

Der humane MCM4-Genpromoter - eine DNA-Binderegion für Replikationsfaktoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

an der Universität Konstanz

vorgelegt von

Eva-Maria Ladenburger

Konstanz, Mai 2002

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Juli 1997 bis Mai 2002 am Lehrstuhl für Molekulare Genetik unter der Leitung von Professor Dr. R. Knippers an der Universität Konstanz angefertigt.

Herrn Professor Dr. R. Knippers möchte ich für seine Förderung und wissenschaftliche Unterstützung, seine Diskussionsbereitschaft sowie sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit danken.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für das gute Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Martina Baack und Dr. Frank O. Fackelmayer, die durch ihre experimentellen Ratschläge zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Weiterhin möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Hartung, insbesondere bei Lars Hareng, für die Nutzung des Light Cyclers bedanken.

Ein weiteres Dankeschön gilt den Stadtwerken Konstanz, da ein Stromausfall maßgeblich zur Optimierung des ChIP-Assays beigetragen hat.

Für die kritische Durchsicht des Manuskriptes danke ich Vera Bettenworth, Alexander Boehm, Günther Sülzle und vor allem Dr. Ulrich Strausfeld und Martina Baack.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben. Vor allem bei Günther.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Ladenburger, E.M., F.O. Fackelmayer, H. Hameister and R. Knippers. 1997.
MCM4 and PRKDC, human genes encoding proteins MCM4 and DNA-PKcs, are close neighbours located on chromosome 8q12-q13.
Cytogenet. Cell Genet. 77:268-270

Ladenburger, E.M., C. Keller and R. Knippers. 2002.
Identification of a binding region for human origin recognition complex proteins 1 and 2 that coincides with an origin of DNA replication.
Mol Cell Biol. 22: 1036-1048

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen.....	1
1.2. Origins und DNA-Replikation	4
1.2.1. Origins in Hefen.....	4
1.2.2. Origins in höheren Eukaryoten	5
1.3. Komponenten des Prä-Replikationskomplexes	8
1.3.1. ORC-Proteine.....	9
1.3.2. MCM-Proteine.....	14
1.3.2.1. Enzymatische Eigenschaften von MCM-Proteinen	14
1.3.2.2. Rekrutierung der MCM-Proteine.....	16
1.3.2.3. Aktivierung der MCM-Proteine	16
1.3.2.4. Regulation von humanen MCM-Proteinen	18
2. Zielsetzung	19
3. Material und Methoden	20
3.1. Material.....	20
3.2. Methoden.....	22
3.2.1. Allgemeine Methoden.....	22
3.2.2 Zellkultur.....	23
3.2.3. Proteinbiochemische Methoden.....	24
3.2.3.1. Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	24
3.2.3.2. Kernextrakte (nach Dynan, 1987).....	24
3.2.3.3. Glycerin-Dichtegradient.....	25
3.2.3.4. Immunfällungen	25
3.2.3.5. Expression und Reinigung von rekombinantem hOrc1p.....	25
3.2.3.6. Aufreinigung von 'inclusion bodies' über NiNTA-Agarose.....	26
3.2.4. Analyse von DNA.....	26
3.2.4.1. Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide.....	26
3.2.4.2. Präparation von genomischer DNA.....	27
3.2.4.3. Radioaktive Markierung von DNA.....	27
3.2.4.4. 'Polymerase chain reaction' PCR.....	28
3.2.4.5. Quantitative PCR	28
3.2.4.6. Sequenzierung von DNA.....	29
3.2.4.7. Präparation von Plasmid-DNA aus Zellen (nach Hirt, 1969).....	29
3.2.5. Analyse von Protein-DNA Wechselwirkungen	29
3.2.5.1. DNase-I-Schutz-Experiment.....	29
3.2.5.2. Benzonase-Schutz-Experiment	30
3.2.5.3. Gel-Retardierungs-Experiment	30
3.2.5.4. Bindungsexperimente mit Membran-fixierten Proteinen.....	30
3.2.5.5. 'Screenen' einer λ -Expressionsbibliothek.....	31
3.2.5.5. ' <i>in vivo</i> -crosslinking' (nach Göhring et al., 1997).....	32

3.2.5.6. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP-Assay).....	33
3.2.5.7. 'in vivo footprinting'-Experimente	33
4. Ergebnisse	35
4.1. Protein-DNA Interaktionen am MCM4-Genpromoter.....	35
4.1.1. Sequenzierung und Struktur des MCM4-Promoters.....	35
4.1.2. Identifizierung von Proteinbindestellen durch DNase-I-Schutz- Experimente.....	37
4.1.3. Benzonase-Schutz-Experimente zum Nachweis einer Bindung von E2F- Proteinen an den MCM4-Promoter.....	41
4.1.4. Nachweis von spezifischen Protein-DNA Interaktionen im Gel- Retardierungs-Experiment	42
4.1.5. Gel-Retardierungs-Experimente mit Extrakten aus synchronisierten HeLa S3 Zellen.....	45
4.1.6. Vergleich der Bindungseigenschaften von Proteinen aus proliferierenden und differenzierten HL60.....	48
4.1.7. Identifizierung eines fp6-bindenden Proteins.....	52
4.2. Identifizierung einer ORC-Bindestelle im MCM4-Genpromoter.....	54
4.2.1. Interaktionen zwischen ORC-Proteinen aus nuklearen Extrakten und der fp6-DNA	55
4.2.2. Untersuchungen zur DNA-Bindung von rekombinantem his-hOrc1p.....	59
4.2.3. Analyse von α -Orc2p-präzipitiertem Chromatin im ChIP-Assay.....	64
4.2.4. Standardisierung des ChIP-Assays durch Verdau des Nukleoproteins mit Nuklease S7 (MNase).....	68
4.2.5. Bestimmung von ChIP-DNA-Mengen durch 'real time' PCR.....	69
4.2.6. ChIP-Assay mit Nukleoprotein aus synchronisierten Zellen	75
4.2.7. Nachweis einer Origin-Aktivität im MCM4-Genpromoter.....	78
4.2.8. 'in vivo footprinting' Studien zur Eingrenzung der ORC-Binderegion.....	80
4.2.9. Untersuchungen zur episomalen Replikation von Plasmiden mit MCM4-Promoterfragmenten	82
4.2.10. Assoziation von ORC-Proteinen mit der Lamin B2 Origin Region	83
5. Diskussion	86
5.1. Die Struktur des MCM4-Genpromoters	86
5.2. Die DNA-PK.....	87
5.3. Proteinbindestellen im MCM4-Genpromoter.....	90
5.4. E2F als Regulator für die Zellzyklus-abhängige Expression von <i>MCM4</i>	92
5.5. Identifizierung einer cDNA die für Bub1 codiert.....	96
5.6. Identifizierung einer ORC-Bindestelle im MCM4-Genpromoter.....	98
5.7. Eingrenzung der ORC-Binderegion im MCM4-Genpromoter.....	104
5.8. Kolokalisation von MCM-Proteinen und ORC-Proteinen.....	107
6. Zusammenfassung.....	112
7. Literaturverzeichnis	113

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Cyclin-abhängigen Kinasen innerhalb des Zellzyklus bei Säugern.	3
Abb. 1.2 Struktur eukaryotischer Origins.....	8
Abb. 1.3 Modell der Initiation der DNA-Replikation.....	10
Abb. 1.4 Struktur von Proteinen, die homologe Bereiche zu ScOrc1 aufweisen.....	11
Abb. 3.1 Schematische Darstellung der LM-PCR.....	34
Abb. 4.1 Die Struktur des MCM4-Genpromoters.....	36
Abb. 4.2 Schematische Darstellung der markierten Promoter-DNA-Fragmente.	37
Abb. 4.3 Der codogene Strang des MCM4-Promoters im DNase-I-Schutz-Experiment.	38
Abb. 4.4 Der nicht-codogene Strang im DNase-I-Schutz-Experiment.	39
Abb. 4.5 DNase-I-Schutz-Experimente ergeben sechs geschützte Bereiche.....	40
Abb. 4.6 Benzonase-Schutz-Experimente zum Nachweis der E2F-Bindung.....	42
Abb. 4.7 Die Proteinbindung an fp5- oder fp6-Sequenzen ist spezifisch.....	43
Abb. 4.8 In nuklearen Extrakten aus HeLa S3 Zellen sind E2F-ähnliche Proteine vorhanden.....	44
Abb. 4.9 Gel-Retardierungs-Experimente mit Extrakten aus synchronisierten HeLa S3 Zellen.....	46
Abb. 4.10 Konkurrenzexperimente zeigen, dass keine Proteine an das E2F-Bindemotiv eines 287 bp Promoterfragmentes binden.....	48
Abb. 4.11 <i>in vitro</i> Differenzierung von HL60 Zellen.....	50
Abb. 4.12 Proteine von proliferierenden und differenzierten HL60 Zellen im DNase-I-Schutz-Experiment.....	51
Abb. 4.13 Die fp6-DNA bindet an ein 68 kD Protein.	52
Abb. 4.14 Identifizierung eines fp6-bindenden Proteins.....	53
Abb. 4.15 Ein hOrc2p-spezifischer Antikörper verändert das Bandenmuster des fp6-Protein Komplexes im Gel-Retardierungs-Experiment.	55
Abb. 4.16 Sedimentation von ORC-Proteinen im Glycerin-Dichtegradient.....	57
Abb. 4.17 Immunfällung von ORC-Proteinen.....	58
Abb. 4.18 Nukleare Extrakte enthalten Proteine, die mit der fp6-DNA einen identischen Protein-DNA Komplex bilden wie rekombinantes his-hOrc1p.....	60
Abb. 4.19 Bindung von his-hOrc1p an den MCM4-Genpromoter im 'South-Western' Experiment.....	61
Abb. 4.20 Bindung des MCM4-Promoterfragmentes und einer Kontroll-DNA an Proteine aus nuklearen Extrakten im 'South-Western' Experiment.....	63
Abb. 4.21 ORC-Proteine werden durch eine kurze Behandlung mit Formaldehyd mit genomischer DNA vernetzt.	65
Abb. 4.22 hOrc2p assoziiert spezifisch mit der Promoterregion (UPR)	67

Abb. 4.23 Die Effizienz von PCR-Reaktionen mit dem UPR Primerpaar ist abhängig von der DNA-Fragmentlänge des Nukleoproteins.	68
Abb. 4.24 hOrc2p und hOrc1p assoziieren spezifisch mit der Promoterregion (UPR) des <i>MCM4</i> -Gens.	70
Abb. 4.25 Schmelzkurven-Analyse mit dem LightCycler System.	72
Abb. 4.26 Quantitative PCR.	73
Abb. 4.27 Die <i>MCM4</i> -Promoterregion ist in hOrc1p- und hOrc2p-präzipitiertem Chromatin angereichert.	74
Abb. 4.28 S-Phase Chromatin enthält kein hOrc1p.	76
Abb. 4.29 Die Lokalisation von hMcm3p verändert sich während der S-Phase.	78
Abb. 4.30 Die <i>MCM4</i> -Promoterregion (UPR) ist in Präparationen von naszierender DNA stark angereichert.	79
Abb. 4.31 'in vivo footprinting'-Studien.	81
Abb. 4.32 Plasmide mit <i>MCM4</i> -Promoteranteilen zeigen keine episomale Replikation in HeLa S3 Zellen.	83
Abb. 4.33 Sequenzen der Replikationsstartstelle des Lamin B2 Origins sind in ORC-Präzipitaten angereichert.	84
Abb. 5.1 Die genomische Organisation der Promotoren der <i>MCM4</i> -Gene ist evolutionär konserviert.	87
Abb. 5.2 Struktur der humanen E2F-Transkriptionsfaktoren.	93
Abb. 5.3 Alle Promotoren der hMCM-Gene enthalten Bindemotive für den Transkriptionsfaktor E2F.	95

Verwendete Abkürzungen

aa	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	'copy' DNA; DNA-Kopie einer mRNA
C_E	Endkonzentration
chl	Chloramphenicol
cpm	counts per minute
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxinukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'2-Ethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani Medium
m	milli (10^{-3})
M	Molar
Mb	Megabasenpaar(e)
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
NP-40	Nonidet-P40
OD	optische Dichte
pfu	Plaque Forming Unit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PVDF	Polyvinyliden Flourid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeffizient)
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
u	unit; Enzymeinheit
ün	über Nacht
V	Volt
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen

Durchläuft eine eukaryotische Zelle den Zellzyklus, so führt dies zur Verdoppelung der Zelle. Dieser fundamentale Prozess erfordert das vollständige und exakte Kopieren des Erbmaterials sowie eine gleichmäßige Verteilung der Chromatiden auf die Tochterzellen. Dementsprechend wird der Zellzyklus in vier Phasen eingeteilt, wobei eine DNA-Synthese-Phase (S-Phase) und eine Mitose-Phase (M-Phase) durch zwei Ruhephasen (G1 und G2; g, gap; engl. Lücke) getrennt werden. Die Dauer zwischen Mitose und DNA-Replikation wird als G1-Phase bezeichnet, der Zeitraum nach der Verdoppelung der DNA als G2-Phase. Während die S-Phase und die M-Phase zeitlich relativ begrenzt sind, ist der Zeitraum der einzelnen G-Phasen abhängig von den Wachstumsbedingungen sowie dem jeweiligen Zelltyp.

Der Ablauf des Zellzyklus ist ein hochregulierter Prozess, bei dem eine Familie von Proteinkinasen, die so genannten Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), eine entscheidende Funktion bei den Übergängen der einzelnen Zellzyklus-Phasen einnehmen (Übersichtsartikel Nigg, 1995). Eine aktive CDK ist ein heterodimerer Komplex, der sich aus einer regulatorischen Untereinheit - dem Cyclin - und einer katalytischen Untereinheit - der Kinase (cdk) - zusammensetzt. Sowohl die Aktivität als auch die Substratspezifität der CDKs wird durch die Cycline vermittelt. Diese Faktoren werden Zellzyklus-abhängig synthetisiert und abgebaut (Amon et al., 1994; Nurse, 1994; Peeper et al., 1993). Zusätzlich wird die Aktivität der cdk/Cyclin-Komplexe über Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungs-Ereignisse reguliert. So besitzt die Mehrzahl der cdk Untereinheiten konservierte Aminosäurereste (Tyrosin 15 oder Threonin 161), deren Phosphorylierungsstatus entscheidend für die Aktivität der jeweiligen CDK ist. Demnach können CDKs zu bestimmten Phasen des Zellzyklus gebildet und aktiviert werden, wobei ihre Aktivitäten für die Steuerung von S-Phase und Mitose essenziell sind.

Die Anzahl an cdk- und Cyclin-Genen variiert unter den Eukaryoten. In Hefen etwa scheint jeweils nur eine cdk Untereinheit an der Regulation des Zellzyklus beteiligt zu sein, während in höheren Eukaryoten mindestens sieben verschiedene cdk (cdk1-7) entdeckt wurden. Auch die Cycline bilden eine große Proteinfamilie. Bisher wurden in Vertebraten elf (Cyclin A - K) und in Hefen neun verschiedene Cycline (CLN1-3 und CLB1-6) identifiziert, die direkt in die Zellzyklus-Regulation involviert sind. Durch diese Vielfalt wird das breite Wirkungsspektrum der CDKs ermöglicht.

Ein weiterer regulatorischer Effekt bei Cyclin-abhängigen Kinasen wird durch die Gruppe der CDK-Inhibitoren (CKIs) vermittelt (Elledge & Harper, 1994). Diese Proteine binden an das Cyclin/cdk-Holoenzym und hemmen dessen Kinase-Aktivität. Der erste CDK-Inhibitor, der in Säugerzellen identifiziert wurde, ist p21^{cip1} (el-Deiry et al., 1993; Gu et al., 1993). Dieses Protein besitzt mindestens zwei Funktionen: Einerseits hemmt p21^{cip1} CDKs und bewirkt so einen Stopp im Zellzyklus (Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993), andererseits wirkt p21^{cip1} als Inhibitor für PCNA ('proliferating cell nuclear antigen') (Flores-Rozas et al., 1994; Waga et al., 1994), den Prozessivitäts-Faktor für die DNA-Polymerasen δ und ϵ , was einen unmittelbaren Stopp der laufenden DNA-Replikation zur Folge hat. Zusammenfassend spielen CKIs eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung negativer Wachstumssignale zur Unterbrechung des Zellzyklus.

Die Substrate aktiver CDKs sind vielfältig und vor allem an Replikations- oder Transkriptionsprozessen beteiligt. Die am besten untersuchten G1-Cyclin/cdk-Substrate in Säugerzellen sind die Produkte der Retinoblastom Tumor Suppressor Gen-Familie (p130, p107 und pRb). Diese Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation des Zellzyklus während der G1-Phase und beim G1/S-Übergang. Die supprimierende Aktivität der RB-Proteine basiert auf Protein-Protein Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren wie den E2F/DP-Proteinen. Diese Interaktionen sind abhängig vom Phosphorylierungsgrad der RB-Proteine. In proliferierenden Zellen wird während der G1-Phase die Bindung zwischen pRb und E2F1/DP1 durch eine cdk4/6/Cyclin D-vermittelte Phosphorylierung von pRb aufgehoben, was zur Aktivierung des E2F1/DP1-Komplexes führt (Nevins et al., 1992a,b). Durch eine E2F1/DP1-abhängige Transkription werden essenzielle Replikations-Proteine exprimiert (Übersichtsartikel Farnham, 1996), wie beispielsweise die Dehydrofolat-Reduktase (DHFR) (Means et al., 1992), die Thymidin-Kinase (TK) (Kim et al., 1991), die DNA-Polymerase α (Pearson et al., 1991) oder die cdk1 (Dalton et al., 1992).

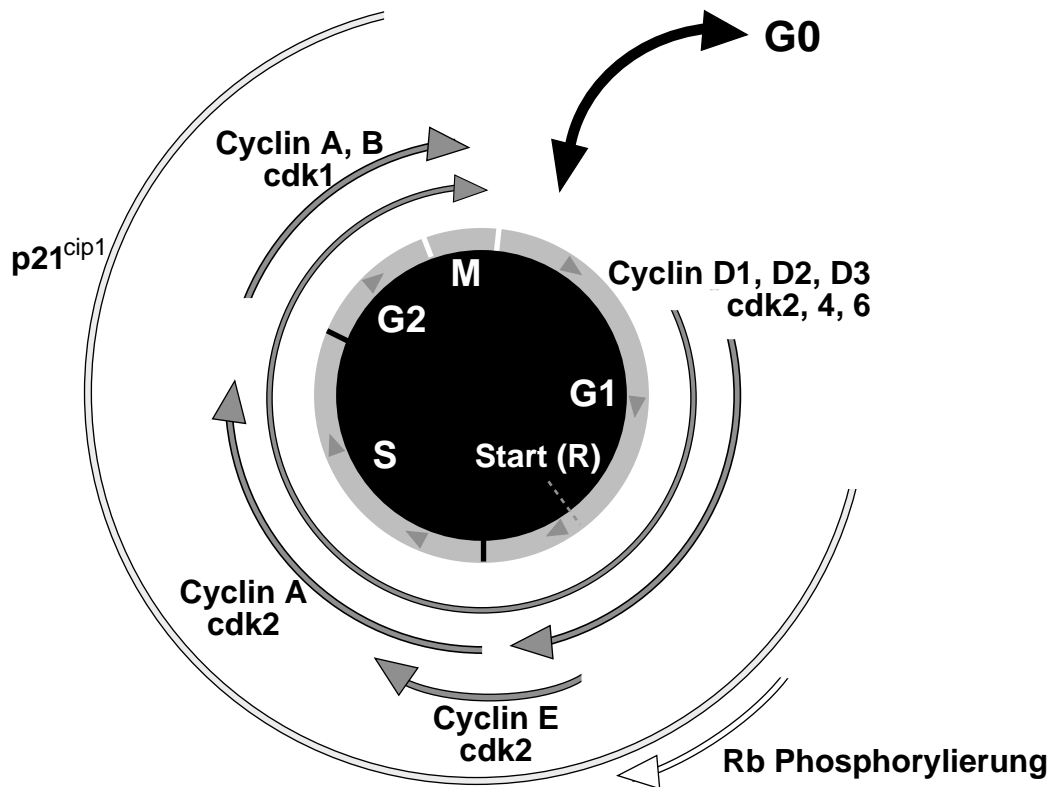


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Aktivität der verschiedenen Cyclin-abhängigen Kinasen innerhalb des Zellzyklus bei Säugern.

(modifiziert aus: www.pb.ipw.biolog.ethz.ch/images/cellcycle_Os.jpg)

Der innere Kreis kennzeichnet die Phasen des Zellzyklus. Das Auftreten der verschiedenen Cyclin/cdk-Komplexe ist den jeweiligen Zellzyklus-Phasen zugeordnet (Pfeile): Der Eintritt in den Zellzyklus erfolgt durch die Synthese von D-Typ Cyclinen (D1, D2 und D3), die je nach Zelltyp entweder an cdk4 oder cdk6 binden (Matsushime et al., 1994; Meyerson & Harlow., 1994). D-Typ Cycline sind Zielproteine einer durch Wachstumsfaktoren ausgelösten Signalkaskade und scheinen den Proliferationsstatus einer Zelle aufrecht zu erhalten. Cyclin E wird nach dem Auftreten der D-Typ Cycline am Ende der G1-Phase maximal exprimiert und bindet an cdk2 (Koff et al., 1992; Sherr et al., 1993). Dieser Komplex bewirkt einen Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase, wobei Cyclin E mit dem Eintritt in die S-Phase degradiert wird und cdk2 mit Cyclin A assoziiert. Dieser Komplex wiederum ist für das Durchlaufen der S-Phase essenziell. Cyclin A wird am Ende der G1-Phase exprimiert, erreicht maximale Mengen in der späten G2/M-Phase und wird in der Mitose degradiert (Übersichtsartikel Graña & Reddy, 1995). Der Eintritt in die Mitose wird durch den 'maturation promoting factor' (MPF) reguliert, der sich aus cdk1 und Cyclin B zusammensetzt. Durch den Abbau von Cyclin B in der mitotischen Anaphase erfolgt der Übergang in die G1-Phase (Übersichtsartikel King et al., 1994).

1.2. Origins und DNA-Replikation

Die exakte und vollständige Replikation der DNA ist essenziell für die genaue Weitergabe der Erbinformation einer eukaryotischen Zelle. Dieser Prozess benötigt die Koordination vieler Initiationsereignisse innerhalb des Zellzyklus (siehe 1.3.) sowie Regulationsmechanismen, die gewährleisten, dass die DNA genau einmal pro Zellzyklus verdoppelt wird. So findet die eukaryotische DNA-Replikation in einer Reihe von hintereinander geschalteten Einheiten, so genannten Replikons, statt, die in einem Abstand von ca. 50 bis 100 kb entlang der Chromosomen angeordnet sind (Hubermann & Riggs, 1968). Jedes Replikon besitzt eine Startstelle der Replikation, den Origin, von welchem zwei Replikationsgabeln bidirektional ausgehen (Hand et al., 1978).

1.2.1. Origins in Hefen

Die am besten charakterisierten Origins in Eukaryoten sind die ARS-Sequenzen (ARS für engl. 'autonomously replicating sequence') der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. ARS-Elemente wurden aufgrund ihrer Eigenschaft identifiziert, zirkulären extrachromosomalen Plasmiden die Fähigkeit zur eigenständigen Replikation zu verleihen (Sinchcomb et al., 1979). Diese ca. 150 bp langen Origins bestehen aus einem A-Element und drei B-Elementen (B1-B3) (Marahrens & Stillman, 1992). Das A-Element enthält eine konservierte AT-reiche Konsensussequenz, die 11 bp lang ist (${}^A/TTTTAC/T^A/GTTT^A/T$) und als ACS ('ARS consensus sequence') bezeichnet wird. Obwohl die B-Elemente nur geringe Sequenzhomologien aufweisen, sind sie für die Origin-Aktivität essenziell und in definierter Orientierung und Entfernung zum A-Element angeordnet. Das A-Element und das B1-Element bilden eine Bindestelle für den hexameren Origin Recognition Complex (ORC) (Bell & Stillman, 1992), wodurch eine Plattform für die Rekrutierung weiterer Initiationsfaktoren geschaffen wird (siehe 1.3.). An das B3-Element, das nicht bei allen ARS-Sequenzen vorhanden ist, bindet der Transkriptionsfaktor Abf1 (Diffley & Stillman, 1988). Zwischen der ORC-Bindestelle und dem B3-Element ist ein DNA-Entwindungselement (DUE) lokalisiert, welches das B2-Element beinhaltet (Abb. 1.2).

Bei *S. cerevisiae* findet sich also ein genau definiertes Sequenzelement, das als Origin der DNA-Replikation dient. Diese Situation ist aber nicht auf andere Eukaryoten übertragbar. In der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* können wie in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* autonom replizierende Sequenzen identifiziert werden. Jedoch weisen ARS-Sequenzen in *S. pombe* nur geringe Sequenzhomologien untereinander auf. Diese Origins erstrecken sich über größere Initiationszonen, die durch das Auftreten von 20-50 bp langen AT-reichen-Elementen gekennzeichnet sind (Clyne & Kelly, 1995; Dubey et al., 1994). Zahlreiche

genetische und biochemische Eigenschaften von *S. pombe* sind eher mit denen von mehrzelligen Organismen vergleichbar als mit *S. cerevisiae*, und somit scheint die Organisation der beiden Genome und die Regulation der DNA-Replikation ebenso verschieden zu sein wie ihre evolutionäre Abstammung (Fraçon et al., 1999).

1.2.2. Origins in höheren Eukaryoten

Die Identifizierung von Origins in höheren Eukaryoten erweist sich als weitaus schwieriger als in Hefen. Die Replikation extrachromosomaler DNA ist in menschlichen oder anderen Säugerzellen ineffizient, was eine Identifizierung von autonom replizierenden Sequenzen erschwert. Jedoch konnten verschiedene Methoden entwickelt werden, die eine Kartierung von Origins zulassen (Übersichtsartikel DePamphilis, 1997). Inzwischen wurden mindestens 23 Initiationsstellen in verschiedenen Zelltypen von höheren Eukaryoten identifiziert, die sich jedoch in ihrer Größe und Organisation unterscheiden. Werden die Strukturen von Replikationsgabeln und Replikationsblasen mittels zweidimensionaler Gel-Elektrophorese untersucht, so findet man Initiationszonen mit einer Größe von 4 - 55 kb, in welchen kein spezifischer Origin lokalisiert werden kann. Verschiedene Untersuchungen von neu-synthetisierter DNA oder naszierender DNA hingegen zeigen, dass die Mehrzahl (85% - 95%) der Initiationsereignisse an spezifischen Startstellen in Bereichen von 0,5 – 2 kb stattfinden. Demnach können auch in höheren Eukaryoten definierten Regionen Origin-Aktivitäten zugeordnet werden, wodurch diese Startstellen mit den Origins der Hefe vergleichbar sind (Übersichtsartikel DePamphilis, 1999).

Der erste in Säugern charakterisierte Origin wurde im DHFR-Genlocus in Hamsterzellen identifiziert (Heintz & Hamlin, 1982). Wird dieser Locus mittels 2D-Gel-Elektrophorese untersucht, so findet man Initiationsereignisse in einer 55 kb großen Region zwischen dem *DHFR*-Gen und dem *2BE2121*-Gen (Dijkwel & Hamlin, 1992; Vaughn et al., 1990). Innerhalb dieser Region konnten durch verschiedene Methoden zur Untersuchung von neu-synthetisierter DNA oder naszierender DNA, bevorzugte OBRs ('origins of bidirectional replication') charakterisiert werden: ori- β (Burhans et al., 1986; Burhans et al., 1990; Pelizon et al., 1996), der 17 kb stromabwärts vom 3'-Endes des DHFR-Gens und ori- γ (Anachkova et al., 1989; Leu et al., 1990), der 23 kb weiter stromabwärts von ori- β lokalisiert ist. Beide Origins sind jedoch unterschiedlich aktiv, wobei in einer 0,5 kb langen Region, die den ori- β umgibt, Initiationsereignisse mit einer zehnfach höheren Frequenz stattfinden. Durch quantitative kompetitive PCR-Analysen von naszierender DNA wurde eine weitere Initiationsstelle (ori- β') identifiziert, die 5 kb stromabwärts von ori- β lokalisiert ist (Kobayashi et al., 1998). Demnach existieren im DHFR-Locus mindestens 3 primäre Initiationsstellen (ori- β , ori- β' und ori- γ), die

allerdings unterschiedliche Initiationsfrequenzen aufweisen. Generell scheinen Initiationszonen aus einer oder mehreren primären Startstellen zu bestehen, die von weniger aktiven, sekundären Origins umgeben sind (Jesuiten-Modell nach DePamphillis, 1999).

Andere Startstellen der DNA-Replikation, wie der in menschlichen HL-60 Zellen identifizierte Origin in der Lamin B2 Region, besitzen ausschließlich eine Initiationsstelle. Das genomische Fragment, das den Lamin B2 Origin beinhaltet, wurde ursprünglich in einer Bibliothek aus naszierender DNA identifiziert (Tribioli et al., 1987). Später konnte über kompetitive PCR-Analysen einer 474 bp langen Region Origin-Aktivität zugeordnet werden, die in einem intergenischen Bereich zwischen dem 3'-Ende des Lamin B2-Gens (*LMNB2*) und dem Transkriptionsstart eines weiteren Gens, *ppv1*, lokalisiert ist (Giacca et al., 1994). Dieser Origin wird in einem frühen Stadium der S-Phase in HL-60 Zellen aktiviert, und ist in allen bisher untersuchten Zelltypen aktiv (Kumar et al., 1996). Durch 'in vivo footprinting'-Analysen konnte einem Bereich, der die Initiationsstelle umgibt, eine Proteinbindestelle zugeordnet werden. Die Protein-DNA Interaktionen treten ausschließlich in proliferierenden Zellen auf (Dimitrova et al., 1996) und verändern sich Zellzyklus-abhängig (Abdurashidova et al., 1998). Dieses Verhalten zeigt Parallelen zu den in *S. cerevisiae* und *Xenopus laevis* beschriebenen Veränderungen zwischen prä- und postreplikativen Komplexen (Cocker et al., 1996; Diffley et al., 1994; Rowles et al., 1996; Santocanale & Diffley, 1996). Durch die Anwendung der 'RIP mapping method' (replication initiation point mapping) (Bielinsky & Gerbi, 1998) konnte der Startpunkt der Replikation auf ein Nukleotid genau bestimmt werden (Abdurashidova et al., 2000). Dies macht den Lamin B2 Origin zu dem am besten charakterisierten Origin in Metazoen.

Die Kartierungen von Origins in Säugern und deren genetische Analyse zeigen, dass sich Origins durch eine 0,5 – 2 kb lange DNA-Sequenz definieren. Obwohl sich keine Homologien oder gar Konsensussequenzen ermitteln lassen, weisen die einzelnen Regionen doch gewisse Gemeinsamkeiten auf. Zum einen findet man häufig AT-reiche-Elemente, die vermutlich als Entwindungszonen dienen. Diese AT-Elemente sind meist von CpG-reichen Abschnitten umgeben, die oft stark methyliert sind (Araujo et al., 1998; Rein et al., 1997; Übersichtsartikel Rein et al., 1997). Sequenzanalysen von klonierter naszierender DNA ergaben, dass CpG-Inseln innerhalb der naszierenden DNA zehnfach angereichert sind (Delgado et al., 1998). CpG-Inseln sind DNA-Abschnitte mit einer Länge von mindestens 1 kb, die sich in Ihrem GC-Gehalt (65%) von anderer genomischer DNA (40%) (Bird et al., 1985) unterscheiden. Sie repräsentieren 1,5% des Gesamtgenoms (Antequerra & Bird, 1993) und liegen häufig (50%) mit Promotoren von Haushaltsgenen assoziiert vor. Interessanterweise wurden die meisten der untersuchten humanen

Origins in Promoterregionen von aktiv transkribierten Genen identifiziert (*ppv1* (Giacca et al., 1994), *β -globin* (Kitsberg et al., 1993), *c-myc* (Vassilev & Johnson, 1990), *hsp 70* (Taira et al., 1994), *dnmt1* (Araujo et al., 1999); rRNA Gene (Little et al., 1993; Yoon et al., 1995)). Ob eine direkte Verbindung von Replikation und Transkription besteht, ist unklar.

Ein weiterer Aspekt bei der Identifizierung von Origins ist der Einfluss der Kernstruktur. So findet die Initiation der DNA-Replikation ausschließlich in intakten Zellkernen statt. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass neu synthetisierte DNA häufig mit der Kernmatrix assoziiert vorliegt (Übersichtsartikel Boulikas, 1996; Laskey & Madine, 1996). Die Kernmatrix ist eine präparativ definierte Struktur, die entsteht, wenn Chromatin und lösliche Proteine aus isolierten Zellkernen entfernt werden. Dieses 'Kerngerüst' besteht aus zwei Substrukturen: Der Inneren Kernmatrix, die sich aus filamentösen und granulären Strukturen zusammensetzt, sowie der Äusseren Kernmatrix, die einen Komplex aus Kernlamina und Proteinen der Kernporen darstellt (Übersichtsartikel Gasser et al., 1989; Verheijen et al., 1988). Biochemische Analysen zeigen, dass die Innere Kernmatrix Komplexe aus Enzymen zur Transkription und DNA-Replikation enthält, so genannte 'replication' oder 'transcription factories' (Hozak et al., 1993; Hassan & Cook, 1993; Jackson et al., 1993b). Demnach haben Komponenten der Kernmatrix wichtige Funktionen bei der DNA-Replikation und sind damit vermutlich auch an Initiationsereignissen beteiligt. Ebenso relevant scheint die Chromatinstruktur zu sein. Je nach Verpackungsgrad der DNA können sowohl Promoter- als auch Origin-Aktivitäten blockiert werden, da die Zugänglichkeit von Replikationsfaktoren an ihre spezifischen DNA-Bindestellen verringert wird (DePamphilis, 1996). Möglicherweise ist dies auch die Ursache für das präferentielle Auftreten von Origins in Promoterregionen von aktiv transkribierten Genen, da sich diese Regionen durch eine aufgelockerte Chromatinstruktur auszeichnen.

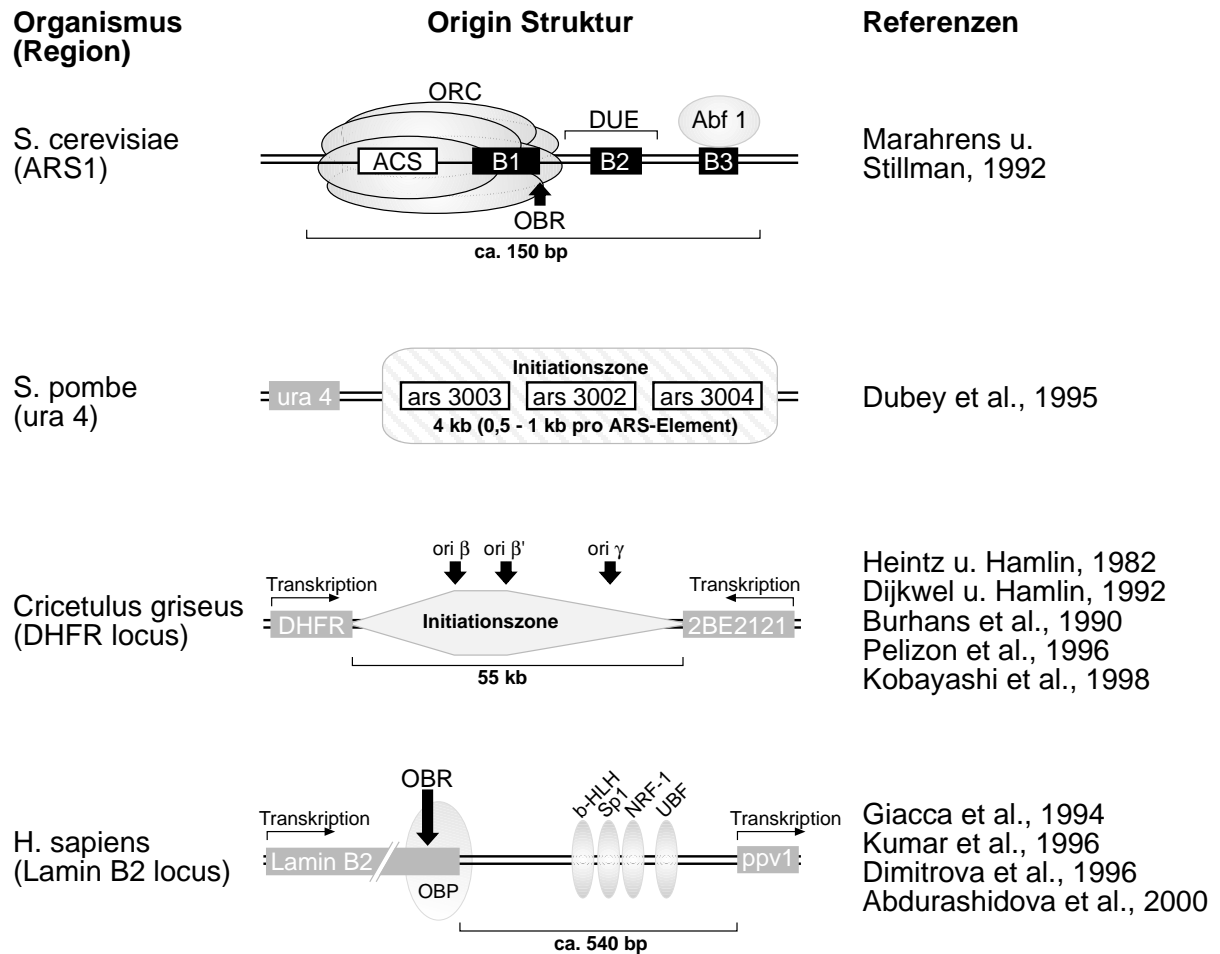


Abb. 1.2 Struktur eukaryotischer Origins

Darstellung von vier Originregionen, die in Hefe oder Säugerzellen charakterisiert wurden (modifiziert nach M. L. DePamphilis, 1999 und P. Françon et al., 1999). Dabei steht ORC für 'origin recognition complex', ARS für 'autonomously replicating sequence', ACS für 'ARS consensus sequence', OBR für 'origin of bidirectional replication' und OBP für 'origin binding protein'.

1.3. Komponenten des Prä-Replikationskomplexes

Jeder Abschnitt des Genoms wird während der S-Phase nur ein einziges Mal repliziert. Dies setzt voraus, dass jeder Origin durch Initiationsfaktoren gekennzeichnet wird, die ausschließlich einmal pro S-Phase aktiv sind und es dem Replikationsapparat erlauben, zwischen replizierter und noch nicht replizierter DNA zu unterscheiden. Das Konzept, dass Chromosomen in der G1-Phase durch Faktoren gekennzeichnet werden, die eine DNA-Synthese in der S-Phase ermöglichen, wurde erstmals mit der Durchführung von Zellfusionsexperimenten in Säugern entwickelt (Rao & Johnson, 1970). 1988 wurde dieses Konzept durch Julian Blow und Ron Laskey verfeinert, die ein hypothetisches 'replication-licencing' Modell postulierten. Durch die Identifizierung von potenziellen Initiations-

faktoren war es möglich, diesen hochregulierten Prozess auf molekularer Ebene zu präzisieren (Diffley et al., 1994). So ist die Einleitung der DNA-Replikation von mindestens 20 verschiedenen Initiationsfaktoren abhängig, die in geordneter Reihenfolge an Origin-Bereiche binden.

Der erste in Eukaryoten identifizierte Proteinkomplex, der spezifisch an Origins bindet, wurde in *S. cerevisiae* entdeckt und als 'origin recognition complex' (ORC) bezeichnet (Bell & Stillman, 1992). Der ORC-Komplex in Hefe setzt sich aus sechs Untereinheiten zusammen (ScOrc1p - ScOrc6p) und bindet spezifisch an ARS-Sequenzen (siehe 1.2.). Durch diese Bindung können weitere Initiationsfaktoren, wie Cdt1, Cdc6 und die MCM-Proteine rekrutiert werden, die zusammen mit ORC den Prä-Replikationskomplex bilden (Coleman et al., 1996; Donovan et al., 1997; Hua & Newport, 1998; Liang & Stillman et al., 1997; Maiorano et al., 2000; Nishitani et al., 2000; Romanowski et al., 1996; Rowles et al., 1996; Tanaka et al., 1997) (siehe Abb. 1.3).

Da in allen bisher untersuchten Eukaryoten homologe Replikationsfaktoren identifiziert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die Initiation der DNA-Replikation ein in der Natur konservierter Prozess ist.

1.3.1. ORC-Proteine

Die in *S.cerevisiae* identifizierten Untereinheiten des ORC-Komplexes werden durch Gene codiert, deren Deletionen letal sind. (Bell & Stillman, 1992; Bell et al., 1993; Fox et al., 1993; Micklem et al., 1993). Die sechs Proteine sind strukturell miteinander verwandt und besitzen ein Molekulargewicht von 120, 72, 62, 56, 53, und 50 kD.

Durch Analysen der Proteinsequenzen wurden in ScOrc1p, ScOrc4p und ScOrc5p Nukleotidbindestellen identifiziert, die aus konservierten 'Walker A- und B-Motiven' bestehen (Koonin, 1993; Walker et al., 1982). Diese Motive findet man bei vielen DNA-Bindeproteinen, die eine Helikase-Aktivität besitzen. Dabei bindet das A-Motiv, das aus der hydrophoben Konsensussequenz GXXGXXGKT besteht (Koonin, 1993), spezifisch Purine über den Triphosphatrest des Nukleotids. Die ATP- oder GTP-Hydrolyse wird durch ein Magnesium-Ion ermöglicht, das innerhalb des B-Motivs gebunden wird (Story & Steitz, 1992). Die sequenzspezifische Bindung des ScORC Komplexes an die A- und B1-Elemente der ARS-Sequenzen erfolgt ATP-abhängig und wird durch ScOrc1p vermittelt (Bell & Stillman, 1992; Klemm et al., 1997). Bei Untersuchungen von vernetzten Protein-DNA Komplexen zeigt sich, dass die Untereinheiten ScOrc1p, ScOrc2p, ScOrc4p und ScOrc5p direkt mit den ARS-Sequenzen interagieren, während über Protein-Protein Interaktionen vermutlich die Bindung von ScOrc3p und ScOrc6p vermittelt wird (Lee & Bell, 1997). Der ScORC-Komplex bleibt während des gesamten Zellzyklus an den Origin-Sequenzen gebunden (Diffley & Cocker, 1992; Diffley et al., 1994).

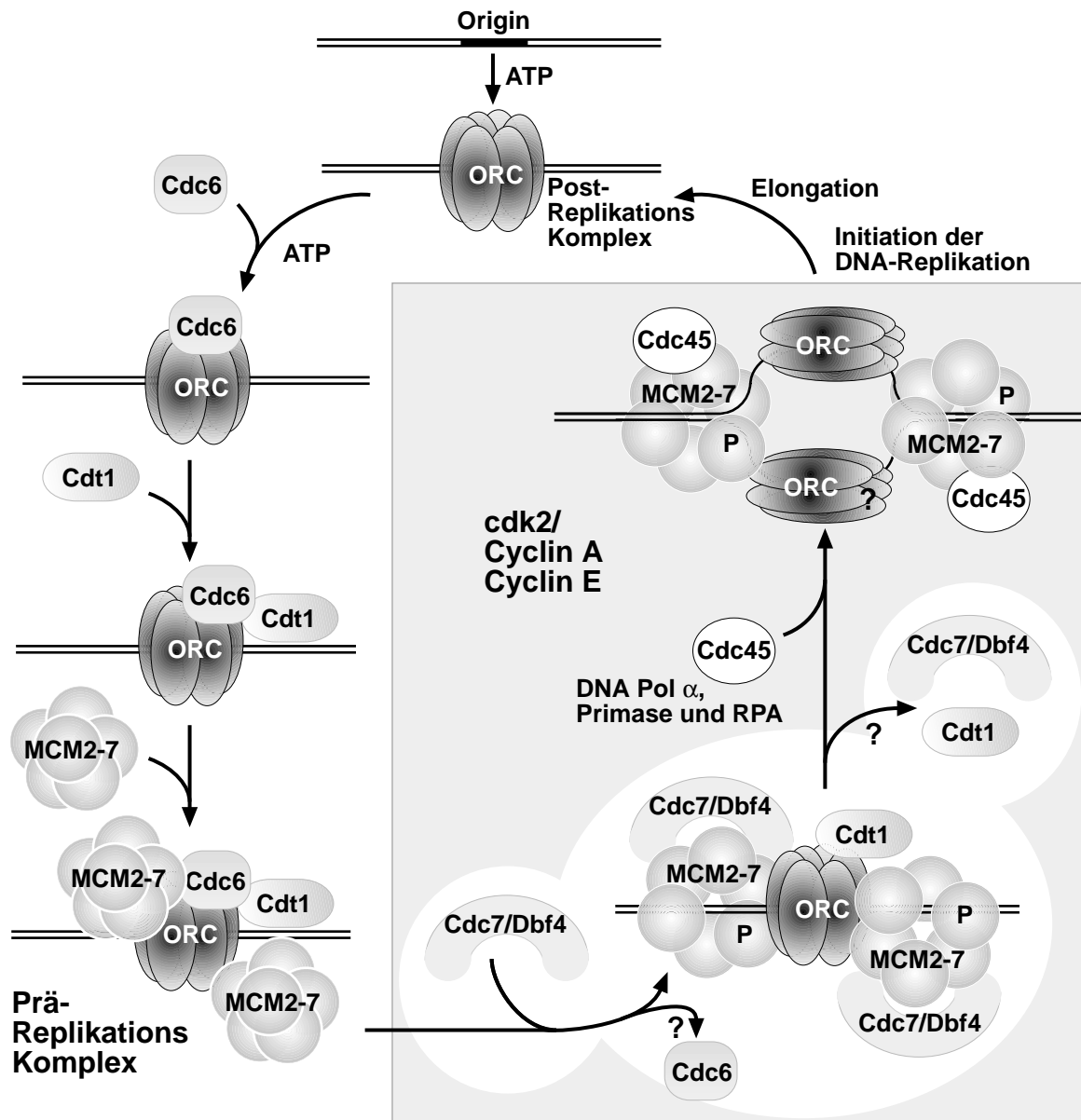


Abb. 1.3 Modell der Initiation der DNA-Replikation

In der frühen G1-Phase rekrutiert der 'origin recognition complex' (ORC) Cdc6 und Cdt1. Dies führt zur Chromatinbindung von MCM-Proteinen. Die Aktivierung der Cdc7/Dbf4 Kinase induziert eine Konformationsänderung des MCM-Komplexes, aus der eine lokale Entwindung des Origin-Bereiches resultiert. Dadurch kann unter dem Einfluss von CDKs Cdc45 zum Prä-Replikationskomplex rekrutiert werden. In diesem Zeitraum dissoziieren Cdc6 und Cdt1 unabhängig voneinander vom Komplex. Die Initiation der DNA Replikation erfolgt, wenn RPA und die DNA-Polymerase α -Primase an die entwundene DNA bindet.

Eine Funktion des ScORC-Komplexes bei der Entwindung der DNA, wie sie bei den Initiationsproteinen von *Escherichia coli* oder dem Simian Virus 40 vorhanden ist (Kornberg und Baiker, 1992), konnte bisher nicht gezeigt werden. ScORC bindet jedoch sowohl an doppelsträngige als auch an einzelsträngige DNA und besitzt unterschiedliche Eigenschaften in Abhängigkeit von den jeweiligen DNA-Substraten. Bindet ScORC an doppelsträngige DNA, so erfolgt dies spezifisch an die ACS-Sequenzen, wobei die ATPase-Aktivität des Komplexes inhibiert wird. Im Gegensatz dazu ist die Bindung an einzelsträngige DNA sequenzunspezifisch. Zusätzlich wird die ATP-Hydrolyse stimuliert (Lee et al., 2000), die durch die ATP-Bindestelle in ScOrc1p katalysiert wird (Klemm et al., 1997). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass der ScORC-Komplex zwischen zwei Konformationen pendelt: Einer erweiterten Konformation, wenn der Komplex an doppelsträngige DNA gebunden ist, und einer eher kompakten Konformation, wenn die Bindung an einzelsträngige DNA erfolgt (Lee et al., 2000). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass ScORC seine Konformation ändert, wenn die Origin-DNA während der Initiation der DNA-Synthese entwunden wird. Vermutlich können dadurch die Protein-Protein Interaktionen des Komplexes moduliert werden, so dass eine Wechselwirkung sowohl mit prä-replikativem als auch post-replikativem Chromatin möglich wird.

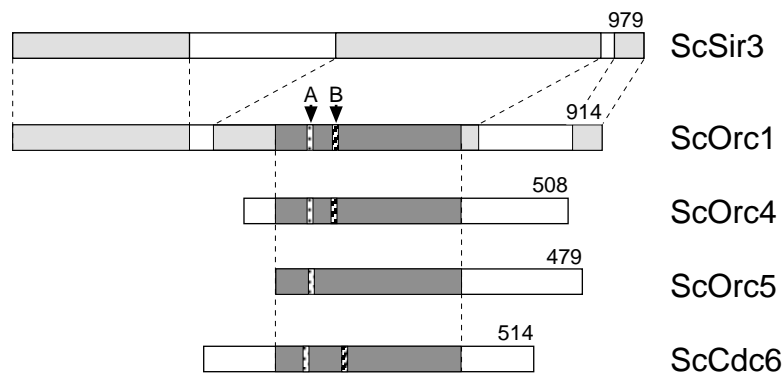


Abb. 1.4 Struktur von Proteinen, die homologe Bereiche zu ScOrc1 aufweisen.
(nach Bell et al., 1995 und Quintana et al., 1997)

Vergleich zwischen ScOrc1, ScOrc4p, ScOrc5p, ScCdc6p und ScSir3p. Schwarze Regionen zeigen konservierte Bereiche, die Nukleotidbindestellen beinhalten. Die Walker A und B Motive sind durch Pfeile gekennzeichnet. ScOrc5p besitzt ausschließlich ein Walker A Motiv, wobei die Funktion der ATP-Bindung noch unklar ist. Graue Regionen weisen auf ähnliche Sequenzfolgen in ScOrc1p und ScSir3p hin.

Biochemische Untersuchungen zeigen eine direkte Interaktion zwischen ScORC und dem essenziellen Initiationsfaktor ScCdc6p (Liang et al., 1995; Mizushima et al., 2000). ScCdc6p (Cdc, für 'cell division cycle') ist mit zwei Untereinheiten des ScORC Komplexes verwandt und besitzt wie ScOrc1p und ScOrc4p eine Nukleotidbindestelle des 'Walker A und B' Typs (Bell et al., 1995; Quintana et al., 1997) (Abb. 1.4). Die Walker A und B-Motive von ScCdc6p haben unterschiedliche Funktionen. Das A-Motiv ist notwendig, um effizient mit Origins zu interagieren, das B-Motiv ist für die folgende Rekrutierung der MCM-Proteine essenziell (Übersichtsartikel Tye, 1999). Neben ScOrc1p und ScOrc4p zeigt ScCdc6p signifikante Sequenzähnlichkeiten zu einer Superfamilie von so genannten 'clamp-loaders', die ringförmige Faktoren auf die DNA laden, um die Prozessivität von DNA-Polymerasen zu stimulieren (Perkins & Diffley, 1998). Zu dieser Superfamilie gehört beispielsweise auch RF-C (replication factor C), der PCNA (siehe 1.1.) auf die DNA lädt (Jonsson & Hübscher, 1997). Man vermutet, dass die Rekrutierung der MCM-Proteine durch ScCdc6p ähnlich verläuft. Durch die extrem kurze Halbwertszeit von ScCdc6p und die Beschränkung der Expression auf die G1-Phase (Detweiler & Li, 1997; Piatti et al., 1995) ist die Rekrutierung der ScMCM-Proteine zeitlich eingeschränkt (siehe 1.3.2.2.).

Weiterhin kann die Cyclin-abhängige Kinase ScCdc28p mit dem ScORC-Komplex kopräzipitiert werden (Weinreich et al., 2001), was darauf hindeutet, dass die Bildung des Prä-Replikationskomplexes durch Phosphorylierungsereignisse Zellzyklus-abhängig reguliert ist. Hinweise darauf geben auch Untersuchungen in *S. pombe*, die zeigen, dass die SpCdc2 Kinase SpOrc2p *in vitro* und *in vivo* phosphorylieren kann (Leatherwood et al., 1996; Vas et al., 2001). Durch diese Phosphorylierung werden Reinitiationsereignisse unterdrückt, weshalb vermutet wird, dass die Phosphorylierung von SpOrc2p für die genetische Stabilität einer Zelle (mit-)verantwortlich ist (Vas et al., 2001).

Darüber hinaus ist der ScORC-Komplex an der Unterdrückung der Genexpression, dem 'silencing', bei den 'mating type' Genen beteiligt. Das 'silencing' resultiert aus der kombinierten Aktion von mindestens drei Komponenten: ca. 150 bp große DNA-Elemente, die als 'silencer' bezeichnet werden, verschiedene multi-funktionelle DNA-Bindeproteine, die direkt an die 'silencer' binden ('silencer binding proteins') und die spezialisierten 'silencing'-Proteine ScSir1p-Sir4p (SIR für 'silent information regulator') (Loo et al., 1995). Da ScSir1p und ScORC direkt interagieren (Triolo & Sternglanz, 1996) wurde vermutet, dass ScORC als 'silencer binding protein' agieren kann. Tatsächlich zeigen unabhängige Untersuchungen (Fox et al., 1995; Kelly & Brown, 2000; Pak et al., 1997), dass durch die Bindung von ScORC an eine innerhalb der 'silencer' gelegenen ACS-Sequenz (siehe 1.2.1.) ScSir1p rekrutiert wird. Dadurch können ScSir2-4 binden, was dann zum 'silencing' der Region führt. Diese und vergleichbare Untersuchungen in *Drosophila melano-*

gaster (Shareef et al., 2001) lassen vermuten, dass ORC an der Bildung von Heterochromatin beteiligt ist. Inwiefern diese Funktionen mit den replikativen Aufgaben des ORC-Komplexes zusammenhängen, ist derzeit noch unklar.

Genetische und biochemische Untersuchungen zeigen, dass ORC-Homologe in höheren Eukaryoten ebenso wie in der Hefe für die Initiation der DNA-Replikation essenziell sind (Übersichtsartikel Quintana & Dutta, 1999). Die ORC-Bindung an Chromatin verändert sich jedoch während des Zellzyklus, wobei das Bindungsverhalten bei den jeweiligen Organismen unterschiedlich ist. In *X. laevis* bleibt XIORC während der S-Phase Chromatin-gebunden, wird während der Mitose vom Chromatin abgelöst und bindet dann erneut in der G1-Phase (Coleman et al., 1996; Romanowski et al., 1996; Rowles et al., 1996). In Säugerzellen scheint sich Orc1p während der S-Phase vom Chromatin abzulösen und in der G1-Phase wieder zu binden, wobei andere Untereinheiten des ORC-Komplexes während des gesamten Zellzyklus mit Chromatin assoziiert vorliegen (Kreitz et al., 2000; Natale et al., 2000).

Die menschlichen Homologe aller sechs ORC Untereinheiten wurden über vergleichende Sequenzanalysen identifiziert (Dhar & Dutta, 2000; Gavin et al., 1995; Pinto et al., 1999; Quintana et al., 1997; Quintana et al., 1998; Tugal et al., 1998). Humane ORC-Proteine bilden spezifische Subkomplexe, wenn sie aus HeLa Chromatin extrahiert oder gleichzeitig in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert werden (Dhar et al., 2001; Vashee et al., 2001). Der hORC-Komplex aus HeLa Zellen scheint sich aus hOrc2p, hOrc3p, hOrc4p und hOrc5p zusammenzusetzen, der nur teilweise mit hOrc1p assoziiert vorliegt (Vashee et al., 2001). hOrc6p ist bei endogenem hORC abwesend, bindet jedoch an den hOrc2–5 Komplex, wenn alle hORC-Proteine im Baculovirus-System exprimiert werden.

Unklar ist bisher, an welche Sequenzen hORC im Humangenom bindet und ob diese Bindestellen wie bei *S. cerevisiae* mit Startstellen der DNA-Replikation überlappen. Die einzigen Hinweise auf eine solche Bindung sind die 'in vivo footprinting'-Analysen im Bereich des humanen Lamin B2 Origins (Dimitrova et al., 1996; Abdurashidova et al., 1998). Eine Assoziation von ORC-Proteinen mit Origin-Sequenzen in höheren Eukaryoten konnte bisher ausschließlich in *D. melanogaster* gezeigt werden (Austin et al., 1999).

1.3.2. MCM-Proteine

MCM-Proteine sind eine hochkonservierte Familie von Proteinen, die eine Schlüsselrolle bei der Bildung des Prä-Replikationskomplexes einnehmen. Die als hexamerer Komplex vorliegenden Kernproteine sind Komponenten des hypothetischen 'replication licensing factor' RLF-M (Blow & Laskey, 1988, siehe 1.3.). Verschiedene Untersuchungen lassen vermuten, dass der MCM-Komplex als replikative Helikase agiert (Ishimi et al., 1997; Labib et al., 2000; Lee & Hurwitz, 2000 u. 2001; You et al., 1999).

Entdeckt wurden die MCM-Proteine bei Untersuchungen von Mutanten in *S. cerevisiae*, die nicht in der Lage sind, extrachromosomale DNA, so genannte 'Minichromosomen', konstant an die Tochterzellen weiterzugeben (Maine et al., 1984; Sinha et al., 1986). Aufgrund von Sequenzhomologien wurden diese Gene mit anderen Genen gruppiert, deren Mutanten phänotypische Defekte in der Zellproliferation aufweisen (Moir & Botstein, 1982). Sie erhielten die Bezeichnung MCM für 'Minichromosome Maintenance' und wurden in sechs Klassen (MCM2 - MCM7) eingeteilt (Chong et al., 1996). Die Sequenzhomologie konzentriert sich auf eine ca. 200 aa lange zentrale Region, die ein Walker A-Motiv (siehe 1.3.1.) als Nukleotidbindestelle enthält (Koonin, 1993). Außerhalb dieser konservierten Region sind die einzelnen Klassen der MCM-Proteine divergent strukturiert. Mutationsanalysen zeigen, dass sich MCM2-7 funktionell nicht ersetzen lassen (Dalton & Whitbread, 1995; Gibson et al., 1990; Hennessy et al., 1990; Yan et al., 1991). Mcm2, Mcm4, Mcm6 und Mcm7 besitzen jeweils ein Zink-Finger-Motiv vom Typ $CX_2CX_{18-19}CX_{2-4}C$, das vermutlich für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich ist (Übersichtsartikel Kearsey & Labib, 1998).

1.3.2.1. Enzymatische Eigenschaften von MCM-Proteinen

Die sechs MCM-Proteine (Mcm2 - Mcm7) interagieren miteinander und bilden verschiedene Subkomplexe, wobei die am häufigsten gereinigte Form ein hexamerer Komplex ist, der sich aus MCM2-7 zusammensetzt (Adachi et al., 1997; Brown & Kelly, 1998; Kubota et al., 1997; Richter et al., 1997). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen (Adachi et al., 1997), dass der MCM-Komplex prinzipiell in zwei Konformationen vorliegt. Es kann sowohl eine globuläre Struktur als auch eine planare Struktur mit einem zentralen Kanal nachgewiesen werden. Der hexamere MCM-Komplex ist relativ stabil, zerfällt jedoch bei Erhöhung der Ionenstärke in zwei Subkomplexe. Einerseits entsteht ein salzstabiles Dimer, das sich aus Mcm3 und Mcm5 zusammensetzt, andererseits ein Trimer aus Mcm4, Mcm6 und Mcm7, an das Mcm2 schwach gebunden ist (Burkhart et al., 1995; Fujita et al., 1997; Kimura et al., 1996; Kubota et al., 1997; Musahl et al., 1995; Thömmes et al., 1997).

Aufgrund des konservierten ATPase-Motivs (Walker A-Motiv) wurde vermutet, dass der hexamere Komplex eine DNA-abhängige ATPase- oder Helikase-Aktivität aufweist. Dem gereinigten Komplex konnten jedoch zunächst keine enzymatischen Aktivitäten oder DNA-Bindeeigenschaften zugeordnet werden (Adachi et al., 1997; Brown & Kelly, 1998). 1997 gelang es Ishimi und Mitarbeitern bei einem dimeren Komplex aus hMcm4p / hMcm6p / hMcm7p Heterotrimeren eine ATPase-Aktivität und eine schwache Helikase-Aktivität nachzuweisen. Neuere Arbeiten zeigen, dass sich die Prozessivität dieser Helikase-Aktivität in Gegenwart eines DNA-Substrats drastisch steigern lässt, wenn dieses einzelsträngige 5'-Überhänge besitzt und damit Replikationsgabeln imitiert (Lee & Hurwitz; 2001). Weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion der MCM-Proteine als replikative Helikase geben Untersuchungen, die in *S. cerevisiae* durchgeführt wurden. Durch 'in vivo crosslinking' Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Lokalisation der MCM-Proteine während der S-Phase vom Origin hin zu Nicht-Originregionen ändert, wobei die MCM-Proteine wahrscheinlich mit den fortschreitenden Replikationsgabeln kolokalisieren (Aparicio et al., 1997). Labib et al. (2000) konstruierten so genannte 'mcm degraon' Mutanten, bei denen MCM-Proteine durch eine N-terminale Extension (dem 'degraon') modifiziert wurden, um ein punktuell Ausschalten der veränderten Proteine zu ermöglichen. Versuche mit diesen Mutanten zeigen, dass MCM-Proteine für das Fortschreiten der Replikationsgabeln essenziell sind und demnach vermutlich auch eine biochemische Funktion während der Elongationsphase besitzen (Labib et al., 2000). Eine weitere Bestätigung der postulierten Helikase-Aktivität der MCM-Proteine liefern Untersuchungen mit MCM-Homologen in Archaeen (Übersichtsartikel Kearsey & Labib, 1998). Im Gegensatz zu Eukaryoten besitzen manche Archaeen, wie beispielsweise *Methanobacterium thermoautotrophicum* ein einziges MCM-Gen (Smith et al., 1997). Dieses bakterielle MCM-Protein bildet hexamere Komplexe mit einer Helikase-Aktivität, die lange Regionen doppelsträngiger DNA entwinden und als replikative Helikase agieren kann (Chong et al., 2000; Kelman et al., 1999; Shechter et al., 2000).

Der MCM-Komplex hat zudem eine direkte Funktion bei der Initiation der DNA-Synthese am Origin (Chong et al., 1995; Kubota et al., 1995; Tanaka et al., 1997; Yan et al., 1993). Um sicherzustellen, dass Initiationsereignisse an einem Origin ausschließlich einmal pro Zellteilung erfolgen, ist die Rekrutierung des MCM-Komplexes und seine Aktivierung in eine enzymatisch aktive Helikase zeitlich getrennt. Diese zeitliche Trennung wird durch verschiedene Faktoren reguliert, die einerseits für die Bildung des Prä-Replikationskomplexes notwendig sind und andererseits zur Aktivierung des MCM-Komplexes führen (Übersichtsartikel Lei & Tye, 2001).

1.3.2.2. Rekrutierung der MCM-Proteine

Die Rekrutierung des MCM-Komplexes erfolgt in einem definierten Abschnitt des Zellzyklus. Sie beginnt in der Anaphase, dauert während der Telophase und der gesamten G1-Phase an und endet mit der Initiation der DNA-Replikation. In diesem Zeitraum müssen unter anderem G1-Phase-spezifische Initiationsfaktoren wie Cdc6 (Cdc18 in *S. pombe*) und Cdt1 angereichert vorliegen (Blow & Tada, 2000; Maiorano et al., 2000; Nishitani et al., 2000; Whittaker et al., 2000). Beide Proteine agieren synergistisch, um MCM-Komplexe an Origins zu rekrutieren. Cdc18 und Cdt1 wurden ursprünglich in *S. pombe* als essenzielle Faktoren der DNA-Replikation identifiziert. Ihre periodische Expression wird durch den Transkriptionsfaktor Cdc10 reguliert (Hofmann & Beach, 1994; Nasmyth & Nurse, 1981; Zhou & Jong, 1990), weshalb Cdt1 mit 'Cdc10 dependent transcript' bezeichnet wurde. Experimente in *X. laevis* und *S. pombe* zeigen, dass Cdc6/Cdc18 und Cdt1 physikalisch interagieren und während der G1-Phase ORC-abhängig mit Chromatin assoziieren. Die Chromatinbindung der beiden Faktoren scheint jedoch unabhängig voneinander zu erfolgen (Maiorano et al., 2000; Nishitani et al., 2000). Ebenso wie ORC werden beide Faktoren für die Rekrutierung des MCM-Komplexes benötigt, sind aber nicht (wie ORC) für eine dauerhafte Bindung notwendig (Hua & Newport, 1998; Maiorano et al., 2000; Nishitani et al., 2000; Rowles et al., 1999).

Eine weitere essenzielle Voraussetzung für die Rekrutierung der MCM-Proteine ist der proteolytische Abbau von mitotischen Regulatoren, wie den B-Typ Cyclinen durch den 'anaphase promoting complex' (APC, auch als Cyclosom bezeichnet, Nurse, 1990; Zachariae & Nasmyth, 1999). Dabei gibt es bei Eukaryoten Unterschiede: In Hefen ist der Abbau von mitotischen Cyclinen (CLB1-6 in *S. cerevisiae*; cdc13 in *S. pombe*) durch den APC ausreichend, um die Mitose zu beenden und den Prä-Replikationskomplex zu bilden (Kearsey et al., 2000; Noton & Diffley, 2000). In Metazoen müssen zusätzliche Regulatoren, wie beispielsweise das Geminin (McGarry & Kirschner, 1998), durch den APC abgebaut werden. Geminin ist ein negativer Regulator von Cdt1, der spezifisch Cdt1 bindet und dadurch die Rekrutierung von MCM-Komplexen an Origins während der Anaphase verhindert (Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000).

1.3.2.3. Aktivierung der MCM-Proteine

Die Aktivierung des MCM-Komplexes wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) (Nasmyth, 1993) und die Dbf4-abhängige Cdc7 Kinase (DDK; Jackson et al., 1993a) reguliert. Während die Funktionen von Cdc7/Dbf4 bei der MCM-Aktivierung weitgehend verstanden werden, sind die Prozesse, die über CDKs gesteuert werden, noch relativ unklar. Ein experimentelles Problem stellt sich dadurch, dass sich CDKs funktionell ersetzen können. Zudem unterscheidet sich das Spektrum

an CDKs bei verschiedenen Eukaryoten. So werden die Ereignisse, die mit der Aktivierung des MCM-Komplexes einhergehen, ausgesprochen kontrovers diskutiert.

Cdc7/Dbf4 ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, deren Aktivität über die periodische Synthese und den Abbau ihrer regulatorischen Untereinheit, Dbf4, gesteuert wird. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass Cdc7/Dbf4 bei der Initiation an Replikations-Origins beteiligt ist (Kihara et al., 2000; Pasero et al., 1999; Santocanale & Diffley, 1998), wobei die Rekrutierung der Kinase an Chromatin vermutlich MCM-abhängig erfolgt (Jares & Blow, 2000; Walter, 2000). Jedoch gibt es hierzu auch kontroverse Daten, die zeigen, dass Cdc7/Dbf4 unabhängig von Cdc6 und dem MCM-Komplex mit Chromatin assoziiert (Pasero et al., 1999; Weinreich & Stillman, 1999). Die Substrate der Kinase sind genauer definiert: So kann Cdc7/Dbf4 MCM-Proteine *in vitro* phosphorylieren, wobei das bevorzugte Substrat des MCM-Hexamers die Mcm2 Untereinheit ist (Brown & Kelly, 1998; Jiang et al., 1999a; Lei et al., 1997). Vermutlich erfolgt durch diese Phosphorylierung eine Konformationsänderung des MCM-Komplexes, wodurch die globuläre Struktur des Hexamers in eine ringförmige Helikase überführt wird (Adachi et al., 1997; Sato et al., 2000; Tye & Sawyer, 2000). Untersuchungen zeigen, dass die Phosphorylierung von Mcm2 mit einer lokalen Entwindung des Origin-Bereiches einhergeht (Geraghty et al., 2000).

Untersuchungen in Hefe und *X. laevis* zeigen, dass sich parallel zu diesen Ereignissen (s.o.) die Lokalisation der Initiationsfaktoren Cdc6 und Cdt1 ändert. Man vermutet, dass durch die Rekrutierung der Cdc7/Dbf4 Kinase Cdc6 vom Chromatin abgelöst wird (Übersichtsartikel Lei & Tye, 2001). In dieser Zeit wird Cdc6 von CDKs phosphoryliert (in *S. cerevisiae* vermutlich durch Cdc28/CLB5 oder Cdc28/CLB6 (Elsasser et al. 1996; Zou & Stillman, 1998); in *X. laevis* (Findeisen et al., 1999; Hua & Newport, 1998) und in Säugerzellen (Jiang et al., 1999b; Petersen et al., 1999) durch cdk2/Cyclin A). Die Funktionen dieser Phosphorylierung sind derzeit noch unklar. Sie könnte für die Dissoziation von Cdc6 vom Chromatin (mit-) verantwortlich sein (Findeisen et al., 1999), und/oder das Protein für das Ubiquitin-abhängige Degradations-System oder den Transport ins Cytoplasma kennzeichnen (Hua & Newport, 1998; Petersen et al., 1999). Unabhängig davon wird durch die Chromatin-Ablösung von ScCdc6 wahrscheinlich eine erneute Rekrutierung von MCM-Proteinen ausgeschlossen, wodurch eine Re-Replikation verhindert wird. Untersuchungen in *X. laevis* und *S. pombe* zeigen, dass Cdt1 zu einem späteren Zeitpunkt als Cdc6/Cdc18 vom Chromatin zu dissoziieren scheint, und es wird vermutet, dass dies mit der lokalen Entwindung des Origin-Bereiches einhergeht (Übersichtsartikel Lei & Tye, 2001).

Für die Initiation der DNA-Replikation, oder das 'Feuern' von Origins, ist mindestens noch ein weiterer Faktor, das Cdc45, notwendig. Die Rekrutierung von

Cdc45 an Chromatin ist sowohl von phosphoryliertem Mcm2 als auch von aktiven CDKs abhängig (Übersichtartikel Lei & Tye, 2001). Untersuchungen zeigen, dass Cdc45 mit Mcm2, Mcm5 und Mcm7 kopräzipitiert werden kann (Hopwood & Dalton, 1996; Zou & Stillman, 1998; Zou et al., 1997). Zudem gibt es Hinweise, dass Cdc45 direkt mit der DNA-Polymerase α interagiert (Übersichtsartikel Tye, 1999). Deshalb wird vermutet, dass die Phosphorylierung von Cdc45 durch CDKs eine Rekrutierung der DNA-Polymerase α ermöglicht und dies zur Initiation der DNA-Replikation führt.

1.3.2.4. Regulation von humanen MCM-Proteinen

Die menschlichen Homologe aller sechs MCM-Proteine wurden aufgrund von charakteristischen Homologiebereichen sowie über vergleichende Sequenzanalysen identifiziert (Burkhart et al., 1995; Holthoff et al., 1996; Hu et al., 1993; Musahl et al., 1995; Schulte et al., 1996; Thömmes et al., 1992; Todorov et al., 1994). Mindestens drei verschiedene Mechanismen sind an ihrer Regulation beteiligt:

(i) Die Chromatinbindung der hMCM-Proteine erfolgt Zellzyklus-abhängig (siehe 1.3.2.2.). hMCM-Proteine sind in äquimolaren Mengen von 10^5 - 10^6 Molekülen im Kern von HeLa Zellen vorhanden (Burkhart 1995, Dissertation; Schulte et al., 1995; Schulte et al., 1996; Todorov et al., 1994). Sie liegen teilweise gelöst und teilweise Chromatin-gebunden vor. Bei konstanter Gesamtmenge verändern sich die Anteile an strukturgebundenen und löslichen hMCM-Proteinen während des Zellzyklus. Chromatin-gebundene hMCM-Proteine lösen sich im Verlauf der S-Phase ab und binden nach der Mitose wieder an Chromatin. Der Anteil strukturgebundener hMCM-Proteine nimmt während der G1 Phase zu und ist während des G1/S-Übergangs maximal (Todorov et al., 1995; Krude et al., 1996).

(ii) Ein weiterer Mechanismus ist die posttranslationale Modifikation der Proteine. Neben der Acetylierung und der Ubiquitinierung sind bisher Phosphorylierungsergebnisse bei verschiedenen Untereinheiten der MCM-Proteine am besten untersucht: hMcm2p (Todorov et al., 1995), hMcm3p (Schulte et al., 1995), hMcm4p (Musahl et al., 1995) und hMcm7p (Tsuruga et al., 1997a) werden im Verlauf der S-Phase phosphoryliert und liegen in der Mitose hyperphosphoryliert vor. Mit dem Austritt aus der Mitose erfolgt eine Dephosphorylierung der Proteine. Die strukturgebundenen MCM-Proteine der G1-Phase sind wenig oder nicht phosphoryliert (Musahl et al., 1995; Richter et al., 1997).

(iii) Die Regulation der MCM-Genexpression stellt den dritten Mechanismus dar. Die mRNA Menge ist in ruhenden Zellen gering, steigert sich jedoch in proliferierenden Zellen um ein Vielfaches. Die Transkription erfolgt dann periodisch in Abhängigkeit vom Zellzyklus, wobei die maximale Expression beim Übergang von der G1-Phase in die S-Phase stattfindet (Fujita et al., 1997; Schulte et al., 1995, 1996; Stoeber et al., 2001; Tsuruga et al., 1997b).

2. Zielsetzung

Die Genexpression der humanen MCM-Proteine ist auf proliferierende Zellen beschränkt und erfolgt periodisch mit einem Maximum beim Übergang von der G1- in die S-Phase (Tsuruga et al., 1997b). Um Hinweise auf die Mechanismen der Expression von MCM-Genen zu erhalten, isolierte und sequenzierte ich im Rahmen meiner Diplomarbeit (1996) ein genomisches Fragment, das den Promoter des MCM4-Gens enthält.

Charakteristische Kennzeichen der Promoterregion sind zahlreiche GC-Boxen, die Bindemotive für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 darstellen. Da zudem keine TATA-Box existiert und das Gen von multiplen Transkriptionsstartstellen aus transkribiert wird (Diplomarbeit, 1996), besitzt der MCM4-Genpromoter die typischen Merkmale konstitutiv exprimierter Promotoren von Haushaltsgenen. Neben den GC-Boxen existieren zahlreiche Bindemotive für weitere Transkriptionsfaktoren, unter anderem für E2F (siehe 1.1.).

In der vorliegenden Dissertation sollten durch DNase-I-Schutz-Experimente Binderegionen für Proteine innerhalb des MCM4-Promoters ermittelt werden. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, ob diese Proteinbinderegionen im MCM4-Promoter bei der Regulation der MCM4-Transkription beteiligt sind. Dabei sollte das E2F-Bindemotiv in Hinblick auf die Zellzyklus-abhängige Expression der MCM-Gene besondere Beachtung finden.

Hauptgegenstand dieser Arbeit ist die Identifizierung einer Binderegion für die Initiationsfaktoren hOrc1p und hOrc2p im MCM4-Genpromoter. Innerhalb dieser Binderegion wurden zwei DNase-I-geschützte Bereiche als potenzielle Bindestellen für hOrc1p und hOrc2p vermutet. Experimentell sollte der Nachweis einer ORC-Bindung im MCM4-Genpromoter sowohl durch *in vitro* als auch durch *in vivo* Studien belegt werden. In *S. cerevisiae* werden die Startstellen der DNA-Replikation durch ORC markiert. Deshalb sollte weiterhin untersucht werden, ob innerhalb der MCM4-Promoterregion ein aktiver Origin lokalisiert ist.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Chemikalien Sofern nicht anders angegeben, stammten alle verwendeten Chemikalien (Reinheitsgrad p. A.) von den Firmen Fluka, Gibco BRL, Merck, Pharmacia, Riedel-de Haen, Serva, Sigma und Roth. Radiochemikalien wurden von ICN Biomedicals, Inc. und Amersham Pharmacia bezogen.

Enzyme Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs und MBI Fermentas bezogen. T4 DNA-Ligase, DNase-I und RNase A lieferte Roche Diagnostics. Benzonase stammte von Merck. Sawady Taq Polymerasen wurden von Genaxis oder Peqlab Biotechnologie GmbH bezogen. RED TaqTM Polymerase lieferte Sigma.

Antikörper Die polyklonalen Antikörper gegen hMcm3p, hMcm5p, hOrc1p und hOrc2p, sowie der α -DEFD-Antikörper stammten aus eigener Herstellung. Sie wurden für die Experimente über entsprechende Antigensäulen aufgereinigt. Ein weiterer polyklonaler Antikörper gegen hOrc2p wurde von P. Romanowski, Cambridge, zur Verfügung gestellt. Der monoklonale hOrc2p-Antikörper wurde von der Arbeitsgruppe Gerdes, Borstel produziert. Der monoklonale hOrc3p-Antikörper stammte von P. Schepers, GSF München. Der polyklonale Antikörper gegen hSAF-A wurde von Dr. F. O. Fackelmayer zur Verfügung gestellt. Der polyklonale Antikörper gegen RNA – Pol II wurde von der Firma Santa Cruz Biotechnology bezogen. Die Peroxidase-gekoppelten sekundären anti-Kaninchen - und anti-Maus - Antikörper wurden von der Firma Jackson ImmunoResearch bezogen.

Zellkultur Nährmedien für Zellen wie DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) wurde von der Firma Gibco bezogen, RPMI (Bezeichnung nach Entdeckungsort: Roswely Park Memorial Institute (1966)) von der Firma Seromed Biochrom KG. FCS (fötales Kälberserum) stammte von Boehringer Mannheim. Die Kulturschalen stammten von der Firma Greiner. Die menschlichen Cervixcarzinom-Zellen HeLa S3 wurden von der Firma Gibco BRL bezogen. Die menschlichen primären Fibroblasten (NHDF) wurden von der Firma PromoCell bezogen. Die menschlichen promyeoliden HL60 Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Wendel zur Verfügung gestellt.

Bakterienstämme Die *E. coli* Stämme XL-1 blue, BL21(DE3)-RIL und Sol R stammten von Stratagene. Der Stamm TOP10 wurde von Invitrogen bezogen.

Nukleinsäuren Poly(dIdC):poly(dIdC) wurde von der Firma Pharmacia bezogen, E.coli DNA stammte von Sigma. Oligonukleotide für Sequenzierungen, PCR und Gel-Retardierungs-Experimente wurden von den Firmen MWG Biotech oder Gibco BRL synthetisiert. Der Klonierungsvektor pBluescript II SK- stammte von Stratagene und der Vektor pEGFP-C1 von Invitrogen. Die Vektoren pCR Blunt II Topo sowie pRSET-C wurden von Clontech bezogen.

Verwendete Oligonukleotide

(A) Komplementäre Oligonukleotide für Gel-Retardierungs-Experimente

Primer	Sequenz	Position / a
fp6	5'-GTCCTTAATT TTTTSTAATA AAAAAAATCT TTAAGTGAGA-3'	-587/-548
	3'-CAGGAATTA AAAAAATTAT TTTTSTAGA AATTCACCTCT-5'	-548/-587
fp5	5'-CCTTATTAAC CAAAAACGCC TAAGGGATAA AGA-3'	-531/-499
	3'-GGAATAATG GTTTTTCGG ATTCCCTATT TCT-5'	-499/-531
E2F (MCM4)	5'-CCAGTTTCC GCGAAAACG CT-3'	-439/-418
	3'-GGTCAAAGG GCGCTTTTGC GA-5'	-418/-439
		Position / d
E2F (DHFR)	5'-CACAATTTTCG CGCCAACTT GA-3'	-51/-72
	3'-GTGTTAAAGC GCGGTTTGA CT-5'	-72/-52
m-E2F	5'-CCAGTTTCC ATGCAAACG TT-3'	
	3'-GGTCAAAGG TACGTTTTCG AA-5'	

a, Position relativ zu dem Translationsstart des *MCM4*-Gens in bp;

d, Position relativ zum Translationsstart des *DHFR*-Gens (Accession No X00855)

(B) Oligonukleotide zur Herstellung einseitig markierter PCR-Produkte

Primer	Sequenz (5' - 3')	Position / a	Länge (bp)	Annealing Temp.(°C)
fp1(5')	CGCAGGAGTTCGAGACCAGTCTGG	-643/-620	382	54
	AATCACAGCGGCGCTCGTACGTGG	-262/-285		
DNA-PK2 N3	GGCCAGTAAGCGCGCCTCTTTGG	-893/-871	537	54
	AAACCAGCCGTAGGCCTCGCTCGG	-357/-380		

a, Position relativ zu dem Translationsstart des *MCM4*-Gens in bp

(C) Oligonukleotide für 'in vivo footprinting' Experimente

Primer	Sequenz (5' - 3')	Position / a	Annealing Temp.(°C)
IVFP1	CCGAATCAACATGGAAACCTAAGG	-869/-846	60
IVFP2	GTGTGACCTGCGGAGGTAGTTTGG	-839/-816	65
IVFP3	AGTTTGGGTGGCTACTTGGTGTGG	-822/-798	68
N31	TGCGTAAACCAGCCGTAGGCCTCG	-352/-375	60
N3	AAACCAGCCGTAGGCCTCGCTCGG	-357/-380	62
N33	ACCAGCCGTAGGCCTCGCTCGGCC	-359/-382	65
Linker 11	GAATTCAGATC		65/62
Linker 25	GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC		

a, Position relativ zu dem Translationsstart des *MCM4*-Gens in bp

(D) Oligonukleotide für PCR-Reaktionen mit genomischer DNA

Primer	Sequenz (5' - 3')	Position / b	Länge (bp)	Annealing Temp.(°C)	
				Standard PCR	Quantitative PCR
Ex9-F Ex9-R	ATGTCTTCCGGAGACTCCTGAAGC GGCCTCCTATTCTCAGAATCATGC	6342-6365 6705-6728	387	52	57
Ex7-F Ex7-R	TAATCCGTACCTTGACTACCACC ACAGCACGTGCATGATTCTGTAGG	8901-8924 9277-9300	400		66
Ex6-F Ex6-R	TACCTGTGGGTAAGAGATGAGTTG TGCCTGTTCCCAAATGCTATATGC	10691-10704 10998-11021	331		65
Ex2-F Ex2-R	TCTGCACTCCGTTTCAGCTCCTCTG GAGTGAGGATGCCAGGTCATCTCC	11894-11917 12191-12214	321		68
UPR-F UPR-R1 UPR-R2	AAACCAGAAGTAGGCCTCGCTCGG GGCCAGTAAGCGCGCCTCTTTGG GTCTGACCTGCGGAGGTAGTTTGG	12946-12969 13460-13482 13405-13428	537 483	62	66
In1-F In1-R	ATCTCGCCTAATCCCACCAGTACC CATATTCACTACTAGACCTCCGG	14364-14387 14633-14656	293		62
In6-F In6-R	GACATTCTGCTTCCATAGCTGTGG GTTGGGAAAGATGTCATCATCAGG	19943-19966 20265-20288	346		55
In7-F In7-R	GAGGAATGCCAGAATTTCCAGAGG TTCCATCTGGAATGAGATCCAGC	26412-26435 26118-26743	327		58
		Position / c			
LB2C1-F LB2C2-R	GTTAACAGTCAGGCGCATGGGCC CCATCAGGGTCACCTCTGGTTCC	1-23 217-240	240		64
LB2-F LB2-R	GGCTGGCATGGACTTTCATTTTCAG GTGGAGGGATCTTTGTTTCGACATC	3839-3862 4047-4070	232		66
LB2C2-F LB2C2-R	CACAGCATGCGGCTGCTGATCTG CCTGGTGCGTCCCATCTGCCTGC	6648-6670 6910-6932	285		68

b, Position wie unter der Accession No U63630 angegeben; c, Position wie unter der Accession No M94363 angegeben

3.2. Methoden**3.2.1. Allgemeine Methoden**

- Elektrophorese von DNA in Agarosegelen (Sambrook et al., 1989)
- Elektrophorese von DNA in nativen Polyacrylamidgelen (Baur & Knippers, 1988)
- Auftrennung von Sequenz- und Footprint-Reaktionen (Protokoll der Firma LKB)
- Elektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970)
- Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen durch Coomassie Brilliant-Blau-Färbung (Bramhall et al., 1969) oder durch Silberfärbung (Wray et al., 1981)
- Semi-Dry Immunblot (Towbin et al., 1979)
- Western Blot Analyse mit monospezifischen oder monoklonalen Antikörpern (Harlow & Lane, 1988) mittels Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (ECL Western Blotting protocols, Amersham Life Science, 1994)
- Fällung von Proteinen durch Methanol / Chloroformextraktion (Wessel & Flügge, 1984)
- Quantifizierung von Proteinlösungen (Bradford, 1976)

- Plasmidpräparationen durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und Reinigung der DNA mittels Gleichgewichtszentrifugation in Anwesenheit von Cäsiumchlorid und Ethidiumbromid (Sambrook et al., 1989)
- Klonierung von DNA in Plasmid-Vektoren und Transformation in TSS-kompetente *E. coli* Bakterien (Chung et al., 1989)
- Elektroporation von Plasmiden in kompetente *E. coli* Bakterien im 'Gene Pulser' (Biorad) nach Angaben des Herstellers
- Klonierung von 'blunt end' PCR-Produkten (Zero Blunt™TOPO™PCR Cloning Kit, Invitrogen)
- DNA-Reinigung über Phenol-, Chloroform / Isoamylalkohol-Extraktion (Sambrook et al., 1989)
- Ethanol- bzw. Isopropanolfällung von DNA (Sambrook et al., 1989)

3.2.2 Zellkultur

Kultivierung Adhärente Zellen werden als Monolayer auf beschichteten Zellkulturschalen (Greiner) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. HeLa S3 Zellen werden in DMEM mit 5% FCS und NHDF-Zellen in DMEM mit 10% FCS gezogen. Zur Subkultivierung werden die Zellen mit Trypsin (8 g NaCl, 0,4 g KCl; 0,35 g NaHCO₃; 1 g Trypsin; 1 g EDTA; 1 g Glucose / l) abgelöst, in Medium resuspendiert und entsprechend verdünnt auf neue Petrischalen verteilt. Die Suspensionszelllinie HL60 wurde in RPMI 1640 mit 10% FCS bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden durch entsprechende Verdünnung in serumhaltigem Kulturmedium bei 1 - 2 x 10⁵ Zellen / ml gezogen. Allen verwendeten Kulturmedien wurden 40 mg / l Penicillin und 80 mg / l Streptomycin zugesetzt.

Synchronisation Zur Synchronisation von HeLa S3 Zellen in der S-Phase werden die Zellen zunächst mit einem doppelten Thymidinblock behandelt (Johnson, 1993; Ritzi et al., 1998) und anschließend für 4 h in die S-Phase entlassen. Zur Synchronisation in der G1-Phase werden HeLa S3 Zellen mit einem einfachen Thymidinblock (16 h / 2,25 mM Thymidin) vorsynchronisiert, anschließend für 9 h aus dem Block entlassen und dann für 2 – 3 h mit Nocodazol (40 ng / ml) behandelt. Die mitotischen Zellen werden gesammelt und für 4 h in die G1-Phase entlassen.

Transfektion HeLa S3 Zellen werden unter Verwendung von SuperFect™ (Qiagen) nach Vorschrift transfiziert.

Differenzierung von HL60 Zellen Proliferierende HL60 Zellen werden bei einer Dichte von 1×10^5 Zellen / ml Medium mit PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetat) bei einer Endkonzentration von 2×10^{-8} M für den angegebenen Zeitraum inkubiert.

3.2.3. Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1. Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Reinigung von Antikörpern wird rekombinantes Antigen nach Vorschrift an SulfoLink Säulenmaterial der Firma Pierce gekoppelt (0,4 mg / ml). 3 ml Anti-Serum wird für 10 min bei 15000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird anschließend für 4 h mit dem Säulenmaterial (0,5 ml) bei RT gerollt. Nach erfolgter Antikörperbindung wird die Säule mit 20 SV NET (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8; 5 mM EDTA; 0,5% NP40), 20 SV NET mit 1 M NaCl, 10 SV NET ohne NP40 und mit 5 SV TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA) gewaschen. Die gebundenen Antikörper werden in zehn Schritten zu je 0,5 SV mit 0,1 M Na-Citrat pH 3,0 eluiert. Zur Neutralisierung werden entsprechende Mengen 1 M Tris-HCl pH 8 vorgelegt und sofort mit den Eluatn gemischt. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wird photometrisch bei 280 nm bestimmt.

3.2.3.2. Kernextrakte (nach Dynan, 1987)

Adhärente Zellen werden auf der Zellkulturschale dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 4°C abgeschabt. Suspensionszellen werden direkt für 5 min bei 600 g im HB4-Rotor abzentrifugiert. Alle folgenden Schritte werden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Zur Entfernung des Kulturmediums werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, anschließend im vierfachen pcv (packed cell volume) in hypotonem Lysispuffer (10 mM NaCl; 10 mM Hepes pH 7,5; 1,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann werden die Zellen mittels eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen. Die Kerne werden abzentrifugiert, nochmals mit hypotonem Lysispuffer gewaschen und dann in Kernextraktionspuffer (420 mM NaCl; 50 mM Hepes pH 7,8; 5 mM MgCl₂; 2 mM DTT; 10% Glycerin; 10% Sucrose) aufgenommen. Die Suspension wird 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min bei 50000 g abzentrifugiert. Der Überstand (nuklearer Extrakt, Kernprotein) wird aliquotiert und bei -70°C aufbewahrt.

3.2.3.3. Glycerin-Dichtegradient

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Sedimentationswert erfolgt über 5 - 25%ige lineare Glycerin-Dichtegradienten. Die Gradienten werden mit einem Gradientenmischer in SW40-Ultrazentrifugenröhrchen gegossen. 750 µl Probe wird in Gradientenpuffer (420 mM oder 150 mM NaCl; 50 mM Hepes pH 7,8; 0,5 mM MgCl₂; 2 mM DTT; 10 mM Na₂S₂O₅) aufgetragen und für 22 h bei 4°C mit 40000 rpm zentrifugiert. Jeder Gradient wird in 13 Aliquote à 1 ml fraktioniert. Ein Teil jeder Fraktion (3 µl) wird im Gel-Retardierungs-Experiment eingesetzt, der Rest wird gefällt (nach Wessel & Flügge, 1984) und in zwei SDS-Gelen aufgetrennt. Eines dieser Gele wird im Immunblot analysiert, das andere wird je nach Proteinmenge entweder mit Silber (nach Wray et al., 1981), oder mit Coomassie (nach Bramhall, 1969) gefärbt.

3.2.3.4. Immunfällungen

Nuklearer Extrakt von ca. 2×10^6 HeLa S3 Zellen (entspricht dem Zehntel einer 145 mm Platte) wird in Gegenwart austitrierter Mengen Antikörper (2 µg hOrc2p-Antikörper; 3 µg hOrc1p-Antikörper) für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend werden 40 µl einer äquilibrierten 50%igen Protein A-Sepharose-Suspension zugegeben und bei 4°C für 1 h gerollt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wird der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Die Präzipitate werden fünfmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2% SDS für 10 min bei 37°C von der Sepharose eluiert. Die Eluate und ein Aliquot der Überstände werden gefällt (Wessel & Flügge, 1984), in Laemmli-Auftragungspuffer aufgenommen und in einem 7,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Weitere Aliquote der Überstände werden in Gel-Retardierungs-Experimenten untersucht.

3.2.3.5. Expression und Reinigung von rekombinantem hOrc1p

Zunächst erfolgt eine TSS-Transformation von 1 ng pRSET-C1-hOrc1p in *E. coli* BL21(DE3)-RIL Zellen (Stratagene). Die Transformanten werden bei RT aufbewahrt. Für die Expression wird 1 Kolonie pro 50 ml LB amp/chl ($c_E(\text{Ampicillin}) = 50 \mu\text{g} / \text{ml}$; $c_E(\text{Chloramphenicol}) = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$) angeimpft und üN bei RT inkubiert. Anschließend wird die Kultur bei 37°C geschüttelt und bei einer OD₅₇₈ von 0,4 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h werden die Bakterien geerntet und für 10 min bei 6000 rpm im GSA-Rotor abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 1/5 des Ausgangsvolumens in ddH₂O aufgenommen, mit Lysozym ($c_E = 0,2 \mu\text{g} / \text{ml}$) versetzt und üN bei -20°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wird die Suspension auf 0,5% Triton X 100 eingestellt und 1 min bei 50 W sonifiziert. Die 'inclusion bodies' werden 10 min bei 15000 rpm im SS34-Rotor abzentrifugiert, in 10 ml ddH₂O aufgenommen und nochmals sonifiziert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min / 15000 rpm / SS34-Rotor) wird das Pellet in 0,2% SDS aufgenommen und

für 10 min bei 80°C gelöst. Ein Aliquot wird mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie (nach Bramhall, 1969) gefärbt.

3.2.3.6. Aufreinigung von 'inclusion bodies' über NiNTA-Agarose

0,2 mg in 0,2% SDS gelöste 'inclusion bodies' (s.o., wobei 200 µl ca. 200 µg rekombinantem Protein entsprechen) werden mit 10 ml Bindungspuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8; 250 mM NaCl; 10 mM Imidazol) verdünnt und so auf eine SDS-Endkonzentration von 4×10^{-6} % eingestellt. Die Proteinlösung wird mit 500 µl äquilibrierter 50%iger NiNTA-Agarose 1 h bei 4°C in einer Minisäule (Biorad Poly-Prep) gerollt. Nach dem Austropfen des Überstands wird die Säule zweimal mit 4 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8; 250 mM NaCl; 20 mM Imidazol) gewaschen, anschließend viermal mit 250 µl Elutionspuffer A (50 mM NaH₂PO₄ pH 8; 250 mM NaCl; 250 mM Imidazol) und danach zweimal mit 250 µl Elutionspuffer B (50 mM NaH₂PO₄ pH 8; 250 mM NaCl; 500 mM Imidazol) eluiert. Aliquote der einzelnen Fraktionen werden nach Wessel & Flügge (1984) gefällt, anschließend mit Laemmli-Auftragspuffer versetzt und im SDS-Gel aufgetrennt.

Bevor die Fraktionen im Gel-Retardierungs-Experiment (vgl. 3.2.5.3.) eingesetzt werden, erfolgt eine Dialyse für 30 min bei 4°C in Gegenwart von 0,1 mg / ml BSA gegen Kernextraktionspuffer (vgl. 3.2.3.2.) unter Verwendung von Schwimmfiltern (Schleicher & Schuell).

3.2.4. Analyse von DNA

3.2.4.1. Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide

Zwei komplementäre Oligonukleotide (je 100 pmol / µl) werden 10 min bei 70°C in einem Thermoblock erhitzt. Anschließend wird der Thermoblock ausgeschaltet und langsam auf RT abgekühlt. Der Ansatz wird in einem 10%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Unter Verwendung einer DC-Plastikfolie (PEI-Cellulose F der Firma Merck) wird die DNA bei 300 nm sichtbar gemacht und die entsprechende Bande ausgeschnitten. Nach mechanischer Zerkleinerung des Polyacrylamidstückes wird die DNA mit 300 µl 0,3 M Ammoniumacetat; 10 mM EDTA üN bei RT eluiert. Anschließend wird das Acrylamid durch Zentrifugation (10 min / 14000 g) pelletiert. Der Überstand wird mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das Pellet wird in TE aufgenommen und die Konzentration der DNA photometrisch bei 260 nm bestimmt.

3.2.4.2. Präparation von genomischer DNA (modifiziert nach Becker et al., 1993)

2×10^7 HeLa S3 Zellen (entspricht einer 145 mm Platte) werden zweimal mit warmen PBS (37°C) gewaschen und anschließend trypsiniert. Alle folgenden Schritte werden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Zellen werden gesammelt, abzentrifugiert (5 min / 600 g / HB4-Rotor), dreimal mit kaltem PBS und anschließend mit 10 ml Puffer A (0,3 M Sucrose; 60 mM KCl, 15 mM NaCl; 60 mM Tris-HCl pH 8; 0,5 mM Spermidin; 0,15 mM Spermin; 0,5 mM EGTA; 2 mM EDTA) gewaschen. Dann werden die Zellen in 5 ml Puffer A aufgenommen, mit 5 ml Puffer A (+ 1% NP40) gemischt und 10 min auf Eis inkubiert, was zur Lyse der Zellen führt. Die Kerne werden mit 10 ml Puffer A (+ 0,5% NP40) gewaschen, vorsichtig in 2,5 ml Puffer B (150 mM NaCl; 5 mM EDTA pH 8) resuspendiert und mit 2,5 ml Puffer C (20 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM NaCl; 20 mM EDTA; 1% SDS) versetzt. Dann wird der Ansatz mit RNase A (100 u / ml) für 1h bei 37°C inkubiert und anschließend üN bei 37°C mit Proteinase K (500 µg / ml) verdaut. Die DNA wird durch eine Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und üN bei RT in TE gelöst. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wird ein Aliquot sonifiziert und photometrisch bei 260 nm vermessen.

3.2.4.3. Radioaktive Markierung von DNA

5'-Endmarkierung mittels T4-Polynukleotidkinase (PNK)

Die zu markierende DNA wird mit einem zehnfachen Überschuss γ (³²P)ATP, 3 µl 10 x PNK-Puffer (700 mM Tris-HCl pH 7,6; 100 mM MgCl₂; 50 mM DTT) und 1 u T4-PNK in einem Reaktionsvolumen von 30 µl 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die freien Nukleotide über eine G25-Sephadex - oder G50-Sephadex Quick SpinTM Column (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers abgetrennt.

Herstellung einseitig markierter DNA-Fragmente

(A) Markierung über 'Polymerase chain reaction'

Einer der in der PCR eingesetzten Primer (13 pmol) wird in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mittels T4-Polynukleotidkinase 5'-endmarkiert. 15 µl des PNK-Ansatzes werden in die PCR-Reaktion (Reaktionsvolumen = 100 µl) eingesetzt, wobei die Zugabe von MgCl₂ im PCR-Ansatz entfällt. Die Bedingungen der PCR für die einzelnen Primerpaare sind in Tabelle 3.1.B aufgelistet. Zur Kontrolle wird 1 µl des PCR-Ansatzes auf einem 8%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel 1 h bei 80°C getrocknet und für 30 min autoradiographiert. Anschließend werden im restlichen Ansatz Primer und freie Nukleotide über eine G-50 Sephadex Quick SpinTM Column (Roche Diagnostics) abgetrennt oder es erfolgt eine

Aufreinigung des Ansatzes unter Anwendung des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen).

(B) Markierung über einen sequenziellen Restriktionsverdau

5 µg Plasmid-DNA (pSK(-)2,8) wird mit Nsi I oder Mlu I (New England Biolabs) verdaut, anschließend wird der Ansatz 1 h mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics) behandelt. Nach einer Phenol-Chloroform Extraktion wird die DNA mit Ethanol gefällt und dann mittels T4-PNK (vgl. 3.2.4.3.) endmarkiert. Die markierte DNA wird nun erneut verdaut (der Nsi I Ansatz mit Mlu I; der Mlu I Ansatz mit Nsi I) und anschließend in einem Agarosegel, welches 0,2 µg / ml Ethidiumbromid enthält, aufgetrennt. Die entsprechende Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten und unter Anwendung des DNA purification Kits (Machery & Nagel) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

3.2.4.4. 'Polymerase chain reaction' (PCR)

Standard PCR-Reaktionen werden in Gegenwart von 200 ng genomischer DNA, je 25 pmol Primer, 0,2 mM dNTPs und 2,5 u RedTAQ™ Polymerase (Sigma) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Template-DNA wird vor der PCR für 4 min bei 94°C denaturiert. Anschließend erfolgt die Reaktion in 30 Zyklen, die jeweils aus einem Denaturierungs- (1 min / 94°C), einem Hybridisierungsschritt (1 min / Temp. siehe Tab. 3.1.D) und einem Synthese-Schritt (1 min / 72°C) bestehen. Nach Beendigung des Programms erfolgt ein weiterer Extensionsschritt für 5 min. Die erhaltenen Produkte werden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Werden Plasmid-DNA oder λ-DNA als Template verwendet, werden je 10 pmol Primer, 0,2 mM dNTPs, 1 u Sawady Taq-Polymerase (Genaxis) oder 2,5 u RedTAQ™-Polymerase (Sigma) und 1 – 2 ng Template-DNA eingesetzt. Die Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte der einzelnen PCR-Zyklen werden auf 20 s verkürzt. Die Dauer der Syntheseschritte ist abhängig von der Größe des jeweiligen Produktes (100 bp / 4 s).

Wird im Ansatz Pfu-Polymerase (Stratagene) verwendet, ergibt sich die Dauer der Elongationsphase aus der Syntheserate der Polymerase, welche bei 400 bp pro min liegt.

3.2.4.5. Quantitative PCR

Quantitative PCR wird im LightCycler Instrument (Roche Diagnostics) durchgeführt. Die Reaktionen werden exakt nach der Bedienungsanleitung (FastStart DNA Master SYBR Green I) ausgeführt. Die Hybridisierungstemperaturen der einzelnen Primerpaare sind in Tabelle 3.1.D angegeben.

3.2.4.6. Sequenzierung von DNA

Doppelsträngige DNA wird mit dem 'Cycle sequencing'-Kit (GATC) nach Anleitung des Herstellers sequenziert. Kontrollreaktionen für DNase-I- oder Benzonase-Schutz-Experimente werden nach dem Protokoll des 'Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit' der Firma USB-Amersham entsprechend den Angaben des Herstellers ausgeführt. Beide Protokolle basieren auf dem von Sanger et al. (1977) entwickelten Kettenabbruchverfahren.

3.2.4.7. Präparation von Plasmid-DNA aus Zellen (nach Hirt, 1969)

Zur Präparation extrachromosomal vorliegender Plasmid DNA aus HeLa Zellen wird eine modifizierte Methode nach Hirt angewendet. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen, trocken gezogen und anschließend mit 1 ml Hirt-Lösung (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,6% SDS) / 100 mm Platte für 20 min bei RT inkubiert. Das Zellysate wird in ein Eppendorffgefäß überführt, auf eine Endkonzentration von 1 M NaCl eingestellt und üN bei 4°C aufbewahrt. Anschließend werden ausgefallene Proteine und zelluläre DNA bei 40000 g für 1 h bei 4°C abzentrifugiert. Nachdem der Überstand 3 h bei 37°C mit Proteinase K (50 µg / ml) verdaut wurde, erfolgt eine Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung bei minimaler SDS-Konzentration. Das DNA/RNA Pellet wird in 100 µl TE resuspendiert, mit RNase A verdaut, noch einmal gefällt und in 10 µl ddH₂O aufgenommen. Mit der DNA werden *E. coli* XL1 blue mittels Elektroporation transformiert.

3.2.5. Analyse von Protein-DNA Wechselwirkungen

3.2.5.1. DNase-I-Schutz-Experiment

Ein Aliquot einer an einem 5'-Ende markierten DNA (1 – 5 ng mit $1 - 2 \times 10^5$ cpm; vgl. 3.2.4.3.) wird mit nuklearem Extrakt (vgl. 3.2.3.2.) in einem Ansatzvolumen von 80 µl unter Bindungsbedingungen (150 mM NaCl; 125 ng BSA / ml; 25 mM Hepes pH 7,8; 1,25 mM MgCl₂; 0,125% Glycerin; 0,125% Sucrose; 2 mM DTT) in Gegenwart von unspezifischer Kompetitor-DNA (32 ng / µl poly(dl-dC):poly(dl-dC)) 30 min auf Eis inkubiert. Ein Ansatz ohne nuklearen Extrakt dient als Kontrolle.

Für die Reaktion wird DNase-I (Roche Diagnostics) (1,5 u für den Kontrollansatz; 3,5 u für Ansätze mit Kernextrakt werden in 50 mM MgCl₂; 10 mM Hepes pH 7,8 verdünnt) in 1 / 10 des Ansatzvolumens (8 µl) vorgelegt. Durch Zugabe des präinkubierten Ansatzes wird die Reaktion gemischt und gestartet. Der Verdau erfolgt für exakt 5 min auf Eis und wird unter Zugabe von 88 µl EDTA - Puffer (20 mM EDTA; 0,6 M Natriumacetat pH 5,2) in flüssigem Stickstoff abgestoppt. Zur Aufreinigung der DNA erfolgt eine Phenol-Chloroform Extraktion. Anschließend wird die DNA zweimal mit Ethanol gefällt, wobei bei der letzten Fällung mit 70% Ethanol

gewaschen wird. Das DNA-Pellet wird in 3 µl Footprint-Auftragspuffer (3 x H₂O : 5 x SP (95% Formamid, 20 mM EDTA; 0,05% Bromphenolblau; 0,05% Xylene Cyanol FF) resuspendiert und über ein Sequenzgel (vgl. 3.2.1.) aufgetrennt. Als Größenmarker wird parallel eine Sequenzreaktion unter Verwendung entsprechender Oligonukleotide aufgetragen.

3.2.5.2. Benzonase-Schutz-Experiment

Prinzipiell werden die Reaktionen analog dem DNase-I-Schutz-Experiment durchgeführt. Die Benzonase (Merck) wird für den Kontrollansatz auf 0,75 u / Reaktion, für Ansätze mit nuklearem Extrakt auf 1,5 u / Reaktion eingestellt.

3.2.5.3. Gel-Retardierungs-Experiment

Als DNA-Substrate werden entweder 5'-endmarkierte komplementäre Oligonukleotide oder aufgereinigte PCR-Produkte verwendet. Ein Aliquot der markierten DNA (0,1 pmol mit $2 - 5 \times 10^4$ cpm) wird mit 1 µg nuklearem Extrakt unter Bindungsbedingungen (120 mM NaCl; 25 mM Hepes pH 7,8; 1,25 mM MgCl₂; 2,5% Glycerin; 2,5% Sucrose; 0,5 mM DTT; 125 ng BSA / µl; 50 ng / µl poly(dI-dC): poly(dIdC)) in einem Ansatzvolumen von 30 µl inkubiert. Für Kompetitions-experimente wird ein entsprechender Überschuss an nicht markierter DNA (10 – 200 fach) eingesetzt. Als unspezifische Kompetitor-DNA wird ein PCR-Produkt über die 'multiple cloning site' von pSK (-) Bluescript verwendet, welches je nach Länge des DNA-Substrats mit Restriktionsenzymen auf die entsprechenden Größen verdaut wird.

Die Bindungsreaktion erfolgt für 30 min auf Eis und wird nach Zugabe von 3 µl 10 x 'Band shift' Puffer (30% Glycerin; 10 mM Hepes pH 7,8; 0,05% Bromphenolblau; 0,05% Xylene Cyanol FF) über ein 10%iges natives Polyacrylamidgel (vgl. 3.2.1.) aufgetrennt. Werden als DNA-Substrat PCR-Produkte größer 100 bp verwendet, erfolgt die Auftrennung über ein 5% Polyacrylamid : 4% Bisacrylamid - Gel. Nach dem Lauf (20 min 150 V dann 300 V) wird das Gel getrocknet und autoradiographiert.

3.2.5.4. Bindungsexperimente mit Membran-fixierten Proteinen

('South-Western' Experiment)

(A) Identifizierung von fp6-bindenden Proteinen

150 µg nukleare Proteine werden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und üN auf eine PVDF-Membran transferiert (20 V, Biorad Transblot Cell). Als Transferpuffer wird 25 mM Tris-HCl; 190 mM Glycin; 10% Methanol verwendet. Zur Kennzeichnung der Molekulargewichtsmarker wird die Membran mit Ponceau-S (0,2% in 5% Essigsäure) angefärbt. Für eine partielle Renaturierung der fixierten Proteine wird die Membran in Bindungspuffer (80 mM NaCl; 20 mM Hepes pH 7,8;

1 mM EDTA; 10 mM β -Mercaptoethanol; 10% Glycerin) gewaschen und anschließend zur Absättigung unspezifischer Proteinbindestellen für 1 h in Bindungspuffer mit 5% Milchpulver inkubiert. Die Protein-DNA-Bindung erfolgt für 1,5 h bei RT unter leichtem Schütteln in Bindungspuffer mit 0,5% Milchpulver unter Zugabe von 0,2 pmol 5'-endmarkiertem doppelsträngigem fp6-Oligonukleotid / ml ($0,5 \times 10^5$ cpm / ml). Um unspezifische Protein-DNA-Bindungen abzusättigen wird *E. coli*-Kompetitor-DNA in 1000-fachem Überschuss verwendet.

Kompetitionsexperimente werden mit einem Überschuss an nicht markierter DNA durchgeführt, wobei doppelsträngiges fp5-Oligonukleotid als unspezifischer Kompetitor dient.

Nach erfolgter Bindung wird die Membran mehrmals mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis keine Hintergrundstrahlung mehr nachweisbar ist. Signale werden auf der getrockneten Membran über eine Autoradiographie sichtbar gemacht.

(B) Bindestudien mit rekombinatem hOrc1p

0,5 μ g his-hOrc1p, his-hMcm5p sowie BSA werden auf einem 7,5%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (Towbin et al., 1979). Die Molekulargewichtsmarker werden mittels einer Ponceau-S Färbung sichtbar gemacht und gekennzeichnet. Anschließend wird die Membran mit TNT (150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,05% Tween 20) entfärbt und in 'South-Western'-Puffer (50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA) gewaschen. Nun wird die Membran für 10 min in 'South-Western'-Puffer mit 6 M Guanidinium Hydrochlorid inkubiert. Anschließend werden die fixierten Proteine durch zehnmalige Zugabe eines gleichen Volumens an 'South-Western'-Puffer renaturiert, wobei jeder Verdünnungsschritt für 10 min unter Schütteln erfolgt. Nachdem unspezifische Proteinbindestellen durch Inkubation der Membran für 1 h in 'South-Western'-Puffer mit 5% Milchpulver abgesättigt wurden, erfolgt die Protein-DNA-Bindung. Dazu wird die Membran für 1 h mit 1 ng ($0,2 \times 10^5$ cpm) 5'-endmarkierter DNA / ml und ggf. mit einem Überschuss an *E. coli*-Kompetitor-DNA in 'South-Western'-Puffer mit 0,5% Milchpulver unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wird mehrmals mit dem gleichen Puffer gewaschen, getrocknet und dann autoradiographiert.

3.2.5.5. 'Screenen' einer λ -Expressionsbibliothek über eine spezifische Protein-DNA Wechselwirkung

Ca. 3×10^6 Plaques einer HeLa-cDNA-Bibliothek (Lambda Uni-ZapTM XR / Stratagene) wurden auf die Expression eines spezifischen fp6-bindenden Proteins hin untersucht. Das Ausplattieren sowie die Bestimmung des Titers der Phagenbibliothek erfolgt nach Angaben des Herstellers. Nach dem Ausplattieren der mit λ -Phagen infizierten Bakterien ($2,5 \times 10^4$ pfu / 145 mm Agarplatte) werden nach einer Infektionsphase (4 h / 42°C) Filterabdrücke hergestellt. Die in 10 mM IPTG

getränkten Nitrozellulosefilter (NC-Filter, BA85, Schleicher und Schuell) werden für 4 h bei 37°C aufgelegt, anschließend wird ein weiterer deckungsgleicher Abdruck (4 h / 37°C) erstellt. Die Filter werden dann wie im 'South-Western'-Experiment beschrieben (3.2.5.4.A) weiterbehandelt. Als spezifische DNA-Probe wird doppelsträngiges 5'-endmarkiertes fp6-Oligonukleotid (2 pmol / ml; 1×10^6 cpm / ml) in Gegenwart von *E. coli*-Kompetitor DNA (1 µg / ml) eingesetzt.

Positive Plaques werden über weitere 'Screening'-Runden gereinigt und in Konkurrenzexperimenten auf Spezifität getestet. Dazu werden die Filter geteilt, wobei in der Bindungsreaktion entweder nicht markierte DNA als spezifischer Kompetitor oder doppelsträngiges fp5-Oligonukleotid als unspezifische Kompetitor-DNA in 5-, 10- oder 20-fachem Überschuss eingesetzt wird.

Die spezifischen pBluescript-Phagemide werden nach Angaben des Herstellers über das Ex-Assist/SolR-System (Stratagene) aus den gereinigten λ-Phagen ausgeschnitten. Die nun als pBluescript-Plasmid DNA vorliegende HeLa-cDNA wird präpariert, sequenziert (vgl. 3.2.4.6.) und über einen Sequenzvergleich (BLASTN nach Altschul et al., 1990) mit entsprechenden Datenbanken (NCBI Datenbank) identifiziert.

3.2.5.5. 'in vivo-crosslinking' (nach Göhring et al., 1997)

HeLa S3 Zellen werden auf 145 mm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. Die Zellen werden auf der Petrischale zweimal mit PBS (37°C) gewaschen und anschließend für 4 min bei 37°C mit 1% Formaldehyd, das kurz zuvor in Medium verdünnt wurde, behandelt. Nachdem das Formaldehyd durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS entfernt wurde, werden die Zellen von den Platten abgeschabt und 5 min bei 600 g im HB4-Rotor abzentrifugiert. Die Zellen werden weitere zweimal mit kaltem PBS gewaschen, dann in RSB Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8; 3 mM MgCl₂) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen mittels eines Dounce-Homogenisators aufgeschlossen. Die Kerne werden abzentrifugiert und zweimal mit RSB Puffer und einmal mit SNSB Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 M NaCl, 1 mM EDTA; 0,1% NP40) gewaschen. Die Nukleoproteine werden in NSB Puffer (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% NP40) resuspendiert und über einen CsCl-Stufengradienten (1,75 g CsCl / ml; 1,5 g CsCl / ml; 1,3 g CsCl / ml in 20 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA; 0,5% Na-Sarcosyl) aufgereinigt. Nach der Zentrifugation (24 h / 18°C / 37000 rpm / SW40-Rotor) wird die Nukleoproteinfraktion bei einer Dichte von etwa 1,35 g CsCl / ml gesammelt, ün gegen TE dialysiert und anschließend sonifiziert (6 x 10 Pulse à 50 W). Die Konzentration des präparierten Nukleoproteins wird photometrisch bei 260 nm bestimmt, auf 2 µg / µl TE, 3 mM CaCl₂ eingestellt und mit *Micrococcus* Nuklease (MNase) verdaut. Der Verdau erfolgt für 15 min bei 37°C, wobei 1 u MNase für 100 µg Nukleoprotein eingesetzt

wird. Die Reaktion wird durch Zugabe von EDTA ($c_E = 20 \text{ mM}$) abgestoppt. Alle Puffer enthalten $10 \text{ mM Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ als Proteaseinhibitor.

3.2.5.6. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP-Assay)

Sämtliche Immunpräzipitationen werden in NET Puffer (50 mM Tris-HCl , $\text{pH } 7,4$; 150 mM NaCl ; 5 mM EDTA ; $0,5\% \text{ NP40}$) durchgeführt. Zur Abtrennung von ausgefallenem Material werden die Ansätze 10 min bei 15000 g abzentrifugiert. Die Überstände (1 mg pro Ansatz) werden für 2 h mit entsprechenden Antikörpern ($15 \text{ }\mu\text{g hOrc1p}$ -Antikörper, $10 \text{ }\mu\text{g hOrc2p}$ -Antikörper, $10 \text{ }\mu\text{g hMcm3p}$ -Antikörper oder $15 \text{ }\mu\text{g}$ Kontroll IgG) bei RT inkubiert und anschließend für 2 h mit $40 \text{ }\mu\text{l}$ 50% iger Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia) gerollt. Die Immunkomplexe werden achtmal mit RIPA (10 mM Tris-HCl $\text{pH } 8$; 140 mM NaCl ; $1\% \text{ NP40}$; $0,1\% \text{ SDS}$; $0,5\% \text{ DOC}$), dreimal mit LiCl - Puffer (10 mM Tris-HCl $\text{pH } 8$; 250 mM LiCl ; $0,5\% \text{ NP40}$; $0,5\% \text{ DOC}$; 1 mM EDTA) und fünfmal mit TE gewaschen. Bei jedem Wechsel der Waschpuffer wird die Protein A-Sepharose in ein neues Eppendorffreaktionsgefäß überführt.

Für die Präparation von Proteinen (Western-Blot-Analyse) und DNA (PCR-Analyse) werden die Präzipitate aufgeteilt. Ein Teil wird mit $200 \text{ }\mu\text{l}$ $2\% \text{ SDS}$ von der Protein A-Sepharose eluiert ($10 \text{ min} / 37^\circ\text{C}$), 30 min bei 65°C inkubiert und anschließend wird eine Proteinfällung nach Wessel und Flügge (1984) durchgeführt. Die gefällten Proteine werden 20 min bei 65°C in $22,5 \text{ }\mu\text{l}$ $2\% \text{ SDS}$ gelöst, dann mit $2,5 \text{ }\mu\text{l}$ $10 \times$ Laemmli-Ergänzungspuffer (100 mM Tris-HCl ; $50\% \text{ Mercaptoethanol}$; $0,05\% \text{ Bromphenolblau}$) versetzt, weitere 10 min bei 80°C inkubiert und anschließend im SDS-Gel aufgetrennt.

Zur Präparation von DNA erfolgt eine weitere Aufreinigung der Immunkomplexe. Die Protein A-Sepharose wird üN bei 4°C in TE inkubiert und anschließend werden alle oben beschriebenen Waschschrte wiederholt. Die Immunkomplexe werden durch zweimalige Inkubation mit $50 \text{ }\mu\text{l TE}$; $1\% \text{ SDS}$ eluiert ($10 \text{ min} / 37^\circ\text{C}$) und üN mit Proteinase K ($200 \text{ }\mu\text{g} / \text{ml}$) bei 37°C verdaut. Aufgereinigt wird die DNA über eine Phenol-Chloroform Extraktion und anschließend mit Ethanol bei minimaler SDS Konzentration präzipitiert. Das Pellet (ca. $5 - 10 \text{ ng DNA}$) wird in $40 \text{ }\mu\text{l ddH}_2\text{O}$ aufgenommen. $1 / 5$ der Probe wird für Standard-PCR-Reaktionen, $1 / 20$ in Reaktionen für die Quantifizierung im LightCycler (Roche Diagnostics) eingesetzt.

3.2.5.7. 'in vivo footprinting'-Experimente

2×10^7 HeLa S3 Zellen oder 3×10^6 NHDF Zellen (entspricht jeweils einer 145 mm Platte) werden mit $0,1\% \text{ DMS}$ (Fluka) in gepuffertem Medium für 5 min inkubiert. Die Methylierungsreaktion wird durch dreimaliges Waschen mit PBS abgestoppt. Anschließend wird die genomische DNA unter Vermeidung von Scherkräften, wie in 3.2.4.2. beschrieben, präpariert. Für die Kontrollreaktionen wird eine G-Reaktion

nach Maxam & Gilbert (1977) mit genomischer DNA aus unbehandelten Zellen durchgeführt. Die Spaltung der DNA an den methylierten Basen erfolgt durch Inkubation mit Piperidin ($c_E = 1 \text{ M}$) für 30 min bei 90°C . Anschließend wird die gespaltene DNA mit Ethanol präzipitiert. Das Pellet wird in $50 \mu\text{l}$ ddH₂O aufgenommen, in ein frisches Eppendorffreaktionsgefäß überführt und 1 h in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur vollständigen Abtrennung des Piperidins wird dieser Vorgang dreimal wiederholt, wobei der letzte Zentrifugationsschritt üN durchgeführt wird. Das Pellet wird in TE resuspendiert und auf eine DNA-Konzentration von $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Da Piperidin die Aktivität von DNA-Polymerasen hemmt, wird ein Aliquot der DNA (200 ng) in einer PCR-Reaktion getestet.

Die DNA wird nun mittels 'ligation-mediated'-PCR (LM-PCR) nach einem modifizierten Protokoll von Quivy & Becker (1993) analysiert. Modifiziert deshalb, da auf die Verwendung von magnetischen Beads (Dynal) verzichtet wurde. Der Ablauf der einzelnen Schritte ist in Abb. 3.1. dargestellt. Die verwendeten Oligonukleotide und die jeweiligen Hybridisierungstemperaturen sind in Tabelle 3.1.C angegeben. Sequenzreaktionen wurden mit den entsprechenden Primern wie in 3.2.4.6. beschrieben durchgeführt und analysiert.

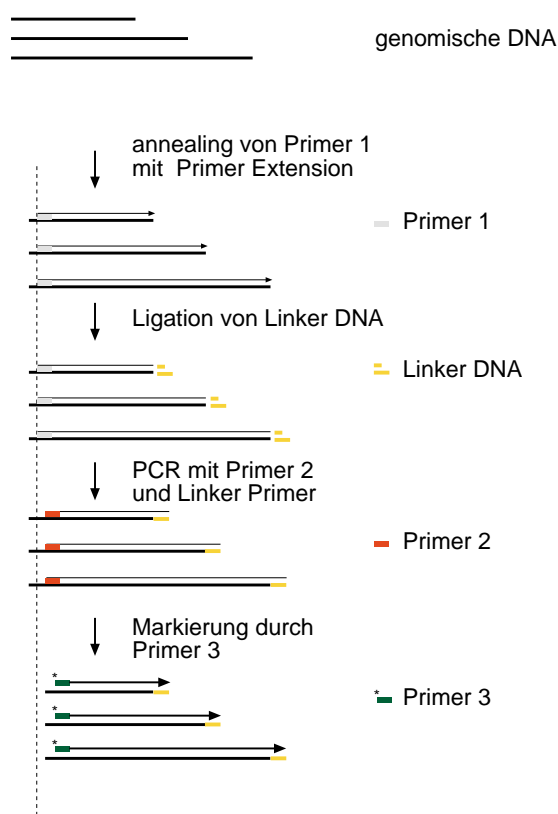


Abb. 3.1. Schematische Darstellung der LM-PCR bei 'in vivo footprinting'-Experimenten

An denaturierte genomische DNA ($0,5 \mu\text{g}$) wird bei einer geeigneten Hybridisierungstemperatur ein Primer A annealt und anschließend mit der Vent^{exo}-Polymerase eine 'Primer Extension'-Reaktion durchgeführt. An die so entstehenden 'blunt ends' werden doppelsträngige 'Linker'-DNAs ligiert. Zur Amplifikation des modifizierten Templates wird eine PCR-Reaktion (14 Zyklen) unter Verwendung von einem Linker-Primer und einem Primer B durchgeführt. Die Markierung der amplifizierten DNA erfolgt nun durch eine erneute 'Primer Extension' Reaktion mit einem 5'-endmarkierten radioaktiven Primer C. Um eine spezifische Amplifikation der jeweiligen Sequenzen zu erreichen, sollten die Primer A, B und C so gewählt sein, dass sie im 3'-Bereich überlappen und steigende Hybridisierungstemperaturen besitzen.

4. Ergebnisse

4.1. Protein-DNA Interaktionen am MCM4-Genpromoter

4.1.1. Sequenzierung und Struktur des MCM4-Promoters

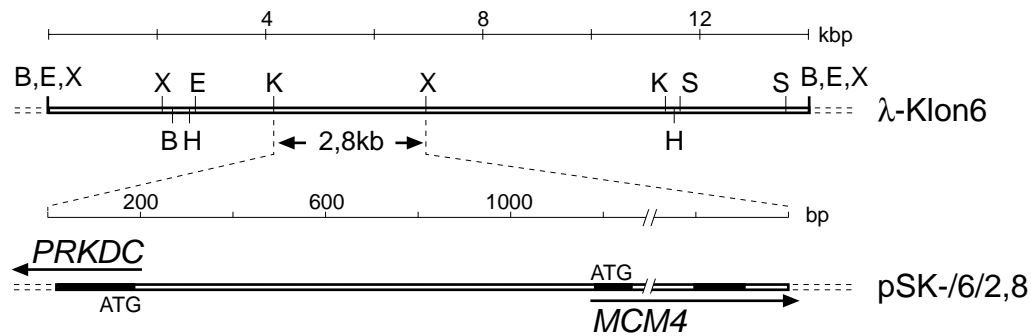
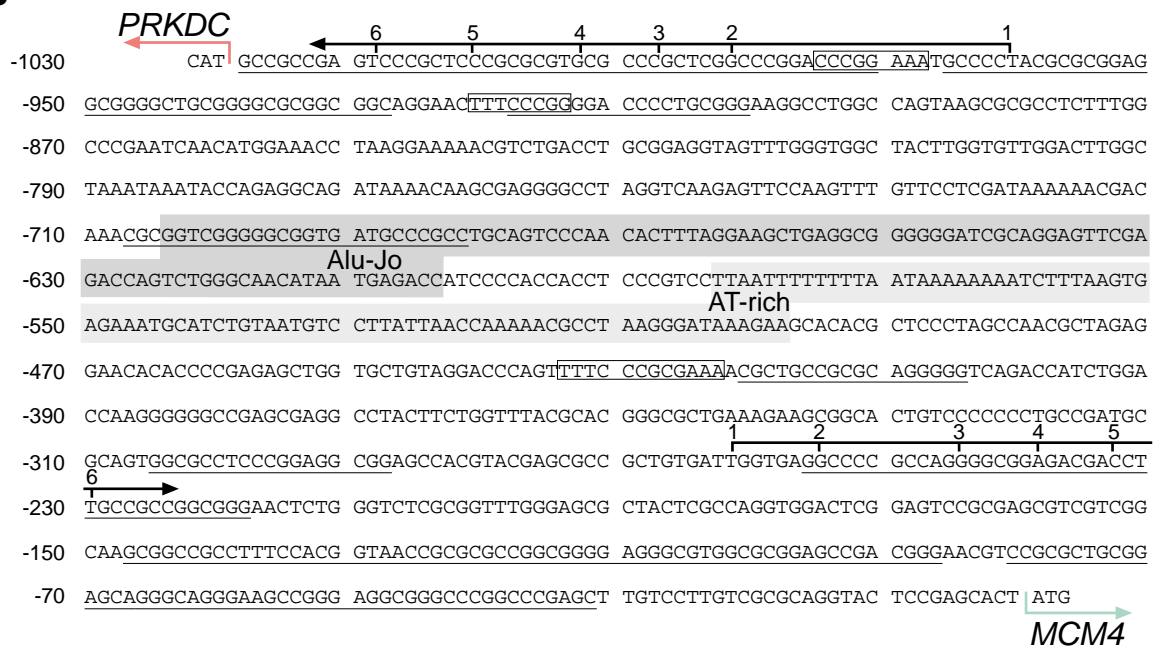
Um Hinweise auf die transkriptionelle Regulation der humanen MCM-Gene zu erhalten, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Promoter des *MCM4*-Gens untersucht werden. Während meiner Diplomarbeit isolierte ich einen Phagenklon, der homologe Bereiche zu codierenden Abschnitten des *MCM4*-Gens enthält. Das genomische Fragment dieses Klons wurde durch eine Restriktionskartierung näher charakterisiert (siehe Abb. 4.1A oben). Weitere Analysen ergaben, dass ein zentrales Kpn I - Xba I Subfragment die codierende Sequenz des 5'-Bereichs des *MCM4*-Gens enthält. Die in der Diplomarbeit bestimmte Sequenz repräsentiert 574 bp des 5'-nichttranslatierten Bereichs und das Initiationscodon mit einem 70 bp langen offenen Leseraster, dem ein Intron folgt.

In dieser Arbeit wurde die Sequenz des Kpn I - Xba I Subfragmentes zwischen dem Initiationscodon und der Kpn I Schnittstelle vervollständigt (Abb. 4.1A). Durch einen Sequenzvergleich mit der NCBI-Datenbank zeigte sich, dass 1027 bp stromaufwärts vom Translationsstart des *MCM4*-Gens der Translationsstart eines weiteren Gens (*PRKDC*, Abb. 4.1) lokalisiert ist, das für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein Kinase (DNA-PKcs) codiert. Demnach handelt es sich um zwei divergent transkribierte Gene, die Kopf an Kopf angeordnet sind.

Die gesamte intergenische Region ist sehr GC-reich (63%), wobei der zentrale Bereich durch eine 86 bp lange AT-reiche Sequenz (Nukleotid -498 bis -583) und ein Teilfragment eines Alu-Jo repetitiven Elementes gekennzeichnet ist (Nukleotid -604 bis -704) (Abb. 4.1B).

Das *MCM4*- und das *PRKDC*-Gen besitzen die typischen Merkmale von Haushaltsgenen (nach Dynan, 1986), da die Promotoren keine funktionellen TATA-Boxen aufweisen (siehe 4.1.2.) und, bedingt durch den hohen GC-Gehalt, zahlreiche Bindestellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 haben. Unterstützt wird diese These durch Arbeiten von Connelly et al. (1998), die zeigen, dass beide Gene von multiplen Transkriptionsstartstellen (Abb. 4.1B) transkribiert werden. Zudem zeigten die Autoren (Connelly et al. ,1998), dass beide Gene divergent transkribiert werden und unabhängig voneinander reguliert sind.

Weitere Sequenzanalysen ergaben, dass beide Promotoren Bindemotive für E2F-Proteine besitzen. In Hinblick auf die Zellzyklus-abhängige Regulation der MCM-Genexpression ist das identifizierte E2F-Bindemotiv im *MCM4*-Promoter (Nukleotid -423 bis -434) von besonderem Interesse.

A**B****Abb. 4.1** Die Struktur des MCM4-Genpromoters

(A) Oben: Restriktionskarte eines genomischen Fragmentes eines λ -Phagen DASH II Vektors (Klon6, siehe Diplomarbeit, 1996). B, BamH I; E, EcoR I; H, Hind III; K, Kpn I; S, Sma I; X, Xba I.

Unten: Sequenzierte Bereiche (Accession No U90415). Schwarze Boxen repräsentieren codierende Bereiche: Die mit ATG (Initiationscodon) gekennzeichnete Box zeigt die Codons 1 - 23 des *MCM4*-Gens, die rechte Box repräsentiert ein Exon mit den Codons 166 - 199. Die Sequenz zwischen den beiden Exons wurde nicht bestimmt. Sequenzvergleiche wurden mit der *MCM4*-cDNA (Accession No X74794) oder mit der cDNA der DNA-PKcs (Accession No U47077) durchgeführt. Die Pfeile geben die Richtung der Transkription an.

(B) Die intergenische Region zwischen dem *MCM4*-Gen und dem Gen der DNA-PKcs.

Die translationalen Startcodons der beiden divergenten Gene sind durch graue Pfeile hervorgehoben. Die multiplen Transkriptionsstartpunkte (schwarze, horizontale Pfeile mit Nummern) wurden von Connelly et al. (1998) bestimmt. Grau schattiert ist ein Teil eines Alu-Jo repetitiven Elementes sowie eine zentrale AT-reiche Region. Unterstrichene Bereiche zeichnen sich durch einen hohen GC-Anteil aus. Eingerahmte Sequenzen stellen Bindemotive für den Transkriptionsfaktor E2F dar.

4.1.2. Identifizierung von Proteinbindestellen durch DNase-I-Schutz-Experimente

Zur Identifizierung von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im MCM4-Promoter wurden zur näheren Charakterisierung DNase-I-Schutz-Experimente durchgeführt. Dabei wurde nuklearer Extrakt von proliferierenden HeLa S3 Zellen unter Bindungsbedingungen (vgl. 3.2.5.1.) in Gegenwart von radioaktiv markierten Promoter DNA-Fragmenten inkubiert. Zur Vermeidung unspezifischer Protein-DNA Wechselwirkungen wurde die Reaktion in Gegenwart von poly(dI-dC):poly(dI-dC) durchgeführt. Um die gesamte Promoterregion im DNase-I-Schutz-Experiment zu untersuchen, wurden drei verschiedene einseitig markierte DNA-Fragmente verwendet, die wie in Abb. 4.2 dargestellt präpariert wurden.

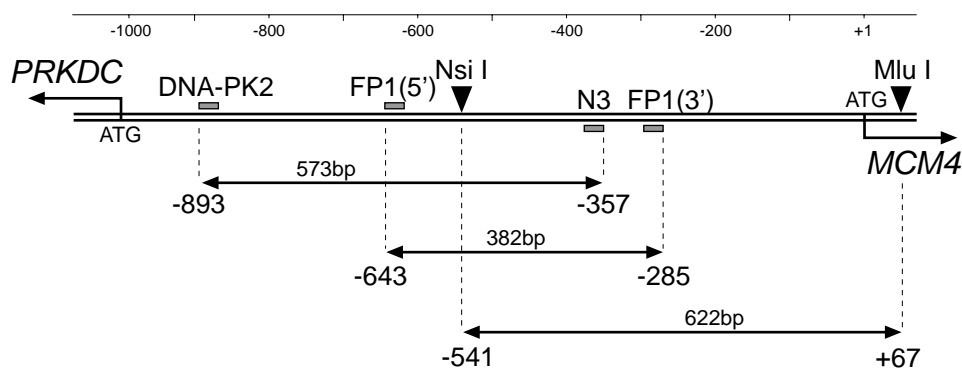


Abb. 4.2 Schematische Darstellung der markierten Promoter-DNA-Fragmente.

Zur Markierung des transkribierten Stranges wurde das Plasmid pSK-/6/2,8 (siehe Diplomarbeit, 1996) mit Mlu I an der Position +67 (relativ zum Adenosinrest im Initiationscodon ATG) geschnitten, 5'-endmarkiert und anschließend mit Nsi I (-541) verdaut. Zur Markierung des komplementären Strangs wurde der Plasmid-Klon zunächst mit Nsi I geschnitten, markiert und dann mit Mlu I behandelt. Zwei weitere Promoterfragmente wurden über PCR hergestellt (vgl. 3.2.4.3.). Das eine Primerpaar (Fp1(5'); Fp1(3')) deckt einen Bereich zwischen -643 und -262 ab, das andere Primerpaar (DNA-PK2; N3) liegt weiter stromaufwärts zwischen den Nukleotiden -893 und -357. Auch hier wurde sowohl der codogene als auch der nicht-codogene Strang markiert.

Die Protein-DNA Komplexe, welche sich unter diesen Bedingungen ausbilden, wurden mit DNase-I behandelt und auf einem Sequenzgel analysiert. Wie in Abb. 4.3 und Abb. 4.4 gezeigt, enthalten nukleare Extrakte aus HeLa Zellen Proteine, die an sechs DNA-Bereiche im MCM4-Promoter binden und diese vor DNase-I-Abbau schützen. Diese Regionen sind mit fp (footprint) 1 bis 6 gekennzeichnet. Fünf der geschützten Sequenzen (fp1, fp2, fp3, fp4 und fp5) weisen charakteristische DNase-I-hypersensitive Bereiche in den Randregionen auf (Pfeile).

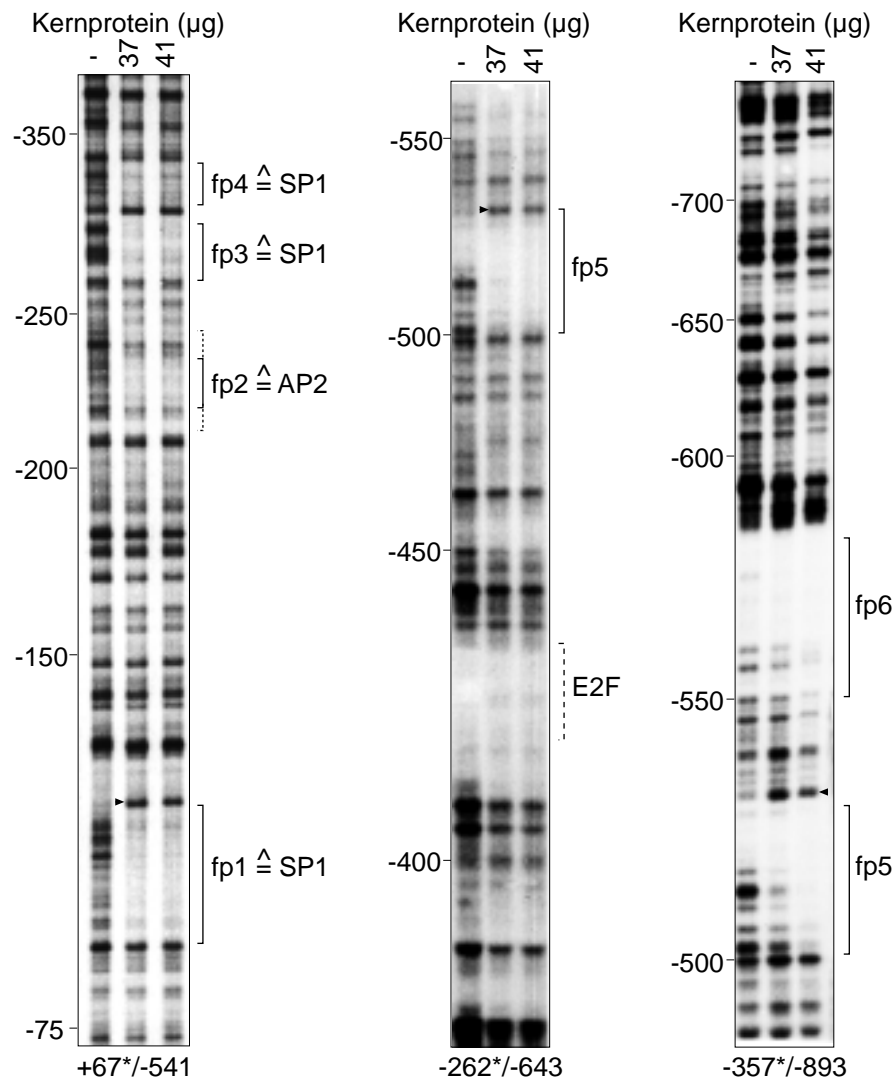


Abb. 4.3 Der codogene Strang des MCM4-Genpromoters im DNase-I-Schutz-Experiment.

Links: Markierte Promoter Fragmente +67*/-541, -357*/-893 und -643*/-262 (Bezeichnung entspricht dem Abstand zum Translationsstart des *MCM4*-Gens) wurden mit oder ohne Kernproteine inkubiert und mit DNase-I behandelt. Die Auftrennung auf einem Sequenzgel ergab sechs geschützte Regionen die mit fp1 - fp6 gekennzeichnet sind. DNase-I-hypersensitive Sequenzen sind durch Pfeile markiert. Die Positionen der geschützten Regionen wurden durch paralleles Auftragen einer Sequenzreaktion (nicht gezeigt) bestimmt.

Die Ergebnisse der DNase-I-Schutz-Experimente sind in Abb. 4.5A zusammengefasst. Die sechs identifizierten Binderegionen (fp1 - fp6) im MCM4-Genpromoter sind durch Boxen hervorgehoben. Aufgrund der Größe der untersuchten DNA-Fragmente war es nicht möglich, die exakten Sequenzabschnitte der geschützten Regionen auf beiden DNA-Strängen zu bestimmen. So entsprechen die Boxen für fp1, fp2, fp5 und fp6 den 'footprints' auf dem codogenen Strang, die Regionen fp3 und fp4 wurden aus dem nicht-codogenen Strang ermittelt.

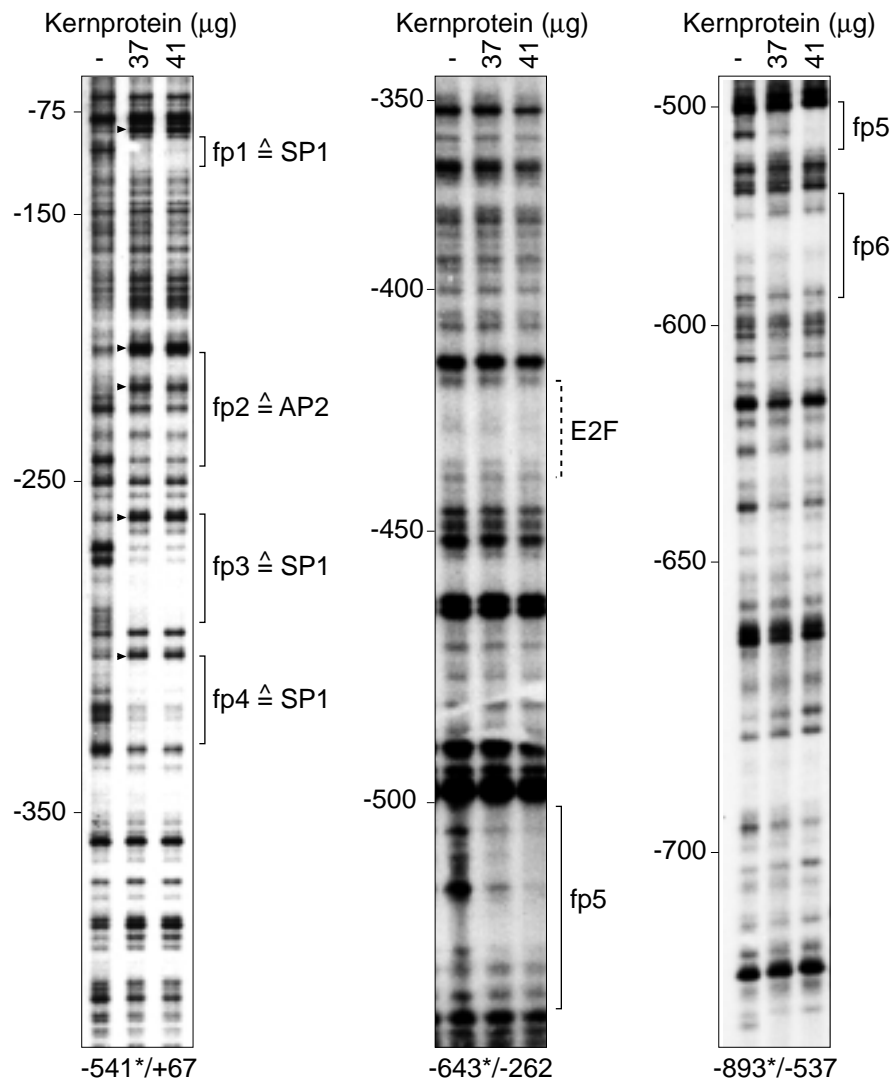


Abb. 4.4 Der nicht-codogene Strang des MCM4-Genpromoters im DNase-I-Schutz-Experiment.

Die Experimente wurden wie in Fig.2 beschrieben durchgeführt. Links: DNase-I-Schutz-Experiment unter Verwendung eines DNA-Fragmentes von -541* bis +64. Mitte: Dasselbe Experiment mit einem PCR-amplifizierten, markierten DNA Fragment, welches der Sequenz -643* bis -262 des MCM4-Genpromoters entspricht. Rechts: 'Footprint'-Experiment mit einem markierten DNA-Fragment von -893* bis -357.

Unter Verwendung der Programme Matinspector V2.2 und HUSAR / EMBL / GenBank wurden die geschützten Sequenzen mit Konsensussequenzen bekannter Transkriptionsfaktoren verglichen. Die GC-reichen Bereiche fp1, fp3 und fp4 beinhalten Bindemotive für den Transkriptionsfaktor Sp1, wobei die fp4-Sequenz um ein Nukleotid von der Konsensussequenz ($\text{G}^{\text{G}}/\text{T}^{\text{A}}\text{GGC}^{\text{G}}/\text{T}^{\text{G}}/\text{A}^{\text{G}}/\text{A}^{\text{G}}/\text{T}$) (Kadonaga et al., 1987) abweicht. fp2 enthält das Sequenzmotiv 5'-GCCNNGGC-3' und könnte somit als Bindestelle für den Transkriptionsfaktor AP2 (Mitchell et al., 1987) dienen. Die AT-reichen geschützten Sequenzen fp5 und fp6 weisen keine signifikanten Homologien zu Bindemotiven bekannter Transkriptionsfaktoren auf. Innerhalb des Sequenzmotivs von fp6 findet sich die Konsensussequenz des TATA-

Bindeproteins, jedoch ist eine Bindung aufgrund des Abstands (310 bp) zum Transkriptionsstart unwahrscheinlich. fp5 hat Ähnlichkeiten mit Promotersequenzen, die eine Affinität zu dem Transkriptionsfaktor GATA-1 aufweisen.

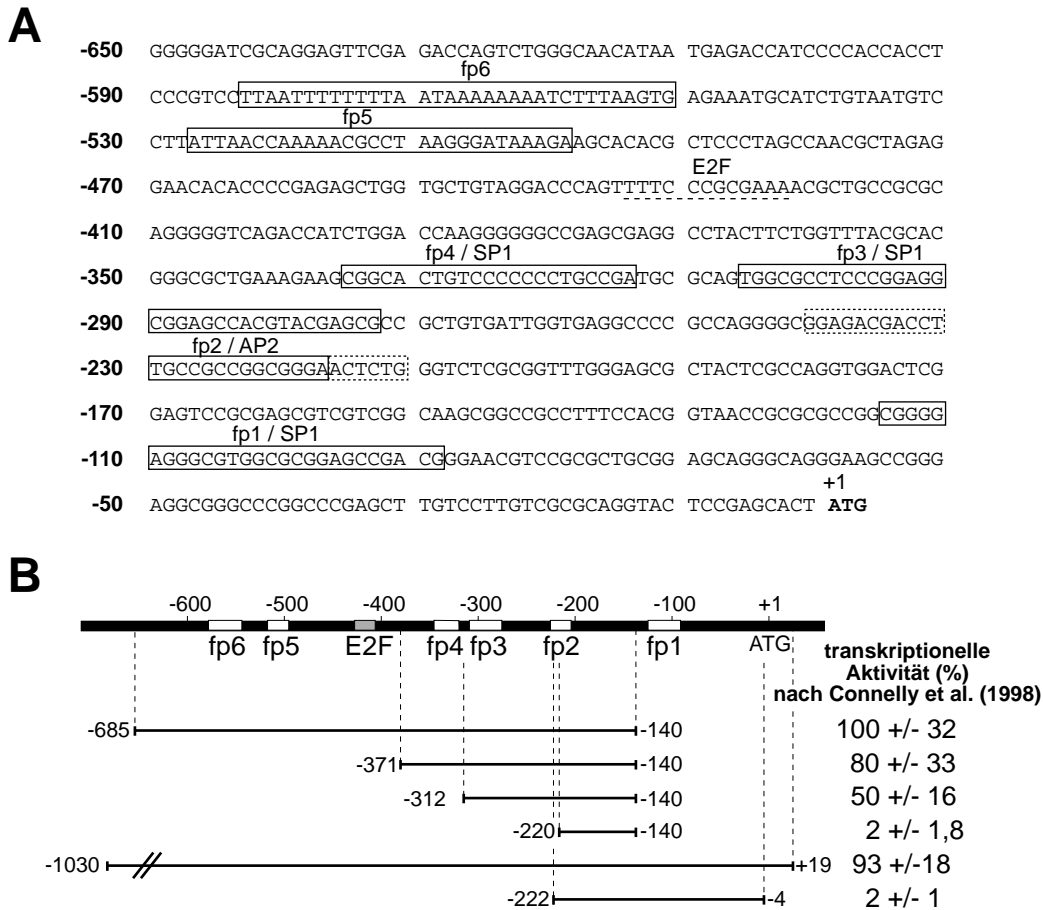


Abb. 4.5 DNase-I-Schutz-Experimente ergeben sechs geschützte Bereiche im MCM4-Promoter.

(A) Sequenz des MCM4-Promoters. Das Initiationscodon ist in Fettdruck hervorgehoben. DNase-I-geschützte Regionen sind durch Boxen gekennzeichnet. Bindemotive für den Transkriptionsfaktor E2F sind unterstrichen.

(B) Transfektionsstudien nach Connelly et al. (1998). Der Promoter ist als dicke Linie dargestellt. Die weißen Boxen zeigen Bereiche geschützter Sequenzen, die graue Box stellt die mögliche E2F-Bindestelle dar. Die horizontalen Linien unterhalb des Promoters zeigen verkürzte Promoter-Konstrukte (Connelly et al., 1998). Die Zahlen geben die Promoteraktivität der jeweiligen Konstrukte an, welche durch Transfektionsstudien ermittelt wurden. Zur Bestimmung der Aktivität wurden die Promotersequenzen an ein Luciferase-Reporter gen fusioniert und anschließend transfiziert (Connelly et al., 1998).

Connelly et al. (1998) führten Transfektionsstudien mit Konstrukten aus verkürzten Promotersequenzen und dem Reporter gen Luciferase in asynchron proliferierenden HeLa Zellen durch. Die bei diesen Arbeiten ermittelten Daten ermöglichen einen direkten Vergleich zwischen den Aktivitätsraten verschiedener Promoterfragmente und den identifizierten Binderegionen, weshalb eine Einschränkung auf

wichtige regulatorische Bereiche erfolgen kann. Aufgrund der Untersuchungen von Connelly et al. (1998) kann gezeigt werden, dass Regionen, welche fp2, fp3 und fp4 einschließen, essenziell für die MCM4-Genexpression sind, da entsprechende Deletionen zu einer drastischen Abnahme der Promoteraktivität führen (Abb. 4.5B). Konstrukte, die sowohl das potenzielle E2F-Bindemotiv als auch die fp5 / fp6 Regionen tragen, zeigen eine um ca. 20 Prozent geringere Aktivität gegenüber den maximalen Expressionsraten. Somit scheinen die AT-reichen Regionen fp5 und fp6 keinen signifikanten Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des MCM4-Promoters zu besitzen (Abb. 4.5B).

Die Arbeiten von Connelly et al. (1998) bestätigen jedoch die Relevanz der identifizierten Binderegionen fp2, fp3 und fp4 in Hinblick auf die Regulation der MCM4-Genexpression in HeLa Zellen. Demnach scheint diese weitgehend von den Transkriptionsfaktoren Sp1 und AP2 abhängig zu sein.

4.1.3. Benzonase-Schutz-Experimente zum Nachweis einer Bindung von E2F-Proteinen an den MCM4-Promoter

Da durch die unter 3.1.2. beschriebenen Experimente keine Proteinbindung an die E2F-Sequenz im MCM4-Promoter nachgewiesen werden konnte, wurden die Schutz-Experimente unter Verwendung der extrazellulären Endonuklease von *Serratia marcescens* (kommerziell unter dem Namen 'Benzonase' erhältlich) wiederholt. Dieser Ansatz resultierte aus der Beobachtung, dass das GC-reiche E2F-Bindemotiv DNase-I-resistent zu sein scheint (siehe Abb. 4.3 und Abb. 4.4). Demnach wäre eine Bindung von Proteinen an diesen Bereich nicht nachweisbar, da keine Schnittstellen innerhalb der Region vorliegen. Dieses Problem sollte unter Verwendung von Benzonase vermieden werden, da diese Endonuklease eine Schnittpräferenz für GC-Nukleotide besitzt (Meiss et al., 1995). Tatsächlich tauchen im Versuch Schnittstellen innerhalb des E2F-Motivs auf, jedoch zeigt der limitierte Verdau mit Benzonase keinen geschützten Bereich über der E2F-Sequenz (Abb. 4.6). Allerdings ist anzumerken, dass die fp5 Region einen weniger ausgeprägten 'footprint' zeigt, als bei den DNase-I-Schutz-Experimenten. Dies könnte auf die Behandlung mit der Nuklease Benzonase zurückzuführen sein. Deshalb sollte die aus diesem Experiment resultierende Feststellung, dass keine Interaktionen von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie mit dem MCM4-Promoter stattfinden, durch weitere Versuche belegt werden.

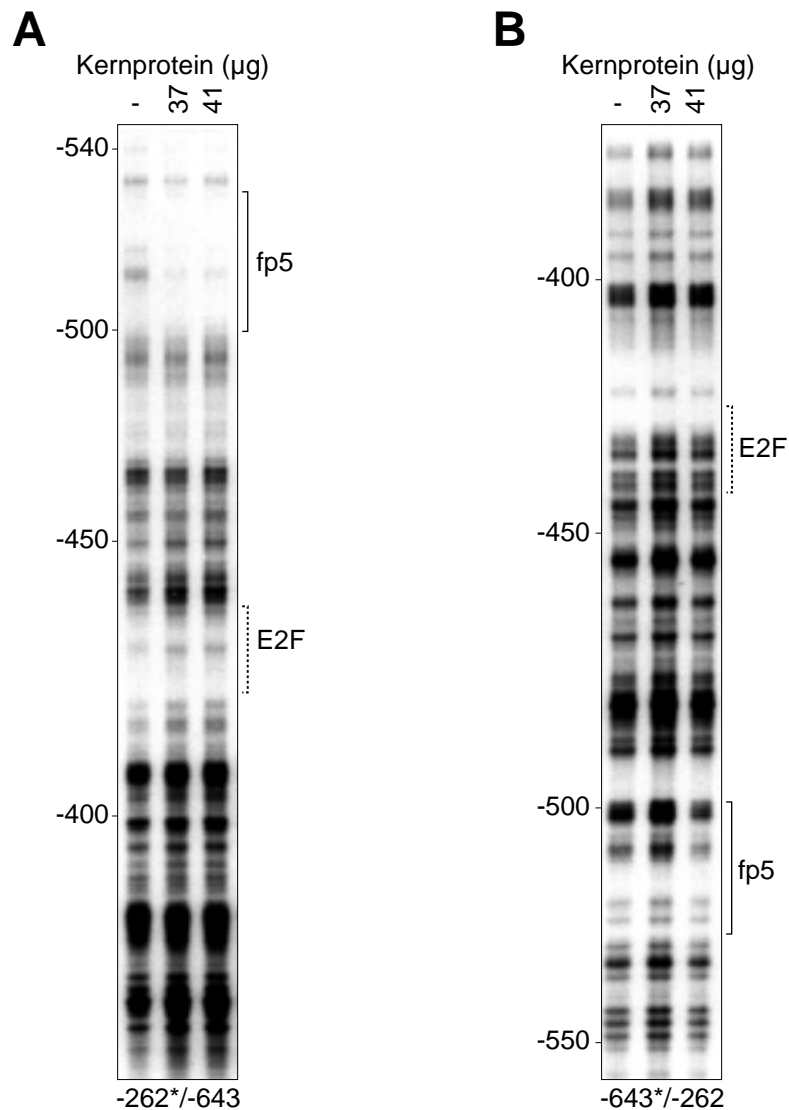


Abb. 4.6 Benzonase-Schutz-Experimente zum Nachweis der E2F-Bindung im MCM4-Promoter.

Der limitierte Verdau von markierter MCM4-Promoter-DNA (-643 bis -262) mit Benzonase zeigt weder auf dem codogenen (A) noch auf dem nicht-codogenen Strang (B) einen 'footprint' über der potenziellen E2F-Bindestelle.

4.1.4. Nachweis von spezifischen Protein-DNA Interaktionen im Gel-Retardierungs-Experiment

Da weder durch DNase-I- noch durch Benzonase-Schutz-Experimente eine Proteinbindung an die potenzielle E2F-Bindestelle nachgewiesen werden konnte wurden Gel-Retardierungs-Experimente durchgeführt. Dabei wurde nuklearer Extrakt aus HeLa S3 Zellen mit markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden in Gegenwart von Kompetitor-DNA inkubiert. Um methodische Probleme auszuschließen, wurden zunächst Oligonukleotide untersucht, die komplementär zu den fp5- (Abb. 4.7A) oder fp6- (Abb. 4.7B) Sequenzen sind. Im Gel-Retardierungs-Experiment werden in beiden Fällen spezifische Protein-DNA Komplexe gebildet,

da mit steigenden Mengen nicht-markierter fp5-DNA (Abb. 4.7A) oder fp6-DNA (Abb. 4.7B) die Bildung der Komplexe mit radioaktiver DNA unterdrückt wird, nicht aber wenn ein Überschuss an unspezifischer Kompetitor-DNA derselben Größe eingesetzt wird.

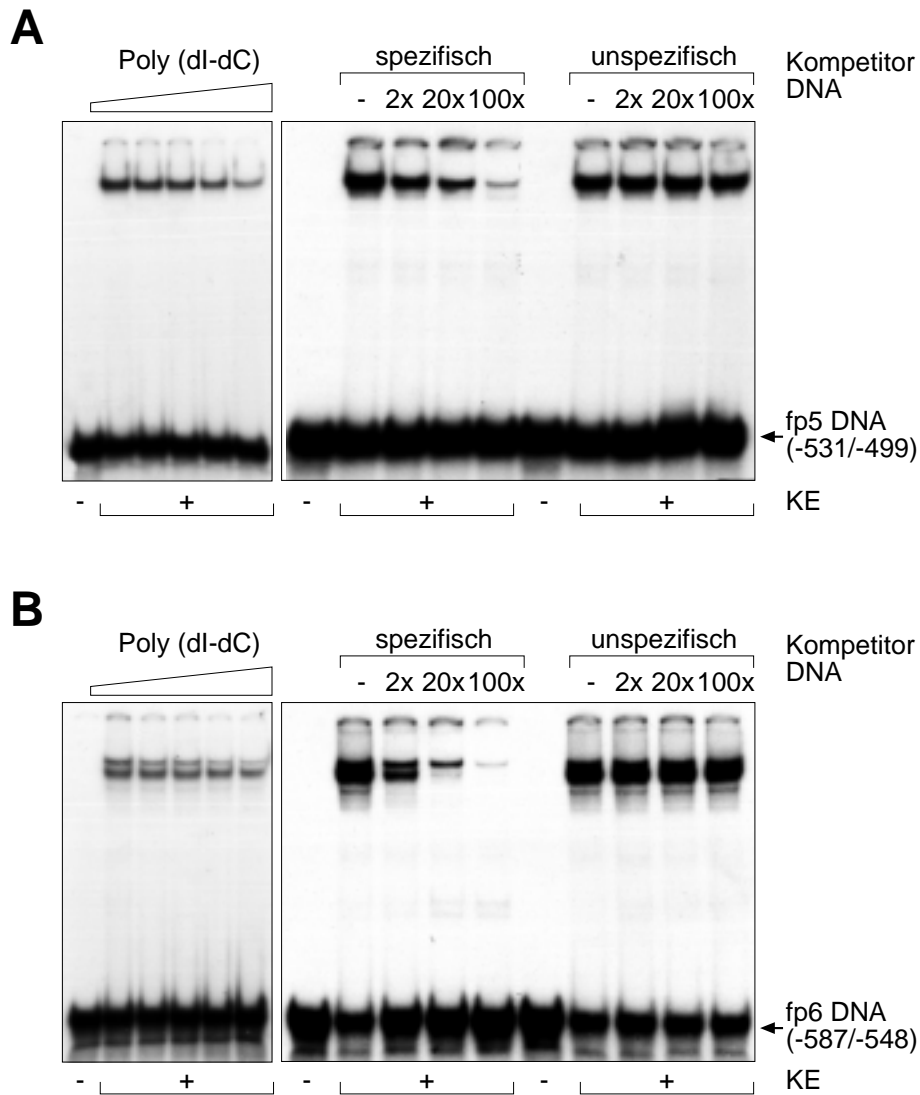


Abb. 4.7 Die Proteinbindung an fp5- oder fp6-Sequenzen ist spezifisch.

(A) 5'-[³²P]-markiertes, doppelsträngiges fp5-Oligonukleotid wurde mit oder ohne nuklearen Extrakt in An- oder Abwesenheit von Kompetitor-DNA inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend auf einem nativen 10%igen Polyacrylamidgel analysiert. Im linken Experiment wurde poly(dl-dC):poly(dl-dC) in 1000-, 2000-, 3000-, 4000- oder 5000-fachem Überschuss im Verhältnis zur markierten DNA eingesetzt. Rechts wurde als spezifischer Kompetitor nicht-markiertes fp5-Oligonukleotid verwendet. Unspezifische Kompetitor-DNA wurde durch einen Xho I / Pst I Restriktionsverdau eines PCR-Produktes, das über die 'multiple cloning site' von pBluescript SK- gebildet wurde, präpariert. Die resultierenden DNA-Fragmente besitzen eine unterschiedliche Länge von 32 bp und 74 bp.

(B) Die Experimente wurden wie unter (A) beschrieben durchgeführt. Die eingesetzten markierten Oligonukleotide entsprechen der fp6-Sequenz des MCM4-Promoters.

In den folgenden Experimenten wurde das E2F-Bindemotiv des MCM4-Promoters als doppelsträngiges Oligonukleotid markiert und unter denselben Bedingungen, wie in Abb. 4.7 beschrieben, inkubiert. Dabei zeigt sich, dass in nuklearen Extrakten von HeLa Zellen Proteine vorhanden sind, die mit der E2F-DNA interagieren und spezifische Protein-DNA-Komplexe bilden (Abb. 4.8A).

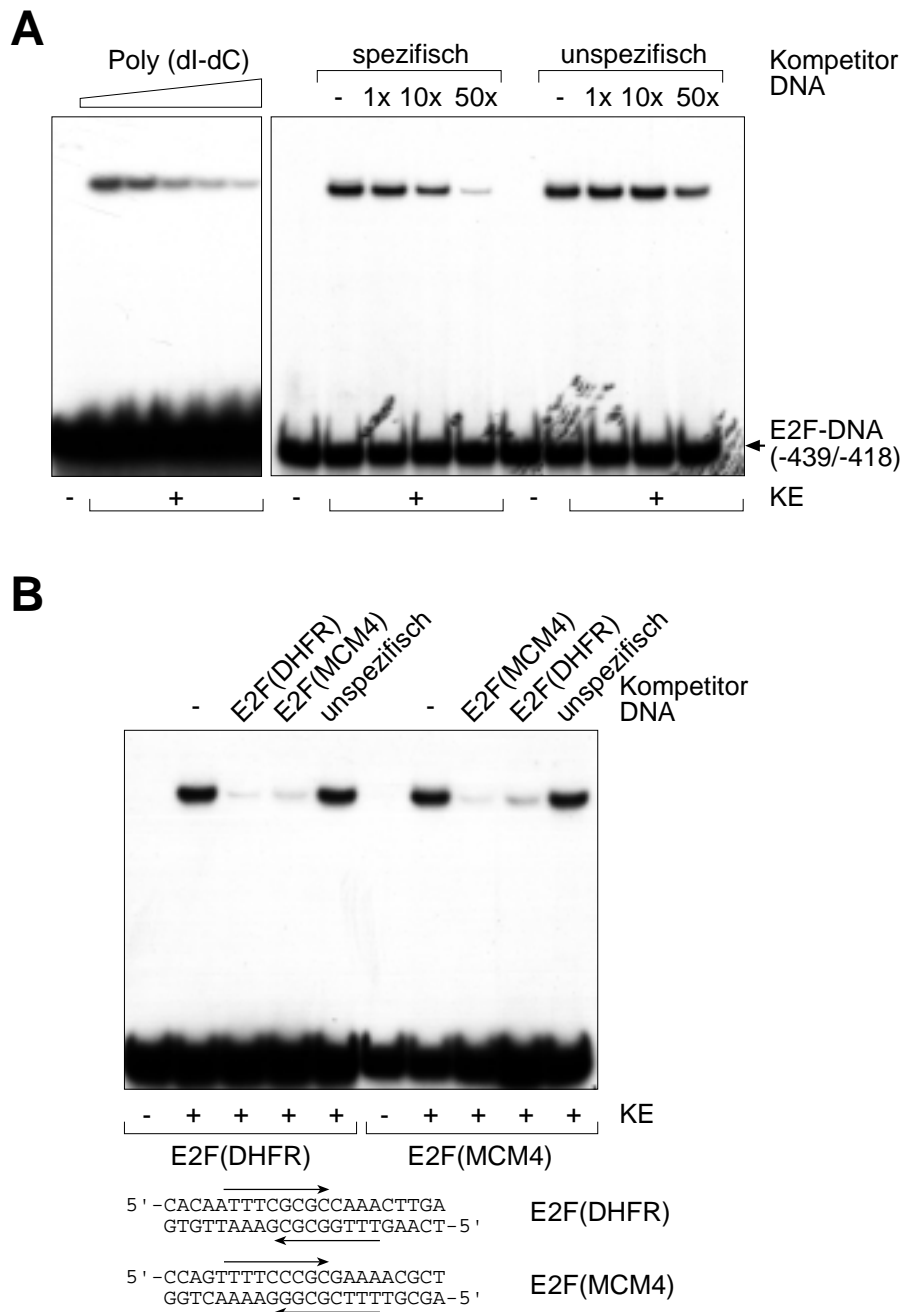


Abb. 4.8 In nuklearen Extrakten aus HeLa S3 Zellen sind E2F-ähnliche Proteine vorhanden.

(A) Die Experimente wurden, wie in Abb. 4.7 beschrieben, durchgeführt. Als markierte DNA diente das E2F-Bindemotiv des MCM4-Promoters.

(B) Vergleich der E2F-Bindestellen aus dem DHFR-Genpromoter und dem MCM4-Promoter. Für Konkurrenzexperimente wurde ein fünfzigfacher Überschuss an nicht-markierter E2F-DNA oder unspezifischer Kompetitor-DNA dem Bindungsansatz beigefügt.

Weiterhin wurden als Positiv-Kontrolle E2F-Bindestellen aus dem DHFR- und dem MCM4-Promoter verglichen (Abb. 4.8B). Das Promoterelement des *DHFR*-Gens wurde verwendet, da frühere Experimente zeigten, dass E2F-Proteine aus HeLa Zellen effizient mit diesem Motiv interagieren (Wade et al., 1995). Die in Abb. 4.8B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen eine spezifische Interaktion zwischen Kernproteinen aus HeLa Zellen und beiden E2F-Motiven nachweisbar ist. Die Spezifität ist dadurch nachgewiesen, dass ein Überschuss an nicht-markierten E2F-Sequenzen aus dem DHFR- und dem MCM4-Promoter die Komplexbildung unterdrückt, nicht aber unspezifische Kompetitor-DNAs gleicher Größe. Zudem zeigen beide Protein-DNA Komplexe ein identisches Laufverhalten im Gel und scheinen in vergleichbaren Mengen gebildet zu werden. Demnach kann unter diesen Versuchsbedingungen dem E2F-Bindemotiv im MCM4-Genpromoter eine ähnliche Affinität zu E2F-Proteinen wie dem entsprechenden Bindemotiv im DHFR-Promoter zugeordnet werden. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von E2F-Proteinen an der Regulation der MCM4-Genexpression.

4.1.5. Gel-Retardierungs-Experimente mit Extrakten aus synchronisierten HeLa S3 Zellen

Da die Expression von MCM-Proteinen Zellzyklus-abhängig reguliert ist (Schulte et al., 1995, 1996; Tsuruga et al., 1997), wurde nuklearer Extrakt aus unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen präpariert und in Gel-Retardierungs-Experimenten untersucht. Dazu wurden HeLa S3 Zellen mittels eines doppelten Thymidinblocks am G1/S-Übergang arretiert und anschließend aus dem Block entlassen. Über einen Zeitraum von 14 h wurden alle 2 h lösliche und Chromatin-gebundene Proteine (nuklearer Extrakt) präpariert.

Als Kontrolle für eine effiziente Synchronisation wurde ein Aliquot der löslichen Proteine in einem SDS-Gel aufgetrennt und im Immunblot mit hMcm4p-spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 4.9A). Frühere Experimente zeigten, dass hMcm4p Zellzyklus-abhängig phosphoryliert wird. Das Protein wird während der S-Phase phosphoryliert, am Ende der Mitose dephosphoryliert und liegt während der G1-Phase hypophosphoryliert vor (Musahl et al., 1995). Wie aus Abb. 4.9A hervorgeht, zeigt der Immunblot verschiedene phosphorylierte Formen von hMcm4p, was Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen, in welchen die Extrakte präpariert wurden, zulässt. So befindet sich die Mehrzahl der Zellen 8 - 10 Stunden nach dem 'release' in der Mitose, da zu diesen Zeitwerten das im Gel langsamer laufende hyperphosphorylierte hMcm4p nachgewiesen werden kann. Den Übergang von der Mitose in die G1-Phase wird durch das Verschwinden dieser hyperphosphorylierten Formen angezeigt (12 h nach 'release').

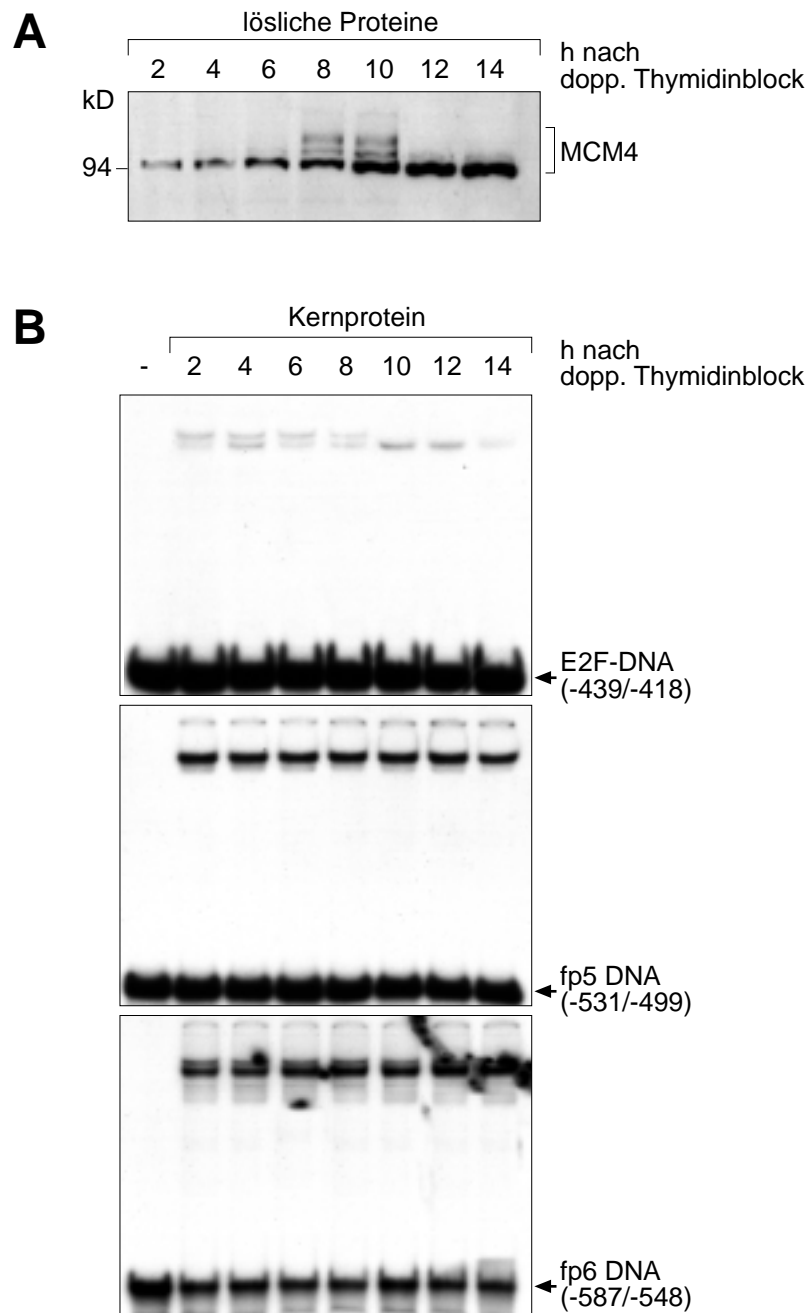


Abb. 4.9 Gel-Retardierungs-Experimente mit Extrakten aus synchronisierten HeLa S3 Zellen. HeLa S3 Zellen wurden durch einen doppelten Thymidinblock arretiert und in die S-Phase entlassen. Nach den angegebenen Zeiten wurden lösliche- und Chromatin-gebundene Proteine präpariert. Aliquote der löslichen Fraktionen wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und im Immunblot mit hMcm4p-Antikörpern analysiert **(A)**. **(B)** Die präparierten Kernextrakte der synchronisierten Zellen (1 µg pro Ansatz) wurden im 'Band-Shift' Experiment unter Verwendung von markierter E2F- (oben), fp5- (Mitte) oder fp6-DNA (unten) untersucht.

Aus den Zellen der verschiedenen Zellzyklus-Phasen wurde nuklearer Extrakt präpariert und, wie in 3.2.5.3. beschrieben, mit markierter fp5-, fp6- oder mit E2F-DNA inkubiert (Abb. 4.9B). In jeder Zellzyklusphase sind Proteine enthalten, die mit allen untersuchten DNA-Substraten Protein-DNA Komplexe bilden. Wird markierte

fp5- und fp6-DNA untersucht, unterscheiden sich die Nukleoprotein-Komplexe der Extrakte aus den verschiedenen Zellzyklusstadien nicht. Wird das E2F-Bindemotiv als DNA-Substrat verwendet, bilden Kernproteine aus S-Phase Zellen (2 – 8 h nach dem doppelten Thymidinblock) einen zusätzlichen Protein-DNA Komplex, der ein verzögertes Laufverhalten im Gel aufweist (Abb. 4.9B). Dieser zusätzliche Komplex könnte ein möglicher Hinweis auf den Mechanismus der Zellzyklus-abhängigen Regulation der MCM4-Genexpression sein, da sich die Interaktionen von Kernproteinen mit dem E2F-Bindemotiv Zellzyklus-abhängig verändern.

Die in Abb. 4.8 und Abb. 4.9 gezeigten Daten weisen auf eine spezifische Interaktion zwischen Proteinen aus nuklearen Extrakten und der E2F-Bindestelle des MCM4-Promoters hin. Dies steht im Widerspruch zu den Daten der DNase-I- oder Benzonase-Schutz-Experimente. Für weitere Untersuchungen wurde ein markiertes PCR-Produkt, welches die MCM4-Promoterregion zwischen den Nukleotiden -357 und -643 repräsentiert, hergestellt. Wie aus Abb. 4.5A hervorgeht, beinhaltet diese Region die mögliche E2F-Bindestelle und die DNase-I geschützten Bereiche fp5 und fp6. Das 287 bp lange Fragment wurde als DNA-Substrat in Gel-Retardierungs-Experimenten mit nuklearem Extrakt aus HeLa S3 Zellen untersucht. Es können mindestens vier Protein-DNA Komplexe (siehe Abb. 4.10, Banden w, x, y und z) aufgrund ihrer verschiedenen elektrophoretischen Mobilität unterschieden werden (Abb. 4.10 Spur 2, 5 und 9). Die beiden Banden mit der geringsten Mobilität (Abb. 4.10; z und w) verschwinden in Anwesenheit eines fünfzigfachen Überschusses an unspezifischer Kompetitor-DNA, was darauf hindeutet, dass es sich bei beiden Komplexen um unspezifische Protein-DNA Wechselwirkungen handelt (vergleiche Spur 2 mit Spur 3). Die Protein-DNA Komplexe der Banden x und y sind durch die Anwesenheit von unspezifischem Kompetitor nicht beeinträchtigt, können aber durch Kompetitionen mit fp6-DNA unterdrückt werden (Spur 4, 6, 8 und 10). Entscheidend ist jedoch, dass ein Überschuss an E2F-DNA keine Änderung des Bandenmusters bewirkt, was eine Bindung von E2F an das 287 bp lange Promoterfragment unter diesen Versuchsbedingungen ausschließt. Da die Daten von Abb. 4.8 und Abb. 4.9 klar zeigen, dass nukleare Extrakte aus HeLa Zellen Proteine enthalten, die dieselbe Bindungsspezifität wie E2F-Proteine besitzen, scheinen möglicherweise die Faktoren, die an die benachbarten Regionen fp5 und fp6 binden, E2F von seiner Bindestelle zu verdrängen. Dies wäre auch eine Erklärung für die Abwesenheit eines 'footprints' über dem E2F-Motiv. Übereinstimmend mit den Daten der von Connelly et al. (1998) durchgeführten Transfektionsstudien (siehe Abb. 4.5B), scheint die Regulation der MCM4-Genexpression in HeLa Zellen nur bedingt von E2F-Proteinen beeinflusst zu sein.

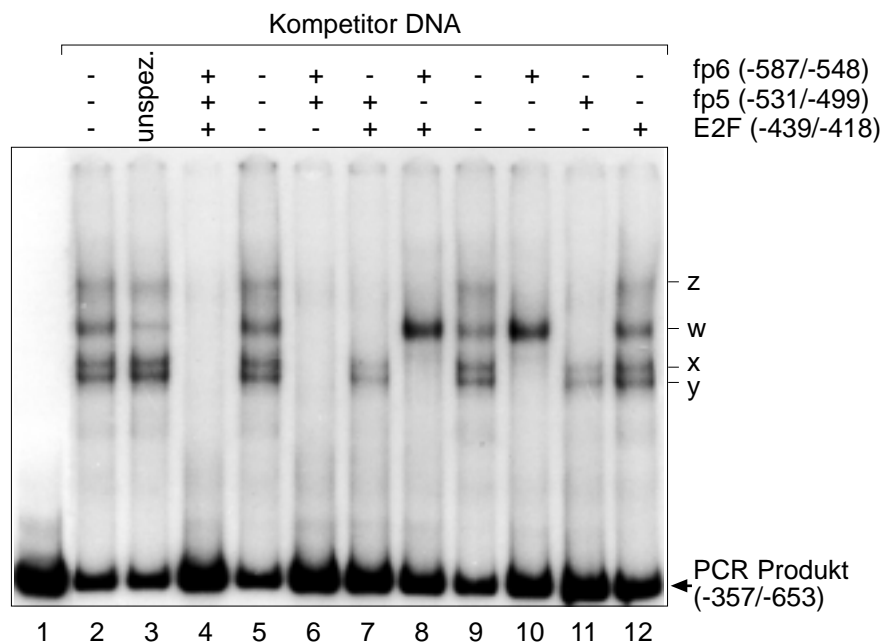


Abb. 4.10 Konkurrenzexperimente zeigen, dass keine Proteine an das E2F-Bindemotiv eines 287 bp Promoterfragmentes binden.

Die eingesetzte markierte DNA umfasst die MCM4-Promoter Region zwischen Nukleotid -643 und -357 (siehe Abb. 4.5). Die Bindungsreaktionen wurden ohne (Spur 2, 5 und 9) Kompetitor-DNA, oder mit einem fünfzigfachen Überschuss an unspezifischer Kompetitor-DNA (Spur3), die wie in Abb. 4.7 beschrieben präpariert wurde, durchgeführt. Die anderen Reaktionen wurden mit einem zehnfachen Überschuss der Oligonukleotide entweder allein oder in den angegebenen Kombinationen durchgeführt. Die Protein-DNA Komplexe wurden wie in Abb. 4.7 beschrieben analysiert.

4.1.6. Vergleich der Bindungseigenschaften von Proteinen aus proliferierenden und differenzierten HL60 Zellen an DNA-Fragmente des MCM4-Promoters

Ein weiterer Aspekt der Genregulation von MCM-Proteinen ist die Beschränkung ihrer Expression auf proliferierende Zellen (Schulte et al., 1996). Die Autoren zeigten, dass bei einer *in vitro* Differenzierung von HL60 Zellen ein drastischer Rückgang der mRNA Menge von MCM3 und MCM7 zu beobachten ist. Da MCM-Proteine eine hochkonservierte Proteinfamilie bilden, liegt die Vermutung nahe, dass die MCM4 mRNA Mengen ähnlich reguliert werden. Deshalb sollten nukleare Extrakte aus proliferierenden und differenzierten HL60 Zellen präpariert und im Gel-Retardierungs-Experiment bzw. DNase-I-Schutz-Experiment untersucht werden, um festzustellen, ob sich während der Differenzierung das Bindungsverhalten der Proteine, die mit den DNase-I-geschützten Regionen (fp1 bis fp6) interagieren, verändert.

Abb. 4.11A zeigt eine Phasenkontrastaufnahme von HL60 Zellen vor und nach Zugabe von PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat). Bereits nach 24 h ist eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie zu beobachten. Die Zellen weisen verstärkte Adhäsionseigenschaften auf und bilden Pseudopodien aus. Werden von beiden Zellpopulationen Kernproteine präpariert und gleiche Mengen in Gel-Retardierungs-Experimenten mit markierter fp5-, fp6- und E2F-DNA inkubiert (Abb. 4.11B), bilden sich in beiden Fällen Protein-DNA Komplexe, die ein identisches Laufverhalten im Gel aufweisen. Im Vergleich zu Reaktionen mit Extrakten aus HeLa Zellen zeigen die Komplexe dieselbe Mobilität und verhalten sich in Konkurrenzexperimenten identisch.

Demnach scheint die Differenzierung der HL60 Zellen keinen Einfluss auf Proteine zu besitzen, die an die fp5-, fp6- und E2F-DNA im Gel-Retardierungs-Experiment binden. Zudem konnte gezeigt werden, dass sowohl in HeLa- als auch in HL60 Zellen Proteine vorhanden sind, die in identischer Weise mit der fp5-, fp6- und der E2F-DNA interagieren.

Zur Untersuchung der Proteinbinderegionen fp1 bis fp4 wurden DNase-I-Schutz-Experimente durchgeführt, wobei ein Promoterfragment von Nukleotid -541 bis +67 als DNA Substrat verwendet wurde. Über einen sequenziellen Restriktionsverdau (siehe Abb. 4.2) wurde sowohl der codogene als auch der nicht-codogene Strang dieses Fragmentes einseitig markiert und mit steigenden Mengen Kernprotein aus HeLa-, proliferierenden HL60- und differenzierten HL60 Zellen inkubiert. Nach erfolgter Bindung wurden die Ansätze mit DNase-I behandelt und auf einem Sequenzgel analysiert.

Wie aus Abb. 4.12 hervorgeht, enthalten nukleare Extrakte aus HL60 und HeLa Zellen Proteine, welche in gleichen Regionen des MCM4-Promoters binden. Die DNase-I-geschützten Bereiche fp1, fp3 und fp4 zeigen mit allen Extrakten identische DNase-I-hypersensitive Stellen (Abb. 4.12, Pfeile) und haben die gleiche Größe. Im Fall von fp2 ist der geschützte Bereich unter Verwendung von Extrakten aus HL60 Zellen ausgedehnt (von Nukleotid -230(-241)/-217 bei HeLa Zellen auf -241/-200 bei HL60 Zellen). Vergleicht man die Bindungsreaktionen von Kernproteinen aus proliferierenden und differenzierten HL60 Zellen, ergeben sich identische DNase-I-geschützte Bereiche. Somit scheinen die Bindungseigenschaften der fp1-, fp2-, fp3- und fp4- bindenden Faktoren durch die Differenzierung der Zellen nicht verändert zu werden. Demnach bleiben die Protein-DNA Interaktionen im MCM4-Promoter, die für proliferierende Zellen charakteristisch sind, in differenzierten Zellen erhalten. Fraglich bleibt, ob die MCM4 mRNA Menge, ebenso wie die MCM7 und MCM3 mRNA Menge, im Verlauf der Differenzierung abnimmt.

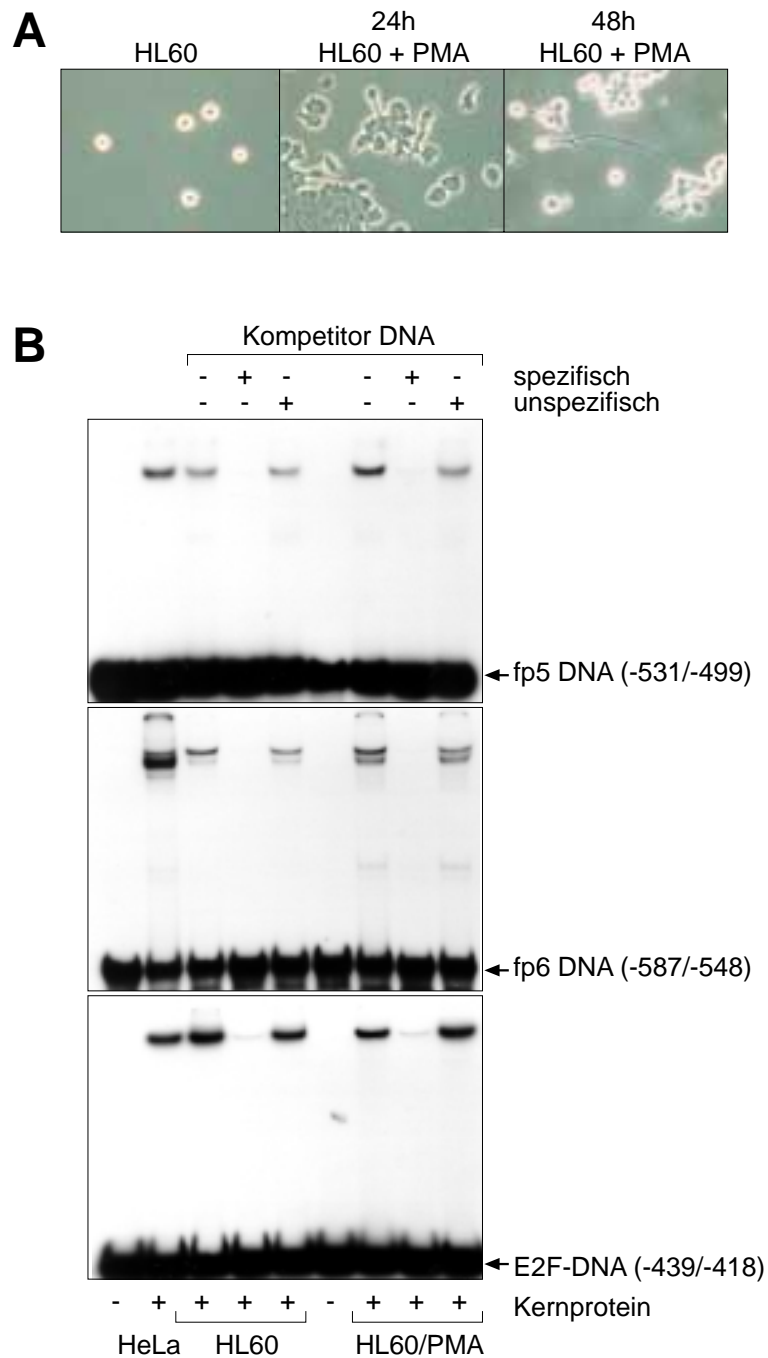


Abb. 4.11 *in vitro* Differenzierung von HL60 Zellen.

(A) Phasenkontrastaufnahme von HL60 Zellen vor und nach Inkubation mit PMA. **(B)** Kernextrakte von proliferierenden und differenzierten Zellen (30 h nach Zugabe von PMA) wurden im 'Band-Shift' Experiment unter Verwendung von markierter fp5- (oben), fp6- (Mitte) oder E2F-DNA (unten) untersucht. Kompetitionen wurden mit einem zwanzigfachen Überschuss an spezifischer- oder unspezifischer Kompetitor-DNA durchgeführt. Parallel wurde eine Reaktion mit nuklearem Extrakt aus HeLa Zellen aufgetragen (Spur 2).

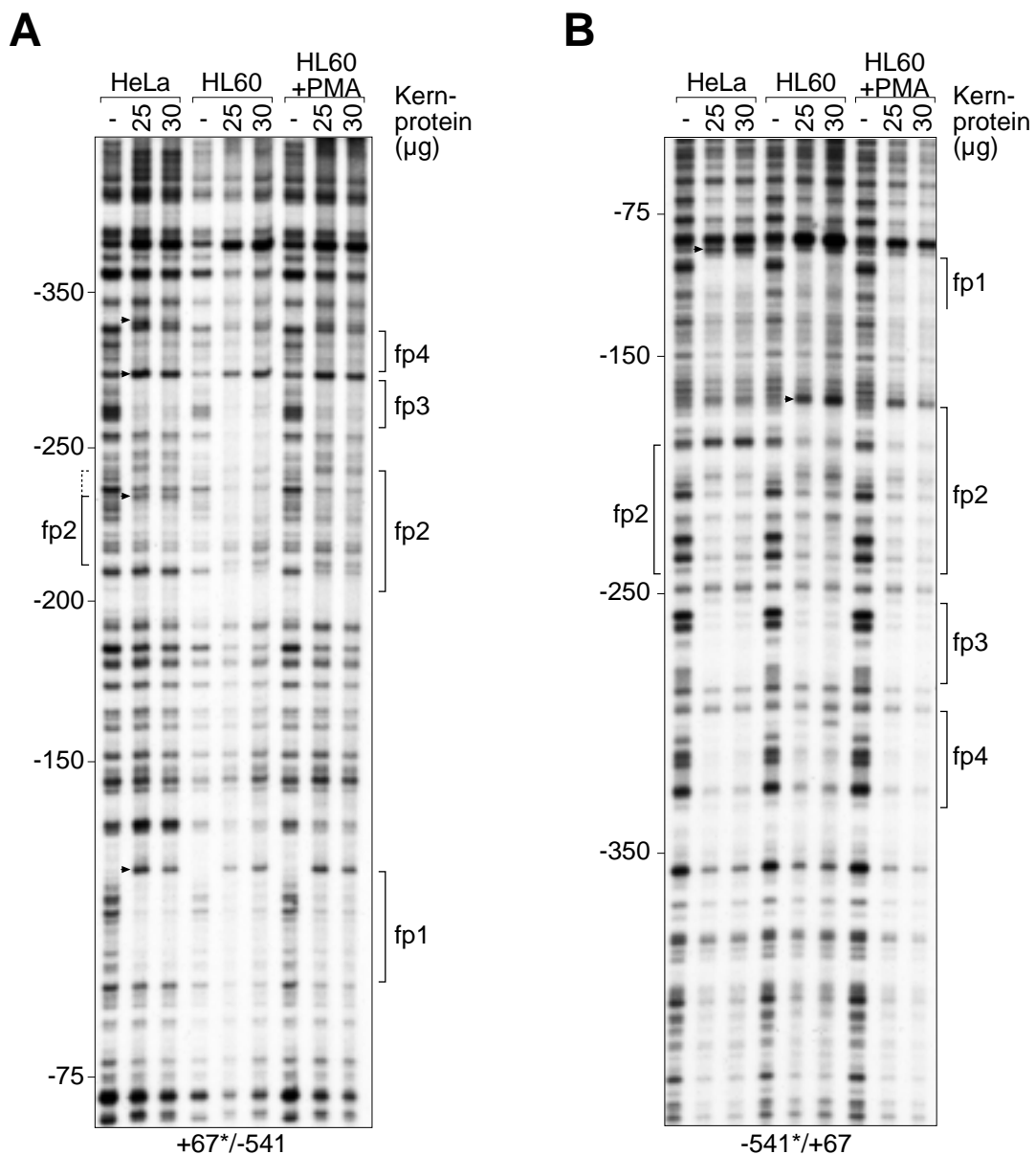


Abb. 4.12 Proteine aus Extrakten von proliferierenden und differenzierten HL60 Zellen zeigen keine unterschiedliche Bindung im DNase-I-Schutz-Experiment.

Über einen sequenziellen Restriktionsverdau wurde der codogene Strang (**A**) und der nicht-codogene Strang (**B**) des Mlu I / Nsi I Promoterfragmentes (+67 bis -541) einseitig markiert. Die Fragmente wurden ohne (-) oder mit steigenden Mengen an Kernprotein aus HeLa -, proliferierenden HL60 - oder differenzierten HL60 Zellen inkubiert und mit limitierenden Mengen DNase-I behandelt. Gezeigt ist die Autoradiographie des Sequenzgels; DNase-I-geschützte Bereiche sind mit Klammern gekennzeichnet; Pfeile markieren hypersensitive Stellen.

4.1.7. Identifizierung eines fp6-bindenden Proteins

Durch DNase-I-Schutz-Experimente wurden die Binderegionen fp5 und fp6 identifiziert, welche keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität der MCM4- oder der DNA-PKcs-Genexpression (Connelly et al., 1998) zeigen. Zudem weisen die Sequenzen keine Homologien zu Bindemotiven bekannter Transkriptionsfaktoren auf. Demnach war es von Interesse, die fp5- und fp6-bindenden Proteine genauer zu untersuchen. Zunächst sollte über 'South-Western' Experimente das Molekulargewicht des fp6-bindenden Proteins ermittelt werden. Dazu wurden 150 µg Kernprotein aus HeLa Zellen auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Damit eine sequenzspezifische DNA-Bindung an den gesuchten Faktor erfolgen kann, wurden die Proteine auf der Membran renaturiert und anschließend mit markierter fp6-DNA (-587/-548) in Gegenwart unterschiedlicher Mengen Kompetitor-DNA inkubiert. Wie aus Abb. 4.13 hervorgeht, zeigt ein Protein mit einem ungefähren Molekulargewicht von 68 kD eine kompetitorstabile Bindung.

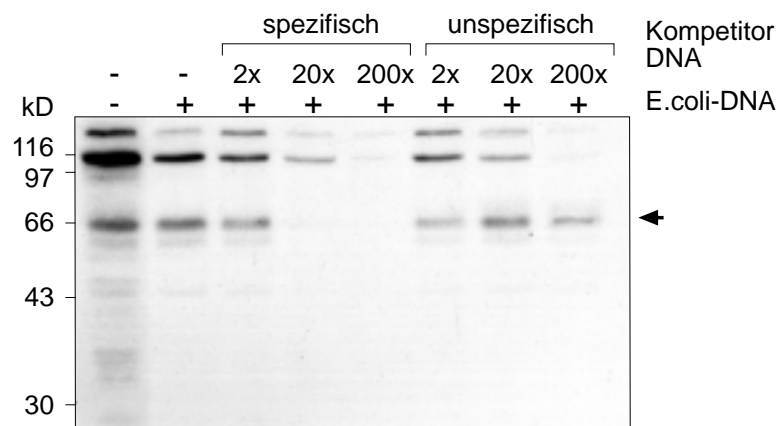


Abb. 4.13 Die fp6-DNA bindet im 'South-Western' Experiment an ein 68 kD Protein.

Je Spur wurden 150 µg nuklearer Extrakt aus HeLa Zellen in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Bindungsreaktionen erfolgten, bis auf Spur1, in Anwesenheit eines 2000 fachen Überschusses an *E. coli*-DNA mit 2 ng markierter fp6-DNA (-587/-548). Zusätzlich wurde mit nicht-markierter fp6-DNA spezifisch und mit fp5-DNA (-531/-499) unspezifisch kompetitiert. Das Laufverhalten der Molekulargewichtsmarker ist am linken Bildrand eingezeichnet, ein Pfeil markiert die Position des fp6-bindenden Proteins.

Zur Identifizierung dieses Proteins wurde im Folgenden eine λ -Expressionsbibliothek (Lambda Uni-ZapTM XR / Stratagene) auf eine sequenzspezifische Protein-DNA-Wechselwirkung in Anwesenheit kompetitierender *E. coli*-DNA untersucht. Aus 2×10^6 Plaques wurden zwei positive Phagenklone isoliert und zur Homogenität gereinigt. Das von einem dieser Phagen exprimierte Fusionsprotein erkennt spezifisch die fp6-Sequenz (Abb. 4.14). Die Spezifität dieser Bindung wurde durch Kompetitions-Experimente überprüft, die wie in Abb. 4.13 beschrieben durchgeführt wurden.

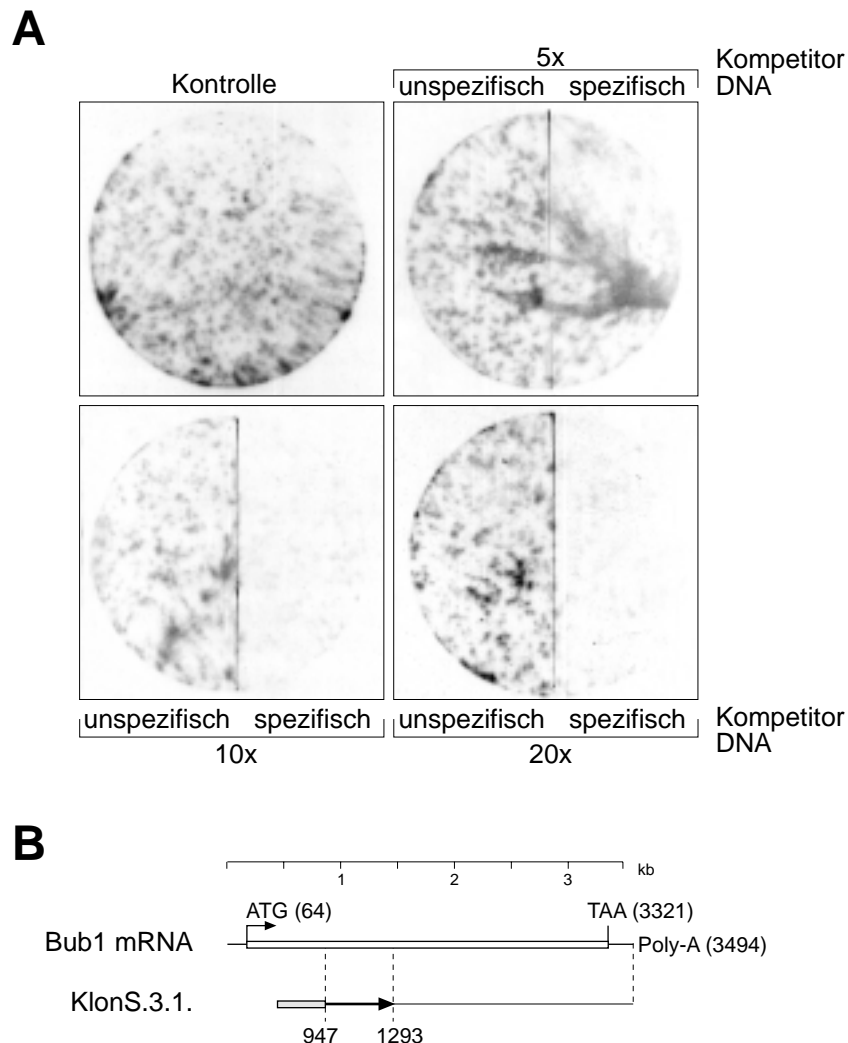


Abb. 4.14 Identifizierung eines fp6-bindenden Proteins.

(A) Nachweis der Spezifität eines isolierten λ -Expressionsklons (KlonS.3.1.). Der gereinigte Phage wurde auf 4 verschiedene Platten ausplattiert, die Proteinexpression mit IPTG induziert und ein Filterabdruck je Platte hergestellt. Die Filter wurden mit 10 ng markierter fp6-DNA in Gegenwart von *E. coli*-DNA (1 mg / ml) inkubiert. Für Wettbewerbsexperimente wurde nicht-markierte fp6-DNA als spezifischer -, sowie fp5-DNA als unspezifischer Kompetitor eingesetzt.

(B) Vergleich der publizierten cDNA Sequenz von hBub1 (Taylor et al., 1998) und der HeLa cDNA, die aus dem λ -Klon S.3.1. präpariert wurde. Die Nummerierung der Nukleotide erfolgte nach Taylor et al. (1998). Die HeLa cDNA codiert für ein β -Galaktosidase-Fusionsprotein von 827 Aminosäuren, das die C-terminalen Aminosäuren 299 bis 1085 von hBub1p umfaßt. Der in dieser Arbeit sequenzierte Bereich, zwischen den Nukleotiden 947 und 1293, ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die cDNA dieses Phagenklons (S.3.1.) wurde als pBluescript Phagemid in den *E. coli* Stamm Sol R übertragen, präpariert und sequenziert. Über einen Sequenzvergleich (BLASTN der NCBI Datenbank; nach Altschul et al., 1990) ergaben sich Homologien zu der cDNA der 'mitotic checkpoint kinase Bub1' (BUB1) (Taylor et al., 1998) (Abb. 4.14B). Damit umfasst das exprimierte Polypeptid ein 2374 bp langes cDNA Fragment, das für die C-terminalen Aminosäuren 294 bis 1085 von hBub1p codiert. Als β -Galaktosidase-Fusionsprotein besteht es aus insgesamt 827 Aminosäuren.

Das BUB1 Gen wurde ursprünglich in *S. cerevisiae* entdeckt (Hoyt et al., 1991) und codiert für eine Proteinkinase, deren Funktion essenziell für den mitotischen 'spindle checkpoint' ist (Roberts et al., 1994). Eine DNA-Bindung von Bub1p wurde bisher nicht nachgewiesen. Da das menschliche Homolog, hBub1p, ein apparentes Molekulargewicht von 122 kD besitzt (Taylor et al., 2001), bleibt zu untersuchen, warum im 'South-Western' Experiment ein Protein von ca. 68 kD spezifisch mit der fp6-DNA interagiert.

4.2. Identifizierung einer ORC-Bindestelle im MCM4-Genpromoter

Im ersten Teil der Arbeit wurden durch DNase-I-Schutz-Experimente sechs Proteinbindestellen (fp1 bis fp6) im MCM4-Genpromoter identifiziert. Von besonderem Interesse sind die geschützten Regionen fp5 und fp6, da sie weder einen signifikanten Effekt auf die MCM4- oder DNA-PKcs-Genexpression zeigen (Connelly et al., 1998) noch Homologien zu Bindemotiven bekannter Transkriptionsfaktoren aufweisen. Betrachtet man die Sequenzen genauer, so zeigt sich, dass dieser Bereich (-587 bis -499) Ähnlichkeiten zu Origins aufweist, die aus Hefen oder dem SV40 Virus bekannt sind. Untersuchungen in höheren Eukaryoten ergaben, dass Startpunkte der DNA-Replikation häufig in der Nähe aktiv transkribierter Gene lokalisiert sind (DePamphilis, 1993). Weitere Arbeiten zeigten, dass sich früh replizierende Sequenzen durch einen hohen Anteil an nicht-methylierten CpG-Nukleotiden auszeichnen (Delgado et al., 1998). Da die fp5 / fp6 Region zwischen zwei aktiv transkribierten Genen liegt, deren Promotoren einen hohen GC-Gehalt aufweisen, könnte dieser Bereich eine Bindestelle für ORC-Proteine im humanen Genom darstellen.

4.2.1. Interaktionen zwischen ORC-Proteinen aus nuklearen Extrakten und der fp6-DNA

Um festzustellen ob ORC-Proteine in nuklearen Extrakten spezifisch an die fp6-DNA binden, wurden Gel-Retardierungs-Experimente in Anwesenheit von hOrc2p-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Dazu wurde, wie in Abb. 4.7B beschrieben, nuklearer Extrakt aus HeLa Zellen mit markierter fp6-DNA inkubiert. Die Antikörper wurden entweder vor (Abb. 4.15B) oder nach der Bindungsreaktion (Abb. 4.15A) zugegeben. Wie aus Abb. 4.15B hervorgeht, zeigt sich ein verändertes Bandenmuster, wenn der Extrakt mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern präinkubiert wurde, nicht aber wenn der Versuch mit unspezifischen Kontroll-Antikörpern (IgG) durchgeführt wird. Derselbe Effekt zeigt sich, wenn ein markiertes PCR-Produkt, das die MCM4-Promoterregion zwischen den Nukleotiden -357 und -643 repräsentiert (vergl. Abb. 4.10), als DNA-Substrat untersucht wird (Abb. 4.15C).

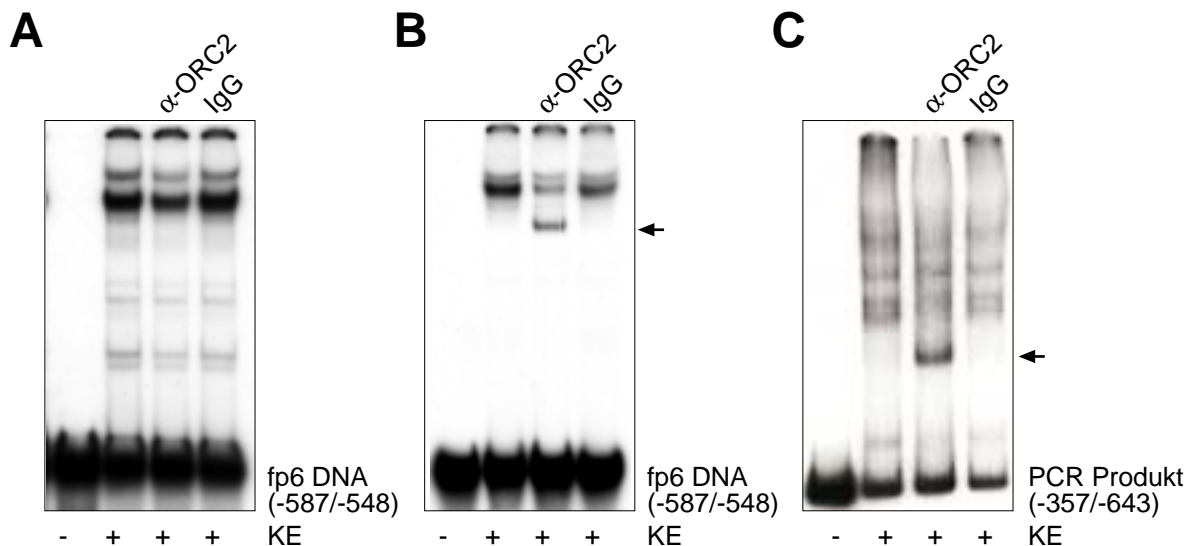


Abb. 4.15 Ein hOrc2p-spezifischer Antikörper verändert das Bandenmuster des fp6-Protein-Komplexes im Gel-Retardierungs-Experiment.

Markiertes fp6 Oligonukleotid wurde, wie in Abb. 4.7 beschreiben, mit nuklearem Extrakt aus HeLa Zellen inkubiert. **(A)** Nach erfolgter Protein-DNA Bindung wurden 1 μ g hOrc2p-spezifischer Antikörper (α -ORC2) oder Kontroll-Antikörper (IgG) für 20 min zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Gel getrocknet und eine Autoradiographie angefertigt. **(B)** Der Extrakt wurde vor der Bindungsreaktion mit 1 μ g hOrc2p-spezifischen Antikörpern oder Kontroll-Antikörpern (IgG) für 20 min inkubiert. **(C)** Die Experimente wurden wie unter (B) beschrieben durchgeführt. Als DNA-Substrat wurde ein Promoterfragment von Nukleotid -357 bis -643 verwendet.

Der bei diesen Experimenten verwendete hOrc2p-spezifische Antikörper wurde von P. Romanowski (Cambridge) zur Verfügung gestellt. Dieser Antikörper (α -hOrc2Cb) ist gegen ein ca. 40 aa langes Teilfragment gerichtet und erkennt dementsprechend nur ein bestimmtes Epitop im hOrc2 Protein. Möglicherweise ist dieses Epitop in einer Domäne lokalisiert, die Protein-Protein Interaktionen vermit-

telt, so dass durch den Antikörper eine Assemblierung des ORC-Komplexes unterdrückt wird. Dadurch könnte man die durch den Antikörper verursachte höhere Mobilität des Protein-DNA Komplexes erklären. Weder die aus eigener Herstellung stammenden polyklonalen monospezifischen Antikörper gegen hOrc1p und hOrc2p, noch monoklonale hOrc2p- und hOrc3p-spezifische Antikörper zeigten einen Effekt (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung hierfür wäre, dass bei diesen Antikörpern die entsprechende Epitopspezifität nicht ausreichend repräsentiert ist, oder dass der durch den α -hOrc2Cb verursachte veränderte 'band shift' ein Artefakt ist.

Unabhängig davon deutet die durch diesen Antikörper (α -hOrc2Cb) verursachte höhere Mobilität der Protein-DNA Komplexe auf eine Interaktion von ORC-Proteinen mit der fp6-DNA hin.

Der in Abb. 4.15 gezeigte Effekt lässt sich nur erklären, wenn der Protein-DNA Komplex, der bei der Inkubation von fp6-DNA mit nuklearem Extrakt entsteht, durch ORC-Proteine verursacht wird. Um weitere Hinweise auf eine solche Interaktion zu erhalten, wurde nuklearer Extrakt aus HeLa S3 Zellen über einen linearen Glycerin-Dichtegradienten aufgetrennt und fraktioniert. Verschiedene Aliquote der Fraktionen wurden entweder im Immunblot mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 4.16B) oder im Gel-Retardierungs-Experiment (Abb. 4.16C) untersucht. Abb. 4.16A zeigt eine Silberfärbung der Proteine der einzelnen Fraktionen nach Auftrennung im SDS-Gel.

Um das Sedimentationsverhalten von hOrc1p und hOrc2p bei physiologischen Salzkonzentrationen zu bestimmen, wurde der Extrakt auf 140 mM NaCl eingestellt, wobei durch Zugabe von 0,5% NP40 ein Ausfallen von Kernproteinen weitgehend vermieden wurde (Abb. 4.16A, Spur 'P'). Die Daten der Western Blot Analysen zeigen (Abb. 4.16B), dass hOrc1p und hOrc2p gleich weit sedimentieren (Fraktion 5, 6 und 7), wobei ein Teil der hOrc2p-Population ein von hOrc1p unabhängiges Sedimentationsverhalten aufweist (Fraktion 4). Die Daten scheinen mit neueren Untersuchungen von humanen ORC-Proteinen übereinzustimmen, die zeigen, dass diese Proteine spezifische Subkomplexe bilden, wenn sie aus HeLa Zellen präpariert werden (Dhar et al., 2001; Vashee et al., 2001). Der Komplex scheint aus hOrc2p, hOrc3p, hOrc4p und hOrc5p zusammengesetzt zu sein, der nur teilweise mit hOrc1p assoziiert vorliegt (Vashee et al., 2001).

In Abb. 4.16C wurde fp6-DNA mit nuklearem Extrakt sowie mit Aliquoten der einzelnen Fraktionen inkubiert und im Gel-Retardierungs-Experiment untersucht. Die durch Inkubation mit nuklearem Extrakt entstehende Doppelbande besteht aus zwei unterschiedlichen Protein-DNA-Komplexen (Abb. 4.16C, x und y), wobei die Bande (x) mit der geringeren Mobilität im Gel-Retardierungs-Experiment Proteinen mit einem höheren Sedimentationswert zugeordnet werden kann. Vergleicht man

das Auftreten von Protein-DNA Komplexen mit den Fraktionen, die hOrc1p und hOrc2p enthalten, so zeigt sich trotz einer Übereinstimmung, dass Proteine, die spezifisch mit der fp6-DNA interagieren, langsamer sedimentieren als hOrc1p und hOrc2p. Dies kann auch beobachtet werden, wenn das in Abb. 4.10 beschriebene PCR-Produkt als DNA-Substrat verwendet wird (Daten nicht gezeigt). Demnach liefert dieser Versuch keinen eindeutigen Nachweis auf eine Interaktion von ORC-Proteinen mit der fp6-DNA.

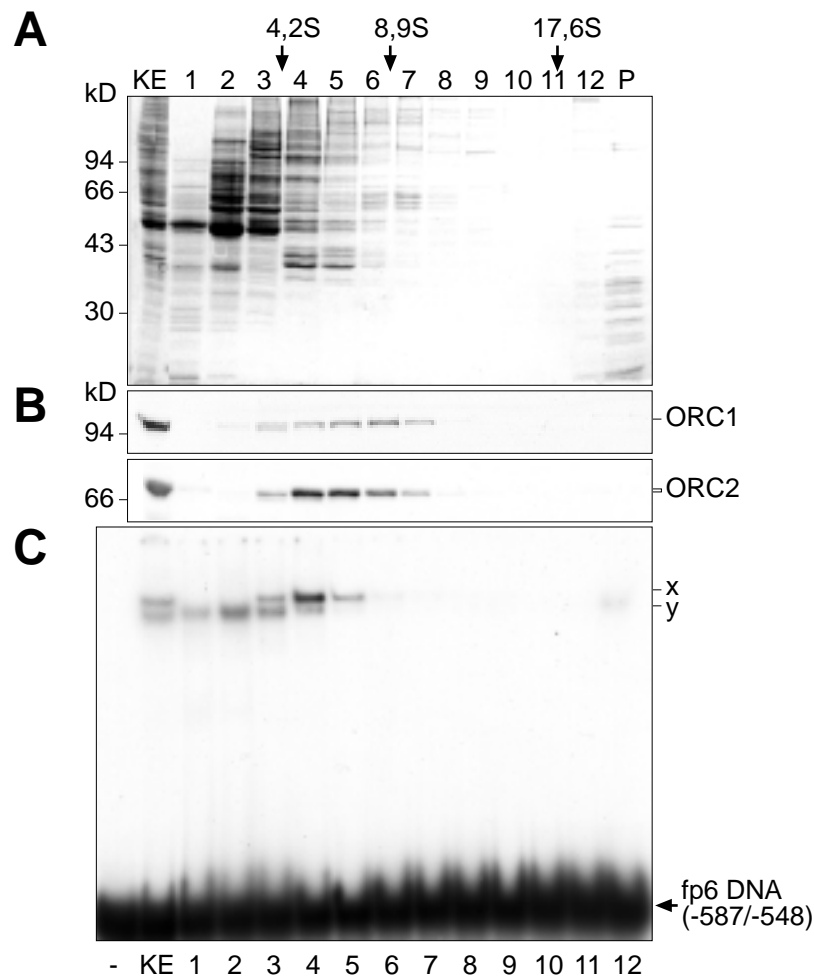


Abb. 4.16 Sedimentation von ORC-Proteinen im Glycerin-Dichtegradient.

Nuklearer Extrakt wurde in Anwesenheit von 0,5% NP40 auf 140 mM NaCl eingestellt, in einem 5% bis 25% Glycerin-Dichtegradienten aufgetrennt und anschließend fraktioniert. Zur Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten wurden in einem separaten Gradienten die Markerproteine BSA (4,2 S), β -Amylase (8,9 S) und Apoferritin (17,6 S) aufgetrennt und nach erfolgter Fraktionierung im Coomassie-gefärbten SDS-Gel analysiert.

Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden **(A)** durch Silberfärbung nach Auftrennung im SDS-Gel dargestellt; **(B)** im Immunblot mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern analysiert; oder **(C)** im Gel-Retardierungs-Experiment mit markiertem fp6 Oligonukleotid (-587/-548) als DNA-Substrat untersucht.

Um eine solche Interaktion nachzuweisen, wurden im Folgenden nukleare Extrakte mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern immundepletiert und anschließend im Gel-Retardierungs-Experiment untersucht (Abb. 4.17). Als Kontrolle wurden die Extrakte mit gleichen Mengen unspezifischer Antikörper (IgG) behandelt. Der Auftrag (I), ein Aliquot der Überstände (S) und die Präzipitate (P) wurden im Immunblot mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern analysiert.

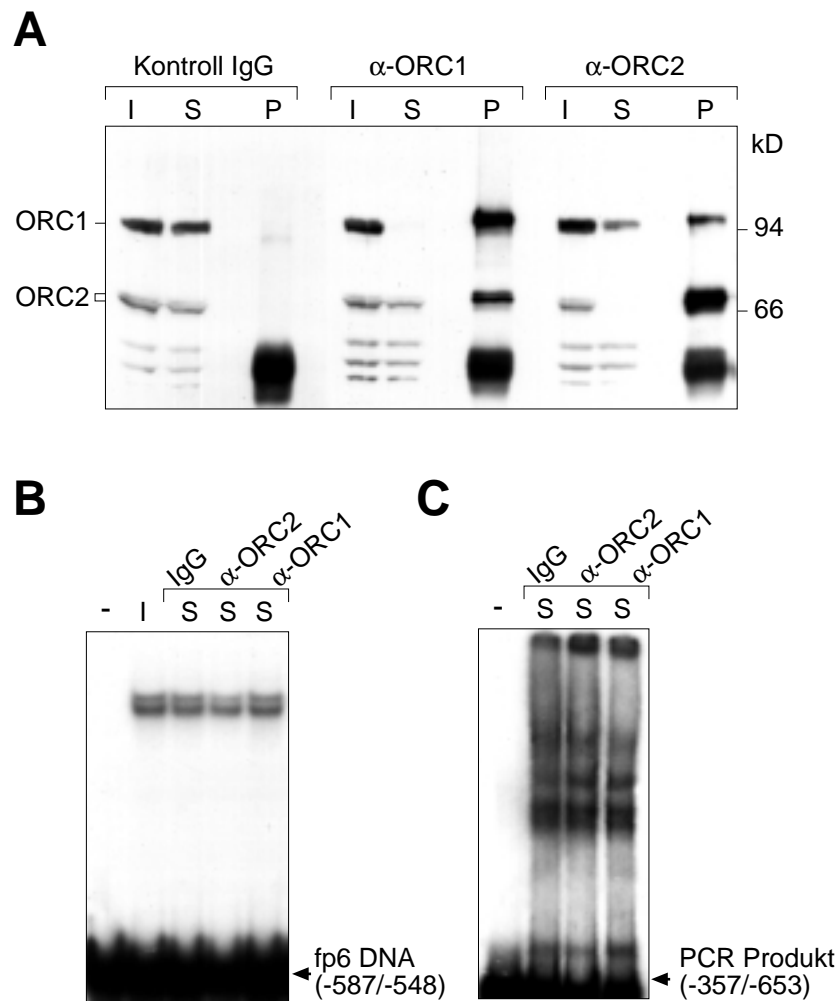


Abb. 4.17 Immunfällung von ORC-Proteinen durch hOrc1p- und hOrc2p-spezifische Antikörper. Nuklearer Extrakt von 2×10^6 HeLa Zellen wurde mit $2 \mu\text{g}$ hOrc2p- ($\alpha\text{-ORC2}$) und $3 \mu\text{g}$ hOrc1p-Antikörpern ($\alpha\text{-ORC1}$) sowie $3 \mu\text{g}$ unspezifischer Kontroll-Antikörper (IgG) immundepletiert. **(A)** Auftrag (I), Überstände (S) und Präzipitate (P) wurden im Immunblot mit hOrc1p- und hOrc2p-Antikörpern analysiert. Ein Aliquot der Überstände wurde im Gel-Retardierungs-Experiment mit markiertem fp6 Oligonukleotid **(B)** oder mit einem 278 bp langen PCR-Produkt **(C)** als DNA-Substrat untersucht.

Wie in Abb. 4.17A dargestellt, konnte der Extrakt mit den entsprechenden Antikörpern depletiert werden. Die Präzipitate zeigen, dass mit hOrc1p-spezifischen Antikörpern hOrc2p und mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern hOrc1p koprizipitiert

werden kann. Vergleicht man die Mengen an hOrc1p und hOrc2p in den Überständen (S) mit denen in den Aufträgen (I), so wird bei einer vollständigen Fällung von hOrc1p nur ein Teil von hOrc2p kopräzipitiert und umgekehrt. Demnach werden beide Proteine nicht in stöchiometrischen Mengen gefällt, was auf unterschiedliche Populationen von hOrc1p und hOrc2p hindeutet. Die gezeigten Verhältnisse entsprechen den von Kreitz et al. (2000) publizierten Daten (Fig. 4).

Untersucht man ein Aliquot der Überstände (S) im Gel-Retardierungs-Experiment mit markierter fp6-DNA (Abb. 4.17B) oder dem in Abb. 4.10 beschriebenen PCR-Produkt (Abb. 4.17C), so findet man keinen Unterschied der Bandenmuster der einzelnen Ansätze. Somit sprechen auch diese Daten gegen eine Interaktion von ORC-Proteinen mit der fp6-DNA.

4.2.2. Untersuchungen zur DNA-Bindung von rekombinantem his-hOrc1p

Die in Abb. 4.16 und 17 gezeigten Daten liefern keinen Nachweis für eine direkte Interaktion von hORC-Proteinen mit der fp6-DNA. Deshalb sollte überprüft werden, ob rekombinantes hOrc1p im Gel-Retardierungs-Experiment an die fp6-DNA bindet. Als Ausgangsmaterial für die Expression von hOrc1p diente die in einen pRSET-B-Expressionsvektor klonierte cDNA, welche von Martina Baack (Uni Konstanz) zur Verfügung gestellt wurde. Da hOrc1p ausschließlich als unlösliches Protein ('inclusion bodies') in Bakterien exprimiert wird, konnte es nur in denaturiertem Zustand in Lösung gebracht werden. Für eine Renaturierung wurde das Protein über seinen aus dem Vektorsystem stammenden aminoterminalen Histidin-Anteil, wie in 3.2.3.6. beschrieben, isoliert und renaturiert (Abb. 4.18A). Abb. 4.18B zeigt ein Gel-Retardierungs-Experiment, das mit his-hOrc1p und markierter fp6-DNA durchgeführt wurde. In der parallel aufgetragenen Reaktion mit nuklearem Extrakt, die wie in Abb. 4.7B durchgeführt wurde, können nach längerer Exposition mindestens 4 Nukleoprotein-Komplexe unterschieden werden. Die bereits in Abb. 4.16 beschriebene Doppelbande (x,y) ist entsprechend gekennzeichnet. Die Mobilität der beiden schneller laufenden Banden entspricht dem Laufverhalten des his-Orc1p/fp6-DNA Komplexes. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in nuklearen Extrakten Proteine vorhanden sind, die mit der fp6-DNA einen ähnlichen Protein-DNA Komplex bilden wie his-hOrc1p.

Zum Nachweis einer spezifischen Protein-DNA Interaktion zwischen his-hOrc1p und der fp6-DNA wurde ein Ansatz nach erfolgter Komplexbildung zusätzlich mit hOrc1p-spezifischen Antikörpern inkubiert. Nach längerer Exposition der Autoradiographie (Abb. 4.18C) lässt sich ein weiterer Protein-DNA Komplex darstellen, der oberhalb der Doppelbande auftaucht. Demnach scheint sich der in Abb. 4.18B beschriebene Nukleoprotein-Komplex tatsächlich aus fp6-DNA und his-Orc1p zusammensetzen. Allerdings kann dies nur bedingt als Beweis gewertet werden, da in Gegenwart von Kontroll-Antikörpern (IgG) keine Protein-DNA

Komplexe gebildet werden. Wahrscheinlich würden Versuche mit rekombinantem hOrc1p, das über das Baculovirus System in Insektenzellen exprimiert wird, eine eindeutigere Aussage zulassen.

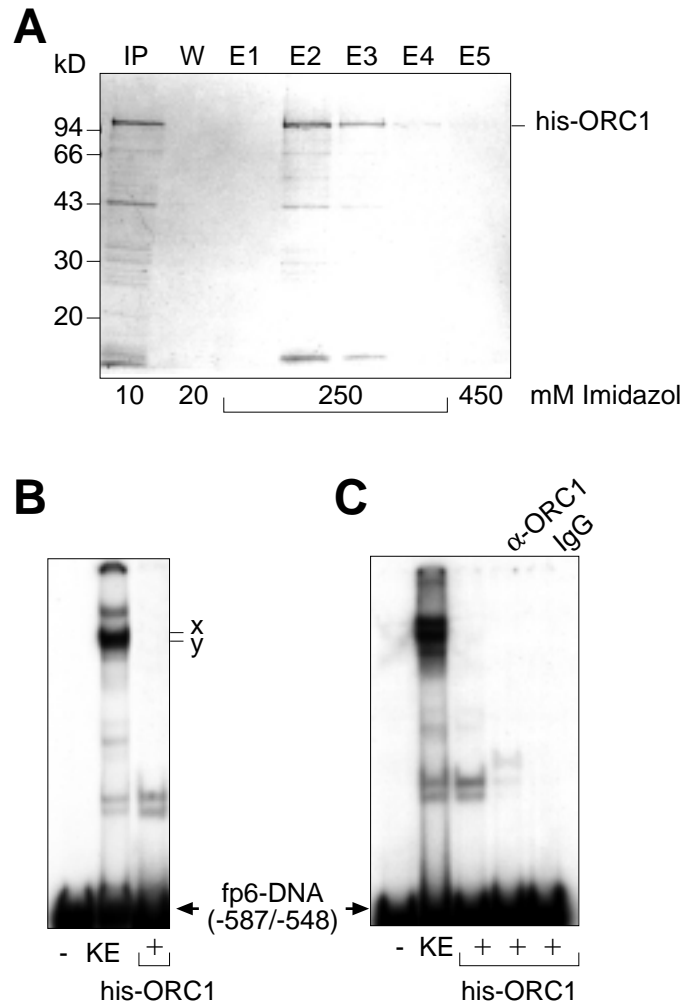


Abb. 4.18 Nukleare Extrakte enthalten Proteine, die mit der fp6-DNA einen identischen Protein-DNA Komplex bilden wie rekombinantes his-hOrc1p.

(A) Das Coomassie-gefärbte SDS-Gel dokumentiert die (partielle) Renaturierung von his-hOrc1p über NiNTA-Agarose, wobei der Auftrag mit 'I', der letzte Waschschritt vor dem Eluieren mit 'W' und die Eluate mit 'E1 - E5' bezeichnet sind. **(B)** Gel-Retardierungsexperiment mit his-hOrc1p und markierter fp6-DNA. Parallel wurde ein Ansatz mit nuklearem Extrakt aufgetragen (Spur 2). **(C)** Supershift-Experiment. Nach erfolgter Bindungsreaktion wurden die Ansätze mit 300 ng hOrc1p-spezifischen Antikörpern (α -ORC1, Spur 4) oder mit Kontroll-Antikörpern (IgG, Spur 5) inkubiert.

Eine andere Möglichkeit, Protein-DNA Wechselwirkungen zu untersuchen, ist das 'South-Western' Experiment. Mit dieser Technik sollte im Folgenden eine spezifische Interaktion zwischen Membran-gebundenem his-hOrc1p und einem markierten PCR-Produkt, das die MCM4-Promoterregion zwischen den Nukleotiden -357 und -643 repräsentiert (vgl. Abb. 4.10), nachgewiesen werden. Dazu wurde rekombinantes, gereinigtes his-hOrc1p und his-hMcm5p verwendet (Abb.

4.19A). his-hMcm5p sollte neben BSA als Negativ-Kontrolle dienen, da frühere Experimente zeigten, dass das Protein im 'South-Western' Experiment keine DNA bindet (Esther Biermann, Diplomarbeit 1999). Das im Versuch verwendete rekombinante his-hMcm5p wurde von Esther Biermann (Uni Konstanz) zur Verfügung gestellt.

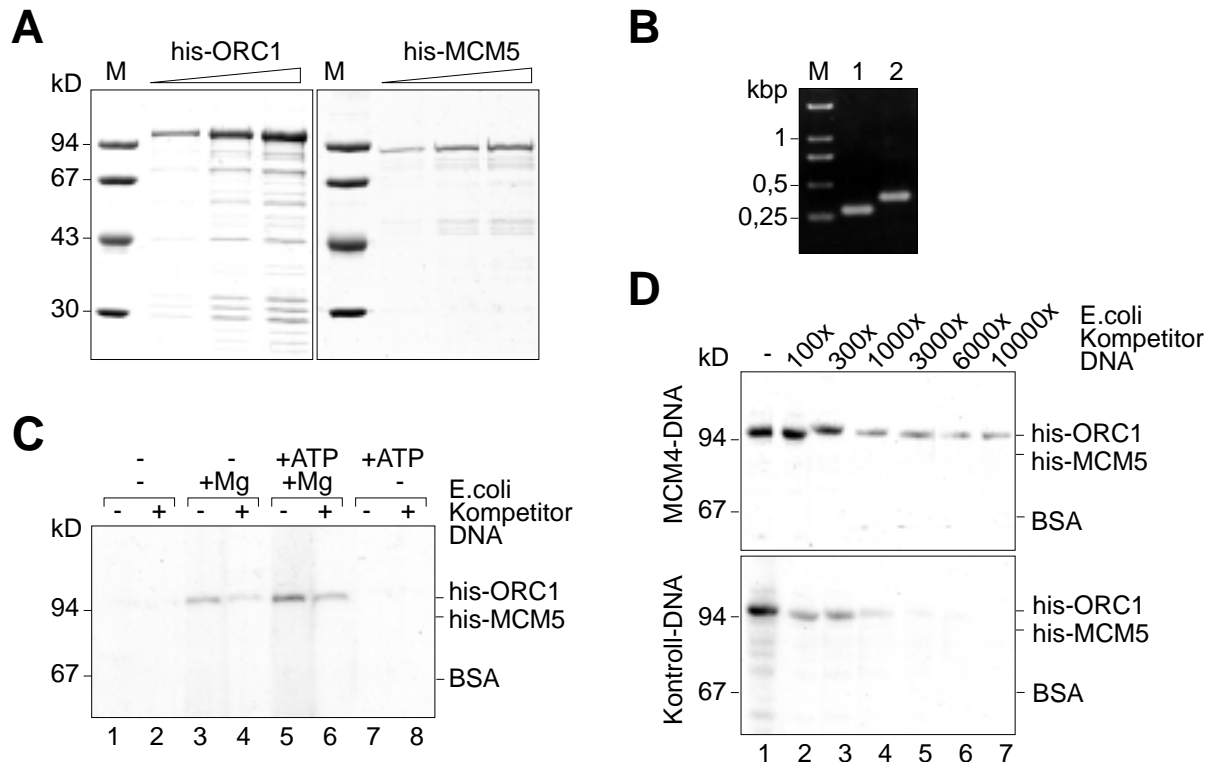


Abb. 4.19 Bindung von his-hOrc1p an den MCM4-Genpromoter im 'South-Western' Experiment.

(A) Verdünnungsreihe der angereinigten 'inclusion bodies' his-hOrc1p und his-hMcm5p im Coomassie-gefärbten 10%igen SDS-Gel. (B) Die aufgereinigten PCR-Produkte der MCM4-Promoter-DNA (1) sowie der Kontroll-DNA (2) im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. (C) 'South-Western' Experiment. Je 0,5 µg his-hOrc1p, his-hMcm5p und BSA wurden pro Spur in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend wurden die Membran-gebundenen Proteine bei sinkenden Guanidinium Hydrochlorid Konzentrationen schrittweise renaturiert (vgl. 3.2.5.4.). Die Bindung erfolgte in Ab- und Anwesenheit eines 1000fachen Überschusses an *E. coli*-Kompetitor-DNA mit 2,5 ng markierter Promoter DNA. Wie angegeben wurde der Ansatz in Gegenwart von ATP ($c_E = 1$ mM) und / oder MgCl₂ ($c_E = 5$ mM) inkubiert. (D) Die Bindung im 'South-Western' Experiment erfolgte, wie unter Abb. 4.19C beschrieben, in Gegenwart von ATP ($c_E = 1$ mM) und MgCl₂ ($c_E = 5$ mM) und wurde mit steigenden Mengen *E. coli*-Kompetitor-DNA durchgeführt. Als markiertes DNA-Substrat wurde entweder MCM4-Promoter-DNA (oben), oder Kontroll-DNA verwendet (unten).

Da aus *S. cerevisiae* bekannt ist, dass die spezifische Bindung von ORC-Proteinen an ARS-Sequenzen ATP-abhängig erfolgt (Bell & Stillman, 1992), wurde zunächst der Einfluss von ATP und MgCl₂ auf die Bindungsreaktion untersucht (Abb. 4.19C). Das Experiment wurde in Ab- und Anwesenheit eines 1000-fachen Überschusses an nicht-markierter *E. coli*-Kompetitor-DNA mit dem in Abb. 4.10 beschriebenen

markierten 287 bp langen Promoterfragment durchgeführt. Wie aus Abb. 4.19C hervorgeht, bindet his-hOrc1p die DNA in Anwesenheit von $MgCl_2$ und Kompetitor-DNA (Abb. 4.19C, Spur 3, 4, 5 und 6). Die Bindung wird durch Zugabe von ATP verstärkt (vgl. Spur 4 und Spur 6). Darum wurden weitere Versuche in Anwesenheit von ATP und $MgCl_2$ durchgeführt.

Um zu zeigen, dass eine sequenzspezifische Bindung vorliegt, wurde das Bindungsverhalten des MCM4-Promoterfragmentes in Gegenwart steigender Mengen *E. coli*-Kompetitor-DNA untersucht. Als Kontrolle wurde eine markierte DNA, die ein 387 bp langes genomisches Fragment, das 6 kb stromabwärts im *MCM4*-Gen lokalisiert ist, präpariert. Die Reinheit der verwendeten DNA-Fragmente wurde im Agarosegel überprüft (Abb. 4.19B). Wie aus Abb. 4.19D (oben) hervorgeht, bleibt die Bindung des MCM4-Promoterfragmentes ab einem 1000 fachen Überschuss an *E. coli*-Kompetitor-DNA konstant (Abb. 4.19B oben, Spur 4 bis 7), während die Bindung der Kontroll-DNA mit zunehmender Kompetitor-Menge unterdrückt wird (Abb. 4.19D, unten). Das Ergebnis zeigt, dass hOrc1p spezifisch mit dem 287 bp langen DNA-Fragment aus dem MCM4-Genpromoter interagiert.

In einem weiterführenden Experiment sollte die Bindung der in Abb. 4.19 verwendeten MCM4-Promoter- und Kontroll-DNA an Proteine aus nuklearen Extrakten im 'South-Western' Experiment untersucht werden. Zunächst wurde nuklearer Extrakt auf einem 5% bis 25%igen Glycerin-Dichtegradienten aufgetrennt und fraktioniert. Im Gegensatz zu Abb. 4.16 wurde der Extrakt direkt auf einen Gradienten mit 420 mM NaCl aufgetragen. Abb. 4.20A zeigt eine Coomassie-Färbung der Proteine in den einzelnen Fraktionen (oben) und einen Immunblot, der mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern analysiert wurde (unten). Die Proteine zeigen ein identisches Sedimentationsverhalten wie in einem Gradienten mit physiologischen Salzkonzentrationen (vgl. Abb. 4.16B).

Für 'South-Western' Analysen (Abb. 4.20B) wurden Proteine der einzelnen Fraktionen auf einem 10%igen SDS Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran-gebundenen Proteine wurden, wie in 3.2.5.4. beschrieben, schrittweise renaturiert und mit markierter Promoter-DNA oder Kontroll-DNA (siehe Abb. 4.19) in Gegenwart von *E. coli*-Kompetitor-DNA (5 μ g / ml) inkubiert. Die Ansätze wurden in An- und Abwesenheit von ATP und $MgCl_2$ durchgeführt. Das in Abb. 4.20B dargestellte Ergebnis zeigt, dass unter den beschriebenen Bedingungen beide DNA-Substrate an zahlreiche Proteine binden. In Anwesenheit von ATP und $MgCl_2$ treten weniger markierte Proteinbanden auf als in Ansätzen ohne ATP und $MgCl_2$. Beide DNA-Substrate unterscheiden sich in ihrer Bindungsspezifität nicht wesentlich, was auf die geringen Mengen an eingesetzter *E. coli*-Kompetitor-DNA zurückzuführen ist. Es ist fraglich, ob in diesem System eine Spezifität der MCM4-Promoter-DNA für hORC-Proteine bei optimierten Kompetitor-

DNA Mengen nachzuweisen wäre. Deshalb wurde dieser Versuchsansatz nicht weiter verfolgt.

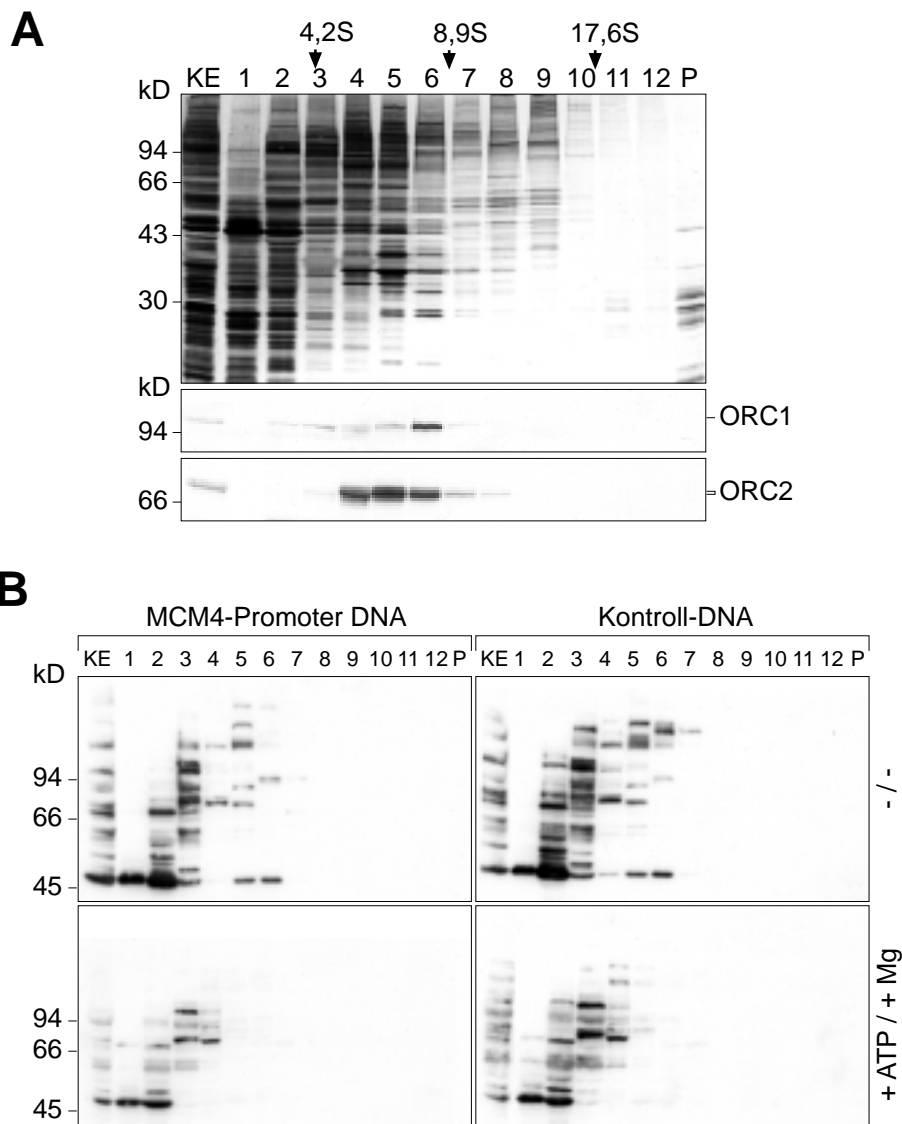


Abb. 4.20 Bindung des MCM4-Promoterfragmentes und einer Kontroll-DNA an Proteine aus nuklearen Extrakten im 'South-Western' Experiment.

Nuklearer Extrakt wurde über einen 5% bis 25%igen Glycerin-Dichtegradienten aufgetrennt und fraktioniert. **(A)** Proteine der einzelnen Fraktionen wurden in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (oben) oder im Immunblot mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern analysiert (unten). **(B)** 'South-Western' Experiment. Der Versuch wurde wie in Abb. 4.19C beschrieben durchgeführt. Als markierte DNA-Substrate dienen die in Abb. 4.19B dargestellten PCR-Produkte.

4.2.3. Analyse von α -Orc2p-präzipitiertem Chromatin im ChIP-Assay

Da bei den bisher gezeigten Experimenten keine überzeugenden Interaktionen von ORC-Proteinen mit Bereichen des MCM4-Genpromoters nachzuweisen waren, sollten durch 'in vivo-crosslinking' Methoden ORC-Bindestellen im humanen Genom identifiziert werden. Diese Technik ist eine in Eukaryoten gängige biochemische Methode um Interaktionen zwischen Proteinen und DNA zu untersuchen (Göhring et al., 1997; Crane-Robinson et al., 1999; Orlando et al., 2000). Dabei werden proliferierende Zellen über einen bestimmten Zeitraum mit Formaldehyd behandelt, was zu einer kovalenten Vernetzung von Proteinen und DNA führt. Das vernetzte Nukleoprotein wird durch mehrfache Waschschriffe sowie über einen CsCl-Stufengradient gereinigt und so von freien nicht-vernetzten Proteinen bzw. Protein-freier DNA und RNA abgetrennt (vgl. 3.2.5.6.). Wird das gereinigte Nukleoprotein durch Sonifizierung oder Behandlung mit Nukleasen in Lösung gebracht, so können durch Immunpräzitationen mit geeigneten Antikörpern Protein-DNA Komplexe gefällt werden. Dies ermöglicht zwei analytische Ansätze: Zum einen können die gefällten Proteine im Immunblot dargestellt werden, andererseits kann die kopräzipitierte DNA über PCR-Techniken untersucht werden.

Da die Dauer der Behandlung der Zellen mit Formaldehyd ausschlaggebend für eine effektive Immunpräzitation ist, wurde zunächst eine Zeitreihe mit steigender crosslinking Dauer durchgeführt. Die gereinigten Nukleoprotein-Komplexe wurden im Coomassie-gefärbten Gel dargestellt und im Immunblot auf die Anwesenheit von hOrc1p und hOrc2p untersucht (Abb. 4.21). Wie erwartet nimmt die DNA-assoziierte Proteinmenge bei längerer Behandlung mit Formaldehyd zu, wobei sich der Anteil an Histon-Proteinen schon bei kurzen crosslinking-Zeiten (2 min) im sättigenden Bereich befindet. Sowohl hMCM-Proteine als auch hORC-Proteine werden bei kurzen crosslinking Zeiten effektiv mit der DNA vernetzt (siehe Ritzi et al., 1998). Bei längeren crosslinking Zeiten taucht eine Abbaubande von hOrc1p auf, was darauf hindeutet, dass entweder hOrc1p durch längere Formaldehydbehandlung degradiert wird oder endogenes partiell abgebautes hOrc1p nur durch längere Formaldehydfixierung vernetzt wird.

Die in Abb. 4.21 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine 2 - 4 minütige Behandlung der Zellen mit Formaldehyd ausreicht, um hORC-Proteine effizient mit genomischer DNA zu vernetzen.

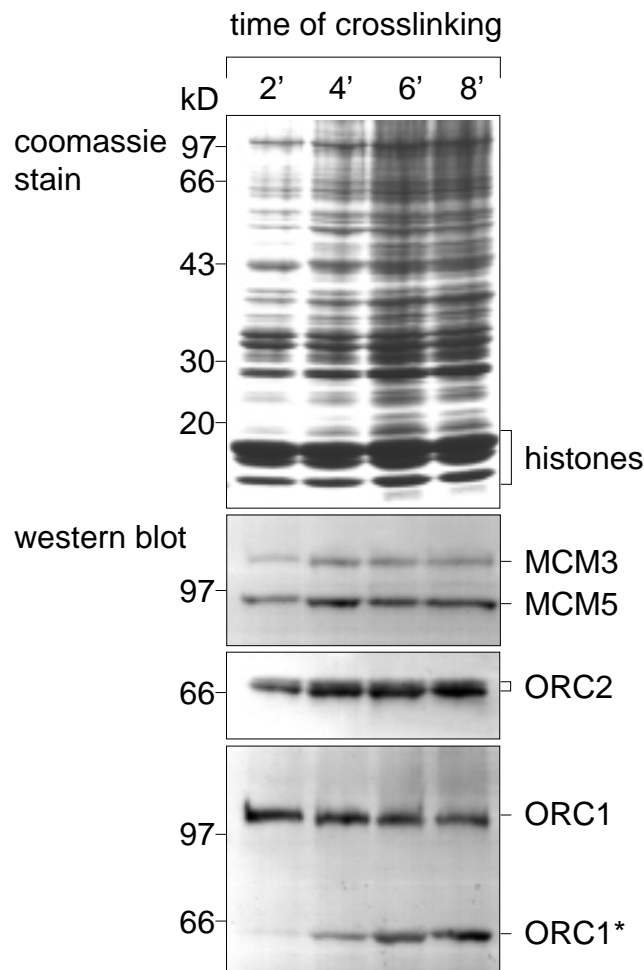


Abb. 4.21 ORC-Proteine werden durch eine kurze Behandlung mit Formaldehyd mit genomischer DNA vernetzt.

HeLa Zellen wurden *in vivo* für 2, 4, 6 und 8 min mit 1% Formaldehyd vernetzt. Die Nukleoproteine wurden über mehrere Waschschriffe und einen CsCl-Stufengradienten aufgereinigt. Aliquote (je 100 µg DNA) wurden in Laemmli-Puffer resuspendiert und in SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie gefärbt (oben) oder im Immunblot mit polyklonalen mono-spezifischen Antikörpern gegen hMcm3p, hMcm5p sowie hOrc1p und hOrc2p analysiert. Bei der mit * gekennzeichneten Bande handelt es sich um ein Abbauprodukt von hOrc1p.

Im Folgenden sollte sonifiziertes Nukleoprotein mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und die gefällten Proteine sowie die kopräzipitierte DNA analysiert werden.

Wie aus Abb. 4.22B hervorgeht, präzipitieren hOrc2p-Antikörper spezifisch und effizient Chromatin, an welches hOrc2p gebunden ist. Im Präzipitat kann auch hOrc1p nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass beide Proteine auf denselben Chromatinfragmenten lokalisiert sind. Ebenso wird mit hOrc1p-Antikörpern Chromatin gefällt, an das hOrc1p und hOrc2p gebunden sind. Wird der Immunblot mit SAF-A-spezifischen Antikörpern analysiert, so kann eine schwache Kopräzipitation mit hOrc1p und hOrc2p nachgewiesen werden. Dies ist insofern interessant, da frühere Untersuchungen zeigten, dass Origin-Regionen häufig mit

SAR/MAR-Elementen assoziiert vorliegen (Boulikas et al., 1996). Um auszuschließen, dass bei der Vernetzung unspezifische Proteinaggregate entstanden sind, wurden Antikörper gegen die Untereinheiten der RNA Polymerase II (Santa Cruz Laboratories) verwendet. RNA-Pol II konnte im Nukleoprotein nachgewiesen werden, wurde jedoch nicht mit hOrc1p- oder hOrc2p-spezifischen Antikörpern koprizipitiert. Daraus kann gefolgert werden, dass hORC-Proteine und die RNA Polymerase II nicht auf denselben Chromatinfragmenten lokalisiert sind.

Weiterhin sollte über konventionelle PCR-Methoden gezeigt werden, ob Bereiche des MCM4-Promoters in der mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern koprizipitierten DNA angereichert sind. Dabei wurden zwei Primerpaare getestet. Ein Paar ist komplementär zu Sequenzen der MCM4-Promoterregion (UPR), ein weiteres Primerpaar ist homolog zu Sequenzen, die 6 kb stromabwärts bei Exon IX des *MCM4*-Gens lokalisiert sind (Abb. 4.22C). Durch das Sonifizieren des Nukleoproteins entstehen DNA-Fragmente die bis zu 8 kb lang sind. Um auszuschließen, dass beide Amplikons auf identischen Chromatinfragmenten vorliegen, wurde das Nukleoprotein mit der Restriktionsendonuklease Nci I verdaut (Abb. 4.22A). Dieses Enzym schneidet mehrfach zwischen, nicht aber in den Amplikons und garantiert so eine Trennung der beiden Sequenzen ohne dabei das DNA-Template zu zerstören. Da durch die Pufferbedingungen des Enzyms 50% des Nukleoproteins ausfällt, wurden die an Protein A-Sepharose-gebundenen Nukleoproteine mit Nci I verdaut und die freigewordene DNA durch weitere Waschschrte abgetrennt. Die mit ORC vernetzte restliche DNA bleibt während des Waschens an der Protein A-Sepharose gebunden und konnte anschließend präpariert und analysiert werden. Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen sind in Abb. 4.22D dargestellt. Die Kontrolle zeigt, dass genomische DNA durch beide Primerpaare mit derselben Effizienz amplifiziert wird. Wird Template-DNA eingesetzt, die aus Chromatin präpariert wurde, das mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurde, so erhält man nur unter Verwendung des UPR Primerpaars ein positives Signal, nicht aber bei den Exon 9 Primern. Daraus ergibt sich, dass hOrc2p spezifisch mit DNA aus dem MCM4-Promoter vernetzt wird, nicht aber mit DNA der Exon 9 Region des *MCM4*-Gens.

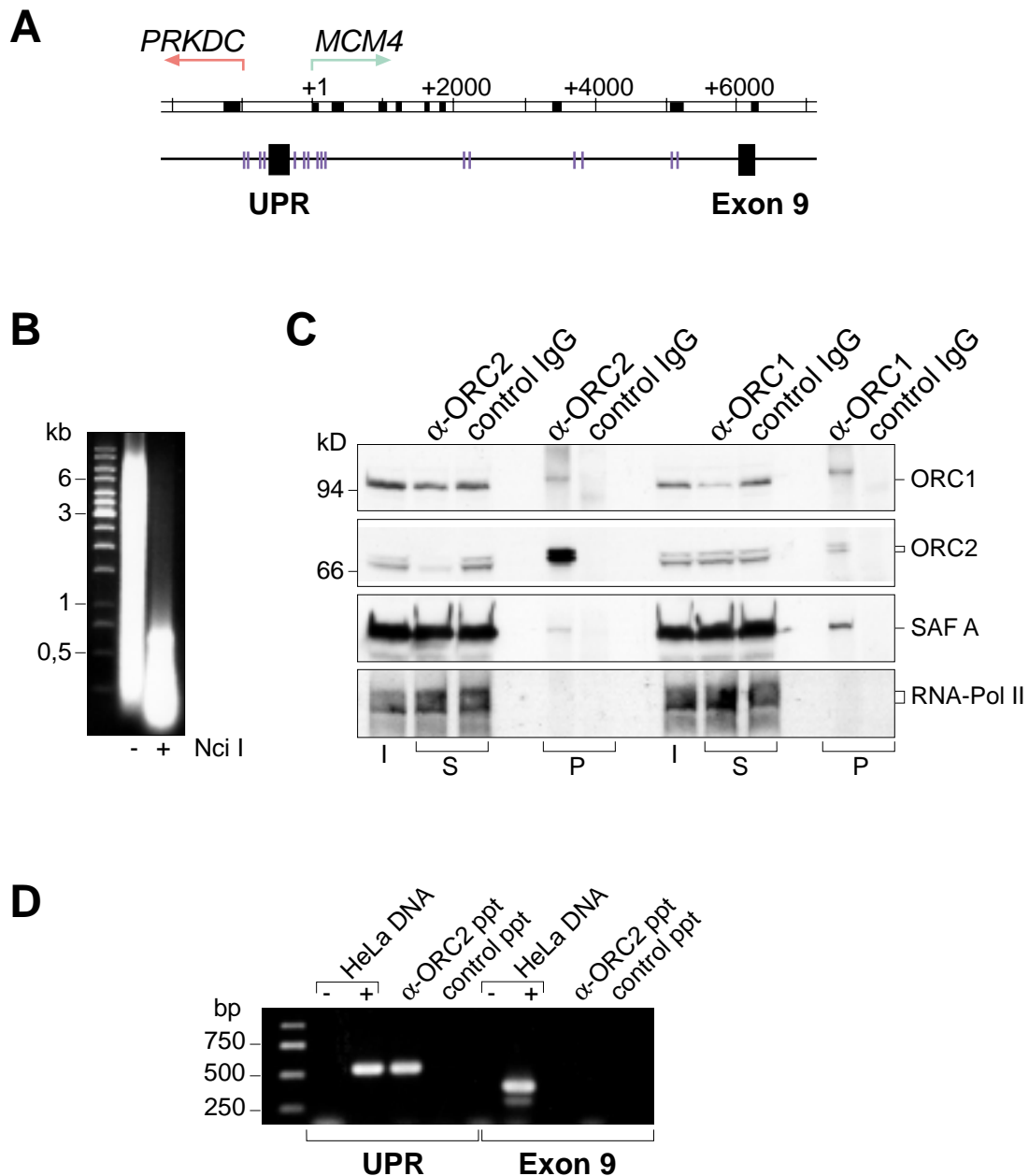


Abb. 4.22 hOrc2p assoziiert spezifisch mit der Promoterregion (UPR) des *MCM4*-Gens.

(A) Genomische Organisation. Doppellinie: Exons sind als schwarze Boxen hervorgehoben; Pfeile geben den Startpunkt und die Richtung der Transkription an. Einfache Linie: Die Boxen geben die Lage der amplifizierten PCR-Produkte an, vertikale Linien zeigen Schnittstellen des Restriktionsenzym Nci I. **(B)** DNA aus sonifiziertem Nukleoprotein vor (-) und nach (+) Verdau mit Nci I. **(C)** Immunpräzipitation von Nci I-verdautem Nukleoprotein mit hOrc2p-spezifischen (α -ORC2), hOrc1p-spezifischen (α -ORC1) und Kontroll (IgG) -Antikörpern. Die Aufträge (I), Überstände (S) und die Präzipitate (P) wurden im Immunblot mit hOrc1p- und hOrc2p- spezifischen Antikörpern sowie mit Antikörpern gegen den Scaffold Attachment Factor-A (SAF-A) und die großen Untereinheiten der RNA Polymerase II analysiert. **(D)** PCR-Analyse. UPR, Primerpaar komplementär zu Sequenzen des *MCM4*-Promoters. Exon 9, Primer komplementär zu Exon IX. HeLa DNA, PCR mit genomischer DNA als Template (+) oder ohne (-) DNA. α -ORC2 ppt, Template-DNA präpariert aus Chromatin, das mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurde. Kontroll-ppt, DNA präpariert aus Ansätzen mit unspezifischen Kontroll-Antikörpern (IgG).

4.2.4. Standardisierung des ChIP-Assays durch Verdau des Nukleoproteins mit Nuklease S7 (MNase).

Die in Abb. 4.22 gezeigten Daten bilden die Grundlage für weitere Experimente. Dabei sollte ein größerer genomischer Bereich um den MCM4-Genpromoter durch unterschiedliche Amplikons im ChIP-Assay analysiert werden. Das gereinigte Nukleoprotein sollte nun mit einer unspezifischen Nuklease auf geeignete DNA-Fragmentlängen reduziert werden, da sequenzspezifisch schneidende Restriktionsendonukleasen, wie beispielsweise Nci I, unterschiedliche Schnittfrequenzen zwischen und in den Amplikons aufweisen könnten. In Abb. 4.23 ist eine Titration dargestellt, bei der gereinigtes Nukleoprotein mit steigenden Mengen S7 Nuklease (MNase) verdaut und im Agarosegel analysiert wurde. Wird das verdaute Material mit dem UPR Primerpaar amplifiziert, zeigt sich mit zunehmender Reduktion der DNA-Fragmentlängen eine Abnahme der Effizienz der PCR-Reaktionen (Abb. 4.23B). Für weitere Versuche wurde 1 mg Nukleoprotein mit 10 u MNase bei einer Konzentration von 2 µg DNA / µl verdaut.

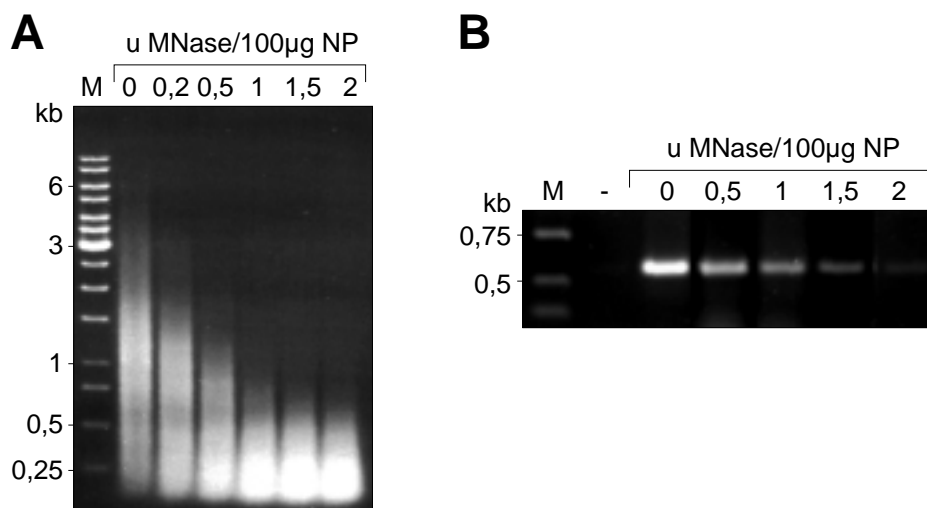


Abb. 4.23 Die Effizienz von PCR-Reaktionen mit dem UPR Primerpaar ist abhängig von der DNA-Fragmentlänge des Nukleoproteins.

(A) Titration: 100 µg Nukleoprotein (NP) wurde bei einer Konzentration von 2 µg DNA / µl mit steigenden Mengen MNase (0,2 u; 0,5 u; 1 u; 1,5 u; 2 u) verdaut. Jeweils 15 µg des Proteinase K verdauten Ansatzes wurde im Agarosegel aufgetrennt und analysiert. **(B)** Je 100 ng aufgereinigte DNA des verdauten Materials wurden mit dem UPR Primerpaar in 30 PCR-Zyklen amplifiziert.

Der in Abb. 4.22 beschriebene Versuch wurde mit MNase-verdaulichem Nukleoprotein wiederholt, wobei die DNA-Fragmente des Chromatins auf eine Länge zwischen 0,25 und 1 kb reduziert wurden (Abb. 4.24A). Zusätzlich zu den hOrc1p- und hOrc2p-Antikörpern wurde das MNase-behandelte Material mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern und unspezifischen Kontroll-Antikörpern inkubiert. Frühere Arbeiten zeigten, dass hMcm3p-spezifische Antikörper Chromatin präzipitieren, welches mit MCM-Proteinen vernetzt ist (Ritzi et al., 1998). Wie aus Abb. 4.24B hervorgeht, präzipitieren hMcm3p-spezifische Antikörper, nicht aber die Kontroll-Antikörper, Chromatin-Fragmente, an denen alle sechs MCM-Proteine assoziiert vorliegen. Zudem kann ein geringer Anteil hOrc2p kopräzipitiert werden.

Wird MNase-verdaulichem Nukleoprotein mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern präzipitiert und das gefällte Chromatin im Immunblot mit hOrc1p- und hOrc2p-Antikörpern analysiert (Abb. 4.24C), so können auch unter diesen Versuchsbedingungen Kopräzipitationen beider Proteine gezeigt werden. hMcm5p ist in keinem der beiden Präzipitate nachweisbar.

Analysiert man die mit hOrc1p- und hOrc2p-Antikörpern kopräzipitierte DNA mit den in Abb. 4.22C beschriebenen Primerpaaren, so erhält man nur mit dem UPR Primerpaar positive Signale, nicht aber bei den Exon 9 Primern (Abb. 4.24D). DNA, welche aus Chromatin präpariert wurde, das mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern gefällt wurde, gibt bei beiden Primerpaaren ein positives Signal. Da nur ein Fünftel der PCR-Ansätze im Gel aufgetrennt wurde, ist die Intensität der Banden schwächer als bei dem in Abb. 4.22 beschriebenen Versuch. Das Experiment zeigt, dass unabhängig von der eingesetzten Nuklease, eine spezifische Assoziation von hOrc1p und hOrc2p mit den UPR-Sequenzen des MCM4-Promoters nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz dazu scheint hMcm3p mit beiden untersuchten DNA-Regionen zu interagieren.

4.2.5. Bestimmung von ChIP-DNA-Mengen durch quantitative 'real time' PCR

Um eine Aussage über die genaue Verteilung von Proteinen über einen größeren genomischen Bereich treffen zu können, war es notwendig die Mengen der im ChIP-Assay kopräzipitierten DNA in den einzelnen PCR-Ansätzen zu bestimmen. In früheren Untersuchungen wurden zur Bestimmung von Template-DNA-Mengen kompetitive PCR-Techniken angewendet (Giacca et al., 1994). In dieser Arbeit wurden solche Quantifizierungen im sogenannten 'Light Cyler' (LightCyler instrument, Roche Diagnostics) über 'real time' PCR durchgeführt. Die Vorteile dieser Technik beruhen darauf, dass keine spezifischen Kompetitor-DNA Sequenzen hergestellt werden müssen. Zudem können verschiedene Amplikons in relativ kurzer Zeit mit hoher Sensitivität quantifiziert werden.

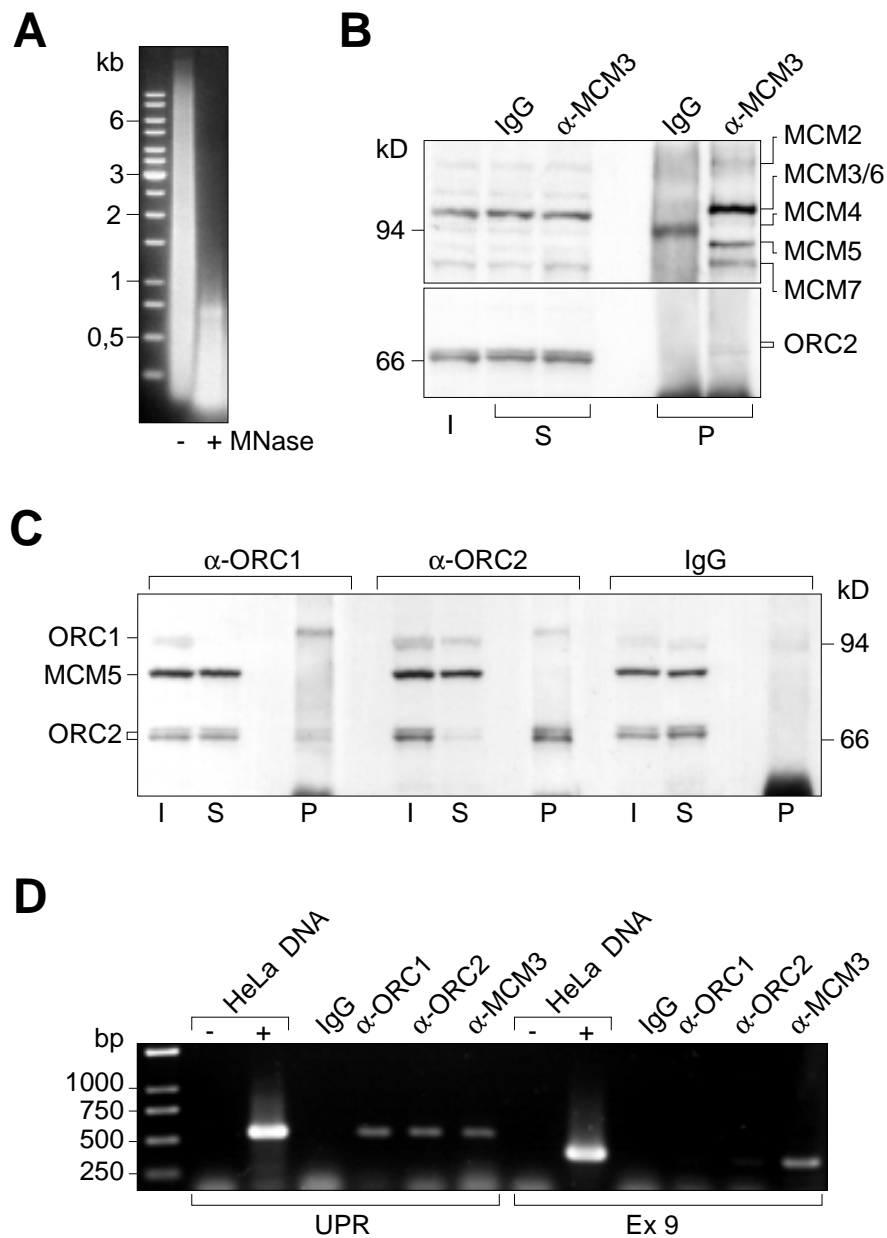


Abb. 4.24 hOrc2p und hOrc1p assoziieren spezifisch mit der Promoterregion (UPR) des *MCM4*-Gens.

(A) DNA aus Nukleoprotein vor (-) oder nach (+) Behandlung mit MNase. **(B)** Immunpräzipitation von MNase-behandeltem Nukleoprotein mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern (α -MCM3) und mit unspezifischen Kontroll-Antikörpern (IgG). Auftrag (I), Überstände (S) und Präzipitate wurden mit DEFD-Antikörpern und hOrc2p-spezifischen Antikörpern im Immunblot analysiert. Der DEFD-Antikörper ist gegen ein konserviertes Polypeptid gerichtet, das in allen MCM-Proteinen vorkommt. **(C)** MNase-verdautes Nukleoprotein wurde mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern sowie mit unspezifischen Kontroll-Antikörpern (IgG) immunpräzipitiert und im Immunblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. **(D)** Die kopräzipitierte DNA wurde unter Verwendung der in Abb. 4.22 beschriebenen Primerpaare mit konventioneller PCR analysiert. HeLa DNA, PCR-Reaktionen ohne (-) oder mit (+) genomischer DNA als Template dienten als Kontrolle. Mit folgenden Antikörpern wurde präzipitiert: Kontroll-Antikörper (IgG), α -ORC1, α -ORC2 und α -MCM3.

Eine PCR-Reaktion zeichnet sich durch ein typisches Reaktionsprofil aus (Abb. 4.25A). Die Menge der PCR-Produkte nimmt nach den ersten Zyklen logarithmisch zu und erreicht dann ein Plateau. Dabei beginnt die logarithmische Phase der Reaktion in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Template-DNA. Der methodische Ansatz der 'real time' PCR besteht darin, dass das Reaktionsprofil einer PCR-Reaktion über einen fluoreszierenden Farbstoff dokumentiert wird. In dieser Arbeit wurde das 'FastStart DNA Master SYBR Green I' System (Roche Diagnostics) verwendet. Der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green I bindet an die kleine Rinne der DNA-Doppelhelix und fluoresziert in gebundenem Zustand, wobei die Intensität der Fluoreszenz mit der DNA-Menge im Ansatz korreliert.

Für quantitative Analysen wird eine Verdünnungsreihe von genomischer DNA mit bekannten Konzentrationen erstellt und mit entsprechenden Primerpaaren amplifiziert. Nach der PCR berechnet die Light Cycler Software die Kopienanzahl der Proben, indem für jede Standardreaktion der Schnittpunkt der logarithmischen Fluoreszenz mit der Baseline gebildet wird. Diese Schnittpunkte werden gegen die logarithmischen Konzentrationen der Standards aufgetragen, wodurch eine lineare Regressionsgerade als Standardkurve berechnet wird. Parallel werden identische PCR-Ansätze mit DNA aus immunpräzipitiertem Chromatin als Template durchgeführt. Die Konzentrationen der spezifischen DNA-Sequenzen werden durch Extrapolation mit der Standardkurve bestimmt.

Um auszuschließen, dass unspezifisch amplifizierte Produkte bei Quantifizierungen berücksichtigt werden, erfolgt nach jeder PCR-Reaktion eine Schmelzkurven-Analyse. Dabei wird zunächst in einem Test-Ansatz der spezifische Schmelzpunkt eines PCR-Produktes bestimmt (Abb. 4.25). Abb. 4.25A zeigt exemplarisch das Reaktionsprofil von zwei 'real time' PCR-Reaktionen, die mit Primern, welche komplementär zu Sequenzen im Intron VII des *PRKDC*-Gens sind (In 7; vgl. Tab 3.1.D), in Gegenwart von genomischer DNA (durchgezogene Linie) oder H₂O (gestrichelte Linie) durchgeführt wurden. Beide Reaktionen zeigen ab einer bestimmten Zyklenzahl eine DNA-Amplifikation, wobei die Produkte mit H₂O bei späteren Zyklen entstehen. Für die Schmelzkurven-Analyse werden die Proben auf 65°C abgekühlt, so dass die doppelsträngig vorliegende DNA maximal fluoresziert. Durch allmähliches Erhitzen wird die DNA denaturiert und schmilzt bei einer für das Produkt charakteristischen Temperatur. Die Abnahme der Fluoreszenz beim Schmelzpunkt kann über das SYBR Green I dokumentiert werden (Abb. 4.25B). Bildet man die erste Ableitung der Schmelzkurve, so können die exakten Schmelzpunkte der Produkte bestimmt werden (Abb. 4.25C). Es zeigt sich, dass bei der Reaktion mit H₂O ein deutlich niedrigerer Schmelzpunkt vorliegt, was typisch für so genannte Primerdimere ist. Solche Produkte sollten bei Quantifizierungen nicht berücksichtigt werden. Abb. 4.25D zeigt das Schmelzprofil einer Quantifizierung mit denselben Primerpaaren (In 7) die in Abb. 4.25A, B und C unter-

sucht wurden. Bei der Bestimmung der Kopienanzahl wurden nur Produkte berücksichtigt, die einen für das Amplikon charakteristischen Schmelzpunkt besitzen.

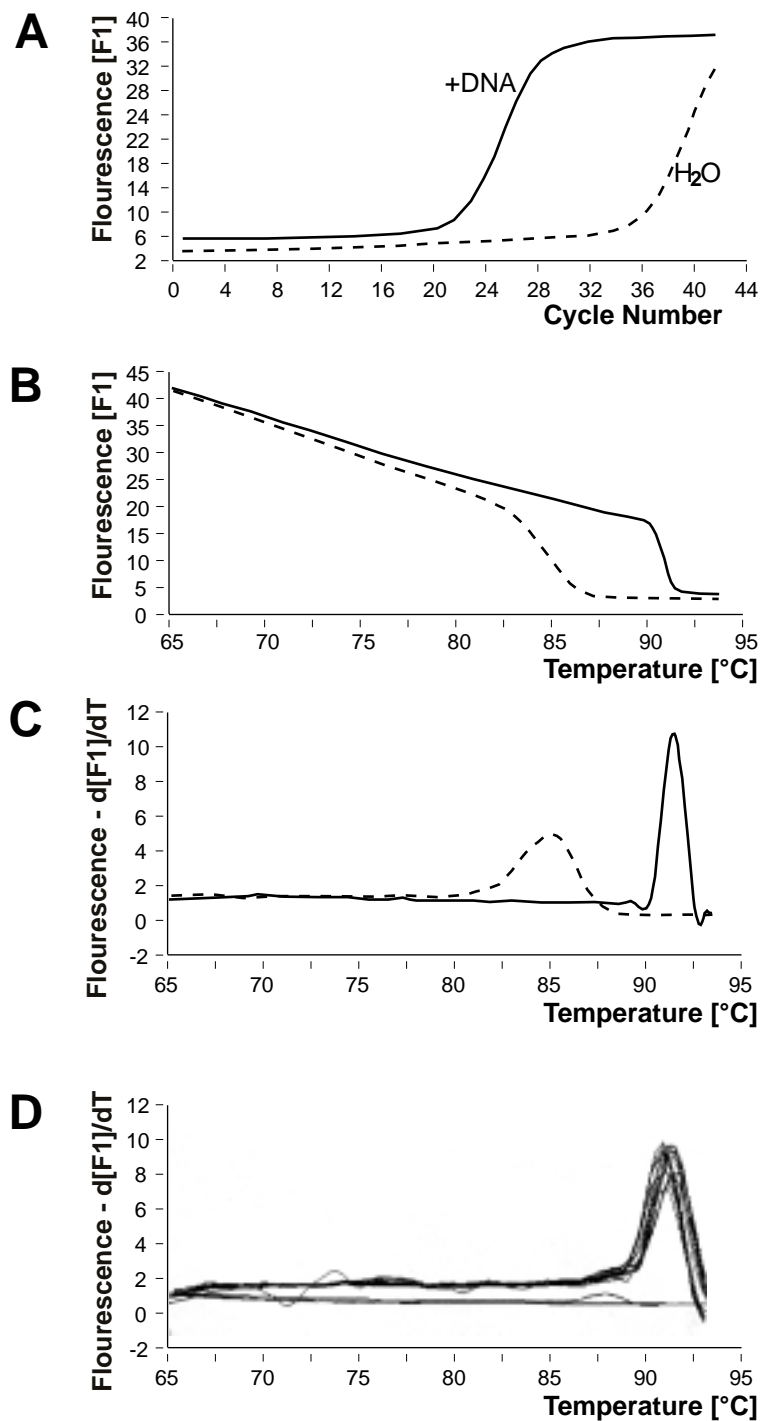


Abb. 4.25 Schmelzkurven-Analyse von PCR-Produkten mit dem LightCycler System.

(A) Reaktionsprofil von zwei 'real time' PCR-Reaktionen, die mit In 7 Primern (vgl. Tab. 3.1.D) in Gegenwart von genomischer DNA (durchgezogene Linie) oder mit H₂O (gestrichelte Linie) durchgeführt wurden. (B) Schmelzkurve der entstandenen PCR-Produkte. (C) Bestimmung der Schmelztemperatur der Produkte, indem die erste Ableitung der Schmelzkurve gebildet wurde. (D) Schmelzprofil einer Quantifizierungsreaktion mit dem unter (A), (B) und (C) beschriebenen Primerpaar.

In Abb. 4.26 ist das Reaktionsprofil von zwei quantitativen ‘real time’ PCR-Reaktionen dargestellt. Dabei wurden ca. 0,1 ng DNA aus immunpräzipitiertem Chromatin einerseits mit dem Primerpaar UPR (UPR für ‘upstream promoter region’), das homolog zu Sequenzen des MCM4-Promoters ist (Abb. 4.26A), andererseits mit einem Primerpaar das komplementär zu Sequenzen des Exon VII des *MCM4*-Gens ist, amplifiziert und quantifiziert (Fig.26B). In der mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern präzipitierten Probe wurden für das UPR Primerpaar ungefähr 2000 Kopien bestimmt und weniger als 10 Kopien mit dem Exon 7 Primerpaar. Demnach sind in der mit hOrc2p-Antikörpern kopräzipitierten DNA die MCM4-Promoter-Sequenzen gegenüber einer Kontroll-Region, die bei Exon VII im *MCM4*-Gen lokalisiert ist, stark angereichert.

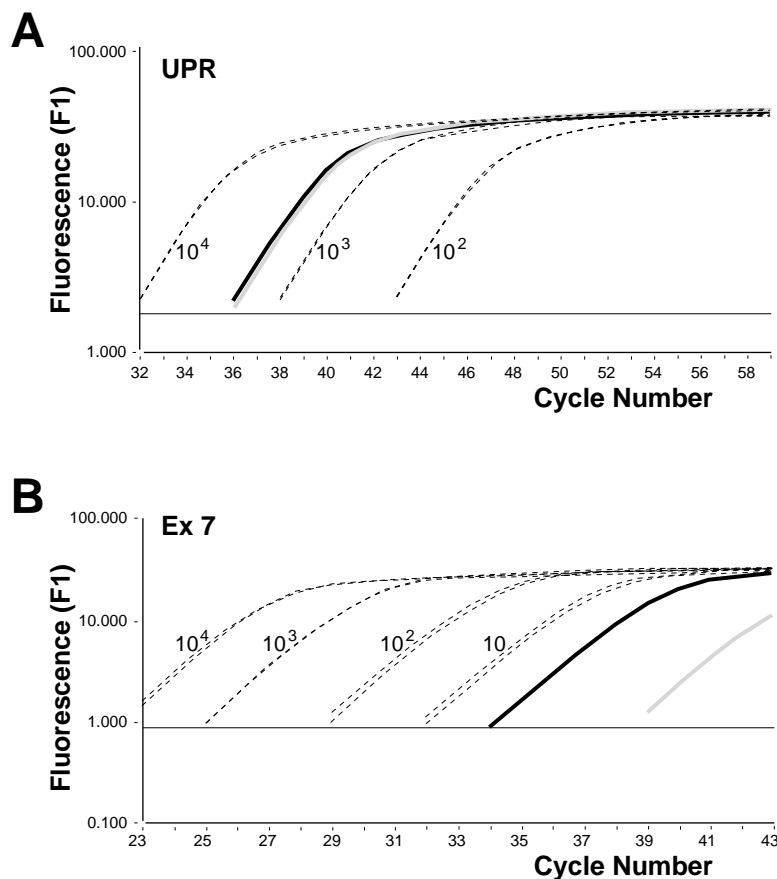


Abb. 4.26 Quantitative PCR.

Gestrichelte Linien, zwei Verdünnungsreihen genomischer HeLa DNA. Die Verdünnungen basieren darauf, dass 30 ng DNA 10^4 Genomäquivalenten entsprechen. Die x-Achse gibt die Anzahl der PCR-Zyklen an, die y-Achse entspricht der gemessenen Fluoreszenz. Dicke Linien: Template-DNA, die aus Chromatin präpariert wurde, das mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurde. **(A)** PCR-Primer komplementär zur MCM4-Promoterregion (UPR). **(B)** PCR-Primer (Ex 7) komplementär zu Exon VII Sequenzen des *MCM4*-Gens.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob hOrc1p-spezifische Antikörper ebenso wie hOrc2p-Antikörper Chromatinfragmente präzipitieren, in welchen die MCM4-Promotersequenz angereichert vorliegt. Zudem sollte die mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern kopräzipitierte DNA analysiert werden. In diesen Experimenten wurden zusätzlich zu denen in Abb. 4.26 beschriebenen Primerpaaren weitere Primer verwendet, die komplementär zu Sequenzen der benachbarten Gene sind (Abb. 4.27A).

Die Ergebnisse von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zeigen (Abb. 4.27B), dass hOrc1p-Antikörper und hOrc2p-Antikörper bevorzugt Chromatinfragmente präzipitieren, welche DNA der MCM4-Promoterregion enthalten. Die mit hMcm3p-Antikörpern kopräzipitierte DNA scheint in derselben Region angereichert zu sein. Demnach kann aus den gezeigten Daten geschlossen werden, dass sowohl hOrc1p und hOrc2p als auch hMcm3p spezifisch mit der UPR-Region zwischen den divergent transkribierten Genen *MCM4* und *PRKDC* assoziiert vorliegen.

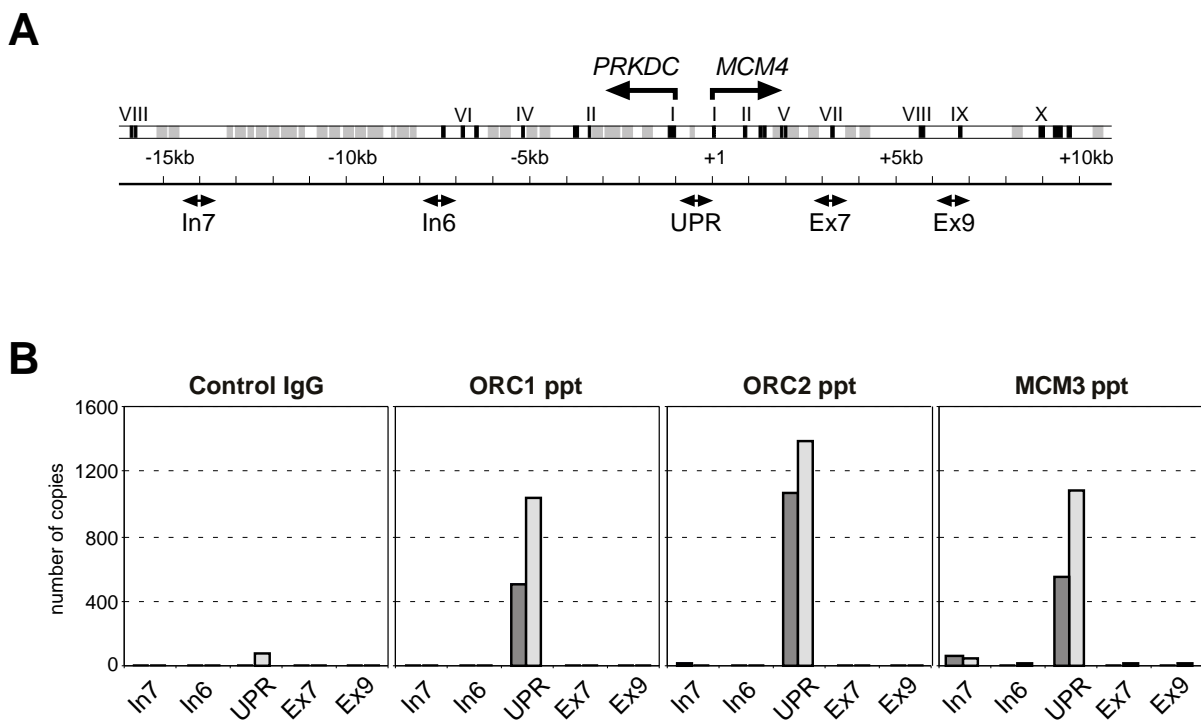


Abb. 4.27 Die MCM4-Promoterregion ist in hOrc1p- und hOrc2p-präzipitiertem Chromatin angereichert.

(A) Schematische Darstellung der genomischen Organisation der divergent transkribierten Gene *PRKDC* und *MCM4*. Schwarze Boxen: Exons; graue Boxen: repetitive Elemente; Doppelpfeile: Sequenzen, die komplementär zu den verwendeten Primerpaaren sind (siehe Tab.3.1.D). (B) Quantitative 'real time' PCR bei der aus Chromatin präparierte Template-DNA verwendet wurde, die mit unspezifischen Kontroll-Antikörpern (IgG) oder mit hOrc1p-, hOrc2p-, und hMcm3p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurde.

4.2.6. ChIP-Assay mit Nukleoprotein aus synchronisierten Zellen

Die bisherigen Versuche wurden mit asynchron proliferierenden HeLa S3 Zellen durchgeführt. Frühere Arbeiten zeigten, dass sich die Zusammensetzung des ORC-Komplexes während der S-Phase verändert, da hOrc1p vom Chromatin dissoziiert (Kreitz et al., 2000). Deshalb war es von Interesse, Chromatinpräparationen aus Zellen der G1-Phase und S-Phase zu vergleichen, um festzustellen, ob sich die Lokalisation von hOrc1p und hOrc2p in den verschiedenen Zellzyklus-Phasen unterscheidet. Dazu wurde Nukleoprotein aus G1-Phase Zellen und S-Phase Zellen präpariert und mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern präzipitiert.

Die im Immunblot dargestellten Daten zeigen (Abb. 4.28A), dass hOrc1p und hOrc2p effizient mit Chromatin aus G1-Phase Zellen präzipitiert werden können. Untersuchungen mit Chromatin aus S-Phase Zellen ergaben, dass hOrc1p nicht im Nukleoprotein nachweisbar ist und somit auch nicht gefällt werden kann. hOrc2p ist jedoch sowohl in Immunpräzipitaten von Chromatin aus G1-Phase Zellen als auch aus S-Phase Zellen nachweisbar.

Weiterhin wurde die kopräzipitierte DNA über quantitative 'real time' PCR analysiert. Dabei wurden drei zusätzliche Primerpaare verwendet, die komplementär zu Sequenzen sind, die näher bei der MCM4-Promoterregion lokalisiert sind und somit eine genauere Eingrenzung der Binderegion zulassen (Abb. 4.28B). Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten zeigen, dass in G1-Phase Chromatin hOrc1p und hOrc2p an die MCM4-Promoterregion binden, wohingegen in S-Phase Chromatin ausschließlich hOrc2p mit der Promoter-DNA assoziiert vorliegt (Abb. 4.28C). Ein weiterer Aspekt der in Abb. 4.28C gezeigten Daten sind die Ergebnisse der Quantifizierungen mit den Primerpaaren In1 und Ex2. Beide Amplikons weisen eine kurze Distanz (0,7 und 1 kb) zu der UPR Region auf. So präzipitieren hOrc1p- und hOrc2p-Antikörper Chromatinfragmente aus G1-Zellen die UPR- und Ex2-Sequenzen enthalten. In S-Phase Chromatin, das mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurde, sind jedoch UPR- und zusätzlich In1-Sequenzen angereichert. Demnach scheint sich die Lokalisation von hOrc2p während der S-Phase geringfügig zu verändern. Unabhängig davon zeigen die Experimente, dass bei einem Amplikonabstand von 0,7 – 1 kb eine für die ChIP-Technik limitierende Auflösung erreicht wird. Die Binderegion von hOrc1p und hOrc2p konnte somit eindeutig auf die UPR-Sequenzen eingegrenzt werden.

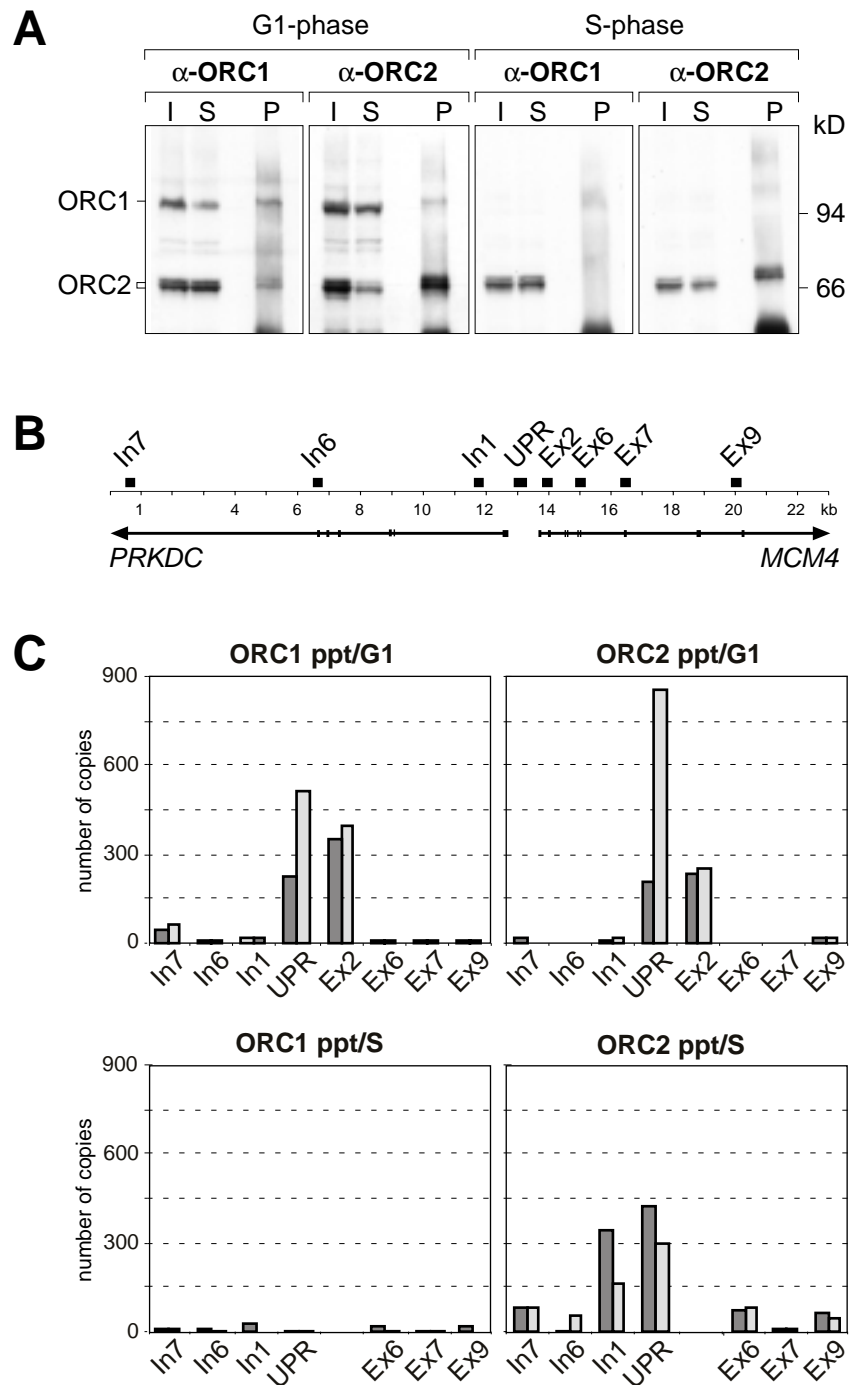


Abb. 4.28 S-Phase Chromatin enthält kein hOrc1p.

(A) MNase-verdautes Nukleoprotein aus G1-Phase Zellen und S-Phase Zellen wurde mit hOrc1p-Antikörpern oder mit hOrc2p-Antikörpern immunpräzipitiert. Auftrag (I), Überstände (S) und Präzipitate (P) wurden im Immunblot mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern analysiert. (B) Schematische Darstellung der untersuchten genomischen Region. Die Positionen der Amplikons sind durch schwarze Boxen hervorgehoben. (C) Quantifizierung der DNA, die aus immunpräzipitiertem Chromatin präpariert wurde, das einerseits aus G1-Phase Zellen (oben) oder S-Phase Zellen (unten) gewonnen wurde. Die Abbildung zeigt zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Die Bindung der MCM-Proteine an Chromatin ist ähnlich wie die Chromatinbindung von hOrc1p Zellzyklus-abhängig reguliert (siehe 1.3.2.4.). Deshalb wurde Nukleoprotein aus G1-Phase Zellen und S-Phase Zellen präpariert und mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern sowie mit Kontroll-Antikörpern (IgG) präzipitiert (Abb. 4.29).

Bei der Untersuchung im Immunblot mit hOrc1p-, hOrc2p- und hMcm5p-spezifischen Antikörpern (Abb. 4.29A) ergab sich folgendes Ergebnis: Werden die Mengen an vernetztem hOrc2p und hMcm5p miteinander verglichen, so ist bei Nukleoproteinpräparationen von G1-Phase Zellen mehr hMcm5p an die DNA gebunden als hOrc2p, wohingegen bei S-Phase Chromatin gleiche Mengen vernetzt vorliegen. Demnach scheinen in S-Phase Zellen geringere Anteile von MCM-Proteinen Chromatin-gebunden vorzuliegen als in G1-Phase Zellen. Dieses Ergebnis ist aufgrund früherer Arbeiten zu erwarten, die zeigten, dass sich hMCM-Proteine während der S-Phase vom Chromatin ablösen (Todorov et al., 1995; Krude et al., 1996). Analysiert man die Präzipitate im Immunblot mit hMcm5p-spezifischen Antikörpern, so zeigt sich, dass sowohl in S-Phase Chromatin als auch in G1-Phase Chromatin hMcm5p mit hMcm3p-Antikörpern kopräzipitiert werden kann. Die Menge an kopräzipitiertem hMcm5p ist bei Fällungen mit S-Phase Chromatin geringer als bei Nukleoprotein aus G1-Phase Zellen.

In Abb. 4.29B sind die Ergebnisse der quantitativen 'real-time' PCR dargestellt, bei der die mit hMcm3p-Antikörpern oder Kontroll-Antikörpern (IgG) kopräzipitierte DNA als Template-DNA eingesetzt wurde. Bei Präparationen aus G1-Phase Zellen ergab sich, dass in Chromatin, das mit hMcm3p-Antikörpern präzipitiert wurde, DNA-Sequenzen der UPR-Region und der Ex2-Region gegenüber benachbarten Regionen angereichert sind. Die Daten zeigen, dass in G1-Phase Zellen hMcm3p ebenso wie hOrc1p und hOrc2p spezifisch mit der MCM4-Promoterregion assoziiert vorliegt. Dies deutet auf eine Kolo-kalisation von ORC-Proteinen und MCM-Proteinen während der G1-Phase hin. Entsprechend der im Immunblot dargestellten Mengen an kopräzipitiertem hMcm5p ist bei Präparationen aus S-Phase Zellen die Menge an kopräzipitierter DNA geringer als bei Experimenten mit G1-Phase Zellen. Zudem scheinen die Sequenzen über einen größeren genomischen Bereich angereichert zu sein, was auf eine Veränderung der Lokalisation von hMcm3p während der S-Phase hindeutet.

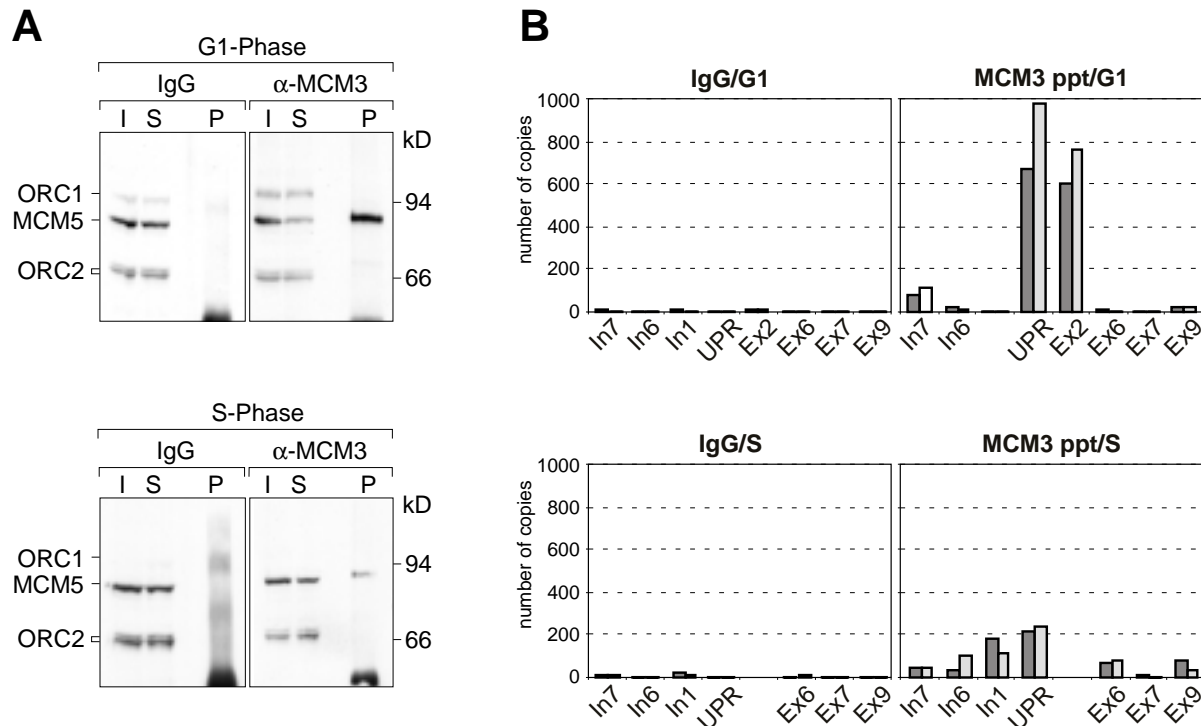


Abb. 4.29 Die Lokalisation von hMcm3p verändert sich während der S-Phase.

(A) MNase verdautes Nukleoprotein aus G1-Phase und S-Phase Zellen wurde mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern (α-MCM3) oder unspezifischen Kontroll-Antikörpern (IgG) präzipitiert. Auftrag (I) Überstand (S) und die Präzipitate (P) wurden im Immunblot mit hMcm5p-, hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern analysiert. (B) Quantifizierung der DNA, die aus immunpräzipitiertem Chromatin präpariert wurde, das einerseits aus G1-Phase Zellen (oben) oder S-Phase Zellen (unten) gewonnen wurde. Es sind zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente dargestellt.

4.2.7. Nachweis einer Origin-Aktivität im MCM4-Genpromoter

Da aus *S. cerevisiae* bekannt ist, dass ORC an die Startstellen der DNA Replikation bindet, sollte im Folgenden untersucht werden ob die hOrc1p/hOrc2p-Bindestelle im MCM4-Genpromoter auch als Origin aktiv ist. Dazu wurde der sogenannte 'nascent strand abundance assay' durchgeführt (Giacca et al., 1997). Der Versuch basiert auf der Annahme, dass einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 1 kb vorzugsweise in der Nähe von Replikationsstartstellen auftreten, da Vorwärts-Stränge von fortgeschritteneren Replikationsgabeln wesentlich länger sind und Rückwärts-Stränge aus Okazaki-Fragmenten bestehen, die eine Länge von 100 – 200 bp aufweisen.

Die untersuchte 'nascent DNA' wurde von Christian Keller (Uni Konstanz) zur Verfügung gestellt, wobei der Versuchsablauf schematisch in Abb. 4.30A dargestellt ist. Zunächst wird genomische DNA aus proliferierenden HeLa S3 Zellen präpariert, anschließend durch Erhitzen denaturiert und dann über einen Sucrose Gradienten fraktioniert. Durch das parallele Auftrennen eines Größenmarkers in einem identischen Gradienten wird die durchschnittliche Länge der DNA der

einzelnen Fraktionen bestimmt und die 1 – 2 kb Fraktion als Template in quantitativen PCR-Reaktionen eingesetzt.

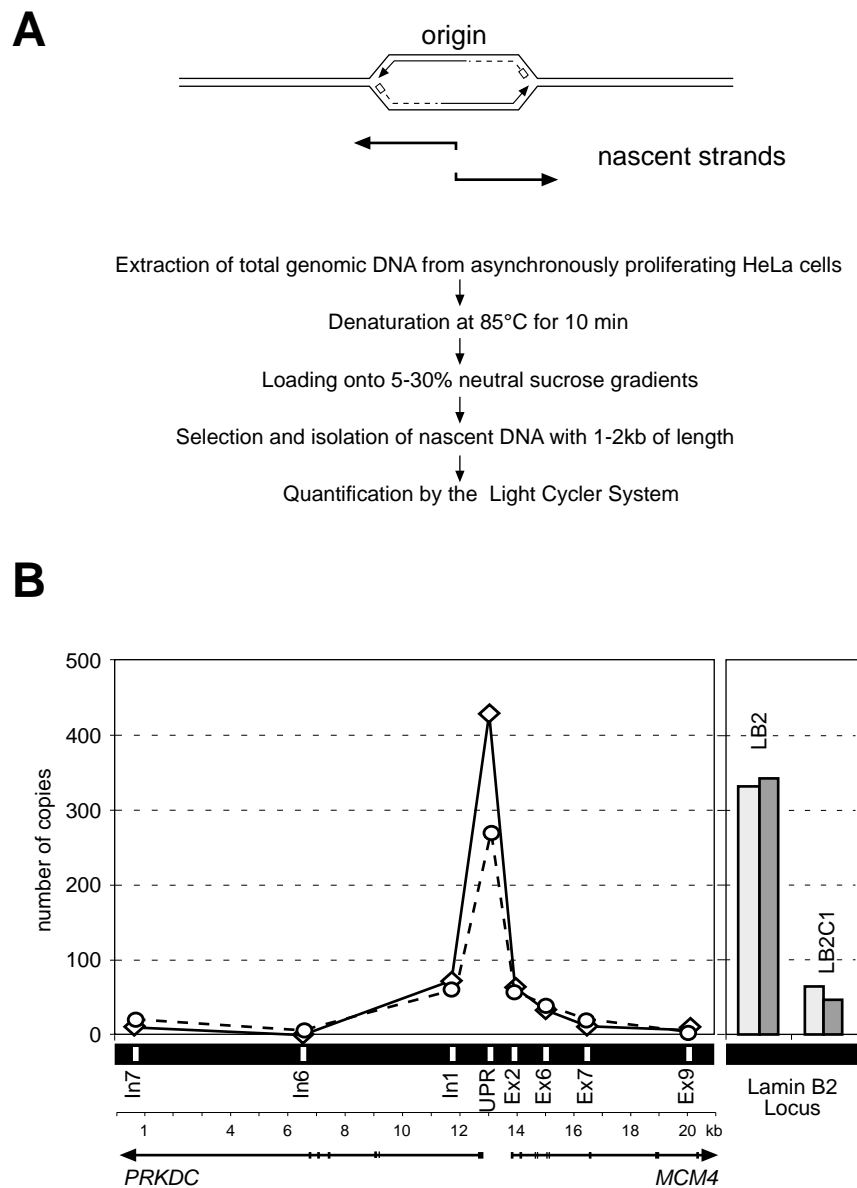


Abb. 4.30 Die MCM4-Promoterregion (UPR) ist in Präparationen von naszierender DNA stark angereichert.

(A) Schematische Darstellung der Präparation von naszierender DNA. (B) Links, Quantifizierung von DNA Sequenzen in der 1-2kb Fraktion der naszierenden DNA. Die Primerpaare UPR, In7, In6, In1, Ex2, Ex6, Ex7 und Ex9 (Tab.3.1.D) wurden in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen eingesetzt. Rechts, LB2 entspricht einem Primerpaar das homolog zu Sequenzen des Lamin B2 Origins ist, LB2C1 ist ein Kontroll-Primerpaar, komplementär zu einer genomischen Region die 3,5 kb stromaufwärts des Lamin B2 Origins lokalisiert ist.

Um festzustellen, ob in dieser Fraktion tatsächlich Origin-Sequenzen angereichert vorliegen, wurden zunächst Kontrollversuche mit einer bereits bekannten Startstelle der DNA-Replikation, dem Lamin B2 Origin, durchgeführt (siehe 1.2.2.). Dabei wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet: Ein Primerpaar (LB2), das komplementär zu den Lamin B2 Origin-Sequenzen ist, sowie ein zweites Primerpaar (LB2C1) das homolog zu einer nichtcodierenden Region ist, die 3,5 kb stromaufwärts vom Origin liegt. Die in Abb. 4.30B dargestellten Ergebnisse zeigen eine deutliche Anreicherung von Lamin B2 Origin-Sequenzen in der 1 kb Fraktion, die genau den von Giacca et al. (1994) publizierten Daten entsprechen.

Daraufhin wurden die in Abb. 4.28B beschriebenen Primerpaare der MCM4-Genregion für quantitative 'real time' PCR-Analysen verwendet. Es zeigt sich, dass die UPR-Region des MCM4-Genpromoters gegenüber den benachbarten genomischen Bereichen deutlich angereichert vorliegt (Abb. 4.30). Wie zu erwarten, nimmt diese Anreicherung der UPR-Region in Fraktionen mit größeren DNA-Fragmentlängen ab (Daten nicht gezeigt). Demnach ist der MCM4-Genpromoter als Origin aktiv. Zudem liegt diese neu identifizierte Startstelle der DNA-Replikation in derselben genomischen Region wie die Bindestelle für hOrc1p und hOrc2p.

4.2.8. 'in vivo footprinting' Studien zur Eingrenzung der ORC-Binderegion

Die Durchführung von 'in vivo footprinting'-Experimenten am Lamin B2 Origin sind wichtige Arbeiten, da erstmals Protein-DNA Interaktionen über einer Startstelle der DNA-Replikation in höheren Eukaryoten nachgewiesen werden konnten (Dimitrova et al., 1996; Abdurashidova et al., 1998). Diese Interaktionen beschränken sich auf proliferierende Zellen und verändern sich in Abhängigkeit vom Zellzyklus. Durch ChIP-Assays konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich zwischen den beiden divergent transkribierten Genen *PRKDC* und *MCM4* eine ORC-Binderegion befindet. Nun sollte diese Region durch 'in vivo footprinting'-Experimente genauer definiert werden. Durch DNase-I-Schutz-Experimente konnte ein relativ kleiner Bereich, der für eine solche Bindung in Frage kommt, eingegrenzt werden. Da die geschützten Bereiche fp1, fp2, fp3 und fp4 Konsensussequenzen bekannter Transkriptionsfaktoren darstellen, sollte die untersuchte Region die DNase-I-geschützten Bereiche fp5 und fp6 umfassen (siehe Abb. 4.32A).

Bei 'genomischen footprints' werden Zellen zunächst *in vivo* mit Dimethylsulfat (DMS) behandelt, was zu einer spezifischen Methylierung von proteinfreien Guanosin-Resten in der DNA führt. Anschließend wird die genomische DNA präpariert und an ihren methylierten Resten durch Behandlung mit Piperidin gespalten. In einem Kontrollansatz wird proteinfreie genomische DNA *in vitro* mit DMS behandelt und ebenfalls gespalten. Nach Entfernung des Piperidins kann die modifizierte DNA über 'ligation-mediated' PCR (LM-PCR) analysiert werden (Quivy & Becker, 1993)(siehe 3.2.5.8.).

Elemente hybridisieren. Fraglich ist, ob diese unspezifische Interaktion vermieden werden kann, da die Auswahl an möglichen Primern durch den hohen GC-Gehalt der intergenischen Sequenz (63%), extrem eingeschränkt ist (siehe Abb. 4.32A). Demnach konnte über diesen Versuch keine Kartierung der ORC-Binderegion erfolgen.

4.2.9. Untersuchungen zur episomalen Replikation von Plasmiden mit MCM4-Promoterfragmenten

Ein wichtiger biotechnischer Aspekt ist die Entwicklung von eukaryotischen Vektorsystemen, die unabhängig von viralen Komponenten arbeiten. Da es sich bei der MCM4-Promoterregion um einen genomischen Bereich handelt, der sowohl Origin-Aktivität besitzt als auch eine Bindestelle für essenzielle Proteine der DNA-Replikation beinhaltet, sollte im Folgenden ein sogenannter ARS-Assay durchgeführt werden. Dieses Experiment basiert auf Versuchen, welche in *S. cerevisiae* zur Identifizierung von Startstellen der DNA-Replikation, so genannter ARS-Sequenzen (autonomously replicating sequences), geführt haben (Stinchcomb et al., 1979) (siehe 1.2.1.). Bisher gab es in höheren Eukaryoten keine Hinweise auf eine effiziente Replikation extrachromosomaler Plasmid-DNA. Neuere Arbeiten zeigen allerdings, dass bestimmte SAR/MAR-Elemente episomal in CHO-Zellen replizieren (Baiker et al., 2000; Piechaczek et al., 1998). Deshalb wurde ein 537 bp langes MCM4-Promoterfragment (-893 bis -357; pEGFP-MCM4), sowie das in Abb. 4.19 beschriebene 387 bp lange Kontroll-Fragment (pEGFP-K) in einen pEGFP-C1 Vektor kloniert und in HeLa S3 Zellen transfiziert (vgl. 3.2.2.). Abb. 4.32A zeigt die Zellen 24 h nach der Transfektion. Die Transfektionsrate, die in allen Zellen vergleichbar ist, konnte über die Fluoreszenz des GFP-Proteins, das durch den Vektor exprimiert wird, bestimmt werden (Abb. 4.32A unten).

Die transfizierten Zellen wurden über einen längeren Zeitraum passagiert, wobei bei jeder Passage extrachromosomale DNA mittels der HIRT-Methode (vgl. 3.2.4.7.) präpariert und anschließend durch Elektroporation in *E. coli* XL1-blue transformiert wurde. In Abb. 4.32B ist die Anzahl der erhaltenen Transformanten in einem Schaubild dargestellt. Es zeigt sich, dass der pEGFP-MCM4 Vektor eine etwas stabilere Anzahl von Transformanten in den ersten Passagen aufweist, die jedoch nach 4 bis 8 Passagen, wie die Kontroll-Plasmide, gegen Null tendieren. Dasselbe Ergebnis wurde erhalten, wenn Plasmide (wie z.B. pSK-/6/2,8; siehe Diplomarbeit, 1996) mit größeren Promoterfragmenten untersucht wurden (Daten nicht gezeigt). Demnach sind Plasmide mit MCM4-Promoterfragmenten nicht in der Lage episomal in HeLa S3 Zellen zu replizieren. Es scheint, dass neben Origins weitere cis-wirkende DNA-Elemente, wie beispielsweise die beschriebenen SAR/MAR-Elemente (Baiker et al., 2000; Piechaczek et al., 1998), notwendig sind, um diesen Effekt zu erzielen.

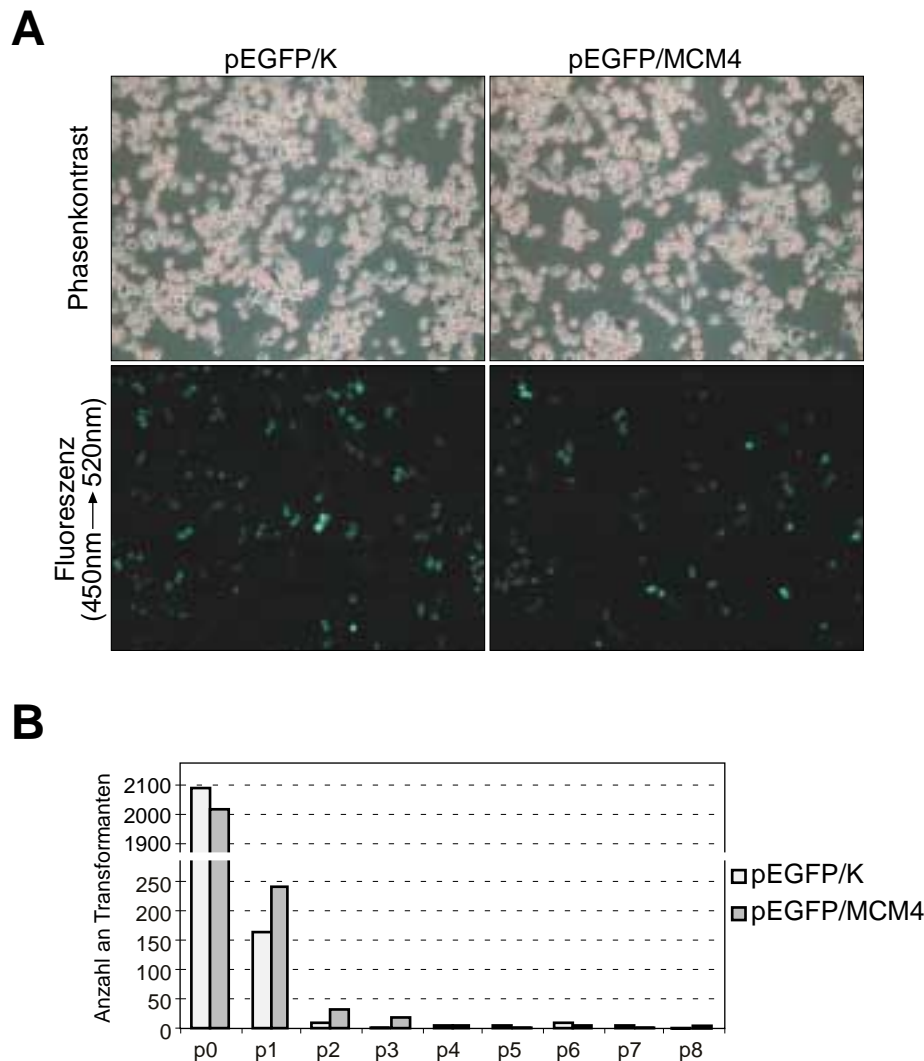


Abb. 4.32 Plasmide mit MCM4-Promoteranteilen zeigen keine episomale Replikation in HeLa S3 Zellen. **(A)** 1×10^6 HeLa S3 Zellen wurden mit pEGFP-C1, pEGFP-MCM4 sowie pEGFP-K mit SuperfectTM (Qiagen) nach Angaben des Herstellers transfiziert. 24h nach der Transfektion wurde die Rate über den GFP-Anteil des Vektors bestimmt (unten). **(B)** Anzahl der Klone, die durch Transformation der präparierten HIRT-Überstände erhalten wurden (Y-Achse), wobei 'p' die Zellpassage angibt in welchen extrachromosomale DNA präpariert wurde (X-Achse).

4.2.10. Assoziation von ORC-Proteinen mit der Lamin B2 Origin Region

Es stellte sich die Frage, ob die ChIP-Technik, die die Identifizierung einer ORC-Binderegion im MCM4-Genpromoter ermöglichte, auch dazu geeignet ist andere ORC-Bindestellen im menschlichen Genom zu lokalisieren. Deshalb sollte im ChIP-Assay untersucht werden, ob bekannte Origin-Sequenzen ebenso mit ORC-Proteinen assoziiert vorliegen. Da der Lamin B2 Origin die am besten charakterisierte Startstelle der DNA-Replikation darstellt (Abdurashidova et al., 2000, Giacca et al., 1994), wurde der ChIP-Assay bei dieser Region angewendet. Für quantitative Analysen wurden entsprechende Primerpaare hergestellt. Ein Primerpaar, das homolog zu Sequenzen der kartierten Replikationsstartstelle

(LB2) ist, sowie zwei angrenzende Kontroll-Primerpaare, die 3,6 kb (LB2C1; siehe Tab. 3.1.D) und 2,6 kb (LB2C2) entfernt lokalisiert sind. Zunächst wurde die amplifizierbare DNA-Menge von MNase-verdautem Material vor der Immunpräzipitation bestimmt. Es zeigt sich (Abb. 4.33A), dass Fragmente, die LB2C1-Sequenzen enthalten, eine 6 - 8 fach höhere Amplifikationsrate aufweisen als die anderen untersuchten Regionen. Vermutlich handelt es sich bei der LB2C1-Sequenz um eine Region, die sehr resistent gegen die MNase-Behandlung ist und deshalb im Verhältnis zu den anderen untersuchten Regionen effizienter amplifiziert werden kann.

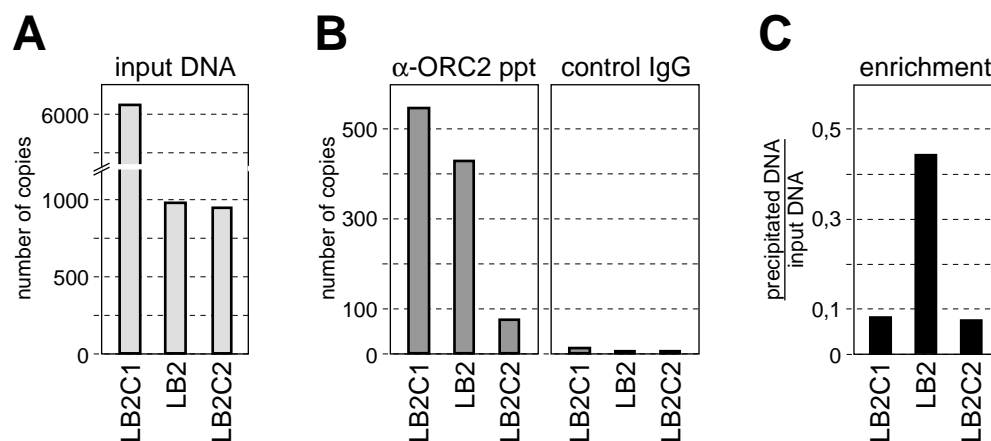


Abb. 4.33 Sequenzen der Replikationsstartstelle des Lamin B2 Origins sind in ORC-Präzipitaten angereichert.

(A) Die Kopienanzahl der Sequenzen wurde durch quantitative 'real-time' PCR in MNase behandeltem Chromatin (input DNA) bestimmt. **(B)** Das MNase behandelte Chromatin wurde mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern sowie mit unspezifischen Kontroll-Antikörpern (IgG) präzipitiert. Die Kopienanzahl der amplifizierbaren Sequenzen in den Präzipitaten wurde bestimmt. **(C)** Die Anreicherung der Sequenzen ergibt sich aus dem Verhältnis zwischen Auftragsprobe und präzipitierter DNA.

Obwohl Sequenzen, welche die Lamin B2 Origin Region enthalten, keine höheren Kopienanzahlen gegenüber der benachbarten Kontrollregion LB2C1 aufweisen (Abb. 4.33B), findet man im Vergleich mit der Auftragsprobe eine deutliche Anreicherung. Demnach ist in der mit hOrc2p-Antikörpern kopräzipitierten DNA ein höherer Prozentsatz von Chromatinfragmenten vorhanden, die Lamin B2 Origin-Sequenzen enthalten, als in den angrenzenden Kontrollregionen (Abb. 4.33C). Aufgrund der variablen Amplifikationsraten der einzelnen Amplikons (Abb. 4.33A/B), die vermutlich aus dem MNase-Verdau resultieren, scheint der CHIP-Assay keine allgemein brauchbare Methode zur direkten Identifizierung von ORC-Bindestellen zu sein. Jedoch kann die Technik hilfreich sein, um bekannte Sequenzabschnitte auf ORC-Bindestellen zu untersuchen, da spezifische Primerpaare hergestellt

werden können, die es ermöglichen, Anreicherungen in dem präzipitierten Chromatin abzugleichen (siehe Abb. 4.33C).

Unabhängig davon scheint der Lamin B2 Origin, wie auch der in dieser Arbeit identifizierte Origin im MCM4-Promoter mit ORC-Proteinen assoziiert vorzuliegen. Dies unterstützt die These, dass im humanen System, ähnlich wie in Hefe, Origins durch eine Bindung von ORC markiert werden.

5. Diskussion

5.1. Die Struktur des MCM4-Genpromoters

MCM-Proteine bilden eine hochkonservierte Proteinfamilie, die eine direkte Funktion bei der Initiation der DNA-Replikation einnehmen (Chong et al., 1995; Kubota et al., 1995; Tanaka et al., 1997; Yan et al., 1993). Bei Untersuchungen zur Regulation der humanen MCM-Proteine zeigte sich, dass die Expression ihrer Gene in Abhängigkeit vom Zellzyklus und der Zellproliferation gesteuert wird. MCM-Gene werden nur in proliferierenden Zellen exprimiert und es wurde nachgewiesen, dass die MCM-mRNA Menge während des Übergangs von der G1-Phase in die S-Phase ansteigt (Ohtani et al., 1999; Schulte et al., 1995, 1996; Tsuruga et al., 1997b).

Um Hinweise auf die transkriptionelle Regulation der MCM4-Genexpression zu erlangen, wurde ein genomisches Fragment, das den Promoter des *MCM4*-Gens enthält, isoliert und partiell sequenziert (Diplomarbeit, 1996). In dieser Arbeit wurde die bereits bekannte 570 bp lange Promotersequenz um 700 bp 5'-wärts erweitert. Durch eine vergleichende Sequenzanalyse mit der NCBI Datenbank (BLASTN nach Altschul et al., 1990) ergab sich, dass 1027 bp stromaufwärts des *MCM4*-Gens ein weiteres Gen (*PRKDC*, Abb. 4.1), welches für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein Kinase (DNA-PKcs) codiert (siehe 5.2.), lokalisiert ist. Es handelt sich um zwei divergent transkribierte Gene, die Kopf an Kopf angeordnet sind. Weitere Datenbankrecherchen ergaben, dass diese Anordnung zumindest unter höheren Eukaryoten konserviert ist (siehe Abb. 5.1.). Demnach scheint die genomische Organisation des MCM4-Genpromoters evolutionär ebenso konserviert zu sein, wie die Aminosäuresequenzen der MCM4-Proteine verschiedener Spezies.

Divergent angeordnete Gene sind keine Seltenheit im humanen Genom. In einigen Fällen scheinen solche Genpaare voneinander abhängige Funktionen zu besitzen und die Promotoren weisen gemeinsame Kontrollelemente auf, die möglicherweise eine koordinierte Expression der Gene erleichtern. Beispiele dafür sind die Promotoren der divergent angeordneten Histon-Gene *H2A* und *H2B* (Hentschel & Birnstiel, 1981) oder der Typ IV Kollagen-Gene *COL4A1* ($\alpha 1(IV)$) und *COL4A2* ($\alpha 2(IV)$) (Schmidt et al., 1993). Die meisten Genpaare besitzen jedoch unterschiedliche Funktionen, und ihre Expression scheint unabhängig voneinander reguliert zu sein. So zeigen Transfektionsstudien von Connelly et al., (1998), dass die *PRKDC*- und *MCM4*-Gene über getrennte, unabhängig voneinander regulierte Promotoren transkribiert werden. Interessant ist, dass das mit der DNA-PKcs verwandte Gen *ATM* (siehe 5.2.) und das Gen *E14/NPAT* ebenfalls divergent transkribiert werden,

da die 5'-Enden beider Transkripte 513 bp voneinander entfernt sind (Imai et al., 1996).

Sequenzanalysen ergaben, dass die intergenische Region zwischen dem *MCM4*- und dem *PRKDC*-Gen einen GC-Gehalt von 63% besitzt, so dass eine typische CpG-Insel vorliegt. CpG Dinukleotide sind selten in der humanen DNA und liegen häufig mit Promotoren der Klasse II assoziiert vor (Gardiner et al., 1995), welche die konstitutive Expression von Haushaltsgenen regulieren. Da beide Promotoren zudem keine funktionelle TATA-Box besitzen und von multiplen Transkriptionsstartstellen aus transkribiert werden (Connelly et al., 1998), weisen sie die typischen Merkmale von konstitutiv exprimierten Genen auf (Dynam, 1986).

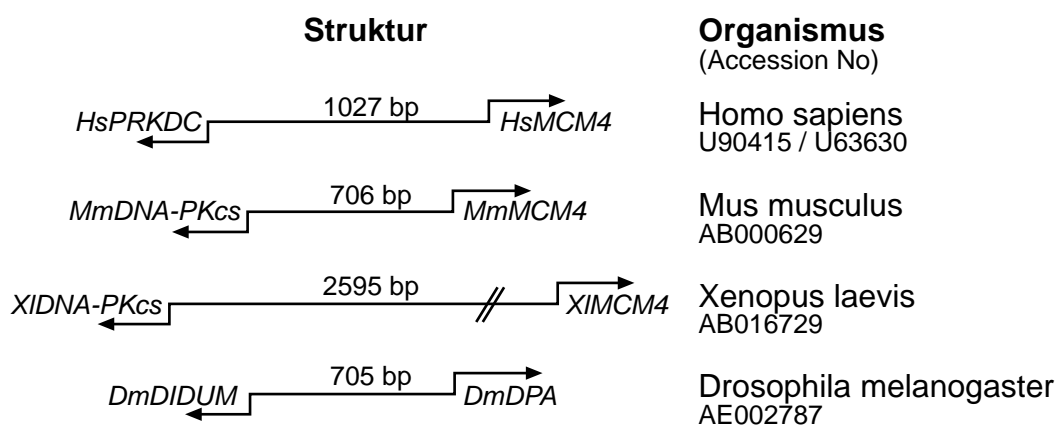


Abb.5.1 Die genomische Organisation der Promotoren der *MCM4*-Gene ist evolutionär konserviert. Die Anordnung der *MCM4*-Gene bei Mensch, Maus, Krallenfrosch und Fruchtfliege ist ähnlich. Bis auf *MCM4/Didum* in *D. melanogaster*, sind die *MCM4*-Gene Kopf an Kopf mit dem Gen der DNA-PKcs orientiert. DPA ('disc proliferation abnormal') bezeichnet das *MCM4*-Homolog in *D. melanogaster*. Die Längen der intergenischen Regionen ergeben sich aus den Abständen zwischen den Startstellen der Translation der Genpaare.

5.2. Die DNA-PK

Die DNA-abhängige Protein Kinase (DNA-PK) ist eine Serin/Threonin Kinase, die sowohl an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) als auch an der Rekombination der V, D und J-Segmente der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene bei der Entwicklung von Lymphozyten beteiligt ist (Übersichtsartikel Anderson & Carter, 1996; Anderson & Lees-Miller, 1992; Jackson & Jeggo, 1995; Jeggo, 1998). Neuere Arbeiten zeigen, dass die DNA-PK bei verschiedenen weiteren Prozessen involviert ist, unter anderem bei der Modulierung der Chromatinstruktur sowie bei der Aufrechterhaltung von Telomerbereichen der Chromosomen (Gilley

et al., 2001; Smith & Jackson, 1999). Das Enzym besteht aus drei Untereinheiten: Der katalytischen Untereinheit (DNA-PKcs), die mit 4127 aa ein apparentes Molekulargewicht von ca. 470 kD besitzt (Connelly et al., 1996), sowie zwei weiteren Untereinheiten mit ca. 70 und 80 kD, die mit Ku70 und Ku80 bezeichnet werden. Im Gegensatz zu der katalytischen Untereinheit sind die Ku Untereinheiten, deren Gene konstitutiv exprimiert werden, in großen Mengen im Zellkern vorhanden und binden als stabiles Heterodimer unspezifisch an DNA. Sie wurden als Autoantigene in Seren von Patienten identifiziert, die unter der Autoimmunkrankheit Polymyositis-Scleroderma leiden (Mimori et al., 1981). Die Aktivierung der DNA-PK erfolgt vermutlich über die Ku Untereinheiten. Diese binden an DSBs, wodurch die DNA-PKcs rekrutiert und deren Kinase-Aktivität stimuliert wird (Gottlieb & Jackson, 1993; Singleton et al., 1999; Smith & Jackson, 1999).

Die carboxyterminalen 400 aa der DNA-PKcs sind homolog zu Sequenzen der Phosphatidylinositol-3 (PI 3)-Kinasen (Hartley et al., 1995; Poltoratsky et al., 1995), was die DNA-PK zum Mitglied einer Familie von DNA-Reparatur- und Zellzyklus-Genen macht, die in sämtlichen Organismen vertreten sind (Carpenter & Cantley, 1996). Die DNA-PKcs scheint jedoch auf höhere Eukaryoten beschränkt zu sein: Homologe wurden bisher in der Maus *Mus musculus* (Araki et al., 1997), dem Pferd *Equus caballus* (Shin et al., 1997) und dem Krallenfrosch *X. laevis* (Labhart, 1997) identifiziert, nicht aber in der Hefe *S. cerevisiae* oder dem Wurm *Caenorhabditis elegans*. Neben der DNA-PKcs ist das derzeit am meisten beachtete Mitglied der PI 3-Kinasen das ATM-Protein, das bei der humanen Krankheit Ataxia telangiectasia defekt ist. Die Patienten leiden unter neurodegenerativen Störungen und besitzen eine akute Prädisposition für Krebserkrankungen (Übersichtsartikel Jeggo et al., 1998; Lavin & Shiloh, 1997). ATM ist ein hochkonserviertes Protein, das eine Verbindung zwischen dem Erkennen von DNA-Schäden und dem Vermitteln von Signalen an entsprechende regulatorische Zellzyklus-Proteine darstellt (Rotman & Shiloh, 1998). Damit steht dieses Protein im Zentrum der Forschung, die einerseits zur Aufklärung von Reparaturmechanismen beiträgt, die in Folge von DNA-Schäden aktiviert werden, und andererseits 'checkpoint' Kontrollmechanismen untersucht (Übersichtsartikel Durocher & Jackson, 2001).

Die Beteiligung der DNA-PK an der Reparatur von DSBs wurde bei der Untersuchung von mutierten Nagerzellen nachgewiesen. Diese Zelllinien zeigten eine Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, nicht aber gegenüber anderen DNA-schädigenden Substanzen, wobei gezeigt wurde, dass diese Mutanten Defekte bei der Reparatur von chromosomalen DSBs besitzen (Übersichtsartikel Zdzienicka, 1995). Bei Zellfusionsexperimenten konnten diese phänotypischen Defekte durch eine Gruppe von Genen, den sogenannten *XRCC* Genen (*X*-ray *c*ross-*c*omplementing), komplementiert werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass *XRCC5* mit Ku80 (Boubnov et al., 1995; Getts & Stamato,

1994), XRCC6 mit Ku70 (Gu et al., 1997) und XRCC7 mit der DNA-PKcs (Blunt et al., 1995) identisch ist.

Der Hauptmechanismus, über welchen DSBs in Säugerzellen repariert werden, ist die nichthomologe oder integrative Rekombination (NHEJ für 'non-homologues end-joining'). Unabhängig von Reparaturereignissen ist dieser Mechanismus für die Bildung von Immunglobulinen bei der Reifung von B- oder T-Lymphozyten verantwortlich. So sind 'knockout'-Mäuse, die keine funktionelle DNA-PKcs besitzen sensitiv gegenüber ionisierender Strahlung und zudem nicht in der Lage Immunglobuline zu bilden, da sie keine korrekte V(D)J-Rekombination durchführen können. Dieser Phänotyp wird deshalb als SCID ('severe combined immunodeficiency') (Bosma & Carroll, 1991) bezeichnet.

Obwohl die DNA-PK vor über 10 Jahren entdeckt wurde, sind ihre physiologischen Substrate noch weitgehend unbekannt. Zu den zahlreichen *in vitro* Substraten der DNA-PK gehören unter anderen auch Transkriptionsfaktoren wie das p53 (Lees-Miller et al., 1990, 1992; Shieh et al., 1997; Woo et al., 1998), die große Untereinheit der RNA-Polymerase II, die 34 kD Untereinheit des Replikationsproteins RPA (Brush et al., 1994), die Ku Untereinheiten (Chan & Lees-Miller, 1996) sowie zahlreiche Chromatin-Komponenten (Übersichtsartikel Anderson & Lees-Miller, 1992). Allerdings ist es umstritten, ob diese Proteine auch *in vivo* DNA-PK-abhängig phosphoryliert werden (Rathmell et al., 1997; Burma et al., 1999). Andere potenzielle Substrate sind Faktoren, die bei der nichthomologen Rekombination beteiligt sind. Ein Beispiel ist das Phosphoprotein XRCC4, ein Cofaktor der DNA Ligase IV, die entscheidende Funktionen bei dem NHEJ einnimmt (Critchlow et al., 1997; Leber et al., 1998). Zudem scheint sich die katalytische Untereinheit der DNA-PK über Autophosphorylierung selbst zu regulieren (Chan & Lees-Miller, 1996).

Übereinstimmend mit der wichtigen Funktion dieses Enzyms bei der Reparatur von DSBs ist die DNA-PK in hohen Mengen im Kern von HeLa Zellen vorhanden und bildet ca. 1% des gesamten Kernproteins. Diese Konzentration scheint unabhängig von DNA-schädigenden Einflüssen zu bestehen (Lee et al., 1997). Obwohl die DNA-PK-Proteinmenge während des Zellzyklus gleich bleibt, scheint die DNA-PK-Aktivität zu variieren und Maxima während der G1-, der frühen S-Phase und der G2-Phase zu haben (Lee et al., 1997). Allerdings besitzen Nager ein weitaus geringeres Niveau an DNA-PKcs- und Ku-Proteinmengen sowie an DNA-PK-Aktivität als Primatenzellen (Anderson & Lees-Miller, 1992; Finnie et al., 1995). Tatsächlich scheinen die DNA-PK-Proteinmengen mit der Lebensdauer der jeweiligen Spezies übereinzustimmen. Vermutlich stellen die erhöhten DNA-PK-Konzentrationen einen Mechanismus dar, der die genomische Stabilität bei Organismen, die eine größere Lebenserwartung besitzen, aufrechterhält (Übersichtsartikel Smith & Jackson, 1999).

5.3. Proteinbindestellen im MCM4-Genpromoter

Bedingt durch den hohen GC-Gehalt (63%) der intergenischen Region zwischen dem *MCM4*- und dem *PRKDC*-Gen besitzen beide Promotoren potenzielle Bindestellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 (siehe 5.3.). Durch DNase-I-Schutz-Experimente wurden im MCM4-Promoter drei geschützte Bereiche identifiziert (fp1, fp3 und fp4), welche Homologien zur Konsensussequenz $G_T^G/A^G GGC^G_T^G/A^G/A^G/T$ von Sp1 (Kadonaga et al., 1986) aufweisen. Vergleichende Analysen mit Daten der von Connelly et al. (1998) durchgeführten Transfektionsstudien zeigen, dass die fp3- und fp4-Regionen essenziell für die MCM4-Genexpression in HeLa Zellen sind. Somit scheint die Proteinbindung von Sp1 an die entsprechenden Binderegionen eine funktionelle Bedeutung für die konstitutive Expression des *MCM4*-Gens in proliferierenden Zellen zu haben.

Das humane Sp1-Protein besteht aus 778 aa und kann sowohl phosphoryliert (Jackson et al., 1990) als auch glykosyliert (Jackson & Tjian, 1988) werden. Das Protein interagiert mit sich selbst, wodurch multimeren Komplexe entstehen (Mastrangelo et al., 1991; Pascal & Tjian, 1991; Su et al., 1991). Weiterhin konnten Interaktionen mit verschiedenen Kernproteinen nachgewiesen werden, wie z.B. dem TATA-Bindeprotein (TBP) (Emili et al., 1994) oder regulatorischen Zellzyklus-Proteinen, wie dem zur RB-Familie gehörenden p107 (Datta et al., 1995) oder dem Transkriptionsfaktor E2F (Karlseder et al., 1996; Lin et al., 1996) (siehe 1.1.). Sp1 ist ein Transkriptionsaktivator, der zudem den unmethylierten Status von CpG-Dinukleotiden im 5'-Bereich von Haushaltsgenen aufrecht erhält, indem er den Angriff von Methyltransferasen verhindert (Brandeis et al., 1994; Macleod et al., 1994). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für Transkriptionsereignisse, da die Methylierung von CpG-Dinukleotiden als ein Mechanismus der transkriptionellen Repression bei der Entwicklung von Vertebraten gilt (Übersichtsartikel Bird et al., 1995).

Sp1 bildet mit drei weiteren Faktoren (Sp2, Sp3 und Sp4) eine Proteinfamilie (Übersichtsartikel Suske, 1999). Diese Proteine besitzen eine charakteristische Domänenstruktur mit zwei Glutamin-reichen transaktivierenden Domänen und drei C-terminalen C2-H2-Zinkfingermotiven, über welche die DNA-Bindung der Faktoren vermittelt wird. Sp1, Sp3 und Sp4 sind in diesem Bereich hochkonserviert und erkennen deshalb die Sp1-Konsensussequenz mit identischer Affinität (Hagen et al., 1992, 1994). Während Sp1 (Courey & Tjian, 1988; Pascal & Tjian, 1991) und Sp4 (Hagen et al., 1994, 1995) ausschließlich als transkriptionelle Aktivatoren agieren, scheint Sp3 zudem einen reprimierenden Effekt auf Sp1-vermittelte Transkriptionsereignisse auszuüben (Birnbauer et al., 1995; Dennig et al., 1996; Hagen et al., 1994). Die Funktionen von Sp2 sind bisher unbekannt (Übersichtsartikel Suske, 1999). Sp3 ist wie Sp1 ubiquitär vorhanden, wohingegen die

Expression von Sp4 auf wenige Gewebetypen beschränkt ist und vorzugsweise in neuronalen Zelllinien exprimiert wird (Hagen et al., 1992; Supp et al., 1996). Man geht davon aus, dass Sp1 und Sp3 *in vivo* um identische Bindestellen kompetieren und die durch Sp1 und Sp3 vermittelte transkriptionelle Aktivierung über die Proteinkonzentration der beiden Faktoren reguliert wird. Hinweise darauf geben verschiedene Untersuchungen, die zeigen, dass sich die Mengenverhältnisse von Sp1 und Sp3 in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Zellen drastisch verändern (Apt et al., 1996; Discher et al., 1998; Hata et al., 1998; Prowse et al., 1997; Ye et al., 1996). In primären Keratinozyten liegt beispielsweise mehr Sp3 als Sp1 vor. Bei einer Calcium-abhängigen *in vitro* Differenzierung der Zellen invertiert sich dieses Verhältnis, was vermutlich zu einer Veränderung der Transkription von verschiedenen Genen führt (Apt et al., 1996). Dies ist ein wichtiger Aspekt in Hinblick auf die MCM4-Genexpression während der Differenzierung von HL-60 Zellen. Möglicherweise kann die damit einhergehende Reprimierung der Expression durch eine modulierte Bindung von Sp1 oder Sp3 erfolgen. Der Befund, dass Sp1 und Sp3 identische DNA-Bindungseigenschaften besitzen (Hagen et al., 1994), könnte erklären, dass keine Veränderungen der DNase-I-geschützten Bereiche fp3 und fp4 im MCM4-Promoter vor oder nach der Differenzierung der Zellen nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 4.12).

Neben den DNase-I-geschützten Regionen fp3 und fp4 wurde im MCM4-Promoter eine weitere Proteinbindestelle (fp2) identifiziert, die nach den von Connelly et al. (1998) durchgeführten Transfektionsstudien von regulatorischer Bedeutung für die MCM4-Expression ist. Diese Binderegion entspricht der Konsensussequenz (GCCN₃GGC) des Transkriptionsfaktors AP2 (Mitchell et al., 1987). AP2 bildet eine Proteinfamilie, die sich aus AP2- α , AP2- β und AP2- γ zusammensetzt. Entsprechend der palindromischen Konsensussequenz binden die drei Proteine als Homo- oder Heterodimere an DNA (Übersichtsartikel Hilger-Eversheim et al., 2000). Die Dimerisierung wird über eine hochkonservierte C-terminale Helix-span-Helix-Domäne vermittelt, der sich ein basisches DNA-Bindemotiv anschließt (Williams & Tjian, 1991a, b). Im N-Terminus der Proteine befindet sich eine weniger konservierte Prolin-reiche Transaktivierungsdomäne (Williams & Tjian, 1991a).

Wie Sp1 liegt AP2 in hohen Konzentrationen im Kern von HeLa Zellen vor (Williams et al., 1988) und könnte somit wichtig für die MCM4-Genexpression sein. Im Gegensatz zu Sp1 scheint die Expression von AP2 vorzugsweise auf Zelllinien beschränkt zu sein, die ektodermalen Ursprungs sind (Byrne et al., 1994; Creaser et al., 1996; Meier et al., 1995; Mitchell et al., 1991). Ektodermale Gewebe sind beispielsweise das zentrale und das periphere Nervensystem oder auch die Epidermis. Die promyeloide Zelllinie HL60 ist mesodermalen Ursprungs, da sie von hämatopoetischen Stammzellen abstammt, die Vorläufer der Lymphe- oder

Myelopoese sind. Dies könnte möglicherweise eine Erklärung für die unterschiedliche Protektierung der DNase-I-geschützten Region fp2 sein, wenn Extrakte aus HeLa - oder HL60 Zellen verwendet werden (siehe Abb. 4.12).

Entsprechend der Gewebe-spezifischen Expression hat AP2 eine wichtige Funktion bei der Entwicklung von Säugern (Byrne et al., 1994; Zhang et al., 1996). Diese Funktionen werden über externe Signale reguliert, die im Verlauf der Embryogenese auftreten (Williams & Tjian, 1991b). Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass AP2 als Tumorsuppressor agiert, da dieser Faktor bei der Regulation der Expression von verschiedenen wichtigen Zellzyklus-Genen beteiligt ist. So wird beispielsweise bei der Differenzierung von K562-Zellen ('human leukaemia cells') durch Phorbol-Ester (TPA) der Promoter des CDK-Inhibitors p21^{cip1} (siehe 1.1.) AP2-abhängig aktiviert (Zeng et al., 1997), was zu einer Hemmung der Proliferation der Zellen führt (el-Deiry et al., 1995; Michieli et al., 1994). Zudem ist AP2 ein negativer Regulator von c-myc (Gaubatz et al., 1995). c-myc bindet und transaktiviert die Expression von Genen über E-Box Elemente, die eine zentrale CAG^G/_ATG Sequenz enthalten. Ein solches Gen ist beispielsweise Cyclin D2, dessen Expression c-myc-abhängig über ein kombiniertes E-Box/AP2 Promoterelement in der frühen G1-Phase aktiviert wird (Bouchard et al., 1999). In Abhängigkeit von den Konzentrationen der beiden Faktoren kompetieren sowohl c-myc als auch AP2 um diese Bindestelle. Bei einem Überschuss von AP2 wird die Expression von Cyclin D2 reprimiert, was wiederum Auswirkungen auf die Zellproliferation hat (Hilger-Eversheim et al., 2000).

Zusammenfassend spielt AP2 sowohl bei der Embryonalentwicklung als auch bei der Kontrolle der Zellproliferation eine wichtige Rolle. Jedoch geben die bisher publizierten Daten keinen unmittelbaren Hinweis darauf, dass AP2 für die gesteigerte MCM4-Genexpression von Zellen verantwortlich ist, wenn diese von der G0- in den proliferativen Status der G1-Phase übergehen (Leone et al., 1998; Ohtani et al., 1999; Tsuruga et al., 1997a,b). Diese Funktion könnte über das in der MCM4-Promoterregion identifizierte palindromische E2F-Motiv vermittelt werden.

5.4. E2F als möglicher Regulator für die Zellzyklus-abhängige Expression des *MCM4*-Gens.

Der Transkriptionsfaktor E2F spielt eine zentrale Rolle bei der Einleitung der S-Phase in Säugerzellen, indem er die Transkription von Genen reguliert, die für den Zellzyklus essenziell sind (siehe 1.1.).

E2F bildet Heterodimere bestehend aus Mitgliedern der E2F- und der DP-Proteinfamilie. Bisher wurden in Säugern sechs Mitglieder der E2F-Familie (E2F1 bis E2F6) und zwei Mitglieder der DP-Familie (DP1 und DP2) identifiziert

(Übersichtsartikel Black & Azizkhan-Clifford, 1999) (siehe Abb. 5.2.). Alle sechs E2F-Proteine besitzen N-terminal eine basische Helix-loop-Helix DNA-Bindedomäne, welche die Konsensussequenz $TTT^C/G^C/GCGG$ erkennt. Die Bindung wird verstärkt, wenn diese Sequenz zweifach invertiert und überlappend als Palindrom vorliegt (Wade et al., 1995). C-terminal der DNA-Bindedomäne befindet sich eine hochkonservierte Dimerisierungsdomäne mit einem Leucin-Zipper Motiv (Helin et al., 1993). Außer E2F6 besitzen alle Familienmitglieder eine C-terminale Transaktivierungsdomäne, die unter anderem für Interaktionen mit Mitgliedern der pRB-Familie (pRb, p107, p130) verantwortlich ist (Shan et al., 1992). E2F1-3 unterscheiden sich von E2F4-5 durch eine N-terminal gelegene Domäne, an die Cyclin A binden kann (Xu et al., 1994). Da E2F6 keine Transaktivierungsdomäne besitzt, kann E2F6 nicht mit pRB-Proteinen interagieren, was sich reprimierend auf E2F-abhängige Transkriptionseignisse auswirkt (Gaubatz et al., 1998; Morkel et al., 1997; Trimarchi et al., 1998).

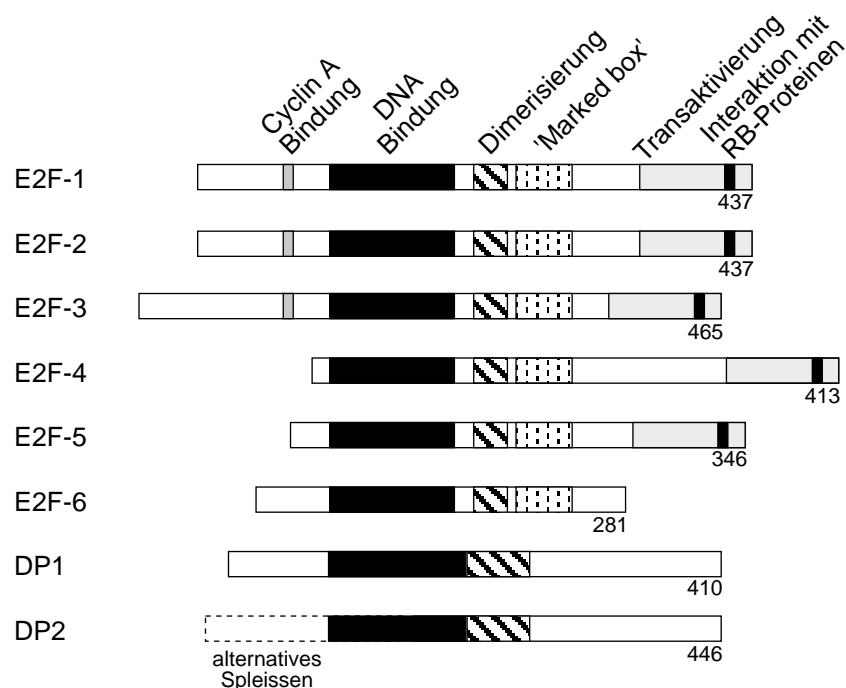


Abb. 5.2 Struktur der humanen E2F-Transkriptionsfaktoren (nach Black & Azizkhan-Clifford, 1999).

Die transkriptionelle Aktivität von E2F ist Zellzyklus-abhängig reguliert. In ruhenden Zellen (G0) wird diese durch die Interaktion mit hypophosphorylierten Mitgliedern der pRB-Proteinfamilie (pRb, p107, p130) reprimiert (Übersichtsartikel Dyson, 1998). Dabei bindet pRb bevorzugt an E2F1, E2F2 und E2F3 (Lees et al., 1993), p107 an E2F4 und p300 an E2F4 und E2F5 (Beijersbergen et al., 1994; Vairo et al., 1995). Die pRB-E2F Bindung wird durch eine cdk2/Cyclin D- oder cdk2/Cyclin E-abhängige Phosphorylierung der pRB-Proteine aufgehoben, was zur Expression

von E2F-abhängigen Genen in der späten G1-Phase führt (Chellappan et al., 1991; Dyson, 1998; Übersichtsartikel Weinberg, 1995). Beim Austritt aus der S-Phase geht die Expression der E2F-abhängigen Gene zurück, was mit einer Inaktivierung von E2F einhergeht. Dabei wird die E2F1/DP1-DNA-Bindung durch eine cdk2/Cyclin A-abhängige Phosphorylierung von E2F1 und DP1 inhibiert (Krek et al., 1994, 1995; Dynlacht et al., 1997). Freies E2F wird Ubiquitin-abhängig im Proteasom abgebaut (Campanero et al., 1997; Hateboer et al., 1996; Hofman et al., 1996).

Gene, die E2F-abhängig transkribiert werden, können prinzipiell in drei Gruppen eingeteilt werden (Übersichtsartikel Ohtani, 1999): Eine Gruppe von Genen sind regulatorische Zellzyklus-Proteine wie E2F1, E2F2, Cyclin D1, D2, E und A, cdk1, pRb und p107 sowie Proteine der c-myc-Proteinfamilie. Eine weitere Gruppe von E2F-abhängigen Genen codieren für Proteine, die direkte enzymatische Funktionen bei der DNA-Synthese besitzen, wie die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), die DNA-Polymerase α , PCNA, die Thymidin-Kinase oder die Ribonukleotid-Reduktase. Die dritte Gruppe wurde im Entstehungszeitraum dieser Arbeit (1996 - 1999) identifiziert und umfaßt Proteine, die regulatorisch auf die DNA-Replikation wirken, wie hOrc1p (Ohtani et al., 1996), hCdc6p (Hateboer et al., 1998; Leone et al., 1998; Ohtani et al., 1998; Williams et al., 1997; Yan et al., 1998), hCdc45p (Saha et al., 1998) sowie hMcm5p (Ohtani et al., 1999; Tsuruga et al., 1997a), hMcm6p (Ohtani et al., 1999; Tsuruga et al., 1997b) und hMcm7p (Suzuki et al., 1998).

Für die sechs humanen MCM-Proteine wurde ein drastischer Anstieg der mRNA Mengen nachgewiesen, wenn primäre Fibroblasten durch Serumzugabe von der G0-Phase in die G1-Phase entlassen werden (Leone et al., 1998; Tsuruga et al., 1997). Durch eine Überexpression von E2F1 in REF52 Zellen ('rat embryonic fibroblast'), konnte die Expression aller MCM-Gene induziert werden (Leone et al., 1998; Ohtani et al., 1999). Weiterhin konnte eine periodische Zellzyklus-abhängige Expression mit einem Maximum beim G1/S-Übergang der *hMCM2*-, *4*-, *5*-, und *hMCM6*-Gene in HeLa Zellen nachgewiesen werden (Tsuruga et al., 1997b). In den Promotoren von *hMCM5* (Tsuruga et al., 1997a), *hMCM6* (Tsuruga et al., 1997b) und *hMCM7* (Suzuki et al. 1998), wurden wie bei dem *hMCM4*-Gen E2F-Bindestellen identifiziert. Durch das humane Genom Projekt war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, die Sequenzen der Promotoren der *hMCM2*- und *hMCM3*-Gene aus entsprechenden Datenbanken zu ermitteln und auf E2F-Bindemotive zu untersuchen. Wie in Abb. 5.3. dargestellt, enthalten alle humanen MCM-Gene in ihren Promotoren E2F-Bindemotive. Diese Sequenzanalysen unterstützen die These, dass die Expression der hMCM-Gene einheitlich über E2F reguliert wird.

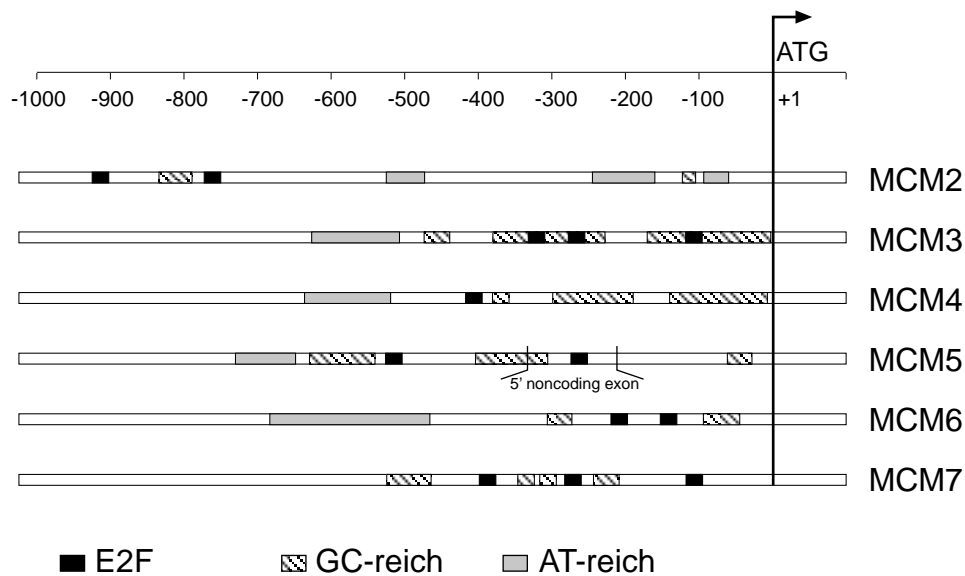


Abb. 5.3 Alle Promotoren der hMCM-Gene enthalten Bindemotive für den Transkriptionsfaktor E2F. Bei Sequenzanalysen der Promotoren wurden AT-reiche- (graue Boxen) und GC-reiche- (gestreifte Boxen) Regionen berücksichtigt. E2F-Bindemotive sind als schwarze Boxen dargestellt. Die Sequenzen der MCM2- und MCM3-Promotoren wurden über das 'Human Genome Project' ermittelt und besitzen die Accession No NT005673 (MCM2) und NT019428 (MCM3). Die Sequenzen der MCM4-7-Promotoren wurden von folgenden Autoren (Accession No) bestimmt: MCM5: Tsuruga et al., 1997a (AB003469); MCM6: Tsuruga et al., 1997b (D89335); MCM7: Suzuki et al., 1998 (AB004270); MCM4: Connelly et al., 1998 (U63630), diese Arbeit (U90415).

In dieser Arbeit wurden nukleare Extrakte aus HeLa S3 Zellen verwendet, um Interaktionen zwischen dem palindromischen E2F-Bindemotiv im MCM4-Promoter und entsprechenden Kernproteinen nachzuweisen. Obwohl gezeigt wurde, dass in den Extrakten Proteine vorhanden sind, die dieselbe Bindungsspezifität wie E2F-Proteine besitzen (Abb. 4.8), konnte bei Promoterfragmenten, die neben dem E2F-Bindemotiv auch die Proteinbinderegionen fp5 und fp6 enthalten, keine Proteinbindung an das E2F-Motiv nachgewiesen werden. Dies zeigte sich sowohl bei DNase-I- (Abb. 4.3 und 4.4) oder Benzonase-Schutz-Experimenten (Abb. 4.6), als auch bei Gel-Retardierungs-Experimenten (Abb. 4.10). Eine Erklärung wäre, dass Proteine, die an die benachbarten fp5- und fp6-Regionen binden, E2F-Proteine von ihrer Bindestelle verdrängen. Die von Connelly et al. (1998) durchgeführten Transfektionsstudien mit verkürzten Promoterkonstrukten zeigen, dass das E2F-Bindemotiv keine signifikanten Auswirkungen auf die MCM4-Promoteraktivität in asynchron proliferierenden HeLa Zellen besitzt. Vergleichbare Resultate ergeben Transfektionsstudien mit MCM6- (Tsuruga et al., 1997b) oder MCM7-Promoterkonstrukten (Suzuki et al., 1998) die in HeLa Zellen durchgeführt wurden. Dabei zeigte sich, dass die im MCM6-Promoter vorhandenen E2F-Bindemotive zwar einen Einfluss auf die Promoteraktivität besitzen, jedoch wird

diese Aktivität hauptsächlich von anderen Promoter-Elementen vermittelt (Tsuruga et al., 1997b). Auch im MCM7-Promoter scheinen die E2F-Motive nur eine sekundäre Rolle in Hinblick auf die MCM7-Genexpression in HeLa Zellen zu besitzen (Suzuki et al., 1998). Demnach scheint die Zellzyklus-abhängige Regulation der MCM-Genexpression in HeLa Zellen nur bedingt von E2F abhängig zu sein. Eine Erklärung dafür ist die Tatsache, dass es sich bei HeLa Zellen um Cervix-Carzinom-Zellen handelt, die mit dem DNA-Tumorvirus HPV18 ('human papillomavirus') transformiert sind (zur Hausen, 1991). Die onkogene Eigenschaft dieses Virus beruht auf der Expression der viralen Proteine E6 und E7. Das E6 Onkoprotein ist in der Lage mit dem Tumorsuppressor p53 über eine zelluläre Ubiquitin-Ligase (E6-AP) zu interagieren, was zur Degradierung von p53 führt (Scheffner et al., 1993). Das E7 Protein hingegen bildet unter anderem mit pRb Komplexe und setzt so E2F/DP Heterodimere frei, was dann zur transkriptionellen Aktivierung von S-Phase Genen führt (Dyson et al., 1989; Münger et al., 1989; Nevins et al., 1992). Demnach findet man in HeLa Zellen keine E2F/pRb-Komplexe, was eine Erklärung für die Daten von Tsuruga et al. (1997b), Suzuki et al. (1998), Connelly et al. (1998) und dieser Arbeit (Abb. 4.3, Abb. 4.4, Abb. 4.6, Abb. 4.10) sein könnte. Tatsächlich unterscheidet sich das Spektrum an Protein-DNA Komplexen, wenn nukleare Extrakte aus HeLa Zellen oder aus primären Fibroblasten mit dem E2F-Bindemotiv als DNA-Substrat im Gel-Retardierungs-Experiment untersucht werden. Extrakte aus primären Fibroblasten bilden mindestens zwei Protein-DNA Komplexe mehr als Extrakte aus HeLa Zellen (Daten nicht gezeigt). Dieser Ansatz wurde allerdings nicht weiter verfolgt, da durch die Arbeiten von Tsuruga et al. (1997a, b), Suzuki et al. (1998), Leone et al. (1998) und Ohtani et al. (1999) sowie die Untersuchungen der Promotoren der *hORC1*- und *hCDC6*-Gene eine E2F-abhängige Regulation der Zellzyklus-abhängigen MCM-Genexpression und somit auch des *hMCM4*-Gens als wahrscheinlich gilt.

5.5. Identifizierung einer cDNA, die für die 'mitotic checkpoint kinase' Bub1 codiert

Zur Identifizierung eines fp6-bindenden Proteins wurde in dieser Arbeit eine λ -Expressionsbibliothek auf eine spezifische Protein-DNA Wechselwirkung untersucht. Dabei wurde ein Phagenklon isoliert, der ein spezifisch mit der fp6-Sequenz interagierendes Fusionsprotein exprimiert (Abb. 4.14). Datenbankanalysen ergaben, dass es sich um ein Polypeptid handelt, das den C-terminalen Aminosäuren 294 bis 1085 von hBub1p entspricht. Das *BUB1*-Gen wurde ursprünglich in *S. cerevisiae* bei Untersuchungen von Mutanten entdeckt, die sensitiv gegenüber Mikrotubuli-Antagonisten sind (Hoyt et al., 1991). Die

Bezeichnung *BUB1* steht daher für 'budding uninhibited by benzimidazole'. ScBub1p ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, deren Funktion essenziell für den mitotischen 'spindle checkpoint' in *S. cerevisiae* ist (Roberts et al., 1994). Dieser Kontrollmechanismus ist für die gleichmäßige Verteilung der Chromatiden durch den Spindelapparat in der Mitose notwendig. Dabei wird sowohl die Assoziation der Mikrotubuli an die Kinetochoren der Chromosomen als auch die Spannung von bereits assoziierten Mikrotubuli überwacht. Tritt ein Fehler auf, werden durch den Checkpoint Inhibitoren stabilisiert, die einen Eintritt in die mitotische Anaphase und damit eine Segregation der Chromatiden verhindern (Übersichtsartikel Clarke & Giménez-Abián, 2000; Shah & Cleveland, 2000).

Ein Modell für höhere Eukaryoten besagt, dass Kinetochore, die nicht mit Mikrotubuli assoziiert vorliegen, spezifisch von einem Protein, dem Mad2 (mad für 'mitotic arrest defect'; Li & Murray, 1991), erkannt werden (Waters et al., 1999). Dadurch wird ein aktiver Checkpoint-Komplex gebildet, der sich aus Mad2 und hyperphosphoryliertem Mad1 zusammensetzt (Hardwick et al., 1996; Weiss & Winey, 1996). Die Phosphorylierung von Mad1 ist abhängig von der Msp1 Kinase, Mad2, Bub1 und Bub3 (Hardwick et al., 1995, 1996). Der Zellzyklus wird durch Inhibition des APC ('anaphase promoting complex') unterbrochen. Die Verbindung zum APC wurde durch Studien in Hefe belegt, die zeigen, dass Mad2 an Cdc20, einer Komponente des APC, binden kann (Li et al., 1997; Hwang et al., 1998). Es scheint, dass durch diese Bindung möglicherweise die APC-abhängige Ubiquitinierung von APC-Substraten verhindert wird.

Das menschliche Homolog zu ScBUB1 wurde aufgrund vergleichender Sequenzanalysen identifiziert (Pangilinan et al., 1997; Taylor et al., 1998). Das Protein hBub1p wird Zellzyklus-abhängig exprimiert (Taylor et al., 2001). Beim G1/S Übergang in HeLa Zellen ist die Menge an hBub1p gering, nimmt dann während der S- und G2-Phase um das Zehnfache zu, um dann nach der Mitose in der frühen G1-Phase abgebaut zu werden. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen, dass hBub1p, entsprechend seiner Funktion als 'spindle checkpoint'-Komponente, während der Mitose mit den Kinetochoren kolokalisiert (Chan et al. 1999; Sharp-Baker & Chen, 2001; Skoufias et al., 2001; Taylor et al., 1998). In Interphase-Zellen findet man hBub1p in Foci im Nukleus konzentriert, wo hBub1p mit dem Kinetochor-Antigen CREST kolokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass hBub1p in Interphase Zellen mit den Centromeren interagiert (Ouyang et al., 1998). Eine DNA-Bindung wurde bisher weder untersucht noch nachgewiesen. Die cDNA von hBub1 wurde jedoch in dieser Arbeit über einen Versuch identifiziert, der eine Protein-DNA Bindung voraussetzt. Es wäre von Interesse, diese ersten Hinweise auf eine DNA-Bindung durch weitere Untersuchungen zu überprüfen.

Eine Bindung von hBub1p an die AT-reiche fp6-DNA wäre aufgrund der ebenfalls AT-reichen Centromerbereiche von Chromosomen (Übersichtsartikel Sunkel &

Coelho, 1995) denkbar. Datenbankanalysen ('Human Genome Project') ergaben, dass das *MCM4*-Gen ca. 3 Mb vom Centromer auf Chromosom 8 in der Region 8q12-q13 (Diplomarbeit, 1996) lokalisiert ist und sich somit in unmittelbarer Nähe des Centromers befindet. Diese Region könnte mit der durch Fluoreszenzaufnahmen ermittelten Lokalisation von hBub1p überlappen.

Ein Argument gegen eine Bindung von hBub1p an die fp6-DNA im MCM4-Promoter ist die Zellzyklus-abhängige Expression dieses Proteins (s.o.). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Protein-DNA Komplexe von Proteinen aus Extrakten verschiedener Zellzyklus-Phasen mit der fp6-DNA im Gel-Retardierungs-Experiment nicht unterscheiden (siehe Abb. 4.9.). Zudem besitzt hBub1p ein apparentes Molekulargewicht von 122 kD (Taylor et al., 2001), was im Widerspruch zu den Resultaten der 'South-Western' Experimente steht, wonach ein Protein von ca. 68 kD mit der fp6-DNA interagiert (siehe Abb. 4.13). Unabhängig davon, dass dieses 68 kD Protein möglicherweise ein Abbauprodukt von hBub1p sein könnte, ist zu beachten, dass die angewendete 'Screening' Methode eine kritische Technik zur Identifizierung von spezifischen DNA-bindenden Faktoren ist, da Protein-DNA Interaktionen von vielleicht unvollständig gefalteten Proteinen, die zusätzlich an einen Träger gebunden sind, untersucht werden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass in einer Region des MCM4-Promoters, die die fp6-DNA einschließt, eine Bindestelle für hOrc1p und hOrc2p vorliegt (siehe 5.6.). Somit ist es unwahrscheinlich, dass hBub1p an die fp6-DNA im MCM4-Promoter bindet. Möglicherweise ist die in Abb. 4.14 gezeigte DNA-Bindung von hBub1p eher durch den hohen AT-Gehalt der fp6-DNA definiert als durch die DNA-Sequenz.

5.6. Identifizierung einer ORC-Bindestelle im MCM4-Genpromoter

Durch die Anwendung einer modifizierten *in vivo* Crosslinking Methode (3.2.5.6.) konnten Sequenzen identifiziert werden, die sowohl mit hOrc1p als auch mit hOrc2p assoziiert vorliegen. Eine dieser Bindestellen ist zwischen den beiden divergent transkribierten Genen *MCM4* und *PRKDC* lokalisiert. Diese Region überlappt zudem mit einer Startstelle der DNA Replikation. Damit konnte erstmals eine Binderegion für ORC-Proteine im humanen Genom beschrieben werden. Neben einer in *D. melanogaster* identifizierten ORC-Bindestelle im Chorion Gen Locus (Austin et al., 1999) ist dies die zweite identifizierte ORC-Bindestelle in Metazoen.

Crosslinking und Immunpräzipitation

Die ChIP-Technik wurde bei einer Vielzahl von Untersuchungen erfolgreich angewendet, bei welchen Protein-DNA Interaktionen in Eukaryoten analysiert wurden (Orlando, 2000). Mittels dieser Methode werden DNA-gebundene Proteine durch Formaldehyd kovalent mit der DNA und benachbarten Proteinen *in vivo* vernetzt. Die Protein-DNA Komplexe werden durch verschiedene Reinigungsschritte von nicht-vernetzten Proteinen sowie Protein-freier DNA und RNA abgetrennt. Das so gereinigte Nukleoprotein wird durch Sonifizieren in Lösung gebracht und kann dann mit entsprechenden Antikörpern immunpräzipitiert werden.

Technische Aspekte

Die ChIP-Technik hat innerhalb der Arbeitsgruppe (LS Knippers) eine langjährige Tradition. Die Methode wurde 1997 von Dr. F. O. Fackelmayer und Frank Göhring etabliert und dann von Marion Ritzi während ihrer Dissertation (2000) verfeinert. Diese Untersuchungen bildeten die Grundlage für die hier diskutierten Resultate.

In dieser Arbeit sollten mittels der ChIP-Technik neben den gefällten Proteinen vor allem die kopräzipitierten DNA-Fragmente mittels PCR-Techniken auf eine Anreicherung von spezifischen Sequenzen hin untersucht werden. Dazu war es notwendig, verschiedene technische Details des ChIP-Assays für eine erfolgreiche Anwendung zu optimieren.

Ein wichtiger Aspekt bei der Bildung von Protein-DNA Komplexen ist die Dauer der Formaldehydbehandlung. Einerseits sollten die zu untersuchenden Proteine mit der DNA vernetzt vorliegen, andererseits führen längere Behandlungen mit Formaldehyd zur Bildung von großen Protein-DNA Aggregaten, was wiederum die Zugänglichkeit der Antikörper zu den Zielproteinen beeinträchtigt. Bei einer Fixierungsdauer von 4 min werden sowohl hOrc1p, hOrc2p als auch die hMCM-Proteine mit der genomischen DNA vernetzt (Abb. 4.21), und zudem kann bei diesem Vernetzungsgrad erfolgreich mit den entsprechenden Antikörpern immunpräzipitiert werden.

Ein weiterer Punkt ist die Länge der DNA-Fragmente im Nukleoprotein. Für eine genaue Kartierung ist es sinnvoll, mit möglichst kurzen DNA-Fragmenten zu arbeiten. Da die Effizienz von PCR-Reaktionen sowohl von der Menge als auch von der Länge der jeweiligen DNA-Templates abhängig ist, wurde das Nukleoprotein mittels MNase so verdaut, dass die Fragmentlängen zwischen 0,25 und 1 kb liegen. Mit diesen Fragmentlängen kann eine relativ genaue Kartierung erfolgen und die DNA effizient amplifiziert werden (Abb. 4.23).

Eine grundsätzliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung des ChIP-Assays ist die Qualität der Antikörper, mit denen immunpräzipitiert wird. Durch die Affinitätsreinigung der Antikörper über spezifische Antigen-Säulen wurde in dieser

Arbeit, wie bereits bei Ritzi et al. (1998) beschrieben, eine Anreicherung von präzipitationskompetenten Immunglobulinen gewährleistet.

Ein weiterer kritischer Schritt ist das extensive Waschen der Immunpräzipitate mit verschiedenen Puffern. Um eine hohe Anreicherung von spezifischen DNA-Sequenzen im immunpräzipitierten Chromatin zu erreichen, wurde ein aufwendiges Protokoll etabliert. Dabei werden die Proben 16 mal mit Puffern gewaschen, die verschiedene Detergenzien und teilweise hohe Salzkonzentrationen enthalten (siehe 3.2.5.7.), um dann im Western Blot analysiert zu werden. Bevor die DNA für PCR-Reaktionen präpariert wird, werden diese stringenten Waschschrte wiederholt. Dadurch konnten unspezifische Signale drastisch reduziert werden, was eine sinnvolle Analyse der koprazipitierten DNA ermöglichte. Durch die Anwendung der quantitativen 'real-time' PCR konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte genomische DNA-Fragmente gegenüber benachbarten Regionen angereichert vorliegen. Die hohe Sensitivität der Light Cycler Analysen ermöglichte es, die DNA einer Fällung derart zu verdünnen, dass dieselbe Probe in mehreren Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen Primerpaaren quantifiziert werden konnte. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, um die einzelnen Werte der Quantifizierungen miteinander vergleichen zu können. So war die Menge an eingesetzter Template-DNA, die im Light Cycler System reproduzierbare Daten ergab, viermal geringer als die Template-DNA-Menge, die bei konventionellen PCR-Reaktionen im Agarosegel ein nachweisbares Ergebnis lieferte. Eine quantitative Analyse der immunpräzipitierten DNA mittels kompetitiver PCR wäre aufgrund der geringen DNA-Menge deshalb nicht möglich. Da bei der 'real-time' PCR zudem die Präparation von Kompetitor-DNA entfällt, ist diese Technik eine relativ einfache und zeitsparende Methode, um die Kopienanzahl einer spezifischen DNA-Sequenz in einer Probe zu bestimmen.

hOrc1p und hOrc2p im Nukleoprotein

In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen hOrc1p und hOrc2p verwendet um Chromatin mit spezifischen DNA-Sequenzen zu präzipitieren. Bei den hier durchgeführten Experimenten konnten mit hOrc2p-Antikörpern nahezu alle Chromatinfragmente gefällt werden, die hOrc2p tragen, wohingegen mit hOrc1p-Antikörpern nur ein Bruchteil des vernetzten hOrc1p immunpräzipitiert werden konnte (Abb. 4.22C, Abb. 4.24C). Da die verwendeten hOrc1p-Antikörper lösliches hOrc1p effizient immunpräzipitieren (Abb. 4.17; Kreitz et al., 2000), scheint ein großer Anteil des vernetzten Proteins für die Antikörper nicht zugänglich zu sein, oder, bedingt durch die Formaldehydbehandlung, strukturell verändert vorzuliegen. Vergleichbar mit Untersuchungen in anderen Eukaryoten (Chesnokov et al., 1999; Lee & Bell, 1997; Tugal et al., 1998) konnten in Extrakten aus HeLa Zellen hOrc1p und hOrc2p als Komponenten des ORC-Komplexes nachgewiesen werden

(Vashee et al., 2001), so dass man davon ausgehen kann, dass hOrc1p und hOrc2p auch *in vivo* Bestandteile eines multimeren ORC-Komplexes sind. Demzufolge scheinen hOrc1p und hOrc2p nicht unabhängig voneinander an Chromatin gebunden zu sein. In den ChIP Assays zeigte sich, dass nur ein geringer Anteil der Chromatinfragmente, die mit hOrc1p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurden, auch mit hOrc2p vernetzt vorliegen und umgekehrt. Der Grund dafür könnte sein, dass durch die kurze Behandlung mit Formaldehyd verschiedene Varianten des ORC-Komplexes fixiert werden, die dann von den Antikörpern je nach Zugänglichkeit des jeweiligen Antigens selektiv erkannt werden. Ein Hinweis darauf, dass hOrc1p und hOrc2p Bestandteile eines Chromatin-gebundenen ORC-Komplexes sind, ist der Untersuchungsbefund (Abb. 4.27, Abb. 4.28), dass sowohl hOrc1p-Antikörper als auch hOrc2p-Antikörper Chromatinfragmente mit identischen DNA-Sequenzen präzipitieren.

Frühere Experimente zeigten, dass sich in Säugerzellen die Zusammensetzung des ORC-Komplexes während des Zellzyklus verändert, wohingegen in Hefe der ORC Komplex über den gesamten Zellzyklus intakt bleibt. In höheren Eukaryoten verändern sich die Interaktionen zwischen Orc1p und anderen Komponenten des ORC-Komplexes während der S-Phase (Hua et al., 1997; Natale et al., 2000; Rowles et al., 1999; Sun et al., 2000). Dieser Vorgang konnte auch in proliferierenden HeLa Zellen nachgewiesen werden, wo sich hOrc1p während der S-Phase vom Chromatin ablöst (Kreitz et al., 2001). Das Verhalten von hOrc1p wurde untersucht, indem Zellen für vier Stunden aus einem doppelten Thymidinblock in die S-Phase entlassen wurden. In der S-Phase präpariertes Chromatin konnte nicht mit hOrc1p-spezifischen Antikörpern präzipitiert werden und enthält dementsprechend auch kein hOrc1p (Abb. 4.28A). Jedoch bindet hOrc2p während der S-Phase innerhalb derselben Region wie in der G1-Phase, was darauf hindeutet, dass eine S-Phase-abhängige Dissoziation von hOrc1p vom Chromatin keine wesentliche Veränderung der Lokalisation von hOrc2p und vermutlich anderer ORC-Untereinheiten während des Zellzyklus bewirkt.

ORC und die Kernmatrix

Interessant sind die in Abb. 4.22C dargestellten Daten, die zeigen, dass ein geringer Anteil des 'Scaffold Attachment Factors A' (SAF-A) mit hOrc1p- und hOrc2p-spezifischen Antikörpern kopräzipitiert werden kann. SAF-A ist ein typisches Protein der Kernmatrix, das eine hohe SAR/MAR-spezifische DNA-Bindeaktivität besitzt (Fackelmayer et al., 1994; Kipp et al., 2000; Romig et al., 1992). Untersuchungen zeigen, dass die Kernmatrix häufig mit naszierender DNA assoziiert vorliegt. Deshalb geht man davon aus, dass die DNA-Abschnitte, an denen die Initiation der DNA-Replikation stattfindet, möglicherweise innerhalb der MAR-Elemente liegen (Übersichtsartikel Berezney et al., 2000; Cook, 1999; Dijkwel

& Hamlin, 1988; Dijkwel et al., 1991; Gilbert, 2001;). Untersuchungen von SAR/MAR-Elementen im Topoisomerase 1-Gen zeigen jedoch weder eine ORC-Bindung noch eine Origin-Aktivität (Keller et al., submitted). Dagegen konnte mittels der ChIP-Technik und dem 'nascent strand abundance assay' gezeigt werden, dass ORC im Promoterbereich des *TOP1*-Gens, der ca. 5 kb stromaufwärts eines MAR-Elements lokalisiert ist, bindet und diese Region Origin-Aktivität besitzt (Keller et al., submitted). Diese Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, dass MAR-Elemente wichtige replikative Funktionen einnehmen. Neuere Arbeiten zeigen, dass ein MAR-Element den essenziellen Bestandteil eines Plasmides bildet, das in der Lage ist, extrachromosomal zu replizieren (Piechaczek et al., 1999). Das MAR-Element in diesem Vektor vermittelt die Interaktion zwischen dem Plasmid und dem Chromatin. Im Fall einer Deletion dieses Elements wird die Fähigkeit des Plasmides episomal zu replizieren zerstört (Baiker et al., 2000). Möglicherweise sind MAR-Elemente notwendig, um über ihre Interaktion mit der Kernmatrix Replikons räumlich zu strukturieren. So scheint eine Verbindung zwischen replikativen Elementen und der chromosomalen Architektur wichtig zu sein, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass Plasmide, die MCM4-Promoterfragmente enthalten und somit eine ORC-Bindestelle und einen Origin besitzen, nicht in der Lage sind, episomal zu replizieren (Abb. 4.32).

Eine Binderegion für hOrc1p und hOrc2p

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass in Chromatin, das mit hOrc1p- und mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurde, spezifische DNA-Sequenzen angereichert vorliegen. Durch konventionelle und quantitative 'real-time' PCR konnte einem Bereich, der zwischen den beiden divergent transkribierten Genen *MCM4* und *PRKDC* lokalisiert ist, eine Binderegion für hOrc1p und hOrc2p zugeordnet werden. Zudem überlappt dieser Bereich mit einer Startstelle der DNA-Replikation. Die untersuchte Sequenz (UPR für 'upstream promoter region') zeichnet sich durch eine 84 bp lange, AT-reiche Region aus, die von GC-reichen Abschnitten umgeben ist. Vergleicht man die Region mit bereits bekannten humanen Origins, die mit Ausnahme von AT-reichen DNA-Entwindungs-Elementen keine konservierten Sequenz-Elemente besitzen, so sind im MCM4-Genpromoter weitere Merkmale vorhanden, die für eine Originaktivität sprechen: Die UPR-Region überlappt mit transkriptionellen Kontrollelementen und ist zudem sehr GC-reich.

Viele der bisher in höheren Eukaryoten kartierten Origins sind häufig in Promoter- oder Enhancer-Bereichen von aktiv transkribierten Genen lokalisiert (Übersichtsartikel Antequerra & Bird, 1999). Eine Korrelation zwischen Transkription und Replikation wurde auch für verschiedene virale Systeme beschrieben (Guggenheimer et al., 1984; Übersichtsartikel Van der Vliet, 1996). So erinnert die

molekulare Architektur des MCM4-Genpromoters an die Replikationsstartstelle im Genom des Simian Virus 40. Dieser ca. 100 bp große Origin enthält neben einigen GC-Elementen, die als Bindestelle für das Initiatorprotein (T-Antigen) der viralen Replikation dienen, sowohl Folgen von essenziellen AT Nukleotiden als auch Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Untersuchungen zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 die Funktion des T-Antigens und somit die Aktivität des viralen Origins um ein Vielfaches steigert (Guo et al., 1989; Guo & DePamphilis, 1992; Simmons, 2000; Turner & Woodworth, 2001). In Hefe vermitteln die B3-Elemente der ARS-Sequenzen eine Bindung des Transkriptionsfaktors Abf1. Durch diese Bindung an den Origin bewirkt Abf1 eine Stimulation der DNA-Replikation (Diffley & Stillman, 1988). Vergleichbare Effekte sind zu beobachten, wenn die RNA-Polymerase II an ARS Sequenzen rekrutiert wird (Stagljar et al., 1999). Neuere Untersuchungen in *D. melanogaster* zeigen, dass die Lokalisation des ORC-Komplexes an das ACE3-Element (amplification control element) des Origins im Chorion-Genlocus durch eine direkte Interaktion zwischen dem E2F-Transkriptionskomplex und dem ORC-Komplex reguliert wird (Bosco et al., 2001).

Weiterhin sind viele Origins, die in der frühen S-Phase aktiviert werden, häufig durch Folgen von CpG Dinukleotiden gekennzeichnet (Delgado et al., 1998). Solche Motive sind charakteristische Elemente in Promotoren von Haushaltsgenen, da sie mögliche Bindemotive für den Transkriptionsfaktor Sp1 darstellen. Viele Untersuchungen zeigen, dass genomische Bereiche, die Haushaltsgene enthalten, tatsächlich früh in der S-Phase replizieren (z.B. Lamin B2 Origin, Kumar et al., 1996), ebenso wie so genannte 'regulierte Gene', die in den Zellen exprimiert werden. Interessant ist, dass solche 'regulierte Gene' erst in der späten S-Phase repliziert werden, wenn die Zellen differenziert sind und die entsprechenden Gene nicht mehr exprimiert werden (Hatton et al., 1988; Simon et al., 2001). Diese enge Korrelation zwischen Transkription und DNA-Replikation läßt vermuten, dass möglicherweise in vielen Promotoren von Haushaltsgenen ORC gebunden vorliegt. Weitere Beispiele hierfür sind die im Promoter des *TOP1*-Gens (Keller et al., submitted) oder des *ppv1*-Gens (Abb. 4.33) identifizierten ORC-Binderegionen. Daraus ergibt sich die Frage, warum ORC-Komplexe bevorzugt in Promoterregionen mit DNA assoziieren. Tatsache ist, dass diese Bereiche eine aufgelockerte Chromatinstruktur besitzen, was möglicherweise die Zugänglichkeit des ORC-Komplexes an die DNA erleichtert. Dass die Chromatinstruktur einen Einfluss auf die Effizienz der DNA-Replikation hat, zeigen Experimente mit dem 'Chromatin Accessibility Complex' (CHRAC) im Simian Virus 40 System. Dieser Faktor bewirkt eine Verschiebung von Nukleosomen am SV 40 Origin, so dass dieser frei von Nukleosomen vorliegt. Dadurch wird die Interaktion von dem T-Antigen mit dem Origin erleichtert, was die Effizienz der DNA-Replikation steigert (Alexiadis et al., 1998). Ähnliche Effekte zeigen Untersuchungen mit dem

Tumorsuppressor BRCA 1, der über seine saure transkriptionelle Aktivierungsdomäne die Chromatinstruktur lokal verändert und dadurch die chromosomale DNA-Replikation stimuliert (Hu et al., 1999).

Die Initiation der Replikation kann mit hoher Wahrscheinlichkeit an vielen Stellen in Genomen von höheren Eukaryoten stattfinden, jedoch scheinen sich diese Ereignisse eher auf euchromatische promotornahe Bereiche zu konzentrieren, wo die ORC-Bindung möglicherweise durch Transkriptionsfaktoren stabilisiert wird. Deshalb wäre es von Interesse zu klären, inwiefern benachbarte transkriptionelle Kontrollelemente im MCM4-Genpromoter sowohl die Origin-Aktivität als auch die ORC-Bindung beeinflussen. Ein wichtiger Schritt wäre eine genauere Eingrenzung der ORC-Binderegion im MCM4-Genpromoter.

5.7. Eingrenzung der ORC-Binderegion im MCM4-Genpromoter

Hinweise darauf, welche Sequenzen im MCM4-Genpromoter für eine ORC-Bindung in Frage kommen, geben die unter 4.1.2. beschriebenen 'in vitro footprinting' Experimente. Dabei sind die DNase-I-geschützte Bereiche fp5 und fp6 insofern interessant, da sie weder einen signifikanten Einfluss auf die Transkription der beiden Gene besitzen (Connelly et al., 1998) noch Bindemotive für bekannte Transkriptionsfaktoren darstellen. Insgesamt decken beide Motive einen Bereich von 85 bp ab und erinnern, aufgrund ihrer Größe und Sequenz, sowohl an die in *S. cerevisiae* beschriebenen Protein-DNA Interaktionen von ORC mit den ARS1-Elementen (Bell & Stillman, 1992) als auch an die geschützten Regionen, die durch 'in vivo footprinting'-Analysen im Lamin B2 Locus über der OBR-Region nachgewiesen wurden (siehe 1.2.) (Abdurashidova et al., 1998; Dimitrova et al., 1996).

Ähnliche DNase-I-geschützte Bereiche, wie die im MCM4-Genpromoter identifizierten Regionen fp5 und fp6, finden sich auch im Promoter des *TOP1*-Gens, der ebenfalls eine ORC-Binderegion enthält (Keller et al., submitted). Die geschützten Bereiche sind 519 bis 604 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart lokalisiert und mit Fp11 und Fp12 bezeichnet (Heiland et al., 1993; 1996 Dissertation). Vergleichbar mit den fp5 / fp6 Regionen des MCM4-Promoters sind diese Bereiche für die Regulation der *TOP1*-Genexpression nicht relevant (Heiland et al., 1995), besitzen keine Sequenzhomologien zu Bindemotiven bekannter Transkriptionsfaktoren und liegen, da das *TOP1*-Gen ein Haushaltsgen ist, im Kontext mit Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 vor. Vergleicht man die Sequenzen von Fp11 des *TOP1*-Genpromoters mit denen von fp6 des MCM4-Genpromoters, so findet man, dass beide Motive durch eine Folge von AT-Nukleotiden gekennzeichnet sind, die eine palindromische Sequenzfolge (AAAATAATTTT)

bilden. Zudem protektieren Fp11 und Fp12 gemeinsam eine Region von 86 bp, die damit der ermittelten Länge des fp5 / fp6 Bereichs von 85 bp in etwa entspricht. Welche Proteine genau mit den DNase-I-geschützten Bereichen fp5 und fp6 interagieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Hinweise auf eine Interaktion von ORC-Proteinen mit der fp5/fp6-DNA geben sowohl Gel-Retardierungs- und 'South-Western' Experimente mit rekombinatem hOrc1p (siehe Abb. 4.18 und Abb. 4.19) als auch Supershift-Experimente mit hOrc2p-spezifischen Antikörpern (siehe Abb. 4.15). So verändert sich die Mobilität der Protein-DNA Komplexe im Gel-Retardierungs-Experiment, wenn fp6- oder fp5/fp6-DNA als Substrate verwendet und mit nuklearem Extrakt aus HeLa S3 Zellen inkubiert werden, der zuvor mit einem hOrc2p-spezifischen Antikörper behandelt wurde (Abb. 4.15). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre, dass durch den Antikörper eine vollständige Assemblierung des ORC-Komplexes unterdrückt wird, was eine Ursache für die höhere Mobilität des Komplexes sein könnte. Dies würde allerdings voraussetzen, dass ORC-Proteine mit der fp6-DNA interagieren und bei der Bildung der unter Abb. 4.16 beschriebenen Doppelbande (x,y) direkt involviert sind.

Jedoch gibt es auch verschiedene Hinweise gegen eine Interaktion von ORC-Proteinen und der fp6-DNA. Sowohl aus *S. cerevisiae* als auch aus *D. melanogaster* ist bekannt, dass eine spezifische Bindung von ORC an Origin-Sequenzen nur in Anwesenheit von ATP erfolgt (Austin et al., 1999; Bell & Stillman, 1992; Lee et al., 2000). Die Bildung der in Abb. 4.7 oder Abb. 4.16 beschriebenen Protein-DNA Komplexe wird durch ATP nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Zudem befinden sich hOrc1p und hOrc2p im Glycerindichtegradient teilweise in anderen Fraktionen als die fp6-bindenden Proteine (Abb. 4.16). Demnach scheinen unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen andere Faktoren mit der fp6-DNA zu interagieren. Ein weiteres Argument gegen eine direkte Interaktion von ORC mit der fp6-DNA liefern die Daten der Abb. 4.17, die zeigen, dass Extrakte, die mit hOrc1p- oder hOrc2p-spezifischen Antikörpern immunodepletiert wurden, denselben Protein-DNA Komplex bilden wie unbehandelte Extrakte. So scheint der Ansatz, DNA in Kernextrakten zu inkubieren, ungeeignet zu sein, um eine spezifische ORC-Bindung an eine DNA-Sequenz nachzuweisen. Da in solchen Extrakten zahlreiche DNA-bindende Faktoren vorhanden sind, die mit hoher Affinität entweder Sequenz-spezifisch (z.B. Transkriptionsfaktoren) oder auch Sequenz-unspezifisch (z.B. DNA-Polymerasen) an DNA binden, ist es denkbar, dass ORC-Proteine von ihrer Bindestelle verdrängt werden. Beispielsweise wurden über einen 'one-hybrid screen' Faktoren identifiziert, die spezifisch mit der OBP-Region im Lamin B2 Origin (siehe Abb. 1.2) interagieren. Die Untersuchungen zeigten, dass an diese Sequenz die Transkriptionsfaktoren HOXA13, HOXC10 und HOXC13 aus der Familie der Homeoproteine binden (de Stanchina et al., 2000) und nicht - wie

vermutet - Komponenten der Replikationsmaschinerie, wie ORC oder Cdc6. Auch bei dieser Methode des 'one-hybrid screens' ist eine Selektion für Proteine begünstigt, die *per se* an DNA binden und nicht als Bestandteil eines heteromeren Komplexes wie beispielsweise ORC.

Weiterhin stellt sich die Frage, welche Faktoren die Spezifität der DNA-Bindung des hORC-Komplexes vermitteln. Untersuchungen in *S. cerevisiae* zeigen, dass die ScOrc1-5-Untereinheiten, nicht aber ScOrc6p, für eine spezifische DNA-Bindung notwendig sind (Lee & Bell, 1997), wobei die ATP-abhängige Bindung über ScOrc1p vermittelt wird (Klemm et al., 1997). Die Spezifität der DNA-Bindung des ScORC-Komplexes wird durch ScCdc6p gesteigert (Mizushima et al., 2000). In *D. melanogaster* ist DmOrc1p, ähnlich wie in *S. cerevisiae* beschrieben, sowohl für die ATP-Bindung als auch für eine stabile DNA-Bindung notwendig und ausreichend (Chesnokov et al., 2001). Allerdings wird die Spezifität der DNA-Bindung über DmOrc6p vermittelt (Chesnokov et al., 2001). In *S. pombe* wiederum ist SpOrc4p für eine spezifische DNA-Bindung essenziell (Kong & DePamphilis, 2001). Demnach unterscheidet sich das Bindungsverhalten von ORC bei Eukaryoten. In Säugerzellen verändert sich die Zusammensetzung von ORC während des Zellzyklus, da sich hOrc1p während der S-Phase vom Chromatin ablöst (Kreitz et al., 2000; Natale et al., 2000). So könnte es durchaus sein, dass in Säugerzellen die Bindungsspezifität von ORC über hOrc1p definiert wird. Ein Hinweis darauf sind die in Abb. 4.19 dargestellten 'South-Western' Experimente, die zeigen, dass rekombinantes his-hOrc1p allein spezifisch mit einem 280 bp langen MCM4-Promoterfragment interagiert.

Aufgrund der variablen Zusammensetzung des hORC-Komplexes (Kreitz et al., 2000) ist es eher unwahrscheinlich, dass sich intakte hexamere hORC-Komplexe aus nuklearen Extrakten reinigen lassen. Jedoch könnten die von Vashee et al. (2001) oder Dhar et al. (2001) beschriebenen, im Baculo Virus System exprimierten, isolierten humanen ORC-Komplexe Aufschluss über den Mechanismus der DNA-Bindung geben. Es wäre interessant festzustellen, ob solche Komplexe spezifisch mit der fp5 / fp6 DNA des MCM4-Genpromoters interagieren. Hinweise geben Untersuchungen, die zeigen, dass rekombinantes his-hOrc1p im Gel-Retardierungs-Experiment mit der fp6-DNA als Substrat einen ähnlichen Protein-DNA Komplex bildet wie Proteine aus nuklearen Extrakten (Abb. 4.18). Demzufolge scheinen die in den Extrakten vorhandenen ORC-Proteine, oder zumindest hOrc1p - neben anderen Faktoren - mit der fp6-DNA zu interagieren.

Vergleicht man allerdings die Sequenzen der über den ChIP-Assay identifizierten ORC-Binderegionen in den *TOP1*- (Keller et al., submitted), *ppv1*- oder *MCM4*-Genpromotoren, so finden sich neben den AT-reichen Bereichen kaum Sequenzhomologien, die auf ein konserviertes DNA-Bindemotiv für ORC hindeuten. Die

Bindung von hORC an DNA scheint daher eher durch die Chromatinstruktur definiert zu sein, als über spezifische Sequenzelemente.

5.8. Kolokalisation von MCM-Proteinen und ORC-Proteinen

Untersuchungen in Hefe und in *X. laevis* zeigen, dass Prä-Replikationskomplexe in einer geordneten Reihenfolge gebildet werden. Dabei wird über ORC Cdc6 und Cdt1 an den Origin rekrutiert, was dann zur Chromatinbindung von MCM-Proteinen führt (siehe 1.3.2.2.). Da alle bisher identifizierten Initiationsfaktoren hochkonservierte Proteine sind, liegt die Vermutung nahe, dass in allen Eukaryoten ähnliche Mechanismen vorliegen. Um Erkenntnisse über die Zusammensetzung des Prä-Replikationskomplexes in humanen Zellen zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit mittels der ChIP-Technik Chromatin untersucht, das mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurde. Durch quantitative 'real time' PCR konnte gezeigt werden, dass in α -hMcm3p-immungefälltem Chromatin, das aus G1-Phase Zellen präpariert wurde, spezifische DNA-Sequenzen angereichert sind. Diese Sequenzen überlappen mit der identifizierten ORC-Binderegion im MCM4-Genpromoter (Abb. 4.29). Somit scheinen in humanen Zellen MCM- und ORC-Proteine an identische DNA-Bereiche zu binden und gemeinsam Startstellen der DNA-Replikation in der G1-Phase zu markieren.

Die Daten der quantitativen 'real time' PCR (siehe Abb. 4.29) widersprechen der bisherigen Annahme, dass hMCM-Proteine gleichmäßig über das Genom verteilt sind, während hORC-Komplexe an bestimmten Stellen lokalisiert sind (Ritzi et al., 1998). Dieses Modell basiert unter anderem auf Western Blot Analysen von *in vivo*-vernetztem Nukleoprotein, das mit hMCM- oder hOrc2p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurde. In Western Blot Analysen können, ähnlich wie in Abb. 4.24B dargestellt, nur geringe Mengen an kopräzipitiertem hOrc2p in α -Mcm3p-präzipitiertem Chromatin nachgewiesen werden. Die geringe Kopräzipitation von hOrc2p und hMCM-Proteinen im ChIP-Assay sprechen tatsächlich gegen eine Kolokalisation von hMCM-Proteinen und hORC-Proteinen.

Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnten jedoch die unterschiedlichen Mengenverhältnisse von Chromatin-gebundenen hORC- und hMCM-Proteinen sein. Frühere Arbeiten zeigten, dass die Anzahl an gebundenen hMCM-Proteinen die Anzahl an Origins und somit vermutlich auch an gebundenem hORC übersteigt (Burkhart, 1995, Dissertation; Fujita et al., 1997). So kann, selbst wenn hORC- und hMCM-Proteine in unmittelbarer Nachbarschaft am Chromatin lokalisiert sind, nur ein Bruchteil der mit hMcm3-spezifischen Antikörpern gefällten Proteine hORC sein. Allerdings müssten die so kopräzipitierten ORC-Proteine anteilmäßig mitgefällt werden, was unterschiedliche ORC-Proteinmengen in den Auftragsproben und den Überständen zur Folge hätte. Die in Abb. 4.24B und Abb. 4.29A

gezeigten Daten sind jedoch schwer interpretierbar, da weder die hOrc2p- noch die hMCM-Proteinmengen signifikante Unterschiede zwischen den Auftragsproben und den Überständen zeigen.

Eine weitere Ursache für die geringe Kopräzipitation beider Proteinkomplexe könnte in der Natur des ChIP-Assays begründet liegen. Geht man theoretisch davon aus, dass der hORC-Komplex aus hOrc2-5(6) besteht, der nur teilweise mit hOrc1p assoziiert vorliegt, so müssten zumindest die mit α -hOrc1p-präzipitierten Chromatinfragmente gleiche Mengen an hOrc2p und hOrc1p enthalten, was, wie bereits in 5.5. beschrieben, nicht der Fall ist. Somit ist es denkbar, dass der Nachweis einer Kopräzipitation von unterschiedlichen Proteinkomplexen (wie ORC und MCM) im Western Blot weitaus schwieriger sein könnte.

Vergleicht man Immunfällungen von hMCM3-spezifischen Antikörpern aus Nukleoprotein mit denen von löslichen Extrakten, so findet man auch hier drastische Unterschiede. Werden beispielsweise lösliche Extrakte mit entsprechenden Mengen α -hMcm3p-Antikörpern gefällt, so können diese effizient immundepletiert werden (Daten nicht gezeigt). Beim Vergleich der Mengen an hMCM-Proteinen in den Überständen des mit hMcm3p-Antikörpern präzipitierten Nukleoproteins mit denen im Auftrag zeigt sich jedoch, dass nur ein geringer Anteil der hMCM-Proteine gefällt werden kann (Abb. 4.24, Abb. 4.29). Demnach ist die Zugänglichkeit der Antikörper durch die Fixierung der Proteine mit Formaldehyd stark beeinträchtigt und man kann davon ausgehen, dass bei den Immunfällungen gezielt Nukleoproteine selektiert werden, die für die Antikörper zugänglich sind. So sind in α -hOrc1/2p-präzipitiertem Chromatin keine hMCM-Proteine nachweisbar (siehe Abb. 4.24, Abb. 4.29). Da der ORC-Komplex als Plattform für die Rekrutierung von Initiationsfaktoren dient, ist er wahrscheinlich im zentralen Bereich des Prä-Replikationskomplexes lokalisiert. Deshalb scheint es plausibel, dass durch die Chromatinbindung von MCM-Proteinen der Zugang zu ORC-Proteinen erschwert wird.

Die Tatsache, dass es überhaupt möglich ist ORC-Proteine zu präzipitieren, zeigt, dass im Nukleoprotein verschiedene Varianten von Protein-DNA Komplexen vorhanden sind. Diese Varianten ergeben sich aus unterschiedlichen Vernetzungen mit Formaldehyd, die von Zelle zu Zelle variieren können. Dabei ist es wahrscheinlich, dass der Vernetzungsgrad bei unterschiedlichen genomischen Regionen innerhalb der Kernkompartimente einer Zelle verschieden ist. Deshalb bleiben die Verhältnisse der kopräzipitierten DNA-Sequenzen, unabhängig von den präferenziell gefällten Varianten von Nukleoprotein, erhalten. Da bei der Präparation des Nukleoproteins nur die Proteine gereinigt werden, die mit ihrer '*in vivo*' DNA-Binderegion vernetzt vorliegen, repräsentieren die kopräzipitierten DNA-Sequenzen eine statistische Auswahl, die die *in vivo* Lokalisation der präzipitierten Proteine widerspiegeln. Dies zeigt sich sowohl bei Analysen von α -hOrc1p- und α -

hOrc2p-kopräzipitierter DNA, als auch bei Vergleichen von α -hMcm3p-präzipitiertem Nukleoprotein aus verschiedenen Zellzyklus-Phasen.

Der Chromatin-gebundene Anteil von MCM-Proteinen verändert sich in Abhängigkeit vom Zellzyklus. In Säugerzellen ist der Struktur-gebundene Anteil zu Beginn der S-Phase maximal und nimmt dann mit dem Fortschreiten der Replikation graduell ab (Kimura et al., 1996; Krude et al., 1996; Todorov et al., 1995). Dieses Verhalten wurde durch die Präparation von S-Phase Chromatin untersucht (Abb. 4.29). Es zeigt sich, dass in Chromatinpräparationen aus S-Phase Zellen weniger hMcm5p mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern präzipitiert werden kann als in Nukleoprotein, das aus G1-Phase Zellen stammt. Diese Verhältnisse spiegeln sich in den absoluten Mengen an kopräzipitierter DNA wieder (Abb. 4.29B). Zudem scheint sich die Lokalisation von hMcm3p während der S-Phase zu verändern, da über den gesamten Locus verstärkte Amplifikationsraten zu beobachten sind, wohingegen bei G1-Phase Chromatin eine Konzentration auf die den UPR-Locus umgebenden Amplikons stattfindet. Diese Beobachtungen scheinen mit den von Aparicio et al. (1997) publizierten Daten übereinzustimmen, die zeigen, dass sich die Lokalisation von ScMCM-Proteinen während der S-Phase vom Origin hin zu Nicht-Originregionen ändert.

Studien in *S. cerevisiae* zeigen, dass ScCdc6p essenziell für die Bindung der MCM-Proteine an Chromatin ist (Donovan et al., 1997). Depletionsstudien mit *Xenopus*-Eiextrakten liefern einen funktionellen Zusammenhang zwischen dem XIORC-Komplex, dem XIMCM-Komplex und den Initiationsfaktoren XICdc6p und XICdt1p (Maiorano et al., 2000; Romanowski et al., 1996; Rowles et al., 1996). Nach diesen Studien ist die Bindung des XIORC-Komplexes eine notwendige Voraussetzung für die Bindung von XICdc6p und XICdt1p, wodurch eine Rekrutierung von XIMCM2-7 an Chromatin ermöglicht wird. Allerdings setzten diese Untersuchungen nicht notwendigerweise voraus, dass ORC- und MCM-Proteine an identischen Bereichen am Chromatin lokalisiert sein müssen. So zeigten Donovan et al. (1997), dass in Hefe sowohl ScORC-Proteine als auch ScCdc6p durch Salzbehandlung vom Chromatin abgelöst werden können, ohne die ScMCM-Chromatinbindung zu beeinflussen. Im *Xenopus* System konnten Hua & Newport (1998) durch die cdc2/Cyclin A Kinase XIORC und XICdc6p, nicht aber die XIMCM-Proteine, vom Chromatin dissoziieren. Demnach scheinen ORC und Cdc6p als Lade-Faktoren für MCM-Proteine zu dienen, sind aber nicht für eine dauerhafte Bindung der MCM-Proteine an Chromatin notwendig.

Hinweise auf eine Kolokalisation von MCM-Proteinen mit ORC in der G1-Phase geben Untersuchungen in der Spaltheife *S. pombe*, bei denen eine direkte Interaktion zwischen SpMcm4p und SpOrc1p sowohl genetisch als auch biochemisch nachgewiesen werden konnte (Grallert & Nurse, 1996). Genetische Interaktionen wurden zudem für die *MCM5*- und *ORC6*-Gene beschrieben (Li et al.,

1993). Darüberhinaus könnten ORC- und MCM-Proteine indirekt über andere Faktoren interagieren. So ist bekannt, dass MCM-Proteine mit der Cdc7-Dbf4 Kinase (Lei et al., 1997) und mindestens zwei weiteren Proteinen, Mcm10p (Merchant et al., 1997) und Cdc45p (Hopwood & Dalton, 1996) physikalisch interagieren. Zou & Stillman (1998) zeigten, dass Cdc45p während der S-Phase, nach der Bildung des Prä-Replikationskomplexes, mit dem MCM-Komplex interagiert. Weiterhin zeigen 'in vivo crosslinking' Studien, dass Cdc45p seine Lokalisation von Origins in der späten G1-Phase hin zu Nicht-Originregionen in der S-Phase mit ähnlichen Kinetiken wie die DNA-Polymerase ϵ verändert und somit, wie die MCM-Proteine, mit der Elongations-Maschinerie assoziiert vorzuliegen scheint (Aparichio et al., 1997). Ob Cdc45p eine Vermittlerrolle zwischen ORC-Proteinen und MCM-Proteinen in der späten G1-Phase einnimmt, ist derzeit unklar. Allerdings interagieren beide Faktoren zumindest genetisch miteinander (Zou et al., 1997; Hardy, 1997).

Untersuchungen, die deutlich auf eine indirekte Interaktion von MCM-Proteinen und ORC-Proteinen während der G1-Phase hinweisen, wurden in Hefe mit dem Initiationsfaktor ScMcm10p durchgeführt. ScMcm10p liegt Chromatin-gebunden vor und kann mit allen sechs Untereinheiten des ScMcm2-7 Komplexes direkt interagieren (Homesley et al., 2000; Izumi et al., 2000; Merchant et al., 1997). Durch ChIP-Assays konnte gezeigt werden, dass ScMcm10p an Origins lokalisiert ist (Homesley et al., 2000). Eine Entfernung von ScMcm10p nach der Bildung des Prä-Replikationskomplexes während der G1-Phase bewirkt eine Dissoziation von ScMCM-Proteinen vom Chromatin, ohne dass die ScORC-Bindung beeinflusst wird. Jedoch hat eine Entfernung von ScORC vom Prä-Replikationskomplex keinen Einfluss auf die ScMcm10p-Bindung an Chromatin. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass die Assoziation des ScMCM-Komplexes mit Origins während der G1-Phase über ScMcm10p vermittelt wird (Homesley et al., 2000). Entscheidend ist, dass diese Studien auf eine gemeinsame Lokalisation von ScMCM- und ScORC-Proteine am Origin während der G1-Phase hindeuten. Neuere Arbeiten von Labib et al. (2001) beweisen, dass sowohl die Bildung des Prä-Replikationskomplexes als auch dessen Aufrechterhaltung von ScMCM-Proteinen abhängig ist. Unter Verwendung von 'mcm degron' Mutanten (siehe 1.3.2.1.) konnten die Autoren zeigen, dass für das Bestehen des durch den Prä-Replikationskomplex verursachten 'in vivo footprints' über dem ARS305 Origin die Anwesenheit von ScMcm2-7 Proteinen während der gesamten G1-Phase essenziell ist.

Ob sich die in *S. cerevisiae* beschriebenen Zusammenhänge auch auf humane Systeme übertragen lassen, werden zukünftige Arbeiten zeigen. Hinweise auf eine indirekte Interaktion zwischen dem humanen ORC-Komplex und MCM-Proteinen geben Untersuchungen mit der Histon-Acetyltransferase HBO1. HBO1 wurde ursprünglich als Protein beschrieben, das mit Orc1p interagiert, weshalb es mit

Histon-Acetyltransferase binding to Orc1 (HBO1) bezeichnet wurde (Iizuka & Stillman, 1999). Neuere Arbeiten zeigen, dass dieses aus 611 aa bestehende Protein über ein zentral gelegenes C₂HC-Zinkfingermotiv *in vitro* und *in vivo* mit hMcm2 interagiert (Burke et al., 2001). Diese Interaktionen könnten auf eine Kolokalisation von ORC- und MCM-Proteinen hindeuten. Zumindest zeigen sie, dass eine physikalische Interaktion zwischen einer Histon-Acetyltransferase-Aktivität und Initiationsfaktoren besteht.

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten deuten darauf hin, dass in humanen Zellen eine vergleichbare Situation vorliegt wie für *S. cerevisiae* beschrieben. In HeLa Zellen scheinen demnach ORC-Proteine und MCM-Proteine gemeinsam Startstellen der Replikation während der G1-Phase zu markieren. Vermutlich verändert sich die Lokalisation des MCM-Komplexes auf der DNA mit dem Eintritt in die S-Phase, wobei der MCM-Komplex möglicherweise in seine enzymatisch aktive Form als replikative Helikase überführt wird und mit der Replikationsgabel kolokalisiert.

Die über den ChIP-Assay ermittelten Daten sollten durch weitere Untersuchungen ergänzt werden. Dabei wäre von Interesse, ob die im MCM4-Genpromoter beschriebene Situation auch auf andere Origins übertragbar ist. Weiterhin wäre es sinnvoll zusätzliche Antikörper einzusetzen, die beispielsweise gegen die DNA-Polymerasen δ oder ϵ gerichtet sind. Die so präzipitierten DNA-Fragmente sollten dann ein vergleichbares Anreicherungsprofil in der S-Phase aufweisen, wie es mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern gefunden wurde.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden durch *in vivo* und *in vitro* Studien Protein-DNA Interaktionen im humanen MCM4-Genpromoter nachgewiesen und dessen Struktur aufgeklärt.

Durch DNase-I-Schutz-Experimente wurden sechs Proteinbindestellen im MCM4-Promoter identifiziert. Die vier proximalen Binderegionen sind GC-reich und könnten somit als Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und AP2 dienen. Die beiden eher distal gelegenen Regionen zeichnen sich durch einen hohen Anteil an AT-Nukleotiden aus und zeigen keine signifikanten Homologien zu Konsensussequenzen bekannter Transkriptionsfaktoren. Wie alle humanen MCM-Genpromotoren besitzt auch der MCM4-Promoter ein E2F-Bindemotiv. Obwohl in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass in nuklearen Extrakten aus HeLa Zellen E2F-Proteine vorhanden sind, binden diese Proteine nicht an MCM4-Promoter DNA-Fragmente. Folglich ist der Transkriptionsfaktor E2F nach meinen Untersuchungen nicht an der Regulation der MCM4-Genexpression in HeLa Zellen beteiligt.

Weiterhin konnten Sequenzen identifiziert werden, die sowohl mit hOrc1p als auch mit hOrc2p assoziiert vorliegen. Für diese Fragestellung wurde eine modifizierte *in vivo* Crosslinking Methode etabliert und angewendet. Eine der hOrc1p/hOrc2p-Bindestellen ist zwischen den beiden divergent transkribierten Genen *MCM4* und *PRKDC* lokalisiert. Damit konnte erstmals eine Binderegion für ORC-Proteine im humanen Genom beschrieben werden. Zudem wurde gezeigt, dass hOrc2p an den gut charakterisierten Origin der Lamin B2 Region bindet. Bei Präparationen von naszierender DNA sind die Sequenzen des MCM4-Promoters und der Lamin B2 Originregion ebenfalls angereichert. Daraus folgt, dass in diesen speziellen Regionen der ORC-Komplex Startstellen der DNA-Replikation im humanen Genom markiert.

Bei Untersuchungen von vernetzten Protein-DNA Komplexen, die mit hMcm3p-spezifischen Antikörpern präzipitiert wurden, zeigte sich, dass hMcm3p in G1-Phase Zellen - ebenso wie hOrc1p und hOrc2p - spezifisch mit der MCM4-Promoterregion assoziiert vorliegt. Bei Präparationen aus S-Phase Zellen hingegen ist die MCM4-Promotersequenz deutlich weniger angereichert. Dies ist der erste Hinweis darauf, dass in HeLa Zellen MCM-Proteine während der G1-Phase ausschließlich am Origin lokalisiert sind. Während der S-Phase scheint sich die Lokalisation des MCM-Komplexes zu verändern, wobei er sich vermutlich zusammen mit der Replikationsgabel vom Origin fortbewegt.

Aufgrund der Daten dieser Arbeit kann der MCM4-Promoter als Grundlage für weitere Forschungen zur Aufklärung der Struktur des Prä-Replikationskomplexes und der Zusammenhänge zwischen Transkription und Replikation dienen, da er sowohl replikative als auch transkriptionelle Kontrollelemente in sich vereinigt.

7. Literaturverzeichnis

- Abdurashidova, G., M. Deganuto, R. Klima, S. Riva, G. Biamonti, M. Giacca, and A. Falaschi. 2000. Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin. *Science*. 287:2023-6.
- Abdurashidova, G., S. Riva, G. Biamonti, M. Giacca, and A. Falaschi. 1998. Cell cycle modulation of protein-DNA interactions at a human replication origin. *Embo J*. 17:2961-9.
- Adachi, Y., J. Usukura, and M. Yanagida. 1997. A globular complex formation by Nda1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast. *Genes Cells*. 2:467-79.
- Alexiadis, V., P.D. Varga-Weisz, E. Bonte, P.B. Becker, and C. Gruss. 1998. In vitro chromatin remodelling by chromatin accessibility complex (CHRAC) at the SV40 origin of DNA replication. *Embo J*. 17:3428-38.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215:403-10.
- Amon, A., S. Irniger, and K. Nasmyth. 1994. Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell*. 77:1037-50.
- Anachkova, B., and J.L. Hamlin. 1989. Replication in the amplified dihydrofolate reductase domain in CHO cells may initiate at two distinct sites, one of which is a repetitive sequence element. *Mol Cell Biol*. 9:532-40.
- Anderson, C.W., and T.H. Carter. 1996. The DNA-activated protein kinase: DNA-PK. *Curr Top Microbiol Immunol*. 217:91-111.
- Anderson, C.W., and S.P. Lees-Miller. 1992. The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2:283-314.
- Antequera, F., and A. Bird. 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:11995-9.
- Antequera, F., and A. Bird. 1999. CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr Biol*. 9:R661-7.
- Aparicio, O.M., D.M. Weinstein, and S.P. Bell. 1997. Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*. 91:59-69.
- Apt, D., R.M. Watts, G. Suske, and H.U. Bernard. 1996. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology*. 224:281-91.
- Araki, R., A. Fujimori, K. Hamatani, K. Mita, T. Saito, M. Mori, R. Fukumura, M. Morimyo, M. Muto, M. Itoh, K. Tatsumi, and M. Abe. 1997. Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:2438-43.
- Araujo, F.D., J.D. Knox, S. Ramchandani, R. Pelletier, P. Bigey, G. Price, M. Szyf, and M. Zannis-Hadjopoulos. 1999. Identification of initiation sites for DNA replication in the human dnmt1 (DNA-methyltransferase) locus. *J Biol Chem*. 274:9335-41.
- Araujo, F.D., J.D. Knox, M. Szyf, G.B. Price, and M. Zannis-Hadjopoulos. 1998. Concurrent replication and methylation at mammalian origins of replication. *Mol Cell Biol*. 18:3475-82.
- Austin, R.J., T.L. Orr-Weaver, and S.P. Bell. 1999. *Drosophila* ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element. *Genes Dev*. 13:2639-49.

- Baiker, A., C. Maercker, C. Piechaczek, S.B. Schmidt, J. Bode, C. Benham, and H.J. Lipps. 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.
- Baur, C.P., and R. Knippers. 1988. Protein-induced bending of the simian virus 40 origin of replication. *J Mol Biol.* 203:1009-19.
- Becker, P.B., F. Weih, and G. Schutz. 1993. Footprinting of DNA-binding proteins in intact cells. *Methods Enzymol.* 218:568-87.
- Beijersbergen, R.L., R.M. Kerkhoven, L. Zhu, L. Carlee, P.M. Voorhoeve, and R. Bernards. 1994. E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 in vivo. *Genes Dev.* 8:2680-90.
- Bell, S.P., R. Kobayashi, and B. Stillman. 1993. Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication. *Science.* 262:1844-9.
- Bell, S.P., J. Mitchell, J. Leber, R. Kobayashi, and B. Stillman. 1995. The multidomain structure of Orc1p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing. *Cell.* 83:563-8.
- Bell, S.P., and B. Stillman. 1992. ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature.* 357:128-34.
- Berezney, R., D.D. Dubey, and J.A. Huberman. 2000. Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma.* 108:471-84.
- Bielinsky, A.K., and S.A. Gerbi. 1998. Discrete start sites for DNA synthesis in the yeast ARS1 origin. *Science.* 279:95-8.
- Biermann, E. 1999. I Bindungsstudien von hMcm5 an Kernprotein. II Bindungsstudien von hCdc6 an DNA. Diplomarbeit, Universität Konstanz.
- Bird, A., M. Taggart, M. Frommer, O.J. Miller, and D. Macleod. 1985. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell.* 40:91-9.
- Bird, A., P. Tate, X. Nan, J. Campoy, R. Meehan, S. Cross, S. Tweedie, J. Charlton, and D. Macleod. 1995. Studies of DNA methylation in animals. *J Cell Sci Suppl.* 19:37-9.
- Birnbaum, M.J., A.J. van Wijnen, P.R. Odgren, T.J. Last, G. Suske, G.S. Stein, and J.L. Stein. 1995. Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry.* 34:16503-8.
- Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Black, A.R., and J. Azizkhan-Clifford. 1999. Regulation of E2F: a family of transcription factors involved in proliferation control. *Gene.* 237:281-302.
- Blow, J.J., and R.A. Laskey. 1988. A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. *Nature.* 332:546-8.
- Blow, J.J., and S. Tada. 2000. Cell cycle. A new check on issuing the licence. *Nature.* 404:560-1.
- Blunt, T., N.J. Finnie, G.E. Taccioli, G.C. Smith, J. Demengeot, T.M. Gottlieb, R. Mizuta, A.J. Varghese, F.W. Alt, P.A. Jeggo, and et al. 1995. Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell.* 80:813-23.
- Bosco, G., W. Du, and T.L. Orr-Weaver. 2001. DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex. *Nat Cell Biol.* 3:289-95.
- Bosma, M.J., and A.M. Carroll. 1991. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol.* 9:323-50.

- Boubnov, N.V., K.T. Hall, Z. Wills, S.E. Lee, D.M. He, D.M. Benjamin, C.R. Pulaski, H. Band, W. Reeves, E.A. Hendrickson, and et al. 1995. Complementation of the ionizing radiation sensitivity, DNA end binding, and V(D)J recombination defects of double-strand break repair mutants by the p86 Ku autoantigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:890-4.
- Bouchard, C., K. Thieke, A. Maier, R. Saffrich, J. Hanley-Hyde, W. Ansorge, S. Reed, P. Sicinski, J. Bartek, and M. Eilers. 1999. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J.* 18:5321-33.
- Boulikas, T. 1996. Common structural features of replication origins in all life forms. *J Cell Biochem.* 60:297-316.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brandeis, M., D. Frank, I. Keshet, Z. Siegfried, M. Mendelsohn, A. Nemes, V. Temper, A. Razin, and H. Cedar. 1994. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature.* 371:435-8.
- Brown, G.W., and T.J. Kelly. 1998. Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem.* 273:22083-90.
- Brush, G.S., C.W. Anderson, and T.J. Kelly. 1994. The DNA-activated protein kinase is required for the phosphorylation of replication protein A during simian virus 40 DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:12520-4.
- Burhans, W.C., J.E. Selegue, and N.H. Heintz. 1986. Isolation of the origin of replication associated with the amplified Chinese hamster dihydrofolate reductase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:7790-4.
- Burhans, W.C., L.T. Vassilev, M.S. Caddle, N.H. Heintz, and M.L. DePamphilis. 1990. Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes. *Cell.* 62:955-65.
- Burke, T.W., J.G. Cook, M. Asano, and J.R. Nevins. 2001. Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1. *J Biol Chem.* 276:15397-408.
- Burkhart, R. 1995. Untersuchungen über das menschliche Kernprotein P1Mcm3. Dissertation, Universität Konstanz.
- Burkhart, R., D. Schulte, D. Hu, C. Musahl, F. Gohring, and R. Knippers. 1995. Interactions of human nuclear proteins P1Mcm3 and P1Cdc46. *Eur J Biochem.* 228:431-8.
- Burma, S., A. Kurimasa, G. Xie, Y. Taya, R. Araki, M. Abe, H.A. Crissman, H. Ouyang, G.C. Li, and D.J. Chen. 1999. DNA-dependent protein kinase-independent activation of p53 in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 274:17139-43.
- Byrne, C., M. Tainsky, and E. Fuchs. 1994. Programming gene expression in developing epidermis. *Development.* 120:2369-83.
- Campanero, M.R., and E.K. Flemington. 1997. Regulation of E2F through ubiquitin-proteasome-dependent degradation: stabilization by the pRB tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:2221-6.
- Carpenter, C.L., and L.C. Cantley. 1996. Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 8:153-8.
- Chan, D.W., and S.P. Lees-Miller. 1996. The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J Biol Chem.* 271:8936-41.
- Chan, G.K., S.A. Jablonski, V. Sudakin, J.C. Hittle, and T.J. Yen. 1999. Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol.* 146:941-54.

- Chellappan, S.P., S. Hiebert, M. Mudryj, J.M. Horowitz, and J.R. Nevins. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*. 65:1053-61.
- Chesnokov, I., M. Gossen, D. Remus, and M. Botchan. 1999. Assembly of functionally active Drosophila origin recognition complex from recombinant proteins. *Genes Dev*. 13:1289-96.
- Chesnokov, I., D. Remus, and M. Botchan. 2001. Functional analysis of mutant and wild-type Drosophila origin recognition complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11997-2002.
- Chong, J.P., M.K. Hayashi, M.N. Simon, R.M. Xu, and B. Stillman. 2000. A double-hexamer archaeal minichromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1530-5.
- Chong, J.P., H.M. Mahbubani, C.Y. Khoo, and J.J. Blow. 1995. Purification of an MCM-containing complex as a component of the DNA replication licensing system. *Nature*. 375:418-21.
- Chong, J.P., P. Thommes, and J.J. Blow. 1996. The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication. *Trends Biochem Sci*. 21:102-6.
- Chung, T.D., F.H. Drake, K.B. Tan, S.R. Per, S.T. Crooke, and C.K. Mirabelli. 1989. Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:9431-5.
- Clarke, D.J., and J.F. Gimenez-Abian. 2000. Checkpoints controlling mitosis. *Bioessays*. 22:351-63.
- Clyne, R.K., and T.J. Kelly. 1995. Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J*. 14:6348-57.
- Cocker, J.H., S. Piatti, C. Santocanale, K. Nasmyth, and J.F. Diffley. 1996. An essential role for the Cdc6 protein in forming the pre-replicative complexes of budding yeast. *Nature*. 379:180-2.
- Coleman, T.R., P.B. Carpenter, and W.G. Dunphy. 1996. The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell*. 87:53-63.
- Connelly, M.A., H. Zhang, J. Kieletzawa, and C.W. Anderson. 1996. Alternate splice-site utilization in the gene for the catalytic subunit of the DNA-activated protein kinase, DNA-PKcs. *Gene*. 175:271-3.
- Connelly, M.A., H. Zhang, J. Kieletzawa, and C.W. Anderson. 1998. The promoters for human DNA-PKcs (PRKDC) and MCM4: divergently transcribed genes located at chromosome 8 band q11. *Genomics*. 47:71-83.
- Cook, P.R. 1999. The organization of replication and transcription. *Science*. 284:1790-5.
- Courey, A.J., and R. Tjian. 1988. Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell*. 55:887-98.
- Crane-Robinson, C., F.A. Myers, T.R. Hebbes, A.L. Clayton, and A.W. Thorne. 1999. Chromatin immunoprecipitation assays in acetylation mapping of higher eukaryotes. *Methods Enzymol*. 304:533-47.
- Creaser, P.C., D.A. D'Argenio, and T. Williams. 1996. Comparative and functional analysis of the AP2 promoter indicates that conserved octamer and initiator elements are critical for activity. *Nucleic Acids Res*. 24:2597-605.
- Critchlow, S.E., R.P. Bowater, and S.P. Jackson. 1997. Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV. *Curr Biol*. 7:588-98.

- Dalton, S. 1992. Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *Embo J.* 11:1797-804.
- Dalton, S., and L. Whitbread. 1995. Cell cycle-regulated nuclear import and export of Cdc47, a protein essential for initiation of DNA replication in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:2514-8.
- Datta, P.K., P. Raychaudhuri, and S. Bagchi. 1995. Association of p107 with Sp1: genetically separable regions of p107 are involved in regulation of E2F- and Sp1-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 15:5444-52.
- de Stanchina, E., D. Gabellini, P. Norio, M. Giacca, F.A. Peverali, S. Riva, A. Falaschi, and G. Biamonti. 2000. Selection of homeotic proteins for binding to a human DNA replication origin. *J Mol Biol.* 299:667-80.
- Delgado, S., M. Gomez, A. Bird, and F. Antequera. 1998. Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo J.* 17:2426-35.
- Dennig, J., M. Beato, and G. Suske. 1996. An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains. *Embo J.* 15:5659-67.
- 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. xiii, 1058 pp.
- DePamphilis, M.L. 1997. Identification of replication origins in eukaryotic cells. San Diego: Academic Press.
- DePamphilis, M.L. 1999. Replication origins in metazoan chromosomes: fact or fiction? *Bioessays.* 21:5-16.
- Detweiler, C.S., and J.J. Li. 1997. Cdc6p establishes and maintains a state of replication competence during G1 phase. *J Cell Sci.* 110:753-63.
- Dhar, S.K., L. Delmolino, and A. Dutta. 2001. Architecture of the human origin recognition complex. *J Biol Chem.* 276:29067-71.
- Dhar, S.K., and A. Dutta. 2000. Identification and characterization of the human ORC6 homolog. *J Biol Chem.* 275:34983-8.
- Diffley, J.F., and J.H. Cocker. 1992. Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. *Nature.* 357:169-72.
- Diffley, J.F., J.H. Cocker, S.J. Dowell, and A. Rowley. 1994. Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. *Cell.* 78:303-16.
- Diffley, J.F., and B. Stillman. 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 J.L. Hamlin. 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 J.L. Hamlin. 1992. Initiation of DNA replication in the dihydrofolate reductase locus is confined to the early S period in CHO cells synchronized with the plant amino acid mimosine. *Mol Cell Biol.* 12:3715-22.
- Dijkwel, P.A., J.P. Vaughn, and J.L. Hamlin. 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.
- Dimitrova, D.S., M. Giacca, F. Demarchi, G. Biamonti, S. Riva, and A. Falaschi. 1996. In vivo protein-DNA interactions at human DNA replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:1498-503.

- Discher, D.J., N.H. Bishopric, X. Wu, C.A. Peterson, and K.A. Webster. 1998. Hypoxia regulates beta-enolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element. *J Biol Chem.* 273:26087-93.
- Donovan, S., J. Harwood, L.S. Drury, and J.F. Diffley. 1997. Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5611-6.
- Dubey, D.D., J. Zhu, D.L. Carlson, K. Sharma, and J.A. Huberman. 1994. Three ARS elements contribute to the *ura4* replication origin region in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J.* 13:3638-47.
- Durocher, D., and S.P. Jackson. 2001. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol.* 13:225-31.
- Dynan, W.S. 1986. Promoters for housekeeping genes. *Trends Genet.* 2:196-197.
- Dynan, W.S. 1987. DNase I footprinting as an assay for mammalian gene regulatory proteins. Plenum Press, New York.
- Dynlacht, B.D., K. Moberg, J.A. Lees, E. Harlow, and L. Zhu. 1997. Specific regulation of E2F family members by cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol.* 17:3867-75.
- Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12:2245-62.
- Dyson, N., P.M. Howley, K. Munger, and E. Harlow. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 243:934-7.
- el-Deiry, W.S., T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 75:817-25.
- el-Deiry, W.S., T. Tokino, T. Waldman, J.D. Oliner, V.E. Velculescu, M. Burrell, D.E. Hill, E. Healy, J.L. Rees, S.R. Hamilton, and et al. 1995. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 55:2910-9.
- Elledge, S.J., and J.W. Harper. 1994. Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr Opin Cell Biol.* 6:847-52.
- Elsasser, S., F. Lou, B. Wang, J.L. Campbell, and A. Jong. 1996. Interaction between yeast Cdc6 protein and B-type cyclin/Cdc28 kinases. *Mol Biol Cell.* 7:1723-35.
- Emili, A., J. Greenblatt, and C.J. Ingles. 1994. Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol.* 14:1582-93.
- Fackelmayer, F.O., K. Dahm, A. Renz, U. Ramsperger, and A. Richter. 1994. Nucleic-acid-binding properties of hnRNP-U/SAF-A, a nuclear-matrix protein which binds DNA and RNA in vivo and in vitro. *Eur J Biochem.* 221:749-57.
- Farnham, P.J. 1996. Transcriptional control of cell growth: The E2F gene family. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 208.
- Findeisen, M., M. El-Denary, T. Kapitza, R. Graf, and U. Strausfeld. 1999. Cyclin A-dependent kinase activity affects chromatin binding of ORC, Cdc6, and MCM in egg extracts of *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem.* 264:415-26.
- Finnie, N.J., T.M. Gottlieb, T. Blunt, P.A. Jeggo, and S.P. Jackson. 1995. DNA-dependent protein kinase activity is absent in *xrs-6* cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:320-4.

- Flores-Rozas, H., Z. Kelman, F.B. Dean, Z.Q. Pan, J.W. Harper, S.J. Elledge, M. O'Donnell, and J. Hurwitz. 1994. Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:8655-9.
- Fox, C.A., S. Loo, A. Dillin, and J. Rine. 1995. The origin recognition complex has essential functions in transcriptional silencing and chromosomal replication. *Genes Dev.* 9:911-24.
- Fox, C.A., S. Loo, D.H. Rivier, M.A. Foss, and J. Rine. 1993. A transcriptional silencer as a specialized origin of replication that establishes functional domains of chromatin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 58:443-55.
- Francon, P., D. Maiorano, and M. Mechali. 1999. Initiation of DNA replication in eukaryotes: questioning the origin. *FEBS Lett.* 452:87-91.
- Fujita, M., T. Kiyono, Y. Hayashi, and M. Ishibashi. 1997. In vivo interaction of human MCM heterohexameric complexes with chromatin. Possible involvement of ATP. *J Biol Chem.* 272:10928-35.
- Gardiner, K., and R.J. Mural. 1995. Getting the message: identifying transcribed sequences. *Trends Genet.* 11:77-9.
- Gasser, S.M., B.B. Amati, M.E. Cardenas, and J.F. Hofmann. 1989. Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function. *Int Rev Cytol.* 119:57-96.
- Gaubatz, S., A. Imhof, R. Dosch, O. Werner, P. Mitchell, R. Buettner, and M. Eilers. 1995. Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *Embo J.* 14:1508-19.
- Gaubatz, S., J.G. Wood, and D.M. Livingston. 1998. Unusual proliferation arrest and transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:9190-5.
- Gavin, K.A., M. Hidaka, and B. Stillman. 1995. Conserved initiator proteins in eukaryotes. *Science.* 270:1667-71.
- Geraghty, D.S., M. Ding, N.H. Heintz, and D.S. Pederson. 2000. Premature structural changes at replication origins in a yeast minichromosome maintenance (MCM) mutant. *J Biol Chem.* 275:18011-21.
- Getts, R.C., and T.D. Stamato. 1994. Absence of a Ku-like DNA end binding activity in the xrs double-strand DNA repair-deficient mutant. *J Biol Chem.* 269:15981-4.
- Giacca, M., C. Pelizon, and A. Falaschi. 1997. Mapping replication origins by quantifying relative abundance of nascent DNA strands using competitive polymerase chain reaction. *Methods.* 13:301-12.
- Giacca, M., L. Zentilin, P. Norio, S. Diviacco, D. Dimitrova, G. Contreas, G. Biamonti, G. Perini, F. Weighardt, S. Riva, and et al. 1994. Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:7119-23.
- Gibson, S.I., R.T. Surosky, and B.K. Tye. 1990. The phenotype of the minichromosome maintenance mutant mcm3 is characteristic of mutants defective in DNA replication. *Mol Cell Biol.* 10:5707-20.
- Gilbert, D.M. 2001. Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science.* 294:96-100.
- Gilley, D., H. Tanaka, M.P. Hande, A. Kurimasa, G.C. Li, M. Oshimura, and D.J. Chen. 2001. DNA-PKcs is critical for telomere capping. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:15084-8.
- Gohring, F., and F.O. Fackelmayer. 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.

- Gottlieb, T.M., and S.P. Jackson. 1993. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell*. 72:131-42.
- Grallert, B., and P. Nurse. 1996. The ORC1 homolog orp1 in fission yeast plays a key role in regulating onset of S phase. *Genes Dev*. 10:2644-54.
- Grana, X., and E.P. Reddy. 1995. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*. 11:211-9.
- Gu, Y., S. Jin, Y. Gao, D.T. Weaver, and F.W. Alt. 1997. Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:8076-81.
- Gu, Y., C.W. Turck, and D.O. Morgan. 1993. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*. 366:707-10.
- Guggenheimer, R.A., B.W. Stillman, K. Nagata, F. Tamanoi, and J. Hurwitz. 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 M.L. DePamphilis. 1992. Specific transcription factors stimulate simian virus 40 and polyomavirus origins of DNA replication. *Mol Cell Biol*. 12:2514-24.
- Guo, Z.S., C. Gutierrez, U. Heine, J.M. Sogo, and M.L. Depamphilis. 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.
- Hagen, G., J. Dennig, A. Preiss, M. Beato, and G. Suske. 1995. Functional analyses of the transcription factor Sp4 reveal properties distinct from Sp1 and Sp3. *J Biol Chem*. 270:24989-94.
- Hagen, G., S. Muller, M. Beato, and G. Suske. 1992. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res*. 20:5519-25.
- Hagen, G., S. Muller, M. Beato, and G. Suske. 1994. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *Embo J*. 13:3843-51.
- Hand, R. 1978. Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell*. 15:317-25.
- Hardwick, K.G., and A.W. Murray. 1995. Mad1p, a phosphoprotein component of the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *J Cell Biol*. 131:709-20.
- Hardwick, K.G., E. Weiss, F.C. Luca, M. Winey, and A.W. Murray. 1996. Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science*. 273:953-6.
- Hardy, C.F. 1997. Identification of Cdc45p, an essential factor required for DNA replication. *Gene*. 187:239-46.
- Harlow, E., Lane, D.P. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S.J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin- dependent kinases. *Cell*. 75:805-16.
- Hartley, K.O., D. Gell, G.C. Smith, H. Zhang, N. Divecha, M.A. Connelly, A. Admon, S.P. Lees-Miller, C.W. Anderson, and S.P. Jackson. 1995. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. *Cell*. 82:849-56.
- Hassan, A.B., and P.R. Cook. 1993. Visualization of replication sites in unfixed human cells. *J Cell Sci*. 105:541-50.

- Hata, Y., E. Duh, K. Zhang, G.S. Robinson, and L.P. Aiello. 1998. Transcription factors Sp1 and Sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence. *J Biol Chem.* 273:19294-303.
- Hateboer, G., R.M. Kerkhoven, A. Shvarts, R. Bernards, and R.L. Beijersbergen. 1996. Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins. *Genes Dev.* 10:2960-70.
- Hateboer, G., A. Wobst, B.O. Petersen, L. Le Cam, E. Vigo, C. Sardet, and K. Helin. 1998. Cell cycle-regulated expression of mammalian CDC6 is dependent on E2F. *Mol Cell Biol.* 18:6679-97.
- Hatton, K.S., V. Dhar, E.H. Brown, M.A. Iqbal, S. Stuart, V.T. Didamo, and C.L. Schildkraut. 1988. Replication program of active and inactive multigene families in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 8:2149-58.
- Heiland, S. 1996. Zur transkriptionellen Regulation des menschlichen Typ-I-DNA-Topoisomerase Gens. Dissertation, Universität Konstanz.
- Heiland, S., and R. Knippers. 1995. The human topoisomerase I gene promoter is regulated by NF-IL6. *Mol Cell Biol.* 15:6623-31.
- Heiland, S., R. Knippers, and N. Kunze. 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.
- Heintz, N.H., and J.L. Hamlin. 1982. An amplified chromosomal sequence that includes the gene for dihydrofolate reductase initiates replication within specific restriction fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:4083-7.
- Helin, K., C.L. Wu, A.R. Fattaey, J.A. Lees, B.D. Dynlacht, C. Ngwu, and E. Harlow. 1993. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev.* 7:1850-61.
- Hennessy, K.M., C.D. Clark, and D. Botstein. 1990. Subcellular localization of yeast CDC46 varies with the cell cycle. *Genes Dev.* 4:2252-63.
- Hentschel, C.C., and M.L. Birnstiel. 1981. The organization and expression of histone gene families. *Cell.* 25:301-13.
- Hilger-Eversheim, K., M. Moser, H. Schorle, and R. Buettner. 2000. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene.* 260:1-12.
- Hirt, B. 1969. Replicating molecules of polyoma virus DNA. *J Mol Biol.* 40:141-4.
- Hofmann, F., F. Martelli, D.M. Livingston, and Z. Wang. 1996. The retinoblastoma gene product protects E2F-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 10:2949-59.
- Hofmann, J.F., and D. Beach. 1994. cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis. *Embo J.* 13:425-34.
- Holthoff, H.P., H. Hameister, and R. Knippers. 1996. A novel human Mcm protein: homology to the yeast replication protein Mis5 and chromosomal location. *Genomics.* 37:131-4.
- Homesley, L., M. Lei, Y. Kawasaki, S. Sawyer, T. Christensen, and B.K. Tye. 2000. Mcm10 and the MCM2-7 complex interact to initiate DNA synthesis and to release replication factors from origins. *Genes Dev.* 14:913-26.
- Hopwood, B., and S. Dalton. 1996. Cdc45p assembles into a complex with Cdc46p/Mcm5p, is required for minichromosome maintenance, and is essential for chromosomal DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:12309-14.

- Hoyt, M.A., L. Totis, and B.T. Roberts. 1991. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*. 66:507-17.
- Hozak, P., A.B. Hassan, D.A. Jackson, and P.R. Cook. 1993. Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell*. 73:361-73.
- Hu, B., R. Burkhart, D. Schulte, C. Musahl, and R. Knippers. 1993. The P1 family: a new class of nuclear mammalian proteins related to the yeast Mcm replication proteins. *Nucleic Acids Res*. 21:5289-93.
- Hu, Y.F., Z.L. Hao, and R. Li. 1999. Chromatin remodeling and activation of chromosomal DNA replication by an acidic transcriptional activation domain from BRCA1. *Genes Dev*. 13:637-42.
- Hua, X.H., and J. Newport. 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.
- Hua, X.H., H. Yan, and J. Newport. 1997. A role for Cdk2 kinase in negatively regulating DNA replication during S phase of the cell cycle. *J Cell Biol*. 137:183-92.
- Huberman, J.A., and A.D. Riggs. 1968. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol*. 32:327-41.
- Hwang, L.H., L.F. Lau, D.L. Smith, C.A. Mistrot, K.G. Hardwick, E.S. Hwang, A. Amon, and A.W. Murray. 1998. Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science*. 279:1041-4.
- Iizuka, M., and B. Stillman. 1999. Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J Biol Chem*. 274:23027-34.
- Imai, T., M. Yamauchi, N. Seki, T. Sugawara, T. Saito, Y. Matsuda, H. Ito, T. Nagase, N. Nomura, and T. Hori. 1996. Identification and characterization of a new gene physically linked to the ATM gene. *Genome Res*. 6:439-47.
- Ishimi, Y. 1997. A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem*. 272:24508-13.
- Izumi, M., K. Yanagi, T. Mizuno, M. Yokoi, Y. Kawasaki, K.Y. Moon, J. Hurwitz, F. Yatagai, and F. Hanaoka. 2000. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Mcm10 interacts with replication factors and dissociates from nuclease-resistant nuclear structures in G(2) phase. *Nucleic Acids Res*. 28:4769-77.
- Jackson, A.L., P.M. Pahl, K. Harrison, J. Rosamond, and R.A. Sclafani. 1993a. Cell cycle regulation of the yeast Cdc7 protein kinase by association with the Dbf4 protein. *Mol Cell Biol*. 13:2899-908.
- Jackson, D.A., A.B. Hassan, R.J. Errington, and P.R. Cook. 1993b. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *Embo J*. 12:1059-65.
- Jackson, S.P., and P.A. Jeggo. 1995. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK. *Trends Biochem Sci*. 20:412-5.
- Jackson, S.P., J.J. MacDonald, S. Lees-Miller, and R. Tjian. 1990. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell*. 63:155-65.
- Jackson, S.P., and R. Tjian. 1988. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*. 55:125-33.
- Jares, P., and J.J. Blow. 2000. *Xenopus* cdc7 function is dependent on licensing but not on XORC, XCdc6, or CDK activity and is required for XCdc45 loading. *Genes Dev*. 14:1528-40.
- Jeggo, P.A. 1998. DNA breakage and repair. *Adv Genet*. 38:185-218.
- Jeggo, P.A., A.M. Carr, and A.R. Lehmann. 1998. Splitting the ATM: distinct repair and checkpoint defects in ataxia-telangiectasia. *Trends Genet*. 14:312-6.

- Jiang, W., D. McDonald, T.J. Hope, and T. Hunter. 1999a. Mammalian Cdc7-Dbf4 protein kinase complex is essential for initiation of DNA replication. *Embo J.* 18:5703-13.
- Jiang, W., N.J. Wells, and T. Hunter. 1999b. Multistep regulation of DNA replication by Cdk phosphorylation of HsCdc6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:6193-8.
- Johnson, R.T., C.S. Downes, and R.E. Meyns. 1993. The synchronization of mammalian cells. *In The Cell cycle: a practical approach.* P.Fantes and R.Brooks, editors. IRL Press at Oxford University Press, Oxford ; New York. 1-24.
- Jonsson, Z.O., and U. Hubscher. 1997. Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays.* 19:967-75.
- Kadonaga, J.T., K.R. Carner, F.R. Masiarz, and R. Tjian. 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell.* 51:1079-90.
- Karlseder, J., H. Rotheneder, and E. Wintersberger. 1996. Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol.* 16:1659-67.
- Kearsey, S.E., and K. Labib. 1998. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim Biophys Acta.* 1398:113-36.
- Kearsey, S.E., S. Montgomery, K. Labib, and K. Lindner. 2000. Chromatin binding of the fission yeast replication factor mcm4 occurs during anaphase and requires ORC and cdc18. *Embo J.* 19:1681-90.
- Keller, C., E.M. Ladenburger, M. Kremer, and R. Knippers. 2002. The origin recognition complex marks a novel replication origin in the human TOP1 gene promoter. *submitted (JBC).*
- Kelly, T.J., and G.W. Brown. 2000. Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem.* 69:829-80.
- Kelman, Z., J.K. Lee, and J. Hurwitz. 1999. The single minichromosome maintenance protein of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DeltaH contains DNA helicase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:14783-8.
- Kihara, M., W. Nakai, S. Asano, A. Suzuki, K. Kitada, Y. Kawasaki, L.H. Johnston, and A. Sugino. 2000. Characterization of the yeast Cdc7p/Dbf4p complex purified from insect cells. Its protein kinase activity is regulated by Rad53p. *J Biol Chem.* 275:35051-62.
- Kim, Y.K., and A.S. Lee. 1991. Identification of a 70-base-pair cell cycle regulatory unit within the promoter of the human thymidine kinase gene and its interaction with cellular factors. *Mol Cell Biol.* 11:2296-302.
- Kimura, H., T. Ohtomo, M. Yamaguchi, A. Ishii, and K. Sugimoto. 1996. Mouse MCM proteins: complex formation and transportation to the nucleus. *Genes Cells.* 1:977-93.
- King, R.W., P.K. Jackson, and M.W. Kirschner. 1994. Mitosis in transition. *Cell.* 79:563-71.
- Kipp, M., F. Gohring, T. Ostendorp, C.M. van Drunen, R. van Driel, M. Przybylski, and F.O. Fackelmayer. 2000. SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol Cell Biol.* 20:7480-9.
- Kitsberg, D., S. Selig, I. Keshet, and H. Cedar. 1993. Replication structure of the human beta-globin gene domain. *Nature.* 366:588-90.
- Klemm, R.D., R.J. Austin, and S.P. Bell. 1997. Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. *Cell.* 88:493-502.

- Kobayashi, T., T. Rein, and M.L. DePamphilis. 1998. Identification of primary initiation sites for DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene initiation zone. *Mol Cell Biol.* 18:3266-77.
- Koff, A., A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J.W. Harper, S. Elledge, T. Nishimoto, D.O. Morgan, B.R. Franza, and J.M. Roberts. 1992. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science.* 257:1689-94.
- Kong, D., and M.L. DePamphilis. 2001. Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. *Mol Cell Biol.* 21:8095-103.
- Koonin, E.V. 1993. A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *J Mol Biol.* 229:1165-74.
- Kornberg, A., and T.A. Baker. 1992. DNA replication. WH Freeman and Company, New York.
- Kreitz, S., M. Ritzi, M. Baack, and R. Knippers. 2001. The Human Origin Recognition Complex Protein 1 Dissociates from Chromatin during S Phase in HeLa Cells. *J Biol Chem.* 276:6337-6342.
- Krek, W., M.E. Ewen, S. Shirodkar, Z. Arany, W.G. Kaelin, Jr., and D.M. Livingston. 1994. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell.* 78:161-72.
- Krek, W., G. Xu, and D.M. Livingston. 1995. Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell.* 83:1149-58.
- Krude, T., C. Musahl, R.A. Laskey, and R. Knippers. 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.
- Kubota, Y., S. Mimura, S. Nishimoto, T. Masuda, H. Nojima, and H. Takisawa. 1997. Licensing of DNA replication by a multi-protein complex of MCM/P1 proteins in *Xenopus* eggs. *Embo J.* 16:3320-31.
- Kubota, Y., S. Mimura, S. Nishimoto, H. Takisawa, and H. Nojima. 1995. Identification of the yeast MCM3-related protein as a component of *Xenopus* DNA replication licensing factor. *Cell.* 81:601-9.
- Kumar, S., M. Giacca, P. Norio, G. Biamonti, S. Riva, and A. Falaschi. 1996. Utilization of the same DNA replication origin by human cells of different derivation. *Nucleic Acids Res.* 24:3289-94.
- Labhart, P. 1997. mRNA encoding the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase is widely expressed in *Xenopus* cells. *Gene.* 203:235-40.
- Labib, K., S.E. Kearsey, and J.F. Diffley. 2001. MCM2-7 proteins are essential components of prereplicative complexes that accumulate cooperatively in the nucleus during G1-phase and are required to establish, but not maintain, the S-phase checkpoint. *Mol Biol Cell.* 12:3658-67.
- Labib, K., J.A. Tercero, and J.F. Diffley. 2000. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science.* 288:1643-7.
- Ladenburger, E.M. 1996. Untersuchungen zur Struktur des menschlichen Cdc21-Gens. Diplomarbeit, Universität Konstanz.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Laskey, R.A., Madine. 1996. Roles of nuclear structure in DNA replication (p119-130). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- Lavin, M.F., and Y. Shiloh. 1997. The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annu Rev Immunol.* 15:177-202.

- Leatherwood, J., A. Lopez-Girona, and P. Russell. 1996. Interaction of Cdc2 and Cdc18 with a fission yeast ORC2-like protein. *Nature*. 379:360-3.
- Leber, R., T.W. Wise, R. Mizuta, and K. Meek. 1998. The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA- dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 273:1794-801.
- Lee, D.G., and S.P. Bell. 1997. Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol Cell Biol*. 17:7159-68.
- Lee, D.G., A.M. Makhov, R.D. Klemm, J.D. Griffith, and S.P. Bell. 2000. Regulation of origin recognition complex conformation and ATPase activity: differential effects of single-stranded and double-stranded DNA binding. *Embo J*. 19:4774-82.
- Lee, J.K., and J. Hurwitz. 2000. Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem*. 275:18871-8.
- Lee, J.K., and J. Hurwitz. 2001. Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:54-9.
- Lee, S.E., R.A. Mitchell, A. Cheng, and E.A. Hendrickson. 1997. Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 17:1425-33.
- Lees, J.A., M. Saito, M. Vidal, M. Valentine, T. Look, E. Harlow, N. Dyson, and K. Helin. 1993. The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol*. 13:7813-25.
- Lees-Miller, S.P., Y.R. Chen, and C.W. Anderson. 1990. Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. *Mol Cell Biol*. 10:6472-81.
- Lees-Miller, S.P., K. Sakaguchi, S.J. Ullrich, E. Appella, and C.W. Anderson. 1992. Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol*. 12:5041-9.
- Lei, M., Y. Kawasaki, M.R. Young, M. Kihara, A. Sugino, and B.K. Tye. 1997. Mcm2 is a target of regulation by Cdc7-Dbf4 during the initiation of DNA synthesis. *Genes Dev*. 11:3365-74.
- Lei, M., and B.K. Tye. 2001. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci*. 114:1447-54.
- Leone, G., J. DeGregori, Z. Yan, L. Jakoi, S. Ishida, R.S. Williams, and J.R. Nevins. 1998. E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev*. 12:2120-30.
- Leu, T.H., B. Anachkova, and J.L. Hamlin. 1990. Repetitive sequence elements in an initiation locus of the amplified dihydrofolate reductase domain in CHO cells. *Genomics*. 7:428-33.
- Li, J.J., and I. Herskowitz. 1993. Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science*. 262:1870-4.
- Li, R., and A.W. Murray. 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell*. 66:519-31.
- Li, Y., C. Gorbea, D. Mahaffey, M. Rechsteiner, and R. Benezra. 1997. MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:12431-6.
- Liang, C., and B. Stillman. 1997. Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev*. 11:3375-86.

- Liang, C., M. Weinreich, and B. Stillman. 1995. ORC and Cdc6p interact and determine the frequency of initiation of DNA replication in the genome. *Cell*. 81:667-76.
- Lin, S.Y., A.R. Black, D. Kostic, S. Pajovic, C.N. Hoover, and J.C. Azizkhan. 1996. Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction. *Mol Cell Biol*. 16:1668-75.
- Little, R.D., T.H. Platt, and C.L. Schildkraut. 1993. Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol Cell Biol*. 13:6600-13.
- Loo, S., C.A. Fox, J. Rine, R. Kobayashi, B. Stillman, and S. Bell. 1995. The origin recognition complex in silencing, cell cycle progression, and DNA replication. *Mol Biol Cell*. 6:741-56.
- Macleod, D., J. Charlton, J. Mullins, and A.P. Bird. 1994. Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev*. 8:2282-92.
- Maine, G.T., P. Sinha, and B.K. Tye. 1984. Mutants of *S. cerevisiae* defective in the maintenance of minichromosomes. *Genetics*. 106:365-85.
- Maiorano, D., J. Moreau, and M. Mechali. 2000. XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature*. 404:622-5.
- Marahrens, Y., and B. Stillman. 1992. A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*. 255:817-23.
- Mastrangelo, I.A., A.J. Courey, J.S. Wall, S.P. Jackson, and P.V. Hough. 1991. DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:5670-4.
- Matsushime, H., D.E. Quelle, S.A. Shurtleff, M. Shibuya, C.J. Sherr, and J.Y. Kato. 1994. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 14:2066-76.
- Maxam, A.M., and W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:560-4.
- McGarry, T.J., and M.W. Kirschner. 1998. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell*. 93:1043-53.
- Means, A.L., J.E. Slansky, S.L. McMahon, M.W. Knuth, and P.J. Farnham. 1992. The HIP1 binding site is required for growth regulation of the dihydrofolate reductase gene promoter. *Mol Cell Biol*. 12:1054-63.
- Meier, P., M. Koedood, J. Philipp, A. Fontana, and P.J. Mitchell. 1995. Alternative mRNAs encode multiple isoforms of transcription factor AP-2 during murine embryogenesis. *Dev Biol*. 169:1-14.
- Meiss, G., P. Friedhoff, M. Hahn, O. Gimadutdinow, and A. Pingoud. 1995. Sequence preferences in cleavage of dsDNA and ssDNA by the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease. *Biochemistry*. 34:11979-88.
- Merchant, A.M., Y. Kawasaki, Y. Chen, M. Lei, and B.K. Tye. 1997. A lesion in the DNA replication initiation factor Mcm10 induces pausing of elongation forks through chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 17:3261-71.
- Meyerson, M., and E. Harlow. 1994. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol*. 14:2077-86.
- Michieli, P., M. Chedid, D. Lin, J.H. Pierce, W.E. Mercer, and D. Givol. 1994. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res*. 54:3391-5.
- Micklem, G., A. Rowley, J. Harwood, K. Nasmyth, and J.F. Diffley. 1993. Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature*. 366:87-9.

- Mimori, T., M. Akizuki, H. Yamagata, S. Inada, S. Yoshida, and M. Homma. 1981. Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *J Clin Invest.* 68:611-20.
- Mitchell, P.J., P.M. Timmons, J.M. Hebert, P.W. Rigby, and R. Tjian. 1991. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5:105-19.
- Mitchell, P.J., C. Wang, and R. Tjian. 1987. Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell.* 50:847-61.
- Mizushima, T., N. Takahashi, and B. Stillman. 2000. Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the origin recognition complex in vitro. *Genes Dev.* 14:1631-41.
- Moir, D., and D. Botstein. 1982. Determination of the order of gene function in the yeast nuclear division pathway using *cs* and *ts* mutants. *Genetics.* 100:565-77.
- Morkel, M., J. Wenkel, A.J. Bannister, T. Kouzarides, and C. Hagemeyer. 1997. An E2F-like repressor of transcription. *Nature.* 390:567-8.
- Munger, K., B.A. Werness, N. Dyson, W.C. Phelps, E. Harlow, and P.M. Howley. 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo J.* 8:4099-105.
- Musahl, C., D. Schulte, R. Burkhardt, and R. Knippers. 1995. A human homologue of the yeast replication protein Cdc21. Interactions with other Mcm proteins. *Eur J Biochem.* 230:1096-101.
- Nasmyth, K. 1993. Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol.* 5:166-79.
- Nasmyth, K., and P. Nurse. 1981. Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet.* 182:119-24.
- Natale, D.A., C.J. Li, W.H. Sun, and M.L. DePamphilis. 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.
- Nevins, J.R. 1992a. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science.* 258:424-9.
- Nevins, J.R. 1992b. Transcriptional regulation. A closer look at E2F. *Nature.* 358:375-6.
- Nigg, E.A. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays.* 17:471-80.
- Nishitani, H., Z. Lygerou, T. Nishimoto, and P. Nurse. 2000. The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast [see comments]. *Nature.* 404:625-8.
- Noton, E., and J.F. Diffley. 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.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature.* 344:503-8.
- Nurse, P. 1994. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell.* 79:547-50.
- Ohtani, K. 1999. Implication of transcription factor E2F in regulation of DNA replication. *Front Biosci.* 4:D793-804.

- Ohtani, K., J. DeGregori, G. Leone, D.R. Herendeen, T.J. Kelly, and J.R. Nevins. 1996. Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol Cell Biol.* 16:6977-84.
- Ohtani, K., R. Iwanaga, M. Nakamura, M. Ikeda, N. Yabuta, H. Tsuruga, and H. Nojima. 1999. Cell growth-regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F. *Oncogene.* 18:2299-309.
- Ohtani, K., A. Tsujimoto, M. Ikeda, and M. Nakamura. 1998. Regulation of cell growth-dependent expression of mammalian CDC6 gene by the cell cycle transcription factor E2F. *Oncogene.* 17:1777-85.
- Orlando, V. 2000. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci.* 25:99-104.
- Ouyang, B., Z. Lan, J. Meadows, H. Pan, K. Fukasawa, W. Li, and W. Dai. 1998. Human Bub1: a putative spindle checkpoint kinase closely linked to cell proliferation. *Cell Growth Differ.* 9:877-85.
- Pak, D.T., M. Pflumm, I. Chesnokov, D.W. Huang, R. Kellum, J. Marr, P. Romanowski, and M.R. Botchan. 1997. Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell.* 91:311-23.
- Pangilinan, F., Q. Li, T. Weaver, B.C. Lewis, C.V. Dang, and F. Spencer. 1997. Mammalian BUB1 protein kinases: map positions and in vivo expression. *Genomics.* 46:379-88.
- Pascal, E., and R. Tjian. 1991. Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev.* 5:1646-56.
- Pasero, P., B.P. Duncker, E. Schwob, and S.M. Gasser. 1999. A role for the Cdc7 kinase regulatory subunit Dbf4p in the formation of initiation-competent origins of replication. *Genes Dev.* 13:2159-76.
- Pearson, B.E., H.P. Nasheuer, and T.S. Wang. 1991. Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol Cell Biol.* 11:2081-95.
- Peeper, D.S., L.L. Parker, M.E. Ewen, M. Toebe, F.L. Hall, M. Xu, A. Zantema, A.J. van der Eb, and H. Piwnicka-Worms. 1993. A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *Embo J.* 12:1947-54.
- Pelizon, C., S. Diviacco, A. Falaschi, and M. Giacca. 1996. High-resolution mapping of the origin of DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene domain by competitive PCR. *Mol Cell Biol.* 16:5358-64.
- Perkins, G., and J.F. Diffley. 1998. Nucleotide-dependent prereplicative complex assembly by Cdc6p, a homolog of eukaryotic and prokaryotic clamp-loaders. *Mol Cell.* 2:23-32.
- Petersen, B.O., J. Lukas, C.S. Sorensen, J. Bartek, and K. Helin. 1999. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *Embo J.* 18:396-410.
- Piatti, S., C. Lengauer, and K. Nasmyth. 1995. Cdc6 is an unstable protein whose de novo synthesis in G1 is important for the onset of S phase and for preventing a 'reductional' anaphase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 14:3788-99.
- Piechaczek, C., C. Fetzer, A. Baiker, J. Bode, and H.J. Lipps. 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., D.G. Quintana, P. Smith, R.M. Mihalek, Z.H. Hou, S. Boynton, C.J. Jones, M. Hendricks, K. Velinzon, J.A. Wohlschlegel, R.J. Austin, W.S. Lane, T. Tully, and A. Dutta. 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.
- Poltoratsky, V.P., X. Shi, J.D. York, M.R. Lieber, and T.H. Carter. 1995. Human DNA-activated protein kinase (DNA-PK) is homologous to phosphatidylinositol kinases. *J Immunol*. 155:4529-33.
- Prowse, D.M., L. Bolgan, A. Molnar, and G.P. Dotto. 1997. Involvement of the Sp3 transcription factor in induction of p21Cip1/WAF1 in keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*. 272:1308-14.
- Quintana, D.G., and A. Dutta. 1999. The metazoan origin recognition complex. *Front Biosci*. 4:D805-15.
- Quintana, D.G., Z. Hou, K.C. Thome, M. Hendricks, P. Saha, and A. Dutta. 1997. Identification of HsORC4, a member of the human origin of replication recognition complex. *J Biol Chem*. 272:28247-51.
- Quintana, D.G., K.C. Thome, Z.H. Hou, A.H. Ligon, C.C. Morton, and A. Dutta. 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.
- Quivy, J.P., and P.B. Becker. 1993. An improved protocol for genomic sequencing and footprinting by ligation-mediated PCR. *Nucleic Acids Res*. 21:2779-81.
- Rao, P.N., and R.T. Johnson. 1970. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature*. 225:159-64.
- Rathmell, W.K., W.K. Kaufmann, J.C. Hurt, L.L. Byrd, and G. Chu. 1997. DNA-dependent protein kinase is not required for accumulation of p53 or cell cycle arrest after DNA damage. *Cancer Res*. 57:68-74.
- Rein, T., D.A. Natale, U. Gartner, M. Niggemann, M.L. DePamphilis, and H. Zorbas. 1997a. Absence of an unusual "densely methylated island" at the hamster dhfr ori-beta. *J Biol Chem*. 272:10021-9.
- Rein, T., H. Zorbas, and M.L. DePamphilis. 1997b. Active mammalian replication origins are associated with a high-density cluster of mCpG dinucleotides. *Mol Cell Biol*. 17:416-26.
- Richter, A., and R. Knippers. 1997. High-molecular-mass complexes of human minichromosome-maintenance proteins in mitotic cells. *Eur J Biochem*. 247:136-41.
- Ritzi, M. 2000. Replikations-Initiations-Proteine am Chromatin. Dissertation, Universität Konstanz.
- Ritzi, M., M. Baack, C. Musahl, P. Romanowski, R.A. Laskey, and R. Knippers. 1998. Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J Biol Chem*. 273:24543-9.
- Roberts, B.T., K.A. Farr, and M.A. Hoyt. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene BUB1 encodes a novel protein kinase. *Mol Cell Biol*. 14:8282-91.
- Romanowski, P., M.A. Madine, A. Rowles, J.J. Blow, and R.A. Laskey. 1996. The *Xenopus* origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. *Curr Biol*. 6:1416-25.
- Romig, H., F.O. Fackelmayer, A. Renz, U. Ramsperger, and A. Richter. 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.

- Rotman, G., and Y. Shiloh. 1998. ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet.* 7:1555-63.
- Rowles, A., J.P. Chong, L. Brown, M. Howell, G.I. Evan, and J.J. Blow. 1996. Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*. *Cell.* 87:287-96.
- Rowles, A., S. Tada, and J.J. Blow. 1999. Changes in association of the *Xenopus* origin recognition complex with chromatin on licensing of replication origins. *J Cell Sci.* 112:2011-8.
- Saha, P., K.C. Thome, R. Yamaguchi, Z. Hou, S. Weremowicz, and A. Dutta. 1998. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* CDC45. *J Biol Chem.* 273:18205-9.
- Sambrook, J.E.F., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, second ed.
- Sanger, F., G.M. Air, B.G. Barrell, N.L. Brown, A.R. Coulson, C.A. Fiddes, C.A. Hutchison, P.M. Slocombe, and M. Smith. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature.* 265:687-95.
- Santocanale, C., and J.F. Diffley. 1996. ORC- and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 15:6671-9.
- Santocanale, C., and J.F. Diffley. 1998. A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature.* 395:615-8.
- Sato, M., T. Gotow, Z. You, Y. Komamura-Kohno, Y. Uchiyama, N. Yabuta, H. Nojima, and Y. Ishimi. 2000. Electron microscopic observation and single-stranded DNA binding activity of the Mcm4,6,7 complex. *J Mol Biol.* 300:421-31.
- Scheffner, M., J.M. Huibregtse, R.D. Vierstra, and P.M. Howley. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 75:495-505.
- Schmidt, C., G. Fischer, H. Kadner, E. Genersch, K. Kuhn, and E. Poschl. 1993. Differential effects of DNA-binding proteins on bidirectional transcription from the common promoter region of human collagen type IV genes COL4A1 and COL4A2. *Biochim Biophys Acta.* 1174:1-10.
- Schulte, D., R. Burkhart, C. Musahl, B. Hu, C. Schlatterer, H. Hameister, and R. Knippers. 1995. Expression, phosphorylation and nuclear localization of the human P1 protein, a homologue of the yeast Mcm 3 replication protein. *J Cell Sci.* 108:1381-9.
- Schulte, D., A. Richter, R. Burkhart, C. Musahl, and R. Knippers. 1996. Properties of the human nuclear protein p85Mcm. Expression, nuclear localization and interaction with other Mcm proteins. *Eur J Biochem.* 235:144-51.
- Shah, J.V., and D.W. Cleveland. 2000. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell.* 103:997-1000.
- Shan, B., X. Zhu, P.L. Chen, T. Durfee, Y. Yang, D. Sharp, and W.H. Lee. 1992. Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F. *Mol Cell Biol.* 12:5620-31.
- Shareef, M.M., C. King, M. Damaj, R. Badagu, D.W. Huang, and R. Kellum. 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.
- Sharp-Baker, H., and R.H. Chen. 2001. Spindle checkpoint protein Bub1 is required for kinetochore localization of Mad1, Mad2, Bub3, and CENP-E, independently of its kinase activity. *J Cell Biol.* 153:1239-50.

- Shechter, D.F., C.Y. Ying, and J. Gautier. 2000. The intrinsic DNA helicase activity of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H minichromosome maintenance protein. *J Biol Chem.* 275:15049-59.
- Sherr, C.J. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell.* 73:1059-65.
- Shieh, S.Y., M. Ikeda, Y. Taya, and C. Prives. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 91:325-34.
- Shin, E.K., L.E. Perryman, and K. Meek. 1997. A kinase-negative mutation of DNA-PK(CS) in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. *J Immunol.* 158:3565-9.
- Simmons, D.T. 2000. SV40 large T antigen functions in DNA replication and transformation. *Adv Virus Res.* 55:75-134.
- Simon, I., T. Tenzen, R. Mostoslavsky, E. Fibach, L. Lande, E. Milot, J. Gribnau, F. Grosveld, P. Fraser, and H. Cedar. 2001. Developmental regulation of DNA replication timing at the human beta globin locus. *Embo J.* 20:6150-7.
- Singleton, B.K., M.I. Torres-Arzayus, S.T. Rottinghaus, G.E. Taccioli, and P.A. Jeggo. 1999. The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Mol Cell Biol.* 19:3267-77.
- Sinha, P., V. Chang, and B.K. Tye. 1986. A mutant that affects the function of autonomously replicating sequences in yeast. *J Mol Biol.* 192:805-14.
- Skoufias, D.A., P.R. Andreassen, F.B. Lacroix, L. Wilson, and R.L. Margolis. 2001. Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:4492-7.
- Smith, D.R., L.A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, D. Blakely, R. Cook, K. Gilbert, D. Harrison, L. Hoang, P. Keagle, W. Lumm, B. Pothier, D. Qiu, R. Spadafora, R. Vicaire, Y. Wang, J. Wierzbowski, R. Gibson, N. Jiwani, A. Caruso, D. Bush, J.N. Reeve, and et al. 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol.* 179:7135-55.
- Smith, G.C., and S.P. Jackson. 1999. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13:916-34.
- Stagljar, I., U. Hubscher, and A. Barberis. 1999. Activation of DNA replication in yeast by recruitment of the RNA polymerase II transcription complex. *Biol Chem.* 380:525-30.
- Stinchcomb, D.T., K. Struhl, and R.W. Davis. 1979. Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature.* 282:39-43.
- Stoeber, K., T.D. Tlsty, L. Happerfield, G.A. Thomas, S. Romanov, L. Bobrow, E.D. Williams, and G.H. Williams. 2001. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci.* 114:2027-41.
- Story, R.M., and T.A. Steitz. 1992. Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature.* 355:374-6.
- Su, W., S. Jackson, R. Tjian, and H. Echols. 1991. DNA looping between sites for transcriptional activation: self- association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev.* 5:820-6.
- Sun, W., M. Hola, K. Pedley, S. Tada, J.J. Blow, I.T. Todorov, S.E. Kearsey, and R.F. Brooks. 2000. The replication capacity of intact mammalian nuclei in *Xenopus* egg extracts declines with quiescence, but the residual DNA synthesis is independent of *Xenopus* MCM proteins. *J Cell Sci.* 113:683-95.
- Sunkel, C.E., and P.A. Coelho. 1995. The elusive centromere: sequence divergence and functional conservation. *Curr Opin Genet Dev.* 5:756-67.

- Supp, D.M., D.P. Witte, W.W. Branford, E.P. Smith, and S.S. Potter. 1996. Sp4, a member of the Sp1-family of zinc finger transcription factors, is required for normal murine growth, viability, and male fertility. *Dev Biol.* 176:284-99.
- Suske, G. 1999. The Sp-family of transcription factors. *Gene.* 238:291-300.
- Suzuki, S., A. Adachi, A. Hiraiwa, M. Ohashi, M. Ishibashi, and T. Kiyono. 1998. Cloning and characterization of human MCM7 promoter. *Gene.* 216:85-91.
- Tada, S., A. Li, D. Maiorano, M. Mechali, and J.J. Blow. 2001. Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF- B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol.* 3:107-13.
- Taira, T., S.M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga. 1994. A novel DNA replication origin identified in the human heat shock protein 70 gene promoter. *Mol Cell Biol.* 14:6386-97.
- Tanaka, T., D. Knapp, and K. Nasmyth. 1997. Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell.* 90:649-60.
- Taylor, S.S., E. Ha, and F. McKeon. 1998. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol.* 142:1-11.
- Taylor, S.S., D. Hussein, Y. Wang, S. Elderkin, and C.J. Morrow. 2001. Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. *J Cell Sci.* 114:4385-95.
- Thommes, P., R. Fett, B. Schray, R. Burkhardt, M. Barnes, C. Kennedy, N.C. Brown, and R. Knippers. 1992. Properties of the nuclear P1 protein, a mammalian homologue of the yeast Mcm3 replication protein. *Nucleic Acids Res.* 20:1069-74.
- Thommes, P., Y. Kubota, H. Takisawa, and J.J. Blow. 1997. The RLF-M component of the replication licensing system forms complexes containing all six MCM/P1 polypeptides. *Embo J.* 16:3312-9.
- Todorov, I.T., A. Attaran, and S.E. Kearsey. 1995. BM28, a human member of the MCM2-3-5 family, is displaced from chromatin during DNA replication. *J Cell Biol.* 129:1433-45.
- Todorov, I.T., R. Pepperkok, R.N. Philipova, S.E. Kearsey, W. Ansorge, and D. Werner. 1994. A human nuclear protein with sequence homology to a family of early S phase proteins is required for entry into S phase and for cell division. *J Cell Sci.* 107:253-65.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:4350-4.
- Tribioli, C., G. Biamonti, M. Giacca, M. Colonna, S. Riva, and A. Falaschi. 1987. Characterization of human DNA sequences synthesized at the onset of S-phase. *Nucleic Acids Res.* 15:10211-32.
- Trimarchi, J.M., B. Fairchild, R. Verona, K. Moberg, N. Andon, and J.A. Lees. 1998. E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2850-5.
- Triolo, T., and R. Sternglanz. 1996. Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature.* 381:251-3.
- Tsuruga, H., N. Yabuta, K. Hashizume, M. Ikeda, Y. Endo, and H. Nojima. 1997a. Expression, nuclear localization and interactions of human MCM/P1 proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 236:118-25.

- Tsuruga, H., N. Yabuta, S. Hosoya, K. Tamura, Y. Endo, and H. Nojima. 1997b. HsMCM6: a new member of the human MCM/P1 family encodes a protein homologous to fission yeast Mis5. *Genes Cells*. 2:381-99.
- Tugal, T., X.H. Zou-Yang, K. Gavin, D. Pappin, B. Canas, R. Kobayashi, T. Hunt, and B. Stillman. 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 M.E. Woodworth. 2001. DNA replication efficiency depends on transcription factor-binding sites. *J Virol*. 75:5638-45.
- Tye, B.K. 1999. MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem*. 68:649-86.
- Tye, B.K., and S. Sawyer. 2000. The hexameric eukaryotic MCM helicase: building symmetry from nonidentical parts. *J Biol Chem*. 275:34833-6.
- Vairo, G., D.M. Livingston, and D. Ginsberg. 1995. Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev*. 9:869-81.
- Vas, A., W. Mok, and J. Leatherwood. 2001. Control of DNA rereplication via Cdc2 phosphorylation sites in the origin recognition complex. *Mol Cell Biol*. 21:5767-77.
- Vashee, S., P. Simancek, M.D. Challberg, and T.J. Kelly. 2001. Assembly of the human origin recognition complex. *J Biol Chem*. 276:26666-73.
- Vassilev, L., and E.M. Johnson. 1990. An initiation zone of chromosomal DNA replication located upstream of the c-myc gene in proliferating HeLa cells. *Mol Cell Biol*. 10:4899-904.
- Vaughn, J.P., P.A. Dijkwel, and J.L. Hamlin. 1990. Replication initiates in a broad zone in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain. *Cell*. 61:1075-87.
- Verheijen, R., W. van Venrooij, and F. Ramaekers. 1988. The nuclear matrix: structure and composition. *J Cell Sci*. 90:11-36.
- Vliet, V.d. 1996. Roles of transcription factors in DNA replication. p87-118. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- Wade, M., M.C. Blake, R.C. Jambou, K. Helin, E. Harlow, and J.C. Azizkhan. 1995. An inverted repeat motif stabilizes binding of E2F and enhances transcription of the dihydrofolate reductase gene. *J Biol Chem*. 270:9783-91.
- Waga, S., G.J. Hannon, D. Beach, and B. Stillman. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 369:574-8.
- Walker, J.E., M. Saraste, M.J. Runswick, and N.J. Gay. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*. 1:945-51.
- Walter, J.C. 2000. Evidence for sequential action of cdc7 and cdk2 protein kinases during initiation of DNA replication in *Xenopus* egg extracts. *J Biol Chem*. 275:39773-8.
- Waters, J.C., R.H. Chen, A.W. Murray, G.J. Gorbsky, E.D. Salmon, and R.B. Nicklas. 1999. Mad2 binding by phosphorylated kinetochores links error detection and checkpoint action in mitosis. *Curr Biol*. 9:649-52.
- Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81:323-30.
- Weinreich, M., C. Liang, H.H. Chen, and B. Stillman. 2001. Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11211-7.

- Weinreich, M., and B. Stillman. 1999. Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway. *Embo J.* 18:5334-46.
- Weiss, E., and M. Winey. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol.* 132:111-23.
- Wessel, D., and U.I. Flugge. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 138:141-3.
- Whittaker, A.J., I. Royzman, and T.L. Orr-Weaver. 2000. *Drosophila* double parked: a conserved, essential replication protein that colocalizes with the origin recognition complex and links DNA replication with mitosis and the down-regulation of S phase transcripts. *Genes Dev.* 14:1765-76.
- Williams, T., A. Admon, B. Luscher, and R. Tjian. 1988. Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev.* 2:1557-69.
- Williams, T., and R. Tjian. 1991a. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* 5:670-82.
- Williams, T., and R. Tjian. 1991b. Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins. *Science.* 251:1067-71.
- Wohlschlegel, J.A., B.T. Dwyer, S.K. Dhar, C. Cvetic, J.C. Walter, and A. Dutta. 2000. Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science.* 290:2309-12.
- Woo, R.A., K.G. McLure, S.P. Lees-Miller, D.E. Rancourt, and P.W. Lee. 1998. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature.* 394:700-4.
- Wray, W., T. Boulikas, V.P. Wray, and R. Hancock. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 118:197-203.
- Xiong, Y., G.J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, and D. Beach. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 366:701-4.
- Xu, M., K.A. Sheppard, C.Y. Peng, A.S. Yee, and H. Piwnicka-Worms. 1994. Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 14:8420-31.
- Yan, H., S. Gibson, and B.K. Tye. 1991. Mcm2 and Mcm3, two proteins important for ARS activity, are related in structure and function. *Genes Dev.* 5:944-57.
- Yan, H., A.M. Merchant, and B.K. Tye. 1993. Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast. *Genes Dev.* 7:2149-60.
- Yan, Z., J. DeGregori, R. Shohet, G. Leone, B. Stillman, J.R. Nevins, and R.S. Williams. 1998. Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:3603-8.
- Ye, J., R.H. Xu, J. Taylor-Papadimitriou, and P.M. Pitha. 1996. Sp1 binding plays a critical role in Erb-B2- and v-ras-mediated downregulation of alpha2-integrin expression in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 16:6178-89.
- Yoon, Y., J.A. Sanchez, C. Brun, and J.A. Huberman. 1995. Mapping of replication initiation sites in human ribosomal DNA by nascent-strand abundance analysis. *Mol Cell Biol.* 15:2482-9.
- You, Z., Y. Komamura, and Y. Ishimi. 1999. Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity. *Mol Cell Biol.* 19:8003-15.
- Zachariae, W., and K. Nasmyth. 1999. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 13:2039-58.

- Zdzienicka, M.Z. 1995. Mammalian mutants defective in the response to ionizing radiation- induced DNA damage. *Mutat Res.* 336:203-13.
- Zeng, Y.X., K. Somasundaram, and W.S. el-Deiry. 1997. AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression. *Nat Genet.* 15:78-82.
- Zhang, J., S. Hagopian-Donaldson, G. Serbedzija, J. Elsemore, D. Plehn-Dujowich, A.P. McMahon, R.A. Flavell, and T. Williams. 1996. Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature.* 381:238-41.
- Zhou, C., and A. Jong. 1990. CDC6 mRNA fluctuates periodically in the yeast cell cycle. *J Biol Chem.* 265:19904-9.
- Zou, L., J. Mitchell, and B. Stillman. 1997. CDC45, a novel yeast gene that functions with the origin recognition complex and Mcm proteins in initiation of DNA replication. *Mol Cell Biol.* 17:553-63.
- Zou, L., and B. Stillman. 1998. Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin. *Science.* 280:593-6.
- zur Hausen, H. 1991. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology.* 184:9-13.