

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**Identifizierung von neuen Replikationsursprüngen  
in humanen Zellen**

vorgelegt von  
**Jeannine Gerhardt**

München im Februar 2005

Dissertation eingereicht am: 28.02.2005  
1. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Eick  
2. Gutachter: PD Dr. Daniele Zink  
Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2005

Bisherige Veröffentlichungen und Präsentationen:

Gerhardt, J., Spindler, M.-P., Ott, E., and Schepers, A. (2005) Identification of new human origins of DNA replication with ARS-activity by an origin-trapping assay. (eingereicht)

Ritzi, M., Tillack, K., Gerhardt, J., Ott, E., Humme, S., Kremmer, E., Hammerschmidt, W. and Schepers, A. (2003) Complex Protein-DNA Dynamics at the Latent Origin of DNA Replication of Epstein-Barr Virus. *J. Cell Sci.*, **116**, 3971-3984.

Identification of new origin of DNA replication, Gerhardt, J., Spindler, M.-P., Ott, E., and Schepers, A. Posterpräsentation auf dem „DNA Replication and Genome Integrity Congress“ am Salk Institute in San Diego im August 2004

Identifizierung von neuen Replikationsursprüngen in humanen Zellen. Seminar am Lehrstuhl für Molekulare Genetik an der Fakultät für Biologie der Universität Konstanz unter der Leitung von Prof. Dr. Rolf Knippers im Juli 2004

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
I. Einleitung .....	1
1    DNA-Replikation.....	1
1.1    Das Replikon-Modell .....	2
1.2    Der ARS-Assay .....	3
2    Initiation der Replikation in Eukaryoten.....	5
2.1    Die Proteinkomponenten des Initiationskomplexes.....	5
2.2    Aufbau der eukaryotischen Replikationsursprünge .....	7
3    Die Replikationsursprünge in Säugetierzellen .....	9
3.1    Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von Replikationsursprüngen....	10
3.2    Die humanen Replikationsursprünge .....	11
4    Das Epstein-Barr Virus .....	14
4.1    Das EBV nukleäre Antigen 1 (EBNA1) .....	15
4.2    Der latente EBV-Replikationsursprung <i>oriP</i> .....	16
5    Episomal replizierende Systeme.....	18
6    Zielsetzung .....	20
II. Material .....	21
1    Bakterien .....	21
2    Zelllinien .....	21
3    Antikörper .....	22
4    Plasmide .....	22
5    Oligonukleotide .....	26
6    Chemikalien, Reagenzien, Geräte und Sonstiges.....	29
III. Methoden .....	31
1    Arbeiten mit Bakterien.....	31
1.1    Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien.....	31
1.2    Transformation und Elektroporation von <i>E. coli</i> .....	31
2    Arbeiten mit Zellen.....	32
2.1    Einfrieren, Auftauen und Aufbewahrung von Zellen .....	32

2.2	Transfektion von Zellen und Selektion der Zellen mit einem Selektionsmarker .....	33
3	Arbeiten mit DNA .....	33
3.1	Präparative Plasmidreinigung.....	34
3.2	„head to tail“-Klonierung (Kopf-an-Schwanz).....	34
3.3	Polymerase-Kettenreaktion .....	34
3.4	Quantitative „real time“-PCR.....	35
3.5	HIRT-Extrakte .....	38
3.6	Plasmid-Wiedergewinnungs-Analysen („plasmid rescue“) .....	38
3.7	Southern-Blot.....	39
3.8	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden für Southern-Blots .....	39
3.9	Analyse der naszierenden DNA.....	40
4	Arbeiten mit Proteinen.....	41
4.1	Western-Blot-Analyse.....	41
4.2	ChIP im plasmidalen Kontext.....	42
4.3	Klonierung der ChIP-Fragmente .....	43
4.4	ChIP im chromosomalen Kontext.....	43
IV.	Ergebnisse.....	45
	Etablierung des transienten Replikationsassays in humanen Zellen.....	46
1.1	Herstellung und Analyse der verschiedenen <i>oriP</i> - und LaminB2-Origin-Konstrukte .....	46
1.2	Herstellung und Analyse der Konstrukte LB <sub>M</sub> und p3407 zur Bestätigung der Funktionalität des Replikationsassays .....	51
2	Der „origin trapping“-Assay .....	52
2.1	Anreicherung der humanen Orc2-bindenden DNA-Sequenzen .....	53
2.2	Untersuchung der Orc2-bindenden Sequenzen im Replikationsassay.....	54
3	Bestätigung der im „origin trapping“-Assay isolierten DNA-Sequenzen als Replikationsursprünge .....	59
3.1	Analyse der replizierenden Sequenzen mit der „nascent strand“-Methode .....	59
3.2	Untersuchung der replizierenden DNA-Sequenzen mittels ChIP im chromosomalen Kontext .....	62
4	Untersuchung der potentiellen Replikationsursprünge.....	65
4.1	Analyse der Replikationsfähigkeit der neuen humanen Replikationsursprünge ..	65

4.2	Untersuchung der neuen potentiellen Replikationsursprünge mittels ChIP im plasmidalen Kontext .....	67
4.3	Auswertung des Replikationsassays der potentiellen Replikationsursprünge nach sechs Wochen .....	70
5	Nähere Untersuchung des Replikationsursprunges Or6 .....	72
5.1	Analyse von Or6-Multimeren.....	72
5.2	Analyse von Or6-Mutanten .....	74
V. Diskussion.....		78
1	Initiation der Replikation in humanen Zellen .....	78
2	Der „origin trapping“-Assay, eine neue Methode zur Identifizierung von Replikationsursprüngen .....	79
2.1	Funktionalität des Replikationsassays .....	79
2.2	Einfluss der Transkription auf die Replikation.....	82
2.3	Analyse von ChIP-Sequenzen im Replikationsassay .....	85
2.4	Vergleich des „origin trapping“-Assays mit anderen Methoden zur Identifizierung von Replikationsursprüngen .....	86
3	Bestätigung von Or6 als neuen humanen Replikationsursprung.....	87
3.1	Untersuchungen der Or6-Sequenz im Replikationsassay .....	87
3.2	Untersuchungen der Or6-Region im genomischen Kontext .....	88
3.3	Die Sequenzmotive der Or6-Sequenz .....	89
4	Die neu identifizierten Replikationsursprünge im chromsomalen Kontext.....	90
VI. Zusammenfassung.....		96
Literatur .....		98
Anhang .....		113
Danksagung .....		115

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ARS	autonom replizierende Sequenzen
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
c-myc	zelluläres Myc
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	radioaktive Zerfälle („disintegrations“) pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Epstein-Barr Virus
FKS	fötales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierende Protein
h	Stunden
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
HRP	gekoppelte Meerrettich-Peroxidase
Hyg	Hygromyzin
IS	Initiationsstelle
Kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LB2	LaminB2-Origin
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
MAR	„matrix attachment region“
min	Minuten
NLS	nukleäres Lokalisations-Signal
ORC	„origin recognition complex“

<i>OriP</i>	latenter EBV-Replikationsursprung
<i>OriLyt</i>	lytische EBV-Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pre-RC	Prä-Replikationskomplex
RIP	Startstelle der Replikation („replication intiation point“)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S.cer.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SIDD	„supercoiled-induced DNA duplex destabilized structure“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
TEMED	N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Units (enzymatische Aktivitätseinheit)
UV	ultraviolett
V	Volt



# I. Einleitung

## 1 DNA-Replikation

Während der Zellteilung wird die genetische Information von einer Zellgeneration zur nächsten weitergegeben. Die molekulare Grundlage dieses Prozesses ist die DNA-Replikation. Diese erfolgt einmal pro Zellzyklus und gewährleistet die präzise Duplikation des Genoms. Die DNA-Replikation umfasst die folgenden Abläufe: die Initiation der Replikation, die Elongation der neuen DNA-Stränge und die Termination der DNA-Synthese. Diese Prozesse sind sehr komplex und in der Evolution hochkonserviert.

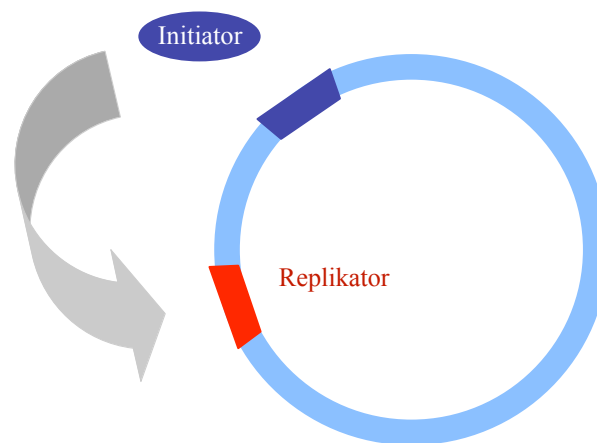
Die vorliegende Arbeit befasst sich vorwiegend mit der Initiation der DNA-Replikation. Die Regulation der Initiation erfolgt an den Startstellen der Replikation, den sogenannten Replikationsursprüngen oder Origins (Knippers, 1995). Diese sind in Bakterien, Viren und einfachen Eukaryoten wie *Saccharomyces cerevisiae* gut beschrieben. In höheren Eukaryoten sind bisher nur wenige Replikationsursprünge bekannt. Es wurden noch keinerlei gemeinsame Sequenzmotive oder Strukturen in diesen Replikationsursprüngen identifiziert. Daher wird zurzeit kontrovers diskutiert, ob es überhaupt sequenzspezifische Replikationsursprünge gibt oder ob bestimmte epigenetische Strukturen zur Initiation der Replikation in höheren Eukaryoten führen (Aladjem and Fanning, 2004; Gilbert, 2004). Der Hauptgrund, weshalb bis heute nur wenige humane Replikationsursprünge identifiziert wurden, liegt im Mangel geeigneter Methoden neue Replikationsursprünge zu isolieren (Todorovic et al., 1999). Um mehr Einblick in diesen Sachverhalt zu bekommen, wurde in dieser Arbeit eine funktionelle Methode zur Identifizierung neuer humaner Replikationsursprünge mit Hilfe des latenten Replikationsursprunges *oriP* des Epstein-Barr Virus (EBV) entwickelt.

Zur Einführung wird die Initiation der Replikation in den verschiedenen Spezies besprochen. Besonders erläutert werden die Replikationsursprünge sowie die Methoden,

mit denen diese isoliert wurden. Am Schluß der Einleitung erfolgt eine kurze Darstellung des Epstein-Barr Virus und seines latenten Replikationsursprunges *oriP*.

## 1.1 Das Replikon-Modell

1963 schlugen Jacob und Brenner das Replikon-Modell zur Regulation der Initiation der DNA-Replikation in *Escherichia coli* vor (Jacob et al., 1963). Nach diesem Modell wird ein spezifisches DNA-Element, der Replikator, von einem Protein, dem Initiator, erkannt und gebunden (Abb. 1). Der Initiator rekrutiert weitere Proteine zu diesem DNA-Abschnitt und leitet hiermit die DNA-Replikation ein. Nach dem Aufschmelzen der DNA am Replikator erfolgt die bidirektionale Synthese der Tochter-DNA-Stränge. DNA-Abschnitte, die von einem Origin aus repliziert werden, bezeichnet man als Replikon. Dieses Modell beschreibt zutreffend die Initiation der DNA-Replikation in Bakterien und Viren. Später wurde dieses Modell für die Initiation der Replikation in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erweitert.



### Abb. 1: Das Replikon-Modell von Jakob und Brenner:

Nach diesem Modell, welches für Prokaryoten entwickelt wurde, gibt es zwei spezifische genetische Elemente. Ein Gen kodiert für den Initiator. Dieses Protein bindet an eine spezifische DNA-Sequenz, den Replikator, und rekrutiert daraufhin weitere Faktoren des Initiationskomplexes zu dieser DNA-Sequenz, welche die Replikation einleiten.

Der Replikator von *E. coli* ist die 240 bp lange *oriC*-Sequenz. *OriC* enthält 9 bzw. 13 bp lange repetitive DNA-Fragmente, die in verschiedenen Bakterienarten konserviert sind (Fuller et al., 1984). Das Initiatorprotein DnaA bindet an den Replikationsursprung *oriC*, und initiiert die DNA-Replikation.

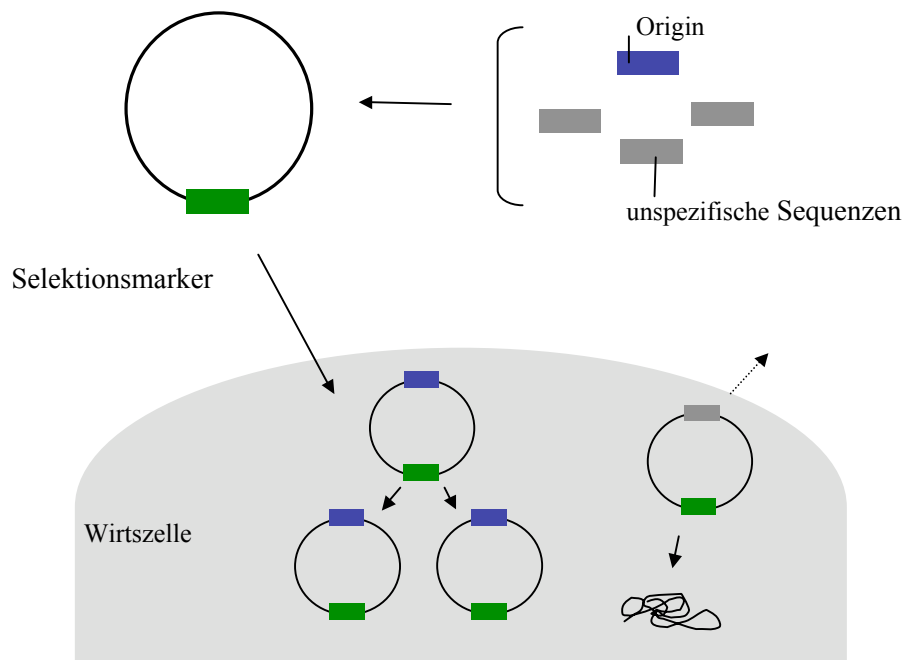
In einigen Viren verläuft die Initiation der Replikation ebenfalls nach dem Replikon-Modell. Das bekannteste Beispiel hierfür ist das SV40-Virus (Dean et al., 1987). Die Einleitung der Replikation am SV40-Origin erfolgt dort durch die Bindung des T-Antigens, eines vom Virus kodierten sequenzspezifischen Proteins.

In der Hefe *S. cerevisiae* dienen die „autonomously replicating sequences“ (ARS) als Replikatoren. ARS wurden in der Hefezelle als extrachromosomal replizierende Sequenzen isoliert. Diese Sequenzen enthalten ein gemeinsames Konsensusmotiv (siehe dazu I.2.2). An den ARS-Elementen bildet sich der Prä-Replikationskomplex („pre-replicative complex“; pre-RC) aus, welcher als Initiator fungiert und zur Initiation der Replikation führt (Stillman, 1996). Im Gegensatz zu den Initiatoren in Bakterien und Viren ist der Prä-Replikationskomplex in der Hefe *S. cerevisiae* ein dynamisch regulierter Komplex. Es ist allgemein bekannt, dass die Prozesse und die daran beteiligten Proteine, umso vielfältiger und komplizierter werden, je komplexer ein Organismus ist. Zu den Proteinen des pre-RC in Hefezellen gibt es analoge Proteine in Säugetierzellen. Die Initiation der Replikation in Metazoen ähnelt der in Hefe. Daher wird zurzeit der Ablauf der Replikationsinitiation in *S. cerevisiae* als Modell zur Analyse dieses Prozesses in höheren Eukaryoten herangezogen (siehe I.2.1).

## 1.2 Der ARS-Assay

In Bakterien und der Hefe *S. cerevisiae* konnten die Replikationsursprünge durch den sogenannten ARS-Assay identifiziert werden (Struhl et al., 1979; Yasuda and Hirota, 1977). Mit dieser Methode kann man replizierende DNA-Sequenzen von nicht replizierenden Fragmenten unterscheiden. Das Prinzip des ARS-Assays ist in Abbildung 2 dargestellt. Im ARS-Assay werden die zu untersuchenden Sequenzen in ein Plasmid mit einem Selektionsmarker kloniert. In der Hefe *S. cerevisiae* enthalten die Plasmide, auch Minichromosomen genannt, zusätzlich ein Centromer-motiv zur gerichteten Segregation

der DNA (Clarke and Carbon, 1980). Anschließend werden diese Plasmide mit den zu untersuchenden genomischen Sequenzen in Zellen transfiziert. Dabei stellen die Wirtszellen die zur Replikation benötigten Proteine zur Verfügung. Die Zellen werden mehrere Tage unter Selektion gehalten. Danach erfolgt die Analyse der Plasmide auf ihre Extrachromosomalität. Entweder replizieren die Plasmide auf Grund der eingefügten Sequenzen und bleiben so extrachromosomal erhalten oder die auf dem Plasmid befindlichen genomischen DNA-Sequenzen unterstützen die Replikation nicht. Diese Plasmide werden ins Genom integriert oder gehen verloren (Stinchcomb et al., 1979).



**Abb. 2: Schema des ARS („autonomously replicating sequences“-Assays:**

Die genomische DNA wird in Fragmente zerkleinert und anschließend in ein Plasmid mit Selektionsmarker (grüne Box) kloniert. Diese Plasmide mit den genomischen Sequenzen werden in Zellen, welche die benötigten Replikationsproteine enthalten, transfiziert. Nach mehreren Tagen unter Selektion wird die DNA der Zellen isoliert und analysiert. Die Plasmide mit einem Replikationsursprung (blaue Box) replizieren in den Zellen und können in der isolierten DNA der Zelle detektiert werden. Die Plasmide mit DNA-Sequenzen, die nicht als Replikatoren fungieren (graue Boxen), werden in das Genom integriert oder gehen verloren.

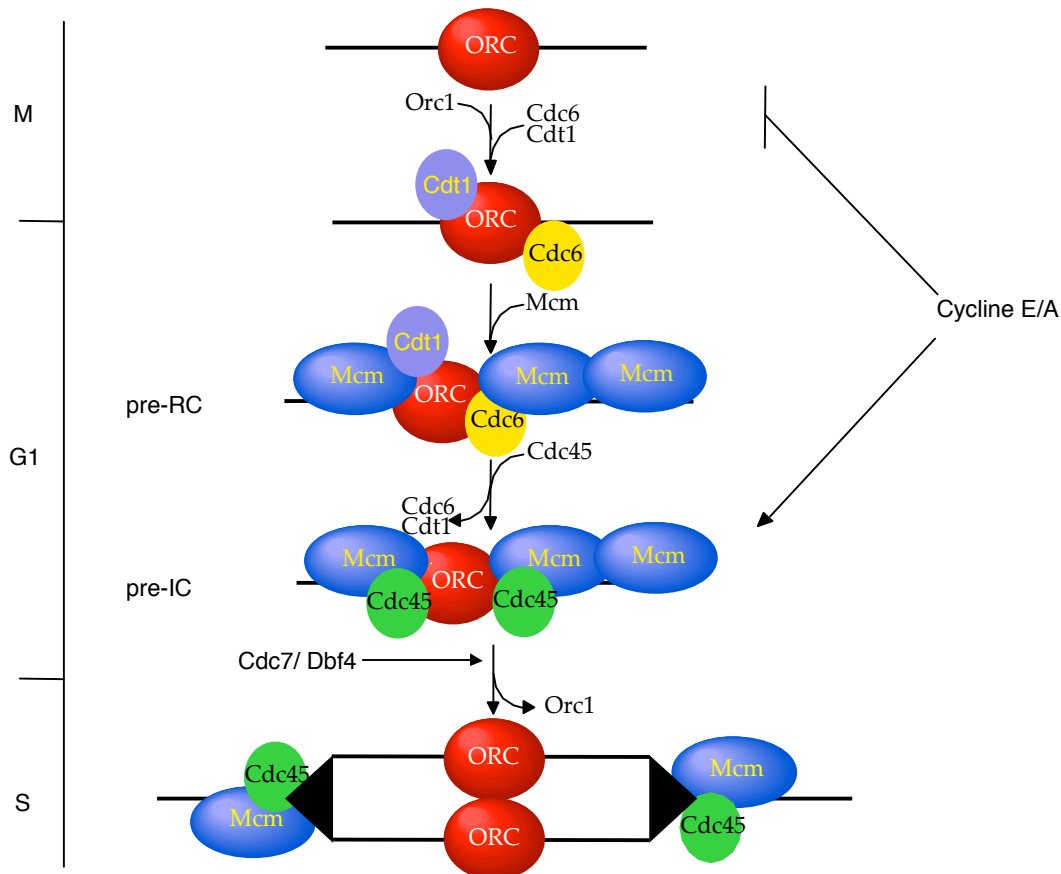
## 2 Initiation der Replikation in Eukaryoten

### 2.1 Die Proteinkomponenten des Initiationskomplexes

Die Einleitung der Replikation in höheren Eukaryoten erfolgt ebenso wie in der Hefe *S. cerevisiae* (Diffley et al., 1994) in zwei Schritten (siehe Abb. 3). Im ersten Schritt bildet sich in der späten M-Phase und der frühen G1-Phase an den Replikationsursprüngen der Prä-Replikationskomplex aus (DePamphilis, 2005). Ein Teil des pre-RC ist der „origin recognition complex“ (ORC). ORC besteht aus einer Gruppe von sechs Proteinen (Orc1-6), der ATP-abhängig an das Chromatin bindet (Dhar et al., 2001; Kreitz et al., 2001; Natale et al., 2000; Tatsumi et al., 2000; Vashee et al., 2001). Die Untereinheiten Orc2-5 bleiben über den gesamten Zellzyklus hinweg an die DNA gebunden, während das Orc1 in der S-Phase den Initiationskomplex verlässt (Li and DePamphilis, 2002; Ritzi et al., 2003; Schaarschmidt et al., 2002). In der Hefe *S. cerevisiae* bleibt der ganze ORC-Komplex an die DNA gebunden (Lee and Bell, 1997). ORC dient als Landeplattform für die Proteine Cdc6 (Mendez and Stillman, 2000; Perkins and Diffley, 1998; Saha et al., 1998) und Cdt1 (Maiorano et al., 2000). Diese beiden Proteine werden unabhängig voneinander zur DNA rekrutiert und laden wiederum gemeinsam den MCM („minichrosome maintenance“-Komplex auf das Chromatin (Mendez and Stillman, 2000). Der aus sechs Komponenten bestehende MCM-Komplex (Mcm2-7) dient im pre-RC vermutlich als Helikase (Labib and Diffley, 2001; Takisawa et al., 2000). Beim Übergang in die S-Phase erfolgt die CyclinA/CDK2-abhängige Phosphorylierung des Cdc6. Ein Teil der Cdc6-Proteine wird daraufhin aus dem Zellkern ins Zytoplasma exportiert (Petersen et al., 1999; Saha et al., 1998), während der andere Teil von Cdc6 an die DNA gebunden bleibt (Saha et al., 1998). In Säugetierzellen inhibiert Geminin die Funktion des Cdt1 (Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000). Im Gegensatz dazu wird in der Hefe *S. cerevisiae* Cdt1 vollständig aus dem Kern geschleust (Tanaka et al., 1997). Durch die Inhibierung des Cdt1 und das Ausschleusen des Cdc6-Proteins aus dem Kern wird eine erneute Initiation der Replikation verhindert.

Der Einfluss von CyclinE/CDK2 („cyclin-dependent kinase“) und der Kinase DDK (Cdc7/Dbf4) führt beim Übergang von der G1-Phase in die S-Phase zu einem Konformationswechsel im pre-RC. Daraufhin erfolgt die Rekrutierung des Proteins Cdc45 (Mimura and Takisawa, 1998) zum entstehenden Prä-Initiationskomplex („pre-initiation complex; pre-IC). Das Protein Mcm10 soll bei der Ladung des Cdc45-Proteins zum

Replikationsursprung ebenfalls beteiligt sein (Wohlschlegel et al., 2002). Des Weiteren ruft die DDK-Kinase einen Konformationswechsel in den Mcm-Proteinen hervor, welches zur Aufschmelzung des Origin-Bereiches führt (Geraghty et al., 2000; Takisawa et al., 2000).



### Abb. 3: Mechanismus der Initiation der DNA-Replikation:

Zuerst bindet der ORC-Komplex an den Replikationsursprung. Dieser rekrutiert die Proteine Cdc6 und Cdt1 unabhängig voneinander an die DNA. Cdc6 und Cdt1 laden gemeinsam den MCM-Komplex auf dem Replikationsursprung. Es entsteht der pre-RC. Durch Einwirkung der Cyclin/CDK's erfolgt eine Konformationsänderung zum Initiation-Komplex (pre-IC), welcher zur Bindung von Cdc45 führt. Dabei wird Cdc6 aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert. Cdc45 wiederum lädt die DNA-Polymerase $\alpha$ /Primase an den Replikationsursprung und die DNA-Synthese beginnt.

Es ist wahrscheinlich die Aufgabe von Cdc45 in *S. cerevisiae* zusammen mit dem GINS-Komplex, den DNA-Polymerase  $\alpha$ /Primase-Komplex auf das Chromatin zu laden

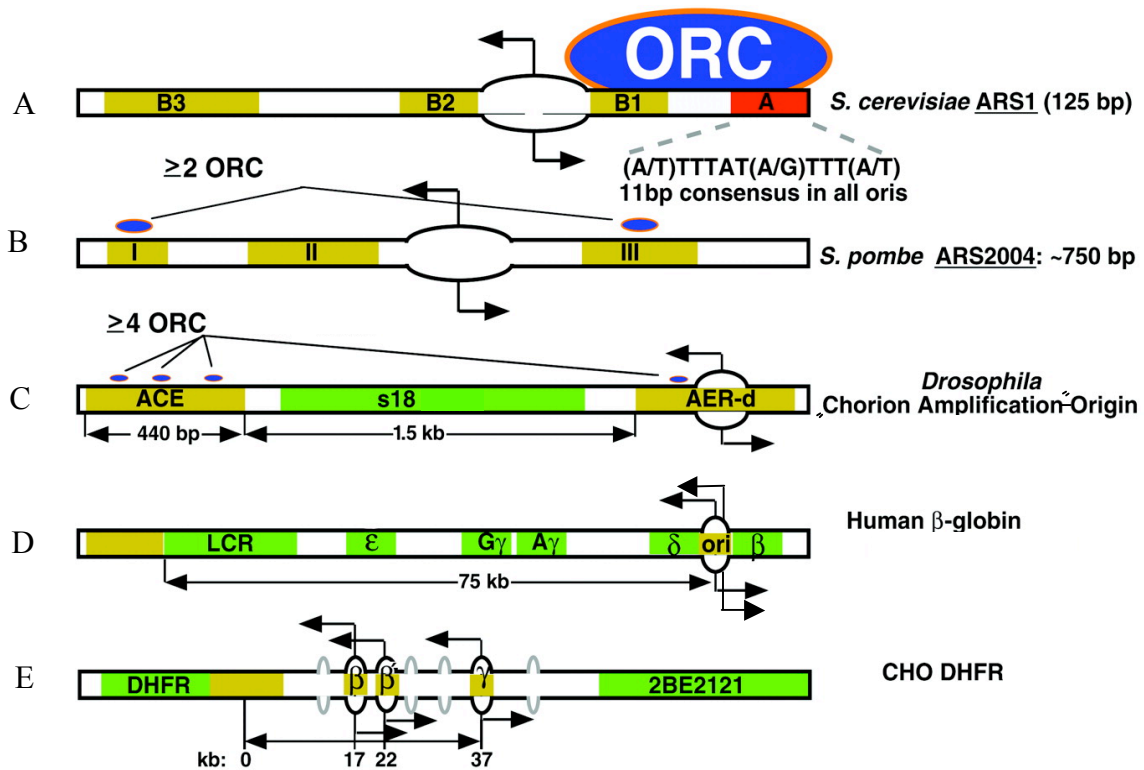
(Kanemaki et al., 2003; Mimura and Takisawa, 1998; Takayama et al., 2003; Walter and Newport, 2000). Es wird vermutet, dass durch diese Proteine in mehrzelligen Eukaryoten ebenfalls die Bindung der DNA-Polymerase  $\alpha$ /Primase-Komplex an die DNA erfolgt. Einzelne Komponenten des GINS-Komplexes wurden in Säugetierzellen bereits identifiziert. Die funktionelle Bestätigung ist derzeit jedoch noch offen (persönliche Mitteilung H. Araki). Die Rekrutierung des DNA-Polymerase  $\alpha$ /Primase-Komplexes und die Aufschmelzung der DNA leitet die DNA-Synthese ein.

## 2.2 Aufbau der eukaryotischen Replikationsursprünge

Die Initiation der eukaryotischen DNA-Replikation erfolgt nicht wie in Bakterien und Viren an einem singulären Origin, sondern an mehreren tausend Replikationsursprüngen. Dies belegen autoradiographische Studien der DNA-Synthese anhand isolierter DNA-Fasern (Gilbert, 2001b; Huberman and Riggs, 1966; Li et al., 2003).

Die ersten eukaryotischen Replikatoren wurden 1979 in der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert, die sogenannten ARS-Elemente (Stinchcomb et al., 1979). Sie bestehen aus zwei DNA-Komponenten, dem A-Element und dem weniger stringent definierten B-Element. Das A-Element enthält die 11 bp lange Konsensussequenz ACS („ARS consensus sequence“) und einige nichtkonservierte Nukleotide (Marahrens and Stillman, 1992; Marahrens and Stillman, 1994; Theis and Newlon, 1994). Das B-Element ist aus verschiedenen Subdomänen aufgebaut. Als Beispiel sind in Abbildung 4 die funktionellen Bereiche von ARS1 dargestellt. ARS1 enthält neben dem A-Element drei funktionelle Motive B1, B2 und B3. Die Subdomäne B1 und das A-Element werden von dem ORC-Komplex gebunden (Bell and Stillman, 1992; Diffley and Stillman, 1992; Lee and Bell, 1997; Rao and Stillman, 1995). Das Element B2 ist ein „DNA unwinding element“ (DUE), in welchem die initiale Entwindung der DNA stattfindet (Matsumoto and Ishimi, 1994). Andere leicht schmelzbare DNA-Sequenzen können das B2-Element substituieren, so wie dies bei ARS121 durch eine AT-reiche Domäne geschieht (Theis et al., 1999). B3 wird von dem Transkriptionsfaktor und Replikations-Enhancer-Protein Abf1 gebunden (Walker et al., 1990).

In der Hefe *S. pombe* sind die Replikationsursprünge viel größer und bestehen aus mehreren Elementen (siehe Abb. 4B), welche keine gemeinsame Konsensussequenz besitzen. Diese Elemente enthalten asymmetrische AT-reiche Sequenzen. Als Beispiel ist in Abbildung 4 der Replikationsursprung ARS2004 dargestellt. Hier erfolgt die ORC-Bindung an die AT-reichen Sequenzen I und III (Ogawa et al., 1999).



**Abb. 4: Struktur der verschiedenen eukaryotischen Replikationsursprünge (modifiziert nach (Gilbert, 2001a)):**

(A) Die funktionalen Elemente der ARS1-Sequenz (*S. cerevisiae*) sind das A-Element (rot unterlegt) mit der Konsensussequenz ASC und das B-Element. Das B-Element besteht aus drei verschiedenen Teilelementen: B1 ist mit verantwortlich für die Orc-Bindung, B2 ist eine leicht schmelzbare DNA-Region, B3 ist eine Abf1-Bindestelle (gelb). In (B) ist der Origin ARS2004 aus der *S. pombe* mit den AT-reichen, teilweise Orc-bindenden Regionen I-III skizziert. (C) Der „chorion amplification“-Origin aus *Drosophila* besitzt zwei funktionelle Elemente, die ACE („amplification control element“- und die verstärkende AER („amplifikation enhancer region“-) -Region. (D) Der humane  $\beta$ -Globin-Locus enthält einen Replikator mit zwei Replikationsursprüngen. (E) Zwischen dem DHFR-Gen und dem 2BE2121-Gen befindet sich eine 40 kb große Initiationszone, der DHFR-Origin. Die Pfeile stellen die Initiationstellen der Replikation dar.



Über die Replikationsinitiation und die Replikationsursprünge in höheren Eukaryoten weiß man bisher im Gegensatz zu denen in Hefen relativ wenig. Zur Amplifikation der Chorion-Gene in *Drosophila* benötigt man zwei unterschiedliche Sequenzen: die „amplification enhancer region“-Sequenz (AER), welche den Origin enthält, und eine „amplification control element“-Sequenz (ACE), welche 440 Basenpaare lang ist (Gilbert, 2001a). Die Chorion-Gene werden von mehreren AER-Regionen aus repliziert. In Abbildung 4 ist nur der proximale AER-d dargestellt. Hier findet die Initiation der Replikation statt (Lu et al., 2001). Die ACE-Region fördert die Initiation an der AER-Stelle (Carminati et al., 1992). ORC bindet an beide Elemente ACE und AER. Das ACE-Element besitzt mehrere ORC-Bindestellen, welche die Interaktion zwischen dem ORC-Komplex und der Initiationsstelle verstärken (Austin et al., 1999).

### **3 Die Replikationsursprünge in Säugetierzellen**

Säugetierzellen enthalten mehrere tausend Replikationsursprünge, welche ca. 100 kb voneinander entfernt liegen (Huberman and Riggs, 1968). Mit den bislang ca. 25 identifizierten Replikationsursprüngen kennt man nur einen Bruchteil der existierenden Origins in Säugetierzellen, deren Anzahl man auf bis zu 30000 schätzt (Hand, 1978; Vassilev and DePamphilis, 1992).

Man kann die bekannten Replikationsursprünge in zwei Kategorien unterteilen. Zum einen existieren Origins, bei denen eine Startstelle der Replikation innerhalb weniger Basenpaare identifiziert werden konnte. Dazu gehören z.B. der LaminB2-, der HPRT-, der Top1- und der Mcm4-Origin. Zum anderen sind auch Replikationsursprünge bekannt, welche eine 10 bis 50 kb große Initiationszone mit mehreren Initiationspunkten aufweisen. Als Beispiel für diese Kategorie sind die Replikationsursprünge DHFR und c-myc-Origin zu nennen. Einige Replikationsursprünge sind über mehrere Spezies konserviert, wie z.B. der rRNA-Origin, der in humanen Zellen sowie in Maus- und Rattenzellen identifiziert wurde (Gencheva et al., 1996). Bisher limitierte das Fehlen einer funktionellen Analyseverfahren in Säugetierzellen die Identifizierung von weiteren Replikationsursprüngen.

Der am intensivsten untersuchte humane Replikationsursprung liegt am 3'-Ende des DHFR-Gens (Heintz and Hamlin, 1982) (siehe Abb. 4 E). Dieser Replikationsursprung repliziert in der frühen S-Phase und wurde durch unterschiedlichsten Methoden, wie *in vivo* Markierungs-Experimente, 2D- Gelelektrophorese (Dijkwel et al., 1991; Vaughn et al., 1990) und „nascent strand“-Analyse (Dijkwel and Hamlin, 1995) (siehe dazu Punkt I.3.1) analysiert. Innerhalb einer breiten Initiationszone von ca. 55 kb befinden sich mehrere spezifische Startstellen der Replikation (Anachkova and Hamlin, 1989). Zwei Initiationsstellen befinden sich 17 kb (ori $\beta$ ) bzw. 22 kb (ori $\beta$ ') abwärts von dem DHFR-Gen (Kobayashi et al., 1998). Die Initiationsstelle Ori $\gamma$  liegt 37 kb weiter vom 3'-Ende des DHFR-Gens entfernt (Leu and Hamlin, 1989). Ektopische Analysen bestätigten die ori $\beta$ -Sequenz als aktiven Replikationsursprung (Altman and Fanning, 2001; Altman and Fanning, 2004). Durch Mutationen in der ori $\beta$ -Sequenz konnten Elemente identifiziert werden, die die Aktivität dieses Replikationsursprungs beeinflussen. Neben den Startstellen spielen auch regulatorische Elemente im 3'-und 5'-Bereich des DHFR-Gens für die Initiation der Replikation eine Rolle ((Saha et al., 2004), persönliche Mitteilung J. Hamlin, Charlottesville, USA).

### 3.1 Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von Replikationsursprüngen

Zur Identifizierung von humanen Replikationsursprüngen stehen Methoden zur Verfügung, welche das Chromatin auf Startstellen der Replikation untersuchen. Diese können in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt werden (Todorovic et al., 1999). Mit der ersten Methode werden die Replikationsursprünge durch die Isolierung und Markierung von Okazaki-Fragmenten oder des Leitstrangs identifiziert. Diese markierten DNA-Fragmente werden dann als Sonde zur Untersuchung von einzelsträngiger DNA verwendet. Der DHFR-Origin wurde mit dieser Methode näher analysiert (Gilbert et al., 1993). Die zweite Technik beruht auf der Anreicherung naszierender („nascent strand“) DNA in einer bestimmten Region. Zuerst werden die in der Zelle naszierenden einzelsträngigen DNA-Fragmente isoliert und anschließend mittels quantitativer PCR analysiert (Cohen et al., 2002). Mit dieser Methode können die Origins mit einer hohen Auflösung kartiert werden (Abdurashidova et al., 2000). Die naszierende DNA wird dazu mit einer „extension“-PCR untersucht und die entstandenen PCR-Produkte nach ihrer Größe in einem Gel aufgetrennt. Parallel erfolgt die Sequenzierung der PCR-Produkte. Auf diese Weise kann der

sogenannten RIP („replication initiation point“), welcher zwischen dem Leit- und Folgestrang liegt, bestimmt werden (Bielinsky and Gerbi, 2001). Die dritte Technik, die 2D-Gelelektrophorese, untersucht spezifische Strukturen des sich replizierenden Chromatins. Diese Methode beruht auf dem unterschiedlichen Laufverhalten von Replikationsgabeln, Replikationblasen und Terminationstrukturen im 2D-Gel. In der ersten Dimension werden die DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In der zweiten Dimension werden die Replikationsintermediate weiter nach Masse und Form separiert. Im Anschluss erfolgt der Transfer der Fragmente auf eine Membran. Diese wird mit einer Sonde, bestehend aus der zu untersuchenden Region, hybridisiert. Mit der 2D-Gelelektrophorese kann man eine größere DNA-Region nach Replikationsinitiationsstellen untersuchen (Nawotka and Huberman, 1988). Allerdings kann man nicht die genaue Anzahl und die präzise Lokalisation der Replikationsinitiationsstellen mit dieser Technik bestimmen. Da es bisher keine funktionelle Analysemethode gibt, wurde in den letzten Jahren versucht, ektopisch die Replikationsursprünge als Initiationsstellen der Replikation zu bestätigen. Beispiele hierfür sind die Replikationsursprünge LaminB2,  $\beta$ -Globin, c-myc und DHFR (Aladjem and Fanning, 2004). Da der chromosomale Kontext eines Replikators seine Aktivität beeinflussen kann, sind diese ektopischen Studien schwierig zu interpretieren. Unterschiedlich große Konstrukte müssen an eine replikationsinaktive Stelle im Genom transferiert werden. Diese Stelle darf ihrerseits wiederum die Replikationsinitiation des Replikators nicht beeinflussen. Es wurden etliche Strategien entwickelt, um solchen Positionseffekten bei der ektopischen Analyse zu entkommen. Derzeit wird eine chromosomale Region zwischen zwei Insulatoren als Zielregion verwendet (Lu et al., 2001).

### **3.2 Die humanen Replikationsursprünge**

Bisher sind nur wenige humane Replikationsursprünge bekannt. Diese Replikationsursprünge sind AT-reich, weisen aber keine gemeinsamen DNA-Sequenzmotive auf (Todorovic et al., 1999). Alle bisher bekannten humanen Replikationsursprünge sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. Einige der Replikationsursprünge werden in dem folgenden Abschnitt näher beschrieben.

Replikationsursprung	Initiationsstelle (IS)	Referenzen
$\beta$ -globin	zwei IS zw. $\delta$ - und $\beta$ -globin-Gen	(Aladjem et al., 1998) (Kitsberg et al., 1993)
LaminB2	am 5' Ende des <i>LaminB2</i> -Gens eine IS	(Giacca et al., 1994) (Abdurashidova et al., 2000)
HSP70	eine IS im Promotorbereich des <i>HSP70</i> -Gens	(Taira et al., 1994)
c-myc	IS liegt innerhalb eines Bereich vor dem <i>c-myc</i> -Gen	(Vassilev and Johnson, 1990) (Waltz et al., 1996)
Top1	eine IS im Promotorbereich des <i>Top1</i> -Gens	(Keller et al., 2002)
Mcm4	eine IS zw. dem <i>PRKDC</i> und dem <i>Mcm4</i> -Gen	(Ladenburger et al., 2002) (Schaarschmidt et al., 2002)
rRNA	mehrere IS in einem Bereich vor der Transkriptionsstartstelle	(Gencheva et al., 1996; Little et al., 1993; Yoon et al., 1995)
DNA-Methyltransferase	IS im <i>DNA-Methyltransferase</i> -Gen	(Araujo et al., 1999)
HPRT	IS liegt innerhalb des <i>HPRT</i> -Gens in der Nähe des 5'-Ende	(Cohen et al., 2002)

### **Tabelle 1: Die derzeit bekannten humanen Replikationsursprünge:**

Die Origins sind unter ihren Namen in der ersten Spalte aufgelistet. Die identifizierten Initiationsstellen der Replikation sind in der zweiten Spalte aufgeführt. In der dritten Spalte werden die entsprechenden Literaturangaben genannt.

#### $\beta$ -Globin-Origin

Der Replikationsursprung überspannt den Promotorbereich, sowie den codierenden Bereich bis zum zweiten Intron des  $\beta$ -Globin-Gens. Mutationen in dieser Sequenz inhibieren die Einleitung der Replikation an dieser Stelle (Aladjem et al., 1995; Cimbora et al., 2000). Ein acht kb langes Fragment des  $\beta$ -Globin-Origin wurde durch ektopische Analysen als Replikationsursprung bestätigt (Aladjem et al., 1998). Vor kurzem wurde entdeckt, dass der  $\beta$ -Globin-Origin aus zwei nicht überlappenden, voneinander unabhängigen Initiationsstellen der Replikation (Rep-P und Rep-I) besteht (Wang et al., 2004).

### *c-myc*-Origin

Der *c-myc*-Origin liegt im flankierenden 5'-Bereich des humanen *c-myc*-Gens (Waltz et al., 1996). Die Initiation der Replikation erfolgt in einer Zone mit mehreren Startstellen. Ektopische Analysen bestätigen den *c-myc*-Origin als funktionellen Replikationsursprung (Malott and Leffak, 1999). Der *c-myc*-Origin überlappt mit den Promotoren P<sub>0</sub> und P<sub>1</sub> des Gens und enthält somit viele Transkriptionsfaktorbindestellen sowie eine DUE-Region (Michelotti et al., 1996).

### LaminB2-Origin

Ein weiterer gut beschriebener Replikationsursprung ist der LaminB2-Origin. Er liegt am 3'-Ende des LaminB2-Gens und wurde aus einem Pool von naszierender DNA isoliert (Tribioli et al., 1987). Die Initiationsstelle dieses Origins ist auf ein Nukleotid genau bestimmt worden (Abdurashidova et al., 2000). Der LaminB2-Origin ist in allen bisher getesteten Zellen aktiv (Kumar et al., 1996). *In vivo*-Footprint-Analysen zeigen eine starke Protein-DNA-Wechselwirkung, welche nur in proliferierenden Zellen vorhanden ist (Dimitrova et al., 1996). Die Anreicherung von ORC an den Replikationsursprung wurde mit der Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) nachgewiesen (Abdurashidova et al., 2003). Ektopische Analysen ergaben, dass der LaminB2-Replikator an einer anderen Stelle im Genom die Replikation ebenso aktiv initiiert (Paixao et al., 2004).

### Mcm4- und Top1-Origin

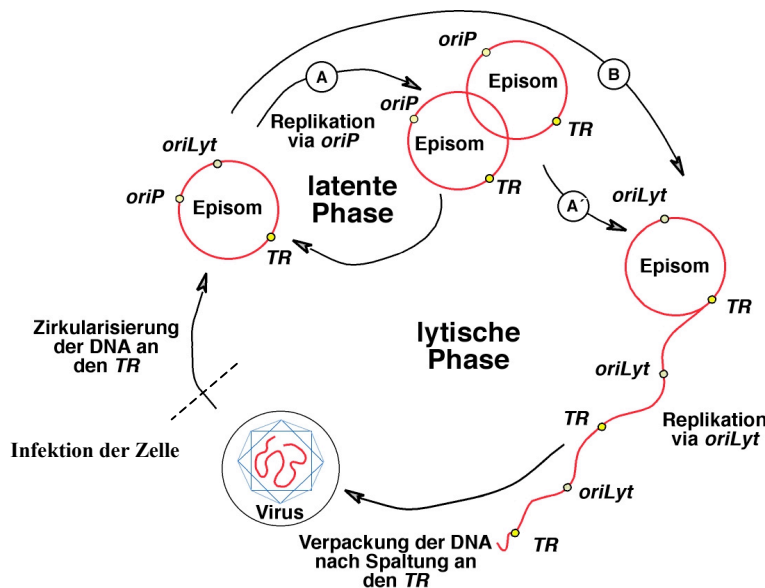
Der Mcm4-Origin liegt zwischen den zwei Promotoren des PRKDC- und des Mcm4-Gens. Der Top1-Origin ist im Promotorbereich des *top1*-Gens lokalisiert. Beide Replikationsursprünge wurde mittels der ChIP isoliert und durch „nascent strand“-Analyse und ChIP auf dem Chromatin als Startstelle der Replikation bestätigt (Ladenburger et al., 2002; Schaarschmidt et al., 2002).

### HPRT-Origin

1988 wurde ein humanes Fragment entdeckt, welches als ARS-Sequenz in Hefe repliziert (Sykes et al., 1988). Diese Sequenz liegt im ersten Exon des HPRT-Gens und wurde durch Analyse von naszierender DNA als Replikationsursprung bestätigt (Cohen et al., 2002).

## 4 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus (EBV) ist ein  $\gamma$ -Herpesvirus, welches hauptsächlich B-Zellen, aber auch Epithelzellen des Menschen infiziert (Rickinson and Kieff, 2001). Die Primärinfektion findet über Speichelkontakt im Epithel des Mundrachenraums statt. Mehr als 95 % der Bevölkerung weltweit sind mit diesem Virus infiziert. Gewöhnlich verläuft die Infektion im frühen Kindesalter asymptomatisch. Im Jugend- und Erwachsenenalter wird die Erst-Infektion häufig durch eine lymphoproliferative Erkrankung begleitet. Das EBV verhält sich in der Regel wie ein harmloser Parasit. Dieser Virus wird allerdings auch mit einigen Tumor-Erkrankungen wie dem Hodgkin-Lymphom, dem T-Zell-Lymphom, sowie dem Nasopharynx-Karzinom und dem Magen-Karzinom assoziiert (Baumforth et al., 1999; Epstein et al., 1978). Das Epstein-Barr Virus hat einen dualen Lebenszyklus mit einer lytischen und latenten Phase (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001), welcher in Abbildung 5 dargestellt ist.



**Abb. 5: Der duale Lebenszyklus des Epstein-Barr Virus:**

Nach der Infektion der Zellen zirkularisiert das lineare Genom des EBV und bleibt als Episom im Kern der Wirtszelle bestehen (Weg A). Durch Induktion geht das Virus in den lytischen Lebenszyklus über (Weg B). Die Replikation des Plasmides in der latenten Phase beginnt am Replikationsursprung *oriP*. In der lytischen Phase erfolgt die Replikation des EBV-Genoms vom Replikationsursprung *oriLyt* aus. Es entstehen lineare, doppelsträngige EBV-Genome, welche in Viruspartikel verpackt werden.

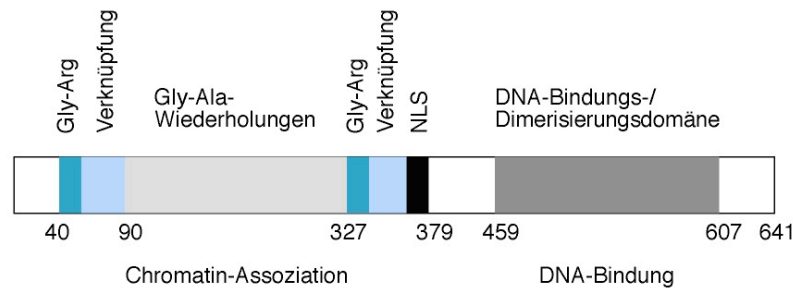
Nach der Infektion schließt sich das lineare, doppelsträngige EBV-Genom im Zellkern zu einer zirkularisierten DNA (Hurley and Thorley-Lawson, 1988). Aus der latenten Phase kann das Virus durch Induktion mit dem viralen Transaktivator BZLF1 in die lytische Phase übergehen (Lieberman et al., 1990). In der lytischen Phase erfolgt die DNA-Synthese von dem Replikationsursprung *oriLyt* aus. Die hierbei entstehenden linearen Virusgenome werden in Viruskapside verpackt. Anschließend wird die Wirtszelle lysiert und die Viruspartikel werden freigesetzt (Thorley-Lawson, 2001).

In der latenten Phase des Lebenszyklus bleibt das EBV-Genom als Episom in der Zelle erhalten und wird an die Tochterzellen weitergegeben. Die latente Replikation des EBV-Episoms erfolgt vom Replikationsursprung *oriP* aus. Zur Replikation wird das virale Protein EBNA1 benötigt, welches an *oriP* bindet. Dies ist die Voraussetzung für die spezifische Replikation des Virusgenoms via *oriP*.

#### 4.1 Das EBV nukleäre Antigen 1 (EBNA1)

Das EBNA1-Protein aktiviert zusammen mit EBNA2 die Transkription ihrer eigenen und weiterer latenter EBV-Gene, wie EBNA-LP, EBNA3A, -3B und -3C (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001). Die Bindung von EBNA1 an den Replikationsursprung *oriP* wird durch die C-terminale Dimerisierungs- und DNA-Bindungs-Domäne vermittelt (Abb. 6). Die Struktur dieser Domäne ist mittels Kristallisation aufgeklärt worden (Bochkarev et al., 1996; Bochkarev et al., 1995). EBNA1 bindet als Dimer an den Replikationsursprung *oriP* (Rawlins et al., 1985). Der N-Terminus von EBNA1 besteht aus Wiederholungen des Glycin-Glycin-Alanin Motives und aus zwei stark basischen Arginin-reichen Verknüpfungsdomänen. Für die Replikation und die Erhaltung des Virus sowie für die transkriptionelle Aktivierung der viralen Gene spielen die Arginin-reichen Verknüpfungsdomänen eine entscheidende Rolle (Kapoor and Frappier, 2003; Leight and Sugden, 2000; Mackey and Sugden, 1999; Marechal et al., 1999; Yates, 1996). Im Gegensatz dazu können die Gly-Ala-Wiederholungen deletiert werden, ohne die Funktion von EBNA1 zu beeinflussen (Lee et al., 1999; Yates et al., 1985). Über den N-Terminus interagiert EBNA1 mit der Wirts-DNA und koppelt so das EBV-Episom über *oriP* an die genomische DNA. Während der Zellteilung bleibt das EBV-Genom mit den Metaphase-

Chromosomen verhaftet und gewährleistet so die gleichmäßige Segregation des Virusgenoms (Aiyar et al., 1998; Leight and Sugden, 2000).



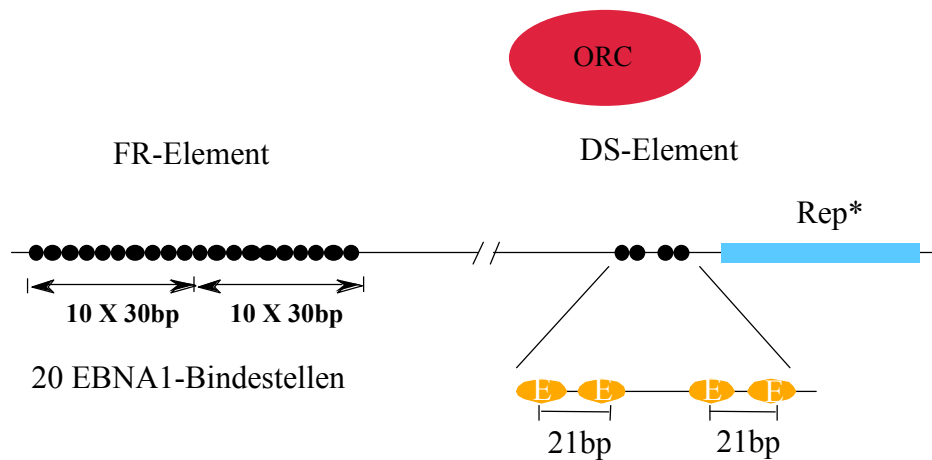
### Abb. 6: Struktur des viralen Proteins EBNA1:

Der C-Terminus von EBNA1 enthält die Dimerisierungs- und DNA-Bindungs-Domäne, welche spezifisch an den Replikationsursprung *oriP* bindet (dunkelgrauer Abschnitt). Die N-terminale Transaktivierungsdomäne besteht aus zwei Arginin-reichen Verknüpfungsdomänen, die bei der Transkriptionsaktivierung, der Replikation und bei der Erhaltung des EBV-Episoms in der Zelle eine Rolle spielen (blauer Abschnitt). Die Glycin-Arginin-reichen Domänen sind durch lange, jedoch nicht essentielle Gly-Ala-Wiederholungen unterbrochen (grauer Abschnitt). EBNA1 besitzt ein nukleäres Lokalisations-Signal (NLS, schwarz).

## 4.2 Der latente EBV-Replikationsursprung *oriP*

1984 wurde das 172 kb große doppelsträngige Genom des EBV-Stammes B95.8 als erstes Virusgenom vollständig kloniert und sequenziert (Baer et al., 1984). Bei der Suche nach Sequenzen, die für die Synthese und Erhaltung des EBV-Episoms eine Rolle spielen, wurde im selben Jahr eine 1,8 kb große DNA-Region identifiziert, der latente Replikationsursprung *oriP* (Yates et al., 1984). Wie in Abbildung 7 dargestellt, besteht *oriP* aus zwei Elementen: den „family of repeats“ (FR-Element) und dem „dyad symmetry“ (DS-Element). Das FR-Element enthält 20 Bindestellen für das EBNA1-Protein und ist für die episodale Erhaltung des Plasmids in der Zelle verantwortlich. Ebenso fungieren die „family of repeats“ als Replikationsblock, an dem die Replikation pausiert (Gahn and Schildkraut, 1989; Norio and Schildkraut, 2004). Des Weiteren verstärkt das FR-Element die Aktivierung der Transkription von viralen Promotoren aus, wie z.B. bei der Transkription des LMP1-Gens (Reisman and Sugden, 1986).





**Abb. 7: Der latente Replikationsursprung des EBV, *oriP* und das Rep\*-Element:**

*OriP* besteht aus zwei Komponenten; den „family of repeats“ (FR-Element) und dem „dyad symmetry“-Element (DS). Beide Sequenzen enthalten EBNA1-Bindestellen, aber mit einem unterschiedlichen Abstand der EBNA1-Bindestellen zueinander. Das FR-Element enthält EBNA1-Bindestellen mit 30 bp Abstand und das DS-Element mit 21 bp Abstand zueinander. Der ORC-Komplex bindet direkt oder indirekt in der Nähe des DS-Elements, welches somit als Replikationsursprung fungiert. Das FR-Element ist für die extrachromosomale Erhaltung der *oriP*-Plasmide in der Zelle verantwortlich. Neben dem DS-Element befindet sich die Rep\*-Sequenz.

Ca. 1000 Basenpaare vom FR-Element entfernt befindet sich die zweite funktionelle Einheit von *oriP*, das DS-Element. Das DS-Element ist 120 bp lang und enthält vier EBNA1-Bindestellen, welche in zwei spiegelbildlichen Paaren angeordnet sind. Jedes Paar hat einen exakten Abstand von 21 bp vom Zentrum der ersten Bindestelle zum Zentrum der zweiten EBNA1-Bindestelle (Hearing et al., 1992; Rawlins et al., 1985; Yates et al., 2000). Eine geringfügige Veränderung dieses Abstandes hat zur Folge, dass keine Replikation mehr stattfindet. 21 bp entsprechen genau zwei Windungen der DNA-Helix in der B-Form. Für die Funktion des EBNA1-Proteins ist es von Bedeutung, dass die Bindung des Proteins auf derselben Seite der DNA stattfindet (Wang and Sugden, 2005). Vermutlich wird dadurch eine spezielle DNA-Konformation hergestellt, die die Initiation erleichtert. Im FR-Element beträgt der Abstand der EBNA1-Bindestellen zueinander 30 bp. Das FR-Element ist nicht alleine in der Lage, die extrachromosomale Replikation zu gewährleisten (Aiyar et al., 1998; Reisman et al., 1985). Deletiert man ein Paar der

EBNA1-Bindestellen des DS-Elementes, findet zwar die Initiation der Replikation statt, aber die Replikationseffizienz ist erheblich reduziert. Mehrere tandemförmige Kopien des DS-Elements leiten die Replikation auch ohne Vorhandensein des FR-Elements ein (Kirchmaier and Sugden, 1995).

200 Basenpaare entfernt vom DS-Element befindet sich das Rep\*. Dieses Fragment wurde zufällig bei der Analyse von EBNA1-Mutanten entdeckt (Kirchmaier and Sugden, 1998). Das Rep\* unterstützt zusammen mit dem FR-Element auf einem Plasmid eine sehr schwache Replikation dieses Plasmides. Allerdings wurde kein EBNA1-Konsensusmotiv in dieser Sequenz gefunden. Trotzdem fand man heraus, dass ein EBNA1-Dimer an das Rep\*-Element bindet (Wang and Sugden, 2005). Rep\*-Multimere führen zusammen mit dem FR-Element zur einer effizienteren episomalen Replikation, indem das Rep\* als Origin fungiert.

Mehrere Gruppen konnten zeigen, dass der ORC-Komplex sowie weitere Proteine des Prä-Replikationskomplexes an dem DS-Element des viralen Replikationsursprunges *oriP* angereichert sind (Chaudhuri et al., 2001; Dhar et al., 2001; Ritzi et al., 2003; Schepers et al., 2001). Dies zeigt, dass das EBV die zelluläre Replikationsmaschinerie zur eigenen DNA-Synthese nutzt. Heutzutage dient *oriP* als Modellsystem zur Untersuchung der Proteine, die an der Replikationsinitiation in humanen Zellen beteiligt sind. Da *oriP* zellzyklusabhängig kontrolliert wird und zelluläre Proteine an dieser Stelle zur Initiation der Replikation führen - imitiert *oriP* einen chromosomalen Replikationsursprung in humanen Zellen (Ritzi et al., 2003; Schepers et al., 2001). Das macht *oriP* zu einem idealen Werkzeug zur Identifizierung von chromosomalen Replikationsursprüngen (Krysan et al., 1989).

## 5 Episomal replizierende Systeme

In Säugetierzellen wird transfizierte DNA in das Genom der Empfängerzelle eingebaut (Knippers, 1995). Somit sind keine extrachromosomalen Untersuchungen von genomischen DNA-Sequenzen möglich. In den letzten Jahren wurden verschiedene Strategien für die Entwicklung eines episomal replizierenden Systems in humanen Zellen ausprobiert.

### virale Vektoren

Vor 15 Jahren versuchte die Gruppe um M. Calos einen humanen ARS-Assay zur Identifizierung von Replikationsursprünge zu entwickeln (Krysan et al., 1989). Da Plasmide in humanen Zellen schnell verloren gehen oder ins Genom integriert werden, gab es bis zu diesem Zeitpunkt keine Möglichkeit, genomische DNA-Sequenzen extrachromosomal zu untersuchen. Calos und Kollegen setzten humane DNA-Fragmente in ein Plasmid mit einem Selektionsmarker, dem EBNA1-Gen und dem FR-Element ein. Das FR-Element ist Teil der viralen *oriP*-Sequenz. Das FR-Element und das in den humanen Nierenkarzinom-Zellen 293 exprimierte EBNA1-Protein sollten die episodale Erhaltung dieser Plasmide in den humanen Zellen gewährleisten. Mit diesem Experiment, dem Replikationsassay, konnte die Gruppe zeigen, dass FR-Plasmide extrachromosomal erhalten blieben und dass humane Sequenzen die Replikation dieser Plasmide unterstützten. Ab einer Länge von 6000 Basenpaaren replizierte jede humane DNA-Sequenz im Replikationsassay (Heinzel et al., 1991). Somit war die beobachtete Initiation der Replikation unabhängig von der integrierten DNA-Sequenz. Eine leichte Sequenzspezifität konnte bei einigen untersuchten humanen DNA-Fragmenten jedoch nicht ausgeschlossen werden.

### Nicht-virale Vektoren

1992 wurde ein artifizielles Plasmid konstruiert, das selbständig in humanen Zellen extrachromosomal repliziert. Dieser pEPI-Vektor ist 6692 bp lang und enthält neben dem SV40-Origin eine Resistenzkassette sowie eine MAR-Sequenz („matrix attachment region“) aus der 5'-Region des humanen Interferon  $\beta$ -Gens (Bode et al., 1992). Hierbei ist das Vorhandensein der MAR-Sequenz für die extrachromosomale Replikation ausschlaggebend. Die Funktion des SV40 T-Antigens kann durch die MAR-Sequenz ersetzt werden (Piechaczek et al., 1999). Essentiell für die episodale Replikation ist die aktive Transkription des Reportergens, die in MAR einlaufen muss (Stehle et al., 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der mit Metaphase-Chromosomen assoziierte pEPI-1 stabil im Zellkern vorliegt (Baiker et al., 2000). Der pEPI-1 interagiert mit dem Protein SAF-A (Jenke et al., 2002). Da zu Beginn dieser Arbeit die molekularen Mechanismen, welche die episodale Replikation des pEPI-1 regulieren, nicht bekannt waren, fiel die Wahl auf das besser untersuchte virale System *oriP* zur Untersuchung genomischer Fragmente auf ARS-Aktivität.

## 6 Zielsetzung

Im Gegensatz zur Hefe *S.cerevisiae*, wo die Replikationsursprünge exakt durch eine Konsensussequenz definiert sind, weiß man bisher relativ wenig über humane Startstellen der DNA-Replikation (Todorovic et al., 1999). Bisher sind nur zehn Replikationsursprünge in humanen Zellen identifiziert worden. Die Hauptursache für die geringe Anzahl an identifizierten humanen Replikationsursprüngen liegt im Fehlen einer funktionalen Analysemethode. In Bakterien und der Hefe *S. cerevisiae* wird zur Identifizierung neuer Replikationsursprünge der sogenannte ARS-Assay genutzt, in welchem die Replikationsfähigkeit genomischer Sequenzen getestet wird.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer humaner Replikationsursprünge. Als erstes sollte ein methodischer Ansatz zur funktionellen Analyse von Startstellen der Replikation etabliert werden. Dazu sollte die Anreicherung von 200 bis 1000 bp langen Orc2-bindenden DNA-Fragmenten mit Hilfe einer Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) erfolgen. Anschließend sollte die Untersuchung diese ChIP-Sequenzen auf ARS-Aktivität im Replikationsassay stattfinden (Krysan et al., 1989). Die Kombination des Replikationsassays mit der ChIP-Technik sollte eine gezielte Isolation von humanen Replikationsursprüngen in 293/EBNA1-Zellen erlauben.

Die auf diese Weise isolierten replizierenden humanen DNA-Sequenzen sollten zunächst verifiziert und anschließend weiter charakterisiert werden. Die Bestätigung als aktive chromosomale Replikationsursprünge sollte durch die „nascent strand“-Analyse und durch die Untersuchung der ORC-Anreicherung an diese DNA-Sequenzen im ChIP erfolgen.

## II. Material

### 1 Bakterien

Folgende Bakterienstämme wurden in dieser Arbeit verwendet.

<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	F-, <i>lacI</i> -, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169, F80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>
<i>E.coli</i> DH10B	F-, <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\Phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara, leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , $\lambda$ -, <i>rpsL</i> , <i>nupG</i>
<i>E.coli</i> GM2163	F-, <i>mcrA</i> -, <i>mcrB</i> -, <i>dam-13::Tn 9</i> , <i>dcm-6</i> , <i>hsdR2</i> , <i>leuB6</i> , <i>his-4</i> , <i>thi-1</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rpsL136</i> , <i>tonA31</i> , <i>tsx-78</i> , <i>supE44</i>

### 2 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren der GSF

A39	humane B-Zelllinie, die mit dem Mini-EBV immortalisiert ist
293/EBNA1	humane embryonale Nierenkarzinom-Zelllinie mit stabil integrierten CMV-kontrollierten EBNA1 (Neomycin-Resistenz)
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie
143/EBNA1	humane Osteosarkoma-Zelllinie mit stabil integrierten EBNA1 (von B. Sugden zur Verfügung gestellt)

### 3 Antikörper

aufgelistet nach: Spezifität/Name; Spezies; Isotyp/Markierung; Hersteller

Rabbit-HRP;	Ziege; IgG/HRP; Dianova
Ratte-HRP;	Ziege; IgG/HRP; Dianova
anti-Ratte;	Kaninchen; IgG; Dianova
EBNA1;	Ratte; 1H4; E. Kremmer (GSF)
Orc2;	Kaninchen; IgG; Eurogentec
Preimmunserum;	Kaninchen; IgG; Eurogentec

### 4 Plasmide

Die folgende Auflistung gibt die verwendeten Plasmide mit den Nummern entsprechend der Datenbank der Abteilung Genvektoren (GSF) wieder. Ein Teil der Plasmide war in der Arbeitsgruppe vorhanden. Die mit (\*) markierten Plasmide wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit hergestellt.

- p2832      Zum Vektor p2545, der die *oriP*-Sequenz enthält, wurde das Puromyзин-Resistenzgen und das eGFP-Gen aus dem PINCO-Vektor hinzugefügt.
- p2932\*      Aus der *oriP*-Sequenz des Vektors p2545 wurde mit den Restriktionsenzymen *HpaI* und *BsaBI* das DS-Element entfernt und dafür an diese Stelle eine *AscI*-Schnittstelle eingesetzt. Die dafür verwendeten phosphorylierten Oligonukleotide *AscI*-upP und *AscI*-downP sind unter Punkt III.5 aufgelistet. Die mutierte *oriP*-Kassette wurde mit den Enzymen *BamHI* und *XhoI* herausgeschnitten und in den Vektor p2832 an die Stelle der *oriP*-Sequenz, die vorher ebenso mit den Enzymen *BamHI* und *XhoI* entfernt wurde, kloniert. Das neu entstandene Plasmid p2932 enthält nun die *oriP*-Sequenz ohne das DS-Element, des Weiteren das Puromyзинresistenzgen, eGFP-Gen sowie das Ampizillin-Resistenzgen zur Propagierung in Bakterien.

- 
- p3024\* In den Vektor p2932 wurde ein 437 bp großes Fragment des LaminB2-Origin (LB2) in die *AscI*-Schnittstelle eingesetzt. Das 435 bp lange LB2-Fragment wurde aus den RZBD-Plasmiden (IRALp962B012Q2 und IMAGp998F222861Q2) mittels einer PCR mit den Primern *laminF2AscI* und *laminB4AscI* isoliert. Diese Primer enthielten eine *AscI*-Schnittstelle am 5'-Ende. Entgegen der Erwartungen wurde anstatt des zu erwartenden 1000 bp langen LB2-Fragments ein Fragment isoliert, welches neben 437 bp des LB2-Fragments 500 bp des Vektors IRALp962B012Q2 enthielt.
- p3025\* In die *AscI*-Schnittstelle des Plasmides p2932 wurde eine 730 bp große LB2-Sequenz eingesetzt. Das 730 bp lange LB2-Fragment wurde aus dem Vektor pDP17 (M. Giacca, Trieste, Italien) mittels PCR mit den Primern *laminB4AscI* und *laminFRAscI* angereichert.
- p3026\* In die *AscI*-Schnittstelle des Plasmides p2932 wurde eine 1005 bp große LaminB2-Origin-Sequenz eingesetzt. Das 1005 bp große LB2-Fragment wurde mit Hilfe einer PCR mit den drei Plasmiden IRALp962B012Q2, pDP17 und IMAGp998F222861Q2 als Template und den Primer *laminF2AscI* und *laminB4AscI* isoliert.
- p3026.2\* Dieses Plasmid entstand durch eine Restriktionsspaltung von p3026 mit den Enzymen *FspAI* und *AscI*. Da das Enzym *FspAI* nur nicht-methylierte DNA-Sequenzen schneidet, wurde das Plasmid p3026, welches das LB2<sub>1005</sub>-Konstrukt beinhaltet, vorher in die Bakterienstamm GM2163 transformiert. Von den Restriktionsenzymen wurde mittels Gelelektrophorese eine 250 bp große Sequenz abgetrennt. Das 750 bp große LB2-Fragment wurde mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und durch eine Blunt-Ligation in die *AscI*-Schnittstelle des Vektor p2932 eingesetzt.
- p3405 Das Plasmid stammt aus dem Labor von R. Knippers (Konstanz). In diesen Vektor pEPI wurde eine 387 bp lange genomische Sequenz (Ex9) kloniert.

- p3407\* Aus dem Vektor p3405 wurde ein 387 bp großes humanes DNA-Fragment (Ex9) mit dem Enzym BglIII ausgeschnitten und durch eine Blunt-Ligation in die *AscI*-Stelle des Plasmides p2932 eingesetzt.
- p3242.1-7\* In den Vektor p2932 wurden verschiedene mittels „origin trapping“-Assay isolierte DNA-Sequenzen kloniert (*AscI*).

Puromycin-Plasmide	DNA-Sequenz	Hygromycin-Plasmide
p3242.1	Or10	p3244.1
p3242.2	Or6	p3244.2
p3242.3	OrII	p3244.3
p3242.4	OrIII	p3244.4
p3242.5	OrB	p3244.5
p3242.6	Or9	-
p3242.7	Or15	-

**Tabelle 2: Auflistung der Plasmide mit den replizierenden ChIP-Sequenzen:**

Die Plasmide wurden mittels des „origin trapping“-Assay isoliert und entweder in die *AscI*-Schnittstelle von p2932 (3242.x) oder durch eine gerichtete *BamHI/XhoI*-Klonierung aus den Plasmiden p3242.x in p3225.16 eingesetzt.

- p3225.16 Der Vektor enthält ein Hygromycin-Resistenzgen, destabilisiertes GFP-Gen und ein Ampizillinresistenz-Gen.
- p3230.3 Zu dem Vektor p3225.16 wurde die *oriP*-Sequenz hinzugefügt.
- p3243\* In den Vektor p3225.16 wurde die mutierte *oriP*-Kassette, mit dem FR-Element ohne das DS-Element, über eine gerichtete Klonierung mit den Restriktionsenzymen SpeI und Ecl136II eingebracht.
- p3244.1-5\* Die verschiedenen Origin-Sequenzen aus den Plasmiden p3242.1-5 wurden mit SpeI und *XhoI* ausgeschnitten. Das *XhoI*-Ende wurde mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt. Anschließend wurden die Fragmente über eine gerichtete



- 
- Klonierung in den mit den Enzymen *SpeI*/*Ecl136II* behandelten Vektor p3225.16 eingesetzt.
- p3334\* Das Plasmid enthält das Or6-Dimer. Die Klonierung erfolgte durch eine Kopf-an-Schwanz-Klonierung und wird im Methodenteil unter Punkt IV.3.1 näher beschrieben.
- p3335\* Das Plasmid enthält das Or6-Tetramer. Dazu wurde p3334 mit dem Enzym *AscI* linearisiert und mit dem Or6-Dimer ligiert.
- p3336\* Das Plasmid enthält das Or6-Hexamer. Das Or6-Tetramer enthaltende Plasmid p3335 wurde wiederum mit *AscI* geschnitten und das Or6-Dimer eingesetzt.
- p3434 \* Das Plasmid p3434 enthält die Or6-Mutante X13 und entstand durch eine ungerichtete Ligation. Dazu wurde das Plasmid p3242.2 mit den Restriktionsenzymen *AscI* und *XmnI* geschnitten. Ein 179 bp langes Fragment wurde mittels Gelelektrophorese isoliert. Anschließend wurden die Enden mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und in die Stelle die *AscI*-Schnittstelle des Vektor p2932 eingesetzt.
- p3435 \* Das Plasmid p3425 enthält die Or6-Mutante A/B1 mit dem 3'-Ende der Or6-Sequenz. Das Restriktionsenzym *BamHI* schneidet einmal in der Mitte der Or6-Sequenz (p3242.2). Ebenso schneidet *BamHI* im Vektor p3242.2 sowie im Basis-Plasmid p2932 vor dem CMV-Promotor des GFP-Gens. Das aus dem Plasmid 3242.2 mit dem Restriktionsenzym *BamHI* entfernte DNA-Fragment mit dem 3'-Hälfte der Or6-Sequenz und einem Stück des Vektors wurde danach in den *AscI/BamHI* geschnitten Vektor p2932 eingesetzt.
- p3436 \* Das Plasmid p3436 enthält die Or6-Mutante B4 mit der 5'-Hälfte der Or6-Sequenz. Durch eine Restriktionshydrolyse das Plasmides p3242.2 mit *BamHI* wurde die eine 3'-Hälfte der Or6-Sequenz und ein Stück vom Vektor entfernt. Diese kurze Vektor-Sequenz ohne die 3'-Or6-Sequenz

wurde danach wieder eingesetzt. Sie stammt aus dem Ursprungsvektor p2932 und wurde mit den Enzymen *AscI* und *BamHI* ausgeschnitten.

## 5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung angegeben. Vorhandene oder eingefügte Restriktionsenzym-Motive, welche zur Klonierung verwendet wurden, sind unterstrichen. Die genetische Unversehrtheit der klonierten Plasmide wurde durch Sequenzierung (Firma Sequiserve) überprüft.

zur Klonierung:

*AscI*-upP: Pho-GCTATAGACCGGCGCGCCAATGCATTAG  
*AscI*-downP: Pho-CTAATGCATTGGCGCGCCGGTCTATAGC  
laminF2*AscI*: ATAGGCGCGCCCCTCCCTGCGAAGCATCAG  
laminB4*AscI*: ATAGGCGCGCCACAACCTCCCACACGACCGC  
laminFR*AscI*: ATAGGCGCGCCCGTCGCCGCCTGCAGAAC  
*AscI*-Or6: ATTGGCGCGCCAATACATTAGAGAATCAATCACTC  
Or6-AflIII2: ACCCACGCGTTCACCCATTTTCTGCATC

für „nascent strand“ Analyse und ChIP im chromosomalen Kontext:

HPRT 2f: TAAGGAATTGGCATTCTCCAG  
HPRT 2r: GATCAAGAAGGCATTCTCCAG  
HPRT 7f: GACCAGGTTTTGCCTTTAG  
HPRT 7r: TCTAGCACATGTGAATTTTCG  
HPRT 14f: ATTTACCACTTCTAGGCCCTC  
HPRT14r: CAGTCCATAACAAGCACCCAAC  
HPRT 16f: ACTGCATATCTGGGATGAAC  
HPRT 16r: AGTTACTCACTGCTTCTGCC  
Or6-fow: TGAGAAGGAGAAGGCAAAGAGTGA  
Or6-rev: ATCCTCTCCCTGCTTTTCTTACCT

---

N-fow: CAACCTGCTTCTGAATCACTACTGG  
N-rev: CTGCTTTCTCTTGTGGGCATTTAG  
N1-fow: TCAGAGTCACATCAATCACCCCC  
N1-rev: CCCATCCCACACCTGTCAGTC  
N2-fow: CTAATGCTGAGAGATTTTGTACCG  
N2-rev: CACACTGATGGGTCTTGATTCTTTATC  
N3-fow: AAAGGACATCCATAACCAAAAACCC  
N3-rev: TGAAGGCTCTGAAACACGGAAAG  
III<sub>m</sub>-fow: CACACACACACAGAAAACCTACAGGC  
III<sub>m</sub>-rev: TGAAAAGGAATGAACAAAACCTCC  
III.1-fow: TTTCCCTTTGGTTAGGTCTGGTC  
III.1-rev: AATGTTACTTCTTTCCCATCCCTTG  
III.2-fow: TGTGCTTATGCGTAGCCTGATG  
III.2-rev: TCCCAACTTTCAAACCCCTTCTC  
β<sub>m</sub>-fow: CATTAGCAATCAGACTTCAGTGG  
β<sub>m</sub>-rev: TGAGGGGTAGCCTGGTGGG  
β.1-fow: GGTTTCTCTCTGATGCCTGTGC  
β.1-rev: CGTGTCTCCTCTTTGATTTTCC  
β.2-fow: ACCCTTCCACCTTTTGTAGTCTCC  
β4.2-rev: GCAACTGCTGCTTGAGTCAGG  
10<sub>m</sub>-fow: GAGGCTGAGGCACAAGAATGG  
10<sub>m</sub>-rev: GGCATCAAAATGTCCTGGAGAG  
10.1-fow: TCAACATTCTGTCGTATCCCAG  
10.1-rev: TGAGGCTTCTTCTTCAGTTTGGC  
10.2-fow: GAATACTCTCCTCCTCTTTTCCCG  
10.2-rev: GCAGGTGTGGATGATAGTCAAGTTG  
9<sub>m</sub>-fow: CAAGCATTGTTTTGTGACTTTTCG  
9<sub>m</sub>-rev: GGCTCAGACACACAGTTGAAACC  
9.1-fow: AGAATACGCAAGGAACTCAAAGC  
9.1-rev: CTGAAATGGAAAGATAGAAGGAGGG  
9.2-fow: AAGGGTTTTCTTTCCTGACTTTGG  
9.2-rev: CTGTTCACTGGTGGCTTCTACTCTC  
15<sub>m</sub>-fow: CACTTTCCTTATGCCTTTCCTGAG  
15<sub>m</sub>-rev: TGCGTTCCTGCTGAAGACTCTG

15.1-fow: AACAAACCCTCACATTTTCCATAGC  
15.1-rev: TCAGTCTAAGGCAGTTCAGAAGCAG  
15.2-fow: GAGTGGGGTCTTTCTGTTTGGTC  
15.2-rev: TGCGTTTGGGTCTCTTCCTTC  
14m-fow: CACATCTACTCATTCCGCACGC  
14m-rev: GCTGTCTGCCAGTTAACATCAATG  
14.1-fow: ACAGTCCACCACCTCGTCCC  
14.1-rev: AGAGACCCAGAATGTGTCCACG  
Prompt-F: AAACCAGAAGTAGGCCTCGCTCGG (mcm4 origin)  
Prompt-R: GGCCAGTAAGCGCGCCTCTTTGG (mcm4 origin)  
Ex9-F: ATGTCTTCCGGAGACTCCTGAAGC (mcm4 origin)  
Ex9-R: GGCCTCCTATTCTCAGAATCATGC (mcm4 origin)  
LB-fow: GGCTGGCATGGACTTTCATTTACAG  
LB-rev: GTGGAGGGATCTTTCTTAGACATC  
LBC1-f: GTTAACAGTCAGGCGCATGGGCC  
LBC1-r: CCATCAGGGTCACCTCTGGTTCC  
LBC2-f: CACAGCATGCGGCTGCTGATCTG  
LBC2-r: CCTGGTGCGTCCCATCTGCCTGC

für die ChIP-Experimente im plasmidalen Kontext:

4.2-fow: AAAGTCTGCTCCAGGATGAAAGC  
4.2-rev: CCAGGGCGTTCTATTTTTACAG  
F16: CTGCTGCCCGACAACCACTAC (GFP)  
B11: ATTCCCCCTTTTTCTGGAGAC (GFP)  
Puro-fow: CTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATG  
Puro-rev: CGCAACCTCCCCTTCTACGAG

Southern-Blot-Sonde

Als Sonde wurde der Vektor p2832 mit der *OriP*-Sequenz verwendet.

## 6 Chemikalien, Reagenzien, Geräte und Sonstiges

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (München) in reinster Form „*pro analysis*“ bezogen.

### Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Hybond-ECL-Zellulose-Membran, Hybond-N+-Nylonmembran,  $\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol), „ECL-Western blotting analysis“-System, G50-und G25-Sepharose-Säulen

### Beckmann, Heidelberg

Avanti J25 Zentrifuge

### BectonDickinson GmbH, Heidelberg

Plastik-Reagenzgefäße 15 und 50 ml, Zellkulturflaschen, 96 und 6-Loch-Platten

### BiochromAG

Fötale Kälberserum

### Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA

Gene Pulser, Polyprep-Säulen

### Biozym

SeaPlaque Agarose

### Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main

Dithiothreitol (DTT), Hygromyzin B, Puromyzin

### Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

### Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA

Röntgenfilme XAR5

### Eppendorf Gerätebau, Hamburg

Tischzentrifuge 5415, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, BioPhotometer, PCR-Maschine: Mastercycler personal

### Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

### Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA

SemiPhor, Semidry Blottingsystem

### Labor Schubert, München

48 Loch-Platten

Life Technologies, Eggenstein

Amphotericin B (Fungizone), HBSS-Puffer, HEPES, 1 kb DNA-Leiter, Penicillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640, BenchMark Prestained Protein Ladder; Elektromax DH10B elektrokompetente Bakterien

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme, „Lambda DNA-BstE II Digest“-Leiter

Nunc GmbH, Wiesbaden

Einfrierröhrchen 2ml, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen, 48- und 96-Loch-Platten, PCR-Reaktionsgefäße

Peqlab, Erlangen

Elektroporationsküvetten, Elektrophorese-Kammern, dNTPs

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

dNTPs, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), alkalische Phosphatase, High Prime DNA labeling Kit, RNase I, Klenow-Fragment, Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, „LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I“, LightCycler

Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat, Phenol, Roti-Block, Acrylamid

Qiagen, Mannheim

Polyfect-Zelltransfektionsreagenz; „Quiaquick PCR Purification Kit“, „Quiaquick Gel Extraction Kit“

Sarstedt

Gelb-Deckel-Röhrchen (12 ml)

Sigma

Sigma 2K15 Zentrifuge, „Dual Gel Vertical Electrophorese Unit“

Stratagene, Heidelberg

Taq PCR Precision System, Robocycler

Schleicher & Schuell, Dassel

Blottingpapier GB40; Filtereinheit 1,2 µm

Zeiss, Oberkochen

Axiovert10-Fluoreszenzmikroskop

## III. Methoden

### 1 Arbeiten mit Bakterien

#### 1.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Die verwendeten Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium (Millers Luria Broth) oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agar-Platten kultiviert. Zur selektiven Aufzucht der Bakterien mit transformierter Plasmid-DNA wurde dem LB-Medium bzw. -Agar Antibiotika, wie Ampizillin (100 µg/ml) zugesetzt. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine dicht gewachsene Bakterienkultur mit 25 % Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

LB-Medium: 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl

LB-Agar-Platten: LB-Medium 1,5 % Bacto-Agar

#### 1.2 Transformation und Elektroporation von *E. coli*

##### Chemische Transformation:

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Bakterien erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode. Dazu wurden die Bakterien bei 4°C und 3000 rpm 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1/3 Zellvolumen vorgekühltem TFB-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen, wie oben beschrieben, nochmals abzentrifugiert und in 1/10 Zellvolumen TFB resuspendiert. Für die Transformation über Hitzeschock wurde nach einem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983) gearbeitet. Zu 200 µl kompetenten Bakterien wurden 7 µl DMSO und 10 bis 100 ng Plasmid-DNA pipettiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock; 2 min bei 42°C. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium zur Bakteriensuspension zugegeben und diese 1 h bei 37°C

geschüttelt. Die Bakterien wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen.

TFB:                   10 mM K-MES (pH 6,2), 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 45 mM MnCl<sub>2</sub>,  
                          100 mM RbCl

#### Elektroporation:

Durch Elektroporation wurde Plasmid-DNA in kommerziell erworbenen DH10B-Bakterien (Life Technologies) einschleust. Die Elektroporation von 100 µl kompetenten Bakterien mit 0,5 bis 1,5 µg DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers in gekühlten Elektroporationsküvetten (1 mm Elektrodenabstand) bei 2 kV, 200 Ω und 25 µF.

## **2 Arbeiten mit Zellen**

Alle eukaryotischen Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Luftatmosphäre in einem Inkubator (Heraeus) kultiviert. Alle für die Zellkultur benötigten Medien und Lösungen waren keimfrei und wurden auf 37°C vorgewärmt. Das Kulturmedium RPMI 1640 wurde mit 10 % Kälberserum (FKS) und 100 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Penizillin versetzt. Je nach Zelllinie wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Zum Ablösen und Verdünnen von adhärennten Zellen wurden die Zellen mit Trypsin behandelt, wie vom Hersteller (Life Technologies) beschrieben. Die semiadhärente Zelllinie 293/EBNA1 wurde regelmäßig trypsinisiert, um ein Wachstum als Einzelzellen zu gewährleisten. Die in Suspension wachsende Zelllinie A39 wurde nach Erreichen einer Zellzahl von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro ml auf 2 x 10<sup>5</sup> Zellen pro ml verdünnt, damit die Zellen nicht in die stationäre Phase übergehen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer.

### **2.1 Einfrieren, Auftauen und Aufbewahrung von Zellen**

Etwa 5 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden langsam in 1 ml RPMI 1640-Medium mit 50 % FCS 10 % DMSO bei -80°C in 2 ml-Gefäßen (NUNC-Cryotube™) eingefroren. Später wurden die



eingefrorenen Zellen in flüssigem Stickstoff umgesetzt und permanent gelagert. Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml Kulturmedium gewaschen und mit frischem Medium in ein Kulturgefäß überführt.

## **2.2 Transfektion von Zellen und Selektion der Zellen mit einem Selektionsmarker**

Die zu transfizierenden 293-D/EBNA1-Zellen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert, bis sie 80% Konfluenz erreicht hatten (ca.  $5 \times 10^5$  Zellen). Die Transfektion erfolgte mit Polyfectamin nach einem modifizierten Protokoll der Firma Qiagen. Hierbei wurde die Menge an Polyfectamin auf 4 µl pro µg transfizierter DNA verringert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Durchmesser 15 cm) überführt. Einige Stunden nach dem Absetzen der Zellen wurde dem Medium Hygromyzin (80 µg/ml Endkonzentration) oder Puromyzin (180-360 ng/ml) zugegeben. Um tote Zellen zu entfernen, wurde das Kulturmedium in den ersten Tagen nach der Transfektion täglich gewechselt. Nach zwei Wochen konnte mittels Fluoreszenzmikroskop über die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) die Vollständigkeit der Selektion kontrolliert werden.

## **3 Arbeiten mit DNA**

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, wie z.B. die Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels Phenol-Extraktion und anschließender DNA-Präzipitation mit Ethanol oder Isopropanol, die Aufarbeitung von Nukleinsäuren mittels Restriktionspaltung, elektrophoretische Auftrennung, Anfärbung von Nukleinsäuren in Gelen mit Ethidiumbromid, die Konzentrationsbestimmung von DNA im Spektralphotometer, Minipräparation von Plasmid-DNA usw. erfolgten in Anlehnung an Standard-Protokolle und werden daher nicht näher beschrieben (Sambrook et al., 1989).

### 3.1 Präparative Plasmidreinigung

Die präparative Plasmidreinigung aus einer 200 ml Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des „JetSTAR 2,0 Plasmid Maxiprep Kit“ (Genomed) nach Angaben des Hestellers. Das Aufreinigungsverfahren beruht auf der Adsorption von DNA an eine Matrix.

### 3.2 „head to tail“-Klonierung (Kopf-an-Schwanz)

Zur Multimerisierung der Or6-Sequenz wurden Primer synthetisiert, welche die Or6-Sequenz amplifizieren und am 5'-Ende unterschiedliche Restriktionsschnittstellen enthalten. Nach der enzymatischen Hydrolyse mussten die beiden Schnittstellen kompatible kohäsive Enden bilden, so dass sie wieder miteinander verknüpft werden konnten. Der Primer *AscI*-Or6, der am 5'-Ende der Or6-Sequenz bindet, wurde mit einer *AscI*-Schnittstelle versetzt. Dahingegen wurde der Primer, der am 3'-Ende der Or6-Sequenz bindet, mit einer *AflIII*-Restriktionsschnittstelle versehen. Die beiden Enzyme *AscI* und *AflIII* erzeugen jeweils einen 5'-CGCG-Überhang.

Zuerst erfolgte eine PCR mit den beiden Primern *AscI*-Or6 und Or6-*AflIII*. Das amplifizierte Monomer wurde mittels Gelelektrophorese gereinigt und dann mit den beiden Enzymen *AscI* und *AflIII* geschnitten. Über Nacht erfolgte die Ligation der Monomere. Um nur gerichtete Or6-Multimere zu erhalten, wurde gleich eine Spaltung mit *AscI* und *AflIII* angeschlossen. Bei den gerichteten Or6-Multimeren existieren diese Schnittstellen nur an den Enden. Die potentiellen Schnittstellen in der Mitte des Dimers wurden durch Kombination der beiden Erkennungssequenzen der Enzyme *AscI* und *AflIII* zerstört. Das Or6-Dimer wurde über ein Agarose-Gel aufgereinigt und in den Vektor p2932 an die Stelle des DS-Elements kloniert. Der neu entstandene Vektor p3334 wurde mit dem Enzym *AscI* gespalten. In diese Schnittstelle wurde erneut ein Or6-Dimer eingesetzt.

### 3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR („polymerase chain reaction“) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Sequenzen einer bestimmten Region. Zur Amplifikation wurden die hitzebeständige

„Taq“-DNA-Polymerase und „TaqPlus-Precision“-Polymerase, die zusätzlich eine „proofreading“-Aktivität zur Korrektur von Basen-Fehlpaarungen besitzt, verwendet. Die Oligonukleotide sind unter Punkt II.5 beschrieben. Die Hybridisierungstemperatur betrug 4°C unter der berechneten Schmelztemperatur des verwendeten Primerpaars. Die PCR wurde mit folgenden Komponenten und Bedingungen durchgeführt:

Reaktionsansatz: 10 pg DNA; 1 µl dNTP-Mix (25 mM); je 0,5 µl Primer (10 pmol); 5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer; 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl); 10 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega); mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt

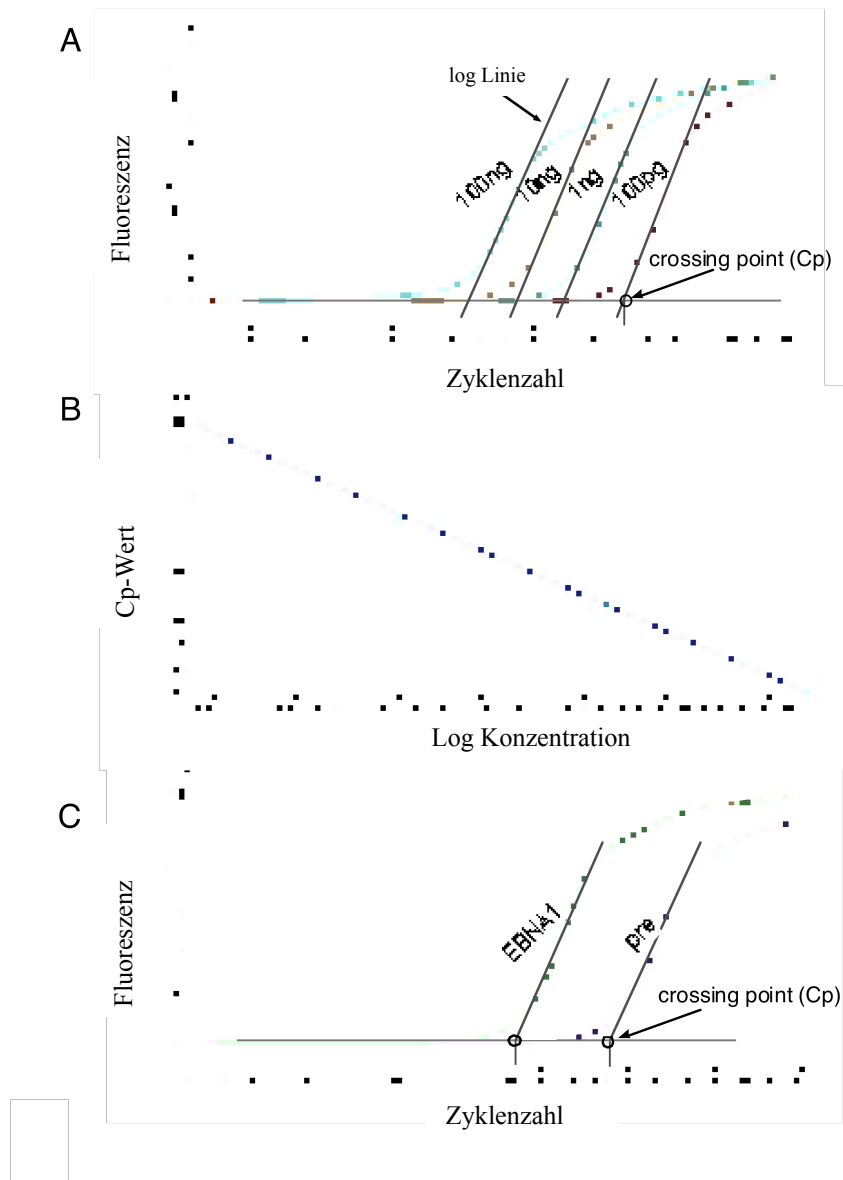
PCR-Programm: 95°C/5 min; 25 Zyklen: 95°C/1 min, 50-64°C/1 min., 72°C /1,5 min;  
72°C / 10 min

### 3.4 Quantitative „real time“-PCR

Die „real time“-PCR wurde zur Quantifizierung der in der Chromatinimmunpräzipitation angereicherten DNA und der „nascent strand“-DNA genutzt. Die dabei verwendeten Primerpaare sind im Materialteil unter Punkt II.5 aufgelistet.

Mit der konventionellen PCR-Methode kann nur eine qualitative, aber keine quantitative Aussage über die DNA-Matrize getroffen werden. Daher wurde die sogenannte „real time“-PCR verwendet. Mit dieser Methode kann die eingesetzte Menge der Matrize am Anfang der Reaktion bestimmt werden.

Die Quantifizierung der DNA erfolgt mit Hilfe des Lightcyclers (Roche). Der kommerziell erhältliche „Light Cycler PCR Reaction Mix“ enthält den Farbstoff SYBR-Green, der sich während „real time“-PCR-Reaktion in die amplifizierte doppelsträngige DNA einlagert. Die emittierte Fluoreszenz wird von dem Gerät nach jedem Zyklus gemessen (Higuchi et al., 1993) (Abb. 8A).



**Abb. 8: Quantifizierung der Menge der eingesetzten Matrize mittels „real-time“-PCR**

(A) Zur Bestimmung der Zyklanzahl ( $n$ ), die benötigt wird, um ein detektierbares Produkt zu erhalten wird durch den linearen Bereich der Amplifikationskurve eine Ausgleichsgerade gelegt. Eine zweite Gerade wird senkrecht zur X-Achse durch den Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit dem Hintergrund der Wasserkontrolle gelegt. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der X-Achse ergibt den Cp-Wert. (B) Die Bestimmung der Effizienz und der Ursprungsmenge an Matrize  $T_0$  der PCR-Reaktion: die Y-Achse beschreibt die benötigte Anzahl an PCR-Zyklen, um ein detektierbares Produkt über dem Hintergrund zu erhalten; Cp-Wert. Auf der X-Achse ist der Logarithmus der dazu initial benötigten Kopienzahl aufgetragen. Die Effizienz berechnet sich aus dem Anstieg dieser Gerade nach der Formel  $-1/\log(\text{Anstieg})$ . Der  $T_0$  wird anhand der Geradengleichung aus dem Cp-Wert ermittelt.

(C ) Die Bestimmung der spezifischen Anreicherung ( $\Delta C_p$ ) z.B. von EBNA1 an *OriP* erfolgte durch die Berechnung der Differenz zwischen dem spezifischen Immunpräzipitat EBNA1 und dem Präimmunserums nach folgender Formel:  $\Delta C_p = C_p(\text{EBNA1}) - C_p(\text{Präimmunserum})$

Während der exponentiellen Vermehrung kann die Menge des entstandenen Produktes nach der Formel:

$$T = T_0(E)^n$$

berechnet werden, wobei T die Anzahl der amplifizierten Kopien nach Zyklus n,  $T_0$  die Anzahl der Ursprungsmenge an Matrize, E die Effizienz der PCR-Reaktion und n die Zykluszahl ist (Schepers et al., 2001). Die Effizienz einer PCR-Reaktion ist abhängig vom verwendeten Primerpaar. Aus diesem Grund wurde für jedes Primerpaar eine Standardreihe, bestehend aus genomischer DNA mit bekannter Ursprungsmenge an eingesetzter Matrize, erstellt. Dies ist exemplarisch für das Primerpaar x graphisch in der Abb. 8A dargestellt. Hierbei wurde durch den linearen Bereich der Amplifikationskurve eine Ausgleichsgerade gelegt. Eine zweite Gerade wurde senkrecht zur X-Achse durch den Schnittpunkt der Ausgleichsgerade mit dem Hintergrund der Wasserkontrolle gelegt. Aus dem Schnittpunkt dieser Gerade mit der X-Achse ergab sich die Zyklusanzahl (n), die benötigt wurde, um ein detektierbares Produkt zu erhalten. Diese Zahl n wurde  $C_p$  („crossing point“-)Wert benannt. Zur Bestimmung der Ursprungsmenge  $T_0$  und der Effizienz wurde in Abbildung 8B der  $C_p$ -Wert auf der Y-Achse gegen den Logarithmus der initial benötigten Kopienzahl auf der X-Achse aufgetragen. Die Effizienz berechnet sich aus der Steigung dieser Gerade nach der Formel:

$$-1/\log(\text{Anstieg})$$

Dabei liegt die Effizienz zwischen 1 (keine Amplifikation) und 2 (Verdopplung des PCR-Produktes je Zyklus). Da die Effizienz einer PCR-Reaktion mit einem Primerpaar konstant ist, konnte anhand einer DNA-Verdünnungsreihe direkt aus dem  $C_p$ -Wert auf die Ursprungsmenge  $T_0$  geschlossen werden. Dies erfolgte bei der „nascent strand“-Analyse und beim ChIP im chromosomalen Kontext.

In Abbildung 8C ist ein Beispiel zur Berechnung des  $\Delta C_p$ -Wertes, welcher bei der Analyse des ChIP im plasmidalen Kontext untersucht wurde, dargestellt.

### 3.5 HIRT-Extrakte

Zur Präparation von niedermolekularer Plasmid-DNA aus 293/EBNA1-Zellen wurde eine konfluente 15 cm Zellkulturplatte nach Abschütten des Mediums mit TEN-Puffer gewaschen. Auf dem Zellrasen wurden je 1,5 ml TEN- und 2x HIRT-Puffer gegeben und gemischt. Dadurch wurden die Zellen lysiert (Hirt, 1966). Nach Überführung des Extrakts in 12 ml Röhrchen wurde das Lysat 1 min gedreht. Zum Fällern der Proteine und der genomischen DNA wurden 750  $\mu$ l der 5 M NaCl-Lösung zugegeben. Nach dem Durchmischen wurde das Röhrchen über Nacht bei 4°C oder für mindestens 5 h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (4°C, 20.000 x g, 30 min) wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Isopropanol gefällt. Die DNA wurde mit 80 %igen Ethanol gewaschen und anschließend in 50  $\mu$ l TE aufgenommen.

TEN-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA
2x HIRT-Puffer:	20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 1,2 % SDS; 20 mM EDTA

### 3.6 Plasmid-Wiedergewinnungs-Analysen („plasmid rescue“)

Die nach der Hirt-Methode aus 293/EBNA1-Zellen isolierte DNA wurde auf das Vorhandensein von extrachromosomaler DNA hin überprüft. Dazu wurden ca. 0,5  $\mu$ g DNA mit dem methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym DpnI gespalten, um restliche nichtreplizierte DNA zu entfernen. Die transfizierte DNA stammt aus dem *E.coli*-Stamm DH5 $\alpha$  und wurde durch die *dam*-Methylase methyliert. Die in den humanen Zellen replizierende DNA ist nicht *dam*-methyliert. Nach der Spaltung wurde die Hirt-DNA durch Elektroporation in elektrokompente *E.coli* des Stammes DH10B (Life Technologies) transformiert. Die Bakterien wurden auf Agarplatten mit Ampizillin ausplattiert, über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert und die auswachsenden Kolonien am nächsten Tag gezählt.

### 3.7 Southern-Blot

Der Southern-Blot erfolgte nach Standard-Protokollen (Church and Gilbert, 1984; Southern, 1975). Dazu wurden ca. 2 µg zelluläre DNA mit Restriktionsenzymen gespalten und in einem 0,8%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Überprüfung der vollständigen Restriktionsspaltung wurde die DNA nach der Gelelektrophorese durch Färbung mit Ethidiumbromid (40 ng/ml in 1 x TAE-Puffer) im UV-Licht sichtbar gemacht. Anschließend wurde das Gel 30 min mit 0,25 M HCl inkubiert, um durch einen Depurinierungsschritt später Strangbrüche in den DNA-Fragmenten durch Hydrolyse hervorzurufen. Danach wurde die DNA mit einer 1,5 M NaCl/ 1,5 N NaOH-Lösung denaturiert und durch kapillaren Transfer auf eine Nylon-Membran (Hybond N+) übertragen.

Nach kurzem Schwenken der Membran im Waschpuffer erfolgte die 60-minütige Prähybridisierung der Membran in 15 ml Hybridisierungspuffer (Church-Puffer) bei 65°C. Nach dieser Zeit wurde der Puffer erneuert und die radioaktiv markierte Probe ( $3 \times 10^7$  dpm) zugegeben. Die Hybridisierung der radioaktiv markierten Probe an homologe DNA-Bereiche erfolgte über Nacht bei 65°C. Am nächsten Tag wurde der hybridisierte Nylonfilter 3-mal für je 15 min bei 65°C im Waschpuffer gewaschen und anschließend in Folie gewickelt. Der Autoradiographie wurde bei -80°C durchgeführt. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Intensität der Signale.

1xTAE-Puffer:	40 mM Tris-HCl (pH8,0); 5 mM NaAc; 1mM EDTA
2x SSC:	300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat
Church-Puffer:	400 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 7 % SDS; 1 mM EDTA (pH 7,2); 1 % BSA
Waschpuffer:	0,2x SSC; 1 % SDS

### 3.8 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden für Southern-Blots

Für die Herstellung radioaktiv markierter einzelsträngiger DNA-Fragmente wurde eine von Feinberg und Vogelstein entwickelte Methode verwendet, bei der Hexanukleotide von zufälliger Sequenz an hitzedenaturierte, einzelsträngige DNA binden und als Primer für die

Elongation mit Hilfe der Polymerase-Aktivität des Klenow-Fragmentes dienen (Feinberg and Vogelstein, 1983). Die Markierung von 50-100 ng DNA wurde mit dem „High Prime labeling kit“ nach Herstellerangaben (Boehringer) durchgeführt. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über eine Sephadex-G50 Säule (Nick Column). Nach Hitzedenaturierung (5 min. bei 95°C, 5 min. Eis) konnte die markierte Sonde direkt zur Hybridisierungslösung gegeben werden.

### 3.9 Analyse der naszierenden DNA

Die naszierende DNA („nascent strand“) wurde nach dem Protokoll von Leffak isoliert (Ghosh et al., 2004). Die Elektrophorese-Kammer wurde zunächst mit einer 0,2 M HCl-Lösung und anschließend mit einer NaOH/NaCl-Lösung gereinigt. Dann wurden  $2 \times 10^7$  Zellen mit PBS gewaschen und in PBS mit 10 % Glycerin aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in die Taschen eines Agarosegels geladen. Dort wurden die Zellen durch den Laufpuffer lysiert. Die Größenauftrennung der denaturierten DNA erfolgte über Nacht bei 30 V durch ein 1,2%-iges niedrig schmelzendes Agarosegel (von CAMBREX). Parallel dazu wurde ein Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Am nächsten Tag wurde der Größenmarker herausgeschnitten und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Laufweite der 0,8 und 1,3 kb langen Banden wurde unter dem UV-Licht ausgemessen. Die entsprechenden DNA-Fragmente der Zellen („nascent strand“-DNA, naszierende DNA) wurden aus dem Gel isoliert und mit dem „Gelextraction Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die „nascent strand“-DNA wurde mittels quantitativer „real time“-PCR mit den verschiedenen Primern (siehe Material II.5) vermessen.

NaOH/NaCl-Lösung: 0,1 N NaOH, 1,5 M NaCl

Laufpuffer: 50 mM NaOH, 1mM EDTA



## 4 Arbeiten mit Proteinen

### 4.1 Western-Blot-Analyse

Für den Nachweis bestimmter Proteine in Zellextrakten wurden ca.  $1 \times 10^7$  Zellen mit PBS gewaschen und in 200  $\mu$ l RIPA-Puffer lysiert. Nach Zugabe des SDS-Probenpuffer wurden die Lysate 2 min bei 95°C denaturiert und anschließend elektrophoretisch in einem 10 %-igen Polyacrylamid-Gel bei 45 mA und 300 V nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Unmittelbar nach der Elektrophorese wurden die Proteine für 60 min bei 15 V auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham) transferiert.

Zum Nachweis bestimmter Proteine wurde der Western-Blot mit spezifischen Antikörpern (siehe Punkt II.3) inkubiert. Um unspezifische Interaktionen zu vermeiden, wurde die Membran zuerst 1 h lang in der Blocklösung geschwenkt. Dann wurde der Western-Blot mit dem Primärantikörper (in PBS-T verdünnt) 1 h inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS-T erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (gelöst in 2% Magermilch). Der Sekundärantikörper ist kovalent mit der Peroxidase (HRP) verknüpft. Die Entwicklung des Western-Blots erfolgte mit Hilfe von Chemilumineszenz (ECL, Amersham).

RIPA-Puffer:	150 mM NaCl; 0,1 % SDS; 0,5 % SDS; 0,5 % DOC; 1 % NP40; 50 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM DTT
SDS-Probenpuffer (5x):	250 mM Tris-HCl (pH 6,8); 500 mM DTT; 10 % SDS; 20 % Glyzerin; 2 % Bromphenolblau
Laufpuffer :	192 mM Glycin, 24 mM Tris-Base, 3,4 mM SDS (pH 7,4)
Sammelgelpuffer (2x) :	0,25 M Tris-HCl, 7 mM SDS (pH6,8)
Trenngelpuffer (5x) :	1,86 M Tris-HCl, 17 mM SDS (pH 8,8)
Transferpuffer:	48 mM Tris; 39 mM Glycin; 0,038 % SDS; 20 % Methanol
PBS-T:	PBS; 0,05 % Tween
Blocklösung:	Roti-Block (Roth)

## 4.2 ChIP im plasmidalen Kontext

Für die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) wurden  $1 \times 10^7$  A39- bzw. 293/EBNA1-Zellen mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500  $\mu$ l Mendez A (Mendez and Stillman, 2000) resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,04 % Triton-X100 wurden die Zellen 10 min bei 4°C inkubiert und anschließend 4 min bei 1300 rpm, 4°C abzentrifugiert (Zentrifuge: Hettich Rotanta). Die Kerne wurden in 500  $\mu$ l Mendez A mit 200 mM NaCl anstatt KCl resuspendiert und abzentrifugiert. Die Fixierung der Proteine an die DNA erfolgte mit 1% Formaldehyd (in Mendez A verdünnt) für 10 min bei 37°C. Dann wurden die Kerne mit PBS/NP-40 gewaschen. Die Kerne wurden durch die Zugabe von 2 % Sarkosyl lysiert und die Kernextrakte auf einen Sucrose-Gradienten (40 ml LSB/100 mM Sucrose) geladen. In dem Gradienten wurden die löslichen Proteine von den DNA-Protein-Komplexen getrennt. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Pellet in 2 ml TE aufgenommen. Durch Sonifizierung (2 min, 40% Amplitude, 1 s Impuls, 1 s Pause) wurde die DNA fragmentiert. Durch die Zugabe von 10 U Mikrokokken-Nuklease wurden die Fragmente nochmals gekürzt, so dass ca. 500 bis 2000 bp lange Sequenzen entstanden.

Der Extrakt wurde mit 10  $\mu$ g des jeweiligen Antikörpers versetzt und 1,5 h bei RT in NET inkubiert. Nach der Zugabe von 50  $\mu$ l Protein-SepharoseA-beads (50% in NET gelöst) wurde der Antikörper 1,5 h lang an diese Matrix gekoppelt. Die Beads wurden anschließend mit je 15 ml RIPA, LiCl und TE gewaschen. Das Pellet wurde in 200  $\mu$ l TE mit 1% SDS aufgenommen und 20 min geschüttelt. Mit diesem Schritt wurden die adsorbierten Proteine von den Beads eluiert. Durch Zugabe von Proteinase K (15,6  $\mu$ g/ $\mu$ l) und Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die Vernetzung der Proteine an die DNA revertiert und die Proteine degradiert. Die Reinigung der präzipitierten DNA erfolgte durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol. Zum Schluß erfolgte eine Ethanol-Fällung und die DNA wurde in 50  $\mu$ l TE gelöst und mittels „Real time“-PCR vermessen.

Mendez A: 10mM Hepes (7,9), 10mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerin, 0,34 M  
Sucrose

LSB: 0,1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; 0,1% NP40; 1 Tablette  
Protase-Inhibitoren (Roche)

---

NET:	50 mM Tris/HCl (7,5), 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 0,5% NP-40
RIPA:	50 mM Tris/HCl (pH 8); 150 mM NaCl; 0,1%SDS; 0,5% DOC; 1% NP-40
LiCl:	10 mM Tris/HCl (pH 8); 250 mM LiCl; 0,5% DOC; 0,5% NP-40; 1mM EDTA

### 4.3 Klonierung der ChIP-Fragmente

Insgesamt wurden  $1 \times 10^9$  Zellen nach dem ChIP-Protokoll lysiert und die Extrakte in zehn parallel laufenden Immunpräzipitationen mit dem Orc2 Antikörper inkubiert. Die Enden der aufgereinigten DNA-Fragmenten, wurden mit dem Klenow-Enzym (2U) aufgefüllt und anschließend mit 10 pmol AscI-Linker (AscI-upP/AscI-downP) über Nacht legiert. Die ChIP-DNA wurde durch eine PCR mit AscI-upP und AscI-downP als Primer, 2% DMSO und „Taq Precision“-Polymerase angereichert. Die PCR-Produkte wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Daraus wurden die 200 bis 500 bp langen DNA-Sequenzen isoliert. Nach der Restriktionshydrolyse mit dem Enzym AscI (2U) wurden die ChIP-Sequenzen in den Vektor p2932 kloniert.

### 4.4 ChIP im chromosomalen Kontext

Das Protokoll stammt von der Arbeitsgruppe Knippers (Schaarschmidt et al., 2002). Im Unterschied zum ChIP-Protokoll im plasmidalen Kontext wurden beim ChIP im chromosomalen Kontext HeLa-Zellen verwendet.  $2 \times 10^7$  adherente HeLa-Zellen wurden auf der Platte mit warmen PBS gewaschen. Dann erfolgte eine vierminütige Vernetzung der Proteine mit der DNA mit 1%-igem Formaldehyd bei 37°C im Brutschrank. Diese Behandlung wurde durch Waschen der Zellen mit kaltem PBS gestoppt. Da diese Zellen ein größeres Zytoplasma und einen kleineren Kern als die Zelllinien A39 und 293/EBNA1 besitzen, wich das Protokoll zur Präparation der Kerne von den ChIP-Experimenten im plasmidalen Kontext ab. Nach zehnmütiger Inkubation der Zellen im hypotonen Puffer RSB schollen die Zellen an. Die Zellmembran wurde anschließend mechanisch im Douncer zerstört. Die HeLa-Kerne wurden erst mit RSB und dann mit dem Hochsalz-Puffer SNSB gewaschen. Die Lyse

der Kerne erfolgte mit Sarkosyl und die Abtrennung der löslichen Proteine von den DNA-gebundenen Proteinen erfolgte wiederum durch einen Sucrose-Gradienten. Die DNA wurde mittels Ultraschall (4 min, 70% Amplitude, 1s Impuls, 1s Pause) und anschließend durch die Behandlung mit Mikrokokken-Nuklease in ca. 500-2000 bp lange Fragmente zerlegt.

Nach dem Mikrokokken-Verdau (wie unter III.4.2) wurden 500 µg Chromatin mit 10 µg gereinigtem polyklonalen Orc2-Antikörper und als Kontrolle mit 10 µg Kaninchen anti-Ratte IgG über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch 50 µl Protein-Sepharose-beads wurden die Antikörper gebunden. Diese Beads wurden mit je 20 ml Puffer RIPA, dann LiCl und TE gewaschen. Die Proteine wurden mit TE mit 1%-igem SDS eluiert. Die Vernetzung der DNA mit den Proteinen wurde durch Inkubation eine Stunde bei 65°C und anschließend durch Zugabe von Proteinase K bei 55°C über Nacht gelöst. Zum Schluß wurde die DNA durch Phenolisierung gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und in 20 µl TE resuspendiert. Zwei µl dieser CHIP-DNA wurden mit der „real time“-PCR vermessen.

RSB: 10 mM Tris (pH 8,0), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 Tabl. „Complete Proteinase“-Inhibitor  
SNSB: 1 M NaCl, 10 mM Tris (pH7,4), 0,1 % NP-40, 1 mM EDTA, 1 Tabl. Complete Proteinase-Inhibitor

## IV. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung humaner Replikationsursprünge und damit einhergehend die Entwicklung einer funktionellen Analysemethode zur Isolierung von Replikationsursprüngen in humanen Zellen.

Eingangs wurde die Funktionalität des Replikationsassays für humane DNA-Sequenzen überprüft. Dies erfolgte anhand des LaminB2-Replikationsursprungs.

Im zweiten Teil dieser Arbeit gelang es, durch die Verknüpfung des transienten Replikationsassays mit der Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) einen ARS-Assay in humanen Zellen zu entwickeln, den „origin trapping“-Assay. In diesem Versuch wurden Orc2-bindende DNA-Sequenzen mittels ChIP angereichert und hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit im Replikationsassay analysiert. Insgesamt konnten mit dem „origin trapping“-Assay sechs neue humane Replikationsursprünge isoliert werden. Die Charakterisierung dieser potentiellen Replikationsursprünge erfolgte mittels der „nascent strand“-Analyse und durch ChIP.

Im dritten Teil erfolgte die nähere Analyse eines potentiellen Replikationsursprungs, des Or6. Durch Multimerisierung der Or6-Sequenz konnte die extrachromosomale Replikation verstärkt werden. Weitere Mutationsanalysen bestätigten im Replikationsassay Or6 als die für die extrachromosomale Replikation verantwortliche DNA-Sequenz.

## 1 Etablierung des transienten Replikationsassays in humanen Zellen

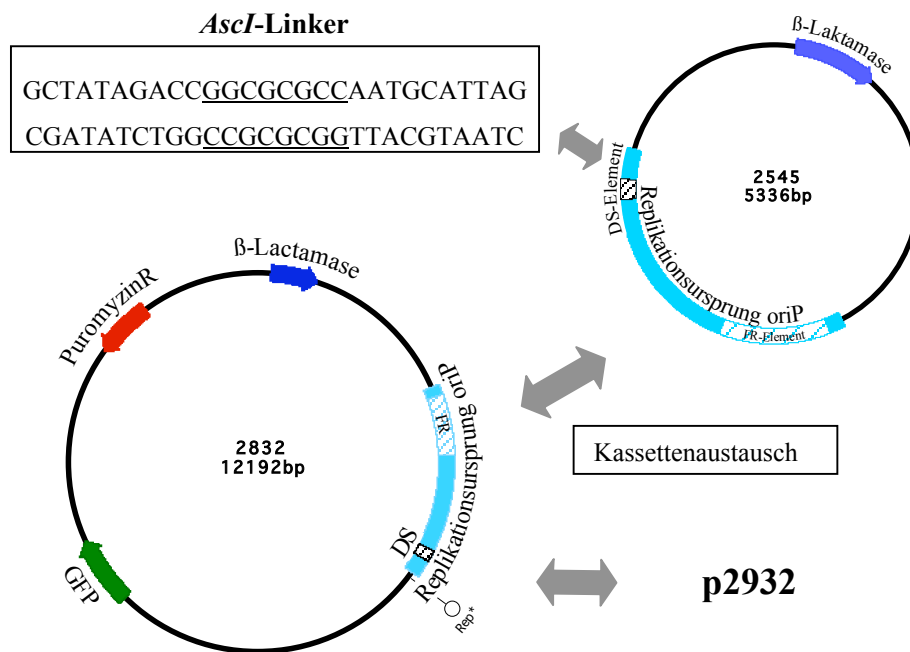
1989 versuchten Calos et al. einen ARS-Assay in humanen Zellen mit Hilfe des viralen Replikationsursprungs *oriP* zu etablieren (Krysan et al., 1989). Dabei nutzten sie als virale Komponenten das Protein EBNA1 und das FR-Element, um die episomale Stabilität der untersuchten Plasmide in humanen Zellen zu gewährleisten. Mit diesen EBNA1 exprimierenden FR-Vektoren untersuchte sie humane Sequenzen hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit in 293-Zellen in der Hoffnung, humane Replikationsursprünge zu finden. Calos und Kollegen stellten im sogenannten Replikationsassay fest, dass ab einer Größe von 6000 Basenpaaren jegliche eukaryotische Sequenz die extrachromosomale Replikation in humanen Zellen unterstützt (Heinzel et al., 1991).

Um humane DNA-Sequenzen hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit testen zu können, wurde der Replikationsassay (Krysan et al., 1993a; Yates et al., 1985) in humanen Nierenkarzinom-Zellen 293/EBNA1, in welchen das zusätzlich integrierte Protein EBNA1 expremiert wird, etabliert. Dazu wurde ein Ursprungs-Plasmid p2932 mit dem FR-Element sowie mit einem Selektionsmarker konstruiert. In dieses Plasmid wurde der LaminB2-Origin kloniert. Zur Prüfung der Funktionalität des Replikationsassays in humanen Zellen wurde die Replikationsfähigkeit dieser Plasmide getestet.

### 1.1 Herstellung und Analyse der verschiedenen *oriP*- und LaminB2-Origin-Konstrukte

#### Konstruktion von p2932

Aus dem Plasmid p2545, welches den minimalen latenten EBV-Replikationsursprung *oriP* enthält, wurde das DS-Element entfernt und durch eine *AscI*-Schnittstelle ersetzt (siehe Abb. 9). Das Restriktionsenzym *AscI* wurde ausgesucht, weil es eine selten vorkommende DNA-Sequenz erkennt. Dann wurde diese mutierte *oriP*-Kassette in den Vektor p2832 an die Stelle der *oriP*-Kassette kloniert. Das neu entstandene Plasmid p2932 enthält somit neben dem FR-Element, welches das Plasmid extrachromosomal in den 293/EBNA1-Zellen erhalten soll, das Puromycinresistenzgen, das eGFP-Gen und das Ampizillin-Resistenzgen.



**Abb. 9: Austausch des DS-Elements durch eine *Ascl*-Schnittstelle:**

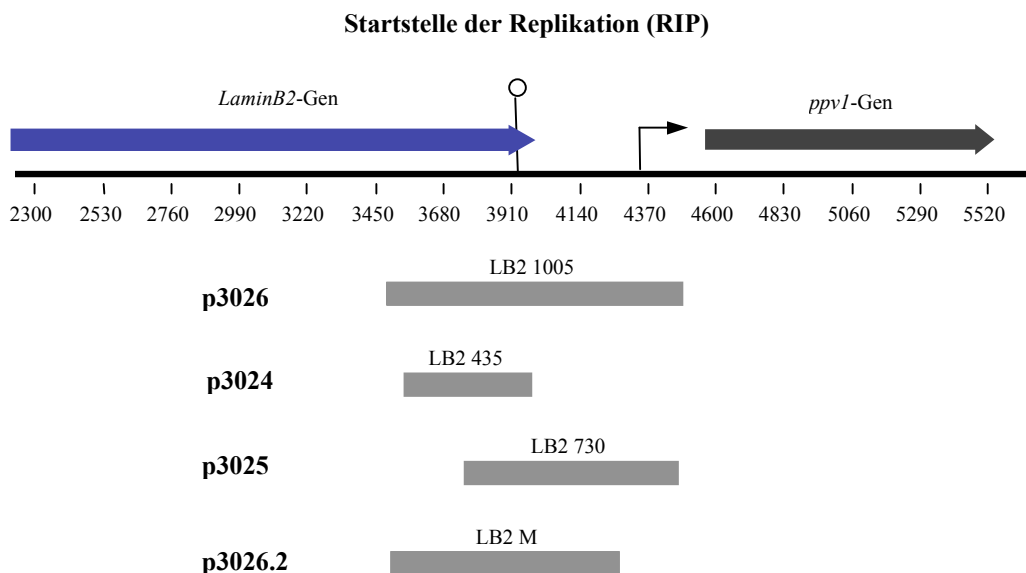
Das DS-Element des viralen Replikationsursprunges *oriP* im Vektor p2545 wurde durch eine *Ascl*-Schnittstelle ersetzt. Durch eine Kassettenmutagenese wurde die mutierte *oriP*-Sequenz mit dem FR-Element und der *Ascl*-Schnittstelle an die Stelle der vorhandenen *oriP*-Sequenz in den Vektor p2832 eingesetzt. Es entstand der Vektor p2932, welcher neben der mutierten *oriP*-Kassette mit dem FR-Element ein eGFP-, ein Puromycinresistenz- und ein Ampizillinresistenz-Gen enthält.

#### Herstellung der LaminB2-Origin-Konstrukte

Um die Funktionalität des Replikationsassays zu untersuchen, wurden unterschiedliche Fragmente des gut charakterisierten LaminB2-Orgins (LB2) an die Stelle des DS-Elements in den Vektor p2932 kloniert. Der LaminB2-Origin liegt am 3'-Ende des LaminB2-Gens und enthält die Promotorregion des nächsten Gens, *ppv1*. Dieser Replikationsursprung ist bis auf eine Base genau auf dem Genom kartiert (Abdurashidova et al., 2000). Der „replication initiation point“ (RIP), welcher zwischen dem Leit- und Folge-Strang liegt, befindet sich an Position 3930 (siehe Abb. 10).

Da die erworbenen Plasmide von der Firma RZPD nur Teilstücke der LB2-Sequenz enthielten, wurden folgende drei Konstrukte angefertigt (siehe Abb. 10): der Vektor p3024 enthält 435 bp, p3025 730 bp und p3026 1005 bp der LB2-Sequenz (dazu Punkt II.4). Alle

drei LB2-Fragmente enthalten den RIP, an welchem die Replikation beginnt. Die kürzeste LB2-Sequenz LB2<sub>435</sub> (p3024) enthält am 3'-Ende den RIP. Nach dem RIP folgen nur noch 30 Basenpaare. Die anderen konstruierten LB2-Konstrukte enthalten einen größeren Bereich um den RIP. Bei dem LB2-Fragment (p3026) mit 1005 Basenpaaren der LB2-Sequenz befindet sich der RIP in der Mitte. In der LB2-Sequenz mit 700 Basenpaaren der LB2-Sequenz befindet sich der RIP im 5'-Bereich der Sequenz. Das LB2-Fragment LB2<sub>M</sub> wurde später in den Vektor p2932 in die *AscI*-Schnittstelle eingesetzt (siehe Punkt IV.1.3). In Abbildung 10 sind alle klonierten LB2-Sequenzen skizziert.



**Abb. 10: Die Struktur des humanen LaminB2-Replikationsursprunges und die verschiedenen amplifizierten Fragmente:**

Der LaminB2-Origin liegt zwischen dem LaminB2-Gen (blauer Pfeil) und dem *ppv1*-Gen (schwarzer Pfeil). Die Startstelle der DNA-Replikation ist gekennzeichnet durch einen grauen Punkt an Position 3930. Alle LB2-Konstrukte beinhalten die Initiationsstelle und sind als graue Abschnitte skizziert. Das Plamid p3026 enthält das LB2-Fragment LB2<sub>1005</sub>. Das Plasmid p3025 beinhaltet die Sequenz LB2<sub>730</sub>. Die kleinste LB2-Sequenz LB2<sub>435</sub> befindet sich im Plasmid p3024. P3026.2 besteht aus der LB2<sub>1005</sub>-Sequenz ohne 250 bp am 5'-Ende (LB2<sub>M</sub>). Alle vier Konstrukte ersetzen in dem Plasmid p2932 das DS-Element.



### Analyse von p2932 und der verschiedenen LB2-Konstrukte im Replikationsassay

Im Replikationsassay wurden die verschiedenen *oriP*- und LaminB2-Konstrukte hinsichtlich ihrer episomalen Replikationsfähigkeit untersucht. Dazu wurden zwei µg Plasmid-DNA in 293/EBNA1-Zellen, welche das stabil integrierte Protein EBNA1 exprimieren, transfiziert. Die Expression des Proteins wurde zuvor durch einen Western-Blot überprüft. EBNA1 ist für die Erhaltung der FR-Plasmide in den Zellen essentiell. Nach zwei bis drei Wochen unter Puromycin-Selektion wurde die niedermolekulare DNA aus den Zellen mittels des Hirt-Protokolls isoliert.

Die Extrachromosomalität der untersuchten Konstrukte wurde mit zwei verschiedenen Methoden analysiert. Bei beiden Analysen wurde zunächst die isolierte DNA mit dem Restriktionsenzym DpnI inkubiert, um die transfizierte bakterielle DNA zu fragmentieren. Danach wurde die isolierte DNA entweder durch einen Southern-Blot oder durch ein Plasmid-Wiedergewinnungs-Experiment („plasmid rescue“) analysiert. Für den „plasmid rescue“-Versuch wurden 500 ng der DpnI-behandelten Hirt-Extrakte in elektrokompetente DHB10-Bakterienzellen transformiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien pro Platte ausgezählt. Für den Southern-Blot wurden zwei µg von den Hirt-Extrakten mit DpnI und zusätzlich mit dem Enzym *BamHI* inkubiert, um die Plasmide zu linearisieren. Der Southern-Blot wurde mit der radioaktiven Probe p2832 hybridisiert.

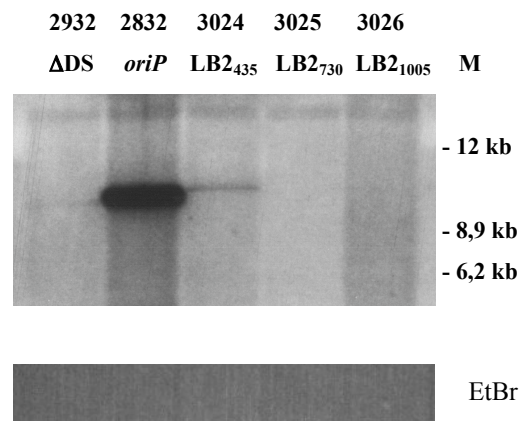
Im Replikationsassay wurde die Replikationsfähigkeit der verschiedenen LaminB2-Origin-Fragmente sowie der Plasmide p2932 und p2832 als Standards analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 zusammengefasst. Die ersten Versuche zeigten, dass das *oriP*-enthaltende Plasmid p2832 sehr effizient in humanen Zellen repliziert wird. Dies kann man an der Stärke der Banden des Southern-Blots und an der Anzahl der Kolonien des „plasmid rescue“-Versuches erkennen. Das Plasmid p3024 mit der 500 bp langen LB2-Sequenz wurde schwach in den 293/EBNA1-Zellen repliziert. Das Plasmid p2932 ohne DS-Element wurde ebenfalls in geringen Mengen extrachromosomal erhalten, aber im Vergleich zum Plasmid p3024 war die Replikationseffizienz des Plasmids p2932 um den Faktor 2 geringer. Die anderen Konstrukte der LB2-Sequenz LB2<sub>730</sub> und LB2<sub>1005</sub> wurden nicht repliziert. In diesen Puromycin-resistenten und GFP-exprimierenden Zellen wurden die Plasmide p3025 und p3026 wahrscheinlich in das Genom der Zelle integriert.

Diese Versuche bestätigen, dass es prinzipiell möglich ist, Plasmide extrachromosomal in humanen Zellen zu erhalten und somit ihre Replikationsfähigkeit zu testen. Denn wie gezeigt, wurde das DS-deletierte Plasmid p2932 im Gegensatz zum *oriP*-Plasmid p2832, welches eine starke Replikationsfähigkeit aufwies, schwach repliziert. Die Replikationsfähigkeit der verschiedenen Konstrukte des humanen LaminB2-Replikationsursprunges war sehr unterschiedlich. Die beiden größeren LB2-Sequenzen unterstützten die DNA-Replikation des Plasmides p2932 nicht, während das Plasmid p3024 mit dem kürzesten LB2-Fragment schwach repliziert wurde. Die Versuche zeigen, dass auch kleinere humane DNA-Fragmente die episomale Replikation unterstützen können, allerdings ist die Effizienz sehr gering. Außerdem stellt sich die Frage nach dem Aufbau des LaminB2-Origins.

#### A „plasmid rescue“-Analyse

Plasmid	Insert	Kolonien
2932	$\Delta$ DS	80
2832	<i>oriP</i>	3012
3024	LB2 <sub>435</sub>	170
3025	LB2 <sub>730</sub>	0
3026	LB2 <sub>1005</sub>	0

#### B Southern-Blot



### Abb. 11: Analyse der verschiedenen *oriP*- und LB2-Konstrukte hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit in humanen 293/EBNA1-Zellen.

Untersuchung der Plasmide p2832 (*oriP*), p2932 (DS-deletiertes *oriP*) und der verschiedenen LB2-Konstrukte auf ihre Replikationsfähigkeit. Nach zwei Wochen unter Selektion mit Puromycin wurde die DNA aus den Zellen isoliert und mit dem Enzym DpnI inkubiert, um die bakterielle DNA zu zerkleinern. Anschließend wurden die Plasmide auf Extrachromosomalität mittels des Plasmid-Wiedergewinnungs-Versuchs („plasmid rescue“) (A) und durch einen Southern-Blot (B) überprüft. Für den Southern-Blot wurde die DNA zusätzlich mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI zur Linearisierung der Plasmide inkubiert. Zur Überprüfung, ob gleiche Mengen an DNA im Southern-Blot eingesetzt wurden, erfolgte eine Ethidiumbromid-Färbung (EtBr) des Gels.

## 1.2 Herstellung und Analyse der Konstrukte LB<sub>M</sub> und p3407 zur Bestätigung der Funktionalität des Replikationsassays

Die im vorherigen Abschnitt geschilderten Experimente zeigen, dass nur das Plasmid mit dem kleinsten LB2-Fragment im Replikationsassay repliziert wurde. Dies deutet daraufhin, dass DNA-Motive im 3'-Bereich des LB2-Origins möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Replikationseffizienz haben. Um diese These zu überprüfen, wurde ein weiteres LaminB2-Konstrukt hinsichtlich seiner Replikationsfähigkeit im Replikationsassay analysiert. Die zwei nicht replizierenden größeren LB2-Konstrukte unterscheiden sich von der replizierenden kleineren LB2-Sequenz hauptsächlich durch den 3'-Bereich. Aus diesem Grund wurden 250 Basenpaare vom 3'-Ende des LB2<sub>1005</sub>-Fragmentes entfernt (siehe Abb. 10). Es entstand das Plasmid p3026.2 mit einem 750 bp langen LB2-Fragment (LB<sub>M</sub>).

Als weitere Kontrolle wurde eine von Knippers Gruppe näher beschriebene humane DNA-Sequenz Ex9 in die *AscI*-Schnittstelle des Vektor p2932 kloniert. Diese humane 400 bp lange DNA-Sequenz liegt auf dem Chromosom 8 im Exon 9 des Mcm4-Gens (Schaarschmidt et al., 2002). Diese Sequenz wird nicht von dem Protein Orc2 gebunden. Dies wurde anhand von ChIP-Experimenten gezeigt. Außerdem bestätigten die „nascent strand“-Analysen, dass diese Sequenz keine Startstelle der Replikation ist. Das neu erstellte Plasmid mit der Ex9-Sequenz hat die Bezeichnung p3407.

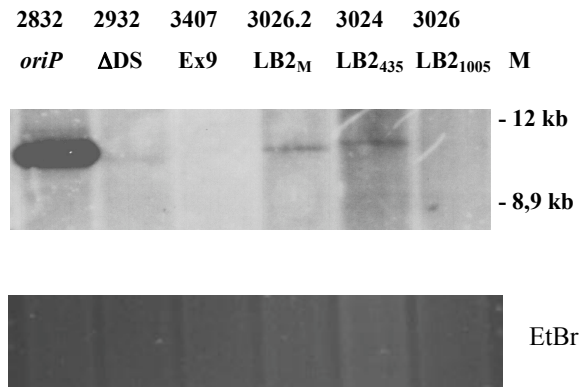
Die ARS-Aktivität dieser neuen Konstrukte wurde im Replikationsassay untersucht. Das Resultat ist in Abbildung 12 dargestellt. Wie schon oben beschrieben, wurde das Plasmid p3024 mit der LB2<sub>437</sub>-Sequenz gegenüber p2932 mit doppelter Effizienz repliziert. Das Plasmid mit dem DNA-Fragment LB2<sub>1005</sub> wurde nicht in 293/EBNA1-Zellen repliziert. Der Ursprungsvektor p2932 und das Plasmid p3407 mit der humanen Ex9-Sequenz wurden sehr schwach repliziert. Das neu konstruierte Plasmid p3026.2 mit der LB2<sub>M</sub>-Sequenz wurde stärker repliziert, wie man an der Bande im Southern-Blot und an der Kolonienzahl des „plasmid rescue“-Experiments detektieren konnte. Die Replikationseffizienz von p3026.2 ist um das 8-fache höher als die von p2932. Somit unterstützt dieses DNA-Fragment die episodale DNA-Replikation im Kontext mit dem FR-Element. Das Plasmid p3026.2 mit einer etwa 300 bp längere LB2-Sequenz wurde stärker als das Plasmid p3024 (LB2<sub>437</sub>) repliziert. Hier liegt die Schlussfolgerung nahe, dass durch weitere

funktionale Elemente die Replikationseffizienz erhöht wurde. Das Ziel, die Funktionalität des Replikationsassay für humane DNA-Sequenzen zu verifizieren, wurde hiermit erreicht.

**A** „plasmid rescue“-Analyse

Plasmid	Insert	Kolonien
2832	<i>oriP</i>	3200
2932	$\Delta$ DS	12
3407	Ex9	9
3026.2	LB2 <sub>M</sub>	100
3024	LB2 <sub>437</sub>	31
3026	LB2 <sub>1005</sub>	3

**B** Southern-Blot



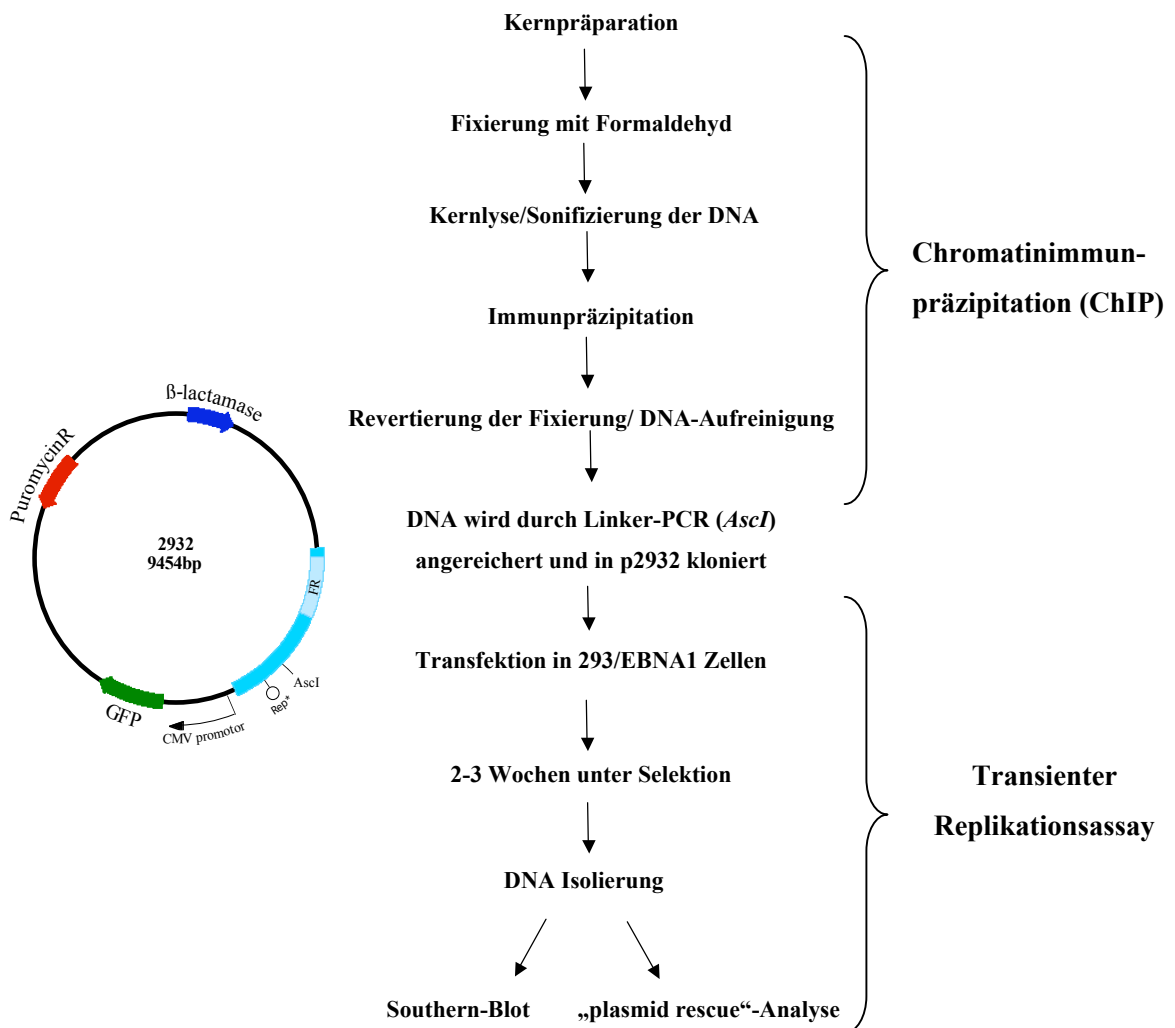
**Abb. 12: Untersuchung des LB2-Konstrukts LB2<sub>M</sub> und der humanen Sequenz Ex9 im Replikationsassay:**

Das Plasmid p3407, das die humane Sequenz des Exons 9 vom Mcm4-Gen enthält (Ex9) und p3026.2, das dieselbe LB2-Sequenz wie p3026 ohne 250 bp des 3'-Endes (LB2<sub>M</sub>) wurden auf ihre Replikationsfähigkeit analysiert. **(A)** Im „plasmid rescue“-Versuch wurden die Hirt-Extrakte mit *DpnI* inkubiert, bevor die DNA in Bakterien transformiert wurde. **(B)** Für den Southern-Blot wurden die Hirt-Extrakte mit *DpnI* und *BamHI* inkubiert, um die Plasmide zu linearisieren. Als Positiv-Kontrolle wurde das Plasmid p2832 (*oriP*) und als Negativ-Kontrolle das Plasmid p2932 ( $\Delta$ DS) zusammen mit den Plasmiden p3024 (LB2<sub>435</sub>), p3026 (LB2<sub>1005</sub>) in 293/EBNA1-Zellen transfiziert.

## 2 Der „origin trapping“-Assay

Zur Identifizierung neuer humaner Replikationsursprünge wurden genomische Sequenzen, welche vom ORC gebunden werden, im Replikationsassay analysiert. Im ersten Teil des „origin trapping“-Assays wurden diese Orc2-bindenden Sequenzen mit Hilfe der Chromatinimmunpräzipitation angereichert. Im zweiten Teil wurden die isolierten ChIP-

Fragmente hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit (ARS-Aktivität) im Replikationsassay untersucht. Das Schema des „origin trapping“-Assay ist in Abbildung 13 skizziert.



**Abb. 13:** Schema des „origin trapping“-Assay:

Zuerst wurden humane DNA-Sequenzen mit Hilfe der ChIP-Methode angereichert. Dann wurden die Orc2-bindenden Sequenzen in die *AscI*-Schnittstelle des Vektor p2932 kloniert. Diese Plasmide wurden in 293/EBNA1-Zellen transfiziert und zwei bis vier Wochen unter Selektion gehalten. Anschließend wurde die DNA isoliert und mittels Southern-Blot und „plasmid rescue“-Analyse untersucht. Die replizierenden Plasmide blieben extrachromosomal in der Zelle erhalten.

## 2.1 Anreicherung der humanen Orc2-bindenden DNA-Sequenzen

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden zuerst die Kerne der humanen mini-EBV-B-Zelllinie A39 isoliert. Dies erfolgte nach einem Protokoll von Mendez (Mendez and

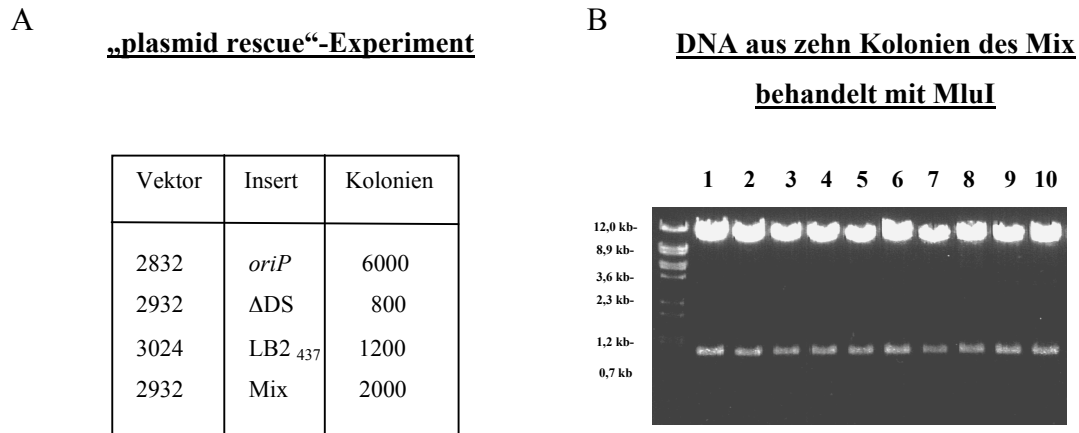
Stillman, 2000). Dann wurden die Kerne mit 1%-iger Formaldehydlösung behandelt. Dadurch wurden die Proteine kovalent mit der DNA verknüpft. Nach der Lyse der Kerne durch Sarkosyl wurden die löslichen Proteine im Sucrose-Gradienten von den DNA-gekoppelten Proteinen abgetrennt. Das Chromatin wurde mittels Sonifizierung und Mikrokokken-Nuklease-Behandlung in ca. 200 bis 2000 bp lange DNA-Fragmente zerkleinert. Diese Extrakte wurden anschließend mit einem Orc2-Antikörper bzw. mit dem Preimmunserum als Kontrolle inkubiert. Nach der Immunpräzipitation wurde die Protein-DNA-Quervernetzung revertiert und die Proteine durch die Proteinase K hydrolysiert. Die ChIP-DNA wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt.

Durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Enzym wurden die Enden geglättet und über Nacht an den *AscI*-Linker legiert. Insgesamt wurde nur eine sehr geringe Menge an DNA aus einem ChIP-Experiment gewonnen. Infolgedessen wurde eine PCR mit dem *AscI*-Linker als Primer angeschlossen. Die DNA-Sequenzen wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und aus diesem DNA-Pool wurden die 200 bis 500 bp langen DNA-Fragmente isoliert. Es wurden kleine Fragmente ausgewählt, um deutlich unter 6000 bp zu bleiben. Wie Calos et al. in ihren Arbeiten gezeigt haben, replizieren alle humanen DNA-Sequenzen im Replikationsassay ab einer Größe von 6000 bp (Krysan et al., 1993a). Die mit dem ChIP angereicherten Orc2-bindenden Sequenzen wurden mit dem Restriktionsenzym *AscI* gespalten und an die Stelle in den Vektor p2932, an welcher ursprünglich das DS-Elements plaziert war, kloniert. Insgesamt wurden auf diese Weise ca. 1000 individuelle Plasmide isoliert. Von diesen wurden 99 Plasmide in Gruppen von vier bis sechs Stück im Replikationsassay untersucht.

## 2.2 Untersuchung der Orc2-bindenden Sequenzen im Replikationsassay

Die Analyse der Replikationsfähigkeit der Orc2-bindenden-Sequenzen erfolgte, wie schon vorher erwähnt, in Gruppen. Je 400 ng der ersten fünf FR-Plasmide mit ChIP-DNA wurden zusammengemischt und in 293-EBNA1-Zellen transfiziert. Parallel dazu wurden die Plasmide p2832 (*oriP*) als Positiv-Kontrolle bzw. p2932 (DS-deletierte *oriP*) als Negativ-Kontrolle im Replikationsassay untersucht. Nach zwei Wochen wurde die

niedermolekulare DNA isoliert und der extrachromosomale Status der verschiedenen Plasmide mittels der „plasmid rescue“-Analyse überprüft (siehe Abb. 14A).



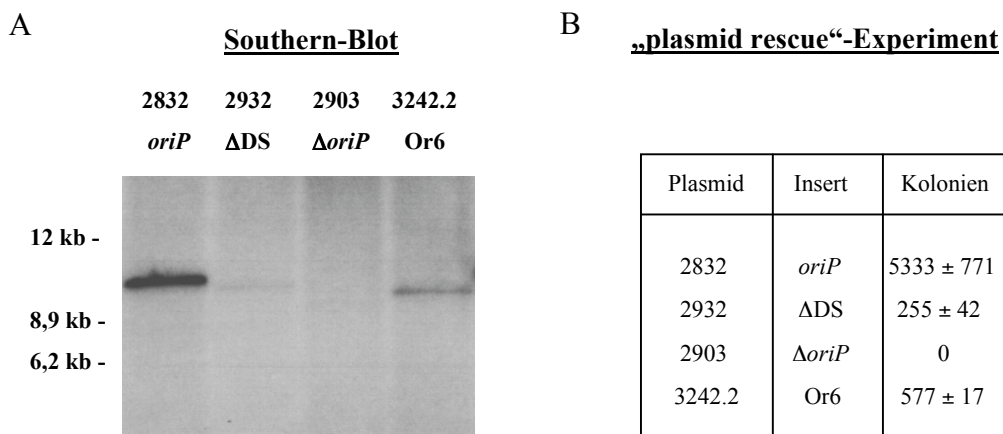
**Abb. 14: Analyse der Replikationsfähigkeit der ersten fünf hOrc2-bindenden Sequenzen (Mix) in humanen 293/EBNA1-Zellen:**

(A) Nach zwei Wochen unter Puromycin-Selektion wurde die niedermolekulare DNA mittels des Hirt-Protokolls extrahiert und der extrachromosomale Status der Plasmide überprüft; als Negativ-Kontrolle wurde p2932 (ohne DS), als Positiv-Kontrolle p2832 und zum Vergleich p3024 (LB2<sub>437</sub>) mitgeführt. (B) Aus zehn Kolonien des „plasmid rescue“-Experiments wurden die Plasmid-DNA isoliert. Die DNA wurde mit dem Enzym *MluI* geschnitten. Die replizierende DNA-Sequenz war in allen zehn Kolonien identisch. Diese Sequenz wurde Or6 benannt.

Auf Grund des Ergebnisses des „plasmid rescue“-Versuches war zu erkennen, dass eine oder mehrere Orc2-bindenden Fragmente aus dem Pool besser replizierten als p2932. Um die replizierenden Sequenzen zu identifizieren, wurde die Plasmid-DNA von zehn Kolonien des „plasmid rescue“-Experiments isoliert und mit Hilfe des Restriktionsenzym *MluI* analysiert. *MluI* schneidet 2-mal im Ausgangsvektor p2932; wobei ein 920 bp langes Fragment entsteht. Je nach Größe der eingefügten humanen DNA-Sequenz erhält man ein entsprechend längeres DNA-Stück. Nach der Restriktionsspaltung konnte man aus der Größe schließen, welche DNA-Sequenzen von den fünf zusammen untersuchten Orc2-bindenden Sequenzen replizierten. Da alle zehn Klone in diesem Experiment ein gleich großes DNA-Fragment enthielten (siehe Abb. 14B), replizierte nur eine DNA-Sequenz. Dieses Plasmid p3242.2 (Or6) wurde sequenziert. Anschließend wurde die Or6-Sequenz

mit der humanen Genomsequenz-Bibliothek des NCBI verglichen. Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei der replizierenden Sequenz um 230 Basen der 5'-UTR („untranslated region“) des humanen Retinol-Dehydrogenase-Gens (RDH) handelt.

Zur Bestätigung wurde das Plasmid p3242.2 einzeln auf seine Replikationsfähigkeit hin untersucht. Die Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen sind in Abbildung 15 dargestellt. Das Plasmid p3242.2 wurde durchschnittlich doppelt so stark repliziert wie das Ursprungsplasmid p2932. Als weitere Kontrolle wurde das Plasmid p2903 im Replikationsassay untersucht. Dieses Plasmid enthält keinen humanen oder viralen Replikationsursprung und repliziert nicht in 293/EBNA1-Zellen.



### Abb. 15: Replikationsfähigkeit von p3242.2 mit der humanen Or6-Sequenz

Zur Bestätigung wurde das Plasmid p3242.2 (Or6) nochmals einzeln im Replikationsassay getestet. In (A) ist der Southern-Blot abgebildet. In der Tabelle (B) sind vier Experimente mit „plasmid rescue“-Auswertung zusammengefasst. Als zusätzliche Negativ-Kontrolle neben p2932 wurde das Plasmid p2903, dem der ganze latente Replikationsursprung des EBV (*oriP*) fehlt, transfiziert.

Um die Beeinflussung der ARS-Aktivität durch die Zellart zu untersuchen, wurden die Replikationsfähigkeit der Plasmide p2832, p2932 und p3242.2 in Osteosarkoma-Zelllinien 143/EBNA1 analysiert. In diesen Zellen wurde die neu isolierte DNA-Sequenz Or6 ebenso wie in den Nierenkarzinom-Zelllinie 293/EBNA1 repliziert. Das Ergebnis wurde hier nicht abgebildet. Dieses Experiment zeigt, dass der „origin trapping“-Assay zelltypunabhängig funktioniert.



Nach der erfolgreichen Isolierung einer replizierenden DNA-Sequenz wurden weitere Gruppen Orc2-bindender Sequenzen im Replikationsassay untersucht. Insgesamt wurden in 24 Gruppen 99 Orc2-bindende-Sequenzen hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit getestet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Zuerst wurden die Gruppen hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit untersucht. Wies eine Gruppe mehr Kolonien im „plasmid rescue“-Experiment auf als die Negativ-Kontrolle p2932, wie z.B. Gruppe 5, wurden aus zehn Kolonien die Plasmid-DNA isoliert. Durch eine Restriktionsspaltung wurde anhand der Größe des Fragments überprüft, wie viele DNA-Sequenzen in dieser Gruppe replizierten. Dabei konnten zwei ähnlich große DNA-Sequenzen nicht voneinander unterschieden werden. In der Gruppe 5 replizierte ein DNA-Fragment effizienter als die anderen. Diese DNA-Sequenz wurde aus acht Kolonien von den untersuchten zehn Kolonien isoliert. Wenn überwiegend eine DNA-Sequenz extrachromosomal wie in Gruppe 5 erhalten blieb, wurde diese DNA-Sequenz mittels Sequenzierung, der „nascent strand“-Analyse und der ChIP-Methode näher analysiert (siehe IV.3). Die replizierenden Gruppen enthielten im Gegensatz zu den nicht replizierenden Gruppen meist eine dominante DNA-Sequenz.

Bei der Klonierung der ChIP-Sequenzen wurde in einigen Fällen wie bei Gruppe 3 und Gruppe C mehrere zusammenhängende DNA-Sequenzen in die *AscI*-Schnittstelle von p2932 eingesetzt. Dies passierte z.B. dann, wenn die Fragmente bei der ungerichteten Ligation nicht mit dem Linker, sondern mit anderen Fragmenten verbunden wurden. Diese Fragmente waren meist sehr klein (unter 200 bp) und ihre Replikationsfähigkeit gering. Diejenigen Orc2-bindende Sequenzen, welche eine sehr geringe Anreicherung an „nascent strand“-DNA zeigten, wie z.B. in Gruppe 13 und C, wurden nicht weiter analysiert. Die Sequenzen OrIII und eine repetitive DNA-Sequenz vom Chromosomen Y (Gr. 6) wurden 2-mal unabhängig voneinander im Replikationsassay isoliert. OrIII konnte als Startstelle der Replikation im Genom durch die „nascent strand“-Analyse bestätigt werden. Das repetitive Fragment konnte mit der „nascent strand“-Methode nicht weiter analysiert werden, da diese Sequenz auf dem Chromosomen alle fünf kb wieder auftaucht. Für die „nascent strand“-Analyse benötigt man für den Vergleich eine Sequenz, die drei bis zehn kb von der untersuchten Sequenz weiter entfernt liegt.

Gruppe	„plasmid rescue“- Analyse	Häufigkeit der Sequenzen	Sequenzlänge (bp)	„nascent strand“- Analyse
1	2 x mehr als 2932	(5) 10	249	+ (Or6)
2	weniger als 2932	(4)		
3	wie 2932	(5) 9,1	3 x (91,148,180)	-
4	weniger als 2932	(4) 3,3,2,2		
5	4 x mehr als 2932	(3) 8,2	411	+ (Orß)
6	2,4 x mehr als 2932	(4) 4,3,2,1	140	repetitive Seq.
7	weniger als 2932	(4)		
8	2 x mehr als 2932	(4) 4,3,2,1	120	-
9	2 x mehr als 2932	(4) 9,1	223	+ (Or9)
10	wie 2932	(4) 6,2,1,1	330	+ (Or10)
11	weniger als 2932	(4)		
12	weniger als 2932	(4)		
13	2,5 x mehr als 2932	(4) 6,3,1	238	-
14	2 x mehr als 2932	(3) 5,2,3	209	-
15	2,5 x mehr als 2932	(4) 6,2,2,1	203	+ (Or15)
16	2 x mehr als 2932	(3) 5,2,1	213	-
A	4 x mehr als 2932	(6) 5,2,2,1	120	selbe wie Gr.6
B	weniger als 2932	(6)		
C	4 x mehr als 2932	(4) 6,3,1	2 x (222,257)	-
D	weniger als 2932	(6) 3,3,1,1,1		
I	wie 2932	(4) 3,3,2,1		
II	2 x mehr als 2932	(4) 4,3,2,1	166	-
III	weniger als 2932	(4) 7,2,1	480	+ (OrIII)
IV	2 x mehr als 2932	(4) 5,2,2,1	480	+ (selbe wie III)

**Tabelle 3: Untersuchung von 24 Gruppen Orc2-bindender Sequenzen auf ihre Replikationsfähigkeit hin:**

In der zweiten Spalte ist das Verhältnis der „plasmid rescue“-Kolonienzahl zur Negativ-Kontrolle p2932 aufgelistet. In der dritten Spalte wurde die Anzahl der replizierenden Gruppenmitglieder

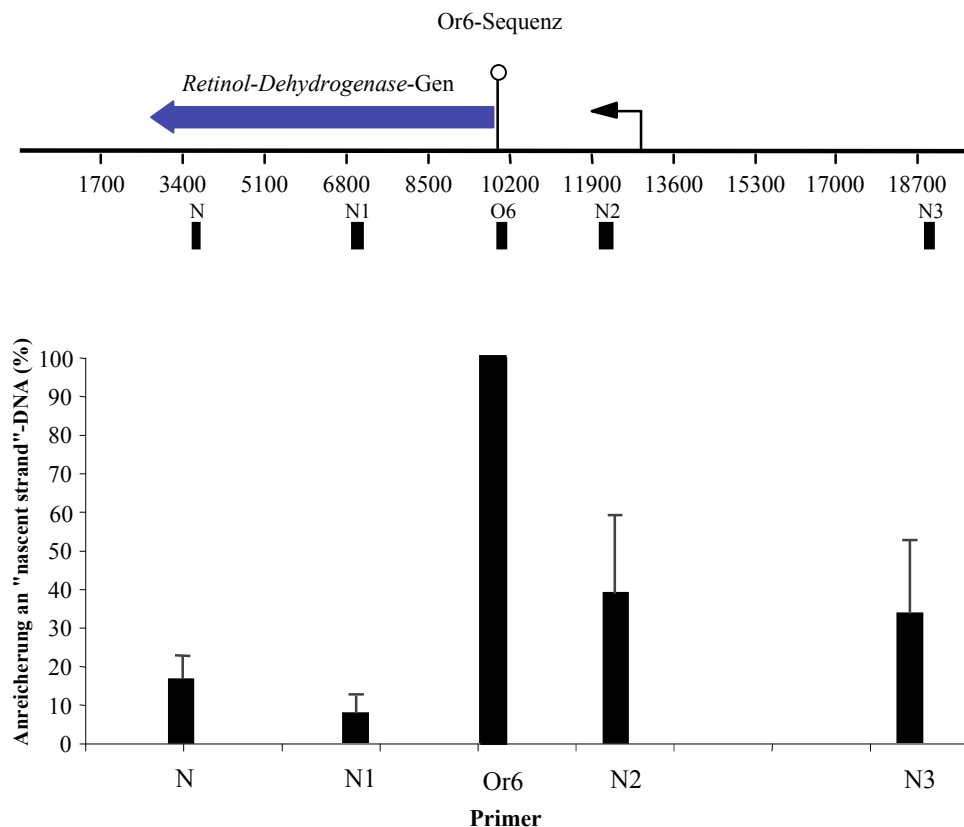
analysiert (in Klammer steht die Anzahl der transfizierten Sequenzen; fett gedruckt ist die dominierende DNA-Sequenz). In der vierten Spalte ist die Größe der replizierenden Sequenz in Basenpaaren (bp) angegeben und in der letzten Spalte wurde nach der „nascent strand“-Analyse festgestellt, ob diese Sequenz eine Initiationstelle der DNA-Replikation im Genom ist. Potentielle Replikationsursprünge wurde mit einem (+) gekennzeichnet. Lag ein solcher nicht vor, wurde ein (-) eingetragen.

### **3 Bestätigung der im „origin trapping“-Assay isolierten DNA-Sequenzen als Replikationsursprünge**

#### **3.1 Analyse der replizierenden Sequenzen mit der „nascent strand“-Methode**

Mit der „nascent strand“-Methode wurde untersucht, ob die 14 im „origin trapping“-Assay isolierten DNA-Sequenzen aktive Startstellen der DNA-Replikation im chromosomalen Kontext sind. Eingangs wurde die naszierende DNA, die sogenannte „nascent strand“-DNA, aus den Zellen isoliert. Dafür wurden die A39-Zellen, wie im Methodenteil unter Punkt III.3.9 beschrieben, lysiert. Nach der Lyse der Zellen wurde die genomische DNA in einem alkalischen Agarosegel aufgetrennt. Aus diesem Gel konnten die in der Zelle naszierenden DNA-Fragmente von 800 bis 1300 bp Länge extrahiert werden. Für die zu analysierende Stelle, den potentiellen Replikationsursprung sowie stromaufwärts und stromabwärts weiter entfernt von dieser Sequenz, wurden Primer entworfen. Anschließend wurde mit Hilfe der quantitativen „real time“-PCR bestimmt, wie viel naszierende DNA in den verschiedenen DNA-Regionen im Genom vorliegt.

Zuerst wurde die „nascent strand“-DNA in der chromosomalen Or6-Region vermessen. Die Ergebnisse von sechs aufgereinigten „nascent strand“-DNA sind in Abbildung 16 zusammengefasst. Die höchste Anreicherung von naszierenden DNA-Fragmenten war in der Or6-Region zu beobachten. Diese Anreicherung wurde auf 100 % gesetzt. Schon zwei bis drei kb weiter entfernt war nur noch eine 10 bzw. 40 %ige Anreicherung von „nascent strand“-DNA zu verzeichnen. Zehn kb entfernt von dem potentiellen Replikationsursprung Or6 wurde eine 15 bzw. 30%ige Anreicherung von naszierender DNA gemessen. Dies deutet daraufhin, dass sich im 5'-UTR des humanen Retinol-Dehydrogenase-Gens ein Replikationsursprung befindet.

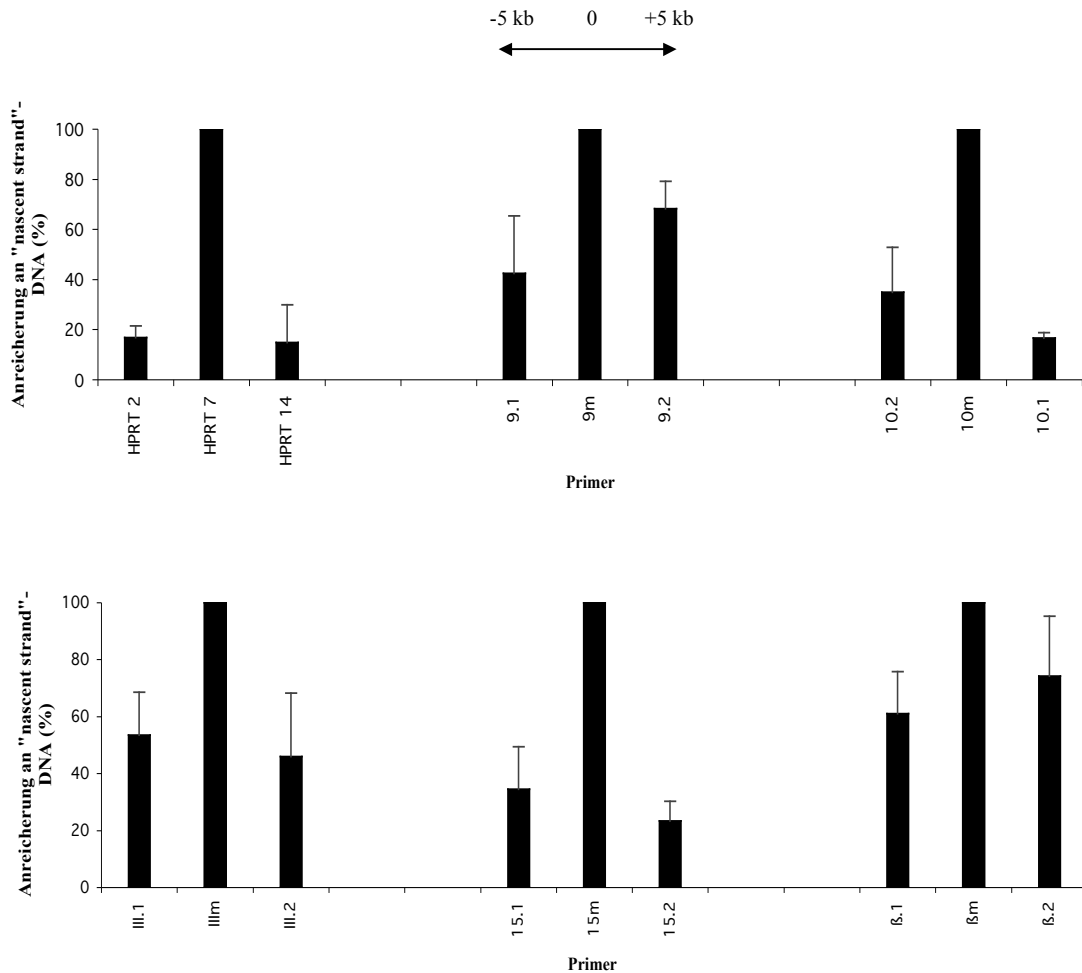


### Abb. 16: „Nascent strand“-Analyse der Or6-Sequenz:

Die humane Or6-Sequenz liegt in der 5'UTR des Retinol-Dehydrogenase-Gens, wie im Bild schematisch dargestellt. Die für die Analyse benutzten Amplikons sind ebenfalls eingezeichnet. Das Primerpaar Or6 bindet direkt in der replizierenden Sequenz, die anderen Primerpaare amplifizieren DNA-Fragmente, die 2 kb (N2), 3 kb (N1), 7 kb (N3) und 10 kb (N) entfernt von dieser DNA-Sequenz liegen. Mit Hilfe der quantitativen „real-time“-PCR wurde die isolierte „nascent strand“-DNA mit den verschiedenen Primerpaaren vermessen. Für das Or6-PCR-Produkt wurde die höchste Anreicherung von „nascent strand“-DNA gemessen und auf 100% gesetzt. Das relative Verhältnis der Kontrollamplifikate (N-N3) zum Or6-Wert wurde ermittelt. Insgesamt wurden sechs unabhängig aufgereinigte „nascent strand“-DNAs quantifiziert.

Als Kontrolle für die Qualität der einzelnen „nascent strand“-DNA-Präparationen wurde der HPRT-Origin verwendet (Cohen et al., 2002). In Abbildung 17 ist das Ergebnis der „nascent strand“-Analyse des HPRT-Origins dargestellt. Das Primerpaar HPRT7 bindet in der Region des Replikationsursprungs. Die anderen beiden Primerpaare HPRT2 und HPRT14 binden jeweils fünf kb ab- bzw. aufwärts von dieser DNA-Sequenz. Die größte

Anreicherung von „nascent strand“-DNA war im Bereich des HPRT-Origin zu verzeichnen. Dies bestätigt, dass die Aufreinigung der naszierenden DNA aus der Zelllinie A39 erfolgreich war.



**Abb. 17: „Nascent strand“-Analyse des HPRT-Orgins und der neuen potentiellen Replikationsursprünge:**

Drei unabhängig voneinander aufgereinigte „nascent strand“-DNAs wurden mit Hilfe der quantitativen „real time“-PCR untersucht. Als Kontrolle wurde der HPRT-Origin analysiert. Das Primerpaar HPRT2 bindet fünf kb abwärts und das Primerpaar HPRT14 bindet fünf kb aufwärts von dem HPRT-Origin (HPRT7). Für jeden der sechs potentiellen Replikationsursprünge wurden drei Primerpaare getestet. Ein Primerpaar bindet fünf kb abwärts (9.1, 10.2, III.1, 15.1, beta.1) und ein Primerpaar bindet fünf kb aufwärts (9.2, 10.1, III.2, 15.2, beta.2) von der isolierten DNA-Sequenz (9.m, 10.m, III.m, 15.m, beta.m). Die Anreicherung an „nascent strand“-DNA für die Primer HPRT7 und x.m wurde auf 100% gesetzt. Die Anreicherung der „nascent strand“-DNA für die anderen Primerpaare wurde im Vergleich zum potentiellen Origin berechnet.

Die 14 Orc2-bindenden DNA-Sequenzen, welche sich im Replikationsassay als replizierende DNA-Sequenzen erwiesen (siehe Tabelle 3), wurden ebenfalls mit der „nascent strand“-Analyse untersucht. Es wurden dazu für jede Sequenz drei Primerpaare entworfen. Ein Primerpaar (x.m) amplifiziert die replizierende Sequenz und die beiden anderen Primerpaare amplifizieren einen Bereich fünf kb in 5'-Richtung bzw. 3'-Richtung entfernt von dem potentiellen Replikationsursprung (x.1, x.2). Das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 17 dargestellt. Von den 14 replizierenden DNA-Fragmenten konnten sechs als aktive Startstellen der DNA-Replikation im Genom bestätigt werden.

Zwei der replizierenden Sequenzen, Or10 und Or15, zeigten genauso wie der HPRT-Origin und Or6 fünf kb von der Initiationsstelle der DNA-Replikation entfernt einen Rückgang an „nascent strand“-DNA auf 10 bis 40 %. Die anderen potentiellen Replikationsursprünge Or9, Orβ und OrIII wiesen fünf kb weiter entfernt noch eine 45 bis 80%ige Anreicherung von „nascent strand“-DNA auf. Nichtsdestotrotz ist bei diesen drei DNA-Sequenzen mindestens eine 20%ige Anreicherung an naszierender DNA messbar. Neben der naszierenden DNA aus der Zelllinie A39 wurde auch „nascent strand“-DNA aus der Zelllinie 293/EBNA1 isoliert und mit den verschiedenen Primern untersucht. Die Ergebnisse sind hier nicht aufgeführt, weil diese der Resultate der „nascent strand“-Analyse der A39-Zellen weitgehend entsprachen. Auch in diesen Zellen wurden die sechs replizierenden Orc2-bindenden DNA-Sequenzen als Startstellen der DNA-Replikation bestätigt.

### **3.2 Untersuchung der replizierenden DNA-Sequenzen mittels ChIP im chromosomalen Kontext**

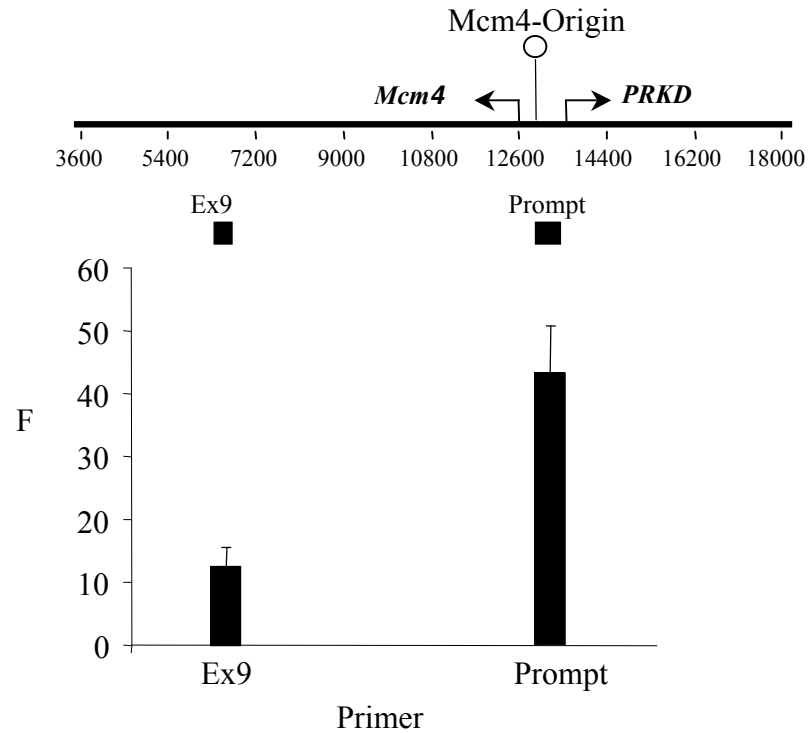
Mit der ChIP-Technik kann man die ORC-Anreicherung an spezifische genomische Sequenzen überprüfen. Da ORC keine besonders hohe Sequenzaffinität besitzt, sind die methodischen Anforderungen an den ChIP im Vergleich zu ChIP-Analysen von Transkriptionsfaktoren höher. In der Gruppe von R. Knippers wurde die ChIP-Analyse von ORC im chromosomalen Kontext mit der Beschreibung der Replikationsursprünge Mcm4 und Top1 etabliert. Das Protokoll für den ChIP im chromosomalen Kontext ist im Methodenteil unter Punkt III.4.3 beschrieben (Schaarschmidt et al., 2002). Bisher konnte

eine regionale Anreicherung von ORC mittels ChIP nur für den LaminB2-Origin bestätigt werden (Abdurashidova et al., 2003). Die in diesen Versuchen angereicherte ChIP-DNA wurde mit denselben Primern wie bei der „nascent strand“-Methode analysiert. Die Ergebnisse der ChIP-Analysen sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Die Berechnung der Orc2-Anreicherung erfolgte nach dem Protokoll von Schaarschmidt. Zuerst wurde anhand einer genomischen Reihe und der gemessenen Cp-Werte die Konzentration der ChIP-DNA bestimmt. Von der DNA-Menge der mit dem Orc2-Antikörper präzipitierten DNA wurde die Menge an unspezifisch mitgefällter DNA aus der Kontroll-IP abgezogen, so dass man die spezifische Menge an Orc2 gefällter DNA ermitteln konnte (cIP). Vor der IP wurde eine Extrakt-Probe (cEP) abgenommen. Mit der „real time“-PCR wurde die DNA-Konzentration von cEP bestimmt. Die spezifische Anreicherung F ergibt sich nach folgender Formel:

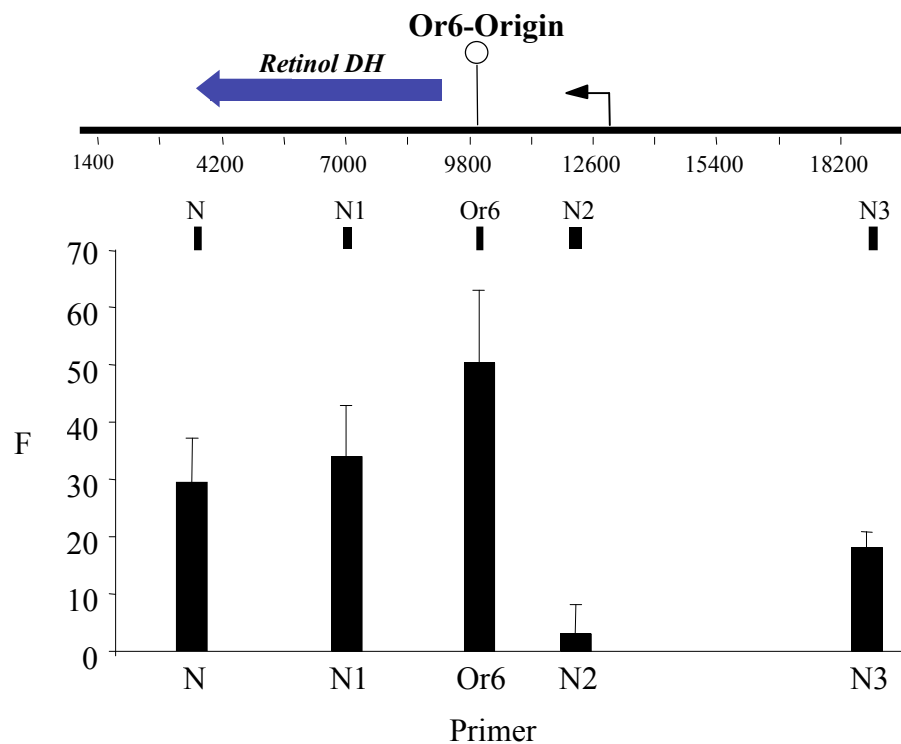
$$F = \text{cIP} / \text{cEP} \times 100$$

Der cEP wurde mit einberechnet, da postuliert wird, dass verschiedene Regionen des mit Formaldehyd behandelten Chromatins nicht mit derselben Effizienz in der PCR amplifiziert werden. Diese Beobachtungen erklärt D. Schaarschmidt damit, dass manche Regionen im Genom (wie z.B. Promotoren) durch Proteine mehr geschützt sind (wie z.B. durch Transkriptionsfaktoren) als andere. Somit kann die Mikrokokken-Nuklease an diesen Stellen nicht schneiden. Als Kontrolle wurde die Orc2-Anreicherung am Mcm4-Origin untersucht. Das Primerpaar Prompt bindet in der Mitte der Initiationsstelle, während das Primerpaar Ex9 eine Sequenz sechs kb aufwärts von der Startstelle der Replikation amplifiziert (Schaarschmidt et al., 2002). Das Mcm4-Primerpaar Prompt zeigt im Vergleich zum negativen Primerpaar Ex9 eine spezifische Anreicherung an Orc2 (siehe Abb. 18 A). Alle potentiellen Replikationsursprünge werden von dem Orc2-Protein gebunden. Allerdings wurde in der replizierenden Region der Sequenzen Or10, OrIII, Or9 und Or $\beta$  keine spezifische Anreicherung an Orc2 gemessen. In 5000 bp weiter vom Replikationsursprung entfernt liegenden Regionen wurde dieselbe Anreicherung an Orc2 im ChIP ermittelt. Der potentielle Replikationsursprung Or6 weist eine schwache Anreicherung an Orc2-Proteinen gegenüber der Region auf, die 3 bis 10 kb in 5'Richtung entfernt liegt (Abb. 18 B). Gegenüber der DNA-Region, die 2 kb in 3'Richtung vom Or6 entfernt liegt, liegt eine starke Anreicherung von Or6 vor.

A



B



**Abb. 18: Analyse der Orc2-Anreicherung an den Replikationsursprüngen Mcm4 und Or6 mittels ChIP:**

F gibt die spezifische Orc2-Anreicherung an. In (A) wurden die Anreicherung an Orc2 am Mcm4-Origin und 7 kb entfernt von diesem Replikationsursprung gemessen. (B) Für den ChIP wurden



denselben Primern (N, N1, N2, N3, Or6) wie bei der „nascent strand“-Analyse verwendet. Es wurde die Anreicherung an Orc2 in der Origin- und 3 kb bzw 10 kb entfernt davon untersucht.

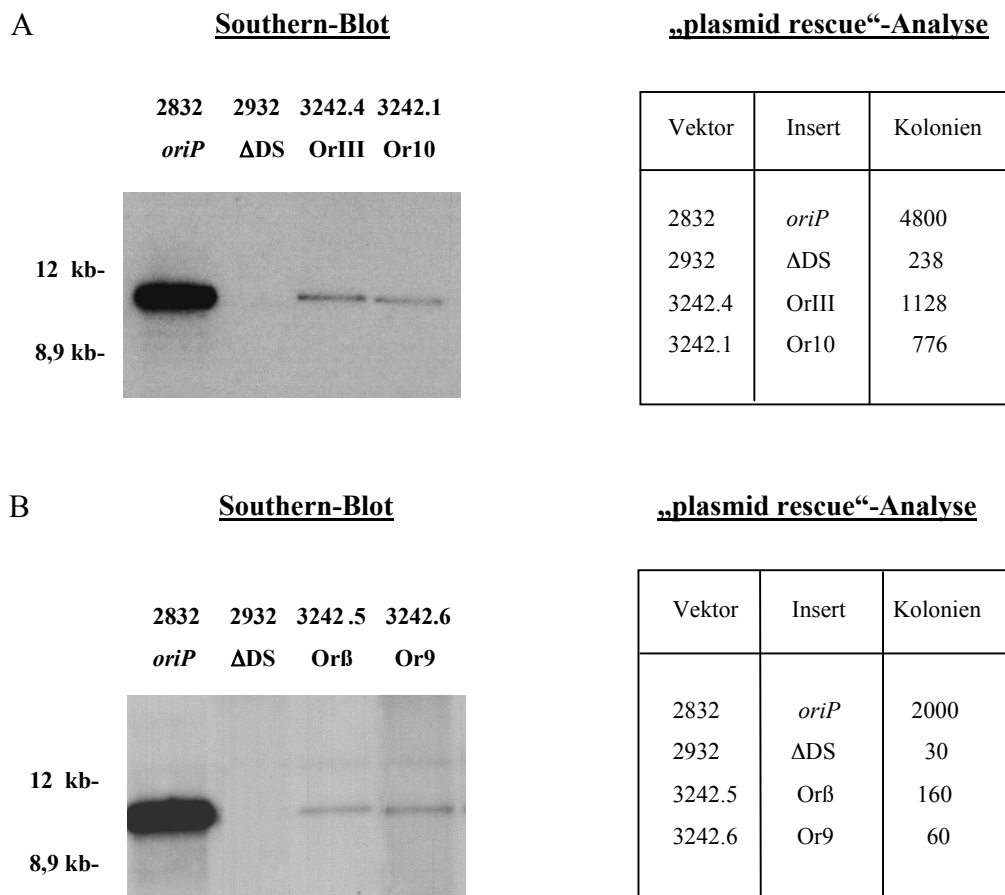
Bisher ist es nicht gelungen, zu zeigen, dass ORC in Säugetierzellen eine spezifische DNA-Sequenz erkennt. Daher bleibt die Möglichkeit, dass der Komplex durch seine geringere Sequenzaffinität teilweise an DNA-Sequenzen bindet, die keine aktiven Startstellen der Replikation sind. Somit hat die ChIP-Analyse im chromosomalen Kontext eine geringere Aussagekraft zu anderen etablierten Analysen, wie z.B. der „nascent strand“-Analyse (siehe Diskussionsteil V.3.2).

## **4 Untersuchung der potentiellen Replikationsursprünge**

### **4.1 Analyse der Replikationsfähigkeit der neuen humanen Replikationsursprünge**

Sechs der Orc2-bindenden Sequenzen erwiesen sich in der „nascent strand“-Analyse als Initiationsstellen der DNA-Replikation. Diese sechs potentiellen Replikationsursprünge wurden nochmals einzeln im Replikationsassay untersucht. Für die Or6-Sequenz ist dies bereits in Kapitel IV.2.2 beschrieben. Der Replikationsassay wurde wie unter Punkt 1.2 beschrieben, durchgeführt. Zwei µg DNA wurden in 293/EBNA1-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach zwei Wochen unter Selektion lysiert und die niedermolekulare DNA mittels Hirt-Protokoll isoliert. Die DNA wurde mit dem Enzym DpnI inkubiert und im „plasmid rescue“-Versuch und im Southern-Blot auf die Extrachromosomalität der untersuchten Plasmide analysiert. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse dargestellt. Das Experiment wurde für jeden potentiellen Replikationsursprung 2-mal wiederholt. Als Postiv-Kontrolle wurde das *oriP*-Plasmid p2832 mitgeführt. Dieses Plasmid replizierte sehr stark, wie man an der Kolonienzahl im „plasmid rescue“-Experiment und an der Signalintensität im Southern-Blot erkennen kann. Die Negativ-Kontrolle p2932 wurde schwach repliziert. Dagegen wiesen die Plasmide mit den potentiellen humanen Replikationsursprüngen (p3242.x) mehr Kolonien im „plasmid rescue“-Versuch auf als das Ursprungsplasmid p2932. Mit diesem Ergebnis übereinstimmend waren die Plasmide p3242.x extrachromosomal im Southern-Blot ebenfalls detektierbar - im Gegensatz zum

Plasmid p2932. Die einzelnen Originkandidaten zeigten verschieden starke ARS-Aktivitäten. Die Plasmide p3242.4 und p3242.5 wiesen 5-mal mehr Kolonien im „plasmid rescue“-Experiment auf als das Plasmid p2932, während die Plasmide p3242.1 und p3424.6 eine 2- bis 3-fache Anreicherung an Kolonien zu p2932 aufwiesen. In Abbildung 19 ist jeweils ein Versuch dargestellt.



**Abb. 19: Separate Untersuchung der potentiellen humanen Replikationsursprünge hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit:**

Als Positiv-Kontrolle wurde das *oriP*-Plasmid p2832 und als Negativ-Kontrolle wurde das Basisplasmid p2932 transfiziert. Die Replikationsfähigkeit der Plasmide 3242.1,4 (**A**) und 3242.5,6 (**B**) wurde nach zwei Wochen Puromycin-Selektion untersucht. Hierfür wurde die niedermolekulare DNA aus den 293/EBNA1-Zellen nach dem Hirt-Protokoll isoliert und der extrachromosomale Status die Plasmide mit einem Southern-Blot (rechts) und mit dem „plasmid rescue“-Experiment (links) getestet.

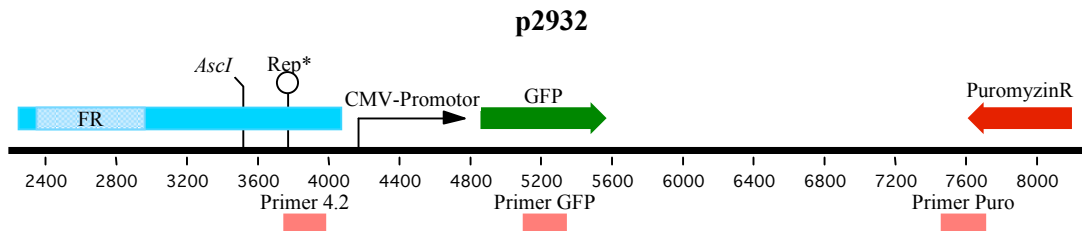
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bis auf eine Ausnahme alle Plasmide mit einem potentiellen Replikationsursprung doppelt bis 3-fach effizienter als der Ursprungsvektor p2932 repliziert wurden. Überraschend war, dass die humane DNA-Sequenz Or15 im Replikationsassay eine sehr schwache, kaum detektierbare Replikation zeigte. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der „nascent strand“-Analyse, wonach diese Sequenz als aktiver Replikationsursprung detektiert wurde. Möglicherweise fehlen für eine stabile extrachromosomale Replikation bei dieser DNA-Sequenz weitere Sequenzelemente.

#### **4.2 Untersuchung der neuen potentiellen Replikationsursprünge mittels ChIP im plasmidalen Kontext**

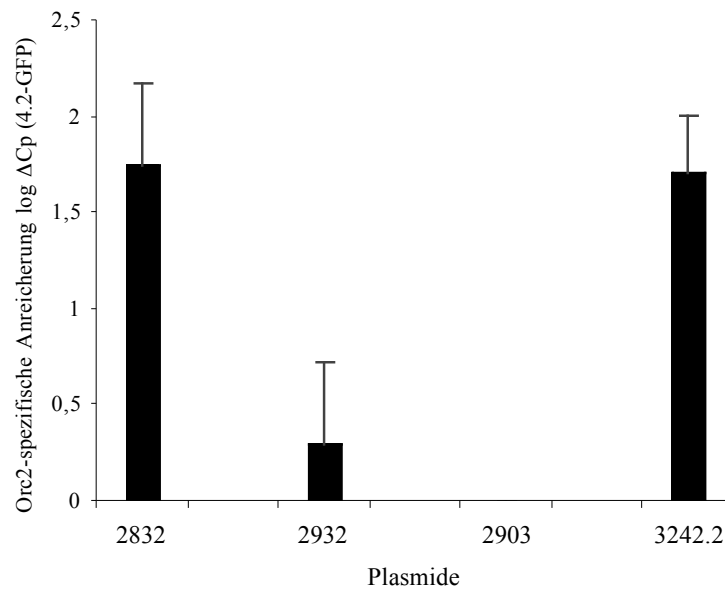
Ein wichtiges Kriterium für einen Replikationsursprung ist die Bindung des ORC-Komplexes. Zur Bestätigung der mit der „origin trapping“-Technik isolierten potentiellen Replikationsursprünge wurden diese auf ORC-Bindung hin untersucht. Die Analyse der ORC-Anreicherung mittels ChIP im plasmidalen Kontext ist eine etablierte Methode (Ritzi et al., 2003; Schepers et al., 2001). Dazu wurden die im Kapitel IV.4.1 mit den verschiedenen Origin-Kandidaten transfizierten 293/EBNA1-Zelllinien nach drei Wochen geerntet und mittels der ChIP-Methode analysiert. Die mit Orc2-gefällte ChIP-DNA wurde mit drei verschiedenen Primerpaaren in der quantitativen „real time“-PCR analysiert. Die Amplikons sind in der Karte der Abbildung 20 A verzeichnet. Das Primerpaar 4.2 amplifiziert den 5'-Bereich der *oriP*-Sequenz, die direkt neben der *AscI*-Schnittstelle liegt, während das Primerpaar Puro ca. vier kb weiter entfernt in der Nähe des Puromyzin-Gens und das Primerpaar GFP 1,5 kb entfernt im GFP-Gen bindet. Die drei Primerpaare wurden so gewählt, dass sie in dem Ursprungsplasmid p2932 binden und somit für alle Plasmide verwendet werden können. In dem Plasmid p2903, welches keine *oriP*-Sequenz enthält, bindet das 4.2-Primerpaar nicht. Die Anreicherung von Orc2 an einer bestimmten Sequenz wurde wie im Methodenteil beschrieben (III.3.4) aus der Differenz zwischen dem Cp-Wert des Präimmunserums und dem Cp-Wert der mit dem Orc2-Antikörper koprizipitierten DNA berechnet. Dies ergab den  $\Delta$ Cp-Wert, welcher die Anreicherung an Orc2 symbolisiert. Als Kontrolle wurde der  $\Delta$ Cp-Wert des GFP-Primers vom  $\Delta$ Cp-Wert des 4.2-Primer abgezogen. Daraus ergab sich die lokus-spezifische Anreicherung von Orc2, der  $\Delta$ Cp (4.2-GFP)-Wert. Zuerst wurde die Orc2-Bindung am Plasmid p3242.2 mit der Or6-Sequenz untersucht. Dazu wurde p3242.2 in 293/EBNA1-Zellen transfiziert. Nach drei

Wochen unter Puromycin-Selektion wurden die Zellen mittels ChIP analysiert. Wie in Abbildung 20 B zu sehen ist, zeigen die Sequenzen *oriP* (2832) und Or6 (3242.2) eine vergleichbare Orc2-Anreicherung, während das Plasmid p2932 nur in geringem Maße von Orc2 gebunden wurde. Von dem Plasmid p2903 wird kein PCR-Produkt gebildet.

A



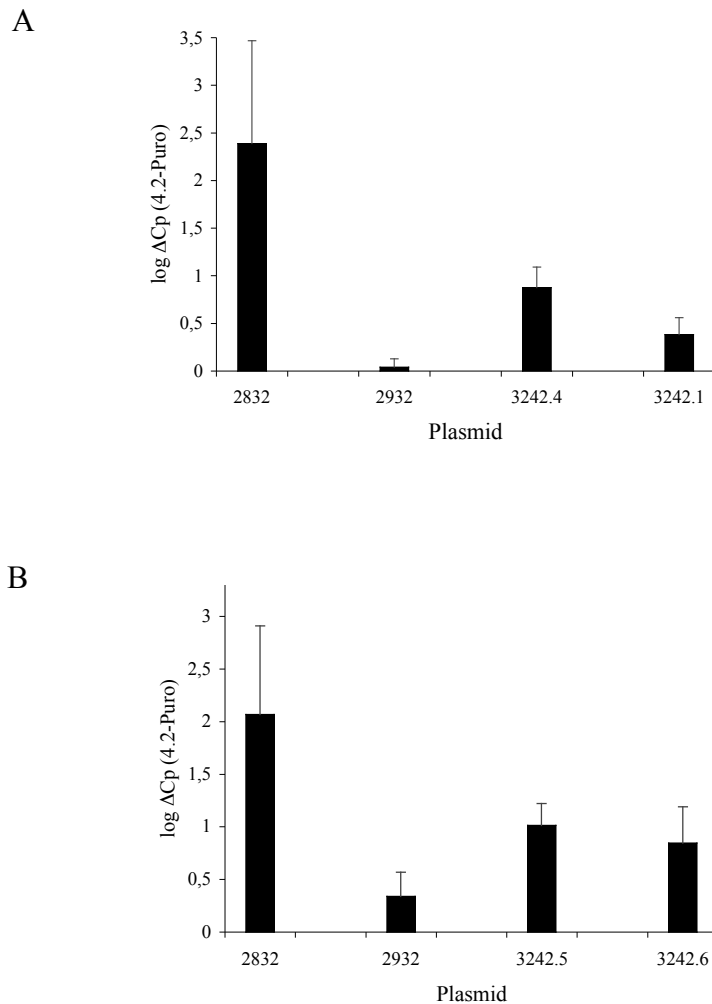
B



**Abb. 20: Bindung des Replikationsproteins Orc2 an den potentiellen humanen Replikationsursprung Or6 (p3242.2):**

(A) In der Karte des Plasmids p2932 ist die Lage der verwendeten Primerpaare 4.2, GFP und Puro eingezeichnet. Mit Hilfe der quantitativen „real time“-PCR wurde die  $\Delta$ Cp-Werte der Primer 4.2 und GFP, aus denen sich die spezifische Anreicherung an Orc2-DNA berechnet, ermittelt. Um die lokus-spezifische Anreicherung von Orc2 zu messen, wurde die Differenz zwischen dem  $\Delta$ Cp-Wert des GFP-Primerpaars und dem  $\Delta$ Cp-Wert des 4.2-Primerpaars gebildet. (B) Als Positiv-Kontrolle wurde die Bindung an Orc2 an die *oriP*-Sequenz (p2832) und als Negativ-Kontrolle die DS-deletierte Sequenz (p2932) analysiert. Dem Plasmid p2903 fehlt die *oriP*-Sequenz vollkommen, so dass sich mit den Primerpaar 4.2 kein PCR-Produkt bildet.

Ebenso wie für Or6 wurde die Orc2-Bindung für die anderen potentiellen Replikationsursprünge mittels ChIP bestimmt. Das Ergebnis dreier unabhängiger ChIP-Experimente ist in der Abbildung 21 zusammengefaßt.



**Abb. 20: Spezifische Anreicherung an Orc2 an die potentiellen humanen Replikationsursprünge im Plasmid-Kontext:**

Im ChIP-Experiment wurde die Anreicherung von Orc2-Proteinen an den replizierenden DNA-Sequenzen gemessen. Als Kontrollen wurden die Plasmide p2832 und p2932 analysiert. In **(A)** sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente für die Plasmide p3242.4 (OrIII), und p3242.1 (Or10) und in **(B)** für die Plasmide p3242.5 (OrB) und p3242.6 (Or9) graphisch dargestellt. Die Anreicherung an Orc2 wurde durch eine quantitative „real time“-PCR bestimmt.

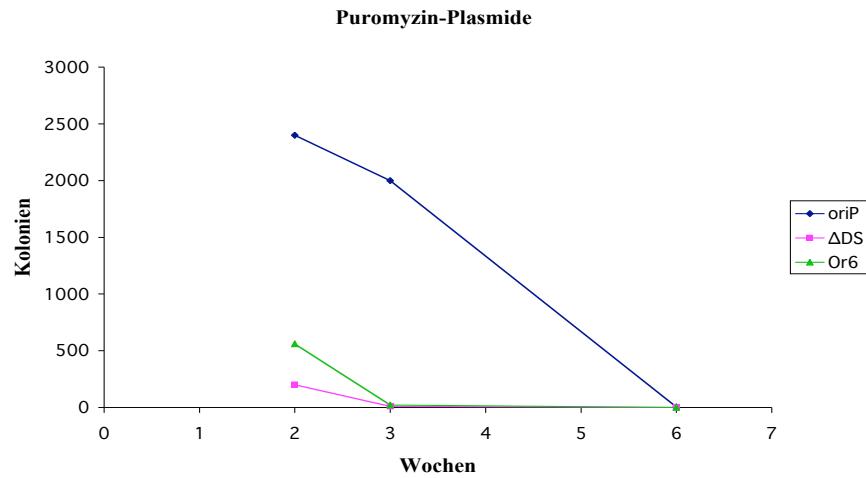
In diesen Experimenten wurde die ChIP-DNA in der „real time“-PCR mit dem Puro-Primerpaar vermessen, da dieses weiter vom 4.2-Primerpaar entfernt liegt als das GFP-Primerpaar. In jedem ChIP-Versuch wurden die Kontrollen p2832 und p2932 mitgeführt. An alle potentiellen Replikationsursprünge war das Protein Orc2 angereichert. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, zeigten die stärker replizierenden DNA-Sequenzen OrIII (3242.4) und Or $\beta$  (3242.5) eine etwas stärkere Anreicherung von Orc2 als die schwächer replizierenden DNA-Sequenzen Or10 (3242.1) und Or9 (3242.6). Alle Origin-Kandidaten wiesen eine schwächere Anreicherung von Orc2 auf als die *oriP*-Sequenz (2832). Eine Ausnahme bildet das Or6-Fragment, an dem im ChIP-Experiment dieselbe Anreicherung von Orc2 wie an der *oriP*-Sequenz detektiert wurde.

### **4.3 Auswertung des Replikationsassays der potentiellen Replikationsursprünge nach sechs Wochen**

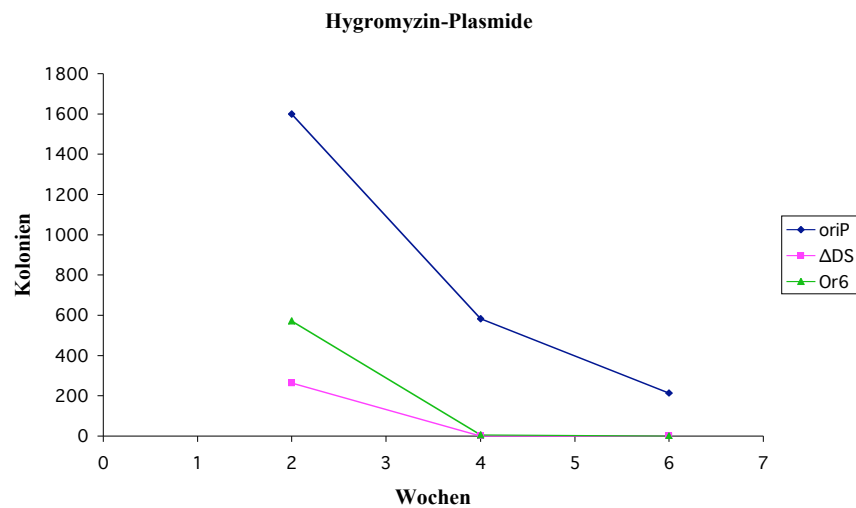
In der Literatur wird beschrieben, dass *oriP*-Plasmide über Monate und Jahre stabil in humanen Zellen extrachromosomal replizieren. M.Calos Gruppe untersuchte in ihren Arbeiten die *oriP*-Plasmide in einem Kurzzeit-Replikationsassay nach vier Tagen und einem Langzeit-Replikationsassay nach 28 bis 60 Tagen (Krysan et al., 1989), wobei die Plasmide extrachromosomal erhalten blieben.

Um zu untersuchen, ob sich die Plasmide mit den neuen potentiellen Replikationsursprüngen stabil in 293/EBNA1-Zellen etablieren, wurde der extrachromosomale Status der Plasmide nach mehreren Wochen analysiert. Dieses Experiment erfolgte exemplarisch anhand der Plasmide p2832, p2932 und 3242.2 (Or6-Sequenz). Der Replikationsassay wurde nach zwei, drei und sechs Wochen ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mittels der „plasmid rescue“-Analyse (Abb. 22 A). Alle Plasmide hatten nach sechswöchiger Puromycin-Selektion ihren extrachromosomalen Status verloren. Sogar das *oriP*-Plasmid p2832 blieb nicht extrachromosomal erhalten. Bei dem Plasmid p2932 war auf Grund des fehlenden DS-Elements der Verlust nach sechs Wochen zu erwarten. Das Plasmid p3242.2 wurde ebenso wie p2932 zwei Wochen episomal erhalten, allerdings mit einer höheren Kopienzahl als p2932 und einer geringeren Kopienzahl als p2832.

A



B



**Abb. 22: Erhaltung der FR-Plasmide in humanen 293/EBNA1-Zellen über mehrere Wochen:**

Der Replikationsassay wurde nach verschiedenen Zeitpunkten: zwei, vier und sechs Wochen, mittels des „plasmid rescue“-Experiments ausgewertet. In **(A)** ist der Replikationsassay der Puro-Plasmide p2832 (*oriP*), p2932 ( $\Delta$ DS), p3242.2 (Or6) und in **(B)** der Replikationsassay der Hyg-Plasmide p3230.3 (*oriP*), p3243 ( $\Delta$ DS) und p3244.2 (Or6) dargestellt.

Eine mögliche Erklärung für den Verlust des Plasmides p2832 könnte in der Selektion der Zellen mit Puromyzin liegen. In der Gruppe von B. Jungnickel wurde beobachtet, dass unter Puromyzin-Selektion einige Zellen ihren Phänotyp veränderten (persönliche

Mitteilung M.Mierau, GSF). Daraufhin wurde die DS-deletierte *oriP*-Kassette und der potentielle Replikationsursprung Or6 in das Plasmid p3225.16 kloniert. Dieses Plasmid enthält statt des Puromycin- das Hygromycin-Resistenzgen und anstatt des eGFP das destabilisierte deGFP-Gen. Diese Plasmide 3244.2 mit der Or6-Sequenz sowie das *oriP*-Plasmid p3230.3 und p3243 mit der mutierten *oriP*-Kassette ohne das DS-Element wurden im Replikationsassay untersucht. Das Ergebnis ist in der Abbildung 22 B dargestellt. Die Hygromycin-Plasmide replizierten mit ähnlicher Affinität wie die Puromycin-Plasmide. Nach sechs Wochen waren von den Plasmiden p3243 und p3244.2 keine extrachromosomalen Kopien mehr vorhanden. Allerdings wurde von dem *oriP* beinhaltenden Plasmid p3230.3 noch extrachromosomale DNA im „plasmid rescue“-Versuch detektiert. Diese Versuche zeigen, dass der Selektionsmarker einen Einfluss auf die Replikationskompetenz hat, jedoch nicht entscheidend für den Verlust der Plasmide nach vier bis sechs Wochen ist.

## 5 Nähere Untersuchung des Replikationsursprunges Or6

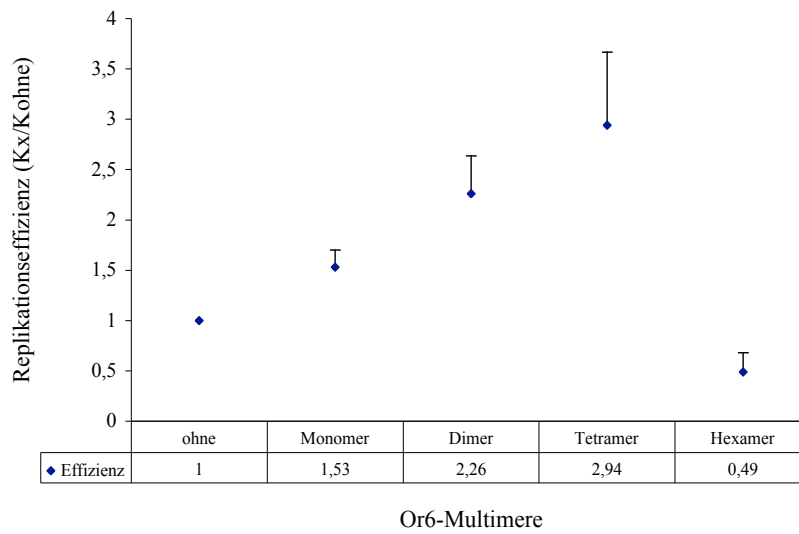
Der neue humane Replikationsursprung Or6 zeigte von den isolierten Replikationsursprüngen in allen Parametern eine hohe Effizienz und wurde daher näher analysiert. Das Plasmid p3242.2 mit der Or6-Sequenz wurde mit einer geringeren Effizienz als das *oriP*-Plasmid p2832 repliziert. Um die Replikationseffizienz von p3242.2 zu erhöhen, wurde Or6 multimerisiert. Ergänzend wurden verschiedene Or6-Mutanten konstruiert, um potentielle für die Replikation von p3242.2 verantwortliche DNA-Sequenzen zu bestimmen.

### 5.1 Analyse von Or6-Multimeren

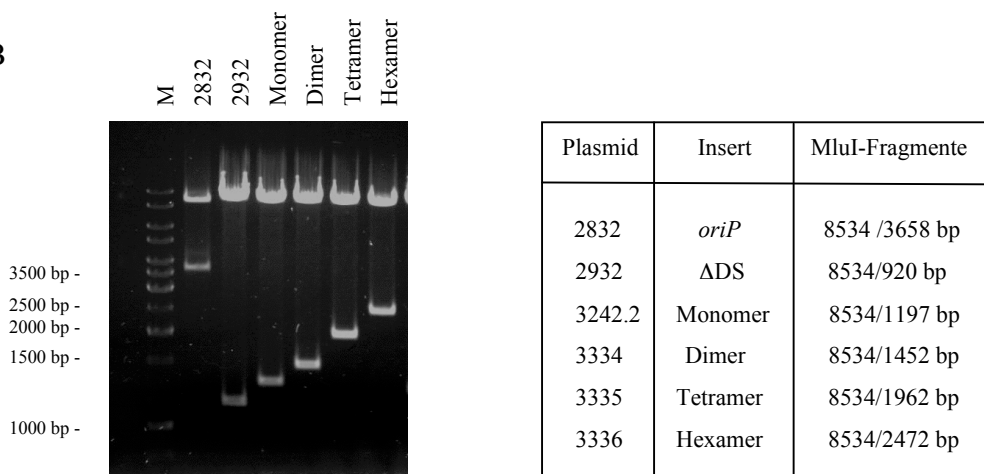
Für die Synthese der Multimere erfolgte eine Kopf-an-Schwanz-Klonierung, welche im Methodenteil unter Punkt III.3.2 näher beschrieben ist. Der Replikationsassay der Or6-Multimere wurde mittels der „plasmid rescue“-Experiments in Abbildung 23 ausgewertet.



A



B



### Abb. 23: Replikationsfähigkeit der Or6-Multimere:

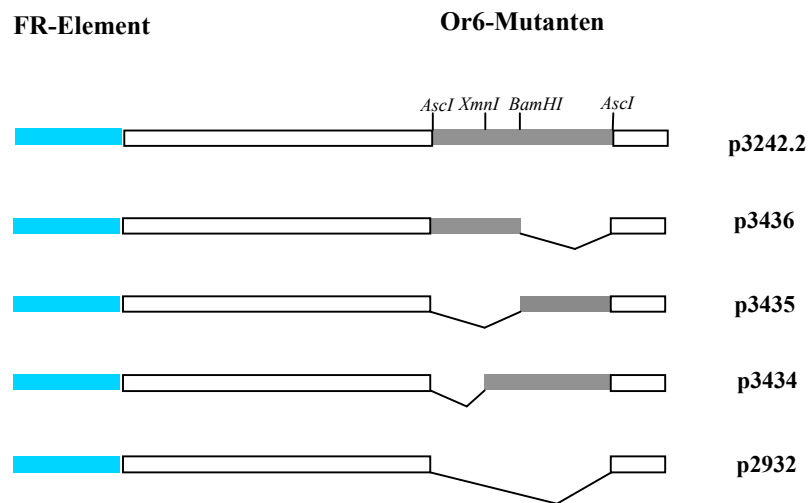
(A) Die Or6-Multimere p3334 (Dimer), p3335 (Tetramer), p3336 (Hexamer) wurden im Replikationsassay untersucht und mit der „plasmid rescue“-Analyse ausgewertet. Die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten sind im Diagramm zusammengefasst. Auf der y-Achse ist die Replikationseffizienz aufgetragen. Die Effizienz berechnet sich aus der Kolonienzahl des jeweiligen Multimers geteilt durch die Kolonienzahl des Ausgangsvektors ohne Replikator (p2932). Auf der x-Achse sind die verschiedenen Or6-Multimere verzeichnet. Die gemittelten Werte sind in der Tabelle unter dem Diagramm wiedergegeben. (B) Zur Kontrolle wurde die Plasmid-DNA der „plasmid rescue“-Kolonien isoliert und mit dem Enzym *MluI* geschnitten. Nach der Restriktionsspaltung wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid

gefärbt. Die zu erwartenden Fragmentgrößen der Restriktionsspaltung sind in der Tabelle rechts aufgelistet. Als Positiv-Kontrolle wurde das Plasmid p2832 mit der *oriP*-Sequenz im Replikationsassay mitgeführt.

Die Replikationseffizienz wurde anhand des Ursprungsvektors p2932 (ohne) berechnet, der keine Or6-Sequenz enthält. Die im „plasmid rescue“-Experiment ermittelte Kolonienzahl wurde durch die Kolonienzahl des Plasmides p2932 geteilt. Damit ergab die Replikationseffizienz des Plasmides p2932 immer den Wert 1. In den vorangegangenen Experimenten wurde für die Or6-Sequenz eine etwas höhere Replikationseffizienz von 2 gemessen. In diesen Versuchen betrug die Replikationseffizienz durchschnittlich 1,5. Wie aus Abbildung 23 A ersichtlich ist, steigt die Replikationseffizienz der Multimere linear vom Monomer bis zum Tetramer an. Vier hintereinander liegende Or6-Sequenzen erhöhen die Replikationseffizienz des Plasmides um das Doppelte im Vergleich zu einer Or6-Kopie. Erstaunlicherweise unterstützt das Hexamer die extrachromosomale DNA-Replikation nicht. Als Kontrolle wurde aus den Kolonien des „plasmid rescue“-Versuches die Plasmid-DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym *MluI* geschnitten. Die Fragmentgrößen sind in der Tabelle in Abbildung 23 B aufgelistet.

## 5.2 Analyse von Or6-Mutanten

Aus der DNA-Sequenz von Or6 konnten bisher noch keine Schlussfolgerungen auf bestimmte, für die DNA-Replikation essentielle Sequenzelemente, gezogen werden. Um den potentiellen Replikationsursprung Or6 näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Deletionsmutanten konstruiert. In Abbildung 24 sind alle hergestellten Or6-Mutanten skizziert. Die Or6-Mutanten wurden nach dem Vorhandensein von Restriktionsenzymen entworfen. Das Restriktionsenzym *BamHI* schneidet in der Mitte der Or6-Sequenz. So entstanden die Plasmide p3436 und p3435. Außerdem schneidet das Enzym *XmnI* im 5'-Bereich der Or6-Sequenz, so dass ca. 90 bp der Or6-Sequenz entfernt wurden (p3434). Alle Mutanten wurden ebenso wie die Or6-Sequenz an die Stelle des ursprünglich lokalisierten DS-Elements in das Plasmid p2932 eingesetzt.

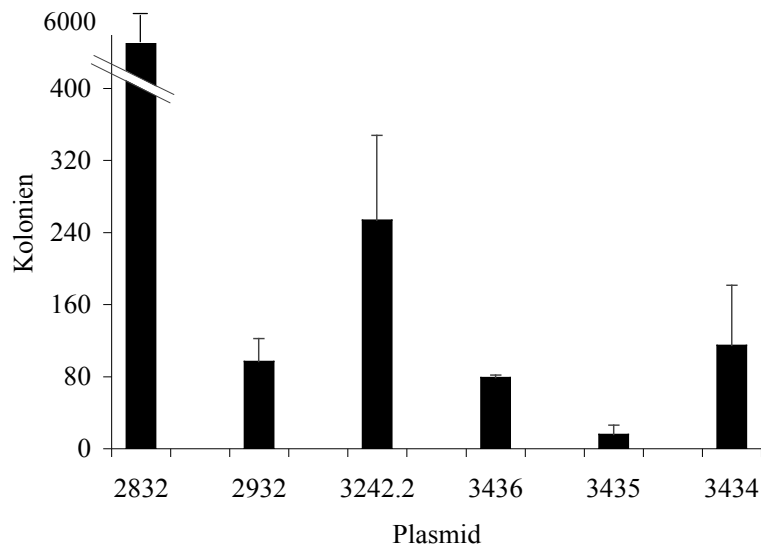


#### Abb. 24: Schematische Darstellung der Or6-Mutanten:

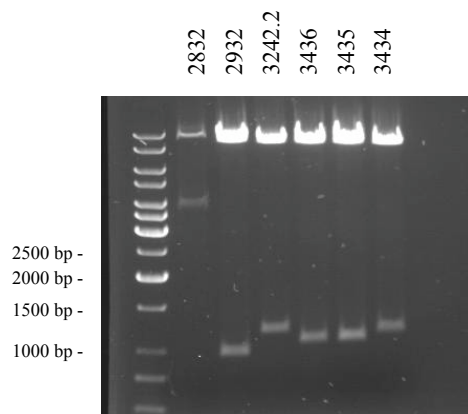
Die Or6-Sequenz ist in dem Plasmid p3242.2 vollständig (grauer Abschnitt). Ein Teil des FR-Elements wurde durch einen blauen Abschnitt skizziert. Darunter sind die verschiedenen Deletionsmutanten dargestellt. Im Plasmid p3436 befindet sich die 5'-Hälfte des Or6-Fragments und im Vektor p3435 die 3'-Hälfte der Or6-Sequenz. P3434 enthält bis auf die ersten 90 bp fast den vollständigen potentiellen Replikationsursprung Or6. Der Basisvektor, in welchem sich alle Konstrukte befinden, ist p2932.

Die Replikationsfähigkeit der verschiedenen Or6-Mutanten wurde in 293/EBNA1-Zellen getestet. Nach zwei Wochen unter Selektion wurde die niedermolekulare DNA mittels Hirt-Protokoll isoliert und mit der „plasmid rescue“-Technik analysiert. Das Ergebnis ist in der Abbildung 25 A dargestellt. Zur Kontrolle wurden die DNA einzelner „plasmid rescue“-Kolonien isoliert und mit dem Enzym *MluI* behandelt. In der Abbildung 25 B wurden die Fragmente der Restriktionsspaltung in einem Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die zu erwartenden Fragmentgrößen sind in der Tabelle in Abbildung 25 C aufgelistet.

A



B



C

Plasmid	Insert	<i>MluI</i> -Fragmente
2832	<i>oriP</i>	8534 /3658 bp
2933	$\Delta$ DS	8534/920 bp
3242.2	Or6	8534/1197 bp
3436	B4	8534/1063 bp
3435	A/B1	8534/1054 bp
3434	X13	8534/1100 bp

### Abb. 25: Replikationsfähigkeit von Or6-Deletionsmutanten:

Die Ergebnisse des Replikationsassays der verschiedenen Or6-Mutanten ist im Diagramm (A) dargestellt. Die Auswertung dreier unabhängiger Experimente erfolgte mit der „plasmid rescue“-Analyse. (B) Zur Kontrolle wurden die Kolonien des „plasmid rescue“-Experiments näher analysiert. Die DNA wurde aus Bakterienzellen isoliert und mit dem Enzym *MluI* gespalten. Die dabei für jedes Plasmid entstehenden DNA-Fragmente sind in der Tabelle (C) aufgelistet. Anhand der Fragmentgröße konnte dann kontrolliert werden, um welche Sequenzen es sich handelt.

---

Wie schon in vorherigen Experimenten (IV.2.2) beobachtet, wurde das Plasmid p3242.2 um mehr als das Doppelte als der Ursprungsvektor p2932 repliziert. Das Plasmid p3435 wurde kaum und p3436 mit vergleichbarer Effizienz wie p2932 repliziert. Im Gegensatz dazu zeigte p3434 eine etwas höhere Replikationseffizienz als p2932. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Or6-Sequenz im Plasmid p3434 ein größeres Or6-Fragment als die anderen Mutanten enthält. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die extrachromosomale Replikationsfähigkeit des Plasmides p3242.2 nicht von einem spezifischen Motiv abhängt, sondern dass das ganze Or6-Fragment benötigt wird.

## V. Diskussion

### 1 Initiation der Replikation in humanen Zellen

Das Fehlen einer funktionellen Analysemethode limitierte bisher die Identifizierung von humanen Replikationsursprüngen. Dies ist einer der Gründe, weshalb über den Aufbau der Replikatoren in Säugetierzellen wenig bekannt ist (Todorovic et al., 1999). Von den zehn identifizierten Replikationsursprüngen in humanen Zellen kann man keine gemeinsamen Sequenzmotive ableiten (Aladjem and Fanning, 2004). Es ist nach wie vor ungeklärt, ob die Replikation in humanen Zellen an spezifischen DNA-Sequenzen beginnt oder nicht. In der Hefe *S. cerevisiae* existieren spezifische Initiationstellen, die sich durch eine ähnliche Struktur und ein Konsensusmotiv auszeichnen, die ARS-Elemente (Theis et al., 1999). Diese ARS-Sequenzen werden von ScORC und weiteren Replikationsproteinen gebunden, zu denen es analoge Proteine in humanen Zellen gibt. Der Aufbau des Initiationskomplexes in Hefe ähnelt dem in Säugetierzellen (Kearsey and Cotterill, 2003). Die Frage, ob die humanen Replikationsursprünge gemeinsame Strukturen oder Elemente wie in der Hefe *S. cerevisiae* besitzen, bleibt noch offen, bis mehr humane Replikationsursprünge identifiziert worden sind. Möglicherweise gibt es unterschiedliche Klassen von Replikationsursprüngen in humanen Zellen. Neben spezifischen Initiationsstellen der Replikation könnte es ebenso flexible Replikationsstartstellen geben, die durch spezielle topologische oder epigenetische Elemente die Replikation an einer bestimmten Stelle einleiten und keine spezifische DNA-Sequenz erfordern. Fest steht, dass etwa alle 50-100 Kilobasen ein Replikationsursprung aktiviert wird (Huberman and Riggs, 1966). Diese Replikationsursprünge garantieren die vollständige Replikation des ganzen Genoms in einen bestimmten Zeitraum. Welche Faktoren oder Sequenzen für die Koordination der Replikation und somit für die Initiation der Replikation in bestimmten Regionen verantwortlich sind, ist derzeit ungewiss.

## 2 Der „origin trapping“-Assay, eine neue Methode zur Identifizierung von Replikationsursprüngen

Die wenigen bekannten Replikationsursprünge in humanen Zellen wurden mit Methoden, welche das Chromatin nach Startstellen der DNA-Replikation analysieren, identifiziert. In dieser Arbeit gelang es erstmals einen Funktionstest zur effizienteren Identifizierung von humanen Replikationsursprüngen, den „origin trapping“-Assay zu entwickeln. Methodisch verknüpft dieser Versuchsansatz zwei Techniken, die Chromatinimmunpräzipitation mit dem transienten Replikationsassay.

Als extrachromosomal replizierendes System wurde der virale Replikationsursprung *oriP* verwendet. Vorteil des *oriP* ist, dass die Replikations- und Plasmiderhaltungsfunktionen unabhängig voneinander sind. Dies ermöglicht die stabile Erhaltung der Plasmide, während verschiedene DNA-Fragmente auf ihre Replikationskompetenz getestet werden konnten. Neben dem viralen System gibt es noch den Vektor pEPI-1, welcher stabil extrachromosomal in humanen Zellen repliziert wird. Die Replikation des Plasmides ist von der MAR-Sequenz und der aktiven Transkription des Reportergens, die in die MAR-Sequenz einläuft, abhängig (Bode et al., 1992; Stehle et al., 2003). Mittels ChIP wurde eine Anreicherung von Orc2 und Mcm3 detektiert, die sich über das ganze Plasmid erstreckt. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Formation des pre-RC zwar zellzyklusabhängig aber sequenzunspezifisch erfolgt. Ebenso wurde festgestellt, dass die Startstellen der Replikation über das ganze Plasmid verteilt sind. Die Klonierung eines bekannten Replikationsursprunges Mcm4 sowie einer Negativ-Kontrolle in den pEPI-1 hatten keine Auswirkung auf die extrachromosomale Replikation des Plasmides (Schaarschmidt et al., 2004). Somit ist dieses Plasmid zur Analyse von genomischen Sequenzen auf Startstelle der Replikation unbrauchbar.

### 2.1 Funktionalität des Replikationsassays

Zur Prüfung der Funktionalität des Replikationsassays wurde in dieser Arbeit zuerst die Replikationsfähigkeit verschiedener LaminB2-Origin- und *oriP*-Konstrukte in den humanen Nierenkarzinomzellen 293/EBNA1 getestet (siehe IV.1). Der LaminB2-Origin ist einer der am besten untersuchten humanen Replikationsursprünge (Abdurashidova et al.,

2003; Dimitrova et al., 1996; Giacca et al., 1994). Plaziert man 1,2 kb des LaminB2-Origin ektopisch, d.h. an eine andere Stelle im Genom, wird die Replikation ebenso wie an der ursprünglichen Stelle initiiert (Paixao et al., 2004). Aus diesem Experiment geht hervor, dass der LaminB2-Origin zur Analyse der Funktionalität des Replikationsassays geeignet ist. Caddle und Kollegen untersuchten die Replikationsfähigkeit des DHFR-Origin im Replikations-assay (Caddle and Calos, 1992). Sie beobachteten, dass ein 13,3 kb großes Fragment des DHFR-Origin die Replikation von FR-Plasmiden unterstützt - Allerdings führte man diese Replikationskompetenz auf die Größe des Fragments und nicht auf die Spezifität der Sequenz zurück. Diese Schlussfolgerung wurde anhand der früheren Beobachtungen getroffen, wonach ab einer bestimmten Größe alle humanen Fragmente im Replikationsassay replizierten (Heinzel et al., 1991).

Es wurden insgesamt vier verschiedene LB2-Konstrukte hergestellt (siehe Abb. 26) und im Replikationsassay untersucht. Als Positiv-Kontrolle diente das *oriP*-Plasmid p2832 und als Negativ-Kontrolle das DS-deletierte Plasmid p2932. P2832 wurde mit einer hohen Effizienz in 293/EBNA1-Zellen repliziert. Im Gegensatz dazu wurde p2932 nur sehr schwach repliziert (siehe Abb. 11). Die geringe Replikation des Ursprungsplasmids p2932 kann man mit dem Fehlen des DS-Elements und mit dem Vorhandensein des Rep\*-Elements erklären. Rep\* ist ein sehr schwacher viraler Origin, der im 3'-flankierenden Bereich des DS-Elements liegt (Kirchmaier and Sugden, 1998). Als weitere Negativ-Kontrolle wurde eine genomische DNA-Sequenz aus dem Exon 9 des Mcm4-Gen (Ex9) in den p2932 kloniert (dazu Punkt V.1.3). Diese Sequenz wird nicht von ORC gebunden und ist keine Startstelle der Replikation auf dem Genom (Schaarschmidt et al., 2002). Im Replikationsassay wurde diese Sequenz mit derselben niedrigen Effizienz wie p2932 repliziert. Als Startstelle der schwachen Replikation dient hier vermutlich ebenfalls das Rep\*-Element.

In dieser Arbeit stellte sich heraus, dass das Plasmid p3024 mit dem kurzen LB2-Fragment LB2<sub>435</sub> mehr als doppelt so effizient repliziert wurde wie p2932. Die anderen Plasmide p3025 und p3026 mit den größeren LB2-Fragmenten LB2<sub>705</sub> und LB2<sub>1005</sub> wurden nicht repliziert (siehe IV.1.2). Diese Fragmente enthalten eine längere Sequenz im 3'-Bereich des LB2, die scheinbar eine negative regulatorische Funktion hat. Nachdem 250 Basenpaare des 3'-Endes von der LB2<sub>1005</sub>-Sequenz entfernt wurden, wurde das neu entstandene Plasmid p3026.2 mit der LB2<sub>M</sub>-Sequenz 8-mal stärker repliziert als p2932



(siehe IV.1.3). Im Vergleich zu p2832, das durchschnittlich eine zwanzigfach höhere Replikationseffizienz als p2932 hat, ist die Replikationsfähigkeit des Plasmides p3026.2 jedoch noch immer gering. Dies lässt sich damit erklären, dass *oriP* ein perfekt etablierter Replikator ist, der sich während der Evolution an die Replikation des Wirtes angepasst hat. Bei der Konstruktion des Ursprungsplasmides p2932 wurde das DS-Element sowie ein für die Replikation von *oriP* vermutlich wichtiges flankierendes DUE-Element (Polonskaya et al., 2004) entfernt und durch humane DNA-Sequenzen ersetzt. Die Replikation des *oriP*-Plasmides p2832 in humanen Zellen funktioniert optimal. Damit liegt die Replikationseffizienz des Plasmides bei 100%, während die genomischen Fragmente vermutlich in der viralen Umgebung nicht so effizient die Replikation der FR-Plasmide unterstützen können.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der gut charakterisierte Replikationsursprung LaminB2 spezifisch die extrachromosomale Replikation der FR-Plasmide in humanen 293/EBNA1-Zellen unterstützt. Dagegen wurde die genomische DNA-Sequenz Ex9, die keine Startstelle der Replikation enthält, nicht im Replikationsassay repliziert. Diese Ergebnisse zeigen, dass genomische DNA-Sequenzen spezifisch hinsichtlich ihrer Replikationsfähigkeit im Replikationsassay untersucht werden können.

In der Literatur ist dokumentiert, dass *oriP*-Vektoren sich in humanen 293-Zellen extrachromosomal über Monate in sogenannten Langzeit-Experimenten etablieren (Heintz and Hamlin, 1982; Krysan and Calos, 1991). Sugden und Kollegen fertigten einen Zeitverlauf des Replikationsassays über zwei Wochen an. Ohne Selektion gingen 95% der *oriP*-Plasmide innerhalb von zwei Wochen verloren. Unter Selektion waren die Plasmide noch nach fünf Wochen extrachromosomal vorhanden. Allerdings wurde von den selektierten Zellen bisher keine Zeitkurve angefertigt (Leight and Sugden, 2001). In der hier durchgeführten Langzeitstudie wurde das *oriP*-Plasmid p2832 nicht stabil extrachromosomal in 293/EBNA1-Zellen etabliert (IV.4.3). Nach sechs Wochen war p2832 nicht mehr extrachromosomal detektierbar. Eine mögliche Erklärung für den Verlust des extrachromosomalen Zustands der *oriP*-Plasmide wurde in dem Selektionsmarker Puromycin vermutet. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung gestützt, dass sich der Phänotyp bei manchen Zellen durch die Puromycin-Zugabe veränderte (persönliche Mitteilung Maren Mierau, GSF). Daher wurde das Puromycinresistenzgen durch ein Hygromycinresistenzgen ersetzt. Durch den Austausch

des Selektionsmarkere wurde nach sechs Wochen das *oriP*-Plasmid extrachromosomal detektiert. Jedoch gingen 80 % der zuvor transfizierten Plasmide verloren. Die Beobachtung, dass die Anzahl an *oriP*-Plasmiden unter Selektion in humanen Zellen sich mit jeder Zellgeneration verringert, wurde auch von einer anderen Gruppe gemacht (persönliche Mitteilung Maren Mierau, GSF).

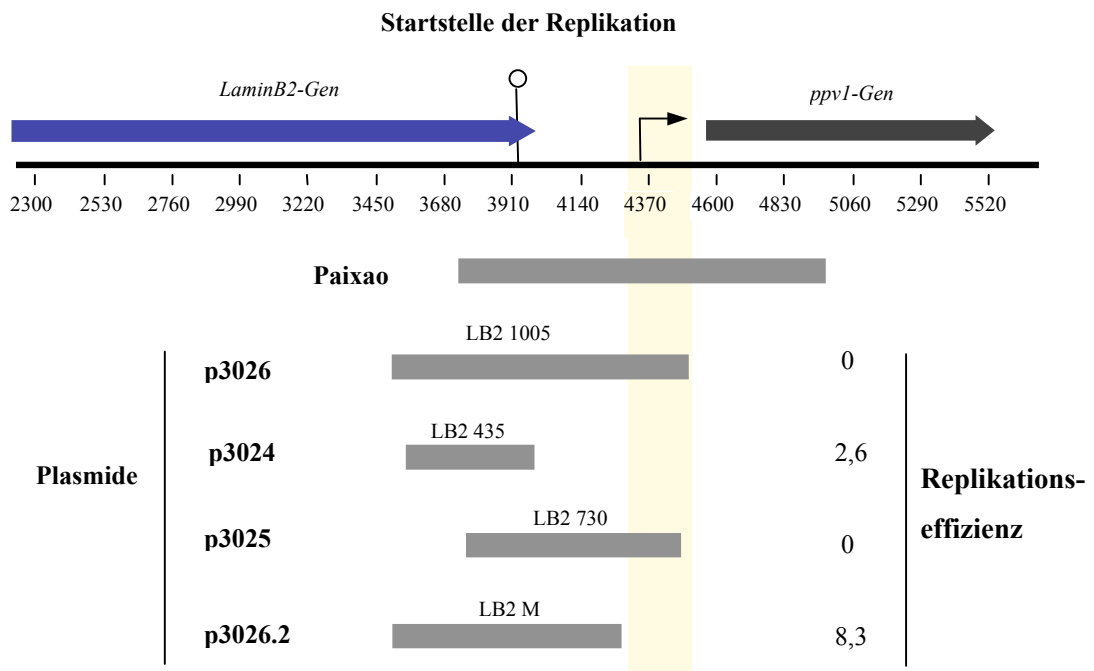
Der Austausch des Selektionsmarkers hatte keinen Einfluss auf die übrigen getesteten Plasmide. Nach sechs Wochen waren das Ausgangsplasmid p3243 sowie das Plasmid mit dem potentiellen Replikationsursprung p3244.2 nicht mehr extrachromosomal detektierbar. Die Ergebnisse zeigen, dass die Plasmide mit den potentiellen Replikationsursprüngen nicht auf Dauer stabil in den Zellen etabliert werden. Dies könnte durch die schwächere Initiation der Replikation an den potentiellen humanen Replikationsursprüngen im Vergleich zum DS-Element erklärt werden. Das Fazit dieser Langzeitexperimente ist, dass der Replikationsassay nur transient innerhalb von vier Wochen funktioniert.

## 2.2 Einfluss der Transkription auf die Replikation

Die Ergebnisse des Replikationsassays (siehe IV.1 und Abb. 26) mit den verschiedenen LaminB2-Konstrukten lassen die Schlussfolgerung zu, dass das 3'-Ende der Konstrukte LB2<sub>705</sub> und LB2<sub>1005</sub> inhibierend auf die Initiation der Replikation wirkt. Diese 250 Basenpaar lange DNA-Sequenz enthält den Promotor des *ppv1*-Gens mit Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, UBF und Nrf1 (Paixao et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass die Promotoraktivität möglicherweise die Originaktivität moduliert. Der Einfluss von Promotoren auf die Replikationsaktivität wurde bisher nur von Haase und Kollegen erforscht (Haase and Calos, 1991). In Detail wurde beobachtet, dass die Replikation von FR-Plasmiden mit humanen DNA-Fragmenten als Replikationsursprünge durch einen vorgeschalteten CMV-Promotor inhibiert wird. Ein analoges Phänomen könnte die Inhibierung der Replikation des LaminB2-Origin auf den Plasmiden p3025 und p3026 sein. Diese Vektoren enthalten den *ppv1*-Promotor, der einen negativen Einfluss auf die Replikation der Plasmide haben könnte.

Bei der ektopischen Analyse des LaminB2-Origins verwendete man eine 1,2 kb großes DNA-Fragment, welches die Region von 3728 bis 4929 bp umfasst (Paixao et al., 2004)

(siehe Abb. 26). Diese DNA-Sequenz fungiert ektopisch als Replikationsursprung. Warum inhibierte der *ppv1*-Promotor die Replikation des 1,2 kb langen LaminB2-Origins nicht? Eine Möglichkeit ist, dass die von Haase und in dieser Arbeit beschriebene Inhibierung der Replikation durch einen Promotor ausschließlich auf dem Plasmid und nicht im chromosomalen Kontext stattfindet. Eine weitere Überlegung ist, dass eine aktive Transkription des *ppv1*-Gens die Inhibierung der Replikation durch den Promotor aufhebt. Eine ähnliche Beobachtung wurde ebenfalls von Haase und Kollegen beschrieben. Nachdem der inhibierende CMV-Promotor mit der Transkription eines GFP-Gens aktiviert wurde, wurden die Plasmide mit derselben Effizienz wie ohne CMV-Promotor repliziert (Haase and Calos, 1991).



**Abb. 26: Die Replikationsfähigkeit verschiedener LaminB2-Konstrukte:**

Im Replikationsassay wurden vier verschiedene Konstrukte, welche den LaminB2-Origin (Registrierungsnummer: M94363) enthalten, getestet. Die LB2-Sequenzen LB2<sub>435</sub> und LB2<sub>M</sub> unterstützen die Replikation der FR-Plasmide, während die Plasmide p3026 und p3025 nicht in humanen 293/EBNA1-Zellen replizieren. Die Replikationseffizienz berechnet sich aus der Anzahl an replizierenden LB2<sub>x</sub>-Plasmiden geteilt durch den Ursprungsvektor p2932. Zum Vergleich ist der von Paixao publizierte LB2-Origin skizziert (Paixao et al., 2004).

Ob eine aktive Transkription in den Plasmiden p3025 und p3026 von dem ppv1-Promotor aus die Replikationseffizienz der Plasmide erhöht, wurde nicht untersucht. Ein möglicher negativer Einfluss eines inaktiven humanen Promotors auf die DNA-Replikation wurde bisher nicht beobachtet. Dies ist ein neuer Aspekt in der Regulation der DNA-Replikation in humanen Zellen, wurde jedoch in Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Für die Zukunft erscheint dies aber lohnenswert zu sein.

In der Literatur ist beschrieben, dass ein Zusammenhang zwischen der Transkription und der Replikation besteht (Dahmann et al., 1995; Danis et al., 2004). Man beobachtet, dass das transkriptionaktive locker gepackte Euchromatin früh in der S-Phase, während das dicht verpackte Heterochromatin spät in der S-Phase repliziert wird (Schubeler et al., 2002). Einige bekannte Replikationsursprünge sind im Promotorbereich von Genen lokalisiert, wie z.B. die Replikationsursprünge *c-myc* (Vassilev and Johnson, 1990),  $\beta$ -Globin (Kitsberg et al., 1993), HSP70 (Taira et al., 1994) und Top1 (Keller et al., 2002). Vielleicht führen ähnliche Mechanismen wie bei der Aktivierung der Transkription zur Initiation der Replikation. In diesen Abschnitt sollen die Chromatinstruktur und deren Modifikationen, die bei der Transkriptionsaktivierung eine entscheidende Rolle spielen, im Zusammenhang mit der Initiation der Replikation diskutiert werden. Chromatin-Remodellingfaktoren verschieben die Nukleosomen wodurch die DNA zugänglicher für die Transkriptionsfaktoren wird (Varga-Weisz and Becker, 1995). Es wird vermutet, dass die Nukleosomen-Struktur ebenfalls die Intiation der Replikation auf dieselbe Art und Weise beeinflusst. In der Hefe *S. cerevisiae* wird beobachtet, dass der Replikationsursprung ARS1 frei von Nukleosomen ist (Thoma et al., 1984). Für die Etablierung dieses nukleosomenfreien Replikationsursprungs sind die Proteine Abf1 und ORC verantwortlich. Eine Veränderung der Abf1- und ORC-Bindestellen verhindert die Replikationsinitiation. (Lipford and Bell, 2001; Simpson, 1990). Auch sind die Nukleosomen am Replikationsursprung *oriP* präzise positioniert. In der G1/S-Phase erfolgt eine Umordnung der Nukleosomen und die Bindung des Chromatin-Remodelling-Proteins SNF2h (Zhou et al., 2005). Eine Depletion von SNF2h inhibiert die Replikation von *oriP*-Plasmiden und verringert die Rekrutierung von Mcm3 in der G1/S-Phase an *oriP*. Weiterhin wurde beobachtet, dass die *oriP* flankierenden Nukleosomen in der G1/S-Phase eine geringere Acetylierung am Histon 3 K9 aufweisen. Im Gegensatz dazu verstärkt in anderen Organismen wie Drosophila und der Hefe *S.cerevisiae* die Acetylierung die Replikationseffizienz, während eine Deacetylierung die Replikationsinitiation reprimiert

(Aggarwal and Calvi, 2004). Des Weiteren interagieren die humanen Proteine Orc1 und Mcm2 mit der Histonacetyltransferase HBO1 (Burke et al., 2001; Iizuka and Stillman, 1999). Dies spricht dafür, dass durch die Histonacetylierung und damit einhergehenden Destabilisierung der Nukleosomenstruktur, die DNA zugänglicher für Replikationsinitiationsfaktoren wird. Neben der Nukleosomenpositionierung und der Histonacetylierung könnten weitere epigenetisch relevante Modifikationen der Histone die Initiation der Replikation beeinflussen.

### 2.3 Analyse von ChIP-Sequenzen im Replikationsassay

In dieser Arbeit wurden DNA-Sequenzen, die im ChIP mit dem Orc2-Antikörper angereichert wurden, im Replikationsassay hinsichtlich ihrer ARS-Aktivität untersucht. Von den getesteten 99 Orc2-bindenden Sequenzen konnten nur 14 Sequenzen im Replikationsassay als replizierende Sequenzen bestätigt werden. Dieser auf den ersten Blick relativ geringer Anteil, lässt sich durch verschiedene Aspekte erklären. Ein Grund dafür ist, dass wahrscheinlich nicht jedes chromosomale DNA-Fragment ARS-Aktivität besitzt. Dies bedeutet, dass die untersuchten Fragmente bedingt durch die Größe nur Anteile des Replikationsursprunges enthalten könnten. Ein zweiter Grund ist, dass auch DNA-Sequenzen welche keine aktive Initiationsstelle der Replikation enthalten, in geringer Masse von den Orc-Proteinen gebunden werden. Für hORC wurde bisher kein spezifisches DNA-Erkennungsmotiv gefunden. *In vitro*-Analysen zeigen, dass der ORC-Komplex auch an artifizielle AT-Sequenzen bindet und dort einen funktionellen pre-RC ausbilden kann (Anglana et al., 2003). Somit könnten auch Fragmente, die keine Replikationsursprünge enthalten im ChIP, angereichert worden sein. Ein weiterer Grund liegt im experimentellen Ansatz. Die in der Immunpräzipitation aufgereinigten DNA-Fragmente enthalten auch DNA-Sequenzen, welche nicht spezifisch durch das Epitop des Orc2-Antikörpers angereichert wurden. Der polyklonale Orc2-Antikörper erkennt zwar hauptsächlich Orc2-Proteine, zu einem geringen Anteil aber auch andere humane Proteine. Dies kann man anhand der mitgeführten Präimmenserum-Kontrolle beobachten, dass im ChIP auch eine Anreicherung von unspezifischen DNA-Sequenzen erfolgt. Um noch genauere Aussagen zu erhalten, weshalb nicht alle durch ChIP mit Orc2 angereicherte Sequenzen im Replikationsassay replizierten, sind weitere Experimente notwendig.

Die Bestätigung der replizierenden DNA-Fragmente als Replikationsursprünge im Genom erfolgte u.a. durch die „nascent strand“-Analyse. Sechs der 14 replizierenden Sequenzen erwiesen sich als Startstellen der Replikation im Genom. Somit wurde nicht bei alle DNA-Sequenzen, welche die plasmidale Replikation unterstützen, eine Anreicherung an naszierender DNA im chromosomalen Kontext gemessen. Dies bedeutet allerdings nicht, dass dies falsch positive Kandidaten sind, sondern möglicherweise redundante im Genom nicht aktivierte Replikationsursprünge. In der Hefe *S. cerevisiae* wurde eine ähnliche Beobachtung gemacht und festgestellt, dass nicht alle Replikationsursprünge in der S-Phase aktiviert werden (Santocanale and Diffley, 1996).

Durch die Aufreinigung und Analyse von Orc2-bindenden Sequenzen ist es gelungen, humane Replikationsursprünge zu isolieren. Mit der Identifizierung dieser sechs humanen Replikationsursprünge wurde gezeigt, dass man aus einem Pool von ChIP-Sequenzen, gefällt mit dem Orc2-Antikörper, humane Replikationsursprünge mit Hilfe des Replikationsassays isolieren kann.

#### **2.4 Vergleich des „origin trapping“-Assays mit anderen Methoden zur Identifizierung von Replikationsursprüngen**

Bisher wurden die Replikationsursprünge in Säugetierzellen aufwendig im Genom mit Methoden wie der 2D-Gelelektrophorese (Wu and Gilbert, 1995), der „nascent strand“-Analyse (Dijkwel and Hamlin, 1995) und Okazaki-Hybridisierungen (Burhans et al., 1990) kartiert. Funktionell konnte man die Replikationsursprünge ektopisch, d.h. an einer anderen Stelle im Genom analysieren und durch eine Initiation der Replikation in einem Bereich, wo sonst keine Initiation stattfand, bestätigen (Aladjem and Fanning, 2004). Dies gelang bisher aber nicht für alle identifizierten humanen Replikationsursprünge. Methodisch sind die genannten experimentellen Analysen schwierig und zeitaufwendig, so dass eine Analyse einer größeren Anzahl an DNA-Fragmenten nicht möglich ist. Um diese Lücke zu schließen, ist es wünschenswert, einen Ansatz zu etablieren, mit welchem mehrere Kandidaten leicht auf einmal funktionell überprüft werden können. Dies ist mit der gewählten Kombination von ChIP und episomaler Replikationsaktivität gelungen.

Knippers und Kollegen nutzten ebenfalls die ChIP-Technik zur Anreicherung von ORC-bindenden Sequenzen. Potentielle Replikationsursprünge wurden nicht funktionell, sondern mittels „nascent strand“-Analyse verifiziert. Dies führte zur Identifizierung der Replikationsursprünge Top1 (Keller et al., 2002) und Mcm4 (Ladenburger et al., 2002; Schaarschmidt et al., 2002).

Mit dem Replikationsassay gelang schon früher die Isolierung von replizierenden humanen DNA-Sequenzen. Aber erst durch die hier in dieser Arbeit beschriebene Untersuchung von Orc2-bindenden DNA-Sequenzen im Replikationsassay konnten gezielt humane Replikationsursprünge identifiziert werden. Mit diesem „origin trapping“-Assay kann man schnell eine Vielzahl von humanen ORC-bindenden Sequenzen anreichern und auf ihre Replikationsfähigkeit hin untersuchen. Dies ist ein wichtiger Vorteil dieser neuen Analysemerhode.

### **3 Bestätigung von Or6 als neuen humanen Replikationsursprung**

#### **3.1 Untersuchungen der Or6-Sequenz im Replikationsassay**

Bei der gemeinsamen Untersuchung der ersten fünf ChIP-Sequenzen im Replikationsassay wurde die Or6-Sequenz als ARS-aktives DNA-Fragment identifiziert. Die Replikationsfähigkeit des Plasmides p2932 stieg mit der Or6-Sequenz auf etwas mehr als das Doppelte (siehe dazu Punkt IV.2.2). Das Plasmid p2903 ohne *oriP* replizierte nicht extrachromosomal. Die Orc2-Anreicherung an die Or6-Sequenz auf dem Plasmid p3242.2 wurde mittels ChIP bestätigt. Dabei wurde Orc2 an die Or6-Sequenz in einem vergleichbaren Maße angereichert wie an *oriP* (Abb. 20, IV.4.2). Allerdings replizierte p3242.2 mit Or6 nicht mit derselben Effizienz wie das OriP-Plasmid p2832.

Zur Bestätigung von Or6 als Replikationsursprung wurden Or6-Multimere synthetisiert und deren Replikationsfähigkeit bestimmt. Die Replikation eines schwachen Origins kann durch Multimerisierung dieser DNA-Sequenz im Replikationsassay beträchtlich erhöht werden. Dies wurde z.B. für das schwach replizierende Rep\*-Element beschrieben. Eine Multimerisierung des Fragments durch drei hintereinander liegende Rep\*-Sequenzen

erhöhte die Replikationsfähigkeit der FR-Plasmide mit dieser Sequenz (Kirchmaier and Sugden, 1998). Plasmide mit acht hintereinander liegende Rep\*-Sequenzen replizieren mit derselben Effizienz wie *oriP* im Replikationsassay (persönliche Mitteilung B. Sugden). Die Multimerisierung der Or6-Sequenz ergab, dass die Replikationseffizienz des Plasmides p3242.2 durch das Einfügen von Or6-Multimeren im Replikationsassay linear zunahm. Das Plasmid p3336 mit dem Or6-Hexamer replizierte nicht. Die Erhöhung der extrachromosomalen Replikationseffizienz durch das Or6-Dimer und Or6-Tetramer zeigte, dass die Replikation des Plasmides p3242.2 durch die Or6-Sequenz effektiv unterstützt wird.

Um die Or6-Sequenz näher zu charakterisieren wurden verschiedene Deletionsmutanten konstruiert. Die Plasmide, die eine stärkere Replikationseffizienz aufwiesen als p2932, wurden als replizierende Sequenzen bezeichnet. Das Ergebnis zeigte, dass sich lediglich das Plasmid mit der ganzen Or6-Sequenz deutlich vom Hintergrund p2932 abhob und replizierte. Die Or6-Mutante p3434 replizierte schwach im Vergleich zu dem Or6-Plasmid p3242.2. Die Plasmide p3435 mit der 3'-Hälfte und das Plasmid p3436 mit der 5'-Hälfte der Or6-Sequenz replizierten nicht. Damit ist eindeutig bewiesen, dass das Plasmid p3242.2 nicht ein bestimmtes Sequenzelement, sondern die vollständige Or6-Sequenz zur extrachromosomalen Replikation benötigt. Die Or6-Sequenz dient hier wahrscheinlich wie das DS-Element im *oriP*-Plasmid p2832 als Replikationsursprung.

### 3.2 Untersuchungen der Or6-Region im genomischen Kontext

Die Frage, ob das isolierte Or6-Fragment spezifisch im Genom durch ORC erkannt wird, wurde mit Hilfe der ChIP-Analyse untersucht. Bisher konnte eine spezifische ORC-Bindung nur an dem LaminB2-Origin (Abdurashidova et al., 2003) und an den neu entdeckten Top1- und Mcm4-Origin (Keller et al., 2002; Schaarschmidt et al., 2002) im Genom nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde eine spezifische Anreicherung von Orc2 an Or6 bzw. Mcm4-Origin, aber keine an den anderen potentiellen Replikationsursprüngen im genomischen Kontext gemessen. Auf dem Plasmid dagegen wurde eine ORC-Anreicherung an allen neuen Replikationsursprüngen mittels ChIP detektiert (siehe IV.4.2). Die Analyse der ORC-Anreicherung auf dem Plasmid ist einfacher und über mehrere Jahre erforscht, während die Analyse der ORC-Bindung in chromosomalen



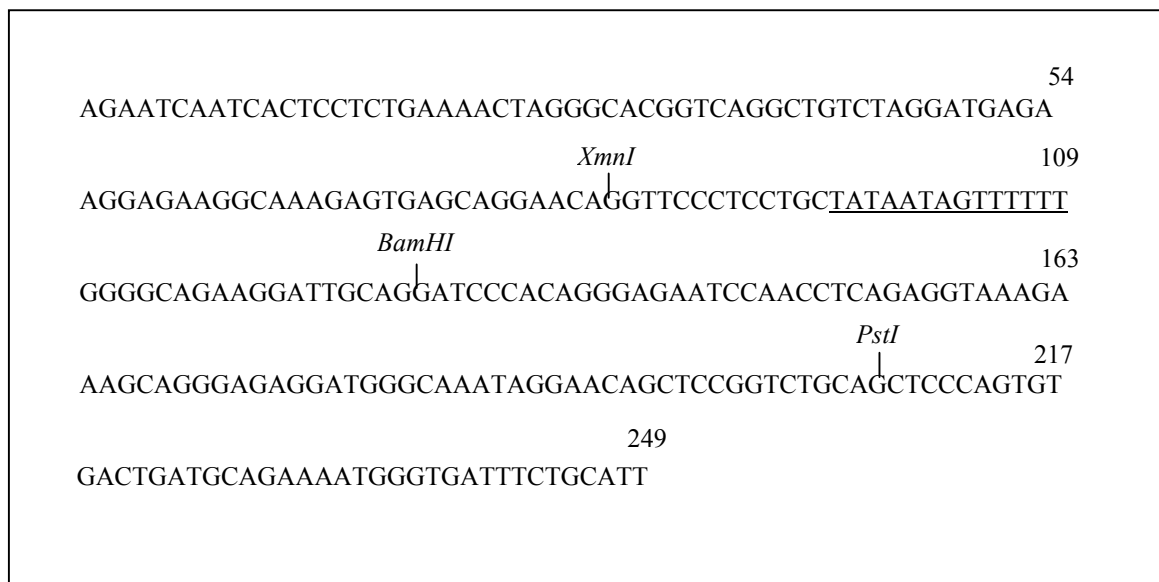
Regionen erst in den letzten Jahren zu einem Erfolg geführt hat. Durch die höhere Kopienzahl der Plasmid-DNA in der Zelle ist der Anteil an chromosomalen DNA-Fragmenten in den ChIP-Analysen im plasmidalen Kontext geringer. Auf Grund der geringen Bindungsaffinität von ORC an die DNA ist eine ORC-Anreicherung auf dem Plasmid leichter zu detektieren als im chromosomalen Kontext. Die Untersuchung der Bindung von anderen Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren Sp1 an die DNA mittels ChIP stellt im chromosomalen Kontext kein Problem dar (Clem et al., 2003). Die Transkriptionsfaktoren haben meist sehr spezifische und hochaffine Bindestellen. Bei der ChIP-Analyse von Orc-Proteinen erschwert die geringe Sequenzaffinität des ORC-Komplexes die Untersuchungen. Deswegen ist es unklar, ob die ChIP-Methode im chromosomalen Kontext sensitiv genug ist, um die spezifische ORC-Bindung an allen chromosomalen Replikationsursprüngen nachzuweisen. Es gibt eine Untersuchung des Replikationsursprunges *c-myc*, bei welchem keine spezifische Bindung des ORC-Komplexes auf dem Genom feststellbar war. Allerdings wurde die Anreicherung des Mcm3-Proteins am Replikationsursprung mittels ChIP detektiert (Leffak, zur Veröffentlichung eingereicht).

Zur Bestätigung einer chromosomalen Region als aktiven Replikationsursprung wird die „nascent strand“-Analyse angewandt. Diese Methode ist seit Jahren etabliert und dient zur Bestätigung potentieller Replikationsursprünge. Alle bisher bekannten humanen Replikationsursprünge wurden mit dieser Methode analysiert und als Initiationsstelle der DNA-Replikation im chromosomalen Kontext bestärkt (Aladjem et al., 1995; Araujo et al., 1999; Cohen et al., 2002; Giacca et al., 1994; Keller et al., 2002; Kobayashi et al., 1998; Ladenburger et al., 2002; Taira et al., 1994; Tao et al., 2000; Yoon et al., 1995). Die „nascent strand“-Analyse in A39- und 293/EBNA1-Zelllinien zeigte, dass Or6 und die anderen im „origin trapping“-Assay isolierten DNA-Fragmente humane Replikationsursprünge sind.

### **3.3 Die Sequenzmotive der Or6-Sequenz**

Die Or6-Sequenz liegt in der 5'-UTR des Retinol-Dehydrogenase-Gens (RDH). RDH ist ein Enzym, welches für die Synthese der all-trans Retinolsäure in den Kerstinozyten der Epidermis verantwortlich ist. RDH wird in verschiedenen Zellen unterschiedlich stark

exprimiert, z.B. in den Nierenkarzinom-Zellen 293, allerdings nicht in der Hamsteroovarien-Zelllinie CHO (Markova et al., 2003). Das Or6-Fragment ist insgesamt 249 bp lang. In Abbildung 27 ist die isolierte Or6-Sequenz mit den drei eingezeichneten Restriktionsschnittstellen skizziert, die zur Synthese der Or6-Mutanten benutzt wurden. Zwischen den Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xmn*I befindet sich eine AT-reiche Region, die sich aus der replizierenden Or6-Sequenz heraushebt. Diese Sequenz enthält ein TATAATA-Motiv und ein T<sub>6</sub>-Fragment. In diesen auf Grund des AT-Gehalts leicht aufschmelzbaren Bereich könnte die genaue Startstelle der Replikation liegen. Mit der RIP-Technik sowie mit Punktmutationsanalysen könnte man diese Region analysieren (Bielinsky and Gerbi, 2001).



**Abb. 27: Die Sequenz des potentiellen Replikationsursprunges Or6 (RDH):**

Der neue potentielle Replikationsursprung Or6 liegt im 5'-Bereich des Retinol-Dehydrogenase-Gens (RDH). Auffallend ist eine AT-reiche Sequenz in der Mitte, die sich von Position 96 bis 109 erstreckt.

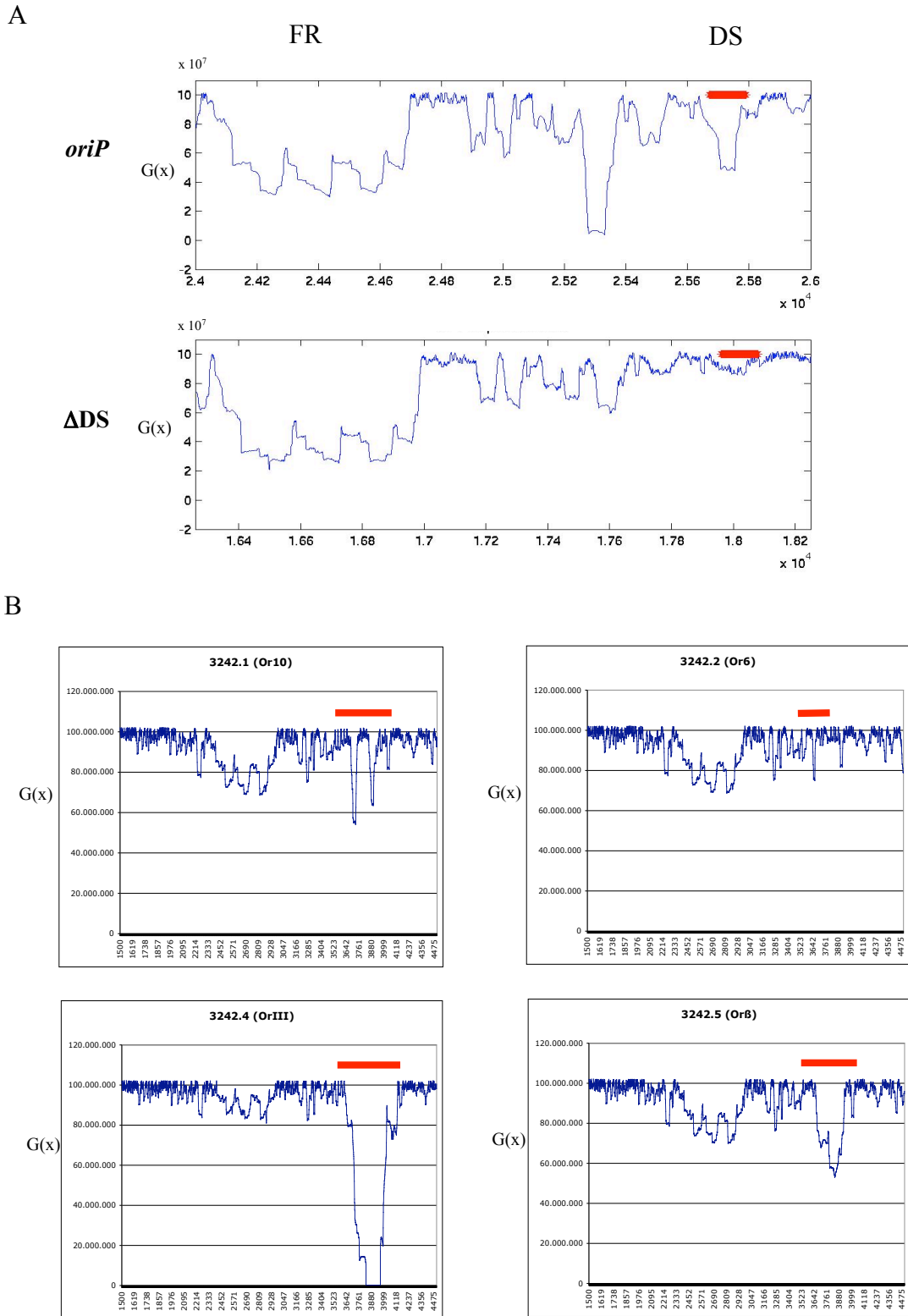
#### 4 Die neu identifizierten Replikationsursprünge im chromsomalen Kontext

Die Sequenzen der potentiellen Replikationsursprünge Or $\beta$ , OrIII, Or9, Or10 und Or15 sind im Anhang dieser Arbeit beigelegt. Alle Sequenzen enthalten AT-reiche Regionen

Ein Konsensusmotiv ist nicht erkennbar. Um gemeinsame physikalische Eigenschaften der potentiellen Replikationsursprünge zu charakterisieren, wurden die Origins mit einem mathematischen Programm zur Identifizierung von leichtaufwindbaren DNA-Sequenzen („supercoiled-induced DNA duplex destabilized structure“, SIDD) analysiert. Mit diesem SIDD-Programm wurden die Startstellen der Replikation in der Hefe *S. cerevisiae* charakterisiert (Prasanth et al., im Druck). Diese Replikationsursprünge in Hefezellen sind durch ein allgemeingültiges Profil charakterisiert. Dieses Profil zeichnet sich durch eine leicht destabilisierende DNA-Sequenz im Bereich des Replikationsursprunges aus. Außerdem wurde mit diesem neuen Programm eine neue DUE im *oriP* identifiziert (Polonskaya et al., 2004).

Die SIDD-Profile der Plasmide p3242.1 (Or10), p3242.2 (Or6), p3242.4 (OrIII) und p3242.5 (Or $\beta$ ) sind in Abbildung 28 zusammengefasst. Das SIDD-Profil von *oriP* in Abbildung 28A zeigt, dass die FR-Region eine leicht zu destabilisierende Sequenz ebenso wie das DS-Element ist. Die Entfernung des DS-Elements führt in diesen Bereich zu einer geschlossenen DNA-Sequenz, die erst durch einen größeren Energieaufwand aufschmelzbar ist. Die humanen DNA-Sequenzen enthalten durch den relativ hohen AT-Gehalt bedingt ebenfalls leicht aufschmelzbare Bereiche. Dabei gibt es hier individuelle Unterschiede zwischen den Fragmenten. Or $\beta$  und OrIII besitzen eine viel größere leicht destabilisierte DNA-Sequenz als Or6 und Or10.

Es wurden ebenfalls SIDD-Profile von den entsprechenden genomischen DNA-Bereichen angefertigt. Diese sind hier nicht dargestellt, weil sie den SIDD-Profilen im plasmidalen Kontext entsprachen. Die potentiellen Replikationsursprünge könnten, durch ihre leicht aufschmelzbaren Bereiche, das DS-Element ersetzen und somit die Replikationseffizienz der Plasmide, wie im Ergebnisteil (IV.2.2 und IV.4.1) beschrieben, erhöhen. Durch eine Mutationsanalyse in diesen Bereichen könnte die Bedeutung der Originssequenzen für die Replikationsaktivität untersucht werden. Bisher scheint es jedoch, dass keine lineare Beziehung zwischen dem SIDD-Profil und der Replikationsaktivität besteht, da z.B. der Replikationsursprung OrIII ein stärkeres SIDD-Profil besitzt als *oriP*. In den hier vorgestellten Versuchen replizierte das *oriP*-Plasmid jedoch effizienter als p3242.4 (OrIII).



**Abb. 28: SIDD-Profil der Plasmide p3242.1, p3242.2, p3242.4 und p3242.5**

Das SIDD-Profil zeigt die zunehmende freie Energie  $G(x)$ , die für die Denaturierung der Basenpaare an der Position  $x$  ( $x$ -Achse) erforderlich ist. In **(A)** sind die SIDD-Profile von *oriP* und von *oriP* ohne das DS und in **(B)** die SIDD-Profile von p3242.1, p3242.1, p3242.4 und p3242.5 dargestellt. Rot gekennzeichnet ist die Position des DS-Elements und der isolierten potentiellen Replikationsursprünge.

Vermutlich spielt für die Origin-Aktivität die Lokalisation der Replikationsursprünge zu anderen regulatorischen und epigenetischen Elementen, eine wichtige Rolle. Im Folgenden wird die Beziehung der isolierten Replikationsursprünge im chromosomalen Kontext diskutiert. In der Tabelle 4 erfolgt eine Zusammenstellung der neuen Origins gemeinsam mit sechs bekannten Replikationsursprüngen. Die Lage der Sequenzen auf dem Genom sowie die Registrierungsnummern der NSBI-Bibliothek sind ebenfalls aufgelistet. Vier der neuen humanen Replikationsursprünge befinden sich in nicht näher untersuchten Regionen des Chromatins. Zwei potentielle Replikationsursprünge liegen im 5'-Bereich (Or6) bzw. im 3'-Bereich (Or15) eines Gens. Die bisher bekannten Replikationsursprünge sind ebenfalls in den unterschiedlichsten Regionen im Genom kartiert worden, welche jedoch alle im Euchromatin lokalisiert sind. Entweder liegen sie zwischen zwei Genen (Mcm4, DHFR), im Promotorbereich (Top1, HSP70) oder im Gen (LaminB2, HPRT).

Das Chromatin zeichnet sich durch die Bildung von Nukleosomenfasern aus, die sich im Durchschnitt alle 100 kb an das Kerngerüst heften (Knippers, 1995). Dies erfolgt an MAR-Elementen („matrix attachment region“). Beim Vergleich der neuen potentiellen Replikationsursprünge wurde eine Gemeinsamkeit festgestellt. Alle besitzen im etwa gleichen Abstand von sieben bis neun Kilobasen Entfernung zur Initiationsstelle der Replikation ein MAR-Element. Diese Sequenzen wurden mit dem „MAR-Wiz“-Programm aus dem Internet analysiert (<http://www.futuresoft.org/MAR-Wiz/>). Das Programm identifizierte die hypothetischen MAR-Sequenzen nach dem Vorhandensein folgender sechs Eigenschaften: Vorliegen eines ATTA-Motivs, einer TG-reichen Sequenz, einer Topoisomerase-Erkennungsequenz, einer AT-reichen Sequenz und nach bestimmten topologischen Merkmalen wie verbogener DNA-Sequenz mit TTTAAA-Motiv sowie Wiederholungen von TG, CA oder TA-Dinukleotiden. In der letzten Spalte der Tabelle 4 wurde das nächstliegende MAR-Element verzeichnet. MAR ist eine Sequenz, die das Chromatin mit dem Kerngerüst verbindet (Heng et al., 2004). Drei der bekannten Origins HPRT, LaminB2 und DHFR liegen auf dem Genom ebenfalls sieben bis zehn Kilobasen von einer MAR-Sequenz entfernt. Die Erkenntnis, dass ein MAR-Element sich in der Nähe eines Replikationsursprunges befindet, wurde schon früher gewonnen.

<i>Origin</i>	<i>DNA-Sequenz</i>	<i>Chromosom</i>	<i>Registrierungsnummer</i>	<i>MAR-Wiz</i>
Or6	<i>RDH</i> -Gen 5`Region	12	AC026120 59950-60150 bp	7 kb
OrIII	Gen nicht beschreiben	5	AC108095 131681-132166 bp	6,9 kb
Orβ	Gen nicht beschrieben	1	HSDJ543C6 40381-40792 bp	7,0 kb / 8,5 kb
Or10	Gen nicht beschrieben	1	AC099795 104440-104685 bp	8,9 kb
Or15	<i>SNAP25</i> -Gen 3`Region	20	HS1068F16 42131-42334 bp	6,5 kb
Or9	Gen nicht beschrieben	8	AP000428 65472-65699	7,3 kb
LaminB2	<i>LaminB2</i> -Gen 3`Region	19	AC011522 19000-19800 bp	9 kb
HPRT	Intron 1 <i>HPRT</i> -Gen	X	AC004383 45363-45536 bp	10 kb (nach Lit. 3)
Top1	Promotorregion <i>Top1</i> -Gen	20	AL035652 12461-12749 bp	30 kb (nach Lit. 5 )
Mcm4	zw. <i>PRKDC</i> & <i>MCM4</i> -Gen	8	U63630 12946-13482 bp	4 kb
DHFR	zw. <i>DHFR</i> & <i>EB1212</i> -Gen	18	X94372/AF028017 β 2400 bp/β`7250 bp	nach Lit. 7-10 kb
HSP70	Promotorregion <i>HSP70</i> -Gen	6	AL662834 79264 - 79792 bp	15 kb

**Tabelle 4: Vergleich der potentiellen Replikationsursprünge mit einigen bekannten humanen Replikationsursprüngen :**

In der Tabelle ist die Lage der Replikationsursprünge im Genom (Spalte 2-3) verzeichnet. Außerdem sind die Registrierungsnummern der „ncbi“-Bibliothek (Spalte 4) aufgelistet. Die letzten Spalte gibt an, wie groß der Abstand vom Replikationsursprung zum nächstliegenden potentiellen MAR-Element ist. Die MAR-Elemente wurden mit dem „MAR-Wiz“-Programm berechnet.

Bereits 1982 wurde vermutet, dass ein Zusammenhang zwischen den Chromatin-Schleifen und der Größe der Replikons besteht (Buongiorno-Nardelli et al., 1982). Die Replikons in Säugetierzellen werden auf eine Größe von ca. 100 kb geschätzt (Huberman and Riggs, 1968). Dies entspricht der Durchschnittsgröße einer Chromatin-Schleife. Des Weiteren

wurde naszierende DNA, die an die Kernmatrix assoziiert ist, entdeckt (Carri et al., 1986; Pardoll et al., 1980) Daraufhin wurde ein Modell erstellt, wonach die Replikationsenzyme an die Kernmatrix gebunden sind und die Synthese der DNA an der Kernmatrix in Replikationsapparaten stattfindet (Cook, 1999). Unterstützt wird dieses Modell durch die Beobachtung, dass neusynthetisierte DNA nicht diffus im Zellkern verteilt ist, sondern an spezifischen Replikationsstellen („replication foci“) lokalisiert ist (Nakamura, 1988; Nakayasu and Berezney, 1989). Diese Replikationsstellen bleiben erhalten, auch wenn der größte Teil des Chromatins entfernt wurde. Dies impliziert, dass die neusynthetisierte DNA an einer Kernstruktur anhaftet (Hozak et al., 1993). Anhand der Anzahl der Replikationsstellen, der Länge des Genoms und der Syntheserate an der bidirektionalen Replikationsgabel wurde berechnet, dass eine Replikationsstelle in der frühen S-Phase mehrere Replikons enthält (Jackson and Pombo, 1998; Ma et al., 1998) und somit auch als Replikationsfabrik bezeichnet wird. Des Weiteren sind Replikationsfaktoren sowie Proteine, die an der Replikation beteiligt sind, wie z.B. DNA-Polymerase  $\alpha$  (Hozak et al., 1993) und  $\epsilon$  (Fuss and Linn, 2002), PCNA (Hozak et al., 1993), RPA (Cardoso et al., 1993) und CAF (Krude, 1995) mit diesen Replikationsstellen kolokalisiert (Frouin et al., 2003). Zellzyklus-Untersuchungen der Replikationsstellen in lebenden Zellen zeigen, dass diese Replikationsfabriken ihre Position im Zellkern nicht verändern (Leonhardt et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass die Replikationsstellen an eine Kernmatrix immobilisiert sind. Es wurde anhand eines GFP fusionierten PCNA-Proteins und durch Markierung der neusynthetisierten DNA beobachtet, dass früh replizierende DNA im Kerninnenraum und spät replizierende DNA an der Peripherie der Nukleoli sowie der Kernmembran lokalisiert ist (Leonhardt et al., 2000; Sadoni et al., 2004). Diese Untersuchungen zeigen, dass der Kern eine bestimmte Architektur besitzt, in der die DNA in Korrelation zur ihrer Funktion (wie z.B. Replikation und Transkription) an bestimmten Stellen im Kern positioniert ist. Die Kernmatrix spielt bei dieser Ordnung scheinbar eine entscheidende Rolle (Cremer et al., 2000).

## VI. Zusammenfassung

Replikationsursprünge (Origins) sind funktionell definierte DNA-Elemente, an welchen die Initiation der DNA-Replikation stattfindet. In der Hefe *S. cerevisiae* sind dies genetisch leicht eingrenzbar DNA-Sequenzen, die ca. 200 bp lang sind. Im Gegensatz dazu weiß man über humane Replikationsursprünge relativ wenig. Man schätzt, dass 3000 bis 30000 Replikationsursprünge in humanen Zellen existieren. Zehn davon sind näher charakterisiert. Bisher war die Identifizierung der Replikationsursprünge durch das Fehlen einer funktionellen Analysemethode limitiert. Erstes Ziel dieser Arbeit war es, mit der Etablierung des „origin trapping“-Assay eine funktionelle Untersuchungsmethode für die Identifizierung von Replikationsursprüngen zu entwickeln. Zur Identifizierung dieser Startstellen der Replikation wurde die Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) mit dem transienten Replikationsassay kombiniert. Der „origin trapping“-Assay wurde erfolgreich in den humanen Zelllinien 293/EBNA1 und 143/EBNA1 etabliert.

Mit diesem „origin trapping“-Assay wurden sechs neue potentielle Replikationsursprünge identifiziert. Diese wurden im chromosomalen Kontext in 293/EBNA1-Zellen und in A39-Zellen mittels der „nascent strand“-Analyse als tatsächliche Replikationsursprünge bestätigt. Im plasmidalen Kontext wurde den neu identifizierten Replikationsursprüngen sowie dem LaminB2-Origin eine ARS-Aktivität bescheinigt. Die spezifische ORC-Anreicherung an den neuen Replikationsursprüngen wurde mittels ChIP detektiert. Ein Replikationsursprung Or6 wurde näher analysiert. Durch Or6-Deletionsmutanten wurde gezeigt, dass das gesamte Fragment für die Originaktivität benötigt wird. Gleichzeitig wurde durch die Erhöhung der Replikationseffizienz in Multimerisierungsexperimenten, Or6 als Replikationsursprung konkretisiert.

Die potentiellen Replikationsursprünge wurden untereinander verglichen. Alle DNA-Sequenzen sind sehr AT-reich und folglich leicht aufschmelzbare genomische Bereiche, welches mit dem SIDD-Programm festgestellt wurde. Eine weitere Sequenzanalyse ergab keine konservierten Sequenz-Motive zwischen den neu identifizierten und den bekannten



---

Replikationsursprüngen. Auch die Lokalisation der Replikationsursprünge im Genom ist sehr heterogen. Allen neu identifizierten Origins gemeinsam ist die gleiche Entfernung (sieben bis zehn Kilobasen) zu einer potentiellen MAR-Sequenz, welche mit dem MAR-Wiz-Programm bestimmt wurde. Einige der bekannten Replikationsursprünge weisen ebenfalls eine MAR-Sequenz in ihrer unmittelbaren Umgebung auf. Die Annahme das humane Replikationsursprünge in der Nähe zu einer MAR-Sequenz lokalisiert sind, wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben und in dieser Arbeit erneut verstärkt.

Mit dem „origin trapping“-Assay ist es gelungen, eine funktionelle Analysemethode zur Identifizierung von humanen Replikationsursprüngen zu entwickeln. Dies wird eindrucksvoll durch die sechs mit dieser Methode identifizierten Replikationsursprünge belegt.

---

## Literatur

- 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.
- 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.
- Aggarwal, B.D. and Calvi, B.R. (2004) Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature*, **430**, 372-376.
- Aiyar, A., Tyree, C. and Sugden, B. (1998) The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *EMBO J.*, **17**, 6394-6403.
- Aladjem, M.I. and Fanning, E. (2004) The replicon revisited: an old model learns new tricks in metazoan chromosomes. *EMBO Rep*, **5**, 686-691.
- Aladjem, M.I., Groudine, M., Brody, L.L., Dieken, E.S., Fournier, R.E., Wahl, G.M. and Epner, E.M. (1995) Participation of the human beta-globin locus control region in initiation of DNA replication. *Science*, **270**, 815-819.
- Aladjem, M.I., Rodewald, L.W., Kolman, J.L. and Wahl, G.M. (1998) Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus. *Science*, **281**, 1005-1009.
- 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**, 1098-1110.
- 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**, 4138-4150.
- Anachkova, B. and Hamlin, J.L. (1989) Replication in the amplified dihydrofolate reductase domain in CHO cells may initiate at two distinct sites, one of which is a repetitive sequence element. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 532-540.

- 
- 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**, 385-394.
- Araujo, F.D., Knox, J.D., Ramchandani, S., Pelletier, R., Bigey, P., Price, G., Szyf, M. and Zannis-Hadjopoulos, M. (1999) Identification of initiation sites for DNA replication in the human dnmt1 (DNA-methyltransferase) locus. *J. Biol. Chem.*, **274**, 9335-9341.
- Austin, R., Orr-Weaver, T. and Bell, S. (1999) Drosophila ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element. *Genes Dev.*, **13**, 2639-2649.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C. and et al. (1984) DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, **310**, 207-211.
- Baiker, A., Maercker, C., Piechaczek, C., Schmidt, S.B., Bode, J., Benham, C. and Lipps, H.J. (2000) Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix. *Nat Cell Biol*, **2**, 182-184.
- Baumforth, K.R., Young, L.S., Flavell, K.J., Constandinou, C. and Murray, P.G. (1999) The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol*, **52**, 307-322.
- Bell, S.P. and Stillman, B. (1992) Nucleotide dependent recognition of chromosomal origins of DNA replication by a multi-protein complex. *Nature*, **357**, 128-134.
- Bielinsky, A.K. and Gerbi, S.A. (2001) Where it all starts: eukaryotic origins of DNA replication. *J. Cell Sci.*, **114**, 643-651.
- Bochkarev, A., Barwell, J.A., Pfuetzner, R.A., Bochkareva, E., Frappier, L. and Edwards, A.M. (1996) Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein, EBNA1, bound to DNA. *Cell*, **84**, 791-800.
- Bochkarev, A., Barwell, J.A., Pfuetzner, R.A., Furey, W., Jr., Edwards, A.M. and Frappier, L. (1995) Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein EBNA 1. *Cell*, **83**, 39-46.
- Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C. and Kohwi-Shigematsu, T. (1992) Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science*, **255**, 195-197.
- Bornkamm, G.W. and Hammerschmidt, W. (2001) Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 437-459.

- 
- Buongiorno-Nardelli, M., Micheli, G., Carri, M.T. and Marilley, M. (1982) A relationship between replicon size and supercoiled loop domains in the eukaryotic genome. *Nature*, **298**, 100-102.
- Burhans, W.C., Vassilev, L.T., Caddle, M.S., Heintz, N.H. and DePamphilis, M.L. (1990) Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes. *Cell*, **62**, 955-965.
- Burke, T.W., Cook, J.G., Asano, M. and Nevins, J.R. (2001) Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 15397-15408.
- Caddle, M.S. and Calos, M.P. (1992) Analysis of the autonomous replication behavior in human cells of the dihydrofolate reductase putative chromosomal origin of replication. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5971-5978.
- Cardoso, M.C., Leonhardt, H. and Nadal-Ginard, B. (1993) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell*, **74**, 979-992.
- Carminati, J.L., Johnston, C.G. and Orr-Weaver, T.L. (1992) The Drosophila ACE3 chorion element autonomously induces amplification. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 2444-2453.
- Carri, M.T., Micheli, G., Graziano, E., Pace, T. and Buongiorno-Nardelli, M. (1986) The relationship between chromosomal origins of replication and the nuclear matrix during the cell cycle. *Exp. Cell. Res.*, **164**, 426-436.
- Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A. and Yates, J.L. (2001) Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10085-10089.
- Church, G.M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1991-1995.
- Cimbora, D.M., Schubeler, D., Reik, A., Hamilton, J., Francastel, C., Epner, E.M. and Groudine, M. (2000) Long-distance control of origin choice and replication timing in the human beta-globin locus are independent of the locus control region. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 5581-5591.
- Clarke, L. and Carbon, J. (1980) Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature*, **287**, 504-509.
- Clem, A.L., Hamid, T. and Kakar, S.S. (2003) Characterization of the role of Sp1 and NF-Y in differential regulation of PTTG/securin expression in tumor cells. *Gene*, **322**, 113-121.

- 
- 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.
- Cook, P.R. (1999) The organization of replication and transcription. *Science*, **284**, 1790-1795.
- Cremer, T., Kreth, G., Koester, H., Fink, R.H., Heintzmann, R., Cremer, M., Solovei, I., Zink, D. and Cremer, C. (2000) Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **10**, 179-212.
- Dahmann, C., Diffley, J.F. and Nasmyth, K.A. (1995) S-phase-promoting cyclin-dependent kinases prevent re-replication by inhibiting the transition of replication origins to a pre-replicative state. *Curr. Biol.*, **5**, 1257-1269.
- 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**, 721-730.
- DePamphilis, M.L. (2005) Cell Cycle Dependent Regulation of the Origin Recognition Complex. *Cell Cycle*, **4**.
- Dhar, S.K., Delmolino, L. and Dutta, A. (2001) Architecture of the human origin recognition complex. *J. Biol. Chem.*, **276**, 29067-29071.
- Diffley, J.F.X., Cocker, J.H., Dowell, S.J. and Rowley, A. (1994) Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins *in vivo*. *Cell*, **78**, 303-316.
- Diffley, J.F.X. and Stillman, B. (1992) ARS binding factors from *Saccharomyces cerevisiae*. In Hughes, P., Fanning, E. and Kohiyama, M. (eds.), *DNA replication: the regulatory mechanisms*. Springer-Verlag, London, pp. 215-223.
- 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**, 3023-3031.
- Dijkwel, P.A., Vaughn, J.P. and Hamlin, J.L. (1991) Mapping of replication initiation sites in mammalian genomes by two-dimensional gel analysis: stabilization and enrichment of replication intermediates by isolation on the nuclear matrix. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 3850-3859.
- Dimitrova, D.S., Giacca, M., Demarchi, F., Biamonti, G., Riva, S. and Falaschi, A. (1996) In vivo protein-DNA interactions at human DNA replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1498-1503.

- 
- Epstein, A.L., Levy, R., Kim, H., Henle, W., Henle, G. and Kaplan, H.S. (1978) Biology of the human malignant lymphomas. IV. Functional characterization of ten diffuse histiocytic lymphoma cell lines. *Cancer*, **42**, 2379-2391.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, **132**, 6-13.
- Frouin, I., Montecucco, A., Spadari, S. and Maga, G. (2003) DNA replication: a complex matter. *EMBO Rep*, **4**, 666-670.
- Fuller, R.S., Funnell, B.E. and Kornberg, A. (1984) The dnaA protein complex with the E. coli chromosomal replication origin (oriC) and other DNA sites. *Cell*, **38**, 889-900.
- Fuss, J. and Linn, S. (2002) Human DNA polymerase epsilon colocalizes with proliferating cell nuclear antigen and DNA replication late, but not early, in S phase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 8658-8666.
- Gahn, T.A. and Schildkraut, C.L. (1989) The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell*, **58**, 527-535.
- Gencheva, M., Anachkova, B. and Russev, G. (1996) Mapping the sites of initiation of DNA replication in rat and human rRNA genes. *J. Biol. Chem.*, **271**, 2608-2614.
- Geraghty, D.S., Ding, M., Heintz, N.H. and Pederson, D.S. (2000) Premature structural changes at replication origins in a yeast minichromosome maintenance (MCM) mutant. *J. Biol. Chem.*, **275**, 18011-18021.
- Ghosh, M., Liu, G., Randall, G., Bevington, J. and Leffak, M. (2004) Transcription factor binding and induced transcription alter chromosomal c-myc replicator activity. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 10193-10207.
- Giacca, M., Zentilin, L., Norio, P., Diviacco, S., Dimitrova, D., Contreas, G., Biamonti, G., Perini, G., Weighardt, F., Riva, S. and et al. (1994) Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7119-7123.
- Gilbert, D.M. (2001a) Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science*, **294**, 96-100.
- Gilbert, D.M. (2001b) Nuclear position leaves its mark on replication timing. *J Cell Biol*, **152**, F11-15.
- Gilbert, D.M. (2004) In search of the holy replicator. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 848-855.
- Gilbert, D.M., Miyazawa, H., Nallaseth, F.S., Ortega, J.M., Blow, J.J. and DePamphilis, M.L. (1993) Site-specific initiation of DNA replication in metazoan chromosomes and the

- 
- role of nuclear organization. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **58**, 475-485  
Issn: 0091-7451.
- Haase, S.B. and Calos, M.P. (1991) Replication control of autonomously replicating human sequences. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5053-5058.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hand, R. (1978) Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. *Cell*, **15**, 317-325.
- Hearing, J., Mulhaupt, Y. and Harper, S. (1992) Interaction of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 with the viral latent origin of replication. *J. Virol.*, **66**, 694-705.
- Heintz, N.H. and Hamlin, J.L. (1982) An amplified chromosomal sequence that includes the gene for dihydrofolate reductase initiates replication within specific restriction fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4083-4087.
- Heinzel, S.S., Krysan, P.J., Tran, C.T. and Calos, M.P. (1991) Autonomous DNA replication in human cells is affected by the size and the source of the DNA. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 2263-2272.
- Heng, H.H., Goetze, S., Ye, C.J., Liu, G., Stevens, J.B., Bremer, S.W., Wykes, S.M., Bode, J. and Krawetz, S.A. (2004) Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci*, **117**, 999-1008.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 1026-1030.
- Hirt, B. (1966) Evidence for semiconservative replication of circular polyoma DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 997-1004.
- Hozak, P., Hassan, A.B., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell*, **73**, 361-373.
- Huberman, J.A. and Riggs, A.D. (1966) Autoradiography of chromosomal DNA fibers from Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 599-606.
- Huberman, J.A. and Riggs, A.D. (1968) On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol*, **32**, 327-341.
- Hurley, E.A. and Thorley-Lawson, D.A. (1988) B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J Exp Med*, **168**, 2059-2075.
- Iizuka, M. and Stillman, B. (1999) Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 23027-23034.

- 
- Jackson, D.A. and Pombo, A. (1998) Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol*, **140**, 1285-1295.
- Jacob, F., Brenner, S. and Cuzin, F. (1963) On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 329-348.
- Jenke, B.H., Fetzer, C.P., Stehle, I.M., Jonsson, F., Fackelmayer, F.O., Conradt, H., Bode, J. and Lipps, H.J. (2002) An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein SAF-A in vivo. *EMBO Rep*, **3**, 349-354.
- Kanemaki, M., Sanchez-Diaz, A., Gambus, A. and Labib, K. (2003) Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis in vivo. *Nature*, **423**, 720-724.
- Kapoor, P. and Frappier, L. (2003) EBNA1 partitions Epstein-Barr virus plasmids in yeast cells by attaching to human EBNA1-binding protein 2 on mitotic chromosomes. *J. Virol.*, **77**, 6946-6956.
- Kearsey, S.E. and Cotterill, S. (2003) Enigmatic variations: divergent modes of regulating eukaryotic DNA replication. *Mol. Cell*, **12**, 1067-1075.
- Keller, C., Ladenburger, E.M., Kremer, M. and Knippers, R. (2002) The origin recognition complex marks a replication origin in the human TOP1 gene promoter. *J. Biol. Chem.*, **277**, 31460-31440.
- Kirchmaier, A.L. and Sugden, B. (1995) Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **69**, 1280-1283.
- Kirchmaier, A.L. and Sugden, B. (1998) Rep\*: a viral element that can partially replace the origin of plasmid DNA synthesis of Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **72**, 4657-4666.
- Kitsberg, D., Selig, S., Keshet, I. and Cedar, H. (1993) Replication structure of the human beta-globin gene domain. *Nature*, **366**, 588-590.
- Knippers, R. (1995) *Molekulare Genetik*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- 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**, 3266-3277.
- Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M. and Knippers, R. (2001) The Human Origin Recognition Complex Protein 1 Dissociates from Chromatin during S Phase in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 6337-6342.
- Krude, T. (1995) Chromatin assembly factor 1 (CAF-1) colocalizes with replication foci in HeLa cell nuclei. *Exp. Cell. Res.*, **220**, 304-311.



- 
- Krysan, P.J. and Calos, M.P. (1991) Replication initiates at multiple locations on an autonomously replicating plasmid in human cells. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1464-1472.
- Krysan, P.J., Haase, S.B. and Calos, M.P. (1989) Isolation of human sequences that replicate autonomously in human cells. *Mol. Biol. Cell.*, **9**, 1026-1033.
- Krysan, P.J., Smith, J.G. and Calos, M.P. (1993a) Autonomous replication in human cells of multimers of specific human and bacterial DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2688-2896.
- Kumar, S., Giacca, M., Norio, P., Biamonti, G., Riva, S. and Falaschi, A. (1996) Utilization of the same DNA replication origin by human cells of different derivation. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3289-3294.
- Labib, K. and Diffley, J.F. (2001) Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**, 64-70.
- 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**, 1036-1048.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- lDean, F.B., Bullock, P., Murakami, Y., Wobbe, C.R., Weissbach, L. and Hurwitz, J. (1987) Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 16-20.
- Lee, D.G. and Bell, S.P. (1997) Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 7159-7168.
- Lee, M.A., Diamond, M.E. and Yates, J.L. (1999) Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J. Virol.*, **73**, 2974-2982.
- Leight, E.R. and Sugden, B. (2000) EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.*, **10**, 83-100.
- Leight, E.R. and Sugden, B. (2001) Establishment of an oriP replicon is dependent upon an infrequent, epigenetic event. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 4149-4161.
- Leonhardt, H., Rahn, H.P., Weinzierl, P., Sporbart, A., Cremer, T., Zink, D. and Cardoso, M.C. (2000) Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol*, **149**, 271-280.
- Leu, T.H. and Hamlin, J.L. (1989) High-resolution mapping of replication fork movement through the amplified dihydrofolate reductase domain in CHO cells by in-gel renaturation analysis. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 523-531.

- 
- 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**, 105-1016.
- Li, F., Chen, J., Solessio, E. and Gilbert, D.M. (2003) Spatial distribution and specification of mammalian replication origins during G1 phase. *J Cell Biol*, **161**, 257-266.
- Lieberman, P.M., Hardwick, J.M., Sample, J., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (1990) The zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. *J Virol*, **64**, 1143-1155.
- Lipford, J.R. and Bell, S.P. (2001) Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol. Cell*, **7**, 21-30.
- Little, R.D., Platt, T.H. and Schildkraut, C.L. (1993) Initiation and termination of DNA replication in human rRNA genes. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 6600-6613.
- Lu, L., Zhang, H. and Tower, J. (2001) Functionally distinct, sequence-specific replicator and origin elements are required for Drosophila chorion gene amplification. *Genes Dev.*, **15**, 134-146.
- Ma, H., Samarabandu, J., Devdhar, R.S., Acharya, R., Cheng, P.C., Meng, C. and Berezney, R. (1998) Spatial and temporal dynamics of DNA replication sites in mammalian cells. *J Cell Biol*, **143**, 1415-1425.
- Mackey, D. and Sugden, B. (1999) The linking regions of EBNA1 are essential for its support of replication and transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3349-3359.
- Maiorano, D., Moreau, J. and Mechali, M. (2000) XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature*, **404**, 622-625.
- Malott, M. and Leffak, M. (1999) Activity of the c-myc replicator at an ectopic chromosomal location. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5685-5695.
- Marahrens, Y. and Stillman, B. (1992) A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*, **255**, 817-823.
- Marahrens, Y. and Stillman, B. (1994) Replicator dominance in a eukaryotic chromosome. *EMBO J.*, **13**, 3395-3400.
- Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M. and Nicolas, J.C. (1999) Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J. Virol.*, **73**, 4385-4392.

- 
- Markova, N.G., Pinkas-Sarajova, A., Karaman-Jurukovska, N., Jurukovski, V. and Simon, M. (2003) Expression pattern and biochemical characteristics of a major epidermal retinol dehydrogenase. *Mol Genet Metab*, **78**, 119-135.
- Matsumoto, K. and Ishimi, Y. (1994) Single-stranded-DNA-binding protein-dependent DNA unwinding of the yeast ARS1 region. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4624-4632.
- Mendez, J. and Stillman, B. (2000) Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 8602-8612.
- Michelotti, G.A., Michelotti, E.F., Pullner, A., Duncan, R.C., Eick, D. and Levens, D. (1996) Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human c-myc gene in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2656-2669.
- Mimura, S. and Takisawa, H. (1998) Xenopus Cdc45-dependent loading of DNA polymerase alpha onto chromatin under the control of S-phase Cdk. *EMBO J.*, **17**, 5699-5707.
- Nakamura, H. (1988) [Structural organizations of replicon clusters and nuclear matrices in mammalian cells]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **33**, 1752-1757.
- Nakayasu, H. and Berezney, R. (1989) Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. *J Cell Biol*, **108**, 1-11.
- Natale, D.A., Li, C.J., Sun, W.H. and DePamphilis, M.L. (2000) Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the M-G(1) transition in mammals. *EMBO J.*, **19**, 2728-2738.
- Nawotka, K.A. and Huberman, J.A. (1988) Two-dimensional gel electrophoretic method for mapping DNA replicons. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1408-1413.
- Norio, P. and Schildkraut, C.L. (2004) Plasticity of DNA replication initiation in Epstein-Barr virus episomes. *PLoS Biol*, **2**, e152.
- Ogawa, Y., Takahashi, T. and Masukata, H. (1999) Association of fission yeast Orp1 and Mcm6 proteins with chromosomal replication origins. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7228-7236.
- 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**, 2958-2967.
- Pardoll, D.M., Vogelstein, B. and Coffey, D.S. (1980) A fixed site of DNA replication in eucaryotic cells. *Cell*, **19**, 527-536.
- Perkins, G. and Diffley, J.F.X. (1998) Nucleotide Dependent Prereplicative Complex Assembly by Cdc6p, a Homologue of Eukaryotic and Prokaryotic Clamb-Loaders. *Mol. Cell*, **2**, 23-32.

- 
- Petersen, B.O., Lukas, J., Sorensen, C.S., Bartek, J. and Helin, K. (1999) Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.*, **18**, 396-410.
- Piechaczek, C., Fetzer, C., Baiker, A., Bode, J. and Lipps, H.J. (1999) A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 426-428.
- Polonskaya, Z., Benham, C.J. and Hearing, J. (2004) Role for a region of helically unstable DNA within the Epstein-Barr virus latent cycle origin of DNA replication oriP in origin function. *Virology*, **328**, 282-291.
- 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**, 2224-2228.
- Rawlins, D.R., Milman, G., Hayward, S.D. and Hayward, G.S. (1985) Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell*, **42**, 859-868.
- Reisman, D. and Sugden, B. (1986) trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 3838-3846.
- Reisman, D., Yates, J. and Sugden, B. (1985) A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1822-1832.
- Rickinson, A.B. and Kieff, E. (2001) Epstein-Barr Virus. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Virology*. Lippincott, Philadelphia, Pa, Vol. 2, pp. 2575-2627.
- Ritzi, M., Tillack, K., Gerhardt, J., Ott, E., Humme, S., Kremmer, E., Hammerschmidt, W. and Schepers, A. (2003) Complex Protein-DNA Dynamics at the Latent Origin of DNA Replication of Epstein-Barr Virus. *J. Cell Sci.*, **116**, 3971-3984.
- Sadoni, N., Cardoso, M.C., Stelzer, E.H., Leonhardt, H. and Zink, D. (2004) Stable chromosomal units determine the spatial and temporal organization of DNA replication. *J Cell Sci*, **117**, 5353-5365.
- Saha, P., Chen, J., Thome, K.C., Lawlis, S.J., Hou, Z.H., Hendricks, M., Parvin, J.D. and Dutta, A. (1998) Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2758-2767.
- Saha, S., Shan, Y., Mesner, L.D. and Hamlin, J.L. (2004) The promoter of the Chinese hamster ovary dihydrofolate reductase gene regulates the activity of the local origin and helps define its boundaries. *Genes Dev.*, **18**, 397-410.

- 
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*, Clod Spring Harbor, New York.
- Santocanale, C. and Diffley, J.F.X. (1996) ORC- and Cdc6-dependent complexes at active and inactive chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **15**, 6671-6679.
- 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.
- Schaarschmidt, D., Ladenburger, E.M., Keller, C. and Knippers, R. (2002) Human Mcm proteins at a replication origin during the G1 to S phase transition. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4176-4185.
- Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J.L., Harwood, J., Diffley, J.F. and Hammerschmidt, W. (2001) Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J.*, **20**, 4588-4602.
- Schubeler, D., Scalzo, D., Kooperberg, C., van Steensel, B., Delrow, J. and Groudine, M. (2002) Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat Genet*, **32**, 438-442.
- Simpson, R.T. (1990) Nucleosome positioning can affect the function of a cis-acting DNA element in vivo. *Nature*, **343**, 387-389.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Stehle, I.M., Scinteie, M.F., Baiker, A., Jenke, A.C. and Lipps, H.J. (2003) Exploiting a minimal system to study the epigenetic control of DNA replication: the interplay between transcription and replication. *Chromosome Res.*, **11**, 413-421.
- Stillman, B. (1996) Cell cycle control of DNA replication. *Science*, **274**, 1659-1664.
- Stinchcomb, D.T., Struhl, K. and Davis, R.W. (1979) Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature*, **282**, 39-43.
- Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S. and Davis, R.W. (1979) High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1035-1039.
- Sykes, R.C., Lin, D., Hwang, S.J., Framson, P.E. and Chinault, A.C. (1988) Yeast ARS function and nuclear matrix association coincide in a short sequence from the human HPRT locus. *Mol. Gen. Genet.*, **212**, 301-309.

- 
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M. and Blow, J.J. (2001) Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF- B/Cdt1 by geminin. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 107-113.
- Taira, T., Iguchi-Arigo, S.M. and Arigo, H. (1994) A novel DNA replication origin identified in the human heat shock protein 70 gene promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 6386-6397.
- Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A. and Araki, H. (2003) GINS, a novel multiprotein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Genes Dev*, **17**, 1153-1165.
- Takisawa, H., Mimura, S. and Kubota, Y. (2000) Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 690-696.
- Tanaka, T., Knapp, D. and Nasmyth, K. (1997) Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. *Cell*, **90**, 649-660.
- Tao, L., Dong, Z., Leffak, M., Zannis-Hadjopoulos, M. and Price, G. (2000) Major DNA replication initiation sites in the c-myc locus in human cells. *J Cell Biochem*, **78**, 442-457.
- Tatsumi, Y., Tsurimoto, T., Shirahige, K., Yoshikawa, H. and Obuse, C. (2000) Association of human origin recognition complex 1 with chromatin DNA and nuclease-resistant nuclear structures. *J. Biol. Chem.*, **275**, 5904-5910.
- Theis, J.F. and Newlon, C.S. (1994) Domain B of ARS307 contains two functional elements and contributes to chromosomal replication origin function. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 7652-7659.
- Theis, J.F., Yang, C., Schaefer, C.B. and Newlon, C.S. (1999) DNA sequence and functional analysis of homologous ARS elements of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis*. *Genetics*, **152**, 943-952.
- Thoma, F., Bergman, L.W. and Simpson, R.T. (1984) Nuclease digestion of circular TRP1ARS1 chromatin reveals positioned nucleosomes separated by nuclease-sensitive regions. *J Mol Biol*, **177**, 715-733.
- Thorley-Lawson, D.A. (2001) Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol*, **1**, 75-82.
- Todorovic, V., Falaschi, A. and Giacca, M. (1999) Replication origins of mammalian chromosomes: the happy few. *Front. Biosci.*, **4**, D859-868.
- Tribioli, C., Biamonti, G., Giacca, M., Colonna, M., Riva, S. and Falaschi, A. (1987) Characterization of human DNA sequences synthesized at the onset of S-phase. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 10211-10232.

- 
- Varga-Weisz, P.D. and Becker, P.B. (1995) Transcription factor-mediated chromatin remodelling: mechanisms and models. *FEBS Lett*, **369**, 118-121.
- Vashee, S., Simancek, P., Challberg, M.D. and Kelly, T.J. (2001) Assembly of the human origin recognition complex. *J. Biol. Chem.*, **276**, 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**, 4899-4904.
- Vassilev, L.T. and DePamphilis, M.L. (1992) Guide to identification of origins of DNA replication in eukaryotic cell chromosomes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **27**, 445-472.
- Vaughn, J.P., Dijkwel, P.A. and Hamlin, J.L. (1990) Replication initiates in a broad zone in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain. *Cell*, **61**, 1075-1087.
- Walker, S.S., Francesconi, S.C. and Eisenberg, S. (1990) A DNA replication enhancer in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4665-4669.
- 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**, 617-627.
- Waltz, S.E., Trivedi, A.A. and Leffak, M. (1996) DNA replication initiates non-randomly at multiple sites near the c-myc gene in HeLa cells. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1887-1894.
- 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**, 247-256.
- Wang, L., Lin, C.M., Brooks, S., Cimborra, D., Groudine, M. and Aladjem, M.I. (2004) The human beta-globin replication initiation region consists of two modular independent replicators. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 3373-3386.
- Wohlschlegel, J.A., Dhar, S.K., Prokhorova, T.A., Dutta, A. and Walter, J.C. (2002) Xenopus Mcm10 binds to origins of DNA replication after Mcm2-7 and stimulates origin binding of Cdc45. *Mol. Cell*, **9**, 233-240.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C. and Dutta, A. (2000) Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science*, **290**, 2309-2312.
- Wu, J.R. and Gilbert, D.M. (1995) Rapid DNA preparation for 2D gel analysis of replication intermediates. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3997-3998.
- Yasuda, S. and Hirota, Y. (1977) Cloning and mapping of the replication origin of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5458-5462.

- 
- Yates, J., Warren, N., Reisman, D. and Sugden, B. (1984) A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3806-3810.
- Yates, J.L. (1996) Epstein-Barr Virus DNA Replication. In DePamphilis, M.L. (ed.), *DNA Replication in Eukaryotic Cells*. CSH Lab Press, pp. 751-773.
- Yates, J.L., Camiolo, S.M. and Bashaw, J.M. (2000) The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J Virol*, **74**, 4512-4522.
- Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B. (1985) Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, **313**, 812-815.
- Yoon, Y., Sanchez, J.A., Brun, C. and Huberman, J.A. (1995) Mapping of replication initiation sites in human ribosomal DNA by nascent-strand abundance analysis. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2482-2489.
- Zhou, J., Chau, C.M., Deng, Z., Shiekhattar, R., Spindler, M.P., Schepers, A. and Lieberman, P.M. (2005) Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication. *EMBO J.*, **24**, 1406-1417.



## Anhang

### Or9

AATTATGTACTAAAGTCTATCTTTAATAGGCTGTTATCTTCAATCCATGTATAATT  
TAAATACACTCTGCATTTCCCTTCTTTTGGTTTCAACTGTGTGTCTGAGCCTCAATGT  
TGCTCTACCTGAGAGCACTCTTCAAACCTTTAACGTGCACACGAATCATCGAGGGA  
TCTCATTAACAGCCACATTCCTAGCAGTTCTGAGAGGAGGGCCAGAGATTCTGCA  
T

### Orß

GAAGAGGTCCAAACTGGATGCTTTGTCTTCTACCTCACAGCTTTCAGGTTCCCTCT  
CAGTGACCAGGGTACCTCCTCTACCTAAGAAATCACCATCAGCTCTCCCCACTGC  
CAAGAGCTCATAAATGAAGAAGGGATGCAAATCTTTACTTGACACAGAAAGCT  
TTAGGTTGACAACAAATAGCAATAGCTAACATTTACTGAGCATGTCTTTTATATC  
AGGCTGTGGGCTAAGTGCTTTTATATGTAGTATTTCCCTTCATCTTTAAAACAAAC  
CAGTGAGATAGGAATCCTTATGATCTCATACTACAGATAAGAAAAGTGAGCTTTA  
GGGAGGTTAAATAATTTTTCTCAGACCAAGAAGCTAACAAGCAGAGCAGCCAAG  
AGTGAATCCAGGCAGTCTGACTCTAG

### OrIII

CCACAGCAATGCAGAACTGTAAGTCAATTAACCTCTTTCCTTTATAAATTACCC  
AGTTTTGGGTATTTCTTCATAGCAGCATGAGAATGAACTAATAGACATGGTTTTTG  
ACAAATCCACAATGGCATGTATTAATCATTATAGTATCATACAGAATAGTTTCAT  
TGTCCATAAAAAATCAAATCCCTAAGCTTTATTTATTCATCCAACCTTCTTCTTTCAC  
TTAGAATGCATTTATGTTTCTTTCATGCATTTTTGTTTCTTGCTAGCTCTTTTCTTTT  
TTTCTTATAATAATATCTCATTTTATGACTGTATCACAAGTATCAATAGCAGAGTA  
GACTAAGCAGAAAGAATTTCCGAGCTTGAAGTCTATCTTTCTGAAATAAGGCAGG  
CAGACAAGAATGGAGAAAAATGAATGAAAAGGAATGAACAAAACCTCCAAGAA  
ATATGGGACTATGTAAAAGTCAAACCGTATGTTTGATTGGG

Or10

GTCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCTGACATGGTGAAACCCCATCTCTACTAATA  
ATACAAAAAAAAAAGCTGGGCATGGTGGCATGCACCTGTAGTCCCAGCTACTAG  
GGAGGCTGAGGCACAAGAATGGCTTGAACCTGGGAGGCGAAGGTTGCAGTGAAC  
CAAGATCGCGCCACTGTACTCCAGCCTGGGCAACAGAGCATGACAGAGACTCCA  
TCTCAAATAAATAAATAGAAGGCTCTCCAGGACATTTTGATGCCCACTGAGATA  
TAGGAACTCCTGCCATGGGGAGGAGGGCGTCTTTAAGAAGGTATAGGCCCTATTG  
AGA

Or15

TGGCACTTGGACTAATGACCCATGTCCCCAGCATAATAGCCATGTCTCTATTCCT  
TTGTATATCAAAAAGCACACCCTGCTCTATCCACACTCACCTCTCTTCCTGGGCCC  
TAAACTCATATTTTCAGTTCAGAGTCTTCAGCAGGAACGCATTTTTACCCTAAGGC  
ACCTAACTAAGTAAGCCCCTTGACAGGGAAGAACAGT

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Aloys Schepers für seine tatkräftige Hilfe bei der Planung der Experimente und der Diskussion der Ergebnisse. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Dirk Eick für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit danken.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Genvektoren und bei meinen Kollegen der AG Replikation für die nette Zusammenarbeit. Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt und Dagmar Pich danke ich für ihre Fürsorge und die Lösung von jeglichen Problemen. Persönlich möchte ich mich an dieser Stelle nochmals bei Dr. Mark-Peter Spindler und bei Elisabeth Ott bedanken.

Prof. Knippers und Dr. Daniel Schaarschmidt danke ich für die Erlernung des CHIP-Assays und für die nette Zeit in Konstanz.

Zuletzt danke ich Stephan P. Jung und meinen Eltern für ihre Liebe und Unterstützung während meiner Promotionszeit.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Jeannine Gerhardt
Geburtsdatum	18.05.1978
Geburtsort	Sömmerda
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Ausbildung

1984-1991	Karl-Marx-Oberschule Sömmerda
1991-1996	Albert-Schweitzer-Gymnasium Sömmerda, Erlangen der allgemeinen Hochschulreife
1996-2001	Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Jan. 2001- Okt. 2001	Diplomarbeit an der FSU-Jena
Dez. 2001- März 2005	Promotion an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Hammerschmidt an der GSF, Institut für Genvektoren, München