

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

Rolle des Chromatin-Proteins HMGA1a für die Definition von Replikationsursprüngen



Andreas Thomae
aus Weilburg
Juni 2007

Dissertation eingereicht am: 28.06.2007

Erstgutachter: PD Dr. Bettina Kempkes

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Becker

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2007

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 DNA-Replikation | 3 |
| 1.2 Proteine des Prä-Replikations-Komplexes | 5 |
| 1.3 Replikationsursprünge in Eukaryonten | 11 |
| 1.4 DNA-Replikation, Kernarchitektur und Epigenetik | 15 |
| 1.5 Extrachromosomale Replikons | 17 |
| 1.6 „High-Mobility-Group“-Proteine | 21 |
| 1.7 Zielstellung | 25 |
| 2. Material | 26 |
| 2.1 Oligonukleotide | 26 |
| 2.2 Plasmide | 26 |
| 2.3 Antikörper | 28 |
| 2.4 <i>Escherichia coli</i> -Stämme | 29 |
| 2.5 Zelllinien | 29 |
| 2.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges | 30 |
| 3. Methoden | 33 |
| 3.1 Mikrobiologische Methoden | 33 |
| 3.1.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien | 33 |
| 3.1.2 Antibiotika und sonstige Medienzusätze | 33 |
| 3.1.3 Bakterielle Überexpression und Reinigung von HMGA1a::ST | 34 |
| 3.2 Zellkultur | 36 |
| 3.2.1 Kultivierung und Passagierung | 36 |
| 3.2.2 Aufbewahrung von Zellen | 37 |
| 3.2.3 Selektion und Doxzyklin-Behandlung | 37 |
| 3.2.4 Transfektion | 37 |
| 3.2.5 Bestimmung der Zellzahl | 38 |
| 3.2.6 Synchronisation von HEK293-Zellen | 38 |
| 3.2.7 Insektenzellkultur | 39 |
| 3.3 DNA-Arbeitstechniken | 40 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.3.1 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-Mutagenese..... | 40 |
| 3.3.2 | Enzymatische Modifikation von DNA | 40 |
| 3.3.3 | Präparative Agarose-Gelelektrophorese | 41 |
| 3.3.4 | HIRT-Extraktion..... | 41 |
| 3.3.5 | Plasmid-Wiedergewinnungsversuche | 42 |
| 3.3.6 | Southern Blot | 42 |
| 3.3.7 | Radioaktive Markierung von DNA-Sonden für Southern-Blots | 43 |
| 3.3.8 | „nascent strand“-Analyse | 43 |
| 3.3.9 | Quantitative PCR („Real Time“-PCR)..... | 44 |
| 3.4 | Proteinbiochemische Methoden | 47 |
| 3.4.1 | Präparation von RIPA-Lysaten..... | 47 |
| 3.4.2 | Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)..... | 47 |
| 3.4.3 | Herstellung von Kernextrakten..... | 48 |
| 3.4.4 | Co-Immunopräzipitation (Co-IP) und Strep-Tactin-Affinitätschromatographie..... | 49 |
| 3.4.5 | Reinigung von ORC | 50 |
| 3.4.6 | Glycerin-Dichtegradienten-Analyse..... | 51 |
| 3.5 | Mikroskopie | 51 |
| 3.5.1 | Herstellung von Lebend-Beobachtungskammern | 51 |
| 3.5.2 | Immunolokalisation an HepG2-Zellen | 52 |
| 3.5.3 | Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)..... | 53 |
| 3.5.4 | Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie..... | 54 |
| 3.6 | Allgemeine molekularbiologische Methoden..... | 55 |
| 4. | Ergebnisse..... | 56 |
| 4.1 | HMGA1a unterstützt die extrachromosomale Aufrechterhaltung und Replikation von Plasmiden | 57 |
| 4.1.1 | HMGA1a::EBNA1-DBD unterstützt die Replikation und Aufrechterhaltung <i>oriP</i> -basierender Plasmide..... | 58 |
| 4.1.2 | HMGA1a unterstützt die Replikation von Hybridvektoren..... | 61 |
| 4.2 | HMGA1a-ORC-Interaktion..... | 65 |
| 4.2.1 | HMGA1a-Fusionsproteine co-präzipitieren ORC und mit ORC..... | 65 |
| 4.2.2 | Das Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations-System..... | 74 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.2.3 | HMGA1a-Interaktionen mit ORC-Untereinheiten | 79 |
| 4.2.4 | HMGA1a-ORC-Interaktionsmotive und Lokalisation | 86 |
| 4.3 | HMGA1a-abhängige ORC-Rekrutierung | 100 |
| 4.3.1 | HMGA1a-Dosis-abhängige Rekrutierung von ORC | 100 |
| 4.3.2 | Globale ORC-Lokalisierung durch HMGA1a | 103 |
| 4.4 | HMGA1a spezifiziert Replikationsursprünge | 104 |
| 5. | Diskussion | 107 |
| 5.1 | Replikative und nicht-replikative Funktionen des humanen Orc6-Proteins | 108 |
| 5.1.1 | Replikative Funktionen von Orc6 | 108 |
| 5.1.2 | Orc6-Funktionen bei der Ribosomenbiogenese und der Zytokinese | 111 |
| 5.2 | Bedeutung der HMGA1a-ORC-Interaktion | 114 |
| 5.2.1 | HMGA1a rekrutiert ORC an DNA und führt zur Ausbildung von Replikationsursprüngen | 115 |
| 5.2.2 | Bedeutung der HMGA1a-ORC-Interaktion für die Ausbildung und Erhaltung von Heterochromatin | 121 |
| 6. | Zusammenfassung | 125 |
| 7. | Abkürzungsverzeichnis | 126 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 129 |
| 9. | Anhang | 140 |
| 9.1 | Oligonukleotide | 140 |
| 9.1.1 | Oligonukleotide für Klonierungen | 140 |
| 9.1.2 | Oligonukleotide für quantitative PCRs | 141 |
| 9.2 | Klonierungen | 142 |
| 9.3 | Orc6-Cdc6-Interaktion | 144 |
| 9.4 | Western-Blot-Bedingungen | 145 |
| 9.5 | Lebenslauf | 146 |
| 9.6 | Publikationen | 147 |
| 9.7 | Danksagung | 148 |
| 9.8 | Erklärung | 150 |

1. Einleitung



Abb. 1.1: Darstellung einer Skizze zum „replicon model“ nach Jacob *et al.* (1964). Der Kreis symbolisiert das Replikon, das Rechteck den Replikator. Der Anfang des gebogenen Pfeils entspricht dem Lokus, welcher den Initiator codiert. Wird der Initiator exprimiert, so bindet er an den Replikator und leitet die Replikation ein (angedeutet durch den gebogenen Pfeil). (Abbildung entnommen aus (Skarstad *et al.*, 2003)).

Als Sydney Brenner und François Jacob 1962 in Südfrankreich am Strand von La Tranche-sur-Mer über die Regulation der DNA-Replikation in Prokaryonten sinnierten, illustrierten sie ihre Überlegungen durch Skizzen in den Sand. In Abbildung 1.1 ist eine dieser Skizzen wiedergegeben, welche sie 1964 als Replikon-Modell („replicon model“) publizierten (Jacob *et al.*, 1964). Nach dieser Theorie führt die Wechselwirkung eines Initiatorproteins mit einem *cis*-Element, dem Replikator, zur Initiation der DNA-Replikation. Der Initiator und der Replikator bilden zusammen eine Replikationseinheit, das Replikon. Obschon dieses Modell ursprünglich für Prokaryonten postuliert wurde, bewies es seine Gültigkeit teilweise auch in Eukaryonten. Initiatorproteine wurden in bislang allen untersuchten Spezies gefunden, wie zum Beispiel DnaA in *Escherichia coli* oder der „origin recognition complex“ (ORC) in Eukaryonten.

Die Kriterien hingegen, welche Replikatoren festlegen, sind lediglich in manchen einzelligen Organismen bekannt. Der Aufbau von Replikatoren in Metazoen ist nach wie vor ein Rätsel.

Das folgende Kapitel gibt zunächst einen Überblick über die DNA-Replikation im Allgemeinen, gefolgt von einer detaillierten Darstellung der molekularen Abläufe, welche zur Initiation und Regulation der DNA-Duplikation in Eukaryonten beitragen. Des Weiteren werden Arbeiten zu bekannten Replikationsursprüngen vorgestellt sowie die Zusammenhänge zwischen DNA-Replikation, Epigenetik und Zellkernarchitektur zusammengefasst. Anschließend werden die am besten verstandenen extrachromosomalen Replikons beschrieben, an welchen ich in dieser Arbeit die Ausbildung von Replikationsursprüngen untersuchte. In Abschnitt 1.6 werden die „High-Mobility-Group“-Proteine (HMG-Proteine) besprochen, welche neben den Histon-Proteinen zu den häufigsten Chromatin-Proteinen zählen. Sie beeinflussen Chromatin-bezogene Prozesse von Transkription über Reparatur bis hin zur Rekombination. Diese Arbeit spricht HMGA1a, einem Vertreter der „HMG-AT-hook“-Familie (HMGA-Familie), eine Rolle bei der DNA-Replikation zu. Unter welchen Aspekten diese Rolle untersucht wurde, ist am Ende dieses Kapitels in der Zielstellung ausgeführt.

1.1 DNA-Replikation

Mit der Erkenntnis „*omnis cellula e cellula*“ hat Rudolf Virchow im Jahre 1855 herausgestellt, dass jede Zelle nur aus einer anderen Zelle hervorgehen kann. Wann immer eine Zelle anstrebt sich zu teilen, muss sie zunächst ihr Erbgut duplizieren, ein Prozess, der als DNA-Replikation bezeichnet wird.

Der Prokaryont *Escherichia coli* weist unter optimalen Wachstumsbedingungen eine Generationszeit von 20 Minuten auf, was nur aufgrund einer kontinuierlichen DNA-Synthese erreicht wird. Vor Beendigung eines Replikationszyklus wird am einzigen Replikationsursprung „*oriC*“ eine weitere Runde der DNA-Replikation initiiert. Diesbezüglich trifft die Aussage von Jaques Monod „*what is true for E. coli is true for the elephant*“ nicht für die DNA-Replikation in Eukaryonten zu. Die Duplikation der Kern-DNA findet nur einmal in der Synthese-Phase (S-Phase) des eukaryontischen Zellzyklus statt. Aufgrund der Größe der Genome und ihrer Verteilung auf mehrere Chromosomen, benutzen Eukaryonten zudem eine Vielzahl von Replikationsstartstellen (Origins). Fehlerhafte DNA-Replikation kann zu Aneuploidie und zu genomischer Instabilität führen, was unter anderem ein Kennzeichen von Krebszellen ist. Daher ist die DNA-Replikation ein kritischer Schritt für die Zelle und ist dementsprechend einer strengen Regulation unterworfen.

Der Aufbau der DNA aus komplementären gegenläufigen Strängen offenbarte gleichzeitig den Mechanismus der semikonservativen Duplikation. Nach Trennung der beiden Stränge voneinander wird der Einbau des nächsten Nukleotids während der DNA-Synthese durch die Regeln der Basenpaarung vorgegeben (Watson und Crick, 1953). Essentiell hierfür ist das Laden einer DNA-Helikase an den Replikationsursprung, welche zu einer lokalen Entwindung der DNA-Doppelhelix führt. In Eukaryonten bedarf es für das Laden der replikativen DNA-Helikase einer Abfolge von streng regulierten Ereignissen. In einem initialen Schritt bindet ORC an DNA, wodurch potentielle Replikationsstartstellen festgelegt werden. ORC bildet eine Plattform für die Assemblierung des Prä-Replikations-Komplexes (preRC), der neben den ORC-Proteinen aus Cdc6, Cdt1 und dem MCM2-7 Komplex besteht (Diffley *et al.*, 1995). Am Übergang von der G1- zur S-Phase- findet ein Umbau des preRC zum Prä-Initiations-Komplex (preIC) statt (siehe Kapitel 1.2), was zur Entwindung der

Replikationsursprungs-DNA und zur Rekrutierung des DNA-Polymerase α /Primase-Komplexes führt (Lei und Tye, 2001). Die Primase synthetisiert das erste RNA-Startstück, welches durch die DNA-Polymerase α um etwa 20 Desoxyribonukleotide verlängert wird. Nach dem Laden der eukaryontischen Ringklemme („proliferating cell nuclear antigen“, PCNA) übernehmen die DNA-Polymerasen δ und ϵ die Strangsynthese, die am Vorwärts-Strang kontinuierlich erfolgt. Die diskontinuierliche Synthese am Rückwärts-Strang bricht jeweils am Ende des vorherigen Okazaki-Fragmentes ab. Dort wird das RNA-Startstück durch DNA ersetzt und die Okazaki-Fragmente werden durch die DNA-Ligase I miteinander verknüpft. Nach bidirektionaler Synthese der Tochter-DNA-Stränge führt das Aufeinandertreffen zweier Replikationsgabeln schließlich zur Termination der Replikation. Die Abläufe an einer eukaryontischen Replikationsgabel sind in Abbildung 1.2 veranschaulicht.

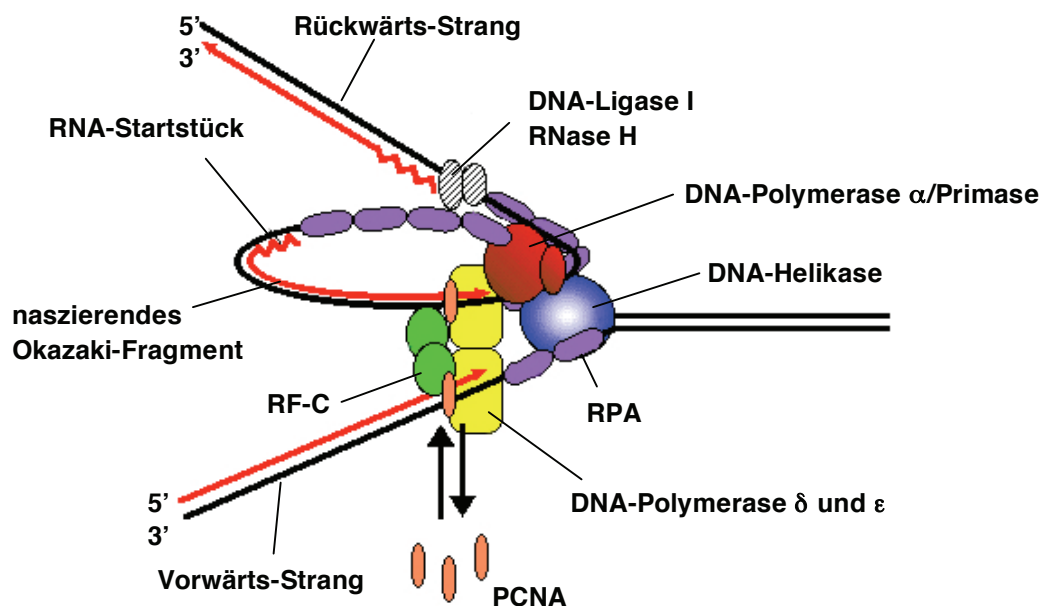


Abb. 1.2: Proteine an einer eukaryontischen Replikationsgabel. Als Bestandteil der Replikationsgabel entwindet die replikative DNA-Helikase den DNA-Doppelstrang. Das Einzelstrang-bindende Protein stabilisiert die entwundene DNA. Am Rückwärts-Strang werden die RNA-Startstücke durch RNase H entfernt und die Okazaki-Fragmente durch die DNA-Ligase I miteinander verknüpft. Das RF-C Protein fungiert als Ladekomplex für die PCNA-Ringklemme (Nach „Molecular Biology Of The Cell“, Bruce Alberts, vierte Ausgabe).

1.2 Proteine des Prä-Replikations-Komplexes

Der eukaryote preRC besteht aus den Proteinen Orc1-Orc6, Cdc6, Cdt1 und den MCM-Proteinen Mcm2-Mcm7. Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit dem ersten Schritt der Definition von Replikationsursprüngen, dem Binden von ORC an DNA. Daher liegt der Fokus des folgenden Abschnitts auf ORC. Weiterhin wird die schrittweise Assemblierung des preRCs, sowie dessen Aktivierung und Zellzyklus-Regulation beschrieben (siehe auch Abbildung 1.3).

Der „origin recognition complex“ (ORC):

In der G1-Phase werden durch die Bindung von ORC an DNA potentielle Replikationsstartstellen markiert. Man bezeichnet diesen Vorgang als Definition von Replikationsursprüngen. ORC wurde zuerst in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als Komplex gefunden, welcher an ARS-Konsensus-Sequenzen in Hefe-Replikationsursprüngen bindet (Bell und Stillman, 1992) (siehe Abschnitt 1.3). Der *S. cerevisiae* ORC (ScORC) besteht aus sechs Untereinheiten, die entsprechend ihrer Größe von Orc1 bis Orc6 nummeriert wurden. Mit 104 kDa ist Orc1 in *S. cerevisiae* die größte und Orc6 mit 50 kDa die kleinste ORC-Untereinheit. Die Orc1-Orc5-Untereinheiten wurden in höheren Eukaryonten aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu den *S. cerevisiae* Proteinen identifiziert. Die Orc6-Proteine vielzelliger Organismen sind zueinander homolog, weisen jedoch keine signifikanten Sequenz-Ähnlichkeiten zu ScOrc6 auf. In Metazoen ist Orc6 erstmalig nach Reinigung des heterohexameren *Drosophila melanogaster* ORC (DmORC) beschrieben worden (Chesnokov *et al.*, 1999). Inwieweit Orc6 in Vertebraten mit Orc1-5 assoziiert, wird kontrovers diskutiert (Dhar *et al.*, 2001, Ranjan und Gossen, 2006) und welche Funktion Orc6 bei der Replikation in Vertebraten erfüllt ist unklar. In *S. cerevisiae* stabilisiert Orc6 die preRCs in der G1-Phase und ist darüber hinaus nötig für den Eintritt in die S-Phase (Semple *et al.*, 2006). In *Drosophila* hingegen scheint Orc6 essentiell für die replikativen Funktionen des DmORC zu sein und zur Erkennung von Origin-DNA beizutragen (Balasov *et al.*, 2007).

Die Untereinheiten Orc2-Orc5 bilden das biochemisch stabile Herzstück des humanen ORC und werden daher als ORC-Kern-Komplex-Untereinheiten bezeichnet. Die größte ORC-Untereinheit Orc1 (97 kDa) interagiert nur schwach mit dem Orc2-Orc5-Komplex. Diese Interaktion ist jedoch essentiell für die Ausbildung der preRCs am M/G1-Phase-Übergang. Während der Mitose ist der Orc2-Orc5 Kern-Komplex nicht an untersuchten Replikationsursprüngen nachzuweisen (Abdurashidova *et al.*, 2003, Gerhardt *et al.*, 2006). Dies hat zur Folge, dass Replikationsursprünge in humanen Zellen in jedem Zellzyklus neu besetzt werden müssen.

Orc1 unterliegt in Säugetierzellen einer proliferationsabhängigen Expressionskontrolle durch den Transkriptionsfaktor E2F (Ohtani *et al.*, 1996). Chromatin-gebundenes Orc1 wird zudem in der S-Phase phosphoryliert, dadurch für den Ubiquitin-vermittelten Abbau durch das 26S-Proteasom markiert (Li und DePamphilis, 2002) und ist nach der Initiation der DNA-Replikation nicht mehr an Replikationsursprüngen nachzuweisen (Ohta *et al.*, 2003, Tatsumi *et al.*, 2003).

Alle ORC-Untereinheiten weisen Homologie zu AAA⁺-Familie-ATPasen (ATPasen, welche mit verschiedenen zellulären Aktivitäten assoziiert sind) auf, jedoch besitzen nur die Untereinheiten Orc1, Orc4 und Orc5 ATPase-Aktivität. Die Integrität der ATP-Bindemotive ist essentiell für die Replikationsfunktion von ORC. Zudem hat ATP eine strukturelle Bedeutung für die Formierung und Stabilität des humanen ORC und stimuliert überdies dessen Bindung an DNA (Giordano-Coltart *et al.*, 2005, Ranjan und Gossen, 2006). Im Komplex mit ATP bindet der Bäckerhefe ORC *in vivo* und *in vitro* Sequenz-spezifisch an die elf Basenpaare umfassende ARS-Konsensus-Sequenz. Hiernach fungiert ORC als Plattform für die Assoziation weiterer preRC-Komponenten (Bell und Stillman, 1992, Diffley *et al.*, 1995). Am G1/S-Phase-Übergang findet die Aktivierung dieser preRCs statt, was die Initiation der DNA-Replikation an den ARS-Konsensus-Sequenzen zur Folge hat.

Auch in humanen Zellen treten *in vivo* ortsspezifische Initiationsereignisse auf (Giacca *et al.*, 1994). Jedoch konnte für den humanen ORC *in vitro* keinerlei Sequenzspezifität nachgewiesen werden, welche die Existenz von lokalisierten Replikationsstartstellen erklären würde (Vashee *et al.*, 2003). Gepaart mit Erkenntnissen, die an extrachromosomalen Replikons erworben wurden, schloss

man, dass ORC-Bindung in humanen Zellen vorwiegend durch epigenetische Faktoren bedingt sein muss (Schaarschmidt *et al.*, 2004).

In vitro-DNA-Bindungsstudien mit humanem ORC wurden stets mit einem Orc1-5-Komplex durchgeführt. Jüngere Arbeiten zeigen jedoch, dass in *Drosophila* das Orc6-Protein die Spezifität von ORC für Origin-DNA vermittelt (Balasov *et al.*, 2007). Des Weiteren trägt das preRC-Protein Cdc6 in *S. cerevisiae* zusätzlich zur Origin-Spezifität von ORC bei (Speck und Stillman, 2007). Aufgrund dieser Erkenntnisse aus anderen Organismen kann man spekulieren, ob die Assoziation weiterer Proteine zu einer erhöhten Sequenzspezifität von humanem ORC führt. Tatsächlich co-präzipitieren viele bislang unidentifizierte Proteine mit Untereinheiten des humanen ORC (Dhar und Dutta, 2000).

Diese könnten zum einen Einfluss auf die DNA-Spezifität von ORC nehmen, darüber hinaus jedoch an den nicht-replikativen Aufgaben beteiligt sein, die ORC in Eukaryonten erfüllt. Orc2 zum Beispiel ist in humanen Zellen sowohl an Centrosomen als auch an Centromeren nachzuweisen und scheint eine Rolle bei der Regulation der Centriolen-Duplikation zu spielen (Prasanth *et al.*, 2004). Orc6 lokalisiert sowohl in humanen als auch in *Drosophila*-Zellen während der Zytokinese an der Teilungsfurche und die Depletion von Orc6 durch RNAi führt in diesen Zellen zu Defekten in der Zytokinese (Chesnokov *et al.*, 2003, Prasanth *et al.*, 2002). Des Weiteren interagiert ORC in allen untersuchten Organismen mit Heterochromatin-Proteinen. In *S. cerevisiae* ist diese Interaktion essentiell für das Silencing des „mating type locus“, wobei ORC die Rekrutierung der Sir-Proteine vermittelt (Triolo und Sternglanz, 1996). Und auch in höheren Eukaryonten spielt ORC eine Rolle bei der Lokalisierung von Heterochromatin-Proteinen. Mutation des Orc2-Proteins in *Drosophila*-Zellen sowie der „knock down“ von Orc2 in humanen Zellen führt zu einer Delokalisation des Heterochromatin-Proteins HP1 (Pak *et al.*, 1997, Prasanth *et al.*, 2004). Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass ORC in *S. cerevisiae* zur Kohäsion der Schwester-Chromatiden beiträgt (Shimada und Gasser, 2007).

Demnach ist ORC an vielen Prozessen des Chromosomen-Zyklus beteiligt, wodurch vermutlich die Duplikation des Erbguts in den Zellteilungszyklus integriert wird.

Assemblierung und Aktivierung des preRCs:

Die Assemblierung des preRCs ist in allen Eukaryonten ein streng konservierter Prozess. Hierbei bildet ORC eine Plattform für das Binden weiterer preRC-Proteine an die Origin-DNA (Diffley *et al.*, 1995).

Das Cdc6-Protein weist bei der Assoziation mit Replikationsursprüngen die gleiche Kinetik wie ORC auf. ORC-Präsenz ist essentiell für die Assoziation von Cdc6 mit Replikationsursprüngen, wobei unklar ist, ob ORC ohne Cdc6 an Origins vorliegen kann. Wie auch Orc1, Orc4 und Orc5, gehört Cdc6 zu den AAA⁺-Familie-ATPasen und fungiert im Komplex mit ORC als Ladefaktor für den MCM2-7-Komplex. Hierbei wird die benötigte Energie von Cdc6 und vermutlich auch von Orc1 durch ATP-Hydrolyse bereitgestellt (Speck *et al.*, 2005). Wahrscheinlich wird MCM2-7 im Komplex mit Cdt1 an Replikationsursprünge geleitet. Cdt1-Überexpression ist in Metazoen ausreichend um Rereplikation zu induzieren. Daher haben Metazoen durch die Zellzyklus-regulierte Expression von Geminin einen zusätzlichen Mechanismus entwickelt, Rereplikation zu verhindern. Geminin akkumuliert während der S-Phase und verhindert durch Cdt1-Bindung ein weiteres Laden des MCM2-7-Komplexes an Replikationsursprünge (Saxena und Dutta, 2005, Wohlschlegel *et al.*, 2000).

Der aus den sechs Untereinheiten Mcm2-Mcm7 bestehende MCM2-7-Komplex wurde ursprünglich bei einem genetischen „screen“ in *S. cerevisiae* entdeckt, welcher Gene identifizieren sollte, die für die Aufrechterhaltung extrachromosomaler DNA essentiell sind (MCM = „minichromosome maintenance“). Alle sechs MCM-Proteine sind Mitglieder der AAA⁺-Familie-ATPasen und bilden den enzymatisch aktiven Teil der replikativen DNA-Helikase. Erste Helikase-„Assays“ mit gereinigtem MCM2-7-Komplex wiesen jedoch bereits darauf hin, dass zur Aktivierung der Helikase-Aktivität die Assoziation weiterer Untereinheiten notwendig ist (Kaplan *et al.*, 2003, Kaplan und O'Donnell, 2004). Origins, an welchen ein preRC ausgebildet wurde, bezeichnet man als lizenziert. Diese lizenzierten Replikationsursprünge können einmal während der S-Phase aktiviert werden, jedoch wird die DNA-Replikation innerhalb einer S-Phase nicht an jedem lizenzierten Origin initiiert.

Die Aktivierung des preRCs am G1/S-Phase-Übergang wird durch zwei Protein-Kinasen vermittelt: der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) Cdk2 und der

Dbf4-abhängigen Kinase (DDK) Cdc7. Die Aktivität dieser Protein-Kinasen ist abhängig von der Akkumulation ihrer regulatorischen Untereinheiten Cyclin A und Cyclin E beziehungsweise Dbf4. Die Phosphorylierung von Komponenten des preRCs durch Cdk2-Cyclin E- und Cdc7-Dbf4-Komplexe führt zu einem Umbau des preRC zum Prä-Initiations-Komplex (preIC) und schließlich zur Initiation der DNA-Replikation. Gleichzeitig verhindert die CDK- und DDK-Aktivität das Assemblieren weiterer preRCs. Dadurch können sich preRCs nur von der Telophase der Mitose bis in die G1-Phase, der Zeitspanne, in der die Cdk2- und DDK-Aktivität am geringsten ist ausbilden. Die Oszillation der CDK- und DDK-Aktivität ist ein Faktor, der gewährleistet, dass nur eine Runde der DNA-Replikation pro Zellzyklus stattfindet (Blow und Dutta, 2005). Die Aktivität dieser Protein-Kinasen führt unter anderem zur Phosphorylierung der MCM2-7-Untereinheiten Mcm2, Mcm4 und Mcm6, was schließlich die Rekrutierung des Cdc45/GINS-Komplexes zur Folge hat (Tanaka *et al.*, 2007). Eine Reihe aktueller Arbeiten sprechen dafür, dass es sich bei dem Cdc45/MCM2-7/GINS-Komplex (CMG) um die aktive replikative DNA-Helikase handelt (Aparicio *et al.*, 2006, Gambus *et al.*, 2006, Moyer *et al.*, 2006). Die aktive DNA-Helikase entwindet den DNA-Doppelstrang, wodurch das Einzelstrang-bindende Protein RPA assoziiert. Gleichzeitig wird der DNA-Polymerase α /Primase-Komplex rekrutiert, der die Synthese des RNA-Startstückes bewerkstelligt und somit zur Initiation der DNA-Replikation führt. Der genaue Mechanismus der Rekrutierung des Komplexes ist ungeklärt, wobei bekannt ist, dass Pol α mit der preRC Komponente Cdc45 interagiert (Kukimoto *et al.*, 1999). Die Aktivierung des preRCs geht einher mit der Dissoziation von Orc1, Cdc6 und Cdt1, wodurch die DNA-Synthese von jedem Replikationsursprung nur einmal innerhalb derselben S-Phase initiiert werden kann. Nach Degradation von Dbf4 sowie der G1/S-Phase-Cycline durch den „Anaphase Promoting Complex/Cyclosome“ (APC/C), assoziiert Orc1 in der Telophase wieder mit den anderen ORC-Untereinheiten an Replikationsursprüngen, wodurch Origins durch Ausbildung von preRCs lizenziert werden können. Abbildung 1.3 zeigt ein vereinfachtes Model der preRC-Ausbildung und Aktivierung.

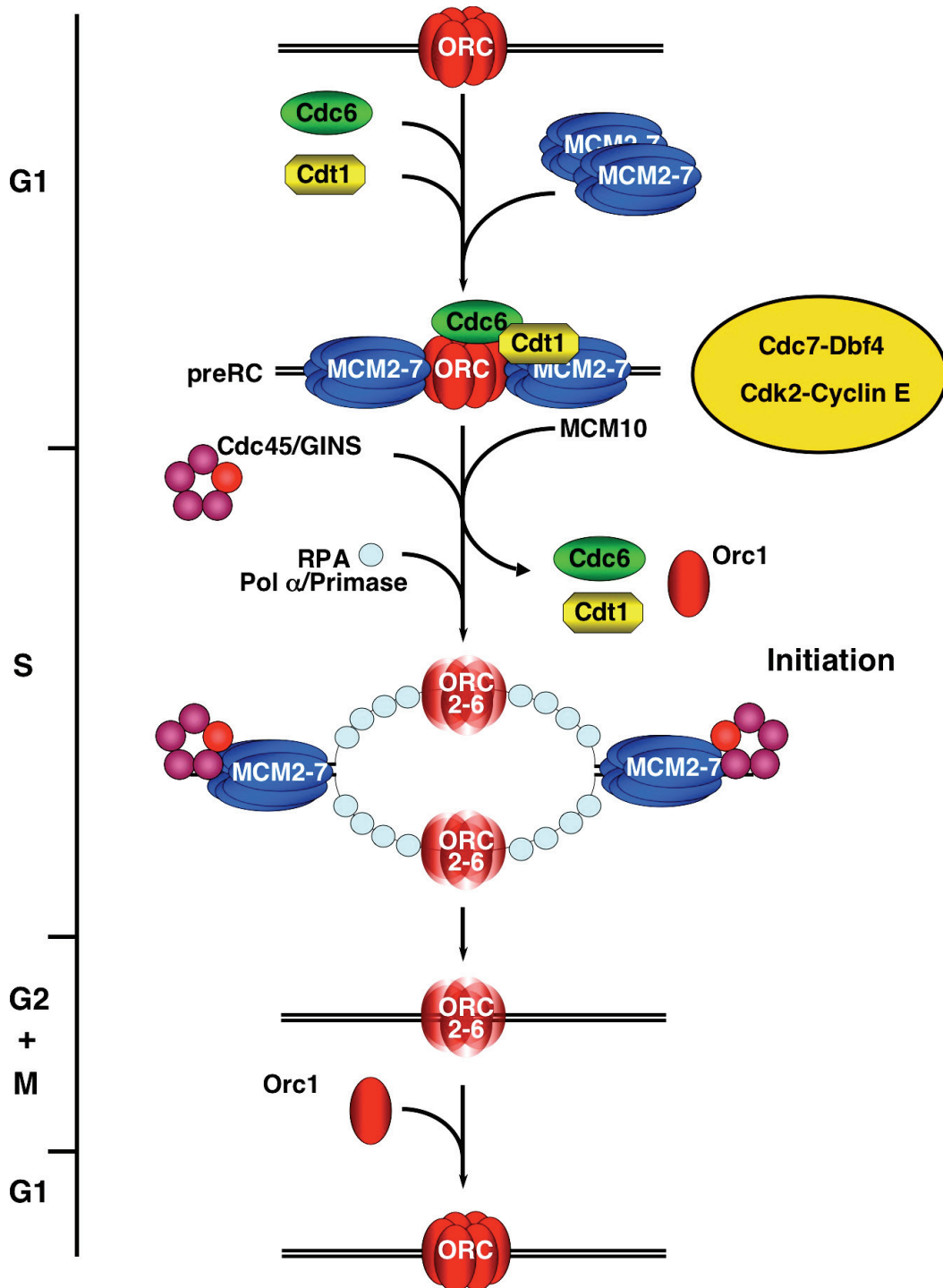


Abb. 1.3: Ausbildung und Aktivierung des preRCs. ORC bindet an Replikationsursprünge und bildet eine Plattform für das Binden von Cdc6. Cdt1 wird gleichzeitig mit dem MCM2-7-Komplex rekrutiert, wodurch der Replikationsursprung lizenziert ist. Nachdem die Cdc7-Dbf4- und Cdk2-Cyclin E-Aktivität ein ausreichendes Niveau erreicht hat, findet die Aktivierung des preRCs statt, wobei die Helikase-Kofaktoren Cdc45/GINS geladen werden. Dadurch wird der Helikase-Komplex aktiv, weitere Faktoren wie RPA und Pol α /Primase assoziieren und die DNA-Replikation wird initiiert.

1.3 Replikationsursprünge in Eukaryonten

Die regulatorischen Prozesse der Initiation der DNA-Replikation wurden in verschiedenen Modellsystemen untersucht. Diese reichten von einzelligen Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* über *Drosophila melanogaster* und den zu den Vertebraten zählendem Krallenfrosch *Xenopus laevis*, bis hin zu Säugetierzellen des chinesischen Zwerghamsters *Cricetulus griseus* und des Menschen. Wie in Abschnitt 1.2 dargestellt, wirken hierbei in all diesen Organismen die gleichen Initiator-Proteine. Dies lässt auf einen konservierten Mechanismus bei der Lizenzierung von Replikationsursprüngen schließen. Hinsichtlich der Replikatoren weisen die untersuchten Modellsysteme jedoch entscheidende Unterschiede auf, die in diesem Abschnitt besprochen werden.

Replikationsursprünge in *Saccharomyces cerevisiae*:

Die ersten Hefe-Replikationsursprünge wurden durch den sogenannten „Autonomous Replicating Sequence“-„Assay“ (ARS-„Assay“) gefunden. Hierbei wurden Hefe-DNA-Fragmente in Plasmide kloniert und untersucht, inwieweit sie die autonome Replikation dieser Plasmide unterstützen (Stinchcomb *et al.*, 1979). Viele der in ARS-„Assays“ identifizierten Sequenzen wurden durch den Nachweis von Replikationsintermediaten an ihrem chromosomalen Lokus als Replikationsstartstellen bestätigt. Den ARS-Elementen gemeinsam ist eine Konsensussequenz aus elf Basenpaaren („ARS consensus sequence“, ACS), die vom Bäckerhefe-ORC *in vitro* und *in vivo* sequenzspezifisch gebunden wird (Bell und Stillman, 1992). Neben dem ACS enthaltenden A-Element bestehen Hefe-Replikationsursprünge zusätzlich aus einem B1- und einer DNA-Entwindungsregion („DNA unwinding element“, DUE). Daneben können verschiedene weitere B-Elemente vorkommen (B2–B4), wobei B2 ein DUE und B3 eine Bindestelle für den Transkriptions-Replikationsfaktor Abf1 enthält (Diffley und Stillman, 1988, Marahrens und Stillman, 1992). Funktional kann B3 durch andere Transkriptionsfaktor-Bindestellen ersetzt werden. Eine Aufgabe von Transkriptionsfaktoren während der Transkriptionsaktivierung ist die Rekrutierung von Chromatin-modifizierenden

Enzymen oder Chromatin-Remodelling-Komplexen, welche die DNA-Zugänglichkeit erhöhen. Nachdem gezeigt wurde, dass über ARS-Elemente positionierte Nukleosomen die Replikationsinitiation verhindern können (Simpson, 1990), spiegelt das B3-Element wahrscheinlich nur die Notwendigkeit einer „offeneren“ Chromatinstruktur wider. Dementsprechend findet man Replikationsursprünge in *S. cerevisiae* vor allem in intergenischen Bereichen, welche offene Chromatinstrukturen aufweisen (Wyrick *et al.*, 2001, Yabuki *et al.*, 2002).

Replikationsursprünge in *Schizosaccharomyces pombe*:

Das mit 14,1 Megabasen in etwa gleich große Genom der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* ist auf lediglich drei Chromosomen verteilt, im Vergleich zu 16 Chromosomen bei der Bäckerhefe. Replikationsursprünge in *S. pombe* können ebenfalls durch ARS-„Assays“ identifiziert werden, enthalten jedoch keine Konsensussequenzen und sind mit 500–1000 bp deutlich größer als in *S. cerevisiae*. ORC-Origin-Erkennung wird allein durch das Orc4-Protein bewerkstelligt, welches, einzigartig für *S. pombe*, neun „AT-hook“-Motive am Aminoterminus trägt. Über diese „AT-hooks“ bindet der SpORC an die asymmetrischen AT-Bereiche innerhalb von *S. pombe*-Replikationsursprüngen (Lee *et al.*, 2001).

Replikationsursprünge in Metazoen:

Die Replikation von Chromosomen in humanen Zellen ist in vielen Replikons organisiert, die eine mittlere Größe von etwa 100 Kilobasen aufweisen (Huberman und Riggs, 1968). Diese Replikongröße wird für alle vielzelligen Organismen angenommen, wodurch es bei einer Genomgröße von 3000 Megabasen in jeder humanen Zelle rechnerisch 30000 Replikationsursprünge gibt. Der ARS-„Assay“ eignet sich in vielzelligen Systemen nur bedingt zur Identifikation von Replikatoren, und so gibt es keine funktionelle Methode zum Auffinden von Replikationsursprüngen. Ferner replizieren Plasmide, die mit einem Kern-Erhaltungselement (Maintenance-Element) ausgestattet sind, Sequenz-unabhängig in humanen Zellen (Krysan und Calos, 1993, Schaarschmidt *et al.*, 2004). Und auch DNA bakteriellen Ursprungs wird nach Injektion in *Xenopus*-Eier Zellzyklus-abhängig

repliziert (Harland und Laskey, 1980). Zudem ließen DNA-Bindungsstudien mit rekombinantem humanem ORC keine Sequenzspezifität erkennen. Daraus schloss man zunächst, dass die Definition von Replikationsursprüngen in Metazoen Sequenz-unabhängig erfolgt.

Neben dem ARS-„Assay“ ist der Nachweis von Replikationsintermediaten gegenwärtig die einzige Möglichkeit, Replikatoren zu identifizieren. Diese Lokalisierung von Initiationsereignissen führte in humanen Zellen bislang zur Identifikation von zirka 20 Replikationsursprüngen. Davon sind der laminB2-, der β -globin-, der MCM4- und der c-myc-Origin die am besten untersuchten Replikationsursprünge, an denen unter anderem auch preRC-Proteine nachgewiesen werden konnten (Abdurashidova *et al.*, 2003, Ladenburger *et al.*, 2002). Die Replikationsursprünge sind nach den Genen benannt, in deren chromosomaler Umgebung sie vorkommen.

Ein DNA-Fragment, welches den laminB2-Origin umfasst, vermag es, unabhängig von seinem chromosomalen Kontext ORC zu rekrutieren und die Replikation ektopisch zu initiieren. Andere humane Replikationsursprünge weisen ektopisch ebenfalls Initiationsaktivität auf, wodurch DNA-Sequenzen zur Definition von Replikationsursprüngen zumindest beitragen können. Des Weiteren lässt die Identifikation von Replikationsursprüngen schließen, dass Initiationsereignisse nicht zufällig über die Metazoen-Genome verteilt sind, sondern lokalisiert sein können. Im Falle des laminB2-Origins wurde der Origin der bidirektionalen Replikation (OBR) auf das Nukleotid genau kartiert.

Neben diesen Replikatoren, welche eine lokalisierte Initiation aufweisen, existieren jedoch auch Initiationszonen, in welchen mehrere preRCs ausgebildet werden, von denen jedoch nur wenige innerhalb eines Zellzyklus aktiviert werden. Eine solche Initiationszone findet sich im 3'-Bereich des Dihydrofolat-Reduktase-Genes in Ovarienzellen des chinesischen Zwerghamsters (Vassilev *et al.*, 1990). Sobald ein Origin innerhalb des DHFR-Origin-Locus feuert, wird die Initiation von benachbarten Replikatoren unterdrückt – ein Sachverhalt, den man als „Origin-Interferenz“ bezeichnet.

Das Phänomen, dass in der G1-Phase mehr preRCs ausgebildet als in der S-Phase aktiviert werden, ist in allen Eukaryonten zu beobachten und wurde von Melvin

DePamphilis als „Jesuit Model“ der Replikationsinitiation bezeichnet: „**many are called, but few are chosen**“ (DePamphilis, 1993).

Wenngleich, im Sinne einer Hefe-ACS, keine Konsensus-Sequenz für Replikationsursprünge in Metazoen identifiziert wurde, weisen diese dennoch einige Gemeinsamkeiten auf.

So kommen asymmetrische **AT-reiche Regionen** in allen untersuchten Origins vor. Dies ist insofern sinnvoll, als dass der humane ORC eine leichte Präferenz für diese Motive aufweist (Stefanovic *et al.*, 2003). Zudem sind, infolge von nur zwei Wasserstoffbrücken zwischen Adenosin und Thymin, AT-reiche DNA-Fragmente thermodynamisch leichter zu entwinden und können so als DUEs dienen.

Einige Replikationsursprünge lokalisieren in oder in der Nähe von **CpG-Inseln** (DHFR-Origin, humane laminB2- und IGFII-Origins). Diese finden sich vor allem in Promotorregionen von Haushalts- und stark exprimierten Genen, was eine für Replikatoren vorteilhafte offene Chromatinstruktur vermuten lässt.

Wie auch in Hefe lokalisieren die meisten identifizierten Replikatoren in **intergenischen Regionen**, welche auch reich an Transkriptionsfaktoren sind.

Proteine, welche ORC durch Protein-Protein-Interaktion an DNA rekrutieren, können ebenfalls zur Definition und Aktivität von Replikationsursprüngen beitragen. Beispiele hierfür sind die **ORC-interagierenden Proteine** Ku80, AIF-C und EBNA1, die für ORC-Rekrutierung an den laminB2-Origin, den AldB-Origin (Ratte) beziehungsweise an den EBV-Replikator (DS) sorgen (Minami *et al.*, 2006, Schepers *et al.*, 2001, Sibani *et al.*, 2005).

Demnach definieren sich Replikationsursprünge in Metazoen nicht linear auf DNA-Sequenz-Ebene, sondern vielmehr durch verschiedene Einflüsse, die kombinatorisch zusammenwirken können.

1.4 DNA-Replikation, Kernarchitektur und Epigenetik

Die DNA in Eukaryonten liegt im Kern im Komplex mit Histon- und Nicht-Histon-Proteinen vor, der aufgrund seiner Färbbarkeit mit basischen Kernfarbstoffen als Chromatin bezeichnet wird (griechisch: *chroma* = Farbe). Die Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom, in dem 146 bp DNA in 1 ¾-Windungen um ein Histonoktamer gewunden sind, das aus jeweils zwei der Histon-Proteine H2A, H2B, H3 und H4 besteht. Hierbei fusionieren zwei H2A/H2B-Heterodimere mit einem zentralen H3/H4-Heterotetramer zum Histonoktamer (Luger *et al.*, 1997). Vor allem die aus dem Nukleosom herausragenden aminoterminalen Enden der Histonproteine sind Ziel posttranslationaler Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, ADP-Ribosylierung und Ubiquitylierung. Zusammen mit Prolin-Isomerisierung bilden diese Modifikationen einen kombinatorischen „Histone Code“ und tragen zur Regulation Chromatin-bezogener Prozesse wie der Transkription, der DNA-Reparatur und auch der DNA-Replikation bei (Jenuwein und Allis, 2001, Kouzarides, 2007, Strahl und Allis, 2000, Turner, 1993). Dieser Histon-Code wird von anderen Proteinen ausgelesen, die den Zustand des Chromatins regulieren.

Auf mikroskopischer Ebene kann man in Interphasekernen aufgrund des unterschiedlichen Verpackungsgrades zwei Arten von Chromatin unterscheiden. Das eher offene Euchromatin und das dicht gepackte Heterochromatin. Euchromatin zeichnet sich durch eine höhere Wahrscheinlichkeit aus transkribiert zu werden als Heterochromatin, was durch den Verpackungszustand der Chromatinfaser aber auch durch die nukleäre Organisation bedingt ist. Jedes Chromosom okkupiert in der Interphase ein begrenztes Territorium, welches in sich eine Polarität aufweist. So lokalisieren transkriptionell aktive Bereiche eher zur Kernmitte, wohingegen transkriptionell inaktive Bereiche nahe der nukleären Peripherie zu finden sind (Sadoni *et al.*, 1999). Der Kern stellt ein hoch kompartmentalisiertes Organell dar, in dem die meisten Prozesse in spezialisierten nukleären Domänen ablaufen. So findet Transkription in „transcription factories“ statt, von welchen zirka 250–350 pro Zelle existieren. Diese lokalisieren an der Grenze zum Chromatin im sogenannten „Interchromatin Compartment“ (IC) (Cremer *et al.*, 2006).

Auch die DNA-Replikation findet in „Fabriken“ statt, die während der S-Phase als Foci durch Fluoreszenz-mikroskopischen Nachweis von Replikationsfaktoren (zum Beispiel PCNA oder DNA Ligase I) sichtbar gemacht werden können. Es wird postuliert, dass die Replikationsmaschinerie an einer Gerüststruktur, der nukleären Matrix, verankert ist und während der Elongation der Replikationsgabel die DNA durch die Replikationsfabrik gespult wird (Hozak *et al.*, 1993). Jüngere Arbeiten in *S. cerevisiae* konnten dieses Modell teilweise bestätigen (Kitamura *et al.*, 2006). Zudem ist das nukleäre Matrix-Protein DNA-Topoisomerase II notwendig für die Replikationsaktivität von mindestens einem Replikationsursprung (laminB2) (Abdurashidova *et al.*, 2007) und reguliert darüber hinaus die Replikongröße während der Differenzierung in *Xenopus laevis* (Lemaitre *et al.*, 2005). Damit übereinstimmend finden sich viele humane Replikationsursprünge in der Nähe von „Scaffold“ und „Matrix Attachment Regions“ (S/MAR) (Gerhardt *et al.*, 2006).

Replikationsfoci repräsentieren zum Zeitpunkt ihrer Entstehung wahrscheinlich „Cluster“ von nahezu synchron feuernenden Replikations-ursprüngen. In humanen HeLa-Zelllinien dauert die S-Phase etwa neun Stunden, in denen die Replikations-Foci charakteristische Verteilungsmuster im Kern zeigen. Diese Muster korrespondieren reproduzierbar mit

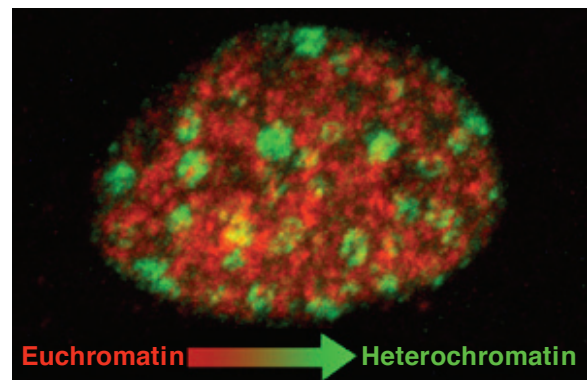


Abb. 1.4: Replikations-Timing-Programm.
Von der Homepage des Cardoso-Labors (MDC, Berlin).

definierten Zeitpunkten innerhalb der S-Phase. Abbildung 1.4 zeigt ein solches Replikations-Timing-Programm anhand einer 3D-Rekonstruktion einer Säugerzelle, welche die GFP-markierte DNA-Ligase I exprimiert. Während einer zehninütigen Inkubationsphase baute die oben dargestellte Zelle das Nukleotidanalogon Bromodeoxy-Uridin (BrdU) ein. Nach weiteren drei Stunden wurde die Zelle fixiert und inkorporiertes BrdU (rot) mit einem spezifischen Antikörper gleichzeitig mit der GFP-markierten DNA-Ligase (grün) nachgewiesen. Die roten, früh replizierten Kern-Bereiche, welche BrdU-positiv sind, kolokalisieren vor allem mit Euchromatin, wohingegen die später replizierten Bereiche, welche hier durch die GFP-markierte

DNA-Ligase I dargestellt sind, mit Verteilungsmustern von Heterochromatin-Proteinen zur Deckung gebracht werden können.

Diese zeitlich und räumlich strikte Trennung der Replikation von Eu- und Heterochromatin erleichtert vermutlich die korrekte Replikation des Epigenoms, wodurch gewährleistet wird, dass transkriptionell inaktive Regionen auch im folgenden Zellzyklus nicht transkribiert werden (McNairn und Gilbert, 2003).

Die Lokalisation innerhalb des Zellkernes sowie der transkriptionelle Status des Chromatins haben folglich Einfluss auf den Replikationszeitpunkt innerhalb der S-Phase. Darüber hinaus zeigten verschiedene Arbeiten, dass Transkription die Ausbildung von Replikationsursprüngen spezifizieren kann (Danis *et al.*, 2004) und bestimmte kovalente Histonmodifikationen für die Aktivität von verschiedenen Origins notwendig sind (Aggarwal und Calvi, 2004, Zhou *et al.*, 2005a, Zhou *et al.*, 2005b).

Somit entscheiden in Metazoen, neben der DNA-Sequenz, zusätzlich epigenetische Faktoren über die Spezifizierung und Aktivierung von Replikationsursprüngen (DePamphilis, 1993).

1.5 Extrachromosomale Replikons

Plasmide, die den latenten Replikationsursprung des Epstein-Barr-Virus (*oriP*) tragen, sowie der von Prof. H.-J. Lipps entwickelte pEPI-I-Vektor sind die am besten untersuchten extrachromosomalen Replikons. *oriP*-Plasmide und pEPI-I wurden auch in dieser Arbeit zum Studium der DNA-Replikationsinitiation verwendet und werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

EBNA1 und *oriP*:

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein γ -Herpesvirus, das humane B-Zellen infizieren und immortalisieren kann. In seinem latenten Zyklus repliziert EBV als ringförmiges doppelsträngiges DNA-Episom synchron mit der chromosomalen Wirts-DNA einmal pro Zellzyklus während der S-Phase. EBV benutzt hierzu die zelluläre Replikationsmaschinerie und stellt somit ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der DNA-Replikation dar (Knipe *et al.*, 2007). EBV-basierende Plasmide benötigen

lediglich zwei virale Komponenten, um stabil in humanen Zellen aufrechterhalten und repliziert zu werden: das EBV-nukleäre-Antigen 1 (EBNA1) *in trans* und den latenten Replikationsursprung *oriP in cis*. Letzterer besteht aus zwei genetischen Elementen, der „family of repeats“ (FR) und dem „dyad symmetry“-Element (DS), welche beide mehrere Bindestellen für EBNA1-Dimere enthalten. FR besitzt davon 20 und fungiert als Element zur nukleären Retention, wobei EBNA1 als Brückenprotein wirkt. Über seine carboxyterminale DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne bindet EBNA1 an FR und vermittelt die Anheftung von *oriP*-Plasmiden an Wirtschromosomen über die AT-hook-Motive in seinem Aminoterminal (Sears *et al.*, 2004). Die Zentren der vier Bindestellen innerhalb von DS sind paarweise durch genau zwei volle helikale DNA-Windungen (21 Basen) voneinander getrennt, wodurch die EBNA1-Dimere an DS die gleiche Orientierung aufweisen. Diese Eigenschaft von DS ist essentiell für seine Funktion als Replikator-Element von *oriP*. Durch eine Protein-Protein-Interaktion rekrutiert EBNA1 den humanen ORC an DS und bietet so eine Plattform für die Ausbildung eines preRCs (Sugden, 2002, Wang und Sugden, 2005). Zudem rahmen die „nonamer repeats“ die EBNA1-Bindestellen an DS ein. Diese werden im Kern von dem Telomer-bindenden Faktor TRF2 gebunden, welcher analog zu EBNA1 ORC an DS rekrutiert und so zur Replikationseffizienz von *oriP*-Plasmiden beiträgt (Atanasiu *et al.*, 2006).

Zusätzlich bindet ein Chromatin-Remodeling-Komplex am G1/S-Phase-Übergang an DS, welcher neben der Chromatin-Remodelling-ATPase Snf2h auch die Histon-Deacetylase HDAC1 enthält. Snf2h führt zu einer Erhöhung der Mobilität der an DS positionierten Nukleosomen und HDAC1 deacetyliert G1/S-Phase-spezifisch Histon H3 an Lysin 9 (H3K9). Beide Faktoren sind für die Ausbildung eines lizenzierten preRCs an DS und somit für dessen Replikationsaktivität essentiell (Zhou *et al.*, 2005b).

Abbildung 1.5 zeigt den Aufbau von *oriP* sowie die Domänenorganisation von EBNA1.

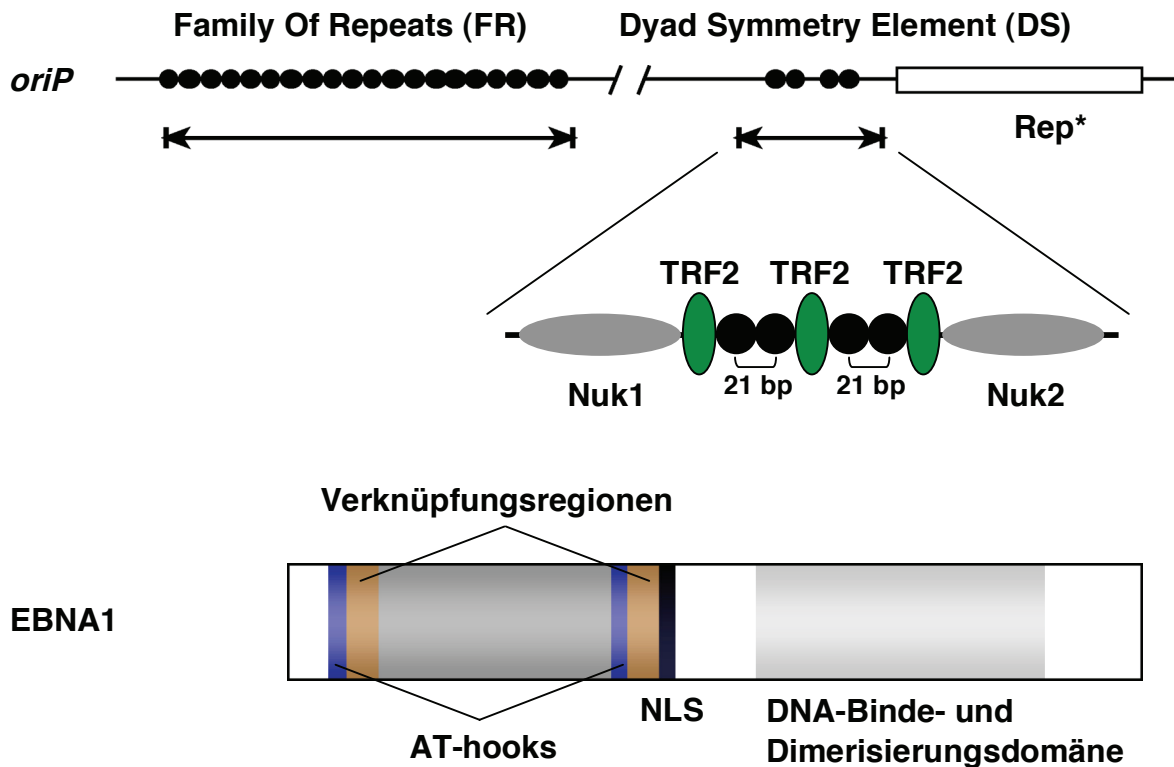


Abb. 1.5: Aufbau des latenten EBV-Origins *oriP* und Domänenarchitektur von EBNA1. Schwarze Ovale symbolisieren Bindestellen für EBNA1-Dimere. Rep* ist ein genetisches Element, welches EBNA1-Bindestellen niedriger Affinität enthält und nach Multimerisierung ebenfalls episodale Replikation unterstützt. Ein vergrößerter Ausschnitt zeigt DS mit seinen vier EBNA1-Dimer-Bindestellen sowie an die „nonamer repeats“ gebundenes TRF2 (grün). EBNA1 besitzt in seinem Aminoterminus zwei „AT-hook“-Motive (blau) sowie zwei Verknüpfungsregionen. Letztere bewirken das „Ausloopen“ von DNA zwischen FR und DS. Die Kernlokalisationssequenz ist in Schwarz und die carboxyterminale DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne in Hellgrau dargestellt. Zwischen den Verknüpfungsregionen sind in Dunkelgrau die Glycin-Alanin-Wiederholungen dargestellt.

Das extrachromosomale Replikon pEPI-I:

pEPI-I wurde im Labor von Prof. Hans-Joachim Lipps (Universität Witten-Herdecke) durch Insertion einer S/MAR Region des humanen Interferon- β -Genlokuses in die „multiple cloning site“ des pGFP-C1 Plasmides (Clontech) hergestellt. Abbildung 1.6 zeigt eine Plasmidkarte des extrachromosomalen Replikons pEPI-I. Ohne weitere virale Faktoren wird dieser Vektor in allen bislang untersuchten Säugetierzellen repliziert. pEPI-I ist als Episom mit Metaphase-Chromosomen assoziiert und interagiert mit dem Kernmatrixprotein SAF-A (Baiker *et al.*, 2000). Dadurch ist pEPI-I auch nach der Mitose im Kern lokalisiert.

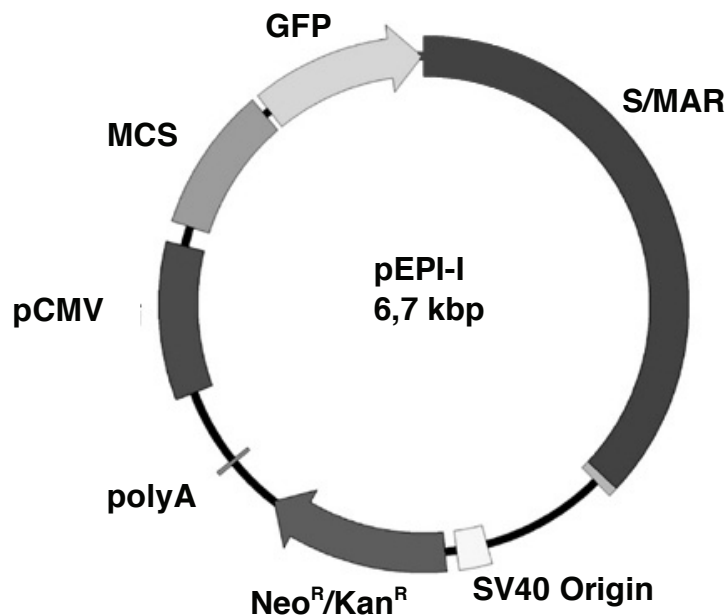


Abb. 1.6: Plasmidkarte des extrachromosomalen Replikons pEPI-I. Vom hCMV-Promotor aus wird ein Transkript produziert, welches erst an einem nicht eingezeichneten polyA-Signal hinter der S/MAR-Region terminiert wird. Zudem enthält das Plasmid einen SV40 Origin und vermittelt in *E. coli* und humanen Zellen Kanamycin- bzw. Neomycin-Resistenz.

Für die Replikation und Aufrechterhaltung des Episoms muss zudem über die S/MAR-Region hinweg transkribiert werden (Stehle *et al.*, 2003).

An pEPI-I wurde in HeLa-Zellen ORC-Bindung, preRC-Ausbildung und Replikationsinitiation untersucht. Sogar die Integration eines bekannten humanen Replikationsursprungs (MCM4) führt auf pEPI nicht zu einer lokalisierten ORC-Bindung und preRC-Ausbildung, was durch Chromatin-Immunopräzipitations-Experimente (ChIP) gezeigt wurde. Nachdem die DNA-Replikation an oder in der Nähe von ORC-Bindungsstellen initiiert, kann an pEPI-I keine lokalisierte Replikationsinitiation nachgewiesen werden, was anhand der ChIP-Experimente bereits zu vermuten war (Schaarschmidt *et al.*, 2004). Diese Eigenschaft von pEPI-I wurde in dieser Arbeit ausgenutzt, um die Ausbildung eines dominanten Replikationsursprungs zu untersuchen (siehe Kapitel 4.4).

1.6 „High-Mobility-Group“-Proteine

Nach den Histonen stellen die HMG-Proteine die zweithäufigste Komponente unter den Chromatin-Proteinen dar. Ihren Namen verdanken sie ihrem hoch mobilen Laufverhalten während der Gelelektrophorese. Die HMG-Proteine werden in die drei Protein-Familien HMGN, HMGB und HMGA eingeteilt, die sie nach ihren Chromatin-Bindungseigenschaften klassifizieren.

Die **HMGN**-Proteine binden Sequenz-unabhängig an Chromatin durch die Interaktion mit **N**ukleosomen. In allen Säugetieren sind die fünf HMGN-Proteine HMGN1, HMGN2, HMGN3a und dessen Spleißvariante HMGN3b sowie HMGN4 zu finden .

HMGN1 und HMGN2 okkupieren verschiedene Bereiche im Kern und ihre Assoziation mit Chromatin ist hochdynamisch. Ihre Verweildauer im Chromatin liegt zwischen vier und 25 Sekunden und wird durch kovalente posttranslationale Modifikation beeinflusst. So führt die Acetylierung durch p300 und die Phosphorylierung durch die Mitogen- und Stress-aktivierten Protein-Kinasen MSK1 und MSK2 zu einer erhöhten Mobilität und dadurch indirekt zur Transkription von „immediate early“-Genen der Jun- und Fos-Familie (Soloaga *et al.*, 2003).

Zudem kompetitieren HMGN-Proteine mit Histon H1 um Bindungsstellen im Chromatin und führen so lokal zu einer besseren Zugänglichkeit des Chromatins (Bianchi und Agresti, 2005). Darüber hinaus steigert HMGN2 die Effizienz des SV40-*in-vitro*-Replikationssystems (Vestner *et al.*, 1998).

Die **HMGB**-Proteine binden an DNA über ihre HMG-**B**ox-Domänen, welche aus drei α -Helices bestehen, die zu einem Keil gefaltet sind. Die drei in Säugern vorkommenden HMGB-Proteine HMGB1, HMGB2 und HMGB3 tragen jeweils zwei HMG-Box-Domänen, mit denen sie die kleine Furche der DNA kontaktieren und DNA zu einem rechten Winkel beziehungsweise darüber hinaus verbiegen können (Thomas und Travers, 2001). Dies beeinflusst die DNA-Bindung anderer Proteine und erleichtert die Remodellierung von Nukleosomen durch den CHRAC-Remodeling-Komplex (Bonaldi *et al.*, 2002).

Die HMGA-Proteine binden über ihre „AT-hook“-Motive an asymmetrische AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche der DNA (Huth *et al.*, 1997, Reeves und Nissen, 1990). Die HMGA-Familie besteht aus den Proteinen HMGA1a und seiner Spleißvariante HMGA1b, sowie aus HMGA2. HMGA-Proteine beeinflussen Chromatin-bezogene Prozesse wie Transkription oder DNA-Reparatur (Bianchi und Agresti, 2005). Jedes dieser Proteine enthält drei „AT-hook“-Motive und wie alle HMG-Proteine eine saure carboxyterminale Domäne. Die verschiedenen HMGA-Proteine unterscheiden sich unter anderem durch den Abstand ihrer „AT-hook“-Motive zueinander. Abbildung 1.7 zeigt eine Darstellung der Domänen-Architektur von HMGA-Proteinen.

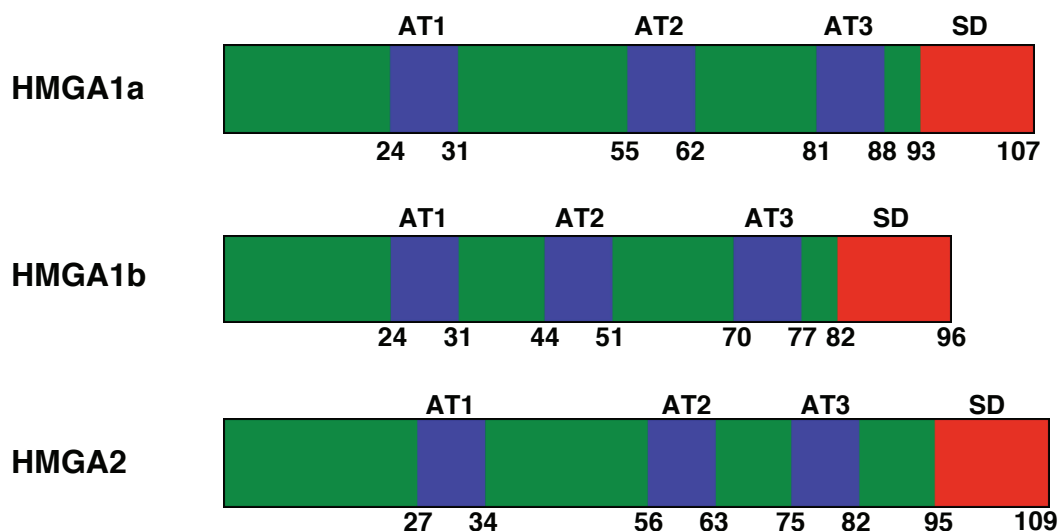


Abb. 1.7: Domänen-Architektur von HMGA-Proteinen. Die drei „AT-hook“-Motive (AT1-3) sind in Blau und die carboxyterminale saure Domäne (SD) in Rot dargestellt. Die Aminosäurepositionen, über die sich die Motive erstrecken, sind unterhalb der Schemata vermerkt.

HMGA-Proteine sind besonders abundant während der Embryonalentwicklung und überexprimiert in Krebszellen, werden in differenzierten Zellen jedoch wenig exprimiert (Sgarra *et al.*, 2004). HMGA1a konkurriert mit Histon H1 um Bindungsstellen im Chromatin und verleiht dem Chromatin so mehr Plastizität (Bonneyoy *et al.*, 1999). Sie wirken als architektonische Transkriptionsfaktoren, indem sie an der Ausbildung von „Enhanceosomen“ mitwirken. So bindet HMGA1a zum Beispiel an den Interferon-beta-Promotor und führt dort zu einer DNA-Biegung, was

die Affinität weiterer Proteine wie ATF2/c-Jun und NF- κ B gegenüber ihren Zielsequenzen erhöht und zur aktivierten Transkription führt (Yie *et al.*, 1999a, Yie *et al.*, 1999b).

Ähnlich wie HMGN-Proteine sind HMGA-Proteine Ziel von posttranslationalen Modifikationen wie Methylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung. Krebszellen weisen andere HMGA-Modifikationen auf als gesunde Zellen und es wird vermutet, dass HMGA-Proteine dadurch andere Protein-Protein-Interaktionen eingehen (Diana *et al.*, 2005). Zudem ist bekannt, dass durch den Phosphorylierungszustand der „AT-hook“-proximalen Threoninreste die Verweildauer von HMGA1a am Chromatin reguliert wird (Harrer *et al.*, 2004). Jüngere Arbeiten konnten HMGA-Proteine als Komponenten von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHF) identifizieren. Zelluläre Seneszenz spiegelt einen stabilen Zustand des proliferativen Arrests wieder. In solchen Zellen lassen sich größere Chromatin-Bereiche ausmachen, die als Heterochromatin vorliegen, in denen stillgelegte Proliferations-assoziierte Gene lokalisieren (Narita *et al.*, 2006). Jan Brocher (Universität Würzburg) fand heraus, dass HMGA1a mit den Heterochromatin-Proteinen HP1 α und HP1 β interagiert und deren Mobilität im Chromatin herabsetzt. Somit könnte die Rolle von HMGA1a bei der Ausbildung von SAHFs in der Rekrutierung der HP1-Proteine liegen, welche die Stilllegung von proliferationsassoziierten Genen bewirken (Brocher *et al.*, 2007).

Somit erfüllen HMGA-Proteine Aufgaben bei so gegensätzlichen Prozessen wie der Transkription und der Heterochromatin-Ausbildung, und sind überdies bereits mit DNA-Replikation in Verbindung gebracht worden. Im Labor von Elliott Kieff wurde gezeigt, dass HMGA1a die Funktionen des EBNA1-Aminoterminus hinsichtlich Plasmid-Aufrechterhaltung und DNA-Replikation ersetzen kann (Hung *et al.*, 2001). So werden *oriP*-Plasmide stabil in Zellen erhalten und repliziert, sofern diese Zellen ein Fusionsprotein aus HMGA1a und der carboxyterminalen DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von EBNA1 exprimieren.

Die Vielseitigkeit der HMG-Proteine verleitete einen der Vorreiter der Chromatin-Forschung zu der im HMG-Feld viel zitierten Aussage:

„There must be money in proteins that control your fat, your teeth, your sex and your health (besides minor things such as transcription, cell division and DNA recombination and repair).“

Alan P. Wolffe, 1.6.1959 – 26.5.2001

1.7 Zielstellung

Eine der offenen Fragen der DNA-Replikation ist noch immer, wie multizelluläre Organismen ihre Replikationsursprünge definieren. Bislang identifizierte Startstellen der DNA-Replikation zeigen keine konservierten Sequenzmotive. Abgesehen von einer bestimmten Abfolge von Basen könnte eine bestimmte Topologie der DNA oder eine spezielle lokale Chromatin-Struktur für ein zielgerichtetes Binden von ORC sorgen und somit Replikationsursprünge definieren. Denkbar wäre auch, dass Kernproteine als eine Art Kofaktor wirken, indem sie das Binden von ORC an bestimmte Bereiche des Genoms fokussieren, ähnlich wie EBNA1 ORC an *oriP* rekrutiert. Hung *et al.* konnten zeigen, dass HMGA1a EBNA1-Funktionen hinsichtlich Plasmid Aufrechterhaltung und Replikation in humanen Zellen ersetzen kann (Hung *et al.*, 2001).

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Hintergründe aufzuklären, welche es HMGA1a ermöglichen, die Replikation von extrachromosomalen Plasmiden zu unterstützen.

Diesbezüglich wurde die potentielle Rolle von HMGA1a für die DNA-Replikation *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Durch biochemische sowie durch Fluoreszenz-mikroskopische Methoden sollte eine mögliche HMGA1a-ORC-Interaktion nachgewiesen und die zelluläre Lokalisation der Interaktion bestimmt werden.

Zur funktionellen Charakterisierung der replikativen Funktion von HMGA1a dienen Plasmidsysteme, an denen die Bindung von ORC und die Ausbildung von Replikationsursprüngen charakterisiert werden sollte.

2. Material

2.1 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München) synthetisiert. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang angegeben (Kapitel 9.1).

2.2 Plasmide

Falls nicht anders angegeben wurden alle folgenden Plasmide im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die Auflistung gibt alle verwendeten Plasmide als Auszug aus der Datenbank der Abteilung Genvektoren wieder. Die mit „*“ gekennzeichneten Plasmide wurden lediglich als Matrize bei PCR-Reaktionen herangezogen.

| | |
|----------|--|
| p2832 | <i>oriP</i> -Reporterplasmid (Gerhardt <i>et al.</i> , 2006) |
| p3230 | <i>oriP</i> -Reporterplasmid (Dagmar Pich, GSF) |
| p3265.12 | pCMV → scTetR:: <i>HMGA1a</i> ::EBNA1-DBD (Dagmar Pich, GSF) |
| p3281 | pCMV → <i>HMGA1a</i> ::EBNA1-DBD::ST |
| p3290 | pCMV → EBNA1::ST |
| p3315 | FR/ <i>tetO₄</i> -Hybridplasmid (Dagmar Pich, GSF) |
| p3560 | T7 → <i>HMGA1a</i> ::ST |
| p3584 | FR/ <i>tetO₈</i> -Hybridplasmid (Dagmar Pich, GSF) |
| p3599 | FR/ <i>tetO₁₆</i> -Hybridplasmid (Dagmar Pich, GSF) |
| p3600 | FR/ <i>tetO₃₂</i> -Hybridplasmid (Dagmar Pich, GSF) |
| p3650 | pCMV → FLAG-Orc1-YN |
| p3652 | pCMV → FLAG-Orc6-YN |
| p3667 | pCMV → HA-Orc4-YC |
| p3668 | pCMV → HA-Orc5-YC |
| p3669 | pCMV → HA-Cdc6-YC |

| | |
|--------|--|
| p3721 | pCMV → HA-HMGA1a-R3xG-NLS-YC |
| p3722 | pCMV → HA-HMGA1a Δ AT1-NLS-YC |
| p3724 | pCMV → HA-HMGA1a-SD-NLS-YC |
| p3726 | pCMV → mRFP-DNA-Ligase I (Heinrich Leonhardt, LMU) |
| p3729* | pCMV → HMGA1a Δ AT1-NLS-EGFP (Brocher <i>et al.</i> , 2007) |
| p3732* | pCMV → HMGA1a-R3xG-NLS-EGFP (Harrer <i>et al.</i> , 2004) |
| p3735 | pCMV → scTetR; pIRES-hyg2 (Clontech) |
| p3760* | pCMV → HA-HMGA1a Δ SD-YC (Brocher <i>et al.</i> , 2007) |
| p3762 | pCMV → HMGA1a-EGFP (Harrer <i>et al.</i> , 2004) |
| | pCMV → FLAG-HP1 α -YN (Brocher <i>et al.</i> , 2007) |
| | pCMV → FLAG-Jun-YN (Hu <i>et al.</i> , 2002) |
| | pCMV → HA-Fos Δ Zip-YC (Hu <i>et al.</i> , 2002) |
| | pCMV → HA-Fos-YC (Hu <i>et al.</i> , 2002) |
| | pCMV → HA-HMGA1a-YC (Brocher <i>et al.</i> , 2007) |
| | pCMV → HA-Pes1-YC (Michaela Rohrmoser, GSF) |
| | pCMV → HP1 α -mRFP (Robert Hock, Universität Würzburg) |
| | pEPI-I (Piechaczek <i>et al.</i> , 1999) |
| | pEPI-tetO20(c) |
| | pFT240, pET3c, T7 → DasR (Fritz Titgemeyer, Universität Erlangen) |

2.3 Antikörper

| Spezifität | Spezies, Isotyp, sonstiges | Bezugsquelle | Verd. |
|----------------------|------------------------------------|-------------------|---------|
| primäre Antikörper | | | |
| EBNA1 | Ratte, 1H4, IgG2a (monokl.) | E. Kremmer, GSF | 1:100 |
| GFP | Maus, IgG1 | Roche | 1:1000 |
| Mcm3 | Kaninchen, IgG | Labor R. Knippers | 1:2000 |
| Mcm7 | Kaninchen, IgG | Labor R. Knippers | 1:2000 |
| Orc1 | Ratte, 1A7, IgG2a (monokl.) | E. Kremmer, GSF | 1:20 |
| Orc2 | Kaninchen, IgG, (aff. ger), IP | Labor R. Knippers | 1:1000 |
| Orc2 | Kaninchen (pAb205), IF | Labor B. Stillman | 1:400 |
| Orc4 | Maus, IgG1 (monokl.) | BD Pharmingen | 1:2000 |
| Orc6 | Ratte, 3A4, IgG2a (monokl.) | E. Kremmer, GSF | 1:200 |
| IgG Ratte | Kaninchen, IgG (aff. ger.), IP | Dianova | |
| TetR | Kaninchen, IgG | Labor W. Hillen | 1:1000 |
| HA | Ratte, R001, IgG1 (monokl.), IF | E. Kremmer, GSF | 1:50 |
| FLAG | Maus, M2 (monokl. & aff. ger.), IF | Sigma | 1:500 |
| sekundäre Antikörper | | | |
| IgG Ratte | Ziege, HRP, IgG | Promega | 1:10000 |
| IgG (L) Kan. | Maus, HRP, IgG | Dianova | 1:10000 |
| IgG Kan. | Ziege, HRP, IgG | Dianova | 1:10000 |
| IgG Maus | Ziege, Texas Red, IgG, IF | Dianova | 1:100 |
| IgG Ratte | Ziege, Indodicarbocyanin (Cy5), IF | Dianova | 1:100 |
| IgG Maus | Ziege, HRP, IgG | Promega | 1:10000 |
| IgG Kan. | Ziege, Texas Red, IgG, IF | Dianova | 1:100 |

Für Western-Blot-Analysen beziehungsweise Immunofluoreszenz-Analysen wurden die Antikörper in der angegebenen Verdünnung eingesetzt. Detaillierte Angaben zu Western-Blot-Bedingungen finden sich im Anhang (Kapitel 9.4).

aff. ger = affinitätsgereinigt; HRP = Meerrettichperoxidase; IF = Immunofluoreszenz; IP = Immunopräzipitation; Kan. = Kaninchen; monokl. = monoklonal; Verd. = Verdünnung.

Für die Immunopräzipitation von HMGA1a-EGFP wurde der GFP-Binder verwendet (Rothbauer *et al.*, 2007).

2.4 *Escherichia coli*-Stämme

| | |
|--------------|---|
| DH5 α | F ⁻ , <i>lac</i> ⁻ , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>), U169, F80d <i>lacZ</i> Δ M15, <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Hanahan, 1985) |
| Rosetta(DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ^m B ^B) <i>gal dcm</i> (DE3) <i>pLysSRARE</i> (<i>argU</i> ⁺ , <i>argW</i> ⁺ , <i>cam</i> ⁺ , <i>ileX</i> ⁺ , <i>glyT</i> ⁺ , <i>leuW</i> ⁺ , <i>proL</i> ⁺) (Novagen) |
| DH10B | F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara, leu</i>)7697, <i>galJ</i> , <i>galK</i> , λ ⁻ , <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> (GibcoBRL) |

2.5 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren oder wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert (*). Bei den etablierten Zellen ist jeweils die Expressionsplasmid-Nummer angegeben, mit dem die HEK293-Zellen stabil transfiziert wurden.

| | |
|-----------------------|---|
| HEK293 | Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch die Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham <i>et al.</i> , 1977). |
| HepG2 | Humane Hepatoblastom-Zelllinie (Knowles <i>et al.</i> , 1980) |
| HeLa S3 | Zervixplattenepithel-Karzinom-Zelllinie (Puck und Marcus, 1955) adaptiert für das Wachstum in Suspension |
| HCT116 | Kolonkarzinomzelllinie |
| HEK293/EBNA1 | (Bill Sudgen) |
| HEK293/2679 | HMGA1a::EBNA1-DBD ⁺ -HEK293 (Klon 2679.7) |
| HEK293/EBNA1/3265.12* | EBNA1/ scTetR::HMGA1a ⁺ -HEK293 |
| HEK293/3265.12 | scTetR::HMGA1a ⁺ -HEK293 (Klon 3265.17) |
| HEK293/3290* | EBNA1::ST ⁺ -HEK293 (Klon 3290.1C) |
| HEK293/3281* | HMGA1a::EBNA1-DBD::ST ⁺ -HEK293 (Klon 3281.2) |
| HEK293/3735* | scTetR ⁺ -HEK293 (Klon 3735.1) |

| | |
|----------------|---|
| HEK293/3762 | HMGA1a-EGFP ⁺ -HEK293 (Klon SCC1) |
| HCT116/3265.12 | scTetR::HMGA1a ⁺ -HCT116 (Klon 963) |
| Sf9 | immortalisierte <i>Spodoptera frugiperda</i> Ovarzellen |
| BTI-Tn-5BI-4 | Insektenzellen (High Five™, Invitrogen) |

2.6 Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in reiner Form pro analysis bezogen.

Beckmann, Heidelberg

Avanti J25 Zentrifuge, L7-55 Ultrazentrifuge,

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Antikörper, Plastik-Reagenzgefäße, Zellkulturflaschen

Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA

Gene Pulser Elektroporationsgerät, 10 ml Poly-Prep Säulen

Boehringer Mannheim, Mannheim

High Prime Labeling Kit

Calbiochem GmbH, Frankfurt/Main

Dithiothreitol (DTT), Hygromycin B, Puromycin

Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

Acrylamid, Natriumdodecylsulfat, Phenol, Roti-Block, Spectra/Por 6 Dialyse-Membran (MWCO 3500 kDa, Durchmesser 11,5 mm)

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Agar, Hefeextrakt, Trypton

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

Röntgenfilme XAR5

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

BioPhotometer, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, Tischzentrifuge 5415

Genomed, Bad Oeynhausen

Maxi-Präparations-Kit für Plasmidpräparationen (Jetstar)

General Electric Healthcare, München

ECL-Western Blotting Analysis System, Hybond™-ECL-Zellulosemembran, Hybond-N+-Nylonmembran, Protein A-Sepharose, Protein G-Sepharose

Hartenstein, Würzburg

Deckgläschen (12 mm, rund), Objektträger

Hoechst, Frankfurt

Hoechst-Farbstoff H33342, Mowiol

Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit, SemiPhor, Semidry Blottingsystem

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

fötales Kälberserum, HEPES, 1 Kb DNA-Leiter, L-Glutamin, Lipofectamin 2000 Transfektionsreagenz, Natrium-Pyruvat, Optimem I, Penizillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640, Zellkulturmedium DMEM, BenchMark Protein Ladder, β -Mercaptoethanol, BTI-Tn-5BI-4 (High Five™) Insektenzellen

Leica-Microsystems, Bensheim

Leica TCS SP2 konfokales Mikroskop

Macherey-Nagel, Düren

NucleoSpin Extract II Kit

Marabu, Tamm

Fixogum Montagekleber

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme, DNA-Leiter-Mix

Merck-Eurolab GmbH

Glyzerin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ammoniumperoxodisulfat (APS), Essigsäure, Ethidiumbromid, Ethanol, Glucose, Glyzin, Glyzylglyzin, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesium-chlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natrium-Orthovanadat, Salzsäure, Saccharose, Tetramethyldiamin (TEMED), Triton-X-100

Millipore, Frankreich

Wasservollentsalzungsanlage Milli-RO 60 PLUS

Nunc GmbH, Wiesbaden

Cryotubes 1,8 ml, Plastikpetrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen, 24 und 6 Loch Platten

New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme, DNA modifizierende Enzyme

PAA Laboratories, Wien

G418-Sulfat (Neomycin)

PE Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

Peqlab, Erlangen

Reaktionsgefäße, Elektrophorese-Kammern, dNTPs

Pierce, Rockford

BCA Protein Assay

Promega, Mannheim

Antikörper, Taq-Polymerase, Taq-Puffer, dNTP's

Qiagen, Hilden

Nickel-NTA-Agarose, Polyfect Zelltransfektionsreagenz

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

dNTPs, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), alkalische Phosphatase, DNase I, RNase I, MNase, Klenow-Fragment, Restriktionsenzyme, Light Cycler, Light Cycler – Fast Start DNA Master SYBR green I, Antikörper, HD Fugene Zelltransfektionsreagenz, complete Protease Inhibitor EDTA free,

Sigma Chemie, München

Ampicillin, Bromphenolblau, DMSO, Dithiothreitol (DTT), Glyzin, HEPES, Harnstoff, Natriumfluorid, Natriummolybdat, Natriumorthovanadat, Natriumpyrophosphat, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Triton X-100, Monolaurat (Tween-20), Prestained SDS Molecular Weight Marker, Rinderserumalbumin (BSA)

Stratagene, Heidelberg

Robocycler, QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit

Schleicher & Schuell, Dassel

Filtereinheit 1,2 µm

Zeiss, Göttingen

Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 40C

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

In Flüssigkultur wurde *Escherichia coli* bei 37 °C und 220 Upm in einem Orbital-Schüttler angezogen. Das hierzu verwendete LB-Medium wurde mit einfach deionisiertem Wasser angesetzt und autoklaviert. Zur Herstellung von LB-Platten wurde zusätzlich 1,2 % (w/v) Agar zugegeben und zusammen mit den anderen Teilkomponenten autoklaviert. Antibiotika und IPTG wurden je nach Anforderung als fakultative Substanzen den autoklavierten Medien beigegeben.

Zur Kultivierung auf LB-Agar wurden *E. coli*-Zellen mit einem Drygalskispatel ausplattiert und die Platten für 16–20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden anschließend bei 4 °C gelagert und maximal eine Woche verwendet.

Zur Herstellung von *E. coli*-Dauerkulturen wurden Übernacht-Flüssigkulturen mit Glycerin (Endkonzentration: 10 %) versetzt und bei –80 °C gelagert.

LB-Medium (Luria-Bertani-Broth): 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl,
0,5 % (w/v) Hefeextrakt

3.1.2 Antibiotika und sonstige Medienzusätze

Von allen Antibiotika wurden Stammlösungen hergestellt, sofern sie in Wasser gelöst wurden sterilfiltriert und, wie von Sambrook *et al.* beschrieben, in den entsprechenden Endkonzentrationen für „relaxed plasmids“ (Plasmide mit hoher Kopienzahl) eingesetzt (Sambrook und Russell, 2001).

IPTG wurde als 1 M Stammlösung mit doppelt-deionisiertem Wasser hergestellt und sterilfiltriert.

3.1.3 Bakterielle Überexpression und Reinigung von HMGA1a::ST

Testexpression

Im kleinen Maßstab wurde zunächst getestet, ob rekombinantes carboxyterminal Strep-Tag-II-markiertes HMGA1a (HMGA1a::ST) in *E. coli* Rosetta(DE3) *pLysSRARE* nach Induktion mit IPTG exprimiert wird. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium in einem 250 ml-Schikanekolben mit den Antibiotika Chloramphenicol und Ampizillin versetzt und mit frisch ausgestrichenen Kolonien einer Plattenkultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C und 220 Upm inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von 0,3 mit IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert. Vor IPTG-Zugabe wurden 20 ml Kultur abgenommen und bei 1600 x g und 4 °C 10 min pelletiert, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Die induzierte Überexpressionskultur wurde nach weiteren 3 Stunden Schütteln bei 37 °C ebenfalls bei 1600 x g und 4 °C 10 min pelletiert, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Die Zellpellets wurden in 1–2 ml PBS aufgenommen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und anschließend bei 16000 x g in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge bei 4 °C abzentrifugiert, um Zelltrümmer und unlösliche Proteine abzutrennen. Von diesen Bakterienlysaten wurden 35 µg auf ein 15-prozentiges SDS-Polyacrylamid-Gel geladen und das Gel nach der Elektrophorese mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt.

Reinigung von HMGA1a::ST

Die Reinigung von HMGA1a::ST wurde schließlich aus einem Liter *E. coli* Rosetta(DE3) *pLysSRARE* Expressionskultur analog zur Testexpression durchgeführt. Die pelletierten Bakterien wurden in 10 ml Millipore-Wasser aufgenommen und nach Zugabe von „complete Protease Inhibitor“-Tabletten (Roche) durch Zugabe von einem Volumen 2 % Triton X-100/10 % Perchlorsäure 30 min auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat für 30 min bei 10000 x g in einem JA25.50-Röhrchen abzentrifugiert. Das bei 5 % Perchlorsäure lösliche HMGA1a::ST wurde aus dem erhaltenen Überstand durch Zugabe von

Trichloressigsäure (Endkonzentration: 25 %) für mindestens eine Stunde auf Eis gefällt und anschließend bei 10000 x g für 30 min in einem JA25.50-Röhrchen pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml Wasser resuspendiert und nochmals durch Zugabe von Trichloressigsäure (Endkonzentration: 25 %) für 30 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation bei 10000 x g für 30 min in einem JA25.50-Röhrchen wurde das Pellet mit angesäuertem Aceton (10 mM HCl) und Aceton gewaschen und in 3 ml PBS aufgenommen. Das angereinigte HMGA1a::ST wurde abschließend einer Strep-Tactin-Affinitätschromatographie unterzogen. Hierzu wurde das Lysat auf eine 1 ml-Säulenvolumen Strep-Tactin-Säule geladen. Nach dreimaligem Waschen mit 5 Säulenvolumen PBS wurde HMGA1a::ST mit 6 mal 500 μ l Desthiobiotin-Elutionspuffer (10 mM Desthiobiotin in PBS) eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden auf ein 15 %iges SDS-PAA-Gel geladen und mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt. Die HMGA1a::ST enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, gegen DG-Puffer dialysiert und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Dichtegradienten (DG)-Puffer: 125 mM NaCl, 10 mM HEPES pH7,9, 1,5 mM MgCl₂, 5 % Glyzerin.

PBS: 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ pH 7,3, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung und Passagierung

Alle Zellen und Zelllinien wurden bei 37 °C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ kultiviert.

HeLa-S3-Zellen:

HeLa-S3-Zellen wurden in Suspensionskultur mit RPMI 1640 kultiviert, welchem 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penizillin, 1 mM Natriumpyruvat und 20 mM HEPES (Gibco) zugesetzt wurde. Das Wachstum der Zellen wurde stets durch Bestimmung der Zellzahl in einer Neugebauer-Zählkammer bestimmt. HeLa-S3-Zellen wurden bei einer Zelldichte von 2–8 x 10⁵ Zellen/ml gehalten.

HepG2-Zellen:

Die adhärenenten HepG2-Zellen wurden in DMEM, 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penizillin, 1 % nicht-essentielle Aminosäuren, 5 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat kultiviert. Beim Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen 1:6 verdünnt. Zum Ablösen der Zellen wurden nach Waschen mit PBS 2 ml Trypsin zugesetzt. Nach kurzer Inkubation wurden die Zellen abgespült und (ein Teil) in frisches Vollmedium überführt.

HEK293-Zellen:

Die semi-adhärenenten HEK293-Zellen wurden in DMEM, 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penizillin kultiviert. Beim Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen 1:5–1:10 verdünnt. Zum Ablösen wurde den Zellen nach Waschen mit PBS 2 ml Trypsin zugesetzt. Nach kurzer Inkubation wurden die Zellen abgespült und (ein Teil) in frisches Vollmedium überführt.

HCT116-Zellen:

Die adhärenenten HCT116-Zellen wurden in McCoy's 5A Medium, 10 % FCS, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penizillin kultiviert. Beim Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen 1:5–1:10 verdünnt. Zum Ablösen wurde den Zellen nach Waschen mit PBS 2 ml Trypsin zugesetzt. Nach kurzer Inkubation wurden die Zellen abgespült und (ein Teil) in frisches Vollmedium überführt.

3.2.2 Aufbewahrung von Zellen

Zellen können in einem Gemisch aus 10 % DMSO und 90% FCS in flüssigem Stickstoff eingefroren und unbegrenzt gelagert werden. Um die Zellen (10^7 Zellen pro 2 ml-Gefäß von NUNC-Cryotub) schonend abzukühlen, wurden sie in einer Einfrierbox (NUNC) mit Isopropanolmantel auf -80°C abgekühlt. Die längere Lagerung der Röhren erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut, in 30 ml vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Medium überführt.

3.2.3 Selektion und Doxyzyklin-Behandlung

Die Zelllinien HEK293/EBNA1, HEK293/2679, HEK293/EBNA1/3265.12, HEK293/3290 und HEK293/3281 wurden unter G418-Sulfat-Selektion (Endkonzentration: $200\ \mu\text{g/ml}$) und HEK293/3735-Zellen unter $80\ \mu\text{g/ml}$ Hygromycin-Selektion kultiviert. HEK293/3265.12-Zellen wurden mit $250\ \mu\text{g/ml}$ Puromycin selektioniert.

Wo angegeben, wurde Doxyzyklin zu den Zellen mit einer Endkonzentration von $2\ \mu\text{g/ml}$ zugesetzt und alle 48 Stunden das Zellmedium gewechselt.

3.2.4 Transfektion

Alle Transfektionen wurden in 6-Loch-Platten mit $2\ \mu\text{g}$ Plasmid-DNA nach Herstellerangaben durchgeführt. Die folgende Tabelle gibt wieder, welche Zelllinie mit welchem Reagenz transfiziert wurde. Zudem ist angegeben, in welchem Verhältnis das Transfektionsreagenz zur DNA (μl zu μg) eingesetzt wurde und worin die Transfektionsreagenz/DNA-Komplexe gemischt wurden.

| Zelllinie | Transfektionsreagenz | Reagenz/DNA | Ansatz in: |
|-----------|----------------------|-------------|------------|
| HepG2 | HD FuGene | 5:2 | Optimem |
| HEK293 | Polyfect | 6:1 | DMEM |
| HCT116 | Lipofectamine 2000 | 5:2 | Optimem |

3.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde die geerntete Zellsuspension zunächst zur Homogenität durchmischt, davon 10 μl auf die Neubauer-Zählkammer zwischen die Kammer und das Deckglas pipettiert und durch zweimaliges horizontales Verschieben des Deckglases für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Zählkammer gesorgt. Die Auszählung erfolgte dann unter dem Mikroskop. Im Mittelsteg dieser Kammer sind Zählnetze eingraviert. Diese bestehen aus vier Großquadraten, die jeweils in 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Der Abstand zwischen dem gravierten Glassteg und dem aufgelegten eingeschliffenen Deckglas beträgt 0,1 mm. Die Fläche eines Großquadrates beträgt 1 mm^2 , somit ist das Volumen eines Großquadrates 0,1 μl . Es wurden stets vier Großquadrate ausgezählt, wobei darauf zu achten war, dass Zellen, die auf den Begrenzungslinien zwischen den Quadraten lagen, nicht doppelt gezählt wurden. Aus der Anzahl der gezählten Zellen konnte die Zellzahl im Gesamtvolumen mit folgender Gleichung ermittelt werden.

Gesamtzellzahl = durchschnittliche Zellzahl (aus 4 Großquadraten) $\times 10^4 \times$
Verdünnungsfaktor \times Ausgangsvolumen

3.2.6 Synchronisation von HEK293-Zellen

Synchronisation durch Mimosin

Am Tag vor der Synchronisation wurden 5×10^6 -Zellen ausplattiert. Die semikonfluenten Platten wurden mit PBS gewaschen und für 20–24 Stunden mit 0,5 mM Mimosin am G1/S-Phase-Übergang arretiert.

Synchronisation durch Nocodazol

Zur Isolierung mitotischer HEK293-Zellen wurde das Medium semikonfluenten Platten mit 40 ng/ml Nocodazol versetzt und für 12–14 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die mitotischen Zellen durch leichtes Klopfen der Zellkulturschale abgelöst. Dadurch befanden sich die mitotischen Zellen im Überstand und konnten durch das Absaugen des Mediums isoliert werden.

3.2.7 Insektenzellkultur

Sf9- und High Five-Insektenzellen wurden als Monolayer in 250 ml Zellkulturflaschen in Grace's Insektenmedium mit 10% FCS bei 27°C kultiviert. Beim Erreichen von 80 % Konfluenz wurden die Zellen mittels sterilen Zellschabern von der Oberfläche gelöst und verdünnt (SF9: 1:3, High Five: 1:5 - 1:10). Sf9-Zellen wurden für Plaque-„Assays“ und die Vermehrung von rekombinanten Baculoviren verwendet. Dies geschah exakt nach den Angaben im Invitrogen Handbuch „Guide To Baculovirus Expression Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques“.

High Five-Zellen wurden zur Expression von rekombinanten ORC-Proteinen eingesetzt (Abschnitt 3.4.5).

3.3 DNA-Arbeitstechniken

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-Mutagenese

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt (Mullis *et al.*, 1986). Alle PCR-Reaktionen wurden mit der *Pfu*-Turbo DNA-Polymerase nach Herstellerangaben angesetzt.

Ein Standard-Temperaturprofil sah wie folgt aus:

1. 94 °C für 5 min
 2. 94 °C für 45 sek
 3. 50–60 °C für 45 sek
 4. 72 °C für 1–3 min
 5. 72 °C für 7 min
 6. 4 °C
- } x 30 Zyklen

Die Annealing-Temperatur (3.) wurde gemäß der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide gewählt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit Nucleospin Extract 2 in 1 (Macherey-Nagel) aus einem 0,8%igen Agarosegel mittels präparativer Gelelektrophorese gereinigt.

PCR-Mutagenesen wurden mittels des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.2 Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktion von DNA: Restriktion mit Endonukleasen wurde mit den vom Hersteller empfohlenen 10 x Puffer-Konzentrationen durchgeführt. Die Enzymmenge und Inkubationsdauer richteten sich nach der eingesetzten DNA-Menge und dem Reaktionsvolumen. Inaktivierung der Enzyme erfolgte ebenfalls nach den Angaben des Herstellers durch Inkubation bei 65 °C bzw. bei 80 °C für 20 min.

Ligation von DNA: Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Es wurden

100 ng Vektor-DNA und ein 1–5 facher molarer Überschuss an Insert-DNA eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht bei 16 °C oder bei RT für 2–3 Stunden.

Dephosphorylierung von 5'-DNA Enden: DNA-Fragmente wurden zur Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe mit Shrimps alkalischer Phosphatase behandelt. Ein Standard-Ansatz enthielt bis zu 0,5 pmol linearisierte DNA, welche unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers mit 2 Units Shrimps alkalischer Phosphatase für 45 min bei 37 °C behandelt wurde. Nach Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65 °C konnte die dephosphorylierte DNA in Ligationsreaktionen eingesetzt werden.

3.3.3 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zu präparierende DNA wurde über ein 0,8%iges TAE-Agarosegel aufgetrennt, welches Ethidiumbromid (1 µg/ml) enthielt. Unter UV-Licht (254 nm) wurden die DNA-Fragmente analysiert, mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit dem Extraktionskit NucleoSpin Extract II (Macherey und Nagel) nach Herstellervorschrift gereinigt.

3.3.4 HIRT-Extraktion

Zur Präparation von extrachromosomaler DNA aus HEK293-Zellen wurde eine konfluente 15 cm-Zellkulturschale nach Abschütten des Mediums mit TEN-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von je 1,5 ml TEN- und 2x HIRT-Puffer wurden die Zellen lysiert (Hirt, 1966). Nach Überführung des Extrakts in 12 ml-Röhrchen wurde das Lysat eine Minute rotiert. Zur Fällung der Proteine und der genomischen DNA wurden 750 µl einer 5 M NaCl-Lösung zugegeben. Nach dem Durchmischen wurde das Röhrchen über Nacht bei 4 °C oder für mindestens 5 Stunden auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (4° C, 20000 x g, 30 min) wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Isopropanol gefällt. Die DNA wurde mit 80%igem Ethanol gewaschen und anschließend in 50 µl TE aufgenommen.

TEN-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA

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

TE: 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA

(Hirt, 1966)

3.3.5 Plasmid-Wiedergewinnungsversuche

Die nach der Hirt-Methode aus HEK293-Zellen isolierte DNA wurde auf das Vorhandensein von extrachromosomaler DNA hin überprüft. Dazu wurden 500 ng Hirt-DNA mit dem *dam*-Methylierungs-spezifischen Restriktionsenzym DpnI gespalten, um nicht replizierte DNA zu spalten. Die transfizierte DNA stammt aus dem *E. coli*-Stamm DH5 α 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 elektrokompetente *E. coli* DH10B 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.

3.3.6 Southern Blot

Der Southern Blot erfolgte nach Standard-Protokollen (Church und Gilbert, 1984, Southern, 1975). Dazu wurden ca. 2 μ g Hirt-DNA mit Restriktionsenzymen gespalten und in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Überprüfung der vollständigen Restriktionsspaltung wurde die DNA nach der Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid (40 ng/ml in 1 x TAE-Puffer) gefärbt. 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 x 10⁷ 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 dreimal für je 15 min bei 65 °C in Waschpuffer gewaschen und anschließend in Folie gewickelt. Die Autoradiographie wurde bei –80 °C durchgeführt. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Intensität der Signale.

1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCl (pH8,0); 5 mM NaAc; 1mM EDTA

2 x SSC: 300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat

Church-Puffer: 400 mM Na₂HPO₄; 100 mM NaH₂PO₄; 7 % SDS; 1 mM EDTA (pH 7,2); 1 % BSA

Waschpuffer: 0,2 x SSC; 1 % SDS

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

3.3.8 „nascent strand“-Analyse

Die naszierende DNA („nascent strand“) wurde nach einem 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 8×10^6 Zellen mit PBS gewaschen und in PBS mit 10 % Glycerin aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf Trockeneis eingefroren und bei –80 °C gelagert oder direkt in die Taschen eines Agarosegels geladen. Dort wurden die Zellen 15 min durch den Laufpuffer lysiert. Die Größenauftrennung der denaturierten DNA erfolgte über Nacht bei 45 V durch ein 1,2%iges niedrig schmelzendes Agarosegel. Parallel dazu wurde ein Phi X 174/HaeIII-Marker auf das Gel

aufgetragen. Am nächsten Tag wurde der Größenmarker herausgeschnitten, mit Ethidiumbromid gefärbt und nach UV-Licht-Anregung die Laufweite der Markerbanden ausgemessen. Anhand dieser Messung wurde ein 700–1100 kb umfassender Bereich, der die naszierende DNA enthielt, mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mittels des Nucleospin Extract 2 in 1 (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben gereinigt. Aus den 40 μ l Eluat wurden je 1–2 μ l in die quantitative PCR eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet. Die absoluten Kopienzahlen der naszierenden DNA, die am *tetO*-, GFP- bzw. am polyA-Lokus nachzuweisen war, wurde in Relation gesetzt zur Menge der DNA, die am polyA-Locus festgestellt wurde. Die aus drei unabhängigen Experimenten stammenden Werte wurden gemittelt und mit Standardabweichungen in einem Säulendiagramm dargestellt (Abbildung 4.36).

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

Laufpuffer: 50 mM NaOH, 1mM EDTA

3.3.9 Quantitative PCR („Real Time“-PCR)

Die „real time“-PCR diente zur Quantifizierung der in der Chromatin-Immunopräzipitation angereicherten DNA und der „nascent strand“-DNA. Die dabei verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet. Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit Hilfe des Lightcyclers (Roche). Der kommerziell erhältliche „Light Cycler PCR Reaction Mix“ enthält den Farbstoff SYBR-Green, der sich während der „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).

Zum Errechnen einer Standardkurve wurden Verdünnungen der zu detektierenden Plasmid-DNA eingesetzt. Für die Quantifizierung wurden Standardeinstellungen nach den Empfehlungen von Roche verwendet. Die Light-Cycler-Software (Version 3.01) ermittelt die Schmelzkurven und berechnet anhand der eingesetzten DNA-Standards eine Standardkurve. Anhand dieser Standardkurve wird die Kopienzahl der zu quantifizierenden DNA-Proben bestimmt.

Ein Standard-Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

| | |
|----------------------------------|--|
| DNA | 1–2 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM, Roche) | 1,6 μ l |
| Oligonukleotid-Mix | 0,5 μ l (1:1 Gemisch; je 10 μ M) |
| Polymerase-Mix (Roche) | 1 μ l (enthält dNTP's, „hot-start“-DNA-Polymerase, SYBR-Green I) |
| H ₂ O | <i>ad</i> 10 μ l |

Das Temperatur-Profil der PCR-Reaktion bestand aus den Segmenten A–G; Segment B umfasste 5 Zyklen, Segment C 4 Zyklen, Segment D 3 Zyklen und Segment E 30 Zyklen.

| Segment | Temperatur | Zeit (sek) | Slope (°C/sek) | Detektion |
|---------|------------|------------|----------------|----------------|
| A | 95 °C | 600 | 20 | - |
| B | 95 °C | 5 | 20 | - |
| | 65 °C | 10 | 20 | - |
| | 72 °C | 12 | 20 | - |
| C | 95 °C | 5 | 20 | - |
| | 64 °C | 10 | 20 | - |
| | 72 °C | 12 | 20 | - |
| D | 95 °C | 5 | 20 | - |
| | 63 °C | 10 | 20 | - |
| | 72 °C | 12 | 20 | - |
| E | 95 °C | 5 | 20 | - |
| | 62 °C | 10 | 20 | - |
| | 72 °C | 12 | 20 | - |
| | 75 °C | 3 | 20 | single |
| F | 97 °C | 5 | 20 | - |
| | 76 °C | 10 | 20 | - |
| | 97 °C | 0 | 0,15 | kontinuierlich |
| G | 20 °C | 3 | 20 | - |

Das angegebene Temperaturprofil wurde für die „real-time“-PCRs für „nascent strand“-Analysen verwendet. In Anhang finden sich neben den Oligonukleotiden ebenfalls die für die „real-time“-PCR verwendeten Temperaturprofile der übrigen PCR-Reaktionen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Präparation von RIPA-Lysaten

Zur Herstellung von RIPA-Zelllysaten wurden 1×10^6 Zellen geerntet, zweimal mit eisgekühltem PBS gewaschen, in einem Eppendorfgefäß mit 200 μ l RIPA-Puffer für 30 min auf Eis lysiert, 10 min in einer Kühlzentrifuge bei 16000 x g abzentrifugiert und der Überstand (RIPA-Lysat) bei -20 °C weggefroren.

RIPA-Puffer: 50 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 % Deoxycholat,
 1 % NP40, 50 mM Tris-HCl pH 8.0

3.4.2 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Für Chromatin-Immunopräzipitations-Experimente wurden zunächst Zellkerne präpariert. Hierzu wurden pro ChIP-Ansatz 1×10^7 Zellen geerntet, in PBS gewaschen und in 250 μ l Hypotonem Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration: 0,04 %) wurden die Zellen für 10 min auf Eis lysiert und anschließend bei 1300 x g für 4 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet, welches die Kerne enthielt, wurde mit Hypotonem Puffer (+200 mM NaCl) gewaschen und nach nochmaligem Pelletieren in 1 ml Hypotonem Puffer aufgenommen. Durch Zugabe von vorgewärmtem Hypotonem Puffer, welcher mit Formaldehyd versetzt wurde (Endkonzentration: 1,1 %), wurden die Kerne für 10 min bei 37 °C fixiert. Die fixierten Kerne wurden zweimal mit PBS/0,5 % NP40 gewaschen und in 2,7 ml LSB-Puffer aufgenommen. Durch Zugabe von 300 μ l 20 % Sarkosyl wurden die Kerne lysiert. Das erhaltene Chromatin wurde auf ein 40 ml-Saccharose-Kissen (LSB + 100 mM Saccharose) geladen und bei 4000 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml TE resuspendiert und sonifiziert (Branson Sonifier 250-D, 35 % Amplitude, 2 min, 1 sek Intervalle). Das mechanisch gescherte Chromatin wurde für 10 min bei 37 °C mit MNase verdaut (2 mM CaCl_2 Endkonzentration, 8 Units MNase von Roche) und die Reaktion durch Zugabe von EGTA (5 mM Endkonzentration) gestoppt. Der Ansatz wurde 10 min bei 16.000 x g in 1,5 ml Eppendorfgefäßen pelletiert und vom Überstand die DNA-Konzentration bestimmt. Je 500 μ g Nukleoprotein wurden mit 1/10 Volumen 11 x NET Puffer versetzt und einer

Immunopräzipitation unterzogen. Hierzu wurden jeweils 10 μg polyklonale Kaninchen α -Orc2-, α -Orc3- und α -Mcm7-Antikörper und ein affinitätsgereinigter Kaninchen α -IgG-Ratte-Antikörper (Isotyp-Kontrolle) eingesetzt. Zudem wurden 50 μl eines α -EBNA1-Antikörpers (1H4) eingesetzt sowie ein Isotypen-Ratten-Antikörper (IgG2a). Die Immunopräzipitation wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Zugabe von Protein A Sepharose (für Kaninchen-Antikörper) beziehungsweise Protein G-Sepharose (für Ratten-Antikörper) wurde die IP für weitere 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während der IP wurden die Ansätze konstant über Kopf rotiert (10 Upm). Die Sepharose-Beads wurden mit 10 ml RIPA-Puffer, 10 ml LiCl-Puffer und 10 ml TE in einer Poly-Prep-Säule (Bio-Rad) gewaschen. Hiernach wurden die Beads mit 1 ml TE in ein Eppendorfgesäß überführt und das Immunopräzipitat mit 200 μl TE / 1% SDS für 10 min bei Raumtemperatur eluiert. Nach anschließendem Proteinase K-Verdau (5 h, 55 °C) wurde die copräzipitierte DNA Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die DNA wurde in 50 μl TE aufgenommen und 1 μl davon in quantitative PCR-Reaktionen eingesetzt.

Hypotoner Puffer: 10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,34 M Saccharose, 10 % Glycerin, 1 mM DTT, complete Protease Inhibitor Mix

LiCl-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 250 mM LiCl, 0,5 % NP40, 0,5 % DOC, 1 mM EDTA pH 8,0

LSB-Puffer: 10 mM HEPES pH7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2

11 x NET-Puffer: 1,65 M NaCl, 5,5 mM EDTA, 550 mM Tris-HCl pH 7,4, 5,5 % NP40

3.4.3 Herstellung von Kernextrakten

Zur Herstellung von Kernextrakten aus HEK293- oder HeLa-S3-Zellen wurden 1×10^8 Zellen geerntet, in 50 ml eisgekühltem PBS gewaschen und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen pelletiert (8 min, 400 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in 14 ml Hypotonem Puffer äquilibriert, die Zellen in ein 14 ml Falcon-Röhrchen überführt und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Hypotonem Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden entweder durch Zugabe von Hypotonem Puffer, welchem Triton X-100 (Endkonzentration 0,12 %) zugesetzt wurde, oder durch Homogenisieren in einem 7 ml Wheaton-Dounce-Homogenisator (T-Fit) durch 35 Stöße lysiert. Die so erhaltenen

Kerne wurden durch Zentrifugation pelletiert (2000 x g, 4 °C, 10 min). Die Kerne wurde in 1 ml Hypotonem Puffer aufgenommen und die Chromatinproteine durch Zugabe von einem Volumen Kernextraktionspuffer für eine Stunde auf Eis extrahiert. Der so erhaltene Kernextrakt wurde für eine Stunde bei 40000 Upm in einem SW60Ti-Rotor bei 4 °C zentrifugiert um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde für 3 Stunden gegen 800 ml BC-0 Puffer bei 4 °C dialysiert (Spectra/Por6 Dialysemembran, MWCO 3,5 kDa, 11,5 cm Durchmesser) und anschließend einer Immunopräzipitation unterzogen oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

BC-0 Puffer: 10 mM HEPES pH 7,9, 125 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂ 10 % Glycerin

Kernextraktionspuffer: 10 mM HEPES pH 7,9, 900 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, complete Protease Inhibitor Mix

3.4.4 Co-Immunopräzipitation (Co-IP) und Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Für Co-IP-Experimente wurden pro Ansatz Kernextrakte aus 5×10^7 Zellen eingesetzt. Dieser Kernextrakt wurde zusammen mit 5 µg IP-Antikörper in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei 4 °C und gleichzeitiger Über-Kopf-Rotation (10 Upm) für 1,5 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 50-prozentiger Protein A Sepharose (für Kaninchen-Antikörper) bzw. 50-prozentiger Protein G-Sepharose (für Ratten-Antikörper) wurde die IP für weitere 1,5 Stunden bei 4 °C und gleichzeitiger Über-Kopf-Rotation (10 Upm) inkubiert. Hiernach wurden die Sepharose-Beads auf Poly-Prep-Säulen (Bio-Rad) mit 3 x 3 ml BC-0 Puffer gewaschen und mit 2 x 500 µl BC-0 Puffer in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Beads wurden durch Zentrifugation (400 x g, 4 °C, 1 min) pelletiert, mit 25 µl 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt (100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 200 mM DTT, 10 % Glycerin, 0,2 % Bromphenolblau) und bis zur Western-Blot-Analyse bei -20°C gelagert.

Für Strep-Tactin-Affinitätschromatographien wurden Kernextrakte aus 5×10^7 Zellen auf eine 500 µl-Strep-Tactin-Säule geladen und zweimal mit 10 ml BC-0 Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 6 x 250 µl Desthiobiotin-Elutionspuffer (10 mM Desthiobiotin in BC-0 Puffer) wurden die aufgefangenen Fraktionen vereinigt, Methanol/Chloroform präzipitiert (Wessel und Flugge, 1984), das Pellet in 40 µl

Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und bis zur Western-Blot-Analyse bei -20°C gelagert.

3.4.5 Reinigung von ORC

Proteinexpression in Insektenzellen

High Five-Zellen wurden bis zu einer Dichte von 90 % (etwa 4×10^7 Zellen auf einer 15 cm-Zellkulturschale) kultiviert. Das Medium wurde entfernt und durch 20 ml frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden je 300 μl der Virusüberstände der rekombinanten Baculoviren, welche HsORC exprimieren ((His)₆-Orc1, Orc2, Orc3, (His)₆-Orc4, Orc5, (His)₆-Orc6; R. Knippers, Universität Konstanz), hinzugefügt (multiplicity of infection: 6) und die Zellen für 48 Stunden bei 27°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Medium mittels Zellschabern von den Platten abgelöst und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Um Serumreste zu entfernen, wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml Lyse-Puffer ISLB aufgenommen und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei $1200 \times g$ wurde das Pellet, welches die Zellkerne enthielt, in OPB2-Puffer + 500 mM NaCl aufgenommen und die Chromatinproteine für eine Stunde bei 4°C eluiert. Der Extraktionsansatz wurde für 1 Stunde bei $140000 \times g$ und 4°C in einem SW60Ti Rotor zentrifugiert, der Überstand mit Imidazol versetzt (Endkonzentration: 10 mM) und auf eine 250 μl -Ni²⁺-NTA-Säule geladen (Qiagen). Nach zweimaligem Waschen mit zehn Säulenvolumen OPB2 + 500 mM NaCl wurden die gebundenen Proteine mit drei Säulenvolumen OPB2 + 500 mM Imidazol eluiert. Nach der Nickel-NTA-Affinitätschromatographie lagen die HsORC-Proteine angereinigt vor und wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Lyse-Puffer ISLB: 20 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,4 M Sorbitol, 150 mM Kaliumacetat, 5 mM MgCl₂, 5 mM MgSO₄, 1 % Triton X-100

OPB2-Puffer: 50 mM HEPES pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol, 10 % Glycerin, 0,01 % Tween 20

3.4.6 Glyzerin-Dichtegradienten-Analyse

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Sedimentationsverhalten erfolgte durch Glyzerin-Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Stufengradienten wurden manuell mit einer abgeschnittenen 200 μ l Spitze in dickwandige Polyallomer-Röhren (3 ml) pipettiert. Hierzu wurden OPB2-Lösungen mit 10 % und 30 % Glyzerin hergestellt. Die weiteren Lösungen unterschiedlicher Glyzerinkonzentration wurden durch Mischen der 10%igen und 30%igen OPB2-Lösungen erhalten. Jeweils 200 μ l OPB2 mit Glyzerinkonzentrationen von 30 % / 28,3 % / 26,5 % / 24,8 % / 23 % / 21,3 % / 19,6 % / 17,8 % / 16,1 % / 14,3 % wurden vorsichtig aufgeschichtet. Auf diesen Glyzerin-Dichtegradienten wurden 200 μ l eines Gemisches aus HMGA1a::ST und rekombinanten HsORC-Proteinen (nach Nickel-NTA-Affinitätschromatographie) geladen. Nach 16 Stunden Zentrifugation bei 40000 Upm und 4 °C in einem SW60Ti-Rotor wurden 11 Fraktionen à 200 μ l von oben abgenommen und zunächst bei –20 °C weggefroren. Je 20 μ l jeder Fraktion wurden über ein 13,3%iges SDS-PAA-Gel aufgetrennt und anschließend einer Silberfärbung oder Western-Blot-Analysen unterzogen.

3.5 Mikroskopie

3.5.1 Herstellung von Lebend-Beobachtungskammern

Mit Fixogum-Montagekleber (Marabu) wurde auf Objektträgern ein an einer Seite offener Ring mit dem Durchmesser eines Deckgläschens aufgetragen. Hierzu wurden abgeschnittene 200 μ l-Spitzen auf die Montageklebertube aufgesteckt. Nach einer Trockenzeit von 5–10 min konnten die Kammern benutzt werden. Dazu wurden 5 μ l Zellkulturmedium in die Mitte des gehärteten Fixogum-Ringes pipettiert und das zu beobachtende bewachsene Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf den Ring gesetzt. Durch weiteres Auftragen von Fixogum wurden die Zellen versiegelt. Die so präparierten Zellen konnten bis zu 30 min lebend mikroskopiert werden.

3.5.2 Immunolokalisation an HepG2-Zellen

Lösungen:

- PBS
- 2 % Formaldehyd in PBS
- 0,5 % Triton X-100 in PBS
- Primärantikörper in PBS (Verdünnung siehe Material 2.3)
- Sekundärantikörper in PBS (Verdünnung siehe Material 2.3)
- Hoechst 33342 (Stammlösung: 10 mg/ml; Arbeitskonzentration: 20 μ g/ml)
- Mowiol

Durchführung: Immunolokalisation von BiFC-Konstrukten

Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden 5 min in PBS gewaschen und dann für 15 min bei Raumtemperatur in 2 % Formaldehyd in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut 5 min in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen folgte eine Inkubation mit einer vorgekühlten 0,5%igen Triton X-100/PBS-Lösung für 3–5 min auf Eis. Nach weiterem zweimaligem Waschen in PBS folgten die Antikörperinkubationen, welche bei Raumtemperatur durchgeführt wurden. Hierzu wurden die Deckgläschen in einer Feuchtkammer auf einen Parafilm gelegt und mit 30 μ l Primär-Antikörperlösung (α -HA) überschichtet. Nach einer Inkubation von 45 min wurde zweimal 5 min mit PBS gewaschen und die Deckgläschen mit 30 μ l Sekundär-Antikörperlösung (α -IgG-Ratte-Cy5) überschichtet. Nach 30-minütiger Inkubation wurde zweimal 5 min mit PBS gewaschen, die Deckgläschen mit 30 μ l Primär-Antikörperlösung (α -FLAG) überschichtet und für 45 min inkubiert. Nach zweimal 5 min Waschen mit PBS wurde die zweite Sekundär-Antikörperlösung (α -IgG-Maus-Texas Red) auf die Deckgläschen gegeben. Nach 20 min wurden zu der Sekundär-Antikörperlösung 10 μ l Hoechst 33342 (20 μ g/ml) zugegeben und für 10 min inkubiert. Nach abschließendem Waschen in PBS wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten zeigend auf einem Obektträger in Mowiol eingebettet und bei 4 °C gelagert.

Durchführung: Immunolokalisation von Orc2

Auf Deckgläschen kultivierte Zellen wurden 5 min mit vorgekühltem CSK-Puffer bei 4 °C gewaschen und dann 5 min mit 0,5 % Triton X-100/CSK-Puffer auf Eis prä-extrahiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei Raumtemperatur in 2 % Formaldehyd/PBS fixiert und 3 x 3 min PBS gewaschen. Hiernach wurden die Zellen für 5 min in -20 °C kaltem 100%igen Methanol inkubiert und 2 x 5 min in PBS/1 % „normal goat serum“ (NGS) blockiert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem primären α -Orc2-Antikörper bei Raumtemperatur (α -Orc2 pAb205, 1:400). Anschließend wurde 2 x 5 min mit PBS/1 % NGS gewaschen und 1 x 5 min mit PBS. Hiernach folgte eine 45-minütige Inkubation mit dem Texas Red-gekoppelten α -IgG-Kaninchen-Antikörper. Nach Zugabe von 10 μ l Hoechst 33342 (20 μ g/ml) und weiterer Inkubation von 15 min, wurde 2 x 5 min PBS gewaschen und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten zeigend auf einem Objektträger in Mowiol eingebettet und bei 4 °C gelagert.

CSK-Puffer: 10 mM PIPES pH 7; 10 mM NaCl; 300 mM Saccharose; 3 mM MgCl₂; 2 mM EDTA

3.5.3 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

16 Stunden vor der Transfektion wurden $2,5 \times 10^5$ HepG2-Zellen in 35 mm-Zellkulturschalen auf 4 Deckgläsern (12 mm) ausgesät. Die zu transfizierenden Plasmide (1 μ g pro Plasmid) wurden in 100 μ l Optimem in Eppendorf-Reaktionsgefäßen sorgfältig gemischt. Ohne an den Rand des Gefäßes zu stoßen wurden 5 μ l HD FuGene Transfektionsreagenz zugegeben und durch zweimaliges Pipettieren mit der Optimem/DNA-Lösung durchmischt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz mit 400 μ l vorgewärmtem HepG2-Medium zu den Zellen gegeben und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 22–26 Stunden wurden zwei der Deckgläser für Lebendbeobachtungen präpariert und die beiden anderen gegebenenfalls für Immunlokalisationen herangezogen.

3.5.4 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Um ein höher auflösendes Bild zu Proteinlokalisationen zu bekommen, wurden sowohl lebende Zellen wie auch Immunofluoreszenzpräparate mit einem Leica TCS SP2 konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Standardmäßig wurden hierzu folgende Software-Einstellungen verwendet:

- HCX PI APO lbd.Bl. 63x 1.4 Ölimmersionsobjektiv
- Scangeschwindigkeit: 800 mW
- Pinhole: 1 AE
- Strahlenexpander: 6
- Anzahl der Scans pro Bild: 6
- Argon-Laser-Level: Drehknopf stets auf ~10 Uhr eingestellt

Verwendete Laserlinien und Einstellungen der Photomultiplier:

| Detektion: | Laser | Laser Power | PMT-Detektionsbereich (nm) |
|----------------------------------|----------------|-------------|----------------------------|
| Hoechst 33342 (PMT1) | 405 nm (Diode) | 25 % | 410–550 nm |
| EGFP (PMT1) | 488 nm (Argon) | 25 % | 500–580 nm |
| mRFP / TexasRed (PMT2) | 561 nm (Diode) | 50 % | 570–680 nm |
| Cy5 (PMT2) | 633 nm (HeNe) | 50 % | 650–750 nm |
| BiFC (YFP) (PMT1) | 514 nm (Argon) | 50 % | 529–560 nm |
| Interferenz-Kontrast (PMT Trans) | +488 nm | 20 % | |

Die Aufnahmen erfolgten im „sequential scan“-Modus, bei welchem jeweils spezifisch ein Fluorochrom angeregt wurde, um einen Nebensignaleffekt (crosstalk) der einzelnen Detektionskanäle zu vermeiden.

3.6 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Die nachfolgend aufgelisteten Methoden wurden exakt wie in der zitierten Literatur durchgeführt und werden daher nicht näher beschrieben.

- Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976).
- Coomassie-Färbung von SDS-PAA-Gelen (Bramhall *et al.*, 1969).
- DNA-Reinigung über Phenol-, Chloroform / Isoamylalkohol-Extraktion (Sambrook und Russell, 2001).
- Elektrophorese von DNA in Agarosegelen (Sambrook und Russell, 2001).
- Elektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970).
- Elektroporation von Plasmiden in kompetente *E.coli*-Bakterien im „Gene Pulser“ (Biorad) nach Herstellerangaben.
- Ethanol- bzw. Isopropanolfällung von DNA (Sambrook und Russell, 2001).
- Fluorimetrische DNA-Konzentrationsbestimmung (Protokoll der Firma Höfer).
- Herstellung kompetenter *E. coli* und Transformation von *E. coli*. (nach Inoue, (Sambrook und Russell, 2001)).
- Plasmidpräparation durch alkalische Lyse (Birnboim, 1983).
- Proteinfällung durch Methanol/Chloroform-Präzipitation (Wessel und Flugge, 1984).
- Semi-Dry Immunoblot (Towbin *et al.*, 1979).
- Silberfärbung von SDS-PAA-Gelen (Blum *et al.*, 1987).
- Western-Blot-Analyse mit monospezifischen Antikörpern (Harlow und Lane, 1988) mittels Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (ECL Western Blotting protocols, Amersham Life Science, 1994).

4. Ergebnisse

Der „origin recognition complex“ (ORC) markiert durch das Binden an DNA potentielle Replikationsursprünge. Welche Kriterien das Binden von ORC bestimmen, ist in Metazoen weitgehend unverstanden. Denkbare Einflüsse auf die ORC-Bindung wären Faktoren wie lokale Chromatinstruktur und spezielle DNA-Sequenzen oder DNA-Topologien.

Diese Doktorarbeit schlägt hierfür ein neues Modell vor, wonach Kernproteine wie das „High Mobility Group AT-Hook Family Protein 1a“ (HMGA1a) als Kofaktor für den „origin recognition complex“ wirken können (Abbildung 4.1). Durch ihre Bindungspräferenz lenken sie ORC gezielt an bestimmte Chromatinbereiche um Replikationsstartstellen festzulegen.

In diesem Kapitel wird gezeigt, dass HMGA1a die Replikation und Aufrechterhaltung von Plasmiden als extrachromosomale Replikons unterstützen kann. Weiterhin wird HMGA1a als ORC-interagierendes Protein mittels biochemischer und Fluoreszenzmikroskopischer Methoden charakterisiert. Zur Validierung der Kofaktor-Hypothese wird abschließend an Vektorsystemen aufgezeigt, dass HMGA1a ORC an DNA rekrutieren kann und somit zur Ausbildung HMGA1a-abhängiger Replikationsursprünge beiträgt.

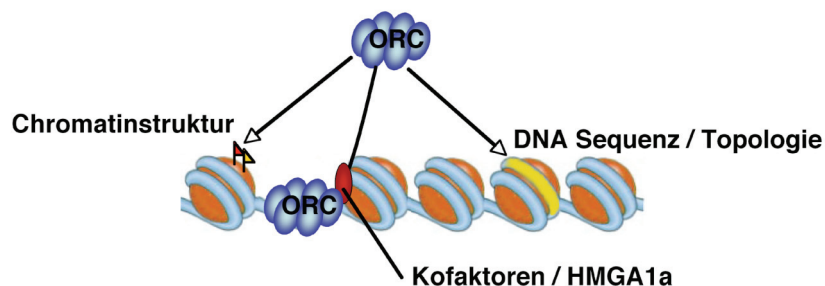


Abb. 4.1: Definition humaner Replikationsursprünge. DNA (hellblau) gewunden um Nucleosomen (orange). Spezielle DNA-Sequenz/Topologie (gelb). Für Erläuterungen siehe Text.

4.1 HMGA1a unterstützt die extrachromosomale Aufrechterhaltung und Replikation von Plasmiden

Das Epstein-Barr-Virus-Nukleäre-Antigen-1 (EBNA1) vermittelt sowohl die Aufrechterhaltung als auch die Replikation von *oriP*-tragenden extrachromosomalen Genomen in humanen Zellen. Als Dimer bindet es über seine carboxyterminale Domäne (EBNA1-DBD) an EBNA1-Bindestellen innerhalb von *oriP*. Die aminoterminalen Verknüpfungsregionen von EBNA1 enthalten „AT-hook“-Motive und ermöglichen die Anheftung an Metaphase-Chromosomen (Sears *et al.*, 2004). Dies garantiert, dass sich *oriP*-DNA auch nach der Mitose im Kern befindet. Zudem rekrutiert EBNA1 ORC an *oriP* und führt dort zur Ausbildung eines Zellzyklus regulierten Prä-Replikations-Komplexes (preRC) (Chaudhuri *et al.*, 2001, Ritzi *et al.*, 2003, Schepers *et al.*, 2001).

Der Aminoterminus von EBNA1 kann durch das Prototyp-„AT-hook“-Protein HMGA1a substituiert werden, ohne die extrachromosomale Aufrechterhaltung und Replikation von *oriP*-tragenden Plasmiden zu beeinträchtigen (Hung *et al.*, 2001). Vermutlich vermittelt HMGA1a, analog zu EBNA1, mitotische Stabilität durch das Binden von Metaphase-Chromosomen über seine „AT-hook“-Motive.

Im folgenden Abschnitt wird gezielt die mögliche replikative Funktion von HMGA1a anhand von verschiedenen extrachromosomalen Vektorsystemen analysiert. In Kapitel 4.1.1 werden Vorarbeiten von Sibille Humme und Mark-Peter Spindler dargestellt, welche die Ergebnisse von Hung *et al.* bestätigen.

In Abbildung 4.2 (folgende Seite) sind die Domänenarchitekturen der *trans*-agierenden Proteine dargestellt, die in Kapitel 4.1 Verwendung finden.

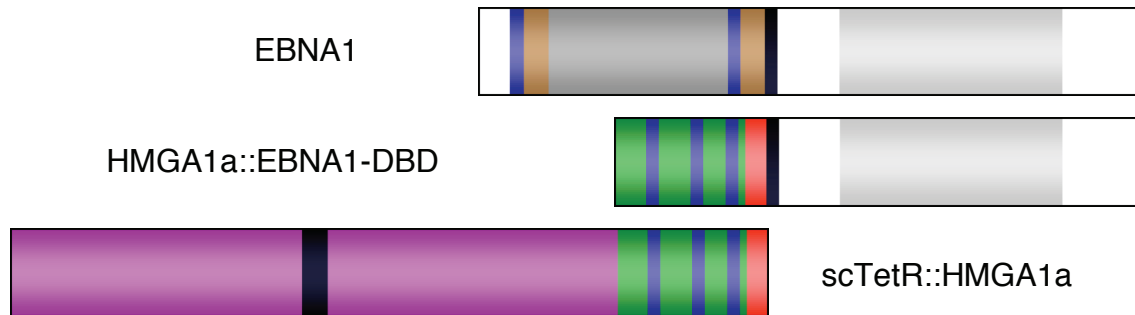


Abb. 4.2: Domänenstruktur der Fusionsproteine aus Kapitel 4.1. Die „AT-hook“-Motive von EBNA1 und HMGA1a sind in Blau, die EBNA1-Verknüpfungsregionen in Braun und die EBNA1-Kernlokalisationssequenz in Schwarz dargestellt. Die Glycin-Alanin-Wiederholungen sind dunkelgrau und die DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von EBNA1 ist hellgrau eingefärbt. Die saure Domäne von HMGA1a ist in Rot abgebildet. Die Tetrazyklin-Repressor (TetR) Monomere, verbunden durch einen Polypeptidlinker (schwarz), sind in Violett abgebildet.

4.1.1 HMGA1a::EBNA1-DBD unterstützt die Replikation und Aufrechterhaltung *oriP*-basierender Plasmide

Hung *et al.* zeigten, dass eine Fusion aus den ersten 90 Aminosäuren von HMGA1a und der DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von EBNA1 (EBNA1-DBD) die extrachromosomale Aufrechterhaltung und Replikation von *oriP*-Plasmiden unterstützt (Hung *et al.*, 2001). Durch Plasmid-Wiedergewinnungsversuche konnten diese Ergebnisse mit einer Fusion aus Volllängen-HMGA1a und der EBNA1-DBD (HMGA1a::EBNA1-DBD) bestätigt werden (Vorarbeiten von S. Humme).

Hierzu wurden HEK293-Zellen, die entweder EBNA1 oder das HMGA1a::EBNA1-DBD-Fusionsprotein exprimieren, mit dem *oriP*-tragenden Plasmid p2832 transfiziert (Humme, 2004). Nach zwei bis drei Wochen Selektion auf Puromycin-Resistenz wurde niedermolekulare DNA mittels HIRT-Extraktion isoliert und mit *DpnI* behandelt. *DpnI* schneidet ausschließlich die vollständig Dam-methylierte transfizierte Ausgangs-DNA. Mit 500 ng *DpnI* behandelter HIRT-DNA wurde anschließend *E. coli* transformiert (siehe Abbildung 4.3).

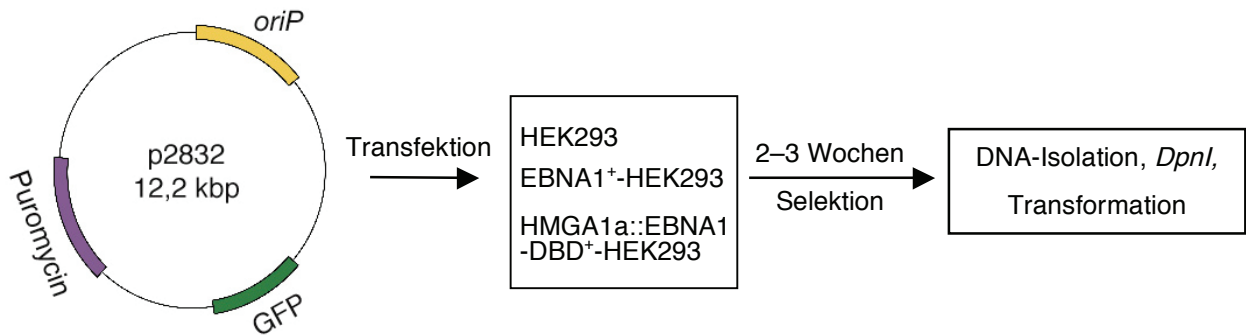


Abb 4.3: Schema eines Plasmid-Wiedergewinnungsversuches („plasmid rescue“). Nach Transfektion eines *oriP*-Reporterplasmides werden HEK293-Zellen für zwei bis drei Wochen auf Puromycin-Resistenz selektioniert. Aus diesen selektionierten Zellen wird anschließend HIRT-DNA gewonnen, welche neben dem Hauptanteil an gescherter chromosomaler DNA auch die niedermolekulare episomal-replizierte p2832-DNA enthält. Vor der Transformation in *E. coli* wird die nicht-replizierte transfizierte Ausgangs-DNA mittels der Restriktionsendonuklease *DpnI* gespalten. p2832 besitzt zusätzlich zu den oben eingezeichneten genetischen Elementen einen prokaryontischen Replikationsursprung und eine Ampizillin-Resistenzkassette.

Ampizillin-resistente *E. coli*-Kolonien können nach Transformation von *DpnI*-behandelter HIRT-DNA lediglich dann entstehen, wenn p2832-Plasmid-DNA in HEK293-Zellen über den Selektionszeitraum extrachromosomal erhalten und repliziert wird, da durch Replikation in der Wirtszelle das Dam-Methylierungsmuster verloren geht.

Die Anzahl der resistenten Kolonien dient als Maß für die mitotische Stabilität und für die Replikationseffizienz der Plasmide. Sofern die HEK293-Zellen kein *oriP*-bindendes Transgen exprimieren, wachsen keine Ampizillin-resistenten Kolonien aus. Gemessen an der Zahl Ampizillin-resistenter Transformanten, konnten aus EBNA1⁺-HEK293-Zellen (220 ± 21) und HMGA1a::EBNA1-DBD⁺-HEK293-Zellen (304 ± 26) vergleichbare Mengen extrachromosomal replizierter p2832-DNA wiedergewonnen werden (Tabelle 4.1). Dies lässt den Schluss zu, dass HMGA1a::EBNA1-DBD die extrachromosomale Aufrechterhaltung und Replikation *oriP*-tragender Plasmide unterstützt.

| Zelllinie | HEK293 | EBNA1 ⁺ -HEK293 | HMGA1a:: EBNA1-DBD ⁺ -HEK293 / |
|--------------|--------|----------------------------|---|
| Kolonienzahl | 0 | 220 ± 21 | 304 ± 26 |

Tabelle 4.1: Auswertung eines Plasmid-Wiedergewinnungsversuches („plasmid rescue“). Die Werte mit Standardabweichungen resultieren aus drei unabhängigen Experimenten. (Vorarbeiten von Sibille Humme).

Die Bindung von EBNA1 an DS bewirkt die Ausbildung eines Zellzyklus-regulierten Prä-Replikationskomplexes. Inwieweit HMGA1a::EBNA1-DBD diese Funktion ebenfalls unterstützt, wurde durch Chromatin-Immunopräzipitationsexperimente überprüft. Hierzu wurden HMGA1a::EBNA1-DBD exprimierende HEK293-Zellen mit dem *oriP*-Reporterplasmid p2832 transfiziert und zwei bis drei Wochen auf Puromycin-Resistenz selektioniert. Die Analyse der preRC-Ausbildung und deren Zellzyklus-Abhängigkeit erfolgte durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) unter Verwendung von Antikörpern, die gegen die preRC-Proteine Orc2 und MCM7 gerichtet sind. Hierzu wurde Chromatin aus G1/S-Phase- beziehungsweise Mitose-arretierten Zellen präpariert (Abbildung 4.4).

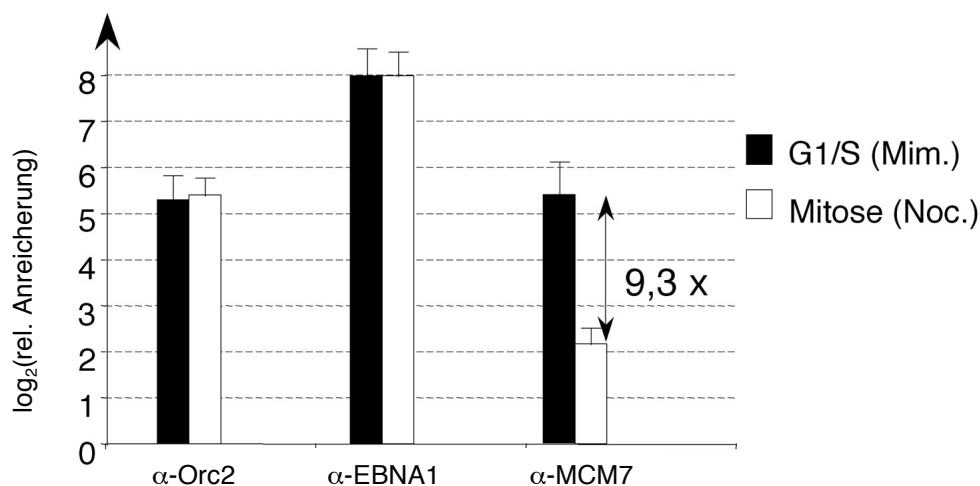


Abb. 4.4: preRC-Ausbildung und Zellzyklus-Abhängigkeit. HMGA1a::EBNA1-DBD⁺-HEK293-Zellen wurden in der G1/S-Phase mittels Mimosin (0,5 mM) beziehungsweise in der Mitose durch Nocodazol-Behandlung (40 ng/ml) arretiert. Auf 800-1000 bp fragmentiertes und durch Formaldehyd vernetztes Chromatin wurde mit α -MCM7-, α -EBNA1- bzw. α -Orc2-Antikörpern präzipitiert und die DNA präpariert. Die Quantifizierung der präzipitierten DNA-Menge erfolgte mittels quantitativer PCR, dargestellt in einer logarithmischen Skala mit der Basis 2. Gezeigt ist die erzielte Anreicherung von DNA durch Chromatin-Immunopräzipitation mit den Antikörpern α -MCM7, α -EBNA1 bzw. α -Orc2 relativ zu dem jeweiligen prä-Immunsereum sowie dem Kontrollloкус innerhalb der Puromycin-Resistenzkassette. (ChIP-Experiment M.-P. Spindler).

Das α -Orc2-ChIP-Experiment demonstriert eine 32fache Anreicherung des Orc2-Proteins an *oriP*, welche gleichermaßen in Mimosin- wie auch in Nocodazol-arretierten Zellen zu erkennen ist. Der verwendete α -EBNA1-Antikörper erkennt ein Epitop innerhalb der EBNA1-DBD und immunopräzipitiert dadurch mit HMGA1a-EBNA1-DBD vernetztes Chromatin. HMGA1a-EBNA1-DBD weist eine mehr als

200fache Anreicherung an *oriP* auf, welche ebenso wenig wie die Orc2-Anreicherung einer Zellzyklus-Regulation unterliegt. Nach Aktivierung chromosomaler Replikationsstartstellen assoziiert der MCM2-7-Komplex mit der Replikationsmaschinerie und ist nicht mehr am Replikationsursprung nachweisbar. Eine 9,3fache Abnahme des Mcm7-Proteins an *oriP* in Nocodazol-arretierten Zellen reflektiert jene Dissoziation von MCM2-7 von aktivierten Replikationsursprüngen, wie sie im chromosomalen Kontext und auch im EBNA1/*oriP*-System zu beobachten ist (Ritzi *et al.*, 2003, Schaarschmidt *et al.*, 2002). Die gleichzeitige Präsenz von Orc2 und Mcm7 sowie die G1/S-Phase-spezifische Assoziation von Mcm7 deuten auf eine Zellzyklus-abhängige Lizenzierung von *oriP* durch das Laden eines preRCs hin.

Aus dem Plasmid-Wiedergewinnungsversuch geht hervor, dass HMGA1a::EBNA1-DBD sowohl die extrachromosomale Aufrechterhaltung als auch die Replikation von *oriP*-Plasmiden unterstützt. Zudem bewirkt HMGA1a::EBNA1-DBD die Ausbildung eines Zellzyklus regulierten preRCs an *oriP*. Ob die Replikation hierbei durch HMGA1a oder durch die EBNA1-DBD vermittelt wird, lässt sich jedoch nicht ableiten.

4.1.2 HMGA1a unterstützt die Replikation von Hybridvektoren

In Kooperation mit Dagmar Pich und Wolfgang Hammerschmidt wurde ein extrachromosomales Hybridvektor-System entworfen, das erlaubt, HMGA1a speziell auf seine Replikationsfunktion hin zu untersuchen. Hierzu wurde der modulare Aufbau des latenten EBV-Replikationsursprungs *oriP* ausgenutzt, welcher aus den funktionell separierbaren Elementen FR und DS besteht. Die Anheftung an die Wirtschromosomen sollte wie auch im Falle von *oriP* über die „Family of Repeats“ (FR-Element) und EBNA1 gewährleistet werden. Das „Dyad Symmetry“-Element (DS) wurde durch vier Tet-Operator-Motive in DS-ähnlicher Anordnung ersetzt, wodurch HMGA1a, als Fusion an den prokaryonten Tetrazyklin-Repressor (Tet-Repressor; TetR), gezielt an den Hybridvektor rekrutiert werden kann. Die Replikation dieser Hybridplasmide wird von EBNA1 nicht mehr unterstützt (Dagmar Pich, persönliche Mitteilung) und hängt somit von den Eigenschaften der HMGA1a-Tet-Repressor-Fusion ab (Abbildung 4.6).

Der Tet-Repressor weist eine extrem hohe Affinität für seine Zielsequenz auf, den Tet-Operator (*tetO*). Dies kommt durch eine Dissoziationskonstante (K_D) im femtomolaren Bereich zum Ausdruck. Zusätzlich weist der TetR eine hohe Affinität gegenüber Tetrazyklinderivaten auf ($K_D \approx 10^9 \text{ M}^{-1}$) und nach Bindung zweier solcher Moleküle an ein TetR-Dimer sinkt die Affinität des Tet-Repressors für seine *tetO*-Zielsequenz um ein Milliardenfaches ($K_D \approx 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Berens und Hillen, 2004). Krueger *et al.* gelang es, ein Doxyzyklin-regulierbares TetR-Derivat zu klonieren, welches aus zwei TetR-Monomeren besteht, die durch eine Kette von 29 Aminosäuren zu einem Polypeptid verknüpft sind („single-chain“-Tet-Repressor; scTetR) (Krueger *et al.*, 2003). Als Fusion an den „single-chain“-Tet-Repressor kann HMGA1a an den Hybridvektor rekrutiert und seine Assoziation an das inserierte *tetO*₄-Element durch Zugabe von Doxyzyklin *in trans* reguliert werden (Abbildung 4.6).

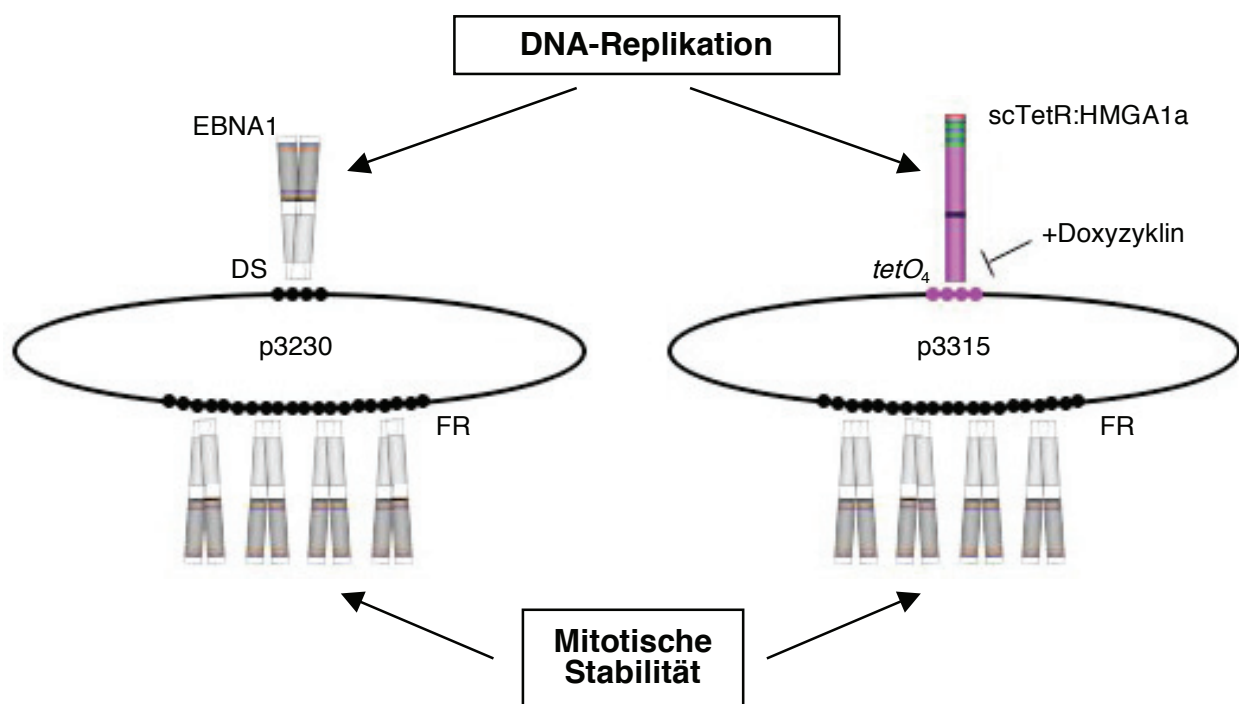


Abb. 4.5: Schema zum Hybridvektorsystem. Die vier in DS enthaltenen EBNA1-Dimer-Bindestellen (schwarze Ovale) wurden durch vier Tet-Repressor-Bindestellen ersetzt (violette Ovale). EBNA1-Bindung an das FR-Element vermittelt in beiden Vektorsystemen mitotische Stabilität. Das Binden des *trans*-agierenden Faktors scTetR::HMGA1a kann durch Doxyzyklingabe reguliert werden. p3230 sowie p3315 vermitteln hCMV-Promotor-getriebene Resistenz gegenüber Hygromycin und können in *E. coli* unter Ampicillinselektion propagiert werden.

Um nun gezielt die Replikationseigenschaften von HMGA1a zu untersuchen, wurden HEK293-Zelllinien hergestellt, die sowohl EBNA1 als auch HMGA1a als carboxyterminale Fusion an den scTetR stabil exprimieren (Abbildungen 4.2 & 4.6)

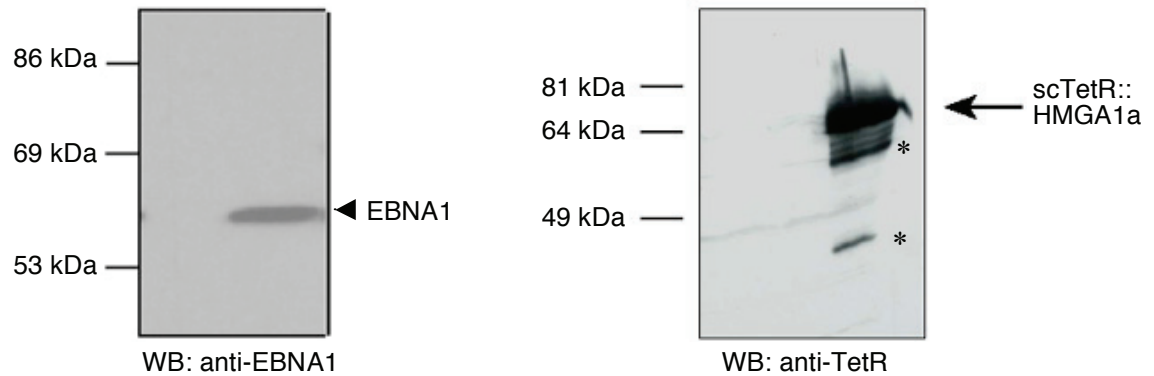


Abb. 4.6: EBNA1⁺/scTetR::HMGA1a⁺-HEK293.

Western-Blot-Detektion von scTetR::HMGA1a (60,7 kDa) und EBNA1 (56,4 kDa). Jeweils linke Spur: HEK293-Lysate, jeweils rechte Spur: Lysate aus EBNA1/scTetR::HMGA1a-exprimierenden HEK293-Zellen. Sowohl scTetR::HMGA1a als auch EBNA1 weisen in Laemmli-Gelen eine zu ihrer berechneten Größe verringerte Mobilität auf, eventuell auf Grund des hohen Anteils an basischen Aminosäuren. Die mit „*“ markierten Signale stammen von degradiertem scTetR::HMGA1a-Protein.

Die EBNA1/scTetR::HMGA1a exprimierenden HEK293-Zellen wurden mit dem *oriP*-Plasmid p3230 und dem Hybridvektor p3315 transfiziert und unter Hygromycin-Selektion gesetzt. Nach zwei bis drei Wochen unter Selektion wurde niedermolekulare DNA mittels HIRT-Extraktion präpariert und mit *DpnI* und *HindIII* gespalten. Zur Southern-Blot-Detektion der replizierten Plasmide diente eine radioaktiv markierte Sonde, die nur den in allen Plasmiden identischen prokaryonten Anteil erkennt.

Unter Selektion (Abbildung 4.7, Spur „Selekt.“) repliziert das Hybridplasmid p3315 ebenso stabil wie das *oriP*-Plasmid p3230. Ohne Hygromycin-Selektion führte die Zugabe von Doxzyzyklin („+“; 2 µg/ml) über einen Zeitraum von ein beziehungsweise zwei Wochen zu einer reproduzierbar verminderten Replikationsaktivität des Hybridplasmids p3315. Dies geht aus der 50-prozentigen Reduktion des Southern-Blot-Signals in Abbildung 4.7 hervor (rechts, Spuren „+“ im Vergleich zu „-“).

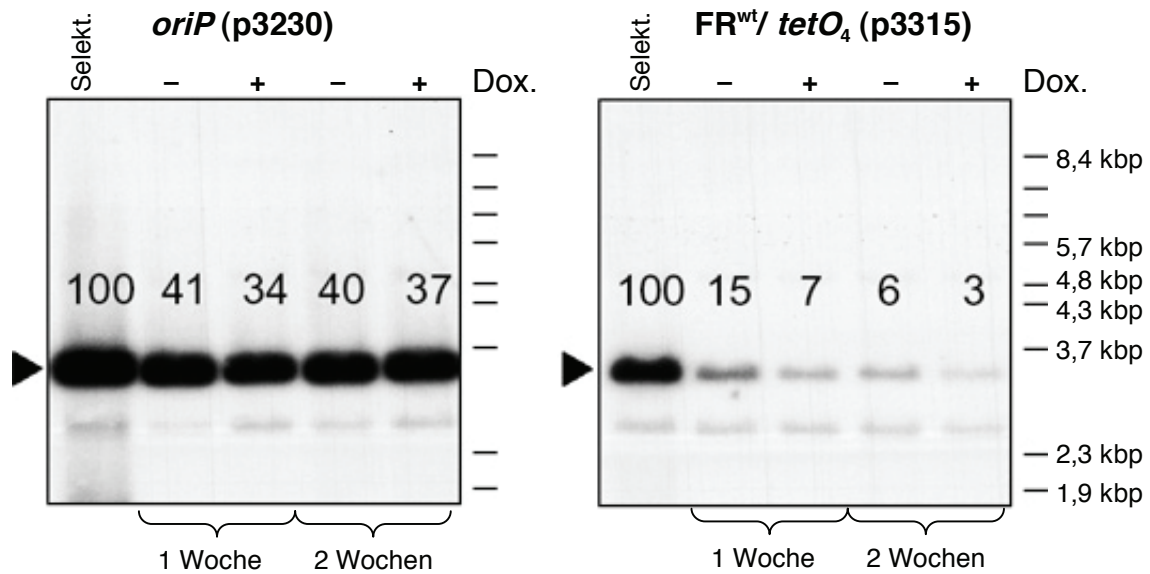


Abb. 4.7: Plasmid-Replikations Versuche; Southern-Blot-Signale der replizierten linearisierten p3230 bzw. p3315 Plasmiden – angedeutet durch Pfeilspitzen – wurden mittels der „AIDA-Software“ quantifiziert: Werte angegeben in [%] oberhalb der Plasmidsignale. Die Intensität der HIRT-DNA-Signale unter Selektionsbedingungen wurde auf 100% gesetzt. Signalintensitäten nach weiteren 1–2 Wochen ohne Selektion mit und ohne Doxzyklingabe wurden in Relation zur Bedingung mit Selektion gesetzt.

Im Vergleich zu p3315 hat Doxzyklingabe keinen Effekt auf die Replikationsaktivität des *oriP*-Plasmides p3230. Darüber hinaus wird der Hybridvektor p3315 in EBNA1⁺-HEK293-Zellen, die kein scTetR::HMGA1a Transgen exprimieren, nicht extrachromosomal repliziert (Dagmar Pich, persönliche Mitteilung).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass HMGA1a als Fusion an den scTet-Repressor, der essentielle Faktor für die Replikation des Hybridvektors p3315 ist.

4.2 HMGA1a-ORC-Interaktion

HMGA1a als Fusion an die DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von EBNA1 und an den „single-chain“-Tet-Repressor unterstützt die Replikation von Plasmiden in humanen Zellen, sofern diese Plasmide Sequenzmotive der jeweiligen DNA-Bindedomänen tragen (siehe Abbildung 4.6). Im am besten verstandenen extrachromosomalen System *oriP* / EBNA1 wird diese Funktion durch die Interaktion des *trans*-aktiven Faktors EBNA1 mit dem zellulären „origin recognition complex“ vermittelt. Hierdurch wird ORC an *oriP* geleitet, was zur Aktivierung des plasmidalen Replikationsursprunges führt (Dhar *et al.*, 2001b, Ritzi *et al.*, 2003, Schepers *et al.*, 2001). Inwieweit sich dieses für EBNA1 gültige Modell auf HMGA1a-Fusionen übertragen lässt, galt es zu untersuchen. Im folgenden Kapitel wird HMGA1a mittels biochemischer und Fluoreszenz-mikroskopischer Methoden ebenfalls als ORC-interagierendes Protein identifiziert. Darüber hinaus werden HMGA1a-Proteinmotive beschrieben, die für die Interaktion mit verschiedenen ORC-Untereinheiten beziehungsweise für die Lokalisation der interagierenden Komponenten essentiell sind.

4.2.1 HMGA1a-Fusionsproteine co-präzipitieren ORC und mit ORC

Inwieweit HMGA1a-Fusionsproteine in humanen Zellen mit ORC assoziieren, wurde zunächst mittels Co-Immunopräzipitation (Co-IP) untersucht. Im Vergleich zur Co-IP zytoplasmatischer Proteine reicht jedoch hierzu kein milder Zellaufschluss aus. HMGA1a und ORC-Proteine sind nicht nur kernständig, sondern zudem DNA-bindend und lassen sich lediglich durch Detergenzien oder Natriumchlorid-Konzentrationen von mehr als 350 mM beziehungsweise 450 mM in Lösung bringen. Somit können die benötigten Solubilisierungsbedingungen bereits zu stringent sein, um die betreffenden Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Versuche, ORC und HMGA1a unter physiologischen Bedingungen durch MNase- oder DNase-Verdau quantitativ in Lösung zu bringen, blieben erfolglos (nicht gezeigt; Juan Mendez, persönliche Mitteilung).

Zunächst galt es, ein Kernextraktionsprotokoll zu etablieren, das erlaubt, ORC-Untereinheiten miteinander zu co-immunopräzipitieren. Ein Dignam-Extrakt, welcher standardmäßig für *in vitro*-Transkription eingesetzt wird, erlaubte keine Co-Präzipitation der ORC-Kern-Komplex-Untereinheit Orc4 mit einem α -Orc2-Antikörper (hier nicht gezeigt). Während der Dignam-Extraktion werden Kernproteine durch schrittweise Erhöhung der Kaliumchlorid-Konzentration schonend aus isolierten Kernen extrahiert. Hiernach wird der Überstand nach Zentrifugation – welcher die solubilisierten Chromatinproteine enthält – bis auf ein Niveau physiologischen Salzgehaltes dialysiert (Dignam *et al.*, 1983). Bekannte Kernextraktionsprotokolle, die nach Verdünnung auf physiologischen Salzgehalt *in vitro*-Replikation zulassen, sowie klassische Protokolle zur Isolation von preRC-Komponenten, enthalten 10 mM HEPES Puffer pH 7,9 anstatt des im Dignam-Kernextraktionspuffer enthaltenen 100 mM TrisCl pH 7,3 und 450 mM NaCl anstelle von KCl (Baltin *et al.*, 2006, Mendez und Stillman, 2000). Extrakte mit 450 mM NaCl ließen jedoch keine Co-IP von Orc1 mit der Orc2-Untereinheit des „origin recognition complexes“ zu, obschon Versuche mit rekombinanten Proteinen diese Interaktion vermuten ließen (Dhar *et al.*, 2001a). *In vitro*-Replikationsexperimente ließen vermuten, dass eine zu hohe Salzkonzentration die Interaktionen zwischen ORC-Untereinheiten unterbindet (Jens Baltin, persönliche Mitteilung). Somit wurde zunächst überprüft, ob Dialyse auf physiologischen Salzgehalt eines nach Mendez *et al.* präparierten Kernextraktes positive Auswirkungen auf die Co-IP von ORC-Untereinheiten hat (Abbildung 4.8) (Mendez und Stillman, 2000).

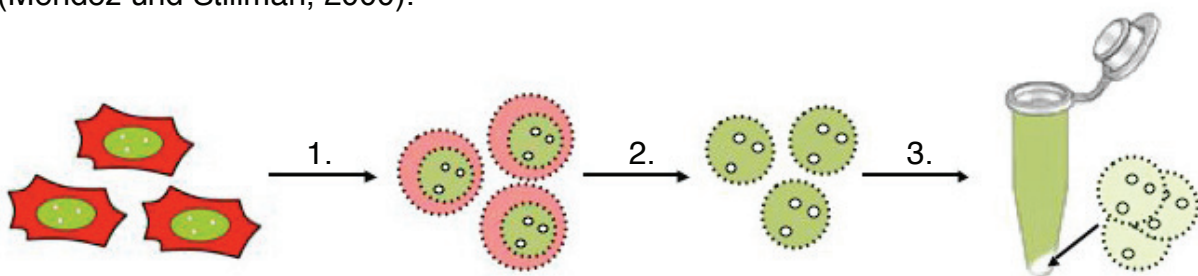


Abb. 4.8: Schema der Kernextraktion. (1.) Kerne (grün) wurden aus in hypotonem Puffer geschwollenen Zellen entweder durch mechanisches Homogenisieren („douncen“) oder durch Zugabe von Triton X-100 (Endkonzentration 0,06 %) gewonnen. (2.) Durch Waschen der Kerne in hypotonem Puffer wurden zytosolische und nukleosolische Proteine entfernt. (3.) Anschließend wurden Chromatinproteine für 60 Minuten mit 450 mM NaCl extrahiert und unlösliche Bestandteile durch Ultrazentrifugation pelletiert. Nach Dialyse des Überstandes (Kernextrakt) gegen Pufferlösung physiologischen Salzgehaltes und erneuter Pelletierung durch Dialyse präzipitierter Proteine, wurde der Überstand mit löslichen Proteinen für Co-IP-Experimente herangezogen.

Ein polyklonaler Kaninchen- α -Orc2-Antikörper präzipitiert neben Orc2 auch Orc1, Orc4 und Orc6 (Abbildung 4.9, Spur „ α -Orc2“). In Immunpräzipitationen mit Kaninchen-Isotyp-Antikörpern können ebenfalls reproduzierbar ORC-Untereinheiten nachgewiesen werden (Spur „IT“). Die Menge des detektierbaren Orc2-beziehungsweise Orc4-Proteins liegt in etwa bei 1% des für die IP eingesetzten Kernextraktes. Dies ist wahrscheinlich das Resultat unspezifischen Bindens von ORC an nicht blockierte Protein A- beziehungsweise G-Sepharose. Dennoch ist eine eindeutige und spezifische Anreicherung der ORC-Untereinheiten Orc1, Orc4 und Orc6 und somit eine Interaktion mit präzipitiertem Orc2 festzustellen.

Da verschiedene Antikörper in Western Blots unterschiedliche Sensitivität aufweisen, lässt dieses Experiment keine Rückschlüsse auf die Komplexstöchiometrie zu. Jedoch ist anzumerken, dass Orc1 in humanen Zellen substöchiometrisch im Vergleich zu anderen ORC-Untereinheiten vorliegt (Dhar *et al.*, 2001a). Der in dieser Arbeit verwendete Ratte- α -Orc1-Antikörper lässt unter den gewählten Western-Blot-Bedingungen ein Signal für Orc1 erst ab einem Auftrag von mindestens 5×10^5 Kernäquivalenten erkennen.

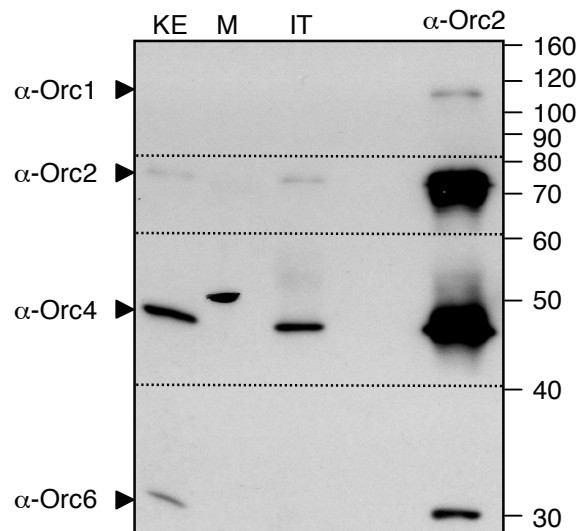


Abb. 4.9: Co-IP von ORC Untereinheiten aus HeLa S3 Kernextrakten. KE: Kernextrakt aus 10^5 Zellen. M: Marker; IT: Isotyp-IP aus 10^7 Zellen. α -Orc2: α -Orc2-IP aus 10^7 Zellen. Das in der Marker-Spur zu beobachtende Signal resultiert aus einer Kreuzreaktion der im Western Blot eingesetzten Antikörper mit der 50 kDa-Markerbande.

Das Auftauchen eines spezifischen Signals, welches mit Orc6 korrespondiert, identifiziert diese mit 30 kDa kleinste potentielle ORC-Untereinheit erstmalig als Teil des humanen ORC mittels Co-IP und suggeriert somit die Existenz eines Orc1-6-Holokomplexes. Bislang konnte Orc6 nur unter rekombinanten Bedingungen als Orc1-5-Komplex assoziiertes Protein charakterisiert werden, wobei dieses Ergebnis nicht zuverlässig reproduzierbar war (Dhar *et al.*, 2001a, Ranjan und Gossen, 2006, Vashee *et al.*, 2001).

Ein Kernextraktionsprotokoll, welches die Co-Präzipitation von ORC-Untereinheiten erlaubt, war demnach etabliert und sollte nun herangezogen werden, um die Assoziation von HMGA1a-Fusionsproteinen mit ORC zu untersuchen.

Hierzu wurde zunächst eine bereits im Labor vorhandene HMGA1a::EBNA1-DBD⁺-HEK293-Zelllinie (2679.7⁺-HEK293) verwendet, die stabil mit dem Expressionskonstrukt p2679 transfiziert wurde (Humme, 2004). Kernextrakte aus diesen HMGA1a::EBNA1-DBD⁺-HEK293-Zellen wurden wie in Abbildung 4.8 beschrieben präpariert und einer Immunpräzipitationen mit EBNA1- beziehungsweise α -Orc2-Antikörpern unterzogen (Abbildung 4.10). Die α -Orc2-Immunpräzipitation wurde zunächst mit 5% N-Laurylsarkosyl behandelt, was zu einer quantitativen Dissoziation Orc2- assoziierter Proteine und lediglich zu einer Teilelution des Orc2-Proteins von der Protein A-Sepharose führte. HMGA1a als Fusionsprotein an EBNA1-DBD konnte in der N-Laurylsarkosyl-Elution detektiert werden und assoziiert somit spezifisch mit Orc2 (Spur „IP Orc2 S“ im Vergleich zu „IP IT S“).

Der in der Immunopräzipitation verwendete α -EBNA1-Antikörper lässt keine quantitative Depletion des HMGA1a::EBNA1-DBD Proteins aus dem Kernextrakt zu, da im Überstand nach α -EBNA1-Immunopräzipitation keine Depletion des zu EBNA1 korrespondierenden Signals festzustellen ist (Spur „ÜS E1“ im Vergleich zur Kernextrakt-Ladekontrolle, Spur „KE“).

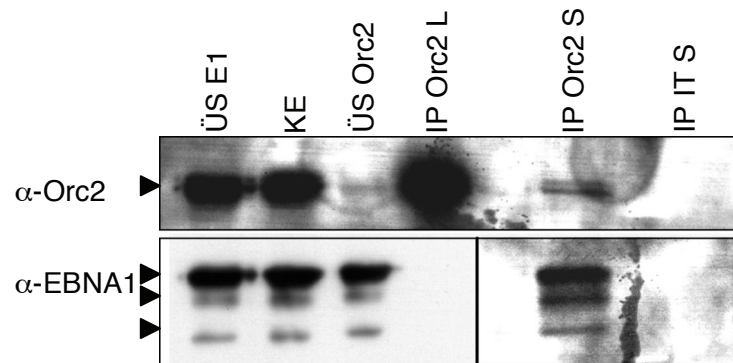


Abb. 4.10: Co-Immunopräzipitation von Orc2 mit HMGA1a::EBNA1-DBD in HEK293-Zellen. „ÜS E1“: Überstand α -EBNA1 IP; „KE“: Kernextrakt; „ÜS Orc2“: Überstand α -Orc2 IP; jeweils 5×10^5 Kernäquivalente / Spur; „IP Orc2 L“: Laemmli-Eluat der α -Orc2 IP; „IP Orc2 S“: 5%-Laurylsarkosyl-Eluat der α -Orc2 IP; „IP IT S“: 5%-Laurylsarkosyl-Eluat der Isotyp IP; jeweils 5×10^7 Kernäquivalente pro Immunopräzipitation.

Dieses Experiment gibt keinen Aufschluss darüber, ob HMGA1a:EBNA1-DBD lediglich mit Orc2 oder mit dem gesamten humanen ORC assoziiert. Hierzu wurde eine HEK293-Zelllinie etabliert, welche HMGA1a::EBNA1-DBD mit einem carboxyterminalem Strep-Tag II (IBA GmbH) exprimiert (HMGA1a::EBNA1-DBD::ST). Einer potentiellen Assoziation von HMGA1a::EBNA1-DBD::ST mit ORC sollte mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie nachgegangen werden.

Dieser lediglich acht Aminosäuren lange „Tag“ erlaubt eine Ein-Schritt-Reinigung von rekombinanten Strep-Tag-II-markierten Proteinen aus Bakterien und physiologische Elutionsbedingungen, da die Bindung des Strep-Tag II an Strep-Tactin-Sepharose durch das Biotin-Derivat Desthiobiotin (DES) kompetitiert werden kann. HEK293-Zellen wurden mit dem HMGA1a::EBNA1-DBD::ST-Expressionskonstrukt p3281 sowie mit einem Neomycinresistenz vermittelnden Plasmid p2727 kotransfiziert. Unter Neomycinselektion wurden Einzelklone isoliert, welche auf die Expression des gewünschten Transgens hin untersucht wurden. Zwei der untersuchten HEK293-Einzelzellklone exprimierten das Fusionsprotein HMGA1a::EBNA1-DBD::ST, wobei Klon 3281.2 für weitere Experimente herangezogen wurde.

RIPA-Lysate aus 5×10^6 HMGA1a::EBNA1-DBD::ST⁺-HEK293-Zellen wurden auf eine 50 μ l-Säulenvolumen Strep-Tactin-Affinitätssäule geladen und der Durchfluss aufgefangen. Nach zweimaligem Waschen wurde mit Desthiobiotin-Elutionspuffer (10 mM DES) eluiert. Alle aufgefangenen Fraktionen wurden mittels Western Blot untersucht (Abbildung 4.11). Eine 50-prozentige Reduktion der Signalintensität des

HMGA1a::EBNA1-DBD::ST Proteins im RIPA-Lysat im Vergleich zum Durchfluss (Spur „ÜS“) lässt darauf schließen, dass in etwa die Hälfte des Strep-Tag-II-markierten Proteins an die Strep-Tactin-Säule gebunden hatte. Ohne weitere Verluste während des Waschens konnte HMGA1a::EBNA1-DBD::ST durch Desthiobiotin-elution wieder-gewonnen werden.

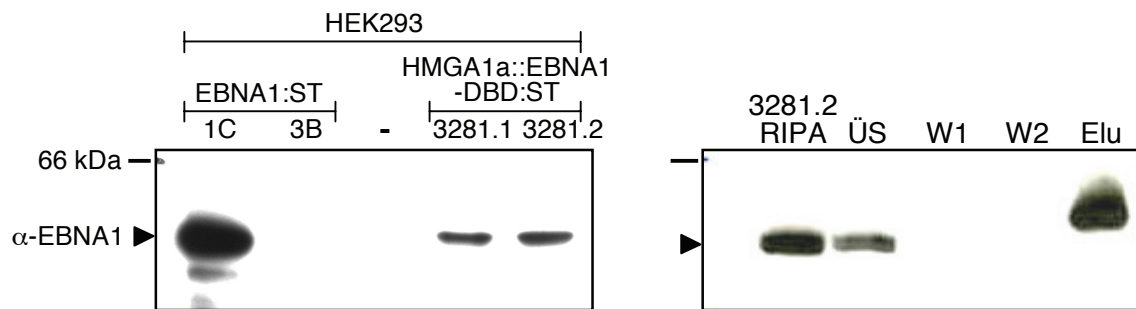


Abb. 4.11: Etablierung HEK293 HMGA1a::EBNA1-DBD::ST & Strep-Tactin-Reinigung.
links: RIPA-Zell-Lysate aus HEK293-EBNA1::ST-Klonen 1C (positiv) und 3B (negativ) sowie HEK293 („-“ Negativkontrolle) und HEK293-HMGA1a::EBNA1-DBD::ST-Klonen 3281.1 und 3281.2 (positiv); **rechts:** Strep-Tactin-Reinigung des HMGA1a::EBNA1-DBD::ST-Proteins aus RIPA-Lysaten: 3281.2 RIPA-Lysat (10 µg), ÜS: Durchfluss der Strep-Tactin-Säule (10 µg), W1 & 2: Waschfraktionen, Elu: 10% des Eluates nach Reinigung aus 5×10^6 Zellen; Detektion mittels α -EBNA1 Western Blot.

Ob HMGA1a als EBNA1-DBD::ST-Fusion mit dem gesamten humanen ORC assoziiert, sollte mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie beantwortet werden. Hierzu wurden Kernextrakte aus 5×10^7 HMGA1a::EBNA1-DBD::ST⁺-HEK293-Zellen präpariert und über eine 500 µl-Strep-Tactin-Säule gegeben, wie oben beschrieben gewaschen und eluiert. Als Negativkontrolle diente ein HEK293-Kernextrakt ohne Strep-Tag-II-enthaltendes Protein, mit welchem analog verfahren wurde. Nach Elution mit Desthiobiotin wurde das Eluat Methanol-Chloroform gefällt (Wessel und Flugge, 1984), in Probenpuffer aufgenommen und mittels Western Blot analysiert (Abbildung 4.12).

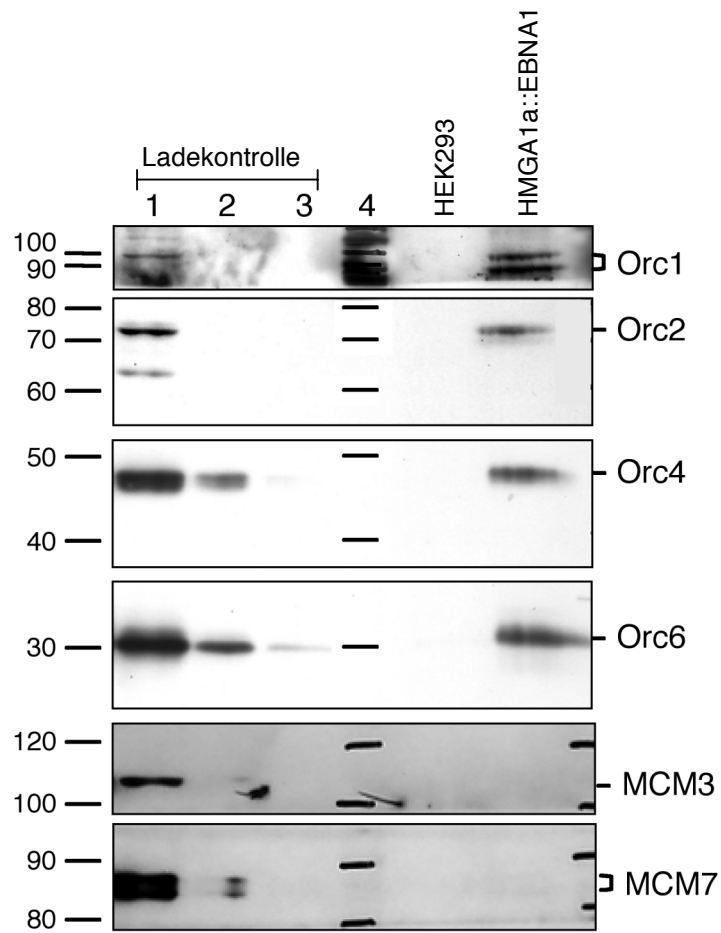


Abb. 4.12: Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Spur 1-3: HEK293 Kernextrakt 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 Kernäquivalente; Spur 4: *Bench Mark* Protein-Standard; Spur HEK293: Eluat der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie von HEK293 Kernextrakten; Spur HMGA1a::EBNA1: Eluat der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie von HEK293 HMGA1a::EBNA1-DBD::ST-Kernextrakten.

Die ORC-Untereinheiten Orc1, Orc2, Orc4 und Orc6, jedoch nicht die preRC Komponenten Mcm3 und Mcm7, wurden mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aus HMGA1a::EBNA1-DBD::ST⁺-HEK293-Kernextrakten angereichert.

Dies lässt darauf schließen, dass ebenso wie EBNA1 auch HMGA1a als Fusion an die EBNA1-DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne mit ORC assoziiert und so Replikation von *oriP*-Plasmiden unterstützt.

Wie in Abschnitt 4.1 dargestellt, unterstützt HMGA1a auch als Fusion an den prokaryontischen Tet-Repressor die extrachromosomale Replikation von Plasmiden. Dies deutet darauf hin, dass HMGA1a und nicht die DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von EBNA1 die Assoziation mit humanem ORC vermittelt. Diese Vermutung sollte experimentell zunächst durch Co-IPs anhand der vorliegenden scTetR::HMGA1a exprimierenden HEK293-Zellen untermauert werden. Als Negativkontrolle wurde eine HEK293-Zelllinie etabliert, die stabil den scTetR exprimiert (Abbildung 4.13).

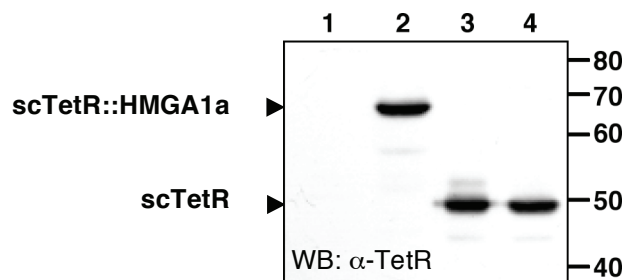


Abb. 4.13: Nachweis der scTetR::HMGA1a- bzw. scTetR-Expression in HEK293-Zellen. Geladen wurden Kernextrakte aus je 2×10^5 Zellen. 1: HEK293 2: scTetR::HMGA1a⁺-HEK293 (3265.17); Spur 3 & 4: scTetR⁺-HEK293 (3735.1 & 3735.2); α -TetR-Western Blot.

Immunopräzipitationen mit α -Orc2- und α -Orc6-Antikörpern aus scTetR⁺-HEK293-beziehungsweise scTetR::HMGA1a⁺-HEK293-Kernextrakten weisen eine Co-IP des scTetR::HMGA1a Proteins auf (Abbildung 4.14, Spur 4 & 7) und mindestens im Falle der α -Orc6-Immunopräzipitation, keine Co-IP des „single-chain“-Tet-Repressors. Im Falle der α -Orc2- Immunopräzipitation lässt sich keine definitive Aussage treffen, nachdem die schwere Kette (Abbildung 4.14, Spur 5 „+“) des für die IP eingesetzten Antikörpers das scTetR-Signal überlagern könnte. Der zur Western-Blot-Detektion verwendete α -TetR-Antikörper wurde ebenso wie der α -Orc2-Antikörper aus einem Kaninchen gewonnen. Obwohl ein Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet wurde, der spezifisch die leichte Kette des Kaninchen-Immunglobulin G erkennt, kommt es zu einer Kreuzreaktion mit der schweren Kette des Immunopräzipitations-Antikörpers. Der sekundäre Antikörper zeigt jedoch keine Kreuzreaktion mit dem Ratten- α -Orc6-Antikörper.

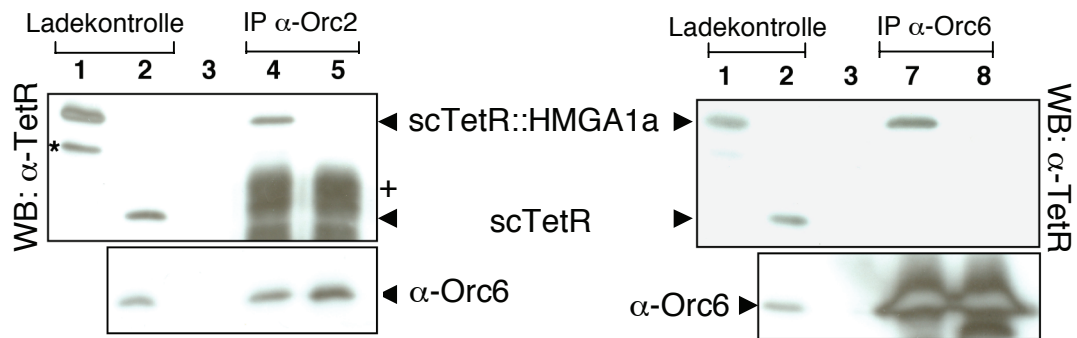


Abb. 4.14: Co-IP von scTetR::HMGA1a mit Orc2 und Orc6.

1: scTetR::HMGA1a⁺-HEK293-Kernextrakte (2×10^5). 2: scTetR⁺-HEK293-Kernextrakte (Klon 3735.1) (2×10^5). In Spur 3 wurden jeweils der letzte Waschschrift der α -Orc2- bzw. der α -Orc6-Immunopräzipitationen aus scTetR::HMGA1a⁺-HEK293-Kernextrakten geladen. 4 und 5: Immunopräzipitation α -Orc2 aus scTetR::HMGA1a⁺-HEK293-Kernextrakten bzw. scTetR⁺-HEK293-Kernextrakten. 7 & 8: Immunopräzipitation α -Orc6 aus scTetR::HMGA1a⁺-HEK293-Kernextrakten bzw. scTetR⁺-HEK293-Kernextrakten. „*“: Signal nach Degradation des scTetR::HMGA1a-Proteins.

Der im Labor vorhandene α -TetR-Antikörper liefert ausreichende Sensitivität in Western-Blot-Analysen, eignet sich jedoch nicht für Immunpräzipitation der scTetR-Proteine. Daher konnte das reziproke Experiment, ORC-Untereinheiten mit dem scTetR::HMGA1a-Protein zu co-präzipitieren, nicht durchgeführt werden.

In der α -Orc2-Immunopräzipitation ist neben dem scTetR::HMGA1a-Protein auch Orc6 nachweisbar (Abbildung 4.14, links, α -Orc6-Western-Blot). Dies bestätigt die Co-IP-Ergebnisse aus HeLa S3-Kernextrakten (Abbildung 4.9).

Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass HMGA1a in HEK293-Kernextrakten mit dem humanen ORC assoziiert ist. Daher kann HMGA1a als Fusion an DNA-Bindedomänen die Replikation von Plasmiden unterstützen (vergleiche Abschnitt 4.1), sofern diese die Zielsequenzmotive der entsprechenden DNA-Bindedomänen tragen.

4.2.2 Das Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations-System

Durch Co-IPs konnte in Kapitel 4.2.1 gezeigt werden, dass HMGA1a als Fusion an DNA-Bindedomänen mit ORC assoziiert. Um etwas über die subzelluläre Lokalisation dieser Interaktion zu erfahren, wurde das Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations-System (BiFC-System) angewendet.

Methoden wie der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (**FRET**) und der „**BiFC**-Assay“ ermöglichen es, Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu untersuchen.

FRET kann zwischen zwei Farbstoffen, die zur Fluoreszenz befähigt sind, beobachtet werden (z.B. zwischen dem cyan fluoreszierenden Protein CFP und dem gelb fluoreszierenden Protein YFP). Dabei wird die Energie eines angeregten Donor-Fluorophors nicht in Form von Fluoreszenz abgegeben, sondern strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf einen fluoreszierenden Akzeptor übertragen, was zu einer detektierbaren Abnahme der Donor- beziehungsweise zu einer Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz führt. Da die Intensität des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers mit der 6. Potenz des Abstands beider Fluorophore abnimmt, dürfen Donor und Akzeptor nur wenige Nanometer auseinanderliegen, wodurch sich FRET zur Studie von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* eignet.

BiFC beruht auf der Ausbildung eines fluoreszierenden Komplexes aus Fragmenten von fluoreszierenden Proteinen, welche voneinander getrennt keine fluoreszierenden Eigenschaften aufweisen. Die Ausbildung eines fluoreszierenden Komplexes wird erleichtert durch die Interaktion von Proteinen, die an diese Fragmente fusioniert wurden (Kerppola, 2006) (Abbildung 4.15; teilweise übernommen aus (Hu *et al.*, 2002)). Der „BiFC-Assay“ funktioniert weitestgehend ohne Hintergrund, wodurch Interaktionen ohne Überexpression der zu untersuchenden Komponenten nachzuweisen sind, wie es oftmals bei FRET nötig ist. Das BiFC-System besteht aus den beiden Plasmiden pBiFC-YN-155 und pBiFC-YC155, welche die Expression von Proteinen als aminoterminaler Fusion an das amino- beziehungsweise carboxyterminale YFP Fragment erlauben. pBiFC-YN-155 besitzt vor der „multiple cloning site“ (MCS) einen FLAG-Tag, der pBiFC-YC155-Vektor einen Hämagglutinin-(HA)-Tag. Diese ermöglichen eine Immunlokalisation der Fusionsproteine innerhalb

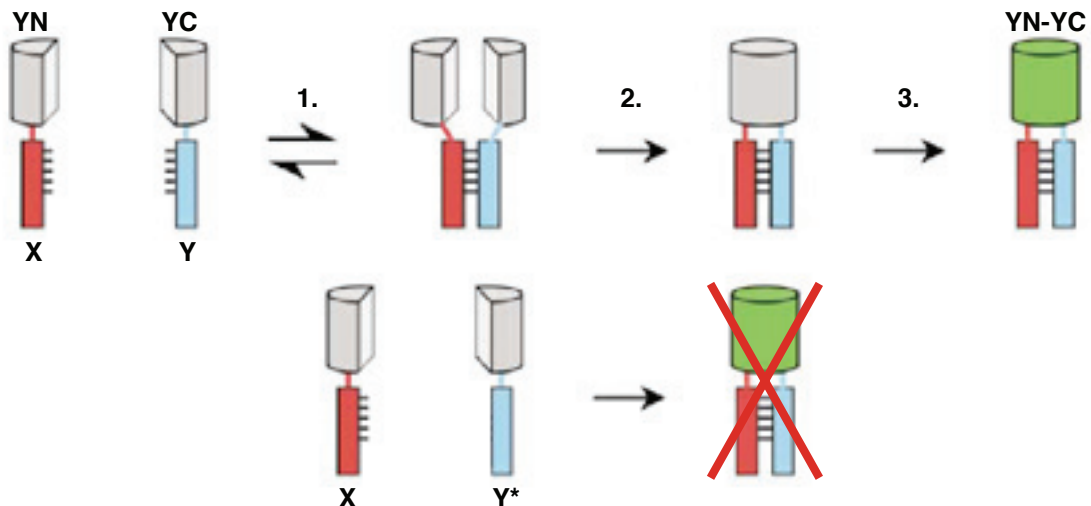


Abb. 4.15: Prinzip des „BiFC-Assays“. **Oben:** 1.: Protein „X“ und „Y“ interagieren miteinander. Dadurch kommen die an Protein „X“ & „Y“ fusionierten YFP-Fragmente (YN: YFP Aminosäuren 1-154; YC: YFP Aminosäuren 155-238) in unmittelbare Nähe. 2.: die YFP Fragmente falten sich zum Gelb-Fluoreszierenden-Protein (irreversibel). 3.: Chemische Reifung des Fluorophores durch Ausbildung eines zyklischen Tripeptides, welches bei 514 nm zur Fluoreszenz angeregt werden kann. **Unten:** Protein „X“ interagiert nicht mit Protein „Y*“. Die Fragmente YN & YC können sich nicht zu einem funktionalen YFP falten und es kommt nicht zur Ausbildung eines fluoreszierenden Proteins.

der transfizierten Zellen, um Transfektionseffizienz und relatives Expressionsniveau der beiden potentiellen Interaktionspartner festzustellen.

Der „BiFC-Assay“ wurde anhand der Leucin-Zipper-Motive (bZIP-Motive) der miteinander interagierenden Transkriptionsfaktoren Jun und Fos entwickelt (Hu *et al.*, 2002). Heterodimerisierung von Jun- und Fos-Proteinfamilie-Mitgliedern über diese bZIP-Motive führt zur Ausbildung des Transkriptionsfaktors AP1.

Anhand der bZIP-Motive von Jun und Fos, welche als aminoternale (Jun-YN) beziehungsweise carboxyterminale (Fos-YC) YFP-Fragment-Fusionen vorlagen, wurde der „BiFC-Assay“ im Labor etabliert. Zudem wurde diese Kombination bei allen nachfolgenden Experimenten als Positivkontrolle parallel durchgeführt. Hierzu wurden auf Deckgläsern wachsende HepG2-Zellen mit je 1 μg Jun-YN- und Fos-YC-Expressionsplasmid transfiziert. 24–26 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen auf Fluoreszenz-Komplementation hin mit einem Leica TCS SP2 Mikroskop untersucht.

Mit der Kombination Jun-YN:Fos-YC transfizierte HepG2-Zellen zeigen wie erwartet Fluoreszenz-Komplementation (Abbildung 4.16 a'). Die dazugehörige Interferenz-

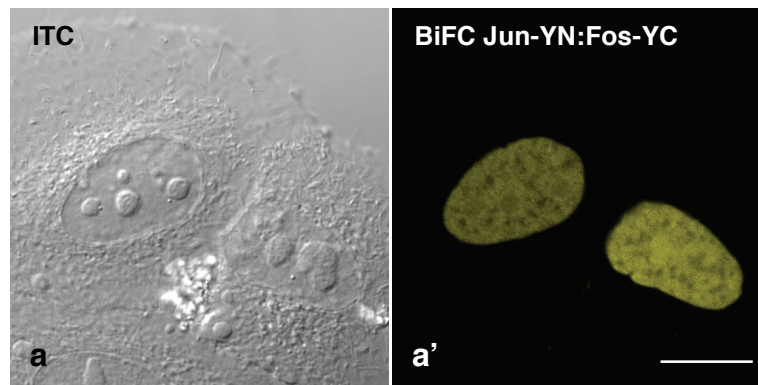


Abb. 4.16: „BiFC-Assay“ Jun-YN:Fos-YC. **a:** Interferenz-Kontrast-Bild **a':** BiFC. YFP-Signal-Detektion (529-560 nm) nach Anregung bei 514 nm. Der Eichstrich (weiß) entspricht 10 μm .

Kontrast-Aufnahme (Abb. 4.16 a) weist, wie von Hu *et al.* beschrieben, auf eine nukleäre Lokalisation der Interaktion hin (Hu *et al.*, 2002).

Zusätzlich zur Analyse der Fluoreszenz-Komplementation in lebenden HepG2-Zellen wurden parallel transfizierte Zellen mittels Immunlokalisation auf Expression der YN- und YC-Fusionsproteine und BiFC analysiert (Abbildung 4.17 a-a''') Die anti-HA-beziehungsweise anti-FLAG-Immunlokalisationen (Abbildung 4.17 a'''' und a''') der BiFC-Konstrukte zeigen an, dass beide im Bildausschnitt befindliche HepG2-Zellen sowohl Jun-YN und Fos-YC exprimieren. Durch Interaktion von Jun und Fos kommt es zur Ausbildung des fluoreszierenden BiFC-Komplexes (a'), der ausschließlich im Zellkern lokalisiert, wie anhand der Hoechst-Färbung (a'') und der Interferenz-Kontrast-Aufnahme (a) ersichtlich ist. Das Auftreten eines stärkeren BiFC-Signals im Nukleolus im Vergleich zum Nukleoplasma ist insbesondere in fixierten Zellen zu beobachten (Abbildung 4.17 a'). Diese unnatürliche Lokalisation des BiFC-Komplexes ist als Fixierungsartefakt zu betrachten, bei dem der hochdynamische Jun-YN:Fos-YC-Komplex während der 15-minütigen Formaldehyd-Inkubation mit höherer Wahrscheinlichkeit an die proteindichte Struktur des Nukleolus als an das umliegende Nukleoplasma vernetzt wird.

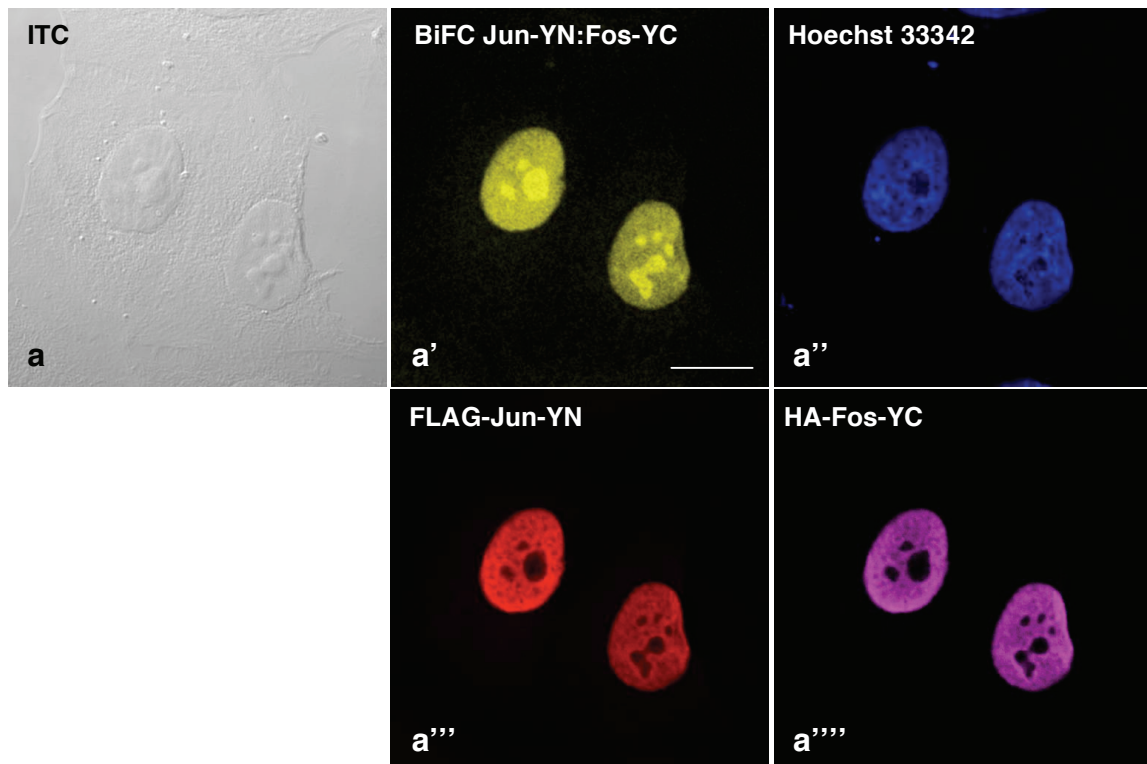


Abb. 4.17: Immunlokalisationsanalyse des „BiFC-Assays“ Jun-YN:Fos-YC. Die Bilder zeigen Jun-YN:Fos-YC-BiFC (a') und die korrespondierende Interferenz-Kontrast-Aufnahme (a) bzw. Hoechst-33342-DNA-Färbung (a''). (a''') und (a''') zeigen die Immunlokalisation des FLAG-markierten Jun-YN bzw. HA-markierten Fos-YC-Proteins. Der weiße Eichstrich entspricht 10 μm .

Das Fehlen eines Immunfluoreszenz-Signals für die Einzelkomponenten innerhalb des Nukleolus resultiert wahrscheinlich ebenfalls aus der langen Fixierungszeit, wonach diese nukleäre Domäne nicht mehr zugänglich für die in der Immunlokalisierung verwendeten Antikörper ist.

Als Negativkontrolle wurde ein Fos Δ ZIP-YC Expressionskonstrukt verwendet. Dieses trägt eine Mutation im Fos-bZIP-Motiv, die eine Interaktion mit dem Jun-bZIP-Motiv unterbindet. HepG2-Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für Jun-YN und Fos Δ ZIP-YC transfiziert und nach 26 Stunden auf Expression der YN- und YC-Fusionsproteine und BiFC analysiert (Abbildung 4.18 a-a'''). Obwohl zwei der in Abbildung 4.18 gezeigten HepG2-Zellen beide BiFC-Fusionen exprimieren (siehe 4.18 a'''-a'''), ist kein Auftreten eines BiFC-Signals in a' zu beobachten.

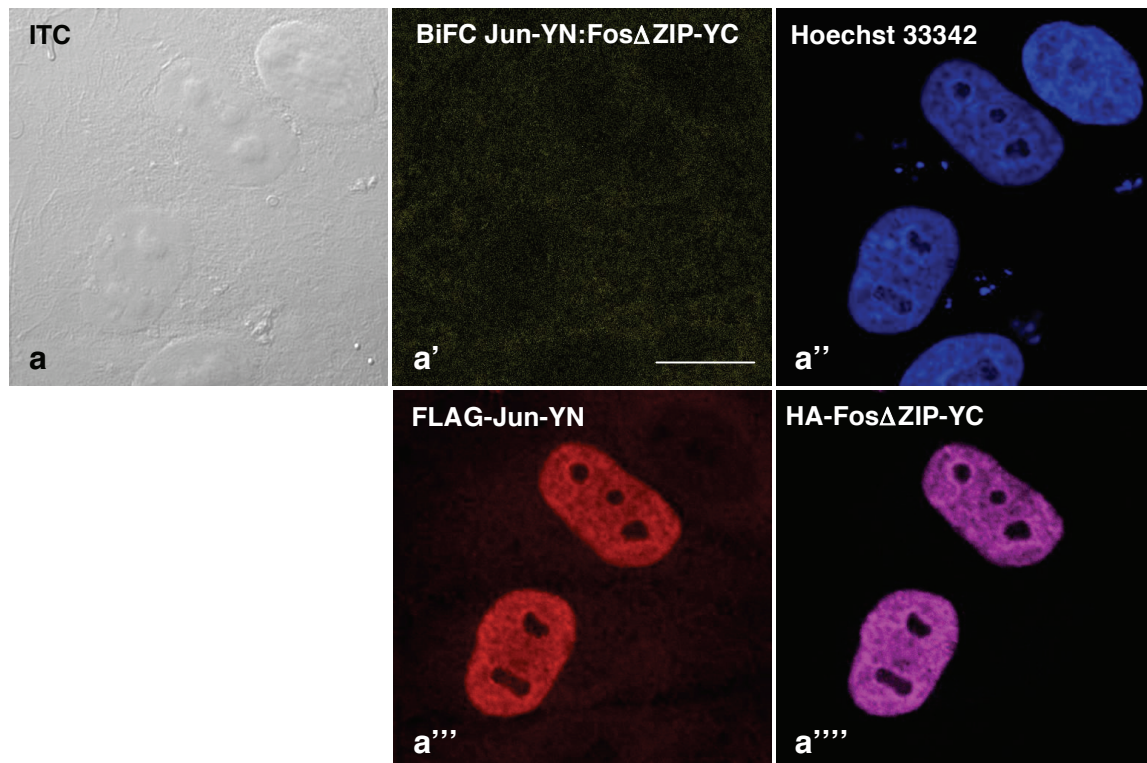


Abb. 4.18: Immunlokalisationsanalyse des „BiFC-Assays“ Jun-YN:Fos Δ ZIP-YC. Die Bilder (a''') und (a''') zeigen Immunlokalisation des FLAG-markierten Jun-YN bzw. des HA-markierten Fos Δ ZIP-YC-Konstruktes. Zwei der gezeigten HepG2-Zellen exprimieren beide BiFC-Fusionen, zeigen jedoch kein BiFC-Signal (a'). Korrespondierende Interferenzkontrast-Aufnahme in (a) bzw. Hoechst-33342-DNA-Färbung in (a''). Der weiße Eichstrich entspricht 10 μ m.

Sehr starke Überexpression kann zu unnatürlichen Interaktionen zwischen Proteinen führen und Fluoreszenz-Komplementation begünstigen. Dies schlägt sich jedoch auch in einer unnatürlichen Morphologie der Zellen nieder (Dr. Robert Hock, persönliche Mitteilung). Folgende Kriterien müssen Fluoreszenz-Komplementationen erfüllen, um als reale Interaktionen zwischen Proteinen beurteilt zu werden:

- BiFC-positive Zellen weisen eine normale Morphologie auf.
- Unterschiedliche Expressionsstärken der BiFC-Proteine führen zu einer Varianz in der Stärke des BiFC-Signals.
- Das BiFC-Signal beschreibt ein klar definiertes und reproduzierbares Muster.

Alle in dieser Arbeit präsentierten BiFC-Experimente erfüllen diese Kriterien.

4.2.3 HMGA1a-Interaktionen mit ORC-Untereinheiten

Durch Co-IPs konnte in Kapitel 4.2.1 gezeigt werden, dass HMGA1a als Fusion an DNA-Bindedomänen mit ORC assoziiert. Um etwas über die subzelluläre Lokalisation dieser Interaktion zu erfahren wurde der „BiFC-Assay“ angewendet. Hierzu wurden die offenen Leserahmen aller sechs ORC-Untereinheiten sowohl in den Vektor pBiFC-YN-155 als auch in pBiFC-YC155 inkloniert. pBiFC-Vektoren YN und YC, welche HMGA1a-YFP-Fragment-Fusionen exprimieren, wurden von unserem Kooperationspartner Dr. Robert Hock (Biozentrum Würzburg) zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden ORC-Untereinheiten als YN-Fusion in Kombination mit HA-HMGA1a-YC getestet. Hierzu wurden auf Deckgläsern gewachsene HepG2-Zellen mit jeweils 1 μ g ORC-Untereinheit-YN- und HMGA1a-YC-Expressionskonstrukt transfiziert. Nach 24–26 Stunden wurden die Zellen auf BiFC untersucht.

Bei den Kombinationen Orc6-YN:HMGA1a:YC und Orc1-YN:HMGA1a:YC war Fluoreszenz-Komplementation (BiFC) zu beobachten (Abbildungen 4.19-4.21).

HMGA1a zeigt Fluoreszenz-Komplementation mit Orc6:

Im Falle der Kombination Orc6-YN:HMGA1a:YC wurden in einem parallelen Experiment zusätzlich 150 ng eines Expressionsplasmids für mRFP-Ligase I kotransfiziert (Abbildung 4.19 b-b’). So konnte in lebenden Zellen beurteilt werden, wie viel Prozent der transfizierten Zellen Fluoreszenz-Komplementation zeigten. Zudem konnte überprüft werden, ob lediglich stark exprimierende Zellen BiFC zeigten.

Mit unterschiedlicher Expressionsstärke der BiFC-Konstrukte ist eine Varianz in der Stärke des BiFC-Signals zu beobachten (Abbildung 4.19 b’-b’”). Zudem zeigen BiFC-positive Zellen in Interferenz-Kontrast-Aufnahmen (ITC-Aufnahmen) eine normale Morphologie (Abbildung 4.19 a und b) und ein klar definiertes und reproduzierbares BiFC-Muster. Dies weist die Orc6-YN:HMGA1a-YC als reale Interaktion aus. Die Interaktion zwischen Orc6 und HMGA1a ist zum großen Teil in der nukleären Peripherie und in der Nähe der Nukleoli zu beobachten.

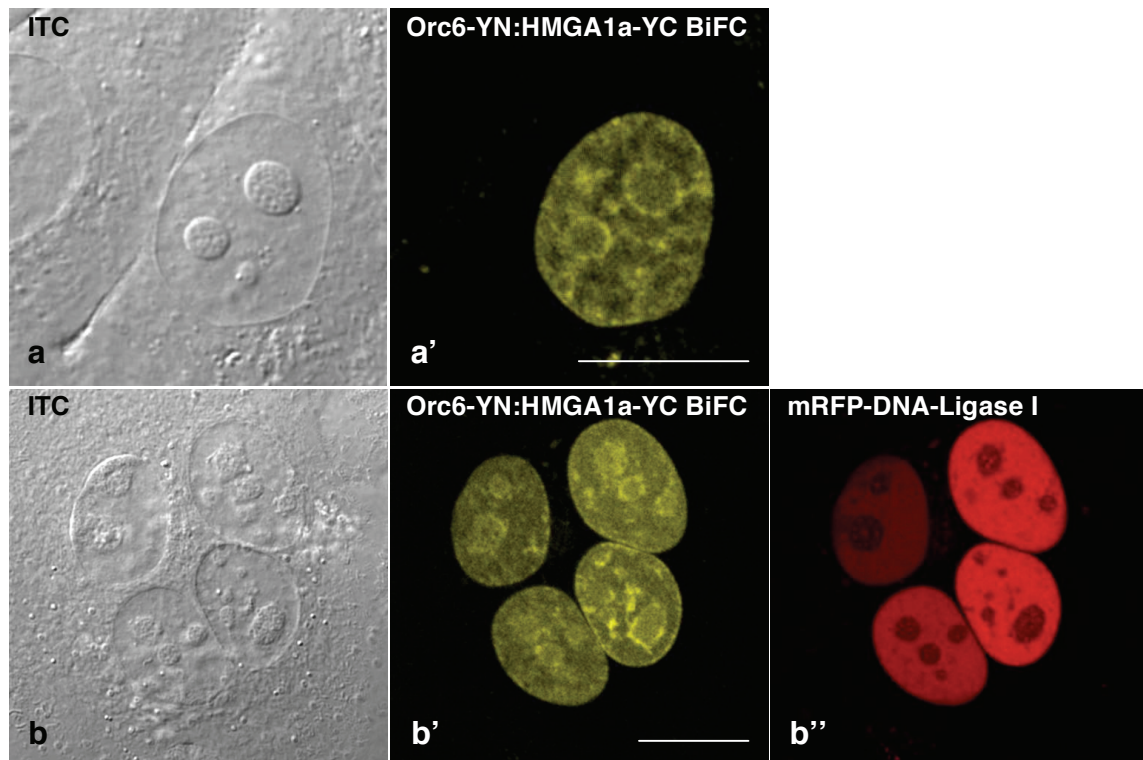


Abb. 4.19: „BiFC-Assay“ Orc6-YN:HMGA1a-YC. a'/b'. Orc6-YN und HMGA1a-YC zeigen Fluoreszenz-Komplementation in lebenden HepG2-Zellen. YFP-Signal-Detektion (529–560 nm) nach Anregung bei 514 nm. **a/b:** Interferenz-Kontrast-Bild. **b-b'':** HepG2-Zellen wurden zusätzlich zu den BiFC-Plasmiden mit 150 ng mRFP-Ligase-I-Expressionsvektor kotransfiziert. **b'':** Detektion der mRFP-Ligase I. Die Eichstriche (weiß) entsprechen 10 μm .

Ein Teil der transfizierten HepG2-Zellen wurde mit Formaldehyd fixiert und einer Immunlokalisation unterzogen (Abbildung 4.20). HepG2-Zellen, die sowohl HMGA1a-YC als auch Orc6-YN exprimieren, zeigen auch ein BiFC-Signal, was die *in vivo*-Beobachtungen (Abbildung 4.19) bestätigt.

Daraus lässt sich schließen, dass HMGA1a mit Orc6 interagiert. Zudem ist festzustellen, dass diese Interaktion in HepG2-Zellen besonders in der nukleären Peripherie sowie in der Nähe der Nukleoli stattfindet.

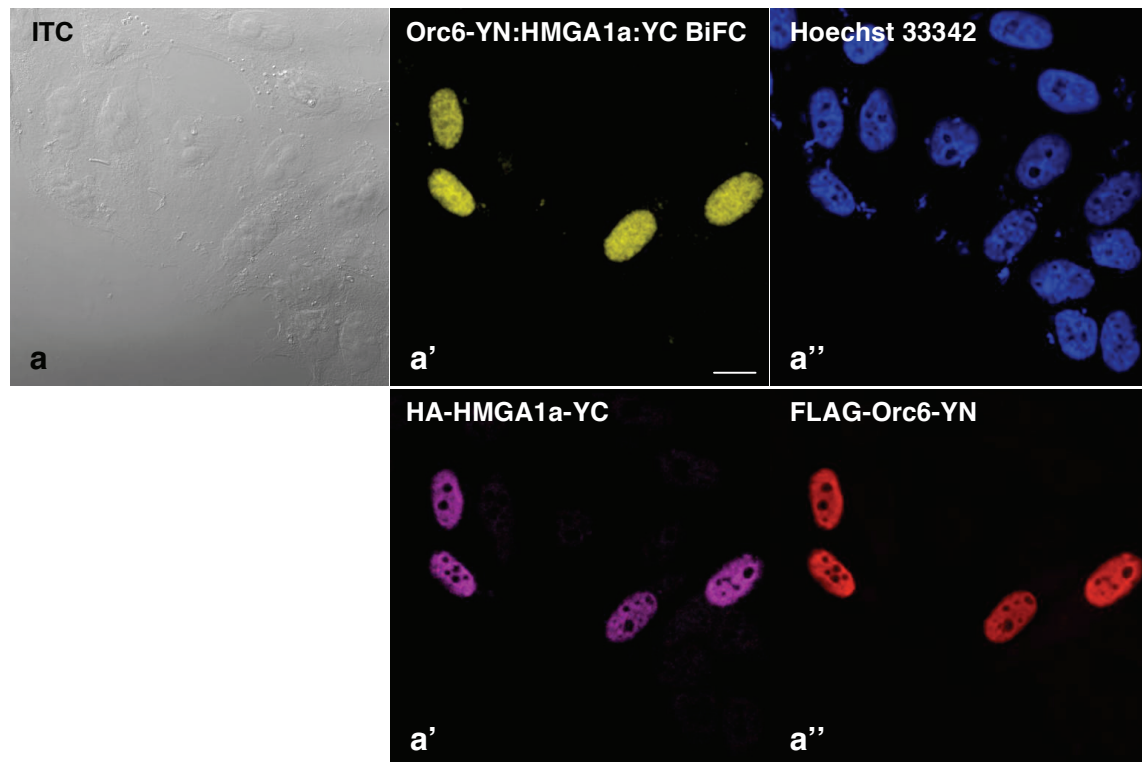


Abb. 4.20: Immunlokalisierung des „BiFC-Assays“ Orc6-YN:HMGA1a-YC. a': Orc6-YN und HMGA1a-YC zeigen Fluoreszenz-Komplementation in fixierten HepG2-Zellen. Korrespondierende Interferenzkontrast-Aufnahme in (a) bzw. Hoechst-33342-DNA-Färbung in (a''). (a''') und (a''') zeigen Immunlokalisierung des FLAG-markierten Orc6-YN bzw. des HA-markierten HMGA1a-YC-Proteins. Der weiße Eichstrich entspricht 10 μm

HMGA1a zeigt Fluoreszenz-Komplementation mit Orc1:

Die Kombination Orc1-YN:HMGA1a-YC zeigt bei normaler Zellmorphologie ebenfalls ein BiFC-Signal mit reproduzierbarem Muster. Ähnlich zum Orc6-YN:HMGA1a-YC-BiFC-Signal-Muster, obschon deutlich lokalisierter, ist eine Kooperation zwischen Orc1 und HMGA1a hauptsächlich in der nukleären Peripherie und perinukleolär zu beobachten (Abbildung 4.21 a'/b'). Immunlokalisationen der Einzelkomponenten Orc1-YN und HMGA1a-YC in fixierten Zellen demonstrieren, dass in doppelt transfizierten HepG2-Zellen auch ein BiFC-Signal zu detektieren ist (4.21 c-c''').

Somit zeigen die ORC-Untereinheiten Orc1 und Orc6, welche zusammen mit Orc2-5 in Co-IPs mit HMGA1a-Fusionsproteinen assoziieren (Kapitel 4.2.1), Kooperation mit HMGA1a im „BiFC-Assay“ und somit eine Interaktion *in vivo*.

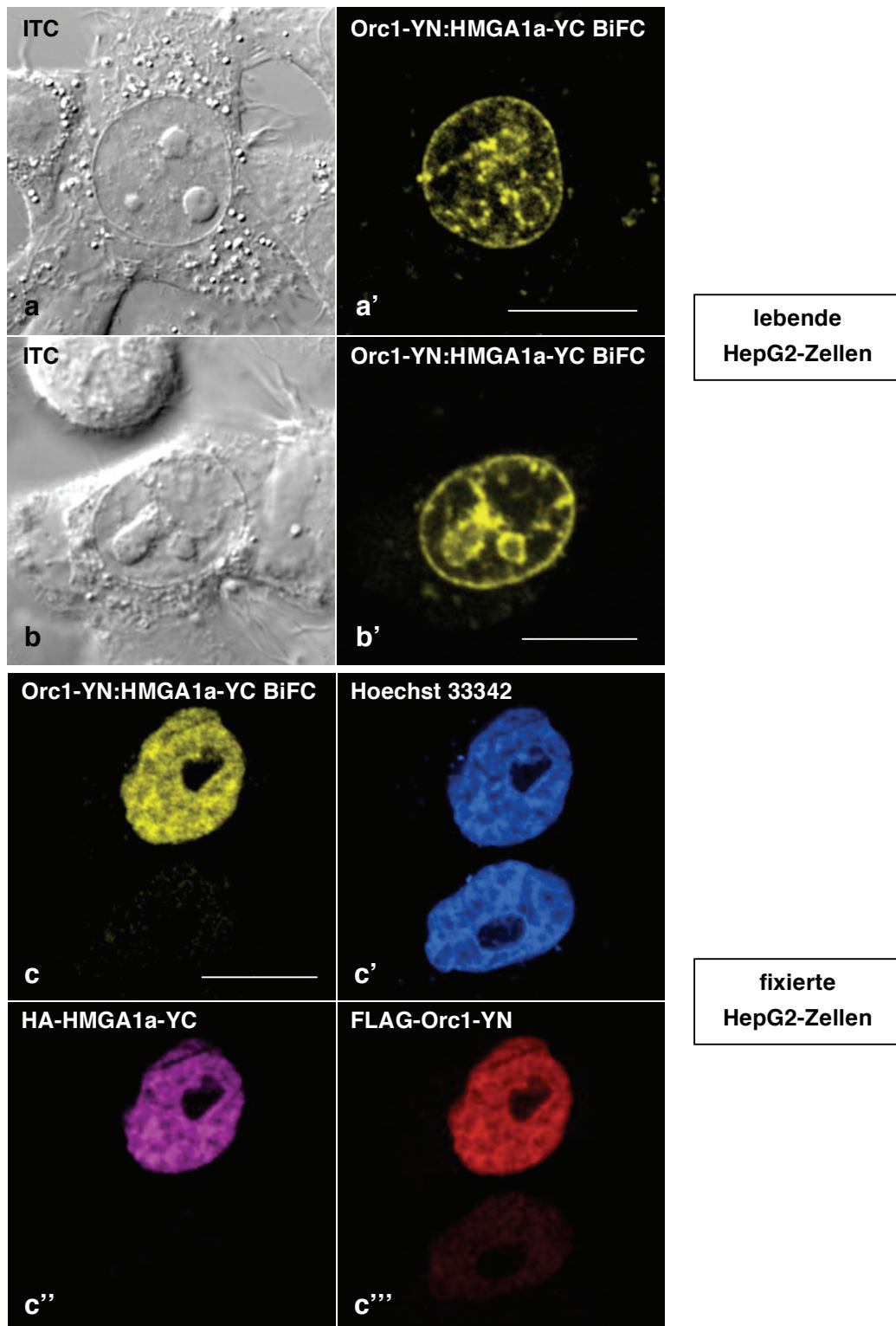


Abb. 4.21: „BiFC-Assay“ Orc1-YN:HMGA1a-YC *in vivo* und nach Immunlokalisation. Orc1-YN und HMGA1a-YC zeigen Fluoreszenz-Komplementation in lebenden (a'/b') und fixierten (c) HepG2-Zellen. Interferenz-Kontrast-Aufnahme von lebenden Zellen in (a/b). Hoechst-33342-DNA-Färbung in (c'). (c'') und (c''') zeigen Immunlokalisation des FLAG-markierten Orc6-YN bzw. des HA-markierten HMGA1a-YC-Proteins. Die weißen Eichstriche entsprechen 10 μm .

HMGA1a-Interaktion mit den ORC-Kern-Komplex-Untereinheiten Orc2-Orc5:

Die Orc-Untereinheiten Orc2, Orc3, Orc4 und Orc5, welche im humanen System das Herzstück des „origin recognition complex“ (ORC-Kern-Komplex) bilden, zeigten als YN-Fusionen keine Fluoreszenz-Komplementation mit HMGA1a-YC. Ein negatives Ergebnis im „BiFC Assay“ bedeutet nicht zwangsläufig, dass die untersuchten Komponenten nicht interagieren. Mit dem hier verwendeten BiFC-Vektor-System werden die zu untersuchenden Proteine immer amino- und carboxyterminal „getaggt“ exprimiert, was die Funktionalität des Proteins beeinträchtigen kann. So interferieren carboxyterminale Fusionen an das Orc2-Protein mit der Ausbildung eines Orc1-5-Komplexes (Manfred Gossen, persönliche Mitteilung).

Die nukleären HMGA1a:Orc6- und HMGA1a:Orc1-BiFC-Muster gleichen sich speziell in einem Bereich, welcher die Nukleoli umgibt. Inwieweit HMGA1a dort lediglich mit Orc1 und Orc6 kooperiert, oder ob dieses BiFC-Muster die Lokalisation des gesamten „origin recognition complexes“ widerspiegelt, kann mit Immunolokalisationsanalysen beantwortet werden. Hierzu wurde mit HMGA1a::EGFP-transfizierten HepG2-Zellen eine α -Orc2-Immunolokalisation durchgeführt (Abbildung 4.22). Die ORC-Kern-Komplex-Untereinheit Orc2 kolokalisiert mit HMGA1a besonders in perinukleolären Bereichen, welche in Abbildung 4.22 a''' und b''' gelb eingefärbt sind. Der Hoechstfarbstoff 33342 bindet speziell an AT-reiche DNA und färbt dadurch besonders die dicht verpackte, AT-reiche α -Satelliten-DNA im perizentrischen Heterochromatin. Aus Abbildung 4.22 a''' und b''' geht hervor, dass HMGA1a und Orc2 ebenfalls im perizentrischen Heterochromatin kolokalisieren, wodurch dieser Bereich weiß erscheint.

Die ORC-Kern-Komplex-Untereinheit Orc2 kolokalisiert mit HMGA1a in perinukleolären Bereichen, an denen präferentiell auch Fluoreszenz-Komplementation zwischen Orc6-YN beziehungsweise Orc1-YN und HMGA1a-YC zu beobachten ist. Dies lässt vermuten, dass perinukleoläres HMGA1a mit dem gesamten „origin recognition complex“ assoziiert ist.

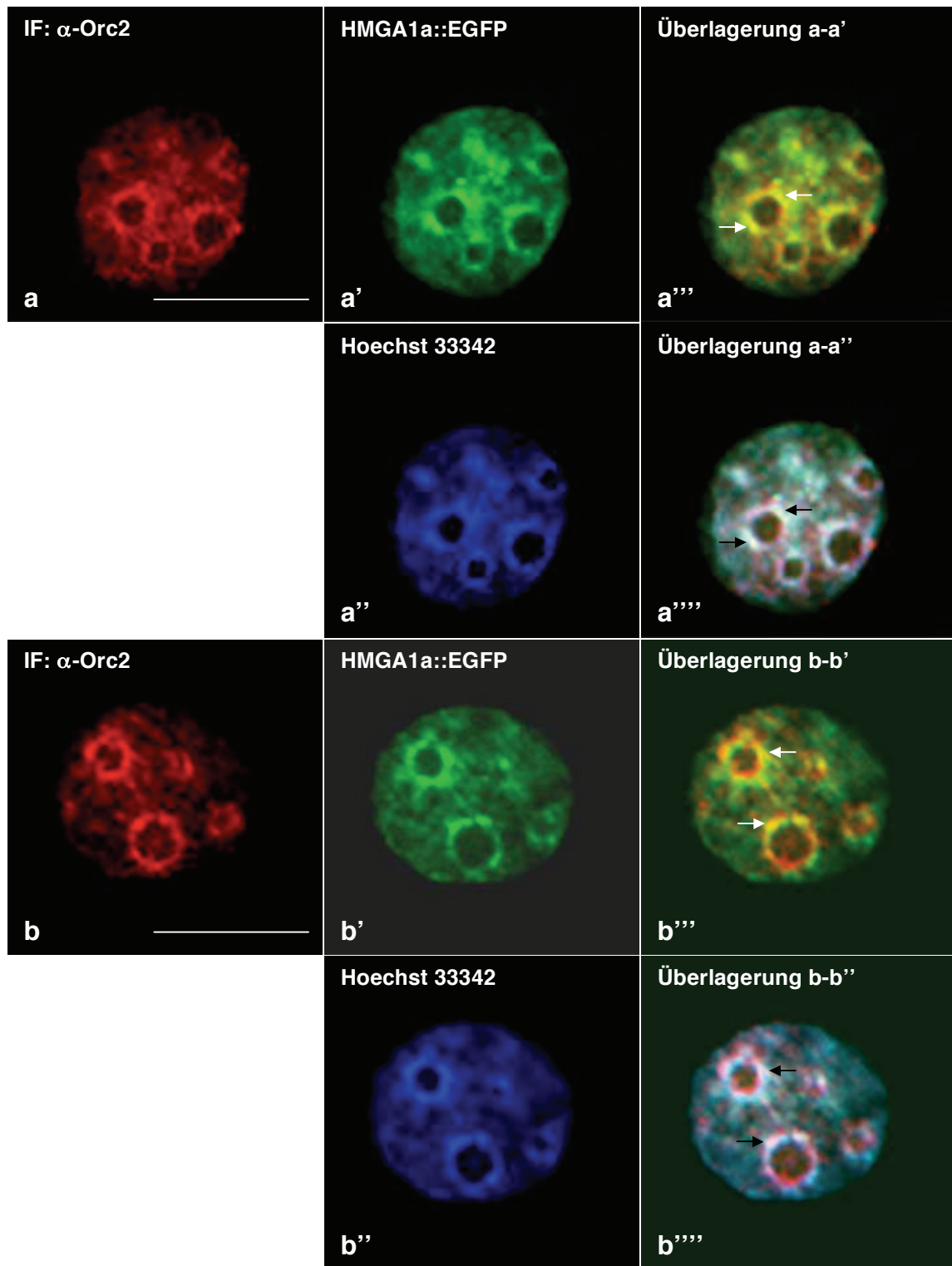


Abb. 4.22: Kolokalisations-Analyse von Orc2 und HMGA1a::EGFP. Immunlokalisation von Orc2 in **a** und **b**. HMGA1a::EGFP-Lokalisation in **a'** und **b'**. Hoechst-DNA-Färbung in **a''** und **b''**. Die Bilder **a'''** und **b'''** zeigen Überlagerungen der Aufnahmen **a** und **a'** beziehungsweise **b** und **b'**. Bereiche, in denen HMGA1a::EGFP und Orc2 kolokalisieren, sind gelb eingefärbt und zum Teil durch weiße Pfeile markiert. In **a''''** und **b''''** sind Überlagerungen der Aufnahmen **a-a''** beziehungsweise **b-b''** dargestellt. Bereiche, in denen HMGA1a::EGFP, Hoechst-DNA-Färbung und Orc2 kolokalisieren, erscheinen weiß und sind zum Teil durch schwarze Pfeile markiert. Die weißen Eichstriche entsprechen 10 μ m.

Dass die beobachtete Kolo­kalisierung zwischen HMGA1a::EGFP und Orc2 auf einer Interaktion der beiden Protein beruht, sollte anhand einer Co-IP bestätigt werden. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit dem HMGA1a::EGFP-Expressionskonstrukt transfiziert und Einzelzellklone isoliert. Von dem Klon HEK293-HMGA1a::EGFP- (SCC1) wurden Kernextrakte hergestellt und aus einem Äquivalent von 2×10^7 -Zellkernen wurde mittels des GFP-Binders (Uli Rothbauer, LMU) HMGA1a::EGFP präzipitiert. Wie aus Abbildung 4.23 (rechts) hervorgeht, erlaubte der GFP-Binder eine quantitative Präzipitation des HMGA1a::EGFP-Proteins aus Kernextrakten, nachdem im Überstand der GFP-Binder-IP (Abbildung 4.23, rechts, Spur ÜS GFP-B.) mittels Western-Blot-Analyse kein HMGA1a::EGFP nachzuweisen war. Die präzipitierten Proteine wurden schließlich mit Laemmli-Probenpuffer eluiert und mittels Immunoblot analysiert (Abbildung 4.23, links). Als Negativkontrolle dienten HEK293-Kernextrakte, mit welchen analog verfahren wurde. In der Immunopräzipitation mittels des GFP-Binders ist eine spezifische Co-IP des Orc6- und Orc2-Proteins nachzuweisen.

Somit kolokalisiert und interagiert HMGA1a mit den ORC-Untereinheiten Orc1, Orc2 und Orc6 und lässt somit eine Assoziation von HMGA1a mit dem gesamten humanen ORC vermuten.

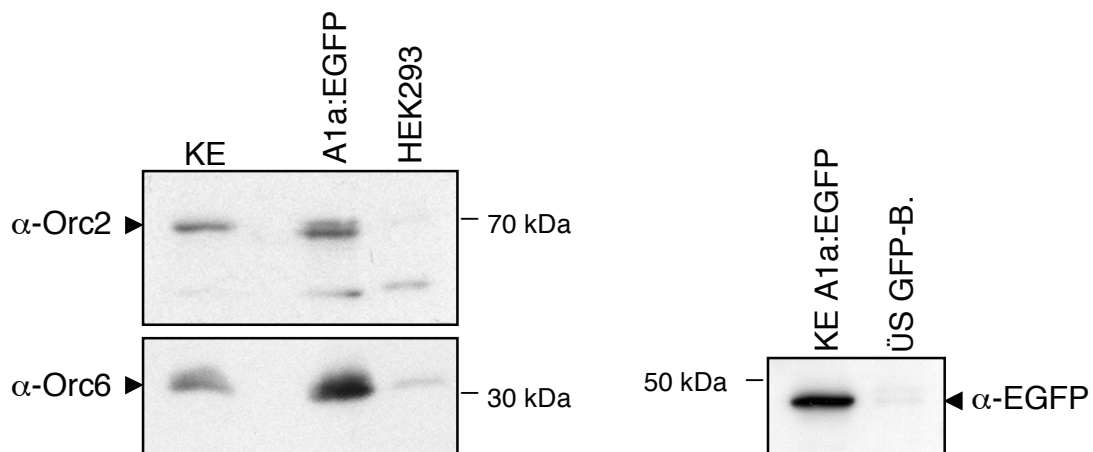


Abb. 4.23: Orc2 und Orc6 co-immunopräzipitieren mit HMGA1a::EGFP. links: KE: 7,5 μ g HEK293-Kernextrakt; A1a:EGFP: GFP-Binder-IP aus HMGA1a::EGFP⁺-HEK293-Kernextrakten; HEK293: GFP-Binder-IP aus HEK293-Kernextrakten. Der Immunoblot wurde durchgeführt mit α -Orc2- bzw. α -Orc6-Antikörpern. Schwarze Pfeilspitzen markieren die Laufhöhe des zu detektierenden Orc2- bzw. Orc6-Proteins. rechts: KE A1a:EGFP: 7,5 μ g HMGA1a::EGFP⁺-HEK293-Kernextrakt. ÜS GFP-B.: 7,5 μ g des Überstandes der GFP-Binder-IP aus HMGA1a::EGFP⁺-HEK293-Kernextrakten. Immunoblot mit einem α -GFP-Antikörper.

4.2.4 HMGA1a-ORC-Interaktionsmotive und Lokalisation

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass HMGA1a mit ORC interagiert. Mein nächstes Ziel war es, Proteindomänen in HMGA1a zu identifizieren, welche die Interaktion zwischen HMGA1a und ORC vermitteln beziehungsweise essentiell sind für die subzelluläre Lokalisation dieser Interaktion.

Wie in Abbildung 4.24 dargestellt, enthält HMGA1a drei „AT-hook“-Motive sowie eine carboxyterminale saure Domäne. Die „AT-hook“-Motive vermitteln die Bindung an AT-reiche DNA-Sequenzen, wohingegen HMGA1a über die saure Domäne Protein-Protein-Interaktionen eingeht (Brocher *et al.*, 2007, Harrer *et al.*, 2004)

Bereits erfolgreich für den Nachweis von HMGA1a-ORC-Interaktionen herangezogen, empfahl sich der „BiFC-Assay“ nicht zuletzt aufgrund der genetischen Manipulierbarkeit für eine Mutationsanalyse der oben dargestellten HMGA1a-Motive. Für die Mutationsanalyse wurden BiFC-YC Konstrukte hergestellt, bei welchen in HMGA1a die saure Domäne beziehungsweise die ersten 30 Aminosäuren, welche den ersten „AT-hook“ umfassen, deletiert sind. Ein weiteres Expressionskonstrukt codierte für die saure Domäne als YC-Fusion. Weiterhin sollte die Bedeutung der „AT-hook“-Motive für die Lokalisation der HMGA1a-ORC-Interaktion analysiert werden. „AT-hook“-Motive zeichnen sich durch eine konservierte Glycin-Arginin-Prolin-Abfolge aus (GRP-Motive). Der zentrale Arginin-Rest innerhalb der HMGA1a-„AT-hooks“ ist hierbei essentiell für die Spezifität des Proteins für AT-reiche DNA. In der Mutante HMGA1a-R3xG sind alle zentralen Arginin-Reste der GRP-Motive (R28, R60 und R86) durch Glycin ersetzt. Dadurch zeigt HMGA1a-R3xG im Vergleich zu Wildtyp HMGA1a eine diffuse nukleäre Lokalisation (Harrer *et al.*, 2004). Inwieweit die Mutation dieser GRP-Motive Einfluss auf die Lokalisation der HMGA1a-ORC-Interaktion nimmt, sollte im „BiFC-Assay“ mit einem Expressionskonstrukt für HA-markiertes HMGA1a-R3xG-YC beantwortet werden. Der Aufbau der entsprechenden HMGA1a-Mutanten ist in Abbildung 4.24 veranschaulicht.

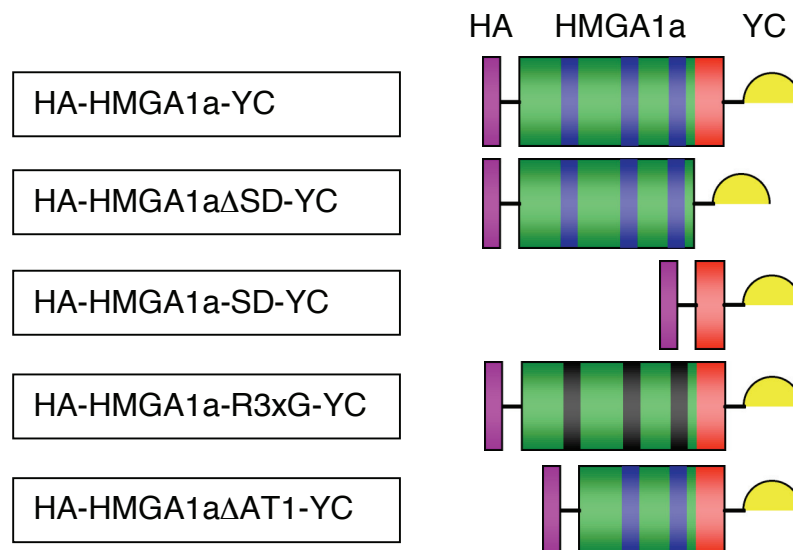


Abb. 4.24: HMGA1a-BiFC-Konstrukte. Zur Bestimmung der HMGA1a-Domänen, welche die ORC-Interaktion sowie die subzelluläre Lokalisation der ORC-HMGA1a-Interaktion vermitteln, wurden folgende HMGA1a-Mutanten als BiFC-YC-Fusionen verwendet: HMGA1a Δ SD: HMGA1a mit Deletion der carboxyterminalen sauren Domäne (Δ 93-107). HMGA1a-SD: saure Domäne von HMGA1a. HMGA1a-R3xG: HMGA1a mit Aminosäuresubstitutionen R28G, R60G, R86G, dargestellt als schwarze „AT-hook“-Domänen. HMGA1a Δ AT1: HMGA1a mit Deletion des ersten „AT-hooks“ (Δ 2-30). Zum Vergleich ist auch Wildtyp-HMGA1a als HA-HMGA1a-YC-Fusion dargestellt.

Die saure Domäne von HMGA1a vermittelt die Interaktion mit Orc6:

Unter Verwendung einer HMGA1a-Mutante, die eine Deletion der carboxyterminalen 15 Aminosäuren und somit der sauren Domäne aufweist (HMGA1a Δ SD), wurde die Bedeutung dieser Protein-Protein-Interaktionsdomäne für die Orc6-Interaktion im „BiFC-Assay“ untersucht. Auf Deckgläschen wachsende HepG2-Zellen wurden mit der Kombination Orc6-YN:HMGA1a Δ SD-YC transfiziert und fixiert (Abbildung 4.25 b-b’’’). In einem parallelen Ansatz wurden mit der Kombination Orc6-YN:HMGA1a Δ SD-YC zusätzlich 150 ng eines Expressionsplasmids für mRFP-Ligase I kotransfiziert (Abbildung 4.25 a-a’’), um *in vivo* auf erfolgreiche Transfektion zu prüfen. Fixierte Zellen wurden mittels Immunlokalisation gegen die HA- beziehungsweise FLAG-markierten Proteine auf erfolgreiche Transfektion und Koexpression untersucht (Abbildung 4.25 b’’-b’’’’). Obwohl die Zellen erfolgreich transfiziert wurden, was anhand der mRFP-Ligase-I-Expression (a’’) und der Koexpression beider BiFC-Konstrukte (b’’-b’’’’) ersichtlich ist, ist kein BiFC-Signal zu detektieren.

Demnach ist die saure Domäne von HMGA1a essentiell für die Interaktion mit Orc6.

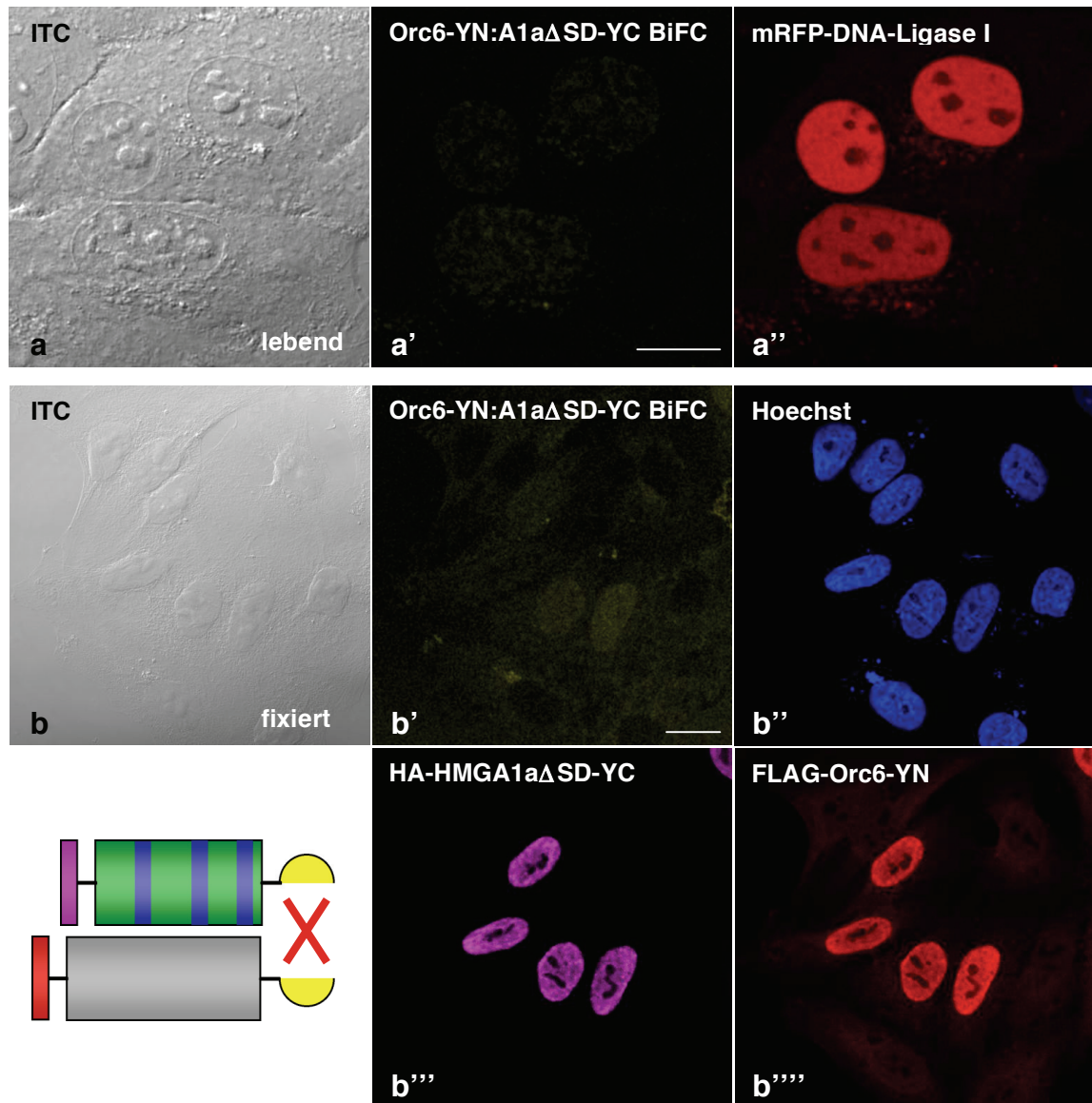


Abb. 4.25: „BiFC-Assay“ Orc6-YN:HMGA1aΔSD-YC. Orc6-YN und HMGA1aΔSD-YC zeigen weder in lebenden (**a'**) noch in fixierten (**b'**) HepG2-Zellen Fluoreszenz-Komplementation. **a** und **b**: Korrespondierende Interferenz-Kontrast-Aufnahmen. **a-a''**: HepG2-Zellen wurden zusätzlich zu den BiFC-Plasmiden mit 150 ng mRFP-Ligase-I-Expressionsvektor kotransfiziert. **b'''** und **b''''**: Immunolokalisation von HA-markiertem HMGA1aΔSD-YC bzw. FLAG-markiertem Orc6-YN. Die Eichstriche (weiß) entsprechen 10 μ m. Zusätzlich links als Grafik dargestellt sind die BiFC-Konstrukte HA-HMGA1aΔSD-YC (oben) und FLAG-Orc6-YN (unten in Grau). Größenrelationen zwischen HMGA1a und Orc6 sind aufgrund der Darstellbarkeit nicht berücksichtigt.

Transfektion der Kombination Orc6-YN:HMGA1a-SD-YC sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit die saure Domäne ausreichend ist, um Orc6-HMGA1a-Interaktion zu vermitteln. In lebenden transfizierten HepG2-Zellen ist Fluoreszenz-Komplementation zu verzeichnen, wenn die saure Domäne von HMGA1a als Fusion an das YC-Fragment zusammen mit Orc6-YN exprimiert wird (Abbildung 4.26 a' und b'). Die im BiFC beobachtete Lokalisation weist im Vergleich zur Interaktion mit Wildtyp-HMGA1a eine andere Verteilung im Kern auf. Die BiFC-Komplexe sind circa 22 Stunden nach Transfektion zunächst nukleolär, was anhand einiger Nukleoli der oberen HepG2-Zelle in Abbildung 4.26 b' zu beobachten ist (rote Pfeilspitzen). Über den Verlauf von weiteren vier bis sechs Stunden bilden die BiFC-Komplexe Aggregate, welche die Nukleoli durchziehen (Abbildung 4.26 a' und b'; weiße Pfeilspitzen).

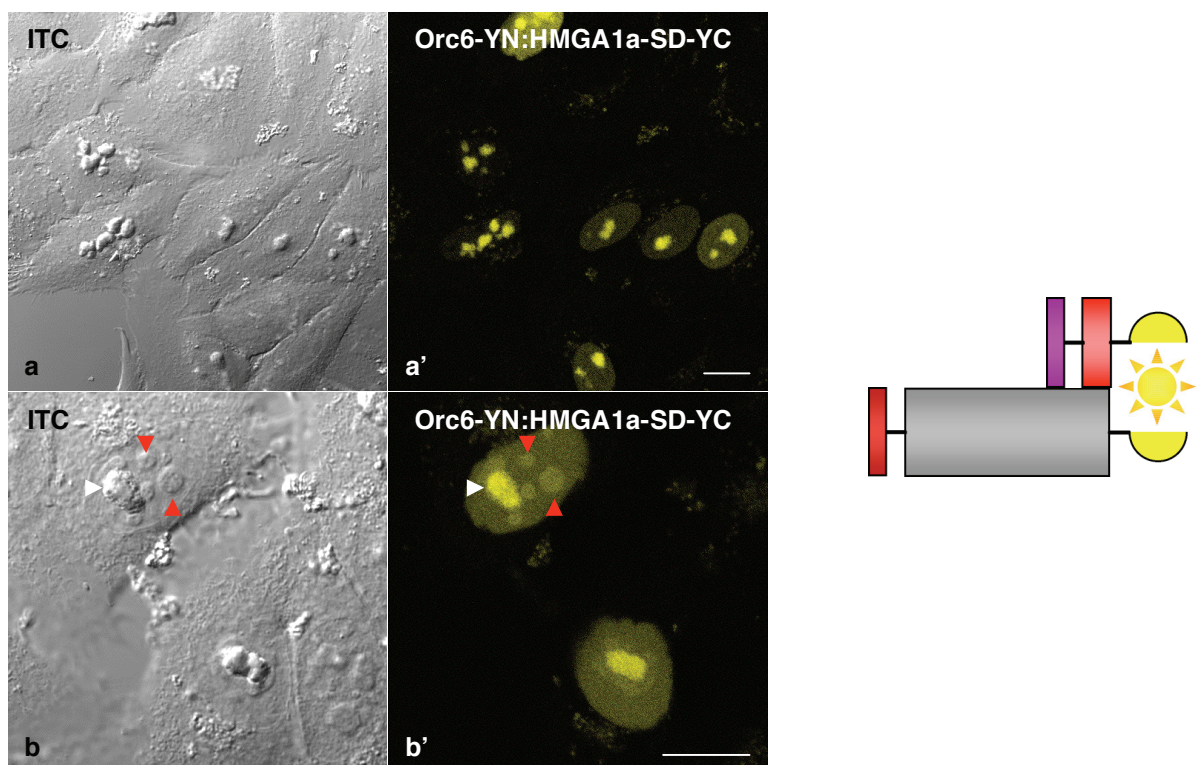


Abb. 4.26: „BiFC-Assay“ Orc6-YN:HMGA1a-SD-YC. Orc6-YN und HMGA1a-SD-YC zeigen Fluoreszenz-Komplementation in lebenden HepG2-Zellen (a' und b'). a und b: korrespondierende Interferenz-Kontrast-Aufnahmen. Die Eichstriche (weiß) entsprechen 10 μm . Zusätzlich als Grafik dargestellt sind die BiFC-Konstrukte HA-HMGA1a-SD-YC (oben) und FLAG-Orc6-YN (unten, in Grau). Größenrelationen zwischen HMGA1a-SD und Orc6 sind nicht berücksichtigt.

Demnach vermittelt die saure Domäne von HMGA1a die Interaktion mit Orc6, nicht jedoch deren Lokalisation. Diese wird folgerichtig nicht durch Orc6 sondern durch die aminoterminalen 92 Aminosäuren von HMGA1a festgelegt.

HMGA1a-„AT-hook“-Motive und HMGA1a-Orc6-Interaktion:

Die „AT-hook“-Motive sind essentiell für die Lokalisation von HMGA1a *in vivo* (Harrer *et al.*, 2004). Inwieweit diese Motive Einfluss auf die Lokalisation der HMGA1a-ORC-Interaktion nehmen, wurde anhand der HMGA1a-R3xG-Mutante beantwortet. Wie erwartet, zeigen Orc6-YN:HMGA1a-R3xG-YC-exprimierende Zellen Fluoreszenz-Komplementation. Das BiFC-Signal weist eine deutlich diffusere Verteilung auf im Vergleich zur Situation mit Wildtyp-HMGA1a (Abbildung 4.27 a'). Somit ist die Integrität der „AT-hook“-Motive mit ausschlaggebend für die charakteristische HMGA1a:Orc6-Lokalisation, aber nicht für die Interaktion zwischen HMGA1a und Orc6.

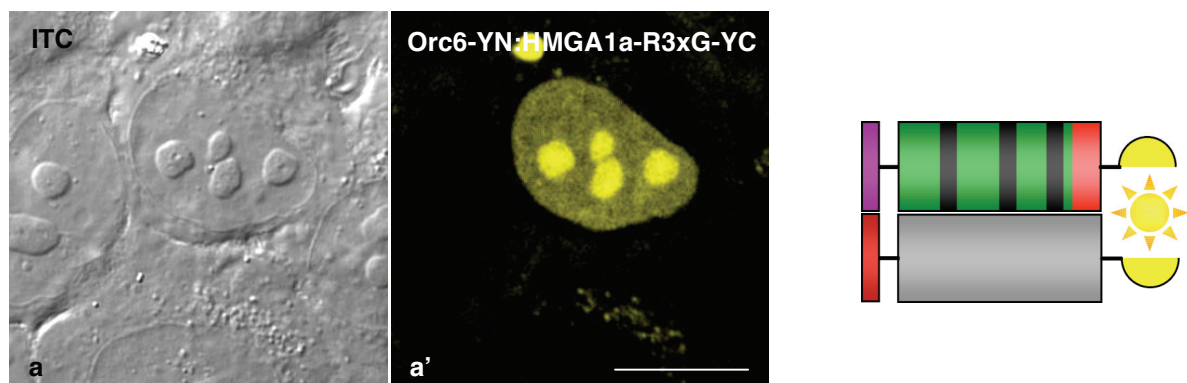


Abb. 4.27: „BiFC-Assay“ Orc6-YN:HMGA1a-R3xG-YC. Orc6-YN und HMGA1a-R3xG-YC zeigen Fluoreszenz-Komplementation in lebenden HepG2-Zellen (a'). a: Korrespondierende Interferenz-Kontrast-Aufnahme. Der weiße Eichstrich entspricht 10 µm. Zusätzlich als Grafik dargestellt sind die BiFC-Konstrukte HA-HMGA1a-R3xG-YC (oben) und FLAG-Orc6-YN (unten, in grau).

HMGA-Proteine nehmen erst nach Bindung von Substraten wie DNA oder anderen Proteinen eine definierte Faltung an (Reeves, 2001). Demnach ist auszuschließen, dass eine inkorrekte Faltung, hervorgerufen durch die Aminosäuresubstitutionen innerhalb des HMGA1a-Proteins, für die veränderte Lokalisation des BiFC-Komplexes verantwortlich ist. Um in einem unabhängigen Experiment die „AT-hook“-Motive als bestimmende Elemente für die Lokalisation der Orc6:HMGA1a-Interaktion zu charakterisieren, wurde der bei Hoechst entwickelte Farbstoff H33342

verwendet. H33342 wird häufig als Alternative zu DAPI zur Färbung von DNA verwendet, bindet bevorzugt an AT-reiche Sequenzen und konkurriert so mit HMGA1a um Bindestellen im Chromatin. Mit dieser Eigenschaft des Hoechstfarbstoffes 33342 lässt sich somit untersuchen, ob die HMGA1a-„AT-hook“-Motive zur spezifischen Lokalisation der Orc6-HMGA1a-Interaktion beitragen. Wie in Kapitel 4.2.3 durch „BiFC-Assays“ und Immunolokalisationen gezeigt, kolokalisiert HMGA1a mit ORC an AT-reichen DNA-Bereichen, welche die Nukleoli umgeben. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die AT-reiche α -Satelliten-DNA im perizentrischen Heterochromatin. Um diese Bereiche als Heterochromatin auszuweisen, wurden Kolokalisations-Experimente mit dem Heterochromatin-Marker HP1 α angestellt. HP1 α bindet über seine Chromodomäne an di- und trimethyliertes Lysin 9 in Histon H3, welches vor allem in nicht-transkribierten Chromatin-Bereichen zu finden ist. Hierzu wurden HepG2-Zellen mit der Kombination Orc6-YN:HMGA1a-YC und einem mRFP-HP1 α -Expressionskonstrukt kotransfiziert. Circa 26 Stunden nach Transfektion wurden die auf Deckgläschen gewachsenen transfizierten HepG2-Zellen für ein beziehungsweise zehn Minuten mit dem Hoechstfarbstoff 33342 (5 μ g/ml) inkubiert. Das BiFC-Signalmuster wurde daraufhin mit dem HP1 α - und dem Hoechst-Muster verglichen (Abbildung 4.28).

Nach einminütiger Inkubation mit Hoechst 33342 kolokalisiert der HMGA1a-Orc6-BiFC-Komplex in transfizierten HepG2-Zellen weitestgehend mit den von Hoechst 33342 gefärbten AT-reichen DNA-Bereichen (4.28-1b). Dies ist anhand der türkis gefärbten Bereiche in Abbildung 4.28-1f zu erkennen. Zudem ist eine signifikante Kolokalisation des BiFC-Signals mit mRFP-markierten HP1 α anhand gelber beziehungsweise weißlicher Färbung in 4.28-1e/g zu beobachten. Da Hoechst 33342 mit HMGA1a um Bindungsstellen konkurriert, findet nach zehnminütiger Inkubation mit 5 μ g/ml Hoechst 33342, in den transfizierten HepG2-Zellen eine teilweise Relokalisation des HMGA1a:Orc6-BiFC-Signals in die Nukleoli statt (gelbliche Bereiche in 4.28-2b/3b/3d, beziehungsweise grünliche Bereiche in 4.28-2e/2f).

Das BiFC-Signal Orc6:YN-HMGA1a-YC lokalisiert im perizentrischen Heterochromatin:

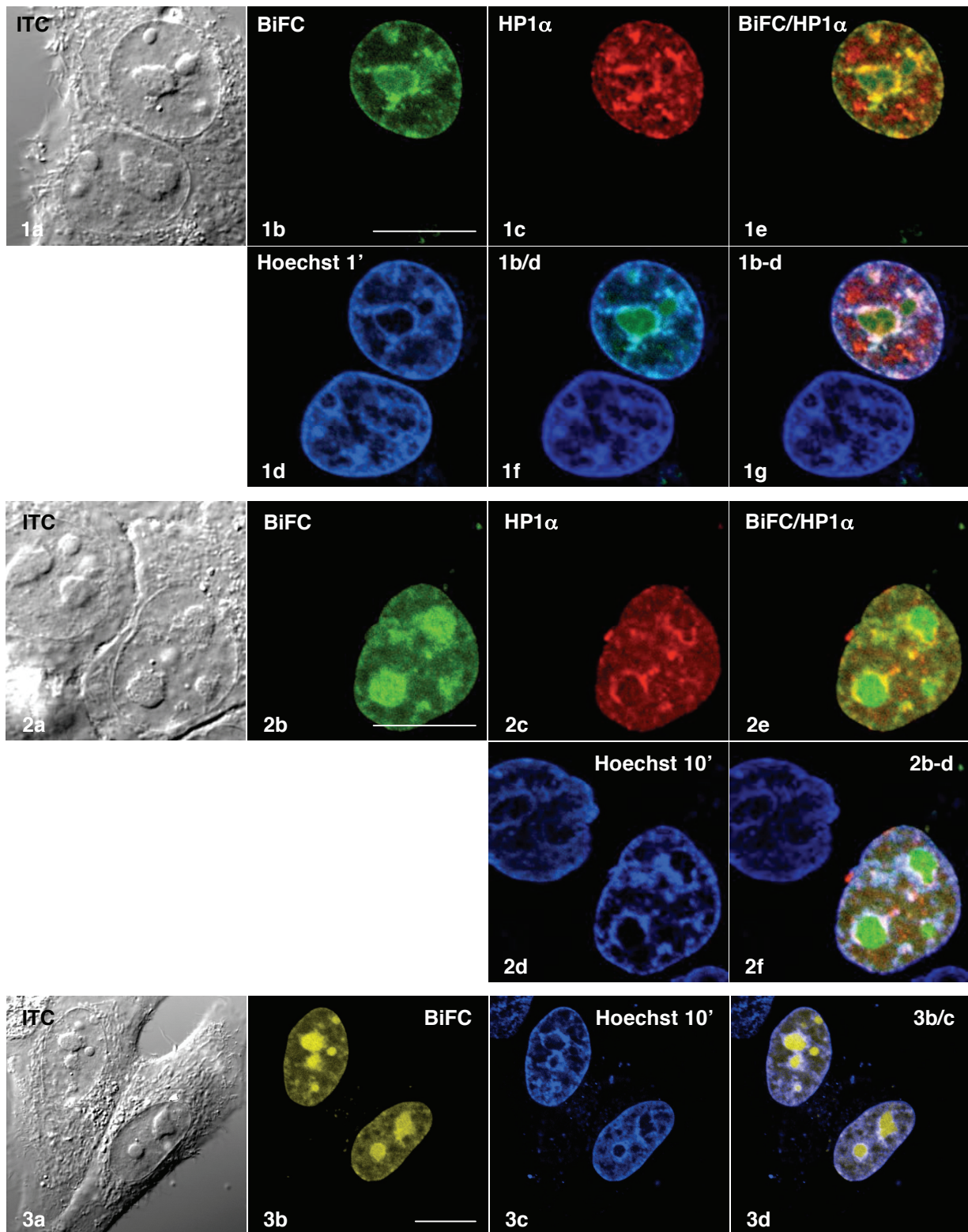


Abb. 4.28: „AT-hook“-Motive und HMGA1a-ORC6-Interaktion. Legende auf nächster Seite.

Abb. 4.28: „AT-hook“-Motiv-Abhängigkeit der HMGA1a-ORC6-Interaktion. HMGA1a-YC:Orc6-YN-BiFC nach Inkubation der Zellen in Hoechst 33342 (5 µg/ml) für eine Minute (**1b**), bzw. zehn Minuten (**2b/3b**). Korrespondierende Hoechst-Färbungs- (**1d, 2d, 3c**) und Interferenz-Kontrast-Aufnahmen (**1a, 2a, 3a**). Koexprimiertes mRFP-HP1 α in **1c** und **2c**. Kolokalisation der Hoechst-Färbung und des BiFC-Signals in **1f** und **3d** nach ein- bzw. zehnminütiger Hoechst-Inkubation. Kolokalisation des mRFP-markierten-HP1 α und des BiFC-Signals in **1e** und **2e**. Kolokalisation des mRFP-markierten-HP1 α , der Hoechst-Färbung und des BiFC-Signals in **1g** und **2f** nach ein- bzw. zehnminütiger Hoechst-Inkubation.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass die HMGA1a-„AT-hook“-Motive für die Lokalisation des HMGA1a-Orc6-Komplexes in AT-reichen heterochromatischen Bereichen verantwortlich sind.

Orc6 interagiert mit dem nukleolären Protein Pes1:

Dass HMGA1a nach Mutation der „AT-hook“-Motive oder nach Competition mit Hoechst 33342 nicht mehr an AT-reiche DNA binden kann, würde eine diffuse nukleäre Lokalisation des BiFC-Signals erklären, nicht jedoch die beobachtete nukleoläre Lokalisation.

Zu den Funktionen, welche das Orc6-Protein in humanen Zellen bei der DNA-Replikation, der Chromosomen-Segregation und Zytokinese erfüllt (Prasanth *et al.*, 2002), übt Orc6p in *Saccharomyces cerevisiae* (ScOrc6p) darüber hinaus Funktionen bei der Ribosomenbiogenese aus (Du und Stillman, 2002, Killian *et al.*, 2004, Prasanth *et al.*, 2002). ScOrc6p wurde als interagierendes Protein des Hefe-Pescadillo-Homologen-Proteins Yph1p beschrieben. Das humane Pescadillo-Protein (Pes1) sowie Yph1p sind vorwiegend nukleolär lokalisiert und essentiell für die Biogenese der 60S-Ribosomen-Untereinheit (Grimm *et al.*, 2006, Rohmoser *et al.*, 2007). Eine Interaktion von humanem Orc6 mit Pes1 wäre eine mögliche Erklärung für die nukleoläre Lokalisation des Orc6:HMGA1a-BiFC-Signals nach Mutation der „AT-hook“-Motive oder nach Competition mit Hoechst 33342. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ebenfalls der „BiFC-Assay“ verwendet. Ein HA-Pes1-YC-Expressionskonstrukt wurde von Michaela Rohmoser (GSF) zur Verfügung gestellt. Mit der Kombination Orc6-YN:Pes1-YC transfizierte Zellen zeigen Fluoreszenz-Komplementation (Abbildung 4.29 a'). Das BiFC-Signal ist ausschließlich nukleolär und dort mit der Proteinkomponente des Nukleolus

assoziiert. Dies ist an den Chromatin/RNA-Aussparungen des BiFC-Signals im Nukleolus zu erkennen.

Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass nach Mutation der HMGA1a-„AT-hook“-Motive das Orc6:HMGA1a-BiFC-Signal aufgrund der Interaktion von Orc6 mit Komponenten des Ribosomenbiogenese-Vorgangs nukleolär lokalisiert.

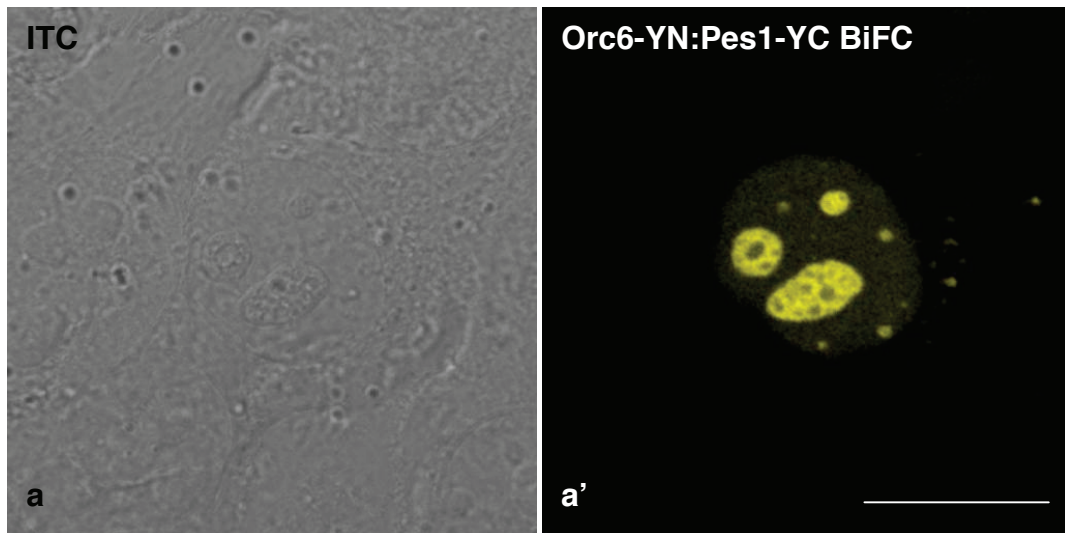


Abb. 4.29: „BiFC-Assay“ **Orc6-YN:Pes1-YC**. Orc6-YN und Pes1-YC zeigen Fluoreszenz-Komplementation in lebenden HepG2-Zellen (**a'**). **a**: korrespondierende Interferenz-Kontrast-Aufnahme. Der Eichstrich (weiß) entspricht 10 μm .

HMGA1a interagiert direkt mit dem Orc1-6-Holokomplex:

Die BiFC-Experimente mit HMGA1a und den ORC-Untereinheiten Orc1 und Orc6 sowie die Co-IP-Studien ließen eine direkte Interaktion von HMGA1a mit ORC vermuten. Dies sollte anhand von Komplexbildungen zwischen rekombinantem HMGA1a und ORC in Glycerin-Dichtegradienten nachgewiesen werden. Hierfür wurde humaner ORC in Baculoviren und HMGA1a in Bakterien exprimiert und gereinigt. Während des Zellaufschlusses von *E. coli* Rosetta(*DE3*)-(pLysS), welche carboxyterminal Strep-Tag-II-markiertes HMGA1a (HMGA1a::ST) exprimierten, neigte HMGA1a::ST trotz Zugabe von Protease-Inhibitoren zur Degradation. Nach Säurepräzipitation und Strep-Tactin-Affinitätschromatographie erhielt ich gereinigtes HMGA1a::ST, welches partiell aminoterminal degradiert war. Die ORC-Untereinheiten Orc1, Orc4 und Orc6 wurden als 6fach-Histidin-Fusionsproteine zusammen mit Orc2, Orc3 und Orc5 in *BTI-TN5B1-4* („High Five“-Insektenzellen, Invitrogen) koexprimiert und über Ni-NTA-Agarose-Säulen gereinigt. Dem gereinigtem ORC wurde substöchiometrisch gereinigtes rekombinantes HMGA1a::ST zugesetzt und nach 30-minütiger Inkubation auf einen 10–30-prozentigen Glycerin-Dichtegradienten geladen. Nach 20 Stunden Zentrifugation bei 170000 x g wurde der Gradient in elf Fraktionen aufgeteilt. Die erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und einer Silberfärbung (Abbildung 4.30) beziehungsweise Immunoblot-Analysen unterzogen (Abbildung 4.31).

Die Dichtegradienten-Analyse wurde insgesamt vier Mal wiederholt und die erhaltenen Fraktionen wiesen eine reproduzierbare Zusammensetzung aus HMGA1a::ST-Protein und ORC-Untereinheiten auf. Die Abbildungen 4.30 und 4.31 zeigen repräsentative Beispiele der Dichtegradienten-Analysen. Die Zusammensetzungen der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

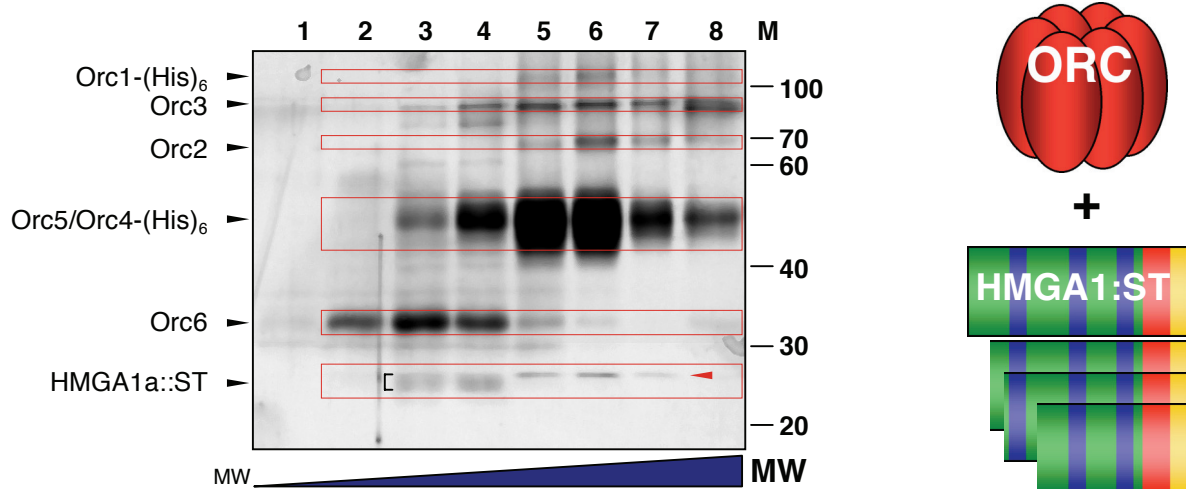


Abb. 4.30: HMGA1a::ST-ORC-Komplexe in Dichtegradienten. Fraktionen 1–8 (niedrige bis höhere Dichte) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen. Schwarze Pfeilspitzen markieren die Laufhöhen der rekombinanten Proteine, welche zusätzlich rot eingerahmt sind. Partiiell degradiertes HMGA1a::ST ist durch ein offenes Rechteck und Volllängen-HMGA1a durch eine rote Pfeilspitze gekennzeichnet. Die rechte Grafik zeigt stark vereinfacht das Proteingemisch, welches auf den Glycerin-Dichtegradienten geladen wurde.

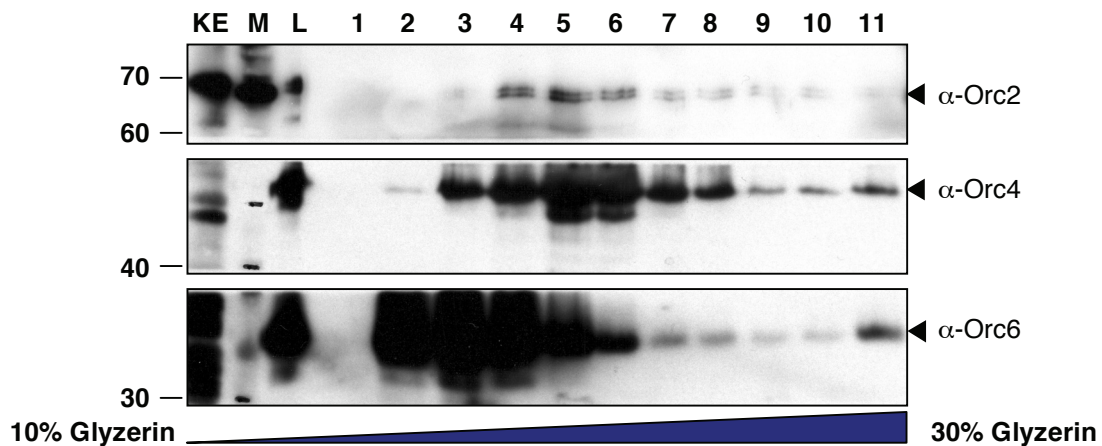


Abb. 4.31: Western-Blot-Analyse der Dichtegradienten-Fraktionen. Fraktionen 1-11 (niedrige bis höhere Dichte) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Schwarze Pfeilspitzen markieren die Laufhöhen der mit α -Orc2-, α -Orc4- und α -Orc6-Antikörpern detektierten rekombinanten Proteine. In „L“ wurde 1 % des über den Dichtegradienten separierten Proteingemisches aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Protein-Standard (M) und 5 μ g eines HEK293-Kernextraktes aufgetragen (KE).

| Fraktion | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------------------------|---|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| Orc1-(His) ₆ | - | - | - | - | + | +++ | + | - |
| Orc2 | - | - | (+) | ++ | +++ | ++ | + | + |
| Orc3 | - | - | + | ++ | +++ | ++ | ++ | + |
| Orc4-(His) ₆ | - | (+) | ++ | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| Orc5 | - | ? | ? | ? | ! | ! | ! | ? |
| Orc6-(His) ₆ | - | ++ | +++ | +++ | + | + | (+) | (+) |
| HMGA1a::ST | - | (+)* | ++* | +++* | ++ | ++ | + | - |

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der Dichtegradienten-Fractionen. In dieser Tabelle sind die Ergebnisse aller Dichtegradienten-Experimente und Western-Blot-Analysen berücksichtigt. Das Auftreten von Vollängen-HMGA1a::ST ist durch ein rotes „+“, die Präsenz von partiell degradiertem HMGA1a::ST durch „*“ gekennzeichnet. „-“: Protein nicht detektierbar; „(+“: Protein schwach detektierbar; „+“ bis „+++“: Protein mäßig bis sehr abundant. Rote Einrahmungen markieren das Auftreten von Vollängen-HMGA1a::ST mit Orc1-(His)₆. „!“: von dem Vorhandensein von Orc5 in diesen Fraktionen kann ausgegangen werden.

Die im Labor vorhandenen α -Strep-Tag-II- und α -HMGA1a-Antikörper waren für Western-Blot-Analysen nicht geeignet. Glycerin-Dichtegradienten-Experimente mit ORC ohne rekombinantes HMGA1a::ST bestätigten jedoch, dass es sich bei dem in Abbildung 4.30 angefärbten Protein um HMGA1a::ST handelt. Rekombinantes HMGA1a ist durch Silberfärbung zusammen mit anderen ORC-Untereinheiten in Fraktionen höherer Dichte nachzuweisen, was eine Komplexbildung von HMGA1a mit ORC-Untereinheiten und somit eine direkte Interaktion impliziert (Abbildung 4.30 sowie Tabelle 4.2, Fraktionen 3-7). Dass HMGA1a::ST trotz partieller Degradation mit anderen ORC-Untereinheiten assoziiert, ist durch die Beobachtungen in BiFC-Experimenten zu erklären. Solange die carboxyterminale saure Domäne von HMGA1a intakt ist, kommt es zur Fluoreszenz-Komplementation mit Orc6. Da HMGA1a über den carboxyterminalen Strep-Tag II gereinigt wurde, enthält partiell degradiertes HMGA1a::ST dennoch die saure Domäne, welche eine Assoziation mit Orc6 zulässt (angedeutet in der Grafik in Abbildung 4.30). Auf das Vorhandensein von Orc5 kann nur indirekt geschlossen werden, da Orc1 nicht in einen Komplex mit

anderen Orc-Untereinheiten eintritt sofern Orc5 nicht präsent ist (Tabelle 4.2, „!“)
(Ranjan und Gossen, 2006).

Daraus lässt sich schließen, dass HMGA1a in den Fraktionen 5–7 (Abbildung 4.30)
mit einem Orc1-6-Holokomplex assoziiert.

Ein aminoterminaleres Motiv in HMGA1a vermittelt die Interaktion mit Orc1:

Das Auftreten von Vollängen-HMGA1a::ST in den Dichtegradienten-Analysen
korrelierte stets mit der Präsenz von 6fach-Histidin-markiertem Orc1-Protein.
Nachdem in BiFC-Experimenten auch Fluoreszenz-Komplementation zwischen Orc1
und HMGA1a zu beobachten war und Orc1 auch in Co-IPs mit HMGA1a-
Fusionsproteinen auftrat, lag die Vermutung nahe, dass HMGA1a über ein
aminoterminaleres Motiv mit Orc1 assoziiert ist. Dies sollte in einem BiFC-Experiment
unter Verwendung einer aminoterminalen Deletionsmutante von HMGA1a
(HMGA1a Δ AT1) beantwortet werden.

HepG2-Zellen wurden zusätzlich zu der Kombination Orc1-YN:HMGA1a Δ AT1-YC mit
einem mRFP-DNA-Ligase-I-Expressionskonstrukt kotransfiziert und auf Fluoreszenz-
Komplementation hin untersucht. Keine der untersuchten mRFP-Ligase-
exprimierenden Zellen zeigte Fluoreszenz-Komplementation (Abbildung 4.32 a' und
b').

Dies lässt vermuten, dass ein aminoterminaleres Motiv von HMGA1a die Assoziation
mit Orc1 vermittelt.

Orc1-BiFC-Experimente waren stets schwer durchzuführen, da HepG2-Zellen die
Expression von Orc1 schlecht tolerieren oder Orc1 trotz erfolgreicher Transfektion
nicht exprimieren. Humanes Orc1 lässt sich nicht rekombinant gewinnen, ohne
weitere ORC-Untereinheiten zu koexprimieren (Manfred Gossen, persönliche
Mitteilung). Daher wäre eine mögliche Erklärung für die beobachtete schlechte
Nachweisbarkeit des FLAG-Orc1-YN-Konstruktes, dass bei konstantem Niveau der
anderen ORC-Untereinheiten keine stabile Expression von exogenem Orc1 möglich
ist. Zudem unterliegt das Protein-Niveau von endogenem Orc1 durch proteolytischen
Abbau während der S-Phase sowie durch Regulation auf Transkriptionsebene der
Zellzyklus-Kontrolle (DePamphilis, 2003). Somit scheint die Menge an vorhandenem

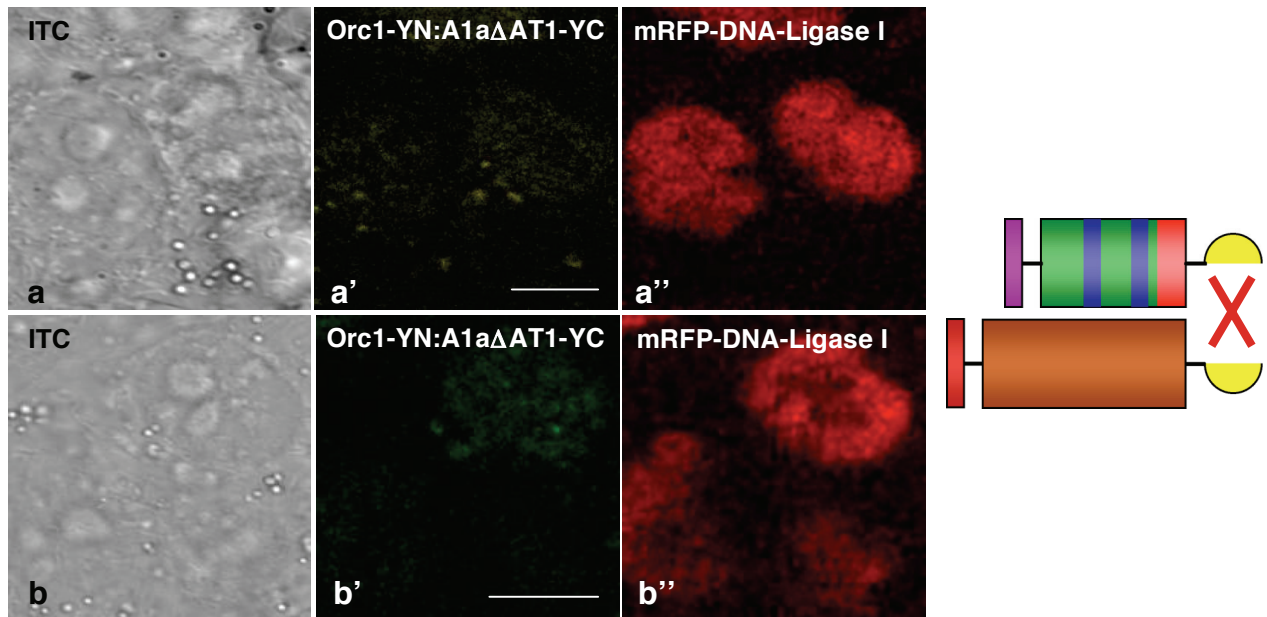


Abb. 4.32: „BiFC-Assay“ Orc1-YN:HMGA1aΔAT1-YC. Orc6-YN und HMGA1aΔAT1-YC zeigen keine Fluoreszenz-Komplementation in lebenden HepG2-Zellen (**a'/b'**). **a** und **b**: korrespondierende Interferenz-Kontrast-Aufnahmen. HepG2-Zellen wurden zusätzlich zu den BiFC-Plasmiden mit 150 ng mRFP-Ligase-I-Expressionsvektor kotransfiziert (**a''/b''**). Die Eichstriche (weiß) entsprechen 10 μm . Zusätzlich als Grafik dargestellt sind die BiFC-Konstrukte HA-HMGA1aΔAT1-YC (oben) und FLAG-Orc1-YN (unten, in Braun). Größenrelationen zwischen HMGA1a und Orc1 sind aufgrund der Darstellbarkeit nicht berücksichtigt.

Orc1-Protein ein kritischer Faktor für das Überleben von Zellen zu sein, welcher durch das Einbringen von exogenem Orc1-YC über hCMV-Promotor-getriebene Expression dereguliert ist (DePamphilis, 2003).

Die Experimente aus Kapitel 4.2 lassen den Schluss zu, dass HMGA1a in humanen Zellen mit einem Orc1-6-Holokomplex interagiert. Die saure Domäne von HMGA1a vermittelt hierbei die Interaktion mit Orc6 und ein aminoterminales HMGA1a-Motiv die Interaktion mit Orc1. Darüber hinaus bestimmen die HMGA1a-„AT-hook“-Motive die subzelluläre Lokalisation des HMGA1a-ORC-Komplexes in AT-reichen Heterochromatin-Regionen.

4.3 HMGA1a-abhängige ORC-Rekrutierung

Aus den vorangegangenen Kapiteln geht hervor, dass HMGA1a als Fusion an DNA-Bindedomänen die extrachromosomale Replikation von Plasmiden unterstützt, sofern diese Sequenzmotive tragen, welche von den DNA-Bindedomänen gebunden werden. Dies ging im Falle von *oriP*-Plasmiden mit der Ausbildung eines preRCs am Bindungsort einher (Kapitel 4.1). Zudem wurde aufgezeigt, dass HMGA1a direkt mit ORC interagiert (Kapitel 4.2). Dies lässt vermuten, dass HMGA1a durch Interaktion mit ORC diesen an DNA rekrutieren kann und so das Binden von ORC spezifiziert. Im folgenden Abschnitt wird dieses Modell anhand von ChIP-Experimenten auf extrachromosomalen Plasmiden bestätigt und anhand von BiFC-Experimenten auf eine globale Ebene übertragen.

4.3.1 HMGA1a-Dosis-abhängige Rekrutierung von ORC

Das DS-Element von *oriP* enthält zwei Bindemotive, die direkt oder indirekt zur Rekrutierung von ORC beitragen. Die EBNA1-Bindestellen innerhalb des DS-Elementes vermitteln durch die Interaktion zwischen EBNA1 und ORC die Rekrutierung von ORC an DS (Schepers *et al.*, 2001). Der Telomerenfaktor TRF2 bindet ein weiteres Element des DS, die „nonamer repeats“, und vermittelt ORC-Rekrutierung auf dieselbe Weise wie EBNA1 (Atanasiu *et al.*, 2006) (siehe Kapitel 1.5). In Abschnitt 4.1 wurde gezeigt, dass HMGA1a::EBNA1-DBD die Ausbildung eines lizensierbaren preRCs an *oriP* unterstützt. Inwieweit HMGA1a hierzu in der Lage ist, ohne weitere DNA-Elemente die kooperativ zur ORC-Rekrutierung beitragen können, wurde anhand von α -Orc3-ChIP-Experimenten auf FR/tetO-Hybridvektoren überprüft. Hierzu wurde in dem Hygromycin-Resistenz vermittelnden *oriP*-Plasmid p3230 das DS-Element durch Tet-Operatoren ersetzt. Integriert wurden *tetO*-Motive DS-ähnlicher Struktur mit 4, 8, 16 beziehungsweise 32 Tet-Repressor-Bindestellen. Diese Hybridvektoren wurden wie auch das *oriP*-Plasmid p3230 separat in EBNA1⁺/scTetR::HMGA1a⁺-HEK293-Zellen transfiziert. Nach zwei bis drei Wochen Selektion auf Hygromycin-Resistenz wurden die transfizierten Zellen mit Formaldehyd fixiert, fragmentiertes Chromatin isoliert und einer α -Orc3-

Immunopräzipitation unterzogen. Als Negativkontrolle diente eine Immunopräzipitation (IP) mit Prä-Immunsereum. Die Orc3-Präsenz an DS beziehungsweise an der *tetO*-Integrationsstelle wurde mittels quantitativer PCR bestimmt und mit der Anreicherung an den Kontrollregionen KL1 und KL2 verglichen (Abbildung 4.33). Wie erwartet ist Orc3 relativ zu den Kontroll-Loci KL1 und KL2 reproduzierbar am DS-Lokus angereichert. Relativ zu den Referenzloci ist im Falle von vier integrierten Tet-Operatoren keine signifikante Anreicherung von Orc3 an der Integrationsstelle festzustellen. Eine zunehmende Anzahl an integrierten Tet-Operatoren resultiert jedoch in einer vermehrten Rekrutierung des Orc3-Proteins an die Integrationsstelle, welche im Falle von 32 integrierten Tet-Operatoren mit einer 8fachen ortsspezifischen Anreicherung an das *oriP*-Niveau heranreicht.

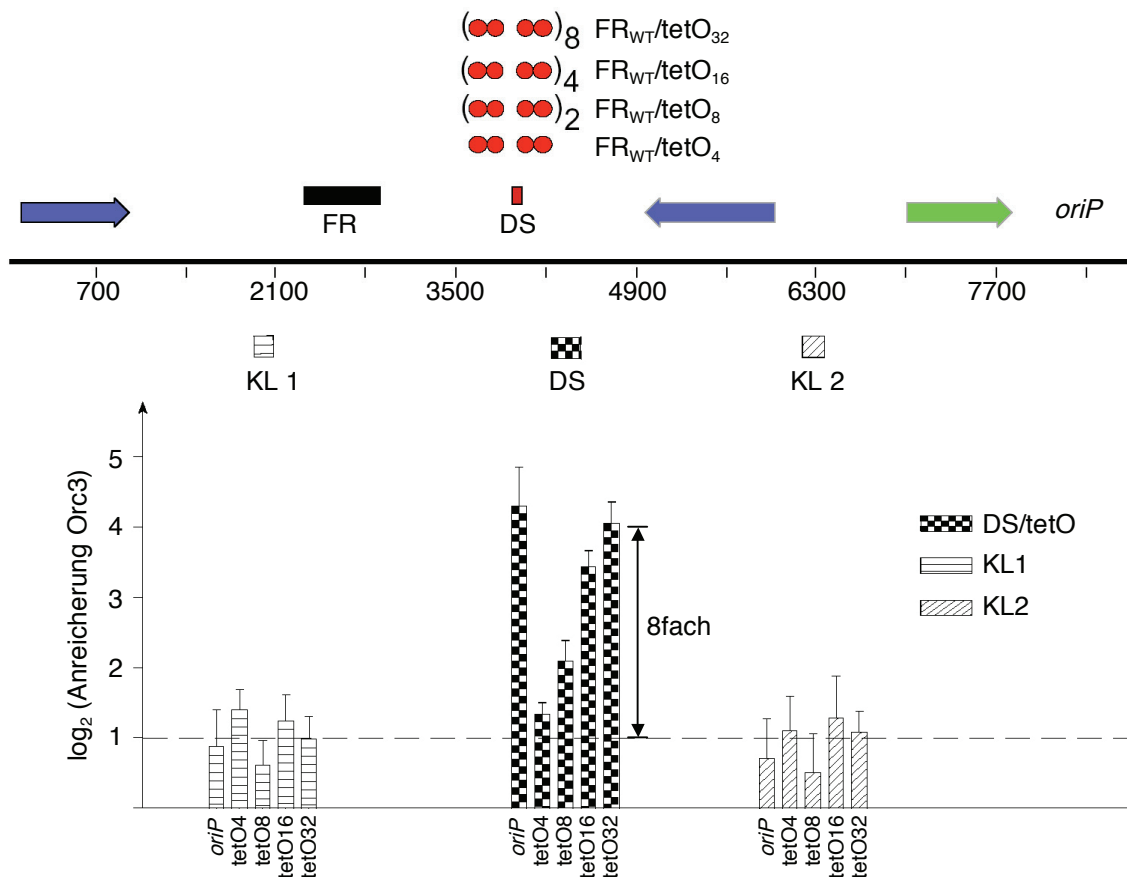


Abb. 4.33: HMGA1a rekrutiert dosisabhängig Orc3. **Oben:** Linearisierte Plasmidkarte des *oriP*-Wildtyp-Plasmides p3230. Das DS-Element wurde durch 4/ 8/ 16 und 32 Tet-Repressor-Bindestellen ersetzt. **Unten:** ChIP-Experiment: Auf einer logarithmischen Skala ist die Anreicherung der präzipitierten DNA gezeigt, welche mit einem α -Orc3-Antikörper relativ zum pre-Immunsereum erzielt wurde. Diese Anreicherung wurde an zwei Kontroll-Loci (KL1 und KL2, horizontal bzw. schräg gestreifte Säulen) sowie an DS bzw. den Tet-Operatoren (DS, karierte Säulen) bestimmt. Die Fehlerbalken resultieren aus drei unabhängigen Experimenten.

Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass HMGA1a ORC an DNA rekrutieren kann. Ob diese vermehrte Rekrutierung von ORC an DNA zur Ausbildung eines funktionellen Replikationsursprunges beiträgt, sollte zunächst anhand der Replikationskompetenz der Hybridvektoren untersucht werden.

Hierzu wurde ein Teil der für das ChIP-Experiment mit Hybridvektoren und p3230 transfizierten Zellen für eine HIRT-Extraktion herangezogen. Die präparierte DNA wurde wie in Abschnitt 4.1 beschrieben aufbereitet und einer Southern-Blot-Analyse unterzogen. Anhand des Southern Blots ist zu erkennen, dass alle Hybridplasmide extrachromosomal erhalten wurden (Abbildung 4.34). Zudem ist mit steigender Anzahl an integrierten Tet-Repressor-Bindestellen eine Zunahme der Signalintensität im Southern Blot zu verzeichnen, was auf eine gesteigerte Replikationskompetenz der Hybridplasmide schließen lässt.

Die gesteigerte Replikationskompetenz der Hybridplasmide lässt vermuten, dass HMGA1a zu einer funktionellen Rekrutierung von ORC im Sinne der Ausbildung von Replikationsursprüngen führt.

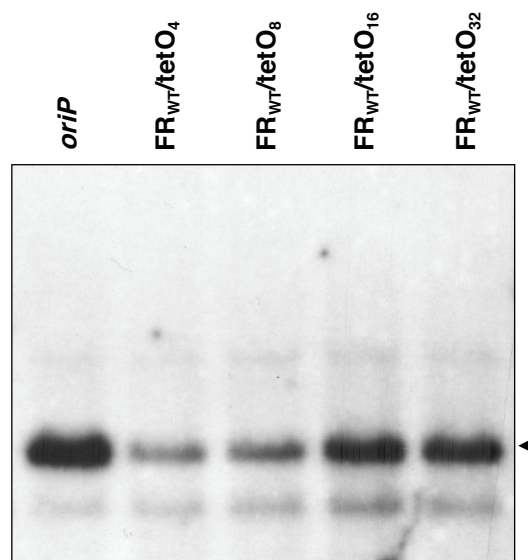


Abb. 4.34: Plasmid-Replikations-Experimente. Southern-Blot-Detektion der in EBNA1⁺/scTetR::HMGA1a⁺HEK293-Zellen replizierten linearisierten Plasmide p3230 (*oriP*) und FR_{WT}/*tetO*₄₋₃₂. Die Laufhöhe der Plasmide ist angedeutet durch die schwarze Pfeilspitze.

4.3.2 Globale ORC-Lokalisierung durch HMGA1a

Wie in Abschnitt 4.3 dargelegt wurde, kann HMGA1a ORC an extrachromosomale DNA rekrutieren, sofern HMGA1a lokal in höherer Konzentration vorliegt. Auf eine globale Ebene übertragen, könnte HMGA1a durch die DNA-Bindeeigenschaften seiner „AT-hook“-Motive ORC in AT-reiche Chromatindomänen rekrutieren (Kapitel 4.2), um dort zur Ausbildung von Replikationsursprüngen beizutragen. Nachdem ORC-Untereinheiten auch in Kernregionen lokalisieren, in denen kein HMGA1a-Protein zu finden ist, setzt das globale Modell voraus, dass ein ausgewogenes Verhältnis zwischen dem ORC- und HMGA1a-Protein-Niveau existieren muss, sodass eine angemessene Verteilung von ORC innerhalb des Zellkerns möglich ist. Durch Überexpression von exogenem HMGA1a stört man dieses Verhältnis, womit alternative Mechanismen der ORC-Lokalisation kompetiert würden.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Lokalisation von ORC durch BiFC-Experimente dargestellt und Einflüsse der Koexpression von mRFP-markiertem HMGA1a auf die Lokalisation des BiFC-Komplexes studiert.

Auf Deckgläschen gewachsene HepG2-Zellen wurden mit der Kombination Orc6-YN:Orc4-YC beziehungsweise Orc6-YN:Orc5-YC transfiziert und nach 26 Stunden auf Fluoreszenz-Komplementation hin untersucht. In beiden Fällen ist ein diffuses nukleoplasmatisches BiFC-Signal zu verzeichnen. Zudem bestätigt diese Beobachtung die Assoziation von Orc6 mit anderen ORC-Untereinheiten (Abbildung 4.35 1a und 2a). Die Kotransfektion von mRFP-markiertem HMGA1a führt zu einer Relokalisation der BiFC-Komplexe (1b und 2b), welche mehrheitlich mit mRFP-markiertem HMGA1a kolokalisieren (1b'' und 2b''). Nachdem HMGA1a direkt mit Orc6 interagiert, kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den relokalierten BiFC-Komplexen lediglich um Orc4/Orc6- beziehungsweise Orc5/Orc6-Subkomplexe handelt und nicht um den gesamten humanen „origin recognition complex“. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da α -Orc2-Immunfluoreszenzen bereits eine Kolokalisation von ORC mit HMGA1a in AT-reichen heterochromatischen Domänen offenbarten.

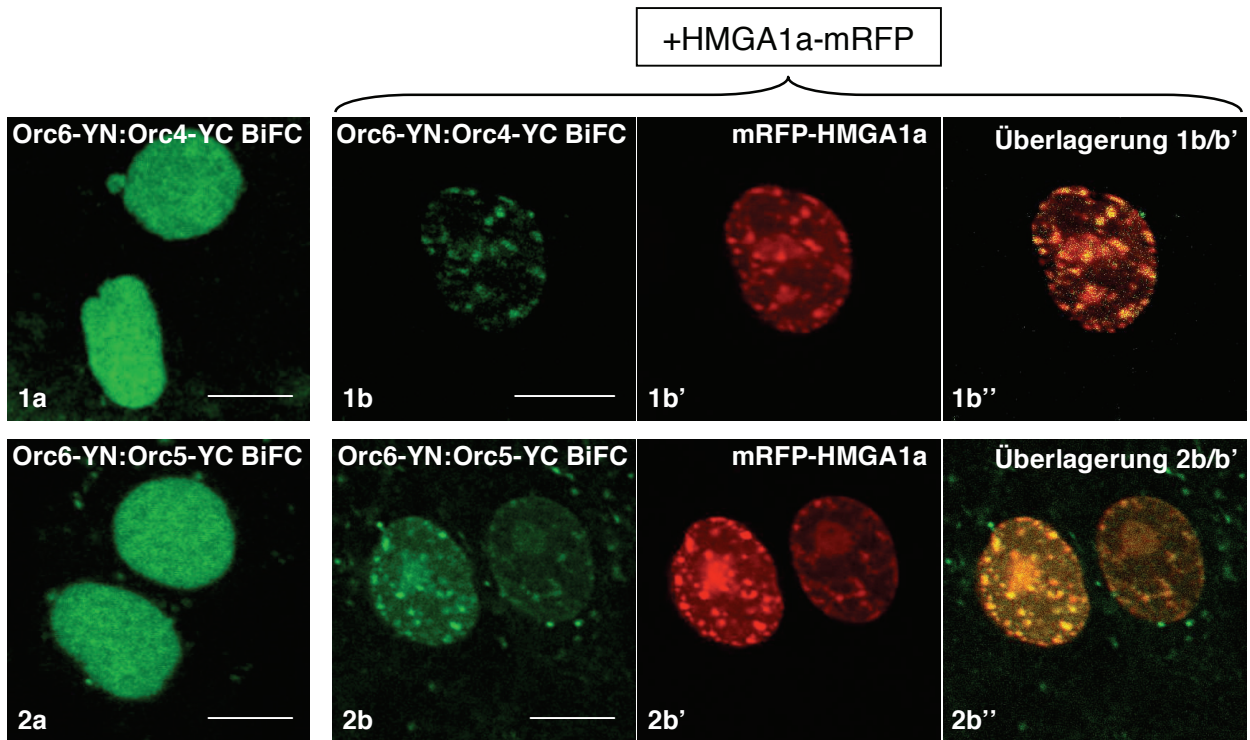


Abb. 4.35: HMGA1a lokalisiert ORC. **1a** und **2a**: Orc6-YN:Orc4-YC bzw. Orc6-YN:Orc5-YC zeigen Fluoreszenz-Komplementation und diffuse nukleoplasmatische Lokalisation. mRFP-HMGA1a-Koexpression bewirkt eine Relokalisierung des Orc6-YN:Orc4-YC- bzw. Orc6-YN:Orc5-YC-Komplex-Verteilungsmusters (**1b** bzw. **2b**). **1b'**/**2b'**: Detektion des mRFP-markierten HMGA1a. **1b''**/**2b''**: Überlagerung der BiFC-Signale mit dem mRFP-HMGA1a-Muster: Kolokalisation gelb dargestellt. Die Eichstriche (weiß) entsprechen 10 μm .

Die in Kapitel 4.3 dargestellten Experimente implizieren somit, dass HMGA1a in der Lage ist, ORC an DNA zu rekrutieren und so Orte der preRC-Ausbildung zu spezifizieren.

4.4 HMGA1a spezifiziert Replikationsursprünge

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass HMGA1a mit ORC interagiert, ORC dadurch an DNA rekrutiert und dessen Bindung spezifiziert wird, wodurch unter anderem HMGA1a bindende extrachromosomale Plasmide an Replikationskompetenz gewinnen. Abgesehen von *oriP*-basierenden Plasmiden, ist pEPI das am besten untersuchte extrachromosomale System, welches in humanen Zellen stabil repliziert wird. Eine humane S/MAR-Sequenz, welche in die pGFP-C1 „multiple cloning site“ integriert wurde, vermittelt durch Assoziation mit der nukleären Matrix mitotische Stabilität (Baiker *et al.*, 2000). An pEPI ist *in vivo* untersucht

worden, mit welcher Spezifität der ORC mit DNA-Sequenzen interagiert (Schaarschmidt *et al.*, 2004). Schaarschmidt *et al.* fanden heraus, dass funktionelle preRCs an vielen verschiedenen Stellen auf pEPI ausgebildet werden und pEPI somit keinen dominanten Replikationsursprung besitzt. Sie schlussfolgerten daraus, dass epigenetische Einflüsse dafür verantwortlich sein müssen, an welchem Ort Replikationsursprünge ausgebildet werden. Anhand dieses Systems, welches keine präferenzielle Replikations-Initiationsstelle besitzt, sollte aufgezeigt werden, dass HMGA1a die Ausbildung ortsspezifischer Replikationsursprünge bewirken kann. Hierzu wurde in einem nicht transkribierten Bereich auf pEPI eine Folge von 20 Tet-Operatoren inseriert (pEPI-tetO₂₀, siehe Plasmidkarte in Abbildung 4.36). Mit pEPI-tetO₂₀ transfizierte HCT116-Zellen und scTetR::HMGA1a⁺-HCT116-Zellen wurden für drei Wochen auf Neomycin-Resistenz selektioniert. Aus diesen Zellen wurde naszierende einzelsträngige DNA gewonnen und deren Menge mittels quantitativer PCR bestimmt. Als Referenz diente die an der HSV-poly-Adenylierungssequenz nachgewiesene Menge an naszierender einzelsträngiger DNA. Die an den integrierten Tet-Repressor-Bindestellen sowie innerhalb des GFP-Gens nachgewiesenen Mengen wurden relativ hierzu berechnet.

pEPI-tetO₂₀ weist auch in HCT116-Zellen keine nennenswert dominante Replikationsstartstelle auf, was die Ergebnisse von Schaarschmidt *et al.* bestätigte (Abbildung 4.36, grüne Säulen). In scTetR::HMGA1a exprimierenden HCT116-Zellen ist jedoch eine reproduzierbare 5fache Anreicherung an naszierender DNA im Vergleich zu den Referenzloci zu beobachten (Abbildung 4.36, rote Säulen). Somit führt ausreichende HMGA1a-Abundanz an DNA nach Rekrutierung von ORC und Ausbildung eines preRCs auch zur Etablierung eines ortsspezifischen Replikationsursprungs.

Das Chromatin-Protein HMGA1a kann somit das Binden von ORC an DNA spezifizieren und im Sinne der Kofaktor-Hypothese zur Ausbildung von Replikationsstartstellen beitragen.

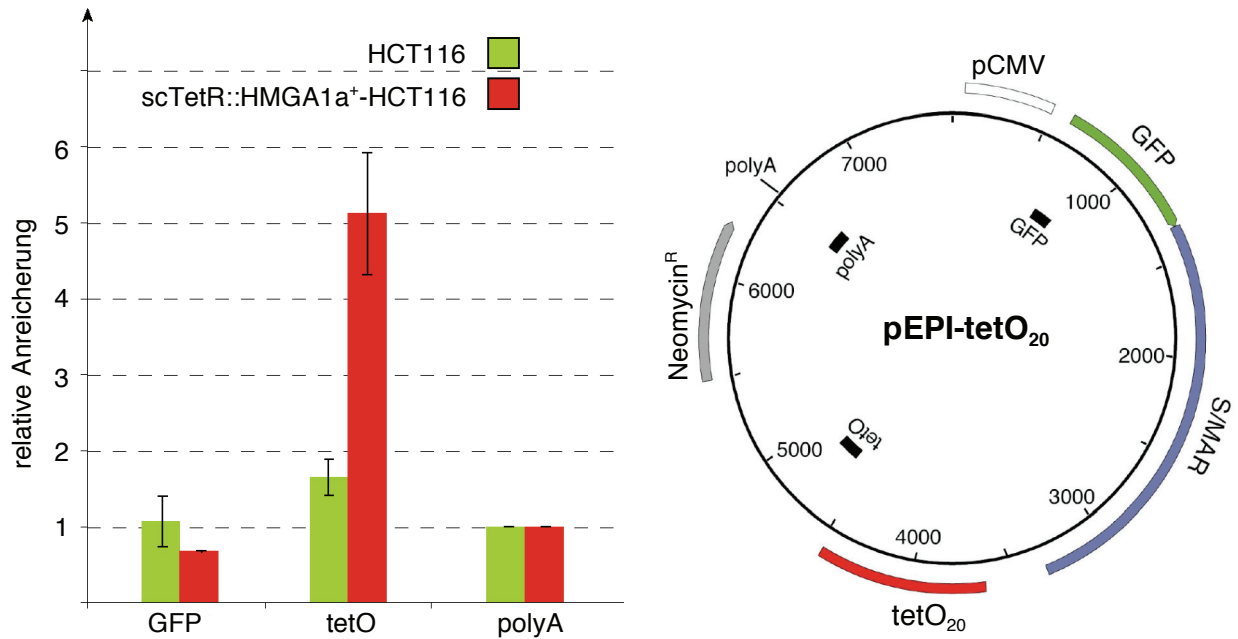


Abb. 4.36: „nascent strand“-Analyse auf pEPI. Links: Quantifizierung der naszierenden pEPI-DNA-Menge relativ zur Menge am polyA-Lokus, welche auf den Wert „eins“ normiert wurde. Die Fehlerbalken resultieren aus drei unabhängigen Experimenten. Quantifizierte DNA-Mengen präpariert aus HCT116 sind in Grün, aus scTetR::HMGA1a⁺-HCT116 in Rot dargestellt. **Rechts:** Plasmidkarte von pEPI-tetO₂₀. In Schwarz ist die Lage der Oligonukleotid-Paare (tetO, polyA, GFP) dargestellt, die zur Analyse naszierender pEPI-tetO₂₀-DNA verwendet wurden. pEPI basiert auf dem Plasmid pGFP-C1, welches zur Expression aminoterminal GFP-fusionierter Proteine verwendet wird. Vom hCMV-Promotor ausgehende Transkription über die in die „multiple cloning site“ integrierte S/MAR-Region ist essentiell für die pEPI-Funktion. 20 Tet-Operatoren wurden *in tandem* integriert (rot). Zudem vermittelt pEPI Neomycin-Resistenz (grau).

5. Diskussion

Das Binden von ORC an DNA nach der Mitose ist der erste Schritt bei der Definition von Replikationsursprüngen in Eukaryonten. Während der S-Phase initiiert die DNA-Replikation an oder in der Nähe von ORC-Bindestellen. Um zu verstehen, wie Replikationsursprünge in Metazoen definiert werden, muss man zunächst verstehen, welche Kriterien das Binden von ORC an DNA spezifizieren. Die DNA-Sequenz ist hierbei in Metazoen nicht der einzige Parameter. Abgesehen von DNA-Sequenz-Motiven, kann eine definierte DNA-Topologie oder lokale Chromatinstruktur den Ort der Bindung von ORC bestimmen. Des Weiteren können DNA-bindende Interaktionspartner von ORC als Kofaktoren wirken, indem sie ORC an ihre DNA-Zielsequenzen leiten.

In dieser Arbeit wurde HMGA1a als ORC interagierendes Protein identifiziert und seine mögliche Rolle bei der Definition von Replikationsursprüngen beleuchtet.

Im folgenden Kapitel wird die Bedeutung der Interaktionen von HMGA1a mit ORC für die DNA-Replikation und nicht-replikative Prozesse erörtert. Ein besonderer Schwerpunkt wird dabei auf Orc6 gelegt. Orc6 wurde als lose assoziierter, aber integraler Bestandteil des humanen ORC verifiziert und als Interaktionspartner von HMGA1a identifiziert.

5.1 Replikative und nicht-replikative Funktionen des humanen Orc6-Proteins

Orc6 ist das am wenigsten konservierte Protein unter den ORC-Proteinen und Sequenzvergleiche zeigen keine Homologien zwischen Bäckerhefe Orc6 und den Orc6-Proteinen der Metazoen. Obwohl keine Sequenzhomologie besteht, ist für Orc6 sowohl in Bäckerhefe als auch in humanen Zellen neben der replikativen Funktion auch eine mögliche Funktion bei der Ribosomenbiogenese beschrieben. Darüber hinaus ist Orc6 in Metazoen essentiell während der Zytokinese. Folglich scheint diese in Metazoen kleinste ORC-Untereinheit auf funktioneller Ebene konserviert zu sein.

In dieser Arbeit werden in Kapitel 4.2 Daten präsentiert, die Orc6 *in vivo* erstmals als Teil des humanen ORC beschreiben und dementsprechend seine Beteiligung bei der DNA-Replikation in humanen Zellen untermauern. Zudem wird Orc6 als Pes1-interagierendes Protein im Nukleolus charakterisiert und dadurch die Verbindung zwischen Orc6 und der Ribosomenbiogenese in humanen Zellen offengelegt.

Im Folgenden werden anhand der in Kapitel 4 dargelegten Daten sowie der bestehenden Literatur die replikativen und nicht-replikativen Funktionen von Orc6 diskutiert und ein Modell entworfen (Abbildung 5.2), wie Orc6 in humanen Zellen DNA-Replikation, Ribosomenbiogenese und Zytokinese koordiniert und in den Zellzyklus integriert.

5.1.1 Replikative Funktionen von Orc6

Ein erster Hinweis auf eine replikative Funktion des humanen Orc6-Proteins wurde durch die Depletion von Orc6 durch RNA-Interferenz (RNAi) erhalten. So inkorporieren deutlich weniger Zellen das Nukleotidanalogen BrdU nach einem Orc6-siRNA-„knock-down“ als nach Transfektion mit einer Kontroll-siRNA (Prasanth *et al.*, 2002). Dies lässt auf eine Beeinträchtigung des Durchlaufens der S-Phase schließen. Darüber hinaus führt die Zugabe von rekombinantem Orc6 zu einer leichten Steigerung der Replikationsaktivität in einem *in-vitro*-Replikationssystem, welches auf

Proteinextrakten aus humanen Zellen beruht (Jens Baltin, persönliche Mitteilung) (Baltin *et al.*, 2006).

In Vertebraten ist Orc6 kein biochemisch stabiler Bestandteil von ORC (Gossen *et al.*, 1995, Sasaki und Gilbert, 2007). Die Assoziation von Orc6 mit den anderen ORC-Untereinheiten wurde lediglich an humanem rekombinantem ORC nach Überexpression mit dem Baculovirus-System gezeigt, wobei sich dieses Ergebnis nicht immer reproduzieren ließ (Vashee *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde durch Co-Immunopräzipitationen (Abbildungen 4.9, 4.12, 4.14 und 4.23), durch Untersuchungen an rekombinanten ORC-Proteinen (Abbildung 4.30) sowie durch Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations-Experimente (Abbildung 4.35) gezeigt, dass humanes Orc6 mit anderen ORC-Untereinheiten interagiert. Dies impliziert auch in humanen Zellen die Existenz eines Orc1-6 Holokomplexes.

Welche Funktion Orc6 innerhalb des humanen ORC zukommt, ist unklar, jedoch offenbaren jüngere Arbeiten aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* mechanistische Details. In *D. melanogaster* ist Orc6 (DmOrc6) essentiell für die Origin-Bindung und Replikationsfunktion von ORC (Balasov *et al.*, 2007, Chesnokov *et al.*, 2001). Auch in *S. cerevisiae* ist Orc6 (ScOrc6p) unabdingbar für die ORC-Funktion *in vivo*, obwohl ScOrc6p *in vitro* für die Sequenz-spezifische DNA-Bindung von ORC an Origin-DNA entbehrlich ist (Lee und Bell, 1997). Die replikative Funktion von ScOrc6p liegt vielmehr in der Erhaltung von preRCs in der späten G1-Phase (Semple *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae*-Zellen, in denen Orc6 in der späten G1-Phase depletiert wird, dissoziiert das preRC-Proteine Mcm2 und das preIC-Protein Mcm10 vom Chromatin ab. Dies führt zu einer verminderten Aktivierung von Replikationsursprüngen, wodurch *S. cerevisiae*-Zellen in der frühen S-Phase arretiert werden. Interessanterweise kann eine Orc6-Cdc6-Interaktion in BiFC-Experimenten nachgewiesen werden (Anhang, Abbildung 9.1). Inwieweit humanes Orc6 wie in Bäckerhefe zur Stabilisierung von preRCs in der G1-Phase oder analog zu *Drosophila* Orc6 zur Origin-Erkennung beiträgt, kann nach Orc6 RNAi-Depletion durch Chromatin-Immunopräzipitations-Analysen untersucht werden. Falls Orc6 für die preRC-Stabilität verantwortlich ist, sollte die Origin-Assoziation der Mcm-Proteine in der späten G1-Phase beeinträchtigt sein. Sofern Orc6 in humanen Zellen zur Origin-Spezifität von ORC beiträgt, hätte ein Orc6-siRNA-„knockdown“

bereits einen negativen Einfluss auf die Bindung von ORC an Replikationsursprünge in der frühen G1-Phase.

Fast alle Erkenntnisse über das DNA-Bindungsverhalten von humanem ORC (HsORC) wurden durch *in vitro*-Experimente mit rekombinanten Proteinen gewonnen. Diese Experimente haben zu der Erkenntnis geführt, dass HsORC keine Sequenzspezifität besitzt (Vashee *et al.*, 2003). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass diese Untersuchungen mit einem Orc1-5-Komplex durchgeführt wurden. Dieser Komplex weist mit einer Dissoziationskonstante im niederen nanomolaren Bereich eine beachtliche Affinität gegenüber DNA auf, gleichgültig, ob es sich dabei um bakterielle DNA oder um Origin-DNA handelt. Vashee *et al.* argumentieren diesbezüglich, dass es angesichts dieser hohen Affinität schwer vorstellbar ist, dass spezielle chromosomale Sequenzen existieren, für die ORC eine höhere Affinität aufweist. Daraus schlussfolgern sie, dass ORC in humanen Zellen Sequenz-unabhängig an DNA bindet, ohne jedoch in Betracht zu ziehen, dass die DNA-Bindungseigenschaft von ORC durch die Assoziation weiterer Proteine moduliert werden könnte. In dieser Hinsicht wurde *in vitro* an Bäckerhefe ORC- und Cdc6-Proteinen gezeigt, dass Cdc6 die Dissoziation des ORC-Cdc6-Komplexes von Nicht-Origin-DNA reguliert (Speck und Stillman, 2007). Daher ist zu überprüfen, ob die Assoziation weiterer Proteine wie zum Beispiel Orc6 und/oder Cdc6 mit Orc1-5, *in vitro* und *in vivo*, die Spezifität von humanem ORC für Origin-DNA verändert. Zudem wurden die ORC-DNA-Bindungsstudien stets mit nackter DNA durchgeführt und nicht mit Chromatin, dem eigentlichen Substrat von ORC. *In vivo* kann das Entfernen von Nukleosomen durch ATP-abhängige „Remodelling“-Komplexe zudem negativ superhelikale DNA freilegen (Lusser und Kadonaga, 2003), eine Struktur für die *Drosophila melanogaster* ORC eine 30fach höhere Affinität aufweist als für relaxierte DNA (Remus *et al.*, 2004). Somit existieren eine Reihe von Faktoren, die bei *in vitro*-Experimenten nicht berücksichtigt wurden, welche *in vivo* bestimmend für die Interaktion von ORC mit DNA sein können.

Zukünftige Untersuchungen zur Dynamik der Assoziation von humanem Orc6 mit Origin-DNA werden mechanistische Erkenntnisse darüber liefern, ob Orc6 wie in Bäckerhefe die Stabilisierung von preRCs in der späten G1-Phase bewirkt oder, analog zu *Drosophila* Orc6, die Bindung an Origin-DNA vermittelt.

5.1.2 Orc6-Funktionen bei der Ribosomenbiogenese und der Zytokinese

Die RNAi-Depletion von Orc6 in humanen Zellen führt neben der Reduktion der DNA-Synthese auch zur Ausbildung mehrpoliger Spindeln, zu anomaler Mitose und zu polynukleären Zellen (Prasanth *et al.*, 2002). Neben dieser möglichen Funktion von Orc6 in der Mitose findet sich Orc6 in humanen und Bäckerhefe-Zellen in einem Komplex mit Komponenten der Ribosomenbiogenese (Du und Stillman, 2002, Killian *et al.*, 2004).

Diese Phänomene deuten auf eine vielschichtige Funktion von Orc6 hin, welche in dieser Arbeit experimentell nicht im Detail untersucht wurden. Jedoch war in BiFC-Analysen zwischen Orc6 und HMGA1a-Deletionsmutanten eine nukleoläre Lokalisation zu beobachten. Dies ist mit der in Bäckerhefe beobachteten Assoziation von Orc6 mit dem Hefe-Pescadillo-Homolog (Yph1) in Einklang zu bringen (Du und Stillman, 2002). Yph1 wird für die Biogenese der 60S-Ribosomenuntereinheit benötigt und lokalisiert im Nukleolus. Das humane Pescadillo-Protein (Pes1) interagiert ebenfalls mit Orc6, wie durch BiFC-Experimente gezeigt wurde (Abbildung 4.29). In Übereinstimmung mit einer möglichen Rolle von Orc6 in der Ribosomenbiogenese war dieser BiFC-Komplex ausschließlich im Nukleolus lokalisiert. Der Sequenzvergleich zwischen Orc6 und einem anderen Interaktionspartner von Pes1, dem SV40 „large“ T-Antigen, lassen einen hoch konservierten Bereich erkennen, welcher auch die Orc6-CDK-Phosphorylierungsstelle (Threonin 195) enthält (Abbildung 5.1) (Maiorana *et al.*, 2004, Olsen *et al.*, 2006). Nachdem sowohl Pes1 als auch Yph1 eine BRCT-Domäne (BRCA1-C-Terminale-Domäne) enthalten, kann man spekulieren, ob dieser Bereich phosphorylierungsabhängig die Interaktion mit Pes1 vermittelt (vergleiche Orc6-Zyklus-Modell, Abbildung 5.2). BRCT-Domänen sind Protein-Protein-Interaktionsmodule, die vor allem Phosphopeptide binden, und kommen häufig in Proteinen vor, die Aufgaben bei der Zellzyklus-Kontrolle erfüllen (Glover *et al.*, 2004, Zegerman und Diffley, 2007).

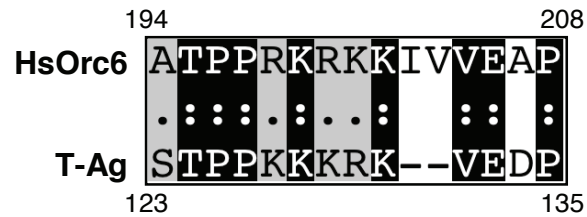


Abb. 5.1: Sequenzvergleich HsOrc6 und SV40 „large“ T-Antigen. Gezeigt sind die Aminosäuren 194–208 von Orc6 und 123–135 des T-Antigens. Identische Bereiche sind schwarz schattiert und durch „:“ markiert. Konservierte Substitutionen sind grau schattiert und durch „.“ gekennzeichnet. Für diesen Sequenzvergleich wurde der Smith-Waterman-Algorithmus angewendet (Smith und Waterman, 1981).

Die Koordination verschiedener zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel der Ribosomenbiogenese und der DNA-Replikation, mag dadurch bewerkstelligt sein, dass Orc6 an beiden Prozessen funktionell beteiligt ist. Interessanterweise oszilliert die Transkription der rRNA Gene über den Zellzyklus, wobei in der S-Phase und in der G2-Phase maximale Transkription zu verzeichnen ist (Klein und Grummt, 1999). In einem zur bestehenden Literatur passenden Szenario würde hypophosphoryliertes Orc6 nach der Zellteilung für die Ausbildung von preRCs in der G1-Phase und für den Eintritt in die S-Phase benötigt. Eine Phosphorylierung durch CDKs führt in der S-Phase zu einer Relokalisation in den Nukleolus. Erst wenn ausreichend Orc6 im Nukleolus verfügbar ist, würde die Ribosomenbiogenese eingeleitet werden, die daher mit einem Fortschreiten der S-Phase korreliert (siehe Modell in Abbildung 5.2). Darüber hinaus wird vermutet, dass Orc6, unabhängig von den anderen ORC-Proteinen, sowohl in *Drosophila* als auch in humanen Zellen die Segregation von Chromosomen mit der Zytokinese koordiniert. So kolokalisiert Orc6 während der Mitose mit Proteinen des äußeren Kinetochors (Prasanth *et al.*, 2004). Zudem interagiert DmOrc6 über eine von der replikativen Orc6-Funktion separierbare Domäne mit dem Septin-Protein peanut und ist, wie auch das humane Orc6, während der Zytokinese membranständig an der Teilungsfurche lokalisiert (Chesnokov *et al.*, 2003). Nach RNAi Depletion von Orc6 treten sowohl in *Drosophila* als auch im humanen System Zellen auf, welche die Mitose beendet haben, ohne in die Zytokinese einzutreten, und dementsprechend polynukleär sind. Wenngleich die Depletion von anderen ORC-Untereinheiten Phänotypen zeigt, die über die DNA-Replikation hinausgehen, wird eine Rolle bei der Zytokinese bislang nur für Orc6 beschrieben (Chesnokov, 2007).

Aus der beschriebenen Datenlage geht hervor, dass Orc6 in Metazoen an verschiedensten zellulären Prozessen wie DNA-Replikation, Chromosomensegregation, Zytokinese und Ribosomenbiogenese beteiligt ist. Zukünftige Untersuchungen werden Aufschluss darüber geben, ob Orc6 diese verschiedenen Prozesse miteinander koordiniert und in das Zellzyklusprogramm integriert oder die einzelnen Aufgaben unabhängig voneinander erfüllt.

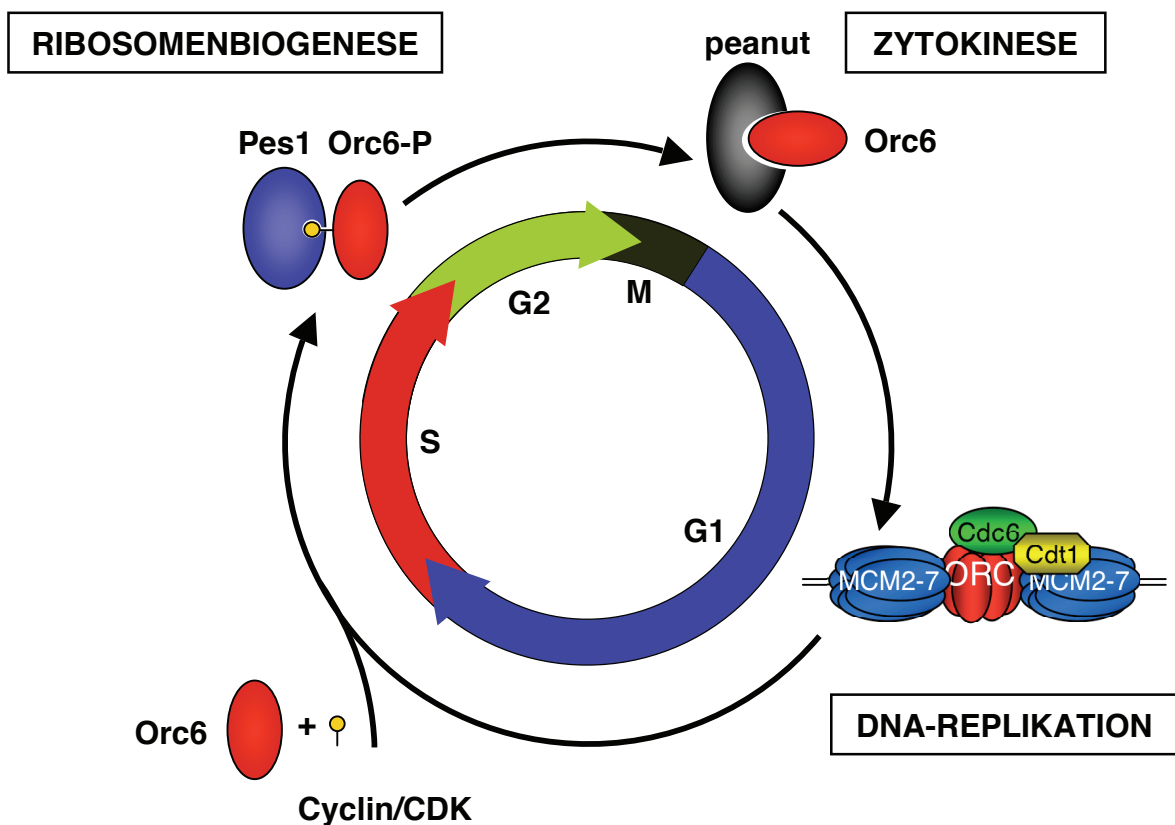


Abb. 5.2: Modell des Orc6-Zyklus. In der G1-S-Phase des Zellzyklus erfüllt Orc6 replikative Aufgaben. Diese könnten in der Stabilisierung von preRCs oder in der Origin-Erkennung liegen. Während der Aktivierung der preRCs am G1/S-Phase-Übergang wird Orc6 durch CDKs an Threonin 195 phosphoryliert. Dadurch kann Orc6 mit Pes1 interagieren, relokalisiert in den Nukleolus und ist dort an der Ribosomenbiogenese beteiligt (S-G2-Phase). Orc6 enthält zudem ein Motiv, welches nukleären Export vermittelt. Nach dem nukleären Export, oder infolge des Auflösens der Kernmembran, assoziiert Orc6 während der M-Phase mit dem Septin-Protein peanut und trägt zur Zytokinese bei. Nach einem vollendeten Zellteilungszyklus bildet Orc6 in der G1-Phase wieder einen Komplex mit anderen preRC-Proteinen.

5.2 Bedeutung der HMGA1a-ORC-Interaktion

HMGA1a ist in Säugetieren als strukturelle Chromatin-Komponente beschrieben, die darüber hinaus auch Einfluss auf Rekombinationsereignisse nimmt und an der Induktion einiger spezifischer Gene mitwirkt. HMGA1a bindet über seine „AT-hook“-Motive AT-reiche Sequenzen in der kleinen Furche der DNA und induziert Konformationsänderungen (Radic *et al.*, 1987). Daher wird HMGA1a auch als architektonischer Transkriptionsfaktor bezeichnet, der nach Bindung an DNA die Affinität weiterer Gen-spezifischer Transkriptionsfaktoren für ihre Zielsequenzen erhöht. Dies führt zur Ausbildung hochspezialisierter, transkriptionsaktivierender Strukturen, sogenannten „Enhanceosomen“ (Bianchi und Agresti, 2005).

HMGA1a partizipiert an den unterschiedlichsten DNA-bezogenen zellulären Prozessen. In Kapitel 4.2 wird HMGA1a als ORC-interagierendes Protein beschrieben, was anhand von Co-Immunopräzipitationen (Abbildungen 4.10, 4.12, 4.14 und 4.23), Untersuchungen mit rekombinantem HMGA1a und ORC (Abbildung 4.30) sowie durch Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations-Experimente (Abbildung 4.19-4.21) gezeigt wird. Weiterhin wird gezeigt, dass HMGA1a den humanen ORC an DNA rekrutieren kann (Kapitel 4.3), was auf dem extrachromosomalen Plasmid pEPI-I zur Ausbildung eines HMGA1a-abhängigen dominanten Replikationsursprunges führt (Kapitel 4.4).

Dies bringt das Nicht-Histon-Chromatin-Protein HMGA1a in humanen Zellen erstmals direkt mit DNA-Replikation in Verbindung.

Anhand der in Kapitel 4 präsentierten Daten sowie der bestehenden Literatur werden im Folgenden die potentiellen replikativen und nicht-replikativen Funktionen der HMGA1a-ORC-Interaktion diskutiert, welche in Abbildung 5.5 zu einem Modell zusammengefasst sind.

5.2.1 HMGA1a rekrutiert ORC an DNA und führt zur Ausbildung von Replikationsursprüngen

HMGA1a-vermittelte Replikation im plasmidalen Kontext:

Neben DNA-Sequenz-Motiven, DNA-Topologie oder lokaler Chromatinstruktur können mit ORC interagierende Proteine (Kofaktoren) das Binden von ORC spezifizieren. So wurde für die zellulären Proteine AIF-C und Ku80 bereits gezeigt, dass sie durch Protein-Protein-Interaktion ORC an ihre Zielsequenzen am *aldB*- beziehungsweise am *laminB2*-Origin rekrutieren (Cvetic und Walter, 2005, Minami *et al.*, 2006, Sibani *et al.*, 2005).

Ein weiteres Beispiel für einen solchen Kofaktor ist das virale *trans*-agierende Protein EBNA1. EBNA1 unterstützt die Replikation von *oriP*-DNA, da es durch die Interaktion mit ORC die Ausbildung eines lizenzierbaren preRCs am viralen Replikator (DS) bewirkt (Chaudhuri *et al.*, 2001, Ritzi *et al.*, 2003, Schepers *et al.*, 2001). Hung *et al.* schlossen aus transienten Plasmid-Replikationsversuchen, dass die carboxyterminale DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne (Aminosäuren 379-641) von EBNA1 (EBNA1-DBD) ausreicht, um Replikation von *oriP*-DNA zu vermitteln. Zudem zeigten sie, dass die aminoterminalen 378 Aminosäuren von EBNA1 durch die ersten 90 Aminosäuren von HMGA1a funktional substituierbar sind (Hung *et al.*, 2001). Sie beobachteten, dass eine Fusion aus HMGA1a und der EBNA1-DBD (HMGA1a::EBNA1-DBD) die extrachromosomale Aufrechterhaltung und Replikation von *oriP*-Plasmiden vermittelt. Hung *et al.* postulierten, dass die EBNA1-DBD hierbei die Replikation der *oriP*-DNA vermittelt, während HMGA1a an mitotische Chromosomen bindet und so die nukleäre Retention der *oriP*-DNA gewährleistet.

In dieser Arbeit wird anhand eines Hybridvektorsystems demonstriert, dass HMGA1a ebenfalls DNA-Replikation unterstützt (Kapitel 4.1.2). Darauf lässt sich schließen, da die Replikation dieser Hybridvektoren von der Bindung einer Tetrazyklin-Repressor-HMGA1a-Fusion an die Plasmid-DNA abhängig ist (Abbildung 4.7). Weiterhin wird gezeigt, dass die Replikationskompetenz dieser Hybridvektoren zunimmt, je mehr HMGA1a-Moleküle an den Hybridvektor rekrutiert werden (Abbildung 4.34). Dies geht einher mit einer fokussierten Bindung der ORC-Kern-Komplex-Untereinheit Orc3 an den Hybridvektor (Abbildung 4.33). Co-

Immunopräzipitations- und BiFC-Experimente, sowie die Untersuchungen mit rekombinantem HMGA1a und ORC implizieren, dass HMGA1a direkt mit ORC interagiert (Kapitel 4.2). Zudem lassen die BiFC-Experimente vermuten, dass diese Interaktion über die ORC-Untereinheiten Orc1 und Orc6 abläuft (Abbildungen 4.19 und 4.21).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass HMGA1a über Orc1 und Orc6 den humanen Orc1-6-HoloKomplex an die Hybridvektoren dirigieren kann. Im Falle des episomalen Replikons pEPI-I führt diese ortsspezifische Rekrutierung von ORC zu einem lokalisierten Initiationsereignis durch die Ausbildung eines dominanten Replikationsursprungs am HMGA1a-Bindungsort (Abbildung 4.36). Die Konsequenz aus diesen Beobachtungen ist, dass HMGA1a analog zu Ku80, AIF-C und EBNA1, als ORC-Kofaktor betrachtet werden kann, welcher ORC rekrutiert und so Replikationsursprünge spezifiziert.

In Kapitel 4.2.4 werden die ORC-Interaktionsmotive von HMGA1a beschrieben. Die BiFC-Experimente lassen vermuten, dass die Orc6-Interaktion durch die carboxyterminale saure Domäne und die Orc1-Interaktion über ein aminotermiales Motiv von HMGA1a vermittelt wird (Abbildungen 4.25 und 4.32). Darüber hinaus sind die HMGA1a-„AT-hook“-Motive essentiell für die Lokalisation der Orc6-HMGA1a-Interaktion (Abbildungen 4.27 und 4.28), spielen jedoch keine Rolle bei der Ausbildung dieser Interaktion. Insofern offenbart HMGA1a einen modularen Aufbau (Abbildung 5.3), bei dem die ORC-Interaktionsdomänen genetisch separierbar von Motiven sind, welche die Bindung an mitotische Chromosomen vermitteln können.

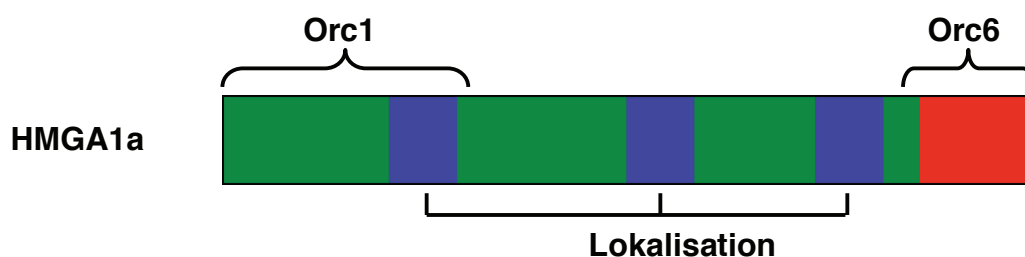


Abb. 5.3: HMGA1a-Interaktions- und Lokalisationsmotive. Der Aminoterminus von HMGA1a vermittelt die Interaktion mit Orc1, die carboxyterminale saure Domäne (rot), die Interaktion mit Orc6. Die HMGA1a-„AT-hook“-Motive (blau) vermitteln die Lokalisation der HMGA1a-ORC-Interaktion im perizentrischen Heterochromatin.

Diese Erkenntnis ist besonders hinsichtlich der Entwicklung von Genvektoren interessant. HMGA1a kann als Fusion an den „single-chain“-Tet-Repressor sowohl die Replikation (Abbildungen 4.7 und 4.34) als auch die extrachromosomale Erhaltung (Wolfgang Hammerschmidt, persönliche Mitteilung) von Tet-Operator tragenden Plasmiden unterstützen. Einzigartig für dieses System lässt sich die Replikation und Aufrechterhaltung dieser potentiellen Genvektoren *in trans* durch Zugabe von Doxzyklin regulieren. Des Weiteren werden Hybridvektoren mit 16 Tet-Operatoren auf einem zu *oriP*-vergleichbaren Niveau in Zellen repliziert und erhalten. Dies deutet auf eine hohe Kopienzahl pro Zelle hin, wodurch eine ausreichende Expression von einzubringenden Genen in den Zielzellen gewährleistet sein sollte.

Jedoch birgt der *trans*-agierende Faktor scTetR::HMGA1a in diesem System beachtliche Risiken. HMGA1a fördert die Expression von Genen, die mit der Zellproliferation, Tumorausbildung, Angiogenese und Metastasierung in Verbindung gebracht werden, und die HMGA1a-Überexpression ist konsistent in humanen Brust-, Prostata-, Darm- oder Lungen-Tumoren zu beobachten (Evans *et al.*, 2004). In all diesen Tumoren wird HMGA1a als Vollängen-Protein ohne Mutationen exprimiert. Daraus lässt sich schließen, dass die funktionelle Einheit aus dem „AT-hook“-DNA-Bindungsmotiv und der carboxyterminalen sauren Protein-Protein-Interaktionsdomäne für die Tumor-induzierenden Eigenschaften von HMGA1a verantwortlich ist. Diese Karzinogenität lässt sich wahrscheinlich ausschließen, wenn man die entsprechenden Elemente genetisch separiert. Die ORC-Interaktionsmotive von HMGA1a könnten als DNA-Replikation unterstützende Elemente und die AT-hook-Motive als Elemente zur nukleären Retention von Genvektoren herangezogen werden. Zukünftige Experimente werden Aufschluss darüber geben, inwiefern diese Motive Replikation und nukleäre Retention in Vektorsystemen vermitteln können, wenn sie getrennt voneinander vorliegen.

HMGA1a und chromosomale DNA-Replikation:

Im Gegensatz zu Ku80 oder AIF-C besitzt HMGA1a keine strikte Sequenzspezifität, sondern bindet an asymmetrische A/T-Nukleotidfolgen in der kleinen Furche der DNA. Dadurch könnte HMGA1a nicht nur an einigen wenigen Loci durch die Rekrutierung von ORC zur Ausbildung von Replikationsursprüngen führen, sondern auf einer globaleren Ebene zur Lokalisierung von ORC und der Definition von Origins beitragen.

Die Beteiligung von „AT-hooks“ an der Definition von Replikationsursprüngen wäre evolutionär gesehen keine Innovation. In der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* enthält das Orc4-Protein (SpOrc4) am Aminoterminal insgesamt neun „AT-hook“-Motive, die exklusiv für die Bindung des *S. pombe* ORC an Replikationsursprünge verantwortlich sind (Lee *et al.*, 2001). Bemerkenswert ist zudem, dass SpOrc4 in einem *Xenopus laevis* (Xl) *in-vitro*-Replikationssystem die gleichen Sequenzen bindet, von denen der XIORC die Replikation initiiert (Kong *et al.*, 2003). Und auch in *Drosophila* ist ORC mit dem HMGA1a-homologen D1-Protein assoziiert, welches insgesamt zehn „AT-hook“-Motive beinhaltet (Gerbi und Bielinsky, 2002). Zusammen mit der Sequenz-unspezifischen DNA-Bindung, die gereinigter Metazoen-ORC *in vitro* aufweist, führten die oben dargelegten Beobachtungen bereits in der Vergangenheit zu der Vermutung, dass es für die ORC-Origin-Erkennung in Metazoen eventuell weiterer Faktoren bedarf und dass HMGA1a einer dieser Faktoren sein könnte (Gilbert, 2001).

HMGA1a existiert in HeLa-Zellkernen in mehreren Subpopulationen, die sowohl mit Heterochromatin, als auch mit transkriptionell aktiven Chromatin-Domänen korrelieren (Amirand *et al.*, 1998). In α -Orc2-Immunlokalisationen ist zu erkennen, dass Orc2 auch außerhalb von HMGA1a-enthaltenen Kernregionen lokalisiert. Die Lokalisation von humanem ORC kann daher nicht ausschließlich durch HMGA1a bestimmt sein. Dies hat zur Konsequenz, dass es in humanen Zellen eine Balance zwischen dem ORC- und HMGA1a-Protein-Niveau geben muss, die eine funktionale Lokalisierung von ORC durch HMGA1a gewährleistet. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist in Abbildung 4.33 gezeigt, dass ein verändertes HMGA1a-Expressionsniveau zu einer globalen Relokalisation von ORC führt, woraufhin ORC vollständig mit HMGA1a kolokalisiert. Wie aus den Abbildungen 4.27 und 4.28

hervorgeht, fokussiert HMGA1a ORC durch seine „AT-hook“-Motive. Daher ist in BiFC-Experimenten die Interaktion zwischen ORC-Untereinheiten und HMGA1a besonders an der perinukleolären AT-reichen α -Satelliten-DNA zu beobachten, die eines der Hauptelemente des perizentromerischen Chromatins darstellt. Diese Regionen sind vor allem heterochromatisch, was auch anhand der Kolo-kalisation der HMGA1a-ORC-Interaktion mit HP1 α ersichtlich ist (Abbildung 4.28) (Schueler *et al.*, 2001, Ugarkovic, 2005). Diese Daten deuten darauf hin, dass ORC durch HMGA1a besonders in heterochromatische Chromatindomänen rekrutiert wird.

Eine Verbindung zwischen ORC und Heterochromatin scheint in allen Eukaryonten konserviert zu sein. In Bäckerhefe beispielsweise wird ORC für die transkriptionelle Repression des „mating type locus“ benötigt. ORC-Bindung an eine nahegelegene ARS-Konsensus-Sequenz führt zur Rekrutierung des Sir1-Proteins durch Orc1, wodurch das „Silencing“ einleitet wird (Triolo und Sternglanz, 1996). Weiterhin konnte in *Drosophila*-, *Xenopus*-, Maus- und humanen Zellen eine Interaktion zwischen ORC-Untereinheiten und HP1-Proteinen gezeigt werden (Pak *et al.*, 1997, Prasanth *et al.*, 2004, Shareef *et al.*, 2003). Interessanterweise findet sich in *Drosophila* zusätzlich ein HMGA1a-ähnliches Protein (HOAP, HP1/ORC-associated protein) im Komplex mit HP1 und Orc1.

Eine Interaktion zwischen HP1-Proteinen und humanem ORC konnte ebenfalls mithilfe des BiFC-Systems nachgewiesen werden (Abbildung 5.4).

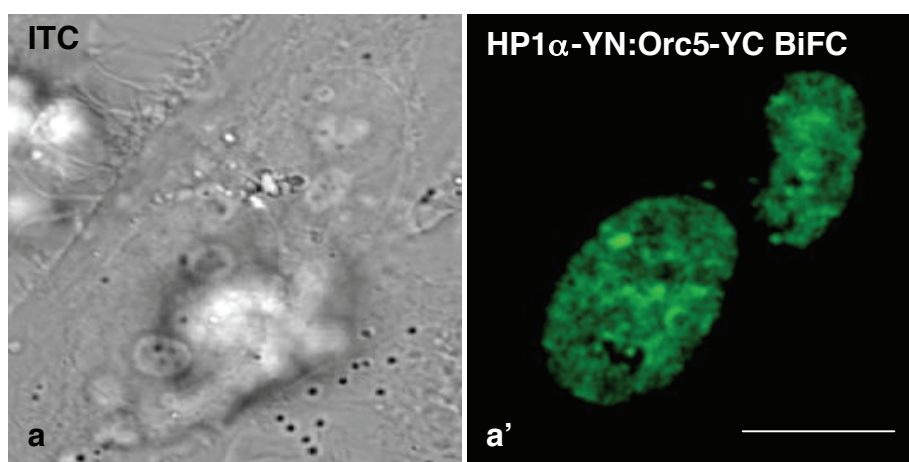


Abb. 5.4: „BiFC-Assay“ HP1 α -YN:Orc5-YC. **a:** Interferenz-Kontrast-Bild. **b:** HP1 α -YN und Orc5-YC zeigen Fluoreszenz-Komplementation in lebenden HepG2-Zellen. Der weiße Eichstrich entspricht 10 μ m.

Die Interaktion ist hierbei zwischen Orc5 und HP1 α sowie Orc5 und HP1 β (nicht gezeigt) festzustellen, die im Vergleich zur HMGA1a-ORC-Interaktion eine deutlich andere Lokalisation aufweist.

Nachdem die Interaktion zwischen ORC und heterochromatischen Proteinen in allen Eukaryonten konserviert ist, scheint diese Verbindung von funktioneller Bedeutung zu sein. Bezogen auf Replikation spiegelt diese Interaktion eventuell die Notwendigkeit wider, genug ORC in Heterochromatin-Domänen zu rekrutieren, um durch eine ausreichende Origin-Dichte die vollständige Replikation innerhalb der S-Phase zu ermöglichen (Leatherwood und Vas, 2003). Um zu zeigen, dass HMGA1a oder HP1 Replikationsursprünge im chromosomalen Kontext definieren, könnte durch Chromatin-Immunopräzipitations-Experimente die Bindung von HMGA1a und HP1 an Replikationsursprünge nachgewiesen werden. Darüber hinaus sollte durch „nascent strand-abundance assays“ in einer HP1- oder HMGA1a-„knock down“-Situation gezeigt werden, dass HMGA1a essentiell ist für die Aktivität einiger Replikationsursprünge. Nachdem in humanen Zellen weniger als 30 von den 30000 vermuteten Replikationsursprüngen bekannt sind und für HMGA1a keine Antikörper existieren, die eine ausreichende Qualität für ChIP-Experimente aufweisen, sind diese Experimente jedoch schwer durchführbar.

Ungeachtet dessen liefert diese Arbeit Hinweise, dass neben einer definierten DNA-Sequenz, DNA-Topologie oder lokalen Chromatinstruktur auch Chromatin-Proteine wie HMGA1a die DNA-Bindung von ORC spezifizieren können (Abbildung 4.35). Dabei ist zu erwarten, dass Chromatinproteine aus verschiedenen Kern-Domänen konkurrierend mit ORC interagieren, wodurch sich eine homogene Verteilung von ORC über den Kern einstellt (siehe Modell, Abbildung 5.5) (McNairn *et al.*, 2005).

5.2.2 Bedeutung der HMGA1a-ORC-Interaktion für die Ausbildung und Erhaltung von Heterochromatin

Der experimentelle Fokus dieser Arbeit liegt auf der replikativen Funktion der ORC-HMGA1a-Interaktion, die in Kapitel 5.2.1 diskutiert wurde. Die Interaktion zwischen HMGA1a und ORC findet überwiegend im Heterochromatin statt, was aus der Kolo-kalisation des Orc6-YN:HMGA1a-YC-BiFC-Verteilungsmusters mit HP1 α hervorgeht (Abbildung 4.28). Diese Ergebnisse lassen zusammen mit der bestehenden Literatur vermuten, dass die HMGA1a-ORC-Interaktion nicht nur zur Definition von Replikationsursprüngen beiträgt, sondern auch für die Etablierung und Erhaltung von Heterochromatin essentiell ist. Diese Funktion wird im Folgenden erläutert.

Chromatin lässt sich aufgrund unterschiedlicher Struktur in die beiden generellen Kategorien Euchromatin und Heterochromatin einteilen. Euchromatin weist in Interphase-Kernen einen geringeren Verpackungsgrad auf, wird in der Regel früh in der S-Phase repliziert und stellt den transkriptionell aktiven Teil des Chromatins dar. Heterochromatin ist auch während der Interphase kondensiert, repliziert später in der S-Phase und ist überwiegend transkriptionell inaktiv. Beide Chromatinarten weisen charakteristische kovalente Histon-Modifikationen auf, wobei sich Euchromatin vor allem durch hyperacetylierte aminoternale Enden der Histone H3 und H4 auszeichnet (Schubeler *et al.*, 2002, Schwaiger und Schubeler, 2006, White *et al.*, 2004).

Heterochromatin ist weiterhin in fakultatives und konstitutives Heterochromatin zu unterteilen. Fakultatives Heterochromatin beinhaltet vor allem Gene und Chromatinbereiche, die im Laufe der Differenzierung oder durch andere äußere Einflüsse transkriptionell stillgelegt wurden. Das konstitutive Heterochromatin umfasst die permanent stillgelegten Bereiche der Telomeren und des perizentrischen Chromatins. Letzteres liegt in Nachbarschaft zu den Centromeren, besteht unter anderem aus der α -Satelliten-DNA und hat vor allem strukturelle Bedeutung bei der Kohäsion der Schwester-Chromatiden und der Assemblierung der Kinetochore (Peters und Schubeler, 2005). Charakteristisch für konstitutives Heterochromatin

enthalten die Nucleosomen des perizentrischen Chromatins am Lysin-Rest 9 trimethyliertes Histon H3 (H3K9me₃).

Nach dem aktuellen Modell findet die Ausbildung des perizentrischen Heterochromatins durch einen autoregulatorischen „Loop“ statt. In einem initialen Schritt führt die Rekrutierung von Histon-Methyl-Transferasen (HMTs) wie Suv39h1/2 zur Trimethylierung des H3K9-Restes. Die Heterochromatin-Proteine HP1 α und HP1 β binden über ihre Chromodomänen spezifisch an H3K9me₃ im perizentrischen Chromatin und rekrutieren weitere HMTs, welche die benachbarten Nucleosomen methylieren und zur Ausbreitung des Heterochromatins führen (Jenuwein und Allis, 2001).

Dieses postulierte Modell der autoregulatorischen Assemblierung von Heterochromatin enthält jedoch einige Schwächen. So weist gereinigtes HP1 zu DNA eine wesentlich höhere Affinität auf als zu seiner designierten Zielstruktur H3K9me₃. Außerdem führt RNase-Behandlung zur Elution von HP1 vom perizentrischen Heterochromatin (Eskeland *et al.*, 2007, Maison *et al.*, 2002).

Diesbezüglich konnte erst kürzlich von Eskeland *et al.* gezeigt werden, dass *Drosophila* HP1 für das Binden an H3K9me₃ zusätzliche Faktoren benötigt (Eskeland *et al.*, 2007).

Brocher *et al.* zeigen, dass HMGA1a die Dynamik von HP1 α in humanen Zellen beeinflusst. So weist HP1 α eine deutlich erhöhte Dynamik in Zellen auf, in welchen HMGA1a durch RNAi depletiert wurde. Umgekehrt hat die Transfektion eines HMGA1a-Expressionskonstruktes eine längere Verweildauer von HP1 α im Heterochromatin zur Folge. Darüber hinaus zeigen HMGA1a und HP1 α eine Interaktion in „BiFC-Assays“, die sowohl von der sauren Domäne von HMGA1a als auch von der Chromodomäne von HP1 α abhängt (Brocher *et al.*, 2007). Jedoch steht noch der Nachweis aus, dass es sich hierbei um eine direkte Interaktion handelt und die Fluoreszenz-Komplementation nicht durch die räumliche Nähe zwischen HMGA1a und HP1 im perizentrischen Heterochromatin vermittelt wird.

Jüngere Arbeiten identifizierten HMGA1a als essentielle Komponenten von Seneszenz-Assoziierten Heterochromatin-Foci (Narita *et al.*, 2006). Zudem wurde gezeigt, dass das *Drosophila* HMGA1a-Homolog D1 essentiell für die Assemblierung von Heterochromatin und das Binden von HP1 an AT-reiche Satelliten-DNA ist

(Aulner *et al.*, 2002, Blattes *et al.*, 2006). Somit könnte HMGA1a ein Faktor sein, der mit HP1 α bei der Ausbildung von Heterochromatin-Domänen kooperiert (Abbildung 5.5).

Die siRNA Depletion von Orc2 führt sowohl in humanen als auch in *Drosophila*-Zellen zu einer Delokalisierung von HP1, obschon das H3K9-Trimethylierungsmuster intakt bleibt und noch immer in Foci organisiert ist. Demnach hängt die Bindung von HP1 an seine Zielstruktur auch von der Chromatinassoziation der ORC-Untereinheit Orc2 ab (Prasanth *et al.*, 2004). Ranjan *et al.* zeigten an gereinigten Orc-Proteinen, dass sich ohne Orc2 kein ORC-Kern-Komplex ausbilden kann (Ranjan und Gossen, 2006). Dies würde konsequenterweise bedeuten, dass entweder Orc2 oder dem gesamten ORC eine Rolle bei der Rekrutierung und/oder Erhaltung von HP1 in Heterochromatin-Domänen zukommt (Abbildung 5.5). Diese These wird durch Experimente bestätigt, in denen Orc2-„knock down“-Zellen unnatürlich kondensierte Chromosomen aufweisen sowie Defekte bei der Spindelorganisation und der Chromosomensegregation besitzen (Prasanth *et al.*, 2004). Hierbei ist anzumerken, dass Orc2 über den gesamten Zellzyklus hinweg an Centromeren und Centrosomen lokalisiert. Insofern ist es wahrscheinlich, dass Orc2 Aufgaben bei der Assemblierung der Kinetochore und der Organisation der Spindeln erfüllt (Prasanth *et al.*, 2004). BiFC-Experimente aus Kapitel 4.2 lassen vermuten, dass die HMGA1a-„AT-hook“-Motive die Lokalisierung von ORC im perizentrischen Heterochromatin bedingen. Daher ist vorstellbar, dass ein Komplex aus HMGA1a, ORC und HP1 am perizentrischen Chromatin lokalisiert ist, der über seine replikative Funktion hinaus das „Silencing“ der α -Satelliten-DNA bewirkt und dadurch die Kinetochorfunktion gewährleistet.

Zukünftige Experimente werden Aufschluss darüber geben, ob HMGA1a und ORC kooperativ oder unabhängig voneinander zur Erhaltung des Heterochromatins in perizentrischen Chromatinregionen beitragen.

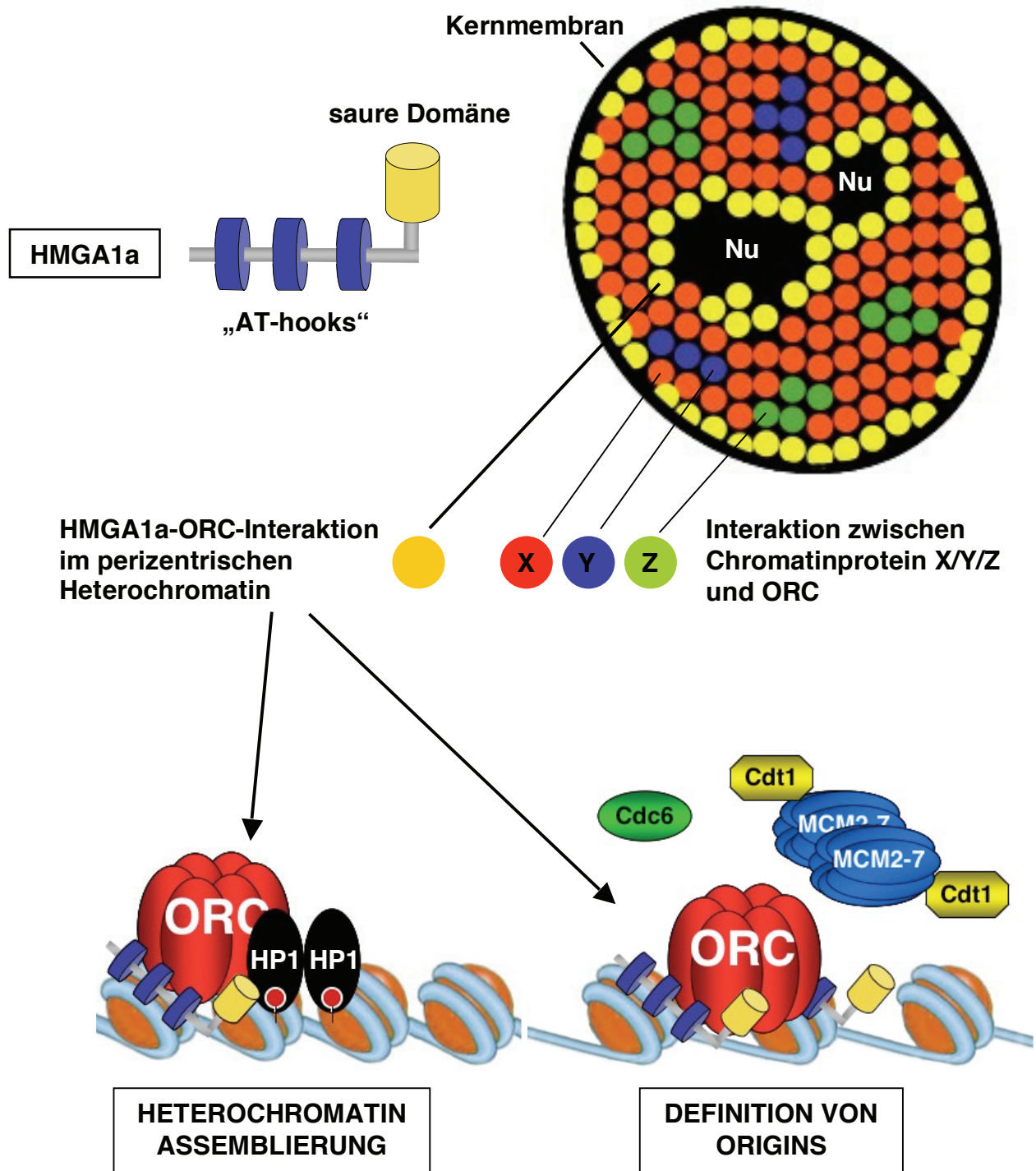


Abb. 5.5: Bedeutung der HMGA1a-ORC-Interaktion. Oben links: Domänenstruktur von HMGA1a. **Oben rechts:** Kofaktor-Modell. Chromatinproteine aus verschiedenen Kern-Domänen konkurrieren um die Interaktion mit ORC, wodurch sich eine homogene Verteilung von ORC über den Kern einstellt. Diese Interaktionen zwischen ORC und verschiedenen Chromatinproteinen sind durch farbige Ovale dargestellt (HMGA1a-ORC-Interaktion in Gelb). „Nu“ = Nukleolus. **unten links:** HMGA1a und ORC tragen kooperativ zur HP1-Bindung an H3K9-me₃ (kleine rote Ovale) bei und dadurch zur Ausbildung bzw. Erhaltung des Heterochromatins. **unten rechts:** HMGA1a rekrutiert ORC über seine „AT-hook“-Motive an DNA. Dies führt zur Ausbildung von preRCs und zur Definition von Replikationsursprüngen.

6. Zusammenfassung

Jede Zellteilung setzt die Duplikation des Erbgutes voraus, ein Vorgang, der als DNA-Replikation bezeichnet wird. Die DNA-Replikation initiiert an Replikationsursprüngen (Origins), die je einmal pro Zellzyklus während der S-Phase aktiviert werden. In Metazoen vermutet man mehrere zehntausend Origins, welche durch die Bindung des eukaryonten „origin recognition complex“ (ORC) determiniert werden. DNA-Sequenzen, epigenetische Faktoren und DNA-bindende ORC-Interaktionspartner können die chromosomalen Bindungsstellen von ORC festlegen. Bekanntestes Beispiel eines solchen ORC-Interaktionspartners ist das Epstein-Barr-Virus nukleäre Antigen 1 (EBNA1). EBNA1 rekrutiert ORC an den latenten Origin von EBV, wodurch die Replikation des viralen Genoms gewährleistet wird. Das „high mobility group AT-hook“ Protein 1a (HMGA1a) kann die replikative Funktion von EBNA1 ersetzen.

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Hintergründe der replikativen Funktion von HMGA1a aufzuklären. Durch Experimente mit rekombinanten HMGA1a- und ORC-Proteinen, durch Co-Immunopräzipitationen sowie durch Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementations-Experimente wurde HMGA1a als ORC-Interaktionspartner identifiziert. Es wurde gezeigt, dass die Interaktion mit Orc1 durch ein aminoterminales HMGA1a-Motiv und die Interaktion mit Orc6 durch die carboxyterminale saure Domäne von HMGA1a vermittelt wird. Die HMGA1a-“AT-hook“-Motive dirigieren ORC an das AT-reiche perizentrische Heterochromatin. An extrachromosomal replizierenden Plasmiden wurde demonstriert, dass ORC von einem HMGA1a-Tetrazyklin-Repressor-Fusionsprotein an Tetrazyklin-Repressor-Bindestellen rekrutiert werden kann. Dies führt zur Ausbildung eines ortsspezifischen und dominanten Replikationsursprunges. Ferner wurde Orc6 als Bestandteil des humanen ORC verifiziert und eine Interaktion zwischen Orc6 und dem Ribosomenbiogenese-Faktor Pes1 erstmalig beschrieben.

Meine Arbeit demonstriert, dass HMGA1a durch die Interaktion mit ORC Replikationsstartstellen festlegen kann. Darüber hinaus schlage ich ein Modell vor, wonach humanes Orc6 zelluläre Prozesse wie DNA-Replikation und Ribosomenbiogenese koordiniert und in das Zellzyklusprogramm integriert.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| aff. ger. | affinitätsgereinigt |
| APS | Ammoniumperoxidisulfat |
| BiFC | Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“) |
| bzw. | beziehungsweise |
| CFP | cyan fluoreszierendes Protein („cyan fluorescent protein“) |
| ChIP | Chromatin-Immunopräzipitation |
| CMV | Cytomegalovirus |
| Co-IP | Co-Immunopräzipitation |
| DES | Desthiobiotin |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| Dox. | Doxyzyklin |
| DS-Element | Dyad Symmetry-Element |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EBNA | Epstein-Barr Virus nukleäres Antigen |
| EBNA1-DBD | DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von EBNA1 |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP | „enhanced“-GFP |
| FCS | Fötales Kälberserum |
| FR | Family of Repeats |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein („green fluorescent protein“) |

| | |
|--------------|--|
| HMG | „high mobility group“ |
| HP1 | Heterochromatin Protein 1 |
| HRP | gekoppelte Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“) |
| IF | Immunofluoreszenz |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IP | Immunopräzipitation |
| Kan. | Kaninchen |
| kbp | Kilobasenpaar(e) |
| K_D | Dissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |
| KE | Kernextrakt |
| L | Liter |
| LB | Luria Bertani |
| M | molar |
| m | milli |
| mA | Milliampere |
| MCM-Proteine | „mini chromosome maintenance“-Proteine |
| min. | Minute |
| MOI | Virusdosis („multiplicity of infection“) |
| mRFP | monomeres rot fluoreszierendes Protein |
| mRNA | Boten-RNA („messenger RNA“) |
| n | nano |
| nm | Nanometer |
| ORC | „origin recognition complex“ |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“) |
| PI | Propidium-Iodid |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| preIC | Prä-Initiations-Komplex |
| preRC | Prä-Replikations-Komplex |
| RFP | rot fluoreszierendes Protein („red fluorescent protein“) |
| scTetR | „single-chain“-TetR |
| SD | saure Domäne |

| | |
|-------------|--|
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| ST | Strep-Tag II |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin |
| <i>tetO</i> | Tet-Operator |
| TetR | Tetrazyklin-Repressor (Tet-Repressor) |
| Tris | Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| ÜS | Überstand |
| UV | Ultraviolett |
| UZ | Ultrazentrifuge |
| V | Volt |
| Verd. | Verdünnung |
| Vol. | Volumen |
| WT | Wild Typ |
| YC | carboxyterminales Fragment von YFP (Aminosäuren 155-238) |
| YFP | gelb fluoreszierendes Protein („yellow fluorescent protein“) |
| YN | aminoternales Fragment von YFP (Aminosäuren 1-154) |
| z. B. | zum Beispiel |
| α | anti |
| κ | kappa |
| λ | lambda |
| μ | mikro |

8. Literaturverzeichnis

Abdurashidova, G., Danailov, M. B., Ochem, A. *et al.* (2003). Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle. *Embo J* 22, 4294-4303.

Abdurashidova, G., Radulescu, S., Sandoval, O. *et al.* (2007). Functional interactions of DNA topoisomerases with a human replication origin. *Embo J* 26, 998-1009.

Aggarwal, B. D. und Calvi, B. R. (2004). Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature* 430, 372-376.

Amirand, C., Viari, A., Ballini, J. P. *et al.* (1998). Three distinct sub-nuclear populations of HMG-I protein of different properties revealed by co-localization image analysis. *J Cell Sci* 111 (Pt 23), 3551-3561.

Aparicio, T., Ibarra, A. und Mendez, J. (2006). Cdc45-MCM-GINS, a new power player for DNA replication. *Cell Div* 1, 18.

Atanasiu, C., Deng, Z., Wiedmer, A. *et al.* (2006). ORC binding to TRF2 stimulates OriP replication. *EMBO Rep* 7, 716-721.

Aulner, N., Monod, C., Mandicourt, G. *et al.* (2002). The AT-hook protein D1 is essential for *Drosophila melanogaster* development and is implicated in position-effect variegation. *Mol Cell Biol* 22, 1218-1232.

Baiker, A., Maercker, C., Piechaczek, C. *et al.* (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.

Balasov, M., Huijbregts, R. P. und Chesnokov, I. (2007). Role of the Orc6 protein in origin recognition complex-dependent DNA binding and replication in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 27, 3143-3153.

Baltin, J., Leist, S., Odrionitz, F. *et al.* (2006). DNA replication in protein extracts from human cells requires ORC and Mcm proteins. *J Biol Chem* 281, 12428-12435.

Bell, S. P. und Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357, 128-134.

Berens, C. und Hillen, W. (2004). Gene regulation by tetracyclines. *Genet Eng (N Y)* 26, 255-277.

Bianchi, M. E. und Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 15, 496-506.

Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* 100, 243-255.

Blattes, R., Monod, C., Susbielle, G. *et al.* (2006). Displacement of D1, HP1 and topoisomerase II from satellite heterochromatin by a specific polyamide. *Embo J* 25, 2397-2408.

- Blow, J. J. und Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 476-486.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bonaldi, T., Langst, G., Strohner, R. *et al.* (2002). The DNA chaperone HMGB1 facilitates ACF/CHRAC-dependent nucleosome sliding. *Embo J* 21, 6865-6873.
- Bonnefoy, E., Bandu, M. T. und Doly, J. (1999). Specific binding of high-mobility-group I (HMGI) protein and histone H1 to the upstream AT-rich region of the murine beta interferon promoter: HMGI protein acts as a potential antirepressor of the promoter. *Mol Cell Biol* 19, 2803-2816.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bramhall, S., Noack, N., Wu, M. *et al.* (1969). A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal Biochem* 31, 146-148.
- Brocher, J., Thomae, A. W., Schepers, A. *et al.* (2007). Impact of HMGA1a proteins on myogenesis and heterochromatin organization during differentiation. eingereicht.
- Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I. *et al.* (2001). Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10085-10089.
- Chesnokov, I., Remus, D. und Botchan, M. (2001). Functional analysis of mutant and wild-type *Drosophila* origin recognition complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11997-12002.
- Chesnokov, I. N. (2007). Multiple functions of the origin recognition complex. *Int Rev Cytol* 256, 69-109.
- Chesnokov, I. N., Chesnokova, O. N. und Botchan, M. (2003). A cytokinetic function of *Drosophila* ORC6 protein resides in a domain distinct from its replication activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9150-9155.
- Church, G. M. und Gilbert, W. (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1991-1995.
- Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S. *et al.* (2006). Chromosome territories--a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* 18, 307-316.
- Cvetic, C. und Walter, J. C. (2005). Eukaryotic origins of DNA replication: could you please be more specific? *Semin Cell Dev Biol* 16, 343-353.
- Danis, E., Brodolin, K., Menut, S. *et al.* (2004). Specification of a DNA replication origin by a transcription complex. *Nat Cell Biol* 6, 721-730.
- DePamphilis, M. L. (1993). Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells. *Curr Opin Cell Biol* 5, 434-441.
- DePamphilis, M. L. (2003). The 'ORC cycle': a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene* 310, 1-15.

- Dhar, S. K., Delmolino, L. und Dutta, A. (2001a). Architecture of the human origin recognition complex. *J Biol Chem* 276, 29067-29071.
- Dhar, S. K., Yoshida, K., Machida, Y. *et al.* (2001b). Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* 106, 287-296.
- Dhar, S. K. und Dutta, A. (2000). Identification and characterization of the human ORC6 homolog. *J Biol Chem* 275, 34983-34988.
- Diana, F., Di Bernardo, J., Sgarra, R. *et al.* (2005). Differential HMGA expression and post-translational modifications in prostatic tumor cells. *Int J Oncol* 26, 515-520.
- Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J. *et al.* (1995). Stepwise assembly of initiation complexes at budding yeast replication origins during the cell cycle. *J Cell Sci Suppl* 19, 67-72.
- Diffley, J. F. und Stillman, B. (1988). Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and a transcriptional silencer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2120-2124.
- Dignam, J. D., Martin, P. L., Shastry, B. S. *et al.* (1983). Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol* 101, 582-598.
- Du, Y. C. und Stillman, B. (2002). Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis. *Cell* 109, 835-848.
- Eskeland, R., Eberharter, A. und Imhof, A. (2007). HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Mol Cell Biol* 27, 453-465.
- Evans, A., Lennard, T. W. und Davies, B. R. (2004). High-mobility group protein 1(Y): metastasis-associated or metastasis-inducing? *J Surg Oncol* 88, 86-99.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Gambus, A., Jones, R. C., Sanchez-Diaz, A. *et al.* (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat Cell Biol* 8, 358-366.
- Gerbi, S. A. und Bielinsky, A. K. (2002). DNA replication and chromatin. *Curr Opin Genet Dev* 12, 243-248.
- Gerhardt, J., Jafar, S., Spindler, M. P. *et al.* (2006). Identification of new human origins of DNA replication by an origin-trapping assay. *Mol Cell Biol* 26, 7731-7746.
- Ghosh, M., Liu, G., Randall, G. *et al.* (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. *et al.* (1994). Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7119-7123.
- Gilbert, D. M. (2001). Making sense of eukaryotic DNA replication origins. *Science* 294, 96-100.

- Giordano-Coltart, J., Ying, C. Y., Gautier, J. *et al.* (2005). Studies of the properties of human origin recognition complex and its Walker A motif mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 69-74.
- Glover, J. N., Williams, R. S. und Lee, M. S. (2004). Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. *Trends Biochem Sci* 29, 579-585.
- Gossen, M., Pak, D. T., Hansen, S. K. *et al.* (1995). A Drosophila homolog of the yeast origin recognition complex. *Science* 270, 1674-1677.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. *et al.* (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Grimm, T., Holzel, M., Rohmoser, M. *et al.* (2006). Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. *Nucleic Acids Res* 34, 3030-3043.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. D e In Glover, ed (Oxford).
- Harland, R. M. und Laskey, R. A. (1980). Regulated replication of DNA microinjected into eggs of *Xenopus laevis*. *Cell* 21, 761-771.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Harrer, M., Luhrs, H., Bustin, M. *et al.* (2004). Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *J Cell Sci Pt*.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. *et al.* (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 U S A* 55, 997-1004.
- Hozak, P., Hassan, A. B., Jackson, D. A. *et al.* (1993). Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell* 73, 361-373.
- Hu, C. D., Chinenov, Y. und Kerppola, T. K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9, 789-798.
- Huberman, J. A. und Riggs, A. D. (1968). On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. *J Mol Biol* 32, 327-341.
- Humme, S. (2004). Das EBNA1 Protein von EBV. Dissertation.
- Hung, S. C., Kang, M. S. und Kieff, E. (2001). Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1865-1870.
- Huth, J. R., Bewley, C. A., Nissen, M. S. *et al.* (1997). The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol* 4, 657-665.
- Jacob, F., Brenner, J. und Cuzin, F. (1964). On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 28, 329-348.

- Jenuwein, T. und Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Kaplan, D. L., Davey, M. J. und O'Donnell, M. (2003). Mcm4,6,7 uses a "pump in ring" mechanism to unwind DNA by steric exclusion and actively translocate along a duplex. *J Biol Chem* 278, 49171-49182.
- Kaplan, D. L. und O'Donnell, M. (2004). Twin DNA pumps of a hexameric helicase provide power to simultaneously melt two duplexes. *Mol Cell* 15, 453-465.
- Kerppola, T. K. (2006). Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 449-456.
- Killian, A., Le Meur, N., Sesboue, R. *et al.* (2004). Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability. *Oncogene* 23, 8597-8602.
- Kitamura, E., Blow, J. J. und Tanaka, T. U. (2006). Live-cell imaging reveals replication of individual replicons in eukaryotic replication factories. *Cell* 125, 1297-1308.
- Klein, J. und Grummt, I. (1999). Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6096-6101.
- Knipe, D. M., Howley, P. M. und Lamb, R. A. (2007). *Fields Virology*.
- Knowles, B. B., Howe, C. C. und Aden, D. P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497-499.
- Kong, D., Coleman, T. R. und DePamphilis, M. L. (2003). Xenopus origin recognition complex (ORC) initiates DNA replication preferentially at sequences targeted by *Schizosaccharomyces pombe* ORC. *Embo J* 22, 3441-3450.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- Krueger, C., Berens, C., Schmidt, A. *et al.* (2003). Single-chain Tet transregulators. *Nucleic Acids Res* 31, 3050-3056.
- Krysan, P. J. und Calos, M. P. (1993). Epstein-Barr virus-based vectors that replicate in rodent cells. *Gene* 136, 137-143.
- Kukimoto, I., Igaki, H. und Kanda, T. (1999). Human CDC45 protein binds to minichromosome maintenance 7 protein and the p70 subunit of DNA polymerase alpha. *Eur J Biochem* 265, 936-943.
- Ladenburger, E. M., Keller, C. und 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.
- Leatherwood, J. und Vas, A. (2003). Connecting ORC and heterochromatin: why? *Cell Cycle* 2, 573-575.

- Lee, D. G. und Bell, S. P. (1997). Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol Cell Biol* 17, 7159-7168.
- Lee, J. K., Moon, K. Y., Jiang, Y. *et al.* (2001). The *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the spOrc4 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13589-13594.
- Lei, M. und Tye, B. K. (2001). Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* 114, 1447-1454.
- Lemaitre, J. M., Danis, E., Pasero, P. *et al.* (2005). Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. *Cell* 123, 787-801.
- Li, C. J. und 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, 105-116.
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K. *et al.* (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Lusser, A. und Kadonaga, J. T. (2003). Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. *Bioessays* 25, 1192-1200.
- Marahrens, Y. und Stillman, B. (1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science* 255, 817-823.
- Maiorana, A., Tu, X., Cheng, G. *et al.* (2004). Role of p53 in the transformation and immortalization of mammalian cells. *Oncogene* 23, 7116-7124.
- Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H. *et al.* (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 30, 329-334.
- McNairn, A. J. und Gilbert, D. M. (2003). Epigenomic replication: linking epigenetics to DNA replication. *Bioessays* 25, 647-656.
- McNairn, A. J., Okuno, Y., Misteli, T. *et al.* (2005). Chinese hamster ORC subunits dynamically associate with chromatin throughout the cell-cycle. *Exp Cell Res* 308, 345-356.
- Mendez, J. und 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.
- Minami, H., Takahashi, J., Suto, A. *et al.* (2006). Binding of AIF-C, an Orc1-binding transcriptional regulator, enhances replicator activity of the rat aldolase B origin. *Mol Cell Biol* 26, 8770-8780.
- Moyer, S. E., Lewis, P. W. und Botchan, M. R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10236-10241.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S. *et al.* (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.

- Narita, M., Narita, M., Krizhanovsky, V. *et al.* (2006). A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126, 503-514.
- Ohta, S., Tatsumi, Y., Fujita, M. *et al.* (2003). The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle. *J Biol Chem* 278, 41535-41540.
- Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G. *et al.* (1996). Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. *Mol Cell Biol* 16, 6977-6984.
- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnani, F. *et al.* (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635-648.
- Pak, D. T., Pflumm, M., Chesnokov, I. *et al.* (1997). Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* 91, 311-323.
- Peters, A. H. und Schubeler, D. (2005). Methylation of histones: playing memory with DNA. *Curr Opin Cell Biol* 17, 230-238.
- Piechaczek, C., Fetzer, C., Baiker, A. *et al.* (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.
- Puck, T. T. und Marcus, P. I. (1955). A Rapid Method For Viable Cell Titration And Clone Production With Hela Cells In Tissue Culture: The Use Of X-Irradiated Cells To Supply Conditioning Factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41, 432-437.
- Prasanth, S. G., Prasanth, K. V., Siddiqui, K. *et al.* (2004). Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *Embo J*.
- Prasanth, S. G., Prasanth, K. V. und Stillman, B. (2002). Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science* 297, 1026-1031.
- Radic, M. Z., Lundgren, K. und Hamkalo, B. A. (1987). Curvature of mouse satellite DNA and condensation of heterochromatin. *Cell* 50, 1101-1108.
- Ranjan, A. und Gossen, M. (2006). A structural role for ATP in the formation and stability of the human origin recognition complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4864-4869.
- Reeves, R. und Nissen, M. S. (1990). The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265, 8573-8582.
- Reeves, R. (2001). Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277, 63-81.
- Remus, D., Beall, E. L. und Botchan, M. R. (2004). DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding. *Embo J* 23, 897-907.
- Ritzi, M., Tillack, K., Gerhardt, J. *et al.* (2003). Complex protein-DNA dynamics at the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J Cell Sci* 116, 3971-3984.

- Rohrmoser, M., Holzel, M., Grimm, T. *et al.* (2007). Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 controls nucleolar localization and assembly of the PeBoW complex required for maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol* 27, 3682-3694.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S. *et al.* (2007). A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. eingereicht.
- Sadoni, N., Langer, S., Fauth, C. *et al.* (1999). Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* 146, 1211-1226.
- Sambrook, J. und Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition.
- Sasaki, T. und Gilbert, D. M. (2007). The many faces of the origin recognition complex. *Curr Opin Cell Biol*.
- Saxena, S. und Dutta, A. (2005). Geminin-Cdt1 balance is critical for genetic stability. *Mutat Res* 569, 111-121.
- Schaarschmidt, D., Baltin, J., Stehle, I. M. *et al.* (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. *et al.* (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. *et al.* (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. *et al.* (2002). Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat Genet* 32, 438-442.
- Schueler, M. G., Higgins, A. W., Rudd, M. K. *et al.* (2001). Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294, 109-115.
- Schwaiger, M. und Schubeler, D. (2006). A question of timing: emerging links between transcription and replication. *Curr Opin Genet Dev* 16, 177-183.
- Sears, J., Ujihara, M., Wong, S. *et al.* (2004). The amino terminus of Epstein-Barr Virus (EBV) nuclear antigen 1 contains AT hooks that facilitate the replication and partitioning of latent EBV genomes by tethering them to cellular chromosomes. *J Virol* 78, 11487-11505.
- Semple, J. W., Da-Silva, L. F., Jarvis, E. J. *et al.* (2006). An essential role for Orc6 in DNA replication through maintenance of pre-replicative complexes. *Embo J* 25, 5150-5158.
- Sgarra, R., Rustighi, A., Tessari, M. A. *et al.* (2004). Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS Lett* 574, 1-8.
- Shareef, M. M., Badugu, R. und Kellum, R. (2003). HP1/ORC complex and heterochromatin assembly. *Genetica* 117, 127-134.

- Shimada, K. und Gasser, S. M. (2007). The origin recognition complex functions in sister-chromatid cohesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 128, 85-99.
- Sibani, S., Price, G. B. und Zannis-Hadjopoulos, M. (2005). Ku80 binds to human replication origins prior to the assembly of the ORC complex. *Biochemistry* 44, 7885-7896.
- Simpson, R. T. (1990). Nucleosome positioning can affect the function of a cis-acting DNA element in vivo. *Nature* 343, 387-389.
- Skarstad, K., Boye, E. und Fanning, E. (2003). Circles in the sand. *EMBO Rep* 4, 661-665.
- Smith, T. F. und Waterman, M. S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 147, 195-197.
- Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R. *et al.* (2003). MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *Embo J* 22, 2788-2797.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Speck, C., Chen, Z., Li, H. *et al.* (2005). ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA. *Nat Struct Mol Biol* 12, 965-971.
- Speck, C. und Stillman, B. (2007). Cdc6 ATPase activity regulates ORC x Cdc6 stability and the selection of specific DNA sequences as origins of DNA replication. *J Biol Chem* 282, 11705-11714.
- Stefanovic, D., Stanojic, S., Vindigni, A. *et al.* (2003). In vitro protein-DNA interactions at the human lamin B2 replication origin. *J Biol Chem* 278, 42737-42743.
- Stehle, I. M., Scinteie, M. F., Baiker, A. *et al.* (2003). Exploiting a minimal system to study the epigenetic control of DNA replication: the interplay between transcription and replication. *Chromosome Res* 11, 413-421.
- Stinchcomb, D. T., Struhl, K. und Davis, R. W. (1979). Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282, 39-43.
- Strahl, B. D. und Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Sugden, B. (2002). In the beginning: a viral origin exploits the cell. *Trends Biochem Sci* 27, 1-3.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K. *et al.* (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 328-332.
- Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H. *et al.* (2003). The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. *J Biol Chem* 278, 41528-41534.
- Thomas, J. O. und Travers, A. A. (2001). HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 26, 167-174.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

- Triolo, T. und Sternglanz, R. (1996). Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. *Nature* 381, 251-253.
- Turner, B. M. (1993). Decoding the nucleosome. *Cell* 75, 5-8.
- Ugarkovic, D. (2005). Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO Rep* 6, 1035-1039.
- Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W. *et al.* (2003). Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev* 17, 1894-1908.
- Vashee, S., Simancek, P., Challberg, M. D. *et al.* (2001). Assembly of the human origin recognition complex. *J Biol Chem* 276, 26666-26673.
- Vassilev, L. T., Burhans, W. C. und DePamphilis, M. L. (1990). Mapping an origin of DNA replication at a single-copy locus in exponentially proliferating mammalian cells. *Mol Cell Biol* 10, 4685-4689.
- Vestner, B., Bustin, M. und Gruss, C. (1998). Stimulation of replication efficiency of a chromatin template by chromosomal protein HMG-17. *J Biol Chem* 273, 9409-9414.
- Wang, J. und 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.
- Watson, J. D. und Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Wessel, D. und Flugge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138, 141-143.
- White, E. J., Emanuelsson, O., Scalzo, D. *et al.* (2004). DNA replication-timing analysis of human chromosome 22 at high resolution and different developmental states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17771-17776.
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Dhar, S. K. *et al.* (2000). Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science* 290, 2309-2312.
- Wyrick, J. J., Aparicio, J. G., Chen, T. *et al.* (2001). Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science* 294, 2357-2360.
- Yabuki, N., Terashima, H. und Kitada, K. (2002). Mapping of early firing origins on a replication profile of budding yeast. *Genes Cells* 7, 781-789.
- Yie, J., Merika, M., Munshi, N. *et al.* (1999a). The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. *Embo J* 18, 3074-3089.
- Yie, J., Senger, K. und Thanos, D. (1999b). Mechanism by which the IFN-beta enhanceosome activates transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13108-13113.
- Zegerman, P. und Diffley, J. F. (2007). Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 281-285.
- Zhou, J., Chau, C., Deng, Z. *et al.* (2005a). Epigenetic Control of Replication Origins. *Cell Cycle* 4.

Zhou, J., Chau, C. M., Deng, Z. *et al.* (2005b). Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication. *Embo J* 24, 1406-1417.

9. Anhang

9.1 Oligonukleotide

9.1.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'–3'-Orientierung angegeben.

| Name | Sequenz |
|---|---|
| AT1 | ATGGAGATGAGGGTGAGGAAGGGCAGGAGTGGAGCCACCCGCAGTTTCGAA AAATGAGGATCCCCCTCTAGAGTCGACCTG |
| AT2 | CAGGTCGACTCTAGAGGGGATCCTCATTTCGAACTGCGGGTGGCTC CACTCCTGCCCTTCCTCACCTCATCTCCAT |
| AT10 | ATGGAGATGAGGGTGAGGAAGGGCAGGAGTGGAGCCACCCGCAGTT CGAAAAATGACGAGATCTGCAGGTCGACCTCGAGATC |
| AT11 | GATCTCGAGGTCGACCTGCAGATCTCGTCATTTTCGAACTGC GGGTGGCTCCACTCCTGCCCTTCCTCACCTCATCTCCAT |
| HMGAlr for | TTTCATATGAGTGAGTCGAGCTCGAAGTCC |
| HMGAlr rev | TTTGGATCCTCATTTCGAACTGCG |
| Orc1 pBiFC for | TTTTGCGGCCGCCATGGCACACTACCCACAAGG |
| Orc1 pBiFC rev | TTTTGTGCACCTCGTCTTTCAGCGCATAACAGC |
| Orc6 pBiFC for | TTTTGCGGCCGCCATGGGGTCGGAGCTGATCGGG |
| Orc6 pBiFC rev | TTTTTCTAGACTCTGCTGTAGCCTTTTGAGCACTGGC |
| Orc4for_pBiFC | CCATGAGCAGTCGTAAATCAAAGAGTAACAGC |
| Orc4rev_pBiFC | TTTGGTACCCTCGAGTAACCAGCTTAGTGAGGATGTTGCC |
| Orc5for_pBiFC | CCATGCCCCACTTGAAAAACGTGG |
| Orc5rev_pBiFC | TTTGGTACCCTCGAGCAAGAAATCATAAAGTATTTTATTATGTCAAAGTTCACC |
| Cdc6for_pBiFC | CCATGCCTCAAACCCGATCCC |
| Cdc6rev_pBiFC | AAAGGTACCCTCGAGAGGCAATCCAGTAGCTAAGATATTTCCAATTAAGC |
| pBiFC-YC HMGAla del1 for Primer | TTTAGATCTCAATGAAGCAGCTCCGGTGAGTCC |
| pBiFC-YC HMGAla del3 for Primer | TTTAGATCTCAATGAAAAAACTGGAGAAGGAGGAAGAGGAGG |
| pBiFC-HMGAla del1-3 rev Primer | TTTCTCGAGCCAGGCTAGCAACCTTTCTCTTCTTCTTCTTGG |
| pBiFC-YC HMGAla 3xR->G for Primer | TTGAATTCTTATGAGTGAGTCGAGCTCGAAGTCCAGC |
| pBiFC-YC HMGAla 3xR->G rev Primer | TTTAGATCTGCTCCTCCTCCGAGGACTCCTGC |

9.1.2 Oligonukleotide für quantitative PCRs

| | |
|--------------------|------------------------------|
| RT-pEPI-2Fb (tetO) | ATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTG |
| RT-pEPI-2Rb (tetO) | AGGGTCCGATTTAGTGCTTTACG |
| RT-pEPI-3F (polyA) | AGGCTAACTGAAACACGGAAGGAG |
| RT-pEPI-3R (polyA) | GGGTCTCGGTGGGGTATCG |
| RT-pEPI-4F (GFP) | CTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGG |
| RT-pEPI-4R (GFP) | CTGGGTATCTTGAAAAGCATTGAAC |
| tet for (KL1) | AGCGAGGAAGCGGAAGAGC |
| tet back (KL1) | AAGCATAAAGTGTAAGCCTG |
| SV40 for (KL2) | GGAGTTAGGGGCGGGACTATG |
| SV40 back (KL2) | TGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGT |
| 4.2-for (DS) | AAAGTCTGCTCCAGGATGAAAGC |
| 4.2-rev (DS) | CCAGGGCGTTCTATTTTTACAG |
| Puro-for | CTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATG |
| Puro-rev | CGCAACCTCCCCTTCTACGAG |

Reaktionsansatz für quantitative PCRs (nach ChIP):

| | |
|----------------------------------|--|
| DNA | 1–2 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM, Roche) | 0,8 μ l |
| Oligonukleotid-Mix | 0,5 μ l (1:1 Gemisch; je 10 μ M) |
| Polymerase-Mix (Roche) | 1 μ l (enthält dNTP's, „hot-start“-DNA-Polymerase, SYBR-Green I) |
| H ₂ O | <i>ad</i> 10 μ l |

Temperaturprofil für quantitative PCRs (nach ChIP):

Das Temperatur-Profil der PCR-Reaktion bestand aus den Segmenten A–G; Segment B umfasste 7 Zyklen, Segment C 4 Zyklen, Segment D 4 Zyklen und Segment E 30 Zyklen.

| Segment | Temperatur | Zeit (sek) | Slope (°C/sek) | Detektion |
|---------|------------|------------|----------------|----------------|
| A | 95 °C | 600 | 20 | - |
| B | 95 °C | 1 | 20 | - |
| | 65 °C | 10 | 20 | - |
| | 72 °C | 12 | 20 | - |
| C | 95 °C | 1 | 20 | - |
| | 64 °C | 10 | 20 | - |
| | 72 °C | 12 | 20 | - |
| D | 95 °C | 1 | 20 | - |
| | 63 °C | 10 | 20 | - |
| | 72 °C | 12 | 20 | - |
| E | 95 °C | 1 | 20 | - |
| | 62 °C | 10 | 20 | - |
| | 72 °C | 12 | 20 | - |
| | 75 °C | 3 | 20 | single |
| F | 97 °C | 1 | 20 | - |
| | 76 °C | 10 | 20 | - |
| | 97 °C | 0 | 0,15 | kontinuierlich |
| G | 20 °C | 3 | 20 | - |

9.2 Klonierungen

- p3281 wurde durch PCR-Mutagenese (QuikChange Kit, Stratagene) des Ausgangsvektors p2679 hergestellt. Oligonukleotidkombination: AT1 + AT2.
- p3290 wurde durch PCR-Mutagenese (QuikChange Kit, Stratagene) des Ausgangsvektors p3279 hergestellt. Oligonukleotidkombination: AT10 + AT11.
- p3560 Das für HMGA1a:ST codierende DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotidkombination HMGA1r-for und HMGA1r-rev). Als Matrize diente p3281. Das Amplifikat sowie das pET3c-Derivat pFT240 wurden NdeI/BamHI verdaut, durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und die erhaltenen linearen DNA-Moleküle ligiert.
- p3650 Das für Orc1 codierende DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotidkombination Orc1 pBiFC for und Orc1 pBiFC rev). Als Matrize diente p3012. Das Amplifikat sowie der

- Zielvektor pBiFC-YN-155 wurden NotI/Sall verdaut, durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und die erhaltenen linearen DNA-Moleküle ligiert.
- p3652 Das für Orc6 codierende DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotidkombination Orc6 pBiFC for und Orc6 pBiFC rev). Als Matrize diente p3396. Das Amplifikat sowie der Zielvektor pBiFC-YN-155 wurden NotI/XbaI verdaut, durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und die erhaltenen linearen DNA-Moleküle ligiert.
- p3667 Das für Orc4 codierende DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotidkombination Orc4for_pBiFC und Orc4rev_pBiFC). Als Matrize diente p3014. Das Amplifikat wurde KpnI verdaut. Der Zielvektor pBiFC-YC155 wurde MscI/KpnI verdaut. Nach der Restriktion wurden Amplifikat und Zielvektor durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und die erhaltenen linearen DNA-Moleküle ligiert.
- p3668 Das für Orc5 codierende DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotidkombination Orc5for_pBiFC und Orc5rev_pBiFC). Als Matrize diente p3015. Das Amplifikat wurde KpnI verdaut. Der Zielvektor pBiFC-YC155 wurde MscI/KpnI verdaut. Nach der Restriktion wurden Amplifikat und Zielvektor durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und die erhaltenen linearen DNA-Moleküle ligiert.
- p3669 Das für Cdc6 codierende DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotidkombination Cdc6for_pBiFC und Cdc6rev_pBiFC). Als Matrize diente p2746. Das Amplifikat wurde KpnI verdaut. Der Zielvektor pBiFC-YC155 wurde MscI/KpnI verdaut. Nach der Restriktion wurden Amplifikat und Zielvektor durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und die erhaltenen linearen DNA-Moleküle ligiert.
- p3721 Das für HMGA1a-R3xG codierende DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotidkombination pBiFC-YC HMGA1a 3xR->G for Primer und pBiFC-YC HMGA1a 3xR->G rev Primer). Als Matrize diente p3732. Das Amplifikat sowie der Zielvektor pBiFC-YC155 wurden EcoRI/BglII verdaut, durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und die erhaltenen linearen DNA-Moleküle ligiert.
- p3722 Das für HMGA1a- Δ AT1-NLS codierende DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotidkombination pBiFC-HMGA1a del1 for Primer und pBiFC-HMGA1a del1-3 rev Primer). Als Matrize diente p3729. Das Amplifikat sowie der Zielvektor pBiFC-YC155 wurden BglII/XhoI verdaut, durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und die erhaltenen linearen DNA-Moleküle ligiert.
- p3724 Das für HMGA1a-SD-NLS codierende DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert (Oligonukleotidkombination pBiFC-HMGA1a del3 for

Primer und pBiFC-HMGA1a del1-3 rev Primer). Als Matrize diente p3729. Das Amplifikat sowie der Zielvektor pBiFC-YC155 wurden BglIII/XhoI verdaut, durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und die erhaltenen linearen DNA-Moleküle ligiert.

pEPI-tetO20(c) Das 20 Tet-Operatoren enthaltende 903 bp Fragment wurde durch AscI-Verdau von p2760 erhalten. Der Zielvektor pEPI-I wurde mit MluI linearisiert. Nach der Restriktion wurden Insert und Zielvektor durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und die erhaltenen linearen DNA-Moleküle ligiert.

Für alle PCR-Amplifikationen wurde die Pfu-Turbo Polymerase verwendet.

9.3 Orc6-Cdc6-Interaktion

Auf Deckgläschen wachsende HepG2-Zellen wurden mit der Kombination Orc6-YN:Cdc6-YC transfiziert und auf Fluoreszenz-Komplementation untersucht. Transfizierte Zellen wiesen zwei verschiedene BiFC-Muster auf. Etwa die Hälfte der BiFC-positiven Zellen zeigten eine diffuse nukleäre Verteilung. In den übrigen Zellen war eine Anreicherung der BiFC-Komplexe in den Nukleoli zu beobachten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Orc6 mit Cdc6 in HepG2-Zellen interagiert.

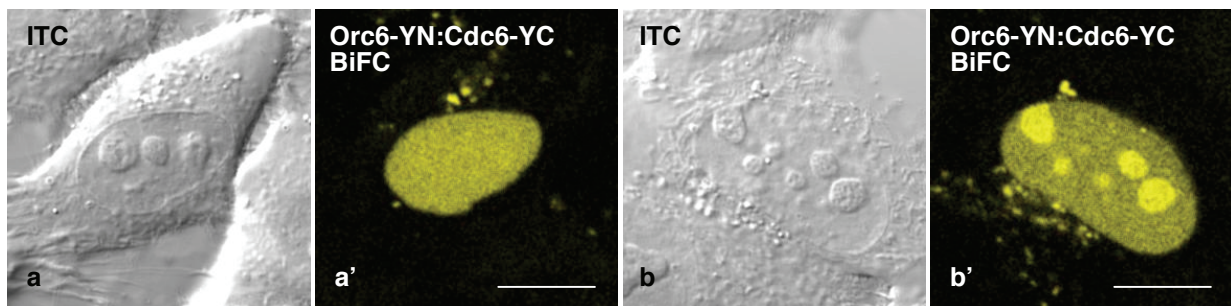


Abb. 9.1: „BiFC-Assay“ **Orc6-YN:Cdc6-YC**. Orc6-YN und Cdc6-YC zeigen Fluoreszenz-Komplementation in lebenden HepG2-Zellen (**a'** und **b'**). **a** und **b**: Korrespondierende Interferenz-Kontrast-Aufnahme. Die weißen Eichstriche entsprechen 10 μm .

9.4 Western-Blot-Bedingungen

Bei allen Western-Blot-Analysen erfolgte der Protein-Transfer auf Nitrocellulose-Membranen (Hybond-ECL, GE Healthcare). Zum Blockieren der Membranen wurde Roti-Block-Lösung verwendet. Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgten bei Raumtemperatur für eine Stunde oder über Nacht bei 4 °C in PBST. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde in PBST/2,5 % Magermilchpulver.

Abweichend hiervon wurde bei α -TetR-Western-Blot-Analysen mit PBST/5 % Magermilchpulver blockiert. Die Inkubation mit dem α -TetR-Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in PBST/2,5 % Magermilchpulver.

9.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------------|----------------|
| Name | Andreas Thomae |
| Geburtsdatum | 20.04.1977 |
| Geburtsort | Weilburg |
| Familienstand | ledig |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |

Schulischer Werdegang

| | |
|-------------|---|
| 1983 – 1987 | Grundschule Wintersdorf, Bayern |
| 1987 – 1997 | Dietrich-Bonhoefer-Gymnasium Oberasbach, Bayern |
| Juni 1997 | Abitur |

Zivildienst

| | |
|-----------------------|--|
| Okt. 1997 – Okt. 1998 | Diakonisches Zentrum Nürnberg Süd-West |
|-----------------------|--|

Studium

| | |
|------------------------|--|
| 1998 – 2002 | Studium der Biologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen |
| Mai 2002 | Diplomprüfung im Studium der Biologie |
| Juli 2002 – März 2003 | Diplomarbeit bei PD Dr. F. Titgemeyer am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen |
| April 2003 – März 2004 | Wiss. Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von PD Dr. F. Titgemeyer am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen |
| April 2004 – Juni 2007 | Promotion in der Arbeitsgruppe von Dr. Aloys Schepers, Abteilung für Genvektoren; GSF, München |

9.6 Publikationen

Thomae, A. W., Pich, D., Brocher, J., Spindler, M. P., Berens, C., Hock, R., Hammerschmidt, W. und Schepers, A. (2007). Interaction between HMGA1a and ORC creates site-specific replication origins. (PNAS, angenommen).

Brocher, J., Thomae, A. W., Schepers, A., Hock, R. (2007). Impact of HMGA1a proteins on myogenesis and heterochromatin organization during differentiation. eingereicht.

Pimentel-Schmitt, E. F., Thomae, A. W., Amon, J., Klieber, M. A., Roth, H. M., Muller, Y. A., Jahreis, K., Burkovski, A. und Titgemeyer, F. (2007). A glucose kinase from *Mycobacterium smegmatis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12, 75-81.

van Wezel, G. P., Konig, M., Mahr, K., Nothaft, H., Thomae, A. W., Bibb, M. und Titgemeyer, F. (2007). A new piece of an old jigsaw: glucose kinase is activated posttranslationally in a glucose transport-dependent manner in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol Microbiol Biotechnol* 12, 67-74.

Parche, S., Thomae, A. W., Schlicht, M. und Titgemeyer, F. (2001). *Corynebacterium diphtheriae*: a PTS view to the genome. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3, 415-422.

9.7 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Dr. **Aloys Schepers**, für die Unterstützung während unserer Zusammenarbeit. Darüber hinaus möchte ich ihm für die Fortbildungsmöglichkeiten danken, die er mir im Rahmen von mehreren internationalen Kongressen zugestanden hat.

Ich danke Professor Dr. **Wolfgang Hammerschmidt** für die freundliche Aufnahme an sein hervorragend ausgestattetes Institut. Darüber hinaus danke ich ihm und **Dagmar Pich** für die stete Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

PD Dr. **Bettina Kempkes** danke ich für die Übernahme der offiziellen Betreuung, für die kritischen Diskussionen und die schnelle Korrektur.

Professor Dr. **Peter Becker** möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken sowie für die Transregio5 Seminare, bei denen ich mir dank der herausragenden geladenen Sprecher, immer neue Inspirationen holen konnte.

Ein Dankeschön gilt unserem ehemaligen Post-Doc **Mark-Peter Spindler** für die exzellente Einarbeitung und die Erkenntnis, dass man als Chromatin-begeisterter Wissenschaftler auch in der Industrie eine attraktive Stelle finden kann.

Unserem jüngsten Labormitglied **Manuel Deutsch** möchte ich für die exzellente Zusammenarbeit am konfokalen Mikroskop danken. Meinem Bench-Nachbarn und langjährigem Freund **Peer Papior** möchte ich bezüglich dieser Arbeit für die konstruktiven Diskussionen danken. Besonders danken möchte ich meinem Laborkollegen **Jens Baltin**, für die vielen inspirierenden Diskussionen, die sich teilweise bis in die frühen Morgenstunden hinzogen.

Krisztina Zeller, der personifizierten Frauen-Power unseres Labors, möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken, sowie für den besonderen Charme, den sie unserer Bay verleiht. Ich möchte mich bei meinem langjährigen Freund, **Christoph Mancao**, dafür bedanken, dass er mich meinem Betreuer Aloys Schepers vorgestellt hat, sowie für unsere gute Labornachbarschaft. **Stefan Boeing** möchte ich für unsere exzellenten Diskussionen danken. **Dirk Eick** möchte ich danken, für die Übernahme der Korrektur sowie für gute Tipps während meiner Doktorarbeit.

Zudem danke ich **Rosi** und **Angie** dafür, dass sie uns Doktoranden die Bürokratie weitestgehend vom Hals gehalten haben.

Der größte Dank gebührt natürlich meiner **Familie** und **Marisa**.

9.8 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Rolle des Chromatin-Proteins HMGA1a für die Definition von Replikationsursprüngen“

von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt wurde und ich mich dabei nur der ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Diese Arbeit wurde weder in der jetzigen noch in einer abgewandelten Form einem anderen Prüfungskomitee vorgelegt.

München, im Juni 2007

Andreas Thomae