

UNIVERSITÄT KONSTANZ

FACHBEREICH BIOLOGIE

**Startstellen der DNA-Replikation und
Bindestellen des „Origin Recognition Complex“
im Humangenom**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

„Doktors der Naturwissenschaften“

(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von

Christian Keller

Konstanz, im Februar 2002

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle zuerst meinen lieben Eltern, Ingeborg und Udo Keller, sowie meiner lieben Großmutter Klara Skubatz danken, ohne die es nur schwer möglich gewesen wäre, den eingeschlagenen Ausbildungsgang zu gehen. Sie haben mich bei all meinen Vorhaben unterstützt und waren stets auf meiner Seite. Um so mehr ist es schmerzlich für mich, dass meine Mutter und meine Großmutter das Ende dieses Abschnittes in meinem Leben nicht mehr miterleben konnten.

Ein Dank geht auch an Beatrice für die entgegengebrachte Liebe und Geduld. Den Großteil dieser Arbeit konnte ich in Ruhe, abgeschieden von Lärm und Ablenkung, bei ihr in der Pfalz anfertigen.

Ein ganz großes Dank geht an Herrn Prof. Rolf Knippers, der mir die Möglichkeit gegeben hat die Dissertation in seinem Labor anzufertigen. Wohl nur wenige Chefs lassen ihren Mitarbeitern so viel Eigenverantwortlichkeit und Gestaltungsfreiheit in Bezug auf die Arbeit. Auch schätzte ich die immer freundliche und angenehme Atmosphäre beim gemeinsamen Umgang und das offene Interesse für die Belange auch außerhalb des Labors.

Herrn Prof. Winfried Boos danke ich für seine Bereitschaft, als Gutachter diese Dissertation zu beurteilen. Ein herzliches Dankeschön an Claudia Gruss und Daniel Schaarschmidt für das Lesen dieser Arbeit und ihre angebrachten Korrekturen.

Thomas Kapitza danke ich für die technische Unterstützung und die vielen schönen Diskussionen bei den gemeinsamen Kaffeepausen. Durch ihn weiß ich jetzt auch, was „High-end“ im eigentlichen Sinne heißt und werde noch lange von den Erfahrungen zehren.

Torsten Krude danke ich für die tolle Kooperation und die produktiven Gespräche. Insbesondere die gemeinsame Treffen auf diversen Konferenzen werden mir immer in Gedächtnis bleiben, sowohl was die Wissenschaft angeht, als auch die gemeinsamen Expeditionen in die Kneipenwelt. Der Arbeitsgruppe Pfeleiderer sei Dank für die Benutzung des Light-Cyclers.

Beate Schumacher, Carmen Eckerich und Frank Fackelmayer danke ich für die vielen lustigen Momente und gute Stimmung im Labor, sowie Marco Findeisen für die Tips zur Berufswahl.

Des weiteren danke ich all meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor, die für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten und wenn nötig mit Rat zur Verfügung standen: Martina Baack, Eva-Maria Ladenburger, Marianne Kirn-Reutter, Ulrich Strausfeld, Claudia Gruss, Ingo Scholten, Tanja Waldmann, Monika Kulartz, Marcel Kremer, Hong-Gang Hu, Ferdinand Kappes, Esther Biermann, Michael Kipp, Roney Graf, Rosemarie Mettke, Sabine Englisch, Sabine Jahr, Sonja Steppan, Catalina Damoc, Nicole Richter, Sandra Kreitz, Ekkehard Hiller, Nikolas Delaroque, Daniela Sahri, Anita Krebs und Erik Carstens.

Konstanz, den 14. Februar 2002

PUBLIKATIONEN

1. Christian Keller, Eva-Maria Ladenburger, Marcel Kremer and Rolf Knippers (2002). **The Origin Recognition Complex marks a Replication Origin in the human *TOP1* Gene Promoter.** Submitted to EMBO Journal, February 2002
2. Christian Keller, Oliver Hyrien, Rolf Knippers and Torsten Krude (2002). **Site-specific and temporally controlled initiation of DNA replication in a human cell-free system.** Submitted to Nucleic Acids Research, February 2002
3. Eva-Maria Ladenburger, Christian Keller and Rolf Knippers (2002). **Identification of a Binding Region for the Human Origin Recognition Complex (ORC) Proteins 1 and 2 that coincides with an Origin of DNA Replication.** Molecular and Cellular Biology, Vol 22, in press
4. Torsten Krude and Christian Keller (2001). **Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle.** Cell. Mol. Life Sci., Vol 58, pp. 001-008
5. Christian Keller and Torsten Krude (2000). **Requirement of Cyclin/Cdk2 and Protein Phosphatase 1 Activity for Chromatin Assembly Factor 1-dependent Chromatin Assembly during DNA Synthesis.** The Journal of Biological Chemistry, Vol 275, pp. 35512-35521

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in den Publikationen Nr. 1 – 3 enthalten.

PRÄSENTATIONEN AUF KONFERENZEN

1. **Christian Keller, Eva-Maria Ladenburger and Rolf Knippers (2000).** *DNA-binding Sites of ORC-proteins in the Human Genome.* Weimar Conference of Genetics, Regulation of Genome Replication and Genome Repair, Conference Book, pp. 86
2. **Christian Keller and Torsten Krude (2000).** *Requirement of Cyclin/Cdk2 and Protein Phosphatase 1 Activity for CAF-1 dependent Chromatin Assembly during DNA Synthesis.* Weimar Conference of Genetics, Regulation of Genome Replication and Genome Repair, Conference Book, pp. 116
3. **Torsten Krude, Dávid Szüts, Christian Keller, Rolf Knippers, Lisa Kitching, Christo Christov (2001).** *Site-specific initiation of DNA replication in a human cell-free system.* Cold Spring Harbor Meeting of Eukaryotic DNA-Replication, Cold Spring Harbor, New York, Conference Book, pp. 116
4. **Christian Keller, Eva-Maria Ladenburger and Rolf Knippers (2001).** *Mapping of replication origins and binding regions of the origin recognition complex in the human genome.* Jahrestagung der Gesellschaft für Genetik, Halle, Book of abstracts, ISSN 0944-6931, Vol 8, pp. 44

ABKÜRZUNGEN

α	Anti, alpha	DNase	Desoxyribonuklease
A	Ampere (Stromstärke)	DOC	Natrium-Deoxycholat
Abb.	Abbildung	dsDNA	Doppelstrang-DNA
ACE	ARS Konsensus Element	EDTA	Ethylendiamin- tetraessigsäure
ARS	Autonom replizierende Sequenz	EtOH	Ethanol
AS	Aminosäure	FACS	Flourescence Activated Cell Sorting
ATP	Adenosin-Triphosphat	FCS	Fetal calf serum, Kälberserum
bp	Basenpaar	g	Erdbeschleunigung
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin	g, mg, μ g	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
CAF	Chromatin Assembly Faktor	GE	Genomische Einheiten
CDC	Cell division cycle	GTP	Guanosin-Triphosphat
CDK	Cyclin-dependent kinase, Cyklin-abhängige Kinase	h	Stunden
cDNA	Komplementär-DNA	h	Human, <i>Homo sapiens</i>
ChIP	Chromatin- Immunpräzipitation	IP	Immunpräzipitation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	IgG	Immunglobulin
CTP	Cytidin-Triphosphat	kbp	Kilo-Basenpaar
Da	Dalton (Molekulargewicht)	kDa	Kilo-Dalton
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>	LB	Luria Bertani
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	LM-PCR	Ligation-Mediated PCR, Ligations-vermittelte PCR
DMSO	Dimethylulaminopurine	l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure	m, cm, nm	Meter, Centimeter, Nanometer

M, mM, μ M	Molar, Millimolar, Mikromolar	RT	Raumtemperatur
		SAF	Scaffold Attachment Factor
MCM	Minchromosome Maintenance	Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MeOH	Methanol	Sp	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
min	Minute		
MNase	Mirococcus Nuklease	SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
NP-40	Nonidet P-40	SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gel
NTP	Nukleotid-Triphosphat	sec	Sekunden
OD	Optische Dichte	ssDNA	Einzelstrang-DNA
ORC	Origin Recognition Complex	SV40	Simian Virus 40
		TBS	Tris-buffered saline
p	Protein	TAE	Tris-acetate
PBS	Phosphate-buffered saline	TE	Tris-EDTA
PCR	Polymerasen-Ketten- Reaktion	TCA	Trichloressigsäure
		TTP	Thmyidin-Triphosphat
RNA	Ribonukleinsäure	V	Volt (Spannung)
RPA	Replikationsprotein A	Xl	<i>Xenopus laevis</i>
rpm	Rounds per minute (Umdrehungszahl)	$^{\circ}$ C	Grad Celsius

INHALTSVERZEICHNIS

KAPITEL 1: EINLEITUNG	13
1.1 Allgemeines zur Genomreplikation	13
1.2 Die DNA-Replikation im Zellzyklus	15
1.3 Startstellen der DNA-Replikation (Origins)	16
1.3.1 Origins in niederen Eukaryonten.....	17
1.3.2 Origins in höheren Eukaryonten.....	18
1.4 Initiationsproteine der DNA-Replikation.....	23
1.4.1 Die Bildung des Prä-Replikationskomplexes	23
1.4.2 Der Origin Recognition Complex (ORC)	26
1.5 Die Initiation der DNA-Replikation in vitro	28
KAPITEL 2: ZIELSETZUNG	31
KAPITEL 3: MATERIAL UND METHODEN	32
3.1 Allgemeines	32
3.2 Zellkultur und Synchronisierung.....	33
3.3 Präparation von Zellkernen und Zellextrakten	34
3.4 Zellfraktionierung.....	35
3.5 SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese und Western-blotting	35
3.6 Proteinfällung nach Wessel und Flügge (1984)	36

3.7 Klonierungstechniken	37
3.7.1 Medien	37
3.7.2 Bakterienstämme.....	37
3.7.3 Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> XL-1 Blue Zellen.....	37
3.7.4 Expressionsvektoren und Herkunft der cDNAs menschlicher ORC-Gene	38
3.7.5 PCR-Amplifizierung und Primer.....	38
3.7.6 Restriktionsverdau und Ligationen.....	39
3.7.7 Sequenzierung.....	40
3.7.8 Plasmid-Präparation und DNA-Aufreinigung.....	40
3.7.9 Transformation von <i>E. coli</i> XL-1 Blue durch Elektroporation	41
3.7.10 TSS-Transformation von <i>E. coli</i> BL21RIL.....	41
3.8 Proteinexpression	42
3.8.1 Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21 RIL Bakterienzellen	42
3.8.2 Herstellung rekombinanter Baculoviren	42
3.8.3 Plaque-Assay	43
3.8.4 Proteinexpression in Insektenzellen	44
3.9 Erzeugung monospezifischer Antikörper	44
3.10 Quantitative Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP-Assay).....	46
3.10.1 Kreuzvernetzung (cross-linking) mit Formaldehyd	46
3.10.2 Isolierung von Nukleoproteinen aus CsCl-Gradienten.....	46
3.10.3 Sonifizierung und Micrococcus Nuklease Verdau	47
3.10.4 Chromatin-Immunpräzipitationen.....	47
3.10.5 Proteinextraktion aus den Immunpräzipitaten	48
3.10.6 DNA-Extraktion aus den Immunpräzipitaten	48
3.11 Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR)	49
3.11.1 Standard-PCR	49
3.11.2 Ligations-vermittelte PCR (LM-PCR).....	49
3.11.3 Quantitative Real-time PCR.....	51
3.11.4 Verwendete Primer	52

3.12 Analyse von ORC-assoziierten DNA-Fragmenten	54
3.12.1 Klonierung	54
3.12.2 Transformation.....	54
3.12.3 Sequenzierung.....	55
3.13 "Nascent DNA strand abundance Assay"	55
3.13.1 Präparation der genomischen DNA	55
3.13.2 Denaturierung.....	56
3.13.3 Ultrazentrifugation und nascent DNA-Isolierung	56
3.13.4 Quantifizierung durch Real-time PCR.....	56
3.14. Nachweis der DNA-Synthese durch den Einbau von ³ H-Thymidin.....	57
3.15 Markierung von replizierender DNA mit halogenierten Nukleotiden	57
3.15.1 Markierung von replizierender DNA in vivo	57
3.15.2 Markierung von replizierender DNA in vitro	58
3.16 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie	58
3.17 2D Gel-Elektrophorese von DNA-Replikationsintermediaten	59
KAPITEL 4: ERGEBNISSE	61
4.1 Spezifische Initiation der DNA-Replikation in einem zellfreien System	61
4.1.1 Die Initiation der DNA-Replikation in vitro.....	61
4.1.2 Die Etablierung von Replikationsfoci in isolierten Zellkernen	64
4.1.3. Initiation der DNA-Replikation in gleichen Chromatindomänen	67
4.2 Sequenzspezifische Initiation der DNA-Replikation in isolierten Zellkernen	72
4.2.1 Der „Nascent Strand Abundance Assay“	72
4.2.2 Quantitative Real-time PCR.....	77
4.2.3 Initiation der DNA-Replikation am Lamin B2 Origin	81
4.2.4 Der rDNA Locus wird nicht in der frühen S-Phase initiiert.....	84
4.3 Charakterisierung humaner Origin Recognition Complex (ORC) Proteine	88

4.3.1 Klonierung der hORC1 - hORC6 cDNAs in Expressionsvektoren	89
4.3.2 De novo Synthese von rekombinaten hORC1 - hORC6 Proteine	92
4.3.3 Herstellung monospezifischer Antikörper gegen die humanen ORC-Proteine .	96
4.4 Intrazelluläre Lokalisierung humaner ORC-Proteine.....	97
4.5 ORC-Proteine co-lokalisieren an gleichen Chromatin-Stellen.....	100
4.5.1 Der Chromatin-Immünpräzipitations-Assay (ChIP-Assay).....	100
4.5.2 Die Kreuzvernetzung von ORC-Proteine an die DNA	104
4.6 Der Origin Recognition Complex co-lokalisiert mit Startstellen der DNA-Replikation	108
4.6.1 Identifizierung einer ORC-Bindestelle im humanen <i>TOP1</i> Genpromotor.....	109
4.6.2 Die ORC-Bindestelle co-lokalisiert mit einer Startstelle der bidirektionalen DNA-Replikation.....	120
4.6.3 ORC bindet an den Lamin B2 Origin.....	123
4.7 Analyse von ORC-assoziierten DNA-Sequenzen.....	125
4.7.1 ORC-assoziierte DNA Sequenzen weisen einen erhöhten GC-Gehalt auf.....	125
4.7.2 Bindung von ORC an heterochromatische alphoid Satelliten-DNA	131
KAPITEL 5: DISKUSSION	136
5.1 Initiation der DNA-Replikation in einem zellfreien System.....	136
5.1.1 Zeitliche und räumliche Koordination der DNA-Replikation.....	136
5.1.2 Die Koordination der Initiation und Sequenzspezifität.....	139
5.1.3 Parallelen zu einem zellfreien System bei <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	141
5.2 ORC-Proteine am Chromatin.....	142
5.2.1 Intrazelluläre Lokalisierung der ORC-Proteine.....	142
5.2.2 ORC-Proteine im Komplex	143
5.3 Bindung von ORC in Promotorbereichen.....	144
5.3.1 Koordination von DNA-Replikation mit der Transkription.....	144

5.3.2 Merkmale des Origins im <i>TOP1</i> Locus	148
5.4 MAR-Elemente und DNA-Replikation	151
5.5 Die Rolle der Chromatinstruktur bei der ORC-Bindung.....	152
5.5.1 ORC-Bindung im spät replizierenden Heterochromatin	152
5.5.2 ORC und Chromatinstruktur	154
KAPITEL 6: ZUSAMMENFASSUNG	156
KAPITEL 7: REFERENZEN.....	158

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1. Replikationsstartstellen (Origins) verschiedener Lebensformen.	21
Abbildung 2. Schrittweise Aktivierung von Origins (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).	25
Abbildung 3. Spezifische Initiation am DHFR Locus nach dem Durchlaufen des ODP in der G1-Phase.	29
Abbildung 4. Arretierung von proliferierenden Hela Zellen in der G1-Phase und Eintritt in die S-Phase.	63
Abbildung 5. Initiation der DNA-Replikation in synchronisierten Zellkernen in vitro und in lebenden Zellen in vivo.	66
Abbildung 6. Die Initiation der DNA-Replikation in vitro co-lokalisiert mit früh replizierten Chromatinbereichen in vivo.	69
Abbildung 7. Die Initiation findet nicht an spät replizierenden Chromatinbereichen statt.	71
Abbildung 8. Identifizierung von Replikationsstartstellen durch den „Nascent Strand Abundance Assay“.	73
Abbildung 9. Der humane Lamin B2 Origin.	75
Abbildung 10. Isolierung von nascent DNA aus Saccharose-Gradienten und PCR- Analyse am Lamin B2 Origin.	76
Abbildung 11. Schmelzkurvenanalyse eines PCR-Produktes nach einem PCR-Lauf im Light-Cycler.	79
Abbildung 12. Das Anfertigen einer Standardkurve als Bezugspunkt zur Quantifizierung von DNA-Templates.	80
Abbildung 13. Sequenzspezifische Initiation der DNA-Replikation am Lamin B2 Origin in vivo und in vitro.	83
Abbildung 14. Initiation der DNA-Replikation am rDNA Locus in der mittleren S-Phase in vivo und in vitro.	86
Abbildung 15. Klonierung der hORC1 - hORC6 cDNAs in Expressionsvektoren.	90
Abbildung 16. Expression von hORC3 und hORC4 in <i>Escherichia coli</i> RIL21 Zellen.	93

Abbildung 17. Expression von hORC1 - hORC6 in Hi5 Insektenzellen.	95
Abbildung 18. Herstellung von monospezifischen Antikörper gegen hORC3 - hORC6...	96
Abbildung 19. Intrazelluläre Lokalisierung humaner ORC-Proteine.	99
Abbildung 20. Flusschema des Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay).	103
Abbildung 21. Spezifität der Kreuzvernetzung.....	105
Abbildung 22. Humane ORC-Proteine sind an identischen Chromatinstellen in vivo lokalisiert.	107
Abbildung 23. Das humane <i>TOP1</i> Gen.....	110
Abbildung 24. Analyse der PCR-Produkte mit den <i>TOP1</i> Primer-Sätzen nach der Quantifizierung im Light-Cycler.	112
Abbildung 25. Der humane Origin Recognition Complex bindet in der <i>TOP1</i> Promotorregion.	114
Abbildung 26. Bestimmte Chromatinbereiche sind resistenter gegenüber der Behandlung mit Micrococcus Nuklease.	117
Abbildung 27. Anreicherung von <i>TOP1</i> Promotor-Sequenzen im hORC2-Präzipitat. .	119
Abbildung 28. Im <i>TOP1</i> Promotorbereich befindet sich eine Startstelle der bidirektionalen DNA-Replikation.....	122
Abbildung 29. Der Origin Recognition Complex bindet am Lamin B2 Origin.	124
Abbildung 30. Klonierung von präzipitierter ORC-DNA in einen Sequenziervektor....	127
Abbildung 31. Analyse der klonierten ORC-Sequenzen durch PCR.....	130
Abbildung 32. Homologien der alphoid Satelliten-DNA mit der ORC1-3 Sequenz.	132
Abbildung 33. ORC bindet an repetitive alphoid Satelliten-DNA in vivo.	134
Abbildung 34. Vergleich der AT-Elemente verschiedener bekannter Origins	149

KAPITEL 1

EINLEITUNG

1.1 Allgemeines zur Genomreplikation

Bei der Zellteilung wird die Erbinformation (DNA) von der Mutterzelle in Form von zwei identischen Kopien auf die beiden Tochterzellen weitergegeben (DNA-Replikation). In höheren Eukaryonten ist dies ein streng kontrollierter Prozess, um zu gewährleisten, dass das Erbgut (Genom) innerhalb eines Zellzykluses für genau ein Mal repliziert wird (Hand, 1978). Der Einleitung (Initiation) der DNA-Replikation wird hierbei eine zentrale Rolle zugeteilt, da sie Ausgangspunkt für die erfolgreiche und präzise Duplikation des gesamten Genoms ist, welches im Falle des Menschen aus ca. 3 Milliarden Basenpaare besteht. Das Prinzip der DNA-Replikation ist bei Pro- und Eukaryonten sehr konserviert. Immer sind es bestimmte Sequenzbereiche der DNA (*cis*-wirkende Faktoren) welche mit Initiationsfaktoren (*trans*-wirkenden Faktoren) interagieren. Das Zusammenspiel bewirkt ein Aufschmelzen der DNA am Startpunkt der Replikation („Origin“) und die Etablierung von Replikons, d.h. von Replikationsstrukturen, an denen die DNA-Replikation eingeleitet wird. Da die DNA-Replikation innerhalb eines zeitlich eng begrenzten Fensters eines Zellzykluses abläuft, ist es leicht nachvollziehbar, dass es viele unabhängige Replikationsstartpunkte im Genom höherer Eukaryonten geben muss, um diesen Vorgang koordiniert ablaufen zu lassen. So schätzt man, dass beim Menschen, etwa 30000 dieser Origins über das Genom verteilt sind (Hamlin and Dijkwel, 1995).

An den biochemischen Apparat, der die DNA-Replikation steuert, werden mehrere Ansprüche gestellt. Erstens muss gewährleistet sein, dass das gesamte Genom innerhalb einer bestimmten Zeit vollständig repliziert wird.

Hierbei ist zu bedenken, dass das Chromatin bei Eukaryonten äußerst heterogen organisiert ist. Man unterscheidet transkriptionsaktive Bereiche, in denen das Chromatin aufgelockert organisiert ist (Euchromatin) von Bereichen mit sehr dicht gepacktem Chromatin (Heterochromatin) (Berezney et al., 2000). Tatsächlich laufen die Initiationsereignisse nicht gleichzeitig, sondern vielmehr in kontrollierter Weise nacheinander ab, wobei das Euchromatin sehr früh, das Heterochromatin dagegen später in der DNA-Synthese-Phase repliziert wird (Berezney et al., 2000). Zweitens muss gewährleistet sein, dass eine Re-Replikation von den selben Chromatinabschnitten während eines Zellzykluses verhindert wird (Coverley and Laskey, 1994). Drittens muss die DNA-Replikation mit anderen zellulären Abläufen, wie z.B. der Transkription oder der DNA-Reparatur koordiniert werden (Gilbert, 2001a). Schließlich besitzen eukaryontische Zellen zellzyklusspezifische Kontrollmechanismen („checkpoints“) um ein Fortlaufen des Zellzykluses z.B. bei Einwirkung von genotoxischen Ereignissen, welche zu einer Beschädigung der DNA führen, gegebenenfalls zu verändern bzw. zu verhindern (Kelly and Brown, 2000).

In den letzten Jahrzehnten hat das Verständnis der biochemischen Ereignisse bei der DNA-Replikation zugenommen. Besonders die Elongation, also die Kettenverlängerung (Polymerisierung) der beiden DNA-Stränge während der Replikation und der daran beteiligten Proteine sind heute sehr gut verstanden. Weniger bekannt sind die Verhältnisse bei der Termination und der Initiation, wobei Letzteres der Bestandteil der Untersuchungen in dieser Arbeit sein wird.

Die Initiation der DNA-Replikation wurde bei Modellsystemen von Eukaryonten, wie den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und dem Frosch *Xenopus laevis* auf molekularer Basis untersucht (Benbow et al., 1992; Bielinsky, 2001; DePamphilis, 1999; Gilbert, 2001a; Mechali, 2001; Stillman, 1989; Todorovic et al., 1999). Trotz der Artunterschiede haben die Untersuchungen gezeigt, dass der generelle Mechanismus der Initiation sehr ähnlich sein muss, da homologe Replikationsproteine in den einzelnen Organismen gefunden wurden. Bei einer genaueren Betrachtung findet man andererseits aber erhebliche Unterschiede, insbesondere zwischen der einzelligen Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und den mehrzelligen Eukaryonten. Allen gemeinsam ist die Existenz von

spezifischen Initiationsfaktoren, welche praktisch in allen untersuchten Organismen mit starker Homologie zueinander vorhanden sind, und auf welche in diesem Kapitel an späterer Stelle genauer eingegangen werden soll.

1.2 Die DNA-Replikation im Zellzyklus

Der eukaryontische Zellzyklus besteht aus vier Phasen, die in einer streng kontrollierter Reihenfolge ablaufen und auf vielfältige Weise, wie zum Beispiel über spezielle Proteinkinasen (u.a. Cyklin-abhängigen Kinasen, CDK), kontrolliert werden (Fantes and Brooks, 1993). Die G1-Phase (G = Gap) dient als Vorbereitung der DNA-Replikation, und stellt die Überbrückungsphase zwischen der Mitose (Zellteilung) und der DNA-Synthesephase (S-Phase) dar. Die DNA-Replikation selbst findet in der S-Phase (S = Synthese) statt (Wuarin and Nurse, 1996). Hier werden Replikationsfaktoren wie zum Beispiel DNA-Polymerasen, DNA-Ligase, DNA-Primasen, oder Nukleotidvorläufer zur Verfügung gestellt, um zu gewährleisten, dass die DNA vollständig repliziert wird. Neben der Replikation der DNA muss aber auch die Verpackung in neue Nukleosomen erfolgen, was durch die Neusynthese von Histon-Proteinen während der S-Phase gewährleistet wird (Krude and Keller, 2001). Nach der S-Phase folgt die G2-Phase, welche in Säugetierzellen als Vorbereitungszeit für die Mitose angesehen wird. Hier wird die Kondensation des Chromatins zu Chromosomen und der Spindelapparat für deren Segregation vorbereitet. Schließlich folgt die eigentliche Zellteilung (Mitose), bei der die DNA zu Chromosomen kondensiert und so, mit Hilfe des Spindelapparates, auf die Tochterzellen weitergegeben wird.

Neue Untersuchungen machen deutlich, dass eine grobe Einteilung des Zellzykluses in vier Phasen nicht die genauen Verhältnisse widerspiegelt (Berezney et al., 2000). Tatsächlich lassen sich die einzelnen Phasen in „Unterphasen“ einteilen, in denen nacheinander Reaktionen ablaufen, um die komplexen zellulären Prozesse im einzelnen zu koordinieren. So wird die Entscheidung für die anstehende Replikation des Genoms in der S-Phase bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der G1-Phase getroffen (TDP, Timing Decision Point) (Dimitrova and Gilbert, 1999; Li et al., 2001). Dieser Zeitpunkt

ist ein Kontrollpunkt, bei dem grundsätzlich festgelegt wird, ob die DNA-Replikation im kommenden Zellzyklus ablaufen soll oder nicht. In der späten G1-Phase gibt es einen weiteren Punkt, der beim Passieren die Spezifität der Initiation der DNA-Replikation festlegt (ODP, Origin Decision Point) (Wu and Gilbert, 1996). Die molekularen Mechanismen, denen diese beiden Stellen in der G1-Phase unterliegen, sind noch unklar (Gilbert, 2001a).

Am Ende der G1-Phase kommt es an den Origins zum Aufbau von Prä-Replikationskomplexen, die aus Initiationsfaktoren (siehe unten) bestehen. In der frühen S-Phase kommt es schließlich zur Aktivierung von „frühen“ Origins in euchromatischen Bereichen. Origins, welche in dem dichter gepackten Heterochromatin lokalisiert sind, werden erst im Verlauf der S-Phase aktiviert („späte“ Origins). Am Ende der S-Phase ist die Replikation des gesamten Genoms schließlich beendet. Befindet sich eine Zelle in der G2-Phase, kann keine neue Runde der DNA-Replikation eingeleitet werden, auch wenn Initiationsfaktoren exogen dazugegeben werden. Der Vollständigkeit halber muss erwähnt werden, dass es in Säugetierzellen eine fünfte Phase gibt (G0-Phase), in der die Zellen keinen Zellzyklus mehr durchlaufen, sondern in der sich in einer Ruhephase befinden.

1.3 Startstellen der DNA-Replikation (Origins)

Startstellen der bidirektionalen DNA-Replikation (Origins) sind durch drei wesentliche Merkmale gekennzeichnet: Erstens befinden sich an diesen Stellen die Ursprünge der kontinuierlichen Vorwärtsstrang- sowie der diskontinuierlichen Rückwärtsstrang-Synthese an der Replikationsgabel. Zweitens sind in diesen Bereichen die Replikationsblasen lokalisiert und drittens sind solche Regionen durch das Auftreten von primären Replikationsprodukten („nascent DNA“) gekennzeichnet. Mehrere Origins (5 – 10) findet man innerhalb von größeren Replikationszonen, und werden dann als „Replikons“ bezeichnet (Berezney et al., 2000). Solche Replikons sind extrem heterogen in ihrer Struktur und Größe. In Zellkernen können Replikons durch Einbau von

markierten Nukleotidvorläufern in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden, und werden dann als Replikationsfoci (engl.: „replication foci“) bezeichnet.

1.3.1 Origins in niederen Eukaryonten

Im vorherigen Kapitel wurde aufgeführt, dass die DNA-Replikation innerhalb der zeitlich begrenzten S-Phase vollständig ablaufen muss. Diese zeitliche Limitation ist beinahe für jeden Organismus gegeben, der einen regulierten Zyklus durchläuft. Die DNA-Replikation wird daher bei sämtlichen Eukaryonten, als auch bei Bakterien und Viren, an spezifischen Stellen, den Origins, eingeleitet. Origin-Sequenzen binden Initiator-Proteine, welche dafür sorgen, dass Replikationsgabeln in der frühen S-Phase etabliert werden. Dies schließt die Entwindung der DNA sowie die Rekrutierung von weiteren Faktoren ein, welche für die bidirektionale Wanderung der Replikationsgabel bzw. für die DNA-Synthese benötigt werden. Die am besten charakterisierten eukaryontischen Origins sind die sogenannten ARS (ARS = Autonomously Replicating Sequences) in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Abb. 1) (Brewer and Fangman, 1987; Heinzl et al., 1991; Newlon, 1996). Der Name leitet sich hierbei von der Fähigkeit dieser Sequenzen ab, die autonome (episomale) Replikation von DNA-Plasmiden zu bewirken (Brewer and Fangman, 1987). Mit Hilfe dieses „ARS-Assays“ gelang die Identifizierung von Sequenzen, die als Origin wirksam sind.

Die ARS sind 100 – 200 bp lang und bestehen aus insgesamt vier Sequenzelementen, die zum Teil sehr konserviert unter den einzelnen ARS sind (Marahrens and Stillman, 1992). Das am meisten konservierte und für die Origin-Funktion wichtigste Element ist das A-Element, welches eine 11 bp lange A/T-reiche Konsensus-Sequenz (ACS = ARS Consensus Sequences; Abb. 1) einschließt (Newlon, 1996). Die weniger konservierten Elemente sind die drei B-Elemente, B1 – B3, welche jedoch für die Origin-Funktion notwendig sind (Marahrens and Stillman, 1992). Das A-Element und das B1-Element dienen zusammen als Bindestelle eines hexameren Initiator-Proteinkomplexes, dem Origin Recognition Complex (ORC) (Diffley and Stillman, 1988; Rowley et al., 1995). Die Bindung des Komplexes findet in *Saccharomyces cerevisiae* spezifisch an ARS-

Sequenzen statt und markiert dadurch den Replikationsorigin. Das B2-Element wirkt höchstwahrscheinlich als ein DNA-Entwindungselement (DUE = DNA Unwinding Element; Abb. 1), um das Aufschmelzen der DNA für die Einleitung der Replikation zu ermöglichen (Rowley et al., 1994). Das B3-Element ist eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Abf1, der die Initiation der DNA-Replikation stimuliert (Diffley and Stillman, 1988). Für die Funktion als Origin ist das A-Element essentiell, während die B-Elemente die Effizienz der Aktivierung steuern (Marahrens and Stillman, 1992).

Obwohl ARS-Sequenzen in regelmäßiger Reihenfolge im Hefegenom vorkommen, werden nur etwa 15% davon benutzt (DePamphilis, 1996). Möglicherweise spielen noch weitere Faktoren, wie zum Beispiel eine bestimmte Chromatinstruktur eine Rolle, um die Funktion von ARS als Origin zu definieren (Melendy and Li, 2001).

Es stellt sich an dieser Stelle die Frage, wie sehr die Spezifität von ARS unter den Eukaryonten verbreitet ist. Schon in der multizellulären Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* sieht die Situation dramatisch anders aus. Auch hier sind mit Hilfe des ARS-Assays Origin-Sequenzen identifiziert worden. Jedoch findet man oft mehrere ARS-Sequenzen tandemartig innerhalb einer 500 – 1000 bp großen Initiationszone angeordnet (Gomez and Antequera, 1999). Auch besitzen diese ARS-Sequenzen zwar ein 20 – 50 bp großes A/T-reiches Element, das wichtig für die Origin-Funktion ist, jedoch lässt sich keine mit der ACS vergleichbare Konsensus-Sequenz feststellen. Die Initiationszonen kommen sehr wahrscheinlich dadurch zustande, dass mehrere klar definierte Origins in proximaler Nähe zueinander angeordnet sind (Abb. 1)(Brewer et al., 1993). Bei der Aktivierung des Origins werden bestimmte Sequenzen bevorzugt, was möglicherweise mit dem Vorkommen distaler Sequenzen oder der Chromatinstruktur zusammenhängt (Newlon, 1996).

1.3.2 Origins in höheren Eukaryonten

Durch das Fehlen von ARS-Sequenzen stellte sich die Identifizierung von Replikationsstartstellen in multizellulären Organismen als sehr schwierig heraus.

In *Xenopus laevis* Eiextrakten und *Drosophila melanogaster* Zellkulturzellen scheint beinahe jede beliebige DNA-Sequenz unspezifisch an verschiedenen Stellen zu

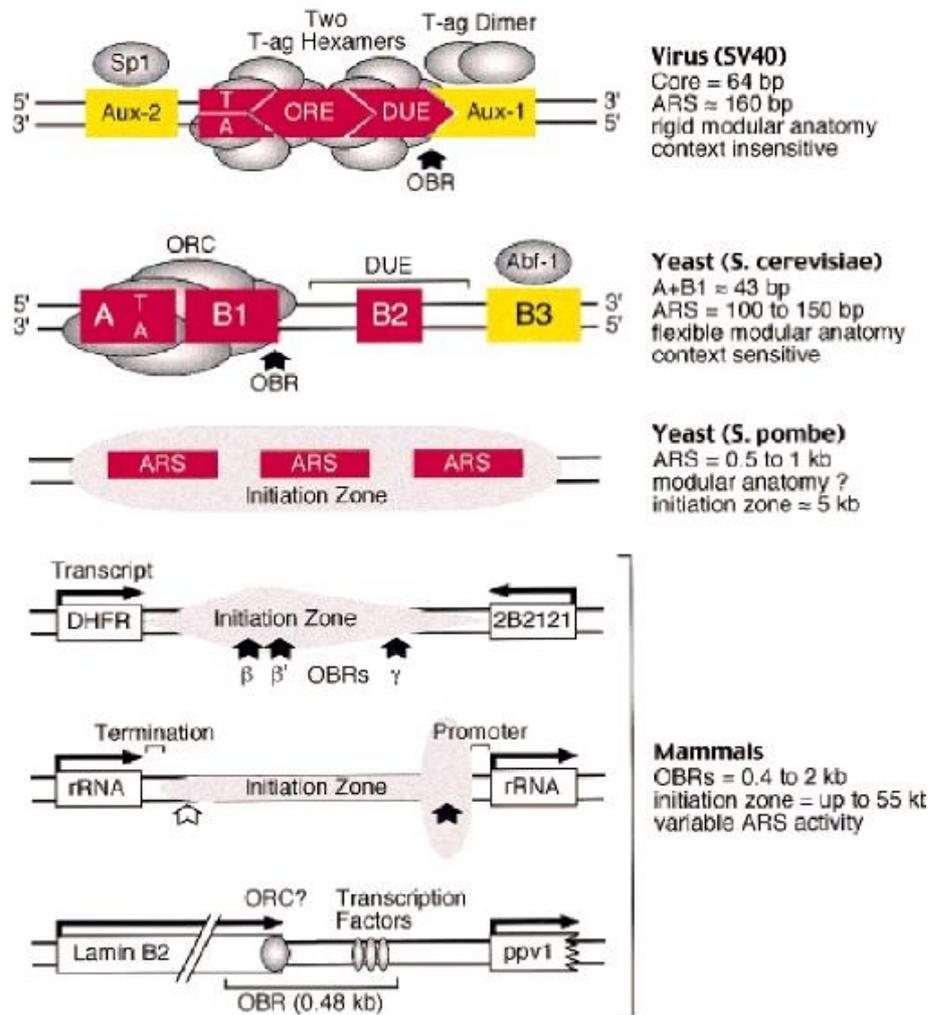
replizieren (Coverley and Laskey, 1994; Gilbert, 1998). So glaubte man für lange Zeit, dass die Initiation der DNA-Replikation in Säugetierzellen unabhängig von *cis*-wirkenden Faktoren, wie einer bestimmten DNA-Sequenz ist. Dieses Bild wurde jedoch durch die Etablierung von modernen Origin-Kartierungsmethoden überarbeitet. Diese schließen zum einen die 2D-Gel-Elektrophorese ein, mit der Replikationszwischenprodukte wie Replikationsgabeln und das Vorhandensein von Replikationsblasen nachgewiesen werden können (DePamphilis, 1993; Dijkwel et al., 1991; Gencheva et al., 1996). Die Replikationszwischenprodukte werden aus den Zellen isoliert, aufgereinigt und in zwei Dimensionen entsprechend der Größe und Masse über Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die Produkte mit radioaktiv markierten Hybridisierungsproben, welche für die Origin-Region spezifisch sind, sichtbar gemacht. Die zweite Methode umfasst die Analyse von neusynthetisierter einzelsträngiger DNA („nascent DNA strands“), welche spezifisch als Folge der DNA-Strangverlängerung an Replikationsblasen der Origins entstehen („Nascent Strand Abundance Assay“) (Giacca et al., 1997; Yoon et al., 1995). Nascent DNA sind primäre Replikationsprodukte mit zunehmender Länge, die nach der Etablierung und als Folge der bidirektionalen Wanderung von Replikationsgabeln, ausgehend von der Initiationsstelle, entstehen. Die Grundidee besteht bei diesem Assay darin, dass Origin-Sequenzen gegenüber Nicht-Origin-Sequenzen bzw. benachbarten Sequenzen in der nascent DNA Präparation angereichert sind. Dadurch ist es zum Beispiel mit quantitativen PCR-Methoden möglich, die Stelle des Origins und damit die Initiationsstelle anhand der Sequenzinformation genau zu kartieren. Hierbei sind bereits die Vor- und Nachteile beider Methoden ersichtlich: Während die 2D-Gel-Elektrophorese eine grobe Kartierung des Origins liefert, müssen beim „Nascent Strand Abundance Assay“ schon recht genaue Sequenz-Informationen über die Lokalisierung des Origins vorliegen, um das Maximum der Anreicherung quantitativ zu erfassen.

Immerhin ist es mit Hilfe dieser beiden Techniken gelungen, ein paar wenige Origins in mehrzelligen Organismen, u.a. auch in menschlichen Zellen zu identifizieren, von denen die wichtigsten hier vorgestellt werden sollen. Der wohl am meisten untersuchte Origin befindet sich innerhalb einer intergenischen Region am 3'-Ende des Dehydrofolatreduktase Gens (*DHFR*) bzw. stromaufwärts des *2BE2121* Genes in CHO

Fibroblasten Zellen (CHO = Chinese Hamster Ovary) (reviewed: (Todorovic et al., 1999)). 2D-Gel-Elektrophoresenmethoden führten hier zu der Identifizierung einer etwa 55 kbp großen Initiationsregion (Abb.1). Die Analyse von nascent DNA mit quantitativen PCR-Methoden, führte zur Identifizierung von drei konkreten Initiationsstellen (ori- β , ori- β' und ori- γ) innerhalb eines 28 kbp großen Locus (zusammengefasst in: (DePamphilis, 1999)). Die zum Teil uneinheitlichen Ergebnisse dieser beiden Methoden bilden Bestandteil zahlreicher Diskussionen (DePamphilis, 1999; Gilbert, 2001a; Mechali, 2001).

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Untersuchungen des Origins im rDNA Locus, welcher aus tandemartig angeordneten 45S rRNA-Transkriptionseinheiten besteht (Abb. 1). Die humanen rRNA Gene werden etwa 400 mal an multiplen Stellen innerhalb eines 31 kbp großen nicht transkribierten Spacers repliziert, welcher die Transkriptions-Einheiten voneinander trennt (siehe Abb. 14A) (Little et al., 1993). Konkrete Initiationsstellen wurden innerhalb einer 10 kbp großen Region stromaufwärts des rRNA Gen Promotors identifiziert (Gencheva et al., 1996; Larner et al., 1999; Yoon et al., 1995).

Das Vorhandensein von präferentiellen Initiationsstellen im Gegensatz zu mehreren Initiationsstellen oder ganzen Initiationszonen ist der am wenigsten verstandene Punkt bei der DNA-Replikation von höheren Eukaryonten. Andererseits wurden viele dieser Ergebnisse in unterschiedlichen Zelllinien mit zum Teil stark in das Zellgeschehen eingreifenden Synchronisierungen erhalten, so dass experimentelle Artefakte und methodisch bedingte Beschränkungen bei diesen Untersuchungen nicht ausgeschlossen sind (Todorovic et al., 1999).


 Abbildung 1. **Replikationsstartstellen (Origins) verschiedener Lebensformen.**

Der „Simian Virus 40“ (SV40; infiziert Affen-Nierenzellen) Origin besteht aus einem Erkennungselement (ORE, Origin Recognition Element), welches für die Bindung des Initiatorproteins T-Antigen benötigt wird, einem DNA-Entwindungselement (DUE, DNA Unwinding Element) und einem A/T-reichen DNA-Abschnitt. Replikationsgabeln entstehen direkt an der Replikationsblase des Origins, von dem sie sich in beide Richtungen (bidirektional) entlang der DNA fortbewegen (OBR, Origin of Bidirectional Replication). Stimulatorische Elemente (Aux = Auxiliary) dienen als Bindestelle eines T-Antigen Dimers bzw. für den Transkriptionsfaktor SP1 und verstärken die Initiation der DNA-Replikation. In der Hefe *S. cerevisiae* wird der Origin (ARS) durch die Bindung des Origin Recognition Complex (ORC) an das A/T-reiche A-Element sowie an das B1-Element markiert. Die Lage des DNA-Entwindungselementes (DUE) und der Initiationsstelle (OBR) sind gekennzeichnet. Das B3-Element dient als Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Abf-1. In der Hefe *S. pombe* sind die ARS größer und bilden oft Initiationszonen, bei denen mehrere ARS-Elemente seriell angeordnet sind. Die Größe der Initiationsstelle von Säuger-Origins

(„mammalian origins“) ist abhängig von der Kartierungsmethode (siehe Text). 2D-Gel-Elektrophorese Methoden kartieren eine breite Initiationszone am 3'-Ende des *DHFR* Locus und in den nicht transkribierten Spacer des rDNA Locus. Starke Origin-Aktivitäten wurden durch häufiges Auftreten von Replikationsblasen identifiziert und sind als dicke schwarze Pfeile dargestellt. Analyse von nascent DNA führte zur Identifizierung von konkreten Initiationsstellen im *DHFR* Locus (ori- β , ori- β' , ori- γ) sowie im Lamin B2 Locus. In der Nähe des Origins befinden sich Bindestellen für diverse Transkriptionsfaktoren. Essentielle Origin-Elemente sind in der Farbe „rot“, stimulatorische Elemente wie Transkriptionsfaktor-Bindestellen in der Farbe „gelb“ dargestellt (aus: DePamphilis, 1999).

Der bis heute am besten untersuchte Origin mit definierten Initiationsstellen ist der Lamin B2 Origin, welcher sich am 3'-Ende des humanen *LMNB2* Gens und einem stromabwärtsliegenden *PPV1* Gen unbekannter Funktion befindet (Biamonti et al., 1992a; Biamonti et al., 1992b; Giacca et al., 1994). Die Initiationsstellen wurden hier sowohl für den Vorwärtsstrang als auch für den Rückwärtsstrang auf das Nukleotid genau bestimmt (Abb. 9)(Abdurashidova et al., 2000). In dieser Region wurde ein Bereich identifiziert, der nach DNaseI Behandlung, mit noch nicht identifizierten Proteinen bedeckt („Footprint“) und zellzyklusspezifischen Schwankungen unterworfen ist (Abdurashidova et al., 1998). In der G₀-Phase ist dieser Footprint nicht detektierbar, in der G₁-Phase bedeckt er einen Bereich von etwa 100 Basenpaaren, welcher sich beim anschließenden Übergang in die S-Phase auf 70 Basenpaare verringert. Solche Footprints sind charakteristisch für die Replikationskomplexe wie sie an den ARS von *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert worden sind. Diese Komplexe bestehen in der G₁-Phase aus Initiationsfaktoren wie ORC, MCM-Proteine oder Cdc6 und sind für die frühen Schritte bei der Initiation notwendig (siehe Kapitel 1.4.1). Der Origin befindet sich innerhalb einer CpG-Insel und besitzt außerdem drei Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. CpG-Inseln sind genomische Regionen von mindestens 300 bp Länge und mit einem überdurchschnittlichen GC-Gehalt, welche bei mehreren Origins bereits gefunden wurde (Antequera and Bird, 1999). Durch Synchronisierungsexperimente wurde gezeigt, dass der Origin sehr früh in der S-Phase aktiviert wird (Biamonti et al., 1992a).

Bisher sind keine spezifische Sequenzelemente identifiziert worden, welche für eine Origin-Aktivität essentiell wären. In einigen Fällen wurde eine Assoziation von nascent DNA mit den Kernstrukturen beobachtet, was zu der Hypothese führte, dass die DNA-Replikation an den sogenannten MAR-Elementen eingeleitet wird (MAR = Matrix

Attachment Region) (Dijkwel and Hamlin, 1988; Dijkwel et al., 1991; Hozak et al., 1993). MAR-Elemente verbinden die chromosomale DNA mit der Kernmatrix, welche hauptsächlich aus einem Ribonukleoprotein Netzwerk besteht (Nickerson, 2001). In erst kürzlich angefertigten Arbeiten wurde berichtet, dass die Initiationsstellen mit den MAR-Elementen co-lokalisieren (Zink et al., 1999). Jedoch gab es auch Berichte, in denen die Initiation unabhängig von der Kernmatrix erfolgte (Berezney et al., 1995; Jack and Eggert, 1992). Weitere Arbeit wird daher notwendig sein, die exakte Rolle der MAR-Elemente sowie der Kernmatrix bei der DNA-Replikation zu klären.

1.4 Initiationsproteine der DNA-Replikation

Bislang wurden die *cis*-wirkenden Faktoren besprochen, die bei der Initiation der DNA-Replikation in höheren Eukaryonten noch viele Fragen aufwerfen. Mehr Erkenntnisse sind bei der Untersuchung der *trans*-wirkenden Faktoren gewonnen worden, welche im Wesentlichen Protein-Initiationsfaktoren sind, die Bestandteil der Replikationskomplexe am Origin sind.

Die Bildung von Prä-Replikationskomplexen an Origin-Sequenzen findet in der G1-Phase des Zellzykluses statt. Im folgenden Kapitel soll der Zusammenbau dieses Komplexes mit seinen Komponenten beschrieben werden und im einzelnen auf die für diese Arbeit relevanten Proteine eingegangen werden. Die meisten der darüber gewonnenen Erkenntnisse wurden in den Modellsystemen bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sowie vom Eiextrakt System des Frosches *Xenopus laevis* gewonnen.

1.4.1 Die Bildung des Prä-Replikationskomplexes

Die Grundkomponente des Prä-Replikationskomplexes ist der Origin Recognition Complex (ORC) welcher in ATP-abhängiger Weise an ARS-Elemente bindet (Bell and Stillman, 1992; Lee and Bell, 1997; Stillman, 1989). Er bildet eine Plattform für die Assoziierung von weiteren Proteinfaktoren an der Replikationsstartstelle und bleibt

vermutlich während des gesamten Zellzykluses am Origin gebunden (Abb. 2). Als nächstes bindet Cdc6 an ORC und vermittelt zusammen mit Cdt1 die weitere Beladung von den MCM-Proteinen (MCM2 – MCM7) (Aparicio et al., 1997; Diffley et al., 1994; Maiorano et al., 2000; Nishitani et al., 2000; Romanowski et al., 1996; Weinreich et al., 1999). Schließlich findet eine Assoziation des Komplexes mit Cdc45 und den DNA-Polymerasen α und ϵ statt, um die DNA-Synthese einzuleiten (Mimura and Takisawa, 1998). DNA-Einzelstrangbereiche werden durch das trimere Replikationsprotein A (RPA) abgedeckt (Treuner et al., 1996).

Die Beladung von Cdc45 und der DNA-Polymerase α kommt durch die Aktivität der Proteinkinase (Cdc7/Dbf4) zustande (Pasero et al., 1999b; Zou and Stillman, 2000). Cdc6 und Cdt1 sind Ladefaktoren für die MCM-Proteine zur Assemblierung auf die Plattform des Origin Recognition Complex. Eine Subpopulation der MCM-Proteine (MCM4 – MCM7) hat sehr wahrscheinlich DNA-Helikasefunktion, auch wenn diese nur für ein sehr kurzes Template mit schwacher Aktivität gezeigt werden konnte (Ishimi, 1997; Ishimi et al., 2000; You et al., 1999). Damit könnten sie bei der frühen Entwindung des DNA-Doppelstranges beteiligt sein.

Cdc45 vermittelt die Assoziierung der DNA-Polymerase α und übernimmt vermutlich noch weitere Aufgaben zusammen mit der MCM-Helikase an der Replikationsgabel (Aparicio et al., 1997). Die Einleitung der DNA-Synthese untersteht hierbei der Regulation der Cdc7/Dbf4 Kinase (Pasero et al., 1999b). In höheren Organismen übernimmt diese Aufgabe vermutlich die Cyklin A/CDK1 und Cyklin E/CDK1 Kinase, welche in der frühen S-Phase aktiv sind (Zou and Stillman, 1998). Die Re-Replikation der DNA wird durch die Aktivität von Proteinkinasen und durch einen neuen Proteinfaktor, Geminin, verhindert (Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000).

Das Cdc6-Protein löst sich am Ende der G1-Phase vom Komplex ab. Beim Eintritt in die S-Phase und nach der Initiation dissoziieren dann auch die MCM-Proteine von dem Komplex. Es wurde auch gezeigt, dass die MCM-Proteine nicht mit frühen Replikationsfoci co-lokalisieren, sondern vielmehr nach angelaufener DNA-Synthese von den Stellen, an denen die DNA-Replikation abläuft, abgelöst werden, was darauf hindeutet, dass die MCM-Helikase keine replikative Helikase ist, sondern vermutlich nur die ersten Schritte der Entwindung durchführt (Krude et al., 1996).

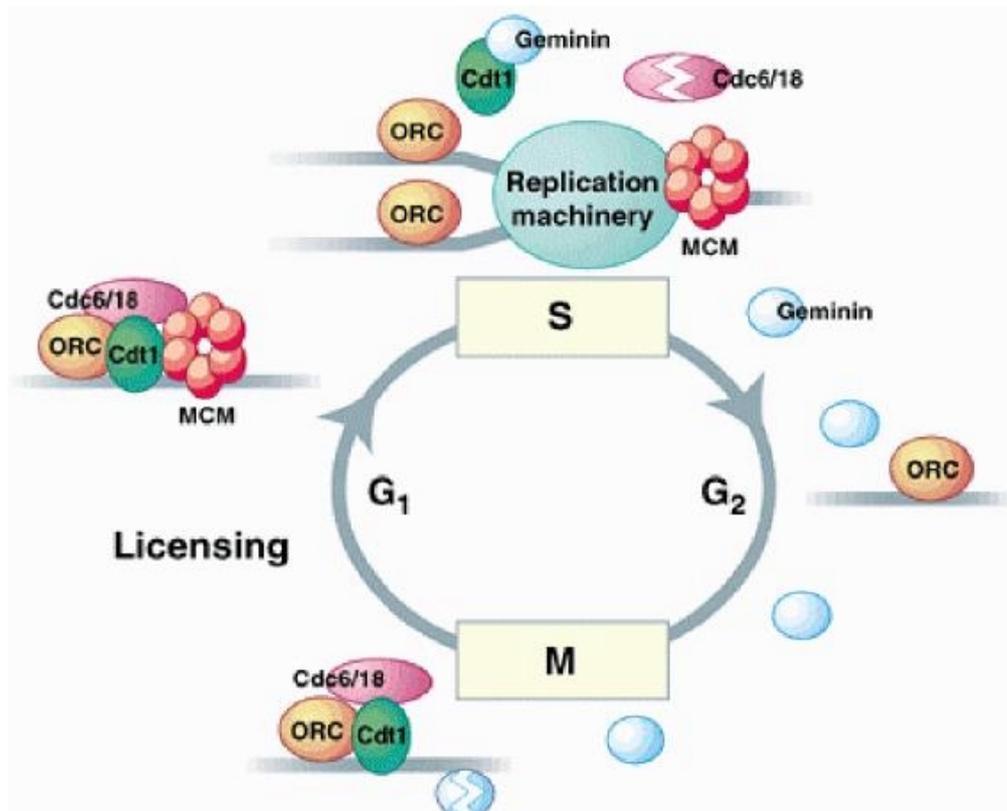


Abbildung 2. **Schrittweise Aktivierung von Origins (*Saccharomyces cerevisiae*).**

Der Origin Recognition Complex (ORC) bleibt während des gesamten Zellzyklus am Origin gebunden. Am Ende der Mitose binden das Cdc6-Protein und Cdt1 an ORC und bilden, nach der erfolgten Assoziation der MCM-Proteine in der G₁-Phase, den Prä-Replikationskomplex. In der S-Phase führt Geminin zum Ablösen von Cdt1. Cdc6 wird abgebaut und es kommt zur Ausbildung von Replikationsstrukturen. Noch während der S-Phase lösen sich die MCM-Proteine vom Komplex. In der darauf folgenden Mitose wird der Inhibitor Geminin abgebaut, so dass ein neuer Replikationszyklus eingeschlagen werden kann.

1.4.2 Der Origin Recognition Complex (ORC)

Der Origin Recognition Complex wurde ursprünglich aus *S. cerevisiae* isoliert und besteht aus sechs heterogenen Untereinheiten, ScORC1 – ScORC6 (Bell and Stillman, 1992). Seine Hauptfunktion besteht darin, an ARS-Elemente zu binden, um dadurch als Plattform für die Rekrutierung weiterer Initiationsfaktoren zu wirken (Dutta and Bell, 1997). Inzwischen wurden auch homologe Proteine in *Schizosaccharomyces pombe* (Moon et al., 1999), *Xenopus laevis* (Romanowski et al., 1996), *Drosophila melanogaster* (Chesnokov et al., 1999) sowie in menschlichen Zellen (Dhar et al., 2001; Vashee et al., 2001) gefunden (zusammengefasst in: (Quintana and Dutta, 1999)). Die ORC-Proteine sind entsprechend ihrer Größen bezeichnet worden (hORC1: 118 kDa, hORC2: 69 kDa, hORC3: 72 kDa, hORC4: 45 kDa, hORC5: 50 kDa, hORC6: 33 kDa).

Die Bindung von ORC ist an den konservierten ARS-Elementen von *Saccharomyces cerevisiae* am besten untersucht worden. Die Bindung benötigt die 11 bp lange ARS-Konsensus-Sequenz (ACS) sowie das B1-Element und erfolgt ATP-abhängig. Die Spezifität der Bindung wird wahrscheinlich durch die ScORC1, ScORC2 und ScORC4 Untereinheiten vermittelt (Lee and Bell, 1997).

In *S. pombe* sind die Origins wie oben erwähnt größer und komplexer organisiert. Jedoch ist ein 20 – 50 bp langes A/T-reiches Element für die ARS-Funktion notwendig (Gomez and Antequera, 1999). Für die SpORC4-Untereinheit wurde gezeigt, dass sie mit dem N-terminalen Ende an ARS-DNA binden kann (Chuang and Kelly, 1999).

In *Drosophila melanogaster* Zellen wurde ORC an vielen Stellen des Chromatins gefunden, jedoch zeigte sich eine Präferenz für die Bindung an Heterochromatin (Pak et al., 1997). Daneben wurde durch Kreuzvernetzungsstudien und Chromatin-Immunpräzipitationen gezeigt, dass DmORC an das Chorin Gen Amplifizierung Element (ACE3), aber auch an eng benachbarte Bereiche bindet (Austin et al., 1999).

Bis heute ist es nicht gelungen, Bindestellen des Origin Recognition Complex in den Genomen höherer Eukaryonten nachzuweisen. Zum einen ist das auf das Fehlen von spezifischen Origin-(Konsensus)-Sequenzen zurückzuführen, zum zweiten auf die methodischen Limitationen, denen solche Untersuchungen ausgesetzt sind.

Die Notwendigkeit des Origin Recognition Complex bei der DNA-Replikation ist anhand von Mutationen in den ORC-Genen untersucht worden. Die Mutationen in den entsprechenden ORC-Genen führen zur Letalität oder zu einer Arretierung des Zellzykluses ohne replizierte DNA (Grallert, 1996). Darüber hinaus haben Immundeletionen von XIORC-Proteinen aus *Xenopus* Eiextrakten gezeigt, dass die Initiation der DNA-Replikation, nicht aber die DNA-Synthese während der Elongation inhibiert wird (Carpenter et al., 1996; Hua and Newport, 1998; Romanowski et al., 1996; Rowles et al., 1996). Der Effekt kann durch Zugabe von rekombinanten ORC-Proteinen wieder aufgehoben werden. XIORC1 und XIORC2 sind auch Substrate für Cyclin-abhängige Kinasen (CyclinA/CDK2, CyclinE/CDK2 und CyclinB/Cdc2). Die Phosphorylierung führt zu einer Dissoziation der Proteine am Chromatin. Diese Kinaseaktivitäten könnten auch die Ablösung von hORC1 während der S-Phase in humanen Zellen bewirken (Kreitz et al., 2001; Mendez and Stillman, 2000; Natale et al., 2000). Jedoch ist nicht klar, wie diese Ergebnisse mit den in den Hefen gefundenen Daten zu vereinbaren sind, da dort ORC in allen Zellzyklusphasen am Chromatin gebunden bleibt (Dillin and Rine, 1998).

Zu den Proteinen welche mit ORC in *S. cerevisiae* interagieren, gehören Cdc6, MCM4 und Cdc7 (Dutta and Bell, 1997). Auch in humanen somatischen Zellen scheinen diese Interaktionen gegeben zu sein (Mendez and Stillman, 2000).

Bisher wurde ORC als essentielle Komponente von Prä-Replikationskomplexen an Origins kennengelernt. Neben der Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation wurden jedoch auch Funktionen von ORC bei der Stilllegung von Genen („transcriptional silencing“), sowie bei der Organisation des Heterochromatins gefunden (Bell et al., 1993; Pak et al., 1997; Triolo and Sternglanz, 1996). Die Repression der Genexpression wird wahrscheinlich von den Sir1-Proteinen vermittelt, welche so das Chromatin zu Heterochromatin verpacken. Ein weiterer Hinweis auf die Funktion von ORC bei der Chromatinorganisation wurde durch die Interaktion mit der Histon-Acetyltransferase (HBO1) nachgewiesen (Iizuka and Stillman, 1999). Die Acetylierung von Histonen könnte die Chromatinstruktur auflockern, um den Initiationsproteinen Zugang zu den Initiationsstellen zu verschaffen.

1.5 Die Initiation der DNA-Replikation in vitro

Um die komplexen biochemischen Ereignisse bei der Initiation der DNA-Replikation auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden zellfreie Replikationssysteme entwickelt, welche es erlauben, die einzelnen Initiationsfaktoren zu untersuchen. Das erste „in vitro“-System leitete sich vom SV40 Origin ab, und führte zu der Identifizierung der ersten essentiellen Initiationsfaktoren (Stillman et al., 1985). Ein weiteres System ist das *Xenopus* Eiextraktsystem, das noch heute wichtige Erkenntnisse über die DNA-Replikation von höheren Eukaryonten liefert (Blow et al., 1987). Die Grundkomponenten dieses Systems sind ein cytosolischer Extrakt, der aus Froscheiern besteht, und ein Membran-freier Kernextrakt. Nach Zugabe von Spermien-DNA oder Plasmid-DNA findet die Replikation der DNA für eine komplette Runde statt. Um die DNA bilden sich aus einzelnen Membran-Bestandteilen kernähnliche Strukturen (Pseudokerne). Die Initiation verläuft allerdings unspezifisch und wird an zufällig ausgewählten Stellen eingeleitet (Coverley and Laskey, 1994). Spezifische Initiationsereignisse findet man am DHFR Origin, wenn die intakten Hamsterzellkerne im cytosolischen Extrakt inkubiert werden (Gilbert et al., 1995). Die Spezifität ist aber streng von dem genauen Zeitpunkt der Präparation der Zellen in der G1-Phase abhängig. Frühe G1-Phase Kerne initiieren an unspezifischen Chromatinregionen. Passieren die Zellen jedoch einen definierten Punkt in der späten G1-Phase (ODP, Origin Decision Point), findet die Initiation spezifisch am ori- β des *DHFR* Locus statt (Abb. 3). Unspezifische Initiationsereignisse wurden auch mit proteinfreier DNA oder permeabilisierten späten G1-Phasen Zellkernen beobachtet (Coverley and Laskey, 1994).

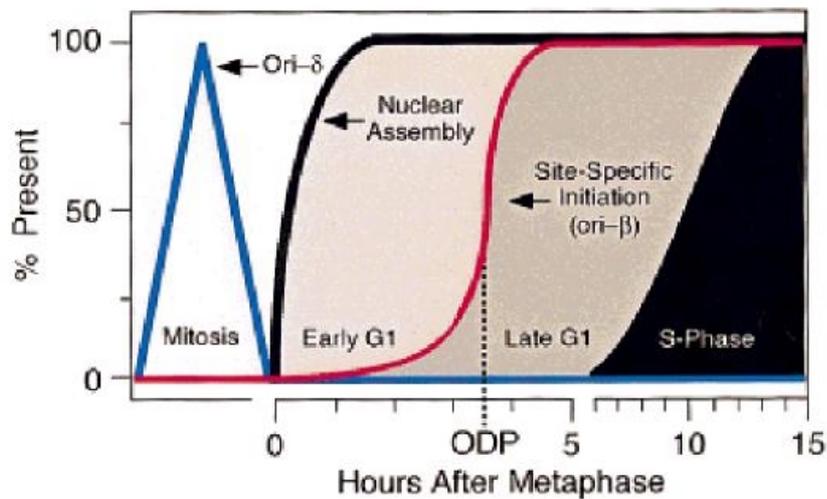


Abbildung 3. Spezifische Initiation am *DHFR* Locus nach dem Durchlaufen des ODP in der G1-Phase.

Werden Hamsterzellkerne in cytosolischen Eiextrakt von *Xenopus laevis* inkubiert, findet die Initiation in frühen G1-Phasen Zellen an zufällig ausgewählten Stellen statt. Ab einem definierten Punkt in der späten G1-Phase (ODP, Origin Decision Point) findet die Initiation spezifisch am ori- β des *DHFR* Locus statt. Interessanterweise wurde auch ein Initiationsereignis am ori- γ in Metaphasenchromosomen beobachtet, das aber während der G1-Phase verschwindet. Die Abbildung zeigt den Anteil der Replikation (in %) während der Zellzyklusphasen. Der Zusammenbau der Kernhülle findet in der frühen G1-Phase statt, die Initiation am ori- β in der späten G1-Phase (aus: DePamphilis, 1999).

In höheren Eukaryonten wurde ein zellfreies System in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Pasero et al., 1999a) sowie beim Menschen (Krude et al., 1997) entwickelt. Das menschliche „in vitro“-System erlaubte es, weitere Faktoren zu identifizieren, die für die Initiation der DNA-Replikation notwendig sind. Hierbei werden Zellkerne von menschlichen späten G1-Phase Zellen isoliert und in cytosolischen Extrakt inkubiert, der aus somatischen S-Phase Zellen präpariert wurde. Alternativ können die Zellkerne auch in Extrakten aus asynchron proliferierenden Zellen inkubiert werden (Krude, 2000). Die Effizienz der Initiation ist abhängig von der Qualität der Zellkerne, welche

aus späten G1-Phasen Zellen präpariert werden müssen. Werden die Zellkerne zu einem früheren Zeitpunkt in der G1-Phase präpariert, verlieren sie die Kompetenz die DNA-Replikation einzuleiten (Stoeber et al., 1998). Das zur Zeit am besten charakterisierte humane zellfreie System benutzt für die Herstellung von späten G1-Phase Kerne die pflanzliche Aminosäure Mimosin. Bei einer Konzentration von 0.5 mM werden die Zellen in der späten G1-Phase arretiert, noch bevor sich Replikationsgabeln etabliert haben und die DNA-Replikation eingeleitet wurde (Krude, 1999). Geringere Konzentrationen von Mimosin führen teilweise zur Neubildung von Replikationsgabeln in den Zellkernen (Krude, 1999). Aus den Mimosin-arretierten Zellen werden die Zellkerne isoliert und in cytosolischen Extrakt inkubiert, was zur spezifischen Initiation der DNA-Replikation, bzw. bei bereits etablierten Replikationsgabeln, zur Elongation der DNA-Replikation führt (Krude, 2000). Mit diesem System konnte bisher gezeigt werden, dass die Initiation von den Aktivitäten der Cyklin-abhängigen Kinasen Cyklin A/CDK1 und Cyklin E/CDK1 abhängt.

Obwohl bereits Erkenntnisse über die wesentlichen Initiationsfaktoren in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* vorliegen, ist der genaue Ablauf der DNA-Replikation in höheren Eukaryonten wie der des Menschen nur sehr wenig bekannt. Insbesondere ist die Frage zu klären, in welchen Regionen die einzelnen Origins im Genom des Menschen lokalisiert sind und welchen Einfluss die Chromatinstruktur auf die Selektion und Aktivierung von Origins ausübt. Auch wird zu prüfen sein, ob und welche Sequenzelemente in den Origin-Regionen für die Initiation notwendig sind.

KAPITEL 2

ZIELSETZUNG

In dieser Arbeit sollen drei wesentliche Teilbereiche der Initiation der DNA-Replikation bearbeitet werden: Im ersten Teil der Arbeit soll mit Hilfe eines zellfreien „in vitro“-Systems die Spezifität der Initiation in isolierten Zellkernen untersucht werden. Im Mittelpunkt dieser Untersuchung wird die Frage sein, ob die DNA-Replikation an spezifischen Origin-Sequenzen eingeleitet wird, oder ob die Initiation an eher zufällig ausgewählten Chromatinbereichen stattfindet. Des Weiteren soll untersucht werden, ob die Aktivierung von Origins während der S-Phase einer zeitlichen Reihenfolge unterworfen ist und ob die Koordination der Aktivierung von einem auf den anderen Zellzyklus weitergegeben wird.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den humanen Origin Recognition Complex (ORC)-Proteinen. Dazu sollen die im Laufe dieser Arbeit identifizierten cDNAs der hORC1 – hORC6 Proteine in pro- und eukaryontische Expressionsvektoren kloniert werden, um die Proteine für die Herstellung von Antikörper sowie für biochemische Untersuchungen rekombinant zu exprimieren. Mit den hergestellten monospezifischen Antikörper sollen die ORC-Proteine in der Zelle näher charakterisiert werden. Insbesondere soll die Lokalisierung der ORC-Proteine in der Zelle, sowie eine mögliche Komplexbildung der Proteine am Chromatin in vivo untersucht werden.

Der dritte Teil der Arbeit behandelt schließlich die Interaktion der ORC-Proteine mit genomischen Sequenzen. Bisher wurde noch keine Bindung des Origin Recognition Complex an humanen Origin-Sequenzen nachgewiesen. Es soll ein modifiziertes Chromatin-Immunpräzipitationsprotokoll in Verbindung mit quantitativer Real-time PCR vorgestellt werden, mit dem ORC-Bindestellen im Humangenom identifiziert werden können.

KAPITEL 3

MATERIAL UND METHODEN

3.1 Allgemeines

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche organischen und anorganischen Chemikalien von den Firmen Promega, Sigma, Serva, Roth, Merck, Fluka, Riedel de Haen und Amersham mit dem angegebenen analytischen Reinheitsgrad bezogen. Die chemischen Symbole entsprechen dem internationalen Standard.

Zellkulturmedien und fötales Kälberserum (FCS) stammten von der Firma Gibco. Die 145 mm Zellkulturplatten wurden von der Firma Greiner bezogen. Die menschlichen Cervix-Karzinom-Zellen Hela-S3 und EJ30 Zellen stammten von Gibco.

DNA-modifizierende Enzyme wie Restriktionsendonukleasen, DNA-Ligasen, DNA-Phosphatasen oder DNA-Polymerasen wurden von den Firmen MBI Fermentas und Biolabs bezogen.

Zur Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen (Sf9 und Hi5) wurde ein Baculovirus-Transfektionskit von der Firma Invitrogen verwendet.

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech im Maßstab 0.01 μmol hergestellt und über HPSF aufgereinigt. Die Standard-PCR Reaktionen wurden in einem Uno-Thermoblock der Firma Biometra durchgeführt.

Für die quantitative Real-time PCR wurde der FastStart DNA Master SYBR Green I Kit von der Firma Roche verwendet. Die Quantifizierungen erfolgten in einem von Roche vertriebenen Light-Cycler Instrument. Die Auswertungen wurden mit Hilfe der Light-Cycler 3.01 Software vorgenommen.

Polyklonale SP1-Antikörper sind von der Firma Santa Cruz Biotechnology Inc. bezogen worden. Die Antikörper gegen p60/CAF sind in Marheineke et al., 1998 beschrieben. Die Antikörper gegen hORC1 und hORC2 sind in Ritzi et al., 1998 beschrieben. Die restlichen in dieser Arbeit verwendeten Antikörper stammten aus eigener Erzeugung.

Standard-Puffer wie PBS, TAE, TBS TE wurden in ihrer Zusammensetzung nach Maniatis et al., 1991 präpariert.

Die konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie wurde in Kooperation mit Torsten Krude, Cambridge, UK, die 2D-Gel-Elektrophorese mit Oliver Hyrien, Paris, und die Expression der ORC-Proteine in Insektenzellen mit Thomas Kapitza, Konstanz, durchgeführt.

3.2 Zellkultur und Synchronisierung

Menschliche HeLa-S3 Zellen wurden als subkonfluente Monolayers auf 145 mm Platten in DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") mit 5% fötalen Kälberserum (FCS) kultiviert. Das Medium enthielt außerdem 40 mg/ml Penicillin (Sigma) und 80 mg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit gehalten. Zur Umsetzung auf andere Platten wurden die Zellen mit 5 mg/ml EDTA-gepufferten Trypsin (Sigma) von der Oberfläche abgelöst.

Zum Arrest in der späten G1-Phase wurden die Zellen für 24 h mit 0.5 mM Mimosin (Sigma) behandelt. Für die Herstellung der Stammlösung wurden 10 mM Mimosin in DMEM/10% FCS bei Raumtemperatur über Nacht gelöst und den einzelnen Platten als 1:20 Verdünnung dazugegeben. Zellen wurden für die Synchronisierung in der frühen S-

Phase für 3 h durch Zugabe von frischem DMEM/10% FCS aus dem Mimosinblock entlassen. EJ30 Zellen wurden in der G₀-Phase in DMEM/0.5% FCS/2.5 µg/ml Amphotericin B (Funigzone, Gibco) arretiert, gewaschen und durch Inkubation in frischem DMEM/10% FCS aus der Ruhephase entlassen. Sämtliche Synchronisierungen wurden durch Durchflußcytometrie von isolierten Zellkernen kontrolliert. Dazu wurden ca. 10⁶ Zellkerne mit 5 µg/ml Propidiumiodid/PBS behandelt und durch FACSan (Becton Dickson) analysiert.

3.3 Präparation von Zellkernen und Zellextrakten

Proliferierende HeLa-S3 Zellen bzw. EJ30 Zellen wurden zweimal in eiskalten hypotonen Puffer (20 mM HEPES, K-HEPES, pH 7.8, 5 mM Kaliumacetat, 0.5 mM MgCl₂, 0.5 mM Dithiothreitol) gewaschen und anschließend für 5 min im hypotonen Puffer inkubiert. Danach wurde der überschüssige Puffer entfernt und die Zellen mit einem Gummischaber vorsichtig von der Platte abgelöst. Die Zellen wurden mit 20 Abwärtsbewegungen eines Mörsers (Wheaton) mechanisch aufgebrochen (Dounce-Homogenisierung) und die Zellkerne durch Zentrifugation bei 600 g (entspricht ca. 2100 rpm/HB4) pelletiert. Die cytosolischen Überstände wurden zum Entfernen von präzipitierten Material ein weiteres Mal bei 20000 g zentrifugiert und die Proteinkonzentration mit dem BioRad Protein Assay anhand einer BSA Standardkurve ermittelt. Zur Herstellung von Kernextrakten wurden die pelletierten Zellkerne in 20 mM K-HEPES, pH 7.8, 0.4 M NaCl, 5 mM Kaliumacetat, 0.5 mM MgCl₂, und 0.5 mM Dithiothreitol aufgenommen und für 45 min bei 4°C und konstanter Bewegung inkubiert. Das unlösliche restliche Kernmaterial wurde durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 min in einer Eppendorf 5415C Zentrifuge entfernt. Die Integrität der Kerne wurde durch Lichtmikroskopie überprüft und deren Konzentration mittels eines Hämocytometers bestimmt.

3.4 Zellfraktionierung

Eine Platte HeLa-S3 Zellen wurde dreimal mit eiskalten hypotonen Puffer (20 mM HEPES, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, pH 7.4) gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber von den Platten abgelöst und in einem Volumen von 5 ml hypotonen Puffer für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Dounce-Homogenisierung (6 x) wurden die Zellen mechanisch aufgebrochen und anschließend nochmals für 15 min auf Eis inkubiert. Der cytosolische Überstand wurde durch Zentrifugation bei 600 g für 5 min von den Zellkernen abgetrennt. Die Kerne wurden in 5 ml N-Puffer (20 mM Hepes, pH 7.8, 20 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 0.5% Nonidet-P40) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Lösliche (nukleosolische) Kernproteine wurden vom Chromatin durch Zentrifugation bei 600 g für 5 min aufgetrennt. Das Pellet wurde in Elutionspuffer (hypotoner Puffer ergänzt mit 250 mM Saccharose) mit 100 mM NaCl resuspendiert und für 25 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in Elutionspuffer mit 250 mM NaCl entsprechend resuspendiert und auf Eis inkubiert. Diese Schritte wurden für das 450 mM Eluat wiederholt. Die nicht eluierbaren Zellmatrix-assoziierte Proteine wurden für 25 min in 1 x RIPA Puffer extrahiert und bei 10000 g für 5 min zentrifugiert. Für die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurden von den einzelnen Überständen bzw. Eluatens jeweils 1/20 auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Volumina wurden durch Extraktion der Proteine mit Methanol/Chloroform (Wessel and Flugge, 1984) eingeengt.

3.5 SDS-Polyacrylamid Gel-Elektrophorese und Western-blotting

Proteinproben wurden durch Zugabe von 4 x SDS-Ladepuffer (250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% Mercaptoethanol, 40% Glycerin, 1% Bromphenolblau) denaturiert und für 5 min bei 85°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf ein den Erfordernissen entsprechend konzentriertes SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen (Laemmli, 1970) und

bei einer Stromstärke von 45 mA für etwa 2 h laufen gelassen. Proteine wurden entweder mit dem Farbstoff Coomassie gefärbt oder für Westernblot Experimente elektrisch auf Nitrozellulose Membranen transferiert. Zum Transfer (1 h) wurde die Semidry-Apparatur von BioRad benutzt. Die Membranen sowie die 3MM-Papiere wurden zuvor in einem Transferpuffer (5.8 g Tris, 2.9 g Glycin, 0.37 g SDS, 200 ml Methanol ad 1l H₂O) inkubiert. Die für das Blotten angelegte Stromstärke richtete sich nach der Membrangröße und ließ sich mit der Formel (Stromstärke in mA = Membranfläche x 0.8) berechnen. Um die Effizienz des Transfers zu kontrollieren, wurden die Membranen mit Ponceau S gefärbt, mit TNT (10 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) entfärbt und für 30 min bei Raumtemperatur mit der Roti-Block Reagenz (Roth) nach Anleitung geblockt. Aufgereinigte primäre monospezifische oder monoklonale Antikörper wurden zu 1:500 - 1:1000 in TNT gelöst. Die Inkubationszeit des primären Antikörpers betrug standardmäßig 1 h. Der spezifische sekundäre Antikörper war mit einer Peroxidase (Horseradish Peroxidase) gekoppelt und wurde in 5% Trockenmilchpulver/TNT 1:50000 verdünnt. Die Membranen wurden mit diesem Antikörper für 1 h inkubiert. Zwischen den Behandlungen wurde die Membran dreimal für 5 min mit TNT gewaschen. Proteine wurden, entsprechend der Anleitung, durch das "ECL Western Blotting System" von Amersham detektiert.

3.6 Proteinfällung nach Wessel und Flügge (1984)

Zum Eingrenzen von Volumina bzw. zur Extraktion von Proteinen aus Zellsuspensionen, wurde ein modifiziertes Protokoll nach Wessel und Flügge (1984) angewendet. Hierbei wurde ein Volumen der Probe mit dem vierfachen Volumen Methanol gemischt. Anschließend wurde ein Volumen Chloroform beigefügt, gemischt und schließlich das dreifache Volumen Wasser zugesetzt. Das Gemisch wurde für 5 min bei 12000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Interphase verworfen und durch das dreifache Volumen Methanol ergänzt. Schließlich wurden die Proteine bei 14000 rpm für 5 min pelletiert. Die Pellets wurden

für 5 min luftgetrocknet und für die Gel-Elektrophorese in 20 µl Lämmli-Ladepuffer aufgenommen.

3.7 Klonierungstechniken

3.7.1 Medien

Folgende Standardmedien wurden für die Kultivierung der Bakterienkulturen verwendet: LB-Medium (Luria-Bertani Medium), NZYM-Medium und SOC-Medium (Zusammensetzung siehe Maniatis et al., 1991). Die Agarplatten enthielten neben dem LB-Medium zusätzlich 15 g Agar. Alle Medien wurden nach der Herstellung sterilisiert. Antibiotika wurden, entsprechend den Selektionsmarker, in folgenden Endkonzentrationen zugestetzt: Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (70 µg/ml) und Chloramphenicol (30 µg/ml). Die Stammlösungen (1000 x konzentriert) wurden nach Maniatis et al., 1991 angefertigt.

3.7.2 Bakterienstämme

DNA wurde in elektropotenten *Escherichia coli* XL-1 Blue Stämmen (*recA1 endA1 gyr96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI^qZΔM15 TN10(Tet^R)*]) amplifiziert. Die Expression von hORC3-His und hORC4-His wurden im *E. coli* BL21RIL Stamm durchgeführt. Beide Bakterienstämme sind in 10% Glycerin/LB bei minus 70°C gelagert worden und wurden vor der Benutzung auf Eis aufgetaut.

3.7.3 Herstellung elektrokompenter *E. coli* XL-1 Blue Zellen

Es wurden 50 ml LB-Medium (ergänzt mit 12.5 µg/ml Tetracyclin) mit Zellen von einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler wachsen gelassen. Etwa 10 ml dieser Übernachtskultur wurden in 1 l vorgewärmten LB-Medium überimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD₅₇₈ = 0.75 wachsen gelassen. Dann wurden die Bakterien für 15 min bei 2600 g bei 4°C zentrifugiert und das Pellet zweimal mit kaltem 10% Glycerin gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift

wurden die Bakterien erneut zentrifugiert und mit 10% Glycerin auf eine $OD_{578} = 200 - 250/ml$ eingestellt. Die Bakterien wurden in einzelne Aliquote zu je 70 μl mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei minus 70°C gelagert.

3.7.4 Expressionsvektoren und Herkunft der cDNAs menschlicher ORC-Gene

Für die bakterielle Expression von hORC3-His und hORC4-His wurde der prokaryontische Expressionsvektor pRSETA (Invitrogen) verwendet. Für die Transfektion von Baculoviren wurden die cDNAs von hORC1, hORC2, hORC3, hORC4, hORC5 und hORC6 in das offene Leseraster des Expressionsvektors pBlueBac-His2 (Invitrogen) kloniert. Die cDNAs von hORC1 (in pBlueScript, kloniert mit *BamHI/HindIII*) und hORC2 (in pBlueScript, kloniert mit *BglII/NcoI*) stammen ursprünglich von Kim Gavin, die cDNAs von hORC4 (in pBlueScript-KS, kloniert mit *XhoI/XbaI*) und hORC5 (in pBlueScript-SK, kloniert mit *EcoR/XhoI*) stammen aus dem Labor von Anindya Dutta, Boston. Die Sequenzen für hORC3 und hORC6 wurde aus einer Hela cDNA-Bibliothek mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die cDNA-Bibliothek für die Klonierung von hORC3 wurde mit Hilfe des Vektors (Pharmacia) hergestellt und stammt von Aloys Schepers, München.

3.7.5 PCR-Amplifizierung und Primer

Alle für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide (Primer) stammen von der Firma MWG Biotech und wurden über HPSF-Reinigung bei einem Maßstab von 0.01 μmol hergestellt. Die Oligonukleotide wurden zu 100 pmol/ μl in TE gelöst und bei minus 20°C gelagert. Die cDNAs für hORC3 und hORC6 wurden von Hela cDNA-Bibliotheken hergestellt. Die cDNA für hORC4 wurde aus dem Vektor pBlueScript-KS amplifiziert.

Da die ersten 30 bp der cDNA von hORC3 im pT7T3-Pac Vektor fehlten, wurde ein Primer entworfen dessen Basenabfolge für die fehlenden 10 Aminosäuren codieren. Alle Primer enthalten die Erkennungssequenzen der jeweiligen für die Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen (in Fettdruck; siehe Tabelle 2 im Kapitel 4.3.1):

ORC3-forward (BamHI):	5'- GCGCGGATCCATGGCTACGTCCTCGATGTCT AAGGGTTGCTTTGTTTTAAAGCCAAACTCC - 3'
ORC3-reverse (KpnI):	5' - GTAAATATGACTGGTACCCTTTTCTC - 3'
hORC6-forward (XhoI):	5'- GAATTGCTCGAGTTAGTGCCGGCGCCATGGGGTC - 3'
hORC6-reverse (HindIII):	5'- CAGTTTGAAGCTTAATCACTCTGCTGTAGCCTT- 3'
hORC4-forward (XhoI):	5'- GCTGGGTACGGGGCCCCCCTCGAGGATCC - 3'
hORC4-reverse (KpnI):	5'- GCTCCACCGCGGTACCGGCCGCTCTAG - 3'

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl angesetzt und enthielten je 10 mM der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP sowie jeweils 25 pmol des stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Primers. Die Reaktionen enthielten ca. 50 ng template DNA und wurden durch Zugabe von 3 units Pfu DNA-Polymerase (Promega) gestartet. Das PCR-Programm bestand, nach einer einführenden 4 min langen Denaturierungsphase bei 94°C, aus 30 Zyklen bei 94°C für 1 min (Denaturierung), 55°C für 1 min (Annealing) und 3 min bei 72°C (Elongation). Schließlich folgte im Anschluß eine Synthesephase von 10 min bei 72°C. Alle PCR-Produkte wurden zur Kontrolle auf ein Agarose-Gel aufgetragen und durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.7.6 Restriktionsverdau und Ligationen

Alle benutzten Enzyme und Puffer stammten, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Biolabs und MBI Fermentas. Das Spalten der DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen richtete sich nach den empfohlenen Reaktionsbedingungen des Herstellers. Verdau von DNA welche für die Klonierungen verwendet werden sollten, wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Analytische Kontrollverdau zur Auftragung auf ein Agarose-Gel wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Verdau mit mehreren Restriktionsendonukleasen wurden seriell durchgeführt. Zum Entfernen von Salzresten zwischen den Verdau wurde die DNA in Anwesenheit von 0.5 M Natriumacetat mit 99% Ethanol präzipitiert und das Pellet sorgfältig mit 70%

Ethanol gewaschen. Die Vektor-DNA wurde mit 1 unit Alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) für 1 h bei 37°C dephosphoriert. Die Ligationsreaktionen wurden bei 15°C über Nacht in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und enthielten 1 unit T4 DNA-Ligase bei einer Menge von 0.5 - 1 µg DNA.

3.7.7 Sequenzierung

Sämtliche Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG in Konstanz durchgeführt. Für die Sequenzierung der Inserts im pRSET Vektor wurde der pT7-F Primer, für die Sequenzierung der Inserts im pBlueBac-His2 Vektor der pBac-Pac Primer verwendet. Die Sequenzen wurden als komprimierte ABI- oder ZIP-Traces zur Verfügung gestellt.

3.7.8 Plasmid-Präparation und DNA-Aufreinigung

Sämtliche DNAs für die Klonierungen wurden entsprechend der Anleitung mit einem von Pharmacia stammenden Gel-Extraktions-Kit aufgereinigt (Genauere Bezeichnung: "DNA and Gel Band Purification Kit"). Plasmid-Präparationen, welche einen hohen Reinheitsgrad erfordern haben (z.B. für die Sequenzierung, Transfektion), wurden mit Hilfe von Quiagen Plasmid-Aufreinigungskits (Miniprep, Midiprep) durchgeführt.

Alternativ wurde die Plasmid-DNA aus Bakterienzellen durch alkalische Lyse isoliert. Hierzu wurden transformierte *E. coli* XL-1 Blue Zellen über Nacht in 1 ml LB-Medium (ergänzt mit 100 µg/ml Ampicillin) bei 37°C unter leichtem Schütteln wachsen gelassen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 3000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge für 5 min pelletiert und in 100 µl GET Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA) resuspendiert. Anschließend wurde 200 µl alkalisches SDS (0.2 N NaOH, 1% SDS) hinzugefügt und die gesamte Suspension sechsmal durch Invertieren gemischt. Dann wurden 150 µl einer Salzlösung (3 M Kaliumacetat, 1.8 M Essigsäure) beigemischt, erneut gemischt und der Ansatz bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 900 µl Ethanol für 30 min bei minus 20°C präzipitiert und durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min pelletiert. Das

DNA-Pellet wurde trocken gelassen, in 50 µl TE gelöst und mit 20 units RNase für 1 h bei 37°C behandelt.

3.7.9 Transformation von *E. coli* XL-1 Blue durch Elektroporation

Elektropotente *E. coli* XL-1 Blue Zellen (70 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 1/10 des Ligationsansatzes vermischt und in gekühlten Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation wurde mit einem BioRad Pulser für 4-5 Millisekunden und einem elektrischen Feld von 12.5 kV/cm durchgeführt. Nach der Transformation wurden die Zellen in 1 ml vorgewärmten NZYM-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen pelletiert (3000 rpm, 5 min, Eppendorf Tischzentrifuge) und auf Agarplatten (ergänzt mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die TransformationsEffizienz lag bei durchschnittlich etwa $2\text{-}5 \times 10^9$ Kolonien/µg DNA.

3.7.10 TSS-Transformation von *E. coli* BL21RIL

Für die TSS-Transformation wurden die Bakterien in 10 ml LB-Medium (ergänzt mit 30 µg/ml Chloramphenicol) angeimpft und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Von dieser Kultur wurden 100 µl zum Animpfen von 10 ml frischem LB-Medium/Chloramphenicol abgenommen und die Bakterien bis zu einer $OD_{578} = 0.6$ wachsen gelassen. Die Zellen wurden für 5 min bei 3000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert und auf Eis in 0.5 ml LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde mit 0.45 ml 2 x TSS (kalt) und 50 µl DMSO ergänzt. Etwa 200 µl der Zellsuspension wurden zur Transformation mit ca. 200 ng DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 30 min auf eine Temperatur von 37°C vorgewärmt und auf Agarplatten (ergänzt mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol) bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.8 Proteinexpression

3.8.1 Proteinexpression in *E. coli* BL21 RIL Bakterienzellen

Eine Einzelkolonie wurde in 400 ml LB-Medium (ergänzt mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol) angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{578} = 0.4 - 0.8$ wachsen gelassen. Die Proteinsynthese wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Löslich exprimierte Proteine wurden von den unlöslichen Proteinen („Inclusion Bodies“) durch Aufnahme in 10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.2% Triton X-100 und anschliessendem Einfrieren über Nacht geteilt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Sonifizieren aufgebrochen und nach einer Zentrifugation bei 15000 rpm für 10 min (SS34) in 1 M NaCl/H₂O resuspendiert. Die Suspension wurde erneut sonifiziert und auf Eppendorf-Gefäße aufgeteilt. Die unlöslichen Proteine wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min pelletiert. Diese „Inclusion Bodies“ wurden mehrmals mit 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 M NaCl, 5% Triton X-100 gewaschen und bei Bedarf erneut sonifiziert. Zum Schluß wurden die Pellets zweimal in H₂O gewaschen. Zur Analyse auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel wurden die Proteine in Laemmli Puffer aufgenommen. Für die Immunisierung von Kanninchen zur Herstellung monospezifischer Antikörper wurden die „Inclusion Bodies“ in 500 µl 0.5%SDS/H₂O resuspendiert.

3.8.2 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Für die Transfektion wurde der „Bac-N-Blue Transfection Kit“ von der Firma Invitrogen verwendet. Der Kit beinhaltet linearisierte AcMNPV DNA für die Produktion von mehr als 90% rekombinanten Viren sowie „Insectin-Plus“ welches für eine effiziente, durch Liposomen vermittelte Transfektion von Insektenzellen notwendig ist. Rekombinante Plaques haben sich durch Blaufärbung auf X-Gal Platten detektieren lassen. Für die Transfektion wurden 0.5 µg virale DNA (Bac-N-Blue DNA) mit 4 µg des pBlueBac-His2 Vektors, sowie 1 ml Grace´s Insektenzellmedium (ohne FCS) und 20 µl der Insectin-Plus Liposomen für 10 sec auf dem Vortexer gemischt. Der Ansatz wurde für 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde von den 60 mm Platten mit den darauf wachsenden Sf9 Insektenzellen das Medium entfernt und 2 ml eines frischen Grace's Insektenzellmedium (ohne Zusätze) dazugegeben, um die Platten vollständig von Serumresten zu befreien. Schließlich wurde zu dieser Platte der Transfektionsansatz transferiert und gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden anschliessend unter langsamen Bewegungen für 4 h bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplattform (2 x Schwenken/min) inkubiert. Danach wurden 1 ml des Grace's Insektenzellmedium (ergänzt mit 10% FCS, 10 µg/ml Gentamycin) zu den Platten gegeben und diese für mindestens 72 h bei 27°C inkubiert. Nach 72 h wurden 2 ml des Mediums von jeder Platte zum Anlegen des Virenstocks abgenommen. Die verbleibenden Zellen auf der Platte wurden weitere 2 Tage in frischem Medium inkubiert und danach sind erneut die Überstände abgenommen worden. Die Transfektion wurde anhand der Zellmorphologie der infizierten Zellen durch Lichtmikroskopie kontrolliert. Hierbei liessen sich drei Stadien der Baculovirusinfektion nachweisen: Eine frühe Phase, in welcher der Durchmesser der Zelle sowie des Zellkerns signifikant zugenommen haben, die späte Phase, in welcher die Zellen sichtbar mit Granula (Occlusion bodies) gefüllt sind, sowie eine sehr späte Phase, bei der die Zellen zum Teil lysiert vorlagen.

3.8.3 Plaqué-Assay

Der Plaqué-Assay wurde unter Anwendung des Farbstoffes X-Gal durchgeführt welcher in Konzentration von 150 µg/ml zu dem Insektenzellmedium gegeben wurde. Etwa 5×10^6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen der Virusüberstände (1:100, 1:1000, 1:10000) infiziert. Hierzu wurden die Zellen auf 100 mm Platten vorbereitet indem sie zuerst für 10 min bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplattform inkubiert worden sind. Anschließend wurden die Platten für weitere 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um eine Assoziation der Zellen mit der Plattenoberfläche zu gewährleisten. Die Zellplatten wurden schließlich mit 1 ml der einzelnen Virusverdünnungen bei einem Gesamtvolumen von 5 ml infiziert und für 1 h bei Raumtemperatur auf einer Schwenkplattform inkubiert. Das Medium wurde entfernt

und die Platten mit 5 ml des flüssig-warmen Agarose-Medium-Mixes (Insektenzellmedium, 2.5% Agarose, auf 47°C erhitzt) bedeckt. Die Platten wurden dann für 5 - 6 Tage bei 27°C inkubiert. Rekombinante Viren haben sich durch Blaufärbung des Plaques nachweisen lassen.

3.8.4 Proteinexpression in Insektenzellen

Etwa 1×10^8 Hi5 Zellen (Ellen Fanning Labor) wurden in 225 cm² Flaschen kultiviert. Das Insektenmedium wurde entfernt und durch 35 ml frisches Medium (ergänzt mit 10% FCS) ersetzt. Anschließend wurden 1 ml des Virusüberstandes hinzugefügt und die Zellen für 48 h nach der Infektion bei 27°C inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet, mit Medium von den Platten abgelöst und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Um Serumreste zu entfernen, wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in Lyse Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM β-Mercaptoethanol, 0.5% NP-40) für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden bei 10000g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand über eine Ni-Agarose Säule aufgereinigt. Der Ansatz wurde schließlich jeweils einmal mit Lyse Puffer/1 M NaCl und Lyse Puffer gewaschen und mit Lyse Puffer/250 mM Imidazol eluiert. Das Eluat wurde über Nacht gegen PBS dialysiert.

3.9 Erzeugung monospezifischer Antikörper

Die Immunisierung der Kanninchen fand an der Tierforschungsanlage der Universität Konstanz (TFA) statt. Dazu wurden die in 500 µl 0.5% SDS/H₂O gelösten Proteine mit 500 µl RAS-Adjuvans gemischt und einem Kanninchen im Abstand von 3 Wochen subkutan gespritzt. Die Antikörperkonzentration in den Seren wurde 10-14 Tage nach dem Spritzen durch Westernblot Experimente mit Hela Kernextrakten und rekombinanten Proteinen untersucht. Hierzu wurden die Seren in 5% Trockenmilch/TNT zu 1:500 - 1:2000 verdünnt. Die Antikörper wurden über Affinitäts-

Säulenchromatographie aufgereinigt. Hierzu wurden das Antigen entweder an CnBr-aktivierte Sepharose oder alternativ an Sulfolink-Material (siehe Anleitung) gekoppelt. Zur Kopplung an CnBr-aktivierte Sepharose wurden ca. 0.3 ng der Substanz für 15 min in 10 ml 1 mM HCl quellen gelassen. Anschließend wurde die CnBr-aktivierte Sepharose mehrmals mit 1 mM HCl sowie mit Kopplungspuffer (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3, ergänzt mit 0.5% SDS) gewaschen. Das in 0.5%SDS/H₂O gelöste Antigen wurde in 5 - 8 ml Kopplungspuffer/0.5% SDS aufgenommen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Beim Auftreten von Flockenbildung wurde die Kopplung sofort durch Zugabe von 0.2 M Glycin, pH 8 für 1 – 2 h auf Eis abgestoppt. Der Puffer wurde gewechselt und das Material erneut mit 0.2 M Glycin , pH 8 über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurde das Material in eine BioRad Säule überführt und dreimal abwechselnd mit Kopplungspuffer und Acetatpuffer (0.1 M Natrimacetat, 0.5 M NaCl, pH 4) gewaschen. Zur Antikörperaufreinigung wurde die Säule zweimal mit PBS gewaschen und die Seren mit 10 x konzentriertem PBS auf 1 x PBS verdünnt. Die Seren wurden für eine halbe Stunde in PBS auf Eis inkubiert und anschliessend bei 12500 rpm für 10 min einem GSA-Rotor zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit dem Serumüberstand geladen, und mit 20 Säulenvolumen 2 x PBS gewaschen. Die Antikörper wurden mit 1 ml 0.1 M Glycin, pH 2.3 (HCl) 4 - 6 Mal von der Säule eluiert. Die Eluate wurden mit 250 µl 1 M Tris-HCl, pH 9 auf einen physiologischen pH gebracht. Die Fraktionen wurden durch Auftropfen von 3 µl des Eluates auf 3MM-Papier und anschliessender Färbung mit Coomassie Farbstoff auf ihren Proteingehalt getestet. Jede Säule wurde ca. 3 - 4 Mal mit dem gleichen Serum geladen. Die Eluate wurden schließlich gegen 1 x PBS in einem Volumen von 5 l über Nacht dialysiert. Die Antikörperkonzentration wurde durch Messen der OD₂₈₀ bestimmt. Die Säulen wurden zur weiteren Verwendung in 2 x PBS/0.05% NaN₃ im Kühlschrank aufbewahrt.

3.10 Quantitative Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP-Assay)

3.10.1 Kreuzvernetzung (cross-linking) mit Formaldehyd

Etwa 1×10^8 asynchron proliferierende HeLa oder CHO Zellen wurden auf 145 mm Platten zweimal mit warmen PBS gewaschen. Die Kreuzvernetzung von Proteinen und DNA wurde durch Zugabe von 1% Formaldehyd (Merck) zu den Zellplatten gestartet. Das Formaldehyd wurde dazu in warmen DMEM (ohne Zusatz von FCS) verdünnt. Die Zellplatten wurden entsprechend den angegebenen Kreuzvernetzungszeiten (Standard: 4 min) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es wurden jeweils 3 Platten gleichzeitig präpariert. Die Zellen wurden nach der Inkubation dreimal mit kaltem PBS gewaschen, um restliches Formaldehyd von den Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen von je vier Platten mit einem Gummischaber abgekratzt, gepoolt und zweimal in kaltem PBS gewaschen. Sämtliche Zentrifugationsschritte fanden bei 2100 rpm für 5 min bei 4°C in einem HB4-Rotor statt. Zur Lyse wurden die Zellen in 5 ml hypotonen RSB Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 3 mM MgCl₂, 10 mM Na₂S₂O₅, pH 8) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Dounce-Homogenisierung (15 x) mechanisch aufgebrochen. Die dadurch gewonnen Zellkerne wurden pelletiert und zweimal in RSB Puffer gewaschen. Um nichtkruzvernetzte Proteine vom Chromatin zu entfernen, wurden die Zellkerne in dem Hochsalzpuffer SNSB (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 M NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA, 10 mM Na₂S₂O₅, pH 8) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurde das Chromatin in einem physiologischen NSB Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA, 10 mM Na₂S₂O₅, pH 8) zur Beladung auf die CsCl-Gradienten aufgenommen.

3.10.2 Isolierung von Nukleoproteinen aus CsCl-Gradienten

Die Stufen-Gradienten wurden in SW40-Zentrifugationsröhrchen hergestellt und bestanden aus drei Konzentrationen des CsCl-Salzes welche exakt mit einem

Refraktometer anhand des jeweiligen Brechungsindex (n) eingestellt worden ist. Die einzelnen Werte betragen im einzelnen (von oben nach unten): 1.3 mg/ml ($n = 1.3625$), 1.5 mg/ml ($n = 1.383$) und 1.75 g/ml ($n = 1.404$). Das CsCl-Salz wurde in einem Gradientenpuffer (0.5% Sarkosyl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8) gelöst. Die Ultrazentrifugation wurde bei 37000 rpm, 18°C für 24 h durchgeführt. Die dichte Nukleoproteinfraktion wurde aus den Zentrifugationsröhrchen isoliert, in Dialyseschläuche überführt und über Nacht bei zweimaligen Pufferwechsel gegen 5 l TE/Na₂S₂O₅ zur Entfernung des CsCl-Salzes dialysiert. Zum Lösen der Nukleoproteine und zur Fragmentierung des Chromatins wurden die Nukleoproteinkomplexe zehnmal mit 10 kurzen Ultraschall-Impulsen auf Eis sonifiziert (ca. 70 - 100 mV, Verstärkung 5). Anschließend wurde die Konzentration der Nukleoproteine durch Messung der OD₂₆₀ bestimmt und auf 2 µg/µl in einem Volumen von 500 µl mit TE eingestellt.

3.10.3 Sonifizierung und Micrococcus Nuklease Verdau

Zur weiteren Fragmentierung (< 1kbp) wurden die Nukleoproteine mit 10 U/mg Micrococcus Nuklease (MBI Fermentas) durch Zusatz von 3 mM CaCl₂ und 10 mM Na₂S₂O₅, pH 8 für 15 min bei 37°C verdaut. Die Benutzung von Endonukleasen anderer Hersteller erbrachte wesentlich schlechtere Ergebnisse, da bei der Herstellung der Enzyme auch signifikante Menge an Proteasen mitgereinigt wurden, welche zum Teil die Zielproteine degradiert haben. Die Reaktionen wurden durch Zusatz von 20 mM EDTA gestoppt. Zur DNA-Aufreinigung wurden dem Ansatz 0.5% SDS sowie 200 µg/ml Protein Ase K (Roth) zugesetzt und das Reaktionsgefäß bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Größe der unverdauten und verdauten DNA wurde auf einem 1% Agarose-Gel durch Gel-Elektrophorese und anschließender Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht kontrolliert.

3.10.4 Chromatin-Immunpräzipitationen

Die Immunpräzipitationen wurden in 1 x NET Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40) durch Zugabe einer 11 x konzentrierten NET Lösung

zu den Ansätzen durchgeführt. Anschliessend wurden ausgefallene, größere Nukleoproteinfragmente durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min in einer Eppendorf Tischzentrifuge entfernt. Zu den Überständen wurden 10 µg monospezifische Antikörper hinzugefügt und für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Die Bindung der Antikörper erfolgte durch Zugabe von 50 µl einer 50%-igen Protein A-Sepharose/TE Lösung und einer weiteren Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur. Die gekoppelten Protein A-Sepharose Kügelchen („Beads“) wurden anschliessend achtmal mit RIPA Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% Natriumdeoxycholat, 0.1% SDS), dreimal mit LiCl₂ Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 250 mM LiCl₂, 0.5% NP-40, 0.5% DOC, 1 mM EDTA) und fünfmal mit TE gewaschen. In allen Puffer befand sich zusätzlich 10 mM Na₂S₂O₅ als Protease Inhibitor. Um unspezifische Bindungen von Nukleinsäuren an der Gefäßinnenwand zu vermeiden, ist bei jedem Pufferwechsel das Reaktionsgefäß gewechselt worden. Die gekoppelten Protein A-Sepharose „Beads“ wurden schließlich je zur Hälfte für die weitere Protein- bzw. DNA-Extraktion aufgeteilt.

3.10.5 Proteinextraktion aus den Immunpräzipitaten

Die präzipitierten Nukleoproteine wurden mit 2% SDS/H₂O für 5 min bei 37°C eluiert. Um die Kreuzvernetzungen zu revertieren, wurden das Eluat für 30 min bei 65°C inkubiert und anschliessend mit Methanol/Chloroform (Wessel und Flügge, 1985) gefällt. Die Input-Proben und Überstände wurden auf die gleiche Art behandelt. Die Protein-Pellets wurden in Ladepuffer aufgenommen und auf ein entsprechendes SDS-Polyacrylamid-Gel geladen.

3.10.6 DNA-Extraktion aus den Immunpräzipitaten

Um das spezifische Signal im Verhältnis zum Hintergrund in der PCR zu erhöhen, mußten die mit der Protein A-Sepharose gefällten Immunkomplexe weitere Male intensiv gewaschen werden. Deshalb wurde die unter Kapitel 3.10.4 beschriebene Waschprozedur ein weiteres Mal wiederholt. Die Nukleoproteine wurden schließlich

zweimal mit 1% SDS/TE bei 37°C für 15 min eluiert. Proteine wurden durch Zugabe von 0.5% SDS und 200 µg/ml Proteinase K über Nacht bei 37°C verdaut. Die DNA wurde durch eine Behandlung mit 1:1 Phenol/Chloroform extrahiert und in Anwesenheit von 0.5 M Natriumacetat mit 99% Ethanol bei minus 20°C für 1h präzipitiert. Die DNA wurde dann für 30 min bei 14000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge auf den Boden des Reaktionsgefäßes zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet dreimal mit 70% Ethanol über einen Zeitraum von 3 - 4 h gewaschen um Salz- und SDS-Reste möglichst vollständig zu entfernen. Das Pellet wurde schließlich in 40 µl TE gelöst.

3.11 Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR)

3.11.1 Standard-PCR

Um vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden sämtliche PCR-Reaktionen mit den "Ready-to-Go PCR Beads" (Amersham) durchgeführt. Die Reaktionen können bei Raumtemperatur angesetzt werden und bedürfen nur der Zugabe von Oligonukleotiden sowie template DNA um gestartet werden zu können. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl unter Zusatz von je 25 pmol des stromaufwärts- und stromabwärts gelegenen Primer angesetzt. Das PCR-Programm enthielt grundsätzlich eine Denaturierungsphase von 4 min bei 94°C zu Beginn. Anschließend folgten 30 - 35 Zyklen für die Denaturierung (94°C), Annealing (entsprechend der T_m des Primers) und Elongation (72°C) welche jeweils 1 min dauerten. Am Ende der Zyklen folgte eine Synthesephase für 4 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden direkt auf ein Agarose-Gel analysiert.

3.11.2 Ligations-vermittelte PCR (LM-PCR)

Zur Klonierung von den präzipitierten ORC-assoziierten DNA-Fragmenten, wurde eine DNA-Bibliothek mittels der LM-PCR angelegt. Hierzu mußten zuerst die Linker-Oligonukleotide gegenseitig gebunden werden (Annealing).

Folgende Linker-Oligonukleotide wurden verwendet:

Linker 25:	5'- GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC - 3'
Linker 11:	5'- GAATTCAGATC - 3'

Beide Linker-Oligonukleotide wurden in einem Volumen von 50 μ l zu einer Endkonzentration von 5 pmol/ μ l pro Primer miteinander gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die Linkerlösung in einen auf 70°C vorgewärmten Heizblock gestellt und darin für 2-3 h zum Annealing abkühlen lassen.

Zur Blunt-end Ligierung der Linker wurden die Enden der präzipitierten und aufgereinigten DNA-Fragmente mit dem Klenow-Enzym behandelt. Hierzu wurde der Reaktionsansatz auf 37°C vorgewärmt und mit 2 units Klenow-Enzym für eine Dauer von 5 min zur Ausübung dessen Exonukleaseaktivität inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 mmol eines Nukleotidmixes welcher je 2.5 mmol der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP enthielt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde das Enzym durch Inkubation bei 70°C für 20 min inaktiviert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde für die nachfolgende Ligation des Linkers verwendet. Hierzu wurden 2 μ l der Linkerlösung (5 pmol/ μ l Primer) und 1 unit T4 DNA-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l angesetzt und über Nacht bei 18°C inkubiert. Zur Dephosphorylierung der DNA-Fragmente wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C mit 1 unit Alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) behandelt. Für die Amplifizierung der DNA-Fragmente über PCR wurden je 25 pmol Primer (10 pmol/ μ l), 2 μ l einer 60% Glycerinlösung sowie 13 μ l des Ligationsansatzes in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l mit den "Ready-to-Go" PCR „Beads“ (Amersham) gemischt. Das PCR Programm bestand aus einer Denaturierungsphase von 1 min bei 94°C, einer Annealing Phase für 2 min bei 63°C und einer Elongationsphase von 3 min bei 72°C mit insgesamt 30 Zyklen.

3.11.3 Quantitative Real-time PCR

Quantitative Messungen der DNA-Konzentration wurden mit dem Light-Cycler Instrument von Roche durchgeführt. Hierbei wurde der "Light-Cycler FastStart DNA Master SYBR GreenI Mix" verwendet. Der Kit ist eine "Hot Start" Reaktionsmix und besteht aus der FastStart Taq DNA-Polymerase sowie einem DNA-Doppelstrang spezifischen Farbstoff, SYBR GreenI, welcher sich in die große Rinne der DNA interkaliert. Die Reaktionen wurden direkt in einer, für den Light-Cycler passenden, Glaskapillare angesetzt, welche in einem vorgekühlten Kapillarenblock gesteckt wurden. Der PCR-Ansatz bestand aus 4.8 µl H₂O, 1.2 µl 4 mM MgCl₂ (von einer 25 mM Stammlösung), 1 µl Primer-Mix (je 5 pmol pro Primer) und 1 µl des SYBR Green Reaktionsmixes. Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 10 µl und wurde durch Zugabe von 2 µl DNA erreicht. Zum Errechnen einer Standardkurve wurden genomische Standard-DNAs mit bekannten DNA-Konzentrationen verwendet. Die entsprechenden genomische Äquivalente sind in der Klammer wiedergegeben: 30 ng (10000 Kopien), 3 ng (1000 Kopien), 300 pg (100 Kopien), 30 pg (10 Kopien), 3 pg (1 Kopie). Die Standards wurden mittels einer Verdünnungsreihe von einer Stammlösung mit einer Konzentration von 15 ng/µl durch eine 1:10 Verdünnung mit H₂O angefertigt. Jeder Reaktionsansatz wurde zur Doppelbestimmung zweifach angesetzt. Die Ansätze wurden durch eine kurze Zentrifugation bei 1500 rpm auf den Boden der Glaskapillare gebracht. Anschließend wurden die Glaskapillaren in den Light-Cycler Adapter gesteckt. Für die Quantifizierung wurden Standardeinstellungen nach den Empfehlungen von Roche verwendet (siehe Anleitung).

Die Light-Cycler Software (Version 3.01) ermittelte die Schmelzkurven und berechnete anhand der eingesetzten DNA-Standards eine Standardkurve. Anhand dieser Standardkurve wurde die Kopielzahl der zu quantifizierenden DNA-Proben bestimmt. Die Kopienzahl entspricht den "genomische Einheiten" im Kapitel "Ergebnisse". Die Reaktionsprodukte wurden anhand der ermittelten Schmelzkurve sowie durch Visualisierung auf einem Agarosegel analysiert.

3.11.4 Verwendete Primer

TOP1 Locus

Primer	Sequenz (5' - 3')	Amplikonposition (*)	Amplikongröße (bp)	Annealing Temp. (°C)
TopC1-F	GACTGCAGAATCTGATGAGGAAC			
TopC1-R	CTAAGAGGTGACAAGCTGCTTCC	1574 - 1873	299	60
TopC2-F	GTAGCTGAGACTGCAGGCACAC			
TopC2-R	GTATGTAGATTAGGGAGCTGCTC	7439 - 7729	290	60
TopC3-F	GCACATTGTATTAATCCAAGCAG			
TopC3-R	CTCTGTGAGGTCGCCTGTATTAC	11603 - 11873	270	60
Prom-F	CACTGCTAGCAGAGGGGCTGGGG			
Prom-R	GCAGTTGTGTAACAGCCTAAGTTTCG	12461 - 12749	288	68
TopC4-F	GCAGAGGACAGACATGGCGTCCC			
TopC4-R	CGACCGTCGACAAGGCGACTTTCC	13434 - 13660	226	60
M1-F	CATGTCTTAAAGTTTATATTCC			
M1-R	CAGAATCATTTTCCATACCATTAG	17370 - 17550	180	60
Ex4-F	GTCCGATGTAGCCAAGACCC			
Ex4-R	CTACTAGAAAACCTCTGTACC	59917 - 60217	354	60
M2-F	GGAGTCATTAAAGGCCTGGAAAAG			
M2-R	GTTTCACTAAAAATAAAACCCC	88619 - 88859	240	60

(*) Accession Nr.: AL 035652 (5' - Ende) und AL022394 (3' - Ende)

LaminB2 Locus

Primer	Sequenz (5' - 3')	Amplikonposition (#)	Amplikongröße (bp)	Annealing Temp. (°C)
LBC1-F	GTTAACAGTCAGGCGCATGGGCC			
LBC1-R	CCATCAGGGTCACCTCTGGTTCC	1 - 240	240	66
LB-F	GGCTGGCATGGACTTTCATTTTCAG			
LB-R	GTGGAGGGATCTTTCTTAGACATC	3839 - 4070	232	68
LBC2-F	CACAGCATGCGGCTGCTGATCTG			
LBC2-R	CCTGGTGCCTCCATCTGCCTGC	6648 - 6932	285	68

(#) Accession Nr.: M94363

ORC-DNA Klonierung

Primer	Sequenz (5' - 3')	Annealing Temp. (°C)	Amplikongröße (bp)
ORC1-1-F	GGACGATAGTCATCAGTGAGCAACCGG		
ORC1-1-R	CGACAGGCTGAACAGTTGCTCGCTCG	55	365
ORC1-2-F	CGATGTCGCAAACCTCGACGACTTCG		
ORC1-2-R	GTGCCGCCAGGTGATCGTATCGATC	55	313
ORC1-3-F	GGGTTTCAGAGCTGCTCTGTCAAGAGG		
ORC1-3-R	CGATTCAACTCACAGAGTTGACCCTTGC	60	394
ORC1-5-F	GTAGATATCGGTATCGCGCGGTCCGG		
ORC1-5-R	CCGCGCAAACGTTGCAATACACCTTGC	60	329
ORC1-6-F	GTCGCATCGACGACGCCTTGAAGCGG		
ORC1-6-R	CCGGTTGGCATCGCTGACCTGTTCCAG	55	383
ORC1-7-F	GGCTTCGACTTCCTTGTCTGGTTCATCG		
ORC1-7-R	CCAAGATACATCGAGGCGATCAGACC	55	491
ORC1-9-F	GAATGGGTTAAGGGTTAGGTCA		
ORC1-9-R	GTAAGTACTCTACCACTGAATC	60	196
ORC1-10-F	CCACAGCACCTTGCTGTAGCCC		
ORC1-10-R	CTTGCTGTCTCATCCAGGTAGTC	55	213
ORC2-1-F	CCACGACCGTGGCTGGCACGTGCTGG		
ORC2-1-R	CACCGCACACGTTGTTGCATTTGG	55	412
ORC2-2-F	GCGATTCATCCGGGCTATGGTTTCC		
ORC2-2-R	CACTTCGATATGACGAGCATTTTGTGAC	55	404
ORC2-3-F	CCAGACAGCTCCAGCGATCAAAGTG		
ORC2-3-R	CCGACCTTCGTCCAGGTTTGCGGG	55	403
ORC2-5-F	GGACCAGGCCAAGGACGAGCTTCTGG		
ORC2-5-R	GGCGCAGGGCATTGTGGAGGAGGTTTC	55	395

Tabelle 1. Verwendete Oligonukleotide für die PCR im *TOP1* Locus, Lamin B2 Locus und der Klonierung der präzipitierten ORC-DNA im ChIP-Assay. Die Annealing Temperaturen der für die quantitative Real-time PCR benutzten Primer-Sätze beziehen sich auf die Anwendung im Light-Cycler. Die Annealing Temperaturen der restlichen Primer-Sätze beziehen auf die Standard-PCR.

3.12 Analyse von ORC-assoziierten DNA-Fragmenten

3.12.1 Klonierung

Die unter Kapitel 3.11.2 (LM-PCR) beschriebene Methode diente zum Anlegen einer Genom-Bibliothek von DNA-Fragmenten welche in vivo mit ORC-Proteinen assoziiert sind. Zur Sequenzierung und weiteren Analyse der genetischen Information, wurden die amplifizierten DNA-Fragmente durch eine von Topoisomerase I vermittelte Blunt-end Ligation in den pCR-BluntII-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert. Für die Klonierung wurde der "Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit" (Invitrogen) verwendet, welcher eine effiziente und schnelle Klonierung erlaubte. Hierzu wurden 4 µl der Genom-Bibliothek mit 1 µl des Klonierungsvektors auf ein Endvolumen von 5 µl gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl der 6 x TOPO Cloning Stop Lösung abgebrochen.

3.12.2 Transformation

Im Kit wurden "TOP10 One Shot" Bakterien zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl der Klonierungsreaktion gemischt. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert, und zum Hitzeschock für 30 sec in ein auf 42°C erhitztes Wasserbad transferiert. Die Proben wurden dann sofort für 2 min auf Eis gestellt. Schließlich wurden 250 µl SOC-Medium dazugegeben und die Zellen bei 37°C für 1 h wachsen gelassen. Die Zellen wurden kurz bei 3000 rpm für 5 min pelletiert und auf Agarplatten (ergänzt mit 70 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Einzelkolonien wurden ausgewählt und deren DNA durch Transformation von *E. coli* XL-1Blue Zellen (siehe Kapitel 3.7.9) amplifiziert. Die DNA wurde mittels PCR-Methoden und analytischen Kontrollverdaus untersucht.

3.12.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente wurde von der Firma GATC Biotech AG in Konstanz durchgeführt. Es wurde hierzu der Sequenzierprimer M13-R verwendet dessen Bindestelle sich ca. 100 bp stromaufwärts der Insertionsstelle befindet.

3.13 "Nascent DNA strand abundance Assay"

Der "Nascent DNA abundance Assay" wurde in einer modifizierten Form nach Giacca et al., 1997 angewendet.

3.13.1 Präparation der genomischen DNA

Etwa 1×10^8 Zellen wurden in DMEM/5% FCS bis zu einer Konfluenz von etwa 70% als Monolayer wachsen gelassen. Die Durchführung von Synchronisierungen sind im Kapitel 3.2 beschrieben. Die Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin von den Platten gelöst und zweimal mit kaltem PBS Puffer sowie einmal mit RBS Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$) gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 3000 rpm für 5 min in einem HB4-Rotor durchgeführt. Die Zellen wurden zu einer Konzentration von 2.5×10^7 Zellen/ml in RBS Puffer resuspendiert (4 ml/4 Platten) und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde zu der Zellsuspension das gleiche Volumen RBS/1% NP-40 Puffer dazugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Enkonzentration von NP-40 betrug somit 0.5%. Anschließend wurden die Zellkerne zentrifugiert, zweimal mit kaltem RBS Puffer gewaschen und schließlich in dem gleichen Puffer zu einer Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml (2 ml bei 4 Platten) resuspendiert. Es folgte die Zugabe des selben Volumens 2 x Lyse Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM EDTA, 2% SDS, 500 μ g/ml Proteinase K) und eine Inkubation des Ansatzes bei 56°C über Nacht. Die gesamte genomische DNA wurde durch Extraktion mit 1:1 Phenol/Chloroform vorsichtig isoliert und mit $2.5 \times$ Isopropanol für 0.5 h bei Raumtemperatur präzipitiert. Die DNA wurde mit einer gebogenen Pasteurpipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Verbleibende Reste des Isopropanols wurden mit

Hilfe eines Vakuumtrockners entfernt. Die DNA wurde in 500 μl TE aufgenommen und auf eine Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt.

3.13.2 Denaturierung

Zur Denaturierung wurde die genomische DNA bei 85°C für 10 min erhitzt und sofort auf Eis transferiert. Es wurden 1 mg der denaturierten DNA in einem Volumen von 500 μl auf 5-30% Saccharose-Gradienten in SW28 Zentrifugationsröhrchen gegeben. Die Saccharose wurde in Gradientenpuffer TNE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8) gelöst. Als Referenz wurde 20 μg Marker DNA (1kbp Leiter, MBI Fermentas) in 500 μl TE gelöst und parallel auf einen Gradienten aufgetragen.

3.13.3 Ultrazentrifugation und nascent DNA-Isolierung

Die Ultrazentrifugation wurden in einem Beckman SW28-Rotor bei 26000 rpm für 20 h bei 20°C durchgeführt. Die Fraktionen wurden zu je 1 ml von oben nach unten abgenommen und mit Ethanol präzipitiert. Die Proben des Referenz-Gradienten mit der Marker DNA wurden nach der Präzipitation in 20 μl TE aufgenommen, auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Fraktionen mit einer durchschnittlichen DNA-Länge von 1 – 2 kbp wurden für die weitere Quantifizierung ausgewählt. Routinemässig hat sich diese DNA in den Fraktionen 14 - 18 befunden. Die nascent DNA wurde nach der Fällung mit 99% Ethanol in 50 μl TE aufgenommen.

3.13.4 Quantifizierung durch Real-time PCR

Die Quantifizierung von spezifischen Sequenzen in der nascent DNA Präparation erfolgte durch Real-time PCR mit dem Light-Cycler Instrument (Roche) entsprechend der Beschreibung im Kapitel 3.11.3. Es wurden zu dem Reaktionsansatz von 8 μl ein Volumen von 2 μl der nascent DNA Präparation gemischt.

3.14. Nachweis der DNA-Synthese durch den Einbau von ^3H -Thymidin

Zur Bestimmung der DNA-Syntheserate wurde der Einbau von ^3H -Thymidin während und nach dem Entlassen aus einem Block mit Mimosin durch Pulsmarkierung gemessen. Hierzu wurden die Zellen mit 0.5 mM Mimosin in der G1-Phase synchronisiert und durch Zugabe von frischem Medium in die S-Phase entlassen. Zur Pulsmarkierung wurden die Zellen mit warmen PBS gewaschen und mit 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin/DMEM/10% FCS zu den angegebenen Zeiten für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 1% SDS/H₂O inkubiert. Die Zellsuspension wurde von der Platte gespült und über Nacht in einem Volumen von 40 ml im Kühlschrank aufbewahrt. Die TCA-Fällung erfolgte mit 2 ml der Zellsuspension sowie 10% TCA in einem Endvolumen von 40 ml. Der Fällungsansatz wurde so 10 min auf Eis inkubiert und anschliessend auf einem Whatman Filter transferiert. Schließlich wurden die Filter jeweils fünfmal mit kaltem 10% TCA, 5% TCA und 99% Ethanol gewaschen, getrocknet und mit einem Szintillationszähler quantifiziert. Von jedem Reaktionsansatz wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.15 Markierung von replizierender DNA mit halogenierten Nukleotiden

Das humane zellfreie System wurde in der Form angewendet wie es von T. Krude, Cambridge beschrieben worden ist (Krude, 2000; Krude et al., 1997).

3.15.1 Markierung von replizierender DNA in vivo

Während der Inkubation mit Mimosin wurde in vivo replizierende DNA mit 20 μM CldU (Chloro-2'-Desoxyuridin, Sigma) markiert. Zum Nachweis von früh replizierenden Chromatinbereichen wurden EJ30 Zellen mit Aphidicolin arretiert, nach dem Block mit PBS gewaschen und anschliessend für 20 min in frisches DMEM(ergänzt mit 20 μM CldU) zur Pulsmarkierung inkubiert. Nach der Markierungszeit wurde die Zellkultur

mit DMEM ohne CldU wachsen lassen. Für den Nachweis von replizierender DNA nach der Entlassung aus dem Mimosin Block, wurden die Zellen *in vivo* in frisches DMEM mit 20 μ M IdU (5-Iodo-2'-Desoxyuridin, Sigma) für 3 h inkubiert.

3.15.2 Markierung von replizierender DNA *in vitro*

Die Zellkerne welche für eine *in vitro* Initiationsreaktion eingesetzt wurden, sind nach dem Protokoll in Kapitel 3.3 präpariert worden. Cytosolische Extrakte wurden aus asynchron proliferierenden Hela Zellen präpariert (siehe Kapitel 3.3). Die Initiationsreaktionen bestanden aus 100 μ g cytosolischen Extrakt (Gesamtproteinmenge), einen gepufferten Nukleotidmix (bestehend aus 40 mM K-HEPES, pH 7.8, 2 mM $MgCl_2$, 0.1 mM ATP, je 0.1 mM GTP, CTP, UTP, 25 μ M dATP, je 0.1 mM dGTP, dCTP, dTTP), einem ATP-regenierenden System (40 mM Kreatinphosphat, 5 μ g Phosphokreatinkinase) und 2 - 5 x 10⁵ Zellkerne von Mimosin arretierten Hela Zellen. Das Reaktionsvolumen betrug 50 μ l und wurde mit Elongationspuffer (20 mM K-HEPES, pH 7.8, 100 mM K-Acetat, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM DTT) eingestellt. DNA-Elongationsreaktionen wurden identisch angesetzt, allerdings ohne der Zugabe von cytosolischen Extrakt. Zur Präparation von nascent DNAs wurden die Reaktionen entsprechend in einem größeren Volumen durchgeführt (4ml). Die Inkubationszeit der *in vitro* Initiationsreaktionen betrug 3 h bei 37°C.

3.16 Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die differentielle Analyse von CldU und IdU markierter DNA wurde das Protokoll von (Aten et al., 1992; Dimitrova et al., 1996) mit dem Markierungsprotokoll für das *in vitro* Initiationssystem (Krude, 1999; Krude, 2000) miteinander verbunden.

Für die Mikroskopie wurden 2 - 5 x 10⁵ Zellkerne, oder alternativ, eine 50 μ l Initiationsreaktion in 1 ml 2% Paraformaldehyd/PBS gemischt und zur Fixierung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kerne wurden über ein 30%-iges Saccharose/PBS Kissen auf Poly-Lysin behandelte Mikroskopie-Deckgläschen zentrifugiert. Anschließend wurden die Deckgläschen einmal in PBS und zweimal in

H₂O gewaschen. Für eine effiziente Immunfärbung wurden die Gläschen für 30 min in 0.8 N HCl bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt durch ein Waschen mit H₂O, mit PBS und schließlich mit PBS (ergänzt mit 0.1% Triton X-100, 0.02% SDS) von jeweils 2 min. Die Deckgläschen wurden in einem speziellen Puffer für 30 min blockiert (PBS, 2% Trockenmilch, 0.1% Triton X-100, 0.02% SDS). Die primären Antikörper (Anti-CldU, Anti-IdU, beide Beckton-Dickinson; Anti-BrdU MAS250b, Harlan Sera Labor) wurden 1:10 in dem Blockpuffer verdünnt und für 1 h bei 37°C auf den Deckgläschen inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen wie oben beschrieben gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Fluorescein gekoppeltes Anti-Digoxigenin Fab-Fragment, Boehringer Mannheim) in einer 1:100 Verdünnung in Blockpuffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden die Deckgläschen mit PBS (ergänzt mit 0.1% Triton X-100, 0.02% SDS), sowie PBS gewaschen und mit 85% Glycerin, 2.5% N-Propylgallat fixiert. Konfocale Immunfluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Leica TCS Mikroskop durchgeführt. Für eine hochauflösende Bilddarstellung wurden Krypton bzw. Argon Laser benutzt, welche bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm bzw. $\lambda = 568$ nm den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein anregen. Das Fluoreszenzsignal wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 510 - 530$ nm gemessen.

3.17 2D Gel-Elektrophorese von DNA-Replikationsintermediaten

Die Replikationsintermediate wurden nach dem Protokoll von (Dijkwel et al., 1991) präpariert. Etwa $0.5 - 1 \times 10^8$ Zellkerne wurden für eine in vitro Initiationsreaktion benutzt und nach 3 h Inkubationszeit durch Zugabe des gleichen Volumens kaltem PBS gestoppt. Die Zellkerne wurden bei 5000 rpm für 5 min in einem SS34-Rotor pelletiert und einmal mit SuNaSpBSA gewaschen. Die Replikationsintermediate welche aus intakten Zellen präpariert worden sind wurden bei den weiteren Schritten gleich behandelt. Die Zellkerne von beiden Präparationen wurden mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII verdaut und über eine Benzyl-Naphtyl-DEAE (BND) Zellulose Chromatographie Säule aufgereinigt. Nach jedem

Aufreinigungsschritt wurden die Replikationsintermediate weitere Male mit EcoRI und HindIII geschnitten um die Effizienz des Verdauens zu erhöhen. Neutrale/Neutrale 2D-Gel-Elektrophorese wurde nach Brewer und Fangman, 1987 mit Modifikationen für die größeren DNA-Fragmente (Hyrien und Mechali, 1992) durchgeführt. In der ersten Dimension wurden die Proben auf einem 0.3% Agarosegel bei 0.3 V/cm für 3-5 Tage bei Raumtemperatur laufen gelassen. Die zweite Dimension wurde mit einem 0.6% Agarosegel in Anwesenheit von 0.3 µg/ml Ethidiumbromid bei 1 V/cm für 2 - 3 Tage laufen gelassen. Die Gele wurden in 0.4 M NaOH auf eine Hybond N⁺ Membran geblottet und mit den C_{HB}/C_{PE} Proben, bzw. mit einer Proben welche zu dem EcoRI Fragment B im humanen rDNA Locus homolog ist, hybridisiert.

KAPITEL 4

ERGEBNISSE

4.1 Spezifische Initiation der DNA-Replikation in einem zellfreien System

4.1.1 Die Initiation der DNA-Replikation in vitro

Bisher war es nur schwer möglich die komplizierten Abläufe bei der Initiation der DNA-Replikation des Menschen an isolierten Zellkernen in vitro zu untersuchen. Größere Erfolge gelangen, als ein von menschlichen Zellen abgeleitetes zellfreies System entwickelt wurde, bei dem die Initiation in isolierten Zellkernen studiert werden kann (Krude, 2000; Krude et al., 1997). Die Zellkerne werden aus menschlichen Zellen isoliert, welche sich in der späten G1-Phase des Zellzykluses befinden. Die Synchronisierung in der G1-Phase erfolgt durch einen Block mit der pflanzlichen Aminosäure Mimosin. Mimosin arretiert die Zellen spezifisch in der späten G1-Phase, noch bevor die S-Phase und somit die Replikation der DNA eingeleitet wird.

Für die Initiation der DNA-Replikation werden die Zellkerne in cytosolischen Extrakt inkubiert, welcher von asynchron proliferierenden menschlichen Zellen präpariert worden ist. Im Extrakt befinden sich zusätzliche cytosolische Faktoren, welche für die Initiation essentiell sind. Die DNA-Synthesereaktion benötigt außerdem einen gepufferten Mix, der aus Nukleotiden und Desoxynukelotiden sowie einem ATP-regenerierendem System besteht.

In diesem ersten Teil der Arbeit soll die zeitliche und räumliche Koordination der Initiation der DNA-Replikation in menschlichen Zellen in vivo sowie in isolierten Zellkernen in vitro untersucht werden.

Zuerst wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, um die Synchronisierung von menschlichen Hela Zellen in der späten G1-Phase bzw. in der frühen S-Phase zu überprüfen. Für eine Arretierung in der G1-Phase wurden proliferierende Hela Zellen für 24 h mit 0.5 mM Mimosin behandelt. Anschließend wurden die Zellen für drei Stunden durch Zugabe von frischem Zellkulturmedium aus dem Block in die S-Phase entlassen. Aus der gesamten Zellpopulation wurden die Zellkerne präpariert, zum Nachweis des DNA-Gehaltes mit Propidiumiodid gefärbt und anschließend einer FACS-Analyse (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) unterzogen (Abb. 4A). Die Profile dieser Analyse sind in der Abbildung 4A aufgeführt, und zeigen anhand des scharfen FACS-Profiles der diploiden Zellen (2n), dass eine erfolgreiche Synchronisierung der Gesamtpopulation in der G1-Phase stattgefunden hat. Beim Entlassen aus dem Mimosinblock treten die Zellen in die S-Phase ein und beginnen mit der Replikation ihrer DNA, was durch das Auftreten einer Schulter im FACS-Profil sichtbar wird. Als Kontrolle wurden die Zellkerne einer asynchron proliferierenden Zellkultur analysiert.

Um die DNA-Synthese beim Eintritt in die S-Phase genauer zu verfolgen, wurden die Zellen nach dem Block mit Mimosin in die S-Phase entlassen und für eine Stunde in der Gegenwart von radioaktiv markiertem ^3H -Thymidin inkubiert. Das radioaktiv markierte Desoxynukleotid wurde so während der DNA-Synthese in die DNA eingebaut. Der Gehalt an Radioaktivität wurde nach der Extraktion der genomischen DNA mit Hilfe eines Scintillationszähler ermittelt (Abb. 4B). Dazu wurde die DNA nach dem Mimosinblock zu verschiedenen Zeitpunkten aus den Zellen präpariert. Zellen in der G1-Phase haben keinen signifikanten Einbau von ^3H -Thymidin gezeigt (Zeitpunkt 0 h; Abb. 4C). Beim Eintritt in die S-Phase hingegen, sieht man bereits nach zwei Stunden einen starken Anstieg der DNA-Synthese, die mit dem Fortschreiten der S-Phase weiter zunimmt (Abb. 4C).

Diese Ergebnisse bestätigen somit die Wirkung von Mimosin und demonstrieren, dass die Zellen zu einem späten Zeitpunkt in der G1-Phase, vor dem Start der DNA-Synthese, arretiert werden (Krude, 2000; Krude et al., 1997).

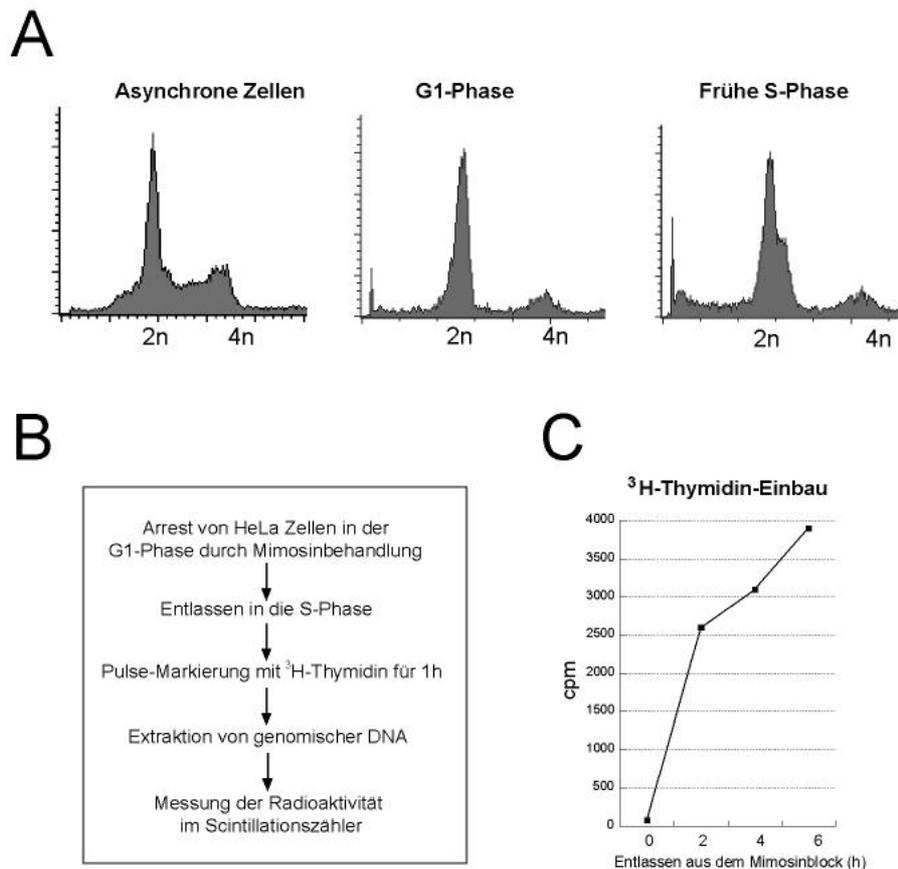


Abbildung 4. **Arretierung von proliferierenden HeLa Zellen in der G1-Phase und Eintritt in die S-Phase.**

(A) Überprüfung der Synchronisierung durch FACS-Analyse. Die Zellkerne wurden aus asynchron proliferierenden Zellen, von Mimosin-arretierten Zellen (G1-Phase) und Zellen, welche für 3 h aus dem Block entlassen wurden (frühe S-Phase) präpariert. Die DNA wurde für die FACS-Analyse mit Propidiumiodid gefärbt. Die Auswertung zeigt die Anzahl der Zellen der Gesamtpopulation während den einzelnen Zellzyklusphasen. (B) Experimentelles Schema zur Durchführung der radioaktiven Puls-Markierung mit ^3H -Thymidin. (C) Start der DNA-Synthese nach dem Eintritt in die S-Phase. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume aus einem Block mit Mimosin in die S-Phase entlassen und neusynthetisierende DNA für 1 h mit ^3H -Thymidin markiert. Die DNA wurde durch TCA-Fällung extrahiert und der Einbau von ^3H -Thymidin durch Messung der Radioaktivität mit einem Scintillationszähler ermittelt.

4.1.2 Die Etablierung von Replikationsfoci in isolierten Zellkernen

Als erstes wurde in gemeinsamer Zusammenarbeit mit Torsten Krude, Cambridge, die Spezifität der Initiation der DNA-Replikation im menschlichen zellfreien „in vitro“-System untersucht. Dazu wurden replikationsaktive Bereiche (engl.: replication foci; „Replikationsfoci“) durch den Einbau von halogenierten Vorläufernukleotiden markiert und über spezifische Antikörper in der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht (Aten et al., 1992).

Zuerst wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt um die Frage zu klären, ob sich Replikationsgabeln in diesem System neu bilden, oder ob die Replikation an bereits etablierten Replikationsgabeln eingeleitet wird.

Neusynthetisierende DNA wurde während des 24 h langen Blockes mit Mimosin mit dem halogenierte Vorläufernukleotid 5'-Chloro-2'-desoxyuridin (CldU) markiert. Anschließend wurden aus diesen Zellen die Zellkerne isoliert und zum Nachweis der DNA-Synthese für 3 h in cytosolischen Hela Zellextrakt in der Gegenwart von Digoxigenin-11-dUTP (dig-dUTP) inkubiert. Parallel wurde die DNA-Synthese in vivo verfolgt, indem die mit Mimosin arretierten Zellen in der Gegenwart des halogenierten Vorläufernukleotids 5'-Iodo-2'-Desoxyuridin (IdU) für dieselbe Zeit in frisches Zellkulturmedium entlassen wurden, um so die S-Phase einzuleiten (siehe Abb. 5A). Die Erstmarkierung der synthetisierten DNA mit dem eingebauten CldU kann mit spezifischen Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, im hochauflösenden konfokalen Immunfluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (siehe Material und Methoden). Bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit einem Laser, erscheint diese Markierung im Fluoreszenzkanal des Mikroskops in der Farbe „grün“, während die zweite Markierung mit dem eingebautem dig-dUTP (in vitro) bzw. IdU (in vivo) durch die Farbe „rot“ nachgewiesen werden kann. Eine Überlagerung beider Signale resultiert für unser Auge in der Farbe „gelb“.

Als erstes wurden die Zellen analysiert, welche während des Blockes mit Mimosin in vivo nicht repliziert hatten (G1-Phase Zellkerne). Diese Zellen zeigten keinen Einbau von CldU (Abb. 5C, -CldU). Etwa 40% der isolierten Zellkerne haben unter diesen Bedingungen in vitro repliziert, wenn sie im cytosolischen Extrakt inkubiert wurden

(Abb. 5B, mittlere Säule). Als Kontrolle dienten Zellkerne, die im Replikations-Elongationspuffer inkubiert worden sind (Abb. 5B, graue Säule). Hier haben nur 4% der Zellkerne repliziert.

Zum Nachweis der Synthese *in vivo*, wurden die Zellen direkt aus dem Mimosinblock in frisches Medium entlassen und neu replizierende DNA durch den Einbau von IdU nachgewiesen (Abb. 5B). Hier wurden 40% der Zellkerne markiert, was identisch mit der Zahl der *in vitro* markierten Zellkernen ist. Nur etwa 10% der Zellen replizierten während des Blockes mit Mimosin *in vivo* (+CldU). Das sind vermutlich Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Mimosinbehandlung in der S-Phase befanden und in denen bereits fertige Replikationsgabeln etabliert worden sind, was daher zur Replikation im Puffer als auch im cytosolischen Extrakt führte (Abb. 5B). Das Experiment zeigt auch, dass sich neben den bereits etablierten Replikationsgabeln (Abb. 5C, Markierung in grün), neue Replikationsgabeln gebildet haben (Abb. 5C, Markierung in rot). Gleiche Ergebnisse ergaben sich bei den Zellen, welche nach dem Block mit Mimosin in die S-Phase entlassen wurden.

Somit werden in dem menschlichen zellfreien „*in vitro*“-System als auch in intakten Zellen *in vivo*, beim Eintritt in die S-Phase neue Replikationsgabeln gebildet. Etwa die Hälfte der Zellen leiten nach dem Entlassen aus dem Mimosinblock die DNA-Replikation *in vitro* und *in vivo* ein.

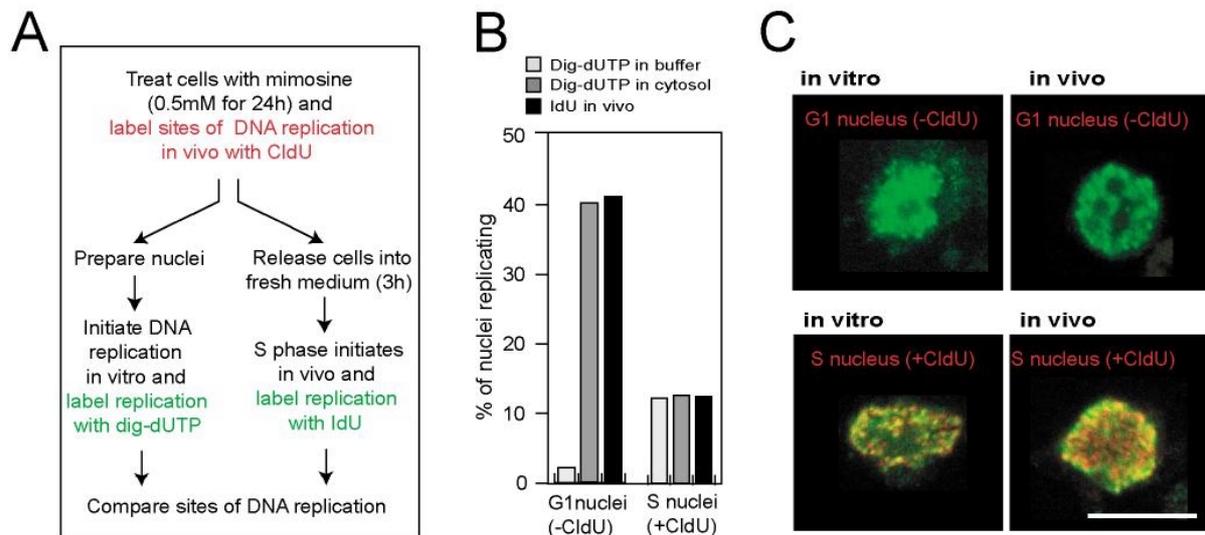


Abbildung 5. **Initiation der DNA-Replikation in synchronisierten Zellkernen in vitro und in lebenden Zellen in vivo.**

(A) Experimentelles Protokoll. (B) Anzahl der Zellen, die im zellfreien System in vitro initiierten (Einbau von dig-dUTP), bzw. in lebenden Zellen in vivo (Einbau von IdU). Es wurden Zellen analysiert, die während des Blockes mit Mimosin nicht repliziert haben (- CldU) und solche die während des Blockes an bestehenden Replikationsgabeln elongiert haben (+ CldU). (C) Immunfluoreszenzmikroskopie. Nachweis von replikationsaktiven Bereichen („Replikationsfoci“) nach dem Eintritt in die S-Phase in vitro und in vivo. Die Farbe „Grün“ entspricht einer Markierung mit CldU in vivo, die Farbe „rot“ entspricht einer Markierung mit dig-dUTP (in vitro) bzw. mit IdU (in vivo). Übereinandergelagerte Bilder erscheinen in der Farbe „gelb“. (Experimentelle Kooperation mit Torsten Krude, Cambridge)

4.1.3. Initiation der DNA-Replikation in gleichen Chromatindomänen

Im eben beschriebenen Experiment wurde ein Doppelmarkierungsprotokoll angewendet, um die Etablierung neuer Replikationsfoci *in vitro* nachzuweisen. Nun sollte gezeigt werden, dass die DNA-Replikation in früh replizierenden Chromatinbereichen auch im nachfolgenden Zellzyklus an den identischen Stellen in der frühen S-Phase im zellfreien System *in vitro* replizieren.

Dazu wurden menschliche EJ30 Zellen aus dem Ruhezustand in der G₀-Phase durch Zugabe von Serum entlassen und beim folgenden G₁/S-Phase Übergang für 24 h mit Aphidicolin arretiert. Aphidicolin ist ein spezifischer Inhibitor für DNA-Polymerasen und arretiert eine Zellkultur in der frühen S-Phase. Die Zellen wurden nach dem Block für 20 min in der Gegenwart von CldU in frisches Zellkulturmedium inkubiert, so dass früh replizierende DNA durch den Einbau des Vorläuferrukleotids in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden konnte. Der Nachweis erfolgte durch CldU-spezifische Antikörper. Der anschließende Verlauf durch die weiteren Phasen des Zellzyklus, der S-Phase, der G₂-Phase sowie der Mitose erfolgte in Abwesenheit der Markierung. Im darauf folgenden Zellzyklus wurden die Zellen durch Zugabe von Mimosin in der späten G₁-Phase arretiert. Für die *in vitro* Initiationsreaktion wurden die Zellkerne in cytosolischen Extrakt in der Gegenwart von dig-dUTP inkubiert, um so den Eintritt in die S-Phase zu ermöglichen. Die Markierung erfolgte für eine Dauer von drei Stunden und wurde in der Immunfluoreszenzmikroskopie über fluoreszierende dig-dUTP-spezifischen Antikörper sichtbar gemacht. Als Referenz wurden die Zellen direkt nach dem Block mit Mimosin für 3 h in frisches Medium entlassen und replizierende DNA durch den Einbau von IdU sichtbar gemacht (siehe auch Abb. 6A).

In diesem Experiment wurden 68% der Zellkerne in der frühen S-Phase mit CldU markiert und 42% der selben Kerne wurden in der darauf folgenden S-Phase nach dem Entlassen aus dem Mimosinblock mit IdU *in vivo* markiert (Abb. 6B, rechte Säule). Dies bedeutet, dass 32% der Zellen nicht durch CldU markiert worden sind und im vorhergehenden Zellzyklus nicht replizierten. Die intranukleare Lokalisierung der

Markierung wurde durch die hochauflösende Immunfluoreszenzmikroskopie über CldU-spezifische bzw. IdU-spezifische Antikörper sichtbar gemacht (Abb. 6C). Hierzu wurden die Stellen, welche durch den Einbau von CldU *in vivo* markiert wurden, mit den Chromatindomänen verglichen, welche in der darauf folgenden S-Phase mit IdU markiert worden sind. Beide Markierungen kennzeichnen diskrete Stellen in den Zellkernen, deren Muster typisch für die frühe S-Phase ist (Abb. 6C). Dieser Typ wird im allgemeinen auch als Typ I bezeichnet, da hier hauptsächlich transkriptionsaktive euchromatische Bereiche markiert werden (Nakayasu and Berezney, 1989). In der mittleren S-Phase sind diese Foci in der Kernperipherie, in perinukleolaren und nukleolaren Regionen anzutreffen (Typ II). In der späten S-Phase werden die restlichen Chromatinbereiche repliziert, welche sich innerhalb der Nukleoli sowie in heterochromatischen Regionen befinden (Typ III, Abb. 7B). Anhand dieser unterschiedlichen Markierungsmuster lassen sich die einzelnen Stadien der DNA-Replikation während der S-Phase unterscheiden.

Bei der Auswertung der Immunfluoreszenzbilder (Abb. 6C) lässt sich eine Co-Lokalisierung beider Markierung an diskreten Replikationsfoci feststellen, welche typisch für die frühe S-Phase sind. Somit findet die Initiation der DNA-Replikation nach einem Block mit Mimosin an den gleichen Chromatindomänen statt, die schon im vorhergehenden Zellzyklus in der frühen S-Phase repliziert hatten. Diese Daten bekräftigen weiterhin, dass die Aktivierung von Chromatindomänen, welche im Laufe der S-Phase repliziert werden sollen, einem zeitlich streng kontrollierten Ablauf unterzogen ist, und dass die zeitliche Koordination der Initiation von einem Zellzyklus auf den nächsten wiedergegeben wird.

Analog wurde untersucht, ob die gleichen Chromatindomänen bei der Initiation in isolierten Zellkernen mit den markierten Chromatinregionen des vorhergehenden Zellzyklus co-lokalisieren. Dazu wurden Zellkerne aus Mimosin-arretierten Hela Zellen isoliert. Etwa 72% dieser Zellkerne sind im vorhergehenden Zellzyklus durch den Einbau von CldU markiert worden (Abb. 6B, mittlere Säule).

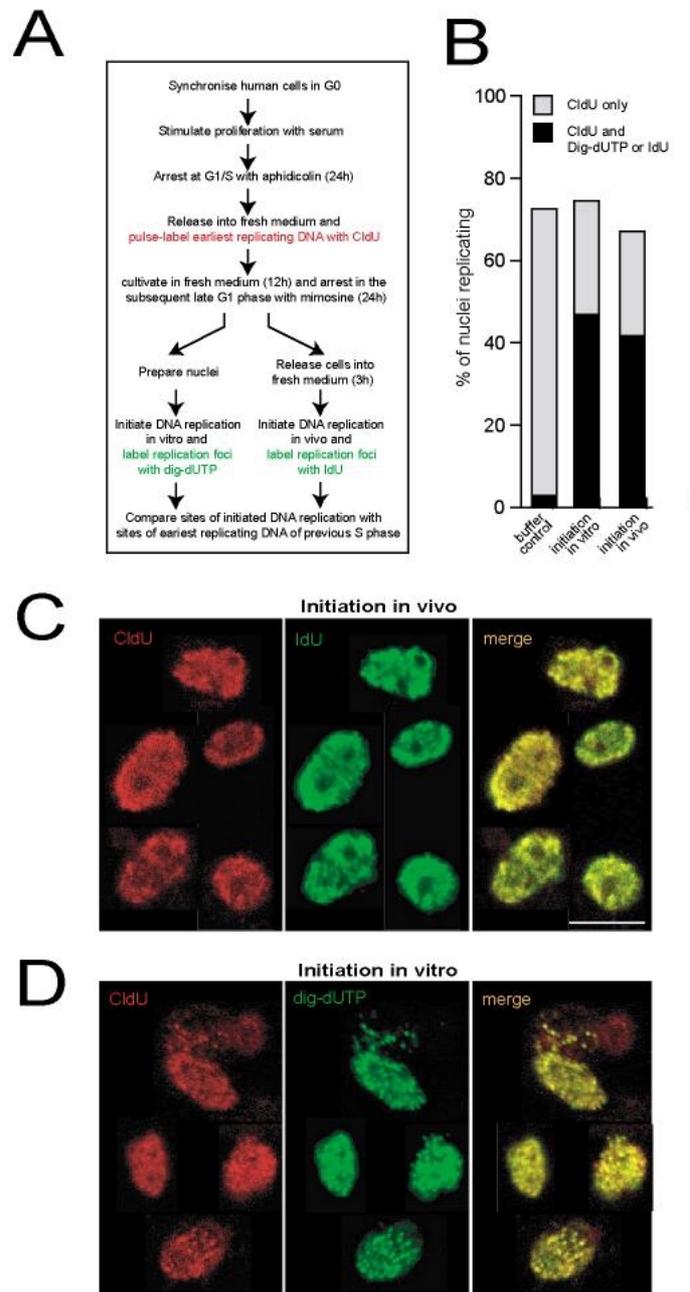


Abbildung 6. Die Initiation der DNA-Replikation in vitro co-lokalisiert mit früh replizierten Chromatinbereichen in vivo.

(A) Experimentelles Protokoll. (B) Auswertung der Initiationsereignisse in vivo und in vitro. Als Negativkontrolle wurden CldU-markierte Zellkerne in Replikationselongationspuffer inkubiert (Pufferkontrolle). Die selben Zellkerne wurden für die in vitro Initiationsreaktion in cytosolischen Extrakt inkubiert. Als Referenz dienten Zellen, welche direkt nach dem Mimosinblock in die S-Phase entlassen

wurden. Ausgewertet wurden solche Zellen, die eine Doppelmarkierung mit CldU (graue Säule) und mit dig-dUTP (in vitro) bzw. mit IdU (in vivo) aufweisen konnten. (C) Immunfluoreszenzmikroskopie von Zellen in vivo. Replizierte Chromatinbereiche sind mit CldU markiert (rot). Die Initiation der DNA-Replikation im darauf folgenden Zellzyklus ist durch den Einbau von IdU nachweisbar (grün). Übereinander gelagerte Bilder lassen die Replikationstellen in der Farbe „gelb“ erscheinen. (D) Immunfluoreszenzmikroskopie von isolierten Zellkernen in vitro. Die Initiation nach dem Entlassen aus dem Mimosinblock wurde durch den Einbau von dig-dUTP nachgewiesen (rot). (Experimentelle Kooperation mit Torsten Krude, Cambridge).

Die Kerne dienten als Template für die Initiation der DNA-Replikation in vitro. Die Replikation wurde durch den Einbau von dig-dUTP über spezifische fluoreszierende Antikörper in der Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

Der Anteil der S-Phase Kontaminanten betrug bei diesen Experimenten etwa 3%, was durch eine Elongationsreaktion der isolierten Zellkerne im Replikationspuffer nachgewiesen wurde (Abb. 6B, linke Säule). Nach der Zugabe des cytosolischen Extraktes replizierten 45% der Zellkerne in vitro (Abb. 6B, mittlere Säule). Eine Analyse der Replikationsfoci in der Immunfluoreszenzmikroskopie ergab, dass beide Markierungen miteinander co-lokalisieren und typische Muster der frühen S-Phase aufweisen (Typ I, Abb. 6D).

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass bei einem Eintritt in die S-Phase die gleichen Chromatinregionen repliziert werden, an denen schon im vorhergehenden Zellzyklus die DNA-Replikation eingeleitet wurde. Diese mit dem zellfreien System gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass die Reihenfolge der Replikation von einzelnen genomischen Regionen in der frühen S-Phase von dem einen auf den anderen Zellzyklus wiedergegeben wird. Weiterhin weisen diese Daten darauf hin, dass die Initiation nicht an den spät replizierenden Chromatinbereichen stattfindet.

Diese Schlussfolgerung wurde in einem weiteren Experiment getestet. Hierzu wurde eine asynchrone Zellkultur für 30 min mit CldU behandelt. Es wurden ausschließlich solche Zellen ausgewählt, welche sich in der mittleren S-Phase befanden und in denen die perinuklearen und perinukleolaren heterochromatischen Regionen repliziert hatten (Abb. 7B). Dann sollte getestet werden, ob diese Stellen mit den selben Chromatinbereichen co-lokalisieren, welche in der darauf folgenden S-Phase nach dem Entlassen aus dem Mimosinblock initiieren (Abb. 7B). Das Ergebnis zeigt klar, dass sich neue Replikationsfoci beim Eintritt in die S-Phase gebildet haben, welche jedoch

außerhalb der spät replizierenden heterochromatischen Bereichen liegen, die im vorhergehenden Zyklus markiert worden sind.

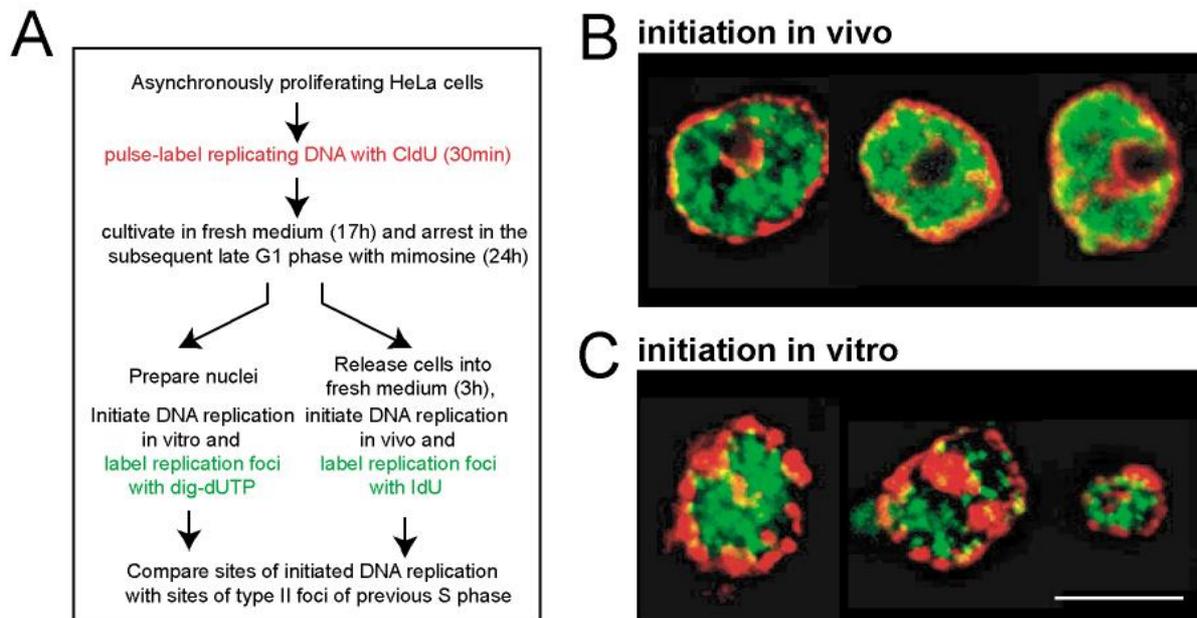


Abbildung 7. Die Initiation findet nicht an spät replizierenden Chromatinbereichen statt.

(A) Experimentelles Protokoll. (B) Immunfluoreszenzmikroskopie. Replizierende DNA wurde für 30 min mit CldU in vivo markiert, mit Mimosin in der späten G1-Phase arretiert und der Einbau mit CldU-spezifischen Antikörper detektiert (rot). Die Initiation in vivo im darauf folgenden Zellzyklus wurde durch den Einbau von IdU nachgewiesen (grün). (C) Initiation in vitro. Der Nachweis erfolgte durch den Einbau von dig-dUTP. Gezeigt werden späte (Typ II) S-Phase Zellkerne.

Als nächstes wurde getestet, ob diese heterochromatische Regionen auch in isolierten Zellkernen nach der Initiation in vitro von der Replikation ausgeschlossen werden (Abb. 7C). Auch hier sitzen die Replikationsfoci in benachbarten Bereichen, und co-lokalisieren nicht mit den spät replizierenden Chromatinbereichen.

Somit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die zeitliche Abfolge der Initiation der DNA-Replikation im zellfreien System rekapituliert wird. Euchromatische Bereiche werden zu einem frühen Zeitpunkt in der S-Phase repliziert, während heterochromatische Bereiche von der Initiation ausgeschlossen werden.

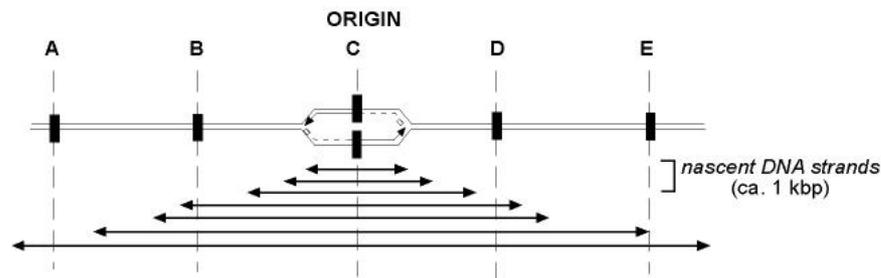
4.2 Sequenzspezifische Initiation der DNA-Replikation in isolierten Zellkernen

Bisher konnte gezeigt werden, dass die gleichen Chromatindomänen in einer zeitlich festgelegten Abfolge in der S-Phase repliziert werden. Nun war es interessant zu prüfen, ob die Initiation der Replikation an spezifischen Sequenzen des Humangenoms eingeleitet wird. Alternativ könnte die DNA-Replikation auch an eher zufällig ausgewählten Initiationsstellen am Chromatin eingeleitet werden.

Der am besten charakterisierte humane Origin, der solche Untersuchungen zulässt, befindet sich am 3'-Ende des *LMNB2* Gens und wird allgemein als Lamin B2 Origin bezeichnet (Biamonti et al., 1992a; Biamonti et al., 1992b; Giacca et al., 1994). Es ist zugleich der einzige humane Origin dessen Initiationsstartstellen sowohl für den Vorwärtsstrang als auch für den Rückwärtsstrang der DNA-Replikationsgabel auf das Nukleotid genau bestimmt wurden (Abb. 9, (Abdurashidova et al., 2000)). Die sequenzspezifische Initiation der DNA-Replikation soll anhand der quantitativen Analyse von nascent DNA untersucht worden. Das sind primäre einzelsträngige Replikationsprodukte, die an der Replikationsblase entstehen und auf das Vorkommen eines Origins hinweisen. Eine Anreicherung von Origin-Sequenzen bei einer Präparation der nascent DNA gegenüber Nicht-Origin-Sequenzen, lässt demnach auf einen aktiven Replikationsorigin schließen.

4.2.1 Der „Nascent Strand Abundance Assay“

Der Lamin B2 Origin bietet somit ein gutes Modellsystem, um die sequenzspezifische Initiation der DNA-Replikation im zellfreien System *in vitro* zu untersuchen.



Extraktion genomischer DNA aus proliferierenden HeLa Zellen
 ↓
 Denaturierung bei 85°C für 10 min
 ↓
 Auftrennung über 5-30% neutrale Saccharose-Gradienten
 ↓
 Isolierung von *nascent DNA strands* mit ca. 1 kbp Länge
 ↓
 Quantitative Real-time PCR

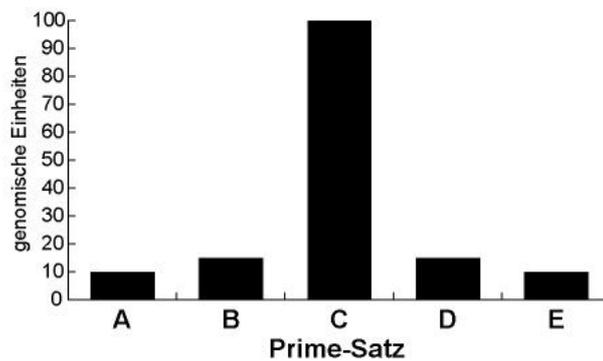


Abbildung 8. **Identifizierung von Replikationsstartstellen durch den „Nascent Strand Abundance Assay“.**

An der Replikationsblase der Initiationsstelle bilden sich neu synthetisierte DNA-Stränge („nascent DNA strands“) welche durch das Fortschreiten der Replikationsgabel bidirektional verlängert werden. Die nascent DNA wird aus einer Präparation von genomischer DNA über einen Saccharose-Gradienten isoliert. Eine Länge von 1 – 2 kbp der nascent DNA wird üblicherweise zur Identifizierung von Replikationsstartstellen benutzt. Das Vorkommen und die Anreicherung spezifischer Origin-Sequenzen lassen sich über die quantitative Real-time PCR bestimmen.

Es wurde ein modifiziertes Protokoll des „Nascent Strand Abundance Assay“ eingeführt, bei dem die Anreicherung von Origin-Sequenzen unter der Präparation von neusynthetisierten DNA-Strängen (nascent DNA) quantitativ über Echtzeit-PCR („Real-time PCR“) bestimmt wird. Die Quantifizierung von DNA-Templates durch Real-time PCR ist weit sensitiver als die bisher verwendete kompetitive PCR und zudem bei weitem effizienter. Ein Versuchsprotokoll dieses Assays ist in Abbildung 8 wiedergegeben.

Nascent DNA wird aus einer Präparation von genomischer DNA gewonnen. Die Präparation der DNA muss hierbei sehr sorgfältig erfolgen, um Strangbrüche zu vermeiden. Zur Isolierung von nascent DNA-Strängen wird die genomische DNA durch Erhitzen auf 85°C denaturiert. Die Auftrennung von nascent DNA erfolgt durch Ultrazentrifugation in einem Saccharose-Gradienten. Als Referenz wird auf einem parallelen Gradienten Marker-DNA aufgetragen, damit die einzelnen Fraktionen einer bestimmten DNA-Länge zugeordnet werden können (siehe Abb. 10A). Für die Analyse von Replikationsstartstellen werden DNA-Stränge mit einer durchschnittlichen Länge von 1 – 2 kbp aus den Gradienten isoliert. Diese Größe ist ideal, da kürzere DNA-Stränge Kontaminationen mit Okazaki-Fragmenten des Rückwärtsstranges Miteinschließen würden. Dagegen sind genomische Bruchstücke, welche durch Scherkräfte entstehen gewöhnlicherweise größer als 10 – 20 kb.

In der Abbildung 10A ist ein typischer Saccharose-Gradient mit Marker-DNA nach Fällung der entsprechenden Fraktionen und Auftragung auf ein Agarose-Gel dargestellt. Die Fraktionen 14 – 18 enthalten DNA-Moleküle mit einer Länge von etwa 1 – 2 kbp und wurden als Referenz für die Selektion der Fraktionen mit der nascent DNA genommen. Das ursprüngliche Protokoll dieses Assays sah vor, dass die nascent DNA nach der Isolierung aus den Saccharose-Gradienten über Säulenaffinitätschromatographie zusätzlich aufgereinigt wird. Dazu wurden die proliferierenden Zellen zuvor einer Puls-Markierung mit dem halogenierten Vorläuferrukleotid 5'-Bromodesoxyuridin (BrdU) ausgesetzt. Dieser wurde dann in Folge der DNA-Synthese in den replizierenden Strang eingebaut.

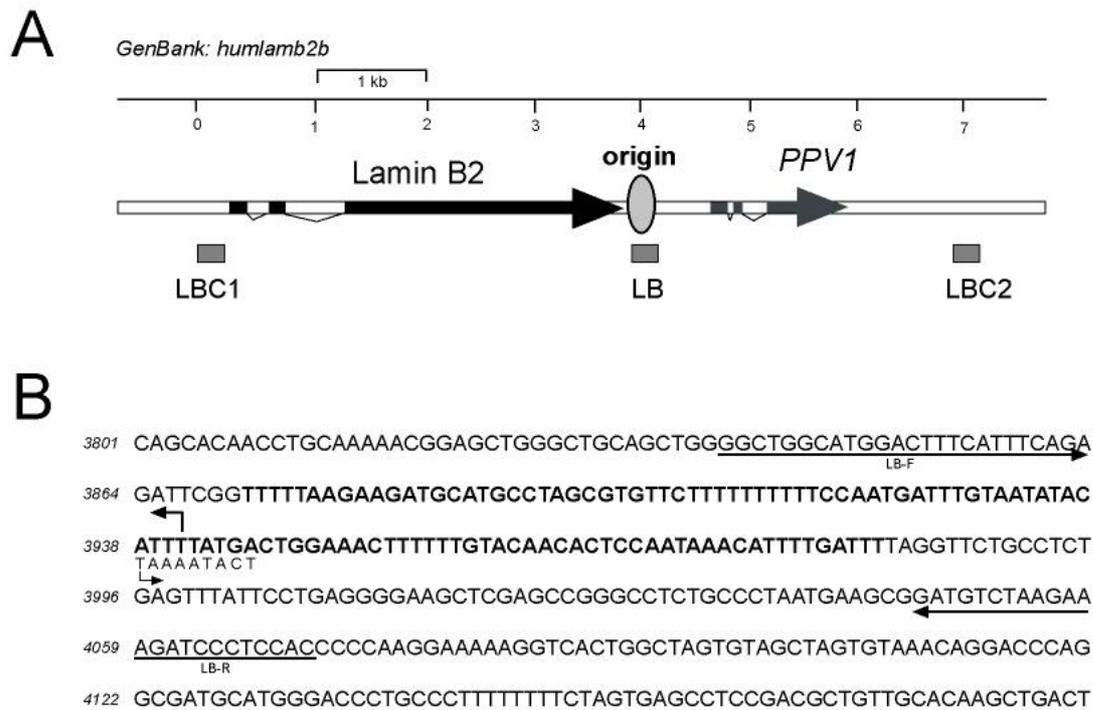


Abbildung 9. Der humane Lamin B2 Origin.

(A) Die DNA-Replikationsstartstelle befindet sich am 3'-Ende des *LMNB2* Gens und stromaufwärts eines funktionell noch nicht näher bekannten Gens, *PPV1*. Für die PCR-Analysen wurden insgesamt drei Primer-Sätze entworfen. Der Primer-Satz LB ist spezifisch für Sequenzen an der Initiationsstartstelle, die beiden Kontrollprimer-Sätze binden an Sequenzen 4 kbp stromaufwärts (LBC1) bzw. 3.5 kbp stromabwärts (LBC2) davon. (B) Sequenz der Initiationsregion (5'-3' Richtung). Die Binderegionen der LB Oligonukleotide sind unterstrichen. Eine A/T-reiche Region wurde in Fettschrift hervorgehoben. Die Startnukleotide für die bidirektionale DNA-Replikation sind durch Pfeile in den entsprechenden Richtungen markiert.

Die Aufreinigung erfolgte mit BrdU-spezifischen Antikörpern über Säulenchromatographie. Neuere Protokolle schlagen jedoch vor, diesen Aufreinigungsschritt nicht mehr durchzuführen, da BrdU sehr lichtsensitiv ist und Doppelstrangbrüche an der DNA induzieren kann (Giaccia et al., 1997).

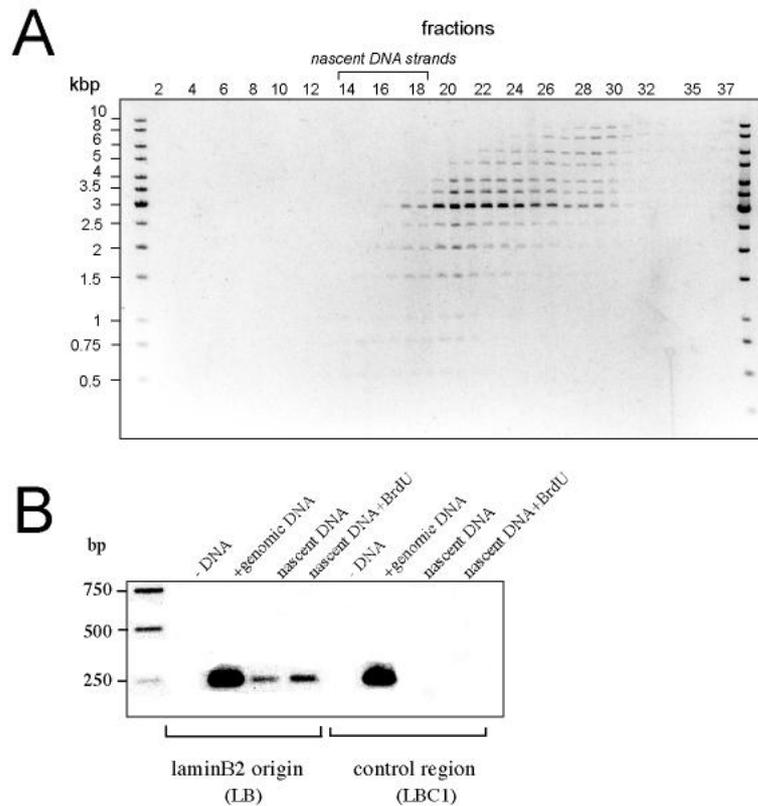


Abbildung 10. **Isolierung von nascent DNA aus Saccharose-Gradienten und PCR-Analyse am Lamin B2 Origin.**

(A) Marker-DNA (1 kbp Marker, MBI Fermentas) wurde als Referenz für die Isolierung von 1–2 kbp langen nascent DNA-Strängen auf einen parallelen Saccharose-Gradienten aufgetragen. Nach der Ultrazentrifugation wurden die 37 Fraktionen mit 99% Ethanol präzipitiert und die DNA auf ein 1% Agarose-Gel aufgetragen. Zur Sichtbarmachung der DNA mit UV-Licht, wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. (B) Anreicherung von Lamin B2 Origin-Sequenzen bei der nascent DNA Präparation. Die PCR wurde mit Primer-Sätzen durchgeführt, welche spezifisch zu Sequenzen bei der Initiationsstartstelle sind (LB) bzw. zu einer Region 4 kbp stromaufwärts davon (LBC1). Für weitere Details siehe auch Abbildung 9.

Zur Etablierung dieser Methode wurde daher zuerst aufgereingte BrdU-substituierte nascent DNA mit direkt präparierter nascent DNA verglichen. Dazu wurden 1 – 2 kbp lange DNA-Stränge aus den Gradienten isoliert und das Vorkommen von Lamin B2 Origin-Sequenzen in einer Standard-PCR qualitativ getestet (Abb. 10B). Die PCR wurden mit zwei Primer-Sätze durchgeführt (Abb. 10B). Der Primer-Satz LB ist spezifisch für Sequenzen, welche sich bei der Initiationsstelle des Lamin B2 Origins befinden. Als Kontrolle wurde der LBC1-Primer-Satz verwendet, der spezifisch zu Sequenzen etwa 4 kbp stromaufwärts von der Initiationsstelle ist (Abb. 9).

Zunächst wurden die Primer-Sätze mit genomischer DNA als Template in der PCR getestet. Die Amplifizierungsprodukte entsprachen den erwarteten Größen der Amplikons (LBC1: 240 bp und LB: 231 bp). Die Negativkontrolle (ohne DNA) zeigte kein durch Kontaminationen hervorgerufenen Amplifizierungsprodukt. Beim Einsetzen von nascent DNA als Template wurde spezifisch die Lamin B2 Origin-Sequenz und nicht die Kontrollsequenz amplifiziert. Des weiteren zeigte die Aufreinigung von BrdU-substituierter nascent DNA keine wesentliche Verbesserung in der Signalintensität und wurde daher bei den zukünftigen Experimenten nicht weiter durchgeführt.

Somit lassen sich mit der präparierten nascent DNA spezifisch Lamin B2 Origin Sequenzen, nicht aber entfernt benachbarte Sequenzen amplifizieren. Das bedeutet, dass die Origin-Sequenzen gegenüber Nicht-Origin-Sequenzen in der nascent DNA Präparation angereichert sind.

4.2.2 Quantitative Real-time PCR

Da mit qualitativen PCR-Assays nur recht ungenaue Schlussfolgerungen auf die exakte Anreicherung bestimmter DNA-Sequenzen zu machen sind, wird im folgenden Kapitel das Prinzip der quantitativen Real-time PCR beschrieben, welche es erlaubt die Menge von DNA-Molekülen in einer PCR-Reaktion zu bestimmen. Dies ist ein wesentlicher Punkt, da Ergebnisse aus unterschiedlichen PCR-Assays in denen mit verschiedenen Primer-Sätzen gearbeitet wurde, nur sehr schwer miteinander verglichen werden können. Dies hängt zum einen mit den unterschiedlichen Effizienzen zusammen, mit denen Oligonukleotide an ihre jeweilige Template-DNA binden und daher zu

verschieden hohen Amplifikationshöhen führen. Zur quantitativen Bestimmung von DNA-Molekülen in einer Reaktion wurde bis heute die kompetitive PCR benutzt (Giacca et al., 1997). Diese Methode basiert auf die Titration einer von der Konzentration bekannten Kompetitor-DNA mit der zu quantifizierenden Probe. Durch den Vergleich der Signalintensitäten der beiden PCR-Produkte in einem Agarose-Gel lässt sich die DNA-Menge der unbekannt Probe ermitteln. Hierbei ist jedoch schon die Limitierung dieser Methode erkennen. Ein Sichtbarmachen von DNA auf einem Gel benötigt, abhängig von der Molekülgröße der DNA, etwa 1000 – 2000 Template-Moleküle. Komplizierte Anwendungen wie der „Nascent Strand Abundance Assay“, bei denen wenige spezifische Sequenzen unter einer Vielzahl von unspezifischen Sequenzen quantifiziert werden sollen, können daher sehr schnell an die Nachweisgrenze der kompetitiven PCR gelangen.

Durch die Einführung der Echtzeit-PCR („Real-time PCR“), steht ein sensitives System zur Verfügung, mit dem verlässlich bis zu 50 Template-Moleküle reproduzierbar quantifiziert werden können. Der weitere Vorteil dieser Methode liegt darin, dass eine, für jede genomische Region, umständliche und zum Teil sehr zeitaufwendige Herstellung von Kompetitor-DNA nicht mehr notwendig ist. Im folgenden soll deshalb die quantitative Real-time PCR näher beschrieben werden, da sie die zu Beginn dieses Projektes benutzte kompetitive PCR vollständig abgelöst hat und in dieser Arbeit noch weitere wichtige Anwendungen finden wird.

Grundlage der Real-time PCR, welche mit dem Light-Cycler Instrument der Firma Roche durchgeführt wurde, ist die Benutzung eines interkalierenden fluoreszierenden Farbstoffes, SYBRGreenI, welcher sich spezifisch in die große Rinne doppelsträngiger DNA einlagert. Nach Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes in die DNA wird die emittierte Fluoreszenz nach Anregung mit einem Laser photometrisch gemessen. Eine Zunahme der gemessenen Fluoreszenz entspricht hierbei einer Zunahme von doppelsträngigen DNA-Molekülen in der PCR-Reaktion. Um ein exaktes Messen einer spezifischen Sequenz aus einer Vielzahl von genomischen Sequenzen zu gewährleisten, werden Oliognukleotide benötigt, die in der PCR ein einziges Amplikon erzeugen. Dies ist notwendig, da sich der SYBRGreenI Farbstoffe prinzipiell in jede Doppelstrang-DNA

einlagert. Die PCR-Produkte können auf ihre Reinheit durch eine Schmelzpunktanalyse sowie durch Gel-Elektrophorese kontrolliert werden (Abb. 11 A/B). Die Schmelzkurven werden mit Hilfe der Light-Cycler Software ermittelt (siehe unten).

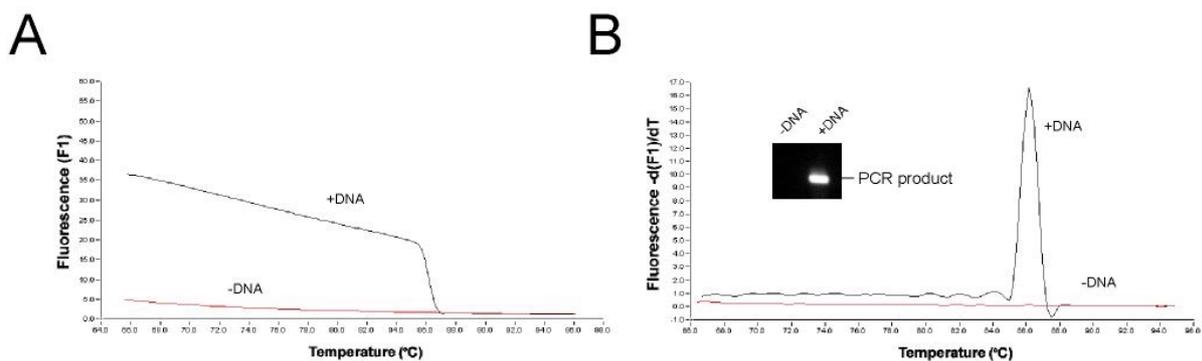


Abbildung 11. Schmelzkurvenanalyse eines PCR-Produktes nach einem PCR-Lauf im Light-Cycler.

(A) Ermittlung der Schmelztemperatur eines PCR-Produktes durch die Light-Cycler Software. Gezeigt sind die Ergebnisse von zwei Reaktionen am Ende eines PCR-Laufes. Als Template wurden 30 ng genomische DNA eingesetzt (+DNA) und als Negativkontrolle eine Reaktion ohne Template (-DNA). Mit zunehmender Temperatur wird die Doppelstrang-DNA in einzelsträngige DNA überführt, bis schließlich der Schmelzpunkt des Produktes ($T_M = 86^\circ\text{C}$) erreicht wird, was zu einem drastischen Abfall der Fluoreszenz führt. Bei Temperaturen oberhalb der Schmelztemperatur liegt das PCR-Produkt vollständig einzelsträngig vor (Nullfluoreszenz). Aufgetragen ist die Funktion $F1(T)$ der Fluoreszenz (Vertikalachse des Diagramms) in Abhängigkeit von der Temperatur T (Senkrechtachse). (B) Darstellung der Schmelzkurve bei Auftragung der negativen Ableitung der Fluoreszenzfunktion $F1$ ($-d(F1)/dT$) gegenüber der Temperatur T . Der Hochpunkt der Kurvenfunktion markiert den Median der Schmelztemperatur des PCR-Produktes. Das Auftragen der PCR-Reaktion auf einem Agarose-Gel resultiert nach der Ethidiumbromidfärbung in einer Monobande des spezifischen Produktes (siehe Gelausschnitt).

Zur Quantifizierung unbekannter Proben ist es notwendig, Bezugspunkte aus einer zuvor angelegten Standardkurve ableiten zu können. Die Standardkurve erhält man durch Anfertigen einer Verdünnungsreihe mit bekannten DNA-Konzentrationen (Abb. 12 A/B). Die Standards werden bei einem PCR-Lauf parallel mit den Proben angesetzt. Die PCR selbst verläuft sehr schnell, da die einzelnen PCR-Segmente nur wenige Millisekunden beanspruchen (siehe Material und Methoden). Am Ende der PCR-Laufes ermittelt die Light-Cycler Software aus den Standard-DNAs eine Standardgerade, mit der die Zahl der DNA-Moleküle von unbekanntem Proben ermittelt wird.

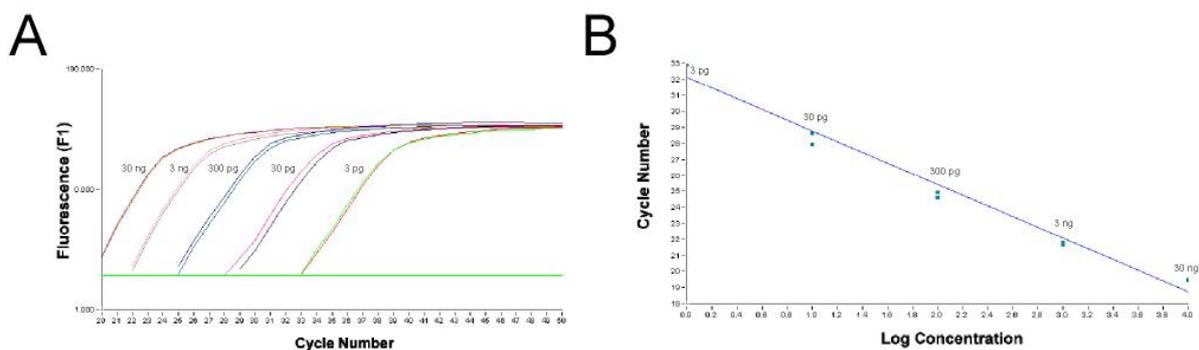


Abbildung 12. **Das Anfertigen einer Standardkurve als Bezugspunkt zur Quantifizierung von DNA-Templates.**

(A) Zunahme der Fluoreszenz des eingelagerten SYBR GreenI Farbstoffes in Abhängigkeit von der Zyklenzahl in der PCR. Zum Erstellen einer Standardgerade wird die genomische DNA seriell verdünnt, was folgenden genomischen Äquivalenten (GE = Genomische Einheiten; Kopien) entspricht: 30 ng (10 000 GE), 3 ng (1000 GE), 300 pg (100 GE), 30 pg (10 GE), 3 pg (1 GE). Von jeder Probe werden Doppelbestimmungen durchgeführt. (B) Ermittlung der Standardgeraden aus den Messdaten von (A). Die einzelnen Messpunkte sind als Quadrate dargestellt. Die Standardgerade wurde durch lineare Regression aus den Mittelwerten dieser Daten ermittelt. Aufgetragen ist die Zyklenzahl in Abhängigkeit von dem Logarithmus der Konzentration.

Für jede PCR-Reaktion werden Doppelbestimmungen durchgeführt, die zu Mittelwerten zusammengefasst und als „genomische Einheiten“ dargestellt werden (Abb. 12).

Abhängig von der Anfangsmenge der Template-DNA, werden sogenannte „crossing-points“ ermittelt. Diese entsprechen dem Schnittpunkt der Zyklenzahl mit dem Wendepunkt der Fluoreszenzkurven (Abb. 12A). Grosse DNA-Mengen führen demnach zu frühen „crossing-points“ und umgekehrt. Die „crossing-points“ unbekannter Proben lassen sich von der Standardgerade extrapolieren und damit lässt sich die exakte Anzahl der genomischen Äquivalente ermitteln.

Somit steht mit der Real-time PCR ein System zu Verfügung, mit dem selbst geringste DNA-Mengen in einer vorgegebenen Reaktion quantitativ erfasst werden können. Da bei jedem PCR-Lauf eine neue Standardkurve angefertigt wird, sind die Messungen unabhängig von den Schwankungen des Annealing- oder Schmelzverhaltens der einzelnen Oligonukleotide.

4.2.3 Initiation der DNA-Replikation am Lamin B2 Origin

Der „Nascent Strand Abundance Assay“ (Abb. 8) wurde in Verbindung mit der quantitativen Real-time PCR eingesetzt, um die Aktivierung des Lamin B2 Origins beim Eintritt in die S-Phase in isolierten Zellkernen zu untersuchen. Als Kontrolle wurde zuerst die Initiation des Origins *in vivo* untersucht.

Dazu wurde nascent DNA mit einer Länge von 1 – 2 kbp aus Mimosin-arretierten Zellen präpariert. (Abb. 13A; siehe auch Abb. 9). Um die Anreicherung von Origin-Sequenzen mit dem Light-Cycler zu ermitteln, wurden drei verschiedene Primer-Sätze verwendet: Der Primer-Satz LB ist spezifisch zu der Initiationsstelle des Origins, während die beiden benachbarten Primer-Sätze homolog zu Sequenzen 4 kbp stromaufwärts (LBC1) bzw. 3.5 kbp stromabwärts (LBC2) des Origins sind.

Die quantitative Analyse zeigt lediglich eine geringe Anreicherung von Lamin B2 Origin-Sequenzen gegenüber den benachbarten Regionen bei der präparierten nascent DNA (Abb. 13B, schwarze Säule).

Dies weist deutlich darauf hin, dass keine Initiation der DNA-Replikation am Origin während der Arretierung der Zellen mit Mimosin in der G1-Phase stattgefunden hat.

Als nächstes wurden die Zellen für drei Stunden aus dem Mimosinblock in die S-Phase entlassen, und aus diesen Zellen die nascent DNA präpariert. In dieser Präparation findet man eine mehr als 5-fache Anreicherung von Origin-Sequenzen gegenüber den Nachbarregionen (Abb. 13B).

Diese Daten weisen somit darauf hin, dass sich die Zellen nach der Arretierung durch Mimosin, in einem Zustand befinden, in dem der Origin nicht aktiviert ist. Nach dem Entlassen aus dem Block findet man jedoch eine Zunahme der DNA-Synthese am Origin, was auf eine erfolgte Aktivierung beim Eintritt in die S-Phase hindeutet.

Nun wurde getestet, ob der Lamin B2 Origin auch in isolierten Zellkernen *in vitro* aktiviert wird. Dazu wurden die Zellen in der G1-Phase mit Mimosin arretiert, und die daraus präparierten Zellkerne in cytosolischen Hela Zellextrakt für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurde aus diesen Zellen die nascent DNA präpariert und mit der quantitativen Real-time PCR wie oben beschrieben vermessen. Hierbei wurden etwa zehn Mal mehr Lamin B2 Origin-Sequenzen als benachbarte Sequenzen amplifiziert, was auf eine deutliche Origin-Aktivität hinweist (Abb. 13C).

Die größere Anreicherung *in vitro* lässt sich höchstwahrscheinlich durch die effizientere Entfernung von Mimosin in diesem System erklären. Intakte Zellen werden durch Zugabe von frischem Zellkulturmedium in die S-Phase entlassen, so dass sich wahrscheinlich noch wirksame Mengen von Mimosin im Inneren der Zelle befindet, während dies bei isolierten Zellkernen nicht der Fall ist.

Diese Daten liefern somit einen wichtigen Hinweis auf eine sequenzspezifische Initiation der DNA-Replikation im zellfreien System und in intakten Zellen. Darüber hinaus zeigen sie, dass der Lamin B2 Origin sehr früh in der S-Phase *in vivo* aktiviert wird und unterstützen damit unabhängig frühere Beobachtungen (Giacca et al., 1994).

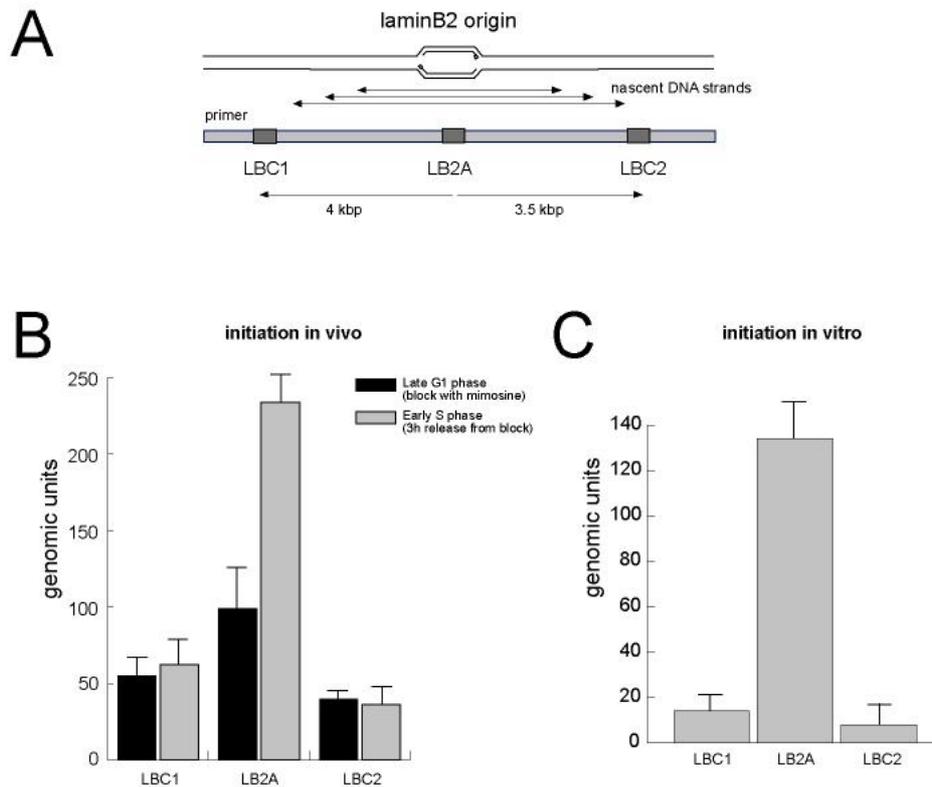


Abbildung 13. Sequenzspezifische Initiation der DNA-Replikation am Lamin B2 Origin in vivo und in vitro.

(A) Übersicht über den Lamin B2 Origin und die in der Real-time PCR benutzten Primer. Der Primer-Satz LB amplifiziert Sequenzen an der Initiationsstelle des Origins, die beiden benachbarten Primer-Sätze, LBC1 und LBC2, dienen als Kontrolle. (B) Initiation der DNA-Replikation in vivo. Quantitative Analyse von nascent DNA in der Real-time PCR. Nascent DNA wurde aus Mimosin-arretierten Zellen (schwarze Säulen) bzw. aus Zellen präpariert, welche für 3 h aus dem Mimosinblock in die frühe S-Phase entlassen wurden (graue Säulen). Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in „genomische Einheiten“ (Vertikalachse des Diagramms) dargestellt und zeigen die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten. (C) Initiation der DNA-Replikation in vitro. Die nascent DNA wurde Zellkernen isoliert, die für 3 h im cytosolischen Extrakt inkubiert wurden. Die Analyse erfolgte wie unter (B) beschrieben.

4.2.4 Der rDNA Locus wird nicht in der frühen S-Phase initiiert

Als nächstes wurde in Kooperation mit Oliver Hyrien, Paris, ein Origin untersucht, welcher zu einem späteren Zeitpunkt in der S-Phase aktiviert wird. Als Beispiel diente der rDNA Locus, welcher die Transkriptionseinheiten der humanen rRNA Gene auf den Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 trägt („rDNA Repeats“)(Little et al., 1993). Die humanen rRNA Gene werden etwa 400 mal an multiplen Stellen innerhalb eines 31 kbp großen nicht transkribierten Spacers repliziert, welcher die tandemartig angeordneten Transkriptions-Einheiten der 45S Vorläufer-rRNA voneinander trennt (siehe Abb. 14A) (Little et al., 1993). Genauere Initiationsstellen wurden durch unterschiedliche Techniken innerhalb einer 10 kbp großen Region stromaufwärts des rRNA Gen Promotors identifiziert (Gencheva et al., 1996; Larner et al., 1999; Yoon et al., 1995).

Die Promotorregionen der einzelnen Transkriptionseinheiten unterscheiden sich durch das Vorkommen einer polymorphen *EcoR I* Erkennungssequenz. Für eine Subpopulation wurde gezeigt, dass der rDNA Locus beim Fehlen dieser Sequenz früher repliziert, als bei der Population in der diese Sequenz vorhanden ist (Larner et al., 1999).

Im folgenden Experiment sollte daher das Auftreten von Replikationszwischenprodukten von beiden Populationen mit Hilfe der 2D-Gel-Elektrophorese untersucht werden. Diese Origin-Kartierungstechnik ist dem „Nascent Strand Abundance Assay“ vorzuziehen, da mit ihr der rDNA Locus bereits intensiv untersucht wurde und exakte Initiationsstellen, wie sie für eine PCR-Analyse benötigt werden, noch nicht bekannt sind.

Die 2D-Gel-Elektrophorese ist in ihren Varianten in (Brewer and Fangman, 1987) näher beschrieben worden und soll hier nur soweit es für das Verständnis erforderlich ist, wiedergegeben werden. An einem Origin befinden sich typische Replikationsstrukturen wie Replikationsblasen und Replikationsgabeln. In der 2D-Gelelektrophorese können diese Strukturen voneinander aufgetrennt und nachgewiesen werden. Die Replikationszwischenprodukte wurden aus Mimosin-arretierten G1-Phase Zellen, aus Zellen der frühen S-Phase (3 h nach dem Mimosinblock) und aus Zellen der mittleren S-Phase isoliert. Die Zwischenprodukte wurden mit den Restriktionsendonukleasen *EcoR*

I und *Hind III* geschnitten und durch 2D-Gel-Elektrophorese (neutral/neutral) analysiert (Abb. 14). In der ersten Dimension wurden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe von oben nach unten aufgetrennt, in der zweiten Dimension entsprechend ihrer molekularen Struktur von links nach rechts. Das Sichtbarmachen einzelner Replikationsstrukturen erfolgte über Autoradiographie mit einer radioaktiv markierten Hybridisierungsprobe (*EcoR I* Fragment B, siehe Abb. 14A).

Mit der hier angewendeten Technik lassen sich grundsätzlich zwei Formen von Replikationsstrukturen unterscheiden: Geschnittene Fragmente, die eine etablierte Replikationsgabel besitzen, wandern als so genannter „Y-Bogen“, während Fragmente mit einer zentral lokalisierten Replikationsblase als „O-Bogen“ wandern (Abb. 14B). Geschnittene Fragmente die keine Replikationsstrukturen enthalten, laufen entlang eines einheitlichen Bogens am unteren Gelrand (Abb. 14B/C). Einheitlich geschnittene DNA-Fragmente sind in einem definierten Slot am rechten Rand auf diesem Bogen lokalisiert (Abb. 14B/C).

Als erstes wurden die Replikationszwischenprodukte aus Mimosin-arretierten Zellen präpariert (G1-Phase; Abb. 14C). Die Replikationszwischenprodukte wurden mit den Restriktionsendonukleasen *EcoR I* und *Hind III* geschnitten und durch 2D-Gel-Elektrophorese analysiert. In diesen Zellen konnten keine Replikationsstrukturen in Form eines Y-Bogens oder O-Bogens nachgewiesen werden (Abb. 14C). Dies ist eine wichtige Kontrolle, da in der G1-Phase keine DNA-Replikation stattfinden sollte.

Als nächstes wurden die Replikationszwischenprodukte aus den Zellen isoliert, die für 3 h aus dem Mimosinblock entlassen wurden (S-Phase). Hier konnte lediglich ein schwacher Y-Bogen nachgewiesen werden, was auf das Vorkommen einer Replikationsgabel schließen lässt und somit auf eine bereits eingeleitete DNA-Replikation.

Dagegen konnte man einen sehr dominanten Y-Bogen bei den Zellen nachweisen, die sich in der mittleren S-Phase des Zellzykluses befanden.

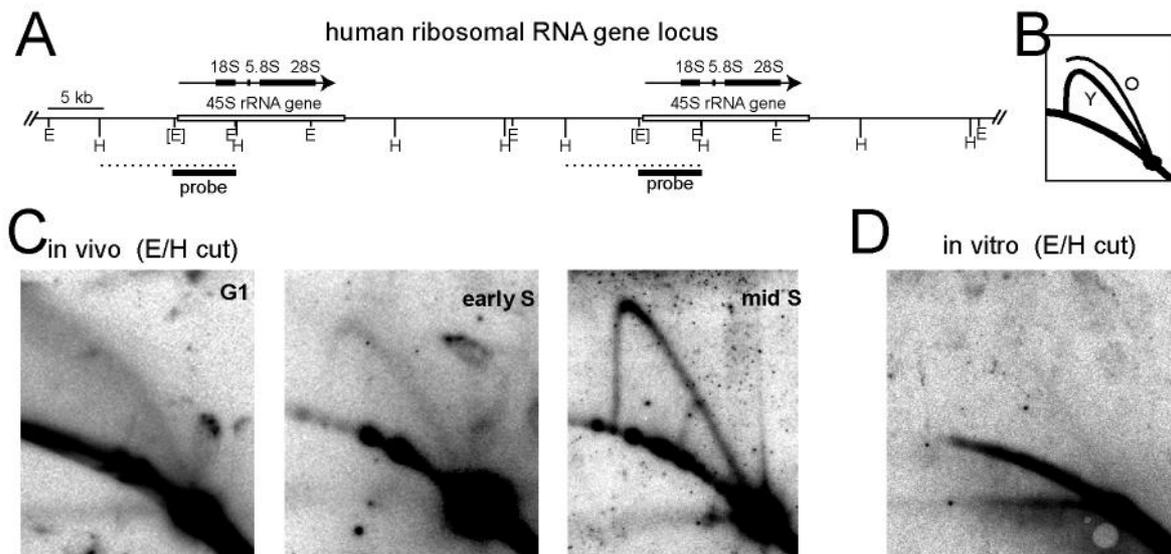


Abbildung 14. **Initiation der DNA-Replikation am rDNA Locus in der mittleren S-Phase in vivo und in vitro.**

(A) Übersicht über den rDNA Locus. Zwei der 45S Vorläufer rRNA Transkriptionseinheiten sowie der 31 kbp lange, nichttranskribierte Spacer sind dargestellt. Das 45S rRNA Gen ist durch eine weiße Box, die Transkriptionseinheiten durch einen unterbrochenen schwarzen Pfeil dargestellt. Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *EcoR I* (E) sowie *Hind III* (H) sind eingezeichnet. Eine *EcoR I* Sequenz ist polymorph und in [] Klammern dargestellt. Die Position der radioaktiv markierten Hybridisierungsprobe (*EcoR I* Fragment B, (Little et al., 1993)) ist als schwarzer Balken („probe“) und die Position des analysierten *EcoR I/Hind III* Fragmentes als unterbrochene Linie eingezeichnet. (B) Prinzip der 2D-Gel-Elektrophorese. Replikationsprodukte werden isoliert und mit Restriktionsendonukleasen geschnitten (siehe unter (A)). Fragmente mit einer etablierten Replikationsgabel wandern als Y-Bogen, während Fragmente mit einer Replikationsblase (und somit zwei etablierten Replikationsgabeln) als O-Bogen im Gel wandern. Lineare Fragmente ohne Replikationsstrukturen sind daher als Bogen am unteren Ende des Gels sichtbar. Vollständig geschnittene Fragmente mit einer einheitlichen Länge sind als definierter Punkt am rechten Rand auf diesem Bogen sichtbar. (C) Initiation der DNA-Replikation am rDNA Locus in vivo. Genomische DNA wurde aus Mimosin-arretierten Zellen (G1-Phase), aus Zellen welche für 3 h aus dem Block entlassen wurden (frühe S-Phase) und aus Zellen, welche für 3 h aus einem doppelten Thymidinblock (mittlere S-Phase) entlassen wurden, präpariert. Die Replikationszwischenprodukte wurden angereichert, mit den Restriktionsendonukleasen *EcoR I* und *Hind III* geschnitten und in zwei Dimensionen über Agarose-Gele (siehe Material und Methoden) aufgetrennt. Die Replikationszwischenprodukte wurden durch eine

Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Probe B (siehe oben) in der Autoradiographie sichtbar gemacht. (D) Analyse der DNA-Replikation am rDNA Locus in vitro. Zellkerne aus Mimosin-arretierten Zellen wurden in cytosolischen Extrakt von proliferierenden menschlichen Zellen für 3 h inkubiert. Die Replikationszwischenprodukte wurden mit der oben beschriebenen Hybridisierungsprobe in der Autoradiographie sichtbar gemacht. (Experimentelle Kooperation mit Oliver Hyrien, Paris).

Ein O-Bogen der auf das Vorkommen einer Replikationsblase schließen lassen würde, war nicht nachweisbar. Allerdings ließen sich auf dem früher replizierenden Restriktionsfragment des rDNA Locus neben dem Y-Bogen eine zentrale Replikationsblase und somit ein O-Bogen nach einer Hybridisierung mit den C_{HB} und C_{PE} Proben im Gel nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dieses Fragment stammt aus einer Region stromaufwärts des Promotors, in der auch die meisten Initiationsereignisse in diesem Locus detektiert worden sind (Little et al., 1993). Das Vorkommen von sowohl früh- als auch spät replizierenden Fragmenten in diesem Locus ist bekannt und bereits beschrieben worden (Larner et al., 1999).

Soweit wurde die Initiation der DNA-Replikation in den nicht transkribierten Spacerregionen des rDNA Locus in lebenden Zellen in vivo untersucht. Die Daten bestätigen frühere Arbeiten (Larner et al., 1999; Little et al., 1993), zeigen aber darüber hinaus, dass der rDNA Locus in der mittleren bis späten S-Phase repliziert und nicht zu Beginn der S-Phase wie der Lamin B2 Origin.

Als nächstes wurde die Bildung von Replikationsstrukturen im zellfreien System in vitro untersucht. Dazu wurden die Replikationszwischenprodukte aus den in Cytosol inkubierten Zellkernen wie oben beschrieben präpariert und behandelt. In Übereinstimmung mit den oben gefundenen Daten, fand keine DNA-Replikation in der frühen S-Phase in den isolierten Zellkernen statt (Abb. 14 D). Dies deutet darauf hin, dass die Initiation der DNA-Replikation beim Eintritt in die S-Phase sowohl in vivo als auch in vitro in isolierten Zellkernen zu einer Aktivierung von früh replizierenden Origins (z.B. Lamin B2 Locus) führt. Später replizierende Origins, wie es am Beispiel des rDNA Locus gezeigt wurde, werden nicht zu Beginn sondern erst im Verlauf der S-Phase aktiviert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Aktivierung von Replikationsorigins beim Eintritt in die S-Phase des Zellzykluses einer zeitlichen und

räumlichen Kontrolle unterworfen ist. Durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass neue Replikationsfoci in der frühen S-Phase etabliert worden sind. Die Initiation der DNA-Replikation hat hierbei in zwei aufeinanderfolgenden Zellzyklen an den selben Chromatindomänen stattgefunden, was darauf hindeutet, dass der zeitliche Ablauf der Initiation für jede Chromatindomäne eindeutig von der Zelle festgelegt ist. Die dabei markierten Chromatindomänen entsprechen dem Muster von sehr früh replizierenden Zellkernen (Typ I) (Nakayasu and Berezney, 1989). Spät replizierende Chromatindomänen, wie zum Beispiel heterochromatische Bereiche, waren nicht für die Initiation kompetent. Des weiteren liefern diese Ergebnisse Hinweise, dass die DNA-Replikation an spezifischen Sequenzen wie es am Beispiel des Lamin B2 Origins gezeigt werden konnte, eingeleitet wird. Auch scheint die Aktivierung der Origins in einer festgelegten Reihenfolge zu erfolgen, da der rDNA Locus erst im Verlauf der S-Phase aktiviert worden ist. Diese Ergebnisse konnten in vivo als auch im zellfreien „in vitro“-System rekapituliert werden.

4.3 Charakterisierung humaner Origin Recognition Complex (ORC) Proteine

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse der zeitlichen und räumlichen Koordination der Initiation der DNA-Replikation in einem menschlichen zellfreien „in vitro“-System, wobei eine sequenzspezifische Initiation an zwei humanen Origins (Faktoren in *cis*) gezeigt wurde. Im folgenden sollen die Proteinfaktoren untersucht werden, welche mit Origin-Sequenzen interagieren (Faktoren in *trans*).

Eine essentielle Komponente des Prä-Replikationskomplexes bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist der aus sechs Untereinheiten bestehende „Origin Recognition Complex“ (ORC) (Bell and Stillman, 1992; Lee and Bell, 1997). Erst in letzter Zeit wurden auch menschliche Homologe zu den ORC-Proteinen der Hefe identifiziert, was vermuten lässt, dass die Initiation der DNA-Replikation bei

mehrzelligen Eukaryonten nach einem ähnlichen Mechanismus verläuft wie bei den Hefen (reviewed in: (Dhar et al., 2001; Quintana and Dutta, 1999; Vashee et al., 2001).

Konservierte DNA-Sequenzen, ähnlich den ARS-Elementen in der Hefe, wurden jedoch beim Menschen nicht gefunden. Auch ist es nicht geklärt, ob der Origin Recognition Complex direkt an die Initiationsstelle eines Origins oder etwa in unabhängigen Chromatinregionen bindet.

Der zweite Teil dieser Arbeit soll sich daher nun der Charakterisierung der humanen ORC-Proteine in menschlichen Zellen widmen. Zuerst wird die Klonierung der cDNAs aller sechs Untereinheiten in prokaryontische und eukaryontische Expressionsvektoren beschrieben, um mit den dadurch erhaltenen Konstrukten die hORC1 – hORC6-Proteine rekombinant zu exprimieren. Im weiteren Verlauf sollen die Proteine analysiert und für die Herstellung von monospezifischen Antikörper, durch eine Immunisierung von Kaninchen, verwendet werden. Mit den erzeugten Antikörper sollen diese wichtigen Replikationsproteine in humanen somatischen Zellen zellbiologisch und biochemisch näher charakterisiert werden.

4.3.1 Klonierung der hORC1 – hORC6 cDNAs in Expressionsvektoren

Für die Expression der sechs menschlichen ORC-Proteine wurden die „full-length“ cDNAs in geeignete pro- und eukaryontische Expressionsvektoren kloniert. Die Expression wurde mit dem pRSET-Vektorsystem durchgeführt (Abb. 15). Dieser Vektor besitzt einen mit IPTG induzierbaren T7-Promotor sowie eine Gensequenz, welche für sechs Histidine stromaufwärts von der MCS (MCS = Multi Cloning Site) codiert. Das exprimierte Konstrukt kann so durch Nickel-Agarose Säulenchromatographie aufgereinigt werden. Für die Expression der humanen ORC-Proteine in Insektenzellen, wurden die cDNAs in einen Baculovirus-Expressionsvektor kloniert (pBlueBac-His2; Abb. 15). Dieser Vektor besitzt, neben zahlreichen anderen funktionellen Sequenzabschnitten, ein *lacZ* (β -Galaktosidase) Gen, um rekombinante Viren beim Plaque-Assay über die β -Galaktosidaseaktivität zu selektionieren (siehe Material und Methoden).

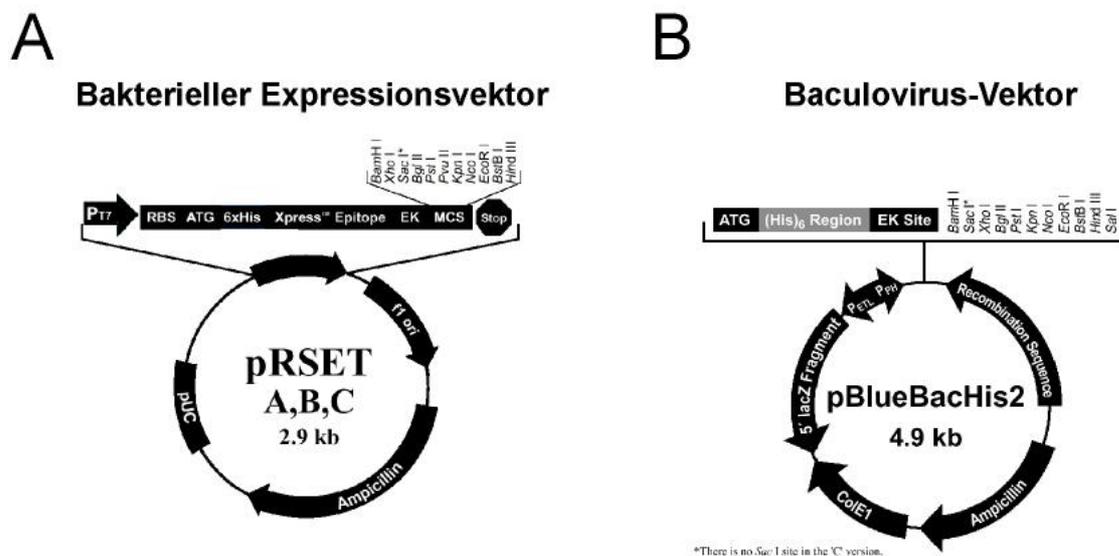


Abbildung 15. **Klonierung der hORC1 – hORC6 cDNAs in Expressionsvektoren.**

(A) Für die Expression in *Escherichia coli* BL21 RIL Zellen wurden die cDNAs von hORC3 – hORC6 in das pRSET Vektorsystem kloniert. Details über die Klonierung können aus der Tabelle 2 entnommen werden. Rekombinante Klone besaßen eine Resistenz gegenüber Ampicillin und konnten so selektiert werden. Die klonierte DNA wurden durch mehrere Kontrollverdaus mit Restriktionsendonukleasen sowie durch Sequenzierung überprüft. (B) Für die Expression in Insektenzellen wurden die cDNAs von hORC1 – hORC6 in den pBlueBacHis2 Vektor kloniert. Beide Vektoren exprimieren ein Polyhistidin am C-terminalen Ende des Konstruktes, was die Aufreinigung der rekombinanten Proteine durch Nickel-Agarose Säulenchromatographie ermöglicht.

Die Herkunft der einzelnen cDNAs, sowie die für die Klonierung benutzten Restriktionsendonukleasen, können aus der Tabelle 2 entnommen werden. Folgende Anmerkungen müssen hierzu gemacht werden: Die cDNAs von hORC1 und hORC2 befanden sich bereits in einem prokaryontischen Expressionsvektor (pRSET; kloniert von Martina Baack) und mussten daher lediglich in den Baculovirus-Vektor (pBlueBacHis2) umkloniert werden. Die cDNAs von hORC3 und hORC6 wurden aus geeigneten humanen cDNA-Bibliotheken durch PCR amplifiziert, wobei die ersten 10 C-

terminalen Aminosäuren von hORC3 durch die Herstellung eines entsprechend codierenden PCR-Oligonukleotids ergänzt werden mussten (siehe Material und Methoden). Die cDNAs von hORC4 und hORC5 stammen aus dem Labor von A. Dutta, Boston. Sämtliche Klonierungsschritte wurden durch geeignete Restriktionsverdau und durch Sequenzierung überprüft (Daten nicht gezeigt).

Durch die erfolgreiche Klonierung der cDNAs in die erwähnten Expressionsvektoren, wurde die de novo Synthese der sechs humanen ORC-Proteine in prokaryontische und eukaryontische Expressionssystemen möglich.

cDNA	Herkunft	Länge (bp)	Vektor (prok.) pRSET	Vektor (euk.) pBlueBac	Insertion
hORC 1	pKG28 Kim Gavin	2585	B	B	<i>BamH I/ HindIII</i>
hORC 2	MHC1H2 Masumi Hidaka	1733	B	B	<i>Bgl II/Nco I</i>
hORC 3	pT7T3D-Pac (cDNA- Bibliothek)	2135	A	A	<i>Kpn I/BamH I</i>
hORC 4	pBlueScript (Dutta)	1310	A	A	<i>Xho I/Sac I</i>
hORC 5	pBlueScript (Dutta)	1307	B	B	<i>BamH I/Kpn I</i>
hORC 6	Hela cDNA-Bibliothek	758	C	C	<i>Xho I/Hind III</i>

Tabelle 2. Herkunft, Länge und benutzte Restriktionsendonukleasen für die Klonierung der „full-length“ cDNAs von hORC1 - hORC6 in geeignete Expressions-Vektorsysteme.

4.3.2 De novo Synthese von rekombinaten hORC1 – hORC6 Proteine

Für die Erzeugung von spezifischen Antikörper wurden die humanen ORC-Proteine in Bakterien bzw. Insektenzellen rekombinant exprimiert. Mit dem pRSET Vektorsystem wurde der größte Teil der Proteine in einer unlöslichen Form exprimiert, was jedoch für eine Immunisierung von Kaninchen sehr günstig ist.

Im folgenden Experiment wurden hORC3 und hORC4 in *Escherichia coli* RIL21 Zellen exprimiert (Abb. 16). Beide Proteine wurden in großen Mengen von den Bakterienzellen nach der Induktion synthetisiert und befanden sich als „inclusion bodies“ in der unlöslichen Fraktion. Die Proteine wurden direkt auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und über eine Coomassie Färbung analysiert. Das Wanderungsverhalten von ORC4-His im Gel entsprach dem erwarteten Molekulargewicht. Die Expression von ORC3-His führte allerdings zu einem verkürzten Produkt bei etwa 50 kDa und nicht bei den erwarteten 72 + 10 (His) kDa. Da dies auch bei der Expression in Insektenzellen beobachtet wurde (siehe Abb. 17 und Abb. 18), ist es naheliegend zu vermuten, dass bei der reversen Transkription zur Herstellung der cDNA, ein Codon zu einem Stopcodon mutiert worden ist. Bei der Herstellung von Antikörper hat dieses verkürzte Protein jedoch keine Auswirkungen.

Die Expression von hORC5 und hORC6 war in den benutzten Bakterienstämmen nicht zufriedenstellend (Daten nicht gezeigt), so dass für die Immunisierung exprimierte und aufgereinigte Proteine aus Insektenzellen benutzt wurden (Abb. 17).

Biochemische Untersuchungen an gereinigten Proteinen benötigen eine effiziente Expression in einen möglichst nativen Zustand. Prokaryontische Expressionssysteme sind für solche Untersuchungen nur sehr begrenzt einsetzbar, da funktionell notwendige chemische Modifikationen an den Proteinen von der Bakterienzelle nicht durchgeführt werden können. Die Expression der humanen ORC1 – ORC6 Proteine in eukaryontische Insektenzellen erlaubt es jedoch, einzelne ORC-Proteine in ihren weitgehend nativen Zustand zu untersuchen. Des Weiteren kann durch eine Co-Expression der ORC-Proteine, eine Analyse der Komplexbildung erfolgen, um so weitere Erkenntnisse über dessen Zusammensetzung in vivo zu erhalten.

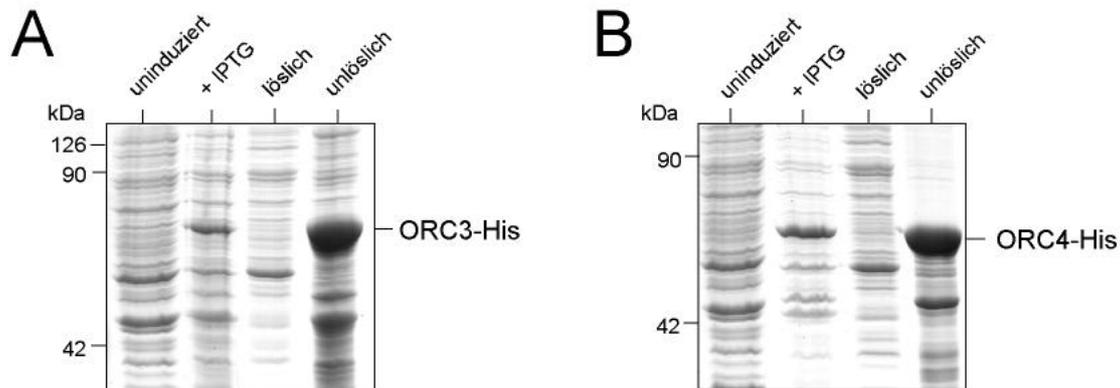


Abbildung 16. **Expression von hORC3 und hORC4 in *Escherichia coli* RIL21 Zellen.**

Bakterienzellen wurden mit den pRSET-hORC3 und pRSET-hORC4 Vektorkonstrukten transformiert und zur Expression der rekombinanten Proteine mit IPTG induziert. Proben von uninduzierten und induzierten Bakterienkulturen wurden abgenommen und in Lämmli-Puffer für eine Analyse durch SDS-Page denaturiert. Lösliche und unlösliche Fraktionen wurden wie unter Material und Methoden beschrieben präpariert und parallel auf das Gel aufgetragen. (A) Expression eines verkürzten hORC3-His. Die Proben wurden über ein 12% SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie zur Sichtbarmachung der Proteine gefärbt. (B) Vollständige Expression von hORC4-His.

Bei dem Experiment in Abbildung 17 wurden die hORC1 – hORC6 Konstrukte in Insektenzellen exprimiert und die löslich exprimierten Proteine über eine Nickel-Agarose Säule aufgereinigt. Die aufgereinigten Proteine wurden anschließend durch SDS-Page aufgetrennt und über eine Silberfärbung bzw. im Western Blot mit einem Antikörper, der spezifisch für die Polyhistidine ist, nachgewiesen.

Die Expression von hORC2, hORC4, hORC5 und hORC6 ist sehr effizient verlaufen und die Produkte wandern im Gel entsprechend den erwarteten Molekulargewichten. Das ORC1-Protein wird deutlich schwächer als die der restlichen ORC-Proteine in löslicher

Form exprimiert. Tatsächlich ist der Großteil von hORC1 in der unlöslichen Fraktion vorhanden (Daten nicht gezeigt). Die geringeren Mengen an nachweisbaren hORC1 lässt sich vermutlich auch durch die Instabilität des Proteins in menschlichen Zellen erklären, welches während der S-Phase des Zellzykluses durch einen noch unbekanntem Mechanismus abgebaut wird (Kreitz et al., 2001; Mendez and Stillman, 2000; Natale et al., 2000). Es ist daher davon auszugehen, dass auch das hORC1-Protein in Insektenzellen einem solchen Degradationsmechanismus unterworfen ist. Das ORC3-Proteine wurde, wie in Bakterienzellen, nur in seiner verkürzten Form exprimiert.

Mit Ausnahme von hORC3, können somit alle sechs humanen ORC-Proteine erfolgreich in voller Länge in dem eukaryontischen Expressionssystem de novo synthetisiert werden. Mit den exprimierten Proteinen können nun biochemische Untersuchungen gemacht werden, um die Interaktion der Proteine zu untersuchen, bzw. um sie für die Herstellung von spezifischen Antikörper zu benutzen.

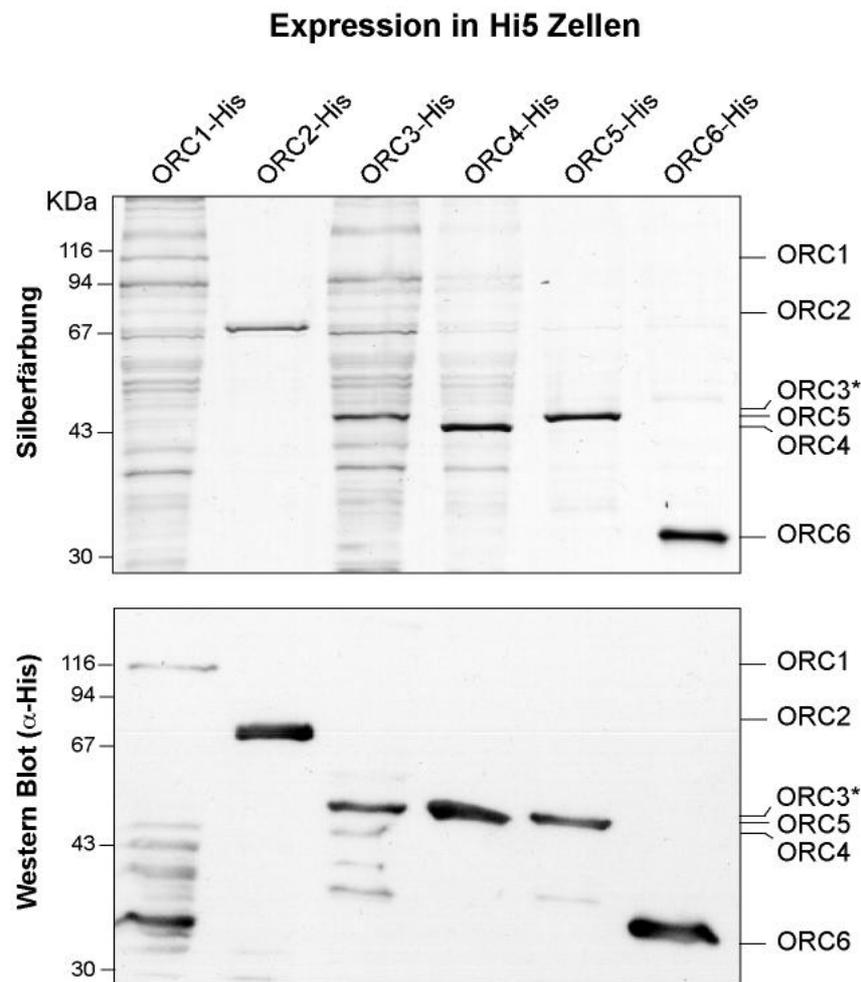


Abbildung 17. **Expression von hORC1 – hORC6 in Hi5 Insektenzellen.**

Die Vektorkonstrukte mit den cDNAs von hORC1 – hORC6 wurden in Baculoviren transformiert. Rekombinante Viren wurden anhand des Plaque-Assays selektiert und zur Infektion von Insektenzellen verwendet. Die löslich exprimierte rekombinante Proteine wurden aus Zellextrakten isoliert, über eine Nickel Agarose-Säule aufgereinigt und durch SDS-Page aufgetrennt. Oben: Nachweis der löslich exprimierten hORC1– hORC6 Proteine nach einer Silberfärbung des Gels. Das verkürzte hORC3-Produkt ist mit einem Sternchen gekennzeichnet. Unten: Nachweis der exprimierten Proteine im Western Blot über deren Polyhistidin-Taq mit einem His-spezifischen Antikörper. Molekulargewichte der nativen ORC-Proteine: hORC1: 118 kDa; hORC2: 69 kDa; hORC3: 72 kDa; hORC4: 45 kDa; hORC5: 50 kDa; hORC6: 33 kDa

4.3.3 Herstellung monospezifischer Antikörper gegen die humanen ORC-Proteine

Für zellbiologische und biochemische Untersuchungen von zellulären Proteinen sind spezifische Antikörper unerlässlich. Antikörper gegen das hORC1 und hORC2 standen bereits im Labor zur Verfügung. Gegen hORC3, hORC4, hORC5 und hORC6 mussten neue Antikörper generiert werden. Mit den oben beschriebenen rekombinanten Proteinen wurden Kaninchen insgesamt 5 – 6 mal in einem Rhythmus von drei Wochen subkutan immunisiert. Die Seren wurden jeweils 10 Tage nach jeder erfolgten Immunisierung auf ihren Antikörpergehalt getestet und das Endserum über Antigengekoppelte Säulen aufgereinigt (Daten nicht gezeigt).

Die so erhaltenen Antikörper wurden mit rekombinanten Proteinen auf ihre Spezifität getestet (Abb. 18). Alle Proteine konnten, entsprechend ihrer Molekulargewichte, mit den erzeugten Antikörper nachgewiesen werden.

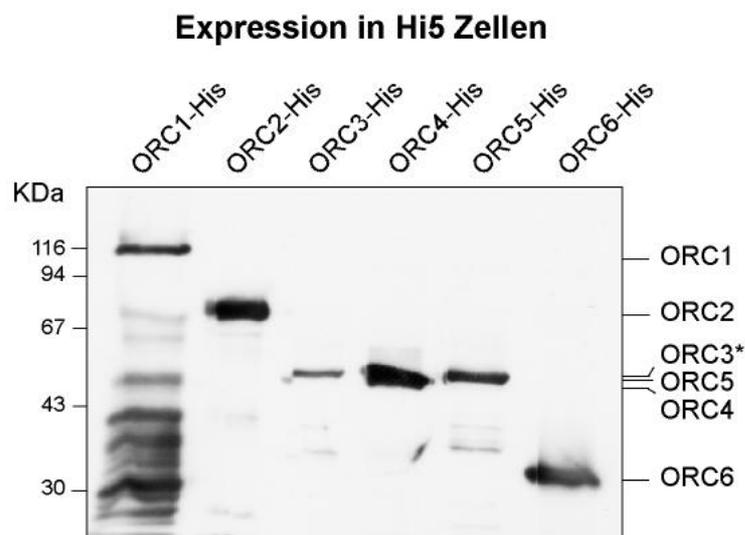


Abbildung 18. **Herstellung von monospezifischen Antikörper gegen hORC3 – hORC6.**

Die Antikörper wurden über Säulenchromatographie monospezifisch aufgereinigt und mit den in Insektenzellen rekombinant exprimierten ORC-Proteinen auf ihre Spezifität getestet (siehe Abb. 17). Der Stern markiert das verkürzte ORC3-Protein.

4.4 Intrazelluläre Lokalisierung humaner ORC-Proteine

In niederen Eukaryonten wurde gezeigt, dass die ORC-Proteine der grundlegende Bestandteil des Prä-Replikationskomplexes sind, der schrittweise während der G1-Phase aufgebaut wird (Bell and Stillman, 1992; Rowley et al., 1995). Die ORC-Proteine sind während des gesamten Zellzykluses an das Chromatin gebunden, während andere Komponenten des Initiationskomplexes, wie zum Beispiel die MCM-Proteine, in der S-Phase vom Chromatin abgelöst werden (Aparicio et al., 1997). Auch in *Xenopus* oder *Drosophila* sind die ORC-Proteine mit Chromatin assoziiert (Rowles et al., 1999; Royzman et al., 1999; Tugal et al., 1998). Bislang gab es nur für einzelne humane ORC-Proteine Hinweise auf eine Assoziierung mit Chromatin (Kreitz et al., 2001; Mendez and Stillman, 2000; Natale et al., 2000; Quintana and Dutta, 1999; Ritzi et al., 1998), wobei die intrazelluläre Lokalisation aller sechs ORC-Proteine systematisch noch nicht untersucht wurde.

In einem ersten grundlegenden Experiment wurde das Vorkommen der hORC1 – hORC6 mit Hilfe der oben aufgereinigten monospezifischen Antikörper in menschlichen somatischen Zellen untersucht (Abb. 19). Dazu wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt, bei der die einzelnen Kompartimente einer Zelle aufgetrennt werden. Die so erhaltenen Fraktionen schließen das Cytosol, das Nukleosol, das Chromatin und die Zellmatrix ein. Chromatin-gebundene Proteine werden durch eine sequentielle Behandlung mit steigenden NaCl-Konzentrationen vom Chromatin eluiert. Die Protein-Gesamtmengen sind in den einzelnen Kompartimenten unterschiedlich groß (Abb. 19B). Der Nachweis der einzelnen ORC-Proteine in der Zelle erfolgte durch Western-Blot Experimente unter Verwendung der hergestellten monospezifischen Antikörper.

Alle sechs humanen ORC-Proteine konnten mit 250 mM NaCl vom Chromatin abgelöst werden (Abb. 19A). hORC2 - hORC6 konnten dabei schon in signifikanten Mengen in der 100 mM NaCl Fraktion nachgewiesen werden. Eine weitere Population von hORC1, und geringe Mengen von hORC2, hORC3 und hORC4 befanden sich in dem 450 mM NaCl-Eluat, was darauf hinweist, dass ORC auch in den dichter gepackten heterochromatischen Bereichen, welche resistenter gegen NaCl-Behandlung sind,

gebunden ist. Tatsächlich wurde in *Saccharomyces cerevisiae* eine Assoziierung von ORC-Proteinen mit Komponenten des Heterochromatins gefunden (Triolo and Sternglanz, 1996). Des weiteren konnte in *Drosophila* eine Interaktion des N-Terminus von ORC1 mit dem Heterochromatin Protein 1 (HP1) nachgewiesen werden (Pak et al., 1997).

Es ist somit sehr wahrscheinlich dass auch humane ORC-Proteine Bestandteil des Heterochromatins sind, was zu einer stärkeren Resistenz bei der Salz-Elution führen würde. Diese schon sehr frühe Schlussfolgerung wird in einem späteren Teil dieser Arbeit bestätigt (siehe Abb. 33).

Während hORC1 – hORC5 ausschließlich als Chromatin-gebundene Proteine nachweisbar sind, können beträchtliche Mengen des hORC6-Proteins in löslicher Form im Cytosol und im Nukleosol nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wurde auch in einer unabhängigen Arbeit bestätigt (Dhar and Dutta, 2000). Die Klärung der Funktion dieser löslichen Form von ORC6 bedarf sicherlich weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend können somit alle sechs humanen ORC-Proteine am Chromatin nachgewiesen werden. Die Co-Elution nach Behandlung mit 250 mM Salz lässt die Vermutung zu, dass diese Proteine in ähnlichen Chromatinregionen lokalisiert sind.

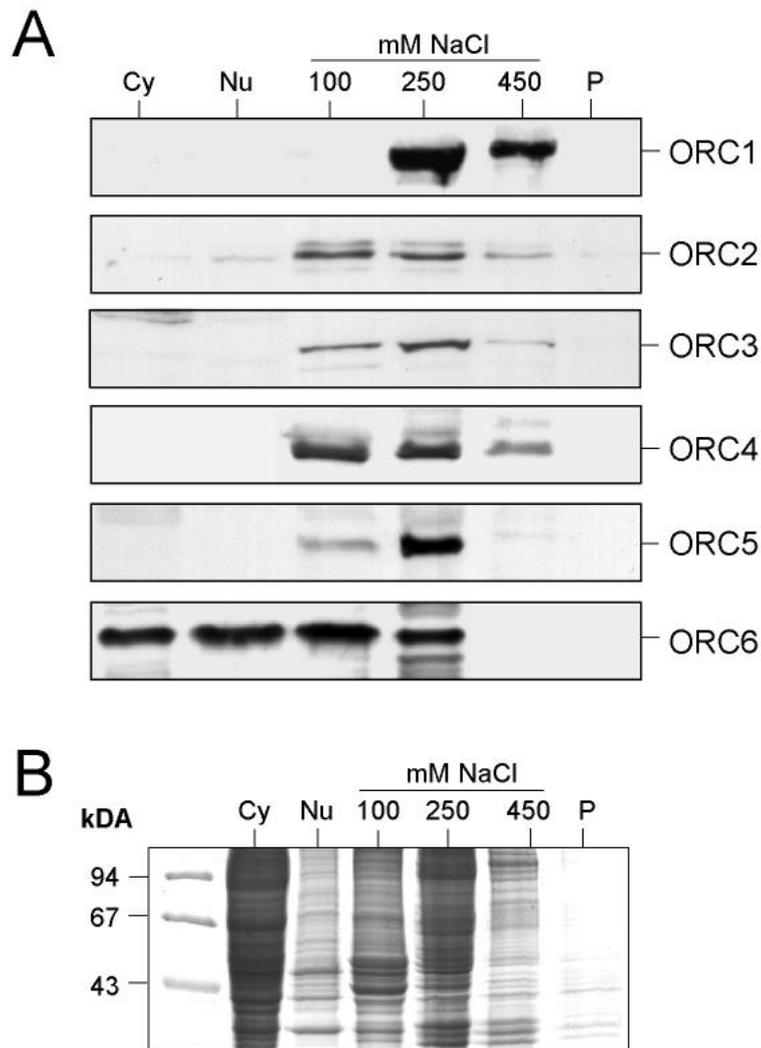


Abbildung 19. **Intrazelluläre Lokalisierung humaner ORC-Proteine.**

Menschliche somatische HeLa Zellen wurden in verschiedenen Fraktionen aufgeteilt, welche als Cytosol (Cy), Nukleosol (Nu), Chromatin sowie Zellmatrix (P) hervorgehen. Chromatin-gebundene Proteine wurden mit steigenden Konzentrationen von NaCl eluiert. (A) Nachweis von hORC1 – hORC6 in den einzelnen Zellkompartimenten. Gleiche Mengen der einzelnen Fraktionen wurden über SDS-Page aufgetrennt und für Western Blot Experimente auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die einzelnen ORC-Proteine wurden mit spezifischen Antikörper nachgewiesen. (B) Nachweis der Gesamtproteinmenge in den Zellkompartimenten. Gleiche Mengen der einzelnen Fraktionen wurden über SDS-Page aufgetrennt und über eine Färbung mit dem Farbstoff Coomassie sichtbar gemacht.

4.5 ORC-Proteine co-lokalisieren an gleichen Chromatin-Stellen

Eine wesentliche Funktion von ORC in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besteht darin, Origins für die Bildung von Prä-Replikationskomplexen zu markieren (Bell and Stillman, 1992). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in *Drosophila* gemacht, in der ORC-Proteine mit einem stark replizierenden Chorion-Kontrollelement assoziiert sind (ACE3) (Austin et al., 1999).

So sehr diese Ergebnisse Hoffnung machten, dass die Initiation der DNA-Replikation in multizellulären Organismen ähnlich verläuft wie bei den niederen Eukaryonten, so schwer blieb es bis heute nachzuweisen, dass ORC-Proteine mit Origin-Sequenzen assoziiert sind. Die Ursachen liegt in den methodischen Limitationen und der Größe des Genoms, welches im Falle des Menschen größer als 3 Mrd. Basenpaaren ist.

Der nächste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Identifizierung von Binderegionen des Origin Recognition Complex im menschlichen Genom. Es wird ein neues Protokoll des Chromatin-Immunpräzipitations-Assay beschrieben (ChIP-Assay), mit dem es möglich ist, über PCR-Methoden Sequenzen zu analysieren, welche mit den ORC-Proteinen in vivo assoziiert sind. Spannend wird insbesondere die Frage sein, ob die Startstellen der bidirektionalen DNA-Replikation im Humangenom durch die Bindung des Origin Recognition Complex in vivo markiert werden, und ob ORC möglicherweise weitere Funktionen in der Zelle hat. Die Beantwortung dieser Fragen, würde dem Verständnis der Initiation der DNA-Replikation des Menschen einen wesentlichen Schritt nach vorne bringen.

4.5.1 Der Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay)

Der Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP) erlaubt die Untersuchung von DNA-bindenden Proteinen, wie zum Beispiel einem Transkriptionsfaktor mit den DNA-

Sequenzen, an denen sie gebunden sind (Fackelmayer and Richter, 1994; Göhring and Fackelmayer, 1997; Orlando, 2000). In dieser Arbeit soll die Interaktion von ORC mit genomischen Sequenzen untersucht werden.

Dazu musste zuerst eine stabile molekulare Bindung zwischen den ORC-Proteinen und der DNA-Bindestelle *in vivo* hergestellt werden. Dies erreicht man durch eine kurze Behandlung von proliferierenden somatischen Zellen einer Zellkultur mit Formaldehyd. Durch die Formaldehydbehandlung werden in der Zelle Protein-DNA- und Protein-Protein Kontakte durch Einführen einer über ein Sauerstoffatom vermittelte kovalenten Atombindung hergestellt. Diese Methode wird in der Literatur als „*in vivo cross-linking*“ (Kreuzvernetzung) bezeichnet (Crane-Robinson et al., 1999; Orlando, 2000). Bei kurzen Inkubationszeiten mit Formaldehyd werden daher hauptsächlich Bindungen zwischen direkten Interaktionspartnern hergestellt. Im Falle der ORC-Proteine ist das die Kreuzvernetzung von ORC an die DNA-Bindestelle bzw. von Proteinen, die mit ORC-Proteinen interagieren.

Ein Schema dieser Methode ist in Abbildung 20 wiedergegeben. Hela Zellen werden für 4 min mit 1% Formaldehyd behandelt. Die Zellkerne werden aus den Zellen isoliert und mit Salz-haltigen Puffern gewaschen, um nicht-kreuzvernetzte Proteine vom Chromatin zu entfernen. Die Nukleoproteine werden schließlich nach der Ultrazentrifugation aus CsCl-Gradienten präpariert. Freie Proteine befinden sich im oberen Teil, freie DNA im unteren Teil des Gradienten. Zum Lösen des dichten Nukleoprotein Netzwerkes, wird das Material mit Ultraschall behandelt (Sonifizierung).

Um die Binderegionen einer bestimmten genomischen Region zuordnen zu können, wurden die Nukleoproteine mit einer Endonuklease auf eine Größe < 1 kbp geschnitten. Diese Größe hat sich bei der Anwendung von PCR-Methoden für die Amplifizierung als optimal herausgestellt (siehe Abb. 26). Die Fragmentierung wird durch eine kontrollierte Behandlung der Nukleoproteine mit dem Enzym *Micrococcus* Nuklease erreicht. Die eingeführten Schnitte befinden sich hauptsächlich in Regionen, in denen die DNA nicht mit Proteinen besetzt ist und daher für das Enzym zugänglich sind. Die Behandlung der Nukleoproteine mit *Micrococcus* Nuklease hat den weiteren Vorteil,

dass unspezifische Kreuzvernetzungen eines Nukleoprotein-Netzwerks weitgehend aufgelöst werden.

Die mit den ORC-Proteinen assoziierte DNA-Fragmente können nun mit ORC-spezifischen Antikörper aus der Gesamtpopulation der Nukleoproteine präzipitiert werden. Im Präzipitat befinden sich daher, nach einem erfolgreichen Verlauf der Immunpräzipitation, ORC-DNA Nukleoproteinkomplexe. Die DNA kann aus diesen Komplexen extrahiert und weiter aufgereinigt werden. Mit Hilfe der LM-PCR (LM = Ligation-mediated⁶), können die präzipitierten DNA-Fragmente amplifiziert werden (Bibliothek mit ORC-DNA). Die präzipitierte DNA kann so direkt kloniert und durch Sequenzierung analysiert werden, oder alternativ, auf das Vorkommen bestimmter Sequenzen über quantitative PCR untersucht werden. Um Wechselwirkungen der ORC-Proteine nachzuweisen, können darüber hinaus die präzipitierten Proteine durch Western Blot Experimente weiter untersucht werden.

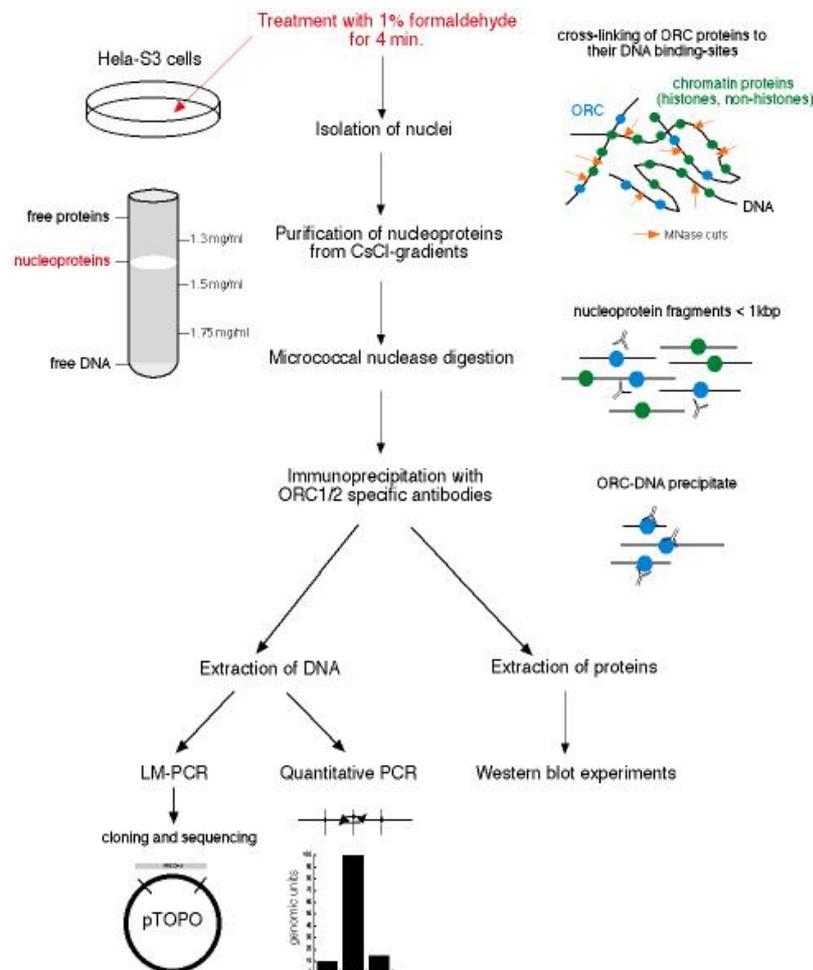


Abbildung 20. Flusschema des Chromatin-Immunpräzipitations-Assay (ChIP-Assay).

Die ORC-Proteine werden kovalent an ihre Bindestellen in vivo durch eine Kreuzvernetzung mit Formaldehyd gebunden. Die entstandenen Nukleoproteinkomplexe werden über CsCl-Gradienten aufgereinigt und durch Ultraschallbehandlung in Lösung gebracht. Um DNA-Fragmente < 1 kbp zu erhalten, werden die Nukleoproteine mit Micrococcus Nuklease behandelt. ORC-DNA Komplexe lassen sich durch ORC-spezifische Antikörper präzipitieren und die DNA bzw. die Proteine vom Präzipitat extrahieren. Die DNA kann über PCR-Methoden weiter untersucht werden. Proteine können in Western Blot Experimenten analysiert werden.

4.5.2 Die Kreuzvernetzung von ORC-Proteine an die DNA

Als erstes wurde die Spezifität der Kreuzvernetzung untersucht. Nukleoproteine wurden aus CsCl-Gradienten präpariert und mit Ultraschall behandelt. Die Länge der DNA-Fragmente betrug nach dem Sonifizieren 200 bp - 10 kbp (Abb. 21A). Die Nukleoproteine wurden unter kontrollierten Bedingungen mit *Micrococcus* Nuklease behandelt, um Chromatinfragmente < 1 kbp zu erhalten (Abb. 21A). Der überwiegende Teil der DNA wurde zu kleinen DNA-Fragmenten (< 200 bp) geschnitten. Dies würde man auch erwarten, da nur ein relativ geringer Teil der DNA mit größeren Proteinkomplexen abgedeckt ist, und der Rest daher zugänglich für die Endonuklease ist.

Als nächstes wurde die Spezifität der Kreuzvernetzung überprüft (Abb. 21B). Dazu wurden proliferierende Zellen zu unterschiedlich langen Zeiten mit Formaldehyd behandelt. Bereits nach 2 min Kreuzvernetzungszeit konnte der Scaffold Attachment Factor A (SAF-A) nachgewiesen werden. Dieser Faktor bindet mit hoher Affinität an DNA und stellt die Verbindung mit der Zellmatrix her (Romig et al., 1992). Nach 4 min waren der Großteil des ORC2-Proteins sowie der mittleren Untereinheit des Replikationsproteins A (RPA70) an die DNA gebunden (Abb. 21B). RPA bindet bevorzugt an der Replikationsgabel an einzelsträngige DNA-Bereiche und fördert die Entwindung der Doppelhelix (Treuner et al., 1996). Längere Kreuzvernetzungszeiten führten zu keiner wesentlichen Zunahme der gebundenen Proteine (Abb. 21B).

Die Nukleoproteinfragmente wurden anschließend mit hORC2-spezifischen Antikörper präzipitiert. Im Präzipitat waren große Mengen von hORC2 nachweisbar, nicht aber RPA oder SAF-A, was auf eine effiziente Präzipitation mit diesem Antikörper hinweist.

Diese Daten zeigen, dass RPA und SAF-A vermutlich in anderen Chromatinbereichen als ORC gebunden sind, da beide Proteine nicht auf den mit ORC-assoziierten Nukleoproteinfragmenten nachweisbar sind. Diese Schlussfolgerung wird auch durch Arbeiten bestätigt, die zeigten, dass RPA nicht als Bestandteil des Prä-Replikationskomplexes gefunden wurde, sondern vielmehr an der Replikationsgabel bei der Elongation der DNA-Replikation eine Rolle spielt (Zou and Stillman, 2000). Darüber hinaus gibt dieses Experiment Aufschluss über die Spezifität der Kreuzvernetzung. Da

durch ein extensive Behandlung mit Formaldehyd auch unspezifische Protein-Protein Kreuzvernetzungen einführt werden können, ist es möglich, dass auch Proteine miteinander verbunden werden, die nicht in vivo miteinander interagieren. Unter den hier getesteten Bedingungen wurde dies aber nicht beobachtet (siehe auch Abb. 22B).

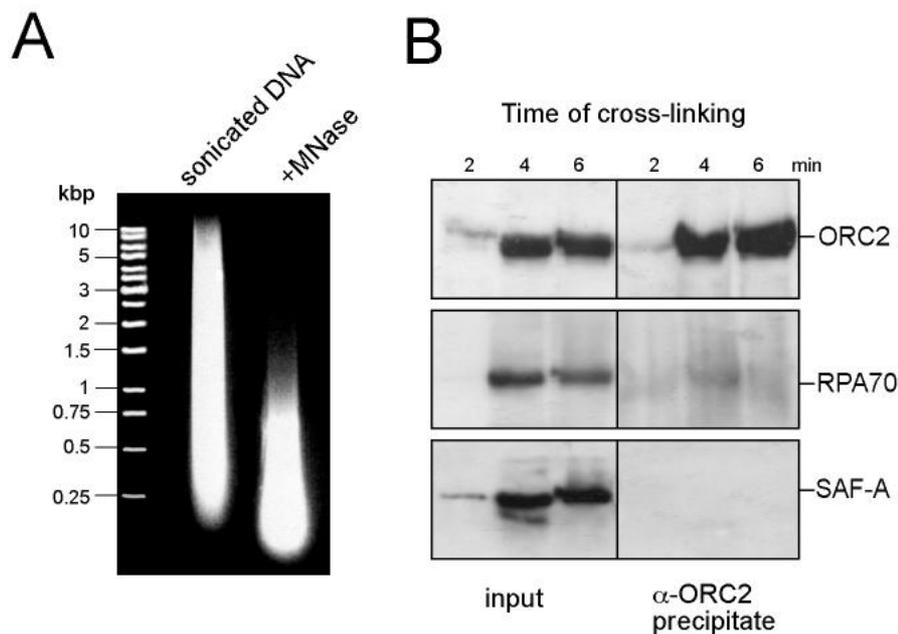


Abbildung 21. **Spezifität der Kreuzvernetzung.**

(A) Nukleoproteine wurden aus CsCl-Gradienten isoliert, mit Ultraschall sowie mit 10 units/mg Nukleoprotein *Micrococcus* Nuklease behandelt. Die DNA wurde extrahiert, aufgereinigt und zur Analyse auf ein Agarose-Gel aufgetragen. (B) Zeitreihe der Kreuzvernetzung. ORC-Proteine sind spezifisch an ihre DNA-Bindestellen kreuzvernetzt worden. Die Zellen wurden für 2, 4 oder 6 min mit Formaldehyd behandelt. Die Nukleoproteine wurden präpariert, über SDS-Page aufgetrennt und durch Western Blot Experimente mit spezifischen Antikörper gegen ORC2, RPA70 und SAF-A analysiert. Chromatin-Immunpräzipitationen wurden mit hORC2-spezifischen Antikörper durchgeführt. Input: Nukleoproteine vor der Immunpräzipitation

Bislang gab es keinen Hinweis darauf, dass alle ORC-Proteine als ein multimerer Komplex an das Chromatin gebunden sind. Zwar wurde zeitgleich mit der Entstehung dieser Arbeit ein hexamerer Komplex, bestehend aus hORC1 – hORC6 Proteinen in Insektenzellen exprimiert (Dhar et al., 2001; Vashee et al., 2001), ein Beweis für seine Existenz in vivo konnte bisher jedoch nicht erbracht werden.

Kreuzvernetzungsexperimente wurden durchgeführt, die zeigten, dass hORC1 – hORC6 an die DNA gebunden werden konnten und somit die oben festgestellte Assoziation mit Chromatin bestätigte (Abb. 22A, input). Im Vergleich zu hORC1 – hORC5, ist weniger hORC6 auf den Nukleoproteinfragmenten nachweisbar. Dies ist vermutlich mit einer schwächeren Bindung von ORC6 an den Gesamtkomplex zu erklären (Dhar et al., 2001). Es sollte nun getestet werden, ob auch die anderen identifizierten ORC-Proteine auf dem gleichen Nukleoproteinfragment wie hORC2 co-lokalisieren. Dazu wurden mit *Micrococcus* Nuklease behandelte Nukleoproteine mit hORC2-spezifischen Antikörper präzipitiert und auf das Vorkommen von hORC1 – hORC6 durch Western Blot Experimente analysiert (Abb. 22A). Tatsächlich konnten alle sechs humanen ORC-Proteine im hORC2-Präzipitat nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente das Präzipitat welches mit unspezifischen Kaninchen-Antikörper (IgG) erhalten wurde.

Die gefundene Co-Lokalisierung der sechs humanen ORC-Proteine auf den Nukleoproteinfragmenten deutet darauf hin, dass sie an gleiche Chromatinstellen in vivo gebunden sind.

Als nächstes wurden weitere Kontrollen durchgeführt. Der Chromatin Assembly Factor 1 (CAF-1) ist ein Histon-Chaperon, welcher spezifisch Nukleosomen auf neu replizierende DNA zusammenbaut (Krude and Keller, 2001). Somit ist dieser Faktor nicht Bestandteil des Initiationskomplexes am Origin, sondern vielmehr eine Komponente der wandernden Replikationsgabel während der Elongation und sollte daher nicht mit ORC-Proteinen in Wechselwirkung treten. Dies wird durch das Ergebnis des Experimentes in Abbildung 22B bestätigt. Die mittlere Untereinheit von CAF-1, p60, ist nicht im dem hORC2-Protein präzipitierbar und ist daher auch nicht an gleichen Chromatinstellen in vivo lokalisiert. Jedoch konnte eine Interaktion von p60 mit dem Proliferating Nuclear Cell Antigen (PCNA) nachgewiesen werden (Abb. 22C).

PCNA ist eine Ringklemme, welche sich an der Replikationsgabel and Doppelstrang DNA anlagert und Elongationsfaktoren, wie z.B. DNA-Polymerasen oder DNA-Ligasen an die Gabel für die DNA-Replikation rekrutiert (Paunesku et al., 2001; Tsurimoto, 1999). Das Ergebnis bestätigt die erst kürzlich beschriebene Interaktion von PCNA mit CAF-1 (Moggs et al., 2000; Shibahara and Stillman, 1999).

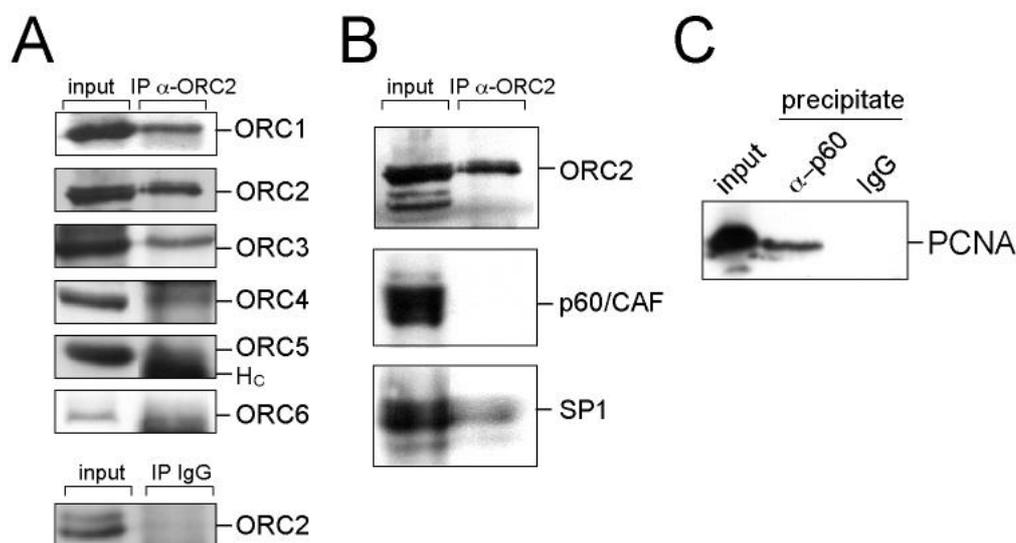


Abbildung 22. **Humane ORC-Proteine sind an identischen Chromatinstellen in vivo lokalisiert.**

(A) Nukleoproteine wurden mit Micrococcus Nuklease behandelt und mit hORC2-spezifischen Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde auf das Vorkommen der hORC1 – hORC6 Proteine durch Western Blot Experimente analysiert. Als Negativkontrolle wurde eine Chromatin-Immünpräzipitation mit unspezifischen Kaninchen IgG durchgeführt. Der Stern markiert die Position der schweren (Hc) Kette des Antikörpers. (B) Nachweis von CAF-1/p60 und SP1 nach der Immunpräzipitation mit hORC2-spezifischen Antikörper. (C) Interaktion von CAF-1 mit PCNA. Nukleoproteine wurden mit p60-spezifischen Antikörper gefällt und PCNA im Präzipitat mit monoklonalen PCNA-Antikörper nachgewiesen.

Interessanterweise konnte ich eine Co-Präzipitation des Transkriptionsfaktors SP1 im hORC2-Präzipitat nachweisen (Abb. 22B). Dies deutet darauf hin, dass ORC und SP1 an den gleichen Chromatinstellen gebunden sind. SP1-Bindestellen sind im Humangenom vornehmlich in Promotorregionen von Haushaltsgenen anzutreffen. Die Bindestelle umfasst eine 10 bp lange GC-haltige Konsensus-Sequenz (GC-Box) (Dyanan and Tjian, 1983a; Dyanan and Tjian, 1983b; Kadonaga et al., 1987; Kadonaga et al., 1988). Das Ergebnis gibt einen wichtigen Hinweis auf eine Bindung von ORC in der Nähe von Promotorregionen von aktiv transkribierten Genen.

Mit Hilfe des ChIP-Assay haben sich somit alle humanen ORC-Proteine auf den Nukleoproteinfragmenten nachweisen lassen. Die Co-Präzipitation mit hORC2 legt nahe, dass die Proteine auch an den gleichen Chromatinstellen gebunden sind. Andere nukleare Proteine, die eng mit dem Replikationsapparat wechselwirken, wie z.B. RPA, SAF-A oder CAF-1, sitzen an nicht benachbarten Chromatin-Stellen in vivo.

4.6 Der Origin Recognition Complex co-lokalisiert mit Startstellen der DNA-Replikation

In einer Reihe von Arbeiten haben Autoren einen Zusammenhang der aktiven Transkription mit der DNA-Replikation diskutiert (review:(Mechali, 2001). In viralen Genomen wurde gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren die Initiation der viralen DNA-Replikation durch eine Interaktion mit einem viralen Initiator verstärken (Van der Vliet, 1996). Der Sinn der Verknüpfung dieser beiden zellulären Prozesse könnte in einer bestimmten Organisation der Chromatindomänen liegen, um so den Zugriff von Initiationsfaktoren an ihre Bindestellen zu erleichtern. In der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* hat man einen Großteil der aktiven Replikationsorigins in der Nähe von Promotoren gefunden (Gomez and Antequera, 1999).

Im folgenden Teil der Arbeit soll nun untersucht werden, ob eine solche enge Kopplung von Transkription mit der DNA-Replikation, wie sie anderen Organismen gefunden wurde, auch beim Menschen eine Rolle spielt. Diese Hypothese soll anhand des gut

charakterisierten *TOP1* Genpromotors überprüft werden, da hier schon ausreichende Kenntnisse über dessen Struktur und Regulation vorliegen (Heiland and Knippers, 1995; Heiland et al., 1993; Kunze et al., 1990).

4.6.1 Identifizierung einer ORC-Bindestelle im humanen *TOP1* Genpromotor

Der Locus des *TOP1* Gens befindet sich auf dem Chromsom 19 und umfasst etwa 100 kbp die im Rahmen des Humangenom-Projektes vollständig sequenziert worden sind (Kunze et al., 1991). Dieses Gen weist mehrere Merkmale auf, die auf eine mögliche ORC-Bindestelle bzw. auf eine Funktion als DNA-Replikationsstartpunkt in dieser Region hinweisen (Abb. 23A). Der Promotor hat einen GC-Gehalt von 67% und befindet sich innerhalb einer CpG-Insel. CpG-Inseln sind gleichmäßig über das Genom verteilt und sollen bevorzugt als Startstellen der DNA-Replikation dienen (Antequera and Bird, 1999; Delgado et al., 1998). Des weiteren befindet sich ein A/T-reiche Sequenz stromaufwärts des Promotors, ähnlich den essentiellen A/T-reichen Elementen wie sie in Origins anderer Organismen gefunden wurden (Abb. 23B) (Chuang and Kelly, 1999; Marahrens and Stillman, 1992). Schließlich ist das Gen an zwei Stellen über MAR-Elemente (MAR = Matrix Attachment Regions) mit der Zellmatrix assoziiert (Romig et al., 1992; Romig et al., 1994). Schon seit längeren wird ein Model diskutiert, bei dem die DNA-Replikation eng mit solchen Regionen verknüpft sein soll (Dijkwel and Hamlin, 1988; Dutta and Bell, 1997). Eine mögliche Bindung von ORC an diese Elemente wäre daher sehr interessant.

Eine Gesamtübersicht über das Gen ist in Abbildung 23A wiedergegeben. Das Gen besteht aus insgesamt 21 Exons wobei die MARs in den Introns 2 und 13 lokalisiert sind. Stromabwärts der MAR II Region befindet sich der Beginn eines weiteren Gens, *PLC-148*, einer Subform der Phospholipase C. Die Promotorregion besitzt mehrere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, u.a. auch zwei Bindestellen für SP1 (Abb. 23B) (Kunze et al., 1990).

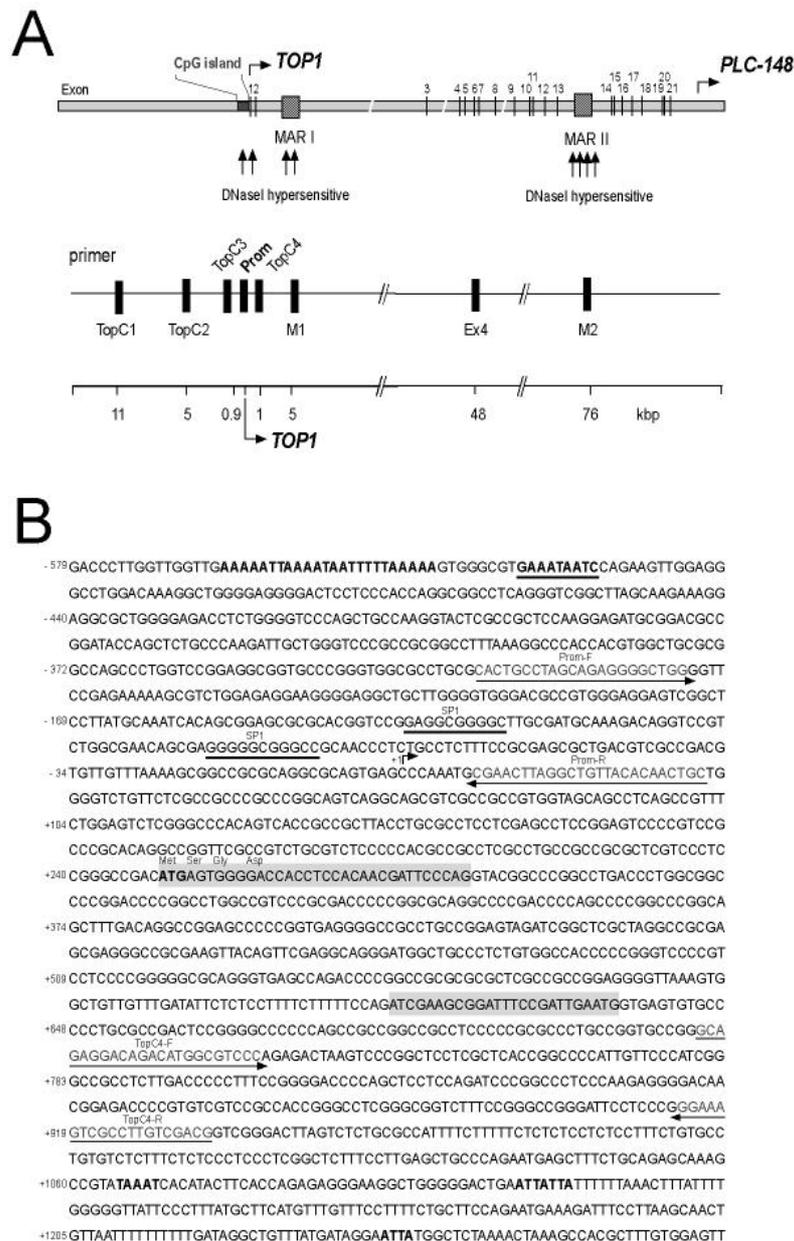


Abbildung 23. Das humane *TOP1* Gen.

(A) Übersicht. Das Gen besteht aus 21 Exons und besitzt zwei Matrix Attachment Regions (MAR). Diese Bereiche sind durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNaseI charakterisiert. Für die quantitative Real-time PCR wurden Primer-Sätze hergestellt (schwarze Kästchen). Die Lage und Entfernung der Amplikons sind eingezeichnet. (B) *TOP1* Promotorregion. Der Transkriptionsstart ist mit +1 gekennzeichnet. Ein A/T-reiches Element stromaufwärts des Promotors wurde durch Fettschrift hervorgehoben. Die Lage des Primer-Satzes Prom und des 1 kbp stromabwärts gelegenen Primer-Satzes TOPC4 sind mit Pfeile eingezeichnet. Die Bindestellen für den Transkriptionsfaktor SP1 sind unterstrichen. Das Exon 1 und das Exon 2 sind mit graue Boxen umrahmt. Matrix Attachment Motive (ATTA/ATTTA) sind durch Fettschrift hervorgehoben.

Eine mögliche Assoziation von ORC-Proteinen mit Sequenzelementen des *TOP1* Locus sollte durch die Anwendung des ChIP-Assays in Kombination mit quantitativer Real-time PCR nachgewiesen werden. Die DNA wurde aus den Präzipitaten extrahiert und die einzelnen genomischen Regionen des *TOP1* Locus wurden mit der Real-time PCR quantitativ verglichen. Die quantitative Real-time PCR wurde bereits in Kapitel 4.3.2 beschrieben. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer hohen Sensitivität, mit der selbst kleinste Molekülzahlen quantifiziert werden können.

Es wurden 8 Primer-Sätze hergestellt, welche die wichtigsten Regionen des Gens abdecken (Abb. 23A). Der Primer-Satz Prom ist homolog zu Promotor-Sequenzen (Abb. 23B). Die am nächsten lokalisierten Primer-Sätze TopC3 und TopC4 haben einem Abstand von 0.9 bzw. 1 kbp davon (Abb. 23A/B). Die Primer-Sätze M1 und M2 sind spezifisch für die MAR-Regionen, die restlichen Primer-Sätze liegen als Kontrolle in intergenischen Regionen.

Zuerst wurden die PCR-Produkte durch Schmelzpunktanalyse mit der Light-Cycler Software auf ihre Spezifität getestet. Jedes Primer-Paar ergab einen einzigen für das Produkt spezifischen Peak (Daten nicht gezeigt, siehe Abb. 11). Zusätzlich wurden die PCR-Produkte mit den verwendeten *TOP1* Primer-Sätzen über Gel-Elektrophorese aufgetrennt und analysiert (Abb. 24).

Für jede Quantifizierung wurde eine Standardkurve mit Hilfe von seriell verdünnten Standard-DNAs angefertigt (Daten nicht gezeigt, siehe Abb. 12). Von dieser Standardkurve ausgehend, ließen sich mit Hilfe der Light-Cycler Software die exakten Kopienzahlen für die einzelnen Präzipitate ermitteln.

Zuerst wurden wichtige Kontrollexperimente durchgeführt. Da bekannt ist, dass der *TOP1* Promotorbereich zwei GC-Boxen als Bindestellen für den Transkriptionsfaktor SP1 besitzt, würde man eine Anreicherung von Promotor-Sequenzen im SP1-Präzipitat erwarten (siehe Abb. 23B). Um dies zu überprüfen wurden Nukleoproteine mit SP1-spezifischen Antikörper präzipitiert. Die Analyse der Western Blot Experimente bestätigte, dass große Mengen des SP1-Proteins präzipitiert wurden, nicht aber im Präzipitat von unspezifischen IgG (Abb. 25A).

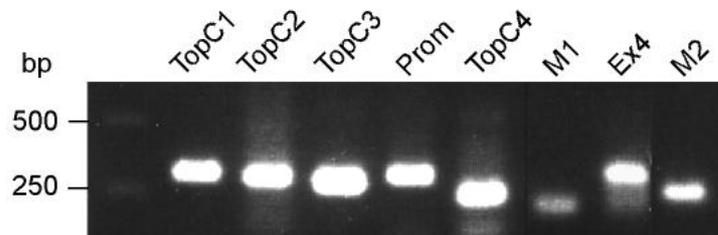


Abbildung 24. Analyse der PCR-Produkte mit den *TOP1* Primer-Sätzen nach der Quantifizierung im Light-Cycler.

Die hergestellten Primer-Sätze wurden auf ihre Spezifität für die quantitative Real-time PCR im Light-Cycler getestet. Die PCR Reaktionen wurden mit 30 ng genomischer DNA als Template durchgeführt. Nach dem PCR-Lauf wurden die Reaktionen zur Analyse auf ein 1.5% Agarose-Gel aufgetragen.

Die präzipitierte DNA wurde aus den SP1-Präzipitaten extrahiert, vorsichtig aufgereinigt und als Template für die quantitative Real-time PCR benutzt. Alle 8 genomischen Regionen wurden quantitativ vermessen.

Das Ergebnis in Abbildung 25A zeigt eine etwa 6000 Anreicherung von Promotor-Sequenzen im SP1-Präzipitat gegenüber den benachbarten Regionen. Dies ist eine klare Bestätigung für eine Bindung des Transkriptionsfaktors SP1 an die Bindestellen der *TOP1* Promotorregion. Es konnten außerdem sehr geringe Mengen (200 Kopien) der 1 kb stromabwärts vom Promotor gelegenen TopC4 Sequenzen nachgewiesen werden. Statistisch gesehen würde man auch eine geringe Anreicherung von Promotor-Randbereichen erwarten, da eine kleine Population der präparierten Nukleoprotein-Fragmente auch diese DNA-Länge abdeckt (Abb. 21A).

Als Negativkontrolle wurden Chromatin-Immunpräzipitationen mit Antikörper gegen die mittlere Untereinheit des „Chromatin Assembly Factor 1“ (CAF-1) durchgeführt. CAF-1 ist Bestandteil der wandernden Replikationsgabel bei der Elongation und besitzt

somit keine definierten Bindestellen im Genom (siehe Abb. 22). Die Antikörper präzipitierten große Mengen des p60-Proteins (Abb. 25B). Mit den benutzten Primersätzen konnte keine Assoziation von p60 mit spezifischen Sequenzen, insbesondere nicht mit Promotor-Sequenzen, nachgewiesen werden. Die meisten Werte lagen nahe der Nachweisgrenze der Real-time PCR. Gleiche Ergebnisse lieferten die Messungen mit der DNA aus den Präzipitaten der unspezifischen IgG (Abb. 25C).

Diese Ergebnisse demonstrieren deutlich, dass DNA-bindende Proteine, wie der Transkriptionsfaktor SP1, durch die Behandlung mit Formaldehyd spezifisch an die Bindestellen *in vivo* kreuzvernetzt werden können.

Als nächstes wurden Chromatin-Immunpräzipitationen mit hORC1- und hORC2-spezifischen Antikörper durchgeführt, um eine mögliche Assoziation von ORC mit *TOP1* Sequenzen festzustellen. Sowohl der ORC1-Antikörper als auch der ORC2-Antikörper konnten die entsprechenden ORC-Proteine effizient präzipitieren (Abb. 25 D/E).

Die präzipitierte DNA wurde extrahiert und, wie oben beschrieben, mit der quantitativen Real-time PCR analysiert. Interessanterweise konnte eine starke Anreicherung von *TOP1* Promotor-Sequenzen in den beiden Präzipitaten nachgewiesen werden, was auf eine Bindung der ORC1 und ORC2-Proteine (Abb. 25D/E) im Promotor hinweist.

Dabei hat die Kopienzahl der quantifizierten ORC2-DNA mit etwa 800 Kopien mehr als doppelt so hoch gelegen als die der ORC1-DNA mit etwa 260 Kopien. Eine Erklärung dafür ist, dass ORC2-Proteine zugänglicher für die Antikörper sind als ORC1-Proteine, was zu unterschiedlichen Effizienzen bei der Immunpräzipitation führen kann. Des Weiteren wurde kürzlich festgestellt, dass hORC2 während des gesamten Zellzyklus am Chromatin gebunden bleibt, während sich hORC1 vom Chromatin während der S-Phase ablöst (Kreitz et al., 2001; Mendez and Stillman, 2000; Natale et al., 2000). Es ist daher anzunehmen, dass sich mehr ORC2- als ORC1 Proteine am Chromatin befinden. Schließlich wurden bei Expressionsexperimenten in Insektenzellen festgestellt, dass das ORC1-Protein sehr instabil ist, und leicht degradiert wird (siehe Kapitel 4.3.2).

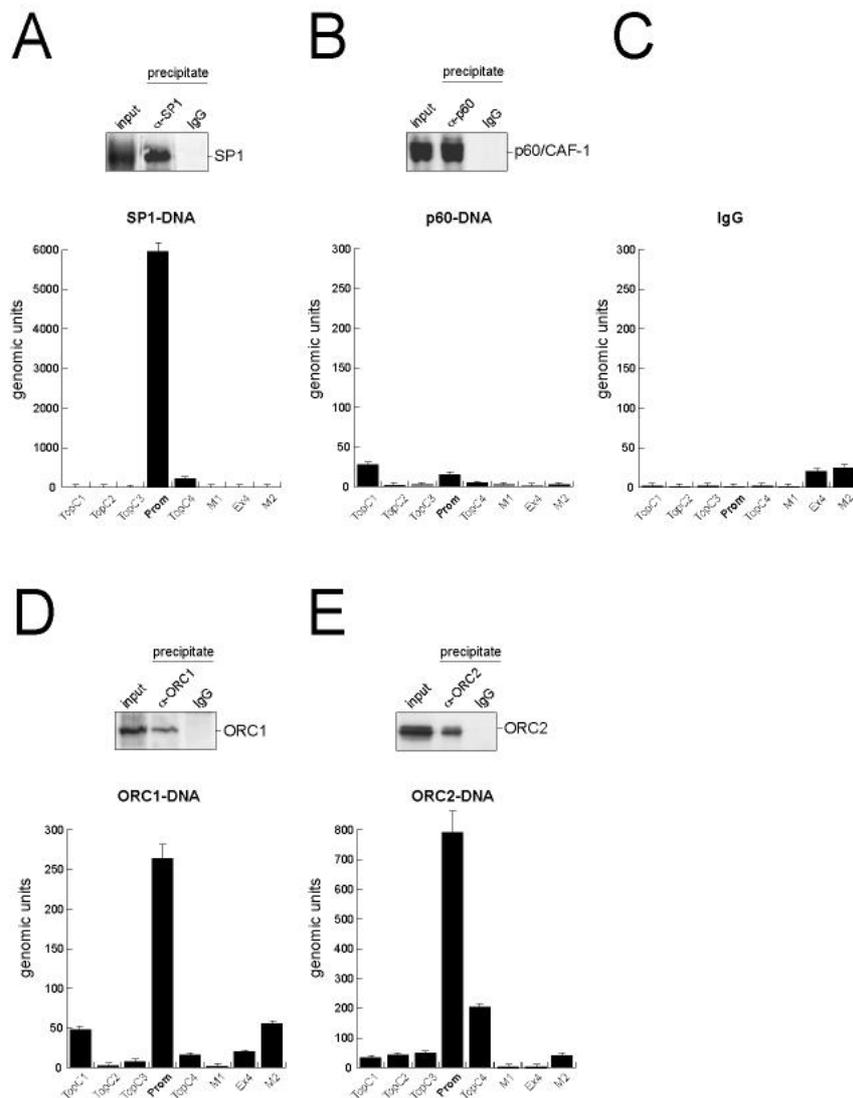


Abbildung 25. Der humane Origin Recognition Complex bindet in der *TOP1* Promotorregion.

Chromatin-Immünpräzipitationen wurden mit den gekennzeichneten Antikörper durchgeführt. Input: Nukleoproteine vor der Immunpräzipitation. Präzipitierte Proteine wurden durch Western-Blot Experimente analysiert. Unspezifische Kaninchen IgG dienten als Negativkontrolle. Für die quantitative Real-time PCR wurde 1/20 der präzipitierten DNA eingesetzt. Die Kopienzahl der quantifizierten Moleküle wurde für jede genomische Region mit den angegebenen Primer-Sätzen (Horizontalachse, siehe Abb. 23A) durch die Light-Cycler Software anhand einer mit genomischen DNA erstellten Standardgerade errechnet. (A) Der Transkriptionsfaktor SP1 bindet an den Bindestellen in der *TOP1* Promotorregion. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einem Western Blot zur Kontrolle der Chromatin-Immünpräzipitation auf Protein-Ebene, sowie das Ergebnis der quantitativen PCR der präzipitierten SP1-DNA im Säulendiagramm. Die von einer Standardkurve abgeleitete Kopienzahlen sind in „genomic units“ dargestellt. (B) Negativkontrolle mit

p60/CAF-1. (C) Hintergrundkontrolle. Unspezifisch assoziierte DNA wurde aus den IgG Präzipitaten extrahiert und quantitativ vermessen. (D-E) Die humanen ORC1/2-Proteine sind in der *TOP1* Promotorregion gebunden. (D) hORC1 ist mit Promotor-Sequenzen assoziiert. (E) Assoziation von Promotor-Sequenzen mit hORC2.

Des Weiteren fällt beim Vergleich von Abbildung 25E mit Abbildung 25A auf, dass 7 – 8 mal mehr Promotor-Sequenzen im SP1-Präzipitat als in den ORC2-Präzipitaten vorhanden sind. Dies wurden bei sämtlichen durchgeführten Experimenten beobachtet. Dieser Unterschied könnte durch die verschiedenen Antikörpereigenschaften bzw. Effizienzen bei der Immunpräzipitation zustande kommen. Es ist vorstellbar, dass ein aus sechs heterogenen Untereinheiten bestehender ORC schwieriger zu präzipitieren ist, als ein einzelner Transkriptionsfaktor. Auch befinden sich im Promotor mehrere SP1-Bindestellen und wahrscheinlich nur eine potentielle ORC-Bindestelle. Somit würde man erwarten, dass mehr Promotor-Sequenzen mit SP1 als mit ORC assoziiert sind. Eine weitaus attraktivere Erklärung wäre jedoch, dass der Origin Recognition Complex nicht in jeder Zelle für die Markierung eines aktiven Origins im Promotorbereich gebunden ist. Alternativ könnte die DNA-Replikation auch an einen benachbarten Origin eingeleitet werden. Dies würde bedeuten, dass die Zelle mehr Origins als nötig für die Replikation des Genoms zur Verfügung hat, und somit nur einige für die Initiation aktiviert werden. Diese Schlussfolgerung würde das „Jesuitenmodell der DNA-Replikation“ unterstützen (Gilbert, 2001a).

Aus dem Experiment in Abbildung 25 D/E ist außerdem ersichtlich, dass ORC nicht mit MAR-Elementen assoziiert ist, was folglich darauf hinweist, dass die DNA-Replikation nicht an diesen Elementen eingeleitet wird.

Um auszuschließen, dass die gefundene Anreicherung von Promotorsequenzen in den ORC-Präzipitaten nicht dadurch zustande kommt, weil die Promotorregion dicht mit Proteinen abgedeckt und damit gegen einen Verdau mit *Micrococcus* Nuklease geschützt ist, wurde ein weiteres Kontrollexperiment durchgeführt. Die Protein-Dichte, welche in Promotor-Bereichen durch die Bindung beispielsweise von Transkriptionsfaktoren vorherrscht, würde zu einer Erhöhung der Kopienzahl von Promotor-Sequenzen in kreuzvernetzten Input-Proben führen und konsequenterweise auch zu einer erhöhten

Kopienzahl bei der Quantifizierung der DNA des Präzipitates. Auch muss ausgeschlossen werden, dass das Enzym bestimmte genomische Sequenzen in diesem Assay bevorzugt, was für isolierte Sequenzen durchaus beobachtet wurde (Dingwall et al., 1981; Horz and Altenburger, 1981).

Ich überprüfte diese Hypothese und behandelte sonifizierte Nukleoproteine mit steigenden Konzentrationen von *Micrococcus* Nuklease (Abb. 26A). Die daraus resultierenden Chromatinfragmente hatten eine Größe von 0.15 – 2 kb (Reaktionen 1 – 3). Die Reaktionen mit höheren Enzymkonzentrationen führten zu einer Fragmentierung bis hin zu mononukleosomalen Chromatinfragmenten (Reaktionen 4 – 5).

Als nächstes wurde die so behandelte DNA von den Nukleoproteinen extrahiert und die Promotorregion durch quantitative Real-time PCR analysiert (Abb. 26B). Als Kontrolle diente eine stromaufwärts des Promotors gelegene Region (Primer-Satz TopC1, siehe Abb. 23). Tatsächlich war die *TOP1* Promotorregion etwa zwei mal resistenter gegenüber einer Behandlung mit *Micrococcus* Nuklease als die benachbarte Kontrollregion. Auch zeigte das Experiment, dass eine zu intensive Behandlung von Nukleoproteinen mit *Micrococcus* Nuklease, die DNA-Templates für eine PCR-Quantifizierung unbrauchbar macht (Abb. 26B).

Eine längere Kreuzvernetzungszeit bei der Behandlung von Zellen mit Formaldehyd führt auch in der Kontrollregion zu einer höheren Resistenz (Abb. 26C). Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass eine länger Kreuzvernetzungszeit auch räumlich entferntere nukleare Proteine miteinander an der DNA kreuzvernetzt und so das Chromatin resistenter macht.

Andere Regionen, wie die *MCM4* Promotorregion oder der Lamin B2 Locus zeigten vergleichbare Resistenzen (Abb. 26D).

Somit scheinen einzelne Chromatinregionen gegenüber einer Behandlung mit *Micrococcus* Nuklease unterschiedlich sensitiv zu sein. Insbesondere die *TOP1* Promotorregion ist resistenter als die benachbarte Kontrollregion.

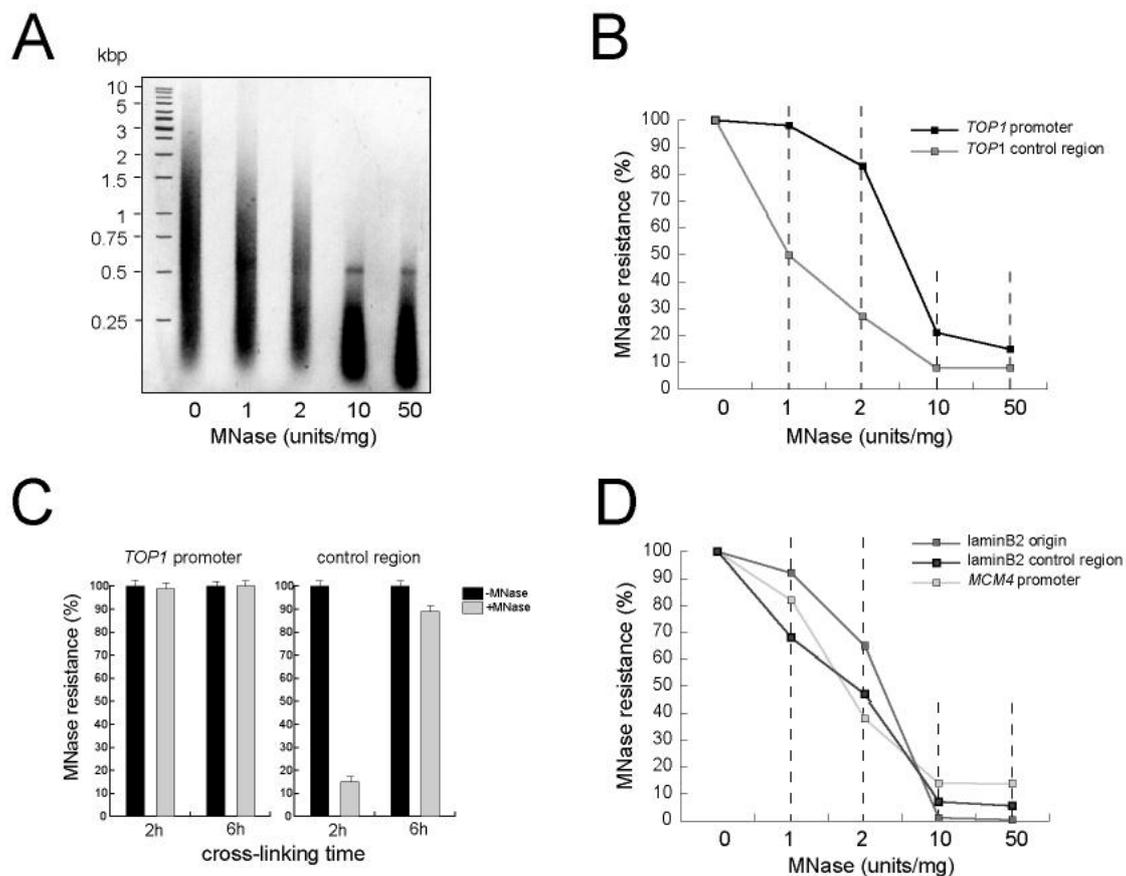


Abbildung 26. Bestimmte Chromatinbereiche sind resistenter gegenüber der Behandlung mit *Micrococcus* Nuklease.

(A) Nukleoproteine (100 µg) wurden mit steigenden Mengen an *Micrococcus* Nuklease behandelt. Die so behandelte DNA wurde extrahiert und zur Analyse auf ein 1% Agarose-Gel aufgetragen. (B) Der Promotorbereich von *TOP1* ist resistenter gegenüber *Micrococcus* Nuklease als eine 11 kb stromaufwärts gelegene Kontrollregion. Die extrahierte DNA wurde mit der quantitativen Real-time PCR mit den Primersätzen Prom und TopC1 analysiert. Der Nullwert (ohne Enzym) wurde 100% gesetzt und die nachfolgenden Reaktionen dazu ins Verhältnis gesetzt. (C) Einfluss der Kreuzvernetzungszeit auf die Sensitivität gegenüber *Micrococcus* Nuklease. Proliferierende HeLa Zellen wurden für 2 oder 6 min mit 1% Formaldehyd behandelt. (D) Sensitivität von Sequenzen des Lamin B2 Locus und der *MCM4* Promotorregion gegenüber der *Micrococcus* Nuklease.

Die Schlussfolgerung aus diesem Experiment ist, dass die Anzahl der Kopien der Sequenzen vor und nach der Immunpräzipitation für jede genomische Region bestimmt wird. Dies wurde im nächsten Experiment berücksichtigt, bei dem die Anreicherung von Promotor-Sequenzen im ORC2-Präzipitat bestimmt, unter Berücksichtigung des eben festgestellten Ergebnisses, bestimmt wurde (Abb. 27).

Kreuzvernetzte Nukleoproteine wurden mit *Micrococcus* Nuklease bis auf eine Fragmentlänge von < 1 kbp verdaut (siehe Abb. 21). Die DNA wurde extrahiert und durch quantitative Real-time PCR analysiert (Abb. 27A). Der Promotorbereich sowie proximal zum Promotor gelegene DNA-Sequenzen des *TOP1* Locus waren etwa 7 mal resistenter gegenüber der Nukleasebehandlung als distal gelegene Chromatinbereiche. Als nächstes wurde das kreuzvernetzte und mit Nuklease behandelte Chromatin mit hORC2-spezifischen Antikörper präzipitiert, die DNA von den Präzipitaten extrahiert und mit Hilfe der Real-time PCR quantifiziert. Mit der isolierten DNA lies sich eine etwa 40-fache Anreicherung von *TOP1* Promotor-Sequenzen gegenüber distal gelegenen benachbarten Regionen feststellen (Abb. 27B).

Zur Ermittlung der tatsächlichen Anreicherung von Promotor-Sequenzen wurde für jede genomische Region das Verhältnis der Kopienzahlen des ORC2-Präzipitates mit den Input-Proben bestimmt und graphisch in Abbildung 27C dargestellt. Mit den so ermittelten Verhältnissen konnte eine 5-fache Anreicherung von Promotor-Sequenzen im ORC2-Präzipitat nachgewiesen werden.

Die exakte Bindestelle lässt sich jedoch aufgrund der Fragment-Länge der Nukleoproteine (< 1 kbp) nicht exakt festlegen, befindet sich aber mit hoher Wahrscheinlichkeit zwischen den Nukleotiden $- 350$ und dem Transkriptionsstart $+1$, da die stärkste Anreicherung mit den Primer-Satz Prom erzielt werden konnte. Eine Entfernung von 0.9 kbp stromaufwärts der Bindestelle dieses Primer-Satzes (Abb. 23B) reduzierte die Anreicherung bereits um den Faktor $2,5$ (Primer-Satz TopC3, Abb. 27C), während eine fast gleiche Entfernung stromabwärts zu einem größeren Abfall führte (Primer-Satz TopC4, Abb. 27C). Daher ist anzunehmen, dass die ORC-Bindestelle vor dem Transkriptionsstart, also innerhalb der Promotorregion liegt und nicht danach.

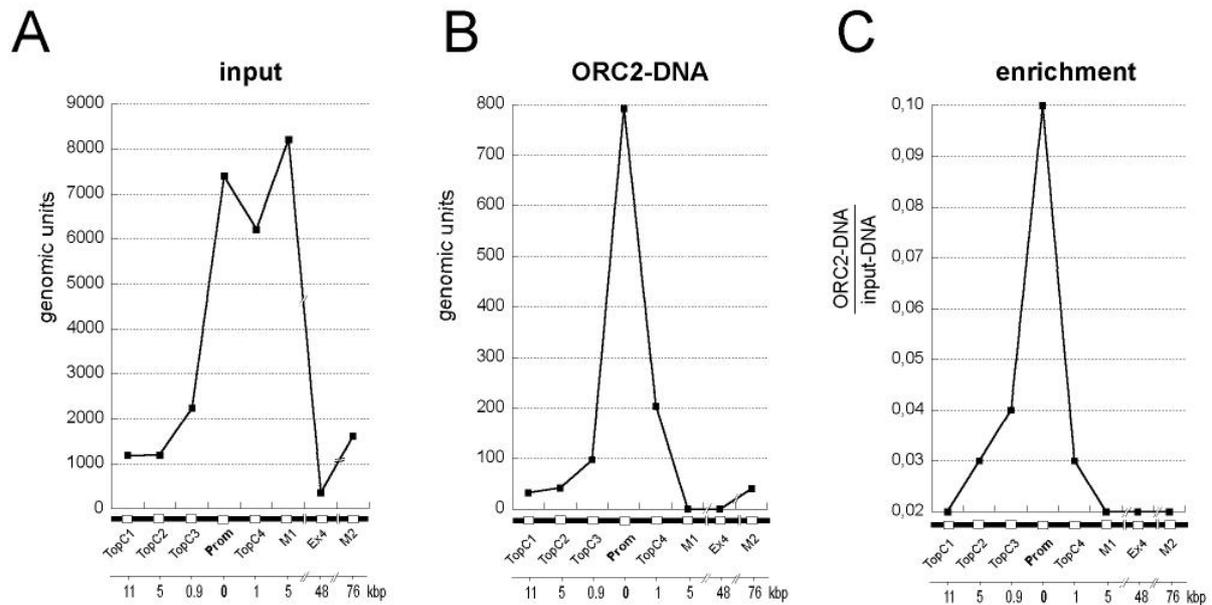


Abbildung 27. **Anreicherung von *TOP1* Promotor-Sequenzen im hORC2-Präzipitat.**

Quantitative Analyse der Nukleoprotein-DNA vor und nach der Chromatin-Immunpräzipitation. (A) Quantifizierung von Input-DNA. Die PCR wurden mit den gekennzeichneten Primer-Sätzen durchgeführt (Horizontalachse) und zeigen die ermittelten Rohdaten. (B) Assoziierung von Promotor-Sequenzen mit hORC2-Proteinen. Die Nukleoproteine wurden mit ORC2-spezifischen Antikörper präzipitiert, die DNA extrahiert und wie bei (A) im Light-Cycler quantifiziert. (C) Anreicherung von Promotor-Sequenzen im ORC2-Präzipitat. Die Anreicherung wurde durch Bildung der Verhältnisse der Kopienzahlen des Präzipitates mit dem Input bestimmt (ORC2-DNA/Input-DNA). Die so erhaltenen Faktoren wurden graphisch aufgetragen.

Somit habe ich mit diesen Experimenten gezeigt, dass trotz der ermittelten Resistenzen im Promotorbereich, eine klare Assoziierung von ORC-Proteinen mit *TOP1* Promotor-Sequenzen vorliegt, was auf eine Bindung des Origin Recognition Complex in dieser Region hinweist. Diese Daten demonstrieren weiterhin, dass der Origin Recognition Complex, zumindest im Falle des *TOP1* Locus, nicht mit den MAR-Elemente assoziiert ist.

In dem in Abbildung 22A gezeigten Experiment wurde gezeigt, dass alle sechs ORC-Untereinheiten mit ORC2-spezifischen Antikörper präzipitiert werden können, was darauf hinweist, dass diese Proteine in einem Komplex organisiert sind. Weitere Hinweise auf die Existenz eines solchen Komplexes kamen von Co-Expressionsstudien, welche in Insektenzellen durchgeführt worden sind (Dhar et al., 2001; Vashee et al., 2001). Diese Fakten zusammengenommen weisen klar darauf hin, dass sich in der Promotor-Region eine Bindestelle für den gesamten Origin Recognition Complex befindet.

Zusammenfassend wurde in diesem Kapitel zum ersten Mal die Identifizierung einer Bindestelle für den Origin Recognition Complex im Humangenom gezeigt. Die Bindung von ORC in einem aktiven Promotor eines Haushaltsgenes könnte wichtige Hinweise auf eine enge Kopplung von Transkription und Replikation in bestimmten Chromatinbereichen liefern.

4.6.2 Die ORC-Bindestelle co-lokalisiert mit einer Startstelle der bidirektionalen DNA-Replikation

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die ORC-Bindestelle auch eine Startstelle der bidirektionalen DNA-Replikation markiert. Dies ist ein interessanter Punkt, da bisher noch nicht gezeigt wurde, dass humane ORC-Proteine an einem Origin binden.

Für die Identifizierung einer solchen Replikationsstartstelle wurde der im Kapitel 4.2.1 bereits beschriebene „Nascent Strand Abundance Assay“ verwendet, der eine recht genaue Kartierung zulässt. Es wurden etwa 1 – 2 kbp lange nascent DNA aus Saccharose-Gradienten isoliert (siehe Abb.10). Die „nascent DNA“ Präparation wurde zuerst anhand des gut charakterisierten Lamin B2 Origins überprüft (Abb. 28A; siehe

auch Abb. 9; Abb. 13). Dazu wurde die Anreicherung von Lamin B2 Origin-Sequenzen gegenüber benachbarten Sequenzen durch quantitative Real-time PCR bestimmt. Der dabei verwendete Primer-Satz LB ist homolog zu den Sequenzen an der Initiationsstelle, während die zwei benachbarten Primer-Sätze LBC1 und LBC2 als Kontrolle dienten (Abb. 28A). Die quantitativen Analysen bestätigten, dass sich mit den LB Primer-Satz spezifisch Origin-Sequenzen amplifizieren lassen konnten und die Präparation daher geeignet für die weiteren Untersuchungen am *TOP1* Locus ist.

Mit der präparierten „nascent DNA“ wurde nun der *TOP1* Locus untersucht. Das Ergebnis in Abbildung 28B belegt deutlich, dass die Promotor-Sequenzen mehr als zehnfach gegenüber den distal gelegenen Sequenzen in der präparierten nascent DNA angereichert sind.

Als nächstes wurden weitere Kontrollexperimente durchgeführt. Bei Verwendung von längeren DNA-Fragmenten, die aus höheren Fraktionen aus dem Saccharose-Gradienten isoliert wurden, würde man eine Zunahme der proximal zum Promotor gelegenen Sequenzen bei der Quantifizierung erwarten. Dieser Linie folgend, wurden 2 – 10 kbp lange nascent DNA Fragmente isoliert und wie oben beschrieben quantitativ durch Real-time PCR analysiert (Abb. 28B). Tatsächlich konnte man eine Zunahme der nahe zum Promotor gelegenen Sequenzen sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts von der Initiationsstelle feststellen. Keine der untersuchten Sequenzen war jedoch bei einer Präparation von genomischer DNA angereichert (Abb. 28B).

Diese Daten demonstrieren somit, dass der *TOP1* Promotorbereich nicht nur eine Bindestelle für den Origin Recognition Complex beinhaltet, sondern dass sich in der selben Region auch eine aktive Startstelle der bidirektionalen DNA-Replikation befindet. Damit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass der Origin Recognition Complex einen humanen Replikationsorigin markiert und damit wahrscheinlich Grundbaustein für den Aufbau eines humanen Initiationskomplexes ist.

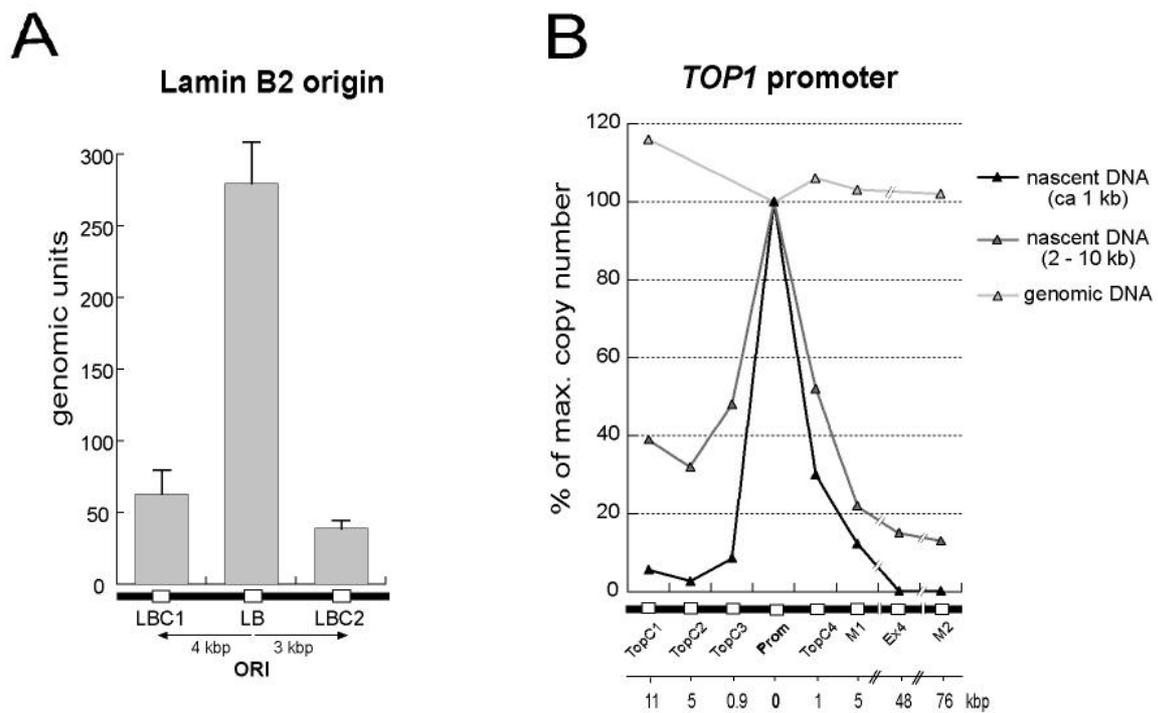


Abbildung 28. Im *TOP1* Promotorbereich befindet sich eine Startstelle der bidirektionalen DNA-Replikation.

Nascent DNA wurde aus Saccharose-Gradienten isoliert und mit Hilfe der quantitativen Real-time PCR analysiert. (A) Lamin B2 Origin-Sequenzen sind stark in der Präparation angereichert. Das Primer-Paar LB ist homolog zu Sequenzen an der Initiationsstelle. Der Primer-Satz LBC1 und LBC2 ist homolog zu Sequenzen 4 kbp stromaufwärts, bzw. 3.5 kbp stromabwärts davon. (B) Anreicherung von *TOP1* Promotor-Sequenzen, ermittelt durch quantitative Real-time PCR. Längere DNA-Fragmente (2 – 10 kbp) sowie genomische DNA dienten als Kontrolle. Zum besseren Vergleich wurde die Region mit der höchsten Kopienzahl (Promotorbereich) auf 100% gesetzt.

4.6.3 ORC bindet an den Lamin B2 Origin

Um diese Theorie weiter zu festigen, wurde die Bindung von ORC an weitere humane Origins mit dem ChIP-Assay überprüft. Bestandteil dieser Experimente war der Lamin B2 Origin, da er der einzige ist, der solche Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt zugelassen hat (Abb. 29). Es wurden Chromatin-Immunpräzipitationen mit ORC2-spezifischen Antikörper wie oben beschrieben durchgeführt. Die DNA wurde aus den Immunpräzipitaten isoliert und mit der quantitativen Real-time PCR untersucht (Abb.29A). Zuerst wurde das Vorkommen der einzelnen Sequenzen vor der Immunpräzipitation analysiert (input). Die Primer-Paare LB und LBC2 amplifizierten annähernd gleiche Kopienzahlen aus den Input-Proben (ca. 1000 Kopien), während das LBC1 Primer-Paar zu einer etwa 6 mal höheren Amplifizierung führte (ca. 6000 Kopien). Diese Region scheint somit resistenter gegenüber der Behandlung mit Micrococcus Nuklease zu sein als die beiden anderen untersuchten Regionen.

Als nächstes wurde die DNA aus den Präzipitaten quantitativ analysiert (Abb. 29B). Die Origin-Sequenzen waren nach der Amplifizierung im ORC2-Präzipitat wesentlich erhöht (Abb. 29B, Primer-Satz LB). Als Kontrolle diente präzipitierte DNA, die aus einem IgG-Präzipitat extrahiert wurde. Hier wurden nur ein paar wenige Kopien der einzelnen Sequenzen als Hintergrundsignale nachgewiesen (Abb. 29B, rechts). Um die Anreicherung von Origin-Sequenzen im Vergleich zu den benachbarten Kontrollsequenzen zu bestimmen, wurden die Verhältnisse der Kopienzahlen des ORC2-Präzipitates (ORC2-DNA) mit den Kopienzahlen des Inputs gebildet. Die so ermittelten Faktoren sind in Abbildung 29C wiedergegeben. Lamin B2 Origin-Sequenzen sind etwa 4 - 5 fach gegenüber den Kontrollsequenzen im ORC2-Präzipitat angereichert.

Diese Daten belegen somit, dass auch der Lamin B2 Origin durch die Bindung des Origin Recognition Complex in vivo markiert ist. Das Experiment illustriert weiterhin, wie wichtig es ist, die Kopienzahlen der einzelnen Sequenzen vor der Chromatin-Immunpräzipitation zu ermitteln, um zuverlässige Aussagen über die Anreicherung einer bestimmten Sequenz im Präzipitat treffen zu können.

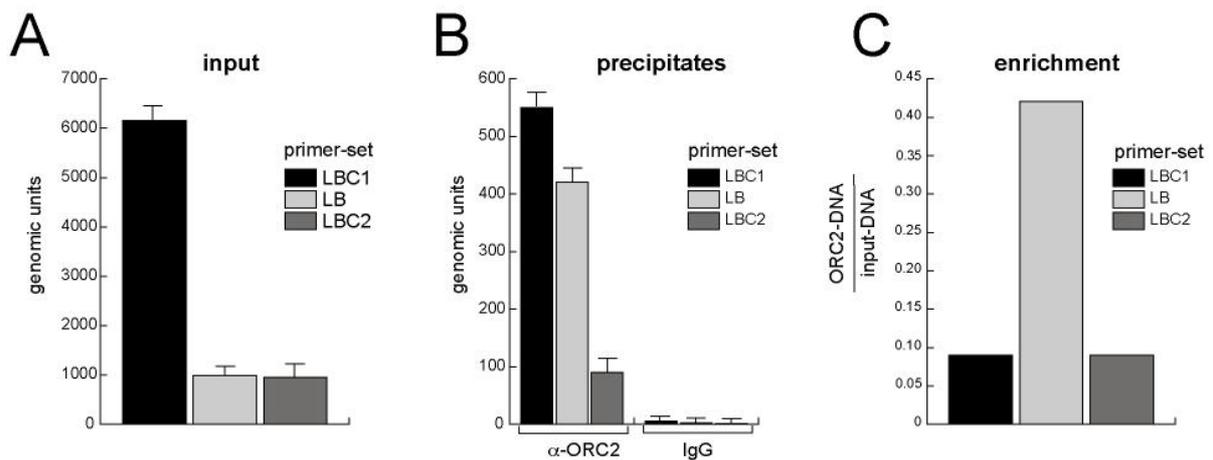


Abbildung 29. **Der Origin Recognition Complex bindet am Lamin B2 Origin.**

Chromatin-Immunpräzipitationen wurden mit ORC2-spezifischen Antikörper durchgeführt. Als Kontrolle dienten Kaninchen IgG. Die DNA wurde aus den Präzipitaten extrahiert und durch quantitative Real-time PCR analysiert. (A) Quantifizierung der Sequenzen vor der Immunpräzipitation (input). Das LB Primer-Paar ist homolog zu den Sequenzen der Initiationsstelle, die beiden benachbarten Primer-Sätze LBC1 und LBC2 befinden sich in einem Abstand von 4 bzw. 3,5 kbp davon (siehe auch Abb. 9). (B) Quantifizierung der aus den Präzipitaten isolierten DNA. (C) Ermittlung der Anreicherung von Origin-Sequenzen. Die Anreicherung wurde bestimmt, indem das Verhältnis der Kopienzahlen des ORC2-Präzipitates mit dem Input gebildet wurde.

Die menschliche Initiation der DNA-Replikation scheint zumindest bei den zwei untersuchten Origins an genau festgelegten Stellen stattzufinden, welche unmittelbar oder über zusätzliche Faktoren als Bindestelle für den Origin Recognition Complex *in vivo* dienen.

Die Anwendung des ChIP-Assay in Kombination mit quantitativen PCR-Methoden ist daher eine nützliche Methode, um die Interaktion von Proteinen mit der DNA *in vivo* zu untersuchen. Die enge Interaktion von ORC-Proteinen mit der DNA könnte darüber hinaus auch Aufschluss über spezifische DNA-Elemente in den entsprechenden Regionen geben. Sowohl der Lamin B2 Origin als auch der in dieser Arbeit neuidentifizierte *TOP1* Origin besitzen ein zentrales A/T-reiches Element in unmittelbarer Nähe zu der Initiationsstelle (Abb. 9 und Abb. 23).

4.7 Analyse von ORC-assoziierten DNA-Sequenzen

Bisher wurde die Bindung von ORC an humane Replikationsorigins beschrieben. In diesem Teil der Arbeit soll nun der ChIP-Assay angewendet werden, um DNA-Sequenzen zu analysieren mit denen ORC-Proteine *in vivo* assoziiert sind. Dazu soll die DNA aus den ORC-Präzipitaten isoliert und direkt in einen Vektor kloniert werden, um anschließend die Inserts durch Sequenzierung zu analysieren. Die damit erhaltenen Sequenzinformationen können zum einen dazu verwendet werden, neue ORC-Binderegionen im Humangenom durch einen Sequenzvergleich in einer Genomdatenbank zu identifizieren. Zum anderen könnten die Sequenzen einen wichtigen Aufschluss über bestimmte DNA-Elemente geben, die für die Bindung von ORC notwendig sind.

4.7.1 Ort-assoziierte DNA Sequenzen weisen einen erhöhten GC-Gehalt auf

Für die Identifizierung von ORC bindenden DNA-Sequenzen wurden Chromatin-Immunpräzipitationen mit ORC1- und ORC2-spezifischen Antikörper durchgeführt. Dies führte zu einer Selektion von ORC-Sequenzen aus einem Pool von genomischen Sequenzen. Die Nukleoproteine wurden wie zuvor mit *Micrococcus* Nuklease behandelt, so dass Chromatinfragmente < 1,5 kbp daraus resultierten (siehe Abb. 21A). Die DNA wurde aus den Präzipitaten isoliert und aufgereinigt. Eine direkte Klonierung von präzipitierter DNA in einen Sequenziervektor stellte sich als nicht machbar heraus, da

die präzipitierten DNA-Mengen für eine Klonierung nicht ausreichten (Daten nicht gezeigt). Daher mussten die aufgereinigten DNA-Fragmente zuerst mit Hilfe der LM-PCR (LM = Ligation-mediated) amplifiziert werden, um auf diese Weise eine Bibliothek von ORC-DNA Fragmenten zu etablieren.

Das Schema in Abbildung 30 zeigt, wie eine solche Bibliothek mit ORC-Sequenzen angelegt wurde. Die DNA-Fragmente wurden zuerst mit dem Klenow Enzym behandelt, um die DNA-Enden über dessen Exonukleaseaktivität bzw. DNA-Polymerasenaktivität „blunt-end“ zu bekommen. Das 3'-Phosphatrest wurde mit dem Enzym Alkalische Phosphatase entfernt, um eine Polymerisierung einzelner DNA-Sequenzen zu verhindern. Anschließend wurden doppelsträngige Linkernukleotide an beide Enden der DNA-Fragmente ligiert, welche dann in der LM-PCR amplifiziert wurden. Nach der PCR stand somit eine Bibliothek amplifizierter DNA-Fragmente zur Verfügung, welche potentiell ORC-Proteine *in vivo* gebunden hatten.

Die amplifizierte DNA wurde in einen geeigneten Sequenziervektor kloniert und in Bakterienzellen transformiert. In unabhängigen Experimenten wurden etwa 20 positive Klone isoliert und deren Inserts durch Sequenzierung näher untersucht. Eine Zusammenfassung dieser Klonierungsexperimente ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Mit einer Ausnahme (Klon ORC2-11 und ORC 2-16), wiesen alle Klone unterschiedliche Sequenzen als Insert auf. Daher ist es nicht anzunehmen, dass in der LM-PCR eine bestimmte DNA-Sequenz bevorzugt amplifiziert worden ist. Die durchschnittliche Länge der Inserts betrug etwa 1250 bp.

Zuerst wurden die klonierten DNA-Sequenzen in ihrer Basenzusammensetzung untersucht (Tabelle 3). Mehr als die Hälfte haben einen überdurchschnittlichen GC-Gehalt aufgewiesen. Dies ist ein sehr bemerkenswertes Merkmal, da eine solche Basenzusammensetzung normalerweise in CpG-Inseln vorgefunden wird (Antequera and Bird, 1993a). Etwa 30000 solcher Inseln sind über das gesamte Humangenom verteilt, wobei eine bevorzugte Lokalisierung in Promotorregionen von aktiven Genen besteht (Antequera and Bird, 1993b; Lander et al., 2001). Interessanterweise befindet sich auch der *TOP1* Promotor und der Lamin B2 Origin innerhalb einer CpG-Insel (Abb. 9 und Abb. 23).

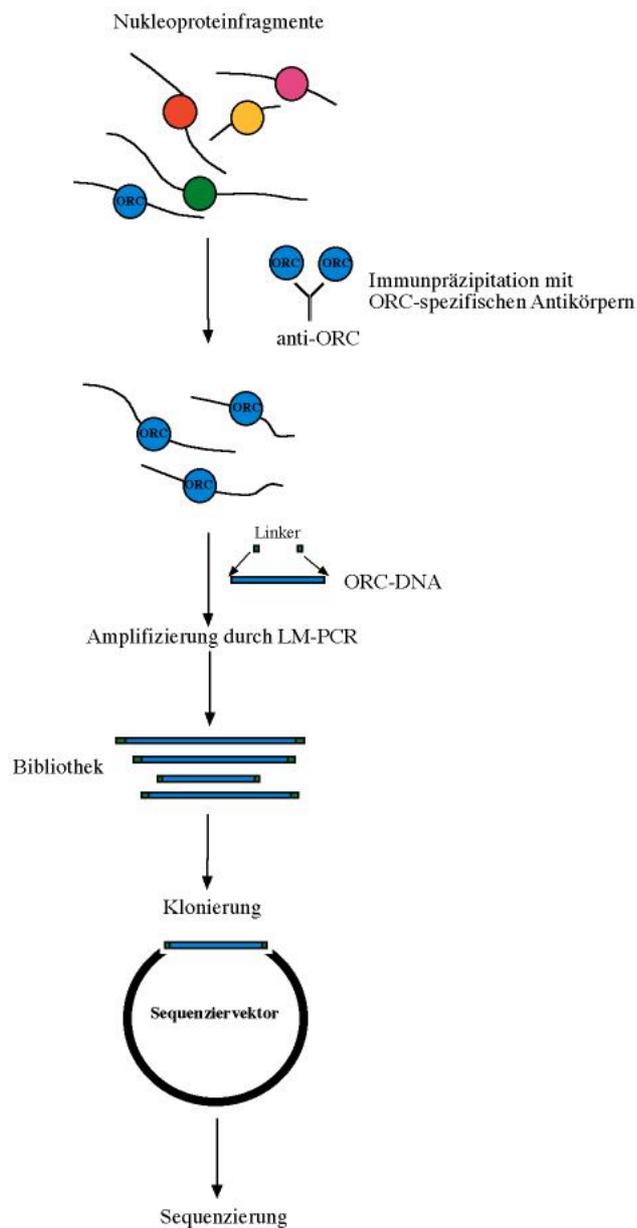


Abbildung 30. **Klonierung von präzipitierter ORC-DNA in einen Sequenziervektor.**

ORC-Proteine wurden an ihren DNA-Bindestellen mit Formaldehyd kreuzvernetzt. Chromatin-Immunpräzipitationen wurden mit ORC-spezifischen Antikörper durchgeführt. Die DNA wurde aus den Präzipitaten aufgereinigt und mit Hilfe der LM-PCR amplifiziert. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden in den pCR-BluntII-TOPO Vektor kloniert. Die Plasmid-DNA wurde in Bakterienzellen transformiert, aufgereinigt und die Inserts anschließend sequenziert.

Darüber hinaus wird schon seit längerem vermutet, dass CpG-Inseln als Replikationsstartstellen dienen sollen, da eine Analyse der Basenzusammensetzung von „nascent DNA“ einen stark erhöhten GC-Gehalt aufgewiesen hat (Delgado et al., 1998). Das so erhaltene Ergebnis weist somit darauf hin, dass auch ORC-Bindestellen, innerhalb oder in der Nähe von solchen Inseln lokalisiert sind.

Als nächstes wurde in der NCBI Datenbank nach Homologien dieser Sequenzen mit bereits sequenzierten genomischen Abschnitten gesucht. Bis heute ließen sich nur 4 der 20 Klone einer bestimmten genomischen Region zuordnen (Tabelle 3). Dies kann unterschiedliche Ursachen haben: Zum einen sind viele Bereiche, auch nach Fortschreiten des Human-Genom-Projektes, noch nicht sequenziert (Bentley, 2000). Hierzu zählen vor allem die aus repetitiven Elementen bestehenden heterochromatische Bereiche. Zum zweiten wurden bevorzugt Regionen mit einem offenen Leseraster sequenziert. Intergenische Bereiche sind lediglich als einzelne „contigs“ zerstreut in den Datenbanken zu finden.

Bei einer geschätzten Anzahl von etwa 30000 Origins im Humangenom ist es daher nicht verwunderlich, dass etliche Startstellen auch in heterochromatischen Bereichen zu finden sein müssen.

Einen Hinweis, dass dies zutrifft, ist bei dem in Abbildung 31 aufgeführten Experiment ersichtlich. Hierbei wurden von 12 der sequenzierten Klone Oligonukleotide aus den ermittelten Sequenzdaten hergestellt und das Vorkommen der Sequenz im Humangenom über PCR-Methoden analysiert. Zuerst wurden die Primer-Sätze mit Plasmid-DNA als Template in einer Standard-PCR getestet. Mit Ausnahme des Primer-Satzes ORC1-7, amplifizierten alle Primer-Paare ein spezifisches Produkt mit der erwarteten Länge (Abb. 31A).

Als nächstes wurde die gleiche PCR mit genomischer DNA als Template durchgeführt. Nur vier Reaktionen amplifizierten ein sauberes Produkt mit der erwarteten Länge (Abb. 31B). Die restlichen Primer-Sätze lieferten zahlreiche Fehlprodukte. Eine Optimierung der PCR-Bedingungen, die auf die einzelnen Primer-Sätze abgestimmt waren, brachte keinen wesentlichen Erfolg (Daten nicht gezeigt).

clon	Estimated insertsize (bp)	G/C content (%)	Sequence analysis	Accession number
ORC1-1	1700	59		
ORC1-2	1700	64		
ORC1-3	1600	42	Homologous to alphoid repetitive satellite DNA; poly A/T tracks	M28031
ORC1-4	1750	58		
ORC1-5	1000	47	GC boxes; poly A/T tracks	
ORC1-6	1200	60		
ORC1-7	500	65	GC boxes; poly A/T tracks	
ORC1-8	600	49	Poly A/T and poly G/C tracks; shares homologies with the human IgG(H) and α -PDGF receptor genes	
ORC1-9	1200	51	Homologies with the mouse troponin (<i>TNNT1</i>) gene locus; poly A tracks	U92882
ORC1-10	1250	51	<i>Mus musculus</i> Bac clone. 80% Homologies to human <i>TOM1</i> gene locus	AC005290
ORC1-14	1250	46		
ORC1-15	1250	-		
ORC2-1		56	Poly A/T tracks	
ORC2-2	1300	43	Poly A/T tracks	
ORC2-3	1100	51	Poly A/T tracks	
ORC2-4	600	-		
ORC2-5	1300	64		
ORC2-11	1200	42		
ORC2-16	1200	42	Sequence identical to clone ORC2-11	
ORC2-17	1500	37	AT-rich; homologous to Human hamster hybrid cosmid clone 38a13	AC000023

20 analysed clones; 10 clones qualify as CpG islands

Tabelle 3. Ergebnisse der Klonierungsexperimente von präzipitierter ORC-DNA.

Die Insertgröße wurde qualitativ über Gel-Elektrophorese abgeschätzt. Der dargestellte GC-Gehalt bezieht sich auf die sequenzierten Anteile. Überdurchschnittliche Anteile von G/C-Basenpaaren sind in Fettdruck gekennzeichnet. Die Zutrittsnummern („Accession number“) von homologen Sequenzen aus der Genom-Datenbank (NCBI GenBank) sind, soweit vorhanden, angegeben. Die Angabe der Homologie in % bezieht sich auf den sequenzierten Anteil.

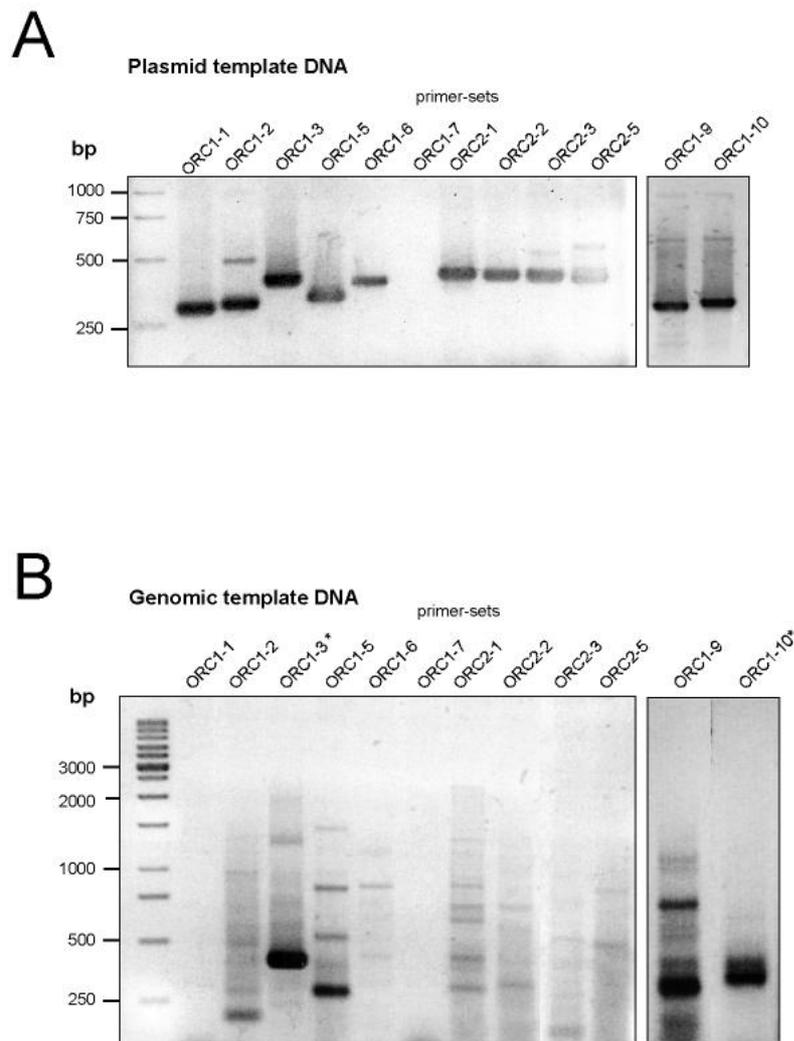


Abbildung 31. Analyse der klonierten ORC-Sequenzen durch PCR.

Von 12 ausgewählten Klonen wurden anhand der ermittelten DNA-Sequenzen Primer-Sätze hergestellt (siehe Tabelle 1, Material und Methoden). (A) Standard-PCR mit Plasmid-DNA als Template. Die Primer-Sätze wurden nach den entsprechenden Klonen benannt. (B) PCR mit 30 ng genomischer DNA als Template. Der Stern (*) markiert die Sequenzen, die mit dem ChIP-Assay weiter untersucht wurden.

Das Auftreten von Fehlprodukten in einzelnen Reaktionen lässt darauf schließen, dass die verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen in ähnlicher Form im Genom vertreten sind, was zum Teil auf den hohen Anteil von G/C Basenpaare zurückzuführen ist. Es ist auch denkbar, dass die klonierten Sequenzen aus nichtsequenzierten heterochromatischen Bereichen stammen, welche aus repetitiven Elementen bestehen und somit zur Amplifizierung von Fehlprodukten führen würde. Diese Vermutung wurde durch die genauere Analyse des Klons ORC1-3 unterstützt. Die Sequenzinformationen lieferte eine Homologie von 97% mit der humanen alphoid repetitiven Satelliten-DNA (Abb. 32). Diese DNA kommt normalerweise in den Centromer und Telomerbereichen von menschlichen Chromosomen vor (Barbosa et al., 2000; Grimes and Cooke, 1998; Jeanpierre, 1994; Jorgensen, 1997; Zaitsev and Rogachev, 1986).

4.7.2 Bindung von ORC an heterochromatische alphoid Satelliten-DNA

Um zu testen, ob der Origin Recognition Complex an alphoid Satelliten-DNA *in vivo* gebunden ist, wurden unabhängige ChIP-Assays durchgeführt. Dazu wurden Chromatin-Immunpräzipitationen mit ORC2-spezifischen Antikörper durchgeführt. Daneben gab es drei Kontroll-Präzipitationen mit Antikörper gegen p60/CAF-1, SP1 sowie unspezifische IgG. Die DNA wurde aus den Immunpräzipitaten extrahiert, aufgereinigt und das Vorkommen der alphoid DNA in den Präzipitaten mit dem unter Abbildung 31 beschriebenen Primer-Satz (ORC1-3) quantitativ in der Real-time PCR analysiert (Abb. 33). Als Kontrolle diente die genomische Region welche homolog zu den Sequenzen des TopC1 Primer-Satzes ist (siehe Abb. 23). Zuerst wurde das Vorkommen der Sequenzen der alphoid DNA sowie der Kontrollregion vor der Immunpräzipitation überprüft (Abb. 33A, input). Im Vergleich zur Kontrollregion wurde die alphoid DNA eher von Microcococcus Nuklease angegriffen, was zu einer Verringerung der Kopienzahl um den Faktor 2 führte. Dies könnte mit einer Bevorzugung der alphoid DNA für die Microcococcus Nuklease zusammenhängen (Horz et al., 1983).

Score = 864 bits (436), Expect = 0.0
Identities = 481/494 (**97%**), Gaps = 2/494 (0%)
 Strand = Plus / Minus

Query: 364 ccctccaaatgccacttgagattctagaaaaagagggttcagagctgctctgcaag 423
 |||
 Sbjct: 2235 ccctccaaatgccacttgagattctagaaaaagagggttcagagctgctctgcaag 2176

Query: 424 aggaaagtcaattcctgaagtggaacacaaacatcacaagcagttctgagaatgctc 483
 |||
 Sbjct: 2175 aggaaagtcaattcctgaagtggaacacaaacatcacaagcagttctgagaatgctc 2116

Query: 484 ctgttagttttctggaagatgaaccggttccaacgaaatctcacagaggtccaca 543
 |||
 Sbjct: 2115 ctgttagttttctggaagatgaaccggttccaacgaaatctcacagaggtccaca 2056

Query: 544 tatccactgcagaatccaagaagagagtttcaaaactgctccatcagcaggattgtt 603
 |||
 Sbjct: 2055 tatccactgcagaatccaagaagagagtttcaaaactgctccatcagcaggattgtt 1996

Query: 604 cacctctgagttgaatgcagtcacaggaacattctgagaatgctctgcttagg 663
 |||
 Sbjct: 1995 cacctctgagttgaatgcagtcacaggaacattctgagaatgctctgcttagg 1936

Query: 664 tttgatgtgaagatataccggttcgaaggaaggccacaaagtggtcgaaatatccact 723
 |||
 Sbjct: 1935 tttgatgtgaagatataccggttcgaaggaaggccacaaagtggtcgaaatatccact 1876

Query: 724 gcagatctacaaaacagtggttgaagctgaactatgaaagcaagggtcaactctgtg 783
 |||
 Sbjct: 1875 gcagatctacaaaacagtggttgaagctgaactatgaaagcaagggtcaactctgtg 1816

Query: 784 agttgaatcacaacatcacaagaagtttctcanaatgcttccg-gtagttctnggaag- 841
 |||
 Sbjct: 1815 agttgaatcacaacatcacaagaagtttctcanaatgcttccg-gtagttctnggaag 1756

Query: 842 ttatcccggttcca 855
 |||
 Sbjct: 1755 ttatcccggttcca 1742

Abbildung 32. **Homologien der alphoid Satelliten-DNA mit der ORC1-3 Sequenz.**

Die Recherche erfolgte durch einen Sequenzvergleich in der NCBI Datenbank (Query = ORC1-3 Sequenz, Sbjct = alphoid Satelliten-DNA; „Accession number“: M28031). Gleiche Basenpaarungen sind durch senkrechte Striche dargestellt („Alignments“). Die Homologie der klonierten ORC1-3 Sequenz zur alphoid Satelliten-DNA beträgt 97%.

Als nächstes wurde die DNA aus den Präzipitaten quantitativ vermessen (Abb. 33B). Hierbei ließen sich etwa 95 Kopien der alphoid DNA im hORC2-Präzipitat nachweisen während nur wenige Moleküle als Hintergrundsignal in den Kontroll-Präzipitaten vorhanden waren (Abb.33B). Die Kopienzahlen von sowohl des ORC2-Präzipitates als auch von den Kontroll-Präzipitaten bei der quantitativen Analyse der Kontrollregion lagen unter 40 und entsprechen somit den routinemäßig erhaltenen Hintergrundswerten (Abb. 33C). Mit den so ermittelten Werten wurde die Anreicherung der alphoid Satelliten-DNA im ORC2-Präzipitat bestimmt (Abb. 33D). Das Ergebnis zeigt klar, dass die alphoid Satelliten-DNA gegenüber der Kontrollregion etwa um den Faktor 6 angereichert ist. Keine spezifische Anreicherung dieser Sequenzen lies sich bei den Kontroll-Präzipitaten feststellen.

Somit wurde in diesem Experiment in einem unabhängigen ChIP-Assay die Bindung von ORC an alphoid Satelliten-DNA nachgewiesen. Die Daten deuten darauf hin, dass ORC auch in dichteren heterochromatischen Regionen des Genoms bindet.

Nun war es von Interesse festzustellen, ob sich in dieser Region auch eine Startstelle der DNA-Replikation befindet. Dazu wurde der „Nascent Strand Abundance Assay“ mit den oben beschriebenen Primer-Sätzen angewendet. Die quantitative Analyse der nascent DNA brachte jedoch keine Anreicherung von alphoid Satelliten-DNA Sequenzen gegenüber der Kontrollregion (Daten nicht gezeigt). Es ist daher wahrscheinlich, dass sich in der untersuchten Region kein Origin befindet, oder dass dieser Origin zwar von ORC markiert wird, aber von der Zelle nicht für die Initiation aktiviert wird.

Viel interessanter wäre jedoch der Aspekt, dass ORC nicht nur für die Initiation der DNA-Replikation benötigt wird, sondern auch weitere Funktionen innerhalb der menschlichen Zelle wahrnimmt. Tatsächlich wurde die Rolle des Origin Recognition Complex bei der Abschaltung von Genen („transcriptional silencing“) und bei der Organisation von Heterochromatin in der Hefe sowie in *Drosophila* diskutiert (Bell et al., 1993; Iizuka and Stillman, 1999; Shareef et al., 2001; Triolo and Sternglanz, 1996). Gleiche oder ähnliche Funktionen könnte auch der humane Origin Recognition Complex erfüllen.

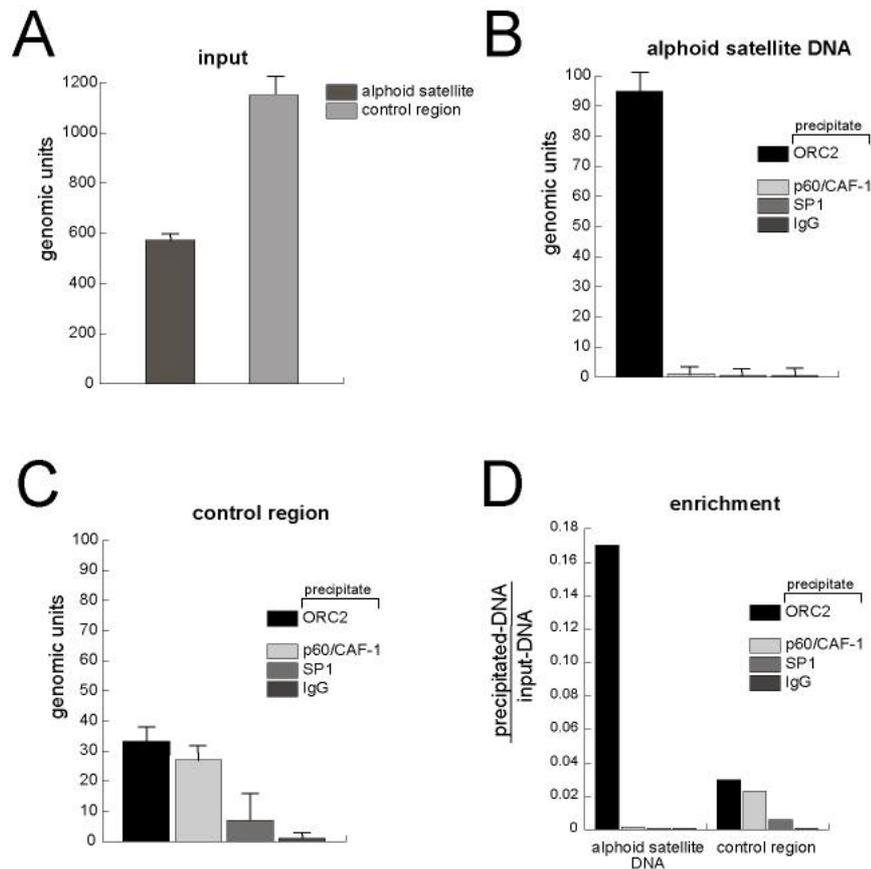


Abbildung 33. **ORC bindet an repetitive alphaoid Satelliten-DNA in vivo.**

ChIP-Assay. Chromatin-Immunpräzipitation in Verbindung mit quantitativer Real-time PCR wurden mit den gekennzeichneten Antikörper durchgeführt. (A) Quantifizierung der alphaoid Satelliten-DNA Sequenzen und einer Kontrollregion (TopC1 Primer-Satz, siehe Abb. 23), vor der Immunpräzipitation (input). (B) Die DNA wurde aus den einzelnen Präzipitaten isoliert und das Vorkommen der alphaoid DNA im Light-Cycler quantifiziert. (C) Quantifizierung der Sequenzen der Kontrollregion. (D) Anreicherung von alphaoid Satelliten-DNA Sequenzen im ORC2-Präzipitat. Die Anreicherungsfaktoren wurde durch das Bilden der Verhältnisse der Kopienzahlen der einzelnen Präzipitate mit den Kopienzahlen der Input-DNA ermittelt.

Ein weiterer Klon (ORC1-10) der ORC-DNA Sequenzierung wurde näher analysiert. Die Sequenz zeigt Homologien mit einer intergenischen Region des humanen *TOM1* Gens (Seroussi et al., 1999). Das Gen ist auf dem humanen Chromosom 22q13.1 lokalisiert und wird von den zwei benachbarten Genen eingeschlossen, wobei eines davon das *HMG2L1* Gen ist, welches eine HMG-Box beinhaltet. Die ORC-Bindung wurde wie oben beschrieben mit dem ChIP-Assay untersucht. Diese Sequenz war ebenfalls im ORC-Präzipitat angereichert, jedoch gab es keinen Hinweis auf eine Anreicherung der Sequenz bei der präparierten nascent DNA (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend wurde in diesem Teil der Arbeit gezeigt, dass der humane Origin Recognition Complex an den zwei aktiven Replikationsstartstellen (*TOP1* Locus und Lamin B2 Locus) in vivo gebunden ist. Auch scheint ORC funktionell oder strukturell eine Komponente des Heterochromatins zu sein, was durch die Bindung von ORC an alphoid Satelliten-DNA deutlich wurde.

KAPITEL 5

DISKUSSION

5.1 Initiation der DNA-Replikation in einem zellfreien System

5.1.1 Zeitliche und räumliche Koordination der DNA-Replikation

Die Untersuchungen zur sequenzspezifischen Initiation der DNA-Replikation ist bei mehrzelligen Organismen, wie beim Menschen bisher recht schwierig und zum Teil in ihrer Auswertung konträr gewesen. Während in einzelligen Eukaryonten, wie in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* konservierte Sequenz-Elemente (ARS) existieren, an denen die DNA-Replikation eingeleitet wird, ist der Ablauf der Replikation des Genoms höherer mehrzelliger Eukaryonten noch weitgehend unklar. In verschiedenen experimentellen Systemen wurden Beobachtungen gemacht, die von völlig unspezifischer Initiation bis hin zur Origin-spezifischen Initiation, ausgehend von einem Start-Nukleotid, reichten. So wird in *Xenopus laevis* oder *Drosophila melanogaster* Embryos beinahe jede DNA, bis zum Blastula Stadium der Embryonalentwicklung, für genau eine Runde repliziert (Coverley and Laskey, 1994). Gleiche Beobachtungen gewinnt man bei Untersuchungen am Hamster *DHFR* Locus. Werden Zellkerne zu verschiedenen Zeitpunkten der G1-Phase isoliert und in *Xenopus* Eiextrakten inkubiert, findet man bis zu einem konkreten Punkt in der späten G1-Phase nur unspezifische Initiationsereignisse (Wu and Gilbert, 1996). Wird dieser Punkt jedoch passiert, findet die Initiation spezifisch am ori- β des *DHFR* Locus statt. Dieser Punkt wurde daraufhin auch als „Origin Decision Point“ (ODP) bezeichnet, da er die sequenzspezifische Aktivierung von Origins festlegt (Wu and Gilbert, 1996). Werden jedoch die Post-ODP Zellkerne permeabilisiert, geht die Spezifität der Initiation

verloren und die DNA repliziert für eine Replikationsrunde unspezifisch (Hyrien et al., 1995; Hyrien and Mechali, 1993; Wu and Gilbert, 1996).

Beim Menschen ist das genaue „Timing“ der Origin Aktivierung bisher noch nicht untersucht worden. Die Entwicklung eines humanen zellfreien Systems, welches vollständig aus somatischen Zellen hergeleitet wurde, erlaubte es gezielte Untersuchungen durchzuführen, um diese Fragen zu beantworten.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass menschliche Zellkerne die aus synchronisierten Zellen in der G1-Phase isoliert wurden, die semikonservative DNA-Replikation einleiten, wenn sie in cytosolischen Extrakt menschlicher Zellen inkubiert werden (Krude, 2000; Krude et al., 1997). Die Initiation kann hierbei durch Analyse der Replikationsfoci in individuellen Zellkernen durch konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Das einführende Kontrollexperiment dieser Arbeit zeigte, dass asynchron proliferierende Zellen mit Mimosin in der späten G1-Phase des Zellzykluses arretiert werden können und in dieser Phase keine signifikante DNA-Synthese abläuft (Abb. 4). Werden die Zellen jedoch nach dem Mimosinblock in die S-Phase entlassen, kommt es zu einem rapiden Anstieg der DNA-Synthese, was übereinstimmend mit den durchgeführten FACS-Analysen ist.

Als nächstes wurde bestätigt, dass in Zellkernen, die sich in der späten G1-Phase befinden, neue Replikations-Foci in vitro etabliert werden. Die Initiation erfolgte hierbei ausschließlich in Zellkernen, die im vorhergehenden Zellzyklus keine aktive Replikationsgabeln etabliert hatten (Abb. 5). Die Initiation der DNA-Replikation erfolgte sowohl in vitro als auch in vivo an den selben Chromatindomänen an denen bereits im vorhergehenden Zellzyklus die DNA-Replikation in vivo eingeleitet wurde. Die Initiation beschränkte sich jedoch ausschließlich auf sehr früh replizierende Chromatindomänen, da Regionen, welche normalerweise erst in der mittleren bis späten S-Phase replizieren, von der Initiation ausgeschlossen waren. Darunter fallen zum Beispiel die perinuklearen oder perinukleolaren heterochromatische Bereiche, welche in der mittleren S-Phase bzw. die Nukleoli, welche in der späten S-Phase replizieren. Somit scheint die zeitliche Reihenfolge der Replikation einzelner Replikons im zellfreien System in vitro erhalten zu bleiben.

Die Frage, ob die Initiation der DNA-Replikation sequenzspezifisch erfolgt, konnte durch die Analyse von zwei humanen Replikationsorigins beantwortet werden. Der Lamin B2 Origin ist bereits als früh replizierender Origin identifiziert worden (Biamonti et al., 1992b; Giacca et al., 1994) und dessen Startstellen für die bidirektionale Replikation konnten auf das Nukleotid genau bestimmt werden (Abdurashidova et al., 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Initiation der DNA-Replikation in isolierten Zellkernen spezifisch an der Initiationsstelle des Origins stattfindet, wenn die Zellkerne für drei Stunden durch Inkubation im cytosolischen Extrakt in die S-Phase entlassen werden (Abb. 13). Als Kontrolle dienten intakte Zellen, bei denen der Lamin B2 Origin beim Eintritt in die frühe S-Phase aktiviert wurde.

Die zeitliche Reihenfolge der Initiation wurde in einem weiteren Experiment untersucht. Der humane rDNA Locus repliziert in einer stromaufwärts gelegenen Promotorregion erst in der mittleren S-Phase *in vivo* und wurde im zellfreien Initiationssystem weiter untersucht. Es konnten keine Replikationszwischenprodukte in der G1-Phase oder frühen S-Phase *in vitro* nachgewiesen werden (Abb. 14). Dies spiegelt die Situation *in vivo* wieder, in der diese Sequenzen beim Eintritt in die S-Phase nicht initiiert wurden. Die Replikation fand wie erwartet zu einem späteren Zeitpunkt in der S-Phase statt. Die genaue zeitliche Abfolge der DNA-Replikation an den gesamten rDNA Repeats wurde bisher in humanen Zellen jedoch noch nicht untersucht. Die bisherigen Experimente zur Bestimmung von Startstellen am rDNA Locus wurden mit asynchronen Zellen durchgeführt (Haaf, 1997; Little et al., 1993; Yoon et al., 1995). Eine Arbeit beschreibt jedoch ein differenziertes Timing der rDNA Replikation in der S-Phase, in der eine Subpopulation bereits in der frühen S-Phase repliziert, während eine andere erst später in der S-Phase repliziert (Larner et al., 1999).

In dieser Arbeit werden die Zellen für 80 min aus einem Block mit einer geringen Mimosinkonzentration (0.2 mM) entlassen, um daraufhin die Replikationszwischenprodukte nachweisen zu können. Diese Beobachtung stimmt mit unabhängig erhaltenen Daten nicht überein, da gezeigt wurde, dass 0.2 mM Mimosin die Zellen in der frühen S-Phase und nicht vor der Initiation in der späten G1-Phase

arretiert (Krude, 1999). Ein Entlassen der Zellen für 80 min würde daher die Zellen in der mittleren S-Phase synchronisieren und ist somit konsistent mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Synchronisierungsprotokoll, welches die Zellen für drei Stunden nach einem doppelten Thymidinblock entlässt, um sie in die mittlere S-Phase zu bringen. Es ist daher anzunehmen, dass die Replikation wie sie von Larner et al. beschrieben worden ist, nicht zu Beginn der S-Phase eingeleitet worden ist, sondern vielmehr zu einem späteren Zeitpunkt in der mittleren S-Phase, was in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten wäre.

5.1.2 Die Koordination der Initiation und Sequenzspezifität

Die molekularen Mechanismen, die den zeitlichen Ablauf der Origin-Aktivierung während der S-Phase in mehrzelligen Organismen definieren, werden erst langsam verstanden (Gilbert, 2001b). Zumindest im *Xenopus* Eiextrakt System sind die Ereignisse während des Durchlaufens der G1-Phase gut untersucht worden. Das Timing der DNA-Replikation wird bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der G1-Phase festgelegt und findet etwa 1 – 2 Stunden nach der Metaphase statt (Dimitrova and Gilbert, 1999). Dieser Zeitpunkt wird auch als der „Timing Decision Point“ (TDP) bezeichnet (Dimitrova and Gilbert, 1999; Li et al., 2001). In den Zellkernen von Mimosin-arretierten Zellen wird diese strenge zeitliche Koordination der DNA-Replikation sowohl in vivo als auch in vitro eingehalten. Daher scheint Mimosin menschliche Zellen, nach dem Durchlaufen des TDP, in der G1-Phase zu arretieren. Die Spezifität der Replikation wird in einem zweiten Punkt in der späten G1-Phase, 3 – 4 Stunden nach der Metaphase festgelegt (ODP) (Wu and Gilbert, 1996). Beim Eintritt in die S-Phase wird die DNA-Replikation an spezifischen Origin-Sequenzen in vitro eingeleitet. Die selben Sequenzen werden auch für die Initiation der DNA-Replikation in intakten Zellen in vivo benutzt. Die Arretierung der Zellen durch Mimosin scheint somit nach dem ODP stattzufinden, da die zeitliche Koordination und Sequenzspezifität der Initiation erhalten bleibt. Die molekularen Ereignisse, welche die DNA-Replikation bereits zu Beginn der G1-Phase vorbereiten und welche Faktoren zur Definition des TDP bzw. ODP führen, sind bislang noch unklar (Gilbert, 2001b). Jedoch scheint festzustehen,

dass *cis*-wirkende Faktoren des Zellkernes oder der DNA die Spezifität der DNA-Replikation in humanen Zellen bewirken, während *trans*-wirkende Faktoren die zeitliche Koordination festlegen. Die Bereitstellung der *trans*-wirkenden Faktoren, wie zum Beispiel lösliche Initiationsfaktoren, wird im zellfreien System durch den cytosolischen Zellextrakt gewährleistet, während die *cis*-wirkenden Faktoren durch die Zellkerne bzw. der darin enthaltenen DNA bestimmt werden.

Das genaue Festlegen, wann und wo die Initiation im Genom stattfinden soll, scheint somit in der Zelle bereits in der frühen G1-Phase festgelegt zu werden. Diese Schlussfolgerung wird durch andere Beobachtungen an isolierten menschlichen Zellkernen bestätigt. So dienen Zellkerne, welche sehr früh in der G1-Phase aus den Zellen isoliert werden, nur als relativ schlechte Templates für eine Initiation in humanen Zellextrakten (Krude et al., 1997; Stoeber et al., 1998). Diesen Zellkernen scheint die Kompetenz für eine erfolgreiche und effiziente Einleitung der DNA-Replikation zu fehlen. Dagegen wird die Replikation in Zellkernen von späten G1-Phasen Zellen sehr effizient eingeleitet. Die Zellkerne können hierbei aus Mimosin-arretierten Zellen stammen (Krude et al., 1997), oder aus Zellen welche für 18 Stunden aus der G0-Phase entlassen wurden (Stoeber et al., 1998). Somit scheinen die Bedingungen und Faktoren, welche zu einer zeitlich koordinierten und sequenzspezifischen Initiation in isolierten Zellkernen führen, in dem beschriebenen zellfreien System vorhanden zu sein. Dies gilt insbesondere für die isolierten Zellkerne, welche diese Faktoren in *cis* bereits vor der Präparation etabliert haben mussten.

Diese Ergebnisse liefern somit einen wichtigen Beitrag für das Verständnis der zeitlichen und räumlichen Koordination der DNA-Replikation des Menschen. Darüber hinaus sind in diesem zellfreien humanen *in vitro* Initiationssystem die Arbeiten zur zeitlichen Koordination der Replikation, welche in einem Mischsystem, bestehend aus isolierten Hamster-Zellkernen und *Xenopus* Eiextrakten, gewonnen wurden, bestätigt worden. Es konnten auch Hinweise geliefert werden, dass die Initiation in isolierten Zellkernen an spezifischen Origin-Sequenzen eingeleitet wird und dass die Aktivierung einzelner Origins während der S-Phase nacheinander erfolgt.

5.1.3 Parallelen zu einem zellfreien System bei *Saccharomyces cerevisiae*

Die Initiation der DNA-Replikation in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* findet an konservierten DNA-Sequenzen statt, welche in regelmäßiger Reihenfolge über das Genom verteilt sind (ARS)(Gilbert, 2001a; Marahrens and Stillman, 1992). Die Initiation setzt die Bildung eines Prä-Replikationskomplexes voraus, welcher u.a. aus dem hexameren „Origin Recognition Complex“ (ORC), den MCM Proteinen, dem Cdc6- und Cdt1 Protein sowie der Cdc7/Dbf4 Proteinkinase besteht. In einem zellfreien Hefesystem konnte gezeigt werden, dass die DNA-Replikation in isolierten G1-Phase Zellkernen eingeleitet wird, wenn die Kerne in cytosolischen Extrakt von S-Phase Zellen inkubiert werden (Pasero et al., 1997). Die Initiation setzt die Bindung des ORC-Komplexes sowie die Aktivität der Cdc7/Dbf4 Kinase an ARS-Sequenzen voraus (Pasero et al., 1997; Pasero et al., 1999b). Dieser Kinasekomplex wird auch als „S phase-promoting Kinase“ (SPK) bezeichnet, da er den Prä-Replikationskomplex in einen „aktiven“ Replikationskomplex überführt. Es wurde ein weiterer nuklearer Kinasekomplex, Clb/Cdc28, identifiziert, welcher für die Initiation essentiell ist (Pasero et al., 1999a). Somit scheint im zellfreien „in vitro“-System der Hefe, die Aktivität von Cyklin-abhängigen Kinasen für die Initiation notwendig zu sein. Dies ist eine bedeutende Beobachtung, da im humanen zellfreien System ebenfalls S-Phasen-spezifische Kinasen für die Initiation in den Zellkerne identifiziert wurden (Cyklin A/Cdk1, Cyklin E/Cdk1)(Krude, 2000; Krude et al., 1997). Die Aktivität dieser Cyklin-abhängigen Kinasen setzt beim Eintreten in die S-Phase ein und bleibt bis zur Metaphase erhalten (Noton and Diffley, 2000). In der Anaphase werden diese Aktivitäten zerstört, so dass es zur Neubildung von Prä-Replikationskomplexen kommen kann. Das Zusammenspiel verschiedener zyklischer Kinasenaktivitäten in den einzelnen Phasen des Zellzykluses ist notwendig, um die DNA-Replikation zu Beginn der S-Phase vorzubereiten und um eine Re-Replikation des Genoms zu verhindern. Ein weiterer Proteinfaktor, Geminin, wurde identifiziert, der dieses Szenario weiter unterstützt (Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000).

Es können somit, neben der zeitlichen Koordination und der Sequenzspezifität der Initiation der DNA-Replikation, weitere Parallelen des Hefe-Systems mit dem

menschlichen „in vitro“-System gezogen werden, auch wenn die Organisation und der Aufbau menschlicher Origins stark von den ARS-Sequenzen, wie sie in der Hefe beschrieben worden sind, abweicht. In jedem Fall findet die Entscheidung über einen geordneten Ablauf der DNA-Replikation, sowohl im Hefe- als auch im menschlichen Zellkernen, zu einem frühen Zeitpunkt am Ende der Metaphase bzw. zu Beginn der G1-Phase statt.

5.2 ORC-Proteine am Chromatin

5.2.1 Intrazelluläre Lokalisierung der ORC-Proteine

Der Origin Recognition Complex (ORC) ist in vielen der bisher untersuchten Eukaryonten ein wichtiger Bestandteil für die Einleitung der DNA-Replikation. Durch die Bindung von ORC an Origin-Sequenzen wird es ermöglicht, dass zusätzliche Initiationsfaktoren, wie zum Beispiel Cdc6, Cdt1 oder die MCM-Proteine, einen funktionellen Prä-Replikationskomplex in der G1-Phase bilden (Cocker et al., 1996; Diffley and Cocker, 1992; Diffley et al., 1994; Lee and Bell, 1997; Maiorano et al., 2000; Mendez and Stillman, 2000; Rowley et al., 1995; Zou and Stillman, 1998). Erst im Verlauf der Anfertigung dieser Arbeit wurden auch die menschlichen homologen ORC-Proteine identifiziert, was die Herstellung neuer Antikörper gegen alle sechs ORC-Proteine ermöglichte (Dhar and Dutta, 2000; Pinto et al., 1999; Quintana and Dutta, 1999; Quintana et al., 1997; Quintana et al., 1998). Mit den so erhaltenen Antikörper konnten grundlegende zellbiologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt werden. Durch Zellfraktionierungsexperimente konnte eine klare Assoziation aller humanen ORC-Proteine mit dem Chromatin festgestellt werden (Abb. 19). Dieses Ergebnis vereinheitlicht das Bild über die Chromatinbindung von ORC in verschiedenen Organismen, denn in *Saccharomyces cerevisiae* bleibt der Komplex während des gesamten Zellzykluses an das Chromatin gebunden (Aparicio et al., 1997; Diffley and Cocker, 1992; Diffley et al., 1994; Liang and Stillman, 1997). Ein ähnliches Verhalten bei der Chromatinbindung wurde auch für den in *Xenopus laevis* identifizierten

Komplex im zellfreien Eiextrakt System festgestellt (Romanowski et al., 1996; Rowles et al., 1996; Rowles et al., 1999).

Eine Co-Elution von hORC1 – hORC6 konnte bei der Chromatinfractionierung in der 250 mM Fraktion festgestellt werden. Das ORC1-Protein scheint resistenter gegen eine Elution mit Salz zu sein, da höhere Salzkonzentrationen notwendig waren, um das gesamte Protein vom Chromatin zu eluieren. Dies deutet darauf hin, dass zumindest eine Population von hORC1 in dichter gepackten Chromatinbereichen lokalisiert ist. Tatsächlich wurde in unabhängigen Experimenten eine Population des ORC1-Proteins in Micrococcus Nuklease resistenten Chromatinregionen angetroffen (Kreitz et al., 2001; Tatsumi et al., 2000). Eine Sonderrolle spielt auch hORC6, da dieses Protein in beträchtlichen Mengen in löslicher Form im Cytosol und im Nukleosol detektierbar war. Dies könnte auf eine eher schwache Assoziierung mit Chromatin hinweisen, oder auf zusätzliche Funktionen dieses Proteins in anderen Kompartimenten der Zelle.

5.2.2 ORC-Proteine im Komplex

Einen wichtigen Hinweis auf eine Komplexbildung der sechs ORC-Proteine wurde durch die in dieser Arbeit durchgeführten Chromatin-Immunpräzipitationen gewonnen. Hierbei wurden die Proteine zuvor durch Behandlung mit Formaldehyd miteinander an die DNA kreuzvernetzt. Nach der Kreuzvernetzung konnten alle sechs ORC-Proteine im ORC2-Präzipitat nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass sie entweder in einem Komplex oder als mehrere Subkomplexe am Chromatin organisiert sind. Die erste Schlussfolgerung wurde durch erst kürzlich veröffentlichte Arbeiten gestützt, die eine Komplexbildung von hORC1- hORC6 mit rekombinant exprimierten Proteinen gezeigt haben (Dhar et al., 2001; Vashee et al., 2001). Allerdings konnten die Autoren lediglich einen aus hORC2 – hORC5 bestehenden Komplex vom Hela Zellchromatin co-immunpräzipitieren. hORC1 und hORC6 waren in den Präzipitaten nicht in den gleichen stöchiometrischen Mengen identifizierbar, was vermutlich mit der unterschiedlichen Sensitivität dieser Proteine bei der Salzbehandlung während der Chromatinelution zusammenhängt (Dhar et al., 2001; Dhar and Dutta, 2000; Vashee et al., 2001) (siehe auch Abb. 19). So wurden bei der oben beschriebenen

Chromatinfractionierung hORC6 bereits mit 100 mM NaCl vom Chromatin eluiert während der Großteil von hORC1 in der 450 mM Fraktion präsent war, was auf eine unterschiedliche Stabilität hinweist. Die von Dhar et al. und Vashee et al. gemachten Beobachtungen wurden in dieser Arbeit bestätigt, da ORC6 zwar mit den anderen ORC-Proteinen kreuzvernetzt werden konnte, aber nur geringe Mengen von ORC6 mit den ORC2-spezifischen Antikörper präzipitiert werden konnten. Durch die Kreuzvernetzung von hORC1 und hORC6 mit den anderen ORC-Proteinen, und den damit eingeführten kovalenten Bindungen, wurde vermutlich das Problem der labilen Bindung und der Salzsensitivität umgangen. Daher zeigen diese Daten, dass ein aus allen sechs Proteinen bestehender, vermutlich einheitlicher Komplex am menschlichen Chromatin nachgewiesen werden konnte.

5.3 Bindung von ORC in Promotorbereichen

5.3.1 Koordination von DNA-Replikation mit der Transkription

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit widmete sich der Identifizierung von Bindestellen des Origin Recognition Complex im Humangenom. Hierbei konnte zum ersten Mal eine Bindestelle von ORC-Proteinen einer genomischen Region zugeordnet werden, welche zugleich als Startpunkt der bidirektionalen DNA-Replikation dient.

Für diese Untersuchungen wurden Chromatin-Immunpräzipitationen mit kreuzvernetzten Nukleoproteinen durchgeführt (Göhring and Fackelmayer, 1997; Orlando, 2000). Eine Analyse der ORC-assoziierten DNA-Sequenzen durch quantitative Real-time PCR zeigte, dass ORC innerhalb einer CpG-Insel des *TOP1* Promotors bindet. Obwohl die Auflösung des ChIP-Assays bei etwa 1 kbp liegt, ist es sehr wahrscheinlich, dass sich die ORC-Bindestelle in der Nähe der Bindestellen für den Transkriptionsfaktor SP1 befindet. Dies kann aus der Co-Immunpräzipitation von SP1 mit ORC2 geschlossen werden. Darüber hinaus konnten mit Antikörper gegen SP1 die gleichen Sequenzen präzipitiert werden, wie mit den ORC2-spezifischen Antikörper. Weiterhin fand ich bei der Sequenzierung der DNA, welche aus SP1-Präzipitaten

isoliert wurde, bei der Mehrheit der Sequenzen einen überdurchschnittlichen GC-Gehalt sowie GC-Boxen, was auf potentielle Bindemotive für SP1 hinweist (Daten nicht gezeigt).

Neben ORC2, konnte auch eine Bindung von ORC1 an dieselbe Sequenz nachgewiesen werden. Die Anreicherung von Promotor-Sequenzen betrug im ORC1-Präzipitat jedoch etwa 2 Mal weniger als im ORC2-Präzipitat. Dies hängt vermutlich mit der geringeren Menge an immunpräzipitierbaren ORC1-Proteine zusammen, denn es wurde gezeigt, dass ORC1 während der S-Phase abgebaut wird, während ORC2 am Chromatin gebunden bleibt (Kreitz et al., 2001; Mendez and Stillman, 2000; Natale et al., 2000). Auch zeigen die für die Präzipitation benutzten Antikörper eine unterschiedliche Qualität bei den Chromatin-Immunpräzipitationen, abhängig davon wie gut sie ihr Ziel-Epitop erreichen (Daten nicht gezeigt).

Obwohl hier lediglich die Bindung der ORC1- und ORC2-Proteine an die Promotorregion analysiert wurde, ist es vermutlich der gesamte Komplex, der in dieser Region bindet. Diese Vermutung wird durch zwei Beobachtungen bekräftigt: Erstens können alle sechs ORC-Proteine mit ORC2-spezifischen Antikörper präzipitiert werden. Zweitens wurde in unabhängigen Arbeiten gezeigt, dass der gesamte hexamere Komplex in Insektenzellen exprimiert und gereinigt werden kann (Dhar et al., 2001; Vashee et al., 2001).

In einem anderen System wurde gezeigt, dass die *TOP1* Promotor-Sequenzen bei einer Präparation von nascent DNA angereichert waren, was deutlich darauf hinweist, dass sich in der gleichen Region auch eine Startstelle der bidirektionalen DNA-Replikation befindet. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit früheren Beobachtungen überein, die darauf hinweisen, dass Origins in der Nachbarschaft von aktiv transkribierten Genen liegen (Antequera and Bird, 1999; Delgado et al., 1998).

Die Bindung von ORC in einem aktiven Promotor könnte eine funktionelle Bedeutung haben, denn eine Beziehung zwischen Transkription und früher DNA-Replikation wurde bereits sehr gut in viralen Genomen untersucht (Murakami and Ito, 1999; Van der Vliet, 1996). Hierbei fördert die Interaktion von viralen Initiatorproteinen mit Transkriptionsfaktoren die Initiation der viralen DNA-Replikation (Guo and

DePamphilis, 1992; Turner and Woodworth, 2001). Auch in höheren Eukaryonten wurde eine Beziehung zwischen Transkription und Replikation gefunden. So stimuliert die Bindung des Transkriptionsfaktors Abf-1 an das B3-Element der ARS die Aktivierung des Origins in beträchtlicher Weise (Diffley and Stillman, 1988). Ein Grund für die bevorzugte Lokalisierung von Replikationsstartstellen in Promotoren könnte eine aufgelockerte Chromatinstruktur sein, wie sie in von aktiv transkribierten Genen vorhanden ist (Melendy and Li, 2001). Hierbei könnte auch die Methylierung von CpG Dinukleotiden in GC-reichen Abschnitten eine Rolle spielen (Antequera and Bird, 1999; Araujo et al., 1999). Eine geringere Dichte des Chromatins könnte so die Bindung von Replikations-Initiatorproteinen, wie zum Beispiel ORC, an die DNA begünstigen. Tatsächlich wurde in einer neueren Arbeit gezeigt, dass aktiv transkribierte Haushaltsgene sehr früh in der S-Phase repliziert werden, während die gleichen Gene in differenzierten Zellen, in denen sie nicht exprimiert werden, erst später in der S-Phase replizieren (Simon et al., 2001).

In der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* liegen die aktiven Origins in der Nähe von Promotoren, während die nichtaktiven in anderen Regionen lokalisiert sind (Gomez and Antequera, 1999). Ein anderes Beispiel ist der rDNA Locus in der Hefe, bei dem die ARS-Elemente in den Spacer-Regionen lokalisiert sind. Die aktiven Origins liegen immer in den transkriptionsaktiven Bereichen, während die nichtaktiven in den stillen Genregionen liegen (Hyrien and Mechali, 1993). In einem frühen Stadium des *Xenopus* Embryos, wenn die Gene nicht transkribiert werden, findet die Initiation unspezifisch an nicht festgelegten Stellen in diesem Locus statt. Im späteren Verlauf jedoch, wenn die Transkription dieser Gene stattfindet, ist die Initiation in den Spacer-Regionen deutlich nachweisbar (Hyrien and Mechali, 1993).

Es ist vermutlich nicht die Transkription selbst, die eine Replikation begünstigt, sondern vielmehr ein für beide Prozesse kompetentes Chromatin. So wird in einigen Arbeiten gezeigt, dass eine gleichzeitig ablaufende Transkription und Replikation eher antagonistisch zueinander wirken, da beide zellulären Mechanismen das gleiche DNA-Template benutzen, was zu einer sterischen Behinderung der daran beteiligten Enzyme (z.B. Polymerasen) führen könnte. So sind in Bakterien die Gene derart ausgerichtet,

dass Transkription und Replikation in dieselbe Richtung verlaufen (Brewer, 1988; Tillier and Collins, 2000). Daneben wurde für die 3'-Region der rDNA Gene gezeigt, dass das Fortbewegen der Replikationsgabel verhindert wird, wenn die RNA-Polymerase in die gleiche Richtung verläuft (Brewer et al., 1992; Gerber et al., 1997). Gleiches wurde bei der Transkription der Hefe tRNA Gene gefunden, bei der die Replikationsgabel bei aktiver ablaufender Transkription aufhört zu wandern, während sie es nicht macht, wenn die Gene derart mutiert wurden, dass die Transkription nicht mehr ablaufen kann (Deshpande and Newlon, 1996). Dennoch scheint ein zeitlich versetzter bzw. koordinierter Ablauf beider Prozesse, die Replikation aktiv transkribierter Chromatinbereiche möglich zu machen, vermutlich indem eine besondere Chromatinstruktur notwendig ist (Lipford and Bell, 2001; Melendy and Li, 2001).

Ein Zugang von ORC an die Bindestellen auf der DNA könnte durch die Aktivität von Chromatin-Remodelling Komplexe zustande kommen (Alexiadis et al., 1998; Melendy and Li, 2001). Somit könnte auch die Bindung von ORC im *TOP1* Promotor durch eine bestimmte Chromatinstruktur begünstigt sein.

Ob die Bindung von SP1 bzw. der Transkriptionsfaktor selber für die DNA-Replikation eine Rolle spielt, bedarf weiterer Untersuchungen. Jedoch gibt es wichtige Hinweise. Am viralen SV40 Origin wurde gezeigt, dass eine Interaktion von SP1 mit dem Initiatorprotein und DNA-Helikase, T-Antigen, dessen Aktivität um ein Vielfaches erhöht (Guo and DePamphilis, 1992; Guo et al., 1989; Turner and Woodworth, 2001). Gleiches wurde auch in anderen viralen Systemen berichtet (Guggenheimer et al., 1984; Murakami and Ito, 1999). Und in *Drosophila melanogaster* hängt die Aktivität der DNA-Replikation am Chorin Amplifizierungselement von der Interaktion von ORC mit dem Transkriptionsfaktor E2F ab (Austin et al., 1999; Bosco et al., 2001). Bei einem parallel zu dieser Arbeit identifizierten Origin im humanen *MCM4* Promotor (Ladenburger et al., 2002) bzw. an einem Origin des Epstein-Barr Viruses (Schepers et al., 2001), wurde ebenfalls die Bindung von ORC mit Hilfe des ChIP-Assays nachgewiesen, was darauf hinweist, dass die Funktion von ORC konserviert ist. Die *MCM4* Promotorregion besitzt Bindestellen für den Transkriptionsfaktor E2F und wird durch diesen in der S-Phase

aktiviert. Es wäre daher nicht überraschend, wenn der Transkriptionsfaktor SP1 auch bei der Initiation am *TOP1* Origin eine funktionelle Rolle zu tragen hat.

5.3.2 Merkmale des Origins im *TOP1* Locus

In dieser Arbeit wurde die Bindung des Origin Recognition Complex an zwei Origin-Sequenzen gezeigt (*TOP1* Promotor, Lamin B2 Origin). In einer unabhängigen Arbeit wurde die Assoziierung von ORC mit *MCM4* Promotor-Sequenzen nachgewiesen, welche ebenfalls als Startpunkt der DNA-Replikation dienen (Ladenburger et al., 2002). Diese Ergebnisse geben somit einen wichtigen Aufschluss für das Verständnis der DNA-Replikation des Menschen. Auch wenn sich keine Konsensus-Sequenz feststellen lässt, gibt es doch erwähnenswerte Gemeinsamkeiten beim Vergleich dieser Origins.

So besitzt die *TOP1* Promotorregion einen GC-Gehalt von 67% und befindet sich innerhalb einer CpG-Insel. Gleiches wurde für den LaminB2 Origin und den *MCM4* Origin berichtet (Biamonti et al., 1992b; Ladenburger et al., 2002). Interessanterweise wurde bei der Analyse der Basenzusammensetzung von nascent DNA eine überdurchschnittliche Anreicherung mit GC-Basenpaaren gefunden (Delgado et al., 1998). Ein solcher GC-Gehalt ist typisch für Promotorregionen von Haushaltsgenen und ist Kennzeichen einer CpG-Insel (Antequera and Bird, 1993a; Antequera and Bird, 1999; Lander et al., 2001). In manchen Fällen wurde eine Methylierung an CpG-Dinukleotiden gefunden, was Auswirkungen auf die Promotoraktivität hatte (Craig and Bickmore, 1994; Phi-van and Stratling, 1999; Rein et al., 1997). Interessanterweise wurde auch bei der Hälfte der in dieser Arbeit klonierten ORC-DNA bei der Sequenzanalyse ein überdurchschnittlicher GC-Gehalt gefunden. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass solche CpG-Inseln auch bei der DNA-Replikation eine Rolle spielen, was in der Tat von einigen Fachleuten diskutiert wird (Antequera and Bird, 1999). Die genaue Zahl dieser Inseln im Genom beträgt nach dem Stand des Humangenom-Projektes 28890 und sie sind mit wenigen Ausnahmen in regelmäßigen Abständen (10 Mbp) auf den einzelnen Chromosomen verteilt (Lander et al., 2001). Ob und welche Funktion die CpG-Inseln, neben einer möglichen Substratfunktion für die Methylierung, bei der Initiation haben, bedarf weiterer Untersuchungen.

Neben dem Vorkommen einer CpG-Insel stromaufwärts des *TOP1* Gens, fällt auch ein 24 Basenpaar langes A/T-Element an der Position -563 bis -549 vor dem Transkriptionsstart (+1) auf (Abb. 23B). Dies ist ein interessanter Punkt, da solche A/T-reichen Elemente in bisher allen identifizierten Origins gefunden wurden (Boulikas, 1996). Ein Vergleich dieser Elemente mit den Origins verschiedener Organismen ist in Abbildung 24 zu sehen. Unabhängig vom Organismus, sind alle Origins durch A/T-Elemente gekennzeichnet.

Origin	Origin-Sequenz
<i>E. coli</i>	GATCCTGGGGTATTA AAAAGAAGATCTATTAATATTTAGAGATCTGTT
SV40 Ori	GAGGCGGCCTCGGCCTCTGCATAAAATAAAAAAATTAGTCAG
ARS1	AATTCGTCAAAAATGCTAAGAAATAGGTTATTACTGAGTAGTATTTATTTAAGTATTG
ACE3	GGTAGAATTTATATACAAAAGCAAAAAAATTGAGATAAATTACAATAAAATTATAAA
<i>TOP1</i> Ori	CTTGGTTGGTTGGAAAAATTAATAAATTTTAAAAAGTGGGCGTGAAATAATCCAGA
<i>MCM4</i> Ori	CTTAATTTTTTTAATAAAAAAATCTTTAAGTGAGAAATGCATCTGTAATGTCCTTATTAACC
LaminB2 Ori	TTTTTTTTTCCAATGATTTGTAATATAACATTTTATGACTGG AAACTTTTTTGTACAACACTCCAATAAACAT

Abbildung 34. Vergleich der AT-Elemente verschiedener bekannter Origins

Die Sequenzdaten der hier gezeigten Origin-Regionen stammen von (Boulikas, 1996) bzw. aus der NCBI Sequenzdatenbank.

Eine mögliche Rolle dieser Sequenz könnte darin liegen, die Entwindung des doppelsträngigen DNA-Templates durch DNA-Helikasen zu beschleunigen („DNA Unwinding Elements“, DUE) (Dobbs et al., 1994). Oft kommen solche Basenabfolgen auch in den MAR-Elementen vor. Allerdings wären in diesem Falle die A/T-Elemente erheblich kleiner. Und zumindest für den *TOP1* Locus wurden die zwei MAR-Elemente bereits identifiziert (Romig et al., 1994). Schließlich könnten solche A/T-reiche Regionen auch als Bindestellen für HMG-Proteine (HMG = High Mobility Group) sein, eine Gruppe von Proteine welche bei der Organisation des Chromatins beteiligt sind und mit ORC-Proteine wechselwirken (Chuang and Kelly, 1999). In der Hefe *Saccharomyces* sind die A/T-reichen Elemente für die Bindung von ORC und für die Origin-Aktivierung essentiell (Bell and Stillman, 1992; Diffley and Cocker, 1992; Gomez and Antequera, 1999; Rowley et al., 1995). Auch in viralen Origins ist dieses Element für die Einleitung der Replikation notwendig und zumindest beim SV40 Origin wird es auch für die Bindung des Initiatorproteins und DNA-Helikase T-Antigen benötigt (Boulikas, 1996; Simmons, 2000). Die genaue Funktion des A/T-reichen Elementes bei menschlichen Origins bedarf somit weiterer Untersuchungen.

Ein weiteres Merkmal der *TOP1* Promotorregion, welche mit allgemeinen Merkmalen von Origins übereinstimmt, sind DNaseI hypersensitive Bereiche (Abb. 23A) (Kunze et al., 1990). Solche Bereiche entstehen vermutlich als Folge der Entwindung an der Replikationsblase nachdem die Nukleosomen bei der Aktivierung des Origins von dieser Stelle verschoben wurden (Hsieh, 1999). In synchronisierten Zellen wurde gezeigt, dass sich zum Zeitpunkt der Aktivierung in der frühen S-Phase, kruziforme DNA-Strukturen am Origin bilden, die sensitiv gegenüber DNaseI sind (Ward et al., 1991).

Obwohl die funktionelle Bedeutung all dieser beschriebenen DNA-Elemente noch nicht geklärt sind, weisen sie doch eine erstaunliche Einheitlichkeit beim Vergleich unterschiedlicher Origins auf.

5.4 MAR-Elemente und DNA-Replikation

Seit längerem wird die Funktion der Kernmatrix-assoziierten DNA-Elemente (MAR) bei der DNA-Replikation recht konträr diskutiert (Jack and Eggert, 1992). Ein intakter Zellkern ist für die Initiation der DNA-Replikation sowohl im *Xenopus* Eiextrakt System (Dimitrova and Gilbert, 1998), im Hefe System (Pasero et al., 1997) als auch im humanen zellfreien System notwendig (Krude et al., 1997). Eine Funktion des Zellkernes ist hierbei höchstwahrscheinlich die Konzentrierung von Replikations-Initiationsfaktoren für eine Assoziierung an deren DNA-Bindestellen. Eine grundsätzliche Funktion bei der Elongation wird eher verneint, da die DNA-Synthese an den Replikationsgabeln unabhängig von den Kernstrukturelementen verläuft (Stillman, 1989).

Die räumliche Nähe von MAR-Regionen an Replikationsorigins führte zu der Hypothese, dass an diesen Elementen auch die DNA-Replikation eingeleitet wird (Dijkwel and Hamlin, 1988; Dijkwel and Hamlin, 1995; Hyrien et al., 1997).

In dieser Arbeit konnte durch Kreuzvernetzungsstudien und Chromatin-Immunpräzipitationen gezeigt werden, dass SAF-A nicht auf unmittelbar benachbarten Chromatinfragmenten mit ORC lokalisiert ist. SAF-A ist das Haupt-Ankerprotein, welches die Verbindung zwischen den MAR-Elementen der DNA und der Zellmatrix herstellt (Romig et al., 1992). Keine der beiden MAR-Sequenzen des *TOP1* Locus konnten nach der Kreuzvernetzung mit ORC-spezifischen Antikörper präzipitiert werden. Auch zeigte der „Nascent Strand Abundance Assay“, dass diese Sequenzen bei der nascent DNA nicht angereichert sind, und sich folglich in diesen Regionen auch kein aktiver Replikationsorigin befindet. Somit konnte ich in verschiedenen experimentellen Systemen keine Bestätigung für die oben beschriebene Beobachtung liefern.

In der Tat wird vermutet, dass die beschriebenen Ergebnisse dieser Autoren sehr vorsichtig interpretiert werden müssen, da sie von den jeweiligen experimentellen Bedingungen (Salzkonzentration, Präparation) abhängen (Jackson and Cook, 1986; Neri et al., 1997). Auch wurde am Beispiel des *DHFR* Locus deutlich demonstriert, dass MAR-Elemente nicht für die Initiation der DNA-Replikation in Zellkernen benötigt

werden (Ortega and DePamphilis, 1998). Es ist daher eher wahrscheinlich, dass die MAR-Elemente andere Funktionen bei der Replikation wahrnehmen. Dies wird durch Experimente unterstützt, die zeigten, dass die episomale Replikation eines DNA-Plasmids in Hamsterzellen von einem in das Plasmid klonierten MAR-Element abhängt (Piechaczek et al., 1999). Das Entfernen dieser Region verhindert die autonome Replikation des Plasmids in der Zelle (Baiker et al., 2000). Eine mögliche Rolle könnte hierbei die strukturelle Anheftung von Replikons an die Zellmatrix sein, um so die DNA-Replikation mit der chromsomalen Architektur zu verbinden (Jackson and Cook, 1986).

5.5 Die Rolle der Chromatinstruktur bei der ORC-Bindung

5.5.1 ORC-Bindung im spät replizierenden Heterochromatin

In den vorausgehenden Kapitel wurde gezeigt, dass der Origin Recognition Complex an den selben Stellen bindet, an denen auch die Replikation der DNA eingeleitet wird. Die Bindung von ORC an Replikationsstartstellen ist hierbei vermutlich nur der erste Schritt, um einen funktionell aktiven Prä-Replikationskomplex am Chromatin zu etablieren (Bell and Stillman, 1992; Cocker et al., 1996; Diffley et al., 1994; Stillman, 1989).

In dieser Arbeit wurde anfangs gezeigt, dass der LaminB2 Origin sehr früh in der S-Phase aktiviert wird und sich in vermutlich aufgelockerten, euchromatischen Regionen befindet. Gleiches dürfte für den neu identifizierten Origin im Promoter des aktiv transkribierten *TOP1* Locus zutreffen. Die Frage stellt sich, wie heterochromatische Regionen im Verlauf der S-Phase repliziert werden. Es wäre durchaus denkbar, dass die frühe Replikation des Euchromatins, zu einer Auflockerung der heterochromatischen Bereiche führt, um so den Zugang und die Bindung von Replikations-Initiationskomplexen zu ermöglichen. Jedoch ist es unklar, ob auch der Origin Recognition Complex bei der Aktivierung von solchen Origins im Heterochromatin beteiligt ist.

Die Analyse der klonierten und sequenzierten ORC-DNA nach der Immunpräzipitation machte deutlich, dass ein Großteil der klonierten Sequenzen nicht in der Genomdatenbank vertreten ist, obwohl die entsprechende Sequenz, wie durch PCR-Analysen gezeigt wurde, im Genom existiert (z.B. Klon ORC1-5 und Klon 1-9). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass diese Sequenzen aus heterochromatischen Bereichen stammen, die bislang für eine Sequenzierung nicht zugänglich waren (Lander et al., 2001).

Ich habe einen zuordnungsfähigen Klon (ORC1-3) näher untersucht, dessen Sequenz zu 97% homolog mit der repetitiven alphoid Satelliten-DNA ist. Alphoid Satelliten-DNA findet man vornehmlich in den Centromerbereichen von Chromosomen, also in Regionen, die in Heterochromatinbereichen liegen (Jorgensen, 1997). Mit Hilfe des ChIP-Assays konnte ich zeigen, dass hORC2 mit alphoid Satelliten-DNA in vivo assoziiert ist. Jedoch war es nicht möglich eine Funktion dieser Sequenz als Startstelle der DNA-Replikation nachzuweisen. Dies könnte bedeuten, dass der Origin zum Zeitpunkt der Kreuzvernetzung nicht aktiv ist, oder dass ORC, neben der Funktion bei der Initiation der DNA-Replikation, weitere Rollen in der Zelle zu erfüllen hat. Tatsächlich wurde in *Saccharomyces* und *Drosophila* gezeigt, dass ORC-Proteine essentielle Funktionen bei der Bildung des Heterochromatins und bei der transkriptionellen Stilllegung von Genen („transcriptional silencing“) hat (Bell et al., 1993; Foss et al., 1993; Iizuka and Stillman, 1999; Lu et al., 1996; Pak et al., 1997; Pflumm and Botchan, 2001; Shareef et al., 2001; Triolo and Sternglanz, 1996). Diese Ergebnisse haben zum ersten Mal darauf hingewiesen, dass Replikationsproteine auch bei der Organisation von speziellen Chromatindomänen beteiligt sind. Am Beispiel des *HML* (*HML* = Haploid Mating Left) Locus in der Hefe wurde gezeigt, dass ORC zusammen mit Silencer-Proteinen, den Sir-Proteinen, für dessen Stilllegung notwendig ist (Triolo and Sternglanz, 1996). Die Stummschaltung wird durch eine Verpackung des Locus in dichteres Heterochromatin erreicht. Dies geschieht durch die ORC-abhängige Rekrutierung von Sir-Proteinen (Triolo and Sternglanz, 1996).

Auch in höheren Eukaryonten wurde eine Funktion von ORC bei der Heterochromatinbildung bzw. -erhaltung berichtet. So findet man eine Assoziation des

aminoterminalen Endes des ORC1-Proteins mit dem Heterochromatin-Protein 1 (HP1) (Pak et al., 1997). HP1 ist eine Komponente des Heterochromatins und vornehmlich in Centromer- und Telomerbereichen bei eukaryontischen Chromosomen lokalisiert. Mutationen im *Orc2*-Gen bei *Drosophila* verhindert die Rekrutierung von HP1 an Heterochromatin (Huang et al., 1998). Interessanterweise wurde kürzlich ein weiteres Protein identifiziert, welches mit HP1 und ORC2 in einem größeren Proteinkomplex assoziiert ist (Shareef et al., 2001). Dieses Protein wurde als „HP1/ORC-associated protein“ bezeichnet und bindet an Satelliten-DNA (Shareef et al., 2001). Das Protein ist in heterochromatischen Bereichen lokalisiert und besitzt eine HMG-Box (HMG = High Mobility Group). Diese Box ist eine spezifische DNA-Bindungsdomäne und charakteristisch für HMG-Proteine, die für die Organisation höherer Chromatinstrukturen notwendig sind. Auch beim ORC4-Protein in *Schizosaccharomyces pombe* wurde ein solches Motiv am aminoterminalen Ende gefunden, über welches das Protein mit einem A/T-Element der ARS wechselwirkt (Chuang and Kelly, 1999). Somit könnten die menschlichen ORC-Proteine mit homologen Proteinen am Heterochromatin gebunden sein, um dort Funktionen bei der Stilllegung von Genen bzw. der Etablierung spezieller Chromatindomänen zu übernehmen. Die Assoziation von ORC mit der alphoid Satelliten-DNA in Heterochromatin könnte daher nicht direkt, sondern vielmehr über einem dem *Drosophila* ähnlichem Protein zustande kommen. Dieses könnte dann zusammen mit ORC an die DNA kreuzvernetzt worden sein.

5.5.2 ORC und Chromatinstruktur

Einen weiteren Hinweis auf die Funktion von ORC bei der Organisation des Chromatins kam durch die Beobachtung, dass ORC1 mit einer Histon-Acetyltransferase assoziiert ist (Iizuka and Stillman, 1999). Dieses Enzym ist homolog mit einem Hefe-Protein, das beim Stilllegen von Genen beteiligt ist (Iizuka and Stillman, 1999). Die Acetylierung von Histonen bewirkt ein Auflockern der Chromatinstruktur und ermöglicht so, dass Kernproteine Zugang zu ihrer DNA-Bindestelle bekommen. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass ORC die Positionierung der Nukleosomen am ARS1 Origin verändert, um so vermutlich Zugang für die Replikations-Initiationsfaktoren zu

schaffen (Lipford and Bell, 2001). Einen ähnlichen Vorgang könnte man sich auch bei der Initiation der DNA-Replikation vorstellen.

Ein wesentlicher Unterschied der DNA-Replikation von höheren Eukaryonten im Vergleich zu der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist das Fehlen spezifischer ARS-Elemente, an denen ORC bindet und die Replikation eingeleitet wird. Es ist daher von Interesse wie ein so exakter und zeitlich genau festgelegter Ablauf wie die Genomreplikation abläuft. Eine Hypothese ist, dass ORC bei der Bildung von speziellen Chromatindomänen beteiligt ist, um so einzelne Replikons am Chromatin zu etablieren (Mechali, 2001). Die Bildung von Replikons könnte so die Rekrutierung der Initiationsfaktoren festlegen.

Die konservierten Origin-Sequenzen (ARS) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* scheinen eher die Ausnahme darzustellen. Multizelluläre Organismen benötigen weitaus höhere Flexibilität was die Expression von Genen und die Replikation der DNA angeht. Das Aktivieren oder Stilllegen von Genen während der Embryonalentwicklung oder bei der Zelldifferenzierung sind hier nur Beispiele. So findet man bei einem frühen Stadium der Embryonalentwicklung in *Xenopus*, in dem die rDNA nicht transkribiert wird, dass die DNA-Replikation unspezifisch an zufällig ausgewählten Stellen des Genoms eingeleitet wird. Dagegen findet man eine spezifische Initiation an der Initiationsstelle stromaufwärts des Promotors (Hyrien and Mechali, 1993). Diese Vermutung wird auch dadurch unterstützt, dass zum Beispiel die Heterochromatin-Proteine unter den multizellulären Organismen sehr konserviert sind, nicht aber mit den Proteinen in *S. cerevisiae*. Die Assoziation von ORC mit Sequenzen des Heterochromatins, wie der alphoid Satelliten-DNA, mag daher nur ein Beispiel für die Beteiligung von ORC an der Chromatinorganisation sein, und einen Zustand beschreiben, welcher zum Zeitpunkt der Kreuzvernetzung in der Zelle vorgeherrscht hat.

KAPITEL 6

ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass in einem humanen zellfreien System, die DNA-Replikation in isolierten Zellkernen spezifisch an Origin-Sequenzen eingeleitet wird. Die Replikation von Chromatindomänen erfolgt in einer festgelegten Ordnung und wird von einen auf den anderen Zellzyklus weitergegeben. Die hier präsentierten Daten verdeutlichen weiterhin, dass die Initiation der DNA-Replikation in einer zeitlich festgelegten Reihenfolge abläuft. So wird der Lamin B2 Origin zu einem frühen Zeitpunkt in der S-Phase aktiviert, während der rDNA Locus erst in der mittleren S-Phase zu replizieren beginnt. Diese Daten liefern somit wichtige Hinweise auf die räumliche und zeitliche Koordination der DNA-Replikation beim Menschen.

Im zweiten Teil der Arbeit habe ich gezeigt, dass die sechs ORC-Proteine an das Chromatin, vermutlich an denselben Chromatin-Stellen gebunden sind, was ein weiterer wichtiger Hinweis auf eine Komplexbildung *in vivo* ist.

Ein wesentlicher Punkt dieser Arbeit hat in der Identifizierung von Bindestellen des Origin Recognition Complex (ORC) im Humangenom gelegen. Hier konnte ich zeigen, dass ORC innerhalb einer CpG-Insel des *TOP1* Gen Promotors in enger Assoziation mit den SP1-Bindestellen gebunden ist. Weiterhin habe ich demonstriert, dass die gleiche Region mit einer aktiven Startstelle der DNA-Replikation co-lokalisiert und somit zum ersten Mal einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Bindung von ORC und einem Replikationsstartpunkt in menschlichen Zellen hergestellt.

Durch den Nachweis der Bindung von ORC an weiteren humanen Origins konnte diese Vermutung bestätigt werden. Die Analyse der Basenzusammensetzung von ORC-assoziierten DNA-Sequenzen zeigte einen für CpG-Inseln charakteristischen GC-Gehalt.

Dies ist einer weiterer Hinweis auf eine mögliche funktionelle Bedeutung von CpG-Inseln für die DNA-Replikation.

Schließlich wurde eine Bindung von ORC in heterochromatischen Chromatinbereichen nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass ORC-Proteine auch bei der Organisation des Chromatins eine wichtige Rolle spielen und auf diese Weise die DNA-Replikation und weitere zelluläre Prozesse steuern.

Die Arbeit hat zusammenfassend gezeigt, dass die Initiation der DNA-Replikation im Menschen nach ähnlichen Mechanismen verläuft, wie es für niedrigere Eukaryonten gezeigt werden konnte. Die zukünftige Arbeit wird sich u.a. darauf konzentrieren, die Sequenzmerkmale von Origin-Regionen näher zu untersuchen und die Bedeutung der Chromatinstruktur auf die Initiation der DNA-Replikation zu klären.

KAPITEL 7

REFERENZEN

- Abdurashidova, G., Deganuto, M., Klima, R., Riva, S., Biamonti, G., Giacca, M. and Falaschi, A. (2000) Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin. *Science*, **287**, 2023-6.
- Abdurashidova, G., Riva, S., Biamonti, G., Giacca, M. and Falaschi, A. (1998) Cell cycle modulation of protein-DNA interactions at a human replication origin. *Embo J*, **17**, 2961-9.
- Alexiadis, V., Varga-Weisz, P.D., Bonte, E., Becker, P.B. and Gruss, C. (1998) In vitro chromatin remodelling by chromatin accessibility complex (CHRAC) at the SV40 origin of DNA replication. *Embo J*, **17**, 3428-38.
- Antequera, F. and Bird, A. (1993a) CpG islands. *Exs*, **64**, 169-85.
- Antequera, F. and Bird, A. (1993b) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11995-9.
- Antequera, F. and Bird, A. (1999) CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr Biol*, **9**, R661-7.
- Aparicio, O.M., Weinstein, D.M. and Bell, S.P. (1997) Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*, **91**, 59-69.
- Araujo, F.D., Knox, J.D., Ramchandani, S., Pelletier, R., Bigey, P., Price, G., Szyf, M. and Zannis-Hadjopoulos, M. (1999) Identification of initiation sites for DNA replication in the human dnmt1 (DNA-methyltransferase) locus. *J Biol Chem*, **274**, 9335-41.

- Aten, J.A., Bakker, P.J., Stap, J., Boschman, G.A. and Veenhof, C.H. (1992) DNA double labelling with IdUrd and CldUrd for spatial and temporal analysis of cell proliferation and DNA replication. *Histochem J*, **24**, 251-9.
- Austin, R.J., Orr-Weaver, T.L. and Bell, S.P. (1999) Drosophila ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element. *Genes Dev*, **13**, 2639-49.
- Baiker, A., Maercker, C., Piechaczek, C., Schmidt, S.B., Bode, J., Benham, C. and Lipps, H.J. (2000) Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix. *Nat Cell Biol*, **2**, 182-4.
- Barbosa, A.C., Otto, P.A. and Vianna-Morgante, A.M. (2000) Replication timing of homologous alpha-satellite DNA in Roberts syndrome. *Chromosome Res*, **8**, 645-50.
- Bell, S.P., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1993) Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication. *Science*, **262**, 1844-9.
- Bell, S.P. and Stillman, B. (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, **357**, 128-34.
- Benbow, R.M., Zhao, J. and Larson, D.D. (1992) On the nature of origins of DNA replication in eukaryotes. *Bioessays*, **14**, 661-70.
- Bentley, D.R. (2000) The Human Genome Project--an overview. *Med Res Rev*, **20**, 189-96.
- Berezney, R., Dubey, D.D. and Huberman, J.A. (2000) Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma*, **108**, 471-84.
- Berezney, R., Mortillaro, M.J., Ma, H., Wei, X. and Samarabandu, J. (1995) The nuclear matrix: a structural milieu for genomic function. *Int Rev Cytol*, 1-65.
- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., Riva, S. and et al. (1992a) The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol*, **12**, 3499-506.
- Biamonti, G., Perini, G., Weighardt, F., Riva, S., Giacca, M., Norio, P., Zentilin, L., Diviacco, S., Dimitrova, D. and Falaschi, A. (1992b) A human DNA replication

- origin: localization and transcriptional characterization. *Chromosoma*, **102**, S24-31.
- Bielinsky, A.K. (2001) Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication. *J Cell Sci*, **114**, 643-651.
- Blow, J.J., Dilworth, S.M., Dingwall, C., Mills, A.D. and Laskey, R.A. (1987) Chromosome replication in cell-free systems from *Xenopus* eggs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **317**, 483-94.
- Bosco, G., Du, W. and Orr-Weaver, T.L. (2001) DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex. *Nat Cell Biol*, **3**, 289-95.
- Boulikas, T. (1996) Common structural features of replication origins in all life forms. *J Cell Biochem*, **60**, 297-316.
- Brewer, B.J. (1988) When polymerases collide: replication and the transcriptional organization of the *E. coli* chromosome. *Cell*, **53**, 679-86.
- Brewer, B.J., Diller, J.D., Friedman, K.L., Kolor, K.M., Raghuraman, M.K. and Fangman, W.L. (1993) The topography of chromosome replication in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **58**, 425-34.
- Brewer, B.J. and Fangman, W.L. (1987) The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell*, **51**, 463-71.
- Brewer, B.J., Lockshon, D. and Fangman, W.L. (1992) The arrest of replication forks in the rDNA of yeast occurs independently of transcription. *Cell*, **71**, 267-76.
- Carpenter, P.B., Mueller, P.R. and Dunphy, W.G. (1996) Role for a *Xenopus* Orc2-related protein in controlling DNA replication. *Nature*, **379**, 357-60.
- Chesnokov, I., Gossen, M., Remus, D. and Botchan, M. (1999) Assembly of functionally active *Drosophila* origin recognition complex from recombinant proteins. *Genes Dev*, **13**, 1289-96.
- Chuang, R.Y. and Kelly, T.J. (1999) The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2656-61.

- Cocker, J.H., Piatti, S., Santocanale, C., Nasmyth, K. and Diffley, J.F. (1996) An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature*, **379**, 180-2.
- Coverley, D. and Laskey, R.A. (1994) Regulation of eukaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem*, **63**, 745-76.
- Craig, J.M. and Bickmore, W.A. (1994) The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nat Genet*, **7**, 376-82.
- Crane-Robinson, C., Myers, F.A., Hebbes, T.R., Clayton, A.L. and Thorne, A.W. (1999) Chromatin immunoprecipitation assays in acetylation mapping of higher eukaryotes. *Methods Enzymol*, **304**, 533-47.
- Delgado, S., Gomez, M., Bird, A. and Antequera, F. (1998) Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo J*, **17**, 2426-35.
- DePamphilis, M.L. (1993) Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin. *Annu Rev Biochem*, **62**, 29-63.
- DePamphilis, M.L. (1996) *DNA replication in eukaryotic cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- DePamphilis, M.L. (1999) Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? *Bioessays*, **21**, 5-16.
- Deshpande, A.M. and Newlon, C.S. (1996) DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science*, **272**, 1030-3.
- Dhar, S.K., Delmolino, L. and Dutta, A. (2001) Architecture of the human origin recognition complex. *J Biol Chem*, **6**, 6.
- Dhar, S.K. and Dutta, A. (2000) Identification and characterization of the human ORC6 homolog. *J Biol Chem*, **275**, 34983-8.
- Diffley, J.F. and Cocker, J.H. (1992) Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. *Nature*, **357**, 169-72.
- Diffley, J.F., Cocker, J.H., Dowell, S.J. and Rowley, A. (1994) Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell*, **78**, 303-16.

- Diffley, J.F. and Stillman, B. (1988) Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and a transcriptional silencer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2120-4.
- Dijkwel, P.A. and Hamlin, J.L. (1988) Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites, genes, and an interamplicon junction in the amplified dihydrofolate reductase domain of Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol*, **8**, 5398-409.
- Dijkwel, P.A. and Hamlin, J.L. (1995) Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm. *Int Rev Cytol*, 455-84.
- Dijkwel, P.A., Vaughn, J.P. and Hamlin, J.L. (1991) Mapping of replication initiation sites in mammalian genomes by two- dimensional gel analysis: stabilization and enrichment of replication intermediates by isolation on the nuclear matrix. *Mol Cell Biol*, **11**, 3850-9.
- Dillin, A. and Rine, J. (1998) Roles for ORC in M phase and S phase. *Science*, **279**, 1733-7.
- Dimitrova, D.S., Giacca, M., Demarchi, F., Biamonti, G., Riva, S. and Falaschi, A. (1996) In vivo protein-DNA interactions at human DNA replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 1498-503.
- Dimitrova, D.S. and Gilbert, D.M. (1998) Regulation of mammalian replication origin usage in *Xenopus* egg extract. *J Cell Sci*, **111**, 2989-98.
- Dimitrova, D.S. and Gilbert, D.M. (1999) The spatial position and replication timing of chromosomal domains are both established in early G1 phase. *Mol Cell*, **4**, 983-93.
- Dingwall, C., Lomonosoff, G.P. and Laskey, R.A. (1981) High sequence specificity of micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Res*, **9**, 2659-73.
- Dobbs, D.L., Shaiu, W.L. and Benbow, R.M. (1994) Modular sequence elements associated with origin regions in eukaryotic chromosomal DNA. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2479-89.
- Dutta, A. and Bell, S.P. (1997) Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 293-332.

- Dynan, W.S. and Tjian, R. (1983a) Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. *Cell*, **32**, 669-80.
- Dynan, W.S. and Tjian, R. (1983b) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, **35**, 79-87.
- Fackelmayer, F.O. and Richter, A. (1994) Purification of two isoforms of hnRNP-U and characterization of their nucleic acid binding activity. *Biochemistry*, **33**, 10416-22.
- Fantes, P. and Brooks, R. (1993) *The Cell cycle : a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Foss, M., McNally, F.J., Laurenson, P. and Rine, J. (1993) Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and DNA replication in *S. cerevisiae* [see comments]. *Science*, **262**, 1838-44.
- Gencheva, M., Anachkova, B. and Russev, G. (1996) Mapping the sites of initiation of DNA replication in rat and human rRNA genes. *J Biol Chem*, **271**, 2608-14.
- Gerber, J.K., Gogel, E., Berger, C., Wallisch, M., Muller, F., Grummt, I. and Grummt, F. (1997) Termination of mammalian rDNA replication: polar arrest of replication fork movement by transcription termination factor TTF-I. *Cell*, **90**, 559-67.
- Giacca, M., Pelizon, C. and Falaschi, A. (1997) Mapping replication origins by quantifying relative abundance of nascent DNA strands using competitive polymerase chain reaction. *Methods*, **13**, 301-12.
- Giacca, M., Zentilin, L., Norio, P., Diviacco, S., Dimitrova, D., Contreas, G., Biamonti, G., Perini, G., Weighardt, F., Riva, S. and et al. (1994) Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7119-23.
- Gilbert, D.M. (1998) Replication origins in yeast versus metazoa: separation of the haves and the have nots. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 194-9.
- Gilbert, D.M. (2001a) Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science*, **294**, 96-100.
- Gilbert, D.M. (2001b) Nuclear position leaves its mark on replication timing. *J Cell Biol*, **152**, F11-5.

- Gilbert, D.M., Miyazawa, H. and DePamphilis, M.L. (1995) Site-specific initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extract requires nuclear structure. *Mol Cell Biol*, **15**, 2942-54.
- Göhring, F. and Fackelmayer, F.O. (1997) The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRNP-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA in vivo: a chemical cross-linking study. *Biochemistry*, **36**, 8276-83.
- Gomez, M. and Antequera, F. (1999) Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome. *Embo J*, **18**, 5683-90.
- Grimes, B. and Cooke, H. (1998) Engineering mammalian chromosomes. *Hum Mol Genet*, **7**, 1635-40.
- Guggenheimer, R.A., Stillman, B.W., Nagata, K., Tamanoi, F. and Hurwitz, J. (1984) DNA sequences required for the in vitro replication of adenovirus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 3069-73.
- Guo, Z.S. and DePamphilis, M.L. (1992) Specific transcription factors stimulate simian virus 40 and polyomavirus origins of DNA replication. *Mol Cell Biol*, **12**, 2514-24.
- Guo, Z.S., Gutierrez, C., Heine, U., Sogo, J.M. and Depamphilis, M.L. (1989) Origin auxiliary sequences can facilitate initiation of simian virus 40 DNA replication in vitro as they do in vivo. *Mol Cell Biol*, **9**, 3593-602.
- Haaf, T. (1997) Analysis of replication timing of ribosomal RNA genes by fluorescence in situ hybridization. *DNA Cell Biol*, **16**, 341-5.
- Hamlin, J.L. and Dijkwel, P.A. (1995) On the nature of replication origins in higher eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 153-61.
- Hand, R. (1978) Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell*, **15**, 317-25.
- Heiland, S. and Knippers, R. (1995) The human topoisomerase I gene promoter is regulated by NF-IL6. *Mol Cell Biol*, **15**, 6623-31.
- Heiland, S., Knippers, R. and Kunze, N. (1993) The promoter region of the human type-I-DNA-topoisomerase gene. Protein- binding sites and sequences involved in transcriptional regulation. *Eur J Biochem*, **217**, 813-22.

- Heinzel, S.S., Krysan, P.J., Tran, C.T. and Calos, M.P. (1991) Autonomous DNA replication in human cells is affected by the size and the source of the DNA. *Mol Cell Biol*, **11**, 2263-72.
- Horz, W. and Altenburger, W. (1981) Sequence specific cleavage of DNA by micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Res*, **9**, 2643-58.
- Horz, W., Fittler, F. and Zachau, H.G. (1983) Sequence specific cleavage of African green monkey alpha-satellite DNA by micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Res*, **11**, 4275-85.
- Hozak, P., Hassan, A.B., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell*, **73**, 361-73.
- Hsieh, C.L. (1999) Evidence that protein binding specifies sites of DNA demethylation. *Mol Cell Biol*, **19**, 46-56.
- Hua, X.H. and Newport, J. (1998) Identification of a preinitiation step in DNA replication that is independent of origin recognition complex and cdc6, but dependent on cdk2. *J Cell Biol*, **140**, 271-81.
- Huang, D.W., Fanti, L., Pak, D.T., Botchan, M.R., Pimpinelli, S. and Kellum, R. (1998) Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of *Drosophila* heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins. *J Cell Biol*, **142**, 307-18.
- Hyrien, O., Maric, C. and Lucas, I. (1997) Role of nuclear architecture in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Biochimie*, **79**, 541-8.
- Hyrien, O., Maric, C. and Mechali, M. (1995) Transition in specification of embryonic metazoan DNA replication origins. *Science*, **270**, 994-7.
- Hyrien, O. and Mechali, M. (1993) Chromosomal replication initiates and terminates at random sequences but at regular intervals in the ribosomal DNA of *Xenopus* early embryos. *Embo J*, **12**, 4511-20.
- Iizuka, M. and Stillman, B. (1999) Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem*, **274**, 23027-34.
- Ishimi, Y. (1997) A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem*, **272**, 24508-13.

- Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., You, Z., Omori, A. and Kitagawa, M. (2000) Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2. *J Biol Chem*, **275**, 16235-41.
- Jack, R.S. and Eggert, H. (1992) The elusive nuclear matrix. *Eur J Biochem*, **209**, 503-9.
- Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1986) Replication occurs at a nucleoskeleton. *Embo J*, **5**, 1403-10.
- Jeanpierre, M. (1994) Human satellites 2 and 3. *Ann Genet*, **37**, 163-71.
- Jorgensen, A.L. (1997) Alphoid repetitive DNA in human chromosomes. *Dan Med Bull*, **44**, 522-34.
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R. and Tjian, R. (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell*, **51**, 1079-90.
- Kadonaga, J.T., Courey, A.J., Ladika, J. and Tjian, R. (1988) Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science*, **242**, 1566-70.
- Kelly, T.J. and Brown, G.W. (2000) Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem*, **69**, 829-80.
- Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M. and Knippers, R. (2001) The Human Origin Recognition Complex Protein 1 Dissociates from Chromatin during S Phase in HeLa Cells. *J Biol Chem*, **276**, 6337-6342.
- Krude, T. (1999) Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner. *Exp Cell Res*, **247**, 148-59.
- Krude, T. (2000) Initiation of human DNA replication in vitro using nuclei from cells arrested at an initiation-competent state. *J Biol Chem*, **275**, 13699-707.
- Krude, T., Jackman, M., Pines, J. and Laskey, R.A. (1997) Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell*, **88**, 109-19.
- Krude, T. and Keller, C. (2001) Chromatin assembly during S phase: contributions from histone deposition, DNA replication and the cell division cycle. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 665-72.

- Krude, T., Musahl, C., Laskey, R.A. and Knippers, R. (1996) Human replication proteins hCdc21, hCdc46 and P1Mcm3 bind chromatin uniformly before S-phase and are displaced locally during DNA replication. *J Cell Sci*, **109**, 309-18.
- Kunze, N., Klein, M., Richter, A. and Knippers, R. (1990) Structural characterization of the human DNA topoisomerase I gene promoter. *Eur J Biochem*, **194**, 323-30.
- Kunze, N., Yang, G.C., Dolberg, M., Sundarp, R., Knippers, R. and Richter, A. (1991) Structure of the human type I DNA topoisomerase gene. *J Biol Chem*, **266**, 9610-6.
- Ladenburger, E.-M., Keller, C. and Knippers, R. (2002) Identification of a Binding Region for Human Origin Recognition Complex Proteins 1 and 2 That Coincides with an Origin of DNA Replication. *Molecular and Cellular Biology*, **22**, in press.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F.,

- Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
- Larner, J.M., Lee, H., Little, R.D., Dijkwel, P.A., Schildkraut, C.L. and Hamlin, J.L. (1999) Radiation down-regulates replication origin activity throughout the S phase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, **27**, 803-9.
- Lee, D.G. and Bell, S.P. (1997) Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol Cell Biol*, **17**, 7159-68.
- Li, F., Chen, J., Izumi, M., Butler, M.C., Keezer, S.M. and Gilbert, D.M. (2001) The replication timing program of the Chinese hamster beta-globin locus is established coincident with its repositioning near peripheral heterochromatin in early G1 phase. *J Cell Biol*, **154**, 283-92.
- Liang, C. and Stillman, B. (1997) Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev*, **11**, 3375-86.
- Lipford, J.R. and Bell, S.P. (2001) Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol Cell*, **7**, 21-30.
- Little, R.D., Platt, T.H. and Schildkraut, C.L. (1993) Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol Cell Biol*, **13**, 6600-13.
- Lu, B.Y., Bishop, C.P. and Eissenberg, J.C. (1996) Developmental timing and tissue specificity of heterochromatin-mediated silencing. *Embo J*, **15**, 1323-32.
- Maiorano, D., Moreau, J. and Mechali, M. (2000) XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature*, **404**, 622-5.
- Marahrens, Y. and Stillman, B. (1992) A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*, **255**, 817-23.
- Mechali, M. (2001) DNA replication origins: from sequence specificity to epigenetics. *Nat Rev Genet*, **2**, 640-5.
- Melendy, T. and Li, R. (2001) Chromatin remodeling and initiation of DNA replication. *Front Biosci*, **6**, D1048-53.

- Mendez, J. and Stillman, B. (2000) Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol*, **20**, 8602-12.
- Mimura, S. and Takisawa, H. (1998) Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *Embo J*, **17**, 5699-707.
- Moggs, J.G., Grandi, P., Quivy, J.P., Jonsson, Z.O., Hubscher, U., Becker, P.B. and Almouzni, G. (2000) A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol Cell Biol*, **20**, 1206-18.
- Moon, K.Y., Kong, D., Lee, J.K., Raychaudhuri, S. and Hurwitz, J. (1999) Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12367-72.
- Murakami, Y. and Ito, Y. (1999) Transcription factors in DNA replication. *Front Biosci*, **4**, D824-33.
- Nakayasu, H. and Berezney, R. (1989) Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol*, **108**, 1-11.
- Natale, D.A., Li, C.J., Sun, W.H. and DePamphilis, M.L. (2000) Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the M-G(1) transition in mammals. *Embo J*, **19**, 2728-38.
- Neri, L.M., Riederer, B.M., Marugg, R.A., Capitani, S. and Martelli, A.M. (1997) Nuclear scaffold proteins are differently sensitive to stabilizing treatment by heat or Cu⁺⁺. *J Histochem Cytochem*, **45**, 295-305.
- Newlon, C.S. (1996) DNA replication in Yeast. In DePamphilis, M.L. (ed.) *DNA replication in eukaryotic cells*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York, pp. 873-914.
- Nickerson, J. (2001) Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci*, **114**, 463-74.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. and Nurse, P. (2000) The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast [see comments]. *Nature*, **404**, 625-8.

- Noton, E. and Diffley, J.F. (2000) CDK inactivation is the only essential function of the APC/C and the mitotic exit network proteins for origin resetting during mitosis. *Mol Cell*, **5**, 85-95.
- Orlando, V. (2000) Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci*, **25**, 99-104.
- Ortega, J.M. and DePamphilis, M.L. (1998) Nucleoskeleton and initiation of DNA replication in metazoan cells. *J Cell Sci*, **111**, 3663-73.
- Pak, D.T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D.W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P. and Botchan, M.R. (1997) Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell*, **91**, 311-23.
- Pasero, P., Braguglia, D. and Gasser, S.M. (1997) ORC-dependent and origin-specific initiation of DNA replication at defined foci in isolated yeast nuclei. *Genes Dev*, **11**, 1504-18.
- Pasero, P., Duncker, B.P. and Gasser, S.M. (1999a) In vitro DNA replication in yeast nuclear extracts. *Methods*, **18**, 368-76, 323.
- Pasero, P., Duncker, B.P., Schwob, E. and Gasser, S.M. (1999b) A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication. *Genes Dev*, **13**, 2159-76.
- Paunesku, T., Mittal, S., Protic, M., Oryhon, J., Korolev, S.V., Joachimiak, A. and Woloschak, G.E. (2001) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol*, **77**, 1007-21.
- Pflumm, M.F. and Botchan, M.R. (2001) Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes. *Development*, **128**, 1697-707.
- Phi-van, L. and Stratling, W.H. (1999) An origin of bidirectional DNA replication is located within a CpG island at the 3' end of the chicken lysozyme gene. *Nucleic Acids Res*, **27**, 3009-17.
- Piechaczek, C., Fetzer, C., Baiker, A., Bode, J. and Lipps, H.J. (1999) A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res*, **27**, 426-8.

- Pinto, S., Quintana, D.G., Smith, P., Mihalek, R.M., Hou, Z.H., Boynton, S., Jones, C.J., Hendricks, M., Velinzon, K., Wohlschlegel, J.A., Austin, R.J., Lane, W.S., Tully, T. and Dutta, A. (1999) *latheo* encodes a subunit of the origin recognition complex and disrupts neuronal proliferation and adult olfactory memory when mutant [see comments]. *Neuron*, **23**, 45-54.
- Quintana, D.G. and Dutta, A. (1999) The metazoan origin recognition complex. *Front Biosci*, **4**, D805-15.
- Quintana, D.G., Hou, Z., Thome, K.C., Hendricks, M., Saha, P. and Dutta, A. (1997) Identification of HsORC4, a member of the human origin of replication recognition complex. *J Biol Chem*, **272**, 28247-51.
- Quintana, D.G., Thome, K.C., Hou, Z.H., Ligon, A.H., Morton, C.C. and Dutta, A. (1998) ORC5L, a new member of the human origin recognition complex, is deleted in uterine leiomyomas and malignant myeloid diseases. *J Biol Chem*, **273**, 27137-45.
- Rein, T., Zorbas, H. and DePamphilis, M.L. (1997) Active mammalian replication origins are associated with a high-density cluster of mCpG dinucleotides. *Mol Cell Biol*, **17**, 416-26.
- Ritzi, M., Baack, M., Musahl, C., Romanowski, P., Laskey, R.A. and Knippers, R. (1998) Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J Biol Chem*, **273**, 24543-9.
- Romanowski, P., Madine, M.A., Rowles, A., Blow, J.J. and Laskey, R.A. (1996) The *Xenopus* origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. *Curr Biol*, **6**, 1416-25.
- Romig, H., Fackelmayer, F.O., Renz, A., Ramsperger, U. and Richter, A. (1992) Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *Embo J*, **11**, 3431-40.
- Romig, H., Ruff, J., Fackelmayer, F.O., Patil, M.S. and Richter, A. (1994) Characterisation of two intronic nuclear-matrix-attachment regions in the human DNA topoisomerase I gene. *Eur J Biochem*, **221**, 411-9.

- Rowles, A., Chong, J.P., Brown, L., Howell, M., Evan, G.I. and Blow, J.J. (1996) Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*. *Cell*, **87**, 287-96.
- Rowles, A., Tada, S. and Blow, J.J. (1999) Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins. *J Cell Sci*, **112**, 2011-8.
- Rowley, A., Cocker, J.H., Harwood, J. and Diffley, J.F. (1995) Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC. *Embo J*, **14**, 2631-41.
- Rowley, A., Dowell, S.J. and Diffley, J.F. (1994) Recent developments in the initiation of chromosomal DNA replication: a complex picture emerges. *Biochim Biophys Acta*, **1217**, 239-56.
- Royzman, I., Austin, R.J., Bosco, G., Bell, S.P. and Orr-Weaver, T.L. (1999) ORC localization in *Drosophila* follicle cells and the effects of mutations in dE2F and dDP. *Genes Dev*, **13**, 827-40.
- Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J.L., Harwood, J., Diffley, J.F. and Hammerschmidt, W. (2001) Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Embo J*, **20**, 4588-602.
- Seroussi, E., Kedra, D., Kost-Alimova, M., Sandberg-Nordqvist, A.C., Fransson, I., Jacobs, J.F., Fu, Y., Pan, H.Q., Roe, B.A., Imreh, S. and Dumanski, J.P. (1999) TOM1 genes map to human chromosome 22q13.1 and mouse chromosome 8C1 and encode proteins similar to the endosomal proteins HGS and STAM. *Genomics*, **57**, 380-8.
- Shareef, M.M., King, C., Damaj, M., Badagu, R., Huang, D.W. and Kellum, R. (2001) *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex (ORC) protein is associated with HP1 and ORC and functions in heterochromatin-induced silencing. *Mol Biol Cell*, **12**, 1671-85.

- Shibahara, K. and Stillman, B. (1999) Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell*, **96**, 575-85.
- Simmons, D.T. (2000) SV40 large T antigen functions in DNA replication and transformation. *Adv Virus Res*, **55**, 75-134.
- Simon, I., Tenzen, T., Mostoslavsky, R., Fibach, E., Lande, L., Milot, E., Gribnau, J., Grosveld, F., Fraser, P. and Cedar, H. (2001) Developmental regulation of DNA replication timing at the human beta globin locus. *Embo J*, **20**, 6150-7.
- Stillman, B. (1989) Initiation of eukaryotic DNA replication in vitro. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 197-245.
- Stillman, B., Gerard, R.D., Guggenheimer, R.A. and Gluzman, Y. (1985) T antigen and template requirements for SV40 DNA replication in vitro. *Embo J*, **4**, 2933-9.
- Stoeber, K., Mills, A.D., Kubota, Y., Krude, T., Romanowski, P., Marheineke, K., Laskey, R.A. and Williams, G.H. (1998) Cdc6 protein causes premature entry into S phase in a mammalian cell-free system. *Embo J*, **17**, 7219-29.
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M. and Blow, J.J. (2001) Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF- B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol*, **3**, 107-13.
- Tatsumi, Y., Tsurimoto, T., Shirahige, K., Yoshikawa, H. and Obuse, C. (2000) Association of human origin recognition complex 1 with chromatin DNA and nuclease-resistant nuclear structures. *J Biol Chem*, **275**, 5904-10.
- Tillier, E.R. and Collins, R.A. (2000) Genome rearrangement by replication-directed translocation. *Nat Genet*, **26**, 195-7.
- Todorovic, V., Falaschi, A. and Giacca, M. (1999) Replication origins of mammalian chromosomes: the happy few. *Front Biosci*, **4**, D859-68.
- Treuner, K., Ramsperger, U. and Knippers, R. (1996) Replication protein A induces the unwinding of long double-stranded DNA regions. *J Mol Biol*, **259**, 104-12.
- Triolo, T. and Sternglanz, R. (1996) Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature*, **381**, 251-3.
- Tsurimoto, T. (1999) PCNA binding proteins. *Front Biosci*, **4**, D849-58.

- Tugal, T., Zou-Yang, X.H., Gavin, K., Pappin, D., Canas, B., Kobayashi, R., Hunt, T. and Stillman, B. (1998) The Orc4p and Orc5p subunits of the *Xenopus* and human origin recognition complex are related to Orc1p and Cdc6p. *J Biol Chem*, **273**, 32421-9.
- Turner, W.J. and Woodworth, M.E. (2001) DNA replication efficiency depends on transcription factor-binding sites. *J Virol*, **75**, 5638-45.
- Van der Vliet, P.C. (1996) Role of transcription factors in DNA replication. *DNA Replication in Eukaryotic Cells (ed. DePamphilis, M.C.)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 87-118.
- Vashee, S., Simancek, P., Challberg, M.D. and Kelly, T.J. (2001) Assembly of the human origin recognition complex. *J Biol Chem*, **276**, 26666-73.
- Ward, G.K., Shihab-el-Deen, A., Zannis-Hadjopoulos, M. and Price, G.B. (1991) DNA cruciforms and the nuclear supporting structure. *Exp Cell Res*, **195**, 92-8.
- Weinreich, M., Liang, C. and Stillman, B. (1999) The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading mcm proteins onto chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 441-6.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, **138**, 141-3.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C. and Dutta, A. (2000) Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science*, **290**, 2309-12.
- Wu, J.R. and Gilbert, D.M. (1996) A distinct G1 step required to specify the Chinese hamster DHFR replication origin. *Science*, **271**, 1270-2.
- Wuarin, J. and Nurse, P. (1996) Regulating S phase: CDKs, licensing and proteolysis. *Cell*, **85**, 785-7.
- Yoon, Y., Sanchez, J.A., Brun, C. and Huberman, J.A. (1995) Mapping of replication initiation sites in human ribosomal DNA by nascent-strand abundance analysis. *Mol Cell Biol*, **15**, 2482-9.
- You, Z., Komamura, Y. and Ishimi, Y. (1999) Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity. *Mol Cell Biol*, **19**, 8003-15.

- Zaitsev, I.Z. and Rogachev, E.I. (1986) [Structural analysis of alphoid DNA of primates. II. Evolution and possible origin of alphoid DNA of primates]. *Mol Biol (Mosk)*, **20**, 674-82.
- Zink, D., Bornfleth, H., Visser, A., Cremer, C. and Cremer, T. (1999) Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories. *Exp Cell Res*, **247**, 176-88.
- Zou, L. and Stillman, B. (1998) Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science*, **280**, 593-6.
- Zou, L. and Stillman, B. (2000) Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol*, **20**, 3086-96.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), und der GATC Biotech AG, Förderkennzeichen 01 KW 9708