

**Untersuchung der Protein-DNA-Interaktion am
Replikationsursprung in der Lysozym-GAS41-Gendomäne
des Huhns
(*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758)**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
(Dr. rer. nat.) des Departments Biologie
der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dipl. - Biol. Katrin Hübner

aus Gehrden

Hamburg, 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. H. STRÄTLING
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. E. PRATJE
Tag der Disputation: 31. Oktober 2008

Hamburg, den 16. Oktober 2008



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jörg Ganzhorn'.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Für meine Eltern
und meine Schwester.

*Das Leben ist das Produkt
unserer Gedanken.*

(Marc Aurel)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Die DNA-Replikation in Eukaryonten	1
1.1.1 Replikationsursprünge in Hefen	2
1.1.2 Replikationsursprünge in Metazoen	5
1.1.3 Der <i>Origin Recognition Complex</i> (ORC)	7
1.1.4 Faktoren zur Auswahl von Replikationsursprüngen	9
1.1.5 Initiation und Ablauf der DNA-Replikation in Säugern	11
1.2 Der OBR und der Lysozym-GAS41-Genlocus des Huhns	13
1.2.1 Das Hühnerlysozymgen	14
1.2.2 Das GAS41-Gen	16
1.2.3 Der OBR im Lysozym-GAS41-Genlocus	17
2 Ziel der Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Bakterienstämme und Zelllinien	19
3.1.2 Kulturmedien und Medienzusätze	19
3.1.3 Oligonukleotide	21
3.1.4 Plasmide	22
3.1.5 Enzyme	23
3.1.6 Radiochemikalien	23
3.1.7 Antikörper und Antiseren	24
3.1.8 Reagenziensysteme (Kits)	24
3.1.9 Marker	25
3.2 Methoden	26
3.2.1 Zellkultur	26
3.2.2 Passagieren von Zellen	26
3.2.3 Cryokonservierung und Auftauen von DT40-Zellen	26
3.2.4 Präparation von Kernextrakten (nach Schreiber et. al., 1989)	27
3.2.5 Präparation von Zellextrakten (Gesamtprotein)	27

3.2.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	28
3.2.7	Bakterienkultur	28
3.2.8	Herstellung transformationskompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	28
3.2.9	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock	29
3.2.10	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> -Zellen	29
3.2.11	DNA-Restriktion	31
3.2.12	DNA-Dephosphorylierung	31
3.2.13	Ligation von DNA-Fragmenten	31
3.2.14	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	31
3.2.15	DNA-Fällungen	32
3.2.16	DNA-Agarosegelelektrophorese	32
3.2.17	DNA-Isolation aus Agarosegelen	33
3.2.18	DNA-Konzentrationsbestimmung	33
3.2.19	Standard PCR	33
3.2.20	Quantitative <i>Real-Time PCR</i>	34
3.2.21	Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide	35
3.2.22	Isolierung von Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgelen	36
3.2.23	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	36
3.2.24	Reinigung radioaktiv markierter Oligonukleotide	37
3.2.25	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)	37
3.2.26	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	38
3.2.27	Vorbereitung von Poly(dIdC) x Poly(dIdC)	39
3.2.28	Gelretardationsanalysen (<i>EMSA</i>)	39
3.2.29	<i>Immunomobility Shift</i> -Analysen	41
3.2.30	Autoradiographie und Filmentwicklung	42
3.2.31	Expression eines rekombinanten cORC2-Polypeptids in <i>E. coli</i>	42
3.2.32	Präparation von cORC2- <i>Inclusion Bodies</i> aus <i>E. coli</i>	43
3.2.33	Reinigung von cORC2- <i>Inclusion Bodies</i> über Nickel-Affinitätschromatographie	44
3.2.34	Produktion polyklonaler α -cORC2-Antikörper in Kaninchen	45
3.2.35	Aufreinigung von α -cORC2-Antikörpern (IgGs) aus Kaninchenblutserum	45
3.2.36	Herstellung einer 50%igen (v/v) Protein A-Sepharose-Suspension	46
3.2.37	Präparation von Nucleoproteinen für ChIP-Analysen	46

3.2.38	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	47
3.2.39	<i>Western Blot</i> -Analyse	50
3.2.40	Transfektion von DT40-Zellen durch Elektroporation	51
3.2.41	Präparation von chromosomaler DNA aus DT40-Zellen (ohne Kit) . .	52
3.2.42	Präparation von chromosomaler DNA aus DT40-Zellen mit dem 'Wizard Genomic DNA Purification Kit' (Promega)	52
3.2.43	Herstellung von DNA-Sonden	53
3.2.44	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	53
3.2.45	<i>Southern Blot</i> -Analyse	53
4	Ergebnisse	55
4.1	Identifizierung von DNA-Bindestellen für Initiationsproteine des Hühner-Lysozym-GAS41-OBRs <i>in vitro</i>	55
4.1.1	Oct-1 bindet an eine „Octamer-Motiv“-ähnliche Nukleotidsequenz des Lysozym-GAS41-OBRs <i>in vitro</i>	55
4.1.2	Sp1 bindet an „GC-Boxen“ des Lysozym-GAS41-OBRs <i>in vitro</i> . . .	60
4.1.3	ORC2 bindet an eine AT-reiche Sequenz aus dem Lysozym-GAS41-OBR <i>in vitro</i>	62
4.2	Herstellung eines polyklonalen α -cORC2-Antikörpers	65
4.2.1	Konstruktion des cORC2-Expressionsvektors pETorc2	66
4.2.2	Expression von rekombinantem cORC2 in <i>E. coli</i> und Proteinreinigung aus <i>Inclusion Bodies</i>	66
4.2.3	Immunisierung eines Kaninchens mit dem rekombinanten cORC2-Peptid und Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus dem Blutserum . .	68
4.3	Untersuchung der Bindung von ORC2, Sp1, Oct-1 und NF1 im Hühner-Lysozym-GAS41-OBR <i>in vivo</i> mithilfe der ChIP-Technik	70
4.3.1	ORC2 bindet am Chromatin <i>in vivo</i>	70
4.3.2	ORC2 und Sp1 binden in benachbarten Chromatinregionen <i>in vivo</i> . .	71
4.3.3	ORC2 und Oct-1 binden in benachbarten Chromatinregionen. NF1 bindet nicht mit ORC2 oder Oct-1 in derselben Chromatinregion. . .	73
4.4	Untersuchung der Anreicherung von OBR-Sequenzen in Immunpräzipitaten durch quantitative <i>Real-Time PCR</i>	75
4.4.1	Sp1 bindet am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBRs <i>in vivo</i>	76
4.4.2	Oct-1 bindet am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBR <i>in vivo</i>	77

4.4.3	ORC2 bindet am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBR <i>in vivo</i>	78
4.5	Transfektionsexperimente zur Deletion der Sp1-Binderegion im Lysozym-OBR / GAS41Promotor von DT40-Zellen	80
4.5.1	Strategie zur Deletion der Sp1-Binderegion durch homologe Rekombination	80
4.5.2	Konstruktion der <i>Targeting</i> -Plasmide pSp1-neo und pSp1-puro	81
4.5.3	Transfektion von DT40-Zellen mit einem GAS41-Expressionsvektor	82
4.5.4	Transfektion von DT40-13/94- und DT40 Z3#4.1-Zellen mit den <i>Targeting</i> -Plasmiden pSp1-puro und pSp1-neo	83
5	Diskussion	87
5.1	DNA-Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren Oct-1, Sp1 und NF1 im Bereich des Lysozym-GAS41-OBR	87
5.2	Die Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Sp1 binden an spezifischen DNA-Bindestellen im Lysozym-GAS41-OBR <i>in vivo</i>	90
5.3	ORC2, eine Komponente des hexameren ORC-Komplexes, bindet an den Lysozym-GAS41-OBR <i>in vivo</i>	94
5.4	ORC2 bindet vermutlich in Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren Sp1 und Oct-1 an den Lysozym-GAS41-OBR <i>in vivo</i>	97
5.5	Transfektionsexperimente zur Deletion der Sp1-Binderegion im Lysozym-OBR / GAS41-Promotor von DT40-Zellen	100
6	Zusammenfassung	103
7	Summary	105
8	Literatur	107
A	Anhang	128
A.1	Stammlösungen	128
A.2	Lösungen und Puffer	131
A.3	Sonstige Materialien, spezielle Geräte, Chemikalien	135
A.4	Nukleotidsequenz der cORC2-cDNA in Plasmid riken1_17f11	140
	Danksagung	143

Abkürzungen

α -	anti-
A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACS	<i>ARS consensus sequence</i>
<i>amp^R</i>	Ampicillin-Resistenzgen
ARS	<i>autonomously replicating sequence</i>
ATCC	<i>The American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
c	Hühner- (chicken)
C	Cytosin
<i>cam^R</i>	Kanamycin-Resistenz
C-terminal	carboxy-terminal
°C	Grad Celsius
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Ci	Curie
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
Δ	Deletion
<i>D.</i>	<i>Drosophila</i>
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHS	DNase I-hypersensitive Stelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)

G	Guanin
G1-Phase	„Wachstumsphase“ zwischen Mitose und DNA-Synthese im Zellzyklus (g: <i>growth, gap</i>)
g	Gramm
G418	Aminoglykosidantibiotikum Geneticin
GAS41	<i>Glioma-Amplified-sequence 41</i>
Gbp	Gigabasenpaare
h	Stunde; human
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1- β -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo-
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	Phage Lambda; Wellenlänge
LB	<i>Luria Broth</i>
μ	Mikro-
m	Milli-
M	Molar
MAR	Kernmatrix-Anheftungsregion (<i>matrix attachment region</i>)
MCM	<i>minichromosome maintenance</i>
MES	2-Morpholinethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
M-Phase	Mitosephase
n	Nano-
<i>neo</i> ^R	Neomycin / G418-Resistenzgen
NF1	<i>Nuclear factor 1</i>
Ni-NTA	<i>nickel-nitriloacetic acid</i>
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P40
N-terminal	amino-terminal
OBR	<i>origin of bidirectional DNA replication</i>
Oct-1	<i>Octamer-binding protein 1</i>
OD _{260nm}	optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge
ORC	<i>origin recognition complex</i>
p	Piko-

p.a.	für die Analyse (<i>pro analysi</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
<i>puro</i> ^R	Puromycin-Resistenzgen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RIP-Mapping	<i>replication initiation point mapping</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde(n)
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
S-Phase	DNA-Synthesephase
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TBST	TBS mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEN	Tris-EDTA-NaCl
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
T _m	mittlere DNA-Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
X.	<i>Xenopus</i>
<i>zeo</i> ^R	Zeocin-Resistenzgen

1 Einleitung

1.1 Die DNA-Replikation in Eukaryonten

Eukaryontische Zellen replizieren ihr Genom mit einer bemerkenswerten Präzision und zeitlichen Koordination. Das exakte und vollständige Replizieren des genetischen Materials ist von essentieller Bedeutung, um genetische Informationen zu bewahren und diese an die nächste Zellgeneration weiterzugeben. Die Replikation des Genoms beginnt an spezifischen Startstellen, den sogenannten Replikationsursprüngen. Wie diese aber im Einzelnen aktiviert und reguliert werden, ist noch längst nicht vollständig verstanden (zur Übersicht: Cvetic und Walter, 2005). Die meisten der heutigen Erkenntnisse über Initiation und Ablauf der DNA-Replikation in Eukaryonten basieren auf detaillierten Untersuchungen verschiedener Modellorganismen (siehe Referenzen im Text). Zu diesen zählt die einzellige Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), die einzellige Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) und multizelluläre Eukaryonten wie der Krallenfrosch *Xenopus laevis* (*X. laevis*) und die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*). Intensive Forschungsarbeiten laufen aber auch mit kultivierbaren Säugerzelllinien wie vom Hamster (*Cricetulus griseus*) (*C. griseus*) und dem Menschen *Homo sapiens* (*H. sapiens*). Um die Initiation der Replikation in Eukaryonten besser zu verstehen, werden auch spezielle Tumor-DNA-Viren als Modellsysteme herangezogen, beispielsweise das Simian Virus 40 (SV40), Baculovirus, Epstein-Barr-Virus (EBV) und Adenovirus (zur Übersicht: Bullock, 1997; Vanarsdall et al., 2007; Wang und Sugden, 2005; Liu et al., 2003; Stenlund, 2003). Viren enthalten ein relativ kleines und einfach strukturiertes Genom, welches praktisch vollständig durch die Replikationsmaschinerie der Wirtszelle repliziert wird. Die Virus-DNA selbst kodiert nur für wenige Initiationsproteine. Stattdessen binden zahlreiche von der Wirtszelle kodierte Proteine, insbesondere Replikations- und Transkriptionsfaktoren, an den viralen Replikationsursprung. Erst dadurch wird die Replikation der Virus-DNA ermöglicht (de Jong und van der Vliet, 1999).

Im Gegensatz zu den kleinen bakteriellen und viralen Genomen, die nur einen einzigen Replikationsursprung besitzen, werden die bedeutend größeren eukaryontischen Genome von zahlreichen (1.000 - 100.000) Replikationsursprüngen repliziert (Blow und Dutta, 2005; Bielinsky, 2003; Bell und Dutta, 2002). Diese sind in Hefen mit einem Abstand von etwa 20 - 30 kbp, in Säugern von etwa 100 - 300 kbp über das Genom verteilt (DePamphilis, 2005). Im humanen Genom existieren etwa 30.000 Replikationsursprünge mit einem durchschnittlichen Abstand von etwa 100 kbp (DePamphilis, 1999). Der Vorteil einer solchen von zahlreichen

Replikationsstartstellen ausgehenden DNA-Replikation besteht in der Verkürzung der DNA-Synthese-(S)-Phase. Deren Dauer richtet sich somit nicht nach der Genomgröße, sondern dem Abstand zwischen zwei Replikationsursprüngen. Erst dies ermöglichte die Evolution von Tieren und Pflanzen mit über 100 Gbp großen und auf mehrere Chromosomen verteilten Genomen (Kearsey und Cotterill, 2003). Die enorme Anzahl von DNA-Replikationsursprüngen erfordert aber auch präzise Kontrollmechanismen. Diese müssen sicherstellen, dass der „richtige“ Replikationsursprung zur „richtigen“ Zeit und nur ein einziges Mal pro Zellzyklus aktiviert wird (zur Übersicht: Machida et al., 2005; Blow und Dutta, 2005; Teer und Dutta, 2006). Da eine unkontrollierte oder fehlregulierte DNA-Synthese zu Genom-Mutationen führen kann, muss die erneute Replikation innerhalb desselben Zellzykluses verhindert werden. Wichtige Kontrollmechanismen zur Vermeidung solcher Re-Replikationen wirken auf der Ebene der Initiation der DNA-Replikation (Machida und Dutta, 2005; Blow und Dutta, 2005). Viele aktuelle Forschungsprojekte beschäftigen sich daher mit der Frage, welche Faktoren bei der Initiation der DNA-Replikation involviert sind und welche Faktoren diese kontrollieren.

Da es bei der Aktivierung von Replikationsursprüngen in den meisten Fällen zur Ausbildung von zwei Replikationsgabeln kommt, welche sich bidirektional von der Startstelle entfernen, werden DNA-Replikationsursprünge in der vorliegenden Arbeit auch als *origins of bidirectional DNA replication* (OBR) oder kurz „Origins“ bezeichnet. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen am Beispiel des Replikationsursprunges im Lysozym-GAS41-Genlocus des Huhns einen Beitrag leisten, neue Erkenntnisse darüber zu erlangen, welche Replikations- und Transkriptionsfaktoren für die Initiation der DNA-Replikation an eukaryontischen Replikationsursprüngen von Bedeutung sind und welche Funktion sie bei diesem Prozess ausüben.

1.1.1 Replikationsursprünge in Hefen

Die Initiation der DNA-Replikation erfolgt an den Replikationsursprüngen in der G1-Phase des eukaryontischen Zellzykluses. Wie dabei *cis*- und *trans*-wirkende Regulationsfaktoren miteinander interagieren ist am besten bei der Bäckerhefe *S. cerevisiae* untersucht. Origins in *S. cerevisiae* sind die sogenannten ARS-Elemente (*autonomously replicating sequence*) (Stinchcomb et al., 1979 und 1980). Diese Elemente wurden aufgrund ihrer Eigenschaft identifiziert, jedem Plasmid, in das sie eingefügt werden, die autonome und episomale Replikation zu ermöglichen (Stinchcomb et al., 1980). Die ARS-Elemente bestehen in *S. cerevisiae* aus mehreren, 10 - 15 bp kurzen Sequenzelementen, die innerhalb eines 100 - 200 bp umfassenden Bereiches lokalisiert sind. Das wichtigste Element ist das sogenannte A-Element, das eine

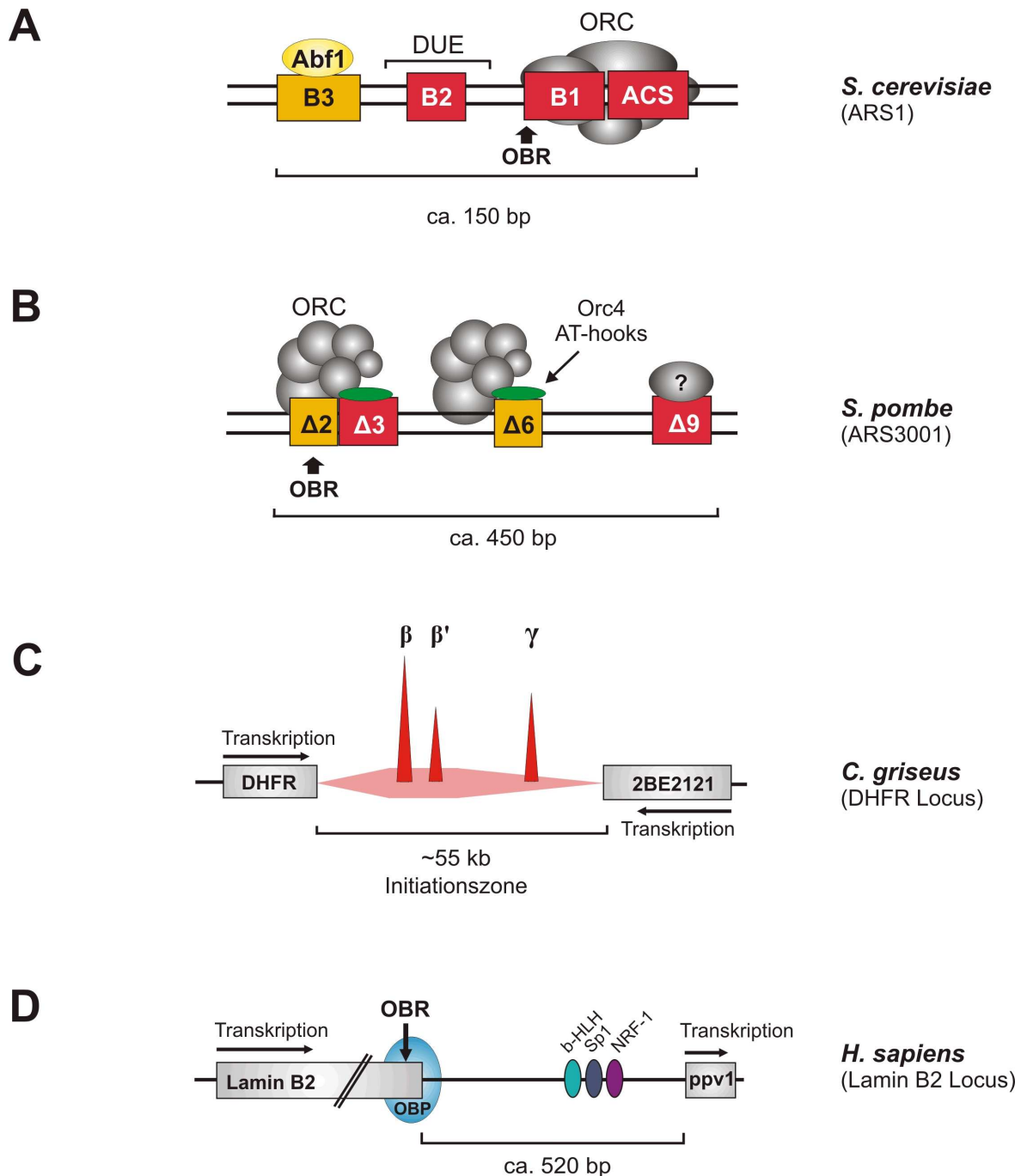


Abb. 1: Struktur von DNA-Replikationsursprüngen in Hefen und multizellulären Eukaryonten (Metazoen). Schematische Darstellung von Replikationsursprüngen **(A)** der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (ARS1), **(B)** der Spaltheefe *S. pombe* (ARS3001), **(C)** des Hamsters *C. griseus* (DHFR Locus) und **(D)** des Menschen *H. sapiens* (Lamin B2 Locus). Abf1, ACS-binding factor 1; ACS, ARS consensus sequence; DUE, DNA unwinding element; ORC, origin recognition complex; OBR, origin of bidirectional DNA replication; DHFR, Dihydrofolatreduktasegen (Abbildungen modifiziert nach <http://depamphilislab.nichd.nih.gov.html> und Kobayashi et al., 1998).

11 bp lange, AT-reiche ARS consensus sequence (ACS) [5'-(A/T)TTTAT(A/G)TTT(A/T)-3'] enthält (Bell und Stillman, 1992). Die ACS ist für die Origin-Funktion essentiell und in den

verschiedenen Origins von *S. cerevisiae* hoch konserviert (Palzkill und Newlon, 1988; Newlon und Theis, 1993). Neben dem konservierten A-Element enthalten Origins in *S. cerevisiae* einige zusätzliche, variable B-Elemente. Beispielsweise existieren im etwa 150 bp umfassenden ARS1-Origin von *S. cerevisiae* drei B-Elemente: B1, B2 und B3 (Abb. 1 A) (Marahrens und Stillman, 1992; Rao et al., 1994). Das B1-Element bildet mit dem angrenzenden A-Element die 43 bp umfassende Bindestelle des *origin recognition complex* (ORC) (siehe Einleitung 1.1.3). Der ORC-Komplex ist für die Initiation der DNA-Replikation essentiell (Rao und Stillman, 1995). Die Startstelle der bidirektionalen DNA-Replikation (OBR) befindet sich in einer nur 4 bp breiten Region zwischen dem B1- und dem B2-Element (Gerbi und Bielinsky, 1997). Das B2-Element wurde ursprünglich als „DNA-Entwindungselement“ (DUE) angesehen (Newlon und Theis, 1993). Neuere Forschungsergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass das B2-Element ein spezifisches, AT-reiches Sequenzelement mit Homologie zur ACS enthält, welches für die Bindung einer Komponente des Prä-Replikationskomplexes (siehe Einleitung 1.1.3) von Bedeutung ist (Wilmes und Bell, 2002). Einige Origins in *S. cerevisiae*, wie ARS1, enthalten noch ein B3-Element, das als Bindestelle des Transkriptionsfaktors Abf1 fungiert (Diffley und Stillman, 1988). Bei der Plasmid-Replikation kann das B3-Element aus ARS1 durch Bindestellen anderer Transkriptionsfaktoren aus Hefen, wie GAL4 und RAP1, funktionell ersetzt werden (Marahrens und Stillman, 1992).

Im Gegensatz zu den relativ einfach strukturierten und konservierten Origins in *S. cerevisiae* sind Replikationsursprünge in allen anderen Eukaryonten bedeutend komplexer und weniger konserviert aufgebaut. Signifikante Unterschiede treten bereits bei der ebenfalls einzelligen Spaltheefe *S. pombe* auf. Origins in *S. pombe* sind mit 500 - 1500 bp Ausdehnung etwa 5 - 10 Mal größer als in *S. cerevisiae*. Zudem besitzen sie keine mit der ACS vergleichbare Konsensussequenz (Bell, 2002; Segurado et al., 2003). Stattdessen enthalten Origins in *S. pombe* zwei oder mehrere asymmetrisch, AT-reiche DNA-Abschnitte von jeweils 20 - 50 bp Länge, in denen ein DNA-Strang hauptsächlich Adenin und der andere Thymin enthält (Takahashi und Masukata, 2001). Für die Funktion des in *S. pombe* detailliert untersuchten Origins ARS3001 (Abb. 1 B) sind vier Elemente notwendig: $\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 6$ und $\Delta 9$ (Kong und DePamphilis, 2002). Die Elemente $\Delta 2$ und $\Delta 3$ bilden zusammen den etwa 100 bp breiten, bipartiten Origin: $\Delta 3$ ist die primäre Bindestelle des ORC-Komplexes, wohingegen das angrenzende $\Delta 2$ -Element die eigentliche Replikationsstartstelle (OBR) enthält. Element $\Delta 6$ ist nur eine schwache ORC-Bindestelle. Da es jedoch die Aktivität des Origins steigert, scheint $\Delta 6$ dem B2-Element in *S. cerevisiae* zu entsprechen (Kong und DePamphilis, 2002). Die $\Delta 9$ -Region ist für die Funktion des Origins ebenfalls essentiell und dient während des Zellzykluses als

Bindestelle für ein noch nicht identifiziertes Protein (Kong und DePamphilis, 2002).

1.1.2 Replikationsursprünge in Metazoen

In multizellulären Organismen (Metazoen) wurden bisher etwa 40 Replikationsursprünge in zehn verschiedenen Organismen identifiziert, darunter etwa 14 humane Origins (Aladjem, 2007; Aladjem et al., 2006; Falaschi et al., 2007). Zu den wenigen bisher im Detail charakterisierten Origins gehören: Der Origin im Bereich des humanen β -Globin-Gens (Kitsberg et al., 1993) und derjenige am 3'-Ende des humanen *Lamin B2*-Gens (Giacca et al., 1994), der Origin im Promotor des humanen *c-myc*-Gens (Vassilev und Johnson, 1990), sowie der Origin im Chorion-Genamplifizierungs-Kontrollelement ACE3 von *D. melanogaster* (Austin et al., 1999) und derjenige in *DHFR*-Genlocus des Hamsters (Heintz et al., 1983; zur Übersicht: Todorovic et al., 1999). Aufgrund der zum einen enormen Größe und Komplexität metazoischer Genome, zum anderen wegen des Fehlens eines für Origins charakteristischen Sequenzmotivs, ist die Identifizierung neuer Origins in höheren Eukaryonten im Vergleich zu Hefen bedeutend schwieriger (zur Übersicht: Cvetic und Walter, 2005; Biamonti et al., 2003). So ist es bis heute nicht möglich, Replikationsursprünge in multizellulären Eukaryonten anhand charakteristischer DNA-Sequenzen zu identifizieren.

Um dennoch Origins in Metazoen identifizieren und kartieren zu können, wurden verschiedene Methoden entwickelt. Diese beruhen unter anderem auf der Analyse von Replikationsintermediaten wie Replikationsblasen durch zweidimensionale-(2D)-Gelelektrophorese (Dijkwel und Hamlin, 1999), der Quantifizierung neu synthetisierter DNA-Stränge mittels kompetitiver PCR (zur Übersicht: Giacca et al., 1997; Staib und Grummt, 1997) oder dem *Replication Initiation Point*-(RIP)-Mapping (Gerbi und Bielinsky, 1997; Bielinsky und Gerbi, 2000). Aufgrund der mit den verschiedenen Methoden erzielten Ergebnisse zeigte sich, dass eukaryontische Origins zum einen solche Chromatinregionen umfassen, in denen die Replikation an einer einzigen oder mehreren, von einer Vielzahl möglicher Startstellen innerhalb einer größeren (2 - 55 kbp) DNA-Region initiiert wird. Diese Regionen werden „Initiationszonen“ bezeichnet (DePamphilis, 1999; Gilbert, 2001; Cvetic und Walter, 2005). Beispiele für Initiationszonen sind der humane *rRNA*-Locus (Little et al., 1993), der Hamster *Rhodopsin*- und *DHFR*-Locus (Dijkwel et al., 2000; Hamlin et al., 1992), der *oriD α* -Origin in *D. melanogaster* (Ina et al., 2001) sowie die Region des *ura4*-Origins in *S. pombe* (Dubey et al., 1994). Zum anderen existieren Origins, in denen die Replikation stets an einer einzigen, festen Startstelle

initiiert wird. Beispiele hierfür sind der humane β -Globin- und *Lamin B2*-Genlocus (Gilbert, 2001; Cvetic und Walter, 2005). Es scheint jedoch, dass die verschiedenen Kartierungsmethoden aufgrund ihrer unterschiedlichen Empfindlichkeit bzw. Auflösung zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Dies lässt sich gut am Beispiel des Dihydrofolatreduktase-(*DHFR*)-Genlocus des Hamsters demonstrieren. Wurde der *DHFR*-Genlocus mittels 2D-Gelelektrophorese analysiert, scheint die Replikation an einer Vielzahl von Initiationsstellen innerhalb einer etwa 55 kbp breiten Initiationszone zu beginnen, die zwischen dem *DHFR*-Gen und dem stromabwärts lokalisierten *2BE2121*-Gen liegt (Dijkwel und Hamlin, 1995 und 1999). Wurde jedoch die gleiche *DHFR*-Region mittels *Nascent Strand PCR* auf die Bildung neu synthetisierter DNA-Stränge hin untersucht, wurden drei konkrete Initiationsstellen ($\text{ori-}\beta$, $\text{ori-}\beta'$ und $\text{ori-}\gamma$) identifiziert (Abb. 1 C) (Kobayashi et al., 1998). Die drei Origins sind unterschiedlich stark aktiv, wobei mindestens 80% aller Initiationen von einer etwa 500 bp breiten Region, die $\text{ori-}\beta$ umgibt, ausgehen (Dijkwel et al., 2002; Kobayashi et al., 1998). In späteren Studien wurde zudem gezeigt, dass die Replikation auch dann am $\text{ori-}\beta$ -Origin beginnt, wenn dieser in ektopischen Chromatinregionen von Human- oder Hamsterzellen integriert ist (Altman und Fanning, 2001 und 2004). Aufgrund der methodisch bedingten, kontroversen Ergebnisse geht man gegenwärtig davon aus, dass die Initiationszonen der Metazoen aus wenigen, primären Initiationsstellen bestehen, welche von einer Vielzahl weniger aktiver, sekundärer Replikationsstartstellen umgeben sind („Jesuiten-Modell“ nach DePamphilis, 1999).

Einer der am besten untersuchten metazoischen Origins mit nur einer Replikationsstartstelle befindet sich am 3'-Ende des humanen *Lamin B2*-Gens (Abb. 1 D). Der *Lamin B2*-Origin umfasst eine etwa 470 bp umfassende Region mit nur einer einzigen Initiationsstelle (Giacca et al., 1994). In diesem Bereich bindet ein Nucleoproteinkomplex (OBP), der je nach Zellzyklusphase zwischen 70 bp und 110 bp des Chromatins überdeckt. Der Komplex enthält in der G1-Phase mehrere Komponenten des Prä-Replikationskomplexes, ORC1, ORC2, CDC6 und MCM3 (Abdurashidova et al., 1998 und 2003). Mithilfe des *RIP-Mappings* (Gerbi und Bielinsky, 1997; Bielinsky und Gerbi, 2000) konnte die Startstelle der DNA-Replikation auf ein Nukleotid genau bestimmt werden. Demnach beginnt die Replikation am *Lamin B2*-Origin innerhalb der vom Proteinkomplex überdeckten Chromatinregion und in beiden DNA-Strängen an fast der gleichen Position, da die beiden Startstellen nur 3 bp auseinanderliegen (Abdurashidova et al., 2000).

1.1.3 Der *Origin Recognition Complex* (ORC)

Ein bedeutender Schritt hin zu einem besseren Verständnis der eukaryontischen DNA-Replikation war die Identifizierung des hexameren *origin recognition complex* (ORC) in der Hefe *S. cerevisiae* (Bell und Stillman, 1992). Der ORC-Komplex besteht aus sechs heterogenen Proteinuntereinheiten (ORC1 - ORC6). Da die Bindung von ORC innerhalb eines Origins eine Voraussetzung für die Bildung des Prä-Replikationskomplexes (siehe Einleitung 2) ist, „markiert“ ORC diejenigen Origins, an denen in der S-Phase die Replikation initiiert werden soll. In der Hefe *S. cerevisiae* bindet der ORC-Komplex an die AT-reiche ACS innerhalb der A-Elemente. *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass für die Bindung von ORC an den ARS1-Origin die fünf größten Untereinheiten (Orc1 - Orc5) notwendig sind, von denen vier (Orc1 - Orc4) in direktem Kontakt mit der ACS stehen (Bell und Stillman, 1992; Lee und Bell, 1997). Obwohl Orc6 für die Chromatinbindung nicht unbedingt benötigt wird, ist sie doch für die Lebensfähigkeit der Zelle unerlässlich (Li und Herskowitz, 1993; Lee und Bell, 1997). In der Spaltheife *S. pombe* bindet der ORC-Komplex mithilfe einer besonderen *AT-hook*-Domäne in der Orc4-Untereinheit an die AT-reichen Origin-Sequenzen (Abb. 1 B), was einzigartig innerhalb der Eukaryonten ist. Die DNA-Bindedomäne besteht aus neun Kopien des HMG-I(Y)-verwandten *AT-hook*-Bindemotivs, das eine hohe Affinität zu AT-reicher DNA [5'-AAA(T/A)-3'] besitzt (Chuang und Kelly, 1999; Lee et al., 2001; Takahashi und Masukata, 2001). In *S. pombe* wird die Bindung von ORC an Origins einzig durch die besondere Orc4-Untereinheit vermittelt (Moon et al., 1999; Kong und DePamphilis, 2001). Beiden Hefen ist jedoch gemein, dass ihre ORC-Komplexe während des gesamten Zellzykluses am Chromatin gebunden bleiben (Lee und Bell, 1997; Lygerou und Nurse, 1999).

Während ORC in Hefen an spezifische, AT-reiche Sequenzen bindet, fehlt metazoischen ORC-Komplexen eine sequenzabhängige Bindungsaktivität. Studien zeigten, dass metazoische ORC-Komplexe lediglich eine leichte Präferenz für allgemein AT-reiche DNA-Sequenzen aufweisen und daher eher sequenzunabhängig an DNA binden (Vashee et al., 2003; DePamphilis, 2005). Dies zeigt sich auch in der Fruchtfliege *D. melanogaster*, in welcher der ORC-Komplex ebenfalls sequenzunabhängig an die Origin-DNA bindet (Chesnokov et al., 2001; Zhang und Tower, 2004). Balasov et al. (2007) konnten kürzlich zeigen, dass in *D. melanogaster* die kleinste ORC-Untereinheit, Orc6, eine N-terminale DNA-Bindedomäne enthält. Diese soll nicht nur für die Bindung des ORC-Komplexes an den Origin, sondern auch für dessen Funktion bei der Replikation notwendig sein. Mutationen in der Aminosäuresequenz dieser Bindedomäne verhindern die ORC-Bindung an die DNA, wodurch die Replikation ge-

hemmt wird. *In vitro* bindet ORC aus *D. melanogaster* nicht nur an AT-reiche DNA-Fragmente aus bekannten Replikationsursprüngen, wie ACE3 und ori- β , sondern auch an synthetische poly(dA)-Sequenzen (Balasov et al., 2007).

Inzwischen wurden die ORC-Proteine der meisten Spezies identifiziert. So beispielsweise auch vom Krallenfrosch *X. laevis* (Rowles et al., 1996; Romanowski et al., 1996) und der Maus *Mus musculus* (Springer et al., 1999a und 1999b). Die sechs humanen ORC-Proteine wurden ebenfalls identifiziert und charakterisiert (Takahara et al., 1996; Pinto et al., 1999; Quintana et al., 1997 und 1998; Ishiai et al., 1997; Tugal et al., 1998; Dhar und Dutta, 2000). In mehreren unabhängigen Studien konnte der humane ORC-Komplex (hORC) mithilfe des Baculovirus-Expressionssystems in Insektenzellen rekonstituiert werden (Dhar et al., 2001; Vashee et al., 2001; Giordano-Coltart et al., 2005; Siddiqui und Stillman, 2007). Dabei wurden Insektenzellen mit ORC-Untereinheiten-kodierenden Baculoviren infiziert, mit der Folge, dass die rekombinant exprimierten ORC-Proteine hexamere ORC-Komplexe bildeten. Aus diesen Studien ging hervor, dass hORC *in vitro* aus einem stabilen Kernkomplex (*core complex*) mit den vier ORC-Untereinheiten hORC(2 - 5) besteht, welcher mit hORC1 und hORC6 nur lose assoziiert ist. Den Studien zufolge wird der hORC-Komplex durch nacheinander assoziierende ORC-Untereinheiten gebildet: Zunächst verbinden sich hORC2 und hORC3 mit hORC5 zu einem hORC(2/3/5)-Komplex, welcher hORC4 und schließlich hORC1 unter ATP-Verbrauch rekrutiert (Siddiqui und Stillman, 2007). Zu welchem Zeitpunkt die hORC6-Untereinheit an der Bildung des hORC-Komplexes beteiligt ist, ist noch unklar. Möglicherweise wird hORC6 von hORC3 in einer ATP-unabhängigen Weise rekrutiert (Siddiqui und Stillman, 2007). Zudem wird angenommen, dass der Kernkomplex hORC(2 - 5), ähnlich wie in Hefen, während des gesamten Zellzykluses am Chromatin gebunden bleibt (diskutiert in DePamphilis, 2005). In weiteren *in vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass hORC sequenzunabhängig an AT-reiche DNA bindet. Dabei unterscheidet hORC nicht signifikant zwischen DNA-Fragmenten aus bekannten humanen Origins, wie Lamin B2 und DHFR-ori- β , und Kontrollfragmenten (Vashee et al., 2003).

Weil ORC eine entscheidende Komponente der Prä-Replikationskomplexe (siehe Einleitung 2) ist, bildet er einen wichtigen Angriffspunkt zur Kontrolle der Replikation. In Eukaryonten wird die Aktivität der ORC-Komplexe zumeist über Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen einer oder mehrerer ORC-Untereinheiten, in einigen Säugern auch über die zellzyklusabhängige Degradation der ORC1-Untereinheit reguliert (zur Übersicht: DePamphilis, 2003 und 2005). In Hefen erfolgt eine zellzyklusabhängige Phosphorylierung einzelner ORC-Proteine mithilfe von zyklinabhängigen Kinasen (CDKs). So werden in *S. cerevisiae*

am G1/S-Phasenübergang Orc2 und Orc6 phosphoryliert, während am S/M-Übergang eine Hyperphosphorylierung und in der frühen G1-Phase eine Hypophosphorylierung der ORC-Proteine erfolgt (Nguyen et al., 2001; DePamphilis, 2005). Auch in *S. pombe* wird Orc2 zu Beginn der S-Phase phosphoryliert und in der G2-Phase hyperphosphoryliert (Vas et al., 2001). In Säugern wie Hamster und Mensch bleibt die Anzahl der am Chromatin gebundenen Untereinheiten ORC2 bis ORC6 während des Zellzykluses annähernd konstant. ORC1 ist nur in der G1-Phase bei der Bildung des ORC-Komplexes am Chromatin zu finden (Tatsumi et al., 2003; Kreitz et al., 2001). In Hamsterzellen bewirkt die Ubiquitinierung von ORC1 dessen Ablösung vom Chromatin in der S-Phase. Die zelluläre ORC1-Konzentration bleibt jedoch konstant (Natale et al., 2000). Im Gegensatz dazu führt in Humanzellen die Ubiquitinierung von ORC1 durch das SCF/Skp2-Ubiquitinierungssystem zu einem partiellen Abbau des ORC1-Proteins in den 26S-Proteasomen während der S-Phase (Mendez et al., 2002; Li und DePamphilis, 2002). Da ORC1 bis zur nächsten G1-Phase resynthetisiert werden muss, ergibt sich ein sogenannter „ORC1-Zyklus“, welcher durch eine Akkumulierung von ORC1 in der G1-Phase, einem ubiquitinvermittelten Abbau in der S-Phase und einer Neusynthese während des M/G1-Übergangs charakterisiert ist (Tatsumi et al., 2003; DePamphilis, 2003). Auch in *D. melanogaster* wird ORC1 ubiquitiniert und in der S-Phase abgebaut (Asano et al., 1999; Araki et al., 2003).

Die zyklusphasenabhängige Chromatinbindung und -ablösung der ORC1-Untereinheit könnte eine Möglichkeit sein, die Bildung von ORC-Komplexen mit dem Verlauf des Zellzykluses abzustimmen. Dies könnte ein Mechanismus zur Regulation der Replikation sein.

1.1.4 Faktoren zur Auswahl von Replikationsursprüngen

Obwohl ORC-Proteine und die meisten anderen bei der Initiation der Replikation involvierten Proteine konserviert sind, sind die Mechanismen zur Auswahl spezifischer Origins in Metazoen noch weitgehend unklar und werden kontrovers diskutiert (Gilbert, 2004; Cvetič und Walter, 2005). In den einzelligen Hefen scheint der für die ORC-Bindung am Origin entscheidende Faktor eine auf der konservierten ACS (*S. cerevisiae*) bzw. auf ausgedehnten, AT-reichen Regionen (*S. pombe*) basierende Sequenzspezifität zu sein. Wie allerdings metazoische ORC-Komplexe einzelne Origins auswählen, ist noch nicht vollständig verstanden. Da metazoische ORC-Komplexe praktisch sequenzunabhängig an DNA binden und lediglich eine leichte Präferenz für allgemein AT-reiche DNA zeigen (Vashee et al., 2003), scheinen

ORC-Komplexe in Metazoen nicht oder nur geringfügig mithilfe der DNA-Sequenz zum Origin „geleitet“ zu werden. Mit zunehmender Komplexität der Organismen scheint auch die Komplexität derjenigen Faktoren zuzunehmen, durch die eine Auswahl einzelner Replikationsstartstellen erfolgt. Diese Tendenz zeigt sich sowohl bei einem Vergleich verschieden hoch entwickelter Eukaryonten-Spezies, als auch während der Entwicklung eines einzelnen Individuums. Letzteres lässt sich gut am Beispiel der frühen Embryonalstadien von *D. melanogaster* und *X. laevis* beobachten, in denen jede beliebige DNA-Sequenz als Replikationsursprung dienen kann (Hyrien und Mechali, 1992 und 1993; Mahbubani et al., 1992; Hyrien et al., 1995). Mit voranschreitender und sich verlangsamender Entwicklung wird die Replikation jedoch nur noch an wenigen, ausgewählten Origins initiiert (Hyrien et al., 1995; Sasaki et al., 1999). Da also Anzahl und chromosomale Lage aktiver Origins je nach Entwicklungsstadium stark variieren, müssen epigenetische Mechanismen existieren, welche eine flexible Auswahl von Origins aus einer größeren Anzahl möglicher Replikationsstartstellen bewerkstelligen (zur Übersicht: Mechali, 2001; Antequera, 2004; Aladjem und Fanning, 2004; Aladjem, 2007).

In der Literatur werden eine Reihe von Faktoren diskutiert, die zur Auswahl von Replikationsstartstellen in Metazoen beitragen könnten. So diskutieren neuere Arbeiten den Chromatinkontext (Tabancay und Forsburg, 2006), den verfügbaren Nukleotid-Pool (Anglana et al., 2003), Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (Danis et al., 2004), Transkription (Lin et al., 2003), Chromosomenstruktur (Aggarwal und Calvi, 2004), DNA-Topologie (Remus et al., 2004) und DNA-Methylierung (Harvey und Newport, 2003). Vor diesem Hintergrund entstand der Vorschlag des „relaxed“ Replikon-Modells (Gilbert, 2004). Darin wird das ursprüngliche Konzept des „Replikators“ als spezifische DNA-Sequenz durch das eines kontextabhängigen Elementes ersetzt, welches vom „Initiatorprotein“ durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren erkannt wird, wobei die DNA-Sequenz nur ein möglicher Faktor ist.

Ein Mechanismus zur Auswahl von Origins in Metazoen ist vermutlich die Verknüpfung von Replikation und Transkription (Gilbert, 2002; Weinreich et al., 2004; Schwaiger und Schübeler, 2006). Studien über die zeitliche Koordination beider Prozesse zeigten, dass in Metazoen aktiv transkribierte Genom-Regionen (Euchromatin) überwiegend in der frühen S-Phase, transkriptionell inaktive Regionen (Heterochromatin) meist in der späten S-Phase repliziert werden (Goren und Cedar, 2003). Im Euchromatin sind die Nukleosomen unregelmäßig angeordnet, so dass Euchromatin aus überwiegend „lockerem“, „offenem“ Chromatin besteht, welches zudem den Großteil aller Gene enthält. Die ausgedehnten, hoch repetitiven Heterochromatin-Regionen sind dagegen wegen einer regelmäßigen Nukleosomenanordnung sehr kompakt und enthalten nur wenige Gene (Tabancay und Forsburg, 2006). Als mögliche

Erklärung für die frühe Replikation aktiv transkribierter Gene wird eine höhere Replikationsgenauigkeit in der frühen S-Phase genannt (Wolfe et al., 1989). Dies wäre ein evolutionärer Vorteil für die früh replizierten Gene und könnte die Anhäufung von Genen im Euchromatin erklären (Schwaiger und Schübeler, 2006).

Die Verknüpfung von Mechanismen der Replikation und Transkription wurde bereits in zahlreichen Viren, Hefen und höheren Eukaryonten beobachtet (Baumann et al., 1999; Saha et al., 2004; Kohzaki et al., 1999; Danis et al., 2004; Murakami und Ito, 1999; Zhou et al., 2005; Kohzaki und Murakami, 2005). Obwohl Origins in *S. cerevisiae* typischerweise im Intergenenbereich liegen, enthalten sie oft Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Beispielsweise wird der Transkriptionsfaktor Abf1 für die Aktivierung einiger Origins in *S. cerevisiae* benötigt. Abf1 bindet innerhalb dieser Origins an spezifische Bindestellen, so auch im B3-Element des Origins ARS1 (Marahrens und Stillman, 1992). Die Funktion von Transkriptionsfaktoren wie Abf1 bei der Replikation besteht vermutlich in einer Begrenzung der Nukleosomenbindung im Bereich des Origins, da die Anwesenheit von Nukleosomen sowohl die Transkription als auch die Replikation inhibiert (Lipford und Bell, 2001; Groth et al., 2007; Zhou et al., 2005). Auch für den Transkriptionsfaktor Mcm1 wurde gezeigt, dass dieser für die Replikation von ARS-Sequenzen enthaltenden Plasmiden in *S. cerevisiae* unverzichtbar ist (Chang et al., 2004). Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass der positive Effekt, den Transkriptionsfaktoren auf die Replikation ausüben, unabhängig von der RNA-Synthese ist und dass dieser stattdessen auf eine durch die Transkriptionsfaktorbindung bewirkte Öffnung und Histon-Modifizierung einer Chromatinregion beruht (Levefre et al., 2003).

1.1.5 Initiation und Ablauf der DNA-Replikation in Säugern

Obwohl sich eukaryontische Origins hinsichtlich Lage, Ausdehnung und Komplexität beträchtlich voneinander unterscheiden, sind der ORC-Komplex und die meisten anderen bei der Initiation der Replikation involvierten Proteine wie Cdc6, Cdt1, MCM[2-7], Cdc7/Dbf4 und Cdc45 innerhalb der Eukaryonten hoch konserviert. Daher wird angenommen, dass von der Hefe bis zum Säugetier ähnliche Mechanismen für die Initiation der DNA-Replikation existieren (DePamphilis et al., 2006; Robinson und Bell, 2005; Bogan et al., 2000; Gavin et al., 1995). Die Befähigung zur Replikation erlangen eukaryontische Origins durch einen Multiproteinkomplex, den sogenannten Prä-Replikationskomplex (preRC). Erst wenn dieser am Replikationsursprung zusammengefügt wurde, kann der Origin aktiviert werden (Gerbi et al., 2002; Diffley, 2004). Bei der Bildung des preRC wird zunächst der hexamere ORC-Komplex

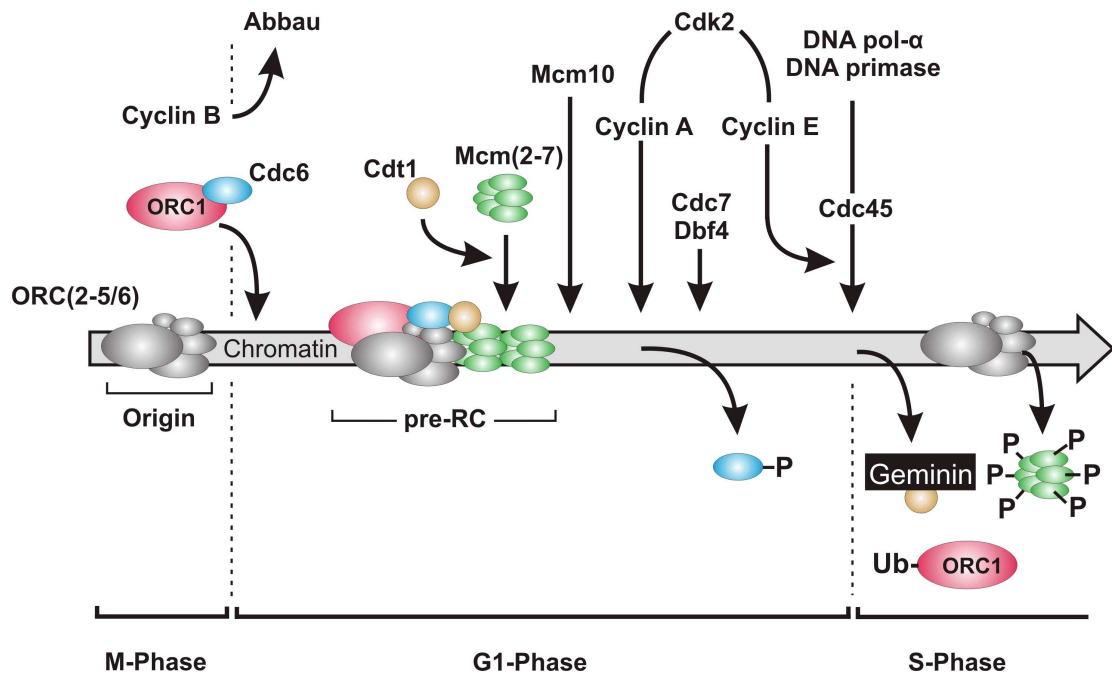


Abb. 2: Initiierung der DNA-Replikation in Metazoen (Säugetier). Schematische Darstellung der wichtigsten Proteine und des zeitlichen Ablaufs, der zur Bildung und Aktivierung des Prä-Replikationskomplexes an einem Origin führt. Cdc, *cell division cycle protein*; cdk, *cyclin-dependent kinase*; cdt1, *Cdc10-dependent transcript protein 1*; Mcm, *minichromosome maintenance protein*; ORC1, *origin recognition complex protein 1*; pre-RC, Prä-Replikationskomplex; P und Ub deuten Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen an (modifiziert nach DePamphilis, 2003).

zusammengesetzt, welcher dann als „Landeplattform“ für die weiteren preRC-Komponenten dient. Die Bildung des preRC ist eng mit dem durch zyclinabhängige Kinasen (CDKs) regulierten Zellzyklus verknüpft. Sie erfolgt gegen Ende der M-Phase, sobald die intrazelluläre Cyclin B-Konzentration sinkt (siehe Abb. 2). Dann verbinden sich in Säugern die ORC1-Untereinheit und das als ATPase fungierende Cdc6-Protein (*cell division cycle protein 6*) zu einem ORC1/Cdc6-Komplex. Dieser bindet in der frühen G1-Phase an chromatingebundene ORC(2-5)- bzw. ORC(2-6)-Subkomplexe (DePamphilis, 2003). Der gebildete ORC/Cdc6-Komplex rekrutiert Cdt1 (*Cdc10-dependent transcript protein 1*) und zahlreiche MCM[2-7]-Komplexe, die wahrscheinlich als replikative Helikase fungieren. Ein MCM[2-7]-Komplex (MCM: *minichromosome maintenance protein*) besteht aus einem heterohexameren Ring von sechs miteinander verwandten Proteinen, welche eine Sequenzhomologie zu AAA+ ATPasen aufweisen und von Archaea bis Eukarya konserviert sind (Forsburg, 2004; Maiorano et al., 2006). ORC, Cdc6, Cdt1 und MCM[2-7] bilden zusammen den Prä-Replikationskomplex (pre-RC in Abb. 2). Die Bindung von MCM[2-7]-Komplexen durch Cdt1 ist für die Aktivierung des Origins von besonderer Bedeutung, da durch diesen Schritt der Prä-Replikationskom-

plex in den Replikationskomplex umgewandelt wird. Dies kann mithilfe des kleinen Proteins Geminin verhindert werden, welches an Cdt1 bindet und dadurch die Bindung von MCM[2-7]-Komplexen verhindert (Tada, 2007). Nach MCM[2-7] bindet MCM10 an den Replikationskomplex, wodurch Cdc6 vom Chromatin abgelöst und mithilfe von Cdc7-Dbf4 und Cdk2-Cylin E durch Cdc45 ersetzt wird (DePamphilis, 2003). Cdc45 scheint eine wichtige Rolle bei der DNA-Entwindung und Etablierung der Replikationsgabeln zu spielen. Es wird vermutet, dass Cdc45 zur Rekrutierung des DNA-Einzelstrang-bindenden Proteins RPA (*Replication Protein A*) und der DNA-Polymerase- α notwendig ist. Desweiteren scheint Cdc45 zusammen mit den MCM-Komplexen und einem ringförmigen, tetrameren Proteinkomplex, „GINS“ genannt, die Funktion einer replikativen DNA-Helikase auszuüben (Walter und Newport, 2000; Tabancay und Forsburg, 2006; Gambus et al., 2006; Labib und Gambus, 2007).

Nach dem Beginn der lokalen Chromatin-Entwindung erfolgt die Rekrutierung der Replikationsmaschinerie und der Start der DNA-Synthese: Während RPA entfernt wird, synthetisiert die mit der DNA-Primase assoziierte DNA-Polymerase- α (Pol- α :Primase) einen kurzen RNA-Primer und verlängert diesen. Dies markiert den Beginn der S-Phase. Nun erfolgt ein „Polymerasen-Wechsel“, bei dem die Pol- α :Primase durch eine prozessivere DNA-Polymerase, δ oder ϵ , ersetzt wird (Garg und Burgers, 2005). Während die Synthese des DNA-Vorwärtsstranges der Helikase kontinuierlich folgt, verläuft die Synthese des DNA-Rückwärtsstranges über diskontinuierlich gebildete „Okasaki-Fragmente“ (MacNeill, 2001). Zur semikonservativen DNA-Replikation wandern die Replikationsgabeln durch das Chromatin bis zwei Replikationsgabeln aufeinander treffen und die Replikation beenden (Waga und Stillman, 1998).

1.2 Der OBR und der Lysozym-GAS41-Genlocus des Huhns

Die Lysozymendomäne des Huhns ist eines der am besten untersuchten Modellsysteme für die zellspezifische und entwicklungsabhängige Genexpression in Wirbeltieren. Innerhalb der Lysozymendomäne befinden sich zwei unterschiedlich regulierte Gene: das gewebespezifisch exprimierte Lysozymgen und das ubiquitär exprimierte GAS41-Gen. Am 3'-Ende des Lysozymgens ist ein DNA-Replikationsursprung (OBR) lokalisiert. Die wichtigsten Merkmale der Lysozymendomäne sind in Abb. 3 zusammengefasst. Die Details werden im Folgenden beschrieben.

1.2.1 Das Hühnerlysozymgen

Das Hühnerlysozymgen (Abb. 3) umfasst etwa 3,7 kbp und besteht aus drei Introns und vier Exons, welche für das 15 kDa kleine bakteriolytische Protein Lysozym kodieren (Lindenmaier et al., 1979; Nguyen-Huu et al., 1979; Jung et al., 1980). Die Lysozymexpression wird durch den Transkriptionsfaktor Myb und einem Mitglied aus der Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren, NF-M (Hühner-Homolog von C/EBP- β), reguliert (Ness et al., 1993). Lysozym wird im Huhn in den tubulären Drüsenzellen des Hühnerovidukts sowie in Makrophagen als Teil der antibakteriellen Strategie des Organismus exprimiert (Hauser et al., 1981). Die Makrophagenentwicklung vom pluripotenten Monoblasten, über Myelomonocyten und Monozyten zum ausdifferenzierten Gewebemakrophagen geht mit einer kontinuierlichen Steigerung der Lysozymexpression einher, welche am höchsten in mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierten Makrophagen ist (Huber et al., 1995). Die Steigerung der Lysozymexpression ist die Folge von komplexen Chromatin-Umstrukturierungen innerhalb der Domäne. Diese umfassen die Modifikation der Acetylierung und der Methylierung von Histonen, die Reorganisation von Nukleosomen und die Verlagerung nukleasesensitiver Bereiche (Huber et al., 1995). Durch diese Prozesse kommt es zu einer lokalen „Öffnung“ des Chromatins, was die Bindung von Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen ermöglicht (Kontaraki et al., 2000; Myers et al., 2006; Lefevre et al., 2003 und 2005).

Das Lysozymgen liegt innerhalb einer 21 - 24 kbp umfassenden Chromatindomäne, die sich durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNase I auszeichnet (Jantzen et al., 1986; Strätling et al., 1986). Desweiteren enthält die Domäne alle Regulationselemente für eine positionsunabhängige Lysozymexpression. So waren transgene Mäuse mit ektopisch im Genom integrierten Kopien des Lysozymgens in der Lage, Hühnerlysozym zu exprimieren (Bonifer et al., 1990 und 1996). In Makrophagen wird das Lysozymgen von mindestens sechs Sequenzelementen reguliert (siehe Abb. 3). Stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle befinden sich drei *Enhancer* (bei -6,1 kbp, -3,9 kbp und -2,7 kbp), ein *Silencer* (bei -2,4 kbp), ein *Hormone Response Element* (HRE, bei -1,9 kbp) sowie ein komplexer Promotor (zur Übersicht: Bonifer et al., 1997). Alle Regulatorelemente überlagern sich mit DNase-I hypersensitiven Stellen (DHS), deren Anzahl und Position entwicklungsabhängig reguliert werden (Fritton et al., 1983 und 1984). DHS sind lokale Unterbrechungen in der regelmäßigen Nukleosomenanordnung und kennzeichnen Genombereiche mit einer „offenen“ Chromatinstruktur. Da eine „Öffnung“ den Zugang von Transkriptions- und Replikationsfaktoren zum Chromatin erleichtert bzw. erst ermöglicht, überlagern sich DHS oft mit den Regulatorelementen aktiv transkri-

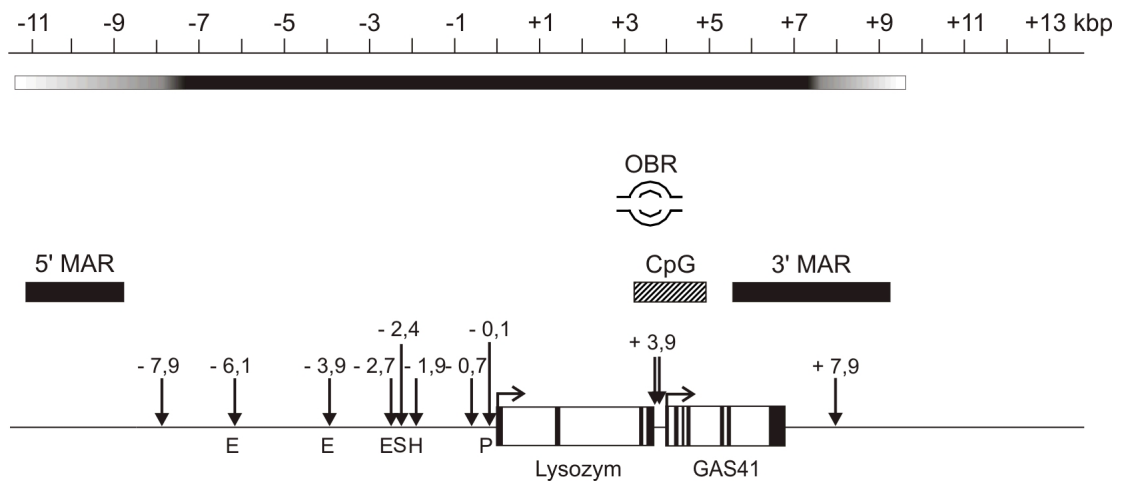


Abb. 3: Wichtige Merkmale der Lysozymgendomäne des Huhns. Der von schwarz nach weiss auslaufende Balken im oberen Bereich repräsentiert die DNase I-Empfindlichkeit der Chromatindomäne, die zu den Randbereichen hin stark abnimmt. Darunter sind die beiden MARs, der OBR und die CpG-Insel dargestellt. Horizontale Pfeile zeigen die Orientierung des Lysozym- und GAS41-Gens an. Schwarze Bereiche innerhalb der Gene markieren Exons. Vertikale Pfeile kennzeichnen DNase I-hypersensitive Stellen (DHS). Die DHS bei +3,9 besteht aus zwei Unterbereichen. Markiert sind außerdem die Positionen der drei *Enhancer*-Elemente (E), des *Silencer* (S), des *hormone response element* (H) und des Lysozymgen-Promotors (P). MAR, *matrix attachment region*; OBR, *origin of bidirectional DNA replication*.

bierter Gene. Die Lysozymgendomäne wird durch zwei Matrixanheftungsregionen (MARs) begrenzt (MAR: *matrix attachment region*; Phi van und Strätling, 1988; zur Übersicht: Bell und Felsenfeld, 1999). MARs sind AT-reiche DNA-Regionen, die mit der Kernmatrix verbunden sind (Phi van und Strätling, 1988; Blasquez et al., 1989). Da MARs häufig stromauf- und stromabwärts von regulatorischen Transkriptionseinheiten vorkommen, wird angenommen, dass MARs das Chromatin in funktionell und strukturell abgegrenzte Regionen unterteilen - und zwar in Form einer Chromatinschleife (Mirkovitch et al., 1987 und 1988). Die Hühnerlysozymgendomäne soll ebenfalls als Chromatinschleife organisiert sein, wobei die beiden MARs die Schleifenbasis bilden (Bonifer et al., 1990). Da die Lysozymgendomäne als funktionale Transkriptionseinheit betrachtet wurde, war die Entdeckung eines zweiten Gens in der Domäne, GAS41 (siehe unten), umso erstaunlicher, weil hier entgegen bisheriger Annahmen zwei unterschiedlich regulierte Gene innerhalb derselben Chromatindomäne existieren.

1.2.2 Das GAS41-Gen

Das *glioma-amplified sequence 41* (GAS41)-Gen des Huhns liegt direkt stromabwärts des Lysozymgens (Abb. 3). Es befindet sich damit vollständig innerhalb der Lysozymgendomäne (Zimmermann et al., 2002; Chong et al., 2002). Das humane GAS41-Gen wurde ursprünglich aus einer Hirntumor-Zelllinie (Glioblastoma multiforme, GBM) isoliert, in welcher das Gen stark amplifiziert und überexprimiert wird (Fischer et al., 1996). Gen-Amplifizierungen, bei denen bis zu mehrere hundert Kopien eines einzigen Gens vorliegen können, sollen eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese spielen (Murakami et al., 2000; Diesel et al., 2003; Arakawa et al., 2005). GAS41 wird häufig in Gliomas amplifiziert, einer Tumorart, die etwa 40% aller humanen Zentralnervensystemtumore ausmacht (Sehgal, 1998; Kleihues, 1995; Fischer et al., 1997 und 2008).

Das Hühner-GAS41-Gen (cGAS41) umfasst etwa 2,7 kbp mit sechs Introns und sieben Exons, die für ein aus 223 oder 227 Aminosäuren bestehendes, rund 30 kDa großes GAS41-Protein kodieren. Das GAS41-Protein ist von der Hefe bis zum Mensch hoch konserviert. Die Aminosäuresequenz ist zwischen Mensch und Maus zu etwa 96% identisch (Chong et al., 2002; Harborth et al., 2000; Munnia et al., 2001). Die Lage des GAS41-Gens in Relation zum Lysozymgen ist ebenfalls konserviert und bei Mensch, Maus und Huhn gleich (Braas et al., 2004). Die biologische Funktion des GAS41-Proteins ist noch unklar. Das GAS41-Protein zeigt Homologien zu den humanen Transkriptionsfaktoren AF-9 und ENL (jeweils 39% Identität und 63% Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz; Fischer et al., 1997). Es besitzt im C-Terminus eine potentielle α -helikale, azide Aktivierungsdomäne, wie sie in vielen eukaryontischen Transkriptionsfaktoren vorkommt (Mitchell und Tjian, 1989). Da eine potentielle DNA-Bindedomäne fehlt, wird vermutet, dass GAS41 ein unvollständiger Transkriptionsfaktor ist (Munnia et al., 2001). GAS41 interagiert mit dem *Nuclear Mitotic Apparatus* (NuMA)-Protein, das in der Interphase ein wichtiger Bestandteil der Kernmatrix und für die Mitose von zentraler Bedeutung ist (Harborth et al., 2000; Luderus et al., 1994). Im Gegensatz zum zellspezifisch exprimierten Lysozym wird das GAS41-Protein im Menschen sowie im Huhn ubiquitär exprimiert. cGAS41 ist ein direktes Zielgen des retroviralen Onkoproteins v-Myb. v-Myb bindet an spezifische Bindestellen innerhalb des GAS41-Promotors, wodurch die GAS41-Transkription aktiviert wird (Braas et al., 2004). Durch Deletion von cGAS41 in DT40-Hühnerlymphozyten wurde gezeigt, dass cGAS41 für die Lebensfähigkeit der Zelle essentiell ist und eine zentrale Rolle bei der RNA-Synthese spielt (Zimmermann et al., 2002).

1.2.3 Der OBR im Lysozym-GAS41-Genlocus

Der im Lysozym-GAS41-Genlocus des Huhns vorkommende Replikationsursprung (OBR) wurde ursprünglich als primäre Replikationsstartstelle innerhalb einer rund 20 kbp breiten Initiationszone identifiziert (Phi van et al., 1998; Phi van und Strätling, 1999). An dieser Replikationsstartstelle finden Initiationsereignisse etwa 17-mal häufiger als in Kontrollregionen stromaufwärts des Lysozymgens statt (Phi van und Strätling, 1999). Der OBR liegt innerhalb eines engen, etwa 300 bp umfassenden Bereiches zwischen dem 3'-Ende des Lysozymgens und dem nur etwa 250 bp stromabwärts angrenzenden GAS41-Gen (siehe Abb. 3). Daher überlagert sich der OBR mit dem GAS41-Promotor. Der Bereich des OBR / GAS41-Promotors überlagert sich zudem mit einer etwa 1,8 kbp umfassenden „CpG-Insel“ (Phi van und Strätling, 1999). CpG-Inseln sind kurze (0,5 - 2 kbp) DNA-Bereiche mit überdurchschnittlich hoher (~65%) CpG-Dinukleotiddichte (CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanosin) sowie fehlender Methylierung (Bird et al., 1985; Bird, 1986; Antequera et al., 1989; Antequera, 2003). Die CpG-Insel der Lysozymgendomäne enthält 66% GC und ist im zentralen Teil, welcher den OBR enthält, ebenfalls nicht methyliert (Phi van und Strätling, 1999). Im Gegensatz dazu ist der Großteil der genomischen DNA GC-arm (\varnothing 40% GC) und an den Cytosinen der CpG-Dinukleotide stark methyliert.

Obwohl CpG-Inseln nur 1 - 2% der gesamten DNA ausmachen (Antequera und Bird, 1993 und 1999; Antequera, 2003), sind sie mit den Promotoren bzw. 5'-Regionen von ~60% aller humanen Gene, darunter aller *housekeeping*-Gene sowie mit ~40% der gewebespezifischen Gene, assoziiert (Larsen et al., 1992). Mit Promotoren assoziierte CpG-Inseln enthalten daher häufig Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Zudem sind CpG-Inseln oft mit Replikationsursprüngen assoziiert. In Säugern wurden zahlreiche Origins entweder in der Nähe oder innerhalb von CpG-Inseln gefunden (Delgado et al., 1998; Rivella et al., 1999, Cohen et al., 2002). Die Überlagerung von CpG-Inseln mit Promotoren und Origins impliziert, dass CpG-Inseln sowohl als Startstellen für die Transkription als auch für die Replikation fungieren (Delgado et al., 1998). Dafür spricht die „offene“ Chromatinorganisation innerhalb der CpG-Inseln, welche durch das Fehlen des Histons H1, der Hyperacetylierung der Histone H3 und H4, dem Vorkommen nukleosomenfreier Bereiche und einer erhöhten Nuklease-Empfindlichkeit charakterisiert ist (Tazi und Bird, 1990; Gilbert und Sharp, 1999).

Der Lysozym-GAS41-OBR überlagert sich aber nicht nur mit einer CpG-Insel und dem GAS41-Promotor, sondern auch mit einer DNase I-hypersensitiven Stelle (DHS). Diese besteht aus zwei etwa 100 bp auseinanderliegenden Unterbereichen (siehe Abb. 3). Kürzlich wur-

de gezeigt, dass in der Hühnermyelomonozytenzelllinie HD11 die Zugänglichkeit des Lysozym-GAS41-OBRs für DNase I im Verlauf des Zellzykluses schwankt und in der G1-Phase am höchsten ist (Zimmermann et al., 2007). Da die GAS41-mRNA-Expression während des Zellzykluses gleich blieb, wurde vermutet, dass die Veränderung der Chromatinstruktur im Bereich des OBR / GAS41-Promotors auf die Replikationsaktivität des OBRs zurückzuführen ist. Die beschriebenen Merkmale deuten darauf hin, dass der Lysozym-GAS41-OBR innerhalb einer Chromatinregion liegt, deren Struktur den Replikations- und Transkriptionsfaktoren einen leichteren Zugang zum OBR bzw. GAS41-Promotor ermöglicht.

2 Ziel der Arbeit

Es gilt als erwiesen, dass DNA-Replikationsursprünge in multizellulären Eukaryonten keine Konsensusbindungssequenzen für den ORC-Komplex enthalten, so dass man davon ausgeht, dass ORC-Komplexe sequenzunabhängig an DNA binden. Daher müssen zusätzliche Regulationsfaktoren existieren, welche ORC-Komplexe zum Origin „leiten“. Bei einigen DNA-Viren sind neben dem ORC-Komplex auch Transkriptionsfaktoren wie Oct-1, NF1 und Sp1 für die Initiation der Virus-Replikation notwendig. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Replikations- und Transkriptionsfaktoren, die mit dem Lysozym-GAS41-OBR des Huhns interagieren und für die Initiation der DNA-Replikation essentiell sind, zu identifizieren. Um dies zu erreichen, sollten zunächst die DNA-Bindestellen für Initiationsproteine des Lysozym-GAS41-OBRs identifiziert werden. Dies sollte mithilfe von *in vitro*-Gelretardationsexperimenten (*EMSA* und *Immunomobility Shift-Assays*) erfolgen. Im Anschluss daran sollten mögliche Protein-DNA-Interaktionen zwischen den identifizierten Initiationsproteinen und dem Lysozym-GAS41-OBR *in vivo* untersucht werden, was mithilfe der Chromatin-Immunpräzipitations-Technik (*ChIP*) und in Verbindung mit quantitativen *Real-Time PCR*-Analysen realisiert werden sollte. Um eine mögliche Involvierung von Transkriptionsfaktoren bei der Initiation der DNA-Replikation am OBR untersuchen zu können, war desweiteren geplant, Transfektionsexperimente mit DT40-Hühnerlymphozytenzellen durchzuführen, um entsprechende Transkriptionsfaktorbindestellen durch homologe Rekombination zu deletieren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme und Zelllinien.

Stamm/Zelllinie	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
BL21(DE3)pLysS	cam ^R ; B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal</i> , λ(DE3) [pLysS cam ^R], Expressionsstamm	Novagen/Merck, Darmstadt
BL21(DE3)pLysS (pETOrc2)	cam ^R , amp ^R , enthält cORC2-Expressionsvektor pETOrc2	diese Arbeit
DH5α	F ⁻ , φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Klonierungsstamm	Hanahan, 1983
Zelllinien		
HD11	mit Geflügelleukämie-Retrovirus (ALV) MC29 transformierte Hühnermyelomonocytenzelllinie	Beug et al., 1979
Hep G2	humane Leberkarzinomzelllinie (ATCC HB-8065) (Hepatozytenzelllinie)	ATCC
DT40	mit Geflügelleukämie-Retrovirus (ALV) MC29 transformierte Hühnerlymphozyten-(B)-Zelllinie (ATCC CRL-211)	ATCC
DT40-13#94	zeo ^R ; enthält GAS41-Expressionsvektor CMV-gas	diese Arbeit
DT40 Z3#4.1	zeo ^R , neo ^R ; enthält GAS41-Expressionsvektor CMV-gas	Zimmermann et al., 2002
DU249	mit Geflügelleukämie-Retrovirus (ALV) MC29 transformierte Hühnerhepatozytenzelllinie	Langlois et al., 1974

3.1.2 Kulturmedien und Medienzusätze

Zur Kultivierung von *E. coli* und der eukaryontischen Zelllinien wurden verschiedene Kulturmedien (Tab. 3) verwendet. Diese wurden bei Bedarf mit Antibiotika und anderen Zusätzen supplementiert (Tab. 4). Die Prozentangaben beziehen sich auf Volumenprozent (v/v).

Tabelle 3: Medien für die Bakterien- und Zellkultur.

Medium	Zusammensetzung
Bakterienkultur	
LB-Medium (-Agar):	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; (15 g/l Agar). Den pH-Wert 7,0 mit 5 M NaOH einstellen, autoklavieren.
2xYT-Medium (-Agar):	16 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; (15 g/l Agar). Den pH-Wert 7,0 mit 5 M NaOH einstellen, autoklavieren.
SOB-Medium:	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 5 ml/l; 0,5 M KCl. Den pH-Wert 7,0 mit 5 M NaOH einstellen. Mit dest. H ₂ O auf 980 ml auffüllen, autoklavieren. Dann 10 ml steriles 1 M MgCl ₂ und 10 ml steriles 1 M MgSO ₄ zugeben.
SOC-Medium:	SOB-Medium, 40 mM sterile Glucose.
Zellkultur	
Iscove's-Vollmedium:	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM); 8% fötales Kälberserum; 2% Hühnerserum; 100 Einheiten/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin
Dulbecco's-Vollmedium:	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); 10% fötales Kälberserum; 100 Einheiten/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin
DT40-Vollmedium:	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM); 10% fötales Kälberserum; 5% Hühnerserum; 100 Einheiten/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 0,1 mM β-Mercaptoethanol
DT40-Einfriermedium:	DT40-Vollmedium; 6% fötales Kälberserum; 10% DMSO

Tabelle 4: Medienzusätze.

Zusatz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	25 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml	34 µg/ml
G418 (Geneticin)	200 mg/ml	2 mg/ml bzw. 1 mg/ml
IPTG	100 mM	1 mM
Puromycin	1 mg/ml	0,5 µg/ml
Zeocin	100 mg/ml	1 mg/ml bzw. 0,75 mg/ml

3.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen Applied Biosystems (Darmstadt) und MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle 5: Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')
EMSA	
OligoA	GGCCGCTTTGCGAGCGCGACGCTAC
OligoA'	GTAGCGTCGCGCTCGCAAAGCGGCC
OligoB	CCGCTTGGCAGTTTTAAACGCATCC
OligoB'	GGATGCGTTTTAAACTGCCAAGCGG
OligoC	CCTCATTAACGACTATACGCAAACG
OligoC'	CGTTTGGCTATAGTCGTTTTAATGAGG
OligoBC	GCTTGGCAGTTTTAAACGCATCCCTCATTAACGACTATACGCAAACGC
OligoBC'	GGCGTTTGGCTATAGTCGTTTTAATGAGGGATGCGTTTTAAACTGCCAAG
OligoD	CCTTCCCGTCGGTCCGCGTCTCTTTCCGCCGCCA
OligoD'	TGGCGGCGGAAAGAGACGCGGACCGACGGGAAGG
OligoE	GTCTCTTGAACATATTGCACCGGAG
OligoE'	GCTCCGGTGCAATATGTTCAAGAGA
OligoF	GGAGGGCGGGAAGGGGGCCGGGCGGGAG („GC-Boxen“)
OligoF'	CTCCCGCCCGGCCCTTCCCGCCCTCC („GC-Boxen“)
OligoOct1	CTGGGTAATTTGCATTTCTA („Octamer-Motiv“)
OligoOct1'	TAGAAATGCAAATTACCCAG („Octamer-Motiv“)
Standard PCR	
Orc2-for	TCTGTTCTCAACCATATGACAGAG (<i>Nde</i> I, ATG Startcodon)
Orc2-rev	TTTGGGAACAGGGATCCGTTATAT (<i>Bam</i> HI, TTA Stopcodon)
Real-Time PCR	
qPri-13kb_for	CAGCATGGGAGCTTGTCTGA
qPri-13kb_rev	CATCCATTTCTGACATTTTGC
qPri-1,7kb_for	GCAGCAGAGGTCAGAGTAACCA
qPri-1,7kb_rev	TGCTGGACACAGGCTGATGA
qPri_OBR_for	ACCCGCTTGGCAGTTTTAAA
qPri_OBR_rev	GGGAAGGCGTTTGGCTATAG
qPri+1,7kb_for	CAGCTGACACTTGGTGCTTACAA
qPri+1,7kb_rev	CGGCGAAGGTATCCTCATTTT
qPri+13kb_for	CCATACAACGATCCCCACAGA
qPri+13kb_rev	TGAAAGGGAAGATGGAATGGA
Adapter	
BglII-Adapter (for)	GGGCAGATCTAGAGCCCGCC
BglII-Adapter (rev)	GGGCTCTAGATCTGCCCTGG

3.1.4 Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Beschreibung	Größe [kbp]	Referenz
CMV-gas	zeo ^R ; GAS41-Expressionsvektor	5,8	Zimmermann et al., 2002
CI-196/5	zur Herstellung der Sonde HB	k.A.	Phi van, pers. Mitteilung
pBluescript II SK+	amp ^R ; Klonierungsvektor	3,0	Stratagene, Heidelberg
pBS-H9ΔSp1H10	amp ^R ; enthält H9H10-Fragment ohne Sp1-Binde- region	6,0	diese Arbeit
pBS-HΔSp1-neo	amp ^R , neo ^R ; enthält H9ΔSp1H10-Fragment und das Neomycin-Phosphotransferasegen (<i>neo</i>) mit β -Actin-Promotor	8,3	diese Arbeit
pBS-H9ΔSp1H10- puro	amp ^R , puro ^R ; enthält H9ΔSp1H10-Fragment und das Puromycin-N-Acetyltransferasegen (<i>pu- ro</i>) mit β -Actin-Promotor	8,4	diese Arbeit
pBS-S4S5	amp ^R ; enthält ein \sim 2,5 kbp- <i>SacI</i> -Fragment aus dem Hühnerlysozymgenlocus	5,5	Phi van, pers. Mitteilung
pBSΔSp1-neo	amp ^R , neo ^R ; Targeting-Plasmid, enthält Frag- mente S4S5, H9ΔSp1H10 und die β -Actin-neo ^R - Resistenzkassette	10,7	diese Arbeit
pBSΔSp1-puro	amp ^R , puro ^R ; Targeting-Plasmid, enthält Frag- mente S4S5, H9ΔSp1H10 und die β -Actin- Puro ^R -Resistenzkassette	\sim 10,6	diese Arbeit
pET-16b	amp ^R , Expressionsvektor	5,71	Novagen, Darmstadt
pETOrc2	amp ^R , cORC2-Expressionsvektor mit \sim 700 bp PCR- Fragment aus C-Terminus der cORC2- cDNA	\sim 6,4	diese Arbeit
riken1_17f11	amp ^R , enthält die vollständige cORC2-cDNA	k.A.	Caldwell et al., 2004

k.A.: keine Angabe

3.1.5 Enzyme

Tabelle 7: Verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Bezugsquelle
DNase I aus Rinderpankreas	Roche, Mannheim
Lysozym aus Hühnereiweiss	Roche, Mannheim
PfuUltra High-Fidelity DNA-Polymerase (2,5 u/ μ l)	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen:	
<i>Bam</i> HI (10 u/ μ l)	Roche, Mannheim
<i>Bgl</i> II (10 u/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Hind</i> III (10 u/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Kpn</i> I (10 u/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Nde</i> I (10 u/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Sac</i> I (10 u/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Sca</i> I (10 u/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Xba</i> I (10 u/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Xho</i> I (10 u/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Rot
RNase A	Roche, Mannheim
SAP (Shrimp alkalische Phosphatase, 1u/ μ l)	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase (1 u/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Rot
T4 Polynukleotidkinase (10 u/ μ l)	Fermentas, St.Leon-Rot

3.1.6 Radiochemikalien

Tabelle 8: Verwendete Radiochemikalien.

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
γ - ³² P-Adenosintriphosphat (ATP)	3000 Ci/mmol	GE Healthcare, München
α - ³² P-Desoxycytosintriphosphat (dCTP)	3000 Ci/mmol	GE Healthcare, München

3.1.7 Antikörper und Antiseren

Tabelle 9: Verwendete polyklonale Antikörper und Antiseren.

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
HRP-Antikörper	Meerrettichperoxidase-gekoppelt, goat anti-rabbit; 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Santa Cruz, Heidelberg
IgG, unspezifisch	aus Kaninchenblutserum, affinitätsgereinigt	diese Arbeit
α -cGAS41-Antiserum	rabbit anti-chicken	K. Ahrens, pers. Mitteil.
α -hNF1-Antikörper	rabbit anti-human; 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Santa Cruz, Heidelberg
α -hOct-1-Antikörper	rabbit anti-human; 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	dianova, Hamburg
α -cORC2-Antikörper	rabbit anti-chicken; aus Kaninchenblutserum, affinitätsgereinigt, $\sim 10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$	diese Arbeit
α -hORC2-Antiserum	rabbit anti-human	BD Pharmingen, Heidelberg
α -hORC2-Antikörper	rabbit anti-human	Prof. R. Knippers, Univ. Konstanz, pers. Mitteil.
α -hSp1-Antikörper	rabbit anti-human; 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	abcam, Cambridge, UK

3.1.8 Reagenziensysteme (Kits)

Tabelle 10: Verwendete Reagenziensysteme (Kits).

Produkt	Hersteller
DC Protein Assay	Bio-Rad, München
EasyPure DNA Purification Kit	Biozym Diagnostic, Hess. Oldendorf
ECL Western Blotting System	GE Healthcare, München
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma, Deisenhofen
PROTEUS Protein A Mini Antibody Purification Kit	Serva, Heidelberg
PROTEUS Protein A Midi Antibody Purification Kit	Serva, Heidelberg
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega, Mannheim

3.1.9 Marker

Tabelle 11: DNA-Marker und Protein-Molekulargewichtstandard

Bezeichnung	Hersteller
100bp DNA Ladder Fragmente in bp: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2072	Invitrogen, Karlsruhe
λ-DNA / <i>HindIII</i>-Marker Fragmente in bp: 125 , 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130	eigene Herstellung
Precision Plus Protein Dual Color Standard Banden in kDa: 10, 15, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250	Bio-Rad, München
Protein Standard I 1,2 mg/ml; für die Protein-Konzentrationsbestimmung	Bio-Rad, München

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden bei absoluter Luftfeuchtigkeit unter folgenden Bedingungen kultiviert: Die adhärenenten Hühnerzelllinien HD11 und DU249 wurden in Iscove's-Vollmedium, die humane Zelllinie Hep G2 in Dulbecco's-Vollmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Kultur der in Suspension wachsenden Zelllinie DT40 und ihrer Derivate erfolgte in DT40-Vollmedium bei 41°C und 6% CO₂. Die Generationszeit von HD11-, Hep G2- und DU249-Zellen betrug etwa 24 h, die von DT40-Zellen etwa 12 h. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Zelllinien in 250 ml-Kulturflaschen und 20 ml Medium kultiviert.

3.2.2 Passagieren von Zellen

Zum Erhalt der Zelldauerkulturen wurde die Zellzahl regelmäßig reduziert und das Medium erneuert. Die Zellzahlreduktion erfolgte bei adhärenenten Zelllinien alle 2-3 Tage, bei Suspensionszellen jeden Tag. Kulturflaschen wurden wöchentlich erneuert. Zum Passagieren adhärenenter Zelllinien wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 10 ml warmen PBS-Puffer (pH 7,2) gewaschen und nach Absaugen des PBS mit 2 ml warmer Trypsin-EDTA-Lösung versetzt. Die Kulturflasche wurde 2-4 min im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Zum Stoppen der Reaktion wurde 10 ml warmes Kulturmedium zugefügt und die Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugengefäß überführt. Nach der Zentrifugation (5 min, 1000 U/min, Zentrifuge Hermle mit Ausschwingrotor) wurden das Zellpellet in 20 ml Medium resuspendiert. Sollte für Versuche eine definierte Zellzahl ausgesät werden, wurde nun die Zellzahl mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Zur einfachen Weiterkultur wurden 2-2,5 ml Zellsuspension ($\sim 8 - 10 \times 10^6$) in die Kulturflasche gegeben und mit dem entsprechenden Medium auf 20 ml ergänzt. Zum Passagieren der Suspensionszelllinie DT40 wurde die Kultur gut durchmischt und die Zellzahl bestimmt. Das entsprechende Zellsuspensionsvolumen ($\sim 0,8 - 10,0 \times 10^6$ Zellen) wurde in die Kulturflasche gegeben mit Medium auf 20 ml ergänzt.

3.2.3 Cryokonservierung und Auftauen von DT40-Zellen

Zur Cryokonservierung wurden 10^7 DT40-Zellen zentrifugiert (8 min, 1000 U/min, Zentrifuge Hermle), das Pellet in 1 ml DT40-Einfriermedium resuspendiert und in ein 2 ml-Cryogefäß überführt. Das Gefäß wurde in einer mit Eis gefüllten Styroporkiste mit geschlossenem Deckel

bei -80°C über Nacht eingefroren. Die Zellen wurden bei -80°C gelagert und zur Revitalisierung etwa alle 6 Monate wieder in Kultur gebracht. Zum Auftauen der Zellen wurde das Cryogefäß im warmen Wasser angetaut und die gefrorenen Zellen in 5 ml vorgewärmtes Medium überführt. Die Zellen wurden erst in 50 ml-Kulturflaschen kultiviert. Gegebenenfalls benötigte Antibiotika wurden erst nach 24 h zugegeben.

3.2.4 Präparation von Kernextrakten (nach Schreiber et. al., 1989)

Proteinextrakte aus Zellkernen (Kernextrakte) wurden aus HD11-, DU249- und Hep G2-Zellen wie folgt präpariert: Pro \varnothing 94 mm Zellkulturschale wurden 8 - 10×10^7 HD11- bzw. 5×10^6 Hep G2- oder DU249-Zellen in je 10 ml Medium ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Schalen sollten vor der Präparation nur zu 90 - 95% bewachsen sein. Die folgenden Arbeiten erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C . Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen 2x mit je 10 ml eiskaltem PBS (pH 7,2) gewaschen, mit einem Gummiwischer in 1 ml PBS abgeschabt und in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Nach kurzem Zentrifugieren (10 Sek, 12000 U/min, Tischzentrifuge) wurden die Überstände verworfen und jedes Zellpellet in 1 ml eiskaltem, hypotonischen Puffer A homogen suspendiert. Die Zellen wurden zum Quellen 15 min auf Eis inkubiert und durch Zugabe von $63 \mu\text{l}$ 10% Nonidet P40 und 10-sekündigem Mischen auf dem Vortex lysiert. Um die freigesetzten Zellkerne vom zytosolischen Überstand zu trennen, wurde die Probe zentrifugiert (30 Sek, 12000 U/min) und der Überstand verworfen. Das Zellkernpellet wurde mit 100 - $150 \mu\text{l}$ eiskaltem Puffer B versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurde die Probe häufig auf dem Vortex gemischt und abschließend zentrifugiert (20 min, 12000 U/min, 4°C). Der kernproteinhaltige Überstand wurde abgenommen und nach einer Konzentrationsbestimmung in 15 - $20 \mu\text{l}$ Aliquots bei -80°C gelagert.

3.2.5 Präparation von Zellextrakten (Gesamtprotein)

10×10^6 abzentrifugierte Zellen (7 min, 1500 U/min, Zentrifuge Hermle) wurden mit 10 ml PBS (pH 7,2) gewaschen, mit 1 ml PBS in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und nach erneuter Zentrifugation (1 min, 12000 U/min) in $50 \mu\text{l}$ 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Probe wurde mit Ultraschall behandelt (12x 10 Sek/5 Sek Pause; *timer: hold, duty cycle: constant, output: 7, 2°C , Branson Sonifier 450*), bis sie nicht mehr zähflüssig war und dann in $5 \mu\text{l}$ -Aliquots bei -80°C gelagert. Für das SDS-PAGE-Gel wurden $4 \mu\text{l}$ Zellextrakt mit $16 \mu\text{l}$ 1x SDS-Probenpuffer vermischt, 5 min bei 97°C erhitzt und davon $5 \mu\text{l}$ pro Geltasche aufgetragen.

3.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe erfolgte mit dem *DC Protein Assay* anhand des Protokolls für Mikrotiterplatten im Herstellerhandbuch. Für alle Proteinmessungen wurde Reagenz S (im Kit) zugefügt. Für die Erstellung einer Eichreihe mit 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 und 1,2 mg/ml Rinder- γ -Globulin wurde der *Protein Standard I* (1,2 mg/ml) mit H₂O verdünnt und zusammen mit den Proben (2x 5 μ l) auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte bei 660 nm Wellenlänge in einem Spektrophotometer für Mikrotiterplatten. Anschließend wurde die Proteinkonzentration anhand der ausgedruckten Werte und unter Einbeziehung des Probenverdünnungsfaktors berechnet.

3.2.7 Bakterienkultur

E. coli-Bakterien wurden in LB-Medium, SOB-Medium oder 2xYT-Medium kultiviert. Agarplatten enthielten 15 g/l Agar-Agar. Bei Bedarf wurde den Flüssig- bzw. Festmedien 100 μ g/ml Ampicillin bzw. 34 μ g/ml Chloramphenicol als Selektionszusatz zugegeben. Übernachtskulturen wurden im Schüttelinkubator bei 37°C und 180 U/min inkubiert. Bakterienstammkulturen wurden durch Mischen von 0,5 ml Bakterienkultur und 0,5 ml sterilem 30%igem (v/v) Glycerinmix hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.8 Herstellung transformationskompetenter *E.coli*-Zellen

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mit der CaCl₂- oder TFB/DnD-Methode. Letztere ermöglicht eine höhere Transformationshäufigkeit. Die so hergestellten kompetenten Bakterienzellen wurden für jede Transformation frisch hergestellt und sofort verwendet.

Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen mit CaCl₂: Am Vortag wurde der zu transformierende *E. coli*-Stamm auf einer 2xYT-Agarplatte ausgestrichen und diese bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit einigen Bakterienkolonien dieses Verdünnungsausstrichs wurden 20 ml 2xYT-Medium angeimpft und die Kultur bei 37°C und 210 U/min bis zu einer optischen Dichte OD_{550nm} \simeq 0,4 inkubiert. Nach 10-minütigem Abkühlen auf Eis wurden 12 ml Kultur 10 min bei 1800 U/min und 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R), der Überstand abgegossen und das Bakterienpellet in 12 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach weiteren 30 min auf Eis wurde die Suspension nochmals 10 min bei 2000 U/min und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 600 μ l eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung durch leichtes Schütteln homogen resuspendiert. Bis zur anschließenden Transformation wurden die Zellen auf Eis gestellt.

Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen mit TFB/DnD: Wie bei der CaCl_2 -Methode wurde ein Verdünnungsausstrich des zu transformierenden *E. coli*-Stammes hergestellt und dieser zum Animpfen von 25 ml SOB-Medium verwendet. Nach Erreichen einer $\text{OD}_{550\text{nm}}$ von 0,4 - 0,45 (2,5 - 3 h) wurde das Bakterienwachstum durch 15-minütige Inkubation auf Eis gestoppt und 18 ml Kultur 12 min bei 2000 U/min, 4°C pelletiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet in 6 ml eiskaltem Transformationspuffer (TFB) vollständig suspendiert. Nach 15 min auf Eis wurde die Suspension nochmals zentrifugiert und das Bakterienpellet in 0,5 ml TFB durch leichtes Schütteln homogen resuspendiert. Das Volumen der Bakteriensuspension wurde vorsichtig mit einer Pipette bestimmt und auf 1,4 ml mit TFB ergänzt. Anschließend wurden 49 μl DnD tropfenweise unter leichtem Schwenken zugefügt und die Zellen 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden nochmals 49 μl DnD zugegeben und die Zellen weitere 15 min auf Eis inkubiert. Bis zur direkt nachfolgenden Transformation wurden die Zellen auf Eis gestellt.

3.2.9 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock

Die Aufnahme von Plasmid-DNA in Bakterienzellen (Transformation) erfolgte mittels Hitzeschock im Wasserbad. In einem 1,5 ml Eppendorfgefäß wurden 200 μl frisch hergestellte, transformationskompetente *E. coli*-Zellen mit 4 μl eines 10 μl Ligationsansatzes (Kap. 3.2.13) oder 50 ng Plasmid-DNA vorsichtig verrührt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 37°C für 5 min (CaCl_2 -kompetente Zellen) bzw. bei 42°C für 90 Sek (TFB/DnD-kompetente Zellen). Die Zellen wurden 1-2 min auf Eis abgekühlt und zur Regeneration und Ausbildung der erworbenen Antibiotikumresistenz mit 800 μl raumwarmem SOC-Medium 45 min bei 37°C inkubiert und dabei gelegentlich gemischt. Zur Selektion antibiotikumresistenter Klone wurde der Ansatz auf 4 LB-Agarplatten à 250 μl mit entsprechendem Antibiotikumzusatz ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.2.10 Plasmidpräparation aus *E. coli*-Zellen

Je nach gewünschter Plasmid-Ausbeute wurden Plasmid-Isolationen im kleinen (Mini), mittleren (Midi) oder großen (Maxi) Maßstab durchgeführt. Sämtliche Plasmidpräparationen basieren auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979).

Mini-Plasmidpräparation: Von Transformationsagarplatten wurden einzelne antibiotikumresistente Bakterienkolonien in Kulturröhrchen mit je 2 ml LB-Medium und entsprechendem Antibiotikumzusatz überimpft und über Nacht bei 37°C und 180 U/min kultiviert. Von der

Übernachtskultur wurde 1 ml kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge), das Zellpellet in 100 μl Lösung I vollständig resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur Zelllyse wurden 200 μl Lösung II zugegeben und das Gefäß mehrmals invertiert, bis die Probe vollständig klar wurde. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden die im Lysat befindlichen Zellproteine und die chromosomale DNA mit 150 μl eiskalter Lösung III und kräftigem Schütteln gefällt. Die Probe wurde 5 min auf Eis inkubiert und zur Trennung der Plasmid-DNA vom Präzipitat 10 min bei 12000 U/min zentrifugiert. 400 μl des Überstandes wurden in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, auf RT gebracht und mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gut gemischt. Es wurde 5 min bei 12000 U/min zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde erneut in ein frisches Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 850 μl absolutem Ethanol gefällt (5 min, RT). Der Ansatz wurde 5 min mit 12000 U/min zentrifugiert und das DNA-Pellet 1x mit 1 ml 80% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde 10 min im Exsikkator getrocknet und in 100 μl TE (pH 7,5) aufgenommen. Zur Kontrolle wurden 3 μl Plasmid-DNA mit 5 - 10 Einheiten Restriktionsenzym und 0,5 μl 1 mg/ml RNase A 3 h bei 37°C inkubiert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Mini-Plasmidpräparation mit dem Kit: Für schnelle Mini-Plasmidpräparationen wurde 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur mit dem *GenElute Plasmid Miniprep Kit* nach Angaben des Herstellers präpariert. Die Plasmid-DNA wurde mit 100 μl des mitgelieferten Elutionspuffers von der Säule eluiert.

Midi-Plasmidpräparation: Für Präparationen bis zu 100 μg Plasmid-DNA wurde der *QIAGEN Plasmid Midi Kit* verwendet. Hierfür wurden in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben 30 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikumzusatz mit 5 - 10 μl einer Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C und 180 U/min über Nacht inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben präpariert. Das DNA-Pellet wurde in 50 - 100 μl TE (pH 7,5) aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt.

Maxi-Plasmidpräparation: Für bis zu 500 μg bakterielle Plasmid-DNA wurde der *Endo-free Plasmid Maxi Kit* verwendet. In einem 1-L-Erlenmeyerkolben wurden 100 - 250 ml LB-Medium und entsprechendem Antibiotikumzusatz mit 20 μl einer Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 U/min inkubiert. Die nach Anweisung des Kit-Herstellers isoliert Plasmid-DNA wurde in 300 - 500 μl des mitgelieferten TE-Puffers aufgenommen und die DNA-Konzentration bestimmt.

3.2.11 DNA-Restriktion

Die enzymatische Spaltung von DNA (DNA-Restriktion) erfolgte mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Roche Diagnostics (Mannheim) und Fermentas (St.Leon-Rot) in den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Enzympuffern. Qualitative Plasmid-Restriktionen erfolgten in einem Ansatzvolumen von 15 μl mit 0,3 - 0,5 μg DNA und 10 Einheiten Enzym in Einzelverdauungen bzw. 5 Einheiten pro Enzym in Doppelverdauungen jeweils für 3 - 4 Stunden bei 37°C. Für quantitative DNA-Restriktionen wurden pro Mikrogramm eingesetzter DNA 10 - 15 μl Ansatzvolumen und 10 Einheiten Enzym berechnet. Die Inkubationsdauer betrug 3 - 5 Stunden bei 37°C. Nach der Verdauung wurden die Restriktionsprodukte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Restriktionen von genomischer DNA für *Southern Blot*-Analysen erfolgten in einem Ansatzvolumen von 100 μl mit 10 μg DNA und je 40 Einheiten Enzym in Doppelverdauungen für etwa 5 - 6 h bei 37°C.

3.2.12 DNA-Dephosphorylierung

Um Selbstligationen kompatibler DNA-Fragmentenden in Ligationsreaktionen zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatgruppen geschnittener Vektoren mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP) entfernt. Dazu wurde zunächst das Restriktionsenzym nach dem Verdau laut Herstellerangaben hitzeinaktiviert und der Ansatz mit 1/10 Volumen SAP-Puffer versetzt. Pro Mikrogramm DNA wurde 1 Einheit Enzym zugegeben und der Ansatz 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Dephosphorylierung erfolgte eine Aufreinigung der DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion oder durch Agarosegelelektrophorese.

3.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten (Ligation) erfolgte in Ligationsreaktionen mit 10 μl Ansatzvolumen in 1 x Ligationspuffer und 1 Einheit T4 DNA Ligase bei 4°C über Nacht. Zur Ligation wurden mindestens 50 ng Vektor-DNA und 3 - 5 x mehr freie Enden des zu ligierenden DNA-Inserts eingesetzt. Anschließend wurde der Ligationsansatz in *E. coli*-Zellen transformiert.

3.2.14 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Zur Entfernung von Proteinen, Salzen oder anderen Verunreinigungen aus DNA-haltigen Lösungen wurden Phenol/Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Kleine Ansatzvolumen wurden mit TE-Puffer (pH 7,5) auf mindestens 250 μl ergänzt, dann mit 1 Ausgangsvolumen

raumwarmen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (P/C/I) (25:24:1) versetzt und die Probe mit dem Vortex gemischt. Zur Phasentrennung wurde die Probe zentrifugiert (5 - 10 min, 12000 U/min, RT, Tischzentrifuge) und die obere, DNA-haltige Phase unter Vermeidung der proteinhaltigen Interphase in ein frisches Gefäß überführt. Um Phenolreste zu entfernen wurde die Probe nochmals mit 1 Volumen P/C (24:1) wie oben extrahiert und zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein frisches Gefäß überführt und die DNA mit Ethanol gefällt (siehe Kap. 3.2.15). Chromosomale DNA für *Southern Blot*-Analysen wurde 2x mit P/C/I und 1x mit C/I extrahiert, wobei zum Mischen nur kräftig geschüttelt, nicht aber der Vortex verwendet wurde.

3.2.15 DNA-Fällungen

Zur DNA-Konzentrierung oder Entfernung von Salzen wurden Nukleinsäurelösungen mit Ethanol bzw. Natriumacetat gefällt. Ethanol-Fällungen erfolgten durch Zugabe von 150 mM NaCl und 2,5 Ausgangsvolumen absolutem Ethanol für 1 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C . Für eine effektivere Fällung geringer DNA-Mengen oder kleiner DNA-Fragmente wurden dem Ansatz 20 μg Glykogen zugefügt. Die Fällung radioaktiv markierter Oligonukleotide erfolgte mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 15 μg Hefe t-RNA und 2,8 Ausgangsvolumen absolutem Ethanol bei -20°C über Nacht. Die DNA-Präzipitate wurden zentrifugiert (15 - 30 min, 12000 U/min, 4°C , Tischzentrifuge) und nach Verwerfen des Überstandes nacheinander mit 1 ml 80% Ethanol und 1 ml absolutem Ethanol gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde 5 min zentrifugiert (12000 U/min) und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde luft- oder vakuumgetrocknet und in 5 μl oder einem anderen gewünschten Volumen TE-Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Fällungen von Plasmid-DNA für Transfektionen (Kap. 3.2.40) erfolgten mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol bei -20°C über Nacht. Anschließend wurde 20 min mit 9500 U/min bei 4°C zentrifugiert (Ausschwingrotor JA 13.1, Beckman Zentrifuge) und das DNA-Pellet einmal mit 1 ml 80% Ethanol und einmal mit absolutem Ethanol gewaschen. Nach dem Lufttrocknen unter der Sterilbank wurde die DNA in 10 μl TE (pH 7,5) gelöst.

3.2.16 DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8 - 2%ige (w/v) Agarosegele hergestellt. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x TBE als Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 50 Volt (6,5 cm x 10 cm Gel) bzw. 75 Volt (11,5 cm x 14 cm Gel) für 2 - 4 Stunden. Vor dem Auftragen wurden Proben und λ /HindIII-Marker mit 1/5 Volumen 6x Gelladepuffer versetzt,

5 min bei 65°C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt. Zur Detektion der DNA im UV-Licht wurden die Agarosegele in 1x TBE mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid 20 min gefärbt und 2x 5 min mit frischem 1x TBE gespült. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden die DNA-Größenstandards *100bp DNA Ladder* und *HindIII*-verdaute λ-DNA verwendet.

3.2.17 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *EasyPure DNA Purification Kit*, indem die gewünschte DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und laut Herstellerprotokoll präpariert wurde. Die Bindung der DNA erfolgte mit 7 - 10 µl der im Kit enthaltenen Glasmilch für 15 - 20 min bei Raumtemperatur auf dem Rotationsrad. Der Ansatz wurde 10 Sek zentrifugiert, das Pellet in 1 ml Wasch-Gebrauchslösung aus dem Kit resuspendiert und nochmals 10 Sek. zentrifugiert. Zur Trennung der DNA von der Glasmilch wurde das Pellet in 100 µl TE (pH 7,5) resuspendiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 12000 U/min zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und das Glasmilch-Pellet nochmals in 50 µl TE (pH 7,5) resuspendiert, inkubiert und zentrifugiert. Die DNA der vereinten Überstände wurde mit 150 mM NaCl, 20 µg Glykogen und 2,5 Volumen absolutem Ethanol präzipitiert und die gefällte DNA in 5 - 7 µl TE (pH 7,5) aufgenommen.

3.2.18 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration einer Lösung wurde photometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bestimmt, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum besitzen. Dabei entspricht eine OD von 1,0 einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA, 37 µg/ml einzelsträngiger DNA und 20 - 33 µg/ml Oligonukleotid. Die DNA-Konzentration (in mg/ml) errechnete sich durch Multiplikation der $OD_{260\text{nm}}$ mit dem Proben-Verdünnungsfaktor sowie des für DNA, RNA usw. spezifischen Faktors. Die Reinheit der Präparation wurde unter Einbeziehung der Absorption (A) durch Proteine bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ überprüft, wobei das Verhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ bei 1,8 - 2,0 liegen sollte.

3.2.19 Standard PCR

DNA-Amplifizierungen durch Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgten in 50 µl-Reaktionsansätzen mit 2,5 ng Plasmid-Matritze, 200 pmol je Primer, 200 nM je dNTP, 1 mM MgCl₂

und 2 Einheiten *PfuUltra*TM High-Fidelity DNA-Polymerase in 1x *PfuUltra*-Reaktionspuffer. Die PCR-Reaktionen wurden im *Thermocycler GeneAmp PCR System 2400* bzw. *Primus PCR-Thermocycler TC 2500 ME* mit folgendem PCR-Programm durchgeführt: initiale Denaturierung (2 min / 95°C), 4 Zyklen mit je einem Denaturierungs- (30 Sek / 95°C), einem Hybridisierungs- (30 Sek / 50°C) und einem Syntheseschritt (70 Sek / 72°C), danach nochmals 11 Zyklen mit je einem Denaturierungs- (30 Sek / 95°C), Hybridisierungs- (30 Sek / 57°C) und Syntheseschritt (70 Sek / 72°C), sowie einem terminalen Syntheseschritt für 7 min bei 72°C. Die Anlagerungstemperatur der ersten vier Zyklen wurde niedriger gewählt, weil die Primer Restriktionsschnittstellen und Start-/Stoppcodons enthielten, sodass beim PCR-Start noch keine exakte Basenpaarung zwischen Primer und Matrizen-DNA möglich war. Zur Analyse wurden die PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

3.2.20 Quantitative *Real-Time PCR*

Die quantitative *Real-Time PCR* bietet im Vergleich zur herkömmlichen PCR die Möglichkeit, die Menge an gebildeten PCR-Produkten direkt während der Reaktion (in „Echtzeit“) zu erfassen. Für die Quantifizierungen wurde der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff *SYBR*[®] *Green I* verwendet, der sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA einlagert und dabei Fluoreszenz freisetzt. Da sich die Anzahl der amplifizierten DNA-Moleküle nach jedem PCR-Zyklus verdoppelt, nimmt die Fluoreszenz ebenfalls proportional mit der Menge an gebildeten PCR-Produkten zu, was die Quantifizierung ermöglicht. Als externer Standard diente für jedes Primerpaar eine eigene Standardreihe mit 0 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng und 100 ng chromosomaler DNA aus HD11-Zellen. Das mögliche Auftreten unspezifischer PCR-Produkte wie Primer-Dimere wurde mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse überprüft, mit welcher jede PCR abgeschlossen wurde. Die Differenzierung basiert darauf, dass Produkte von Primer-Dimeren einen deutlich niedrigeren Schmelzpunkt (T_m) als die längeren, spezifischen PCR-Produkte besitzen. Bei der quantitativen *Real-Time PCR* unterscheidet man zwischen absoluter und relativer Quantifizierung. Die absolute Quantifizierung bestimmt die tatsächliche Menge einer Zielsequenz, die z. B. als Kopienzahl oder Konzentration ausgedrückt werden kann, anhand einer Standardreihe. Die relative Quantifizierung bestimmt hingegen das zahlenmäßige Verhältnis der Zielsequenz zu einer Referenzsequenz (endogene Kontrolle), die in der Regel von einem *housekeeping*-Gen (z. B. 18S rRNA oder GAPDH) stammt. Die für die *Real-Time PCR*-Analysen verwendeten Primer wurden mit der *Primer Express*[®] *Software* (Applied Biosystems) designed und die DNA-Bindestellen so gewählt, dass die PCR-Amplifikate eine

Länge von 50 - 60 bp aufwiesen.

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem 25 μl -Ansatzvolumen mit 12,5 μl 2x *Power SYBR Green*[®] *PCR Master Mix* (SYBR[®] Green I dye, *hot-start* AmpliTaq Gold[®] DNA-Polymerase [LD], dNTPs mit dTTP/dUTP, passive reference I [ROX], optimierten Pufferkomponenten) (Applied Biosystems); 2,5 μl je 1,0 μM Primer (Endkonzentration je Primer 100 nM) und 2 μl Probe. Probenvolumen kleiner 2 μl wurden mit sterilem PCR-Wasser ergänzt. Zur Erstellung einer Eichgerade wurde sonifizierte chromosomale DNA aus HD11-Zellen in einer fünfstufigen Verdünnungsreihe auf 50 ng, 5 ng, 0,5 ng, 0,05 ng und 0,005 ng pro μl eingestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 2 μl eingesetzt und damit eine Eichgerade von 0 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng, 10 ng und 100 ng DNA erstellt. Für jedes Primerpaar wurde stets eine eigene Eichgerade aufgetragen. Primer und Standards wurden bei -20°C aliquotiert eingefroren und nach einmaligem Auftauen verworfen. Standards und Proben wurden als Doppelbestimmung auf 96-Loch-Reaktionsplatten (*MicroAmp*[™] *Optical 96-well Reaction Plates*) aufgetragen. *Inputs* aus ChIP-Analysen wurden vor der PCR 1:100 mit H₂O verdünnt.

Die Quantifizierungen (*Absolute Quantification*) erfolgten mit dem *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System* mit folgendem Temperaturprofil: initiale Denaturierung (10 min / 95°C); 45 Zyklen mit je einer Denaturierung (20 Sek / 95°C) und einem gemeinsamen Hybridisierungs- und Syntheseschritt (35 Sek / 60°C) sowie einer abschließenden Schmelzkurvenanalyse (*Dissociation Step*) mit 1 Zyklus (15 Sek / 95°C, 1 min / 60°C, 15 Sek / 95°C). Nach der PCR wurden die mit den einzelnen Primerpaaren erzielten DNA-Anreicherungen mit der *7500 System Software* (Version 1.2.3f2) des Gerätes ausgewertet. Für die Auswertungen wurden zunächst die *Input*-Mittelwerte (*Mean Qty*) jedes Primerpaares normalisiert und daran die Probenwerte berechnet. Die relative DNA-Anreicherung berechnete sich aus dem Anreicherungsverhältnis der Proben-Mittelwerte in Bezug auf Primerpaar Pri+13kb, das den Wert 1 erhielt.

3.2.21 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotide

Synthetisch hergestellte, komplementäre, einzelsträngige Oligonukleotide wurden zu doppelsträngiger DNA wie folgt hybridisiert: In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 200 μl 2x TEN und 20 μg jedes Einzelstrang-Oligonukleotids gemischt und mit sterilem bidest. H₂O auf 400 μl aufgefüllt. Der Ansatz wurde in einem 2 l-Becherglas 10 min in 80°C heissem Wasser erhitzt und samt Becherglas in einer Styroporkiste über Nacht langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Aufreinigung der hybridisierten Doppelstrang-Oligonukleotide erfolgte

auf 8%igen, nativen Polyacrylamidgelen (siehe Kap. 3.2.26). Zum Beladen des Gels wurden die Proben mit 1/5 Volumen 6x Gelladepuffer versetzt und bei 150 V für 1,5 - 2 Stunden im Gel aufgetrennt. Zur Detektion der DNA wurde das Gel 20 min in 1x TBE mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid gefärbt und 2x 5 min mit 1x TBE gespült. Die gewünschten DNA-Banden wurden mit einem Skalpell unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten und aus dem Gel reisoliert.

3.2.22 Isolierung von Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgelen

Zur Zerkleinerung der ausgeschnittenen, die DNA-Banden enthaltenden Gelstücke, wurden diese durch ein mit einer Kanüle eingestochenes Loch im Boden eines Reaktionsgefäßes (0,65 ml) in ein zweites Gefäß (1,5 ml) zentrifugiert (1 - 2 min, 12000 U/min, Tischzentrifuge). Die DNA-Elution aus der Gelmasse erfolgte durch Diffusion, indem die Gelmasse mit 400 μl TE (pH 7,5) versetzt und für mindestens 12 h bei 4°C inkubiert wurde. Um das Oligonukleotid-haltige Eluat von der Gelmasse zu trennen wurde eine 1 ml-Pipettenspitze mit Dimethyldichlorsilan silikonisierter Glaswolle (s. u.) gestopft und mehrmals mit sterilem dest. H₂O gespült. Die Gelmasse wurde aufgegeben und das durchtropfende Eluat in einem frischen Reaktionsgefäß aufgefangen. Nach weiterem Spülen der „Säule“ mit 100 - 200 μl TE wurden jeweils 500 μl Eluat mit NaCl/Ethanol gefällt. Die DNA aus 3 Gelspuren wurde in 20 μl TE aufgenommen und auf einem nativen Polyacrylamidgel überprüft. **Silikonisierung von Glaswolle mit Dimethyldichlorsilan:** In einem alten Gefäß Glaswolle mit Dimethyldichlorsilan vollständig durchfeuchten, mehrmals gründlich mit reichlich dest. H₂O spülen, autoklavieren und mehrere Tage, ggf. im Trockensterilisator, trocknen.

3.2.23 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Für Gelretardationsanalysen wurden Oligonukleotide durch 5'-Phosphorylierung mit [γ -³²P]-ATP durch die T4 Polynukleotidkinase (PNK) markiert. Dieses Enzym katalysiert den Transfer des γ -Phosphats des ATP auf die freie 5'-Hydroxylgruppe des Oligonukleotids. Pro Markierungsreaktion wurden eingesetzt: 1 - 2 μl Oligonukleotid, 2,0 μl 10x PNK-Puffer, 5,0 μl γ -³²P-ATP (3000 Ci/mmol), 1,5 μl T4 PNK (10 u/ μl), ad 20 μl dest. H₂O. Die Markierungsreaktion erfolgte für 1 Stunde bei 37°C und wurde durch Zugabe von 0,8 μl 0,5 M EDTA (pH 7,5) gestoppt. Anschließend wurden die markierten Oligonukleotide gereinigt (Kap. 3.2.24).

3.2.24 Reinigung radioaktiv markierter Oligonukleotide

Die nach der radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden nicht verbrauchten [γ - ^{32}P]-ATP Moleküle wurden aus dem Markierungsansatz entfernt. Hierfür wurde das Nukleinsäure-Markierungsgemisch auf Gelfiltrations-Chromatographiesäulen (*mini Quick Spin™ Oligo Columns*, Sephadex G-25) aufgetragen, wobei die Moleküle aufgrund ihrer relativen Größe getrennt werden. Während der Zentrifugation durch die Säulenmatrix werden die größeren Oligonukleotide, deren Größe die Porenweite der Matrix überschreitet, schneller eluiert, während die kleineren [γ - ^{32}P]-ATP Moleküle zurückgehalten werden. Nach dem Reaktionsstopp wurde der Markierungsansatz mit 20 μl STE ergänzt, auf eine nach Herstellerangaben vorbereitete Säule aufgetragen und laut Herstellerprotokoll gereinigt. Die im Eluat enthaltenen Oligonukleotide wurden mit TE (pH 7,5) auf 100 μl ergänzt und mit 15 μg Hefe t-RNA, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol bei -20°C über Nacht präzipitiert. Die gefällten Oligonukleotide wurden zentrifugiert (30 min, 10000 U/min, Biofuge 13), mit 1 ml 80% Ethanol und absolutem Ethanol gewaschen und vakuumgetrocknet. Die Radioaktivität des Oligonukleotid-Pellets wurde mit einem Szintillationszähler (β -Counter) bestimmt und die DNA mit TE (pH 7,5) auf 500 - 2000 cpm/ μl eingestellt.

3.2.25 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine denaturiert und entsprechend ihrem Molekulargewicht durch Elektrophorese in einer Polyacrylamidmatrix aufgetrennt. Vor dem Gelauftrag werden die Proteine mit SDS und Hitze behandelt, wodurch diese entfaltet und mit negativ geladenen SDS-Molekülen umhüllt werden. Weil dadurch alle Proteine etwa die gleiche Ladung erhalten, besitzt die Eingenladung der Proteine keinen Einfluss mehr auf das Laufverhalten während der Elektrophorese. Zur Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche Polyacrylamidgele mit einem 4%igen Sammelgel und einem je nach Größe der aufzutrennenden Proteine 10%-, 12%- oder 15%-igen Trenngel hergestellt (nach Laemmli, 1970). Die Zusammensetzung verschieden konzentrierter SDS-PAGE-Gele ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen und Elektrophorese. SDS-PAGE Gele wurden mithilfe des Gelgießstandes für Mini-Gele (Bio-Rad) hergestellt. Zur Herstellung des Trenngels wurden H_2O , TBE-Puffer, Acrylamidstammlösung, TEMED und Ammoniumper-sulfatlösung ohne Entgasung vorsichtig vermischt und sofort zwischen zwei durch 1 mm dicke Abstandhalter getrennte Glasplatten gegossen (bis ca. 3 cm unterhalb des Randes). Abschließend wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet.

Tabelle 12: Zusammensetzung verschieden konzentrierter SDS-PAGE-Gele.

	Trenngel			Sammelgel
	10%	12%	15%	4%
H ₂ O	4,92 ml	4,425 ml	3,682 ml	7,665 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	—
1 M Tris-HCl, pH 6,8	—	—	—	1,25 ml
20% SDS	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
40% Acrylamidstammlösung*	4,475 ml	2,97 ml	3,713 ml	975 μ l
10% Ammoniumpersulfatlösung	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l	10 μ l
Gesamt	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

*: 37,5% Acrylamid, 1% N,N'-Methylenbisacrylamid

Nach 45-minütiger Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, der Zwischenraum mit dest. H₂O gespült und mit einem Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach erneuter Polymerisation (30 - 45 min) wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Vertikalelektrophoresekammer *Mini-PROTEAN 3 Cell* eingespannt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 97°C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden die Proben sowie in einer separaten Spur 5 μ l des Protein-Molekulargewichtstandards *Precision Plus Protein Dual Color Standard* in die Geltaschen überführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit 1x SDS-Laufpuffer als Elektrophoresepuffer bei 120 V im Sammelgel und 150 V im Trenngel, bis die blau gefärbte Lauffront aus dem Gel austrat. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Analyse des gesamten Proteinbandenmusters mit *Bio-Safe Coomassie G-250 Stain*-Färbelösung nach Angaben des Herstellers gefärbt oder für *Western Blot*-Analysen auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Gefärbte Gele wurden in einem Spanrahmen zwischen zwei Cellophanfolien mehrere Tage an der Luft getrocknet, nachdem Gel und Folien 5 min in Geltrocknungslösung eingelegt worden waren.

3.2.26 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Herstellung nativer Polyacrylamidgele (Tab. 13) wurden zunächst dest. H₂O, TBE-Puffer und Acrylamidstammlösung 5 min entgast, dann mit dem Reaktionsbeschleuniger TEMED

und der Ammoniumpersulfatlösung versetzt und sofort zwischen zwei abgedichtete Glasplatten zu einem vertikalen, 15 cm x 17 cm x 2 mm (H/B/T) Gel gegossen (siehe Kap. 3.2.25). Der Kamm wurde sofort eingesteckt. Nach 45-minütiger Polymerisation wurde das Gel in eine Vertikalelektrophoresekammer (GIBCO) eingespannt und eine Vorelektrophorese für 1 h bei 150 V durchgeführt. Für Gelretardationsanalysen wurden 4%ige Gele und 0,25x TBE und für Oligonukleotid-Aufreinigungen 8%ige Gele und 1x TBE als Elektrophoresepuffer verwendet. Die DNA-Detektion erfolgte nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Beleuchtung.

Tabelle 13: Zusammensetzung verschieden konzentrierter, nativer PAGE-Gele.

	4%	8%
dest. H ₂ O	51 ml	31 ml
5x TBE (pH 8,3)	3 ml	—
10x TBE (pH 8,3)	—	4,5 ml
40% Acrylamidstammlösung*	6 ml	9 ml
TEMED	37,5 μ l	37,75 μ l
10% Ammoniumpersulfatlösung	375 μ l	375 μ l

*: 37,5% Acrylamid, 1% N,N'-Methylenbisacrylamid

3.2.27 Vorbereitung von Poly(dIdC) x Poly(dIdC)

Zehn Einheiten ($A_{260\text{nm}}$) Poly(dIdC) x Poly(dIdC) wurden in 400 μ l TEN (10/1/50) für 5 min bei 45°C gelöst, im 1,5 ml-Gefäß mit Ultraschall behandelt (10x 10 Sek / 10 Sek Pause; *timer: hold, duty cycle: constant, output: 7, 3°C*, Branson Sonifier 450). Nach einer DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die Probe aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Die Längen der Polynukleotid-Fragmente betragen \sim 100 - 1300 bp (0,75 μ g DNA / 1% Agarosegel).

3.2.28 Gelretardationsanalysen (EMSA)

Mithilfe von Gelretardationsanalysen, auch *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)* genannt, wurden Protein-DNA-Interaktionen *in vitro* untersucht. Bei dieser Methode wird der Chromatinbereich, in dem Proteinbindestellen vermutet werden, in kurze Fragmente von 20 - 50 bp Länge unterteilt, welche radioaktiv markiert und mit Kernproteinen inkubiert werden (siehe Abb. 4A). Die verwendeten Oligonukleotide und DNA-Fragmente wurden durch

Hybridisierung synthetisch hergestellter, komplementärer Einzelstrang-Oligonukleotide oder durch Restriktion klonierter genomischer DNA mit Restriktionsenzymen erhalten. Anschließend wird der Ansatz auf einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt, wobei die gebildeten Protein-DNA-Komplexe von den nicht komplexierten DNA-Fragmenten separiert werden. Die Verteilung der Radioaktivität wird durch Autoradiographie mit Röntgenfilmen detektiert. Da freie DNA schneller durch das Gel wandert als die größeren Protein-DNA-Komplexe, tritt bei Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes eine zusätzliche Bande oberhalb der freien DNA auf („*Bandshift*“). Ob eine Protein-DNA-Bindung durch sequenzspezifische Interaktion entstanden war, kann durch Zugabe verschiedener Kompetitor-DNAs überprüft werden (siehe Abb. 4B). Dazu wird dem Bindungsansatz, vor Zugabe der markierten DNA, ein etwa 100-facher Überschuss eines unmarkierten DNA-Fragments (Kompetitor) zugesetzt, welches im Vergleich zur markierten Probe entweder sequenzspezifisch oder -unspezifisch ist. Im Reaktionsansatz konkurriert der Kompetitor mit der markierten DNA um die Bindung des DNA-Bindeproteins. Eine Protein-DNA-Bindung ist sequenzspezifisch, wenn die Signalintensität eines Protein-DNA-Komplexes durch einen spezifischen Kompetitor abnimmt, während die Signalintensität nach Zugabe eines unspezifischen Kompetitors nicht beeinflusst wird.

Durchführung: Die Bindungsreaktionen erfolgten auf Eis in einem Ansatzvolumen von 20 μ l mit 10 μ l 2x EMSA-Bindungspuffer, 1,5 - 2 μ g Poly(dI-dC)x Poly(dI-dC), 10 μ g Kernextrakt und 1000 - 3000 cpm radioaktiv markiertem Oligonukleotid. Zunächst wurden Bindungspuffer, dest. H₂O und Kernextrakt 10 - 15 min auf Eis inkubiert, um die Bindung unspezifisch bindender Proteine an Poly(dIdC)x Poly(dI-dC) zu ermöglichen. Danach wurde die unmarkierte Kompetitor-DNA und nach 30 - 45 minütiger Inkubation auf Eis die radioaktiv markierte DNA zugegeben. Nach weiteren 30 - 45 min auf Eis wurden die Ansätze auf 4%igen, nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Um die Probenwanderung im Gel zu verfolgen wurden 20 μ l Glycerin-Probenpuffer in einer eigenen Spur mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 1,5 h bei 150 V mit 0,25x TBE als Elektrophoresepuffer. Zur Fixierung der DNA-Protein-Komplexe wurde das Gel anschließend 15 min in 10%iger Essigsäure inkubiert und, auf einem Filterpapier in Gelgröße liegend, unter Vakuum 45 min bei 80°C im Geltrockner vollständig dehydriert. Zur Detektion der markierten DNA wurde das getrocknete Gel in einer Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolie (Kodak) und aufgelegtem Autoradiographiefilm für 1 - 4 Tage bei -80°C exponiert.

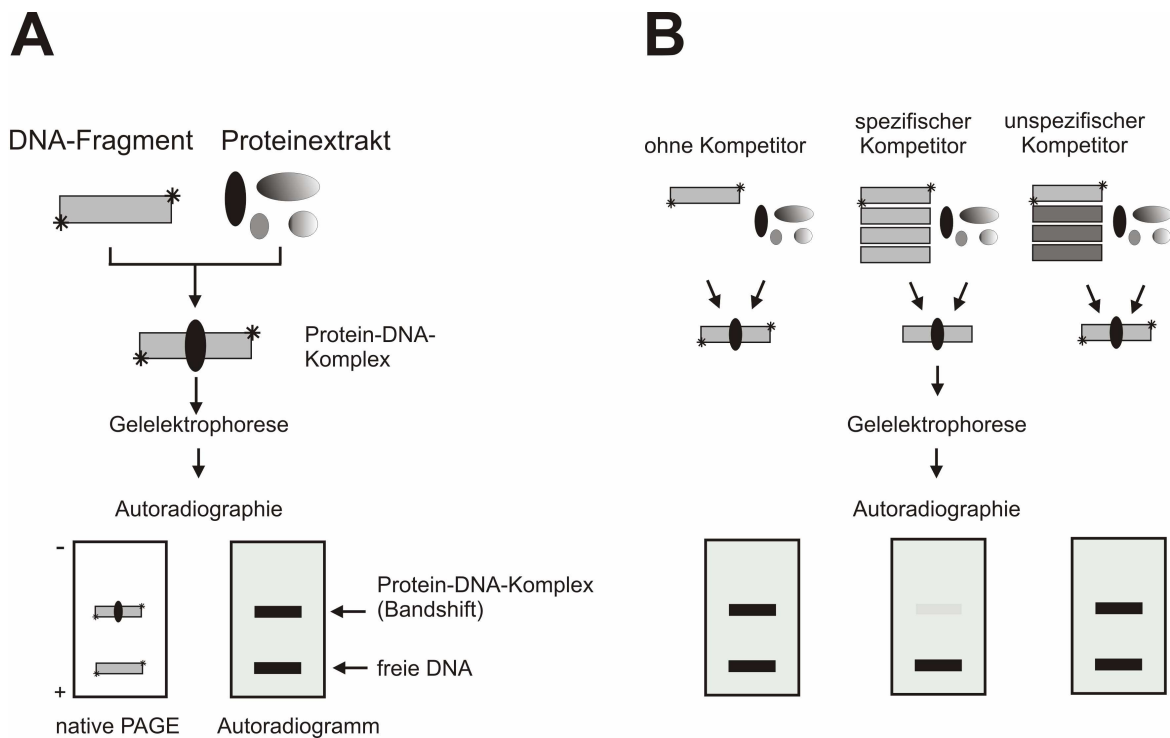


Abb. 4: Prinzip der Gelretardationsanalyse (EMSA). (A) Ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment wird mit Kernproteinen inkubiert und der Ansatz in einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird getrocknet und autoradiographiert. Die Bildung von Protein-DNA-Komplexen führt zur Entstehung einer Bande mit verringerter Mobilität („Bandshift“). (B) Zur Untersuchung der Sequenzspezifität der Proteinbindungen wird dem Reaktionsansatz ein ~100-facher Überschuss einer unmarkierten Kompetitor-DNA zugegeben (modifiziert nach Jansohn, M. (2007); „Gentechnische Methoden“, Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage).

3.2.29 Immunomobility Shift-Analysen

Diese Erweiterung der Gelretardationsanalyse (EMSA, Kap. 3.2.28) ermöglicht die Identifizierung von DNA-bindenden Proteinen mithilfe spezifischer Antikörper (siehe Abb. 5). Bindet der Antikörper an den Protein-DNA-Komplex, so ist im Autoradiogramm eine weitere Bande mit noch stärker verzögertem Laufverhalten detektierbar („Supershift“). Wie beim EMSA wurden zunächst Bindungspuffer, dest. H₂O und Kernextrakt 10-15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Antikörper zugefügt und nach 45 minütiger Inkubation auf Eis die markierte DNA zugegeben. Nach weiteren 45 min auf Eis wurde der Ansatz auf einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die weiteren Arbeitsschritte bis zur Signaldetektion durch Autoradiographie wie in Kap. 3.2.28 beschrieben durchgeführt.

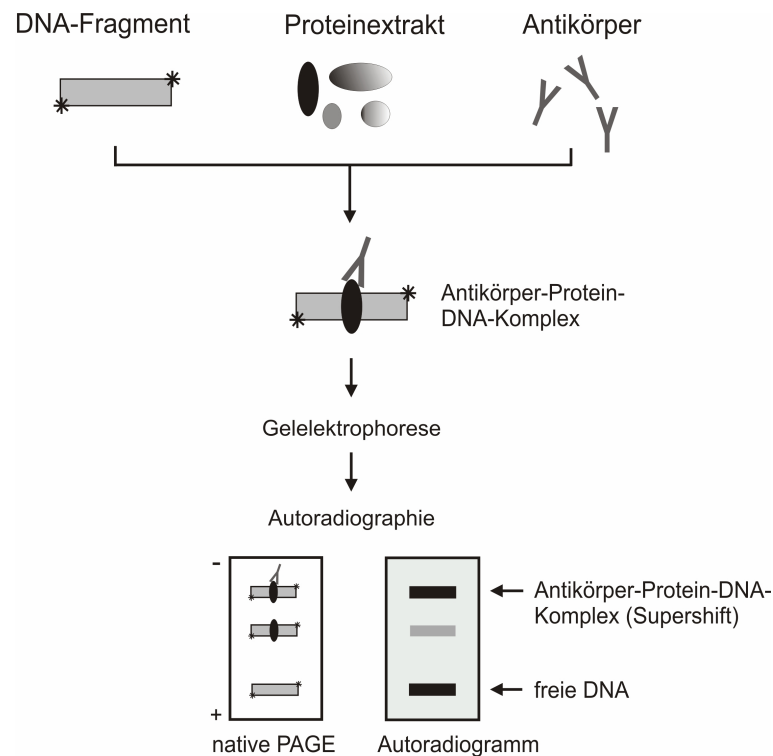


Abb. 5: Prinzip der Immunomobility Shift-Analyse. Zur Identifizierung von DNA-Bindeproteinen werden Gelretardationsanalysen (EMSA) in Gegenwart spezifischer Antikörper, welche gegen bereits bekannte DNA-Bindeproteine gerichtet sind, durchgeführt. Die Bildung von Antikörper-Protein-DNA-Komplexen führt zur Entstehung einer Bande mit noch geringerer Mobilität („Supershift“).

3.2.30 Autoradiographie und Filmentwicklung

Zur Autoradiographie des Radioisotops ^{32}P wurden die beidseitig beschichteten Röntgenfilme Kodak Biomax MS (*Maximum Sensitivity*, 18x 24 cm) und Kodak X-Omat LS (*Low Sensitivity*, 18x 24 cm) sowie die Filmkassetten und Verstärkerfolien der Firma Kodak verwendet. Röntgenfilme wurden bei -80°C exponiert und vor der Entwicklung 30 min bei 37°C aufgetaut. Für *Western Blot*-Analysen wurden *Hyperfilm ECL*-Filme (GE Healthcare) verwendet. Zur Entwicklung wurden die Filme nacheinander jeweils 5 min in Entwickler, Wasser und Fixierer inkubiert, wobei Röntgenfilme in absoluter Dunkelheit und *Hyperfilm ECL*-Filme bei Rotlicht entwickelt wurden.

3.2.31 Expression eines rekombinanten cORC2-Polypeptids in *E. coli*

Die Überexpression eines rekombinanten cORC2-Polypeptids erfolgte mit dem „pET-System“ der Firma Novagen unter Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* BL21 (DE3)pLysS und des Expressionsvektors pET-16b. Der Vektor eignet sich speziell für die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*, da er verschiedene Transkriptionskontrollelemente

und stromaufwärts der *multiple cloning site* eine Nukleotidsequenz enthält, die für eine kurze Sequenz aus 10 hintereinander liegenden Histidinen (*His-Tag*) kodiert. Zunächst wurde der Expressionsvektor pETorc2 konstruiert, der die Expression eines ~28 kDa großen, rekombinanten cORC2-Polypeptids mit N-terminalem *His-Tag* ermöglicht (siehe Ergebnisse 4.2). Das Plasmid wurde mittels Hitzeschock in TFB/DnD-kompetente *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen transformiert. Für die Proteinexpression wurde eine Vorkultur aus 10 ml SOB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol mit einem das ~28 kDa cORC2-Protein exprimierenden *E. coli* BL21(DE3) pLysS(pETorc2)-Klon angeimpft und diese bei 37°C und 180 U/min über Nacht inkubiert. Von dieser Kultur wurden 6,5 ml zum Animpfen der Hauptkultur mit 200 ml SOB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol verwendet. Die Hauptkultur wurde bei 37°C und 180 U/min bis zu einer OD_{600nm} ~0,6 inkubiert, dann nochmals mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt und 1 ml Kultur als Negativkontrolle in ein zweites Kulturröhrchen überführt. In der Hauptkultur wurde die Expression des cORC2-Polypeptids mit 1 mM IPTG induziert. Hauptkultur und Negativkontrolle wurden 3 h bei 35°C und 180 U/min weiterkultiviert und anschließend 10 min auf Eis abgekühlt. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden jeweils 0,5 ml der Hauptkultur und Negativkontrolle abzentrifugiert (Tischzentrifuge), 1x mit PBS (pH 7,2) gewaschen und die Bakterienpellets in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Probe wurde 5 min bei 97°C erhitzt, 1 min bei 12000 U/min zentrifugiert und 5 µl des Überstandes auf einem 15%igen SDS-PAGE Gel analysiert. Die restliche Hauptkultur wurde 5 min mit 6700 U/min bei 4°C zentrifugiert (JA 14 Rotor, Beckman Zentrifuge), das Pellet in 50 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut pelletiert (5 min, 6700 U/min, 4°C). Das Zellpellet wurde nicht eingefroren, sondern direkt für die Präparation des cORC2-Proteins verwendet (Kap. 3.2.32).

3.2.32 Präparation von cORC2-Inclusion Bodies aus *E. coli*

Das in *E. coli* überexprimierte cOrc2-Polypeptid lag in Form von unlöslichen *Inclusion Bodies* vor. Diese wurden aus den Bakterienzellen wie folgt präpariert: Das aus 200 ml induzierter Kultur erhaltene Bakterienpellet wurde in 10 ml IB-Puffer homogen resuspendiert und in ein 50 ml-Zentrifugengefäß überführt. Die Suspension wurde mit 500 µl Proteaseinhibitorcocktail und 1 mg/ml Lysozym versetzt und 30 min bei Raumtemperatur auf dem Rotationsrad inkubiert. Zur Lyse der Bakterienzellen und Freisetzung der cORC2-*Inclusion Bodies* wurde 1 mg/ml Natriumdeoxycholat zugegeben, und unter gelegentlichem kräftigen Schütteln 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden zur Verringerung der Viskosität durch freigesetzte

Nukleinsäuren 8 mM MgCl₂, 10 µg/ml DNase I und 10 µg/ml RNase A zugegeben. Die Probe wurde 30 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert, bis diese wieder dünnflüssig wurde. Die freigesetzten *Inclusion Bodies* wurden durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 4500 U/min, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0 R) und der zytosolische Überstand vollständig entfernt. Bis zur cORC2-Proteinreinigung wurde das *Inclusion Body*-Pellet bei -80°C eingefroren.

3.2.33 Reinigung von cORC2-*Inclusion Bodies* über Nickel-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der präparierten cORC2-*Inclusion Bodies* erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*)-Agarose. Die Nickel-Ionen der Matrix besitzen eine hohe Affinität zum *His-Tag* rekombinanter Proteine.

Das Pellet aus cORC2-*Inclusion Bodies* wurde aufgetaut, in 7-8 ml denaturierendem Guanidiniumpuffer resuspendiert und zum Lösen auf Eis gestellt bzw. mit Ultraschall behandelt (6x 10 Sek / 5 Sek Pause; timer: hold, duty cycle: constant, output: 7, -1°C, Branson Sonifier 450). Die Probe wurde in ein 12 ml-Zentrifugengefäß überführt, 15 min mit 10000 U/min bei 4°C zentrifugiert (JA 20 Rotor, Beckman Zentrifuge) und der Überstand in einem frischen Gefäß auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurden 2,5 ml 50% (w/v) Ni-NTA-Agarose in eine vertikal befestigte, sterile Affinitätschromatographie-Säule (*Poly-Prep Affinity Chromatography Column*) überführt und 3x mit 2 ml Guanidinium-Puffer gewaschen. Für diesen und die folgenden Waschschrte wurde der Schlauch einer Schlauchpumpe über den Säulenablauf gezogen und der Überstand langsam herausgesogen. Erst dann wurde frischer Waschpuffer zugegeben. Das gelöste cORC2-Polypeptid wurde in die vorbereitete Säule überführt und 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rotationsrad inkubiert. Die Säule wurde wieder senkrecht befestigt und der Überstand mit der Schlauchpumpe langsam herausgesogen. Zur Entfernung bakterieller Proteine und anderer Kontaminationen wurde die Agarose 4x mit 3 ml 8 M Harnstoffpuffer (pH 6,3) und 4x mit 3 ml 8 M Harnstoffpuffer (pH 5,9) gespült. Die Elution des cORC2-Proteins erfolgte in sechs Schritten mit je 0,5 ml 8 M Harnstoffpuffer (pH 3,8). Die Reinheit des eluierten cORC2-Proteins wurde auf einem 15%igen SDS-PAGE Gel überprüft. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proteinelutionen à 200 µg aliquotiert und bis zur Immunisierung bei -80°C gelagert.

3.2.34 Produktion polyklonaler α -cORC2-Antikörper in Kaninchen

Zur Herstellung polyklonaler α -cORC2-Antikörper wurde die Firma Sequence Laboratories GmbH (Göttingen) mit der Immunisierung eines Kaninchens beauftragt. Zur Immunisierung wurde 1 mg des affinitätsgereinigten \sim 28 kDa-cORC2-Polypeptids, aliquotiert à 200 μ g, benötigt. Die Proteininjektionen und Blutabnahmen (Präimmunserum, 1. Blutung, 2. Blutung, Endblutung) erfolgten nach dem 3-Monats-Protokoll (Immunisierungsschema) der beauftragten Firma. Der zeitliche Anstieg der Antikörperkonzentration in den Blutseren wurde durch *Western Blot*-Analysen verfolgt (nicht gezeigt).

3.2.35 Aufreinigung von α -cORC2-Antikörpern (IgGs) aus Kaninchenblutserum

Die Aufreinigung der im Kaninchenblutserum enthaltenen Antikörper (IgGs), einschließlich der α -cORC2-Antikörper, sowie der im Präimmunserum enthaltenen unspezifischen IgGs wurden mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung von Protein A-Agarose-Säulen aufgereinigt. Protein A ist ein bakterielles Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus*, das eine spezifische Affinität zur F_c-Region von Immunglobulinen der G-Klasse (IgG) besitzt und kovalent an Agarose gekoppelt wurde. Die Aufreinigung des Präimmunserums erfolgte mit dem *PROTEUS Protein A Mini Antibody Purification Kit*, die der im Blutserum 3 Monate nach der Erstimmunisierung (Endblutung) enthaltenen α -cORC2-Antikörper (IgGs) mit dem *PROTEUS Protein A Midi Antibody Purification Kit*. Die Aufreinigungen erfolgten mit den in den Kits enthaltenen, vorgepackten Protein A-Agarose-Säulen und den Bindungs-, Wasch-, Elutions- und Neutralisationspuffern nach Angaben des Herstellers. Die eluierten Antikörperfraktionen wurden auf 10%igen SDS-PAGE Gelen überprüft. Um die gereinigten Eluate von Endblutung bzw. Präimmunserum zu entsalzen und zu konzentrieren, wurden die im Midi-Kit enthaltenen Ultrafiltrationsäulen Vivaspin 15R mit 10 kDa Ausschlussgröße verwendet. Das Antikörpereluat (\sim 13 ml) wurde bis etwa 1/10 des Ausgangsvolumen durch die Säule zentrifugiert (3000 x g, Ausschwingrotor, Heraeus Megafuge 1.0R), mit kaltem PBS (pH 7,2) auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt (\sim 15 ml) und erneut zentrifugiert. Der Probenrest wurde ein zweites Mal mit PBS aufgefüllt und nochmals reduziert. Um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden, wurden die entsalzten und konzentrierten Antikörperfraktionen (\sim 2 ml) mit 0,1% Natriumazid versetzt. Im Anschluß wurden die Antikörperkonzentrationen bestimmt. Diese wurde nach der im Handbuch des Kit-Herstellers vermerkten Formel $A_{280\text{nm}} \times \text{Probenverdünnung} \times 0,72 \text{ (IgG)} = \text{mg/ml}$ berechnet. Die konzentrierten Antikörperfraktionen aus Endblutung und Präimmunserum wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Bindungs-

spezifität des α -cORC2-Antikörpers wurde in der *Western Blot*-Analyse überprüft.

3.2.36 Herstellung einer 50%igen (v/v) Protein A-Sepharose-Suspension

0,5 g lyophilisierte Protein A-Sepharose CL-4B wurden in ein 50 ml-Zentrifugengefäß eingewogen und zum Ausquellen mit 25 ml Waschpuffer für mehrere Stunden in den Kühlschrank gestellt. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet nochmals in ~25 ml Waschpuffer suspendiert und die Sepharose durch „Stehenlassen“ des Gefäßes bei 4°C sedimentiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit ca. 10 ml Aufbewahrungspuffer in ein 14 ml-Röhrchen mit konischem Boden und Schraubdeckel überführt. Nach erneuter Sedimentation wurde der Überstand verworfen. Das Volumen des Sepharosepellets wurde an der Skala abgelesen (ca. 2 ml) und mit dem gleichen Volumen Aufbewahrungspuffer aufgefüllt. Die so erhaltenen ca. 4 ml 50%ige (v/v) Protein A-Sepharose Suspension wurde bei 4°C gelagert.

3.2.37 Präparation von Nucleoproteinen für ChIP-Analysen

Die Nucleoproteine wurden in Anlehnung an eine von Keller et al. (2002) beschriebene Arbeitsvorschrift präpariert, allerdings wurde zur Fragmentierung der Nucleoprotein-DNA in dieser Arbeit nicht *Micrococcus Nuclease*, sondern Ultraschall eingesetzt.

Pro ChIP-Ansatz wurden zwei Zellkulturschalen (\varnothing 140 mm) à 25×10^6 HD11-Zellen bzw. DU249-Zellen in 25 ml Vollmedium ausgesät und über Nacht inkubiert (max. 90% Konfluenz). Am nächsten Tag wurden auf das Medium jeder Schale 680 μ l 37% Formaldehyd (1% Endkonzentration) unter Schwenken getropft und die Schalen 10 min bei 37°C mit ca. 30 U/min im Schüttelinkubator geschwenkt. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis und mit eisgekühlten Puffern. Zentrifugationen wurden bei 4°C durchgeführt. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen 2x mit 20 ml PBS (pH 7,2) gewaschen, mit einem Gummiwischer in ca. 5 ml PBS/10 mM Na-Bisulfit abgeschabt und in ein 50 ml Zentrifugengefäß überführt. Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 1500 U/min, Heraeus Zentrifuge), das Pellet in 5 - 10 ml hypotonischem NP-Puffer A homogen resuspendiert und nach Überführen in einen vorgekühlten Glas-Dounce Homogenisator 20 min auf Eis inkubiert. Zur Freisetzung der Zellkerne wurden die Zellen mit 10 - 15 Stempelhüben lysiert. Um die Zellkerne vom zytosolischen Überstand zu trennen wurde das Zellysate in ein frisches 50 ml-Zentrifugengefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 1500 U/min). Der zytosolische Überstand wurde verworfen. Das Zellkernpellet wurde noch zweimal in 10 ml NP-Puffer A resuspendiert, zentrifugiert und die Überstände vollständig entfernt. Um unvernetzte Proteine vom Chromatin zu lösen, wurde das Pellet 2x

in 10 ml NP-Puffer B resuspendiert und danach einmal in 20 ml TE/10 mM Na-Bisulfit-Puffer (pH 7,5) gewaschen, wobei jeweils 5 min bei 2500 U/min zentrifugiert und die Überstände vollständig abpipettiert wurden. Das DNA-Nucleoproteinpellet wurde in 200 μ l/Ansatz ChIP-Bindungspuffer resuspendiert und zum Lösen für 0,5 - 1 h auf Eis gestellt. Anschließend wurden 20 μ l Probe für die Agarosegelkontrolle abgenommen („vor Ultraschall“), diese mit 280 μ l 1%iger SDS-Lösung und 15 μ l 4 M NaCl (200 mM Endkonzentration) versetzt und zur Reversion der *crosslinks* über Nacht bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Probe einmal mit P/C/I (25:24:1) extrahiert und mit NaCl gefällt. Die DNA wurde in 20 μ l TE (pH 7,5) gelöst. Davon wurden 3,5 μ g DNA auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Die restliche Probe wurde in ein 1,5 ml-Gefäß überführt (max. 400 μ l) und 5 min mit Ultraschall behandelt (10x 30 Sek/5 Sek Pause; timer: hold, duty cycle: constant, output: 10, -2°C, Branson Sonifier 450). Dann wurde die Probe 5 min bei 12000 U/min zentrifugiert (Tischzentrifuge) und der die Chromatinfragmente enthaltene Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Für die Ultraschall-Kontrolle wurden 20 μ l abgenommen („nach Ultraschall“) und wie oben beschrieben behandelt. Nach einer photometrischen DNA-Konzentrationsbestimmung wurde der DNA-Nucleoprotein-Überstand in die ChIP eingesetzt.

3.2.38 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die ChIP ist eine etablierte Methode, um Interaktionen zwischen DNA-bindenden Proteinen und DNA im Chromatinkontext lebender Zellen zu untersuchen (Orlando et al., 1997; Orlando, 2000). Das Prinzip der ChIP ist in Abb. 6 dargestellt. Bei dieser Methode werden proliferierende Zellen kurz mit Formaldehyd behandelt, wodurch sich kovalente, aber reversible Quervernetzungen zwischen DNA und den daran bindenden Proteinen bilden (*crosslink*) (Solomon et al., 1988). Vernetzungen werden aber auch zwischen benachbarten Proteinen gebildet. Auf diese Weise bleiben die zum Zeitpunkt der Fixierung existierenden Protein-DNA- und Protein-Protein-Komplexe erhalten. Nach der Zellyse werden nicht fixierte Proteine mit Hochsalz-Waschpuffer (1 M NaCl) entfernt. Da die präparierte *crosslink*-Nucleoprotein-DNA ein breites Spektrum von DNA-Fragmenten mit Längen zwischen mehreren 100 bp und 10.000 bp enthält, erfolgt im Anschluss eine Behandlung mit Ultraschall und / oder unspezifischen Nukleasen, um DNA-Fragmente mit einer geringeren und homogeneren Länge von 500 bp bis maximal 1500 bp zu erhalten. Anschließend werden die Protein-DNA-Komplexe mit Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein selektiv immunpräzipitiert. Zur Isolierung der Antikörper-Protein-DNA-Komplexe wird der ChIP-Ansatz mit einer Protein A oder

G-gekoppelten Matrix versetzt. Protein A/G besitzt eine spezifische Affinität zur F_c-Region der Immunglobulin G (IgG)-Antikörper, wodurch das „Einsammeln“ der Antikörper-Protein-DNA-Komplexe ermöglicht wird. Die Identifizierung der vom Antikörper gebundenen Proteine erfolgt durch *Western Blot*-Analysen. Eine Möglichkeit, um festzustellen, welche Chromatinregionen von dem zu untersuchenden Protein gebunden wurden, ist die quantitative *Real-Time PCR*-Analyse von immunpräzipitierten DNA-Fragmenten (Kap. 3.2.20). Hierfür werden die Quervernetzungen durch Hydratisierung (*decrosslink*) gelöst und alle Proteine entfernt. Anschließend werden die DNA-Fragmente mittels *Real-Time PCR* amplifiziert.

Durchführung der ChIP:

Vorbereitung der Protein A-Sepharose. Pro ChIP-Ansatz wurden 150 μ l 50%ige (v/v) Protein A-Sepharose (Kap. 3.2.36) in ein 1,5 ml-Gefäß überführt, 2 min bei 4000 U/ min zentrifugiert und 30 Sekunden bis 1 min auf Eis sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 2 Ausgangsvolumen ChIP-Bindungspuffer zugegeben. Die Probe wurde geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Vorreinigung der Probe. Zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine und zur Reduktion des unspezifischen Hintergrunds wurde der nucleoproteininhaltige Überstand (Kap. 3.2.37) auf die gewaschene Sepharose gegeben und 1 h bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert, sedimentiert und der vorgereinigte DNA-Nucleoprotein-Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Für die *Western Blot*- und *Real-Time PCR*-Analyse wurden jeweils 20 μ l Probe (*Input*) abgenommen und bei -80°C eingefroren.

Zugabe der Antikörper. Pro ChIP-Ansatz wurden 500 - 800 μ g vorgereinigte DNA-Nucleoproteine in ein 0,65 ml-Eppendorfgefäß gegeben und diese mit entsprechendem Antikörper bzw. Antiserum über Nacht bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert.

Bindung und Waschen der Immunpräzipitate. Zur Bindung der DNA-Protein-Antikörper-Komplexe wurden pro Ansatz 100 μ l gewaschene 50%ige Protein A-Sepharose in einem frischem 0,65 ml-Gefäß vorgelegt. Der ChIP-Ansatz wurde dazupipettiert und die Probe 2 h bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Bei den folgenden Waschschrritten wurde die Probe jeweils 2 min bei 4000 U/min zentrifugiert (Tischzentrifuge, 4°C), und 1 min auf Eis ruhen gelassen. Die Überstände wurden vorsichtig abpipettiert und verworfen. Zum Waschen der Sepharose wurden eisgekühlte Waschpuffer verwendet und die *Beads* durch kurzes (10-20 Sek.) vortexen auf niedriger Stufe gewaschen. Nach Bindung der DNA-Protein-Antikörper-Komplexe wurde die Sepharose nacheinander mit folgenden Waschpuffern gewaschen: 1x in 0,45 ml ChIP-Bindungspuffer vom Vortag, 4x in 0,45 ml ChIP-Waschpuffer 1, 4x in 0,45 ml

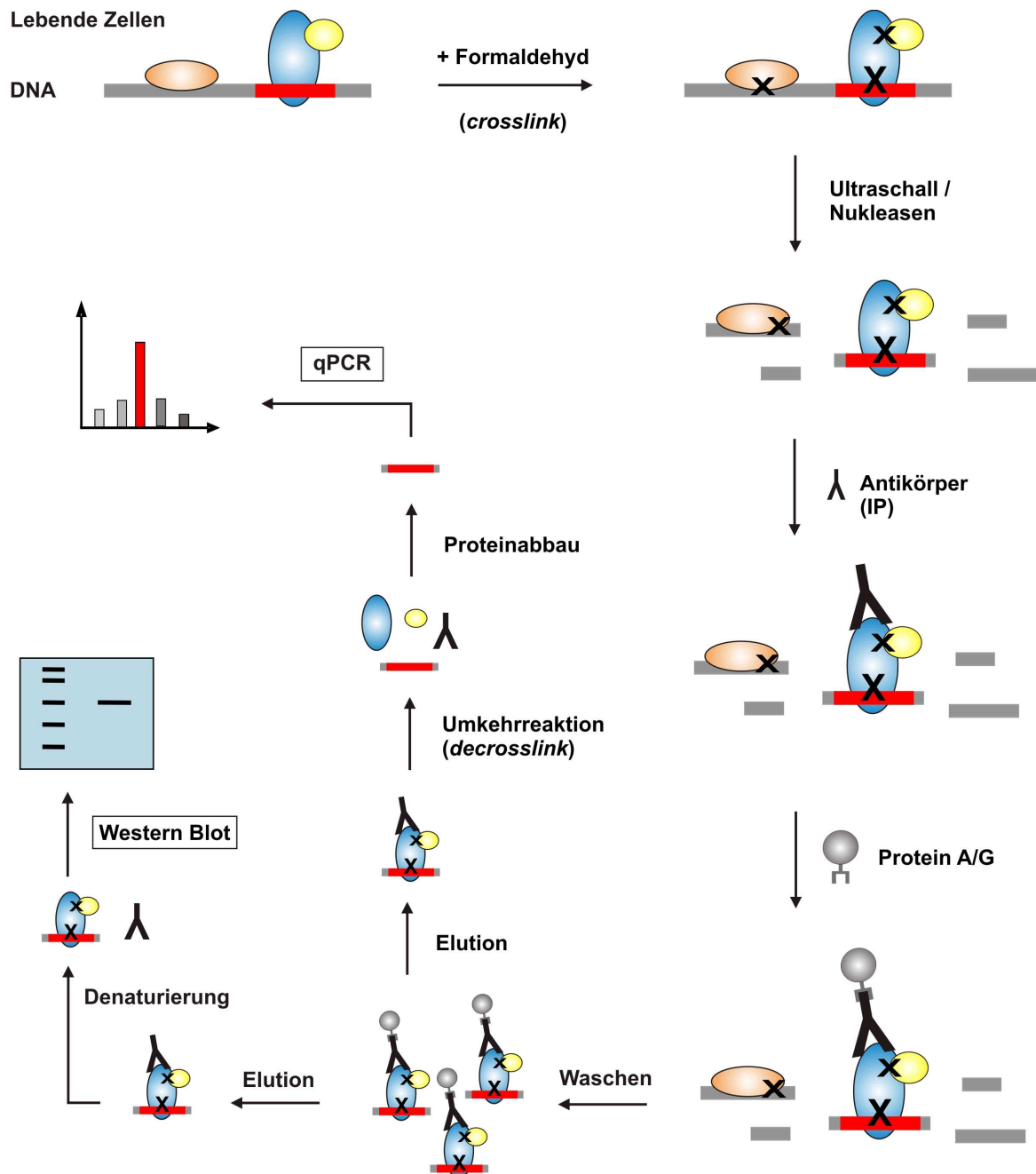


Abb. 6: Prinzip der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP). Proliferierende Zellen werden mit Formaldehyd behandelt, um Protein-DNA- und Protein-Protein-Komplexe zu fixieren (*crosslink*). Die isolierten Nucleoproteine werden mittels Ultraschall und / oder Nukleasen fragmentiert. Anschließend werden die Protein-DNA-Komplexe mit Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein immunpräzipitiert (IP). Die Zugabe von Protein A oder G-Separose ermöglicht das „Einsammeln“ der Antikörper-Protein-DNA-Komplexe, welche nach mehrmaligem Waschen von der Sepharose gelöst werden (Elution). Die Analyse der Proteinfraction erfolgt im *Western Blot*. Für die DNA-Analyse wird eine Reversion der Vernetzungen (*decrosslink*) und Deproteinierung durchgeführt. Die Identifizierung der coimmunpräzipitierten DNA-Fragmente kann mittels quantitativer *Real-Time PCR* (qPCR) erfolgen.

ChIP-Waschpuffer 2, 4x in 0,45 ml ChIP-Waschpuffer 3 und 2x in TE/10 mM Na-Bisulfit-Puffer (pH 8,0). Nach dem letzten Waschen wurde die Sepharose zu gleichen Teilen für die *Western Blot*-Analyse und *Real-Time PCR* aufgeteilt bzw. entweder alles für den *Western Blot* oder die *Real-Time PCR*-Analyse verwendet.

Proben-Präparation für *Western Blot*-Analysen. Nach dem Waschen wurde das Sepharose-Pellet mit 15 - 20 μ l 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 97°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden 5 - 10 μ l Überstand auf einem 10%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit entsprechenden Antikörpern analysiert.

Proben-Präparation für *Real-Time PCR*-Analysen. Das gewaschene Sepharose-Pellet wurde 2x mit je 150 μ l ChIP-Elutionspuffer jeweils 15 min bei 65°C im Wasserbad erhitzt und kurz zentrifugiert. Die vereinigten Überstände (\sim 300 μ l) wurden zur Reversion der *crosslinks* über Nacht im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Der *Input* wurde ebenfalls auf 300 μ l Volumen ergänzt (Endkonzentration: 200 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 1% SDS; pH 8,0) und mit den anderen Proben im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben mit 150 μ l TE (pH 8,0) und 20 μ l 20 mg/ml Proteinase K versetzt und 4 - 5 h bei 50°C inkubiert. Die Proben wurden 2x mit 1 Volumen P/C/I (25:24:1) und 1x mit 1 Volumen C/I (24:1) extrahiert und die DNA mit NaCl und 10 μ g Glykogen gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation (12000 U/min, 4°C) wurde die DNA mit 80%igem und absolutem Ethanol gewaschen und nach dem Lufttrocknen im Becherglas in 25 μ l Low TE (pH 8,0) aufgenommen. Von jeder Probe wurden 2 μ l in die *Real-Time PCR* eingesetzt.

3.2.39 *Western Blot*-Analyse

Zur Analyse der in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennten Proteine mithilfe von Antikörpern wurden die Proteine auf eine Hybond ECL-Nitrocellulosemembran transferiert. Die Komponenten des *Blots* wurden 15 min in Transferpuffer äquilibriert und luftblasenfrei wie folgt übereinandergeschichtet: 1 Fiberpad, 2 Whatman-Filterpapiere in Gelgröße, Gel, Membran, 2 Whatman-Filterpapiere, 1 Fiberpad. Der Blot wurde in einer Kassette zusammengeklemt und in die Elektrophoresekammer *Mini-Transblot-System* eingehängt. Der Proteintransfer erfolgte bei 4°C mit 100 V für 90 min oder mit 30 V über Nacht. Zur Minimierung unspezifischer Antikörperbindungen auf der Membranoberfläche wurden die proteinfreien Membranbereiche mit 0,15 ml/cm² Roti-Block-Blockpuffer abgesättigt. Dafür wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf dem Wipptisch inkubiert.

Anschließend wurde die Membran in einer größeren Petrischale 2x kurz mit TBST-Puffer gespült, dann 1x 15 min und nochmals 2x 5 min in frischem TBST geschwenkt. Danach wurde die Membran mit 0,1 ml/cm² TBST und der danach berechneten Menge des primären Antikörpers in Folie eingeschweißt und bei RT 1 h auf dem Wipptisch inkubiert. Die primären Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt: α -cORC2-Antikörper (1:1000), α -hNF1-Antikörper (1:800), α -hSp1-Antikörper (1:900), α -hOct-1-Antikörper (1:500), α -cGAS41-Antiserum (1:1000). Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit dem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert, welcher in einer Verdünnung von 1:40.000 eingesetzt wurde. Nach einem letzten Waschen erfolgte die Detektion des nachzuweisenden Proteins durch Chemilumineszenz unter Verwendung des *ECL Western Blotting System*. Das bei der Substratumsetzung durch den HRP-konjugierten sekundären Antikörper emittierte Lichtsignal wurde mit *Hyperfilm ECL*-Autoradiographiefilmen detektiert.

3.2.40 Transfektion von DT40-Zellen durch Elektroporation

Zur Transfektion von DT40-Zellen wurden 8 μ g GAS41-Expressionsvektor (CMV-gas) mit der Restriktionsendonuklease *ScaI* bzw. 25 μ g Targeting-Plasmid (pSp1Neo bzw. pSp1Puro) mit *KpnI* linearisiert und die DNA gefällt. Das DNA-Pellet wurde in 10 μ l TE (pH 7,5) aufgenommen und mit 290 μ l PBS (pH 7,2) ergänzt. Für die Transfektionen wurden am Vortag 10⁷ DT40-Zellen in 20 ml frisches Medium ohne Antibiotika überführt und 24 h kultiviert. Davon wurden pro Transfektion 10⁷ DT40-Zellen abzentrifugiert (8 min, 1500 U/min, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0 R), mit 6 ml eiskaltem PBS (pH 7,2) gewaschen und in 480 μ l PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mit der auf Eis vorgekühlten Plasmid-DNA vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte 0,4 cm-Elektroporationsküvette überführt und die Zellen mit 550 V und 25 Mikrofaraad elektroporiert (*Gene Pulser*). Nach einer erneuten 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden 210 - 260 μ l Elektroporationsansatz mit 42 ml DT40-Vollmedium vermischt und auf vier 24-Loch-Zellkulturplatten à 400 μ l/Loch verteilt. Zur Selektion der Zellen wurden 24 h nach der Transfektion 400 μ l/Loch Vollmedium mit entsprechendem Antibiotikumzusatz zugegeben, wobei folgende Endkonzentrationen im Medium eingesetzt wurden: Selektion nur mit Zeocin: 1 mg/ml, Selektion mit zwei Antibiotika: 0,75 mg/ml Zeocin, 2 mg/ml G418 (Geneticin), Selektion mit drei Antibiotika: 0,75 mg/ml Zeocin, 1 mg/ml G418, 0,5 μ g/ml Puromycin. Antibiotikumresistente Klone entwickelten sich nach etwa 7 - 10 Tagen Inkubation. Um Zelltrümmer zu entfernen wurden die Klone zunächst auf der Platte weiterkultiviert und dann in 250 ml-Kulturflaschen überführt. Zur Weiterkultur

wurden die Antibiotikum-Konzentrationen auf 0,75 mg/ml Zeocin bzw. 1 mg/ml G418 verringert. Die Puromycin-Konzentration wurde nicht verändert. Die GAS41-Expression wurde durch *Western Blot*-Analyse überprüft.

3.2.41 Präparation von chromosomaler DNA aus DT40-Zellen (ohne Kit)

Für Präparationen von etwa 50 - 70 μg chromosomaler DNA wurden 10^7 DT40-Zellen abzentrifugiert und in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß mit PBS (pH 7,2) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 μl Lysispuffer resuspendiert und 3 h bei 50°C, alternativ über Nacht bei 37°C inkubiert, bis die Probe vollständig klar wurde. Anschließend wurde die Probe 2x mit 500 μl (1 Volumen) P/C/I (25:24:1) und nochmals mit 1 Volumen C/I (24:1) extrahiert und die obere Phase nach dem letzten Zentrifugieren in ein 2 ml-Gefäß überführt. Zur DNA-Fällung wurden 19 μl 4 M NaCl (150 mM) und 1,25 ml (2,5 Volumen) absoluter Ethanol zugegeben und die Probe sehr vorsichtig gemischt, bis sich ein „Knäul“ aus chromosomaler DNA bildete. Das „DNA-Knäul“ wurde mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette herausgezogen und nacheinander in 80%igem und absolutem Ethanol geschwenkt. Die DNA wurde im Gefäß mit absolutem Ethanol pelletiert (5 min, 12000 U/min, Tischzentrifuge), luftgetrocknet und in 300 μl TE (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 8,0) bei 4°C über Nacht oder länger gelöst. Anschließend wurde die Probe mit 11,3 μl 4 M NaCl (150 mM) und 1,6 μl 10 mg/ml RNAse A (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt und nach 3 - 4-stündiger Inkubation bei 37°C mit 3,2 μl 20 % SDS (0,2 %) und 3,2 μl 20 mg/ml Proteinase K (0,2 mg/ml) versetzt. Die Probe wurde 3 h bei 50°C inkubiert und, wie oben beschrieben, mit 320 μl (1 Volumen) P/C/I (25:24:1) und C/I (24:1) extrahiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde die DNA-haltige Phase ($\sim 300 \mu\text{l}$) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Ethanol gefällt. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 50 μl TE (pH 8,0) bei 4°C über Nacht oder länger gelöst. Es wurde eine DNA-Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

3.2.42 Präparation von chromosomaler DNA aus DT40-Zellen mit dem 'Wizard Genomic DNA Purification Kit' (Promega)

Die Präparationen von chromosomaler DNA aus DT40-Zellen, die mit dem *Wizard Genomic DNA Purification Kit* durchgeführt wurden, erfolgten anhand des Protokolls „Isolating Genomic DNA from Tissue Culture Cells and Animal Tissue“. Pro Präparation wurden 10^7 Zellen abzentrifugiert (5 min, 1000 U/min, Heraeus) und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit PBS (pH 7,2) gewaschen. Das Zellpellet wurde in 600 μl *Nuclei Lysis Solution* homogen suspen-

diert, mit 3 μl *RNAse Solution* versetzt und 1 - 1,5 h bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde 5 min auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 200 μl *Protein Precipitation Solution* versetzt und 20 Sek. auf höchster Stufe mit dem Vortex gemischt. Die Probe wurde 5 min auf Eis inkubiert und 4 min bei RT zentrifugiert (13000 U/min, Tischzentrifuge). Der DNA-haltige Überstand wurde ohne Proteinpelletreste in ein frisches 1,5 ml-Gefäß überführt. Zur DNA-Fällung wurden 600 μl raumwarmes Isopropanol zugegeben und die Probe vorsichtig gemischt, bis die genomische DNA als „Knäuel“ ausfiel. Die DNA wurde pelletiert (2 min, 13000 U/min, RT), mit 600 μl 70%igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet (10 - 15 min). Die DNA wurde in 50 μl *DNA Rehydration Solution* aufgenommen und 1 h bei 65°C oder über Nacht bei 4°C gelöst. Danach wurde eine DNA-Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

3.2.43 Herstellung von DNA-Sonden

Zur Herstellung der DNA-Sonde HB für *Southern*-Hybridisierungen wurden 15 μg des Plasmids Cl-196/5 durch *Bam*HI / *Hind*III-Doppelrestriktion geschnitten und auf 1,4%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die aus dem Gel eluierte \sim 550 bp Sonden-Bande wurde in TE (pH 7,5) gelöst.

3.2.44 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte mit dem *Random Primed DNA Labeling Kit*. Für eine Markierung wurden 250 ng Sonden-DNA mit sterilem H₂O auf ein Volumen von 9 μl aufgefüllt, 10 min bei 97°C denaturiert und rasch auf Eis abgekühlt. Nun wurden 3 μl dNTP-Mix (dATP, dGTP, dTTP), 2 μl Reaktionspuffer, 5 μl (25 μCi) [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) und 1 μl Klenow-Enzym zugegeben und der Markierungsansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Um nicht inkorporierte Nukleotide zu entfernen wurde der Markierungsansatz mit von 30 μl STE (pH 8,0) versetzt und über *Quick Spin Columns* (Sephadex 50) zentrifugiert (2500 U/min, Bactifuge). Pro Markierungsansatz wurde eine Säule verwendet. Anschließend wurde die Radioaktivität des Säulendurchlaufs (Eluat) mit einem Szintillationsmessgerät (β -Counter) bestimmt.

3.2.45 Southern Blot-Analyse

Durch *Southern Blot*-Analysen wurden spezifische DNA-Sequenzen in der chromosomalen DNA von transfizierten DT40-Zellen detektiert. Hierfür wurden in einem 100 μl -Ansatz

10 μg chromosomale DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten (37°C , 6 h), gefällt und in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die DNA wurde nach der Methode von Southern (1975) auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (siehe Kap. 3.2.44) hybridisiert.

DNA-Transfer. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in jeweils 200 ml der folgenden Lösungen inkubiert: 2x 10 min in Depurinierungslösung, 2x 30 min in Denaturierungslösung und 2x 30 min in Neutralisierungslösung. Beim Wechsel zur nächsten Lösung wurde das Gel zweimal mit dest. H_2O gespült. Der DNA-Transfer vom Agarosegel auf die Nylonmembran (Hybond N^+) erfolgte im Kapillarblot über Nacht mit 20x SSC als Transferpuffer. Die Blot-Komponenten wurden wie folgt luftblasenfrei übereinandergeschichtet, wobei die Whatman-Papiere und Nylonmembran auf Gelgröße zurechtgeschnitten waren: Zunächst wurde der umgedrehte Gelträger in eine Schale gelegt und diese bis zur Unterkante des Gelträgers mit 20x SSC-Puffer gefüllt. Als Pufferbrücke wurden vier Lagen Whatman-Papier so auf den Gelträger gelegt, dass die vier Enden in das Pufferreservoir eintauchten. Danach wurden nacheinander fünf Lagen mit 20x SSC befeuchtetes Whatman-Papier, das Agarosegel, die ebenfalls befeuchtete Nylonmembran und nochmals zwei Lagen befeuchtetes Whatman-Papier übereinandergeschichtet. Die Ränder (1 - 2 cm) wurden mit Haushaltsfolie abgedeckt. Es wurden drei weitere Lagen Whatman-Papier aufgelegt und mit 20x SSC durchfeuchtet. Den Abschluss bildete ein Stapel trockenes, saugfähiges Papier mit einer Deckplatte darüber, welche mit 0,5 - 1 kg Gewicht beschwert wurde. Nach vollendetem Transfer wurde die Membran 2 h bei 80°C erhitzt, um die übertragene DNA auf der Membran zu fixieren.

Hybridisierung. Um unspezifische Nukleinsäurebindestellen auf der Membran abzusättigen wurde diese mit $0,1 \text{ ml/cm}^2$ vorgewärmter Hybridisierungslösung und $2,7 \mu\text{g/cm}^2$ gescherter, denaturierter Heringssperma-DNA in einer Hybridisierungsflasche für mindestens 5 h bei 68°C im Rollofen inkubiert. Zur Denaturierung der Heringssperma-DNA wurde diese 20 min bei 97°C erhitzt und rasch auf Eis abgekühlt. Nach dem Abgießen der Lösung wurden $0,03 \text{ ml/cm}^2$ frische Hybridisierungslösung, $1 \mu\text{g/cm}^2$ denaturierte Heringssperma-DNA sowie 15.000 - 40.000 cpm/cm² radioaktiv markierte und denaturierte Sonde zugegeben. Die Inkubation wurde bei 68°C über Nacht fortgesetzt. Danach wurde die Membran 2x mit je 50 ml vorgewärmter Waschlösung 1 gespült. Anschließend wurde die Membran 2x 30 min mit je 60 ml Waschlösung 1, 2x 30 min mit je 60 ml Waschlösung 2 und 2x 30 min mit je 60 ml Waschlösung 3 im Rollofen bei 68°C gewaschen. Die Membran wurde luftgetrocknet, in Haushaltsfolie eingeschlagen und nach dem Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak Biomax MS) für 1 - 2 Tage bei -80°C autoradiographiert.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von DNA-Bindestellen für Initiationsproteine des Hühner-Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro*

Aus der Nukleotidsequenz der Lysozym-GAS41-OBR-Region mit der höchsten Initiationsaktivität (Abb. 7) geht hervor, dass dort zahlreiche Konsensusbindungssequenzen ubiquitärer Transkriptionsfaktoren wie Sp1 (*Specificity protein 1*), NF1 (*Nuclear factor 1*) und Oct-1 (*Octamer-binding protein 1*) existieren. Für diese Transkriptionsfaktoren ist bereits eine essentielle Funktion bei der Replikation vieler DNA-Viren und bei der DNA-Replikation einiger Eukaryonten gezeigt worden (siehe Einleitung und Diskussion). Um die DNA-Bindestelle von ORC2 (*Origin Recognition Complex Protein 2*) und der Transkriptionsfaktoren Sp1, Oct-1 und NF1 im Lysozym-GAS41-OBR zu identifizieren, wurden *in vitro*-Gelretardationsanalysen (EMSA und *Immunomobility Shift*-Assays) durchgeführt. Hierbei wurden synthetische Oligonukleotide und DNA-Restriktionsfragmente aus der Lysozym-OBR/GAS41-Promotorregion (Abb. 7 und 8), welche potentielle Bindungssequenzen für die oben genannten Faktoren enthalten, hinsichtlich spezifischer Interaktionen mit Sp1, Oct-1, NF1 und ORC2 untersucht.

4.1.1 Oct-1 bindet an eine „Octamer-Motiv“-ähnliche Nukleotidsequenz des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro*

Bei der Suche nach potentiellen Bindestellen für Initiationsproteine des Lysozym-GAS41-OBRs wurde die Nukleotidabfolge 5'-ACGCAAAC-3' identifiziert (siehe Abb. 7), welche eine starke Homologie zu der „Octamer-Motiv“ bezeichneten Konsensusbindungssequenz 5'-ATGCAAAT-3' (Verrijzer et al., 1992) aufweist. Das „Octamer-Motiv“ ist als Bindemotiv des Transkriptionsfaktors Oct-1 bekannt (Verrijzer et al., 1992). Die im Lysozym-OBR/GAS41-Promotor identifizierte Nukleotidsequenz ist mit dem Octamer-Motiv jedoch nicht vollständig identisch, da sie an zwei Nukleotidpositionen statt eines Thymins (T) ein Adenin (A) aufweist. Dennoch wurde vermutet, dass diese Nukleotidsequenz eine Bindestelle des ubiquitären Transkriptionsfaktors Oct-1 ist.

Um diese Vermutung zu überprüfen wurde zunächst Oligonukleotid BC, welches die Octamer-Motiv-ähnliche Sequenz enthält (Abschnitt B und C in Abb. 7 und 8), im Rahmen von Gelretardationsexperimenten mit Kernextrakt aus Zellen der Humanhepatozytenzelllinie Hep G2 analysiert. Wie aus dem Experiment in Abb. 9 A hervorgeht, bildet radioaktiv markiertes Oligo-

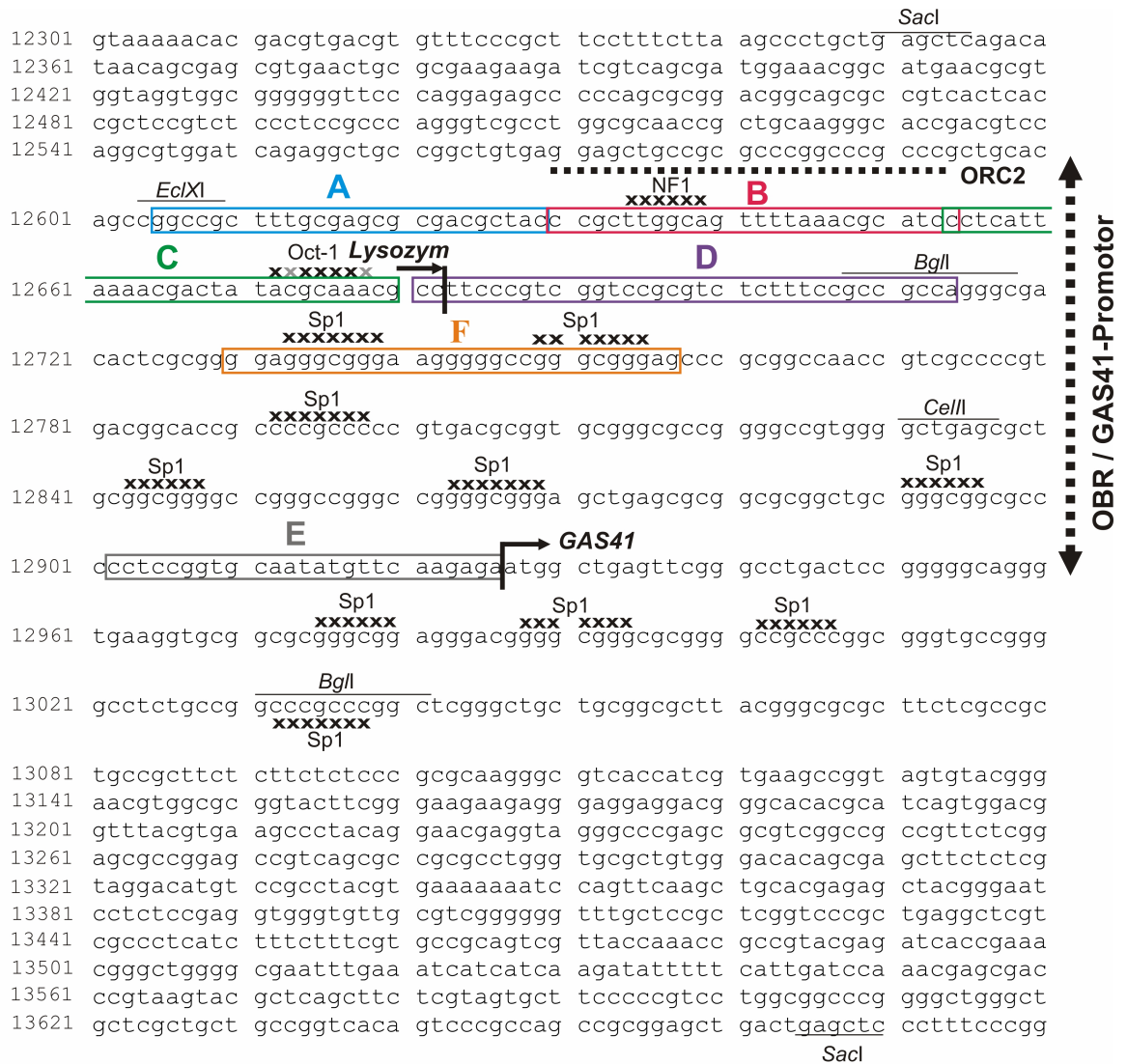


Abb. 7: Nukleotidsequenz des Lysozym-GAS41-OBR/GAS41-Promotors und angrenzender DNA-Bereiche. Die Kreuze markieren Nukleotidsequenzen mit Homologie zu Konsensusbindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren Oct-1, NF1 und Sp1. Die ORC2-Bindestelle ist ebenfalls angedeutet. Senkrechte Balken mit horizontalen Pfeilen markieren das 3'-Ende des Lysozymgens bzw. das ATG-Startcodon des GAS41-Gens. Farbige Boxen mit den Bezeichnungen A-F kennzeichnen einzelne OBR-Teilsequenzen. Ausserdem sind wichtige Restriktionsschnittstellen eingezeichnet. Die vollständige kodierende DNA-Sequenz des Hühnerlysozym- und GAS41-Gens einschließlich regulatorischer Regionen kann in der Sequenzdatenbank www.ncbi.nlm.nih.gov unter Accession no. AF410481 abgerufen werden.

nukleotid BC mit Kernproteinen aus Hep G2-Zellen mehrere unterschiedlich stark retardierte Protein-DNA-Komplexe (Spur 1). Die Bindungsspezifität der Komplexe wurde durch Kompetitionsexperimente untersucht, bei denen die Proteinbindung an die radioaktiv markierte Probe durch eine im Überschuss zugesetzte, unmarkierte DNA kompetiert wird. Die Abb. 9 A zeigt, dass die Ausbildung der Komplexbande mit der geringsten Mobilität durch die unmarkier-

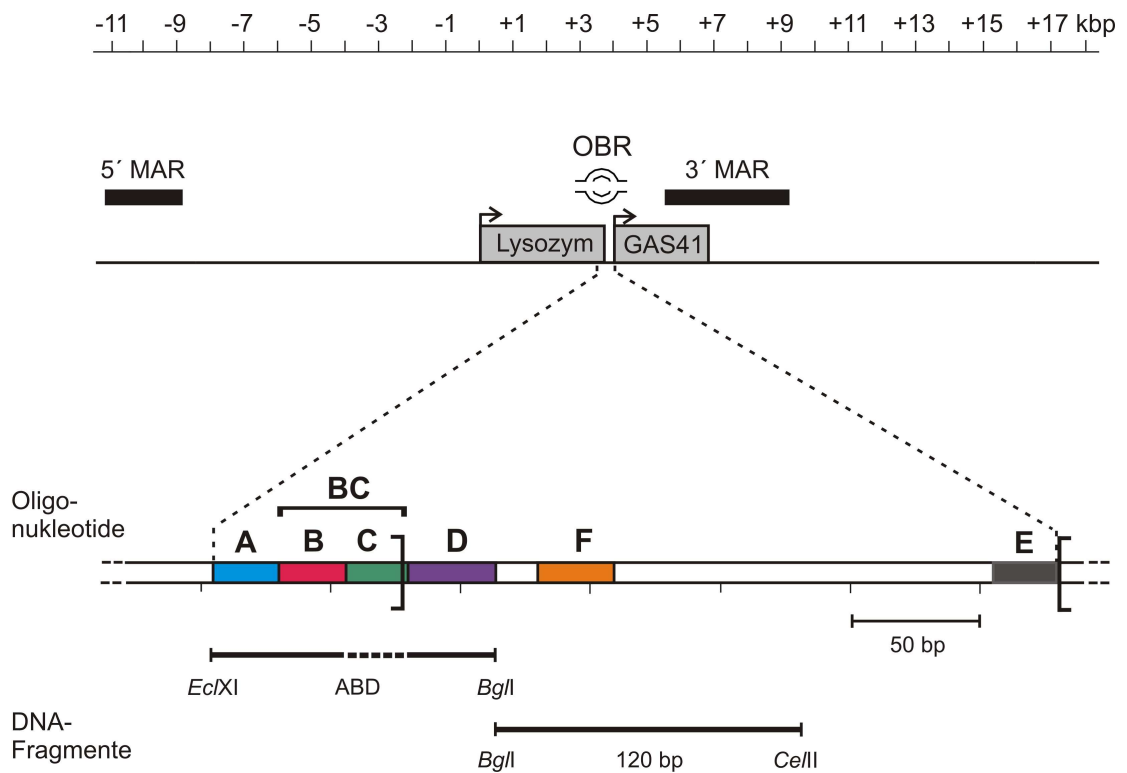


Abb. 8: Schematische Darstellung der in den *in vitro*-Gelretardationsexperimenten (EMSA) eingesetzten Oligonukleotide und DNA-Fragmente und ihre Position im chromosomalen Hühner-Lysozym-GAS41-Genlocus. Oben: Der Lysozym-GAS41-Genlocus des Huhns mit dem zwischen Lysozymgen und GAS41-Gen lokalisierten Replikationsursprung (OBR). Unten: Ausschnitt der OBR-Region mit angrenzenden Bereichen. A, B, C, BC, D, ABD, E, F sowie 120 bp bezeichnen Teilsequenzen aus der OBR/ GAS41-Promotorregion. MAR, *matrix attachment region*; OBR, *origin of bidirectional DNA replication*.

te DNA-Probe selbst (Oligo BC), durch dessen 3'-Hälfte mit der Octamer-Motiv-ähnlichen Sequenz (Oligo C) sowie durch ein Oct-1-spezifisches Oligonukleotid (Oct1), welches das Octamer-Motiv enthält, gehemmt wurde (Spuren 3, 5, 4). Im Gegensatz dazu konnte die Proteinbindung an die markierte Probe BC durch einen Überschuss der Kontroll-DNAs (Oligo E und 120 bp) nicht inhibiert werden (Spuren 2, 6). Dass die Bildung der Komplexbande mit der geringsten Mobilität mit den sequenzspezifischen Kompetitoren BC, C und Oct1, nicht aber mit den -unspezifischen Kompetitoren E und 120 bp-Fragment verhindert wurde, wies drauf hin, dass diese Komplexbande spezifisch gebildete Protein-DNA-Komplexe enthält. Zudem lässt das Ergebnis vermuten, dass in dem von Oligo E und dem 120 bp-Fragment abgedeckten Chromatinbereich keine weiteren Oct-1-Bindestellen existieren. Desweiteren weist die erfolgreiche Konkurrenz mit dem Oct-1-spezifischem Oligonukleotid darauf hin, dass Oct-1 in den spezifischen Komplexen enthalten sein könnte. Um dies zu überprüfen wurden Kompetiti-

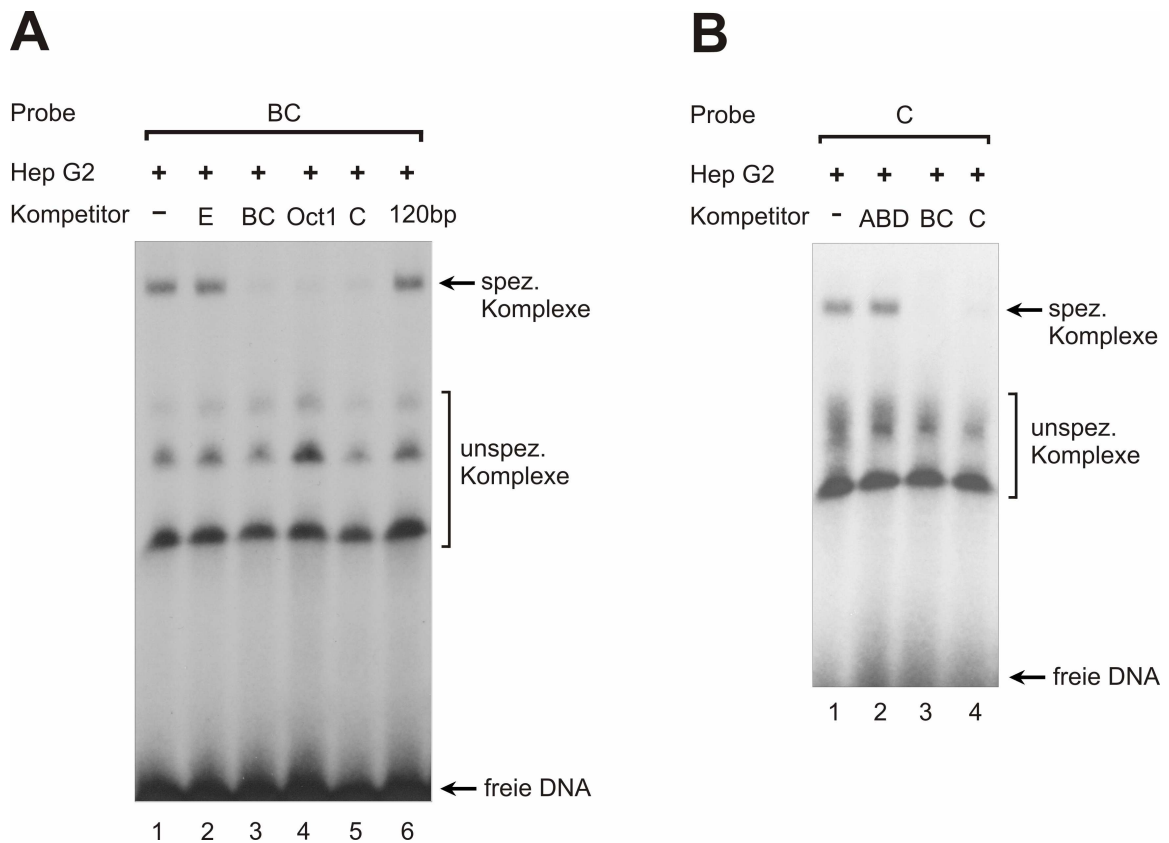


Abb. 9: Spezifische Proteinbindung an eine „Octamer-Motiv“-ähnliche Nukleotidsequenz des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro*. (A) EMSA mit radioaktiv-markiertem Oligonukleotid BC und Kernextrakt aus humanen Hep G2-Hepatozyten (10 μ g) in Gegenwart eines \sim 100-fachen Überschusses verschiedener unmarkierter Kompetitor-DNAs (BC, C, E, Oct1, 120 bp) und ohne Kompetitor (-). Kompetitor Oct1 enthält das Octamer-Motiv. (B) EMSA mit radioaktiv-markiertem Oligonukleotid C und Hep G2-Kernextrakt (10 μ g) in Gegenwart eines \sim 100-fachen Überschusses unmarkierter Kompetitor-DNAs (ABD, BC, C) und ohne Kompetitor (-). Nach der Inkubation wurden die Ansätze auf nativen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, die Gele getrocknet und autoradiographiert. Die Position spezifischer und unspezifischer Protein-DNA-Komplexe ist markiert.

onsexperimente mit Oligonukleotid C als radioaktiv markierte Probe durchgeführt (Abb. 9 B). Auch in diesem Experiment wurde die Bildung der spezifischen Komplexbande durch einen Überschuss der Kompetitoren BC und C verhindert (Spuren 3, 4), nicht aber durch einen Überschuss der Kontroll-DNA ABD (Spur 2). Die Ergebnisse in Abb. 9 zeigen, dass *in vitro* spezifische Protein-DNA-Interaktionen zwischen Kernproteinen und Oligonukleotid C, welches die Octamer-Motiv-ähnliche Sequenz enthält, stattfinden. Zusammen deuten die Ergebnisse der gezeigten Kompetitionsexperimente darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor Oct-1 an die Octamer-Motiv-ähnliche Sequenz bindet. Um Oct-1 als Bestandteil der spezifischen Komplexe eindeutig nachzuweisen, wurden *Immunomobility Shift*-Analysen mit spezifischen α -hOct-1-Antikörpern durchgeführt. Bei der Durchführung wurden zunächst die Kernextrakte

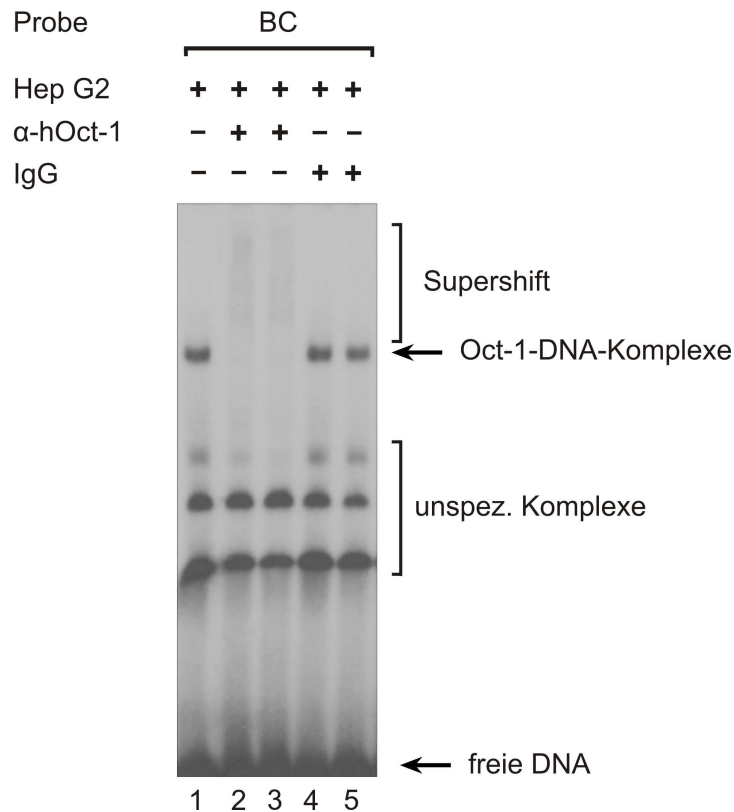


Abb. 10: Oct-1 bindet an eine „Octamer-Motiv“-ähnliche Nukleotidsequenz des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro*. *Immunomobility Shift-Analyse* mit radioaktiv-markiertem Oligonukleotid BC, Kernextrakt aus humanen Hep G2-Hepatozyten (10 μ g) nach Zugabe eines Antikörpers gegen hOct-1 (α -hOct-1), eines unspezifischen Antikörpers (IgG) und ohne Antikörper (-). Die Ansätze wurden wie in EMSAs weiterbehandelt. Zugabe: α -hOct-1 0,8 μ g (Spur 2), 2 μ g (Spur 3), IgG 0,4 μ g (Spur 4), 0,8 μ g (Spur 5). Die Antikörper-Oct-1-DNA-Komplexe sind als „Supershift“ zu sehen.

mit dem Antikörper inkubiert und erst nach einer 45-minütigen Inkubation mit der markierten DNA versetzt. Als Kontrollantikörper dienen unspezifische IgGs aus Kaninchen-Präimmunserum. Das Experiment in Abb. 10 zeigt, dass die Zugabe des α -hOct-1-Antikörpers zu einem *Supershift* bzw. einem Verschwinden der spezifischen Komplexbanden führte (Spuren 2, 3). Die Zugabe des unspezifischen Kontrollantikörpers hatte dagegen keine Auswirkung auf das Laufverhalten der spezifisch gebildeten Protein-DNA-Komplexe (Spuren 4, 5). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde geschlossen, dass der Transkriptionsfaktor Oct-1 *in vitro* mit einer Octamer-Motiv-ähnlichen Nukleotidsequenz aus dem Lysozym-GAS41-OBR interagiert und dass der Lysozym-GAS41-OBR auch *in vivo* eine Oct-1-Bindestelle enthält.

4.1.2 Sp1 bindet an „GC-Boxen“ des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro*

Der Transkriptionsfaktor Sp1 bindet an die als „GC-Box“ bezeichnete, GC-reiche, Konsensussequenz 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' (Kadonaga et al., 1987). Da im Bereich des Lysozym-OBRs und GAS41-Promotors zahlreiche solcher „GC-Boxen“ vorkommen (Abb. 7) wurde untersucht, ob Sp1 mit diesen potentiellen Bindestellen interagiert. Um dies herauszufinden wurde Oligonukleotid F, das zwei der im OBR/GAS41-Promotor vorkommenden „GC-Boxen“ enthält (siehe Abb. 7), mit Kernextrakt aus Zellen der Hühnerhepatozytenzelllinie DU249 inkubiert (Abb. 11). Das Experiment zeigt, dass Oligonukleotid F mit Kernproteinen aus DU249-Zellen mehrere DNA-Protein-Komplexe bildet (Spur 1). Die Bindungsspezifität der gebildeten Protein-DNA-Komplexe wurde wiederum durch den Zusatz unmarkierter Kompetitor-DNAs, hier Oligonukleotid F und D, untersucht. Kompetitor F konnte die Ausbildung der Komplexbande mit der geringsten Mobilität inhibieren (Spur 3), wohingegen dies die Kontroll-DNA, Kompetitor D, nicht vermochte (Spur 2). Dies ließ den Schluss zu, dass die Komplexbande mit der geringsten Mobilität durch spezifische

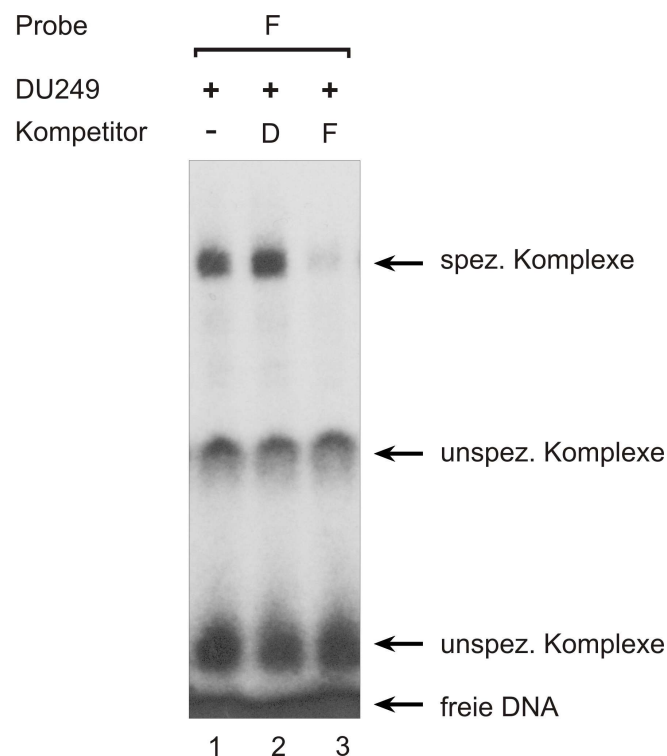


Abb. 11: Spezifische Proteinbindung an ein „GC-Boxen“-enthaltendes DNA-Fragment des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro*. EMSA mit radioaktiv-markiertem Oligonukleotid F und Kernextrakt aus hühnerhepatozytischen DU249-Zellen (10 μ g) in Gegenwart eines \sim 100-fachen Überschusses unmarkierter Kompetitor-DNA (D, F) und ohne Kompetitor (-). Die Position spezifischer und unspezifischer Protein-DNA-Komplexe ist markiert.

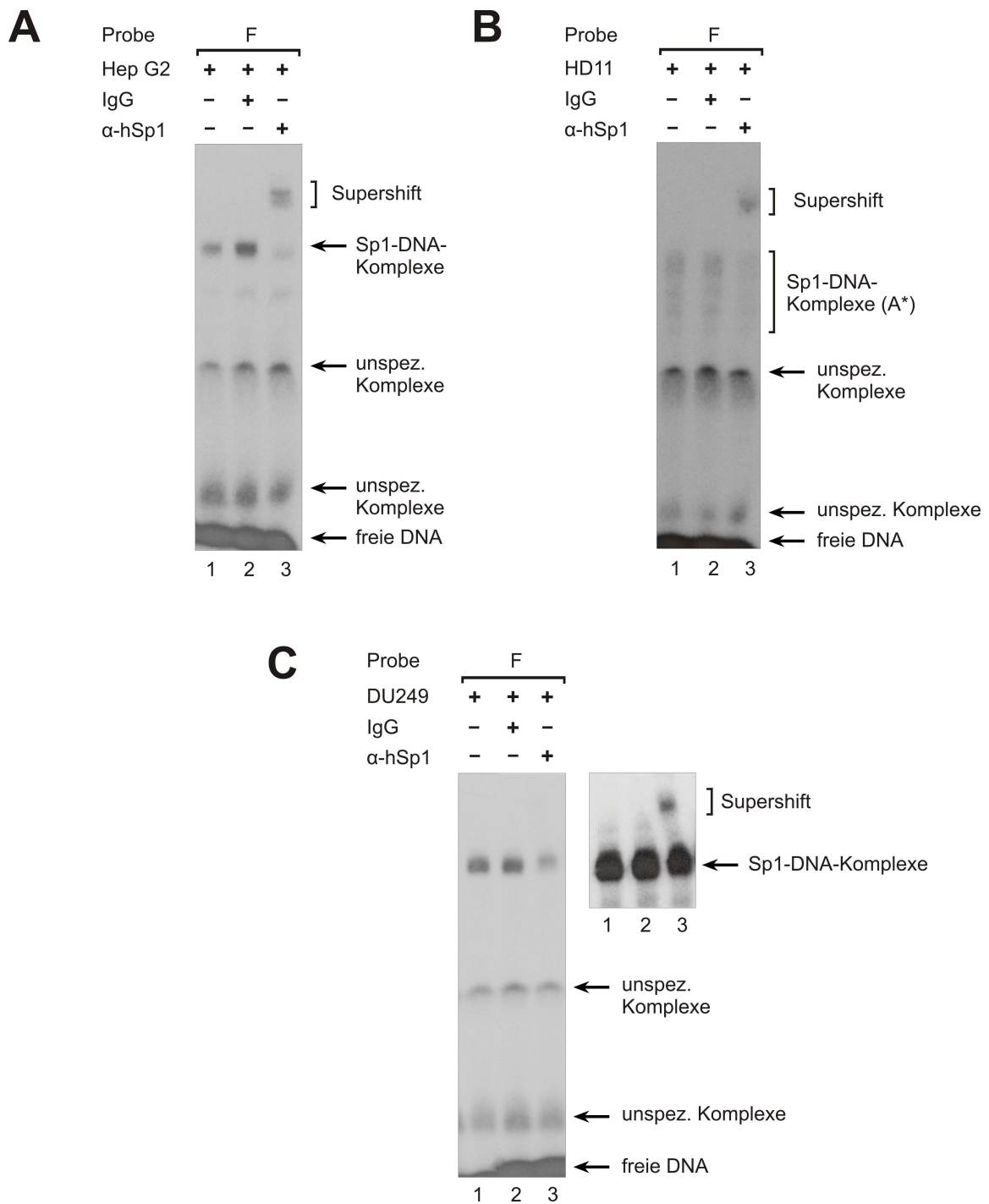


Abb. 12: Sp1 bindet an „GC-Boxen“ des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro*. Radioaktiv-markiertes Oligonukleotid F wurde mit je 10 μ g Kernextrakt aus (A) humanen HepG2-Zellen, (B) HD11-Zellen und (C) DU249-Zellen und Antikörpern gegen hSp1 (α -hSp1), unspezifischen Antikörpern (IgG) und ohne Antikörper (-) inkubiert. Die Ansätze wurden wie in EMSAs weiterbehandelt. In (B) bestehen die Komplexe teilweise aus Abbauprodukten (A*). Die kleine Abb. in (C) zeigt den oberen Teil des Gels nach längerer Exposition des Autoradiographiefilms. Zugabe in A-C jeweils 3,2 μ g Antikörper. Die Antikörper-Sp1-DNA-Komplexe sind als „Supershift“ zu sehen.

Protein-DNA-Interaktionen entstanden war. In weiterführenden *Immunomobility Shift*-Experimenten wurde mithilfe von α -hSp1-Antikörpern geprüft, ob Sp1 in den Oligonukleotid F-spezifischen Protein-DNA-Komplexen enthalten ist (Abb. 12). Es wurden Kernextrakte aus drei verschiedenen Zelllinien eingesetzt, aus Hep G2-Humanhepatozyten (Abb. 12 A), HD11-Hühnermyelomonozyten (Abb. 12 B) und DU249-Hühnerhepatozyten (Abb. 12 C). Bei allen drei Zelllinien führte die Zugabe des α -hSp1-Antikörpers zu einem *Supershift* der spezifischen Komplexe (jeweils Spur 3), wohingegen mit dem Kontrollantikörper kein *Supershift* erzeugt wurde (jeweils Spur 2). Die dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 mit „GC-Boxen“ des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro* interagiert. Es wurde angenommen, dass Sp1 auch *in vivo* an die im Lysozym-GAS41-OBR/GAS41-Promotor vorkommenden Sp1-Bindestellen („GC-Boxen“) binden könnte.

4.1.3 ORC2 bindet an eine AT-reiche Sequenz aus dem Lysozym-GAS41-OBR *in vitro*

In der GC-reichen Lysozym-OBR/GAS41-Promotorregion existiert eine kurze Nukleotidsequenz, welche einen im Vergleich zur umgebenden DNA leicht erhöhten AT-Gehalt (53% AT) aufweist (Abschnitte B und C in Abb. 7). Da der ORC-Komplex bevorzugt an AT-reiche Sequenzen bindet (Vashee et al., 2003), wurde vermutet, dass diese AT-reiche Sequenz die ORC-Bindestelle des Lysozym-GAS41-OBRs enthalten könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen wurde untersucht, ob die ORC2-Untereinheit des ORC-Komplexes mit dieser DNA-Sequenz interagiert. In den zu diesem Zweck durchgeführten Gelretardationsexperimenten wurde Oligonukleotid B, das die 5'-Hälfte der AT-reichen Nukleotidsequenz umfasst, radioaktiv markiert und mit Kernextrakt aus Hep G2-Humanhepatozyten (Abb. 13 A) und DU249-Hühnerhepatozyten (Abb. 13 B) inkubiert. Das Experiment in Abb. 13 A zeigt, dass Kernproteine aus Hep G2-Humanzellen mit Oligonukleotid B mehrere Protein-DNA-Komplexe bilden (Spur 1). Zur Überprüfung der Proteinbindungsspezifität wurden Konkurrenzexperimente mit den Kompetitor-DNAs BC, B, C und D (siehe Abb. 7 und 8) durchgeführt. Aus Abb. 13 A geht hervor, dass die Bildung der Protein-DNA-Komplexe mit der geringsten Mobilität durch einen Überschuss des unmarkierten Oligonukleotids B vollständig (Spur 3), durch Oligonukleotid BC teilweise (Spur 2) und durch Oligonukleotid C überhaupt nicht verhindert wurde (Spur 4). Daraus wurde geschlossen, dass die Komplexe mit der geringsten Mobilität aufgrund von sequenzspezifischen Interaktionen entstanden waren. Die beiden diskreten Komplexbanden waren dagegen unspezifisch, weil deren Bildung durch die Zugabe der Kompetitoren nicht beeinflusst wurde. In dem in Abb. 13 B gezeigten Gelretardationsexperiment mit

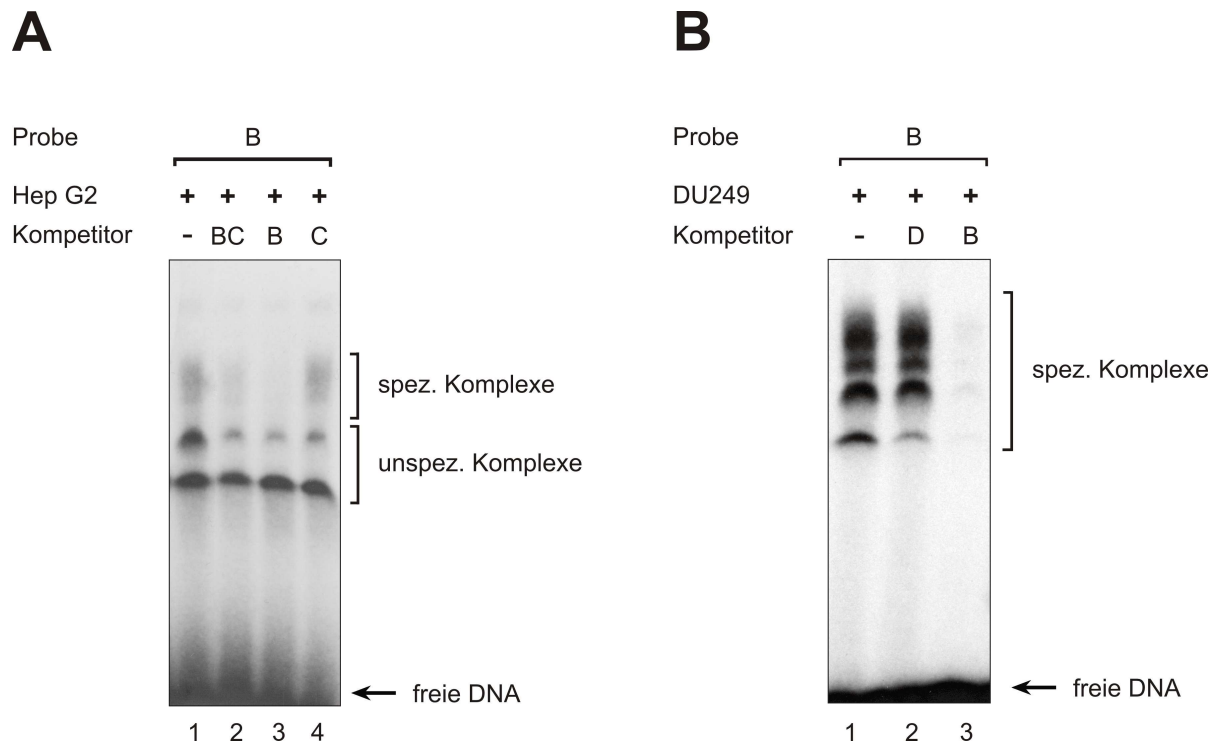


Abb. 13: Spezifische Proteinbindung an eine AT-reiche Nukleotidsequenz des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro*. In EMSAs wurde radioaktiv markiertes Oligonukleotid B mit je 10 μg Kernextrakt aus (A) der humanen Hepatozytenzelllinie Hep G2 und (B) der Hühnerhepatozytenzelllinie DU249 in Gegenwart eines ~ 100 -fachen Überschusses verschiedener unmarkierter Kompetitor-DNAs (B, C, BC, D) und ohne Kompetitor (-) inkubiert. Die Ansätze wurden auf nativen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, die Gele getrocknet und autoradiographiert. Die Position spezifischer und unspezifischer DNA-Protein-Komplexe ist markiert.

DU249-Kernextrakt wurden ebenfalls mehrere Komplexbanden gebildet (Spur 1). Alle Komplexe waren spezifisch, weil deren Bildung durch den unmarkierten Kompetitor Oligonukleotid B (Spur 3), aber nicht durch eine unmarkierte Kontroll-DNA (Oligonukleotid D) kompetiert wurde (Spur 2). Zur Klärung der Frage, ob ORC2 in den Oligonukleotid B-spezifischen Komplexen enthalten ist, wurden *Immunomobility Shift*-Analysen mit einem α -hORC2-Antiserum durchgeführt (Abb. 14). Die mit Kernextrakt aus humanen Hep G2-Zellen (Abb. 14 A) und DU249-Hühnerhepatozyten (Abb. 14 B) durchgeführten *Immunomobility Shift*-Analysen zeigen, dass die Zugabe des α -hORC2-Antiserums eine Signalabschwächung der spezifischen Komplexe bewirkte (jeweils Spur 3). Ein *Supershift*, der durch eine zusätzliche Antikörperbindung hervorgerufen würde, war allerdings in keinem Experiment zu erkennen. Die Zugabe des Kontrollantikörpers hatte keine Auswirkung auf die Signalintensitäten (jeweils Spur 2). Die gezeigten Ergebnisse deuten drauf hin, dass ORC2 ein Bestandteil der Oligonukleotid B-spezifischen Komplexe ist und *in vitro* mit der 5'-Hälfte der AT-reichen Sequenz interagiert.

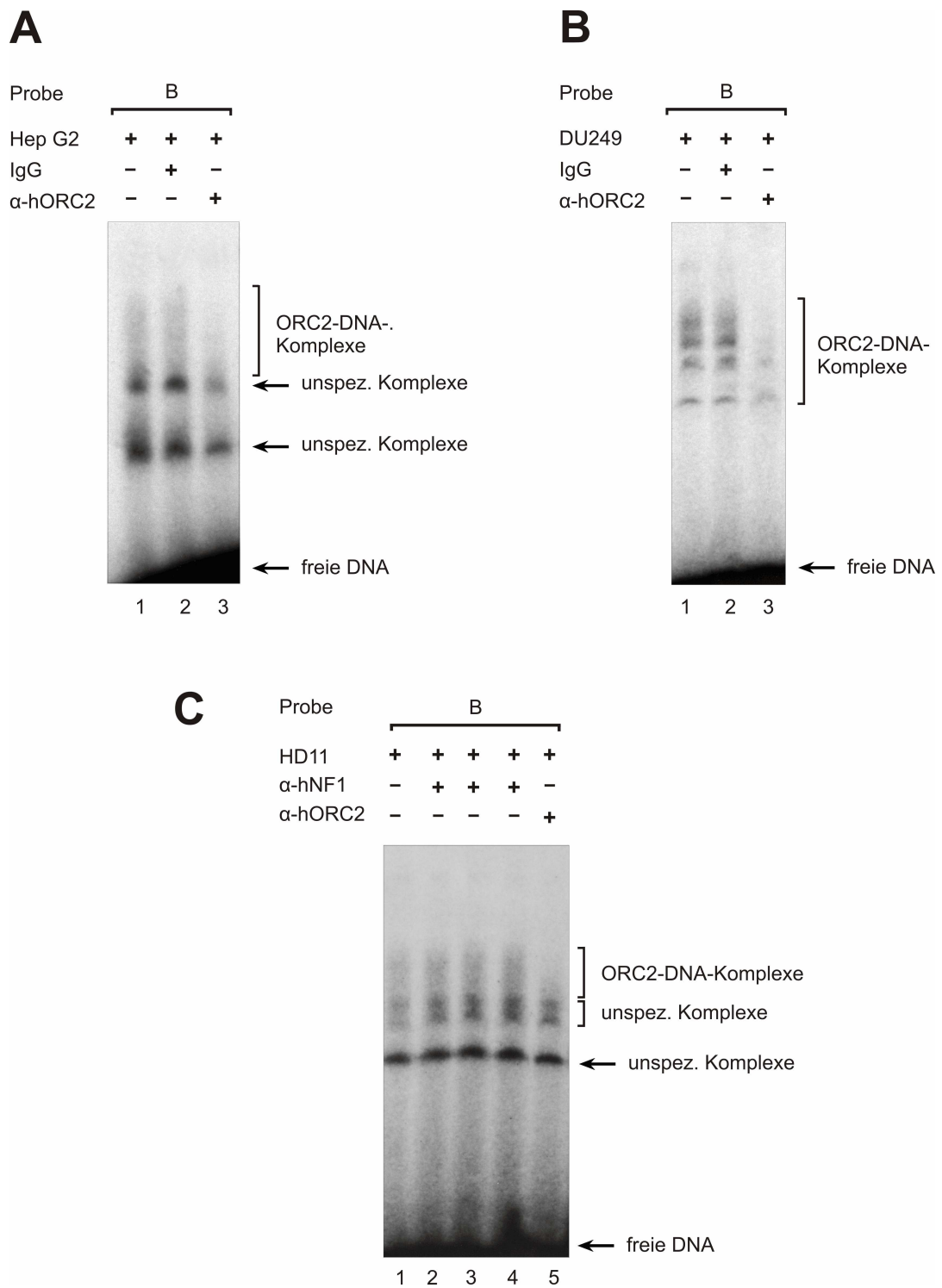


Abb. 14: ORC2 bindet an eine AT-reiche Nukleotidsequenz des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro*. Radioaktiv markiertes Oligonukleotid B wurde mit Kernextrakt aus **(A)** humanen Hep G2-Zellen (12 μ g), **(B)** DU249-Zellen (10 μ g) und **(C)** HD11-Zellen (12,5 μ g) und einem Antiserum gegen hORC2 (α -hORC2), einem Antikörper gegen hNF1 (α -hNF1), einem unspezifischem Antikörper (IgG) und ohne Antikörper (-) inkubiert. Zugabe in (A): jeweils 1:100; (B) IgG 4 μ g, α -hORC2 1:10; (C): α -hNF1 0,08 μ g (Spur 2), 0,16 μ g (Spur 3), 0,4 μ g (Spur 4), α -hORC2 1:100.

Daraus wurde abgeleitet, dass ORC2 auch *in vivo* an diesem Sequenzabschnitt binden könnte. Aus der Nukleotidsequenz des Lysozym-OBR/GAS41-Promotors geht hervor, dass im Abschnitt B auch ein Bindemotiv für den Transkriptionsfaktor NF1 vorkommt (siehe Abb. 7). Die potentielle NF1-Bindestelle hat die Basenabfolge 5'-TTGGCA-3' und entspricht damit dem Halb-Palindrom des als NF1-Konsensusbindungssequenz bekannten Bindemotivs '5-TTGGCA(N₄)TGCCAA-3' (Leegwater et al., 1985; Shigehiro et al., 1996). Es ist bekannt, dass NF1, wenn auch mit etwas geringerer Affinität, an das Halb-Palindrom 5'-TTGGCA-3' bindet (Meisterernst et al., 1988a; Shigehiro et al., 1996). Ob NF1 auch eine Komponente der Oligonukleotid B-spezifischen Komplexe ist, wurde durch *Immunomobility Shift*-Experimente unter Verwendung eines α -hNF1-Antikörpers untersucht (Abb. 14 C). Durch den in steigender Konzentration zugesetzten α -hNF1-Antikörper wurde weder ein *Supershift* noch eine Signalabschwächung der spezifischen Protein-DNA-Komplexe erzeugt (Spuren 2-4). Dagegen führte die Zugabe des α -hORC2-Antiserums abermals zu einer Signalabschwächung dieser Komplexe, wobei allerdings auch hier kein *Supershift* erzeugt wurde (Spur 5). Somit wurde festgestellt, dass NF1 in den Oligonukleotid B-spezifischen Proteinkomplexen nicht enthalten war und dass NF1 daher vermutlich auch *in vivo* nicht an der identifizierten DNA-Sequenz bindet.

4.2 Herstellung eines polyklonalen α -cORC2-Antikörpers

Um die Bindung von ORC2 an den Lysozym-GAS41-OBR mithilfe der ChIP-Technik untersuchen zu können, war ein spezifisch und stark mit dem Hühner-ORC2-Protein (cORC2) reagierender Antikörper notwendig. Ein freundlicherweise von Herrn Prof. R. Knippers (Universität Konstanz) zur Verfügung gestellter α -hORC2-Antikörper sowie das für die *in vitro*-Gelretardationsexperimente eingesetzte α -hORC2-Antiserum reagierten im *Western Blot* zwar spezifisch, aber nur schwach mit cORC2 (siehe Abb. 17). Andere käufliche α -hORC2-Antikörper reagierten mit cORC2 praktisch überhaupt nicht (nicht gezeigt). Daher mußte ein speziell gegen cORC2 gerichteter Antikörper hergestellt werden. Hierfür wurde zunächst ein ORC2-Expressionsvektor konstruiert. Dieser ermöglichte die bakterielle Expression eines rekombinanten cORC2-Polypeptids, welches zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet wurde.

4.2.1 Konstruktion des cORC2-Expressionsvektors pETOrc2

Zur Konstruktion des Plasmids pETOrc2 wurde ein 704 bp DNA-Fragment aus der C-terminalen Hälfte der cORC2-cDNA (Nukleotide 1061 - 1765) unter Verwendung der PCR-Primer Orc2-for und Orc2-rev mit Plasmid riken1_17f11 (Caldwell et al., 2004) als Matrize amplifiziert. Plasmid riken1_17f11 enthält eine cDNA mit dem 1710 bp umfassenden *open reading frame* (Nukleotide 37 - 1747), der für das aus 569 Aminosäuren bestehende cORC2-Protein kodiert, sowie 5'- und 3'- untranslatierte Sequenzen. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn Prof. J.-M. Buerstedde (Institut für Molekulare Radiobiologie, GSF, Neuherberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Nukleotidsequenz der cORC2-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz ist im Anhang A.4 dargestellt und kann in den Sequenzdatenbanken www.ncbi.nlm.nih.gov (Accession no. NM_001006517, XM_421933) und www.ensembl.org (Transcript ID ENSGALT00000013401) abgerufen werden. Zur späteren Klonierung der PCR-Produkte wurde in den Vorwärtsprimer Orc2-for eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle sowie ein ATG-Startcodon und in den Rückwärtsprimer Orc2-rev eine *BamHI*-Schnittstelle eingefügt. Die Position des Startcodons wurde so gewählt, dass der Leserahmen der proteinkodierenden Nukleotidsequenz erhalten blieb. Nach der gelelektrophoretischen Aufreinigung wurden die PCR-Amplifikate mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* geschnitten. Die DNA-Fragmente, welche nun für ein aus 222 Aminosäuren bestehendes cORC2-Polypeptid (Aminosäuren 347 - 569) kodieren, wurden in den ebenfalls mit *NdeI* und *BamHI* linearisierten Vektor pET-16b kloniert, wobei Plasmid pETOrc2 entstand. pET-16b enthält stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle eine Nukleotidsequenz für ein aus 10 Histidinen bestehendes Oligopeptid („*His-Tag*“), welches die spätere Aufreinigung des cORC2-Polypeptids über Affinitätschromatographie ermöglichen sollte.

4.2.2 Expression von rekombinantem cORC2 in *E. coli* und Proteinreinigung aus *Inclusion Bodies*

Der konstruierte ORC2-Expressionsvektor pETOrc2 (Kap. 4.2.1) wurde in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS transformiert und der resultierende *E. coli*-Stamm mit BL21(DE3)pLysS(pETOrc2) bezeichnet. Die Expression des rekombinanten cORC2-Polypeptids wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Proteinexpression mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 15 A). Dabei wurde nachgewiesen, dass die Bakterien das rekombinante ORC2-Polypeptid, welches einschließlich des *His-Tags* ein apparentes Molekulargewicht von etwa 28 kDa besitzt, erst nach der Induktion mit IPTG exprimierten. In Vorversuchen zur Proteinaufreini-

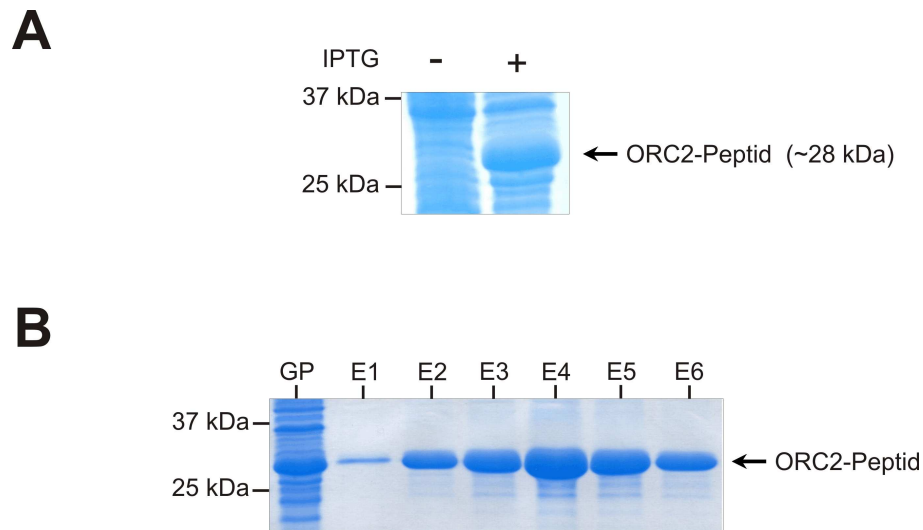


Abb. 15: Bakterielle Überexpression des rekombinanten cORC2-Polypeptids und Proteinaufreinigung aus *Inclusion Bodies*. (A) Bakterielle Expression des rekombinanten, ~28 kDa cORC2-Polypeptids im *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)pLysS(pETOrc2). Die Bakterienzellen wurden 3 h bei 35 °C ohne IPTG (-) und mit 1 mM IPTG (+) inkubiert. Ein Aliquot wurde in denaturierendem Probenpuffer lysiert und auf 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Coomassie G-250 angefärbt. (B) Aufreinigung des rekombinanten, *His-Tag*-markierten cORC2-Peptids aus bakteriellen *Inclusion Bodies*. Aus Bakterien präparierten cORC2-*Inclusion Bodies* wurden in 6 M Guanidiniumchloridpuffer solubilisiert und die Lysate mithilfe der *His-Tags* über Ni-NTA-Affinitätschromatographiesäulen reinigt. GP, Gesamtprotein aus *E. coli*-Zellen vor der Proteinreinigung; E1 - E6, Elutionsfraktionen.

gung wurde festgestellt, dass bakteriell exprimiertes cORC2 nicht in löslicher Form im Bakterienzelllysat, sondern als unlösliche *Inclusion Bodies* im Zellpellet vorliegt. Daher musste das ORC2-Peptid unter denaturierenden Bedingungen aus den *Inclusion Bodies* präpariert werden. Das auf diese Weise solubilisierte ORC2-Peptid wurde anschließend über Ni-NTA-Agarose-Säulen durch schrittweise Elution affinitätschromatographisch gereinigt (Abb. 15 B). In den ORC2-Eluaten (E1 - E6) waren neben dem ORC2-Peptid kaum noch bakterielle Proteine detektierbar, was zeigte, dass das rekombinante cORC2-Peptid effizient und in für die Immunisierung ausreichenden Mengen aufgereinigt wurde.

Bei der in der vorliegenden Arbeit zunächst verfolgten Strategie wurde das gesamte, etwa 72 kDa große cORC2-Protein exprimiert, um gegen einen möglichst großen Epitop-Bereich gerichtete α -cORC2-Antikörper zu erhalten. Dafür war die vollständige, etwa 1,7 kbp umfassende cORC2-kodierende Sequenz mittels PCR amplifiziert und in den pET16b-Vektor kloniert worden (nicht gezeigt). Die Präparation und Reinigung dieses rekombinanten ORC2-Proteins war jedoch nicht erfolgreich und zwar weder unter nativen noch unter verschiedenen

denaturierenden Bedingungen. Die verwendeten Reinigungsmethoden erwiesen sich als ineffizient, da nur eine geringe Proteinausbeute mit zu vielen bakteriellen Proteinkontaminationen erzielt wurde (nicht gezeigt). Aus diesem Grund erfolgte, wie oben beschrieben, die Expression des verkürzten, 28 kDa-cORC2-Proteins. In Vorversuchen zur cORC2-Expression und -präparation mit reduzierter Temperatur (30°C) und/ oder kürzerer Inkubationszeit (1 - 2 h) konnte cORC2 ebenfalls nicht in löslicher Form exprimiert werden. Das verkürzte 28 kDa-cORC2-Peptid lag zwar immernoch als *Inclusion Bodies* vor (siehe oben), es konnte aber aufgrund seiner besseren Löslichkeit in ausreichender Menge isoliert und gereinigt werden.

4.2.3 Immunisierung eines Kaninchens mit dem rekombinanten cORC2-Peptid und Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus dem Blutserum

Nach der Aufreinigung des rekombinanten ORC2-Polypeptids wurde die Firma Sequence Laboratories GmbH (Göttingen) mit der Immunisierung eines Kaninchens beauftragt. Die im Blutserum vor der Immunisierung (Präimmunserum) und nach 3-monatiger Immunisierung (Endblutung) enthaltenen Antikörper (IgGs) wurden über Protein A-Agarose-Säulen affinitätschromatographisch gereinigt, entsalzt und konzentriert. Die Abb. 16 zeigt die Kontrolle des Aufreinigungsverlaufes der Endblutung. Praktisch alle Blutplasmaproteine wie Albumin (~68 kDa) und nicht-IgGs blieben in den Waschfraktionen zurück, so dass die Elutionsfraktionen nur noch IgGs enthielten. Die Proteinbanden bei etwa 50 kDa und 25 kDa zeigen die

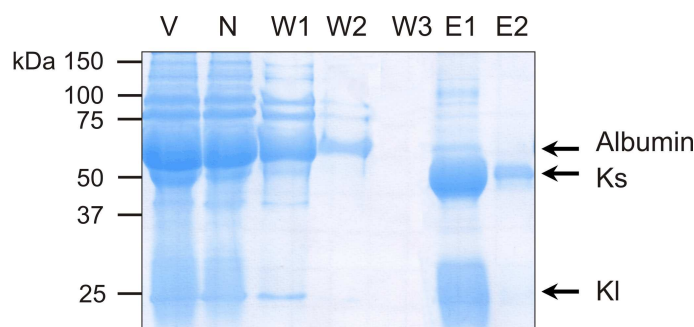


Abb. 16: Aufreinigung von Antikörpern (IgG) aus Kaninchenblutserum durch Säulenchromatographie. Nach der Immunisierung eines Kaninchens mit dem rekombinanten cORC2-Polypeptid wurden die im Blutserum (Endblutung) enthaltenen Antikörper (IgGs) über Protein A-Agarose-Säulen affinitätschromatographisch aufgereinigt. Der Reinigungsverlauf wurde auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen überprüft. V und N, Blutserumfraktion vor und nach der Inkubation mit Protein A-Agarose; W1 - W3, Waschfraktionen; E1 - E3, Elutionsfraktionen, Ks und Kl, schwere bzw. leichte IgG-Peptidketten.

schweren IgG- (50 kDa) bzw. leichten (25 kDa) IgG-Peptidketten (Molekulargewicht IgG, 150 kDa). Die Bindungsspezifität des gereinigten α -cORC2-Antikörpers wurde im *Western Blot* überprüft (Abb. 17 A). Der α -cORC2-Antikörper reagierte spezifisch mit einer einzigen cORC2-Proteinbande, welche ein apparentes Molekulargewicht von ~ 72 kDa aufwies. In einem mit dem α -hORC2-Antikörper von Herrn Prof. R. Knippers (Universität Konstanz) inkubi-

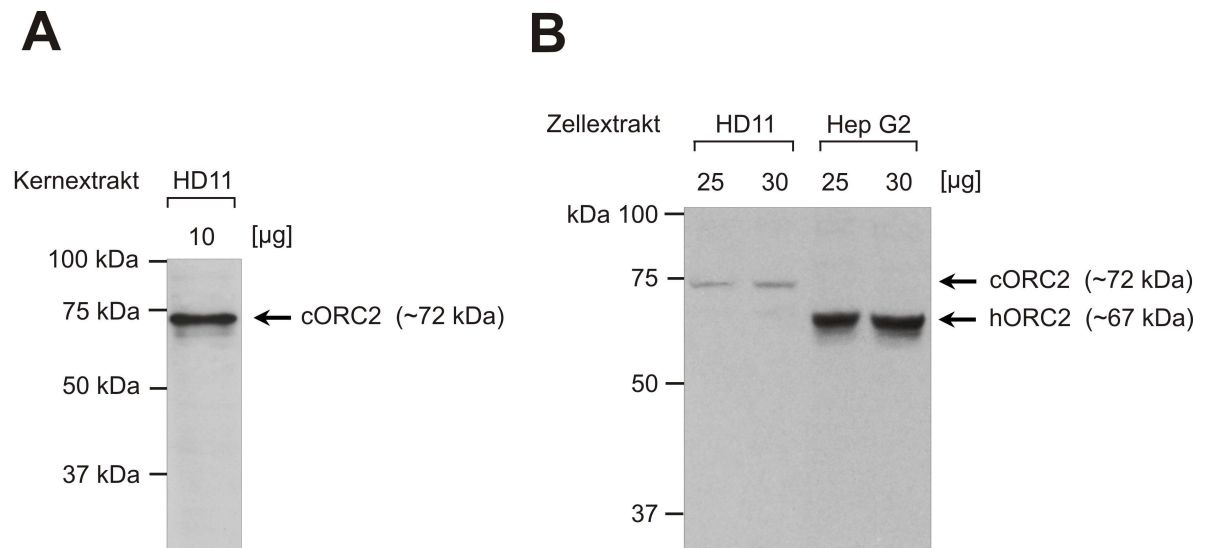


Abb. 17: Der hergestellte α -cORC2-Antikörper reagiert spezifisch mit einem ~ 72 kDa cORC2-Protein aus Huhn. (A) *Western Blot*-Analyse mit affinitätsgereinigten α -cORC2-Antikörpern und Kernextrakt aus HD11-Hühnermyelomonozyten. Der α -cORC2-Antikörper detektiert eine einzige cORC2-Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ~ 72 kDa. (B) *Western Blot*-Analyse mit einem α -hORC2-Antikörper (Prof. R. Knippers, Universität Konstanz) und verschiedenen Mengen (25 μ g, 30 μ g) Zellextrakt aus HD11-Hühnermyelomonozyten und Hep G2-Humanhepatozyten.

bierten *Western Blot* konnte im Zellextrakt aus HD11-Hühnermyelomonozyten ebenfalls eine einzige ~ 72 kDa cORC2-Bande detektiert werden (HD11 in Abb. 17 B). Im Zellextrakt aus Humanzellen wurde dagegen eine ~ 67 kDa hORC2-Bande detektiert (Hep G2 in Abb. 17 B). Dies ließ darauf schließen, dass cORC2 aus Huhn etwas größer als das humane etwa 67 kDa große ORC2-Protein (Gavin et al., 1995) ist. Da der hergestellte α -cORC2-Antikörper spezifisch mit endogenem cORC2 reagierte, konnte dieser für die geplanten ChIP-Experimente verwendet werden.

4.3 Untersuchung der Bindung von ORC2, Sp1, Oct-1 und NF1 im Hühner-Lysozym-GAS41-OBR *in vivo* mithilfe der ChIP-Technik

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe der Chromatin-Immunpräzipitationstechnik (ChIP) untersucht, ob ORC2, Oct-1, Sp1 und NF1 *in vivo* miteinander assoziiert sind und möglicherweise zusammen an den Lysozym-GAS41-OBR binden. Für die ChIP-Experimente wurden asynchron proliferierende Zellen mit Formaldehyd behandelt, um die *in vivo* bestehenden Protein-DNA- und Protein-Protein-Komplexe zu fixieren („crosslink“). Nach der Zerkleinerung mittels Ultraschall wurden die *crosslink*-Nucleoproteine (*Input*) mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Während die immunpräzipitierten Proteinfractionen im *Western Blot* analysiert wurden (dieser Abschnitt), erfolgte die Analyse der coimmunpräzipitierten DNA-Sequenzen mithilfe der quantitativen *Real-Time PCR* (siehe Abschnitt 4.4).

4.3.1 ORC2 bindet am Chromatin *in vivo*

Um nachzuweisen, dass cORC2 in Hühnerzellen am Chromatin bindet, wurden proliferierende Zellen der Hühnermyelomonocytenzelllinie HD11 mit Formaldehyd fixiert und die aus den Zellen isolierten *crosslink*-Nucleoproteine mit α -cORC2-Antikörpern und mit unspezifischen Kontrollantikörpern (IgGs) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im *Western Blot* auf die Anwesenheit von cORC2 hin untersucht (Abb. 18). cORC2 war mit einem apparenten

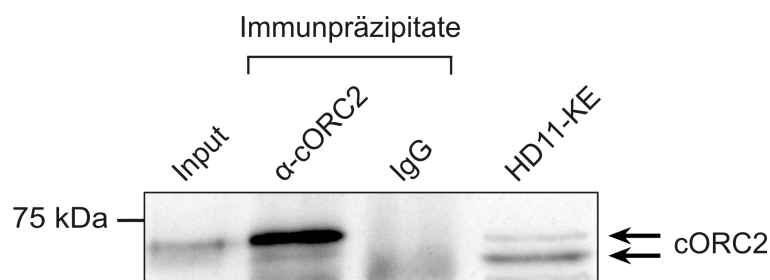


Abb. 18: cORC2 bindet am Chromatin *in vivo*. Formaldehydbehandelte und mittels Ultraschall fragmentierte Nucleoproteine aus HD11-Zellen (*Input*) wurden mit Antikörpern gegen cORC2 (α -cORC2) und mit unspezifischen Antikörpern (IgG) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate und der *Input* wurden in denaturierendem Probenpuffer gelöst und für 10 min bei 97 °C erhitzt. Die denaturierten Proteine wurden auf 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen „geblottet“. Die *Western Blots* wurden mit α -cORC2-Antikörpern inkubiert. 20 μ g Kernextrakt aus HD11-Zellen (HD11-KE) dienten als Vergleich.

Molekulargewicht von etwa 72 kDa in der *crosslink*-Nucleoproteinfraktion vor der Antikörperzugabe (*Input*) und im α -cORC2-Immunpräzipitat enthalten. Im IgG-Immunpräzipitat war cORC2 nicht nachweisbar. Somit war cORC2 mit dem hergestellten α -cORC2-Antikörper spezifisch immunpräzipitierbar. Desweiteren ließ das Vorkommen von cORC2 im *Input* wie auch im α -cORC2-Immunpräzipitat darauf schließen, dass cORC2 *in vivo* mit dem Chromatin verbunden ist. Im HD11-Kernextrakt wurden zwei Proteinbanden detektiert, die \sim 72 kDa-cORC2-Bande sowie eine etwas kleinere Proteinbande. Letztere könnte aus Abbauprodukten des ORC2-Proteins bestehen. Dass die untere Bande jedoch weder im *Input* noch im α -cORC2-Immunpräzipitat vorkam, ließ darauf schließen, dass die in dieser Bande enthaltenen Proteine nicht am Chromatin binden.

4.3.2 ORC2 und Sp1 binden in benachbarten Chromatinregionen *in vivo*.

Um zu untersuchen, ob ORC2 und Sp1 *in vivo* miteinander assoziiert sind bzw. in benachbarten Chromatinregionen binden, wurden *crosslink*-Nucleoproteine aus DU249-Zellen mit α -hSp1-, α -cORC2- und mit unspezifischen Antikörpern (IgG) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden aufgeteilt: In *Western Blots* wurde eine Hälfte mit α -cORC2-Antikörpern (Abb. 19 A) und die andere Hälfte mit α -hSp1-Antikörpern (Abb. 19 B) analysiert.

Die Abb. 19 A zeigt, dass ORC2 im *Input*, im α -cORC2-Immunpräzipitat sowie im DU249-Kernextrakt als monomeres Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 72 kDa vorkommt. Im α -hSp1- bzw. IgG-Immunpräzipitat war ORC2 nicht enthalten. Aus Abb. 19 B geht hervor, dass Sp1 im *Input*, im α -Sp1-Immunpräzipitat und im DU249-Kernextrakt als Monomer mit einem apparenten Molekulargewicht von \sim 100 kDa vorkommt. Die im α -cORC2-Immunpräzipitat detektierte etwa 100 kDa-Bande (Pfeil) zeigt vermutlich ebenfalls monomeres Sp1 (siehe unten). Im IgG-Immunpräzipitat war Sp1 nicht enthalten. Die im DU249-Kernextrakt mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 150 kDa zusätzlich auftretende Proteinbande ist vermutlich auf einen nicht-chromatingebundenen Komplex aus Sp1 und einem anderen Protein zurückzuführen. Desweiteren wurde im α -cORC2- und im IgG-Immunpräzipitat eine starke Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 100 kDa detektiert. Diese Bande trat in sämtlichen *Western Blots* auf, in denen α -cORC2- und IgG-Immunpräzipitate untersucht wurden. Bei dieser Bande könnte es sich um Dimere aus nicht dissoziierten schweren Antikörperketten handeln, welche möglicherweise deshalb erhalten blieben, weil die 10 minütige Denaturierung im SDS-Probenpuffer (Lämmli-Puffer) für eine vollständige Dissoziation der eingesetzten Antikörpermengen nicht ausreichend war.

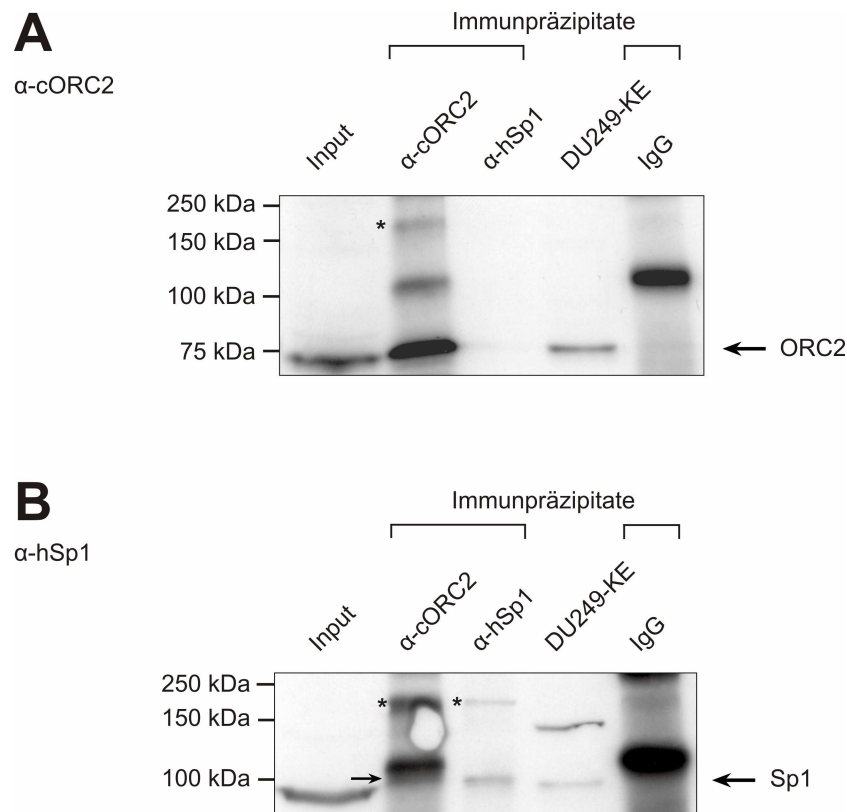


Abb. 19: ORC2 und Sp1 binden in benachbarten Chromatinregionen *in vivo*. Nucleoproteine aus DU249-Zellen (*Input*) wurden mit Antikörpern gegen cORC2 (α -cORC2), hSp1 (α -hSp1) und mit unspezifischen Antikörpern (IgG) immunpräzipitiert. Immunpräzipitate und *Input* wurden aufgeteilt und in *Western Blots* mit **(A)** α -cORC2-Antikörpern und **(B)** α -hSp1-Antikörpern analysiert. 20 μ g DU249-Kernextrakt (DU249-KE) dienten als Vergleich. Sterne markieren die \sim 170 kDa-Bande, der Pfeil zeigt auf die Sp1-Bande.

Im α -cORC2-Immunpräzipitat in Abb. 19 A kommt ORC2 jedoch nicht nur als Monomer, sondern auch als Proteinkomplex mit einem apparenten Molekulargewicht von \sim 170 kDa vor (α -cORC2, Stern). Dieser Komplex wurde auch im α -cORC2-Immunpräzipitat (α -cORC2 in Abb. 19 B, Stern) sowie im α -hSp1-Immunpräzipitat (α -hSp1 in Abb. 19 B, Stern) nachgewiesen. Da Sp1 sowohl Homodimere als auch mit anderen Proteinen Heterodimere bildet (Courey et al., 1988), wurde vermutet, dass der 170 kDa-Proteinkomplex ein Heterodimer aus Sp1 und ORC2 ist. Dies ließe den Schluss zu, dass ORC2 und Sp1 *in vivo* innerhalb dicht benachbarter Chromatinregionen binden und eng miteinander assoziiert sein könnten. Dabei ist ein direkter Kontakt zwischen ORC2 und Sp1 nicht auszuschließen.

In dem mit α -cORC2-Antikörpern inkubierten *Western Blot* (Abb. 19 A) wurde ORC2 zwar im α -cORC2-Immunpräzipitat (α -cORC2, Stern), jedoch nicht im α -Sp1-Immunpräzipitat (α -hSp1) detektiert. Dies könnte damit erklärt werden, dass am Chromatin nur ein Teil der Sp1-Proteine mit ORC2 verbunden sind.

4.3.3 ORC2 und Oct-1 binden in benachbarten Chromatinregionen. NF1 bindet nicht mit ORC2 oder Oct-1 in derselben Chromatinregion.

In weiteren ChIP-Experimenten wurde untersucht, ob ORC2, Oct-1 und NF1 *in vivo* in benachbarten Chromatinregionen binden. Dazu wurden *crosslink*-Nucleoproteine aus DU249-Zellen mit Antikörpern gegen ORC2 (α -cORC2), Oct-1 (α -hOct-1-), NF1 (α -hNF1) und mit unspezifischen Kontrollantikörpern (IgGs) immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate und *Inputs* wurden im *Western Blot* mit entsprechenden Antikörpern analysiert (Abb. 20). Der mit α -cORC2-Antikörpern inkubierte *Western Blot* (Abb. 20 A) zeigt, dass ORC2 mit einem apparenten Molekulargewicht von ~ 72 kDa im *Input*, im α -cORC2-Immunpräzipitat und im DU249-Kernextrakt vorkommt. Im α -hOct-1-, α -hNF1- und IgG-Immunpräzipitat war ORC2 dagegen nicht nachweisbar. Aus dem mit α -hOct-1-Antikörpern inkubierten *Western Blot* geht hervor (Abb. 20 B), dass monomeres Oct-1, welches ein apparentes Molekulargewicht von etwa 100 kDa aufweist, *in vivo* ebenfalls am Chromatin bindet, weil Oct-1 im entsprechenden α -hOct-1-Immunpräzipitat nachweisbar war. Dass Oct-1 nicht im *Input* detektiert wurde, war vermutlich auf eine zu geringe Probenauftragsmenge zurückzuführen. Im α -hNF1-Immunpräzipitat wurde Oct-1 nicht nachgewiesen.

Aus dem *Western Blot* in Abb. 20 B geht zudem hervor, dass monomeres Oct-1 auch im α -cORC2-Immunpräzipitat enthalten ist (Pfeil). Aufgrund des Vorkommens dieser Oct-1-Bande im α -cORC2-Immunpräzipitat wurde vermutet, dass ORC2 und Oct-1 *in vivo* innerhalb benachbarter Chromatinregionen binden und möglicherweise miteinander assoziiert sind. Der Befund, dass Oct-1 zwar im α -cORC2-Immunpräzipitat vorkommt (Abb. 20 B), aber umgekehrt, ORC2 nicht im α -Oct-1-Immunpräzipitat zu finden ist (Abb. 20 A), könnte, ähnlich wie bei Sp1, damit erklärt werden, dass nur ein Teil der Oct-1-Proteine mit ORC2 am Chromatin gebunden sind.

In Abb. 20 C ist der mit α -hNF1-Antikörpern inkubierte *Western Blot* gezeigt. NF1 war mit einem apparenten Molekulargewicht von ~ 72 kDa im *Input*, im α -hNF1-Immunpräzipitat und im DU249-Kernextrakt nachweisbar. Im *Input* wurden auch mehrere Proteinbanden oberhalb der 100 kDa-Markerbande detektiert. Diese deuten darauf hin, dass NF1 homo- und heteromere Proteinkomplexe bildet. Allerdings enthalten die Heteromere vermutlich weder ORC2 noch Oct-1, da NF1 in den entsprechenden Immunpräzipitaten nicht nachweisbar war (α -cORC2 und α -hOct-1 in Abb. 20 C). Die Befunde könnten darauf zurückzuführen sein, dass NF1 *in vivo* weder mit ORC2, noch mit Oct-1 in benachbarten Chromatinregionen bindet.

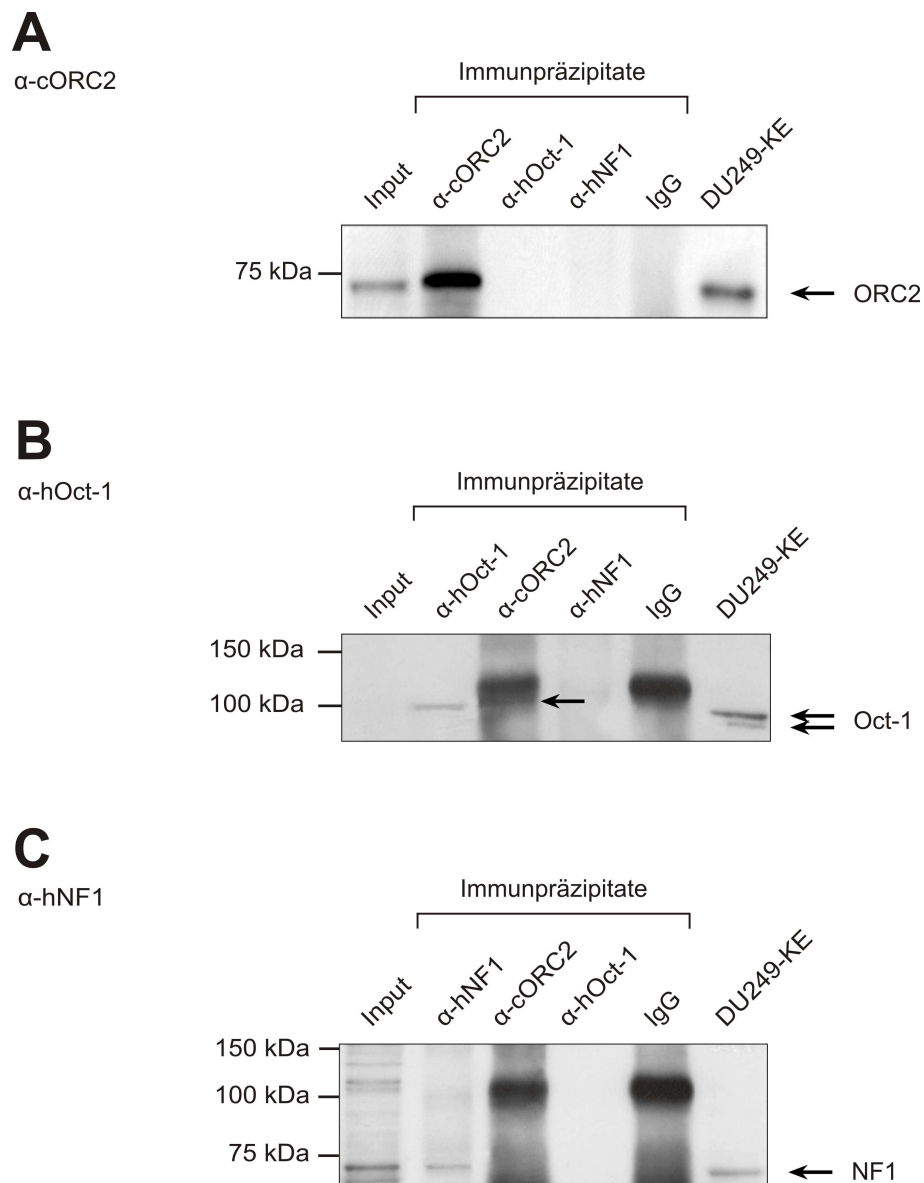


Abb. 20: ORC2 und Oct-1 binden in benachbarten Chromatinregionen *in vivo*. Für die ChIP-Experimente wurden Nucleoproteine aus DU249-Zellen (*Input*) mit Antikörpern gegen cORC2 (α-cORC2), hOct-1 (α-hOct-1), hNF1 (α-hNF1) und mit unspezifischen Antikörpern (IgG) immunpräzipitiert. *Input* und Immunpräzipitate wurden im *Western Blot* mit Antikörpern gegen **(A)** cORC2, **(B)** hOct-1 und **(C)** hNF1 analysiert. 20 μg Kernextrakte aus DU249-Zellen (DU249-KE) dienten als Vergleich. Der Pfeil in Abb.B zeigt auf die Oct-1-Bande.

4.4 Untersuchung der Anreicherung von OBR-Sequenzen in Immunpräzipitaten durch quantitative *Real-Time PCR*

Nach der Identifizierung von DNA-Bindestellen für Initiationsproteine des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro* (Abschnitt 4.1) wurde die Bindung von ORC2, Sp1 und Oct-1 am Chromatin des OBRs auch *in vivo* untersucht. Eine Möglichkeit hierfür war die Analyse der in ChIP-Experimenten coimmunpräzipitierten DNA-Fragmente mittels quantitativer *Real-Time PCR*. Wenn ORC2, Sp1 und Oct-1 am OBR-Chromatin binden, dann sind die Sequenzen des OBRs in den entsprechenden Immunpräzipitaten angereichert. Für die PCR-Analysen wurden fünf Primerpaare hergestellt, qPri-13kb, qPri-1,7kb, qPri_OBR, qPri+1,7kb und qPri+13kb. Diese binden in verschiedenen Regionen der 21 - 24 kbp umspannenden Hühner-Lysozymgdomäne (Abb. 21). Primerpaar qPri_OBR bindet an Sequenzen innerhalb des OBRs. Dagegen wurden die anderen vier Primerpaare zur Amplifizierung OBR-naher und OBR-ferner Kontrollsequenzen verwendet: qPri-1,7kb bindet etwa 1,7 kbp stromaufwärts des zu amplifizierenden OBR-Fragments im Lysozymgen, qPri-13kb entsprechend etwa 13 kbp stromaufwärts des OBR-Fragments im Bereich der 5'-MAR. Primerpaar qPri+1,7kb bindet etwa 1,7 kbp stromabwärts des OBR-Fragments im Bereich des GAS41-Gens und der 3'-MAR, wohingegen qPri+13kb in einer Region etwa 13 kbp weiter stromabwärts des OBR bindet. Für die PCR-Analysen wurden zunächst ChIP-Experimente wie in Material und Methoden beschrie-

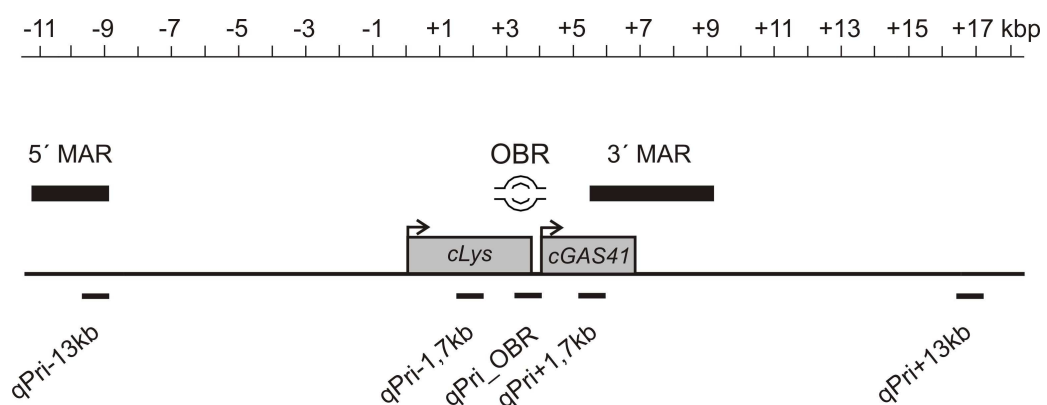


Abb. 21: Schematische Darstellung des Hühner-Lysozym-GAS41-Genlocuses mit den Bindestellen der für die *Real-Time PCR*-Analysen eingesetzten fünf Primerpaare. Zur Amplifizierung der aus ChIP-Immunpräzipitaten isolierten DNA-Fragmente mittels quantitativer *Real-Time PCR* wurden fünf Primerpaare verwendet. Diese binden in ausgewählten Regionen innerhalb der Hühnerlysozymgdomäne: qPri_OBR bindet an Sequenzen innerhalb des OBRs, die anderen vier Primerpaare in Kontrollregionen.

ben durchgeführt und aus den Immunpräzipitaten die DNA isoliert. Diese wurde nach Reversion der *crosslinks* und Deproteinierung mit den fünf Primerpaaren mittels *Real-Time PCR* amplifiziert. Als Vergleichsprobe diente aus Nucleoproteinen vor der Immunpräzipitation (*Input*) isolierte DNA.

4.4.1 Sp1 bindet am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBRs *in vivo*

Um zu zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 *in vivo* am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBR bindet, wurden *Real-Time PCR*-Analysen mit isolierter DNA aus Nucleoproteinen von HD11-Zellen vor der Immunpräzipitation (*Input*) und nach der Immunpräzipitation mit α -hSp1-Antikörpern durchgeführt. Wie aus Abb. 22 hervorgeht, war im α -hSp1-Immunpräzipitat eine signifikante, etwa 7-fache Anreicherung von OBR-Sequenzen gegenüber dem ~ 13 kbp stromabwärts liegenden Kontrollbereich, qPri+13kb, feststellbar. Im Vergleich dazu waren die anderen genomischen Regionen, qPri-13kb, qPri-1,7kb und qPri+1,7kb, nur schwach (etwa 2- bis 3,5-fach) angereichert. Im *Input* wurde keine Anreicherung bestimmter DNA-Bereiche festgestellt. Demnach bindet Sp1 innerhalb der Lysozymgendomäne bevorzugt in der Chromatinregion des OBR/GAS41-Promotors. Da in diesem Bereich zahlreiche „GC-Boxen“

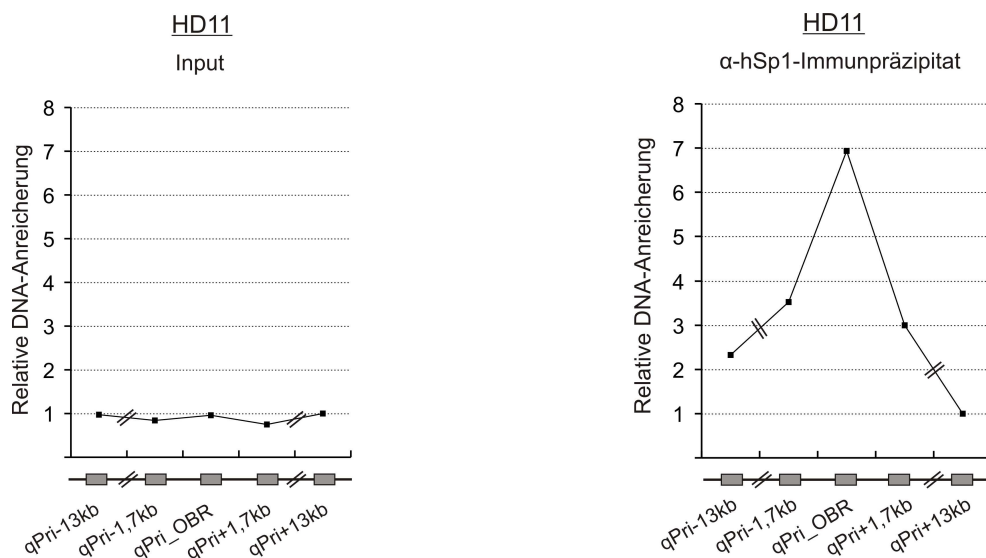


Abb. 22: Anreicherung von OBR-Sequenzen im α -hSp1-Immunpräzipitat. Nucleoproteine aus HD11-Zellen (*Input*) wurden mit Antikörpern gegen hSp1 (α -hSp1) immunpräzipitiert und die aus *Inputs* und Immunpräzipitaten isolierten DNA-Fragmente durch quantitative *Real-Time PCR* mit fünf Primerpaaren amplifiziert (x-Achse). Die relative Anreicherung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde in Relation zu Fragment qPri+13kb ermittelt, das den Wert 1 erhielt (y-Achse). Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

vorkommenen wurde davon ausgegangen, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 an diesen Sp1-Bindestellen und damit in unmittelbarer Nähe zur mutmaßlichen ORC2-Bindestelle bindet.

4.4.2 Oct-1 bindet am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBR *in vivo*

Zudem wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Oct-1 auch *in vivo* am Lysozym-GAS41-OBR bindet. Aus Abb. 23 hervor, dass mit den α -Oct-1-Antikörpern hauptsächlich Chromatinfragmente mit dem Lysozym-GAS41-OBR copräzipitiert wurden, weil in den α -Oct-1-Immunpräzipitaten eine etwa 10,5-fache Anreicherung von OBR-Fragmenten (qPri_OBR) gegenüber der Region qPri+13kb nachweisbar war. Die Kontrollregion qPri-1,7kb wies noch eine etwa 7,5-fache DNA-Anreicherung auf, wohingegen die anderen Regionen, qPri+1,7kb und qPri-13kb, sowie der *Input* nicht angereichert waren. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass Transkriptionsfaktor Oct-1 am Lysozym-GAS41-OBR und an unmittelbar stromaufwärts im Lysozymgen liegenden Sequenzen bindet.

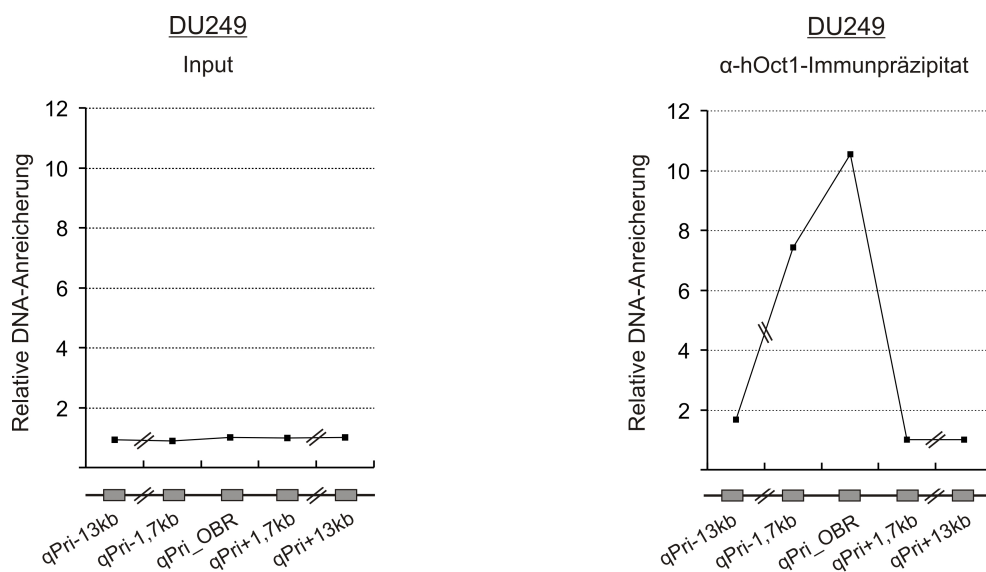


Abb. 23: Anreicherung von OBR-Sequenzen im α -hOct-1-Immunpräzipitat. Nucleoproteine (*Input*) aus DU249-Zellen wurden mit Antikörpern gegen hOct-1 (α -hOct-1) immunpräzipitiert und die aus *Input* und Immunpräzipitaten isolierten DNA-Fragmente durch quantitative *Real-Time PCR* mit fünf Primerpaaren amplifiziert (x-Achse). Die relative Anreicherung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde in Relation zu Fragment qPri+13kb ermittelt, das den Wert 1 erhielt (y-Achse). Es sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

4.4.3 ORC2 bindet am Chromatin des Lyoszym-GAS41-OBR *in vivo*

Zur Aktivierung von DNA-Replikationstartstellen ist die Bindung des hexameren ORC-Komplexes am Origin notwendig. Daher muss ORC2, das *in vivo* permanent am Chromatin gebunden ist (siehe Diskussion), am Chromatin des Lyoszym-GAS41-OBRs zu finden sein. Um

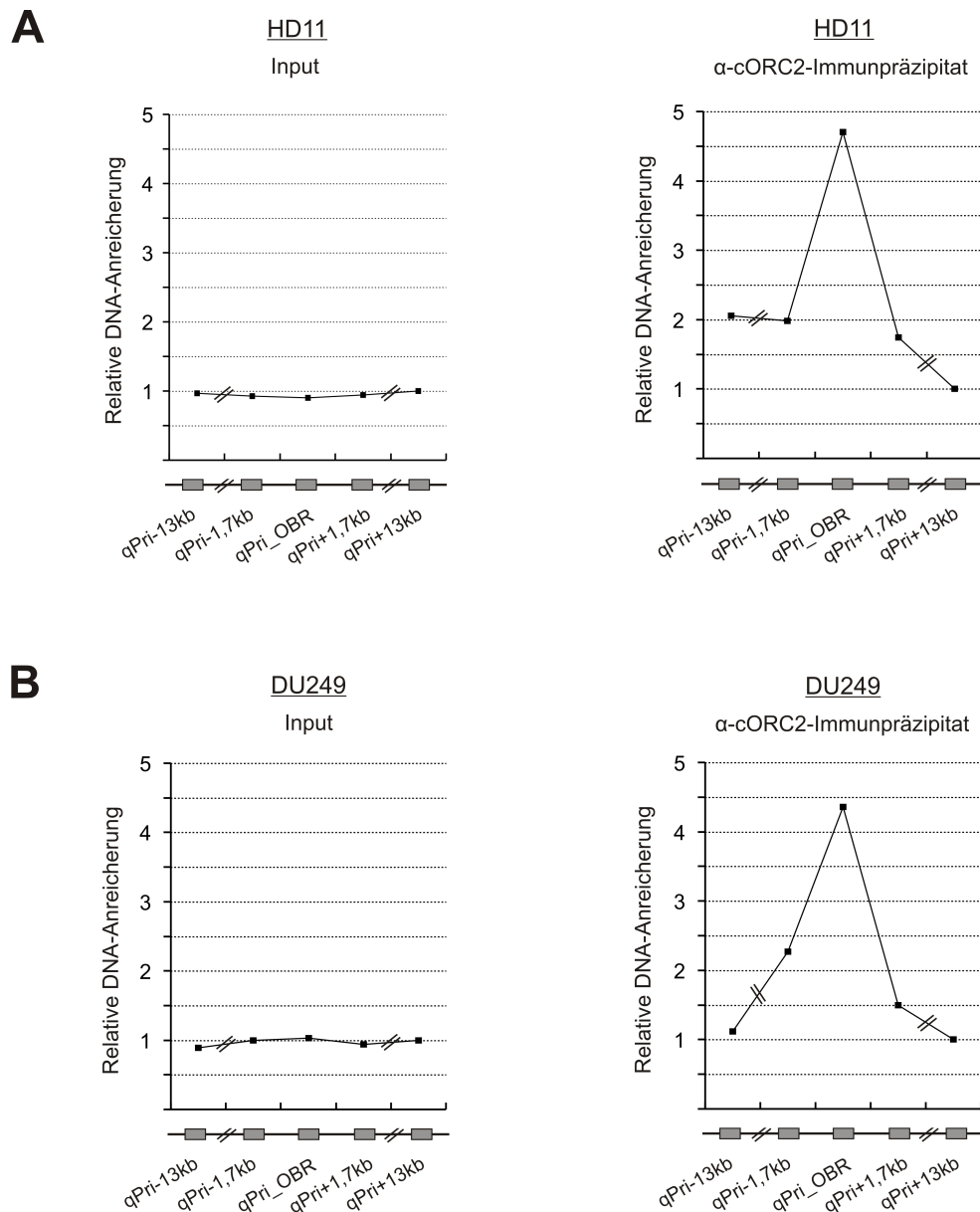


Abb. 24: Anreicherung von OBR-Sequenzen im α -cORC2-Immunpräzipitat. Nucleoproteine (*Input*) aus **(A)** HD11- und **(B)** DU249-Zellen wurden mit Antikörpern gegen cORC2 (α -cORC2) immunpräzipitiert. Nach Reversion der „crosslinks“ und Deproteinierung wurden die aus *Inputs* und Immunpräzipitaten isolierten DNA-Fragmente mittels quantitativer *Real-Time PCR* mit fünf Primerpaaren amplifiziert (x-Achse). Die relative Anreicherung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde in Relation zu Fragment qPri+13kb ermittelt, das den Wert 1 erhielt (y-Achse). Es sind die Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

dies nachzuweisen, wurden Nucleoproteine aus HD11- und DU249-Zellen mit α -cORC2-Antikörpern immunpräzipitiert und die aus den Immunpräzipitaten isolierten DNA-Fragmente durch *Real-Time PCR* amplifiziert (Abb. 24 A und B). In den α -cORC2-Immunpräzipitaten beider Zelllinien war der OBR-Bereich gegenüber dem ~ 13 kbp stromabwärts gelegenen Kontrollbereich, qPri+13kb, etwa 4,5-fach angereichert. Die anderen Bereiche, qPri-13kb, qPri-1,7kb und qPri+1,7kb, waren dagegen nur geringfügig (1- bis ~ 2 -fach) angereichert. In den *Inputs* wurde keine Anreicherung bestimmter DNA-Bereiche festgestellt. Die Anreicherung von Sequenzen des OBR/GAS41-Promotors in den α -ORC2-Immunpräzipitaten kann damit erklärt werden, dass ORC2 am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBRs bindet. Eine Zusammenfassung sämtlicher *Real-Time PCR*-Ergebnisse von ORC2, Sp1 und Oct-1 ist in Abb. 25 dargestellt.

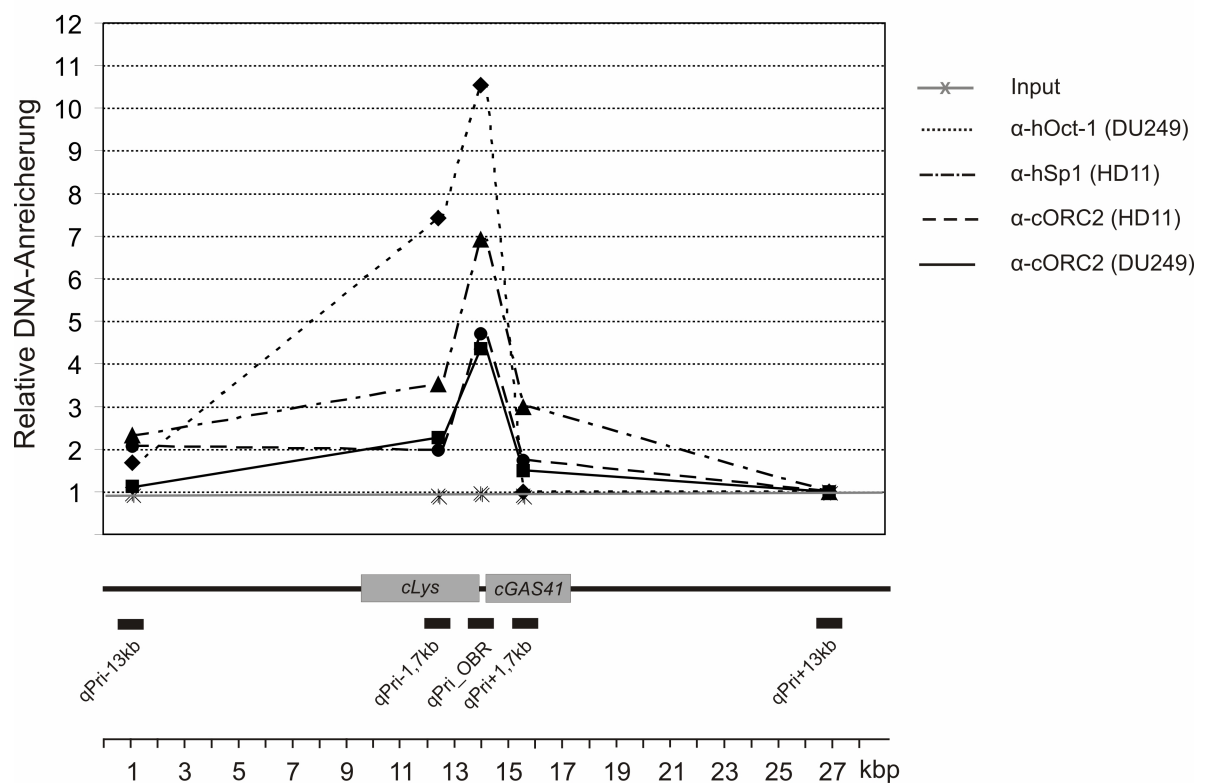


Abb. 25: ORC2, Sp1 und Oct-1 binden am Lysozym-GAS41-OBR des Huhns *in vivo* (Zusammenfassung der *Real-Time PCR*-Ergebnisse). Anreicherung von Sequenzen des Lysozym-GAS41-OBRs in α -cORC2-, α -hSp1- und α -hOct-1-Immunpräzipitaten. Dargestellt ist eine Zusammenfassung der in den Abb. 22, 23 und 24 gezeigten relativen DNA-Anreicherungen durch quantitative *Real-Time PCR*. Input-Werte sind Mittelwerte der vier Input-Werte aus Abb. 22, 23 und 24.

4.5 Transfektionsexperimente zur Deletion der Sp1-Binderegion im Lysozym-OBR / GAS41Promotor von DT40-Zellen

Die Ergebnisse der *Real-Time PCR*-Analysen zeigten, dass Sp1 auch *in vivo* am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBRs bindet. Die Bindung zahlreicher Sp1-Proteine im Lysozym-OBR / GAS41-Promotor könnte darauf hinweisen, dass Sp1 bei der Initiation der DNA-Replikation am OBR involviert ist. Um dies zu untersuchen wurden Transfektionsexperimente mit *Targeting*-Plasmiden durchgeführt. Die Plasmide dienten dazu, in der Hühnerlymphozytenzelllinie DT40 die Sp1-Binderegion im OBR / GAS41-Promotor beider Allele durch homologe Rekombination zu deletieren.

4.5.1 Strategie zur Deletion der Sp1-Binderegion durch homologe Rekombination

Die gezielte Deletion einzelner Sp1-Bindestellen im OBR / GAS41-Promotor wäre nur mit einem hohen Zeitaufwand realisierbar gewesen. Daher sollte der gesamte, etwa 320 bp umfassende Sp1-Bindebereich deletiert werden. Zu diesem Zweck wurden zwei *Targeting*-Plasmide, pSp1-neo und pSp1-puro, konstruiert. Durch *Crossover* homologer Bereiche zwischen Plasmid und chromosomalen Genlocus kann der intakte endogene Sp1-Bindebereich durch eine exogene DNA-Sequenz mit deletiertem Sp1-Bindebereich ersetzt werden (siehe Abb. 26). Um in Transfektionsexperimenten auf homologe Rekombinationsereignisse selektieren zu können, wurden Selektionsmarkergene in die Plasmide eingefügt, wobei das eine Plasmid ein Neomycin-Resistenzgen und das andere Plasmid ein Puromycin-Resistenzgen erhielt. Die aus *E. coli* stammenden Resistenzgene stehen unter direkter Kontrolle des Hühner- β -Actin-Promotors und führen nach Integration in das Genom sensitiver Zelllinien zur Resistenz gegen die Antibiotika Neomycin / Geneticin (G418) bzw. Puromycin. Die Nutzung verschiedener Selektionsmarkergene sollte die Deletion der Sp1-Binderegion in beiden Allelen ermöglichen, da mit verschiedenen Antibiotika selektiert werden kann. Ausserdem wurde eine DNA-Sequenz aus dem chromosomalen Lysozym-GAS41-Genlocus stromaufwärts des jeweiligen Resistenzgens in die Plasmide eingefügt. Die DNA-Sequenz wurde für das homologe 5'-*crossover* zwischen Plasmid und Genlocus benötigt.

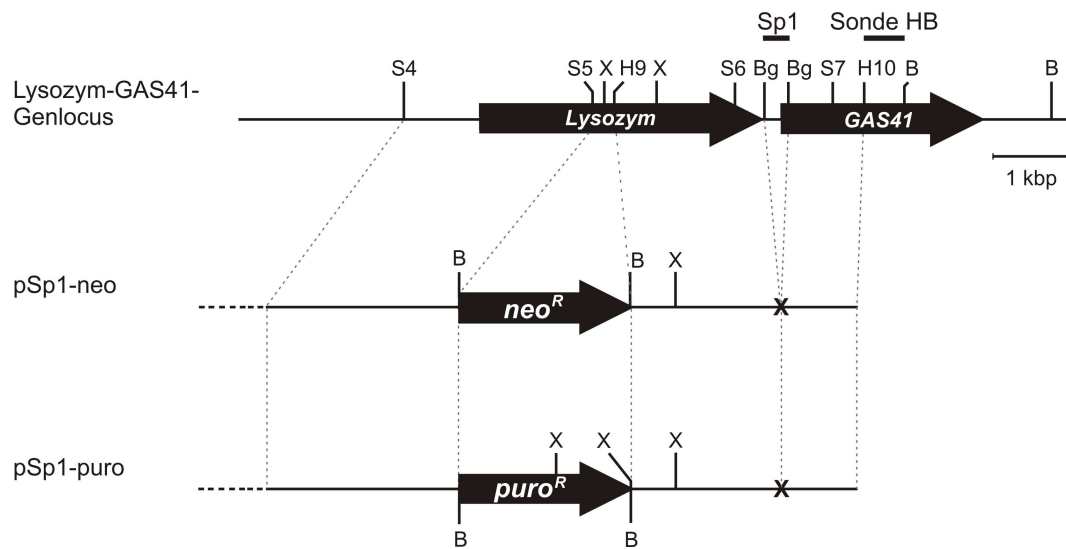


Abb. 26: Strategie zur Deletion der im OBR/GAS41-Promotor lokalisierten Sp1-Binderegion mittels homologer Rekombination. Schematische Darstellung des Lysozym-GAS41-Genlocus mit den Restriktionsschnittstellen *SacI* (S), *XbaI* (X), *HindIII* (H), *BglI* (Bg) und *BamHI* (B) sowie der konstruierten *Targeting*-Plasmide pSp1-neo und pSp1-puro, welche für die homologen Rekombinationsexperimente verwendet wurden. Das fette Kreuz (x) markiert die in der 3'-homologen Sequenz deletierte Sp1-Binderegion. Sonde HB ist ein ~550 bp *HindIII*/*BamHI*-Restriktionsfragment aus dem GAS41-Gen.

4.5.2 Konstruktion der *Targeting*-Plasmide pSp1-neo und pSp1-puro

Zur Konstruktion der *Targeting*-Plasmide wurde ein ~3,3 kbp *HindIII*-Restriktionsfragment (H9H10) aus dem Lysozym-GAS41-Genlocus verwendet. Das Fragment enthält den OBR mit etwa 1,7 kbp stromaufwärts und etwa 1,6 kbp stromabwärts angrenzenden DNA-Bereichen. Es umfasst damit etwa die 3'-Hälfte des Lysozymgens, den OBR/GAS41-Promotor sowie die 5'-Hälfte des GAS41-Gens (siehe Abb. 26). Um die Sp1-Binderegion zu deletieren wurde die Gelegenheit ausgenutzt, dass die Sp1-Binderegion zu beiden Seiten von einer *BglI*-Restriktionsschnittstelle flankiert wird (siehe Abb. 7). Allerdings enthält das Rückgrat des pBluescript-Vektors, in welchem das *HindIII*-Fragment H9H10 integriert ist, zwei weitere *BglI*-Schnittstellen. Da das Restriktionsenzym *BglI* die Erkennungssequenz besitzt (5'-GCC [N]₄↓NGGC-3') und die Erkennungssequenzen der vier *BglI*-Schnittstellen unterschiedlich waren, konnte das Plasmid dennoch mit *BglI* geschnitten und nach einer Phenolaufreinigung des gesamten Verdauungsansatzes mit einem *BglI*-Adapter religiert werden. Die Nukleotidsequenz des Adapters war so gewählt worden, dass die Vektorenden beiderseits der zu deletierenden Sp1-Binderegion zusammengefügt werden konnten, während das zu deletierende 322 bp DNA-Fragment durch den Adapter-Überschuss „verdrängt“ wurde. Das re-

sultierende Plasmid mit dem nun $\sim 3,0$ kbp umfassenden *HindIII*-Fragment des Lysozym-GAS41-Genlocus wurde mit pBS-H9H10 Δ Sp1 bezeichnet. Anschließend wurde in ein Plasmid das Neomycin-Phosphotransferasegen (*neo^R*) und in ein anderes Plasmid das Puromycin-N-Acetyltransferasegen (*puro^R*) eingefügt. Hierzu wurden die jeweils $\sim 2,3$ kbp umfassenden Resistenzmarker in die einzige *BamHI*-Schnittstelle an das 5'-Ende des *HindIII*-Fragments im Plasmid pH9H10 Δ Sp1 ligiert. Aus den so konstruierten Plasmiden pH9H10 Δ Sp1-neo und pH9H10 Δ Sp1-puro wurde durch *XhoI*-Restriktion ein $\sim 5,3$ kbp DNA-Fragment, bestehend aus Resistenzmarker und *HindIII*-Fragment, reisoliert und in das mit *XhoI* linearisierte Plasmid pBS-S4S5 ligiert. Zur Konstruktion dieses Plasmids war ein $\sim 2,5$ kbp *SacI*-Restriktionsfragment aus dem Lysozym-GAS41-Genlocus in die *SacI*-Schnittstelle des Klonierungsvektors pBluescript II SK+ integriert worden. Das *SacI*-Fragment umfasst eine 2,5 kbp-DNA-Region des Lysozygens stromaufwärts des *HindIII*-Fragments und diente als homologe Sequenz für das 5'-*Crossover*. Die auf diese Weise konstruierten etwa 10,8 kbp großen *Targeting*-Plasmide wurden mit pSp1-neo und pSp1-puro bezeichnet (siehe Abb. 26).

4.5.3 Transfektion von DT40-Zellen mit einem GAS41-Expressionsvektor

Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 zahlreiche konstitutiv exprimierte Gene („Haushaltsgene“) reguliert. Deshalb war zu erwarten, dass Sp1 auch die GAS41-Expression kontrolliert. Durch die geplante Deletion der 322 bp umfassenden Sp1-Binderegion im OBR/GAS41-Promotor war zu vermuten, dass das GAS41-Gen inaktiviert und die GAS41-Expression gestoppt würde. Weil jedoch gezeigt wurde, dass GAS41 für die Lebensfähigkeit von DT40-Zellen essentiell ist (Zimmermann et al., 2002), musste vor der Deletion ein GAS41-Expressionsvektor in die Zelllinie transfiziert werden, welcher endogenes GAS41 durch exogen exprimiertes GAS41 ersetzt. Hierfür wurde der 5,8 kbp-GAS41-Expressionsvektor CMV-gas (Zimmermann et al., 2002) verwendet. Dieser enthält das Hühner-GAS41-Gen als ~ 700 bp lange cDNA, deren Transkription unter der Kontrolle des mit Tetracyclin regulierbaren humanen Cytomegalovirus *immediate-early* (CMV)-Promotors steht. Um zugunsten stabiler Plasmid-Integrationen selektieren zu können, vermittelt CMV-gas eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin. In den Transfektionsexperimenten wurden DT40-Zellen durch Elektroporation mit dem *ScaI*-linearisierten Plasmid CMV-gas transfiziert. Nach der Selektion mit 1 mg/ml Zeocin wurden fünf zeocinresistente Klone (13/30, 13/44, 11/53, 13/94 und 13/95) isoliert. Deren Zellextrakte wurden im *Western Blot* mit einem α -GAS41-Antiserum bezüglich einer exogenen GAS41-Expression hin untersucht (Abb. 27). Ein Klon (13/94) zeigte eine

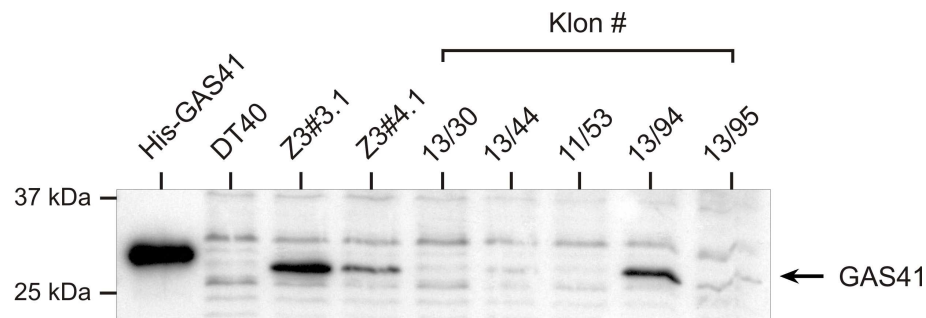


Abb. 27: Transfektion von DT40-Hühnerlymphozyten mit einem GAS41-Expressionsvektor. DT40-Zellen wurden mit dem *Scal*-linearisierten GAS41-Expressionsvektor CMV-gas stabil transfiziert, welcher endogenes GAS41 durch exogenes ersetzen soll. Nach der Selektion mit 1 mg/ml Zeocin wurden fünf zeocinresistente Klone (13/30, 13/44, 11/53, 13/94 und 13/95) isoliert. Die daraus präparierten Zellextrakte wurden im *Western Blot* mit einem α -GAS41-Antiserum auf die GAS41-Expression hin untersucht. Als Vergleichsproben dienten 4 ng *His-tag*-markiertes GAS41-Protein (His-GAS41) sowie Zellextrakt aus DT40-Zellen (DT40) und exogenes GAS41 exprimierenden DT40 Z3#3.1- bzw. Z3#4.1-Zellen.

starke, ein zweiter (13/95) eine schwächere Expression des GAS41-Proteins, welches ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa aufweist. In den anderen drei Klonen (13/30, 13/44, 11/53) und den nicht transfizierten DT40-Zellen wurde ebenfalls eine schwache GAS41-Expression detektiert. Für die weiteren Transfektionsexperimente wurde der Klon DT40-13/94 ausgewählt.

4.5.4 Transfektion von DT40-13/94- und DT40 Z3#4.1-Zellen mit den *Targeting*-Plasmiden pSp1-puro und pSp1-neo

Die Erzeugung einer DT40-Hühnerlymphozytenzelllinie mit doppelt deletierter Sp1-Binderegion kann mit zwei Transfektionsrunden erreicht werden. In der ersten Transfektionsrunde wurden die exogenes GAS41 exprimierenden DT40-13/94-Zellen (siehe Ergebnisse 4.5.3) mit dem *KpnI*-linearisierten *Targeting*-Plasmid pSp1-neo transfiziert. Nach gleichzeitiger Selektion mit 0,75 mg/ml Zeocin und 2 mg/ml G418 wurden 51 antibiotikumresistente Klone isoliert. Die aus diesen Klonen und aus nicht transfizierten DT40-Zellen isolierte chromosomale DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BamHI* geschnitten und im *Southern Blot* mit der radioaktiv-markierten Sonde HB hybridisiert. Die Sonde ist ein etwa 550 bp großes *HindIII*/*BamHI*-Fragment aus dem GAS41-Genlocus, welches außerhalb der in den *Targeting*-Plasmiden enthaltenen DNA-Bereiche bindet. Die repräsentativen Ergebnisse von acht

der 51 Klone sind in Abb. 28 A dargestellt. In keinem der insgesamt 51 analysierten Klone konnte das charakteristische DNA-Fragmentmuster detektiert werden, welches auf eine erfolgreiche homologe Rekombination und Deletion der Sp1-Binderegion schließen ließ. Zwar enthielten alle Klone das $\sim 3,1$ kbp DNA-Fragment des intakten GAS41-Allels, jedoch war das nach einer homologen Rekombination zu erwartende zusätzliche $\sim 2,8$ kbp Fragment, das sich durch die 322 bp Deletion in einem der GAS41-Allele ergeben würde, in keinem Klon enthalten. Daraus wurde geschlossen, dass in allen getesteten Klonen beide GAS41-Allele weiterhin intakt waren. In keinem der isolierten Klone wurde die Sp1-Binderegion deletiert. Im unteren Bereich des Autoradiogramms (Abb. 28 A) wurde ein weiteres DNA-Fragment von etwa 700 bp detektiert. Das Fragment entspricht der 700 bp großen GAS41-cDNA des zuvor stabil transfizierten GAS41-Expressionsvektors CMV-gas, welches durch den *Bam*HI/*Xba*I-Doppelverdau aus dem genomischen Integrationsort ausgeschnitten wurde. Dass die Signalintensität der ~ 700 bp-Bande je nach Klon sehr unterschiedlich war und dies nicht mit der Signalintensität der $\sim 3,1$ kbp „Wildtyp“-Bande korrelierte, könnte darauf hindeuten, dass die zur Transfektion verwendeten DT40-13/94-Zellen nicht monoklonal waren.

Parallel zu den oben beschreibenden Transfektionsexperimenten wurde die zeocin- und G418-resistente DT40-Zelllinie Z3#4.1 (Zimmermann et al. 2002) mit dem *Kpn*I-linearisierten *Targeting*-Plasmid pSp1-puro transfiziert. Diese Zelllinie besitzt nur ein intaktes GAS41-Allel, da das zweite GAS41-Allel bereits mit einem *Targeting*-Plasmid deletiert worden war. Zudem enthält die Zelllinie schon den GAS41-Expressionsvektor CMV-gas und exprimiert das GAS41-Protein (siehe Abb. 27). Die Z3#4.1-Zellen wurden zusätzlich transfiziert, weil zur Entfernung der Sp1-Binderegion in beiden GAS41-Allelen nur noch eine Transfektionsrunde notwendig war. Aus drei durchgeführten Transfektionsexperimenten und gleichzeitiger Selektion mit 0,75 mg/ml Zeocin, 1 mg/ml G418 und 0,5 μ g/ml Puromycin wurden 109 antibiotikumresistente Klone isoliert und im *Southern Blot* analysiert. In Abb. 28 B sind die repräsentativen Ergebnisse von fünf der 109 Klone dargestellt. Auch hier konnte bei keinem der insgesamt 109 analysierten Klonen die gewünschte Sp1-Deletion im chromosomalen OBR/GAS41-Promotor festgestellt werden. Sämtliche Klone enthielten lediglich das 3,1 kbp DNA-Fragment des einen intakten GAS41-Allels. Ein anstelle des 3,1 kbp-Fragments auftretendes 2,8 kbp-Fragment, welches eine erfolgreiche homologe Rekombination des zweiten GAS41-Allels kennzeichnen würde, war in keinem der Klone nachweisbar.

Im unteren Autoradiogrammbereich in Abb. 28 B wurden zwei weitere *Bam*HI/*Xba*I-Fragmente von etwa 700 bp und 400 bp detektiert. Während das 700 bp-Fragment der genomisch integrierten und wieder herausgeschnittenen GAS41-cDNA entspricht (siehe oben),

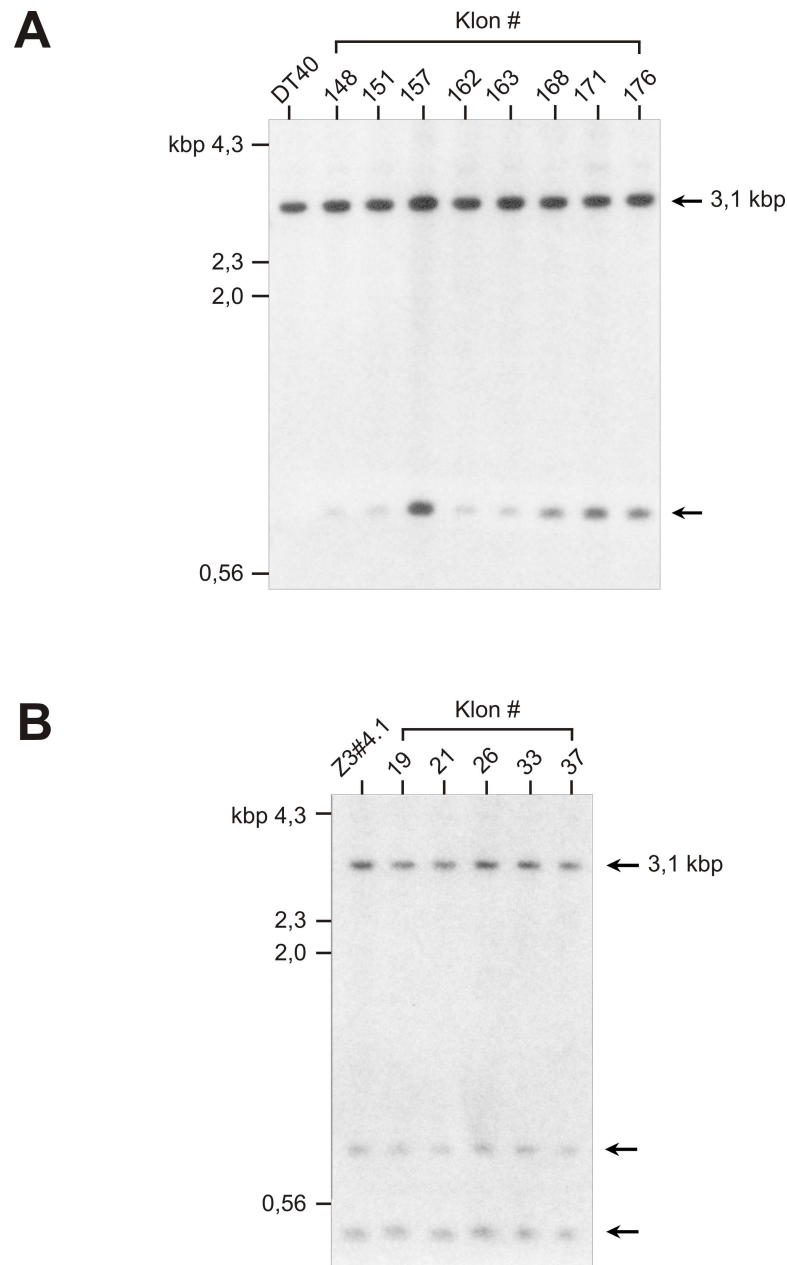


Abb. 28: Transfektionsexperimente zur Deletion der Sp1-Binderegion im OBR/GAS41-Promotor von DT40-Zellen. (A) DT40-13/94-Zellen wurden mit *KpnI*-linearisiertem Plasmid pSp1-neo transfiziert. Nach der Selektion mit 0,75 mg/ml Zeocin und 2 mg/ml G418 wurden 51 antibiotikumresistente Klone isoliert. Die chromosomale DNA wurde mit *Bam*HI und *Xba*I geschnitten und im *Southern Blot* mit der radioaktiv-markierten Sonde HB hybridisiert. Es sind die Ergebnisse von acht Klonen gezeigt. **(B)** DT40 Z3#4.1-Zellen wurden mit *KpnI*-linearisiertem Plasmid pSp1-puro transfiziert und mit 0,75 mg/ml Zeocin, 1 mg/ml G418 und 0,5 μ g/ml Puromycin selektiert. Die isolierte chromosomale DNA aus 109 Klonen wurde mit *Bam*HI und *Xba*I fragmentiert und im *Southern Blot* mit Sonde HB hybridisiert. Es sind die Ergebnisse von fünf Klonen gezeigt. Die Pfeile markieren die \sim 700 bp- und die \sim 400 bp-Bande. Die Markerfragmente sind *Hind*III-verdaute λ -DNA.

entstand das 400 bp-Fragment aus dem einen bereits zuvor mutagenisierten GAS41-Allel. Aufgrund der durch die Transfektionsexperimente erzielten Ergebnisse kann vermutet werden, dass mit den *Targeting*-Plasmiden pSp1-neo und pSp1-puro homologe Rekombinationen zwischen der endogenen Sp1-Bindestelle und der exogenen Plasmidsequenz nicht erzielt werden können.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Protein-DNA-Interaktion am Replikationsursprung (OBR) der Lysozym-GAS41-Gendomäne des Huhns *in vitro* und *in vivo* untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit war, Bindestellen für Replikations- und Transkriptionsfaktoren, die für die Initiation der DNA-Replikation am OBR von Bedeutung sind, zu identifizieren und ihre Bindung am OBR-Chromatin nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde mithilfe von Gelretardationsexperimenten und durch Anwendung der ChIP-Technik in Kombination mit der quantitativen *Real-Time PCR* die Bindung von ORC2 und der Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Sp1 am Lysozym-GAS41-OBR *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. Zudem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass ORC2 in Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren Sp1 und Oct-1 an den Lysozym-GAS41-OBR binden könnte.

5.1 DNA-Bindemotive für die Transkriptionsfaktoren Oct-1, Sp1 und NF1 im Bereich des Lysozym-GAS41-OBR

Eine Reihe von Studien belegt, dass Transkriptionsfaktoren auch bei der DNA-Replikation involviert sind und dabei eine wichtige Rolle spielen (zur Übersicht: Murakami und Ito, 1999). So enthalten fast alle DNA-Viren und zahlreiche Replikationsursprünge in Hefen und multizellulären Eukaryonten Transkriptionsfaktorbindestellen, die als Regulatorelemente bei der Aktivierung der DNA-Replikation fungieren. Tatsächlich wurde gezeigt, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren an solche Sequenzelemente zu einer drastischen Steigerung der Replikationsaktivität führt (Cheng und Kelly, 1989; Guo et al., 1989; Nguyen-Huynh und Schaffer, 1998; Li, 1999). Aus diesen Beobachtungen ging die inzwischen akzeptierte Hypothese hervor, dass Transkriptionsfaktoren nicht nur die Aktivität von Promotoren, sondern auch die von DNA-Replikationsursprüngen regulieren.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, überlagert sich der Lysozym-GAS41-OBR mit dem GAS41-Promotor. Das Vorkommen von Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, Oct-1 und NF1 in diesem Bereich warf die Frage auf, ob im OBR / GAS41-Promotor bindende Transkriptionsfaktoren auch bei der Initiation der DNA-Replikation am OBR involviert sein könnten. Zur Beantwortung dieser Frage konzentrierten sich die Untersuchungen auf die von Phi van und Strätling (1999) identifizierte ~300 bp umfassende OBR / GAS41-Promotorregion mit der höchsten Initiationsaktivität (Abb. 7). Bei der Nukleotidsequenzanalyse dieses Bereiches wurden anhand bekannter Transkriptionsfaktorbindemotive je eine potentielle Bindestelle

für die Transkriptionsfaktoren Oct-1 und NF1 sowie zahlreiche Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Sp1 identifiziert. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese drei Transkriptionsfaktoren bei der Replikation vieler DNA-Viren eine essentielle Rolle spielen (siehe Referenzen unten im Text).

Der Transkriptionsfaktor Oct-1 ist ein ubiquitäres Kernprotein, das für die Transkription zahlreicher ubiquitärer Gene (z. B. für Histon H2B), aber auch gewebespezifischer Gene (z. B. für IgM) verantwortlich ist (Sturm et al., 1988; Schubart et al., 2001). Oct-1 gehört zur Familie der POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren. Deren Mitglieder (Pit-1, Oct-1, Oct-2A, Oct-6 und Unc-86; Herr et al., 1988) zeichnen sich durch eine konservierte, bipartite DNA-Bindedomäne (POU-Domäne) aus. Diese besteht aus einer POU-spezifischen Subdomäne im N-Terminus und einer POU-Homöosubdomäne im C-Terminus, die durch einen flexiblen „Linker“ miteinander verbunden sind (Sturm et al., 1988; Sturm und Herr, 1988; Verrijzer et al., 1992). Das Oct-1-Protein bindet sequenzspezifisch und als Monomer an die konservierte Konsensusbindungssequenz 5'-ATGCAAAT-3', die auch als „Octamer-Motiv“ bezeichnet wird (Verrijzer et al., 1992). Die im OBR/GAS41-Promotor identifizierte Oct-1-Bindestelle besitzt die Nukleotidsequenz 5'-ACGCAAAC-3' (siehe Abb. 7) und weist somit gegenüber dem „Octamer-Motiv“ eine Sequenzabweichung von zwei Basenpaaren auf (T→C Austausch). Daher wurde die Nukleotidsequenz der Oct1-Bindestelle als „Octamer-Motiv-ähnlich“ bezeichnet. In der Literatur wurde bereits mehrfach gezeigt, dass Oct-1 die Replikation von Adenoviren und SV40 stimuliert. Demnach bindet von der Wirtszelle kodiertes Oct-1 an einzelnen Octamer-Motiven nahe des viralen Origins, wodurch die Replikation der Virus-DNA gefördert wird (Pruijn et al., 1986; O'Neill und Kelly, 1988; Coenjaerts et al., 1991; Verrijzer et al., 1992; Kilwinski et al., 1995). Bei Adenoviren wurde gezeigt, dass zur Stimulierung der Virus-Replikation die aus 160 Aminosäuren bestehende POU-Domäne ausreichend ist (Verrijzer et al., 1990; Coenjaerts et al., 1994).

Der Transkriptionsfaktor NF1 ist auch unter der Bezeichnung CTF (*CAAT-box transcription factor*) bekannt. Er umfasst eine Familie sequenzspezifisch bindender „CAAT-Box-“ und TGGCA-bindender Proteine, die für die Transkription zahlreicher zellulärer, aber auch viraler Gene verantwortlich sind und insbesondere bei der Adenovirus-Replikation von Bedeutung ist (Nagata et al., 1982 und 1983; Jones et al., 1987; Santoro et al., 1988; Mul und van der Vliet, 1992; zur Übersicht: de Jong und van der Vliet, 1999; Coenjaerts et al., 1991 und 1994; Mul et al., 1990 und 1992). Die Proteine der NF1-Familie binden als Homo- und Heteromere an die palindromische Konsensussequenz 5'-TTGGCA(N₄)TGCCAA-3' (Leegwater et al., 1985; Hennighausen et al., 1985), können aber auch mit etwas geringerer Affinität an

das Halb-Palindrom 5'-TTGGCA-3' oder 5'-TGCCAA-3' binden (Meisterernst et al., 1988a). Hühner-NF1 zählt zu den TGGCA-bindenden Proteinen (Rupp und Sippel, 1987). Da die im OBR/GAS41-Promotor vorkommende, potentielle NF1-Bindestelle die halbpalindromische Sequenz 5'-TTGGCA-3' aufweist (siehe Abb. 7), lag die Vermutung nahe, dass NF1 an dieser Sequenz bindet.

Zu den Transkriptionsfaktoren, für die eine Involvierung bei der viralen DNA-Replikation gut belegt ist, gehört das ubiquitäre Kernprotein Sp1 (Dyan und Tjian, 1983 und 1985). Das Sp1-Protein bildet mit den drei weiteren Proteinen Sp2, Sp3 und Sp4 eine kleine Familie von humanen Transkriptionsfaktoren (Briggs et al., 1986; zur Übersicht: Suske, 1999). Die Familie zeichnet sich durch eine charakteristische Domänenstruktur aus - einer C-terminalen DNA-Bindedomäne mit drei Zn(II)-Zinkfingermotiven des C2H2-Typs sowie zwei transkriptionsaktivierenden, glutaminreichen Domänen im N-Terminus (Kadonaga et al., 1988; Courey und Tjian, 1988). Sp1 spielt eine Schlüsselrolle beim Erhalt der basalen Transkription von Haushaltsgenen ohne „TATA-Box“. Dabei erleichtert Sp1 die Bindung des TFIID-Komplexes an den Promotor, was eine Rekrutierung der RNA-Polymerase II (Pol II)-Transkriptionsmaschinerie zum Promotor zur Folge hat (Smale et al., 1990; Javahery et al., 1994; Kaufmann und Smale, 1994). Zudem ist Sp1 bei der Transkriptionsaktivierung zahlreicher gewebespezifisch und zellzyklusabhängig aktivierter Gene involviert, insbesondere solcher, die bei der Regulation des Zellzykluses, der Umstrukturierung des Chromatins und dem Erhalt unmethylierter CpG-Inseln von Bedeutung sind (Macleod et al., 1994; Brandeis et al., 1994). Das charakteristische DNA-Bindemotiv von Sp1 ist die sogenannte „GC-Box“ mit der allgemeinen Konsensussequenz 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' (Kadonaga et al., 1987). Die GC-Box ist ein wichtiges und weit verbreitetes Transkriptionskontrollelement in eukaryontischen Promotoren und kommt dort entweder einzeln oder als vielfache Kopie vor (Dyan und Tjian, 1985).

Eine Reihe von Studien belegt, dass GC-Boxen auch wichtige funktionelle Elemente bei der Replikation des SV40, Polyomavirus (Py) und Epstein-Barr-Virus (EBV) sind (Guo und DePamphilis, 1992; Demeret et al., 1995; Baumann et al., 1999; Turner und Woodworth, 2001). Beispielsweise enthält das Nebenelement *aux-2* des SV40-Origins „ori“ drei Sp1- und drei *T-antigen*-Bindestellen. Es zeigte sich, dass für die höchste Replikationsaktivität des *ori*-Origins nicht nur die Bindung des einzigen viruskodierten Initiatorproteins *T-antigen*, sondern auch die des von der Wirtszelle kodierten Transkriptionsfaktors Sp1 im *aux-2*-Element erforderlich ist (Guo und DePamphilis, 1992). Im Lysozym-OBR/GAS41-Promotor kommen bedingt durch den hohen GC-Gehalt der „CpG-Insel“ zahlreiche GC-Boxen vor (siehe

Abb. 7). Vor dem Hintergrund der Bedeutung von Sp1 für die Virus-Replikation war diese auffällige Häufung potentieller Sp1-Bindestellen in unmittelbarer Nähe zur mutmaßlichen ORC-Bindestelle für diese Arbeit von besonderem Interesse. Anhand dieser Sp1-Binderegion sollte untersucht werden, ob Sp1 auch die DNA-Replikation am Lysozym-GAS41-OBR reguliert.

5.2 Die Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Sp1 binden an spezifischen DNA-Bindestellen im Lysozym-GAS41-OBR *in vivo*

Die Nukleotidsequenzanalyse des Lysozym-OBR / GAS41-Promotorbereiches zeigte das Vorkommen einer potentiellen Oct-1-Bindestelle, einer potentiellen NF1-Bindestelle sowie zahlreichen Sp1-Bindestellen (Abschnitt C in Abb. 7). Daher wurde als erstes untersucht, ob die drei Transkriptionsfaktoren tatsächlich an diesen Bindestellen binden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Sp1 im Lysozym-GAS41-OBR in Hühnerzellen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen.

Zunächst wurden in *in vitro*-Gelretardationsanalysen Protein-DNA-Interaktionen zwischen entsprechenden OBR-Sequenzen und Kernproteinen aus Humanzellen (Hep G2) und Hühnerzellen (HD11, DU249) untersucht. Zur Identifizierung der in den spezifischen Protein-DNA-Komplexen enthaltenen Proteine wurden Antikörper gegen Oct-1, Sp1, NF1 und ORC2 verwendet. Die Gelretardationsanalysen zeigten eine spezifische Interaktion zwischen Oct-1 und der im Lysozym-OBR / GAS41-Promotor lokalisierten, potentiellen Oct-1-Bindestelle (Abb. 9 und 10). Das identifizierte Sequenzmotiv 5'-ACGCAAAC-3' ist mit der als „Octamer-Motiv“ bezeichneten Oct-1-Konsensusbindungssequenz 5'-ATGCAA AT-3' (Verrijzer et al., 1992) nicht vollständig identisch, sondern weist an zwei Nukleotidpositionen einen A/T-Austausch auf. Offensichtlich wird die „Octamer-Motiv“-ähnliche Sequenz trotz der Nukleotidabweichung als Oct-1-Bindestelle „erkannt“.

Nach den *in vitro*-Analysen wurde die Bindung von Oct-1 am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBRs auch *in vivo* untersucht. Dazu wurde die Technik der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit der der quantitativen *Real-Time PCR* kombiniert. Die ChIP ist eine etablierte Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen DNA-bindenden Proteinen und dem Chromatin *in vivo* (Orlando et al., 1997; Orlando, 2000). Die Methode basiert auf der Möglichkeit, durch Formaldehyd reversible Vernetzungen (*crosslink*) zwischen DNA und Proteinen sowie zwischen benachbarten Proteinen in lebenden Zellen zu bilden (Solomon und

Varshavsky, 1985; Solomon et al., 1988; Orlando et al., 1997). Die Formaldehydbehandlung der Zellen darf nicht zu lange und mit zu hoher Formaldehydkonzentration erfolgen, da die Vernetzung zum einen zu stark und eine Reversion schwierig wird, zum anderen weil zu lange Inkubationszeiten die Vernetzung von nicht DNA-bindenden Proteinen am Chromatin fördert. Die für diese Arbeit durchgeführten Vernetzungen erfolgen daher mit der in der Literatur beschriebenen Endkonzentration von 1% Formaldehyd (Göhring und Fackelmayer, 1997; Crane-Robinson et al., 1999). Kinetische Verlaufsstudien zur Vernetzung von ORC2 mit DNA in humanen HeLa-Zellen zeigten zudem, dass nach einer Inkubationsdauer von 4 bis 8 Minuten über 90% des detektierbaren ORC2 vernetzt ist (Ritzi et al., 1998; Keller et al., 2002). In Anlehnung an diese Studien wurde für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Vernetzungen eine Inkubationsdauer von 10 min festgelegt.

Die aus DU249-Hühnerhepatozyten präparierten Nucleoproteine bzw. Protein-DNA-Komplexe wurden bei der anschließenden ChIP mit spezifischen α -hOct-1-Antikörpern immunpräzipitiert. Nach Reversion der *crosslinks* zwischen DNA und Proteinen wurde die DNA mittels quantitativer *Real-Time PCR* analysiert. Die Analysen der α -hOct-1-Immunpräzipitate ergaben eine spezifische Anreicherung von Sequenzen aus dem Bereich des Lysozym-GAS41-OBRs (Abb. 23). Aus diesen sowie den Ergebnissen der *in vitro*-Gelretardationsanalysen wurde abgeleitet, dass Oct-1 auch *in vivo* an der Octamer-Motiv-ähnlichen Bindestelle im Lysozym-GAS41-OBR bindet. Mittels *Real-Time PCR* allein ist die Oct-1-Bindestelle jedoch nicht exakt zu bestimmen. Neben dem Abstand der Primer zur Replikationsstartstelle wird die Auflösung der PCR durch die Länge der immunpräzipitierten Chromatinfragmente begrenzt. Diese sind nach der Fragmentierung durch Ultraschall noch zwischen ca. 400 bp und 1500 bp lang. Die Zerkleinerung von Chromatin durch Ultraschall ist jedoch begrenzt. Zwar kann durch Einsatz unspezifischer Nukleasen wie *Micrococcus Nuclease* das Chromatin bis auf Nukleosomenlänge zerlegt werden, jedoch reduzieren zu kleine DNA-Fragmente (<200 bp) Menge und Detektierbarkeit immunpräzipitierter Protein-DNA-Komplexe signifikant.

Aufgrund der *in vitro* erzielten Ergebnisse scheint innerhalb des Lysozym-GAS41-OBRs und GAS41-Promotors nur eine Oct-1-Bindestelle vorzukommen (Abb. 9). Möglicherweise existiert aber noch mindestens eine weitere Oct-1-Bindestelle stromaufwärts des OBRs im Lysozymgen. Eine Anreicherung der entsprechenden Region ist in Abb. 23 (qPri-1,7kb) zu sehen. Das Vorkommen einer Oct-1-Bindestelle im Lysozym-GAS41-OBR ist vermutlich auch auf die Überlagerung des OBRs mit dem GAS41-Promotor zurückzuführen. Vermutlich dient die Oct-1-Bindestelle vor allem als Regulatorelement zur Kontrolle der GAS41-Expression. Möglich wäre aber auch eine Doppelfunktion, welche dem Transkriptionsfaktor Oct-1 nicht

nur die Regulation der GAS41-Expression, sondern auch die der Replikation erlaubt. So könnte das Vorkommen der Oct-1-Bindestelle nur wenige Basenpaare von der mutmaßlichen ORC2-Bindestelle (siehe Diskussion 5.3), ein Hinweis darauf sein, dass Oct-1 bei der Initiati- on der DNA-Replikation am OBR involviert ist. Bei Adenoviren wurde beispielsweise gezeigt, dass von der Wirtszelle exprimiertes Oct-1 die Verankerung des viralen pTP/pol-Komplexes am Virus-Replikationsursprung erleichtert (van Leeuwen et al., 1997). Der pTP/pol-Komplex besteht aus dem Initiationsprotein (pTP) und der DNA-Polymerase (pol). Dabei interagiert die POU-Domäne des Oct-1-Proteins mit dem pTP-Protein, was den Prä-Initiationskomplex stabilisiert und die Virus-Replikation fördert. Die im Oct-1-Protein enthaltene POU-Domäne besitzt aber auch die Fähigkeit, die sie umgebende DNA zu krümmen. So führt in Adenoviren die simultane Bindung von Oct-1 und NF1 im viralen Origin zu einer starken Krümmung der Virus-DNA, was ebenfalls die Replikation der Virus-DNA stark beschleunigt. Dieser repli- kationsfördernde Effekt wird damit erklärt, dass die DNA-Krümmung die Bildung des Prä- Initiationskomplexes erleichtert (Mysiak et al., 2004; Verrijzer et al., 1992; Chen et al., 1990). Somit ist denkbar, dass die Bindung von Oct-1 im Lysozym-OBR bzw. GAS41-Promotor in einer ähnlichen Weise die Bildung von Prä-Replikationskomplexen erleichtert und so zur In- itiation der Replikation am OBR beitragen könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch der Transkriptionsfaktor Sp1 an konser- vierte DNA-Bindemotive (GC-Boxen) innerhalb des Lysozym-OBRs und GAS41-Promotors bindet. In den *in vitro*-Gelretardationsanalysen wurde eine spezifische Interaktion von Sp1 mit einer Sequenz aus dem OBR/GAS41-Promotor, welche zwei GC-Boxen enthält, festgestellt (Abb. 11 und 12). In nachfolgenden ChIP-Experimenten wurden *crosslink*-Nucleoproteine aus HD11-Hühnermyelomonozyten mit α -hSp1-Antikörpern immunpräzipitiert und die coim- munpräzipitierten DNA-Fragmente mittels quantitativer *Real-Time PCR* analysiert. Dabei wurde ebenfalls eine spezifische Anreicherung von Sequenzen aus dem Bereich des Lysozym- GAS41-OBRs festgestellt (Abb. 22). Im Gegensatz zu der einen Oct-1-Bindestelle existie- ren im Lysozym-OBR und GAS41-Promotor zahlreiche potentielle Sp1-Bindestellen (GC- Boxen). Auch wenn aufgrund der begrenzten PCR-Auflösung nicht exakt bestimmbar ist, wieviele und welche der Sp1-Bindestellen benutzt werden, so ist doch zu vermuten, dass Sp1-Proteine an mehrere, wenn nicht sogar an alle im OBR/GAS41-Promotor befindlichen GC-Boxen binden. Aus *in vivo*-Co-Transfektionsexperimenten mit Reporterkonstrukten ist bekannt, dass das Vorkommen mehrerer Sp1-Bindestellen einen stark synergistischen Effekt auf die Transkriptionsaktivität hat (Pascal und Tjian, 1991). Demnach wird die Transkription

von einem nur eine Sp1-Bindestelle enthaltenden Promotor moderat aktiviert (2- bis 3-fach), wohingegen die Transkription von einem Promotor mit zwei Sp1-Bindestellen 50- bis 80-fach aktiviert wird. Dabei ist es unerheblich, ob die GC-Boxen direkt benachbart sind oder beispielsweise 30 bp voneinander entfernt liegen. Die im Lysozym-OBR und GAS41-Promotor zahlreich vorkommenden GC-Boxen könnten daher ebenfalls eine synergistische Aktivierung der GAS41-Transkription bewirken. Zudem ist bekannt, dass Sp1 an einer einzigen GC-Box durch direkte Protein-Protein-Interaktionen multimere Proteinkomplexe, insbesondere Tetramere, bilden kann (Pascal und Tjian, 1991). Der Synergismus ist vermutlich die Folge einer zwischen promotornahen und -entfernten Sp1-Tetrameren stattfindenden direkten Interaktion, welche durch eine DNA-Schleifenbildung ermöglicht wird. Es wird angenommen, dass die Bildung der multimeren Proteinkomplexe die Interaktion der Transkriptionsmaschinerie mit dem Promotor erleichtert (Mastrangelo et al., 1991; Pascal und Tjian, 1991).

Im Gegensatz zu den Transkriptionsfaktoren Oct-1 und Sp1 bindet der Transkriptionsfaktor NF1 nicht am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBRs. Laut Literatur bindet NF1 an die halbpalindromischen Konsensussequenzen 5'-TTGGCA-3' oder 5'-TGCCAA-3' (Rupp und Sippel, 1987; Meisterernst et al., 1988a; Shigehiro et al., 1996). Die im Lysozym-OBR / GAS41-Promotor identifizierte Sequenz weist die Nukleotidabfolge 5'-TTGGCA-3' auf, weshalb diese als potentielle NF1-Bindestelle betrachtet wurde. In den *in vitro*-Gelretardationsanalysen war jedoch keine Interaktion von NF1 mit Sequenzen des Lysozym-GAS41-OBRs feststellbar. Es konnten keine *Supershifts* von Protein-DNA-Komplexen mit dem das NF1-Bindemotiv tragenden Oligonukleotid erzeugt werden (siehe Abb. 14 C). Dies ist sehr wahrscheinlich nicht auf eine mangelhafte Affinität des verwendeten α -hNF1-Antikörpers zurückzuführen. Der α -hNF1-Antikörper ist zwar gegen den N-Terminus des humanen NF1-Proteins gerichtet, dieser ist jedoch im Mensch und Huhn hoch konserviert und zu $\sim 90\%$ in der Aminosäuresequenz identisch (Gronostajski, 2000). NF1 ist dafür bekannt, Homomere und mit anderen Proteinen heteromere Komplexe zu bilden. Dies würde im *Western Blot* das Auftreten mehrerer Banden in der Nucleoproteinfraktion von CHIP-Experimenten (*Input*) erklären. Eine *in vivo*-Interaktion zwischen NF1 und Oct-1, Sp1 oder ORC2 wurde jedoch nicht nachgewiesen (siehe Abb. 20). Es ist daher anzunehmen, dass die im Lysozym-OBR / GAS41-Promotor als potentielle NF1-Bindestelle identifizierte Nukleotidsequenz keine NF1-Bindestelle ist.

Bezüglich der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hühnerzelllinien HD11 und DU249 gibt es noch einige Punkte anzumerken. Der Einsatz von Kernextrakt aus der Hühnermyelo-

monozytenzelllinie HD11 erwies sich in den Gelretardationsanalysen als problematisch. Auf den Autoradiogrammen waren die spezifischen Protein-DNA-Komplexe meist als „Schmier“ anstatt als diskrete Bande zu sehen (siehe z. B. Abb. 12 B). Dies führte dazu, dass mehrere Autoradiogramme nicht auswertbar waren. Diese Befunde sind höchwahrscheinlich auf eine starke Lysozymexpression der HD11-Zellen und einer damit einhergehenden hohen proteolytischen Stoffwechselaktivität zurückzuführen. HD11-Zellen sind durch Transformation mit dem *v-myc*-kodierenden Geflügelleukämie-Retrovirus MC29 immortalisierte Myelomonocyten, deren weitere Ausdifferenzierung zu reifen Makrophagen blockiert ist (Beug et al., 1979). Werden HD11-Zellen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) behandelt, kommt es zur Aktivierung der Zellen und einem drastischen Anstieg der Lysozymexpression (Goethe und Phi van, 1998). Wegen ihrer späteren biologischen Funktion als „Killerzellen“ enthalten bereits die HD11-Makrophagenvorläuferzellen viele proteolytische Enzyme. Diese könnten während der Kernextraktpräparation zur teilweisen Degradation der Kernproteine geführt haben. Die „verwischten“ Banden bestehen daher vermutlich aus unterschiedlich großen Komplexen, die sich zwischen DNA und verschiedenen Oct-1-, Sp1- und ORC2-Proteinabbauprodukten gebildet hatten. Da die Versuchsergebnisse mit HD11-Kernextrakt oftmals unbrauchbar waren, wurden die Studien auf die ebenfalls mit dem Geflügelleukämie-Retrovirus MC29 transformierte Hühnerhepatozytenzelllinie DU249 (Langlois et al., 1974) ausgeweitet. Im Gegensatz zu den HD11-Zellen wird das Lysozymgen in DU249-Zellen nicht exprimiert. Phi van et al. (1998) wiesen jedoch nach, dass der Lysozym-GAS41-OBR in beiden Zelllinien aktiv ist und jeweils in der frühen S-Phase des Zellzykluses aktiviert wird. Daher konnten DU249-Zellen anstelle der HD11-Zellen verwendet werden. Die mit DU249-Kernextrakt durchgeführten Gelretardationsanalysen zeigten dann auch deutlich diskretere Banden der spezifischen Protein-DNA-Komplexe (siehe z. B. Abb. 12 C).

5.3 ORC2, eine Komponente des hexameren ORC-Komplexes, bindet an den Lysozym-GAS41-OBR *in vivo*

Die DNA-Replikation beginnt an zahlreichen Replikationsursprüngen, welche von dem heterohexameren ORC-Komplex „erkannt“ werden. Wo sich allerdings im Lysozym-GAS41-OBR die Bindestelle des ORC-Komplexes befindet, war bis zur vorliegenden Arbeit noch nicht untersucht worden. Bis *dato* war bekannt, dass die bidirektionale Replikation von einer Startstelle (OBR) innerhalb einer engen, etwa 300 bp breiten Region am 3'-Ende des Lysozymgens

ausgeht (Phi van und Strätling, 1999). Folglich muss die ORC-Bindestelle des Lysozym-GAS41-OBRs in diesem Bereich liegen. Um die mögliche Lage der ORC-Bindestelle weiter einzugrenzen, wurde die Nukleotidsequenz der OBR/GAS41-Promotorregion hinsichtlich AT-reicher Abschnitte überprüft. Zwar binden, wie bereits erwähnt, metazoische ORC-Komplexe an keine spezifischen Erkennungssequenzen, Studien belegen jedoch, dass ORC-Komplexe zumindest eine allgemeine, sequenzunabhängige Präferenz für AT-reiche Sequenzen besitzen (Vashee et al., 2003; DePamphilis, 2005). Tatsächlich kommt in der ansonsten AT-armen ($\sim 34\%$ AT) Lysozym-GAS41-OBR-Region (Phi van und Strätling, 1999) eine kurze Nukleotidsequenz mit erhöhtem AT-Gehalt ($\sim 53\%$ AT) vor. Diese etwa 50 bp lange Sequenz liegt am 3'-Ende des Lysozymgens und befindet sich damit im OBR-Bereich mit der höchsten Initiationsaktivität (Abschnitte B und C in Abb. 7). Somit lag die Vermutung nahe, dass die AT-reiche Nukleotidsequenz die gesuchte ORC-Bindestelle enthalten könnte.

Zur Lokalisierung der ORC-Bindestelle des Lysozym-GAS41-OBRs konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Identifizierung der Bindestelle von ORC2, der ~ 72 kDa-Untereinheit des Hühner-ORC-Komplexes. Diese wurde ausgewählt, weil die ORC2-Untereinheit als Repräsentant des ORC-Komplexes angesehen werden kann - und zwar aus mehreren Gründen: Zum einen spielt ORC2 eine zentrale Rolle bei der Bildung der stabilen Kernkomplexe ORC2-ORC5 bzw. ORC1-ORC5 *in vitro* (Dhar et al., 2001; Vashee et al., 2001; Giordano-Coltart et al., 2005; DePamphilis, 2005; Siddiqui und Stillman, 2007). Zum anderen hat ORC2 *in vivo* einen direkten Kontakt zur DNA und somit zur Nukleotidsequenz des Replikationsursprunges (Ladenburger et al., 2002; Keller et al., 2002; Abdurashidova et al., 2003). Somit besitzt ORC2 eine eigene DNA-Bindestelle. Eine weitere vorteilhafte Eigenschaft der ORC2-Untereinheit ist, dass diese während des gesamten Zellzykluses am Chromatin des Origins gebunden bleibt und somit eine Art „Markierung“ darstellt (Ladenburger et al., 2002; Keller et al., 2002; Abdurashidova et al., 2003). Dementsprechend kann durch einen Nachweis von ORC2 am Replikationsursprung auf die dortige Bindung des gesamten ORC-Komplexes geschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass ORC2 an Sequenzen des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro* und *in vivo* bindet. Die Ergebnisse der *in vitro*-Gelretardationsanalysen, in denen die Protein-DNA-Interaktion mit der AT-reichen Sequenz untersucht wurde, lassen vermuten, dass die ORC2-Bindestelle des Lysozym-GAS41-OBRs innerhalb der 5'-Hälfte der AT-reichen Nukleotidsequenz (Abschnitt B in Abb. 7) liegt (siehe Abb. 13 und 14). In den *Immunomobility Shift*-Assays zeigte sich, dass die Zugabe des zum Nachweis des ORC2-Proteins eingesetzten α -hORC2-Antiserums zwar zu einem „Verschwinden“ der spezifischen Protein-

DNA-Komplexe führte, ein „Supershift“ jedoch nicht zu erkennen war (Abb. 14). Das Verschwinden der spezifischen Komplexbande ohne das Erscheinen eines Supershifts könnte auf die Zugabefolge der Reaktionskomponenten zurückzuführen sein. In den Reaktionsansätzen wurden immer zunächst Kernextrakt und α -hORC2-Antiserum vorinkubiert und erst später mit der radioaktiv markierten DNA versetzt. Möglicherweise konnten die mit den Antikörpern verbundenen ORC2-Proteine nicht mehr an die markierte DNA binden, weil der Antikörper die DNA-Bindestelle des Proteins verdeckt haben könnte. Zuvor durchgeführte *Immunomobility Shift*-Experimente, bei denen zunächst Kernextrakt und markierte DNA vorinkubiert und erst danach mit dem Antiserum oder Antikörper versetzt wurden, zeigten überhaupt keine Veränderung der Bandensignalintensität (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die erstgenannte Zugabefolge beibehalten.

Durch ChIPs mit quantitativer *Real-Time PCR* wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass ORC2 auch *in vivo* am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBRs bindet (Abb. 24). Beide Techniken waren bereits erfolgreich zur Identifizierung der DNA-Bindebereiche für die humanen ORC-Proteine, hORC1 und hORC2, im humanen *TOP1*-Promotor und der *MCM4/PRKDC*-Intergenregion eingesetzt worden (Keller et al., 2002, Ladenburger et al., 2002). Dabei wurden die beiden Proteine mit spezifischen α -hORC1- bzw. α -hORC2-Antikörpern aus *cross-link*-Nucleoproteinen immunpräzipitiert und die coimmunpräzipitieren DNA-Fragmente durch quantitative *Real-Time PCR* analysiert. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass am Chromatin gebundenes hORC2 in zwei unterschiedlich kompakten Chromatinkompartimenten existiert (Kreitz et al., 2001). Dies leiteten die Autoren aus Zellfraktionierungsexperimenten ab, in denen aus humanen HeLa-Zellen isolierte Zellkerne nacheinander mit steigenden Salzkonzentrationen extrahiert und die extrahierten Kernproteine im *Western Blot* analysiert wurden. Den Autoren zufolge gibt es ein hochgradig zugängliches Kompartiment mit „lockerem“ Chromatin, in welchem hORC2 unter niedrigen Salzkonzentrationen (0,1 - 0,25 M NaCl) vom Chromatin dissoziiert und ein Kompartiment mit dicht gepacktem Chromatin, in welchem höhere Salzkonzentration (0,45 M NaCl) für die Dissoziation von hORC2 notwendig sind. Möglicherweise kommt cORC2 in Hühnerzellen ebenfalls in unterschiedlich dicht gepackten Chromatinregionen vor. Wie es bereits bei der Identifizierung der Oct-1- und Sp1-Bindestellen diskutiert wurde (Diskussion 5.2), so gilt auch für die ORC2-Bindestelle, dass ihre genaue Position mittels *Real-Time PCR* allein nicht exakt zu bestimmen ist, weil die Auflösung der PCR nicht ausreicht. Durch Kombination der *in vivo* mit den *in vitro* erzielten Ergebnisse ist jedoch zu vermuten, dass ORC2 auch *in vivo* an die als mutmaßliche ORC2-Bindestelle identifizierte 5'-Hälfte der AT-reichen Sequenz bindet (Abschnitt B in Abb. 7). Wenn dem so

ist, dann müßten in diesem Bereich in der G1-Phase des Zellzykluses auch die anderen Proteine des ORC-Komplexes und des Prä-Replikationskomplexes wie Cdt1, Cdc6 und Mcm[2-7] zu finden sein. Um dies zu überprüfen könnten ChIP-Experimente und *Real-Time PCRs* mit synchronisierten Zellen und Antikörpern gegen die genannten Komponenten durchgeführt werden.

Dass ORC2 direkten Kontakt zur DNA hat und permanent am Chromatin gebunden bleibt, könnte darauf hinweisen, dass die Bindung des ORC-Komplexes, zumindest teilweise, durch die ORC2-Untereinheit vermittelt wird. Wie es bereits in der Einleitung beschrieben wurde, enthält die Orc4-Untereinheit der Spalthefe *S. pombe* eine besondere DNA-Bindedomäne mit mehreren Kopien eines „AT-hook“-Bindemotivs, welches eine hohe Affinität zu AT-reicher DNA besitzt. Es gilt als erwiesen, dass in *S. pombe* die Bindung von ORC-Komplexen an Replikationsursprünge einzig durch die Orc4-Untereinheit vermittelt wird (Chuang und Kelly, 1999). Interessant ist in diesem Zusammenhang die kürzliche Identifizierung einer „ORC assembly domain“ im humanen ORC2-Protein. Diese Domäne soll sowohl für das Zusammenfügen des ORC-Komplexes *in vivo*, als auch für dessen Lokalisation im Zellkern notwendig sein (Radichev et al., 2006). Weitere Strukturuntersuchungen werden möglicherweise auch in ORC2 oder in anderen am Chromatin gebundenen ORC-Proteinen spezielle DNA-Bindedomänen nachweisen, welche für die Bindung von ORC-Komplexen an Replikationsursprüngen von Bedeutung sind.

5.4 ORC2 bindet vermutlich in Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren Sp1 und Oct-1 an den Lysozym-GAS41-OBR *in vivo*.

In Anbetracht der geringen DNA-Sequenzabhängigkeit metazoischer ORC-Komplexe und der Tatsache, dass diese trotzdem an spezifischen Replikationsstartstellen zu finden sind, drängt sich die Vermutung auf, dass zusätzliche Faktoren die ORC-Komplexe zum Replikationsursprung „leiten“. Ein diskutierter Mechanismus geht von der Involvierung von Transkriptionsfaktoren aus. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse ist zu vermuten, dass ORC2 in Interaktion mit den beiden Transkriptionsfaktoren Sp1 und Oct-1 an den Lysozym-GAS41-OBR *in vivo* bindet.

Dafür sprechen folgende Ergebnisse: 1) Der Lysozym-OBR / GAS41-Promotor enthält eine Oct-1-Bindestelle und zahlreiche Sp1-Bindestellen, an die Oct-1 bzw. Sp1 *in vitro* binden. 2) ORC2 bindet an eine AT-reiche Sequenz innerhalb des Lysozym-GAS41-OBRs *in vitro*. 3)

ORC2, Sp1 und Oct-1 binden am OBR-Chromatin *in vivo*. 3) Die DNA-Bindestellen von ORC2 und von Oct-1 liegen unmittelbar nebeneinander. Die untersuchten Sp1-Bindestellen sowie weitere GC-Boxen befinden sich ebenfalls in enger Nachbarschaft zur mutmaßlichen ORC2-Bindestelle. 4) ORC2 bildet *in vivo* mit Sp1 und Oct-1 heterodimere Proteinkomplexe, was auf eine dicht benachbarte Chromatinbindung und mögliche Assoziation hinweisen könnte.

Beim letzten Punkt wurde durch *Western Blot*-Analysen von ChIP-Immunpräzipitaten festgestellt, dass ein vergleichsweise großer Anteil des am Chromatin gebundenen ORC2 mit Sp1 oder Oct-1 assoziiert ist. Dagegen kommt nur ein geringer Anteil der chromatingebundenen Sp1- oder Oct-1-Proteine in Verbindung mit ORC2 vor. Das relativ häufige Vorkommen von chromatingebundenen ORC2/Sp1- bzw. ORC2/Oct-1-Komplexen könnte darauf hinweisen, dass ORC2 nur mithilfe von Sp1 oder Oct-1 am Chromatin binden kann. Dementsprechend könnten die beiden Transkriptionsfaktoren für die ORC2-Bindung im Lysozym-GAS41-OBR notwendig sein (siehe unten). Umgekehrt könnte die Beobachtung, dass Sp1 und Oct-1 meist nicht in Verbindung mit ORC2, sondern als Monomer vorkommen, mit ihrer Funktion als ubiquitäre Transkriptionsfaktoren erklärt werden. Weil beispielsweise Sp1 eine zentrale Rolle bei der basalen Transkription vieler, wenn nicht sämtlicher Haushaltsgene spielt, bindet Sp1 in den Promotoren zahlreicher Gene und damit auch in solchen, die keine ORC2-Bindestelle enthalten. Ähnliches gilt vermutlich für den Transkriptionsfaktor Oct-1. Interessanterweise konnten Keller et al. (2002) zeigen, dass auch humanes ORC2 mit Sp1 interagiert. Die Autoren vermuten aufgrund von ChIP-Experimenten und quantitativen *Real-Time PCR*-Analysen, dass in dem von ihnen untersuchten Promotor des humanen *TOP1*-Gens, der ebenfalls einen OBR enthält, der ORC-Komplex und Sp1 an dicht benachbarten Sequenzen binden, wobei eine direkte Protein-Protein-Interaktion nicht auszuschließen ist. Da eine Interaktion zwischen ORC2 und Sp1 sowohl am humanen *TOP1*-Origin als auch am Lysozymgen/GAS41-OBR des Huhns festgestellt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass Interaktionen zwischen Sp1 und ORC2 auch an anderen Replikationsursprüngen und in anderen Organismen stattfinden könnten.

Welche Funktion(en) könnten Sp1 und Oct-1 neben ihrer eigentlichen Funktion als Transkriptionsfaktor am Lysozym-GAS41-OBR ausüben? Zum einen kommt im OBR/GAS41-Promotor nur eine Oct-1-Bindestelle, aber auffällig viele Sp1-Bindestellen vor. Diese Anhäufung von Sp1-Bindestellen könnte nicht nur für die Transkription des GAS41-Gens, sondern auch für die Initiation der Replikation am OBR von Bedeutung sein. Da die Replikationsaktivität durch die „normale“, verpackte Chromatinstruktur gehemmt wird, könnte die gehäuf-

te Bindung von Sp1-Proteinen in unmittelbarer Nähe der Replikationsstartstelle eine „Öffnung“ der lokalen Chromatinstruktur bewirken. Von einigen Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass diese zur Umstrukturierung des Chromatins histonmodifizierende Enzyme rekrutieren, um einen die Transkription fördernden Chromatinzustand bereitzustellen (Narlikar et al., 2002; Workman und Kingston, 1998). Möglicherweise bewirkt die starke Sp1-Anhäufung im GAS41-Promotor eine lokale Aufhebung der replikationshemmenden Wirkung der Chromatinverpackung. Dies könnte dann den Komponenten des Prä-Replikationskomplexes (ORC, Cdc6, Cdt1, Mcm[2-7]) und den Proteinen der Replikationsmaschinerie (z. B. RPA, GINS, Pol- α :Primase) den Zugang zur Replikationsstartstelle ermöglichen.

Eine andere denkbare Funktion von Sp1 bzw. Oct-1 könnte auch darin bestehen, dass die Transkriptionsfaktoren eine „Leitfunktion“ für ORC2 oder auch für andere ORC-Proteine übernehmen. So könnte die Interaktion mit ORC2 dazu beitragen, ORC2 zu seiner DNA-Bindestelle im Replikationsursprung zu geleiten. Umgekehrt könnte dies bedeuten, dass ORC2 nur mithilfe von Sp1 bzw. Oct-1 am OBR-Chromatin binden kann. Weil der ORC-Komplex ohne die ORC2-Untereinheit nicht funktionsfähig ist, könnte auf diese Weise die Initiation der Replikation am OBR kontrolliert werden. Zudem könnte sich eine mutmaßliche Rekrutierungsfunktion von Sp1 bzw. Oct-1 auch auf andere Komponenten der Replikationsmaschinerie erstrecken. Dies könnten zum Beispiel die oben erwähnten Proteine RPA, GINS oder die Pol- α :Primase sein. Van Leeuwen et al. (1997) hatten bei der Adenovirus-Replikation gezeigt, dass von der Wirtszelle kodiertes Oct-1 mit dem viralen Initiationsprotein (pTP) interagiert. Dadurch wurde die Bindung des viralen pTP/DNA-Polymerase-Komplexes an den Virus-Origin erleichtert und die Virus-Replikation stimuliert. In ähnlicher Weise könnte die Bindung von Oct-1 in unmittelbarer Nähe zur mutmaßlichen ORC2-Bindestelle zur Stabilisierung des am OBR gebildeten Prä-Replikationskomplexes beitragen.

Es ist auch vorstellbar, dass die neben der ORC2-Bindestelle auftretende Anhäufung von Sp1-Proteinen dazu dient, ORC2 während des Zellzyklus an seiner Bindestelle zu fixieren. Vielleicht könnte eine solche Interaktion zwischen ORC2 und Kernproteinen erklären, warum ORC2 in Humanzellen und vermutlich auch im Huhn permanent am Chromatin gebunden ist.

Interaktionen zwischen ORC-Komplex und Kernproteinen wie Sp1 und Oct-1 könnten aber auch ein Mechanismus zur spezifischen Auswahl von Replikationsursprüngen sein. Da metazoische ORC-Komplexe offensichtlich keine besondere DNA-Bindungsspezifität besitzen, spricht vieles für die Annahme, dass stattdessen sequenzabhängig bindende Kernproteine wie Transkriptionsfaktoren an spezifischen Regulationselementen innerhalb oder nahe des Replikationsursprunges binden, um ORC-Komplexe über eine direkte Interaktion an den Origin

zu dirigieren. Eine Reihe von Studien belegt, dass am Chromatin bindende Kernproteine in der Lage sind, ORC-Komplexe zur DNA zu leiten. Bei der Replikation des Epstein-Barr-Virus in Humanzellen bindet ORC mithilfe des zellulären Kernproteins TRF2 an den viralen Replikationsursprung OriP, wodurch die Virus-Replikation stark stimuliert wird (Atanasiu et al., 2006). Dabei bildet TRF2, das an spezifische Sequenzen innerhalb des viralen Origins bindet, mit ORC1 und ORC2 stabile Proteinkomplexe - und zwar durch direkte Interaktion zwischen der N-terminalen TRF2-Domäne und ORC1 bzw. ORC2. Auch die Chromatinkomponente HMGA1a interagiert mit verschiedenen ORC-Proteinen (ORC1, ORC2, ORC4 und ORC6), was die Rekrutierung von ORC-Komplexen zum viralen Replikationsursprung OriP bewirkt (Thomae et al., 2008). Funktionelle Interaktionen zwischen ORC und sequenzspezifischen DNA-Bindeproteinen wurden auch in Metazoen nachgewiesen. In der Fruchtfliege *D. melanogaster* bindet das Onkoprotein Myb sequenzspezifisch an das Genamplifizierungskontrollelement ACE3 und den benachbarten, primären Replikationsursprung Ori- β . Myb dirigiert ORC durch direkte Interaktion mit ORC1, ORC2 und ORC6 zum Origin (Beall et al., 2002). Der Transkriptionsregulator AIF-C ist ein ORC1-bindendes Protein, dessen sequenzspezifische Bindung im *aldB*-Origin der Ratte zur verstärkten Replikation führt (Saitoh et al., 2002; Minami et al., 2006). Weitere Beispiele für an ORC-Proteine bindende Faktoren sind EBNA1a, Ku80 und Myc (Schepers et al., 2001; Sibani et al., 2005; Dominguez-Sola et al., 2007). Diese Beispiele implizieren, dass die DNA-Bindungsspezifität von Transkriptionsfaktoren und anderer Kernproteine ein wichtiger Mechanismus sein könnte, um einzelne Replikationsstartstellen aus einer Vielzahl möglicher und über das Genom verteilter Origins auszuwählen und um ORC-Komplexe zielgerichtet dorthin zu führen. Solch ein Mechanismus würde die DNA-Bindung von ORC-Komplexen flexibel gestalten, da zahlreiche Transkriptionsfaktoren mit zudem unterschiedlicher DNA-Bindungsspezifität existieren (Kohzaki und Murakami, 2005). Zudem kann die Aktivität von Transkriptionsfaktoren als Reaktion auf intra- und extrazelluläre Signale über vielfältige Signaltransduktionswege reguliert werden.

5.5 Transfektionsexperimente zur Deletion der Sp1-Binderegion im Lysozym-OBR / GAS41-Promotor von DT40-Zellen

Im vorherigen Abschnitt wurde die Interaktion zwischen ORC2 und dem Transkriptionsfaktor Sp1 am Lysozym-GAS41-OBR diskutiert. Es wurde darüber spekuliert, ob Sp1 eine „Leitfunktion“ für ORC2 bzw. den ORC-Komplex ausübt, indem nahe der ORC-Bindestelle se-

quenzabhängig bindenden Sp1-Proteine sequenzunabhängig bindende ORC-Proteine zu ihrer Chromatinbindestelle „leiten“. Angenommen, ORC-Proteine könnten nur mithilfe des Transkriptionsfaktors Sp1 an den Lysozym-GAS41-OBR binden, dann müßte die Entfernung der OBR-nahen Sp1-Bindestellen dazu führen, dass ORC2 und die anderen ORC-Proteine nicht mehr an den Replikationsursprung binden können. Folglich würde kein Prä-Replikationskomplex gebildet und die DNA-Replikation nicht initiiert werden. Der OBR bliebe inaktiv.

Um diese Überlegungen zu überprüfen, wurden Transfektionsexperimente durchgeführt, um die Sp1-Binderegion durch homologe Rekombination in beiden Allelen zu deletieren. Hierfür wurden zwei *Targeting*-Plasmide, pSp1-neo und pSp1-puro, konstruiert. Diese enthalten das Neomycin- bzw. Puromycin-Resistenzgen als Selektionsmarker, welcher von zwei homologen DNA-Sequenzen aus dem Lysozym-GAS41-Genlocus flankiert wird. Der ~320 bp umfassende Sp1-Bindebereich war in der 3'-homologen Sequenz deletiert. Die *Targeting*-Plasmide dienen dazu, in zwei Transfektionsrunden erst eine heterozygote Sp1 $-/+$ Zelllinie und dann eine homozygote Sp1 $-/-$ Zelllinie mit doppelt deletierter Sp1-Binderegion zu erzeugen, indem die endogene Sequenz durch eine exogene Sequenz mit deletierter Sp1-Binderegion ersetzt wird. Für die Transfektionsexperimente wurde die Hühnerlymphozytenzelllinie DT40 ausgewählt. Bei diesen Zellen handelt es sich um Hühner-B-Lymphozyten, die mit dem *v-myc*-kodierenden Geflügelleukämie-Retrovirus (ALV) MC29 transformiert sind (Baba et al., 1985). In dieser Zelllinie finden homologe DNA-Integrationen häufiger als in anderen Zelllinien statt, je nach eingesetztem Plasmid zwischen 50 - 100% (Buerstedde und Takeda 1991; Wang et al. 1996). Die DT40-Zelllinie war bereits erfolgreich zur Erzeugung einer homozygoten GAS41 $-/-$ Zelllinie mit zwei mutierten GAS41-Allelen verwendet worden (Zimmermann et al., 2002). Die Autoren erzielten in der ersten Transfektionsrunde eine homologe Rekombinationshäufigkeit von 2/24 (Plasmid „Neo-gas“) bzw. 2/52 (Plasmid „Puro-gas“).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nach der ersten Transfektionsrunde insgesamt 160 Zellklone isoliert, 51 Klone aus einem Experiment mit pSp1-neo und 109 Klone aus drei Experimenten mit pSp1-puro. Die aus diesen Klonen präparierte chromosomale DNA wurde mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten und im *Southern Blot* mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde analysiert. Bei keinem der Klone wurde eine homologe Rekombination bzw. Deletion des gewünschten Chromatinbereiches festgestellt. Dies lag vermutlich daran, dass der in den Plasmiden bereits deletierte Sp1-Bindebereich mit ~300 bp zu groß für die daran 3'-angrenzende homologe Sequenz war, so dass eine homologe Rekombination mit der endogenen Sequenz nicht erfolgen konnte. Die für das 3'-*Crossover* eingesetzte

DNA-Sequenz wies nur eine Länge von ~ 1 kbp auf. Dies war vermutlich für die zu deletierende 300 bp-Sequenz zu kurz, so dass Rekombinationen an dem großen Deletionsbereich „unterbrochen“ worden sein könnten. So wurde wahrscheinlich nur ein Teil der zu rekombinierenden Plasmid-DNA ins Genom integriert. Dieser muß auch das Selektionsmarkergen beinhalten, weil durch die Selektion mit den entsprechenden Antibiotika nur Klone mit dem zusätzlich integrierten Resistenzgen überleben konnten. Die meisten Plasmid-Integrationen fanden vermutlich in ektopischen Genombereichen statt. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente lassen vermuten, dass mit den *Targeting*-Plasmiden keine homologen Rekombinationen erzielt werden können. Eine Deletion der OBR-nahen Sp1-Binderegion *in vivo* bietet jedoch interessante Untersuchungsmöglichkeiten. Daher könnte es sich lohnen, andere *Targeting*-Plasmide mit einer größeren 3'-homologen Sequenz zu konstruieren, was die Wahrscheinlichkeit homologer Rekombinationen erhöhen würde.

In weiterführenden Arbeiten könnte man sich mit folgenden Fragen auseinandersetzen: Ist ORC2 in der Lage, ohne den Transkriptionsfaktor Sp1 und die angrenzende Sp1-Binderegion am Lysozym-GAS41-OBR des Huhns zu binden? Bindet der Transkriptionsfaktor Oct-1 auch in Abwesenheit von Sp1 im OBR und interagiert dieser weiterhin mit ORC2? Wird die DNA-Replikation am Lysozym-GAS41-OBR ohne die Sp1-Binderegion initiiert? Und wenn ja, hat sich die Initiationsaktivität verändert? Die Beantwortung dieser Fragen könnte neue Erkenntnisse darüber bringen, inwieweit Kernproteine wie die Transkriptionsfaktoren Sp1 oder Oct-1 bei der Initiation der DNA-Replikation in Eukaryonten involviert sind und welche Rolle sie in diesem Prozess spielen.

6 Zusammenfassung

Die Initiation der DNA-Replikation erfolgt in Eukayonten an zahlreichen Replikationsursprüngen (Origins), die von dem heterohexameren ORC-Komplex erkannt werden. Der ORC-Komplex ist von entscheidender Bedeutung für die Bildung des Prä-Replikationskomplexes, welcher die Initiation der DNA-Replikation am Origin gestattet. Bei zahlreichen DNA-Viren wurde gezeigt, dass neben dem ORC-Komplex auch Transkriptionsfaktoren wie Oct-1, NF1 und Sp1 für die Initiation der Virus-Replikation notwendig sind. Im Lysozym-GAS41-Genlocus des Huhns existiert ein Ursprung der bidirektionalen DNA-Replikation (OBR). Der OBR liegt in einem engen, ~300 bp umfassenden Bereich zwischen dem Lysozymgen und dem direkt stromabwärts angrenzenden GAS41-Gen. Daher überlagert sich der OBR mit dem GAS41-Promotor. Im Bereich des Lysozym-OBR / GAS41-Promotors kommen ebenfalls Bindemotive für Sp1, Oct-1 und NF1 vor. Es wurde vermutet, dass diese Transkriptionsfaktoren auch bei der Initiation der DNA-Replikation am Lysozym-GAS41-OBR involviert sein könnten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, solche Replikations- und Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die mit dem Lysozym-GAS41-OBR des Huhns interagieren und für die Initiation der DNA-Replikation essentiell sind. Dabei sollte auch die DNA-Bindestelle von ORC2, der ~72 kDa-Untereinheit des hexameren Hühner-ORC-Komplexes, im Lysozym-GAS41-OBR identifiziert werden.

Um DNA-Bindestellen für Initiationsproteine des Lysozym-GAS41-OBRs zu identifizieren, wurden *in vitro* Protein-DNA-Interaktionen zwischen DNA-Fragmenten aus dem OBR und GAS41-Promotor und Kernextrakten verschiedener Zelllinien (HD11-Hühnermyelomnozyten, DU249-Hühnerhepatozyten und Hep G2-Humanhepatozyten) untersucht. Aus den Gelretardationsanalysen (*EMSA* und *Immunomobility Shift*-Assays) ging hervor, dass die Transkriptionsfaktoren Sp1 und Oct-1 mit spezifischen DNA-Bindemotiven innerhalb des OBR / GAS41-Promotors interagieren. Sp1 interagiert mit einem als „GC-Box“ bezeichneten Bindemotiv (5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3'), wohingegen Oct-1 mit einer „Octamer-Motiv-ähnlichen“ Sequenz (5'-ACGCAAAC-3') interagiert, welche im Vergleich zum bekannten „Octamer-Motiv“ (5'-ATGCAAAT-3') eine Sequenzabweichung von zwei Basenpaaren aufweist. Eine *in vitro*-Interaktion zwischen NF1 und einer im OBR befindlichen potentiellen NF1-Bindestelle (5'-TTGGCA-3') wurde nicht festgestellt. Zudem wurde gezeigt, dass ORC2, die etwa 72 kDa große Untereinheit des Hühner-ORC-Komplexes, *in vitro* mit der 5'-Hälfte einer im OBR / GAS41-Promotor befindlichen AT-reichen Sequenz interagiert. Die mutmaßliche ORC2-Bindestelle befindet sich direkt stromaufwärts der identifizierten Oct-1-

Bindestelle.

Um die Bindung von ORC2, Sp1 und Oct-1 am Chromatin des OBRs *in vivo* nachzuweisen, wurden Chromatin-Immünpräzipitationen (ChIPs) durchgeführt. Hierfür wurde formaldehydbehandeltes und durch Ultraschall fragmentiertes *crosslink*-Chromatin aus HD11- und DU249-Hühnerzellen mit spezifischen Antikörpern gegen cORC2, hSp1, hOct-1 und hNF1 immunpräzipitiert. Für die ChIP-Experimente wurde auch ein Antikörper gegen Hühner-ORC2 hergestellt, welcher durch Immunisierung eines Kaninchens mit einem bakteriell exprimierten, rekombinanten ~28 kDa-cORC2-Polypeptid produziert wurde. Die immunpräzipitierten Nucleoproteine wurden im *Western Blot* analysiert. Dabei zeigte sich, dass ORC2 sowohl mit Sp1 als auch mit Oct-1 heteromere Proteinkomplexe bildet. Daraus wurde geschlossen, dass ORC2, Sp1 und Oct-1 *in vivo* an dicht benachbarten Chromatinregionen binden und eng miteinander assoziiert sein könnten. Die in den ChIP-Experimenten coimmunpräzipitierten Chromatinfragmente wurden mittels quantitativer *Real-Time PCR* analysiert. Dabei wurde eine signifikante Anreicherung von Sequenzen aus dem OBR / GAS41-Promotorbereich in den α -cORC2-, α -hSp1- und α -hOct-1-Immünpräzipitaten festgestellt. Daraus wurde geschlossen, dass ORC2, Sp1 und Oct-1 auch *in vivo* am Chromatin des Lysozym-GAS41-OBRs binden und dass ihre Bindung vermutlich an den in den *in vitro*-Experimenten identifizierten Bindestellen erfolgt. Desweiteren wurde vermutet, dass ORC2 in Interaktion mit den beiden Transkriptionsfaktoren Sp1 und Oct-1 an den Lysozym-GAS41-OBR *in vivo* bindet.

Das Vorkommen zahlreicher Sp1-Bindestellen im OBR / GAS41-Promotor wurde als Indiz für eine Involvierung von Sp1 bei der Initiation der Replikation am OBR diskutiert. Um dem nachzugehen wurden Transfektionsexperimente mit *Targeting*-Plasmiden und der Hühner-B-Lymphozytenzelllinie DT40 durchgeführt, um die ~320 bp umfassende Sp1-Binderegion in beiden Allelen mittels homologer Rekombination zu deletieren. Nach der ersten Transfektionsrunde wurden insgesamt 160 antibiotikumresistente Zellklone isoliert, 51 Klone aus einem Experiment mit Plasmid pSp1-neo und 109 Klone aus drei Experimenten mit Plasmid pSp1-puro. Die chromosomale DNA der Klone wurde im *Southern Blot* analysiert. Bei keinem Klon wurde eine homologe Rekombination festgestellt. Als Grund hierfür wurde vermutet, dass der in den Plasmiden bereits deletierte Sp1-Bindebereich mit rund 300 bp zu groß für die 3'-angrenzende homologe Sequenz war.

7 Summary

Study on protein-DNA interactions at the chicken lysozyme-GAS41 origin of DNA replication

In eukaryotes, DNA replication initiates at multiple origins of DNA replication which are recognized by the heterohexameric “origin recognition complex“ (ORC). ORC is essential for the assembly of the prereplicative complex which licenses origins for replication initiation. For many DNA viruses it has been shown that, besides ORC, transcription factors such as Oct-1, NF1 and Sp1 are required for the initiation of viral replication. In the chicken lysozyme-GAS41 gene locus an “origin of bidirectional DNA replication“ (OBR) has been identified. The OBR resides within a narrow ~ 300 bp region between the lysozyme gene and the immediately downstream localized GAS41 gene. Hence, the OBR overlaps with the GAS41-promoter. The region of the OBR / GAS41-promoter also contains binding motifs for the transcription factors Sp1, Oct-1 and NF1. It was presumed that these transcription factors may also be involved in the initiation of DNA replication at the lysozyme-GAS41-OBR. Aim of this study was to identify such replication and transcription factors which interact with the chicken lysozyme-GAS41-OBR and which are essential for the initiation of DNA replication. The DNA-binding site of ORC2, the ~ 72 kDa subunit of the hexameric chicken ORC, should also be identified in the lysozyme-GAS41-OBR.

To identify DNA-binding sites for initiation proteins of the lysozyme-GAS41-OBR *in vitro* protein-DNA-interactions between DNA-fragments of the OBR and GAS41-promoter and nuclear extracts from different cell lines (HD11 chicken myelomonocytes, DU249 chicken hepatocytes and Hep G2 human hepatocytes) were investigated. These gel retardation experiments (EMSA and Immunomobility Shift Assays) demonstrated that transcription factors Sp1 and Oct-1 interact with specific DNA-binding motifs within the OBR/GAS41-promoter. Sp1 interacts with a binding motif, called “GC-box“ (5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3'), while Oct-1 interacts with an octamer motif-like sequence (5'-ACGCAAAC-3') which shows two mismatches compared to the known “octamer motif“ (5'-ATGCAAAT-3'). An *in vitro* interaction between NF1 and a potential NF1 binding site within the OBR / GAS41-promoter (5'-TTGGCA-3') was not observed. Additionally, it was shown that ORC2, the ~ 72 kDa subunit of the chicken ORC, interacts with the 5'-half of an AT-rich sequence within the OBR / GAS41-promoter *in vitro*. The presumed ORC2 binding site is located immediately upstream of the identified Oct-1 binding site.

To proof the binding of ORC2, Sp1 and Oct-1 at the OBR chromatin *in vivo* chromatin-immunoprecipitations (ChIPs) were performed. In the experiments, formaldehyde-treated crosslink chromatin from chicken HD11 and DU249 cells was fragmented by sonication and immunoprecipitated with specific antibodies against cORC2, hSp1, hOct-1 and hNF1. Additionally, an antibody against chicken ORC2 was generated for the ChIP experiments which was produced by immunization of a rabbit using a bacterially expressed, recombinant ~ 28 kDa cORC2-polypeptide. The immunoprecipitated nucleoprotein fractions were analysed by Western Blotting. It was shown that ORC2 forms heteromeric protein complexes with both, Sp1 and Oct-1. From these results it was concluded that ORC2, Sp1 and Oct-1 bind to neighbouring chromatin regions *in vivo* and are probably closely associated with each other. The coimmunoprecipitated chromatin fragments from the ChIP experiments were analysed by quantitative Real-Time PCR. A significant enrichment of sequences from the OBR/GAS41-promoter was detected in the α -cORC2-, α -hSp1- and α -hOct-1-immunoprecipitates. This indicates that ORC2, Sp1 and Oct-1 also bind to the chromatin of the lysozyme-GAS41-OBR *in vivo*, most probably to the binding sites which were identified in the *in vitro* experiments. It is presumable that ORC2 binds in interaction with both transcription factors, Sp1 and Oct-1 to the lysozyme-GAS41-OBR *in vivo*.

The presence of multiple Sp1 binding sites in the OBR/GAS41-promoter could point to an involvement of Sp1 in the initiation of DNA replication at the lysozyme-GAS41-OBR. To follow this up, transfection experiments with targeting plasmids and the chicken B-lymphocytic cell line DT40 were performed to delete the ~ 320 bp Sp1 binding region in both alleles by homologous recombination. After the first round of transfection, a total of 160 antibiotic resistant cell clones were isolated, 51 clones from one experiment with plasmid pSp1-neo and 109 clones from three experiments with plasmid pSp1-puro. The chromosomal DNA from these clones was analysed by Southern Blotting. None of the clones showed a homologous recombination. Possibly, the ~ 300 bp encompassing Sp1 binding region which was already deleted in the plasmids, was too broad for the 3'-neighbouring homologous sequence.

8 Literatur

- Abdurashidova, G., Riva, S., Biamonti, G., Giacca, M., and Falaschi, A. (1998).** Cell cycle modulation of protein-DNA interactions at a human replication origin. *EMBO J.* **17**: 2961-2969.
- Abdurashidova, G., Deganuto, M., Klima, R., Riva, S., Biamonti, G., Giacca, M., and Falaschi, A. (2000).** Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin. *Science* **287**: 2023-2026.
- Abdurashidova, G., Danailov, M.B., Ochem, A., Triolo, G., Djeliova, V., Radulescu, S., Vindigni, a., Riva, S., and Falaschi, A. (2003).** Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle. *EMBO J.* **22**: 4294-4303.
- Aggarwal, B.D., and Calvi, B.R. (2004).** Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature* **430**: 372-376.
- Aladjem, M.I., and Fanning, E. (2004).** The replicon revisited: an old model learns new tricks in metazoan chromosomes. *EMBO reports* **5** (7): 686-691. Review.
- Aladjem, M.I., Falaschi, A., and Kowalski, D. (2006).** Eukaryotic DNA replication origins. In: DNA replication and human disease, ed DePamphilis, M.L. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 31-62.
- Aladjem, M.I. (2007).** Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* **8** (8): 588-600.
- Altman, A.L., and Fanning, E. (2001).** The Chinese hamster dihydrofolate reductase replication origin beta is active at multiple ectopic chromosomal locations and requires specific DNA sequence elements for activity. *Mol. Cell. Biol.* **21** (4): 1098-1110. Erratum in *Mol. Cell. Biol.* 2002, **22** (17): 6319.
- Altman, A.L., and Fanning, E. (2004).** Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin. *Mol. Cell. Biol.* **24** (10): 4138-4150.
- Anglana, M., Apiou, F., Bensimon, A., and Debatisse, M. (2003).** Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: Nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing. *Cell* **114** (3): 385-394.
- Antequera, F. (2003).** Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell. Mol. Life Sci.* **60** (8): 1647-1658. Review.
- Antequera, F. (2004).** Genomic specification and epigenetic regulation of eukaryotic DNA replication origins. *EMBO J.* **23** (22): 4365-4370. Review.
- Antequera, F., and Bird, A. (1993).** CpG islands. *EXS.* **64**: 169-185. Review.

- Antequera, F., and Bird, A. (1999).** CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr. Biol.* **9** (17): R661-R667. Review.
- Antequera, F., Macleod, D., and Bird, A. (1989).** Specific protection of methylated CpGs in mammalian nuclei. *Cell* **58** (3): 509-517.
- Arakawa, Y., Tachibana, O., Hasegawa, M., Miyamori, T., Yamashita, J., and Hayashi, Y. (2005).** Frequent gene amplification and overexpression of decoy receptor 3 in glioblastoma. *Acta Neuropathol.* **109** (3): 294-298.
- Araki, M., Wharton, R.P., Tang, Z., Yu, H., and Asano, M. (2003).** Degradation of origin recognition complex large subunit by the anaphase-promoting complex in *Drosophila*. *EMBO J.* **22** (22): 6115-6126.
- Asano, M., and Wharton, R.P. (1999).** E2F mediates developmental and cell cycle regulation of ORC1 in *Drosophila*. *EMBO J.* **18** (9): 2435-2448.
- Atanasiu, C., Deng, Z., Wiedmer, A., Norseen, J., and Liebermann, P.M. (2006).** ORC binding to TRF2 stimulates OriP replication. *EMBO Rep.* **7** (7): 716-721.
- Austin, R.J., Orr-Weaver, T.L., and Bell, S.P. (1999).** *Drosophila* ORC specifically binds to ACE, an origin of DNA replication control element. *Genes Dev.* **13**: 2639-2646.
- Baba, T.W., Giroir, B.P., and Humphries, E.H. (1985).** Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* **144** (1): 139-151.
- Balasov, M., Huijbrechts, R.P.H., and Chesnokov, I. (2007).** Role of the Orc6 protein in origin recognition complex-dependent DNA binding and replication in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **27** (8): 3143-3153.
- Baumann, M., Feederle, R., Kremmer, E., and Hammerschmidt, W. (1999).** Cellular transcription factors recruit viral replication proteins to activate the Epstein-Barr virus origin of lytic DNA replication, *oriLyt*. *EMBO J.* **18** (21): 6095-6105.
- Beall, E.L., Manak, J.R., Zhou, S., Bell, M., Lipsick, J.S., and Botchan, M.R. (2002).** Role for a *Drosophila* Myb-binding protein complex in site-specific DNA replication. *Nature* **420** (6917): 833-837.
- Bell, S.P. (2002).** The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev.* **16** (6): 659-672. Review.
- Bell, S.P., and Dutta, A. (2002).** DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 333-3374. Review.
- Bell, A.C., and Felsenfeld, G. (1999).** Stopped at the border: boundaries and insulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 191-198. Review.
- Bell, S.P., and Stillman, B. (1992).** ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of replication by a multi-protein complex. *Nature* **357**: 128-134.

- Beug, H., von Kirchbach, A., Döderlein, G., Conscience, J.F., and Graf, T. (1979).** Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. *Cell* **18**: (2) 375-390.
- Biamonti, G., Paixao, S., Montecucco, A., Peverali, F.A., Riva, S., and Falaschi, A. (2003).** Is DNA sequence sufficient to specify DNA replication origins in metazoan cells? *Chromosome Research* **11**: 403-412. Review.
- Bielinsky, A.K. (2003).** Replication origins: why do we need so many? *Cell Cycle* **2** (4): 307-309. Review.
- Bielinsky, A.K., and Gerbi, S.A. (2000).** Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication. *J. Cell Sci.* **114** (4): 643-651.
- Bird, A. (1986).** CpG-rich island and the function of DNA methylation. *Nature* **321**: 209-213. Review.
- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O., and Macleod, D. (1985).** A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* **40**: 91-99.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979).** A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blasquez, V.C., Sperry, A.O., Cockerill, P.N., and Garrard, W.T. (1989).** Protein:DNA interactions at chromosomal loop attachment sites. *Genome* **31** (2): 503-509. Review.
- Blow, J.J., and Dutta, A. (2005).** Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nature* **6**: 476-476. Review.
- Bogan, J.A., Natale, D.A., and DePamphilis, M.L. (2000).** Initiation of eukaryotic DNA replication: conservative or liberal? *J. Cell. Physiol.* **184** (2): 139-150. Review.
- Bonifer, C., Huber, M.C., Faust, N., and Sippel, A.E. (1994).** Regulation of the chicken lysozyme locus in transgenic mice. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **6** (2-3): 285-297. Review.
- Bonifer, C., Jäggle, U., and Huber, M.C. (1997).** The chicken lysozyme locus as a paradigm for the complex developmental regulation of eukaryotic gene loci. *J. Biol. Chem.* **272** (42): 26075-26078. Review.
- Bonifer, C., Vidal, M., Grosveld, F., and Sippel, A.E. (1990).** Tissue specific and position independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice. *EMBO J.* **9** (9): 2607-2616.
- Bosco, G., Du, W. and Orr-Weaver, T.L. (2001).** DNA replication control through interaction of E2F-RB and the origin recognition complex. *Nat. Cell Biol.* **3**: 289-295.
- Braas, D., Gundelach, H., and Klempnauer, K.H. (2004).** The glioma-amplified sequence 41 gene (GAS41) is a direct Myb target gene. *Nucleic Acids Res.* **32** (16): 4750-4757.
- Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., and Cedar, H. (1994).** Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* **371**: 435-438.

- Briggs, M.R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P., and Tjian, R. (1986).** Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**: 47-52.
- Buerstedde, J.M., and Takeda, S. (1991).** Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* **67**: 179-188.
- Bullock, P.A. (1997).** The initiation of simian virus 40 DNA replication *in vitro*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **32** (6): 503-568. Review.
- Caldwell, R.B., Kierzek, A.M., Arakawa, H., Bezzubov, Y., Zaim, J., Fiedler, P., Kutter, S., Blagodatski, A., Kostovska, D., Koter, M., Plachy, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., and Buerstedde, J.-M. (2004).** Full-length cDNAs from chicken bursal lymphocytes to facilitate gene function analysis. *Genome Biology* **6** (1): R6.
- Chang, V.K., Donato, J.J., Chan, C.S., and Tye, B.K. (2004).** Mcm1 promotes replication initiation by binding specific elements at replication origins. *Mol. Cell. Biol.* **24** (14): 6514-6524.
- Chen, M., Mermod, N. and Horwitz, M.S. (1990).** Protein-Protein interactions between adenovirus DNA polymerase and nuclear factor I mediate formation of the DNA replication preinitiation complex. *J. Biol. Chem.* **265**: 18634-18642.
- Cheng, L., and Kelly, T.J. (1989).** Transcriptional activator nuclear factor I stimulates the replication of SV40 minichromosomes *in vivo* and *in vitro*. *Cell* **59**: 541-551.
- Chesnokov, I., Remus, D., and Botchan, M. (2001).** Functional analysis of mutant and wild-type *Drosophila* origin recognition complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 11997-12002.
- Chong, S., Riggs, A.D., and Bonifer, C. (2002).** The chicken lysozyme chromatin domain contains a second, widely expressed gene. *Nucleic Acids Res.* **30** (2): 463-467.
- Chuang, R.y., and Kelly, T.J. (1999).** The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 2656-2661.
- Coenjaerts, F.E., De Vries, E., Pruijn, G.J., Van Driel, W., Bloemers, S.M., Van der Lugt, N.M., and Van der Vliet, P.C. (1991).** Enhancement of DNA replication by transcription factors NFI and NFIII/Oct-1 depends critically on the positions of their binding sites in the adenovirus origin of replication. *Biochem. Biophys. Acta.* **1090** (1): 61-69.
- Coenjaerts, F.E., van Oosterhout, J.A., and van der Vliet, P.C. (1990).** The Oct-1 POU domain stimulates adenovirus DNA replication by a direct interaction between the viral precursor terminal protein-DNA polymerase complex and the POU homeodomain. *EMBO J.* **13**: 5401-5409.
- Cohen, S.M., Brylawski, B.P., Cordeiro-Stone, M., and Kaufman, D.G. (2002).** Mapping of an origin of DNA replication near the transcriptional promoter of the human HPRT gene. *J. Cell. Biochem.* **85**: 346-356.

- Courey, A.J., and Tjian, R. (1988).** Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55** (5): 887-898.
- Crane-Robinson, C., Myers, F.A., Hebbes, T.R., Clayton, A.L., and Thorne, W. (1999).** Chromatin immunoprecipitation assays in acetylation mapping of higher eukaryotes. *Methods Enzymol.* **304**: 533-547.
- Cvetcic, C., and Walter, J. (2005).** Eukaryotic origins of DNA replication: could you please be more specific?. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **16**: 343-353. Review.
- Danis, E., Brodolin, K., Menut, S., Maiorano, D., Girard-Reydet, C., and Mechali, M. (2004).** Specification of a DNA replication origin by a transcription complex. *Nat. Cell. Biol.* **6** (8): 721-730.
- Dhar, S.K., and Dutta, A. (2000).** Identification and characterization of the human ORC6 homolog. *J. Biol. Chem.* **275** (45): 34983-43988.
- Dhar, S.K., Delmolino, L., and Dutta, A. (2001).** Architecture of the human origin recognition complex. *J. Biol. Chem.* **276** (31): 29067-29071.
- Dehay, C., and Kennedy, H. (2007).** Cell cycle control and cortical development. *Nature Reviews Neuroscience.* **8**: 438-450.
- de Jong, R.N. and van der Vliet, P.C. (1999).** Mechanism of DNA replication in eukaryotic cells: cellular host factors stimulating adenovirus DNA replication. *Gene* **236**: 1-12.
- Delgado, S., Gomez, M., Bird, A., and Antequera, F. (1998).** Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *EMBO J.* **17** (8): 2426-2435.
- Demeret, C., Le Moal, M., Yaniv, M., and Thierry, F. (1995).** Control of HPV 18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4777-4784.
- DePamphilis, M.L. (1993).** Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin. *Ann. Rev. Biochem.* **63**: 29-63. Review.
- DePamphilis, M.L. (1999).** Replication origins in metazoan chromosomes: Fact or fiction? *Bioessays* **21**: 5-16.
- DePamphilis, M.L. (2003).** The 'ORC cycle': a novel pathway for regulation eukaryotic DNA replication. *Gene* **310**: 1-15. Review.
- DePamphilis, M.L. (2005).** Cell cycle dependent regulation of the origin recognition complex. *Cell Cycle* **4** (1): 70-79. Review.
- DePamphilis, M.L., Blow, J.J., Ghosh, S., Saha, T., Noguchi, K., and Vassilev, A. (2006).** Regulation the licensing of DNA replication origins in metazoa. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **18** (3): 231-239. Review.
- Diesel, B., Fischer, U., and Meese, E. (2003).** Gene amplification and splice variants of 25-hydroxyvitamin D3 1,α-hydroxylase (CYP27B1) in glioblastoma multiforme – a possible role in tumor progression? *Recent Results Cancer Res.* **164**: 151-155. Review.

- Diffley, J.F. (2004).** Regulation of early events in chromosome replication. *Curr. Biol.* **14**: R778-786.
- Diffley, J.F., and Stillman, B. (1988).** Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and a transcriptional silencer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (7): 2120-2124.
- Dijkwel, P.A., and Hamlin, J.L. (1995).** The Chinese hamster dihydrofolate reductase origin consists of multiple potential nascent-strand start sites. *Mol. Cell. Biol.* **15** (6): 3023-3031.
- Dijkwel, P.A., and Hamlin, J.L. (1999).** Physical and genetic mapping of mammalian replication origins. *Methods* **18** (3): 418-431.
- Dijkwel, P.A., Mesner, D.L., Levenson, V.V., d'Anna, J., and Hamlin, J.L. (2000).** Dispersive initiation of replication in the Chinese hamster rhodopsin locus. *Exp. Cell. Res.* **256**: 150-157.
- Dijkwel, P.A., Wang, S., and Hamlin, J.L. (2002).** Initiation sites are distributed at frequent intervals in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication but are used with very different efficiencies. *Mol. Cell. Biol.* **22** (9): 3053-3065.
- Dominguez-Sola, D., Ying, C.Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D.A., Gu, W., Gautier, J., and Dalla-Favera, R. (2007).** Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* **448**: 445-451.
- Dubey, D.D., Zhu, J., Carlson, D.L., Sharma, K. and Huberman, J.A. (1994).** Three ARS elements contribute to the ura4 replication origin region in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **13**: 3638-3647.
- Dynan, W.S., and Tjian, R. (1983).** The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* **35**: 79-87.
- Dynan, W.S., and Tjian, R. (1985).** Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature* **316**: 774-778.
- Fischer, U., Heckel, D., Michel, A., Janka, M., Hulsebos, T., and Meese, E. (1997).** Cloning of a novel transcription factor-like gene amplified in human glioma including astrocytoma grade I. *Hum. Mol. Genet.* **6** (11): 1817-1822.
- Fischer, U., Keller, A., Leidinger, P., Deutscher, S., Heisel, S., Urbschat, S., Lenhof, H.P., and Meese, E. (2008).** A different view on DNA amplifications indicates frequent, highly complex, and stable amplicons on 12q13-21 in glioma. *Mol. Cancer Res.* **6** (4): 576-584.
- Fischer, U., Meltzer, P., and Meese, E. (1996).** Twelve amplified and expressed genes localized in a single domain in glioma. *Hum. Genet.* **98**: 625-628.
- Fritton, H.P., Igo-Kemenes, T., Nowock, J., Strech-Jurk, U., Theisen, M., Sippel, A.E. (1984).** Alternative sets of DNase I-hypersensitive sites characterize the various functional states of the chicken lysozyme gene. *Nature* **311**: 163-165.

- Fritton, H.P., Sippel, A.E., and Igo-Kemenes, T. (1983).** Nuclease-hypersensitive sites in the chromatin domain of the chicken lysozyme gene. *Nucleic Acids Res.* **11 (11):** 3467-3485.
- Forsburg, S.L. (2004).** Eukaryotic MCM proteins: Beyond replication initiation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68:** 109-131. Review.
- Gambus, A., Jones, R.C., Sanchez-Diaz, A. Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R.D., and Labib, K. (2006).** GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat. Cell. Biol.* **8 (4):** 358-266.
- Garg, P, and Burgers, P.M. (2005).** DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **40 (2):** 115-128. Review.
- Gavin, K.A., Hidaka, M., and Stillman, B. (1995).** Conserved initiator proteins in eukaryotes. *Science* **270:** 1667-1671. Comment in: *Science* 1995, **270:** 1585-1587.
- Gerbi, S.A., and Bielinsky, A.K. (1997).** Replication initiation point mapping. *Methods* **13 (3):** 271-280.
- Gerbi, S.A., Strezoska, Z., and Waggenger, J.M. (2002).** Initiation of DNA replication in multicellular eukaryotes. *J. Struct. Biol.* **140:** 17-30.
- Ghosh, M., Liu, G., Randall, G., Bevington, J. and Leffak, M. (2004).** Transcription factor binding and induces transcription alter chromosomal c-myc replicator activity. *Mol. Cell. Biol.* **24 (23):** 10193-10207.
- Giacca, M., Pelizon, C., and Falaschi, A. (1997).** Mapping replication origins by quantifying relative abundance of nascent DNA strands using competitive polymerase chain reaction. *Methods* **13 (3):** 301-312. Review.
- Giacca, M., Zentilin, L., Norio, P., Diviacco, S., Dimitrova, D., Contreas, G., Biamonti, G., Perini, G., Weighardt, F., Riva, S., and Falaschi, A. (1994).** Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91:** 7119-7123.
- Gilbert, D.M. (2001).** Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* **294:** 96-100. Review.
- Gilbert, D.M. (2002).** Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14 (3):** 377-383. Review.
- Gilbert, D.M. (2004).** In search of the holy replicator. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5 (10):** 848-855. Review.
- Gilbert, S.L., and Sharp, P.A. (1999).** Promoter-specific hypoacetylation of X-inactivated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96 (24):** 13825-13830.
- Giordano-Coltart, J., Ying, C.Y., Gautier, J., and Hurwitz, J. (2005).** Studies of the properties of human origin recognition complex and its Walker A motif mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102:** 69-74.

- Göhring, F., and Fackelmayer, F.O. (1997).** The scaffold/matrix attachment region binding protein hnRPN-U (SAF-A) is directly bound to chromosomal DNA *in vivo*: a chemical cross-linking study. *Biochemistry* **36**: 8276-8283.
- Goethe, R., and Phi van, L. (1998).** Posttranscriptional lipopolysaccharide (LPS) regulation of the lysozyme gene at processing of the primary transcript in myelomonocytic HD11 cells. *J. Immunol.* **160 (10)**: 4970-4978.
- Goren, A., and Cedar, H. (2003).** Replication by the clock. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4 (1)**: 25-32. Review.
- Gray, S.J., Liu, G., Altman, A.L., Small, L.E., and Fanning, E. (2007).** Discrete functional elements required for initiation activity of the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin beta at ectopic chromosomal sites. *Exp. Cell. Res.* **313 (1)**: 109-120.
- Gronostajski, R.M. (2000).** Roles of the NF1/CTF gene family in transcription and development. *Gene* **249**: 31-45.
- Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007).** Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* **128**: 721-733.
- Guo, Z.S., Gutierrez, C., Heine, U., Sogo, J.M., and DePamphilis, M.L. (1989).** Origin auxiliary sequences can facilitate initiation of simian virus 40 DNA replication *in vitro* as they do *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **9 (9)**: 3593-3602.
- Guo, Z.S., and DePamphilis, M. (1992).** Specific transcription factors stimulate simian virus 40 and polyoma-virus origins of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **12 (6)**: 2514-2524.
- Hamlin, J.L., Dijkwel, P.A., and Vaughn, J.P. (1992).** Initiation of replication in the Chinese hamster dihydrofolate reductase domain. *Chromosoma* **102 (1 Suppl)**: S17-23.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166 (4)**: 557-580.
- Harborth, J., Weber, K., and Osborn, M. (2000).** GAS41, a highly conserved protein in eukaryotic nuclei, binds to NuMA. *J. Biol. Chem.* **275 (41)**: 31979-31985.
- Harvey, K.J., and Newport, J. (2003).** CpG methylation of DNA restricts prereplication complex assembly in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Cell. Biol.* **23 (19)**: 6769-6779.
- Hauser, H., Graf, T., Beug, H., Greiser-Wilke, I., Lindenmaier, W., Grez, M., Land, H., Giesecke, K., and Schütz, G. (1981).** Structure of the lysozyme gene and expression in the oviduct and macrophages. *Haematol. Blood Transfusion* **26**: 175-178.
- He, L., Brinton, B.T., Greenblatt, J., Hassell, J.A. and Ingles, C.J. (1993).** The transactivator proteins VP16 and GAL4 bind replication factor A. *Cell* **73**: 1223-1232.

- Heintz, N.H., Milbrandt, J.D., Greisen, K.S., and Hamlin, J.L. (1983).** Cloning of the initiation region of a mammalian chromosomal replicon. *Nature* **302**: 439-441.
- Hennighausen, L., Siebenlist, U., Danner, D., Leder, P., Rawlins, D., Rosenfeld, P. and Kelly, T.J. (1985).** High-affinity binding site for a specific nuclear protein in the human IgM gene. *Nature* **314**: 289-292.
- Herr, W., Sturm, R.A., Clerc, R.G., Corcoran, L.M., Baltimore, D., Sharp, P.A., Ingraham, H.A., Rosenfeld, M.G., Finney, M., Ruvkun, G., et al. (1988).** The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. *Genes Dev.* **2 (12A)**: 1513-1516.
- Huber, M.C., Graf, T., Sippel, A.E., and Bonifer, C. (1995).** Dynamic changes in the chromatin of the chicken lysozyme gene domain during differentiation of multipotent progenitors to macrophages. *DNA Cell Biol.* **14 (5)**: 397-402.
- Hyrien, O., and Mechali, M. (1992).** Plasmid replication in *Xenopus* eggs and egg extracts: a 2D gel electrophoresis analysis. *Nucleic Acids Res.* **20 (7)**: 1463-1469.
- Hyrien, O., and Mechali, M. (1993).** Chromosomal replication initiates and terminates at random sequences but at regular intervals in the ribosomal DNA of *Xenopus* early embryos. *EMBO J.* **12 (12)**: 4511-4520.
- Hyrien, O., Maric, C., and Mechali, M. (1995).** Transition in specification of embryonic metazoan DNA replication origins. *Science* **270**: 994-997.
- Ina, S., Sasaki, T., Yokota, Y. and Shinomiya, T. (2001).** A broad replication origin of *Drosophila melanogaster*, oriDalpha, consists of AT-rich multiple discrete initiation sites. *Chromosoma* **109**: 551-564.
- Ishiai, M., Dean, F.B., Okumura, K., Abe, M., Moon, K.Y., Amin, A.A., Kagotani, K., Taguchi, H., Murakami, Y., Hanaoka, F., O'Donnell, M., Hurwitz, J., and Eki, T. (1997).** Isolation of human and fission yeast homologues of the budding yeast origin recognition complex subunit ORC5: human homologue (ORC5L) maps to 7q22. *Genomics* **46 (2)**: 294-298.
- Isomura, H., Stinski, M.F., Kudoh, A., Daikoku, T., Shirata, N. and Tsurumi, T. (2005).** Two Sp1/Sp3 binding sites in the major immediate-early proximal enhancer of human cytomegalovirus have a significant role in viral replication. *J. Virol.* **79 (15)**: 9597-9607.
- Ito, K., Asano, M., Hughes, P., Kohzaki, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Kerppola, T., Curran, T., Murakami, Y., and Ito, Y. (1996).** c-Jun stimulates origin-dependent DNA unwinding by polyomavirus large T antigen. *EMBO J.* **15 (20)**: 5636-5646.
- Ivanova, O., Braas, D., and Klempnauer, K.H. (2007).** Oncogenic point mutations in the Myb DNA-binding domain alter the DNA-binding properties of Myb at a physiological target gene. *Nucleic Acids Res.* **35 (21)**: 7237-7247.
- Jansohn, M. (2007).** Gentechnische Methoden. *Spektrum Akademischer Verlag*, 4. Auflage.

- Jantzen, K., Fritton, H.P., and Igo-Kemenes, T. (1986).** The DNase I sensitive domain of the chicken lysozyme gene spans 24 kbp. *Nucleic Acids Res.* **14 (15):** 6085-6099.
- Javahery, R., Khachi, A., Lo, K., Zenzie-Gregory, B., and Smale, S.T. (1994).** DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **14 (1):** 116-127.
- Jones, N. (1990).** Transcriptional regulation by dimerization: Two sides to an incestuous relationship. *Cell* **61 (1):** 9-11.
- Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Rosenfeld, P.J., Kelly, T.J., and Tjian, R. (1987).** A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* **48 (1):** 79-89.
- Jung, A., Sippel, A.E., Grez, M., and Schütz, G. (1980).** Exons encode functional and structural units of chicken lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77 (10):** 5759-5763.
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., and Tjian, R. (1987).** Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* **51:** 1079-1090.
- Kadonaga, J.T., Courey, A.J., Ladika, J., and Tjian, R. (1988).** Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* **242:** 1566-1570.
- Kaufmann, J., and Smale, S.T. (1994).** Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev.* **8 (7):** 821-829.
- Kearsey, S.E. and Cotterill, S. (2003).** Enigmatic variations: divergent modes of regulating eukaryotic DNA replication. *Molecular Cell* **12:** 1067-1075. Review.
- Keller, C., Ladenburger, E.M., and Knippers, R. (2002).** The origin recognition complex marks a replication origin in the human *TOP1* gene promoter. *J. Biol. Chem.* **277 (35):** 31430-31440.
- Kilwinski, J., Baack, M., Heiland, S. and Knippers, R. (1995).** Transcription factor Oct1 binds to the AT-rich segment of the simian virus 40 replication origin. *J. Virol.* **69 (1):** 575-578.
- Kitsberg, D., Selig, S., Keshet, I., and Cedar, H. (1993).** Replication structure of the human beta-globin gene domain. *Nature* **366:** 588-590.
- Kleihues, P., Soylemezoglu, F., Schauble, B., Scheithauer, B.W., and Burger, P.C. (1995).** Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* **15:** 211-221.
- Kobayashi, T., Rein, T., and DePamphilis, M.L. (1998).** Identification of primary initiation sites for DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene initiation zone. *Mol. Cell. Biol.* **18 (6):** 3266-3277.
- Kohzaki, H., Ito, Y., and Murakami, Y. (1999).** Context-dependent modulation of the replication activity of *S. cerevisiae* autonomously replicating sequences by transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **19:** 7428-7435.
- Kohzaki, H., and Murakami, Y. (2005).** Transkription factors and DNA replication origin selection. *Bioessays* **27 (11):** 1107-1116. Review.

- Kong, D., and DePamphilis, M.L. (2001).** Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. *Mol. Cell. Biol.* **21 (23)**: 8095-8103.
- Kong, D., and DePamphilis, M.L. (2002).** Site-specific ORC binding, pre-replication complex assembly and DNA synthesis at *Schizosaccharomyces pombe* replication origins. *EMBO J.* **21 (20)**: 5567-5576.
- Kontaraki, J., Chen, H.H., Riggs, A., and Bonifer, C. (2000).** Chromatin fine structure profiles for a developmentally regulated gene: reorganization of the lysozyme locus before trans-activator binding and gene expression. *Genes Dev.* **14**: 2106-2122.
- Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M. and Knippers, R. (2001).** The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **276 (9)**: 6337-6342.
- Labib, K., and Gambus, A. (2007).** A key role for the GINS complex at DNA replication forks. *Trends Cell Biol.* **17 (6)**: 271-278. Review.
- Ladenburger, E.M., Keller, C., and Knippers, R. (2002).** Identification of a binding region for human origin recognition complex proteins 1 and 2 that coincides with an origin of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **22 (4)**: 1036-1048.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Langlois, A.J., Lapis, K., Ishizaki, R., Beard, J.W., and Bolognesi, D.P. (1974).** Isolation of a transplantable cell line induced by the MC29 avian leukosis virus. *Cancer Res.* **34 (6)**: 1457-1464.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., and Prydz, H. (1992).** CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* **13 (4)**: 1095-1107.
- Lee, D.G., and Bell, S.P. (1997).** Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* **17 (12)**: 7159-7168.
- Lee, J.K., Moon, K.Y., Jiang, Y., and Hurwitz, J. (2001).** The *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the SpOrc4 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98 (24)**: 13589-13594.
- Leegwater, P.A.J., van Driel, W. und van der Vliet, P.C. (1985).** Recognition site of nuclear factor I, a sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells that stimulates adenovirus DNA replication. *EMBO J.* **4**: 1515-1521.
- Lefevre, P., Lacroix, C., Tagoh, H., Hoogenkamp, M., Melnik, S., Ingram, R., and Bonifer, C. (2005).** Differentiation-dependent in histone methylation and chromatin architecture in the inducible chicken lysozyme gene. *J. Biol. Chem.* **280 (30)**: 27552-27560.
- Lefevre, P., Melnik, S., Wilson, N., Riggs, A.D., and Bonifer, C. (2003).** Developmentally regulated recruitment of transcription factors and chromatin modification activities to chicken lysozyme *cis*-regulatory elements *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **23 (12)**: 4386-4400.

- Li, R. (1999).** Stimulation of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae* by a glutamine- and proline-rich transcriptional activation domain. *J. Biol. Chem.* **274 (42)**: 30310-30314.
- Li, C.J., and DePamphilis, M.L. (2002).** Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. *Mol. Cell. Biol.* **22 (1)**: 105-116.
- Li, J.J., and Herskowitz, I. (1993).** Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* **262**: 1870-1874.
- Lin, C.M., Fu, H., Martinovsky, M., Bouhassira, E., and Aladjem, M.I. (2003).** Dynamic alterations of replication timing in mammalian cells. *Curr. Biol.* **13 (12)**: 1019-1028.
- Lindenmaier, W., Nguyen-Huu, M.C., Lurz, R., Stratmann, M., Blin, N., Wurtz, T., Hauser, H.J., Sippel, A.E., and Schütz, G. (1979).** Arrangement of coding and intervening sequences of chicken lysozyme gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76 (12)**: 6196-6200.
- Lipford, J.R., and Bell, S.P. (2001).** Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol. Cell.* **7 (1)**: 21-30.
- Little, R.D., Platt, T.H. and Schildkraut, C.L. (1993).** Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol. Cell. Biol.* **13 (10)**: 6600-6613.
- Liu, G., Malott, M., and Leffak, M. (2003).** Multiple functional elements comprise a mammalian chromosomal replicator. *Mol. Cell. Biol.* **23 (5)**: 1832-1842.
- Liu, H., Naismith, J.H., and Hay, R.T. (2003).** Adenovirus DNA replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **272**: 131-164. Review.
- Ludérus, M.E., den Blaauwen, J.L., de Smit, O.J., Compton, D.A., and van Driel, R. (1994).** Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions in the minor groove. *Mol. Cell. Biol.* **14 (9)**: 6297-6305.
- Lygerou, Z., and Nurse, P. (1999).** The fission yeast origin recognition complex is constitutively associated with chromatin and is differentially modified through the cell cycle. *J. Cell Sci.* **112**: 3703-3712.
- Machida, Y.I., and Dutta, A. (2005).** Cellular checkpoint mechanisms monitoring proper initiation of DNA replication. *J. Biol. Chem.* **280 (8)**: 6253-6256. Review.
- Machida, Y.I., Hamlin, J.L., and Dutta, A. (2005).** Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* **123**: 13-24. Review.
- Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J., and Bird, A.P. (1994).** Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev.* **8 (19)**: 2282-2292.
- MacNeill, S.A. (2001).** DNA replication: partners in the Okazaki two-step. *Curr. Biol.* **11 (20)**: 842-844. Review.

- Mahbubani, H.M., Paull, T., Elder, J.K., and Blow, J.J. (1992).** DNA replication initiates at multiple sites on plasmid DNA in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res.* **20 (7):** 1457-1462.
- Maiorano, D., Lutzmann, M., and Mechali, M. (2006).** MCM proteins and DNA replication. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **18 (2):** 130-136.
- Malott, M., and Leffak, M. (1999).** Activity of the c-myc replicator at an ectopic chromosomal location. *Mol. Cell. Biol.* **19 (8):** 5685-5695. Erratum in *Mol. Cell. Biol.* 1999, **19 (12):** 8694.
- Marahrens, Y., and Stillman, B. (1992).** A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* **255:** 817-823.
- Mastrangelo, I.A., Courey, A.J., Wall, J.S., Jackson, S.P., and Hough, P.V.C. (1991).** DNA looping and Sp1 multimer links: A mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88:** 5670-5674.
- Mechali, M. (2001).** DNA replication origins: from sequence specificity to epigenetics. *Nat. Rev. Genet.* **2 (8):** 640-645.
- Meisterernst, M., Gander, I., Rogge, L. und Winnacker, E.L. (1988a).** A quantitative analysis of nuclear factor I/DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16:** 4419-4435.
- Mendez, J. and Stillman, B. (2000).** Chromatin association of human origin recognition complex, Cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol. Cell. Biol.* **20 (22):** 8602-8612.
- Mendez, J., Zou-Yang, X.H., Kim, S.Y., Hidaka, M., Tansey, W.P., and Stillman, B. (2002).** Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication. *Mol. Cell.* **9 (3):** 481-491.
- Minami, H., Takahashi, J., Suto, A., Saitoh, Y., and Tsutsumi, K. (2006).** Binding of AIF-C, an Orc1-binding transcriptional regulator, enhances replicator activity of the rat aldolase B origin. *Mol. Cell. Biol.* **26:** 8770-8780.
- Mirkovitch, J., Gasser, S.M., and Laemmli, U.K. (1987).** Relation of chromosome structure and gene expression. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **317 (1187):** 563-574. Review.
- Mirkovitch, J., Gasser, S.M., and Laemmli, U.K. (1988).** Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes. *J. Mol. Biol.* **200 (1):** 101-109.
- Mitchell, P.J., and Tjian, R. (1989).** Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science.* **245:** 371-378. Review.
- Moon, K.Y., Kong, D., Lee, J.K., Raychaudhuri, S., and Hurwitz, J. (1999).** Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96:** 12367-12372.

- Moore, A.E., Sabachewsky, L., and Toolan, H.W. (1955).** Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.* **15 (9):** 598-603.
- Mul, Y.M., and Van der Vliet, P.C. (1992).** Nuclear factor I enhances adenovirus DNA replication by increasing the stability of a preinitiation complex. *EMBO J.* **11 (2):** 751-760.
- Mul, Y.M., Verrijzer, C.P., and Van der Vliet, P.C. (1990).** Transcription factors NFI and NFIII/Oct-1 function independently, employing different mechanisms to enhance adenovirus DNA replication. *J. Virol.* **64 (11):** 5510-5518.
- Munnia, A., Schütz, N., Romeike, B.F.M., Maldener, E., Glass, B., Maas, R., Nastainczyk, W., Feiden, W., Fischer, U., and Meese, E. (2001).** Expression, cellular distribution and protein binding of the glioma amplified sequence (GAS41), a highly conserved putative transcription factor. *Nature* **20:** 4853-4863.
- Murakami, Y., Satake, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Sakai, M., Muramatsu, M., and Ito, Y. (1991).** The nuclear protooncogenes *c-jun* and *c-fos* as regulators of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88 (9):** 3947-3951.
- Murakami, Y., and Ito, Y. (1999).** Transkription factors in DNA replication. *Front. Biosci.* **4:** D824-833. Review.
- Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipat, A., Uchida, K., and Yamaguchi, R. (2000).** Amplification of the cyclin A gene in canine and feline mammary tumors. *J. Vet. Med. Sci.* **62 (7):** 783-787.
- Myers, F.A., Lefevre, P., Mantouvalou, E., Bruce, K., Lacroix, C., Bonifer, C., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (2006).** Developmental activation of the lysozyme gene in chicken macrophage cells is linked to core histone acetylation at its enhancer elements. *Nucleic Acids Res.* **34 (14):** 4025-4035.
- Mysiak, M.E., Wyman, C., Holthuisen, P.E. und van der Vliet, P.C. (2004).** NFI and Oct-1 bend the Ad5 origin in the same direction leading to optimal DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **32 (21):** 6218-6225.
- Nagata, K., Guggenheimer, R.A., Enomoto, T., Lichy, J.H., and Hurwitz, J. (1982).** Adenovirus DNA replication *in vitro*: Identification of a host factor that stimulates synthesis of the terminal protein-dCMP complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79:** 6438-6442.
- Nagata, K., Guggenheimer, R.A., and Hurwitz, J. (1983).** Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80:** 6177-6181.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., and Kingston, R.E. (2002).** Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* **108 (4):** 475-487. Review.
- Natale, D.A., Li, C.J., Sun, W.S., and DePamphilis, M.L. (2000).** Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the M-G1 transition in mammals. *EMBO J.* **19 (11):** 2728-2738.
- Ness, S.A., Kowentz-Leutz, E., Casini, T., Graf, T., and Leutz, A. (1993).** Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes Dev.* **7:** 749-759.

- Nguyen, V.Q., Co, C., and Li, J.J. (2001).** Cyclin-dependent kinases prevent DNA replication through multiple mechanisms. *Nature* **411**: 1068-1073.
- Nguyen-Huu, M.C., Stratmann, M., Goner, B., Wurtz, T., Land, H., Giesecke, K., Sippel, A.E., and Schütz, G. (1979).** Chicken lysozyme gene contains several intervening sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (1): 76-80.
- Nguyen-Huynh, A.T., and Schaffer, P.A. (1998).** Cellular transcription factors enhance herpes simplex virus type 1 oriS-dependent DNA replication. *J. Virol.* **72**: 3635-3645.
- Newlon, C.S., and Theis, J.F. (1993).** The structure and function of yeast ARS elements. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3** (5): 752-758.
- Ohta, S., Tatsumi, Y., Fujita, M., Tsurimoto, T., and Obuse, C. (2003).** The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **278** (42): 41535-41540.
- O'Neill, E.A., and Kelly, T.J. (1988).** Purification and characterization of nuclear factor III (origin recognition protein C), a sequence-specific DNA binding protein required for efficient initiation of adenovirus DNA replication. *J. Biol. Chem.* **263**: 931-937.
- Orlando, V. (2000).** Mapping chromosomal proteins *in vivo* by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem. Sci.* **25** (3): 99-104. Review.
- Orlando, V., Strutt, H., and Paro, R. (1997).** Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. *Methods* **11** (2): 205-214.
- Paixao, S., Colaluca, I.N., Cubells, M., Peverali, F.A., Destro, A., Giadrossi, S., Giacca, M., Falaschi, A., Riva, S., and Biamonti, G. (2004).** Modular structure of the human lamin B2 replicator. *Mol. Cell. Biol.* **24** (7): 2958-2967.
- Palzkill, T.G., and Newlon, C.S. (1988).** A yeast replication origin consists of multiple copies of a small conserved sequence. *Cell* **53**: 441-450.
- Pascal, E., and Tjian, R. (1991).** Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev.* **5**: 1646-1656.
- Phi-van, L., and Strätling, W.H. (1988).** The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain. *EMBO J.* **7** (3): 655-664.
- Phi-van, L., Sellke, C., von Bodenhausen, A., and Strätling, W.H. (1998).** An initiation zone of chromosomal DNA replication at the chicken lysozyme gene locus. *J. Biol. Chem.* **273** (29): 18300-18307.
- Phi-van, L., and Strätling, W.H. (1999).** An origin of bidirectional DNA replication is located within a CpG island at the 3' end of the chicken lysozyme gene. *Nucleic Acids Res.* **27** (15): 3009-3017.

- Pinto, S., Quintana, D.G., Smith, P., Mihalek, R.M., Hou, Z.H., Boynton, S., Jones, C.J., Hendricks, M., Velinzon, K., Wohlschlegel, J.A., Austin, R.J., Lane, W.S., Tully, T., and Dutta, A. (1999).** *latheo* encodes a subunit of the origin recognition complex and disrupts neuronal proliferation and adult olfactory memory when mutant. *Neuron*. **23** (1): 45-54. Comment in: *Neuron*, 1999 **23** (1): 1-2.
- Prasanth, S.G., Prasanth, K.V., Siddiqui, K., Spector, D.L., and Stillman, B. (2004).** Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *EMBO J.* **23** (13): 2651-2663.
- Prasanth, S.G., Mendez, J., Prasanth, K.V., and Stillman, B. (2004).** Dynamics of pre-replication complex proteins during the cell division cycle. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **359**: 7-16.
- Pruijn, G.J., van Driel, W., van der Vliet, P.C. (1986).** Nuclear factor III, a novel sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells stimulating adenovirus DNA replication. *Nature* **322**: 656-659.
- Ptashne, M., and Gann, A. (1997).** Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**: 569-577.
- Quintana, D.G., Hou, Z., Thome, K.C., Hendricks, M., Saha, P., and Dutta, A. (1997).** Identification of HsORC4, a member of the human origin of replication recognition complex. *J. Biol. Chem.* **272** (45): 28247-28251.
- Quintana, D.G., Thome, K.C., Hou, Z.H., Ligon, A.H., Morton, C.C., and Dutta, A. (1998).** ORC5L, a new member of the human origin recognition complex, is deleted in uterine leiomyomas and malignant myeloid diseases. *J. Biol. Chem.* **273** (42): 27137-27145.
- Radichev, I., Kwon, S.W., Zhao, Y., DePamphilis, M.L., and Vassilev, A. (2006).** Genetic analysis of human Orc2 reveals specific domains that are required *in vivo* for assembly and nuclear localization of the origin recognition complex. *J. Biol. Chem.* **281** (32): 23264-23273.
- Rao, H., Marahrens, Y., and Stillman, B. (1994).** Functional conservation of multiple elements in yeast chromosomal replicators. *Mol. Cell Biol.* **14** (11): 7643-7651.
- Rao, H., and Stillman, B. (1995).** The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (6): 2224-2228.
- Remus, D., Beall, E.L., and Botchan, M.R. (2004).** DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding. *EMBO J.* **23** (4): 897-907.
- Ritzi, M., Baack, M., Musahl, C., Romanowski, P., Laskey, R.A. and Knippers, R. (1998).** Human minichromosome maintenance proteins and human origin recognition complex 2 protein on chromatin. *J. Biol. Chem.* **273** (38): 24543-24549.
- Rivella, S., Palermo, B., Pelizon, C., Sala, C., Arrigo, G., and Toniolo, D. (1999).** Selection and mapping of replication origins from a 500 kb region of the human X chromosome and their relationship to gene expression. *Genomics* **62**: 11-20.

- Robinson, N.P., and Bell, S.P. (2005).** Origins of DNA replication in the three domains of life. *FEBS L.* **272 (15):** 3757-3766. Review.
- Romanowski, P., Madine, M.A., Rowles, A., Blow, J.J., and Laskey, R.A. (1996).** The *Xenopus* origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. *Curr. Biol.* **6 (11):** 1416-1425.
- Rowles, A., Chong, J.P., Brown, L., Howell, M., Evan, G.I., and Blow, J.J. (1996).** Interaction between the origin recognition complex and the licensing system in *Xenopus*. *Cell* **87 (2):** 287-296.
- Rupp, R.A., and Sippel, A.E. (1987).** Chicken liver TGGCA protein purified by preparative mobility shift electrophoresis (PMSE) shows a 36.8 to 29.8 kd microheterogeneity. *Nucleic Acids Res.* **15 (23):** 9707-9726. Erratum in: *Nucleic Acids Res.* **16 (4):** 1654.
- Saha, S., Shan, Y., Mesner, L.D., and Hamlin, J.L. (2004).** The promotor of the Chinese hamster ovary dihydrofolate reductase gene regulates the activity of the local origin and helps define its boundaries. *Genes Dev.* **18 (4):** 397-410.
- Saitoh, Y., Miyagi, S., Ariga, H., and Tsutsumi, K. (2002).** Functional domains involved in the interaction between Orc1 and transcriptional repressor AIF-C that bind to an origin/promoter of the rat aldolase B gene. *Nucleic Acids Res.* **30 (23):** 5205-5212.
- Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P. und Tjian, R. (1988).** A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* **334:** 218-224.
- Sasaki, T., Sawado, T., Yamaguchi, M., and Shinomiya, T. (1999).** Specification of origins of DNA replication initiation during embryogenesis in the 65-kilobase *DNApolalpha-dE2F* locus of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **19 (1):** 547-555.
- Schaarschmidt, D., Baltin, J., Stehle, I.M., Lipps, H.J., and Knippers, R. (2004).** An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex. *EMBO J.* **23:** 191-201.
- Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J.L., Harwood, J., Diffley, J.F., and Hamerschmidt, W. (2001).** Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **20 (16):** 4588-4602.
- Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M., and Schaffner, W. (1989).** Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17 (15):** 6419.
- Schwaiger, M., and Schübeler, D. (2006).** A question of timing: emerging links between transcription and replication. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16 (2):** 177-183.
- Segurado, M., de Luis, A., and Antequera, F. (2003).** Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Rep.* **4 (11):** 1048-1053.
- Sehgal, A. (1998).** Molecular changes during the genesis of human gliomas. *Semin. Surg. Oncol.* **14:** 3-12.

- Shigehiro, O., Shoko, D., Tsutomu, N., and Masayoshi, I. (1996).** Identification of DNA binding-site preferences for nuclear factor I-A. *FEBS L.* **390**: 44-46.
- Sibani, S., Price, G.B., and Zannis-Hadjopoulos, M. (2005).** Ku80 binds to human replication origins prior to the assembly of the ORC complex. *Biochemistry* **44**: 7885-7896.
- Siddiqui, K., and Stillman, B. (2007).** ATP-dependent assembly of the human origin recognition complex. *J. Biol. Chem.* **282 (44)**: 32370-32383.
- Simmons, D.T. (2000).** SV40 large T antigen functions in DNA replication and transformation. *Adv. Virus Res.* **55**: 75-134. Review.
- Singh, H., Sen, R., Baltimore, D., and Sharp, P.A. (1986).** A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* **319**: 154-158.
- Sivaprasad, U., Dutta, A., and Bell, S.P. (2006).** Assembly of pre-replication complexes. In: DNA replication an human disease, ed DePamphilis, M.L. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 63-88.
- Smale, S.T., Schmidt, M.C., Berk, A.J., and Baltimore, D. (1990).** Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87 (12)**: 4509-4513.
- Solomon, M.J., Larsen, P.L., and Varshavsky, A. (1988).** Mapping protein-DNA interactions *in vivo* with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* **53**: 937-947.
- Solomon, M.J., and Varshavsky, A. (1985).** Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: a probe for *in vivo* chromatin structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6470-6474.
- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98 (3)**: 503-517.
- Springer, J., Kneissl, M., Pütter, V., and Grummt, F. (1999a).** Identification and characterization of MmORC4 and MmORC5, two subunits of the mouse origin of replication recognition complex. *Chromosoma* **108 (4)**: 243-249.
- Springer, J., Nanda, I., Hoehn, K., Schmid, M., and Grummt, F. (1999b).** Identification and chromosomal localization of murine ORC3, a new member of the mouse origin recognition complex. *Cytogenet. Cell. Genet.* **87 (3-4)**: 245-251.
- Staub, C., and Grummt, F. (1997).** Mapping replication origins by nascent DNA strand length. *Methods* **13 (3)**: 293-300. Review.
- Stenlund, A. (2003).** Initiation of DNA replication: lessons from viral initiator proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4 (10)**: 777-785. Review.
- Stillman, B. (2005).** Origin recognition and the chromosome cycle. *FEBS L.* **579**: 877-884. Review.

- Stinchcomb, D.T., Struhl, K., and Davis, R.W. (1979).** Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* **282**: 39-43.
- Stinchcomb, D.T., Thomas, M., Kelly, J., Selker, E., and Davis, R.W. (1980).** Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77 (8)**: 4559-4563.
- Strätling, W.H., Dölle, A., and Sippel, A.E (1986).** Chromatin structure of the chicken lysozyme gene domain as determined by chromatin fractionation and micrococcal nuclease digestion. *Biochemistry* **25 (2)**: 495-502.
- Sturm, R.A., and Herr, W. (1988).** The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. *Nature* **336**: 601-604.
- Sturm, R.A., Das, G., and Herr, W. (1988).** The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.* **2 (12A)**: 1582-1599.
- Su, W., Jackson, S., Tjian, R., and Echols, H. (1991).** DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1. *Genes Dev.* **5**: 820-826.
- Suske, G. (1999).** The Sp-family of transcription factors. *Gene* **238**: 291-300.
- Tabancay, A.P. Jr, and Forsburg, S.L. (2006).** Eukaryotic DNA replication in a chromatin context. *Curr. Top. Dev. Biol.* **76**: 129-184. Review.
- Tada, S. (2007).** Cdt1 and geminin: role during cell cycle progression and DNA damage in higher eukaryotes. *Front Biosci.* **12**: 1629-1641. Review.
- Takahara, K., Bong, M., Brevard, R., Eddy, R.L., Haley, L.L., Sait, S.J., Shows, T.B., Hoffman, G.G., and Greenspan, D.S. (1996).** Mouse and human homologues of the yeast origin of replication recognition complex subunit ORC2 and chromosomal localization of the cognate human gene ORC2L. *Genomics* **31 (1)**: 119-122.
- Takahashi, T., and Masukata, H. (2001).** Interaction of fission yeast ORC with essential adenine/thymine stretches in replication origins. *Genes Cells* **6 (10)**: 837-849.
- Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H., Tsurimoto, T., and Obuse, C. (2003).** The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. *J. Biol. Chem.* **278 (42)**: 41528-41534.
- Tazi, J., and Bird, A. (1990).** Alternative chromatin structure at CpG islands. *Cell* **60 (6)**: 909-920.
- Teer, J.K., and Dutta, A. (2006).** Regulation of S phase. *Results Probl. Cell. Differ.* **42**: 31-63. Review.
- Thomae, A.W., Pich, D., Brocher, J., Spindler, M.P., Berens, C., Hock, R., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2008).** Interaction between HMGA1a and the origin recognition complex creates site-specific replication origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105 (5)**: 1692-1697.
- Todorovic, V., Falaschi, A., and Giacca, M. (1999).** Replication origins of mammalian chromosomes: the happy few. *Front Biosci.* **4**: D859-868. Review.

- Tugal, T., Zou-Yang, X.H., Gavin, K., Pappin, D., Canas, B., Kobayashi, R., Hunt, T., and Stillman, B. (1998).** The Orc4p and Orc5p subunits of the *Xenopus* and human origin recognition complex are related to Orc1p and Cdc6p. *J. Biol. Chem.* **273 (49):** 32421-32429.
- Turner, W. und Woodworth, M.E. (2001).** DNA replication efficiency depends on transcription factor-binding sites. *J. Virol.* **75 (12):** 5638-5645.
- Vanarsdall, A.L., Mikhailov, V.S., and Rohrmann, G.F. (2007).** Baculovirus DNA replication and processing. *Curr. Drug Targets* **8 (10):** 1103-1115. Review.
- Van Leeuwen, H.C., Rensen, M., and van der Vliet, P.C. (1997).** The Oct-1 POU homeodomain stabilizes the adenovirus preinitiation complex via a direct interaction with the priming protein and is displaced when the replication fork passes. *J. Biol. Chem.* **272 (6):** 3389-3405.
- Vas, A., Mok, W., and Leatherwood, J. (2001).** Control of DNA rereplication via Cdc2 phosphorylation sites in the origin recognition complex. *Mol. Cell. Biol.* **21 (17):** 5767-5777.
- Vashee, S., Cvetic, W., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T.J., and Walter, J.C. (2003).** Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev.* **17 (15):** 1894-1908.
- Vashee, S., Simancek, P., Challberg, M.D., and Kelly, T.J. (2001).** Assembly of the human origin recognition complex. *J. Biol. Chem.* **276 (28):** 26666-26673.
- Vassilev, L., and Johnson, E.M. (1990).** An initiation zone of chromosomal DNA replication located upstream of the *c-myc* gene in proliferating HeLa cells. *Mol. Cell. Biol.* **10 (9):** 4899-4904.
- Verrijzer, C.P., Alkema, M.J., van Weperen, W.W., van Leeuwen, H.C., Strating, M.J. und van der Vliet, P.C. (1992).** The DNA binding specificity of the bipartite POU domain and its subdomains. *EMBO J.* **11:** 4993-5003.
- Verrijzer, C.P., Kal, A.J., and Van der Vliet, P.C. (1990).** The DNA binding domain (POU domain) of transcription factor Oct-1 suffices for stimulation of DNA replication. *EMBO J.* **9:** 1883-1888.
- Waga, S., Bauer, G. and Stillman, B. (1994).** Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J. Biol. Chem.* **269 (14):** 10923-10934.
- Waga, S., and Stillman, B. (1998).** The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **67:** 721-751. Review.
- Walter, J., and Newport, J. (2000).** Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol. Cell.* **5 (4):** 617-627.
- Wang, J., Takagaki, Y., and Manley, J.L. (1996).** Targeted disruption of an essential vertebrate gene: ASF/SF2 is required for cell viability. *Genes Dev.* **10 (20):** 2588-2599.

- Wang, J., and Sugden, B. (2005).** Origins of bidirectional replication of Epstein-Barr virus: models for understanding mammalian origins of DNA synthesis. *J. Cell. Biochem.* **94 (2):** 247-256. Review.
- Weinreich, M., Palacios DeBeer, M.A., and Fox, C.A. (2004).** The activities of eukaryotic replication origins in chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* **1677 (1-3):** 142-157. Review.
- Wilmes, G.M., and Bell, S.P. (2002).** The B2 element of the *Saccharomyces cerevisiae* ARS1 origin of replication requires specific sequences to facilitate pre-RC formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99 (1):** 101-106.
- Wolfe, K.H., Sharp, P.M., and Li, W.H. (1989).** Mutation rates differ among regions of the mammalian genome. *Nature* **337:** 283-285.
- Workman, J.L., and Kingston, R.E. (1998).** Alternation of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **67:** 545-579.
- Zhang, H., and Tower, J. (2004).** Sequence requirements for function of the *Drosophila* chorion gene locus ACE3 replicator and ori-beta origin elements. *Development* **131 (9):** 2089-2099.
- Zhou, J., Chau, C., Deng, Z., Stedman, W., and Liebermann, P.M. (2005).** Epigenetic control of replication origins. *Cell Cycle* **4:** 889-892. Review.
- Zimmermann, K., Ahrens, K., Matthes, S., Buerstedde, J.M., Strätling, W.H., and Phi van, L. (2002).** Targeted disruption of the GAS41 gene encoding a putative transcription factor indicates that GAS41 is essential for cell viability. *J. Biol. Chem.* **277 (21):** 18626-18631.
- Zimmermann, K., Holtz, M., and Phi-van, L. (2007).** The chromatin structure of the lysozyme GAS41 origin of DNA replication changes during the cell cycle. *Biol. Res.* **40:** 185-192.

A Anhang

A.1 Stammlösungen

10% (w/v) Ammoniumpersulfat

100 mg/ml in sterilem H₂O lösen, bei 4°C ca. 2 Wochen verwendbar.

Ampicillin (25 mg/ml)

In H₂O lösen, sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20°C lagern.

2% (w/v) Bromphenolblau

20 mg/ml in sterilem H₂O lösen, bei 4°C lagern.

0,1 M CaCl₂

Lösung autoklavieren.

Chloramphenicol (20 mg/ml)

In absolutem Ethanol lösen, bei -20°C lagern.

Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1)

24 ml Chloroform (Trichlormethan) mit 1 ml Isoamylalkohol mischen.

DNase I (1 mg/ml)

In DNase-Puffer lösen, bei -20°C lagern.

1 M DTT

Lösung sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20°C lagern.

0,5 M EDTA (pH 7,5/8,0)

93,06 g/0,5 l EDTA x 2H₂O (MG 372,24) lösen. Den pH-Wert mit 10 M NaOH (~25 ml) bzw. 2 M NaOH einstellen. Kein HCl zugeben. Lösung autoklavieren.

0,25 M EGTA (pH 7,5)

4,754 g pro 50 ml EGTA (MG 380,35) lösen. Den pH-Wert mit 10 M/2 M NaOH einstellen. Kein HCl zugeben. Lösung autoklavieren.

24% (w/v) Ficoll 400

0,24 g/ml in sterilem H₂O bei 40 - 50°C lösen. Lösung bei 4°C lagern.

G418 (Geneticin 200 mg/ml)

In H₂O lösen, sterilfiltrieren. Bei -20°C lagern.

2 M Glucose

Lösung sterilfiltrieren, bei 4°C lagern.

1 M / 2 M HCl

8,3 ml bzw. 16,6 ml 37%ige HCl (MG 36,46; Dichte 1190 g/l) mit H₂O auf 100 ml ergänzen.

0,25 M HEPES-KOH (pH 7,9)

Den pH-Wert mit 2 M KOH (~10 ml) einstellen. Lösung autoklavieren.

100 mM IPTG

Lösung sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20°C lagern.

1 M / 3 M Kaliumacetat (pH 7,5)

Den pH-Wert mit 2 M Essigsäure einstellen. Lösung sterilfiltrieren.

0,5 M KCl

Lösung autoklavieren.

2 M / 5 M KOH

Lösung autoklavieren.

1 M LiCl₂

Lösung autoklavieren.

Lysozym (50 mg/ml)

Lösung frisch ansetzen.

0,5 M MES (pH 6,3)

10 g MES (MG 213,25) in etwa 40 ml sterilem H₂O lösen. Den pH-Wert mit 5 M KOH einstellen, mit sterilem H₂O auf 93,7 g auffüllen. In 10 ml-Aliquots bei -20°C lagern.

0,5 M MgCl₂

Lösung autoklavieren.

1 M MgCl₂

Lösung sterilfiltrieren, bei 4°C lagern.

1 M MgSO₄

Lösung sterilfiltrieren, bei 4°C lagern.

4 M NaCl

Lösung autoklavieren.

5% (w/v) Natriumazid

5 g/100 ml lösen. Bei 4°C aufbewahren.

3 M Natriumacetat (pH 5,2/7,0)

Den pH-Wert mit 100 %iger Essigsäure (Eisessig, ~5-10 ml) einstellen, autoklavieren.

1 M Natriumbisulfit

1 Mol Natriumbisulfit/Natriumpyrosulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ / NaHSO_3 ; MG $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ = 190,11) dissoziiert in H_2O zu 2 Mol NaHSO_3 . Daher für 1 Mol nur 0,5 M einwiegen: 0,475 g mit sterilem H_2O auf 5 ml auffüllen. Lösung zwei Tage verwenden.

10% (w/v) Natriumdeoxycholat

100 mg/ml unter leichter Erwärmung lösen. Lösung frisch ansetzen.

0,5 M Na_2HPO_4 (pH 6,5)

Den pH-Wert mit 85% ortho-Phosphorsäure (~5 ml/l) einstellen. Lösung autoklavieren.

0,5 M NaH_2PO_4

Lösung autoklavieren.

10 M NaOH

NaOH-Plätzchen unter leichter Erwärmung lösen.

Proteaseinhibitorcocktail

1 Tablette Complete Mini in 2 ml sterilem H_2O lösen. Bei -20°C lagern.

Proteinase K (20 mg/ml)

25 mg lyophilisierte Proteinase K in 1,25 ml sterilem H_2O lösen, bei -20°C lagern.

Benötigt SDS für Aktivität.

Puromycin (1 mg/ml)

In H_2O lösen, sterilfiltrieren. Bei -20°C lagern.

RNase A (1 mg/ml, 10 mg/ml)

RNase A in TN lösen. Bei -20°C lagern.

20% (w/v) SDS

200 g/l in sterilem H_2O lösen.

1 M Tris-HCl (pH 6,8/7,5/8,0)

Den pH-Wert mit 37 % HCl (~65 ml/l) bzw. 2 M HCl einstellen. Kein NaOH zugeben.

Lösung autoklavieren.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

Den pH-Wert mit 37 % HCl bzw. 2 M HCl einstellen. Kein NaOH zugeben. Lösung autoklavieren.

0,5 M ZnCl₂

Lösung autoklavieren.

A.2 Lösungen und Puffer

Aufbewahrungspuffer (Sepharose)

10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 0,05% (v/v) Natriumazid; pH 8,0.

ChIP-Bindungspuffer

150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 0,5% (v/v) Nonidet P40;
10 mM Na-Bisulfit; pH 7,5. Frisch ansetzen.

ChIP-Waschpuffer 1

10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1% (v/v) Nonidet P40; 0,5% (v/v) Natriumdeoxycholat;
0,1% (v/v) SDS; 1 mM EDTA; 10 mM Na-Bisulfit; pH 8,0. Frisch ansetzen.

ChIP-Waschpuffer 2

10 mM Tris-HCl; 400 mM NaCl; 1% (v/v) Nonidet P40; 0,5% (v/v) Natriumdeoxycholat;
0,1% (v/v) SDS; 1 mM EDTA; 10 mM Na-Bisulfit; pH 8,0. Frisch ansetzen.

ChIP-Waschpuffer 3

10 mM Tris-HCl; 250 mM LiCl₂; 0,5% (v/v) Nonidet P40; 0,5% (v/v) Natriumdeoxycholat;
1 mM EDTA; 10 mM Na-Bisulfit, pH 8,0. Frisch ansetzen.

ChIP-Elutionspuffer

200 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA (pH 8,0); 1% (v/v) SDS; pH 8,0.

Denaturierungslösung

1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH. 3 Monate bei Raumtemperatur haltbar.

100x Denhardt's-Lösung

2% (w/v) BSA; 2% (w/v) Ficoll 400; 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon.

Lösung mit 0,45 µm-Filter sterilfiltrieren, in 10 ml-Portionen bei -20°C lagern.

Depurinierungslösung

0,125 M HCl (2,07 ml 37% HCl, steriles H₂O ad 200 ml.)

1 Monat bei Raumtemperatur haltbar.

DNase-Puffer

20 mM Tris-HCl; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 100 µg/ml BSA; 50% (v/v) Glycerin; pH 7,5.

Bei -20°C lagern.

DnD

1 M DTT; 90% (v/v) DMSO; 10 mM K-Acetat (pH 7,5).

In 110 µl-Aliquots bei -20°C lagern.

6,25 mM dNTPs

Jeweils 50 µl 100 mM dATP (25 µmol); 100 mM dTTP; 100 mM dGTP; 100 mM dCTP mit 600 µl sterilem H₂O mischen. Portioniert bei -20°C lagern.

2x EMSA-Bindungspuffer

40 mM HEPES-KOH (pH 7,9); 60 mM NaCl; 2 mM EDTA (pH 8,0); 12 mM MgCl₂;

4 mM ZnCl₂; 8% (v/v) Ficoll; 1,5 - 2 µg/ Ansatz Poly(dIdC) x Poly(dIdC); 2 mM ATP;

4 mM DTT. Puffer frisch ansetzen.

6x Gelladepuffer

0,25% (w/v) Bromphenolblau; 15% (w/v) Ficoll 400. Bei 4°C lagern.

Geltrocknungslösung

25% (v/v) abs. Ethanol; 8% (v/v) Essigsäure (Eisessig); 10% (v/v) Glycerin.

Die Lösung kann mehrere Male benutzt werden, bei Raumtemperatur lagern.

Glycerin-Probenpuffer

10 mM EDTA (pH 7,5); 10% (v/v) Glycerin; 0,02% (w/v) Bromphenolblau.

Guanidiniumpuffer (pH 8,0)

6 M Guanidiniumchlorid; 100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; pH 8,0.

Unter leichter Erwärmung lösen. Den pH-Wert mit 5 M NaOH einstellen.

8 M Harnstoffpuffer (pH 3,8/5,9/6,3)

8 M Harnstoff/Urea; 100 mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; pH 7,5

Unter leichter Erwärmung lösen. Den pH-Wert mit 2M / 1M HCl einstellen.

Hybridisierungslösung (Southern)

4x SSC; 5x Denhardt's Lösung; 0,1% (w/v) SDS; 2 mM EDTA (pH 7,5);

50 mM Na₂HPO₄ (pH 6,5). Lösung frisch ansetzen.

IB-Puffer (pH 8,0)

50 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 8,0.

Den pH-Wert mit 2 M NaOH einstellen, Lösung autoklavieren.

Lösung I (Mini-Plasmidpräparation)

50 mM D(+)-Glucose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl; pH 7,5. Lösung sterilfiltrieren.

Lösung II (Mini-Plasmidpräparation)

0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS. Lösung frisch ansetzen.

Lösung III (Mini-Plasmidpräparation)

3 M Kaliumacetat mit 11,5 ml 100% Essigsäure (Eisessig) auf 100 ml mit H₂O auffüllen.

Lösung autoklavieren.

Low TE (pH 7,5)

1 mM Tris-HCl; 0,01 mM EDTA; pH 7,5. Lösung autoklavieren.

Lysispuffer (chromosomale DNA)

50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,4 (w/v) SDS;

0,5 mg/ml Proteinase K, pH 8,0.

Neutralisierungslösung

1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5.

3 Monate bei Raumtemperatur haltbar.

NP-Puffer A

10 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM Na-Bisulfit; pH 7,5.

NP-Puffer B

1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 0,1% Nonidet P40; 10 mM Na-Bisulfit; pH 7,5.

PBS (pH 7,2)

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄.

Den pH-Wert mit 2 M HCl einstellen, autoklavieren.

Puffer A (Kernextrakte)

10 mM HEPES (pH 7,9); 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA (pH 7,5); 0,1 mM EGTA (pH 7,5);

1 mM DTT; 1 ml/11 ml Proteaseinhibitorcocktail. Puffer frisch ansetzen.

Puffer B (Kernextrakte)

20 mM HEPES (pH 7,9); 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA (pH 7,5); 1 mM EGTA (pH 7,5);
1 mM DTT, 0,5 ml/ml Proteaseinhibitorcocktail. Puffer frisch ansetzen.

10x SDS-Laufpuffer

29,0 g Trisbase; 144,0 g Glycin; 10,0 g SDS; steriles H₂O auf 1 Liter.

1x SDS-Probenpuffer

50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerin; 0,1% (w/v) Bromphenolblau;
1% (v/v) β -Mercaptoethanol. **2x SDS-Probenpuffer**: doppelte Konzentration.

20x SSC

3 M NaCl; 300 mM Natriumcitrat. Entspricht pH 7,0. Lösung autoklavieren.

STE (pH 7,5 / 8,0)

10 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 7,5/pH 8,0.

5x TBE

0,5 M Trisbase; 415 mM Borsäure; 5 mM EDTA

Den pH-Wert 8,3 mit 10 M NaOH bzw. 37% HCl einstellen. Die Herstellung von
0,25x TBE erfolgt durch entsprechende Verdünnung.

10x TBE

1 M Trisbase; 830 mM Borsäure; 10 mM EDTA

Keine Einstellung des pH-Wertes. Die Herstellung von **1x TBE** erfolgt
durch entsprechende Verdünnung.

TBST (pH 7,6)

20 mM Trisbase; 137 mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20.

Den pH-Wert mit 37% HCl einstellen. Lösung autoklavieren.

TE (pH 7,5 / 8,0)

10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5/pH 8,0. Lösung autoklavieren.

TEN (zum Auflösen von Poly(dI-dC) x Poly(dI-dC))

10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 50 mM NaCl; pH 7,5. Portioniert bei -20°C lagern.

2x TEN (zur Hybridisierung von Oligonukleotiden)

20 mM Tris-HCl; 20 mM EDTA; 300 mM NaCl; pH 8,0.

TN (für RNase A)

10 mM Tris-HCl; 15 mM NaCl; pH 7,5.

Transferpuffer (pH 8,3)

3,0 g Trisbase; 14,4 g Glycin; 200 ml Methanol (99,8%); ad 1 L

Den pH-Wert mit 2 M HCl einstellen. Nicht autoklavieren. Bei 4°C lagern.

Transformationspuffer (TFB)

10 mM MES (pH 6,3); 45 mM MnCl₂; 10 mM CaCl₂; 0,1 M KCl; 3 mM Hexamincobaltrichlorid.

Lösung sterilfiltrieren, in 50 ml-Aliquots bei -20°C lagern.

Waschpuffer (Sepharose)

10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0.

Waschlösung 1 (Southern)

2x SSC; 0,1% (w/v) SDS; 25 mM Na₂HPO₄ (pH 6,5).

Lösung bei Raumtemperatur aufbewahren.

Waschlösung 2 (Southern)

1x SSC; 0,1% (w/v) SDS; 25 mM Na₂HPO₄ (pH 6,5).

Lösung bei Raumtemperatur aufbewahren.

Waschlösung 3 (Southern)

0,2x SSC; 0,1% (w/v) SDS; 25 mM Na₂HPO₄ (pH 6,5).

Lösung bei Raumtemperatur aufbewahren.

A.3 Sonstige Materialien, spezielle Geräte, Chemikalien

Bezugsquellen: Applied Biosystems (Darmstadt), Appligene (Heidelberg), Beckman Coulter (Krefeld), Bio-Rad (München), BRL Life Technologies/ Invitrogen (Karlsruhe), Fluka/Sigma-Aldrich (Deisenhofen), GE Healthcare (München), GIBCO BRL/Invitrogen (Karlsruhe), Greiner Bio-One (Solingen), Heraeus (Hanau), Invitrogen (Karlsruhe), Jürgens (Hannover), Landgraf (Langenhagen), Lehnecke Tierärztebedarf (Schortens), Merck (Darmstadt), MWG Biotech (Ebersberg), Perkin-Elmer (Überlingen), Omnilab (Gehrden), Qiagen (Hilden), Roche Diagnostics (Mannheim), Ronnenberger Laborbedarf (Ronnenberg), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg), VWR (Darmstadt).

Sonstige Materialien

Cryogefäße, 2 ml	Greiner
Elektroporations-Küvetten (Gene Pulser, 0,4 cm gap, 50)	Bio-Rad
Gel Blotting Papier GB02 (0,36 mm) Schleicher & Schuell	Ronnenberger Laborbedarf
Glas Dounce Homogenisator (15 ml)	Jürgens
Glaswolle	Jürgens

50% Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Hybond ECL Nitrocellulose Western Blotting Membran	GE Healthcare
Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Gewebekulturflaschen (50 ml, 250 ml)	Greiner
MicroAmp™ Optical 96-well Reaction Plates	Applied Biosystems
Mikroplatten 96-Loch (f. Proteinbest.)	Greiner
Mikrotiterplatten (Zellkultur, 24-Loch)	Greiner
mini Quick Spin™ Oligo Columns (Sephadex 25)	Roche
Petrischalen (Bakteriologie)	Greiner
Petrischalen 94/16mm (Gewebekulturschalen)	Greiner
Poly-Prep Affinitätschromatographiesäulen	Bio-Rad
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Quick Spin Columns (Sephadex 50)	Roche
Röntgenfilm Kodak BioMax MS	GE Healthcare
Röntgenfilm Kodak BioMax MR	GE Healthcare
Röntgenfilm Kodak X-OMAT LS	VWR
Sterilfilter 0,2 µm, FP 030/0,2 CA-S (Schleicher & Schuell)	Ronnenberger Laborbedarf
Sterilfilter 0,45 µm, FP 030/0,45 CA-S (Schleicher & Schuell)	Ronnenberger Laborbedarf

Geräte

Brutschrank (CO ₂ -Brutschrank)	Binder/VWR
Elektrophoresekammer für Agarosegele (6,4cm x 10,2cm) (MINI SUB DNA CELL)	Bio-Rad
Elektrophoresekammer für Agarosegele (11,1cm x 14,0cm) (HORIZON 11•14, Kat. Nr. 1068BD)	BRL Life Technologies/ Invitrogen
Elektroporationsgerät (Gene Pulser)	Bio-Rad
Gel-Dryer Model 583	Bio-Rad
PCR-Gerät (Primus PCR-Thermocycler TC 2500 ME)	MWG Biotech
PCR-Gerät (Gene Amp System 2400)	Perkin Elmer
PCR-Gerät (Real-Time PCR)	Applied Biosystems
Szintillationszähler Wallac 14.10 (β-Counter)	Pharmacia/ GE Healthcare
Ultraschall-Desintegrator	Branson Sonifier 450
UV/Visible-Spectrophotometer für Mikrotiterplatten (DYNATECH MR5000)	Büchi Dynatech Labora- tories
Vakuumpumpe Hydro Tech (für Gel-Dryer)	Bio-Rad
Vertikalelektrophoresekammer Mini-Transblot-System	Bio-Rad
Vertikalelektrophoresekammer Mini-PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad
Zentrifuge Megafuge 1.0R mit Schwingbecherrotor	Heraeus
Zentrifuge (Ultrazentrifuge)	Beckman
Zentrifuge (Hermle Zentrifuge Typ Z233MK)	Landgraf

Zentrifuge (Microzentrifuge Eppendorf 5415D)

Omnilab

Chemikalien

Acrylamid:N,N-Methylenbisacrylamid 37,5:1 (40%)	Fluka/Sigma-Aldrich
Agar-Agar, hochrein	Roth
Agarose, f. Elektroph. ultra pure	GIBCO BRL/Invitrogen
Ammoniumpersulfat	GIBCO BRL/Invitrogen
Ampicillin Natriumsalz, f. d. Molekularbiologie	Roth
ATP, lithium salt 100 mM, pH 7	Roche
Bio-Safe Coomassie Stain G250	Bio-Rad
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
Rinderserumalbumin (BSA) (20 mg/ml)	Appligene
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Chloramphenicol, f. d. Biochemie	Roth
Chloroform/Trichlormethan	Roth
Dimethyldichlorsilan	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO) (90%)	Sigma-Aldrich
Dithiotreitol (DTT)	Roth
DMSO (HPLC)	Merck
dNTPs	GE Healthcare
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat(Titrierkomplex III)	Merck
EGTA (Titrierkomplex VI)	Merck
Entwickler für Röntgenfilme AGFA G150	Lehnecke
Essigsäure (Eisessig)	Roth
Essigsäure (96%)	Roth
Ethanol p.a. (99,8%)	Roth
Ethidiumbromid 1% (10 mg/ml)	Roth
Ethylacetat (Essigsäureethylester)	Roth
Ficoll 400	Sigma-Aldrich
Fixierer für Röntgenfilme AGFA G350	Lehnecke
Fötales Kälberserum (FCS)	GIBCO BRL/Invitrogen
Formaldehyd (37%)	Fluka/Sigma-Aldrich
D(+)-Glukose, f. bioch. Zwecke	Merck
Glycerin p.a.	Roth
Glycine, f. Elektroph.	Sigma-Aldrich
Glykogen (20 mg/ml)	Roche
Guanidiniumchlorid, f. bioch. Zwecke	Merck
Harnstoff (Urea), ultra	Sigma-Aldrich
Hefe t-RNA	GIBCO BRL/Invitrogen

Hefeextrakt, f. d. Bakt.	Roth
HEPES	Sigma-Aldrich
Hexaminkobaltrichlorid	Fluka/Sigma-Aldrich
Hühnerserum	Sigma-Aldrich
IPTG	Roth
Iscove s Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	GIBCO BRL/Invitrogen
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol (2-Propanol)	Roth
Kaliumacetat, reinst	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Lambda-DNA (500 μ g)	GE Healthcare
Lithiumchlorid (99%+)	Sigma-Aldrich
Lysozym (Pulver)	Roche
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Manganchlorid	Fluka
β -Mercaptoethanol	Merck
β -Mercaptoethanol f. Zellkultur	Merck
MES Hydrat	Fluka/Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumcarbonat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecylhydrat	Roth
Natriumhydroxid-Plätzchen	Roth
di-Natriumphosphat	Roth
Nickel-NTA-Agarose (50%)	Qiagen
Nonidet P40 (10%)	Roche
ortho-Phosphorsäure (85%)	Merck
Penicillin-Streptomycin-Lsg.	GIBCO-BRL/Invitrogen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Poly(dI-dc)xPoly(dI-dc)	GE Healthcare
2-Propanol (Isopropanol)	Roth
Proteaseinhibitorcocktail (Comple Mini)	Roche

Protein-A Sepharose Cl-4B	GE Healthcare
10x Roti-Block	Roth
Salzsäure, rauchend (37%)	Merck
SDS (Laurylsulfat), f. Elektroph.	Roth
Sonicated Salmon Sperm DNA	Stratagene
TEMED	Merck
Tris Ultra Quality	Roth
Trypanblau	Sigma
Trypsin-EDTA	GIBCO-BRL
Trypton/Pepton aus Casein	Roth
Tween 20	Roth
Urea (Harnstoff), ultra	Sigma-Aldrich
Zeocin (100 mg/ml)	Invitrogen
Zinkchlorid	Merck

A.4 Nukleotidsequenz der cORC2-cDNA in Plasmid riken1_17f11

Ensembl Transcript ID: ENSGALT00000013401

1 ACGTGTGTGAGGTGGAGGTGCTCGCTGGGCGCCACCATGAGCTTGCGGAGTGTCTGGAG
-M--S--L--A--E--C--R--S

61 CGCCGGCGCTCTGGAAGTGAAGTTCGTGCCCACGAGGACGTTCTGAGACACATCGCTGA
 9 --A--G--A--L--E--V--K--F--V--P--D--E--D--V--L--R--H--I--A--D

121 CGACGCAGGTATTAAAGTTTCAAGAAAGGCAAAAGTCAGCTGATAGCCAACACGAAGAGATT
 29 --D--A--G--I--K--V--Q--K--G--K--S--Q--L--I--A--N--T--K--R--F

181 TGTAAGAAGCTTGAGGCTATCTCAGATGATGAAGCTCAGGAGGTCCTGGAGGAGAAGAG
 49 --V--K--K--L--E--A--I--S--D--D--E--A--Q--E--V--L--E--E--K--S

241 CTATGTTGCTGTTCTAGGTGTATGTGGCGAAGAATCAATGACAAATGGTTCAAGTGTAGG
 69 --Y--V--A--V--L--G--V--C--G--E--E--S--M--T--N--G--S--S--V--G

301 TGGTGGTGAAGTTTACACATTCAGACTCCCAAACGCTCCAACAAAATGGCAGAGCTGGC
 89 --G--G--E--V--Y--T--F--Q--T--P--K--R--S--N--K--M--A--E--L--A

361 CTCTGAATTAGCACAGACACCAGGACAGAGTGTGTACCTGATCCCTCCAAGTGCCTGA
 109 --S--E--L--A--Q--T--P--G--Q--S--A--V--P--D--P--S--K--C--P--E

421 GAAGACTGCCAAAACCCTCAAAGCAGCAAACGTTCAAGTCAAGCCAAGTTCAGCAGAA
 129 --K--T--A--K--T--P--Q--S--S--K--R--S--S--S--S--Q--V--Q--Q--K

481 GACTAAAAGAATGAATTTGTGTCTACCACACCTTACAGGCTCCGAAAGAGACTAGCAGC
 149 --T--K--K--N--E--F--V--S--T--T--P--Y--R--L--R--K--R--L--A--A

541 TCCAGATGCTCAGTTAGAAAGTGAGAGTGAATATTCTGCTTCCGTCGCGAAGAGGAGGA
 169 --P--D--A--Q--L--E--S--E--S--E--Y--S--A--S--C--S--E--E--E--E

601 GGGAGAGGAAGCCAGAAAAGAAGTCAGCACTGTTTTATCACATCAGAAGACCCAGCAAA
 189 --G--E--E--A--Q--K--E--V--S--T--V--L--S--H--Q--K--T--P--A--K

661 AACTAAGGCTGTATCTACGCCTCCTTCTAGAAAAACCCTGACCAAAAAAAGACAACAT
 209 --T--K--A--V--S--T--P--P--S--R--K--T--L--T--K--K--K--D--N--M

721 GAACAACCTTGTAGAGGAATACTTTGAAGCTCACAGTAGTTCCAAAGTGTCTCACTTCGGA
 229 --N--N--L--V--E--E--Y--F--E--A--H--S--S--S--S--K--V--L--T--S--D

781 CCGAACGCTGCAGAAGTTACGGAGGAAAAGATTGAATCAGCAAACATTGCATGACCTTCT
 249 --R--T--L--Q--K--L--R--R--K--R--L--N--Q--Q--T--L--H--D--L--L

841 GCAAAAATCTCCCCTTGCCCTATGCTGCTGAAATTAAGAGTTAAACCAGCAATATGAGTC
 269 --Q--K--S--P--L--A--Y--A--A--E--I--K--E--L--N--Q--Q--Y--E--S

901 CCTGTTTTCAAAGTGGATGCTGCAATTACACTTGGGTTTTAATATTTGTGCTTTATGGACT
 289 --L--F--S--K--W--M--L--Q--L--H--L--G--F--N--I--V--L--Y--G--L

961 TGGATCGAAGCATGATTTGTTAGAGAAGTTTTCGTACATCTATGCTCCAGGATTGTGTTCA
 309 --G--S--K--H--D--L--L--E--K--F--R--T--S--M--L--O--D--C--V--H

Fortsetzung: cORC2- cDNA in Plasmid riken1_17f11

Orc2-for

1021 CCTTGTGGTTAATGGATACTTCCCCAGCATCACTGTGAAATCTGTTCTCAACTCTATCAC
 329 --L--V--V--N--G--Y--F--P--S--I--T--V--K--S--V--L--N--S--I--T

1081 AGAGGAGGTATTGGACCATATAGGAACCTTCCGCAGCCCACTCGATCAACTTGAATTCAT
 349 --E--E--V--L--D--H--I--G--T--F--R--S--P--L--D--Q--L--E--F--I

1141 CATGAAAAGATTTAAAGAAGATTTCATCTTTAGAGCTCTATGTCCTCATTTCATAACCTGGA
 369 --M--K--R--F--K--E--D--S--S--L--E--L--Y--V--L--I--H--N--L--D

1201 CAGCCAGATGTTGAGAGGAGAAAGAAGTCAGCAGATCCTTGCACAGTTATCCTCTCTGCC
 389 --S--Q--M--L--R--G--E--R--S--Q--Q--I--L--A--Q--L--S--S--L--P

1261 TAGCATTACCTCATTGCCTCTATCGATCACATCAATGCTCCTCTCATGTGGGATCAGGC
 409 --S--I--Y--L--I--A--S--I--D--H--I--N--A--P--L--M--W--D--Q--A

1321 AAAGCAAAGCCTCTACAATTGGCTTTGGTATGAGACAACCACATTTAGTCTTATGTAGA
 429 --K--Q--S--L--Y--N--W--L--W--Y--E--T--T--T--F--S--P--Y--V--E

1381 AGAAACATCTTATGAAAACCTCACTGTTAGTACAGCAGTCTGGAATCTTTGGCTTTGAGCTC
 449 --E--T--S--Y--E--N--S--L--L--V--Q--Q--S--G--S--L--A--L--S--S

1441 CCTAACACATGTCTTGCAGCCTCACTCCCAATGCCAGGGGAATATTCAGACTGCTTGC
 469 --L--T--H--V--L--R--S--L--T--P--N--A--R--G--I--F--R--L--L--A

1501 TCAGTACCAGCTGGAGAACAAGGACAACGCATCTTACCCAGGCCTCTCTTTCCAAGACTT
 489 --Q--Y--Q--L--E--N--K--D--N--A--S--Y--P--G--L--S--F--Q--D--F

1561 CTACCAGCAGTGTGAGAGGCCCTTCTTGTAAACAGTGACCTAACACTCAGGGCACAGCT
 509 --Y--Q--Q--C--R--E--A--F--L--V--N--S--D--L--T--L--R--A--Q--L

1621 GACAGAAATTCAGGGACCACAAGCTCATTGGACCAGCGGGGAGCTGATGGTGTGGAGTA
 529 --T--E--F--R--D--H--K--L--I--R--T--K--R--G--A--D--G--V--E--Y

1681 CTTATTAATACCTGTAGATGACAGTACCTTGAGCGACTTCTTAGAGAAAGAGGATGAAGA
 549 --L--L--I--P--V--D--D--S--T--L--S--D--F--L--E--K--E--D--E--D

Orc2-rev

1741 TATATAACGCTCTGCCTGTTCCCAAACAACCACGGCAATTGCTCTCAAGGGCTGCTGGAG
 569 --I--*--.....

1801 AGGAGCCTATACTCAGGTCTTTCTCTTCAGCCTCAAAGCTGCTGGACTACTTACTGAAAT

1861 GTATTAACGTGAATGAACAACGTTTCTTGTTCATCTACTTCAGGTAGTTTGGAAATGATAA

1921 CTTCTTTAAGCAAGCTATTTCTTGCTCTGAAGTTAGATTTATCTGCTTTGTCTCCTAGCT

1981 CAGATGATGTCCTCTTCATATCTACGTAGCCAATATTCAGTCAGGAAAAATTTGATAAG

Fortsetzung: cORC2- cDNA in Plasmid riken1_17f11

2041 ATGTGCCTTCTGCTCTTTACTTTACCAGACGTGAAGGTTTGGTTGGAGCAGTTCACGTG
.....

2101 ATGTGCAAACCACTAGATAGTCAGAGCTTTAGTTTGTACCAGTGATGAATTTTTTTTTTTT
.....

2161 TTTTTTTAATCTCAACTGAGTGCTTTCTGGCACTCCTTTACCAGCTAGACAAGATGGACT
.....

2221 TCCAGCATATGAAGAAGCCAAGATTTATAATGCTAAGAGACCTGTACTGACAAGGAATAT
.....

2281 GAGCAGGTTTGGGATGCTGTGGGTAACCTATTACATTCTGACAGTGGAACTGAAGGACTT
.....

2341 TTCCCAAGGTGGAATTCCTTTATTTATAAGAGGATTTAGGTAACGACTTGAGTCCATCA
.....

2401 CAATTTTGATTACCTCTTGGTGAGGGTGAGATGTTCCAGCTTCTTTCATCTACTTTCCAA
.....

2461 TTTATAATGCGGAAATACGAAGAGGCTGTGAAGATTAGTTTACTTAATAATAATAAAAAA
.....

2521 ATATTGTATGTATGTATTTTTTTTATGTTAGGAGTATCCATTGATTGTGGAGGAGGCCTTA
.....

2581 AATGCCACTTAACAAGCTCTCCTTTTTTGTAGCCCTTAGAGGTTGGGAGAGTGCTGAAGT
.....

2641 TTTGCAGGTTTTCTTCACTGTGTTTCTCAGGTATGTGAGAGTGTGCTCTAGTTTCACCAA
.....

2701 CTGTAGTCTGCTAATCAGACTTCAGGGACTCCAATGTCTAACACTTGGTAGCTGTGTTAC
.....

2761 AGCTCAACGTTGTAATAGTTCAAATCAATCAAATAAAGTTCTTTATTAATTTTCATTAGC
.....

2821 TT
..

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt ...

- ... Herrn Dr. habil. Loc Phi van (Molekulargenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Tierschutz und Tierhaltung, Celle) für die Möglichkeit, in Ihrer Arbeitsgruppe an einem spannenden Thema promovieren zu dürfen. Ich danke Ihnen für Ihre intensive wissenschaftliche Betreuung als Doktorvater und Ihre Bemühungen um die Finanzierung meiner Arbeit. Zudem danke ich Ihnen für Ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, für Ihr stets offenes Ohr, wenn ich Fragen hatte, die vielen fruchtbaren Gespräche und nicht zuletzt für die schöne Zeit!
- ... Herrn Prof. Dr. Wolf H. Strätling (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) für Ihre Durchsicht und Korrektur meiner Dissertation und dafür, dass Sie mir auch noch nach Ihrer Pensionierung als Gutachter für meine Dissertation zur Verfügung standen.
- ... Frau Prof. Dr. Elke Pratje (Molekulare Biologie der Pflanzen, Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg) dafür, dass Sie sich freundlicherweise dazu bereit erklärt haben, mir als Gutachterin für meine Dissertation zur Verfügung zu stehen.
- ... Herrn Dr. Lars Schrader (Leiter des Instituts für Tierschutz und Tierhaltung, Celle) für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Tierschutz und Tierhaltung in Celle .
- ... Herrn Prof. Dr. Jean-Marie Buerstedde (GSF-Institut für Molekulare Strahlenbiologie, Neuherberg-München) für das zur Verfügung stellen des Plasmids riken1_17f11.
- ... Herrn Prof. Dr. Rolf Knippers (Molekulare Genetik, Universität Konstanz) für das freundliche zur Verfügung stellen eines anti-hORC2-Antikörpers.
- ... meinen klasse Arbeitskolleginnen aus der Molekulargenetik des Instituts für Tierschutz und Tierhaltung in Celle für die angenehme, warmherzige und gesellige Wohlgefühl-Arbeitsatmosphäre, die ich vom ersten bis zum letzten Tag miterleben durfte: Ich danke Dir Angela, Doris (schade, dass du nicht mehr da bist), Jutta, Katrin, Marlis und Tanja für Eure Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung. Ich danke Euch für

die zahlreichen witzigen, tiefgründigen, persönlichen, intelligenten, freundlichen, enthusiastischen, verständnisvollen, informationsreichen, ernsthaften und weniger ernsthaften Gespräche, die ich mit Euch in den letzten Jahren führen konnte. Es war eine richtig tolle Zeit mit Euch!

- ... nochmals und ganz besonders Katrin Zimmermann aus der Molekulargenetik für Deine große und geduldige Hilfe, insbesondere während meiner Anfangszeit. Danke, dass Du mir die vielen Methoden beigebracht und meine unzähligen, manchmal doofen Fragen beantwortet hast. Vielen Dank, dass Du Dein großes Wissen und Deine jahrelange Erfahrung in den vielen praktischen Fragen des Laboralltags und Experimentierens an mich weitergegeben hast.
- ... meinen anderen KollegInnen des „Laborgebäudes“ aus der Tierphysiologie und Analytik in Celle, die Ihr ebenfalls alle zu einer für mich angenehmen und gerne zurückdenkenswürdigen Doktorandenzeit im Institut beigetragen habt: Danke Elke, Erika, Kalle (der Hahn im Korb), Mieke, Silke und Steffi!
- ... Lars für seinen IT-Support. Du hast mich, wieder einmal, durch das Paralleluniversum namens Computersoftware mit der Satzsystem-Galaxie LATEX und den Planeten Kile, Gimp und xfig manövriert. Danke, dass Du meinen ollen PC mit der richtigen Weichware ausgerüstet, ihn am Laufen gehalten und mich auch sonst bestens in allen computertechnischen Fragen beraten hast. Insbesondere Danke ich Dir für Deine verlässliche Hilfe während des Beinahe-Super-GAU's am Ende dieser Arbeit und das, obwohl Du eigentlich nicht eine Sekunde Zeit dafür gehabt hättest.
- ... Benita für das Korrigieren und Redigieren der Einleitung. Du hast Dich neben Mann und Kind durch die Einleitung dieser Arbeit gequält und so manche schreibtechnische Verirrung meinerseits ausgebügelt.
- ... Frank für die professionellen Ratschläge bezüglich mancher Formulierungen. Danke für deine Hilfe und deine Meinung.
- ... schließlich noch meinen Eltern für Eure ausdauernde moralische, verständnisvolle, praktische, unterschlupfgewährende und vor allem finanzielle Unterstützung, insbesondere am Ende der Arbeit. Ohne Euch wäre diese Arbeit nur unter stark erschwerten Bedingungen durchführbar gewesen.