

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

**Die Ausbildung von
Pre-Replikationskomplexen
im Epstein-Barr-Virus und dem Menschen:
Eine Genom-weite Analyse**



Peer Papior

aus Nürnberg

München, November 2009

Dissertation eingereicht am:	30. 11. 2009
Tag der mündlichen Prüfung:	02. 11. 2010
1. Gutachter:	Prof. Dr. Berit Jungnickel
2. Gutachter:	Prof. Dr. Peter Becker

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Die Verdopplung der Erbinformation	1
1.2 Entwicklung und Aufbau von Replikationsursprüngen.....	3
1.3 Aufbau und Aktivierung von Replikationskomplexen	8
1.3.1 Kontrolle der DNA-Replikation durch den Zellzyklus.....	8
1.3.2 Lizenzierung von Replikationsursprüngen durch den Pre-Replikationskomplex	10
1.3.3 Aktivierung der DNA-Replikation an Replikationsursprüngen	13
1.4 Replikation im Kontext komplexer Chromatin- und Zellkernstrukturen	15
1.4.1 Funktion von Chromatinstruktur und Genomorganisation im Zellkern ..	16
1.4.2 Histon-Modifikationen	18
1.4.3 ATP-abhängiges Chromatin-Remodeling	19
1.5 Die Replikation des Epstein-Barr-Virus	19
1.6 Variabilität der DNA-Replikation	22
1.7 Zielsetzung	23
2. Material	24
2.1 Zelllinien	24
2.2 Oligonukleotide.....	24
2.3 Antikörper	25
2.4 Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges	26
3. Methoden	28
3.1 Zellkultur.....	28
3.1.1 Kultivierung	28

3.1.2	Aufbewahrung von Zellen	28
3.1.3	Bestimmung der Zellzahl	29
3.2	Zellzyklus-Synchronisation und Bestimmung des DNA-Gehalts	29
3.2.1	Arretierung von HeLa-Zellen in der G ₁ /S-Phase	29
3.2.2	Zellzyklus-Synchronisation von Raji-Zellen durch Zentrifugal-Elutriation	30
3.2.3	Bestimmung des DNA-Gehalts mittels FACS	30
3.3	Proteinbiochemische Arbeiten	30
3.3.1	Präparation von RIPA-Lysaten.....	30
3.3.2	Präparation von Kern-Extrakten.....	31
3.3.3	Co-Immunpräzipitation (Co-IP)	32
3.3.4	Western-Blot	32
3.4	DNA-Arbeitstechniken	33
3.4.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
3.4.2	Präparative Agarose-Gelelektrophorese	33
3.4.3	Bestimmung der DNA-Konzentration	33
3.4.4	Nukleosomen-Footprint und indirektes End-Labeling	33
3.4.5	Southern-Blot	34
3.4.6	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden für Southern-Blots.....	35
3.4.7	Analyse „naszierender DNA“	35
3.4.8	Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP).....	36
3.4.9	Quantitative PCR (Real-Time-PCR / RT-PCR)	40
3.5	Mikroarray-Analysen.....	41
3.5.1	Der EBV-PCR-Mikroarray	41
3.5.2	Der EBV-Oligonukleotid-Mikroarray	42
3.5.3	Der ENCODE-Mikroarray	44

4. Ergebnisse	45
4.1 Etablierung spezifischer ChIP- und ChIP-Chip-Analysen für humane Pre-RC-Proteine.....	45
4.1.1 Protein-DNA Interaktionsstudien mittels ChIP und ChIP-Chip.....	46
4.1.2 Etablierung spezifischer Chromatin-Immunpräzipitationen für Pre-RC-Proteine in Raji-Zellen.....	49
4.2 Genom-weite Analyse von Pre-RC-Bindestellen auf dem EBV-Genom.....	57
4.2.1 EBV-DNA-Mikroarray-Systeme für Pre-RC-Bindungsstudien.....	59
4.2.2 Analysen von Pre-RC-Bindestellen auf dem EBV-PCR-Mikroarray.....	60
4.2.3 Pre-RC- und EBNA1-Signale auf dem EBV-Oligonukleotid-Array.....	71
4.3 Analyse der Ausbildung von Pre-Replikationskomplexen auf dem Human-Genom.....	80
4.3.1 Etablierung humaner ENCODE-Array-Analysen.....	81
4.3.2 Verteilung von Pre-RC-Bindestellen auf dem Human-Genom.....	84
4.4 Die Ausbildung von Pre-RCs am viralen Replikator-Element DS in Abhängigkeit von der lokalen Chromatinstruktur.....	91
4.4.1 Die Assoziation des Pre-RCs an das DS-Element in Abhängigkeit vom Zellzyklus.....	92
4.4.2 Nukleosomen-Position und Chromatin-Remodeling an DS.....	95
4.4.3 Histon-Modifikationen an DS.....	98
4.5 Der Q-Promoter: ein viraler Replikationsursprung.....	104
5. Diskussion	109
5.1 Pre-RC-Dynamik und Chromatinstruktur an einem Modell-Origin.....	110
5.1.1 Das DS-Element in <i>oriP</i> als Modell für eine Helferprotein-vermittelte Pre-RC-Ausbildung.....	110
5.1.2 Chromatin-Dynamik an DS.....	113
5.2 Die DNA-Struktur zwischen FR und Cp begünstigt die Ausbildung von Replikationskomplexen.....	116

5.3	Die ChIP-Chip-Technik zur Identifizierung von Replikationsursprüngen ...	119
5.3.1	Qp: ein effizienter Replikationsursprung ohne signifikante Pre-RC-Ausbildung	120
5.3.2	Variable Lizenzierung und Aktivierung von Replikationsursprüngen...	121
5.4.	Ausblick	125
6.	Zusammenfassung	127
7.	Abkürzungsverzeichnis	128
8.	Literaturverzeichnis	131
9.	Anhang	148
9.1	Signalüberlagerung der Replikate auf dem EBV-PCR-Array	148
9.2	Signale der Serie 2 auf dem EBV-Oligonukleotid-Array	150
9.3	Negative-Cofactor 2 auf dem ENCODE-Array	151
9.4	Naszierende DNA am HPRT-Origin in Raji-Zellen	152
9.6	Publikationen	153
9.7	Erklärung	154

1. Einleitung

1.1 Die Verdopplung der Erbinformation

Damit bei der Zellteilung eine exakte Kopie der Mutterzelle erstellt werden kann, muss die Erbinformation von einer Zellgeneration auf die nächste vollständig weitergegeben werden. Bereits Gregor Mendel postulierte 1866, dass Organismen Faktoren beinhalten (heute als Gene bezeichnet), die jeweils zur Hälfte von jedem Elternteil vererbt werden (Mendel, 1866). Mendels Vererbungslehre konnte sich jedoch in dieser frühen Phase der biologisch-genetischen Forschung nicht durchsetzen. Auch die ersten Desoxyribonukleinsäuren (DNA) – von Friedrich Miescher (Miescher, 1869a) im Jahre 1869 isoliert – fanden als „rein monoton sich wiederholende Nukleotidsequenzen“ kaum Beachtung, da sie für eine Weitergabe von genetischer Information als nicht geeignet erschienen. Bis zum Jahr 1944 wurde angenommen, dass das Erbmaterial in komplexen Proteinstrukturen kodiert sei. Versuche von Oswald Avery, Colin MacLeod und Maclyn MacCarty am Bakterium *Diplococcus pneumoniae* zeigten jedoch, dass DNA tatsächlich vererbare genetische Informationen trägt. Anhand von isolierter DNA wurde ein nicht pathogener Stamm von *D. pneumoniae* in einen virulenten Stamm transformiert (Avery et al., 1979; Avery et al., 1995; Avery et al., 2000).

Als Watson und Crick 1956 die Struktur der DNA aufklärten (Watson und Crick, 1953), offenbarten sich auch Mechanismen, die eine vollständige und fehlerfreie Weitergabe des Genoms zulassen. Der Aufbau der DNA als Doppelstrang (Duplex) ermöglicht es, jeden Einzelstrang als Matrize für die Synthese eines komplementären Schwesternstranges zu nutzen. Experimente von Meselson und Stahl bestätigten diesen – als semikonservative DNA-Replikation bezeichneten – Mechanismus (Meselson und Stahl, 1958). Die Nukleotidsequenz wird anhand von Chargaffs' Regel der Basenpaarung vorgegeben (Cassuto und Chargaff, 1969), wobei der jeweilige Tochterstrang durch Polymerisation von Nukleotiden synthetisiert wird. Somit ist gewährleistet, dass jede Tochterzelle einen vollständigen und zudem identischen Satz an DNA Molekülen bei der Zellteilung erhält.

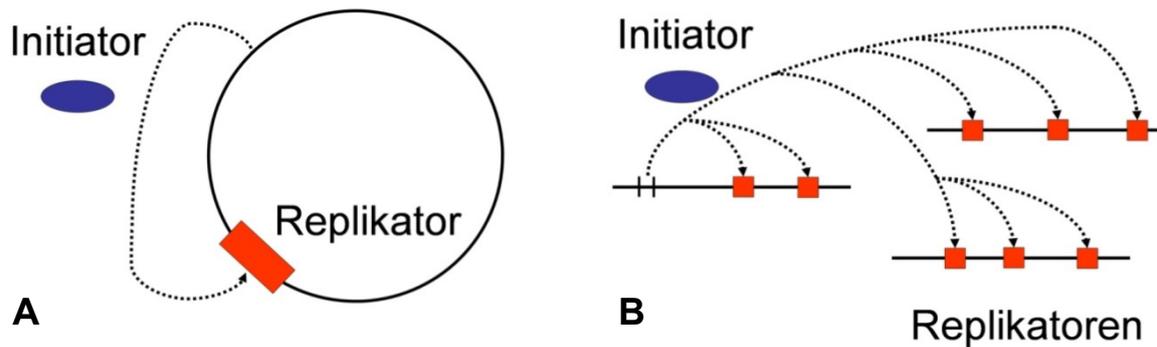


Abb.1.1: (A) Das Replikon Modell nach Jakob und Brenner: In Prokaryonten bindet ein Initiatorprotein an eine Replikatorsequenz. **(B) Modifiziertes Replikon Modell** nach (Gilbert, 2004): In Eukaryonten bindet ein globaler Initiator-Komplex an multiple Replikatorsequenzen.

Mit der Aufklärung des allgemeinen Mechanismus der DNA-Replikation stellte sich die Frage, welche molekularen Mechanismen im Einzelnen hierbei zu Grunde liegen. Eine attraktive Theorie für die Duplikation eines prokaryonten Genoms lieferten 1963 François Jacob und Sydney Brenner mit ihrem Replikon-Modell (Jacob und Brenner, 1963). Dieses besagt, dass ein trans-aktivierendes Protein (Initiator) an ein cis-aktives Sequenzelement (Replikator) bindet und dort dazu beiträgt, die DNA-Replikation einzuleiten (Abb.1.1 A).

Ihre These über die bakterielle Genomverdopplung bestätigte sich weitgehend. 1977 wurde in *E. coli* *oriC* als Replikator (Replikationsursprung) identifiziert (Yasuda und Hirota, 1977) und kurz danach das Protein *DnaA* als entsprechender Initiator. Die Replikatorsequenz und die Struktur des Initiatorproteins sind in Bakterien hoch konserviert (Zahn und Messer, 1979; Ogasawara et al., 1991; Fujita et al., 1992) und das Replikon-Modell ist als genereller Mechanismus der DNA-Replikation für alle Prokaryonten akzeptiert. Das Replikon-Modell wurde in modifizierter Form (Abb.1.1 B) auch auf eukaryonte Organismen übertragen und schien sich ebenfalls zu bestätigen. 1992 identifizierten Bruce Stillman und Stephen Bell (Bell und Stillman, 1992) den „Origin Recognition Complex“ (ORC) als globalen Initiator-Komplex in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). ORC ist ein heterohexamerer Proteinkomplex, der in den folgenden Jahren in allen eukaryontischen Systemen nachgewiesen wurde (Ehrenhofer-Murray et al., 1995; Gavin et al., 1995; Gossen et al., 1995). Mit der Entdeckung des „Origin-Recognition-Complex“ konnte nun auch nach den entsprechenden Bindestellen in eukaryontischen Organismen gesucht werden. Je komplexer die untersuchten

Organismen jedoch waren, desto schwieriger wurde die Suche nach Replikationsursprüngen. So war die Identifizierung von Replikatoren niederer Eukaryonten, wie z.B. der Hefe, noch erfolgreich, aber bei komplexen Organismen, wie dem Menschen, steht die Forschung immer noch am Anfang.

1.2 Entwicklung und Aufbau von Replikationsursprüngen

Replikatoren – auch als Replikationsursprünge oder Origins bezeichnet – sind funktionelle DNA-Elemente, die die Initiation der DNA-Replikation an bestimmten Orten auf der DNA ermöglichen. Durch Bindung von ORC an den Replikator wird die entsprechende DNA-Region markiert. Dabei dient ORC als Plattform für die Rekrutierung weiterer Faktoren, die anschließend den DNA-Doppelstrang aufschmelzen und mit der bidirektionalen Neusynthese des jeweiligen komplementären Schwesternstranges beginnen. Diese molekularen Mechanismen der DNA-Replikation wurden in vielen unterschiedlichen Modellorganismen studiert. Hierbei zeigte sich, dass zum einen der Initiationsprozess an jedem Replikator hoch konserviert abläuft, zum anderen jedoch, dass zwischen verschiedenen Organismen grundlegende Unterschiede in den Selektionsmechanismen von Replikationsursprüngen bestehen.

Der prokaryontische Vertreter *E. coli* besitzt einen einzigen Replikationsursprung (*oriC*), der vom Initiator *DnaA* gebunden wird. *DnaA* bindet hierbei spezifisch an Konsensussequenzen innerhalb des Replikators *oriC* (siehe Replikonmodell Abb.1.1 A). Die Replikation der DNA in Eukaryonten ist deutlich komplexer als im prokaryonten System. Das Genom ist um ein Vielfaches größer, auf mehrere lineare Chromosomen verteilt und in einem speziellen Organell – dem Zellkern – in stabile und kompakte Strukturen (Chromatin) verpackt. Die DNA-Replikation ist auf eine spezielle Phase im Zellzyklus – die S-Phase – beschränkt und kann von mehreren hundert bis tausend Replikationsursprüngen aus flexibel initiiert werden. Bereits 1968 konnten multiple Initiationsereignisse innerhalb eukaryontischer Organismen nachgewiesen werden (Huberman und Riggs, 1968).

Replikationsursprünge in *Saccharomyces cerevisiae*

Die ersten Replikator-Sequenzen in Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) wurden 1979 durch sogenannte „ARS-Assays“ (Autonomous Replicating Sequences-Assay) identifiziert (Stinchcomb et al., 1979). Diese Methode ermöglicht es, Replikator-Sequenzen anhand ihrer Funktion zu finden, da sie Plasmiden Kompetenz zur autonomen Replikation verleihen. Genomfragmente der Bäckerhefe werden hierbei in Plasmide kloniert und in geeignete Hefestämme transfiziert. Nur Plasmide mit funktionalen Replikator-Sequenzen werden über mehrere Zellgenerationen extrachromosomal repliziert und somit stabil propagiert. ARS-Elemente sind ca. 100-200 Basenpaare (bp) lang und besitzen einen modularen Aufbau (Marahrens und Stillman, 1992; Rao et al., 1994). Alle ARS-Elemente im Genom von *S. cerevisiae* enthalten ein A-Modul mit einer konservierten 11bp langen Konsensussequenz, die als „ARS Consensus Sequences“ (ACS) bezeichnet wird. ORC bindet strikt sequenzspezifisch an ACS-Elemente. Des Weiteren findet man in Bäckerhefe-ARS mindestens eine AT-reiche DNA-Entwindungsregion (DNA-Unwindung-Element, DUE) (Huang und Kowalski, 1993). Zudem besitzen Replikationsursprünge in *S. cerevisiae* auch ein B-Element, das wiederum aus bis zu drei Sequenzabschnitten bestehen kann, wobei diese zur Effizienz des Replikationsursprungs beitragen können (Marahrens und Stillman, 1992; Rao et al., 1994; Theis und Newlon, 1994; Huang und Kowalski, 1996).

Replikationsursprünge in *Schizosaccharomyces pombe*

Die Spaltheife (*S. pombe*) ist mit der Bäckerhefe ähnlich nah verwandt wie mit dem Menschen und nimmt eine Mittelstellung ein. In *S. pombe* zeigt sich eine entscheidende Entwicklung zu einem flexibleren Selektionsmechanismus von Replikationsursprüngen. Im Vergleich zu den Replikationsursprüngen in *S. cerevisiae* sind die Replikator-Elemente von *S. pombe* deutlich größer (500bp-1000bp). Zudem enthalten sie keine ACSs für eine sequenzabhängige ORC-Bindung oder zusätzliche funktionale Module. Die ARS-Elemente der Spaltheife zeichnen sich durch ihren hohen AT-Gehalt aus (Takahashi und Masukata, 2001). Wie am Beispiel des Replikationsursprungs *ars2004* erkannt wurde, kann ein Spaltheife-Replikator mehrere AT-reiche Regionen beinhalten, wobei jede Region zur Replikationseffizienz beiträgt (Zhu et al., 1994; Kim und Huberman, 1998; Okuno et al., 1999; Kim et al., 2001). Die AT-reichen Regionen haben zudem die intrinsische Fähigkeit von DUE-

Elementen. Die Bindung von *S. pombe* ORC an *S. pombe*-Replikatoren wird von der Untereinheit Orc4 vermittelt. Spalthefe-Orc4 besitzt eine „AT-hook“-Domäne am Aminoterminus, die spezifisch in die große Furche AT-reicher DNA binden kann (Chuang und Kelly, 1999; Kong und DePamphilis, 2001; Lee et al., 2001; Kong und DePamphilis, 2002).

Replikationsursprünge in Metazoen

Die Identifizierung und Charakterisierung von Replikatoren in mehrzelligen Eukaryonten (Metazoen) erwies sich bislang als wenig erfolgreich. Ursachen hierfür liegen in der Größe und der durch zum Teil noch unbekannt Parameter bedingten Komplexität des Genoms. Die Größe des Human-Genoms beträgt 3200 Megabasen (Mb). Berechnungen zufolge bedarf es der Aktivität von ca. 30.000 Replikationsursprüngen, um das gesamte Genom in der S-Phase zu duplizieren. Ansätze, Replikatoren anhand von ARS-Versuchen zu identifizieren, scheiterten, da alle transfizierten Elemente entweder keine oder eine sequenzunabhängige Replikationsaktivität zeigten (Krysan und Calos, 1991; Ghosh et al., 2004; Remus et al., 2004). Daher bedarf es alternativer Methoden, die nicht von der Replikationskompetenz einzelner Sequenzen abhängig sind.

Ein Ansatz liegt in der Analyse von Replikationsintermediaten, die es ermöglicht, bereits aktivierte Replikationsstartstellen zu identifizieren. Hierzu zählen 2D-Gelanalysen (Dijkwel, 2002), „leading strand polarity“-Analysen (Handeli et al., 1989; Verbovaia und Razin, 1995), Okazaki-Fragment-Polaritätsstudien (Burhans et al., 1990), oder die Isolierung angereicherter naszierender DNA (Pelizon et al., 1996; Giacca et al., 1997; Todorovic et al., 2005; Cadoret et al., 2008; Sequeira-Mendes et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit zur Replikator-Identifikation bietet die ChIP-Technologie (Chromatin-Immunpräzipitation), die auf der Isolierung von Proteinen beruht, welche zuvor kovalent mit ihren DNA-Bindestellen vernetzt wurden (Solomon et al., 1988; Orlando und Paro, 1993; Orlando, 2000). Durch die Kombination mehrerer Analysemethoden konnten einige wenige Replikationsstartpunkte in Metazoen gefunden und genauer charakterisiert werden.

Zu den am besten untersuchten Replikatoren gehören der Chorion-Origin aus *Drosophila* (Lu und Tower, 1997; Lu et al., 2001; Tower, 2004; Zhang und Tower, 2004), der DHRF-Origin aus dem chinesischen Hamster *Cricetulus griseus* (Cg) (Altman und Fanning, 2001; Gray et al., 2007) und die humanen Origins LMNB2

(Abb.1.2) (Altman und Fanning, 2004; Paixao et al., 2004), β -Globin (Abb.1.2) (Aladjem et al., 1995; Aladjem et al., 1998; Buzina et al., 2005; Wang et al., 2006), c-Myc (Trivedi et al., 1998; Liu et al., 2003; Ghosh et al., 2004; Ghosh et al., 2006) und HPRT (Abb.1.2) (Cohen et al., 2002). Der Vergleich identifizierter Replikatorsequenzen ergab, im Unterschied zu Bakterien oder Hefen, keine gemeinsame Konsensus-Sequenz, die spezifisch von Initiator-Komplexen gebunden wird. Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch *in vitro* DNA-Bindungsstudien des „Origin-Recognition-Complex“ gestützt, die zeigen, dass ORC eine sequenzunabhängige Bindungsaffinität besitzt (Vashee et al., 2003).

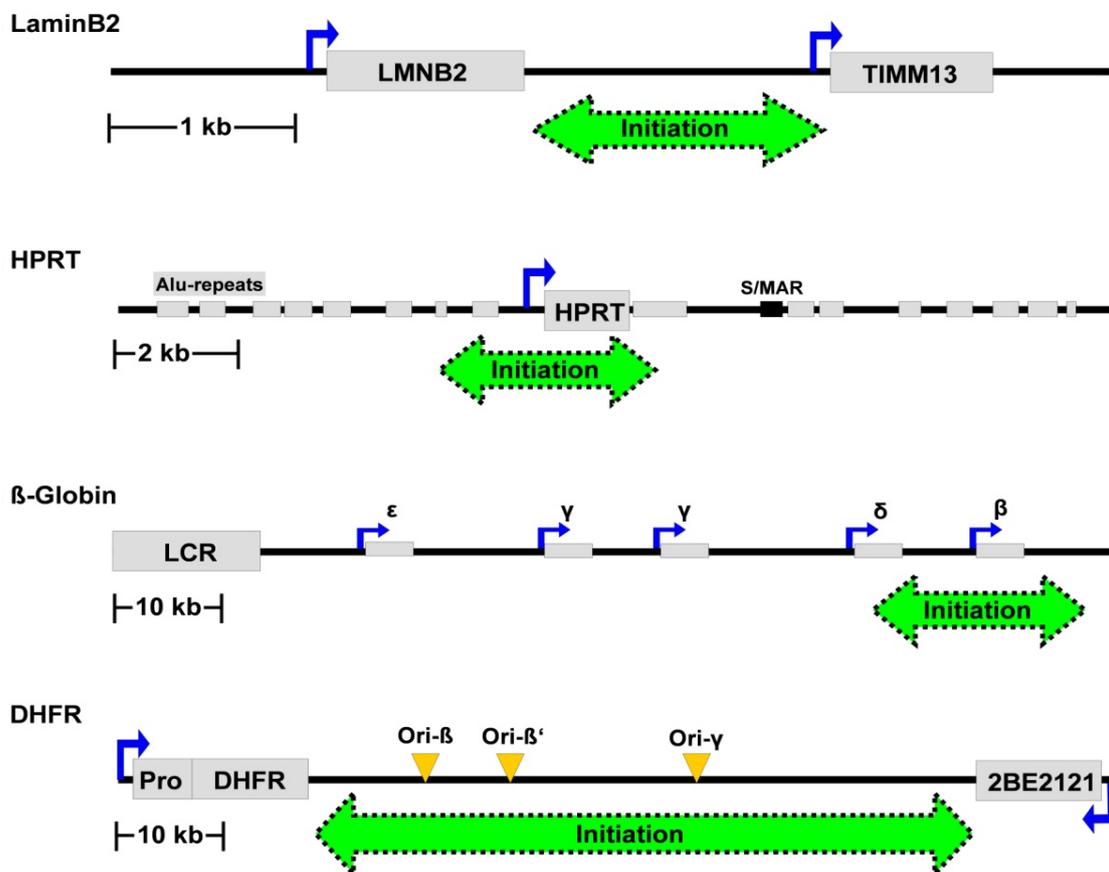


Abb.1.2: Beispiele von Replikationsursprüngen in Metazoen

Mit grauen/schwarzen Boxen wurden jeweils Gene, Promotoren und weitere Elemente der entsprechenden Origin-Regionen gekennzeichnet. LMNB2 (LaminB2-Gen), TIMM13 (transport inner mitochondrial membrane-Gen), HPRT (hydroxy-phosphoribosyl-transferase-Gen) S/MAR (scaffold matrix attachment region), LCR (locus control-region der β -Globin-Gene), Pro (Promoter DHFR), DHFR (dehydrofolat reductase-Gen). Blaue Pfeile entsprechen einzelnen Promotoren. Mit einem grünen Pfeil sind die entsprechenden Bereiche der Initiation von DNA-Replikation markiert. Orange Dreiecke bezeichnen im DHFR-Origin Positionen häufiger Replikationsinitiation (high frequent initiation sites).

Zusätzlich zur Sequenzunabhängigkeit zeigen die Analysen auch eine deutliche Diskrepanz in der Größe einzelner Replikatoren. Zum einen kann Replikationsinitiation an lokalen Positionen innerhalb weniger bp erfolgen. Beispiele für solche „Initiationsstellen“ sind der HPRT-Origin (Cohen et al., 2002) oder der LMNB2-Origin (Giacca et al., 1994; Abdurashidova et al., 2003; Vindigni et al., 2004) (Abb.1.2). Zum anderen können multiple delokalisierte Replikationsereignisse innerhalb großer Bereiche nachgewiesen werden. Diese sogenannten „Initiationszonen“ können, wie das Beispiel des humanen β -Globin-Origin (Aladjem et al., 2002; Wang et al., 2004; Wang et al., 2006) oder das des DHFR-Origin (Vaughn et al., 1990; Dijkwel et al., 1994; Dijkwel et al., 2002) zeigen, bis zu 55 Kilobasen (kb) umfassen und mehrere „high frequent initiation sites“ beinhalten (DHRF-Origin in Abb.1.2).

Trotz fehlender Sequenzübereinstimmung und starker Variation der Größen von analysierten Replikations-Initiationsbereichen lassen sich einige Gemeinsamkeiten erkennen, die einzeln oder kumulativ zur Definition (Auswahl und Aktivität) von Origins beitragen können. Prominente Bereiche der Replikationsinitiation befinden sich vor allem in intergenischen Bereichen. Es wird vermutet, dass aktive Transkription den Aufbau von Replikationskomplexen innerhalb einer Gen-kodierten Region behindern kann („Transkriptions-Interferenz“). Des Weiteren befinden sich die meisten der genauer charakterisierten Origins in oder in der Nähe von Transkriptions-Kontrollelementen, vor allem von Promotoren (Saha et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Transkriptionsfaktoren die Aktivität von Replikationsursprüngen positiv beeinflussen (Minami et al., 2006). Zudem zeigen neueste Studien eine signifikante Korrelation aktiver Replikationsinitiation mit CpG-Inseln (Cadoret et al., 2008; Sequeira-Mendes et al., 2009). Diese befinden sich vor allem in Promotorregionen von Haushalts- und stark exprimierten Genen. Dies lässt darauf schließen, dass Promotoren eine lokal vorteilhafte Chromatinstruktur aufweisen, die die Bindung von Replikationsproteinen begünstigt.

Replikationsursprünge können außerdem durch Helferproteine definiert werden, wobei Replikationsproteine über Protein-Protein Interaktion direkt an Origins rekrutiert werden. Beispiele hierfür sind die ORC-interagierenden Proteine Ku80 (Sibani et al., 2005), AIF-C (Minami et al., 2006) und EBNA1 (Schepers et al., 2001), die ORC an den humanen LaminB2-Origin, den Ratten AldB-Origin beziehungsweise an den Epstein-Barr-Virus-Origin *oriP* rekrutieren.

1.3 Aufbau und Aktivierung von Replikationskomplexen

In vielerlei Hinsicht nimmt die Ausbildung und Aktivierung von Replikationskomplexen auf der DNA im Netzwerk der Kontrolle der DNA-Replikation eine Schlüsselstellung ein. Im Folgenden sollen kurz die regulatorischen Mechanismen erläutert und die molekularen Vorgänge vorgestellt werden, die zur Ausbildung aktiver Replikationskomplexe führen.

1.3.1 Kontrolle der DNA-Replikation durch den Zellzyklus

Wachstum und Vermehrung aller eukaryontischen Zellen unterliegen einer strikt kontrollierten Abfolge von Ereignissen, die in vier Zellzyklusphasen unterteilt wird (Abb.1.3). In der M-Phase (Mitose) wird das duplizierte Genom gleichmäßig auf Tochterzellen verteilt. An die M-Phase schließt sich die G_1 -Phase an (G für gap). Die G_1 -Phase nimmt den größten Zeitraum im Zellzyklus ein und dient der Vorbereitung auf die nächste Zellteilung. Bei proliferierenden Zellen schließt sich nach der G_1 -Phase die S-Phase an (S für Synthese). Im Gegensatz zu Prokaryonten ist dies die einzige Phase im eukaryonten Zellzyklus, in der DNA repliziert werden kann. In der G_2 -Phase bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor. Mit dem erneuten Eintritt in die M-Phase beginnt eine neue Runde des Zellzyklus.

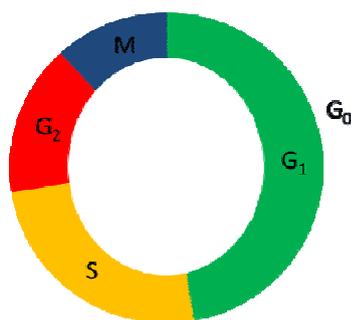


Abb.1.3: Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist in diskrete Abschnitte unterteilt: die G_1 -, die S-, die G_2 - und die mitotische Phase. G_0 entspricht einer Ruhephase.

Der humane Zellzyklus wird von der periodischen (oszillierenden) Aktivität bestimmter Ser/Thr-Proteinkinasen reguliert, den Zyclin-abhängigen Proteinkinasen (cyclin dependent protein kinases; CDKs) und der Dbf4-abhängigen Kinase (Dbf4-dependent kinase; DDK) (Nasmyth und Hunt, 1993; Nigg, 1995; Tsuji et al., 2006;

Francis et al., 2009). Die präzise Regulation der Zellzyklusvorgänge erfolgt über koordinierte Phosphorylierung bestimmter nukleärer Proteine durch CDKs und DDK. Zyklin-abhängige Proteinkinasen benötigen für ihre Aktivität regulatorische Untereinheiten, die Zykline. Die Expression bestimmter Klassen von Zyklinen ist abhängig von den Zellzyklusphasen und ermöglicht so die präzise Regulation der CDKs (Amon et al., 1994; Hayles et al., 1994). Weiterhin kann die Aktivität der CDKs auch durch Modifikationen wie Phosphorylierung und durch spezifische CDK-Inhibitoren reguliert werden (Arellano und Moreno, 1997; Besson et al., 2008).

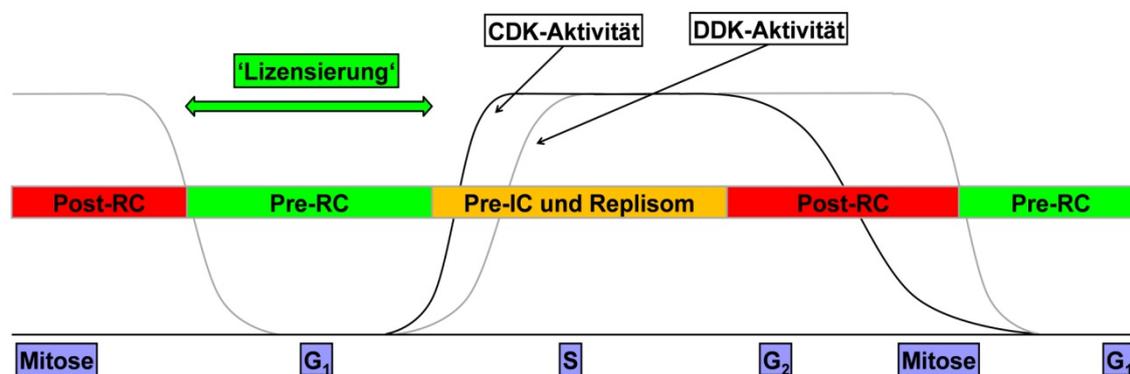


Abb.1.4: Kontrolle von Replikationskomplexen durch den Zellzyklus

Ab der späten Mitose und während der G₁-Phase werden potentielle Origins durch die Bildung des Pre-Replikationskomplexes (Pre-RC) definiert (= Lizensierung). In dieser Phase ist die Aktivität der Zellzykluskinasen gering. Durch den Anstieg der Aktivität von CDK und DDK ab der S-Phase wird ein Teil der Pre-RCs aktiviert und durch Rekrutierung weiterer Faktoren entstehen Pre-Initiationskomplexe (Pre-IC). An Pre-ICs bilden sich durch die Rekrutierung von DNA-Polymerasen Replisomen, die die Neusynthese der DNA übernehmen. Nach der DNA-Synthese wird die Re-Replikation der DNA durch niedrige Zellzykluskinase-Aktivität und den Zerfall der Replikationskomplexe zu Post-RCs verhindert.

Um zu gewährleisten, dass bei jeder Zellteilung ein identischer Chromosomensatz auf die Tochterzellen vererbt wird, muss das Genom genau ein einziges Mal pro Zellzyklus dupliziert werden. Die oszillierende Aktivität der DDK und CDKs ermöglicht die Regulation des Replikationsprogramms und verhindert somit die unkontrollierte „Re-Replikation“ des Genoms (Nishitani und Lygerou, 2002). Ein entscheidender Schritt dieser Kontrolle, liegt in der zeitlichen Trennung der Ausbildung und Aktivierung von Replikationskomplexen. Während der G₁-Phase werden noch unvollständige und daher inaktive Pre-Replikationskomplexe (Pre-RC;

Pre-Replication Complex) auf der DNA ausgebildet (=Lizensierung; Kapitel 1.3.2). Diese können nur in der S-Phase aktiviert werden (=Initiation; Kapitel 1.3.3). Nach erfolgter DNA-Replikation wird eine Re-Replikation durch die **Inaktivierung** der Replikationskomplexe verhindert (Blow und Dutta, 2005).

1.3.2 Lizensierung von Replikationsursprüngen durch den Pre-Replikationskomplex

Die Ausbildung von Pre-Replikationskomplexen in der G_1 -Phase des Zellzyklus legt die potentiellen Orte auf der DNA fest, an denen in der S-Phase die Initiation der DNA-Synthese erfolgen kann. Der Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation liegt in der Identifizierung und Analyse von Replikationsursprüngen auf der Basis von Pre-RC-Bindestellen. Für das spätere Verständnis der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sei bereits hier angemerkt, dass nicht jeder ausgebildete Pre-RC in der anschließenden S-Phase aktiviert wird. Die Anzahl der gebildeten Pre-RCs übersteigt also die Anzahl der tatsächlich aktivierten Replikationskomplexe. Die Prinzipien der Pre-RC-Bildung sind bei allen eukaryonten Organismen konserviert. Ein eukaryonter Pre-RC (siehe Abb.1.5) besteht aus dem ORC-Komplex (Orc1-6), Cdc6, Cdt1 und dem MCM2-7-Komplex (Diffley, 1995).

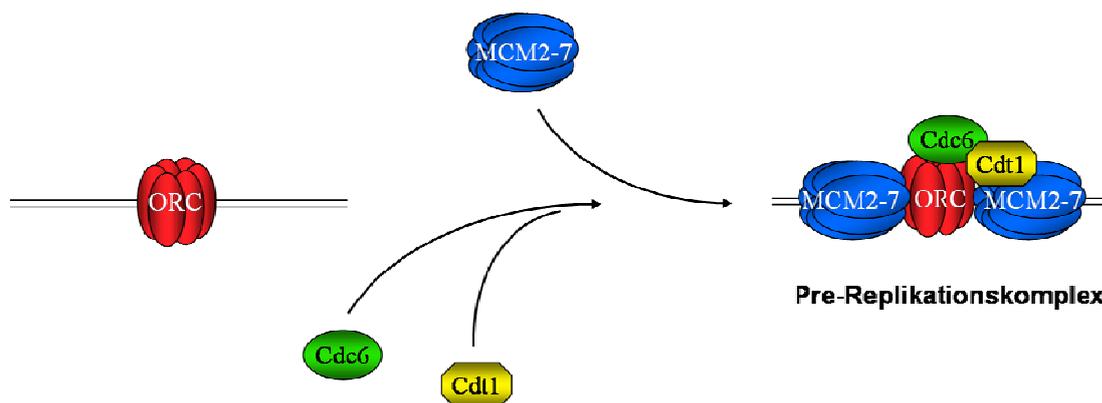


Abb.1.5: Der Pre-Replikationskomplex

Der Pre-Replikationskomplex wird während der G_1 -Phase durch die Komponenten Orc1-6, Cdc6, Cdt1 und Mcm2-7 gebildet.

Da das Ergebnis der Pre-RC-Bildung letztendlich auch die Frage aufwirft, wo es zur Initiation der DNA-Replikation kommen kann, ist das Verständnis um die Pre-RC-Bildung von großer Bedeutung. Die einzelnen Komponenten werden in Aufbau und Funktion im Folgenden genauer beschrieben.

Die Komponenten des Pre-RC

Der „Origin-Recognition-Complex“ ist ein Multiproteinkomplex aus 6 Untereinheiten (Orc1 – Orc6), die entsprechend ihrem Molekulargewicht nummeriert werden. Ursprünglich in *S. cerevisiae* identifiziert, wurden homologe Proteine in allen eukaryonten Systemen gefunden. Anhand von DNA-Bindungsstudien wurde der stimulierende Effekt von Nukleotiden auf die Assoziation von HsORC (Hs; human) und DNA nachgewiesen (Vashee et al., 2003). Alle ORC-Untereinheiten sind Mitglieder der Familie der AAA+-ATPasen (AAA; ATPases associated with a variety of cellular activities). AAA+-ATPasen besitzen konservierte Walker A- und B-Motive, die bei vielen DNA-bindenden Proteinen gefunden wurden, da sie durch ATP-Bindung und Hydrolyse die Affinität zur DNA beeinflussen (Neuwald et al., 1999). Orc1, Orc4 und Orc5 wurden als aktive ATPasen bestätigt. Die Untereinheiten Orc2, Orc3 und Orc6 besitzen nicht-konservierte ATPase-Domänen. In Experimenten mit rekombinanten humanen ORC-Untereinheiten konnte gezeigt werden, dass ATP entscheidend zur Assoziation und Stabilität der Pre-RC-Bildung an DNA beiträgt (Ranjan und Gossen, 2006). Werden in den humanen Untereinheiten Orc1, Orc4 und Orc5 die ATP-Bindestellen mutiert, wird die Initiation der DNA-Replikation verhindert, obwohl HsORC noch an DNA assoziieren kann (Giordano-Coltart et al., 2005). Dies weist auch auf eine entscheidende Funktion des ATPs bei der Replikationsinitiation hin.

Ein großer Unterschied zwischen hoch entwickelten Organismen wie dem Menschen und niederen Eukaryonten wie *S. cerevisiae* (Sc) zeigt sich in der Selektivität der ORC-DNA Bindung. Während ScORC spezifisch an ARS-Elemente bindet, weist HsORC bei *in vitro* Versuchen mit gereinigten Komplexen ein Sequenz-unabhängiges DNA-Bindevverhalten auf (Vashee et al., 2003). Des Weiteren zeigen *in vitro* DNA-Bindungsstudien eine Sequenz-unabhängige Verteilung von HsOrc1 und HsOrc2 auf extrachromosomal replizierenden Plasmiden (Schaarschmidt et al., 2004).

Das Cdc6-Protein wurde zuerst in Bäckerhefe entdeckt (Hartwell et al., 1973) und ist in allen Eukaryonten als hoch konservierte Pre-RC-Komponente zu finden. Cdc6 bildet einen Komplex mit ORC (Speck et al., 2005) und stellt einen Ladefaktor für Cdt1 und den Mcm2-7-Komplex dar (Bell und Dutta, 2002). Auch Cdc6 zählt zu der Familie der AAA+-ATPasen. Wie auch für ORC ist die ATP-Bindung und Hydrolyse für die Funktion von Cdc6 von großer Bedeutung. Mutationen der Walker A- und B-Motive in *S. cerevisiae* verhindern die Rekrutierung des MCM2-7-Komplexes, lassen aber die Cdc6-DNA-Bindung unbeeinflusst (Perkins und Diffley, 1998; Weinreich et al., 1999). Mutationen der Walker A- und B-Motive im humanen System haben eine ähnlich inhibierende Wirkung auf die Ausbildung des Pre-RC. In *S. cerevisiae* trägt ScCdc6 durch Aktivitätsänderungen der ATPase zur spezifischen Bindung des Pre-RC an Replikationsursprünge bei (Speck und Stillman, 2007).

Das Cdt1-Protein wurde ursprünglich in *S. pombe* als Zellzyklus-reguliertes Protein identifiziert (Hofmann und Beach, 1994). Ähnlich wie Cdc6 ist es ein essentieller Ladefaktor für den MCM2-7-Komplex und wurde in allen untersuchten Eukaryonten nachgewiesen (Maiorano et al., 2000; Whittaker et al., 2000; Wohlschlegel et al., 2000; Tanaka und Diffley, 2002; Tanaka und Diffley, 2002). Analysen von Cdt1-Bindungspartnern in vielen Modellorganismen ergaben jedoch zum Teil voneinander abweichende Ergebnisse. So kann Cdt1 in *S. pombe* und *Mammalia* mit dem N-Terminus direkt an Cdc6 binden, eine Eigenschaft, die im *Xenopus* Modell nicht bestätigt werden konnte. In *Xenopus laevis* und *S.pombe* kann eine Cdt1-Bindung an DNA auch ohne Cdc6 erfolgen (Maiorano et al; 2000b; Nishitani et al, 2000). Obwohl die Abhängigkeit von ORC für die Assoziation von Cdt1 an DNA bereits gezeigt ist und auch eine direkte Interaktion von MsCdt1 (Ms; Maus) mit MsOrc2 beschrieben ist, werfen Analysen über eine unspezifische Cdt1-DNA-Bindeaktivität immer noch Fragen auf (Yanagi et al., 2002). Cdt1 interagiert in *Xenopus* und *Maus* mit dem C-Terminus direkt mit dem MCM2-7-Komplex. (Yanagi et al., 2002; Ferenbach et al., 2005). Es ist noch umstritten, ob MCM2-7 direkt über die Plattform ORC-Cdc6-Cdt1 oder bereits als Komplex mit Cdt1 an potentielle Replikationsstartstellen rekrutiert wird (Tanaka und Diffley, 2002; Randell et al., 2006).

Die MCM2-7-Proteine wurden in *S. cerevisiae* bei der Suche nach Zellzyklus-regulierten Genen entdeckt, die zur Aufrechterhaltung extrachromosomaler DNA

beitragen sollten (Tye, 1999) (MCM; minichromosome maintenance). Dem hexameren Proteinkomplex MCM2-7 wird eine essentielle Rolle bei der Ausbildung der aktiven Helikase in der S-Phase zugesprochen (Labib und Diffley, 2001; Takahashi et al., 2005; Kanter et al., 2008). MCM2-7-Proteine werden für die kontinuierliche Bewegung der Replikationsgabel in der S-Phase benötigt (Aparicio et al., 1997; Labib et al., 2000). Bisherige Vermutungen, dass MCM2-7 das aktive Zentrum der replikativen Helikase darstellt, konnten noch nicht final bewiesen werden. Neueste Analysen weisen darauf hin, dass sich die eukaryontische replikative Helikase (CMG) aus Cdc45, MCM2-7 und GINS zusammensetzt (Aparicio et al., 2006; Gambus et al., 2006; Moyer et al., 2006; Remus und Diffley, 2009).

1.3.3 Aktivierung der DNA-Replikation an Replikationsursprüngen

Durch die finale Assoziation von MCM2-7 mit ORC1-6, Cdc6 und Cdt1 in der G₁-Phase sind alle potentiellen Origins auf dem Genom lizenziert. Diese vorläufigen Replikationskomplexe ruhen in der G₁-Phase noch inaktiv an der DNA, bevor ein Teil in der anschließenden S-Phase aktiviert wird. Der Umbau von inaktiven Pre-RCs zu Pre-Initiationskomplexen (Pre-IC; Pre-Initiation-Complex) und danach zu aktiven Replisomen verläuft in allen untersuchten eukaryonten Organismen hoch konserviert (Abb.1.6).

Die Aktivierung des Pre-RCs erfolgt über die Zyklin-E- und Zyklin-A-abhängige Proteinkinase Cdk2 und die Dbf4-abhängige Proteinkinase Cdc7. Durch Phosphorylierung vieler nukleärer Proteine, unter anderem auch von Komponenten des Pre-RCs (z.B. Orc1, Cdc6, Mcm2, Mcm4, Mcm6), wird der Pre-IC gebildet. Dies führt zu einer Dissoziation von Cdc6, Cdt1 und beim Menschen auch von Orc1, wodurch eine unkontrollierte Ausbildung weiterer Replikationskomplexe während der S-Phase verhindert wird. Für den Aufbau des Pre-ICs werden weitere Faktoren wie Mcm10, Dpb11, Sld2, Sld3, Cdc45 und GINS rekrutiert. Für detaillierte Informationen über Interaktion, Funktion und Spezies-abhängige Reihenfolge der Assoziation aller beteiligten Protein siehe (Blow und Dutta, 2005).

Der Mechanismus, mit dem doppelsträngige DNA (dsDNA) an einem Replikationsursprung entwunden wird, konnte bisher noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Bisher veröffentlichte Daten führen teilweise zu sehr unterschiedlichen Theorien. So wird eine dsDNA-Entwindung durch topologischen Stress vermutet, der durch koordiniertes Rotieren mehrerer MCM-Komplexe ausgelöst wird (Laskey und Madine, 2003). Außerdem kann eine partielle Entwindung von dsDNA auch bei Aktivierung der Helikase dadurch erfolgen, dass die Helikase nur einen DNA-Strang vollständig umfasst und den Schwesterstrang aus dem Proteinkomplex ausschließt (Kaplan et al., 2003).

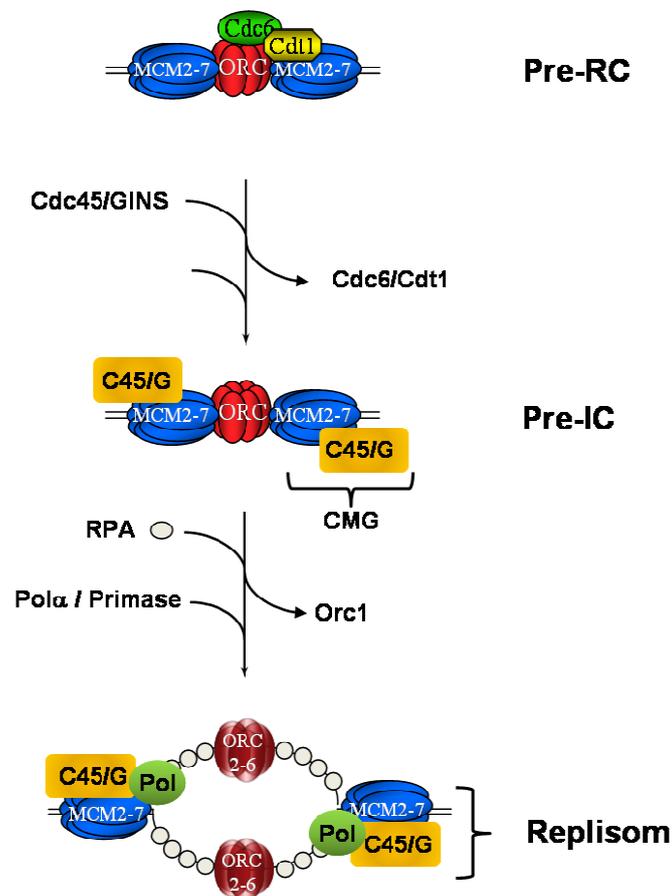


Abb.1.6: Aktivierung des Pre-RCs

Die Aktivierung eines Pre-RC kann ab der G₁/S-Phase erfolgen. Durch die Rekrutierung weiterer Faktoren wie Cdc45 (C45) und GINS (G) [bestehend aus Psf3, Sld5, Psf2 und Psf1] wird der Pre-IC gebildet (weitere Proteine wie Mcm10, Dpb11, Sld2 und Sld3 wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt). Die potentielle Helikase CMG, bestehend aus Cdc45, MCM2-7 und GINS entwindet die doppelsträngige DNA und das Protein RPA (Replikations-Protein-A) besetzt einzelsträngige DNA. Es entstehen zwei Replikationsgabeln. Die bidirektionale DNA-Neusynthese erfolgt durch DNA-Polymerasen.

Nach der Entwindung wird die einzelsträngige DNA durch das Protein RPA (Replikations-Protein-A) stabilisiert und der Polymerase- α /Primase-Komplex rekrutiert. Die Desoxynukleotidpolymerisation kann nicht *de novo* erfolgen. Daher werden durch die Primase kurze, ca. 20nt lange, RNA-Fragmente synthetisiert, die von der DNA-Polymerase- α als Primer für die erste DNA-Synthese verwendet werden. Über das Protein RF-C (Replikations-Faktor-C) wird das Ringklemmenprotein PCNA (proliferating cell nuclear antigen) rekrutiert, das die ssDNA umschließt und für die hohe Prozessivität der replikativen Polymerasen ϵ und δ verantwortlich ist. Bei der DNA-Replikation muss aufgrund der Dreidimensionalität der Replikationsgabeln generell zwischen der DNA-Synthese am Vorwärts- und am Rückwärtsstrang unterschieden werden. Der Vorwärtsstrang wird kontinuierlich von der Polymerase ϵ synthetisiert. Die Synthese des Rückwärtsstranges erfolgt dagegen durch Polymerase δ , wobei diskontinuierlich kleine, bei Eukaryonten bis zu 200bp lange, DNA-Fragmente generiert werden. Diese sogenannten Okazaki-Fragmente werden abschließend durch die DNA-Ligase I miteinander verbunden.

1.4 Replikation im Kontext komplexer Chromatin- und Zellkernstrukturen

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, sind die Erkenntnisse über die molekularen Vorgänge, die zur Initiation der Replikation beitragen, weit vorangeschritten. Wichtige Komponenten der Replikationskomplexe konnten identifiziert und ihre Funktionen im sowie ihre Kontrolle durch den Zellzyklus aufgeklärt werden. Die Frage, welche Eigenschaften einen Replikationsursprung in Metazoen definieren, ließ sich jedoch bis heute nur unzureichend beantworten. Bisher wurde keine „Origin-Konsensussequenz“ für höhere Organismen gefunden, noch zeigen metazoe Replikatorproteine wie ORC Sequenz-spezifische DNA-Bindung. Weiterhin unbeantwortet bleiben auch die selektiven Mechanismen, die einen etablierten Pre-RC aktivieren und für die Replikationsinitiation in einen Pre-IC ausbauen. Bereits 1993 wurde von DePamphilis vermutet, dass es neben der DNA-Sequenz andere Kriterien wie Chromatinstruktur oder Zellkernarchitektur geben muss, die die Spezifizierung und Aktivierung von Replikationsursprüngen regulieren (DePamphilis, 1993).

Es zeigte sich, dass die Etablierung übergeordneter Chromatinstrukturen einen regulatorischen Einfluss auf die DNA-Replikation ausüben kann. Im Folgenden sollen Parameter beschrieben werden, die sowohl zur Selektion als auch zur Aktivierung von Replikationsursprüngen beitragen könnten.

1.4.1 Funktion von Chromatinstruktur und Genomorganisation im Zellkern

DNA liegt im Zellkern nicht „nackt“ vor, sondern ist als Nukleoprotein-Komplex (Chromatin – bestehend aus Histon und Nicht-Histon-Proteinen) in übergeordnete Strukturen verpackt. Die zentrale, sich wiederholende Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, das aus den Histon-Untereinheiten H2A, H2B, H3 und H4 aufgebaut ist (Luger et al., 1997). Um jedes Nukleosom verläuft die DNA-Doppelhelix mit je 146 Basenpaaren in $1\frac{3}{4}$ linksgerichteten superhelikalen Windungen. Jedes Nukleosomkernpartikel ist vom nächsten durch ein Stück freie DNA, sogenannte „linker-DNA“, getrennt. Man geht davon aus, dass die einzelnen Nukleosomen aufeinander gepackt vorliegen. Begünstigt wird diese Struktur durch das Histon H1 und direkten Kontakten zwischen Histonkernkomplexen.

Für die Lagerung des Gesamtgenoms im Zellkern sind weitere Kompaktierungen nötig. Die molekularen Grundlagen dieser komplizierten Verpackung der DNA sind noch weitgehend ungeklärt. Es wird postuliert, dass zusätzliche Verpackungsmechanismen durch Schleifenbildung des Chromatins erreicht werden können, und dass ein zentrales Kerngerüst für SARs oder MARs (skelettassoziierte oder matrixassoziierte Regionen) auf dem Chromatin als Bindestelle dient.

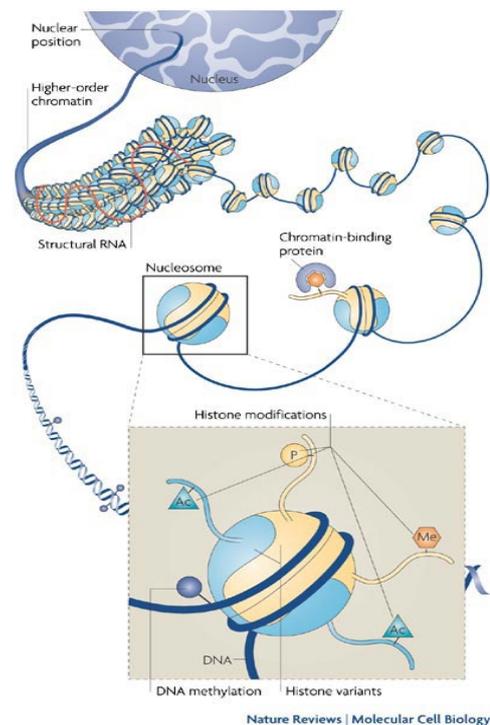


Abb.1.7: Chromatin im Zellkern
Entnommen aus (Probst et al., 2009).

Aus dem Verpackungszustand der DNA und der Position des Chromatins im Zellkern lassen sich Funktionen für Transkription, Replikation und Reparatur ableiten (Fyodorov und Kadonaga, 2001; Peterson und Cote, 2004). Bei Interphase-Chromosomen unterscheidet man grundsätzlich zwei Arten von Chromatin, das aufgelockerte Euchromatin und das dicht gepackte Heterochromatin. Das für nukleäre Proteine leichter zugängliche Euchromatin wird aktiv transkribiert, während das schwerer zugängliche Heterochromatin transkriptionell eher inaktiv ist. Zudem wird Euchromatin früher in der S-Phase repliziert als heterochromatische Regionen, die in der späteren S-Phase verdoppelt werden. In Interphase-Zellkernen nehmen Chromosomen strikt definierte Räume ein, sogenannte Chromosomen-Territorien (Albiez et al., 2006; Cremer et al., 2006). Diese Territorien besitzen funktionale Polarität. Transkriptionell aktive Bereiche sind eher in der Zellkernmitte lokalisiert, transkriptionell inaktive Bereiche in der nukleären Peripherie (Chambeyron und Bickmore, 2004; Bartova et al., 2008).

Viele nukleäre Prozesse wie DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Transkription und RNA-Splicing sind in spezialisierten nukleären Domänen lokalisiert. Wird neu replizierte DNA durch den Einbau von BrdU-markierten Nukleotiden durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht, lassen sich definierte Replikations-Foci erkennen, die sich abhängig vom Zeitpunkt der S-Phase in Größe und Lokalisation ändern (Berezney et al., 2000). Bisher konnte noch nicht hinreichend geklärt werden, wie die DNA-Replikation in diesen Domänen zusammengefasst werden kann. Es wird postuliert, dass sich in einem Replikations-Focus mehrere Origins befinden, die synchron initiieren (Muck und Zink, 2009).

Wie in diesem Kapitel angesprochen, haben Struktur und Organisation des Genoms Einfluss auf viele nukleäre Prozesse. Im Hinblick auf DNA-Replikation könnte die Zugänglichkeit der Chromatin-Struktur ein entscheidendes Kriterium für die Ausbildung von Replikationskomplexen auf der DNA darstellen. Die Zugänglichkeit des Chromatins kann durch Histon-Modifikationen und ATP-abhängige Chromatin-Strukturänderung (Chromatin-Remodeling) flexibel reguliert werden. Beide Mechanismen werden daher mit Bezug auf ihre potentielle Funktion in der Ausbildung von Origins kurz in den nächsten Abschnitten beschrieben.

1.4.2 Histon-Modifikationen

Alle Histone bestehen aus zentralen globulären Domänen und flexiblen aminoterminalen Enden, die Ziel posttranslationaler Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung, Ubiquitinierung und SUMOylierung sind (Strahl und Allis, 2000; Jenuwein und Allis, 2001; Cosgrove und Wolberger, 2005; Kouzarides, 2007). Den kovalent angefügten Modifikationen werden zwei essentielle Funktionen zugesprochen.

Zum einen können sie DNA-Strukturen höherer Ordnung durch sterische oder ladungsabhängige Mechanismen beeinflussen. Beispielsweise vermutet man durch Histon-Acetylierung von Lysinen eine Destabilisierung und Lockerung der Chromatinstruktur (Shogren-Knaak und Peterson, 2006). Durch Neutralisierung einer positiven Ladung am Lysin durch die zusätzliche Acetylgruppe wird die Neutralisierung der negativen Ladung der DNA verhindert und somit die Chromatinstruktur geöffnet. Generell sind zugängliche und transkriptionell aktive Regionen an den Histonen H3 und H4 hyperacetyliert und am Lysin K4 des Histons H3 methyliert (Cosgrove und Wolberger, 2005). Zum anderen stellen Histon-Modifikationen Interaktionsdomänen für eine Vielzahl Chromatin-bindender Proteine dar (Cosgrove und Wolberger, 2005; Tabancay und Forsburg, 2006). Bestimmte Proteinmotive können spezifisch einzelne Modifikationen erkennen. Dieser Mechanismus ermöglicht es, Proteine an ausgewählte („modifizierte“) Chromatinregionen zu rekrutieren. So weisen sowohl kleine lokalisierte Chromatinbereiche, wie aktive Promotoren oder DNA-Reparatur-Foci, spezifische aktivierende Histon-Modifikationsmuster auf, um Faktoren für Transkription oder DNA-Reparatur zu rekrutieren.

Mögliche Verbindungen zwischen Histon-Modifikationen und der Etablierung von Replikationsursprüngen sind Gegenstand aktueller Forschung. Bisherige Analysen lassen auf einen Zusammenhang von Histon-Acetylierung bzw. Deacetylierung und der Spezifizierung von Origins schließen (Aggarwal und Calvi, 2004; Zhou et al., 2005).

1.4.3 ATP-abhängiges Chromatin-Remodeling

Neben der Modifikation einzelner nukleosomaler Untereinheiten kann die Chromatinstruktur auch durch Mobilisierung ganzer Nukleosomen beeinflusst werden (Rippe et al., 2007). Die Mobilisierung der Nukleosomen wird unter ATP-Verbrauch von Multiproteinkomplexen durchgeführt, und hat eine Repositionierung der Nukleosomen-Oktamere auf der DNA zur Folge. Diese ATP-abhängigen Multiproteinkomplexe werden als „Remodeling-Komplexe“ bezeichnet. Allen gemeinsam ist eine ATPase-Untereinheit, die auch für die Namensgebung und Proteinfamilienzuordnung der einzelnen Komplexe herangezogen wird. ATP-abhängiges Chromatin-Remodeling tritt bei vielen Prozessen auf, die eine Änderung der Chromatinstruktur zur Folge haben, so z.B. Transkription, DNA-Reparatur, DNA-Replikation und epigenetische Vererbung (Tsukiyama, 2002; Dirscherl und Krebs, 2004; Eberharter und Becker, 2004; Poot et al., 2005).

Das Ausmaß der Bedeutung von ATP-abhängigem Chromatin-Remodeling für die DNA-Replikation ist bisher nur ansatzweise geklärt (Falbo und Shen, 2006). Bisherige Publikationen lassen darauf schließen, dass Chromatin-Remodeling für einen reibungslosen Ablauf der DNA-Replikation während der S-Phase notwendig ist (Bozhenok et al., 2002; Collins et al., 2002; Poot et al., 2004; Poot et al., 2005; Varga-Weisz, 2005). Zudem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Remodeling-Komplexen an der Etablierung von Pre-Replikationskomplexen. Zhou und Kollegen konnten zeigen, dass ein siRNA vermittelter knock-down der Remodeling ATPase *Snf2h* die Nukleosomenposition am Replikationsursprung *oriP* im Epstein-Barr-Virus verändert (Zhou et al., 2005). Zudem wurde nach *Snf2h knock-down* eine stark reduzierte *Mcm3* Anreicherung an *oriP* gemessen.

1.5 Die Replikation des Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein doppelsträngiges DNA-Virus und wird der Familie der γ -Herpesviren zugeordnet. EBV infiziert humane B-Zellen und hat sich unter 95% der Weltbevölkerung verbreitet. Wie alle Herpesviren zeigt auch EBV eine latente und eine lytische Phase der Infektion. Nach Primärinfektion kann EBV ein Leben lang als zirkularisiertes Episom mit einer Kopienzahl zwischen 10-50 in

menschlichen B-Zellen persistieren (Nonoyama et al., 1973; Gerber et al., 1976; Adams, 1987). Das Virus kann lebenslang aus der Latenz reaktiviert werden und in einen lytischen Zyklus übergehen, wobei neue virale Partikel gebildet werden und die Wirtszelle letztendlich zerstört wird.

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, ist die Analyse der Initiation der DNA-Replikation aufgrund der Größe und Komplexität des humanen Genoms nur stark eingeschränkt möglich. In der Vergangenheit hat sich das 172kb große EBV-Genom für Studien über Kontrolle und Mechanismus der DNA-Replikation als sehr wertvoll erwiesen.

Während des lytischen Zykluses wird die DNA-Replikation über den lytischen Replikationsursprung *oriLyt* reguliert. Zudem werden ausschließlich viral kodierte Proteine wie z.B. eine DNA-Polymerase und Helikase-Primase sowie Einzelstrang-Bindeproteine und *oriLyt* bindende Proteine verwendet. Die DNA-Replikation erfolgt unidirektional nach dem Prinzip des „Rollenden Ring“-Mechanismus (rolling circle) (Jacob et al., 1979)

Vor allem für Studien eukaryontischer DNA-Replikation ist jedoch die latente Infektionsphase von besonderer Bedeutung. In der Latenz unterliegt die Replikation des EBV-Genoms der Kontrolle des humanen Zellzyklus. Wie beim Human-Genom erfolgt auch die Duplikation jedes EBV-Genom nur einmal pro Zellteilung (Yates und Guan, 1991). Zudem werden für die DNA-Replikation keine viral kodierten Proteine verwendet, sondern ausschließlich Proteine der humanen Replikationsmaschinerie. Weiterhin besitzt EBV im latenten Zustand mit *oriP* einen strikt definierten Replikationsursprung (Yates et al., 1984).

Der Replikationsursprung *oriP* ist 1,7kb lang und besitzt während der latenten Phase der Infektion zwei Funktionen, die auf zwei definierte Elemente aufgeteilt werden können. Über das Element „family of repeats“ (FR) wird die genomische Stabilität des EBV-Genoms vermittelt. FR besitzt zwanzig Bindestellen für das virale Protein EBNA1 (EBV nuclear antigen 1) (Reisman et al., 1985). Indem EBNA1 RNA-abhängig zelluläres Chromatin bindet, können die EBV-Episomen während der Zellteilung stabil auf die Tochterzellen verteilt werden (Norseen et al., 2009).

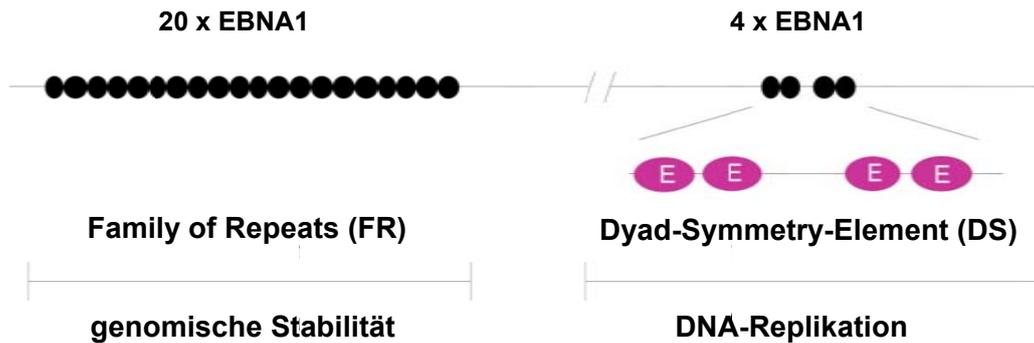


Abb.1.8: Schematische Darstellung des latenten EBV-Replikationsursprungs *oriP*

OriP besteht aus zwei funktionalen Elementen, den „Family of Repeats“ (FR) und dem „Dyad-Symmetry-Element“ (DS). FR besitzt 20 EBNA1-Bindestellen, DS besitzt 4 EBNA1-Bindestellen. Das FR-Element vermittelt die genomische Stabilität von EBV, indem das Virus mittels EBNA1 an das humane Genom gebunden wird. Durch EBNA1-abhängige Bindung von ORC vermittelt das DS-Element Replikationskompetenz.

Das „Dyad-Symmetry-Element“ DS vermittelt Replikationskompetenz (Harrison et al., 1994; Shirakata und Hirai, 1998; Gerhardt et al., 2006; Pich et al., 2008). DS besitzt vier EBNA1-Bindestellen, die in zwei Dyaden angeordnet sind (Reisman und Sugden, 1986; Hsieh et al., 1993). Es wurde gezeigt, dass EBNA1 mit ORC interagieren und somit ORC an DS rekrutieren kann (Dhar et al., 2001; Schepers et al., 2001). Zudem weist der MCM-Komplex eine Zellzyklus-abhängige Regulation an DS auf (Chaudhuri et al., 2001; Ritzi et al., 2003). Wird *oriP* auf Plasmide kloniert, vermittelt es auch dort Replikationskompetenz, wobei aktive Replikationsinitiation in unmittelbarer Nähe zu *oriP* festgestellt werden kann (Norio et al., 2000). Somit stellt *oriP* eine ideale lokal definierte Replikatoreinheit dar, an der sich auch Mechanismen der eukaryonten DNA-Replikation studieren lassen.

Neben *oriP* wurden für EBV weitere aktive Replikationsursprünge postuliert (Little und Schildkraut, 1995; Kirchmaier und Sugden, 1998; Norio und Schildkraut, 2001; Norio und Schildkraut, 2004). Hierbei war die Tendenz zu erkennen, dass sich multiple Replikationsereignisse innerhalb größerer Initiationszonen von mehreren 10kb ereignen. Mit EBV bietet sich somit auch die Möglichkeit, in einem weniger komplexen System als dem Human-Genom, die Etablierung von humanen Replikationskomplexen Genom-weit auf DNA genauer zu analysieren.

1.6 Variabilität der DNA-Replikation

Die Ausbildung von Replikationsursprüngen auf dem Genom scheint in höheren Eukaryonten sowohl gerichtet als auch ungerichtet zu erfolgen. Dieses Paradoxon zeigt sich in der Tatsache, dass einige Replikationsursprünge lokal fixiert, andere flexibel und delokalisiert etabliert werden. Für den humanen Replikationsursprung LaminB2 konnte die Position der Initiation der DNA-Synthese bis auf die Base genau bestimmt werden (Abdurashidova et al., 2000). Dies entspricht einem lokal fixierten Replikationsursprung. Flexible und delokalisierte Origin-Positionierung findet man in großen Initiationszonen von bis zu 55kb. Die Aktivierung von Replikationsursprüngen erfolgt hier statistisch verteilt (Dijkwel et al., 1994; Dijkwel et al., 2002).

Im sog. „Jesuiten-Modell“ wird postuliert, dass deutlich mehr Replikationsursprünge etabliert werden, als in der S-Phase tatsächlich aktiviert werden (DePamphilis, 1993). Durch die Ausbildung von Pre-RCs lizenzierte Replikationsursprünge stellen demnach potentielle Kandidaten-Origins dar, von denen letztendlich nur ein geringer Teil in der S-Phase aktiviert wird. Schätzungen zufolge werden 10-20 mal mehr Origins lizenziert als in der S-Phase benötigt werden (Blow und Ge, 2008). Bisher konnte für höhere Eukaryonten auf Genom-weiter Ebene noch nicht geklärt werden, wo sich durch Aufbau von Replikationskomplexen potentielle Origins ausbilden können. Des Weiteren sind die Kriterien, die zur selektiven Aktivierung von Origins beitragen, noch gänzlich unverstanden.

Erste Analysen über die Genom-weite Ausbildung von Replikationskomplexen und deren Aktivierung waren in Hefe bereits erfolgreich. So wurde in *S. cerevisiae* und *S. pombe* anhand von Pre-RC-Bindestellen die Genom-weite Verteilung von potentiellen Replikationsursprüngen kartiert und mit Bereichen aktiver Replikationsinitiation verglichen (Raghuraman et al., 2001; Wyrick et al., 2001; Newlon und Theis, 2002; Feng et al., 2006; Heichinger et al., 2006; Xu et al., 2006; Hayashi et al., 2007). Der methodische Hauptansatz dieser Analysemethoden lag auf DNA-Mikroarray-Experimenten. Anhand von Mikroarray-Analysen konnten auch auf einem kleinen Teil des Human-Genoms (1%) Bereiche kartiert werden, die aktive Replikationsinitiation aufweisen (Cadoret et al., 2008). Ein Vergleich mit Positionen für Pre-Replikationskomplexe ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

1.7 Zielsetzung

Die Etablierung potentieller Replikationsursprünge (Origins) beginnt mit dem Binden von ORC an Origins und der Ausbildung von Pre-Replikationskomplexen (=Lizensierung) in der G₁-Phase des Zellzyklus. Nur lizenzierte Replikationsursprünge können die DNA-Synthese in der S-Phase einleiten (=Initiation), wobei Replikationsinitiation nur an einem ausgewählten Teil potentieller Kandidaten-Origins erfolgt.

Die Faktoren, die zur Definition von Replikationsursprüngen führen, sind für das Human-Genom weitgehend unbekannt. Postuliert wird der Beitrag von speziellen DNA-Elementen (u.a. A/T-reiche Sequenzen, CpG-Inseln, Promotoren, Matrix-Attachment-Sites), DNA-Topologie, übergeordneter DNA-Struktur, lokaler epigenetischer Vorgänge sowie Helferproteinen. Kriterien, die zur Selektion von Kandidaten-Origins führen, sind ebenfalls noch weitgehend unbekannt. Um die Mechanismen zu verstehen, die der Ausbildung von Replikationsursprüngen zugrunde liegen, müssen zunächst Faktoren identifiziert werden, die zur Positionierung von Pre-RCs auf der DNA beitragen. Der limitierende Faktor, der die Analyse von Replikationsursprüngen auf dem Human-Genom bisher erschwert, ist die geringe Anzahl bisher identifizierter Orte, an denen Pre-RCs ausgebildet werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der Identifizierung von Kandidaten-Origins auf der Basis von Pre-RC-Bindestellen. Diesbezüglich sollen für die Pre-RC-Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 ChIP-Chip-Protokolle etabliert werden. Mittels ChIP-Chip-Analysen auf 1% des Human-Genoms sowie Genom-weit auf dem Epstein-Barr-Virus (EBV) sollen im Folgenden Pre-RC-Bindestellen kartiert und mit bereits bekannten Replikationsinitiationsstellen verglichen werden. EBV nutzt in der latenten Infektionsphase die Replikationsmaschinerie der humanen Wirtszelle und bietet so die Möglichkeit, in einem weniger komplexen System als dem Human-Genom, die Etablierung von humanen Replikationskomplexen Genom-weit auf DNA genauer zu analysieren. Weiterhin werden potentielle regulatorische Prozesse wie Chromatin-Remodeling und Histon-Modifizierung am viralen Replikationsursprung *oriP* studiert.

2. Material

2.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren des Helmholtz Zentrum München. Eine genaue Übersicht befindet sich in Kapitel 3.1.1.

2.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion und Sigma-Aldrich synthetisiert.

Primer				
Bezeichnung	Oligo	Sequenz 5'-3'	Oligo	Sequenz 5'-3'
<i>oriP /DS</i>	fw	CTTGAGGGTCCGCTTATCGGTAGCT	rev	CTACGGGAGGCTACACCA
FR	fw	TCCATTATCCCGCAGTCCAC	rev	GCCGAATACCCTTCTCCCAGAG
crl1	fw	TCAACAGATAATCCACCCGCC	rev	CACAGGAGAGCCAGATGACGAC
crl2	fw	CGGTGAGATAGATTGGAGGCTG	rev	AGGCGTGGGTGTCAGACCTG
<i>oriLyt</i>	fw	CGTCTTACTGCCAGCCTACT	rev	AGTGGGAGGGCAGGAAAT
Q-Prom	fw	TGTCACCACCTCCCTGATAATGTC	rev	CATACACCGTGCGAAAAGAAGC
crl3	fw	ATTCGGTGGCATCCCTGAAG	rev	CCCCAAGAACACAAAGAGACAG
Label-Sonde	fw	ACTAGTATTTATTGCCCAAGGGG	rev	TCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCC
HPRT 2	fw	TAAGGAATTGGCTCACGCA	rev	GATCAAGAAGGCATTCTCCAG
HPRT 7	fw	GACCAGGTTTTGCCTTAG	rev	TCTAGCACATGTGAATTTCCG
HPRT 14	fw	TTACCACTTCTAGGCCCTC	rev	GTCCATAACAAGCACCCAAC

Tabelle 2.1: Oligonukleotidübersicht

fw = vorwärtsstrang Primer; rev = rückwärtsstrang Primer

2.3 Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Primäre Antikörper					
Spezifität	Spezies / Isotyp	Bezugsquelle	Verdünnung (WB)	ChIP	ChIP-Chip
Orc2	Kaninchen IgG	Labor A.Schepers	1:1000	30 µl	50 µl
Mcm3	Kaninchen IgG	Labor A.Schepers	1:1000	30 µl	50 µl
Mcm7	Kaninchen IgG	Labor A.Schepers	1:1000	30 µl	50 µl
Cdt1	Kaninchen IgG	Labor R.Knippers	1:2000	20 µl	30 µl
EBNA1	Ratte; 1H4; IgG2a (monoklonal)	E. Kremmer	1:200	20 µl	40 µl
Snf2h	Ratte; IgG2a (monoklonal)	E.Kremmer	1:200	30 µl	50 µl
H3K4me3	Kaninchen	Abcam	/	2,5 µg	10 µg
H4ac	Kaninchen	Abcam	/	2,5 µg	/
H4K8ac	Kaninchen	Abcam	/	2,5 µg	/
IgG Kaninchen	Ratte IgG (aff. ger.)	Dianova	/	2,5 µg	10 µg
IgG Ratte	Kaninchen IgG (aff. ger.)	Dianova	/	2,5 µg	10 µg
Sekundäre Antikörper					
Spezifität	Spezies / Isotyp	Bezugsquelle	Verdünnung (WB)	ChIP	ChIP-Chip
IgG Kaninchen	Ziege, HRP, IgG	Promega	1:10000	/	/
IgG Ratte	Ziege, HRP, IgG	Promega	1:10000	/	/
IgG (L.) Kaninchen	Ziege, HRP, IgG	Dianova	1:10000	/	/

Tabelle 2.2: Antikörperübersicht

HRP = Horse-Radish-Peroxidase; WB = Western Blot; ChIP = Chromatin Immunpräzipitation; ChIP-Chip = Chromatin-Immunitätspräzipitation mit anschließender Mikroarray Analyse; aff.ger. = affinitätsgereinigt; L. = gerichtet gegen die leichte Kette des Antikörpers

2.4 Chemikalien, Enzyme, Geräte und sonstiges

Sofern nicht anders aufgeführt, wurde die Chemikalien von der Firma Merck (Darmstadt) in reinster Form (pro analysi) 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)

Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe

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

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

Röntgenfilme XAR5

Eppendorf Gerätebau, Hamburg

BioPhotometer, Reaktionsgefäße verschiedener Größe, Tischzentrifuge 5415

General Electric Healthcare, München

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

Hartenstein, Würzburg

Zellschaber

Hoechst, Frankfurt

Hoechst-Farbstoff H33342,

Hofer 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, Natrium-Pyruvat, Penizillin, Streptomycin, Trypsin-EDTA (1x), Trypton, Zellkulturmedium RPMI 1640, Zellkulturmedium DMEM, BenchMark Protein Ladder, β -Mercaptoethanol

Macherey-Nagel, Düren

NucleoSpin Extract II Kit

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, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natrium-Orthovanadat, Salzsäure, Saccharose, Tetramethylethylenamin (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

PE Biosystems, Weiterstadt

PCR-Reaktionsgefäße

Peqlab, Erlangen

Reaktionsgefäße, Elektrophorese-Kammern, dNTPs

Pierce, Rockford

BCA Protein Assay

Promega, Mannheim

Antikörper, dNTP's

Qiagen, Hilden

Nickel-NTA-Agarose

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

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

Sigma Chemie, München

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

Schleicher & Schuell, Dassel

Filtereinheit: 1,2µm

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung

Alle Zelllinien wurden bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert.

Raji-Zellen: Raji-Zellen wurden in Suspensionskultur mit RPMI 1640, dem 10% FKS, 100µg/ml Streptomycin und 100µg/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen wurden bei einer Dichte von $2-8 \times 10^5$ Zellen/ml gehalten.

HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden adhärent in Zellkulturschalen mit DMEM, welchem 10% FKS, 100µg/ml Streptomycin und 100µg/ml Penizillin zugesetzt wurde, kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde optisch bestimmt. Die Zellkultur wurde bei einer Zelldichte von 70%-80% einmal mit 10ml 37°C PBS gewaschen, für 5min mit 3ml Trypsin bei 37°C inkubiert und jeweils 1/15 Volumen auf eine neue Zellkulturschale übertragen.

3.1.2 Aufbewahrung von Zellen

Eukaryonte Zellen wurden für eine Langzeitlagerung in einem Gemisch aus 10% DMSO und 90% FKS in flüssigen Stickstoff eingefroren. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurden die Cryotubes (10⁷ Zellen pro 2ml-Gefäß) der Firma NUNC in einer Einfrierhilfe des gleichen Herstellers, welche einen Mantel aus 80%igem Isopropanol besitzt, auf -80°C abgekühlt. Die Lagerung erfolgte dann in einem Flüssigstickstofftank. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese in einem 37°C warmen Wasserbad rasch aufgetaut, in 15ml vorgewärmten Vollmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Vollmedium überführt.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde die geerntete Zellsuspension zunächst mit dem Ziel größerer Homogenität durchmischt, davon 10µl 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 0,1mm. Die Fläche eines Großquadrates beträgt 1mm², somit ist das Volumen eines Großquadrates 0,1µl. Es wurden stets vier Großquadrate ausgezählt. Aus der Anzahl der gezählten Zellen konnte die Zellzahl im Gesamtvolumen mit folgender Gleichung ermittelt werden.

(Gesamtzellzahl = durchschnittliche Zellzahl (aus 4 Großquadraten) x 10⁴ x Verdünnungsfaktor x Ausgangsvolumen)

3.2 Zellzyklus-Synchronisation und Bestimmung des DNA-Gehalts

3.2.1 Arretierung von HeLa-Zellen in der G₁/S-Phase

2,5x10⁶ HeLa-Zellen wurden auf einer 20cm Zellkulturschale (NUNC) in DMEM ausgesät und für 24h kultiviert. Um die Zellen in der S-Phase zu synchronisieren wurde ein doppelter Thymidinblock (Johnson et al., 1993) durchgeführt. Zur Synchronisation in der G₁/S-Phase wurden die Zellen erst mit einem 15-stündigen Thymidinblock vorsynchronisiert, dann für exakt 9h aus dem Block entlassen und anschließend erneut für 15h mit Thymidin in der G₁/S -Phase arretiert. Thymidin wurde bei einer finalen Konzentration von 10mM (mM: milli Molar) verwendet.

3.2.2 Zellzyklus-Synchronisation von Raji-Zellen durch Zentrifugal-Elutriation

Für eine Zentrifugal-Elutriation wurden jeweils 5×10^9 asynchron wachsende Raji-Zellen verwendet. Die Zellen wurden für 10min bei 4°C mit $1000 \times g$ pelletiert und einmal in 50ml 4°C PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 50ml RPMI1640 mit 1% FKS, 1mM EDTA und 0,23 U/ml DNase (Roche) resuspendiert und bei 30 ml/min Flussgeschwindigkeit (Cole-Palmer-Masterflex-Pumpe) in eine Fraktionierungskammer (Rotor JE-5.0) geladen, die in einer Beckman Zentrifuge (J6-MC-Zentrifuge bei 1500rpm und 4°C) rotierte. Bei konstanter Rotorgeschwindigkeit wurde eine Gegenströmung angelegt, die schrittweise erhöht wurde. Für jede Flussgeschwindigkeit (40ml/min, 45ml/min, 50ml/min, 65ml/min, 80ml/min, 100ml/min) wurden 400ml Fraktionen gesammelt. Die Zellen jeder Fraktion wurden pelletiert ($1000 \times g$, 10min, 4°C), zweimal in je 50ml 4°C PBS gewaschen, anschließend gezählt und jeweils 1×10^8 Zellen für Chromatin-Präparationen verwendet.

3.2.3 Bestimmung des DNA-Gehalts mittels FACS

Die synchronisierten Zell-Fraktionen wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse: Fluorescence Activated Cell Sorter) auf ihren DNA-Gehalt geprüft. Dazu wurden 5×10^6 Zellen für 1h in 70% Ethanol fixiert. Anschließend wurden sie 3x mit je 1ml PBS gewaschen und die RNA durch 30min RNase-Behandlung entfernt. Die Färbung der DNA erfolgte mit $5 \mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid in PBS. Der DNA-Gehalt je Zelle wurde anschließend durch FACS-Analyse vermessen.

3.3 Proteinbiochemische Arbeiten

3.3.1 Präparation von RIPA-Lysaten

Zur Herstellung von RIPA-Zelllysaten wurden 1×10^6 Zellen von den Zellkulturschalen durch eine Trypsin-Behandlung geerntet oder 1×10^6 Zellen einer Suspensionskultur entnommen. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (4°C)

gewaschen und in einem Eppendorfgefäß mit 200µl RIPA-Puffer für 30 min auf Eis lysiert. Im Anschluss daran wurde der Ansatz bei 16000xg für 30min zentrifugiert und der Überstand, das RIPA-Lysat, bei -20°C eingefroren.

RIPA-Puffer: 50mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% Deoxycholat, 1% NP40, 50mM Tris-HCl (pH 8,0);

3.3.2 Präparation von Kern-Extrakten

Im Zellkern lokalisierte Proteine wurden für Western-Blot- und Co-IP-Analysen durch die Präparation von Kernextrakten gewonnen. Zur Herstellung von Kernextrakten aus HeLa- oder Raji-Zellen wurden 1×10^8 Zellen geerntet, in 50ml eiskühlem PBS gewaschen und in einem 50ml Falcon-Röhrchen pelletiert (8min, 400xg, 4°C). Das Pellet wurde in 14ml hypotonen Puffer äquilibriert, die Zellen in ein 14ml Falcon-Röhrchen überführt und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in 1ml hypotonen Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden entweder durch Zugabe von hypotonen Puffer, welchem Triton X-100 (Endkonzentration 0,08%) zugesetzt wurde, oder durch Homogenisieren in einem 7ml Wheaton-Dounce-Homogenisator (T-Fit) durch 35 Stöße lysiert. Die so erhaltenen Kerne wurden durch Zentrifugation pelletiert (10min, 2000xg, 4°C). Die Kerne wurde in 1ml hypotonen 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 40000rpm in einem SW60Ti-Rotor bei 4°C zentrifugiert um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde für 3h gegen 800ml Dialyse-Puffer bei 4°C dialysiert (Spectra/Por6 Dialysemembran, MWCO 3,5kDa, 11,5cm Durchmesser) und anschließend einer Immunpräzipitation unterzogen oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

hypotoner Puffer: 10mM HEPES (pH 7,9), 10mM KCl; 10% Glycerin, 0,34M Sukrose, 1,5mM MgCl₂, 1mM ATP, 1mM DTT, Proteinase-Inhibitor Complete – Roche;

Dialyse-Puffer: 10mM HEPES (pH 7,9), 125mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 10% Glycerin;

Kernextraktionspuffer: 10mM HEPES (pH 7,9), 900mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM ATP, 1mM DTT, Proteinase-Inhibitor Complete – Roche;

3.3.3 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Für Co-IP-Experimente wurden pro Ansatz Kernextrakte aus 5×10^7 Zellen eingesetzt. Dieser Kernextrakt wurde zusammen mit $5 \mu\text{g}$ IP-Antikörper in einem 1,5ml Eppendorfgefäß bei 4°C und gleichzeitiger Über-Kopf-Rotation (10rpm) für 1,5h inkubiert. Nach Zugabe von $50 \mu\text{l}$ 50-prozentiger Protein A-Sepharose (für Kaninchen-Antikörper) bzw. 50-prozentiger Protein G-Sepharose (für Ratten-Antikörper) wurde die IP für weitere 1,5h bei 4°C und gleichzeitiger Über-Kopf-Rotation (10rpm) inkubiert. Danach wurden die Sepharose-beads auf Poly-Prep-Säulen (Bio-Rad) mit $3 \times 3 \text{ml}$ hypotonen Puffer gewaschen und mit $2 \times 500 \mu\text{l}$ hypotonen Puffer in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt. Die Sepharose-beads wurden durch Zentrifugation (1min, $400 \times g$, 4°C) pelletiert, mit $25 \mu\text{l}$ 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und bis zur Western-Blot-Analyse bei -20°C gelagert.

hypotoner-Puffer: 10mM HEPES (pH 7,9), 10mM KCl, 10% Glycerin, 0,34M Sukrose, 1,5mM MgCl_2 , 1mM ATP, 1mM DTT, Proteinase-Inhibitor Complete – Roche;

2x Laemmli-Probenpuffer: 100mM Tris (pH 6,8), 4% SDS, 200mM DTT, 10% Glycerin, 0,2% Bromphenolblau;

3.3.4 Western-Blot

Die im Western-Blot untersuchten Proteine wurden gemäß dem Standard-Protokoll für die Elektrophorese von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) aufgetrennt und mit dem Semi-Dry-Blot-Verfahren (Towbin et al., 1979) auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Zum Blockieren der Membranen wurde Roti-Block-Lösung (Roth) verwendet. Detektiert wurden die Proteine mit spezifischen primären Antikörpern. Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde oder über Nacht bei 4°C in PBST. Abweichend hiervon wurde der Cdt1 Antikörper in 5% Magermilch mit 0,5% Triton X-100 inkubiert. Die primären Antikörper wurden anschließend mit Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern markiert. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde in PBS mit 2,5% Magermilchpulver. Gemäß

dem ECL Western-Blotting-Protokoll von Amersham Life Science wurden die Proteine nachgewiesen.

3.4 DNA-Arbeitstechniken

3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet (Mullis et al., 1986). Alle PCR-Reaktionen wurden mit der Pfu-Turbo DNA-Polymerase nach Herstellerangaben angesetzt. Die DNA-Fragmente wurden nach der Reaktion mit einem Nucleospin-Extract-II-Kit der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt und die Länge der Fragmente wurde in einem 0,8% TAE-Agarosegel durch Gelelektrophorese untersucht.

3.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Die zu präparierende DNA wurde durch ein 0,8% TAE-Agarosegel, dem 1µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde, aufgetrennt. Die Fragmente wurden unter einer 254nm UV-Lampe analysiert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die präparierten Fragmente wurden mit dem Nucleospin-Extrakt-II-Kit (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt.

3.4.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde mit einem DYNAQuant Fluorimeter der Firma Höfer gemäß Herstellerangaben bestimmt.

3.4.4 Nukleosomen-Footprint und indirektes End-Labeling

Für die Analyse der Nukleosomenposition an DS wurden aus 2×10^7 Raji-Zellen zunächst Zellkerne präpariert (siehe Abschnitt 3.3.2). Anschließend wurden die Kerne in hypotonen Puffer aufgenommen und durch ein Sukrose-Kissen

zentrifugiert (15min, 1000xg, 4°C). Hiernach wurden die Kerne in 100µl Reaktionspuffer aufgenommen und mit 75U/ml MNase (Roche) für 5min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100µl Stop-Puffer und Proteinase-K (100µg/ml) beendet. Die Proteinase-K Spaltung erfolgte für 2h bei 50°C. Anschließend wurde die DNA mittels Phenol/Chloroform gereinigt und über Nacht in 100% Ethanol präzipitiert. Die DNA wurde danach für 16h bei 37°C mit NcoI gespalten und im Folgenden auf einem 1,4% TBE Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylon Membran transferiert (siehe Abschnitt 3.4.5).

hypotoner Puffer: 10mM HEPES (pH 7,9), 10mM KCl, 10% Glycerin, 0,34M Sukrose, 1,5mM MgCl₂, 1mM ATP, 1mM DTT, Proteinase-Inhibitor Complete – Roche;

Sukrose-Kissen: 25% Sukrose, 5mM MgAc, 0,1mM EDTA und 10mM HEPES (pH 7,9), 10% Glycerin;

Reaktionspuffer: 25mM KCl, 4mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 50mM Tris (pH 7,4), 12,5% Glycerin;

Stop-Puffer: 2% SDS, 0,2M NaCl, 10mM EDTA, 10mM EGTA, 5mM Tris (pH 8,0);

3.4.5 Southern-Blot

Der Southern-Blot erfolgte nach Standard-Protokollen (Church und Gilbert, 1984; Southern, 1975). Dazu wurden 2µg DNA auf einem 1,4% TBE-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 30min mit 0,25M HCl inkubiert, um durch einen Depurinierungsschritt später Strangbrüche in den DNA-Fragmenten durch Hydrolyse hervorzurufen. Danach wurde die DNA mit einer 1,5M NaCl/1,5M NaOH-Lösung denaturiert und durch kapillaren Transfer auf eine Nylon-Membran (Hybond N+) übertragen. Nach Schwenken der Membran im Waschpuffer erfolgte die 60-minütige Prä-Hybridisierung in 15ml Hybridisierungspuffer (Church-Puffer) bei 65°C. Nach dieser Zeit wurde der Puffer erneuert und die radioaktiv markierte Probe zugegeben. Die Hybridisierung der radioaktiv markierten Probe an homologe DNA-Bereiche erfolgte über Nacht bei 65°C. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran dreimal für je 15min 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: 40mM Tris-HCl (pH8,0), 5mM NaAc, 1mM EDTA;

2 x SSC: 300mM NaCl, 3mM Natriumcitrat;

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

Waschpuffer: 0,2xSSC, 1% SDS;

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

3.4.7 Analyse „naszierender DNA“

Die naszierende DNA („nascent strand“) wurde nach einem Protokoll von Leffak isoliert (Ghosh et al., 2004). Die Elektrophorese-Kammer wurde zunächst mit einer 0,2M 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 anschließend bei -80°C gelagert oder direkt in die Taschen eines Agarosegels geladen. Dort wurden die Zellen 15min durch den Laufpuffer lysiert. Die Größenauftrennung der denaturierten DNA erfolgte über Nacht bei 45V 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 700–1100kb umfassender Bereich, der die naszierende DNA enthielt, mit

einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mittels des Nucleospin Extract II Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben gereinigt. Aus dem 40µl Eluat wurden je 1–2µl in die quantitative PCR eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.2 aufgelistet. Für Analysen am HPRT-Origin in Raji-Zellen wurde der Mittelwert der Anreicherung „naszierender DNA“ gleich 1 gesetzt und die Anreicherungen der beiden Referenzregionen zu HPRT in Relation gesetzt. Für Analysen „naszierender DNA“ auf dem EBV-Genom wurde der Mittelwert für die Replikatorregion DS gleich 1 gesetzt und Anreicherungen aller weiteren Genregionen in Relation zu DS gesetzt.

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

Laufpuffer: 50mM NaOH, 1mM EDTA;

3.4.8 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

(A) Chromatin-Immunpräzipitation für Zellzyklus-Analysen in Raji-Zellen:

Für Zellzykluskinetiken in Raji-Zellen wurden jeweils 1×10^8 Zellen den entsprechenden Elutriationsfraktionen entnommen und dreimal in PBS gewaschen. Die DNA-Protein Bindungen wurden durch Formaldehyd (1% Formaldehyd bei Raumtemperatur für 8min) kovalent verknüpft. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Glyzin (Endkonzentration 125mM) gestoppt und die Zellen dreimal bei 4°C mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5ml LB1-Puffer resuspendiert und für 10min bei 4°C inkubiert. Die Zellen/Zellkerne wurden 10min bei 2000xg pelletiert und erneut für 10min in LB1-Puffer inkubiert. Im Folgenden wurden die Kerne 10min mit LB2-Puffer gewaschen und erneut pelletiert. Um die Zellkerne zu zerstören und das Chromatin mechanisch zu scheren, wurden die Kerne in 3ml LB3-Puffer resuspendiert, mit einer Spatelspitze Glaskugeln (213-300µm; SIGMA) versehen (entspricht ca. 20% des Gesamtvolumens) und bei 35% Leistung mit einer Ultraschall-Sonde (Branson) sonifiziert (8x30sek in ETOH/Eiswasser; 1sek an / 1sek aus). Anschließend wurde die Lösung auf 4mM CaCl₂ eingestellt, 1min bei 37°C erwärmt und mit 100U/ml MNase (Roche) für 10min bei 37°C behandelt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von EGTA (Endkonzentration: 10µM) gestoppt. Durch Zentrifugation (20min, 13200rpm, 4°C) wurden Zelltrümmer entfernt und die

Chromatinmenge des Überstandes mittels NanoDrop vermessen. Die Chromatin-Konzentration wurde mit LB3-Puffer auf 1mg/ml eingestellt. Zudem wurde die Chromatinlösung mit Triton X-100 versetzt (Endkonzentration 0,5%).

Für die Zellzyklusanalyse von Proteinen des Pre-Replikationskomplexes sowie EBNA1 wurden 500µg Chromatin je ChIP-Experiment verwendet. Für die Analyse der Histon-Modifikationen H3K4me3, H4ac und H4K8ac wurden jeweils 250µg Chromatin verwendet. Für Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente wurden entweder 250µg Chromatin in 0,5ml Eppendorfgefäße oder 500µl in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und die entsprechenden Antikörpermengen (siehe Tabelle 2.2) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 4h bei 4°C. In der Zwischenzeit wurden Sepharose-beads, die entweder mit Protein A oder G gekoppelt waren, dreimal 10min mit Block-Lösung gewaschen (5% BSA, 0,003% Herings-Sperma, 1x Protease-Inhibitor in LB3) und anschließend mit Block-Lösung auf 50% eingestellt. Jeweils 40µl der 50%igen Sepharose-beads Lösung wurde der Chromatin-Antikörper Lösung zugegeben und diese in einem Überkopfschüttler (10rpm/min) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Sepharose-beads auf Säulen (Biorad) transferiert und sequenziell mit 2x10ml RIPA-Puffer, 2x10ml LiCl-Puffer und 2x10ml TE gewaschen. Die Sepharose-beads wurden erneut in Eppendorfgefäße transferiert und die Antikörper-Chromatin-Komplexe eluiert (200µl Elutionspuffer, 65°C, 10min). Die kovalenten Protein-DNA Vernetzungen wurde bei 65°C über Nacht revertiert. Nach einer RNase Behandlung für 2h bei 37°C und einer Proteinase-K Behandlung für 4h bei 56°C wurde die DNA mit einem Nucleospin-Extrakt-II-Kit der Firma Macherey-Nagel aufgereinigt (Elutionsvolumen 20µl; 5mM Tris pH 8,5) und anschließend anhand quantitativer Real-Time-PCR analysiert.

(B) Chromatin-Immunpräzipitation für ChIP-Chip-Experimente in Raji-Zellen:

Um für ChIP-Chip-Experimente eine bessere DNA-Anreicherung bei zugleich geringerem unspezifischem Hintergrund zu erhalten, wurde das ChIP-Protokoll modifiziert. Es wurden sowohl mehr Chromatin (1000µg) als auch mehr Antikörper (siehe Tabelle 2.2) eingesetzt. Zudem wurde das Chromatin vor der eigentlichen Chromatin-Immunpräzipitation von unspezifisch an beads und Antikörper bindender DNA befreit (pre-clearing). Hierbei wurde das Chromatin bei 4°C für 4h mit einem unspezifischen IgG-Serum inkubiert (20µg IgG-Serum/1mg Chromatin).

Anschließend wurden 60µl geblockte Sepharose ProteinA/G beads zugegeben, über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Morgen wieder entfernt. Durch diesen Schritt wurden DNA-Fragmente und auch Proteine, die eine unspezifische Bindung gegenüber Antikörpern und Sepharose A/G-beads aufweisen, entfernt. Eine weitere Variation des Protokolls erfolgte bei Zugabe der spezifischen Antikörper. Diese wurden bei ChIP-Chip-Experimenten zuerst für 4h an Sepharose A- oder Sepharose-G-beads gebunden. Erst im Anschluß wurden die Sepharose-A/G-Antikörper-Komplexe, nachdem diese 3x in LB3-Puffer gewaschen wurden, dem „pre-cleared“ Chromatin zugegeben. Die spezifische Chromatin-Immunpräzipitation erfolgte über Nacht bei 4°C. Waschen der Sepharose-beads, Elution und Aufreinigung der DNA erfolgten gemäß dem bereits unter Abschnitt 3.4.8 (A) beschriebenen Protokoll.

(C) Chromatin-Immunpräzipitation für HeLa-Zellen

Für HeLa-Zellen musste das Protokoll für die Scherung des Chromatins modifiziert werden. Das Chromatin wurde 4x30sek bei 35% Leistung sonifiziert. (1sek an/1sek aus). Eine MNase-Behandlung wurde nicht durchgeführt.

(D) Chromatin-Immunpräzipitation für ChIP-Chip-Experimente in HeLa Zellen

Die Chromatin-Scherung erfolgte wie in (C), die Chromatin-Immunpräzipitation erfolgte wie in (D). Wie auch bei Raji-Zell ChIP-Chip Experimenten wurde die Menge des eingesetzten Chromatins auf 1000µg erhöht. Die verwendeten Antikörper-Mengen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

LB1-Puffer: 10mM HEPES (pH 7,5), 140mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5mM EGTA, 10%Glyzerin, 0,5%NP40, 0,5%Triton X-100 + 1x Proteinase-Inhibitor (Complete-Roche) und Proteasom-Inhibitor MG132 (10µM);

LB2-Puffer: 10mM HEPES (pH 7,5), 200mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5mM EGTA, + 1x Proteinase-Inhibitor (Complete-Roche) und Proteasom-Inhibitor MG132 (10µM);

LB3-Puffer: 25mM HEPES (pH 7,5), 140mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5mM EGTA, + 1x Proteinase-Inhibitor (Complete-Roche) und Proteasom-Inhibitor MG132 (10µM);

% Detergenzien bei folgenden Antikörpern:

Orc2: 0,5% Triton X-100, 0,5% Sarcosyl, 0,1% DOC;

Mcm3: 0,5% Triton X-100, 0,5% Sarcosyl, 0,1% DOC;

Mcm7: 0,5% Triton X-100, 0,5% Sarcosyl, 0,1% DOC;

Cdt1: 0,7% Triton X-100, 0,3% NP40, 0,5% Sarcosyl, 0,1% DOC;

EBNA1: 0,7% Triton X-100, 0,3% NP40, 0,5% Sarcosyl, 0,1% DOC;

Snf2h: 0,25% Tritonx-100, 0,25% Sarcosyl, 0,1% DOC;

H3K4me3: 0,7% Triton X-100, 0,3% NP40, 0,5% Sarcosyl, 0,1% DOC;

H4ac: 0,5% Triton X-100, 0,5% Sarcosyl, 0,1% DOC;

H4K8ac: 0,5% Triton X-100, 0,5% Sarcosyl, 0,1% DOC;

Block-Lösung: 5% BSA, 0,003% Herings-Sperma, 1x Protease-Inhibitor, 0,1% Triton X-100 in LB3;

RIPA-Puffer: 1mM EDTA, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% DOC, 1% NP40, 50mM Tris (pH 8,0);

LiCl-Puffer: 250mM LiCl, 0,1% SDS, 0,5% DOC, 1% NP40, 50 mM Tris (pH 8,0);

TE: Tris-EDTA (pH 8,0);

Waschbedingungen:

Orc2: 2x5ml RIPA, 2x5ml LiCL, 2x 5ml TE;

Mcm3: 2x5ml RIPA, 2x5ml LiCL, 2x 5ml TE;

Mcm7: 2x5ml RIPA, 2x5ml LiCL, 2x 5ml TE;

Cdt1: 2x10ml RIPA, 2x5ml LiCL, 2x 5ml TE;

EBNA1: 2x10ml RIPA, 2x5ml LiCL, 2x 5ml TE;

Snf2h: 2x5ml RIPA, 2x5ml LiCL, 2x 5ml TE;

H3K4me3: 2x10ml RIPA, 2x5ml LiCL, 2x 5ml TE;

H4ac: 2x5ml RIPA, 2x5ml LiCL, 2x 5ml TE;

H4K8ac: 2x5ml RIPA, 2x5ml LiCL, 2x 5ml TE;

Elutionspuffer: TE 1% SDS;

3.4.9 Quantitative PCR (Real-Time-PCR / RT-PCR)

Die „Real-Time“-PCR (RT-PCR) diente der Quantifizierung der in der Chromatin-Immunpräzipitation angereicherten DNA. Die hierbei verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit Hilfe eines Light-Cyclers der Firma Roche. Der hier verwendete kommerzielle „Light-Cycler PCR Reaction Mix“ enthält den Farbstoff SYBR-Green, welcher sich während der Reaktion in die amplifizierte doppelsträngige DNA einlagert. Die emittierte Fluoreszenz wird vom Gerät nach jedem Zyklus gemessen (Higuchi et al., 1993). Zum Errechnen einer Standardkurve wurden Verdünnungen des eingesetzten Chromatins verwendet (10%, 4%, 1%, 0,25% und 0,0625% des Inputs). Ein Standard-Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 10µl enthielt 1-2µl DNA, 1,6µl MgCl₂ (25mM; Roche), 0,5µl Oligonukleotid-Mix und 1µl Polymerase-Mix (inklusive dNTPs, SYBR-Green und „hot start“-Polymerase; Roche).

Temperaturprofil für quantitative PCRs (nach ChIP)

Das Temperaturprofil 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 A, F und G je 1 Zyklus.

Segment	Temperatur	Zeit (sek)	Temperaturänderung (°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	einzel
F	97 °C	1	20	-
	76 °C	10	20	-
	97 °C	0	0,15	kontinuierlich
G	20 °C	3	20	-

Für die Quantifizierung der DNA sowie die Erstellung der Amplikon-Schmelzkurven wurde die Light-Cycler Software (Light-Cycler Software Version 3.5; Roche) verwendet.

3.5 Mikroarray-Analysen

Amplifikation der immunpräzipitierten DNA

Die Gesamtmenge immunpräzipitierter DNA nach ChIP-Experimenten war zu gering, um diese direkt auf Mikroarrays hybridisieren zu können. Um die erforderlichen DNA-Mengen zu erlangen, wurde sowohl die immunpräzipitierte DNA als auch die genomische Input-DNA mittels PCR-Amplifikation vermehrt. Für die DNA-Amplifikation wurde der „GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification Kit“ (WGA2; Sigma-Aldrich) verwendet. In die Amplifikationsreaktion wurden jeweils 50% (=10µl) der immunpräzipitierten DNA bzw. 200ng Input-DNA eingesetzt. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Mastercycler personal; Eppendorf) gemäß Angaben des Herstellers (13 Amplifikationszyklen).

3.5.1 Der EBV-PCR-Mikroarray

EBV-PCR-Mikroarray-Aufbau

Der Mikroarray besteht aus 256 einzelnen EBV-PCR-Fragmenten mit Längen von 500–700 Nukleotiden, die das gesamte EBV-B95.8-Wildtyp-Genom dachziegelartig überlappend abdecken. Beide Stränge des EBV-Genoms wurden jeweils in Duplikaten auf ein Epoxyd-beschichtetes Deckglas aufgebracht.

EBV-PCR-Mikroarray-Hybridisierung

2,5µg DNA der amplifizierten spezifischen ChIP-Probe sowie der genomischen Input-DNA wurden gemäß Angaben des Herstellers mit den Farbstoffen Alexa Fluor5® oder Alexa Fluor3® markiert (BioPrime Total Genomic Labeling System; Invitrogen). Die Effizienz des Farbstoffeinbaus wurde durch Fluoreszenzmessung überprüft. (Wellenlänge 555nm für Alex Fluo 3® und Wellenlänge 647nm für Alexa Fluor5®). Beide Proben wurden vereinigt, evaporiert und in einem finalen Volumen von 120µl Hybridisierungs-Puffer (Ocimum

Biosolution) aufgenommen. Die Hybridisierung wurde an einer Tecan HS 4000 Pro Hybridisierungsstation durchgeführt. Die Bindung der DNA an den Mikroarray erfolgte für 16h bei 60°C und unter leichter Bewegung der Hybridisierungskammer. Der Mikroarray wurde im Anschluss an die Hybridisierung mehrfach gewaschen (3x1 min bei 30°C mit 2xSSC, 3x1 min bei 30°C mit 0,1% SDS/1xSSC und 3x1 min bei 30°C mit 0,5xSSC). Abschließend wurde der Mikroarray mit Stickstoff getrocknet.

Scannen, Normalisierung und Analyse der EBV-PCR-Mikroarray-Signale

Die Mikroarray-Signale wurde mittels eines GenePix Personal 4100A Scanners (Axon) eingelesen. Die Analyse der Signalintensitäten erfolgte durch die GenePix Pro 6 Software. Für die Signalnormalisierung wurde der durchschnittliche „Mittlere Wert“ aller Signale berechnet und auf 1 gesetzt. Im Folgenden wurde der Mittelwert der 4 technischen Replikate je Mikroarray berechnet, wobei Signalvarianzen mit einem Standard-Fehler > 0,15 für weitere Analysen ausgeschlossen wurden. Der Mittelwert der relativen Anreicherungen wurde für weitere Normalisierungen verwendet. Aus den relativen Anreicherungen biologischer Replikate wurden in Microsoft[®] Excel Mittelwerte gebildet. Die Mittelwerte der Protein-spezifischen ChIP-Proben wurden zuletzt durch den Mittelwert der unspezifischen IgG-Proben dividiert, um Hintergrundsignale, die durch unspezifische Bindung von DNA an Proteine oder Sepharose-beads erzeugt werden, zu eliminieren.

3.5.2 Der EBV-Oligonukleotid-Mikroarray

EBV-Oligonukleotid-Mikroarray-Aufbau

Für die Herstellung eines High-Resolution Mikroarrays wurden anhand des EBV-Genoms (Accession Number: NC_007605) spezifische Hybridisierungsproben folgendermaßen hergestellt: In Fenstern von 60 Nukleotiden wurden Sequenzen mit einer Länge von 45 bis 60 Nukleotiden so ausgewählt, dass der T_m jedes Oligonukleotids 80°C beträgt. DNA-Proben, die einen zu hohen GC-Gehalt (>80%) aufwiesen, wurden eliminiert. DNA-Proben, die kürzer als 60 Nukleotide waren, wurden mit einer Linkersequenz aufgefüllt, so dass alle Proben dieselbe Länge von 60 Nukleotiden besitzen. Als Hybridisierungskontrolle wurde die Sequenz des

humanen Adenovirus 5 (Ad5) nach denselben Kriterien auf den Chip aufgebracht. Beide Stränge des EBV-Genoms wurden jeweils in Duplikaten und die Stränge des Adenovirus-Genoms in einfacher Ausführung von der Firma Agilent auf einen 8x15K Custom Mikroarray synthetisiert.

Fluoreszenz-Markierung der ChIP-DNA-Proben:

Es wurden jeweils 500ng amplifizierte Input- und IP-DNA für die Markierungsreaktion verwendet. Zu jedem Ansatz wurden 100pg gescherte Ad5-DNA als Hybridisierungskontrolle gegeben. Gemäß des Protokolls der Firma Agilent (Mammalian ChIP-on-chip V10.0) wurden die Proben mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I (*E.coli*) unter Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 (Input) und Cy5 (IP) markiert. Anschließend wurde die so markierte DNA über Microcon-YM30 Filtereinheiten (Invitrogen) gereinigt und in 10µl TE-Puffer aufgenommen. Der Erfolg der Markierungsreaktion wurde photometrisch am Nanodrop überprüft.

Hybridisierung und Scannen der EBV-Oligonukleotid-Mikroarrays:

Für die Hybridisierung der markierten DNA auf den EBV-Oligonukleotid-Mikroarray wurden jeweils 2,5µg Input- und IP-DNA im Verhältnis 1:1 gemischt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen aufgrund von zu hohem GC-Gehalt wurde stark GC-haltige repetitive DNA mit humaner Cot-1 DNA (Invitrogen) und Agilent Blocking Agent (10x) in Agilent Hybridisierungspuffer (2x) in einem Gesamtvolumen von 50µl blockiert. 40µl der Ansätze wurden für 24h bei 65°C und 20rpm in einem Hybridisierungsofen auf den EBV-Array hybridisiert. Anschließend wurden die Mikroarrays 5 min mit Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-chip wash buffer 1 und 1 min in Agilent Oligo aCGH/ChIP-on-chip wash buffer 2 (vorgewärmt auf 37°C) gewaschen und 10 Sekunden bei 300xg in einer Zentrifuge getrocknet. Die Arrays wurden unmittelbar danach mit einem GenePix Personal 4100A Scanner (Axon Instruments) digitalisiert. Der Gain wurde so eingestellt, dass beide Fluoreszenzkanäle deutliche Signale mit möglichst wenigen übersättigten Spots aufwiesen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe externer Software analysiert und visualisiert.

3.5.3 Der ENCODE-Mikroarray

ENCODE-Mikroarray-Aufbau

Für humane DNA-Mikroarray Analysen wurde der „385K Whole-Genome Tiling Array“ der Firma Roche NimbleGene verwendet. Dieser besteht aus 30Mb ausgewählter humaner DNA, die in 385000 einzelnen Fragmenten mit einer Länge von 50-75 Nukleotiden auf den Mikroarray synthetisiert wurden. Der Abstand der einzelnen DNA-Sequenzen zueinander beträgt 100bp.

Fluoreszenz-Markierung und Hybridisierung

Fluoreszenz-Markierung und Hybridisierung der einzelnen DNA-Proben erfolgte durch Roche NimbleGene.

Normalisierung und Analyse der ENCODE-Daten

Die bioinformatische Normalisierung aller ENCODE-Hybridisierungen wurde in Kooperation mit Prof. J. Söding (Genzentrum München) durchgeführt. Jede Hybridisierungsanalyse besteht aus Daten biologischer Replikate. DNA-Probe 1 war mit dem Farbstoff Cy3, DNA-Probe 2 war mit dem Farbstoff Cy5 markiert. Für die Auswertungen der Replikate wurden zunächst die Farbstoff-Effekte durch Aufrechnung von Cy3/Cy5 entfernt. Desweiteren wurden die spezifischen ChIP-Chip-Hybridisierungsdaten gegen unspezifische IgG-Kontrollen normalisiert.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch das Programm „SignalMap“ der Firma Roche NimbleGene. Die Filterparameter „threshold detection“ und „peak window size“ wurden für jede Auswertung individuell bestimmt.

4. Ergebnisse

Es ist für höhere eukaryote Organismen wie den Menschen bisher weitgehend unbekannt, wie Replikationsursprünge definiert werden. Ziel dieser Arbeit war es, Kandidaten-Replikationsursprünge sowohl auf dem Human- als auch dem EBV-Genom zu identifizieren und Kriterien zu erarbeiten, die zur Ausbildung von Replikationsursprüngen beitragen können.

Ein Schwerpunkt der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente lag auf der Analyse der Lokalisation der Pre-RC-Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1. Auf Ebene des EBV-Genoms wurde zusätzlich der Beitrag des viralen Proteins EBNA1 zur Etablierung von Replikationsursprüngen untersucht. Der methodische Hauptansatz der folgenden Analysen beruhte auf DNA-Mikroarray-Experimenten, durch die Genom-weit DNA-Bindestellen für Pre-Replikationskomplexe kartiert werden sollten.

Identifizierte Pre-RC-Bindestellen wurden daraufhin auf gemeinsame Kriterien hin untersucht. Hierbei wurden Mechanismen analysiert, die durch Veränderung der lokalen Chromatinstrukturen dazu beitragen könnten, einen Replikationsursprung zu definieren. Untersucht wurden hierzu die Histon-Modifikationen H3K4me3, H4ac, H4K8ac sowie der Chromatin-Remodeling-Faktor Snf2h.

4.1 Etablierung spezifischer CHIP- und ChIP-Chip-Analysen für humane Pre-RC-Proteine

Die Identifizierung von Replikationsursprüngen auf dem EBV- und dem Human-Genom erfolgte anhand von DNA-Mikroarray Experimenten. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden zunächst spezifische ChIP (Chromatin-Immunpräzipitation) Protokolle etabliert, um nachfolgende ChIP-Chip-Analysen effizient durchführen zu können. Ziel war es zunächst, Chromatin-Immunpräzipitationen für die Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 so zu optimieren, dass Qualität und Menge der isolierten DNA auch für DNA-Mikroarray-Analysen geeignet waren. Im Vergleich zu Transkriptionsanalysen mit zum Teil Genom-weiten Promoter-Chip-Arrays sind auf dem Feld der DNA-Replikation spezifische ChIP- und ChIP-Chip-Experimente für Pre-RC-Komponenten bisher

keine etablierte Routine-Methode. Da die Etablierung spezifischer ChIP und ChIP-Chip-Experimente einen zentralen Kern dieser Arbeit darstellen, werden sowohl die Methode als auch die einzelnen Etablierungsschritte in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben.

4.1.1 Protein-DNA Interaktionsstudien mittels ChIP und ChIP-Chip

Die ChIP-Technik:

Mit ChIP-Experimenten können Protein-DNA-Interaktionen analysiert werden. (Abb.4.1). Dafür werden die Protein-DNA-Strukturen mit Formaldehyd kovalent miteinander verknüpft. In diesem ‚fixierten‘ Zustand werden die Zellen zerstört, Zellkerne isoliert und das Chromatin zerkleinert. Durch Immunpräzipitation mit einem spezifischen Antikörper (z.B. Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1) können DNA-Fragmente isoliert werden, die mit dem gewünschten Protein assoziiert sind. Parallel werden als Negativkontrolle Immunpräzipitationen mit Kontroll-Antikörpern des gleichen Isotyps durchgeführt, wodurch das Basisniveau unspezifisch kopräzipitierter DNA ermittelt werden kann. Die Analyse der präzipitierten Pre-RC-Bindestellen beruht auf der Tatsache, dass die DNA der Bindungsstelle – nach Chromatin-Immunpräzipitation – angereichert vorliegt. Ist ein Bindungsort – wie der virale Replikationsursprung *oriP* – bereits bekannt, kann durch Wahl spezifischer *oriP*-Primer die Anreicherung durch eine quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) überprüft werden. Als Referenz dient eine Region auf dem Genom, die nicht von dem analysierten Protein gebunden wird. Hierfür wird im EBV-Genom die virale Region *oriLyt* verwendet.

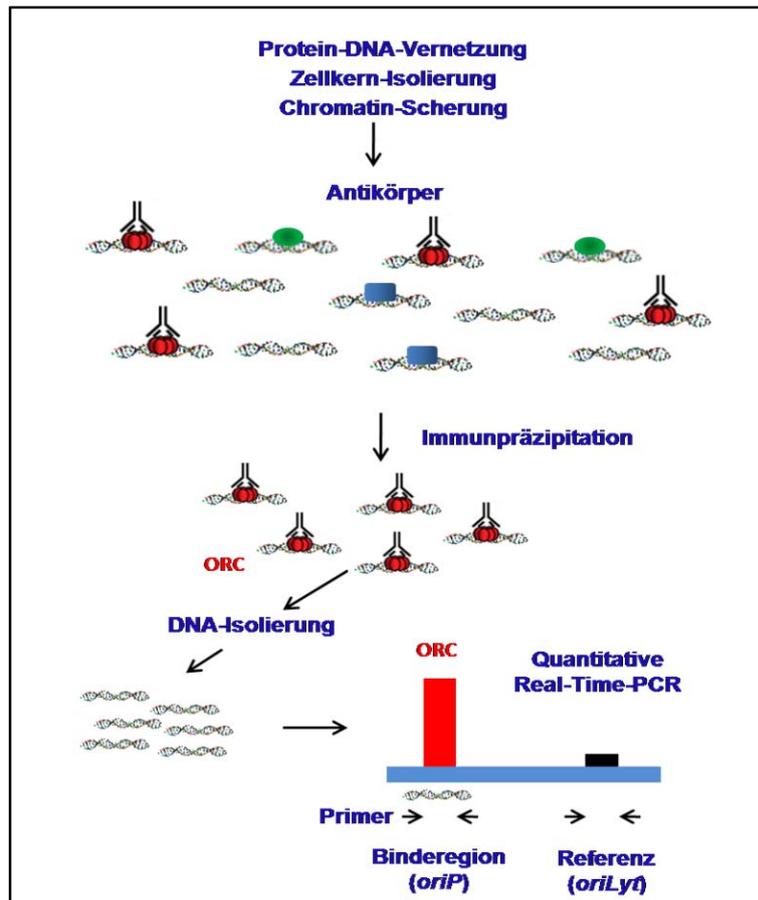


Abb.4.1: Schematische Darstellung einer Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

DNA und Proteine werden mit Formaldehyd quervernetzt. Anschließend werden Zellkerne aus den Zellen präpariert und das Chromatin fragmentiert (Ultraschall / MNase-Behandlung). Durch spezifische Antikörper können mittels Immunpräzipitation entsprechende DNA-Fragmente isoliert werden, an die das immunpräzipitierte Protein gebunden hat. Anschließend wird die Protein-DNA-Quervernetzung durch Hitze revertiert, die Proteine durch Proteinase-K abgebaut und die isolierte DNA aufgereinigt. Die Menge der isolierten Protein-Binderegionen kann mittels Real-Time-PCR an einer bekannten Bindungsregion (z.B. *oriP*) quantitativ erfasst werden. Als Referenz für die Anreicherung eines Proteins dient eine DNA-Region, die von dem entsprechenden Protein nicht gebunden wird (z.B. *oriLyt*).

Die ChIP-Chip-Technik:

ChIP-Chip kombiniert die ChIP-Methode mit der DNA-Mikroarray Technologie (Chip) und ermöglicht es, Protein-Bindestellen in großen Genomabschnitten oder sogar kompletten Genomen zu identifizieren (Abb.4.2). Die für die Analysen gewählten Genomregionen sind als einzelne DNA-Fragmente auf einem Objektträger angebracht. Zunächst werden in dieser Arbeit mittels Chromatin-Immunpräzipitation spezifische DNA-Binderegionen für Pre-RC-Komponenten angereichert. Parallel dazu wird genomische DNA (Input-DNA) als Referenz isoliert. Beide Proben werden

amplifiziert und mit einem Farbstoff markiert. Die markierten Proben werden zu gleichen Teilen gemischt und auf einen DNA-Chip hybridisiert. Mit einem Laser können die Farbintensitäten der einzelnen Genompositionen auf dem Chip ausgelesen werden. Durch Aufrechnung der einzelnen Signale lassen sich somit komplexe DNA-Bindungsprofile für Pre-Replikationskomplexe erstellen.

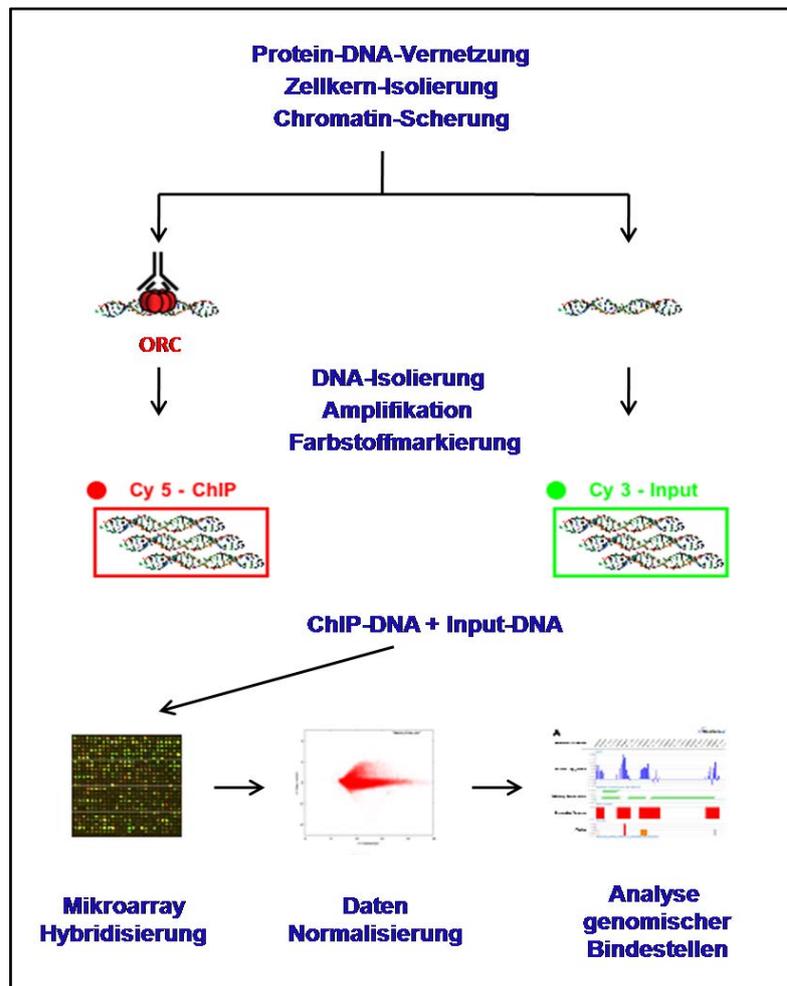


Abb.4.2: Schematische Darstellung einer ChIP-Chip-Analyse

Die Isolierung von proteingebundener DNA erfolgt gemäß dem ChIP-Protokoll. Parallel wird genomische DNA isoliert (Input-DNA). Danach muss die Menge sowohl der spezifisch angereicherten DNA als auch der Input-DNA durch PCR-Amplifikation erhöht werden. Anschließend werden definierte Mengen der angereicherten DNA und der Input-DNA mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert und auf einen Mikroarray hybridisiert. Jede einzelne Position des Mikroarrays entspricht einer genomischen Position. Nach DNA-Hybridisierung gibt die Relation der beiden Farbstoffintensitäten zueinander an, in welchem Verhältnis angereicherte DNA zu Input-DNA steht. Jede Position, die eine spezifische Anreicherung auf dem Mikroarray aufweist, entspricht einer Protein-Bindestelle auf dem Genom.

4.1.2 Etablierung spezifischer Chromatin-Immunpräzipitationen für Pre-RC-Proteine in Raji-Zellen

In den vorgestellten Experimenten in diesem Abschnitt werden einzelne Arbeitsschritte beschrieben, die für die Etablierung von ChIP-Chip-Analysen durchgeführt wurden. Für die Etablierung spezifischer Chromatin-Immunpräzipitationen für Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 wurden Raji-Zellen verwendet. Raji-Zellen sind eine Burkitt-Lymphom-Zelllinie (LCLs), die latent mit EBV infiziert sind. EBV nutzt im latenten Zustand die Replikationsmaschinerie der Wirtszelle. Diese Zelllinie bietet somit die Möglichkeit, die Lokalisation von Pre-RCs sowohl auf dem Human- als auch dem EBV-Genom zu analysieren. Zudem ist das Binden von Replikationsproteinen an den viralen Replikationsursprung *oriP* in EBV besser untersucht als auf zellulären Origins. Durch die geringere Größe und Komplexität des EBV-Genoms – im Vergleich zum Human-Genom – stellt dieses virale System eine geeignete Plattform dar, Genom-weite ChIP-Chip-Analysen zu etablieren. Um die optimalen Bedingungen für ChIP-Chip-Experimente zu erhalten, wurden folgende Parameter getestet und optimiert:

- Präparation von G₁-Phase synchronisierten Zellen
- Chromatin-Präparation
- Bedingungen für Immunpräzipitationen (IP)
- Effizienz der IPs und Amplifikation der präzipitierten DNA
- Vergleich von verschiedenen DNA-Array-Plattformen

Präparation von G₁-Phase Raji-Zellen

Die Ausbildung von Pre-Replikationskomplexen findet in der G₁-Phase des Zellzyklus statt. Um Bindestellen des Pre-RCs effizient identifizieren zu können, mussten Zellen in der G₁-Phase angereichert werden. Raji-Zellen besitzen den Vorteil, dass man sie ohne chemische Manipulation durch Zentrifugal-Elutriation in der G₁-Phase anreichern kann. Diese Zelllinien weisen nach der Zellteilung ein sehr konstantes Zellwachstum auf. Diese Eigenschaften wurden genutzt, um logarithmisch wachsende Raji-Zellen mittels Zentrifugal-Elutriation (Abb.4.3 A) entsprechend ihrer Größe zu trennen. Direkt nach der Mitose sind die Zellen klein. Mit fortschreitendem

Zellzyklus nimmt jede Zelle an Größe zu. Raji-Zellen werden in einer Zylinderkammer durch Zentrifugieren sedimentiert. Durch das Anlegen einer Gegenkraft (Gegenfluss) gegen die Zentrifugalkraft werden die Zellen gemäß ihrer Größe aus der Kammer gedrückt (Elutriation). Kleine Zellen (frühe Zellzyklusphasen) eluieren bei niedrigem Gegenfluss, große Zellen (späte Zellzyklusphasen) eluieren bei hohem Gegenfluss. Bei jeder Elutriation wurden die Zellfraktionen der Gegenflussraten 40, 45, 50, 65, 80, 100 ml/min verwendet. Die gewonnenen Zell-Fraktionen entsprechen somit diskreten Phasen des Zellzyklus.

Die einzelnen Zell-Fraktionen werden durch Propidium-Iodid Markierung mittels FACS (Abb.4.3 B, C) auf den DNA-Gehalt und per Western-Blot auf die Expression Zellzyklus-abhängiger Zykline untersucht (Abb.4.3 D). Die FACS-Analysen (exemplarisch in Abb.4.3 C) zeigen eine deutliche Auftrennung der einzelnen Zellzyklusphasen G_1 (40 ml/min), S (65 ml/min) und G_2 (100 ml/min). Zudem entstehen Mischfraktionen aus G_1 mit S (45, 50 ml/min) und S mit G_2 (80 ml/min). Weiterhin wurde die Expression der Zykline A und B1 überprüft. Zyklin A und B1 werden spezifisch in der S- und G_2 -Phase des Zellzyklus exprimiert und können nicht in der G_1 -Phase (Fraktion: 40 ml/min) nachgewiesen werden (Abb.4.3 D).

Für die Analyse der Positionen von Pre-RCs auf dem EBV- und Human-Genom wurde nur die G_1 -Phase Zell-Fraktion verwendet. Bei Zellzyklusanalysen einzelner Pre-RC-Komponenten (Kapitel 4.4.1) und Histon-Modifikationen an *oriP* (Kapitel 4.4.3) wurden alle Fraktionen verwendet.

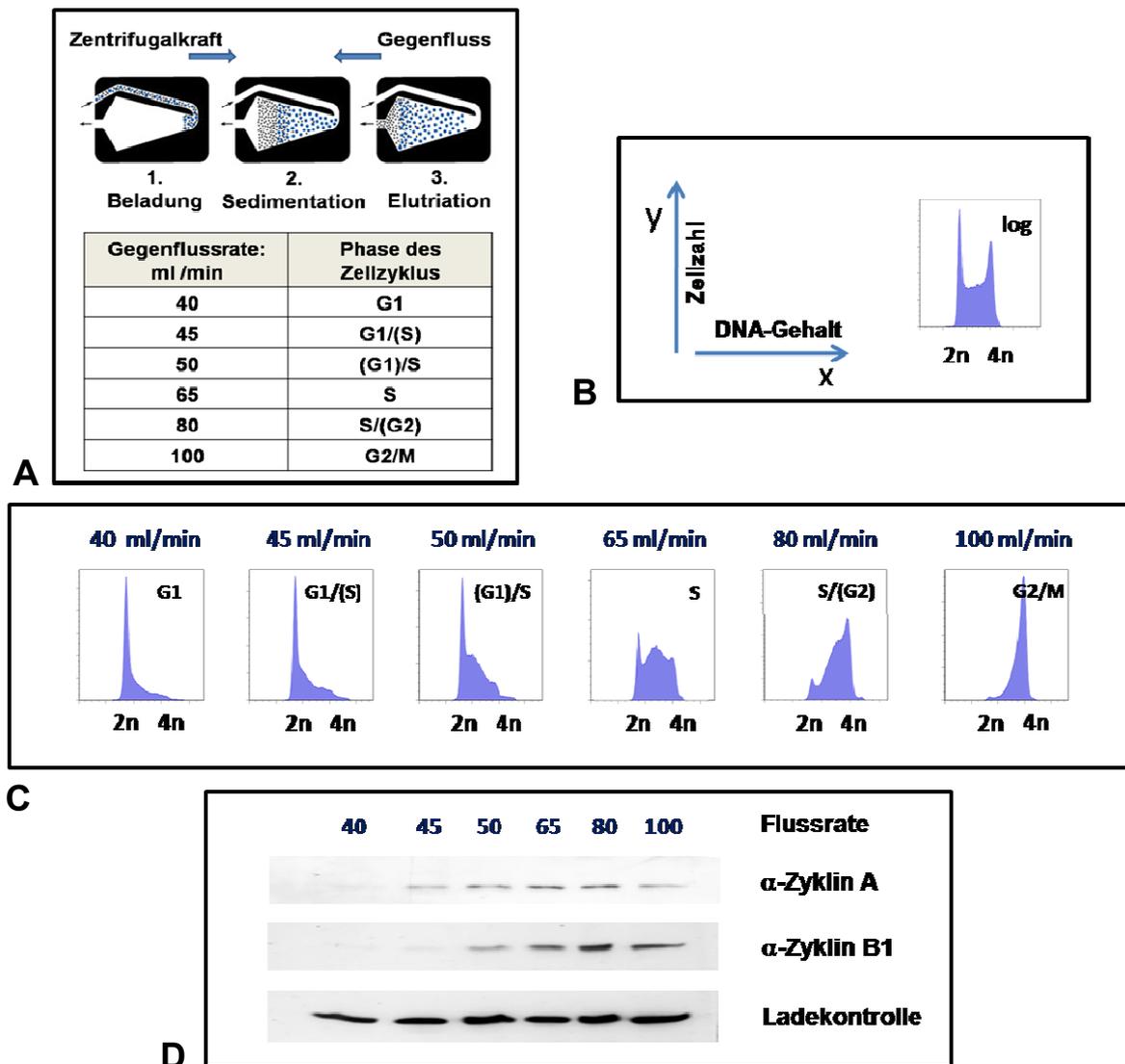


Abb. 4.3: Zellzyklus-Synchronisation von Raji-Zellen durch Zentrifugal-Elutriation

(A) Zentrifugal-Elutriation: Raji-Zellen werden in einer Zylinderkammer durch Zentrifugation sedimentiert. Durch das Anlegen eines Gegenfluss gegen die Zentrifugalkraft werden die Zellen gemäß ihrer Größe aus der Kammer gedrückt. Kleine Zellen entsprechen frühen Zellzyklusphasen bei niedrigem Gegenfluss, große Zellen entsprechen späten Zellzyklusphasen bei hohem Gegenfluss. Bei jeder Elutriation werden die Zellfraktionen der Gegenflussraten 40, 45, 50, 65, 80, 100 ml/min verwendet.

(B) FACS: 5×10^6 logarithmisch wachsende Raji-Zellen wurden mit Propidiumjodid gefärbt und der DNA-Gehalt durch FACS-Analyse bestimmt. Logarithmisch wachsende Zellen enthalten einen normalen Chromosomensatz ($2n$) vor der S-Phase und einen doppelten nach DNA-Replikation ($4n$). Die y-Achse zeigt die Anzahl der analysierten Zellen, die x-Achse den DNA-Gehalt.

(C) FACS-Analyse der elutrierten Zell-Fraktionen: Die FACS-Analyse zeigt die diskrete Auftrennung der einzelnen Zellzyklusphasen.

(D) Zyklin-Western-Blot Analyse der elutrierten Zell-Fraktionen: In jeder Spur wurden $5 \mu\text{g}$ Kernextrakt geladen. Der Nachweis von Zyklin A erfolgte mit einem Zyklin A spezifischen, der Nachweis von Zyklin B1 mit einem Zyklin B1 spezifischen Antikörper.

Ladekontrolle: Unspezifische Nebenbande des α -Zyklin A Antikörpers.

Präparation von Raji-Chromatin

Nachdem erfolgreich G₁-Phase Raji-Zell-Fractionen angereichert wurden, zeigt das nächste Experiment die Präparation von G₁-Phase Raji-Zell Chromatin. Ziel war es – im Hinblick auf DNA-Mikroarray-Analysen – Chromatinfragmente zu generieren, die für effiziente Mikroarray-Experimente geeignet waren. Zu große DNA-Fragmente führen zu einer unscharfen Signalverteilung.

Es stellte sich heraus, dass bei Raji-Zellen die Fragmentierung der DNA mittels Ultraschall gemäß der im Labor verwendeten Standardbedingungen nicht effizient genug erfolgte. Die DNA-Fragmente mit Größen zwischen 1500bp und 10000bp (Abb.4.4 Spur: Sonifiz.) waren zu lang und daher für effiziente Mikroarray-Hybridisierungen ungeeignet. Höhere Leistung sowie längere Ultraschall-Scherung hatten bei nachfolgenden Experimenten eine deutlich geringere Effizienz der Immunpräzipitation zur Folge (Daten nicht gezeigt). Daher wurde das Chromatin zusätzlich mit dem Enzym Mikrokokken-Nuklease (MNase) behandelt (Fig.4.4 Spuren: MNase-Behandlung in Minuten).

Eine Inkubation von 10min (MNase: 100Units/ml) war ausreichend, um DNA-Fragmente mit einer Größe von 100bp – 1000bp zu erhalten. (Abb.4.4 Spur 10min). Diese Fragmentgrößen waren für sensitive Mikroarray-Analysen geeignet.

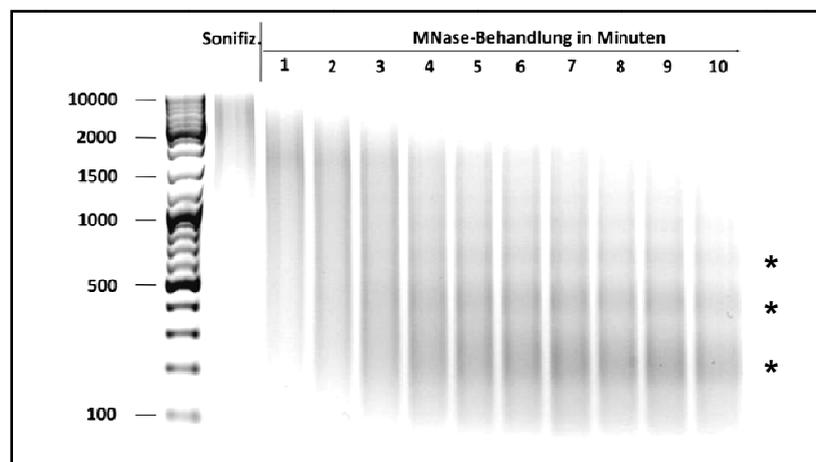


Abb.4.4: Fragmentierung von Raji-Chromatin

Spur Sonifiz.: Formaldehyd fixiertes Chromatin aus isolierten Raji-Zellkernen wurde durch Ultraschall geschert. 8x30 sek (1 sek an / 1 sek aus), bei 4 °C und 35% Leistung.

Spuren 1min-10min: Sonifiziertes Chromatin mit MNase-Behandlung (100Units MNase/1mg Chromatin). Es sind je Spur 1µg Chromatin auf ein 1,4% TBE Agarose-Gel aufgetragen.

(*) Durch MNase-Behandlung generiertes Nukleosomen-Fragmentmuster.

Etablierung spezifischer Immunpräzipitationen für Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1

Um bei DNA-Mikroarray-Analysen spezifische Protein-DNA-Bindungsprofile zu erhalten, müssen die gesuchten Protein-DNA-Verbindungen mittels ChIP angereichert werden. Entscheidend für eine gute Anreicherung ist die Effizienz und die Spezifität der verwendeten Antikörper. Im Folgenden sollte für die Antikörper α -Orc2, α -Mcm3, α -Mcm7 und α -Cdt1 ein ChIP-Protokoll etabliert werden, das die entsprechenden Protein-DNA-Verbindungen spezifisch und in ausreichender Menge präzipitiert.

Um die Spezifität und Effizienz der Antikörper zu optimieren, wurden zunächst Protein-Präzipitationen unter verschiedenen ChIP-Protokollbedingungen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurden die Parameter 1 -3 individuell für jeden Antikörper bestimmt.

- 1) Menge des Antikörpers; (siehe Material und Methoden Tabelle 2.2).
- 2) Stringenz der Immunpräzipitation (Konzentration der Detergenzien NP40, Triton-X100, Sarkosyl und Deoxycholat während der IP; (siehe Material und Methoden Kapitel 3.4.8).
- 3) Stringenz der Waschbedingungen (Waschvolumen und Zusammensetzung der Puffer RIPA, LiCl und TE; siehe Material und Methoden Kapitel 3.4.8).

Die etablierten ChIP-Parameter zeigten in Western-Blot-Analysen eine effiziente Protein-Präzipitation. Die immunpräzipitierten Proteine sind auf der entsprechenden Laufhöhe mit Pfeilen markiert (Abb.4.5 Spur IP Orc2*, Mcm3*, Mcm7*, Cdt1*). Um unspezifische Präzipitationen durch überschüssige Antikörper zu minimieren, wurden die IP-Bedingungen so gewählt, dass das gewünschte Protein nicht quantitativ präzipitiert wurde. Nicht präzipitiertes Mcm3* und Mcm7* ist in den jeweiligen Überstand-Fractionen noch deutlich detektierbar (Abb.4.5 B, C; Spur Üs Mcm3* und Üs Mcm7*). Bei Orc2 und Cdt1 wird das nicht präzipitierte Protein durch unspezifische Signale, die vom Antikörperserum herrühren, überlagert (zw. 60 kDa – 70 kDa) (Abb.4.5 A; Spur Orc2*-Üs und Abb.4.5 D; Spur Cdt1*-Üs). Die Effizienz der Präzipitation ist auch durch einen Vergleich mit der ursprünglich in die IP eingesetzten Proteinmenge ersichtlich (Abb.4.5 A, B, C, D; je Spur Input).

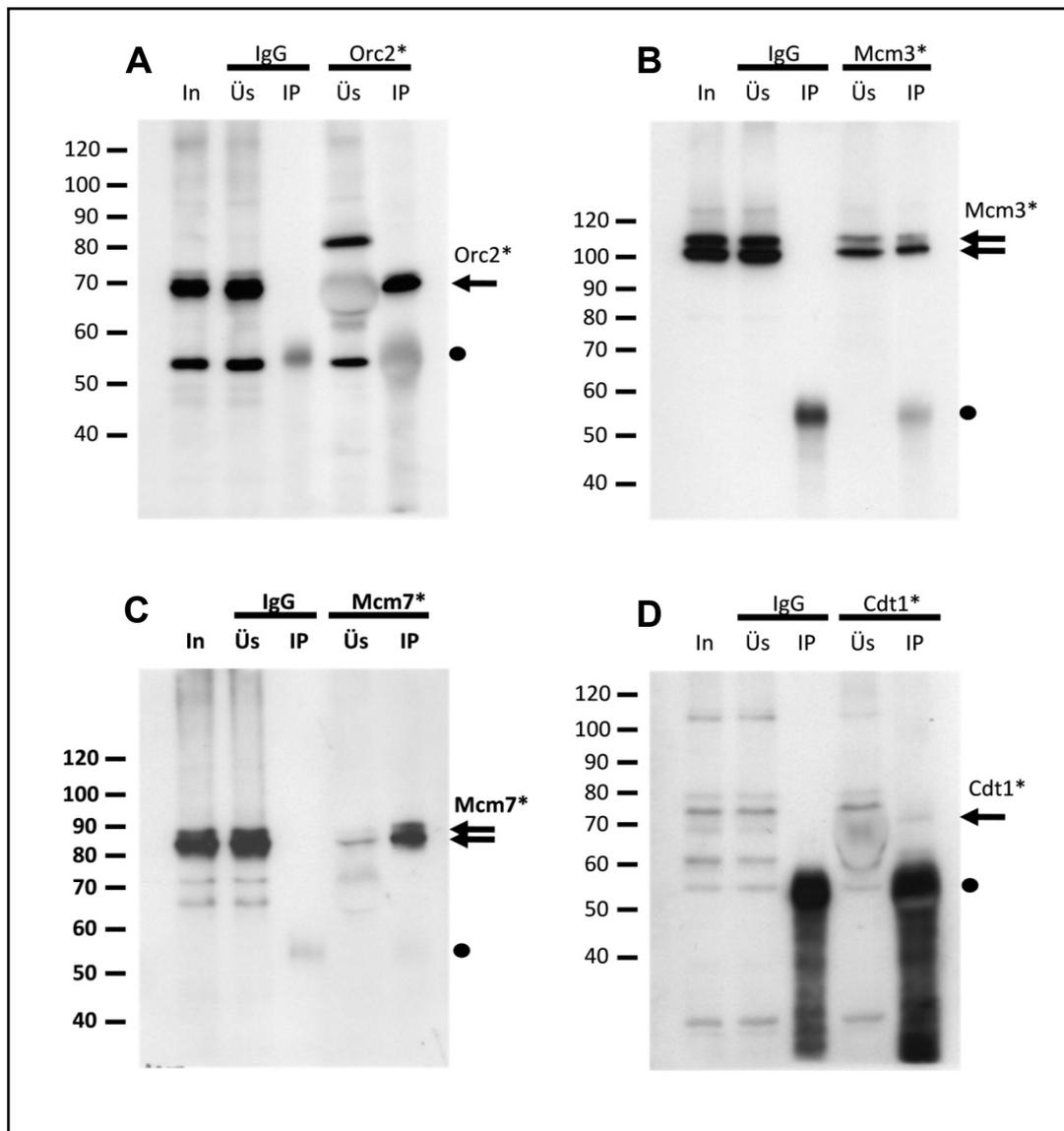


Abb.4.5: Immunpräzipitation der Pre-RC Komponenten Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1

Die IP findet für jeden Antikörper unter den eigens etablierten ChIP-Bedingungen statt. Für jede IP wurden 500µg Raji-Chromatin (Formaldehyd fixiert, sonifiziert und MNase behandelt) eingesetzt. Die FA-Vernetzung wurde nach der IP für 45 min bei 65C° in 1x Lämmli-Puffer revertiert. Auf 10% PAA-Gele sind jeweils Input (In), Überstand unspezifische IgG Kontrolle (Üs-IgG), Immunpräzipitation unspezifische IgG Kontrolle (IP-IgG), Überstand spezifische IP (Üs) und Immunpräzipitation spezifische IP (IP*) aufgetragen. Geladen wurde immer 1/50 der Gesamt-IP-Menge. Die mit Pfeilen markierten Banden entsprechen den immunpräzipitierten Proteinen. Die mit einem Punkt (●) markierten Banden bei ca. 55 kDa entsprechen den schweren Ketten der verwendeten Antikörper. Auf der Höhe von 70 kDa sind jeweils in der Spur des Überstandes der spezifischen IP-Verunreinigungen durch die Antikörperseren zu erkennen.

- (A) IP Orc2* (68 kDa)
- (B) IP Mcm3*: (100 kDa)
- (C) IP Mcm7*: (85 kDa)
- (D) IP Cdt1*: (70 kDa)

Die Negativkontrolle mit unspezifischem Kaninchen-IgG zeigt keine Präzipitation (Abb.4.5 A, B, C, D; Spur IgG-IP). Die Proteinbande in den IP-Spuren bei ca. 54 kDa zeigt die reduzierte schwere Kette des jeweilig eingesetzten Antikörpers und ist in Abb.4.5 A, B, C, und D mit einem Punkt (●) markiert. Weitere unspezifische Banden, vor allem in den Spuren Input, Überstand IgG und Überstand Orc2*/Mcm3*/Mcm7*/Cdt1* entstammen Kreuzreaktionen von Antikörperseren oder nicht revertierten Protein-DNA Formaldehyd-Vernetzungen, die sich nicht gemäß ihres Molekulargewichtes in dem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt haben.

Es bleibt festzuhalten, dass die Antikörper α -Orc2, α -Mcm3, α -Mcm7 und α -Cdt1 unter den etablierten ChIP-Bedingungen spezifisch immunpräzipitieren. Sie erkennen trotz Formaldehyd-Vernetzung und stringenter IP- und Waschparameter mit hoher Affinität ihre Zielproteine.

Isolierung spezifischer Pre-RC-DNA für ChIP-Chip-Experimente

Nachdem die Pre-RC-Antikörper α -Orc2, α -Mcm3, α -Mcm7 und α -Cdt1 unter ChIP-Bedingungen erfolgreich getestet waren, war es nun Ziel, Pre-RC gebundene DNA (DNA von potentiellen Replikationsursprüngen) spezifisch durch Chromatin-Immunpräzipitation anzureichern und in einem Zwischenschritt zu amplifizieren, so dass diese auch für ChIP-Chip-Experimente verwendet werden konnte.

Die Spezifität der Antikörper gegen Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 wurde zunächst in ChIP-Analysen bestätigt. Verglichen wurde die relative DNA-Anreicherung an einem bekannten EBV-Replikationsursprung mit Pre-RC-Bindung (*oriP*) gegenüber einer EBV-Referenzposition ohne Pre-RC-Bindung (*oriLyt*). In Abb.4.6 sind bereits die relativen Anreicherungen der biologischen Replikate dargestellt, die für die ChIP-Chip-Analysen (Abschnitt 4.2) verwendet wurden. Die DNA-Proben in Abb.4.6 Spalte 1 (A:Orc2, D:Mcm3; G:Mcm7; J:Cdt1) zeigen signifikante DNA-Anreicherungen an dem viralen Replikationsursprung *oriP* gegenüber der Referenzposition *oriLyt*. Der Anreicherungsfaktor entspricht dem Verhältnis *oriP/oriLyt* und ist in der Übersicht in Spalte 3 wiedergegeben (Anreicherungsfaktor vor Amplifikation).

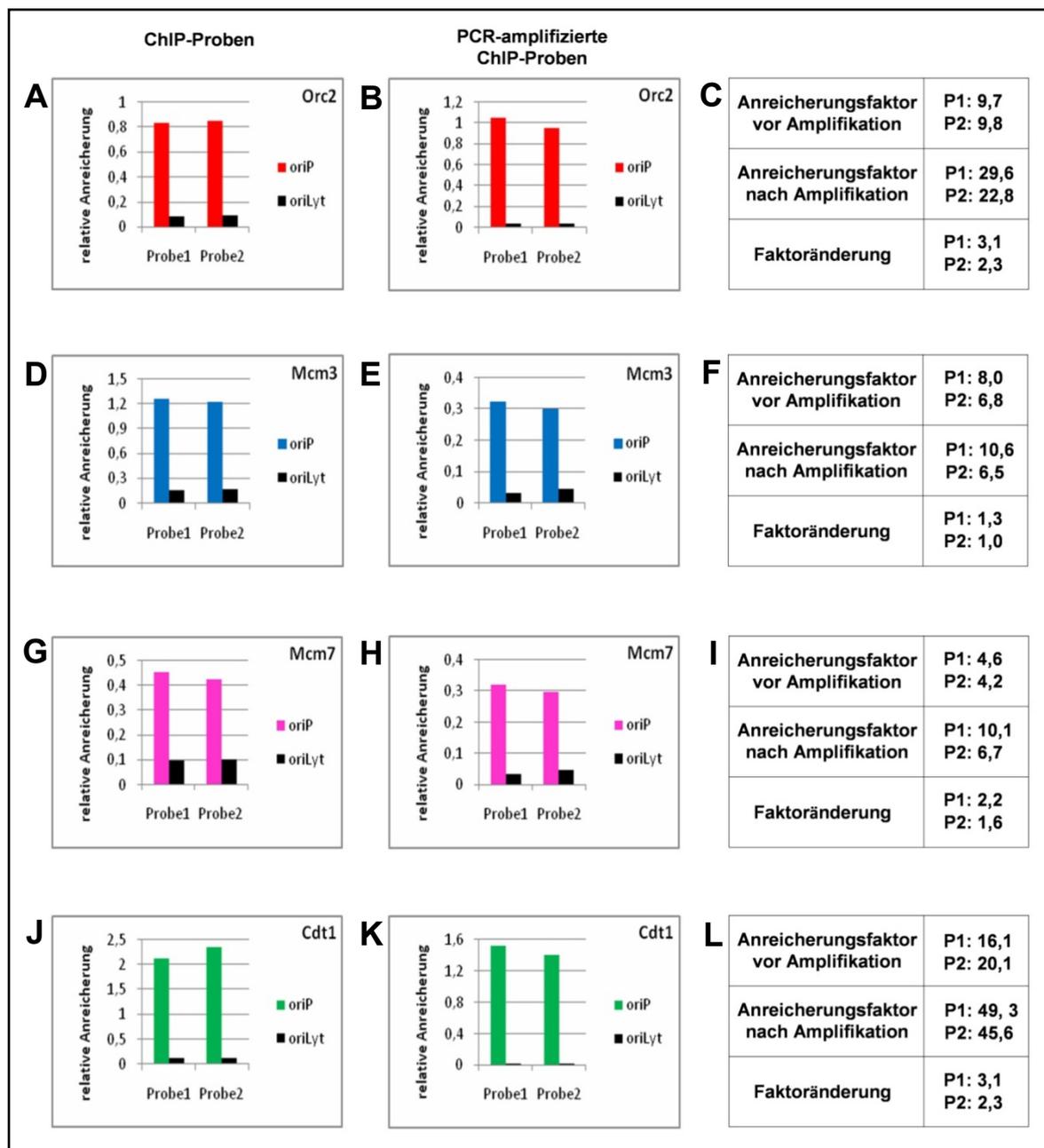


Abb.4.6: Relative DNA-Anreicherung nach Immunpräzipitation der Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 an *oriP* und *oriLyt* vor und nach PCR-Amplifikation

Quantitative Real-Time-PCR-Analyse vor PCR-Amplifikation: A, D, G, J: relative DNA-Anreicherung an *oriP* und *oriLyt* nach Immunpräzipitation der Proteine Orc2 (A), Mcm3 (D), Mcm7 (G) und Cdt1 (J). Biologische Replikate (je Probe 1 und 2) aus G₁-Phase spezifischem Raji-Chromatin (Elutriationsfraktion: 40 ml/min).

Quantitative Real-Time-PCR-Analyse nach PCR-Amplifikation: B, E, H, K: relative DNA-Anreicherung der Proben 1 und 2 an *oriP* und *oriLyt*. Real-Time-PCR Analyse nach Amplifikation der Proben Orc2 (B), Mcm3 (E), Mcm7 (H) und Cdt1 (K) (Aliquots der Proben 1 und 2 wurden nach Amplifikation für quantitative Real-Time-PCR 1/50 verdünnt).

Übersicht: I, J, K, L: Anreicherungs-faktoren der Proben 1 (P1) und 2 (P2) vor PCR-Amplifikation (je Zeile 1), nach PCR-Amplifikation (Zeile 2). Faktoränderung (Zeile 3) wurde aus dem Verhältnis von Anreicherungs-faktor nach/vor Amplifikation berechnet.

Die Ausbeute isolierter DNA ist bei ChIP-Experimenten zu gering, um diese direkt auf DNA-Mikroarrays zu hybridisieren. Um die erforderlichen DNA-Mengen zu erhalten, musste die immunpräzipitierte DNA in einem Zwischenschritt vermehrt werden. Dies erfolgte mittels PCR-Amplifikation. Die relative Anreicherung von *oriP* zu *oriLyt* wurde danach erneut durch qRT-PCR ermittelt und ist in Abb.4.6 Spalte 2 dargestellt (B: Orc2; E: Mcm3; H: Mcm7; K: Cdt1). Hierbei wurde geprüft, ob die PCR-Amplifikation zu einer Änderung im Verhältnis von spezifisch angereicherter DNA zu unspezifisch kopräzipitierter DNA führte. Dazu wurde wieder das Anreicherungsverhältnis *oriP/oriLyt* bestimmt (Abb.4.6 Spalte 3; Anreicherungsfaktor nach Amplifikation). Aus der berechneten Faktoränderung (nach/vor Amplifikation) lässt sich der Einfluss der PCR-Amplifikation ermitteln. Idealerweise sollte die Faktoränderung bei eins liegen. Eine Faktoränderung kleiner eins würde bedeuten, dass unspezifische kopräzipitierte DNA in der PCR stärker vermehrt wurde, als die DNA für die Pre-RC-Bindestellen. Faktisch wurde der *oriP*-Lokus durch den PCR-Schritt bis zu 3-fach angereichert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass für die Pre-RC-Komponenten Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 mittels Chromatin-Immünpräzipitation erfolgreich DNA-Bindestellen isoliert wurden. Die DNA-Anreicherungen wurden an dem bekannten EBV-Replikationsursprung *oriP* bestätigt. Zudem wurde genügend DNA präzipitiert, um diese erfolgreich zu amplifizieren, wobei die spezifische Anreicherung für Pre-RC-Bindestellen erhalten blieb. Die DNA-Proben konnten somit auch für ChIP-Chip-Analysen verwendet werden.

4.2 Genom-weite Analyse von Pre-RC-Bindestellen auf dem EBV-Genom

Neben dem gut charakterisierten latenten Replikationsursprung *oriP* sind auf dem EBV-Genom (Abb.4.7) weitere Regionen beschrieben, die aktive Replikationsinitiation aufweisen (Norio und Schildkraut, 2004). Dieser Nachweis beruht auf Fluoreszenzanalysen, die den Einbau von Nukleotiden während der DNA-Replikation an multiplen Stellen auf dem EBV-Genom sichtbar machen. Die exakten Positionen dieser Initiationsereignisse sind bisher noch nicht identifiziert.

Nach der erfolgreichen Etablierung spezifischer Chromatin-Immunpräzipitationen für die Pre-RC-Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 (Abschnitt 4.1; Abb.4.6) sollten anschließend Genom-weit Replikationsursprünge in EBV (Abb.4.7) identifiziert werden. Dafür wurden die DNA-Proben der Abb.4.6, die eine hoch spezifische DNA-Anreicherung für den Replikationsursprung *oriP* aufweisen, auf EBV-DNA-Mikroarrays hybridisiert. Zudem sollten Genom-weit Positionen des viralen Proteins EBNA1 ermittelt werden. EBNA1 kann ORC binden und könnte somit als virales Helferprotein an weiteren Bindepositionen auf dem EBV-Genom Replikationskompetenz vermitteln.

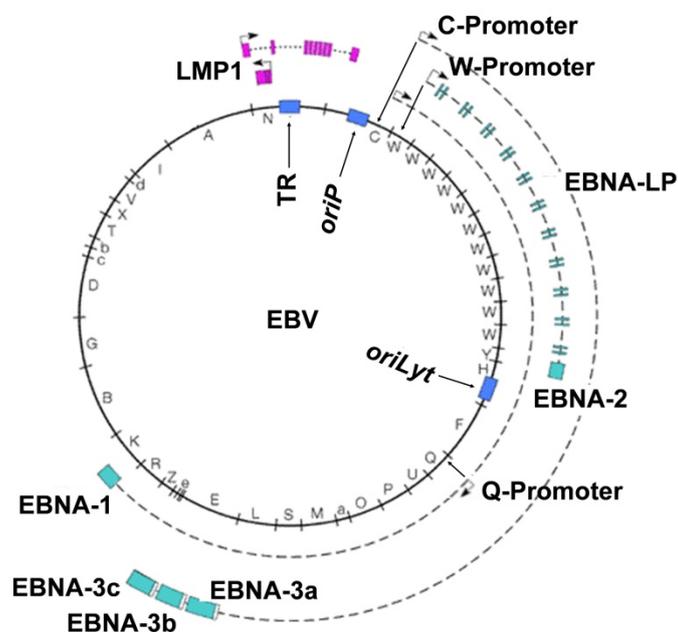


Abb.4.7: Das EBV-Genom

Das EBV-Genom umfasst 172281bp. In Abhängigkeit vom Latenztyp von EBV können in B-Lymphozyten die Proteine EBNA1 (Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen1), EBNA2, EBNA3A, EBNA3C, EBNA-LP (EBNA-Leader-Protein) und das latente Membranprotein LMP1 exprimiert werden. Über die Promotoren Cp, Wp und Qp (Pfeile) wird die Transkription von RNA-Vorläufern (gestrichelte Linien) kontrolliert. Lineare EBV-Genome zirkularisieren im latenten Zustand an den Genomenden über sich wiederholende Sequenzabschnitte (TR: Terminal Repeats). *oriP* ist ein bekannter Replikationsursprung für die latente episodale Genomduplikation. Über *oriLyt* erfolgt die Genomvermehrung der lytischen Phase.

4.2.1 EBV-DNA-Mikroarray-Systeme für Pre-RC-Bindungsstudien

Für die EBV-ChIP-Chip-Analysen standen zwei DNA-Mikroarray Systeme zur Verfügung. Zum Einen wurde ein – auf PCR-Fragmenten basierender – DNA-Mikroarray verwendet (Abb.4.8 A), auf dem das EBV-Genom in 256 Fragmenten (vier Replikate: 4x256) mit je 500-700bp Länge repräsentiert ist (**EBV-PCR-Mikroarray**: in Kooperation mit Wolfgang Hammerschmidt; Helmholtz Zentrum München). Die Sensitivität ist aufgrund der großen Fragmente für jedes Einzelsignal sehr hoch, die Genom-weite Auflösung dagegen gering. Zudem wurde ein EBV-Mikroarray genutzt, der aus synthetisierten Oligonukleotiden besteht (**EBV-Oligonukleotid-Mikroarray**: in Kooperation mit Adam Grundhoff; Heinrich Pette Institut Hamburg). Dieser enthält 3500 Oligonukleotid-Fragmente (vier Replikate: 4x3500) mit Längen von 60 Nukleotiden (Abb.4.8 B). Mit diesem System können Signale Genom-weit detaillierter wiedergegeben werden als auf dem EBV-PCR-Mikroarray.

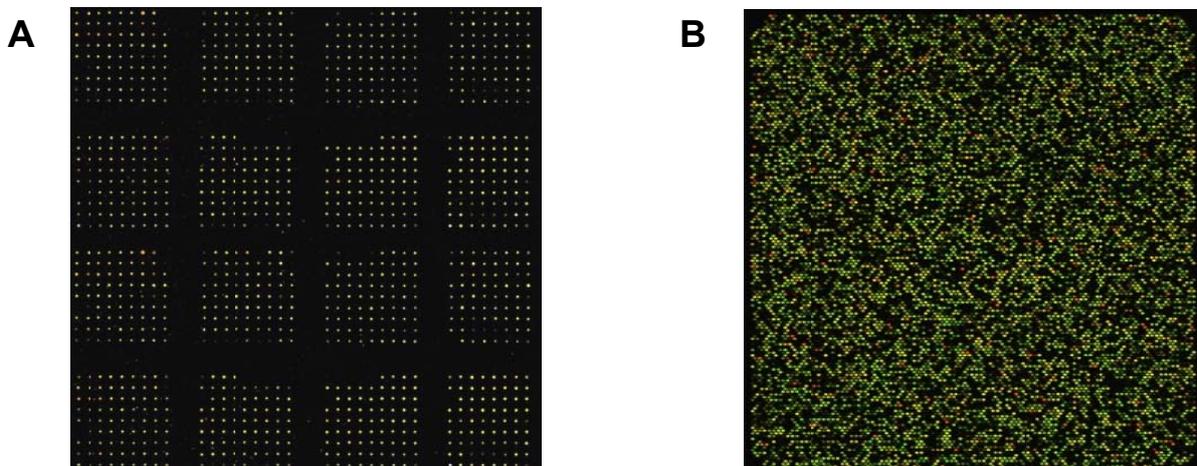


Abb.4.8: EBV-DNA-Mikroarray-Systeme

- (A) EBV-PCR-Mikroarray
- (B) EBV-Oligonukleotid-Mikroarray

4.2.2 Analysen von Pre-RC-Bindestellen auf dem EBV-PCR-Mikroarray

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Hybridisierungen auf dem EBV-PCR-Mikroarray beschrieben. Tabelle 4.1 zeigt zur Übersicht die durchgeführten Experimente. Danach wird auf Normalisierungsmethoden eingegangen, die durchgeführt werden mussten, damit die einzelnen Signale ausgewertet werden konnten. Im letzten Teil dieses Abschnitts werden die normalisierten ChIP-Chip-Signale gezeigt und erörtert.

Zellsystem	Hybridisierung	EBV-PCR-Mikroarray
Raji (G ₁)	IgG	✓ ✓
Raji (G ₁)	Orc2	✓ ✓
Raji (G ₁)	Mcm3	✓ ✓
Raji (G ₁)	Mcm7	✓ ✓
Raji (G ₁)	Cdt1	✓ ✓
Raji (G ₁)	EBNA1	✓ ✓

Tabelle 4.1: Übersicht der Hybridisierungen für den EBV-PCR-Mikroarray

(✓ ✓) = biologische Replikate;

Für alle EBV ChIP-Chip-Analysen wurde G₁-Phase-Chromatin aus Raji-Zellen verwendet (Raji G₁).

Datennormalisierung

Um ChIP-Chip-Signale effizient auswerten zu können, müssen die Rohdaten zunächst normalisiert werden. Hierbei werden unspezifische Hintergrundsignale minimiert und technische Varianzen ausgeglichen. Diese Normalisierung ist im Folgenden exemplarisch für Orc2 dargestellt.

Wenn in ChIP-Chip-Experimenten – wie am Beispiel von Orc2 (siehe Tabelle 4.1) - biologische Replikate erstellt wurden, wurden die Signale der beiden Einzelexperimente zunächst miteinander verglichen (Abb.4.9). Der direkte Vergleich der beiden unabhängigen Orc2-Experimente zeigt eine große Übereinstimmung der Fluoreszenzintensitäten sowie der Positionen, an denen signifikante Orc2 Anreicherung vorliegt (siehe * in Abb.4.9). Dieses Ergebnis spricht für reproduzierbare Versuchsbedingungen sowohl auf biologischer als auch auf

technischer Ebene. Für weitere Analysen wurde aus beiden Proben der Mittelwert berechnet. Zum Vergleich der Einzelsignale Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 siehe Anhang Abb.9.1.

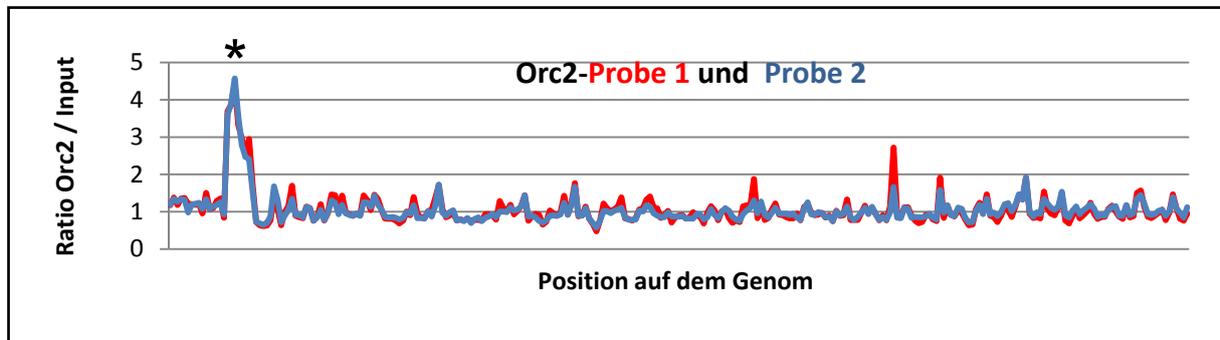


Abb.4.9: Signalüberlagerung für Orc2-Probe 1 und Probe 2 auf dem EBV-PCR-Array

Die Signalintensitäten für Orc2-Probe 1 (rot) und Probe 2 (blau) sind überlagert dargestellt. Das Verhältnis der Intensitäten (Ratio Orc2/Input) wird als numerischer Wert in der y-Achse angegeben. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom bestehend aus 256 Einzelsignalpunkten. Eine signifikante Orc2-Anreicherung ist mit einem Stern markiert (*).

Die mittels ChIP-Experimenten isolierte DNA enthält auch unspezifisch kopräzipitierte DNA. Dies ist auf unspezifische Bindung der DNA an den verwendeten Antikörper sowie an die Sepharose-Matrix zurückzuführen. In ChIP-Chip-Experimenten kann dieses Hintergrundsignal das gesuchte Signal maskieren und muss bei der Auswertung berücksichtigt werden. Daher wird bei allen Experimenten parallel auch unspezifisch-bindende DNA mit IgG Antikörpern (gleicher Antikörper-Subtyp wie für die spezifische ChIP-Probe) isoliert und parallel hybridisiert. Dieses Signal entspricht dem unspezifischen Hintergrund und wird vom Signal einer spezifischen ChIP-Chip-Hybridisierung abgezogen. Die Bildung der Mittelwerte und die Normalisierung gegen IgG sind exemplarisch für Orc2 in Abb.4.10 dargestellt. Alle weiteren Hybridisierungssignale, die in dieser Arbeit dargestellt sind, wurden gegen das Hintergrundsignal (IgG) aufgerechnet.

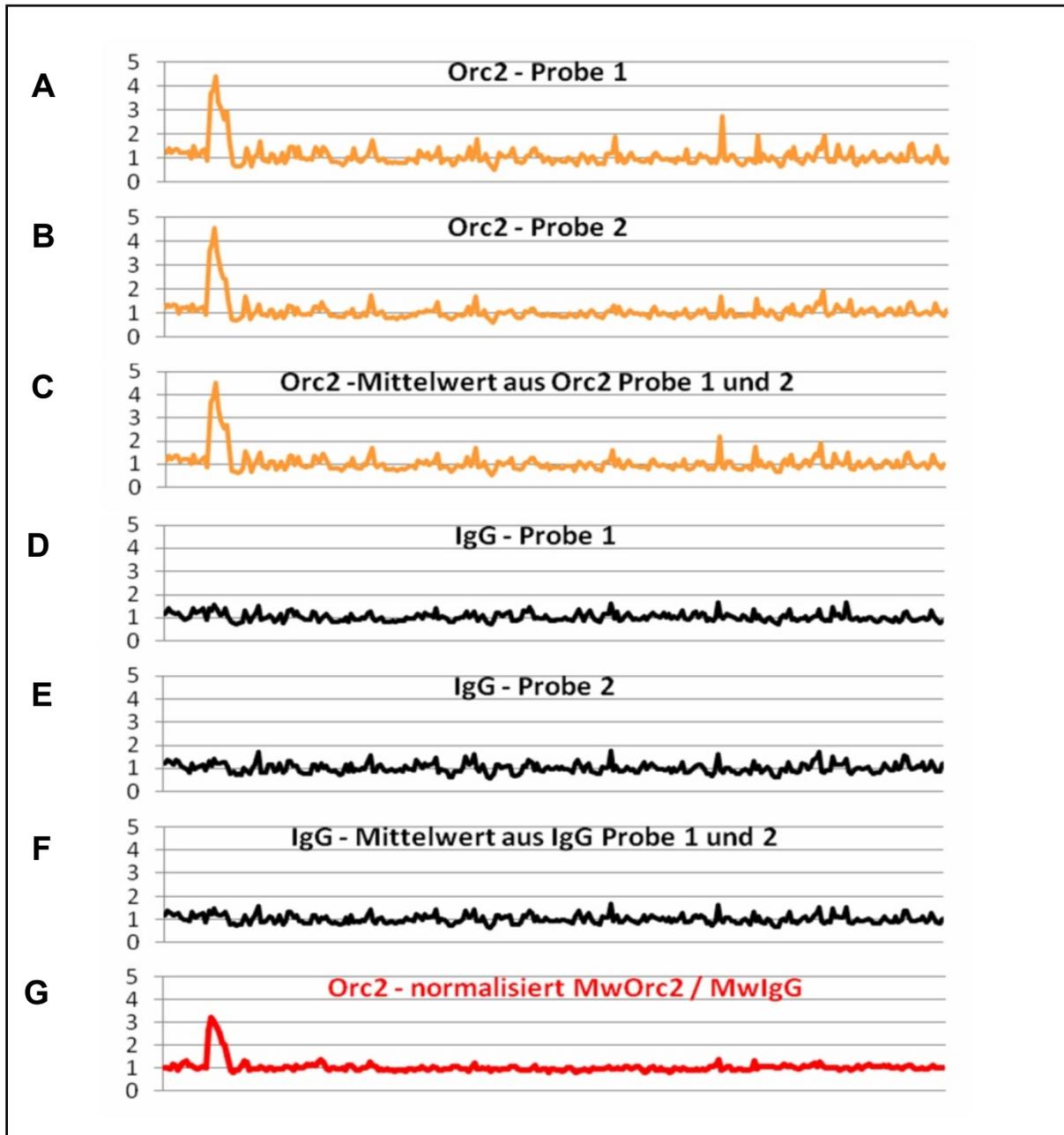


Abb.4.10: Normalisierung des Orc2-Signals auf dem EBV-PCR-Mikroarray

Das Verhältnis der Intensitäten (Ratio Orc2/Input) wird als numerischer Wert in der y-Achse angegeben. Die x-Achse zeigt die Position auf dem Genom bestehend aus 256 Einzelsignalpunkten.

(A und B): Signale der Orc2-Replikate.

(C): Mittelwert aus (A) und (B).

(D und E): Signale der unspezifischen IgG-Replikate.

(F): Mittelwert aus (D) und (E).

(G): normalisiertes Orc2-Signal: (C)/(F).

Pre-RC- und EBNA1-Signale auf dem EBV-PCR-Array

In Abb.4.11-Abb.4.15 werden die Hybridisierungssignale für die Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 sowie EBNA1 auf dem EBV-PCR-Array dargestellt. Bild (A) zeigt die Fluoreszenzsignale über das gesamte EBV-Genom. Die Bilder (B)-(D) zeigen eine Vergrößerung der genomischen Region um *oriP* (B), *oriLyt* (C) und den Q-Promoter (Qp) (D). Die y-Achse der EBV-Hybridisierungssignale entspricht der normalisierten relativen Fluoreszenz. Diese Bezeichnung wird aus Gründen der Übersichtlichkeit in den einzelnen Abbildungen nicht mehr angegeben. In der x-Achse ist das EBV-Genom anhand der einzelnen Gene aufgezeigt. Latente Gene sind mit einem schwarzen Pfeil dargestellt, lytischen Gene mit einem weißen Pfeil. Farblich markiert sind *oriP*, *oriLyt* und die Promotoren Cp, Wp und Qp.

Für Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 ist jeweils ein deutlicher Signalanstieg an *oriP* zu erkennen (Abb.4.11-4.15; je A, B). Die Maximalwerte liegen für Orc2 bei 3,2; Mcm3 bei 2,5; Mcm7 bei 2,0; Cdt1 bei 4,0 und EBNA1 bei 4,6. *oriLyt* zeigt bei allen Hybridisierungssignalen hingegen keine Anreicherung (Abb.4.11-4.15; je A, C). Dies bestätigt, dass mit ChIP-Chip-Analysemethoden Bindestellen für Pre-Replikationskomplexe auf dem EBV-Genom detektiert werden können. Für Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 an *oriP* (jeweils Bild B) deutet sich ein nicht vollständig überlappendes Bindungsprofil an. Für Cdt1 und EBNA1 wird am Qp eine weitere gemeinsame Bindungsstelle detektiert. Die Bindung von EBNA1 an Qp ist bereits bekannt (Day et al., 2007), nicht jedoch dass Cdt1 an Qp bindet.

Ziel der ChIP-Chip-Analysen für Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 war die Identifizierung von Pre-RC-Bindestellen außerhalb von *oriP*. Neben dem deutlichen Signal an *oriP* und der Lokalisation von Cdt1 und EBNA1 an Qp zeigen die Hybridisierungssignale jedoch keine weiteren signifikanten Anreicherungen für die untersuchten Pre-RC-Komponenten. Die Hybridisierungssignale für Orc2, Mcm3 und Cdt1 zeigen Genom-weit mehrere moderate Signalanreicherungen, die aber alle sehr niedrige Signalintensitäten besitzen. Einzig Mcm7 weist eine schwankende Signalverteilung mit diskreten Signalspitzen auf. Obwohl ORC und EBNA1 miteinander interagieren, kann keine Orc2-Anreicherung an der EBNA1-Bindestelle von Qp festgestellt werden.

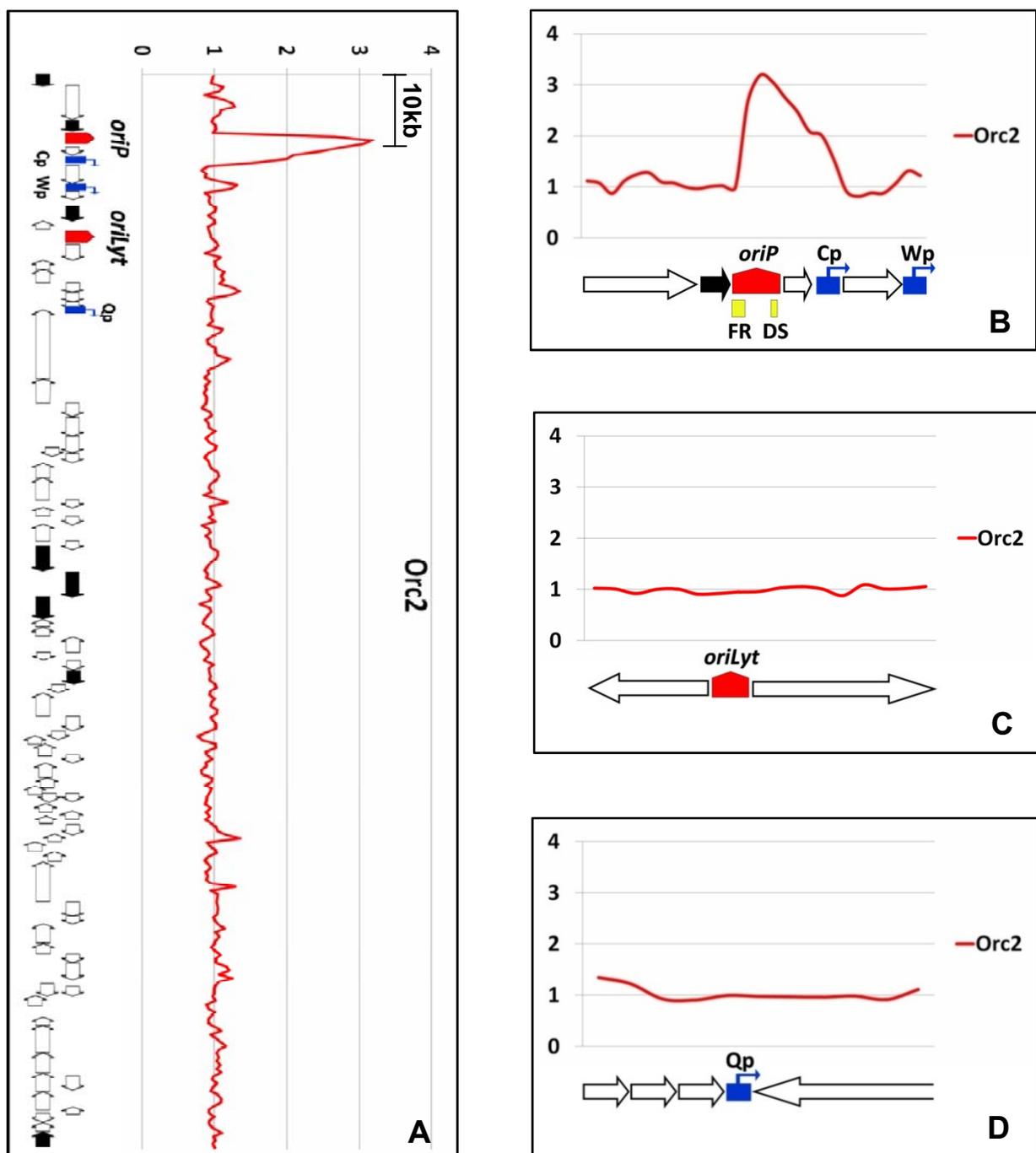


Abb.4.11: Orc2 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-PCR-Array)

- (A) **Normalisiertes Orc2-Signal:** Die y-Achse entspricht der relativen Anreicherung. Die x-Achse entspricht der Position auf dem EBV-PCR-Array. Schwarze Pfeile: latente Gene. Weiße Pfeile: lytische Gene; rotes Fünfeck: *oriP* und *oriLyt*, blaue Quadrate: Promotoren Cp, Wp und Qp.
- (B) **Detailansicht *oriP*:** Beschriftung wie in (A); gelbe Quadrate: FR und DS.
- (C) **Detailansicht *oriLyt*:** Beschriftung wie in (A).
- (D) **Detailansicht Q-Promoter:** Beschriftung wie in (A).

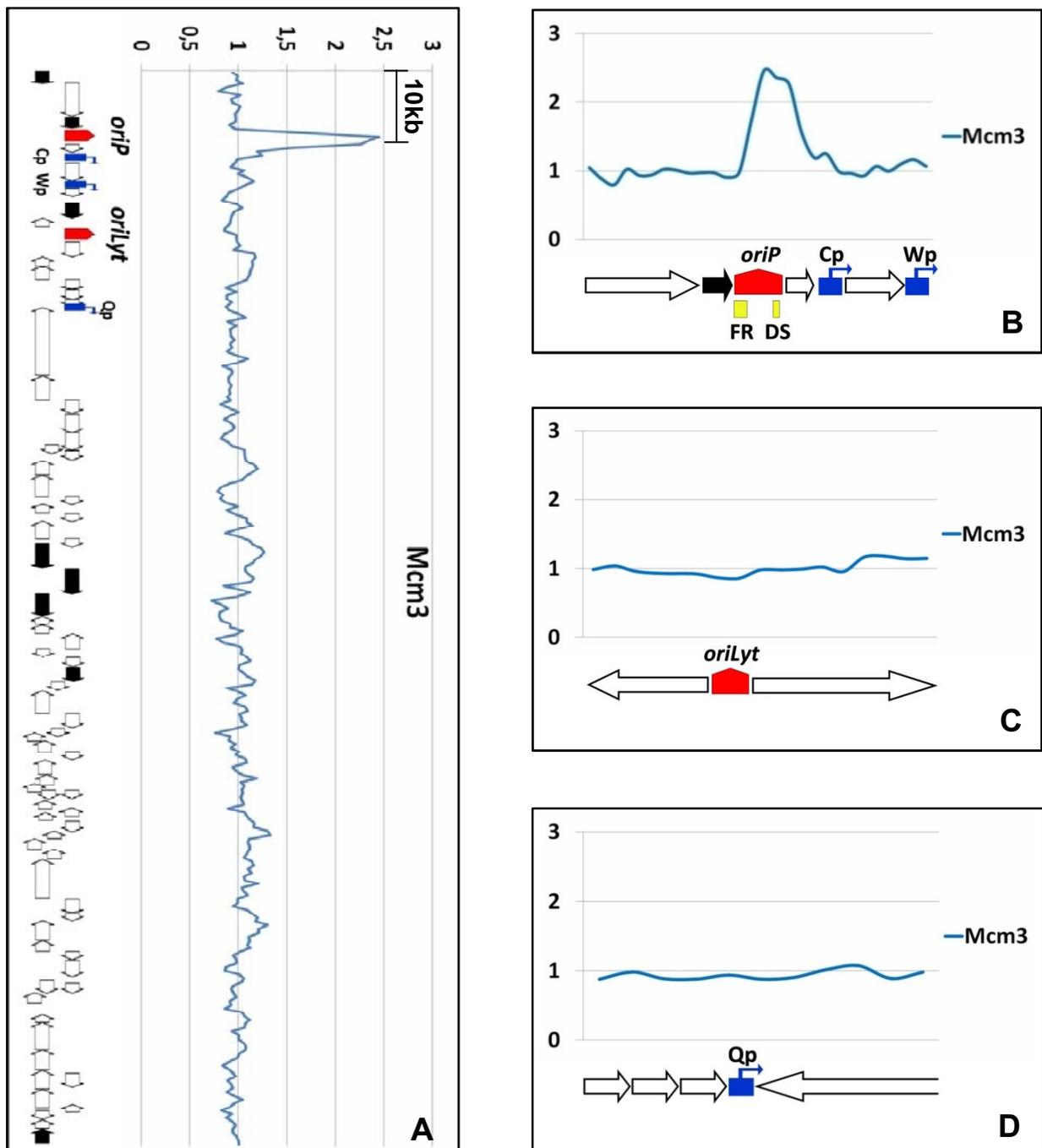


Abb.4.12: Mcm3 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-PCR-Array)

- (A) **Normalisiertes Mcm3-Signal:** Die y-Achse entspricht der relativen Anreicherung. Die x-Achse entspricht der Position auf dem EBV-PCR-Array. Schwarze Pfeile: latente Gene. Weiße Pfeile: lytische Gene; rotes Fünfeck: *oriP* und *oriLyt*, blaue Quadrate: Promotoren Cp, Wp und Qp.
- (B) **Detailansicht *oriP*:** Beschriftung wie in (A); gelbe Quadrate: FR und DS.
- (C) **Detailansicht *oriLyt*:** Beschriftung wie in (A).
- (D) **Detailansicht Q-Promoter:** Beschriftung wie in (A).

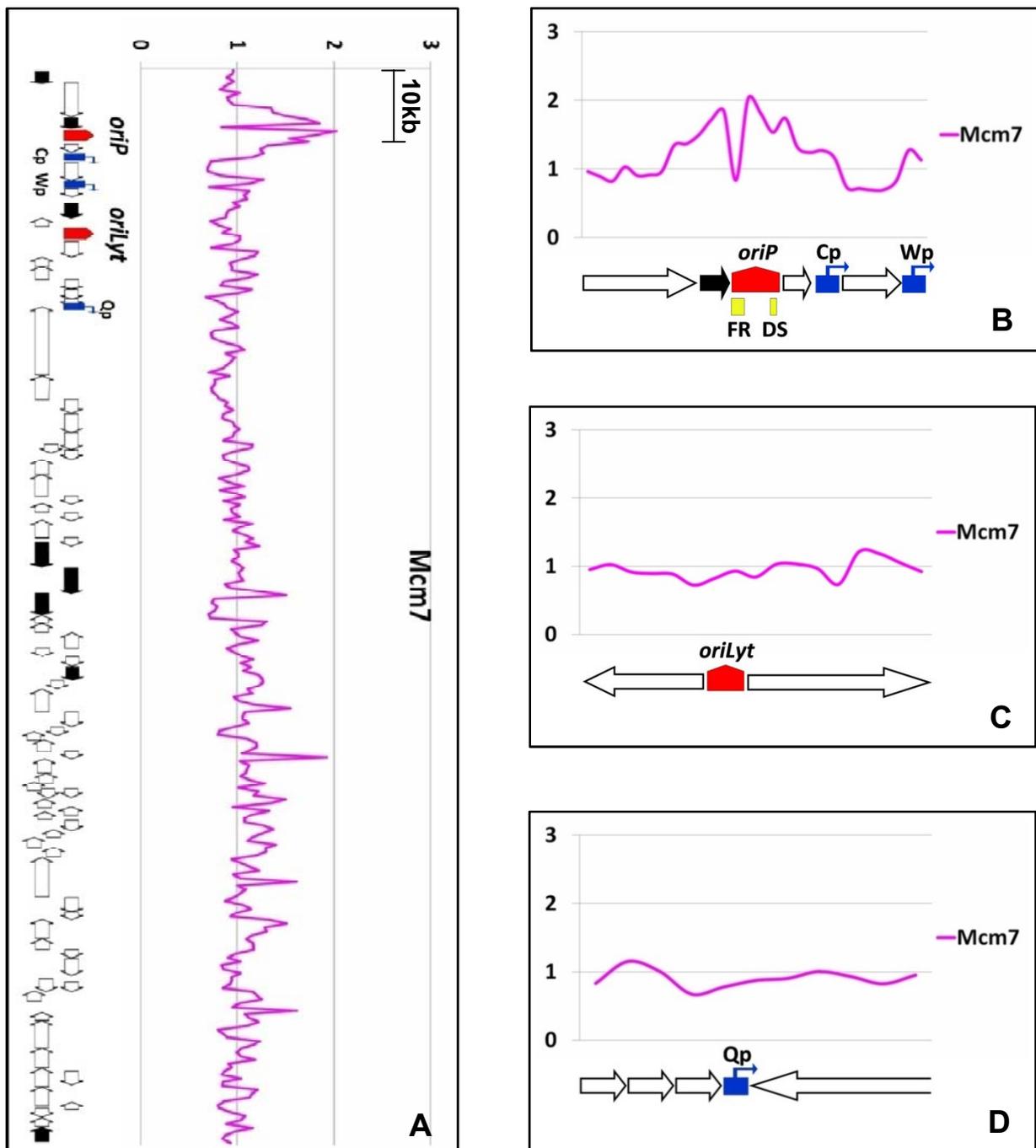


Abb.4.13: Mcm7 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-PCR-Array)

- (A) **Normalisiertes Mcm7-Signal:** Die y-Achse entspricht der relativen Anreicherung. Die x-Achse entspricht der Position auf dem EBV-PCR-Array. Schwarze Pfeile: latente Gene. Weiße Pfeile: lytische Gene; rotes Fünfeck: *oriP* und *oriLyt*, blaue Quadrate: Promotoren Cp, Wp und Qp.
- (B) **Detailansicht *oriP*:** Beschriftung wie in (A); gelbe Quadrate: FR und DS.
- (C) **Detailansicht *oriLyt*:** Beschriftung wie in (A).
- (D) **Detailansicht Q-Promoter:** Beschriftung wie in (A).

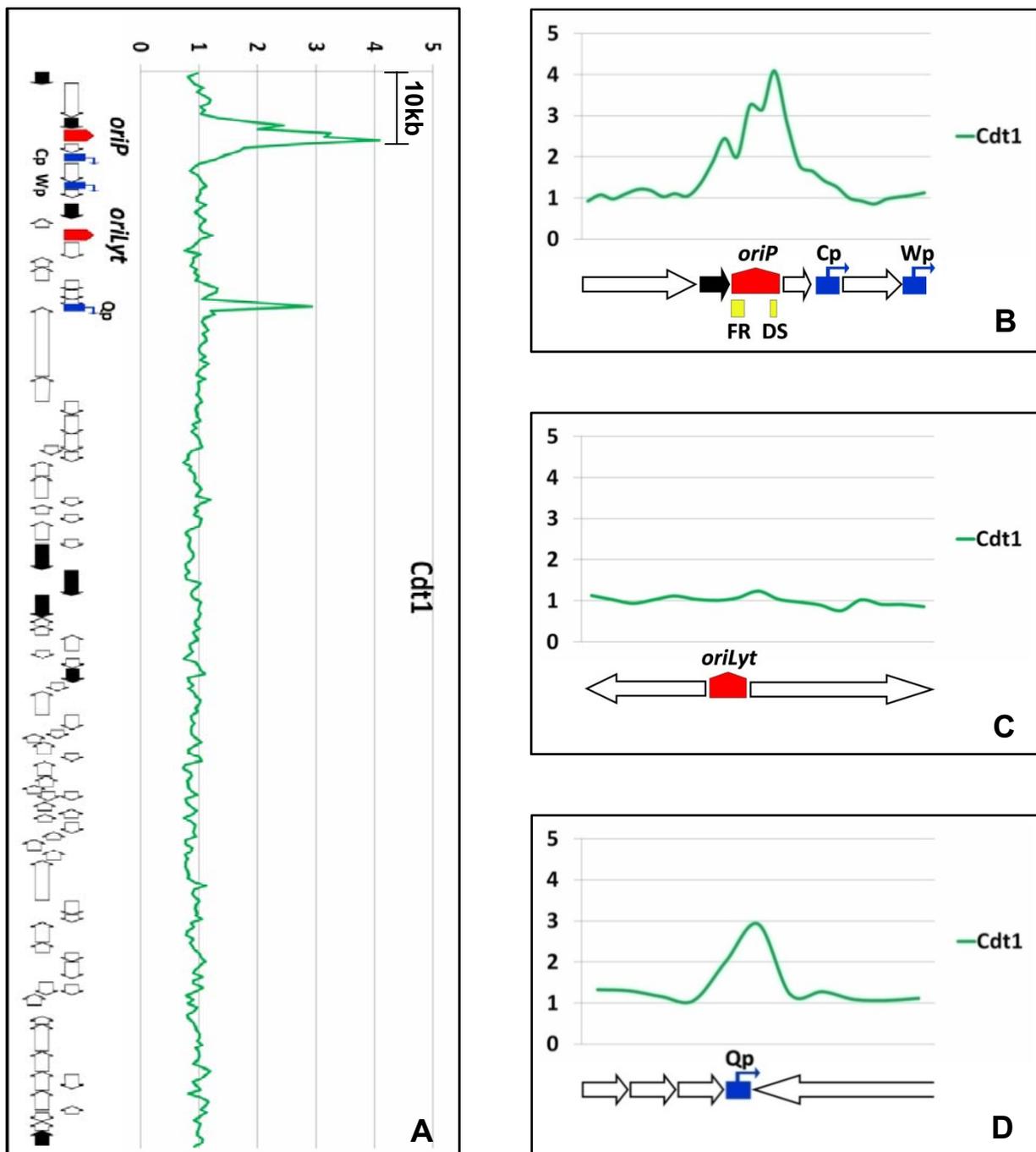


Abb.4.14: Cdt1 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-PCR-Array)

- (A) **Normalisiertes Cdt1-Signal:** Die y-Achse entspricht der relativen Anreicherung. Die x-Achse entspricht der Position auf dem EBV-PCR-Array. Schwarze Pfeile: latente Gene. Weiße Pfeile: lytische Gene; rotes Fünfeck: *oriP* und *oriLyt*, blaue Quadrate: Promotoren Cp, Wp und Qp.
- (B) **Detailansicht *oriP*:** Beschriftung wie in (A); gelbe Quadrate: FR und DS.
- (C) **Detailansicht *oriLyt*:** Beschriftung wie in (A).
- (D) **Detailansicht Q-Promoter:** Beschriftung wie in (A).

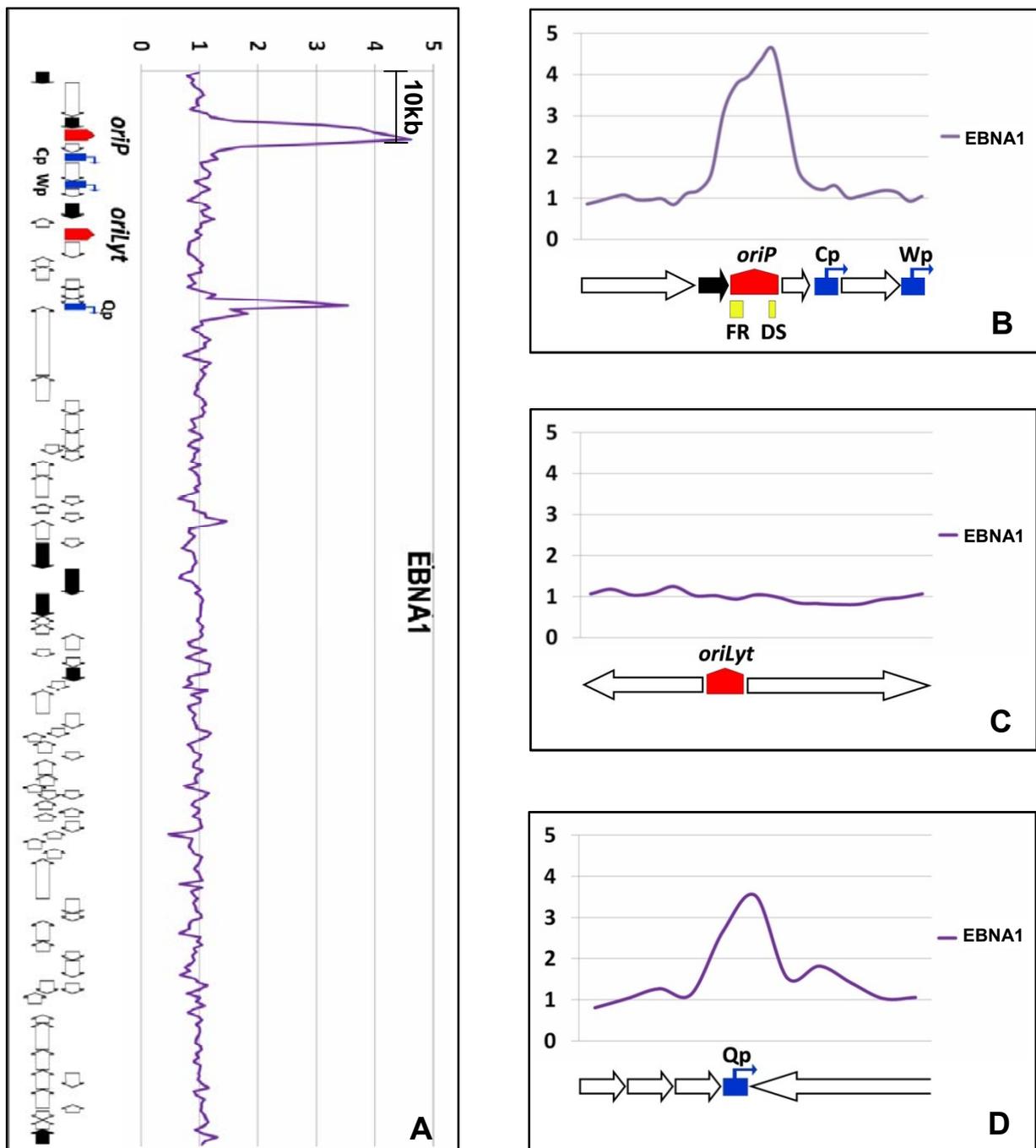


Abb.4.15: EBNA1 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-PCR-Array)

- (A) **Normalisiertes EBNA1-Signal:** Die y-Achse entspricht der relativen Anreicherung; Die x-Achse entspricht der Position auf dem EBV-PCR-Array. Schwarze Pfeile: latente Gene. Weiße Pfeile: lytische Gene; rotes Fünfeck: *oriP* und *oriLyt*, blaue Quadrate: Promotoren *Cp*, *Wp* und *Qp*.
- (B) **Detailansicht *oriP*:** Beschriftung wie in (A); gelbe Quadrate: *FR* und *DS*.
- (C) **Detailansicht *oriLyt*:** Beschriftung wie in (A).
- (D) **Detailansicht *Q*-Promoter:** Beschriftung wie in (A).

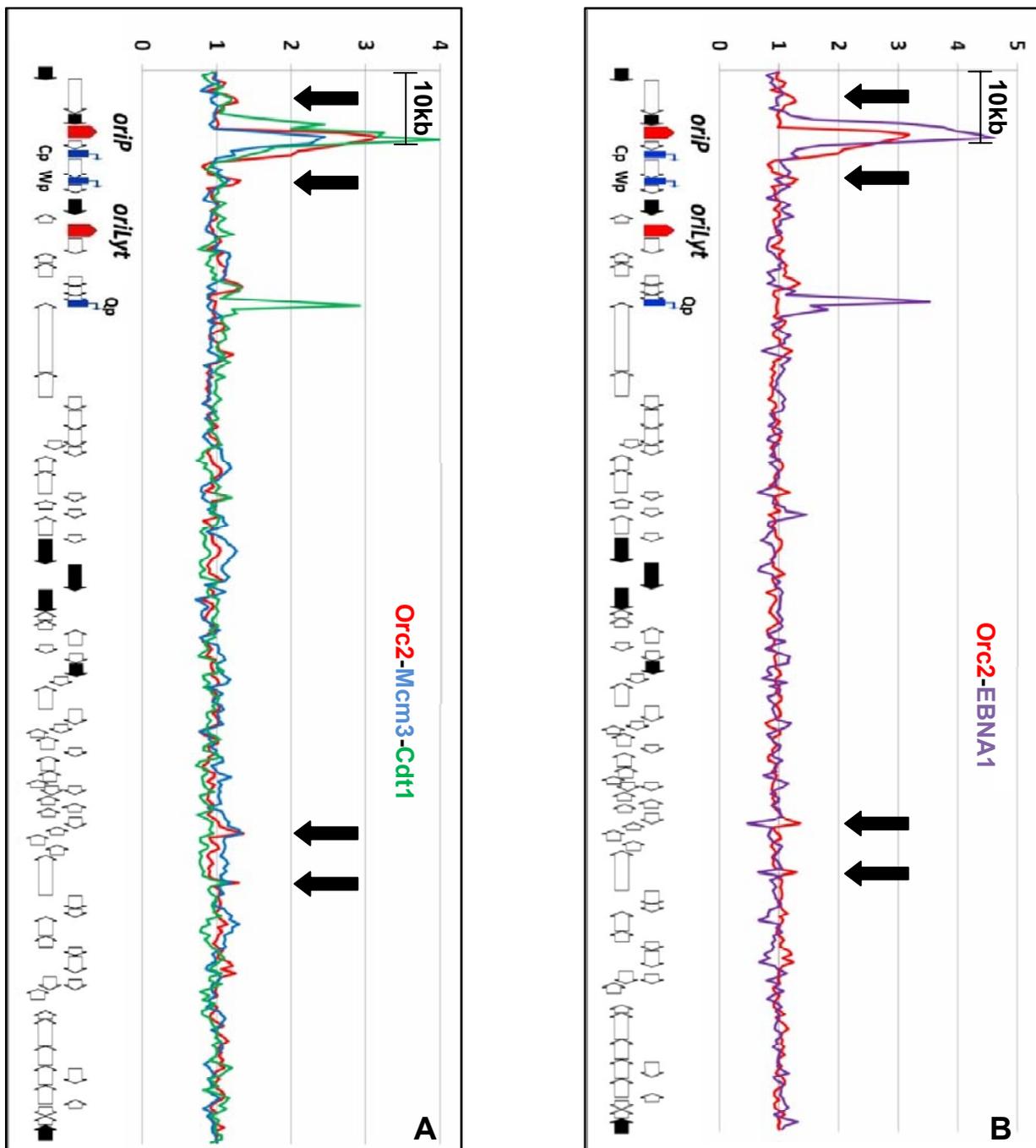


Abb.4.16: Signalüberlagerung für (A) *Orc2-Mcm3-Cdt1* und (B) *Orc2-EBNA1*

- (A) Normalisierte *Orc2-Mcm3-Cdt1*-Signale:** Die y-Achse entspricht der relativen Anreicherung. Die x-Achse entspricht der Position auf dem EBV-PCR-Array. Schwarze Pfeile: latente Gene. Weiße Pfeile: lytische Gene; rotes Fünfeck: *oriP* und *oriLyt*, blaue Quadrate: Promotoren Cp, Wp und Qp.
- (B) Normalisierte *Orc2-EBNA1*-Signale:** Die y-Achse entspricht der relativen Anreicherung. Die x-Achse entspricht der Position auf dem EBV-PCR-Array. Schwarze Pfeile: latente Gene und EBER-RNA. Weiße Pfeile lytische Gene; rotes Fünfeck: *oriP* und *oriLyt*, blaue Quadrate: Promotoren Cp, Wp und Qp.

Eine Analyse der Überlagerung der Signale in Abb.4.16 (exemplarisch (A) Orc2-Mcm3-Cdt1 und (B) Orc2-EBNA1) lässt einige schwache Signal-Regelmäßigkeiten erkennen. Orc2-Mcm3-Cdt1 zeigen an einigen gemeinsamen Genomregionen moderate Signalspitzen (Abb.4.16 A; markiert mit Pfeilen). Für Orc2 und EBNA1 sind Bereiche erkennbar, an denen sich eine gemeinsame Lokalisation auszuschließen scheint (Abb.4.16 B; markiert mit Pfeilen). Die Analysen potentieller Signalgemeinsamkeiten bzw. -unterschiede erwiesen sich bei der geringen Variation der Signalintensitäten jedoch als zu ungenau, um konkrete Aussagen über eine gemeinsame Lokalisation von Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 auf dem EBV-Genom treffen zu können. Ein Grund, warum Genom-weit keine weiteren signifikanten Bindestellen identifiziert werden können, liegt möglicherweise in der geringen Auflösung des EBV-PCR-Arrays. Daher wurden die DNA-Proben zusätzlich auf einen EBV-Oligonukleotid-Array hybridisiert, der durch geringe Fragmentgrößen je Spot und eine deutlich höhere Spotzahl Einzelsignale detaillierter auftrennen kann (siehe nächster Abschnitt).

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Experimente zeigen, dass sich mit dem EBV-PCR-Mikroarray keine signifikanten Signalanreicherungen für Pre-RC-Bindestellen außerhalb von *oriP* identifizieren lassen. Genom-weit sind mehrere schwache Signalregelmäßigkeiten zu erkennen, die sich aber aufgrund der geringen Auflösung des EBV-PCR-Arrays und der geringen Signalintensitäten nicht aussagekräftig interpretieren lassen. An *oriP* zeigen die Pre-RC-Komponenten Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 sowie das virale Protein EBNA1 eine deutliche Anreicherung gegenüber der Referenzposition *oriLyt*. Zudem weist Qp neben EBNA1 eine bisher nicht bekannte Cdt1-Bindung auf. Um die Einzelsignale detaillierter darzustellen, wurde in nachfolgenden Experimenten ein hochauflösender EBV-Oligonukleotid-Array verwendet.

4.2.3 Pre-RC- und EBNA1-Signale auf dem EBV-Oligonukleotid-Array

Die Bindungsprofile der Pre-RC-Komponenten Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 im vorangegangenen Abschnitt zeigten Genom-weit an einigen Positionen überlagernde Signale. Die Signalintensitäten waren jedoch sehr gering und eine Interpretation aufgrund der zusätzlich niedrigen Signalauflösung des verwendeten EBV-PCR-Arrays erschwert. Um die Ergebnisse unabhängig auf einem zweiten Array-System zu überprüfen und eine höhere Auflösung der Einzelsignale zu erzielen, wurde für weitere Analysen ein EBV-Oligonukleotid-Array verwendet. Auf dem Oligonukleotid-Array ist das EBV-Genom in 4x3500 Einzelfragmenten aufgebracht (vgl. PCR-Array: 4x256 Fragmente). Bindungsprofile können daher hochauflösend dargestellt und einzelne Signale genauer analysiert werden. Hybridisierungen auf den EBV-Oligonukleotid-Array für Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 wurden mit den gleichen ChIP-Proben durchgeführt, die bereits mit dem EBV-PCR-Array im vorherigen Kapitel analysiert wurden. Dadurch ist eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet. Es wurden wiederum zwei Serien hybridisiert (Probe 1 und Probe 2). Für Mcm7 und EBNA1 konnte aufgrund einer limitierten Anzahl der Oligonukleotid-Arrays jeweils nur Probe1 hybridisiert werden. Alle durchgeführten ChIP-Chip-Experimente auf dem EBV-Oligonukleotid-Array sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Zellsystem	Hybridisierung	EBV-Oligonukleotid-Array
Raji (G ₁)	IgG	✓ ✓
Raji (G ₁)	Orc2	✓ ✓
Raji (G ₁)	Mcm3	✓ ✓
Raji (G ₁)	Mcm7	✓
Raji (G ₁)	Cdt1	✓ ✓
Raji (G ₁)	EBNA1	✓

Tabelle 4.2: Übersicht der Hybridisierungen für den EBV-Oligonukleotid-Array

(✓) = Einzelhybridisierung; (✓ ✓) = biologische Replikate;

Für alle EBV ChIP-Chip-Analysen wurde G₁-Phase-Chromatin aus Raji-Zellen verwendet (Raji G₁).

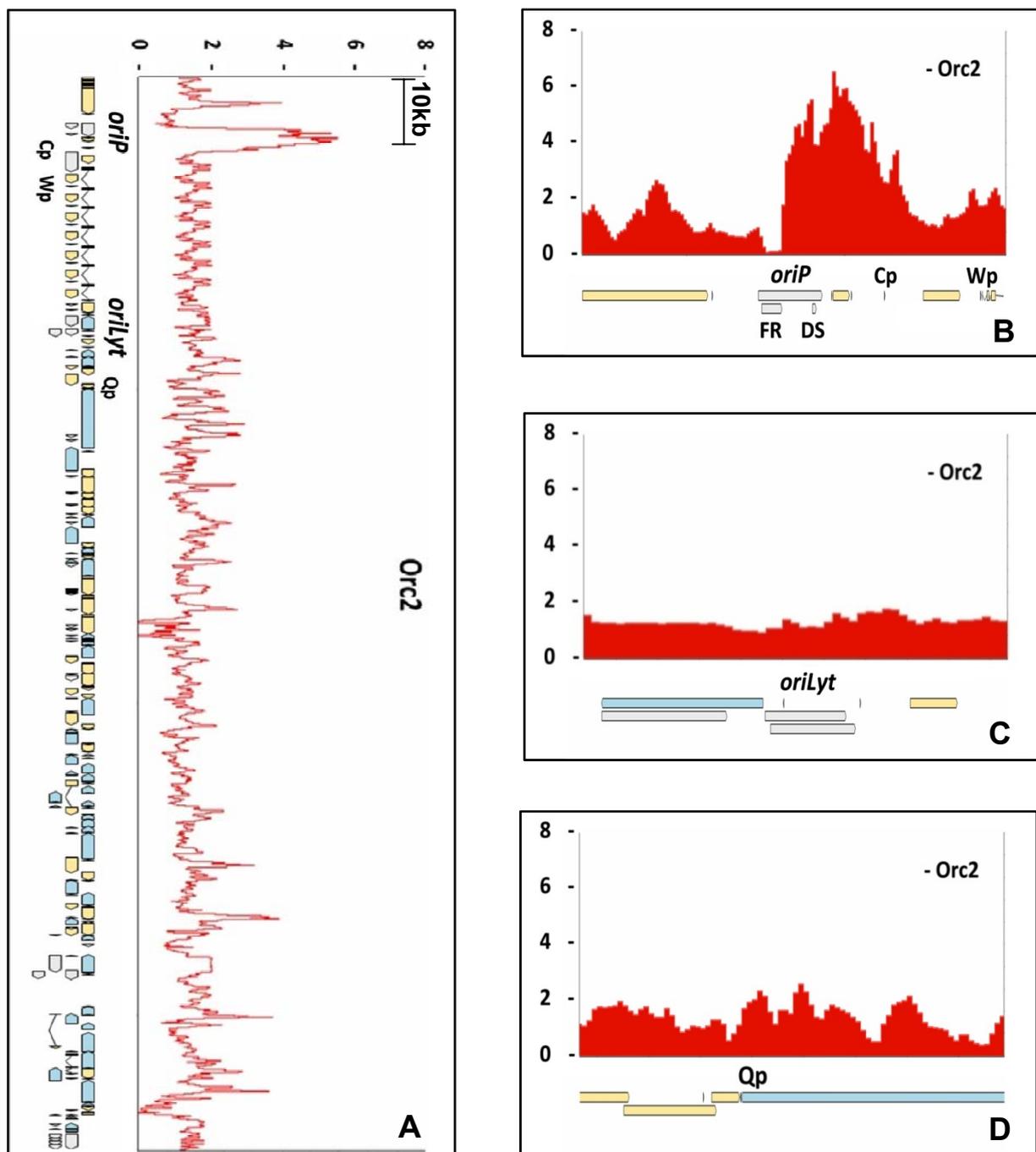


Abb.4.17: Orc2-Probe1 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-Oligonukleotid-Array)

- (A) **Normalisiertes Orc2-Probe1-Signal:** normalisiert gegen IgG-Probe1; y-Achse entspricht der relativen Anreicherung; x-Achse entspricht der Genannotation des EBV; Position von *oriP*, *oriLyt* und den Promotoren Cp, Wp, Qp hervorgehoben. Blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die sich auf dem oberen DNA-Strang befinden, blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die sich auf dem unteren DNA-Strang befinden.
- (B) **Detailansicht *oriP*:** Beschriftung wie in (A); zusätzlich FR und DS beschriftet.
- (C) **Detailansicht *oriLyt*:** Beschriftung wie in (A).
- (D) **Detailansicht Q-Promoter:** Beschriftung wie in (A).

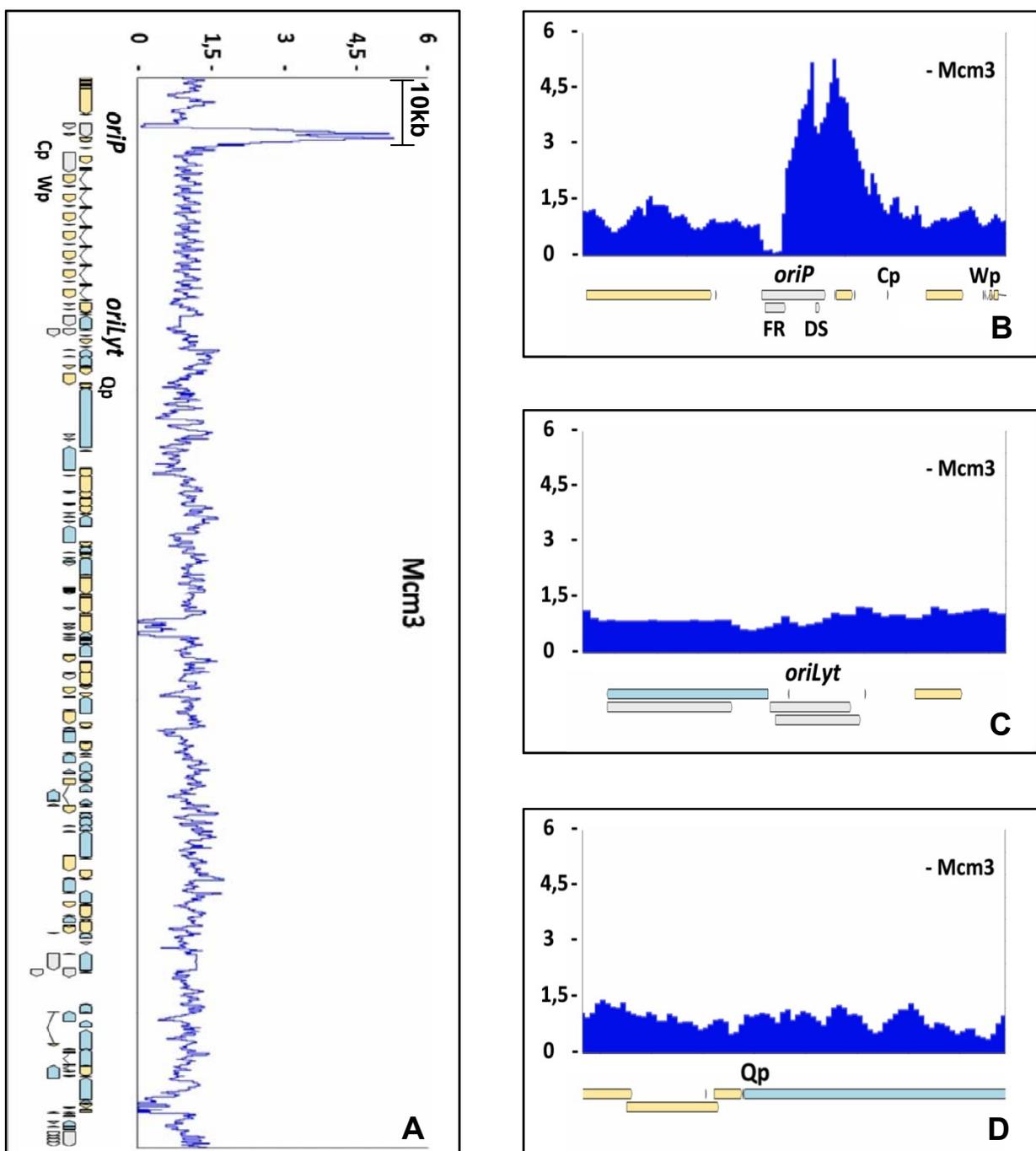


Abb.4.18: Mcm3-Probe1 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-Oligonukleotid-Array)

- (A) **Normalisiertes Mcm3-Probe1-Signal:** normalisiert gegen IgG-Probe1; y-Achse entspricht der relativen Anreicherung; x-Achse entspricht der Genannotation des EBV; Position von *oriP*, *oriLyt* und den Promotoren Cp, Wp, Qp hervorgehoben. Blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die sich auf dem oberen DNA-Strang befinden, blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die sich auf dem unteren DNA-Strang befinden.
- (B) **Detailansicht *oriP*:** Beschriftung wie in (A); zusätzlich FR und DS beschriftet.
- (C) **Detailansicht *oriLyt*:** Beschriftung wie in (A).
- (D) **Detailansicht Q-Promoter:** Beschriftung wie in (A).

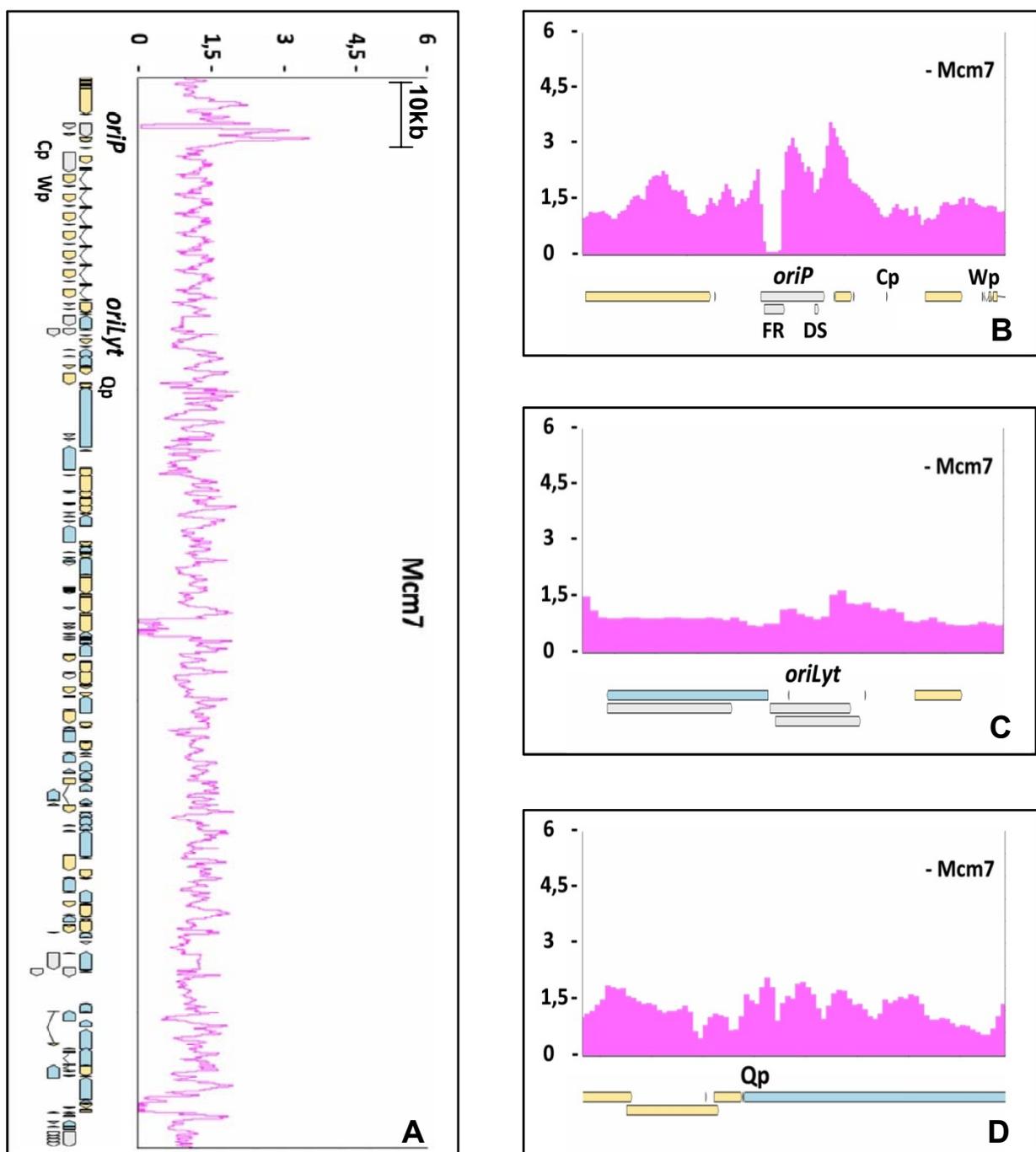


Abb.4.19: Mcm7-Probe1 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-Oligonukleotid-Array)

(A) **Normalisiertes Mcm7-Probe1 Signal:** normalisiert gegen IgG-Probe1; y-Achse entspricht der relativen Anreicherung; x-Achse entspricht der Genannotation des EBV; Position von *oriP*, *oriLyt* und den Promotoren Cp, Wp, Qp hervorgehoben. Blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die sich auf dem oberen DNA-Strang befinden, blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die sich auf dem unteren DNA-Strang befinden.

(B) **Detailansicht *oriP*:** Beschriftung wie in (A); zusätzlich FR und DS beschriftet.

(C) **Detailansicht *oriLyt*:** Beschriftung wie in (A).

(D) **Detailansicht Q-Promoter:** Beschriftung wie in (A).

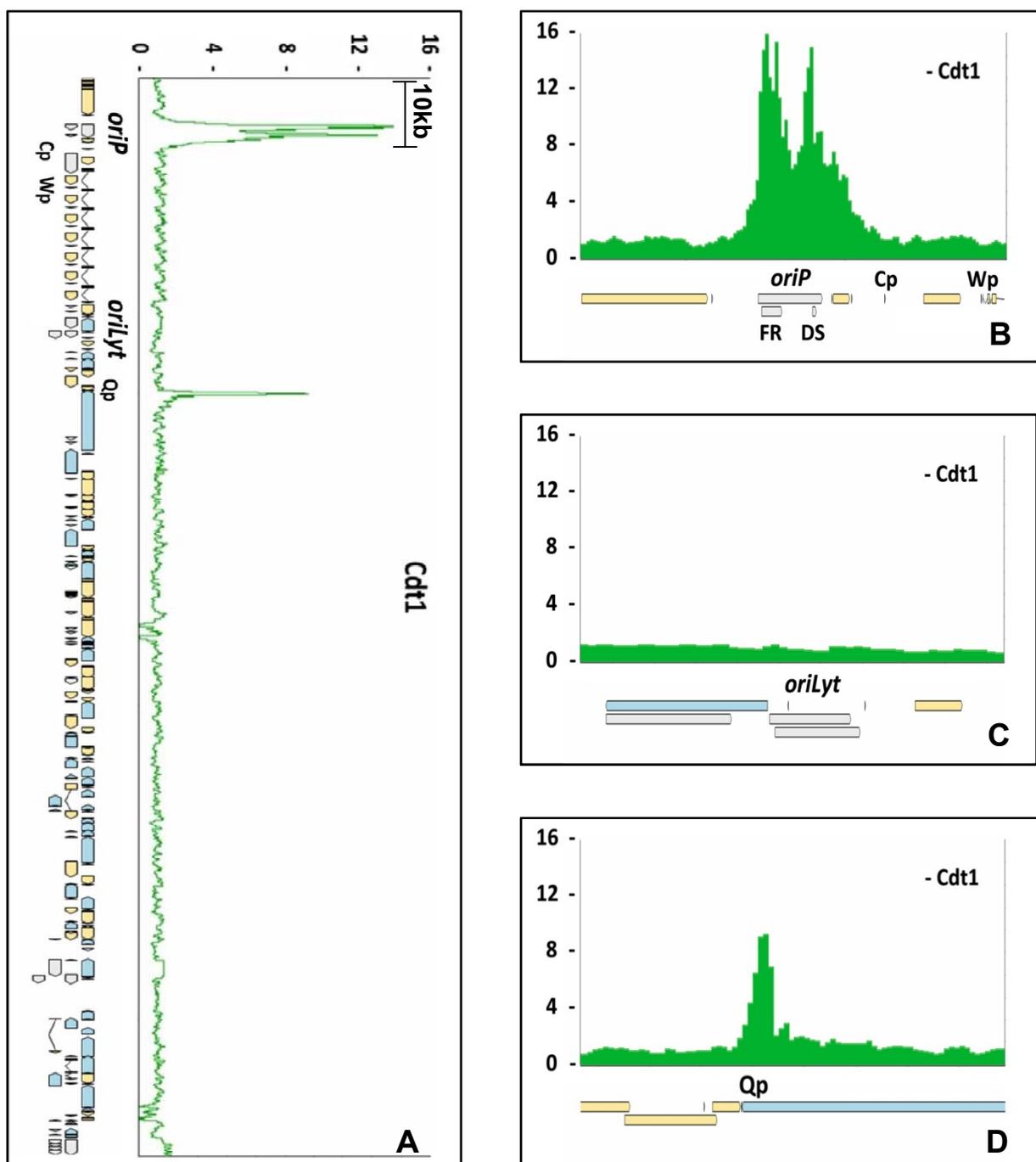


Abb.4.20: Cdt1-Probe1 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-Oligonukleotid-Array)

- (A) **Normalisiertes Cdt1-Probe1-Signal:** normalisiert gegen IgG-Probe1; y-Achse entspricht der relativen Anreicherung; x-Achse entspricht der Genannotation des EBV; Position von *oriP*, *oriLyt* und den Promotoren Cp, Wp, Qp hervorgehoben. Blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die sich auf dem oberen DNA-Strang befinden, blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die sich auf dem unteren DNA-Strang befinden.
- (B) **Detailansicht *oriP*:** Beschriftung wie in (A); zusätzlich FR und DS beschriftet.
- (C) **Detailansicht *oriLyt*:** Beschriftung wie in (A).
- (D) **Detailansicht Q-Promoter:** Beschriftung wie in (A).

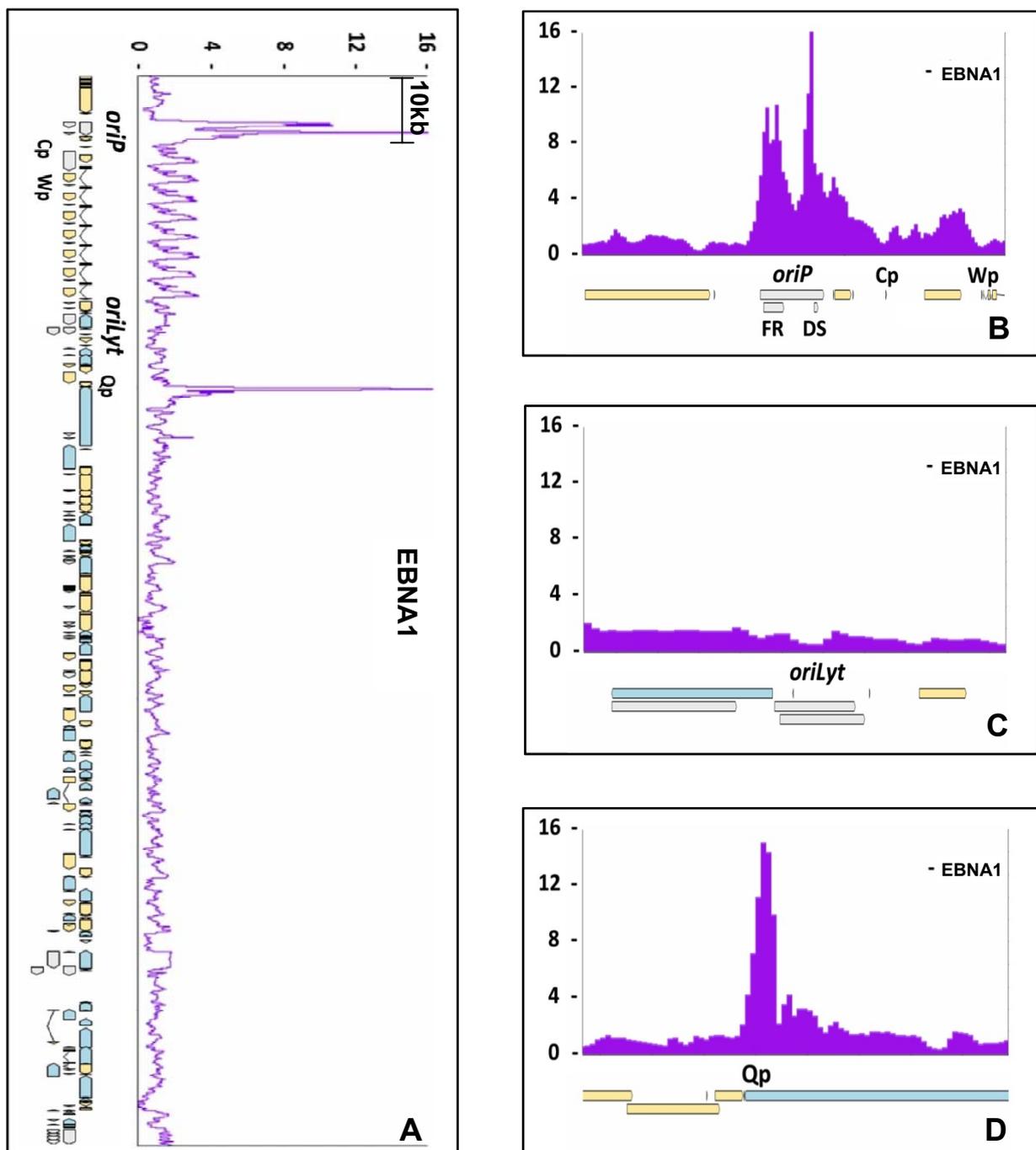


Abb.4.21: EBNA1-Probe1 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-Oligonukleotid-Array)

- (A) **Normalisiertes EBNA1-Probe1-Signal:** normalisiert gegen IgG-Probe1; y-Achse entspricht der relativen Anreicherung; x-Achse entspricht der Genannotation des EBV; Position von *oriP*, *oriLyt* und den Promotoren Cp, Wp, Qp hervorgehoben. Blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die sich auf dem oberen DNA-Strang befinden, blaue Pfeile kennzeichnen Gene, die sich auf dem unteren DNA-Strang befinden.
- (B) **Detailansicht *oriP*:** Beschriftung wie in (A); zusätzlich FR und DS beschriftet.
- (C) **Detailansicht *oriLyt*:** Beschriftung wie in (A).
- (D) **Detailansicht Q-Promoter:** Beschriftung wie in (A).

Die Datenauswertung erfolgte durch ein Computerprogramm, das speziell für den EBV-Oligonukleotid-Array entwickelt wurde. Das Programm ist nur für die Analyse singulärer Hybridisierungen geeignet und lässt die Berechnung von Mittelwerten nicht zu. Daher wurden die Proben der Serie 1 gegen IgG-Kontrolle1 sowie die Proben der Serie 2 gegen IgG-Kontrolle2 normalisiert. Serie 1 ist in Abb.4.17-4.21 dargestellt, Serie 2 im Anhang (Abb.9.2).

Die EBV-Oligonukleotid-Array Analysen zeigen für Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 an *oriP* im Vergleich zu *oriLyt* erneut eine deutliche Signalanreicherung (Abb.4.17-4.21; je A, B). Für Cdt1 (Abb.4.20 A, D) und EBNA1 (Abb.4.21 A, D) sind an Qp ebenfalls eindeutige Anreicherungen detektierbar. Zudem ist die Darstellung der Signale über das gesamte EBV-Genom deutlich detaillierter als beim EBV-PCR-Array. Für Orc2 (Abb.4.17 A), Mcm3 (Abb.4.18 A), Mcm7 (Abb.4.19 A), Cdt1 (Abb.4.20 A) und EBNA1 (Abb.4.21 A) sind über das gesamte Genom multiple moderate Signalspitzen zu erkennen.

Ein direkter Vergleich der biologisch unabhängigen Replikate (siehe jeweils Probe1 zu Probe 2 in Abb.4.22) zeigt die Reproduzierbarkeit der Signalprofile. Die singulären Signale konnten mit dem verwendeten Programm bioinformatisch nicht zusammen ausgewertet werden. Um dennoch übereinstimmende Signalspitzen zu lokalisieren und somit Genom-weit mögliche Bindestellen für Pre-RCs zu identifizieren, wurden die Daten einzeln miteinander verglichen. Eine derartige Analyse ist exemplarisch in Abb.4.22 dargestellt. Sie zeigt alle durchgeführten EBV-Oligonukleotid-Array-Experimente. Die y-Achse ist so gewählt, dass die Genom-weiten Signale optimal miteinander verglichen werden können. Sie wurde variabel für jede Darstellung so angepasst, dass schwache Signale deutlicher werden. Damit erscheint das gesamte Signal in der y-Achse gestreckt, wobei die Maximalwerte an *oriP* und Qp nach oben abgeschnitten sind.

Für die Analyse wurde zunächst für das Orc2 Signal (Probe 1) willkürlich ein Schwellenwert gewählt. Signalspitzen, die eine relative Anreicherung aufweisen, die über dem Wert 2 liegen, wurden markiert (Abb.4.22 Pfeile A - F). Im nächsten Schritt wurden die Signalintensitäten an diesen Bereichen in allen Hybridisierungsprofilen auf Regelmäßigkeiten hin überprüft. Exemplarisch werden im Folgenden einige Signale diskutiert.

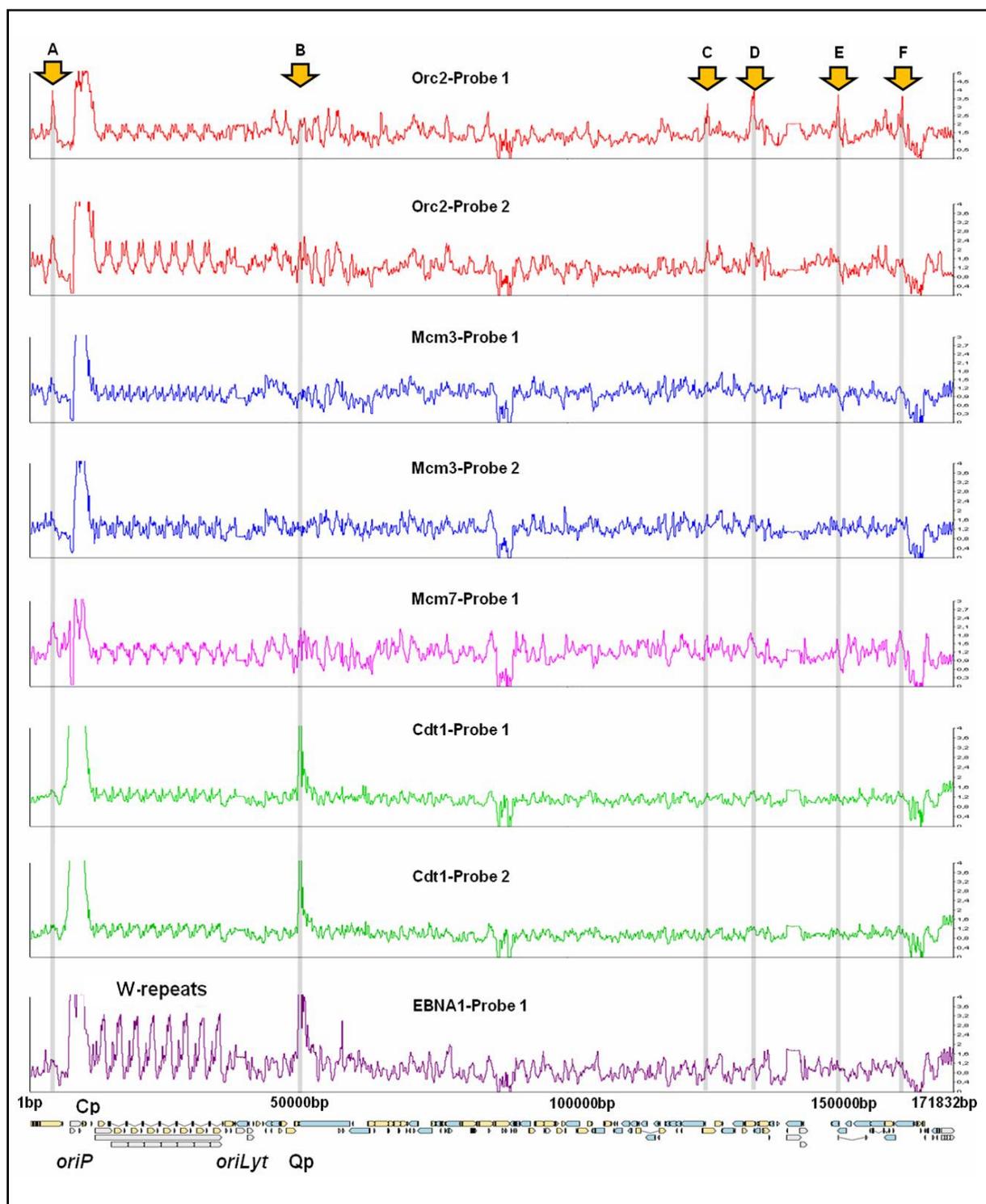


Abb.4.22: Bindungssignale für Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 (EBV-Oligonucleotid-Array)

Für die Auswertung signifikanter Signalanreicherungen wurde in Orc2-Probe1 willkürlich ein Schwellenwert für die relative Anreicherung bei Wert 2 bestimmt. Werte oberhalb 2 in Orc2-Probe1 wurden gekennzeichnet (Pfeil A-F) und durchgängig vertikal mit einem Positionsbalken (grau) für die weiteren Proben markiert.

Im 5'-Bereich von *oriP* ist im Orc2 Signal eine prominente Anreicherung zu erkennen (Abb.4.22 Bereich A). Auch bei Mcm3, Mcm7 ist eine moderate Signalanreicherungen nachweisbar, die jedoch für Cdt1 und EBNA1 nicht so stark ausgeprägt ist. Bereich B markiert den Q-Promoter. Außer für EBNA1 und Cdt1 können bei den Proben Orc2, Mcm3 und Mcm7 keine eindeutigen Signale detektiert werden, die sich signifikant von Genom-weiten Signalen unterscheiden. Desweiteren weist die Orc2-Probe1 relative Anreicherungen über dem Wert 2 an den Bereichen C, D, E, und F auf. In der Orc2-Probe2 sind Signalanreicherungen in abgeschwächter Form nur für die Positionen C und D zu erkennen. Für Position E und F zeigt Orc2-Probe2 keine Signalanreicherung. Ein Vergleich der Orc2-Probe1 Signale an den Positionen C, D, E und F mit Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 zeigt für diese Proben keine signifikanten Signalanreicherungen. 3' von *oriP* erscheinen mehrere Signalspitzen am W-Promoter (Wp). Wp liegt in einer repetitiven Sequenz (W-repeats). Auf dem EBV-Oligonukleotid-Array ist diese Sequenz nur einmal aufgebracht, wird aber durch das Computer-Programm automatisch mehrfach dargestellt. Daher erscheint die Signalspitze für Wp im Orc2 Signal mehrfach hintereinander aufgereiht. Dieses Signal ist auch bei Mcm3, Mcm7 und EBNA1 zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Genom-weiten Bindungsprofile für die Pre-RC-Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 biologisch schwer zu interpretieren sind. Norio und Schildkraut detektierten Replikationsereignisse auch außerhalb des latenten Replikationsursprungs *oriP* (Norio und Schildkraut, 2004). Die Ursprünge dieser Ereignisse lassen sich durch die hier dargestellten ChIP-Chip-Resultate nicht eindeutig ermitteln. Außer den signifikanten Signalanreicherungen an *oriP* und Qp (für EBNA1 und Cdt1) zeigen alle analysierten Proben ein Genom-weit variierendes Bindungsprofil mit niedrigen Signal-Intensitäten. Zum Teil können moderate Signalanreicherungen detektiert werden, eine eindeutige Kolokalisation der Signale kann jedoch nicht festgestellt werden. Für detailliertere Signal-Analysen war der EBV-Oligonukleotid-Array besser geeignet. Eine mögliche Erklärung der Genom-weit niedrigen und variierenden Signal-Anreicherungen liegt in einer flexiblen und delokalisierten Pre-RC-Ausbildung. Diese These wird im folgenden Kapitel auch für das Human-Genom untersucht.

4.3 Analyse der Ausbildung von Pre-Replikationskomplexen auf dem Human-Genom

Die Studien des vorangegangenen Kapitels zeigen, dass lokal fixierte Replikationsursprünge wie *oriP* anhand der Ausbildung von Pre-RCs mit ChIP-Chip identifiziert werden können. Zusätzlich lässt sich anhand der Genom-weit niedrigen und variierenden ChIP-Chip-Bindungssignale für Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 eine flexible und delokalisierte Pre-RC-Ausbildung vermuten. Das EBV-Genom ist um ein vielfaches kleiner und weniger komplex als das Human-Genom. Zudem lokalisiert EBV während der Latenz in sogenannten Interchromatin-Domänen (Deutsch et al., 2009; in Revision). Für die Etablierung von Replikationsursprüngen beim Menschen werden unter anderem Kriterien wie übergeordnete Chromatin- und Genom-Strukturen vermutet. Diese komplexen Bedingungen sind auf dem EBV-Genom nicht vorzufinden. Daher müssen die Bedingungen zur Etablierung von Pre-Replikationskomplexen auf dem viralen Genom nicht unbedingt den Bedingungen auf dem Human-Genom entsprechen und sind daher unabhängig zu studieren.

In diesem Kapitel sind ChIP-Chip-Experimente beschrieben, anhand derer die Lokalisation der Pre-RC-Proteine Orc2, Mcm3 und Cdt1 auf dem Human-Genom analysiert wurde. Für die Studien der Pre-RC-Ausbildung beim Menschen wurde der humane ENCODE-Array verwendet. Dieses System wird im nächsten Abschnitt detaillierter vorgestellt. Im Anschluss werden Experimente erläutert, die als Kontrolle für funktionale ChIP-Chip-Analysen im Humansystem durchgeführt wurden. Im letzten Teil dieses Kapitels werden ChIP-Chip-Ergebnisse für die Pre-RC-Komponenten Orc2, Mcm3 und Cdt1 vorgestellt und erörtert.

4.3.1 Etablierung humaner ENCODE-Array-Analysen

Für die Analyse von Replikationsursprüngen im Human-Genom wurde der humane ENCODE-Array verwendet. Diese Mikroarray-Plattform bietet für die Analyse von Replikationsursprüngen mehrere Vorteile, die im Folgenden kurz beschrieben werden.

ENCODE steht für das Projekt „ENCyclopedia Of DNA Elements“. Ziel von ENCODE ist es, Genom-weit funktionale Elemente des Human-Genoms sowie des Transkriptom zu identifizieren und zu charakterisieren. In einem Pilotprojekt wurde 1% des Human-Genoms analysiert. Erste Ergebnisse wurden 2007 von einem aus mehreren Arbeitsgruppen bestehenden Forschungskonsortium veröffentlicht (Nature; The ENCODE Project Consortium). Darunter sind Daten über transkribierte Gene, Transkriptionsstartpunkte, Promotoren, Enhancer und Silencer, DNA-Replikations-Timing, DNA-Methylierungen, DNase-I-hypersensitive-Stellen und Chromatin-Modifikationen. Zudem werden alle Daten, die im Zuge des ENCODE-Projektes generiert werden, in einer Datenbank öffentlich zugänglich gemacht. Die Informationen des bereits kartierten 1% des Human-Genoms können genutzt und mit eigenen Daten verglichen werden.

Der ENCODE-Array bietet für die Analyse der Genom-weiten Pre-RC-Ausbildung einen weiteren großen Vorteil. Die Arbeitsgruppe um Marie Noelle Prioleau konnte auf dem ENCODE-Array durch Hybridisierung isolierter naszierender DNA (kurze DNA-Fragmente, die nur bei Aktivierung eines Replikationsursprunges entstehen) aktive Replikationsursprünge kartieren (Cadoret et al., 2008). Diese Daten können somit direkt mit den Hybridisierungsprofilen der Pre-RC-Komponenten Orc2, Mcm3, und Cdt1 verglichen werden.

Die ChIP-Chip-Experimente in den vorangegangenen Kapiteln sind alle auf dem EBV-Genom durchgeführt worden. Um zu überprüfen, ob das etablierte ChIP-Chip-Protokoll auch für Versuche auf dem humanen System geeignet ist, wurde vorab eine Hybridisierung mit einem bereits veröffentlichten Antikörper durchgeführt. Für dieses ChIP-Chip-Experiment wurde die nukleosomale Modifikation H3K4me3 in HeLa-Zellen gewählt. Diese Daten sind auf der ENCODE-Homepage einsehbar und mit den eigenen Daten direkt vergleichbar (Koch et al., 2007).

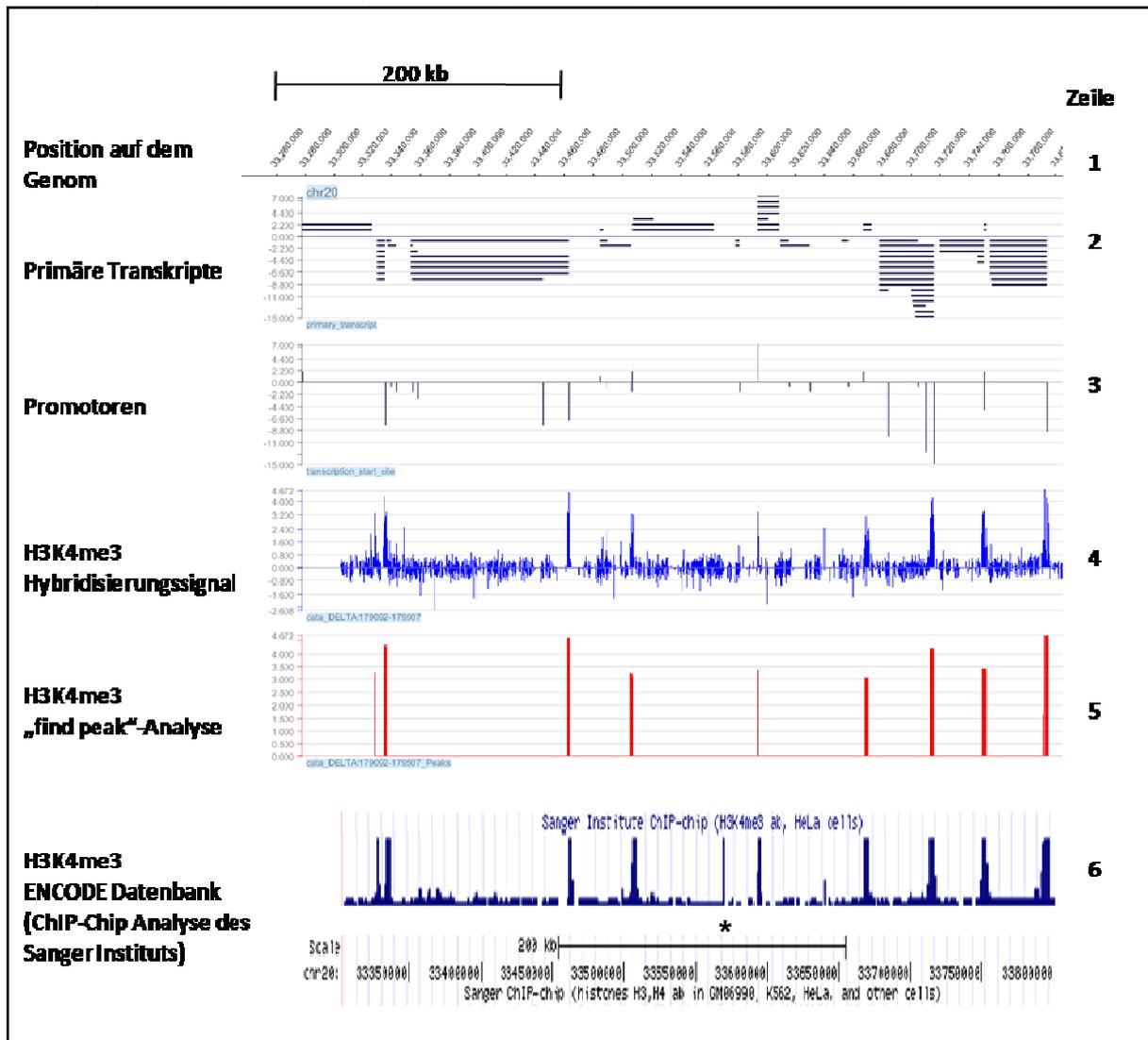


Abb.4.23: H3K4me3-Profil der humanen ENCODE-Region des Chromosoms 20 für HeLa-Zellen

Zeile 1: humane ENCODE-Region des Chromosoms 20 (chr20: 33,304,929bp-33,804,928bp); **Zeile 2:** bekannte Transkripte für die Region; **Zeile 3:** Promotoren als Balken dargestellt (Balken nach oben [unten] für Transkription auf dem oberen [unteren] DNA-Strang); **Zeile 4:** normalisiertes Signal für H3K4me3; **Zeile 5:** Genomregionen mit signifikanter Anreicherung für H3K4me3. Bioinformatisch mittels einer „find peak“ Option des Programms „SignalMap“ ermittelt (peak window size bei 500bp und threshold bei 1); **Zeile 6:** H3K4me3-Daten des ENCODE-Konsortiums. Datensatz: UCSC Genome Browser on Human Mar. 2006 Assembly (hg18) HeLa-H3K4me3. (<http://www.genome.ucsc.edu/ENCODE/encode.hg18.html>). (*) nicht identifizierte H3K4me3-Region.

Abb.4.23 zeigt die grafische Darstellung des H3K4me3 HeLa ChIP-Chip-Experimentes auf dem humanen ENCODE-Array. Die oberste Zeile enthält die Positionsangabe auf dem jeweils ausgewählten Chromosom in bp. Beispielhaft ist eine Region aus Chromosom 20 vergrößert dargestellt. Die zweite Zeile beinhaltet

die Annotationen der bisher identifizierten genomischen Transkripte der ausgewählten Region, wobei in Zeile 3 zusätzlich die Position der einzelnen Promotoren durch vertikale schwarze Balken gekennzeichnet ist. Ein Balken nach oben bedeutet Transkription im oberen DNA-Strang, ein Balken nach unten bedeutet Transkription im unteren DNA-Strang. In Zeile vier ist das primäre Hybridisierungssignal für H3K4me3 dargestellt (blau). Zeile fünf zeigt eine bioinformatische Analyse der Signale mit der „find peak“ Option des Programms „SignalMap“. Dieses Programm bietet die Möglichkeit Grenzwerte für Signalintensitäten festzulegen (threshold detection), um Signalanreicherungen leichter zu identifizieren. Dabei werden die Filterparameter Signalintensitätsgrenze (threshold) sowie Signalbreite (peak window: entspricht der Anzahl nebeneinander liegender Signalwerte) manuell bestimmt. Der Bereich, dessen Signalintensität durch die Filterung der „find peak“ Analyse als „angereichert“ erkannt wird, ist in Zeile 5 an der entsprechenden Position als Balken dargestellt. Höhe und Breite des Balkens werden automatisch, gemäß den Übereinstimmungen der gewählten „threshold detection“-Filter, vorgegeben.

Vergleicht man die identifizierten Promotorbereiche (Zeile 2 und 3) für den entsprechenden Abschnitt des Chromosoms 20 mit den Daten der H3K4me3-Hybridisierung des ENCODE-Konsortiums (Zeile 6) und meinem Hybridisierungsergebnis (Zeile 5), so zeigt sich eine eindeutige Übereinstimmung. Bis auf einen Signalpeak (*) stimmen alle identifizierten Regionen mit den publizierten Signalen überein. Der Vergleich weiterer ENCODE-Regionen zeigt ebenfalls eine klare Übereinstimmung (Daten nicht gezeigt). Desweiteren konnte die Lokalisation des Transkriptionsfaktors NC2 (Negative Cofactor 2) erfolgreich auf dem ENCODE-Array analysiert werden. NC2 wurde an multiplen Promotoren detektiert (Daten siehe Anhang Abb.9.3).

Das in dieser Dissertation etablierte ChIP-Chip-Protokoll ist somit auch für Analysen auf dem humanen ENCODE-Array geeignet.

4.3.2 Verteilung von Pre-RC-Bindestellen auf dem Human-Genom

In den folgenden humanen ENCODE ChIP-Chip-Experimenten wurden sowohl HeLa-Zellen als auch Raji-Zellen verwendet. Für das HeLa-Zellsystem liegen ENCODE-Daten für Bereiche aktiver Replikationsinitiation von Cadoret et al., 2008 und auch Daten des ENCODE-Konsortiums vor. Somit können identifizierte potentielle Pre-RC-Bindestellen im Kontext von Transkriptom, Replikations-Timing und Histon-Modifikationen analysiert und mit den Bereichen aktiver Replikationsinitiation verglichen werden.

Zudem wurden ChIP-Chip-Analysen mit den gleichen ChIP-Proben aus Raji-Zellen durchgeführt, die bereits mit dem EBV-PCR-Array und dem EBV-Oligonukleotid-Array in dem vorherigen Kapitel hybridisiert wurden. Diese Proben sollen das Pre-RC-Bindungsmuster in einem anderen Zellsystem zeigen.

Orc2- und Cdt1-Hybridisierungen für das HeLa-Zellsystem auf dem humanen ENCODE-Array

Tabelle 4.3 zeigt eine Übersicht der durchgeführten ChIP-Chip-Experimente für den humanen ENCODE-Array aus HeLa-Zellen.

Zellsystem	Hybridisierung	Doppelbestimmung
HeLa (G ₁)	IgG	✓ ✓
HeLa (G ₁)	Orc2	✓ ✓
HeLa (G ₁)	Cdt1	✓ ✓

Tabelle 4.3: Übersicht der HeLa ENCODE-Hybridisierungen

(✓ ✓) = biologische Replikate; es wurde HeLa G₁-Phase-Chromatin verwendet.

Für die Analyse der Positionen von Pre-Replikationskomplexen in HeLa-Zellen wurden diese für 24h mit 0,5mM Mimosin inkubiert (Abb.4.24 A). Mimosin ist eine pflanzliche Aminosäure, die bei 0,5mM die Zellen in der späten G₁-Phase arretiert, noch bevor an Origins eine Replikationsgabel ausgebildet wird (Krude, 1999). Das Chromatin wurde mittels Ultraschall auf Fragmentgrößen von 200-1600bp geschert (Abb.4.24 B). Chromatin-Immunpräzipitationen mit den Antikörpern IgG (Kaninchen IgG-Serum), Orc2 und Cdt1 erfolgten gemäß dem etablierten ChIP-Chip-Protokoll.

Die angereicherte Origin-DNA wurde am humanen Replikationsursprung HPRT mittels quantitativer-PCR überprüft. Der Bereich am HPRT-Gen wurde bereits 2002 von Cohen und Kollegen als aktiver Replikationsursprung beschrieben (siehe Abb.4.24 C; entnommen aus Cohen et al., 2002). Abb.4.24 D zeigt den Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen ChIP-Experimenten. Die Analysen bestätigen eine Anreicherung für Orc2 und Cdt1 an HPRT. Orc2 ist an Position HPRT7 um den Faktor 8,4 gegenüber Referenzposition HPRT2 und um den Faktor 5,3 gegenüber Referenzposition HPRT14 angereichert. Cdt1 an HPRT liegt um den Faktor 6,9 gegenüber HPRT2 und um den Faktor 4,3 gegenüber HPRT14 angereichert vor.

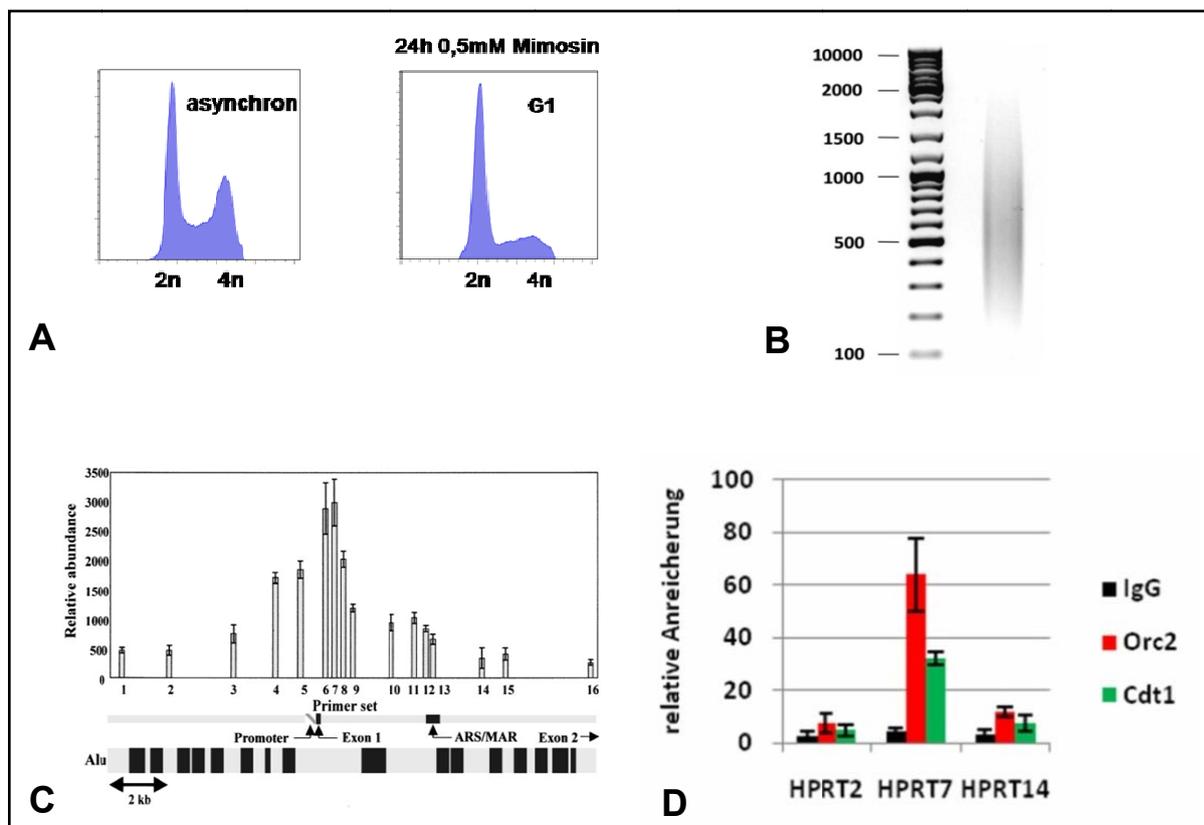


Abb.4.24: G₁-Phase Chromatin-Immunpräzipitation der Proteine Orc2 und Cdt1 aus HeLa-Zellen

- (A) **FACS-Profil für G₁-Phase-Block in HeLa-Zellen:** HeLa-Zellen wurden für 24h mit 0,5mM Mimosin in DMEM-Medium inkubiert.
- (B) **Ultraschall-Scherung von HeLa-Chromatin:** Formaldehyd fixiertes HeLa-Chromatin wurde 4x30 sek bei 35% Leistung sonifiziert; 1µg Chromatin wurde auf einem 1,4% DNA-Agarosegel aufgetrennt. DNA-Standard (DNA-Ladder Mix: 100bp–10000bp).
- (C) **Der humane HPRT-Origin:** Abbildung der Anreicherung naszierender DNA am humanen HPRT-Origin (Cohen et al., 2002). Die überprüften HPRT-Loci sind von 1 bis 16 nummeriert.
- (D) **Orc2 und Cdt1 am humanen HPRT-Origin:** Die Anreicherung isolierter DNA nach α-Orc2 und α-Cdt1 ChIP-Experimenten wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR am humanen HPRT-Origin (HPRT7) gegenüber den Referenzbereichen HPRT2 und HPRT14 überprüft (für Position siehe Bild C).

Je zwei Proben für Orc2 und Cdt1 wurden zusammen mit zwei unspezifischen IgG-Proben amplifiziert und auf den humanen ENCODE-Array hybridisiert. Die Signale in Abb.4.25 für Orc2 und Cdt1 (blau; Zeile 3 und 5) zeigen auf der ENCODE-Region des Chromosoms 20 im Vergleich zum Signalmuster von H3K3me3 keine diskrete Anreicherung. Mit der „find peak“ Analyse können bei hoch eingestellten Filtern sowohl für Orc2, als auch Cdt1, keine angereicherten Bereiche nachgewiesen werden. Bei weniger stringenten Filterparametern für Orc2 und Cdt1 sind schwache Anreicherungen zu identifizieren (Abb.4.25 Zeile 5 und 7). Da es von der Wahl der Filtereinstellungen abhängt, welche Signalintensitäten detektiert werden, kann die Anzahl der in Zeile 5 und 7 gezeigten Regionen nicht direkt miteinander verglichen werden. Generell entsprechen Bereiche mit rot gekennzeichnetem Balken eher den Filterkriterien der „find peak“ Option als Bereiche mit grauen Balken. Die identifizierten Regionen für Orc2 und Cdt1 zeigen insgesamt geringe Übereinstimmungen (Zeile 5 und 7). Für Orc2 wurden im analysierten Bereich des Chromosoms 20 zwölf Positionen (Zeile 5) als angereichert gewertet, für Cdt1 27 Positionen (Zeile 7). Es wurden nur drei Signalpositionen gefunden, die sowohl bei Orc2 als auch bei Cdt1 detektiert werden können (markiert mit *). Somit bleiben auf der ENCODE-Region des Chromosoms 20 für Orc2 neun und für Cdt1 vierundzwanzig Signale, die nicht miteinander korreliert werden können. Diese Diskrepanz erschwert die Analyse potentiell kolokalisierender Bindestellen. Zudem wirft sie die Frage auf, ob potentielle Origins mittels Orc2/Cdt1 ChIP-Chip-Experimenten effizient identifiziert werden können. Auch die Analyse weiterer ENCODE-Regionen zeigte keine signifikante Korrelation zwischen Orc2 und Cdt1 (Signalintensitäten für weitere ENCODE-Regionen sind nicht gezeigt).

Aufgrund der generell sehr homogenen Signalverteilung ohne signifikante Signalanreicherungen (Zeile 4 und 6) konnten keine Bereiche identifiziert werden, die eindeutig für einen positiven Referenzwert verwendet werden konnten. Vergleiche mit Replikationsursprüngen, für die Orc2 oder Cdt1 Anreicherungen bereits publiziert wurden, konnten nicht durchgeführt werden, da die ENCODE-Regionen keine dieser Origin-Regionen enthalten.

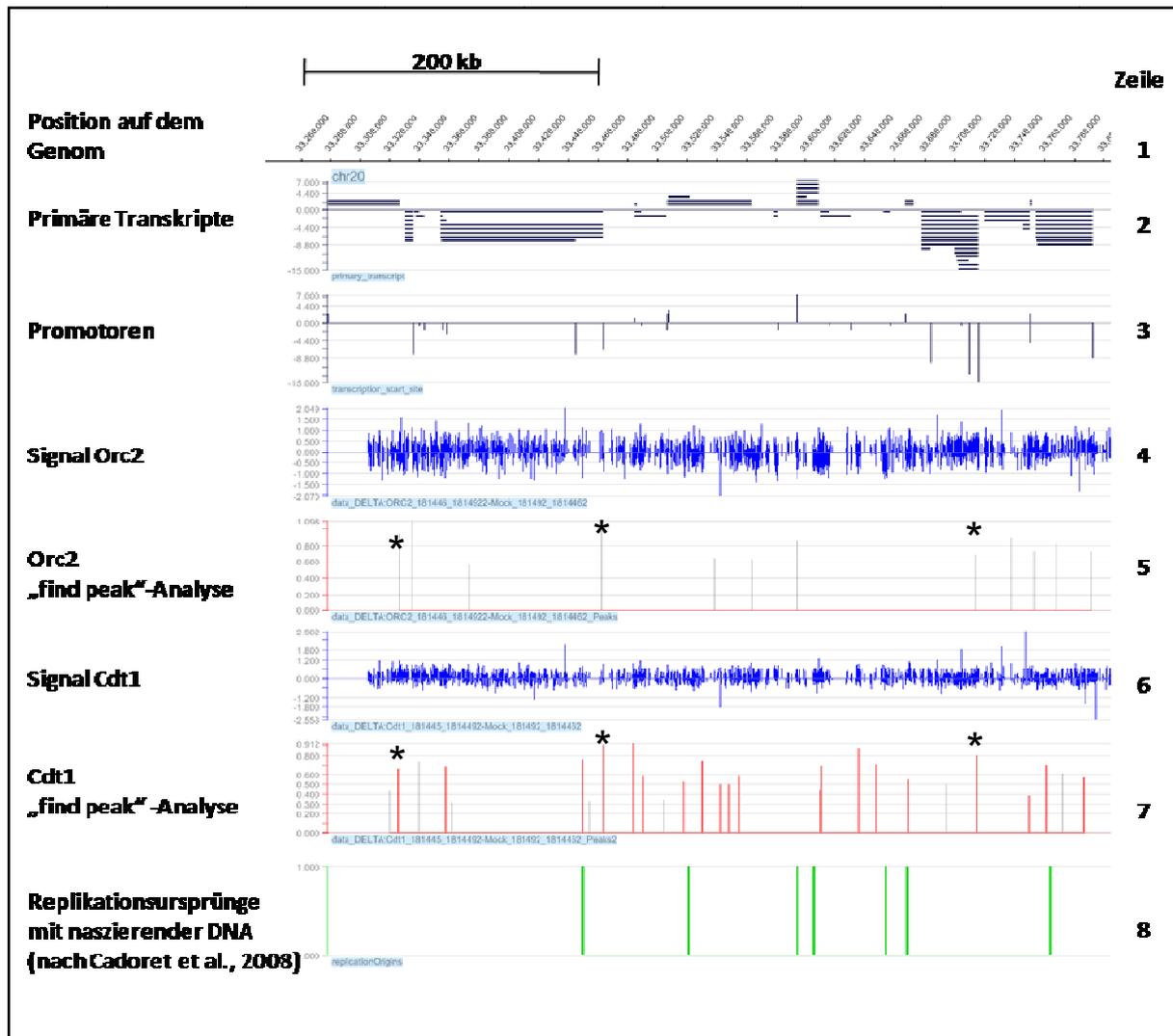


Abb.4.25: humane ENCODE-Hybridisierung für Orc2 und Cdt1 aus G₁-Phase HeLa-Zellen

Zeile 1: humane ENCODE-Region des Chromosoms 20 (chr20: 33,304,929bp-33,804,928bp); **Zeile 2:** bekannte Transkripte für die Region; **Zeile 3:** Promotoren als Balken dargestellt (Balken nach oben [unten] für Transkription auf dem oberen [unteren] DNA-Strang); **Zeile 4:** normalisiertes Signal für Orc2; **Zeile 5:** Genomregionen mit potentiellen Anreicherungen für Orc2 bioinformatisch mittels der „find peak“ Option des Programms „SignalMap“ ermittelt (peak window size bei 100bp und threshold bei 0,5); **Zeile 6:** normalisiertes Signal für Cdt1; **Zeile 7:** Genomregionen mit potentiellen Anreicherungen für Cdt1, bioinformatisch mittels der „find peak“ Option des Programms „SignalMap“ ermittelt (peak window size bei 100bp und threshold bei 0,3); **Zeile 8:** Replikationsinitiations-Bereiche nach Cadoret et al., 2008.

Des Weiteren wurde versucht, die Suche nach möglichen Signalanreicherungen innerhalb der Genom-weit homogen verteilten Signale anhand anderer Referenzen fortzusetzen. Als mögliche Referenzpositionen für Signalanreicherungen wurden Bereiche verwendet, die Cadoret et al. anhand von Analysen naszierender DNA identifiziert haben (Cadoret et al., 2008). Die publizierten Regionen wurden für weitere Analysen im Programm „SignalMap“ gekennzeichnet (Abb.4.25 Zeile 8) und die Signale für Orc2 und Cdt1 in der Umgebung dieser Bereiche genauer untersucht.

Eine Analyse der einzelnen Signale von Orc2 und Cdt1 an und in der Umgebung von Replikationsursprüngen mit naszierender DNA ergab, dass an diesen Regionen keine Signalintensitäten zu finden sind, die über dem Durchschnitt liegen. Auch die Überlagerung aller Signalintensitäten für Orc2 und Cdt1 an den Replikationsinitiationsstellen ergab keine detektierbare Anreicherung (Abb.4.25 - vgl. Zeile 8 mit Zeile 5 und 7).

Die Ergebnisse der Lokalisation von Orc2 und Cdt1 auf dem HeLa-Genom decken sich mit den Daten, die durch Genom-weite CHIP-Chip-Analysen für das Epstein-Barr-Virus gewonnen werden konnten. Auch in HeLa-Zellen erscheint die Position von Orc2 und Cdt1 relativ homogen verteilt. Dies deutet wie in EBV auf eine sehr flexible Ausbildung von Pre-Replikationskomplexen während der G₁-Phase hin.

Orc2-, Mcm3- und Cdt1-Hybridisierungen für das Raji-Zellsystem auf dem humanen ENCODE-Array

Um die Signifikanz der Signalverteilung für die Pre-RC-Komponenten in HeLa-Zellen besser beurteilen zu können, wurden die DNA-Proben für Orc2, Mcm3 und Cdt1 aus Raji-Zellen auf den humanen ENCODE-Array hybridisiert (siehe Tabelle 4.3).

Zellsystem	Hybridisierung	Doppelbestimmungen
Raji (G ₁)	IgG	✓ ✓
Raji (G ₁)	Orc2	✓ ✓
Raji (G ₁)	Mcm3	✓ ✓
Raji (G ₁)	Cdt1	✓ ✓

Tabelle 4.3: Übersicht der Raji ENCODE-Hybridisierungen

(✓ ✓) = biologische Replikate; entsprechen den Proben aus Abschnitt 4.2.2 (Tabelle 4.1).

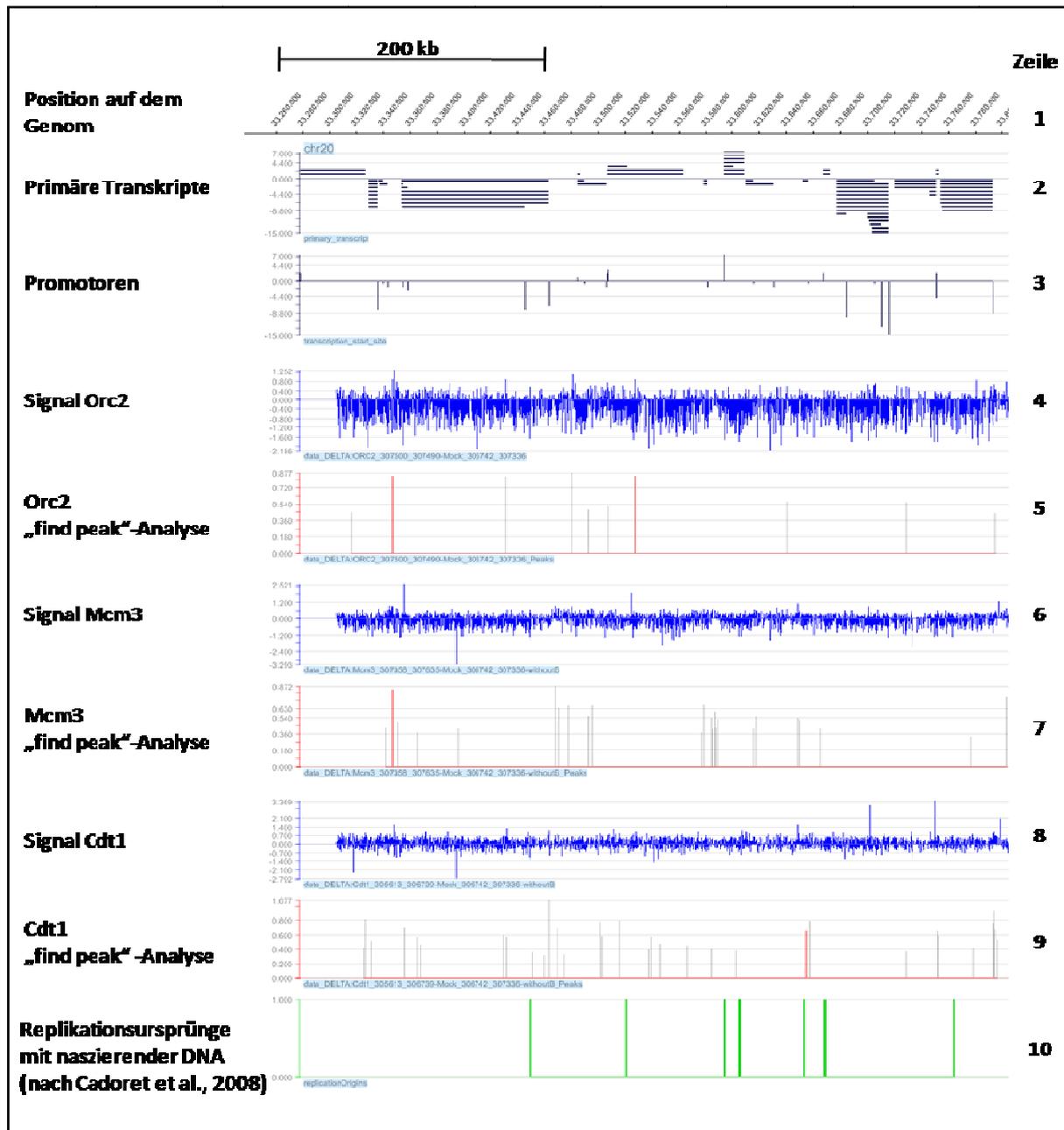


Abb.4.26: humane ENCODE-Hybridisierung für Orc2, Mcm3 und Cdt1 aus G₁-Phase Raji-Zellen

Zeile 1: humane ENCODE-Region des Chromosoms 20 (chr20: 33,304,929bp-33,804,928bp); **Zeile 2:** bekannte Transkripte für die Region; **Zeile 3:** Promotoren als Balken dargestellt (Balken nach oben [unten] für Transkription auf dem oberen [unteren] DNA-Strang); **Zeile 4:** normalisiertes Signal für Orc2; **Zeile 5:** Genomregionen mit potentiellen Anreicherungen für Orc2, bioinformatisch mittels der „find peak“ Option des Programms „SignalMap“ ermittelt (peak window size bei 100bp und threshold bei 0,3); **Zeile 6:** normalisiertes Signal für Mcm3; **Zeile 7:** Genomregionen mit potentiellen Anreicherungen für Mcm3, bioinformatisch mittels der „find peak“ Option des Programms „SignalMap“ ermittelt (peak window size bei 150bp und threshold bei 0,3); **Zeile 8:** normalisiertes Signal für Cdt1; **Zeile 9:** Genomregionen mit potentiellen Anreicherungen für Cdt1, bioinformatisch mittels der „find peak“ Option des Programms „SignalMap“ ermittelt (peak window size bei 150bp und threshold bei 0,3); **Zeile 10:** Replikationsinitiations-Bereiche nach Cadoret et al., 2008.

Anhand dieser DNA-Isolate konnte in EBV-ChIP-Chip-Experimenten der virale Replikationsursprung *oriP* erfolgreich detektiert werden (siehe Abschnitt 4.2). Diese Proben sind somit potentiell geeignet Pre-RC-Anreicherungen an Replikationsursprüngen zu identifizieren. Die Hybridisierungsprofile der Raji-Proben auf dem ENCODE-Array sind in Abb.4.26 dargestellt. Auch die Signalintensitäten für Orc2, Mcm3 und Cdt1 in Raji-Zellen erscheinen Genom-weit recht homogen verteilt (Zeile 4, 6 und 8). Die Gesamt-Signalintensitäten waren in Raji-Zellen niedriger als in HeLa-Zellen, daher wurden in der „find peak“ Option weniger stringente Filterparameter verwendet. Für Orc2, Mcm3 und Cdt1 werden aufgrund der niedrigen Filterparameter multiple Regionen angezeigt (Orc2 in Zeile 5, Mcm3 in Zeile 7 und Cdt1 in Zeile 9), die jedoch nicht miteinander kolokalisieren. Auch der Vergleich mit Regionen, die gemäß Cadoret et al. in HeLa-Zellen aktive Replikationsursprünge beinhalten, weist keine Signalübereinstimmung auf (vergleiche Zeile 10 mit Zeilen 5, 7 und 9).

Abschließend lässt sich sagen, dass während dieser Dissertation erfolgreich ChIP-Chip-Experimente für das Humansystem etabliert wurden. So konnte das bereits veröffentlichte Genom-weite Bindungsprofil der Histon-Modifikation H3K4me3 reproduziert und zudem der Transkriptionsfaktor NC2 an Promotoren nachgewiesen werden. Analog zu den ChIP-Chip-Experimenten in EBV zeigen die Genom-weiten Bindungsprofile für Orc2, Mcm3 und Cdt1 eine homogene Signalverteilung ohne signifikante Signalanreicherungen. Die bioinformatische Auswertung der Daten ergab, dass selbst bei wenig stringenten Filterbedingungen keine einheitlichen Signalübereinstimmungen detektiert werden können. Die Analyse der Genomregionen, für die von Cadoret und Kollegen aktive Replikationsinitiation beschrieben wurde (Cadoret et al., 2008), zeigte, dass die Signalintensitäten an diesen Bereichen dem Genom-weiten Signal-Basisniveau entsprechen. Weitere Analysen, die dem niedrigen Signal-Profil eine biologische Bedeutung zuweisen könnten, sind somit stark erschwert. Analog der These, die bereits im vorangegangenen Kapitel für die Replikation des Epstein-Barr-Virus postuliert wurde, kommt auch beim Menschen eine flexible und delokalisierte Ausbildung von Replikationskomplexen auf dem Genom in Betracht.

4.4 Die Ausbildung von Pre-RCs am viralen Replikator-Element DS in Abhängigkeit von der lokalen Chromatinstruktur

In Abschnitt 4.2. wurde die Genom-weite Ausbildung von potentiellen Replikationsursprüngen in EBV untersucht. Hierbei konnten auf dem EBV-Genom neben *oriP* keine weiteren Bereiche identifiziert werden, die eine eindeutige Pre-RC-Ausbildung aufweisen. Jedoch sind alle analysierten Pre-RC-Proteine am latenten Replikationsursprung *oriP* hoch angereichert nachzuweisen. *oriP* besitzt mit dem DS-Element (Dyad-Symmetry-Element) ein genetisch fixiertes Replikator-Element. An DS bindet der humane „Origin-Recognition-Complex“ durch direkte Protein-Protein Interaktionen. Diese spezifische Bindung wird durch die Proteine EBNA1 und TRF2 vermittelt, die sequenzspezifisch DS binden und somit als Helferproteine zur Ausbildung des Pre-RCs beitragen. Deshalb findet auch die Ausbildung des Pre-RCs lokal fixiert an DS statt. Das DS-Element stellt daher ein *bona fide* Origin-Modellsystem dar, um die lokale Entstehung von Pre-Replikationskomplexen zu studieren.

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Analyse von Faktoren, die sowohl zu einer regulierten Ausbildung des Pre-RCs in der G₁-Phase, als auch zu der Aktivierung des Pre-Replikationskomplexes in der S-Phase beitragen könnten. Zunächst wird das Bindungsverhalten der Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 während einzelner Zellzyklus-Phasen studiert. Danach wird der Fragestellung nachgegangen, ob die Rekrutierung der Replikationsproteine an DS durch Zellzyklus-abhängige Änderungen der lokalen Chromatinstrukturen begünstigt wird. Detailliert analysiert werden die Histon-Modifikationen H4ac, H4K8ac sowie H3K4me3, sowie der Chromatin-Remodeling-Faktor Snf2h.

4.4.1 Die Assoziation des Pre-RCs an das DS-Element in Abhängigkeit vom Zellzyklus

In diesem Abschnitt wird die lokale Ausbildung des Pre-RCs am DS-Element im Kontext verschiedener Zellzyklusphasen untersucht. Die Dynamik der Bindungen der Pre-RC-Komponenten Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 kann somit bei weiteren Zellzyklus-Experimenten mit potentiellen Mechanismen verglichen werden, die zur Assemblierung der einzelnen Komponenten unterstützend beitragen. Abb.4.27 zeigt schematisch den Aufbau des viralen Replikationsursprungs *oriP* mit den Elementen FR und DS. Die folgenden ChIP-Analysen wurden mit einem DS-spezifischen Primerpaar durchgeführt.

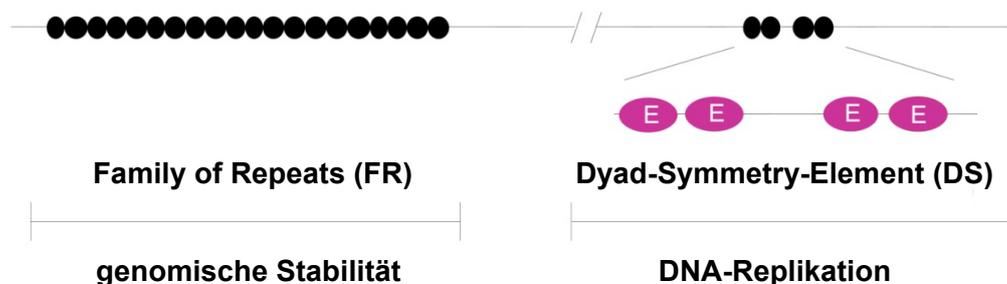


Abb.4.27: Der latente Replikationsursprung *oriP* des EBV

- FR:** Über das Element „Family of Repeats“ (FR) wird die genomische Stabilität des EBV-Genoms vermittelt. FR besitzt zwanzig Bindestellen für das virale Protein EBNA1 (schwarze Punkte). Indem EBNA1 auch an Wirtszell-Chromosomen bindet, können die EBV-Episomen während der Zellteilung stabil auf die Tochterzellen verteilt werden.
- DS:** Das „Dyad-Symmetry-Element“ (DS) vermittelt Replikationskompetenz. DS besitzt vier EBNA1-Bindestellen (E), wobei EBNA1 mit ORC interagieren und somit ORC an DS rekrutieren kann.

Wie in Kapitel 4.1.1 dargestellt, wurde eine logarithmisch wachsende Raji-Zellkultur durch Zentrifugal-Elutriation in Fraktionen aufgetrennt, die den Zellzyklusphasen G_1 , $G_1/(S)$ (G_1)/S, S, (S)/ G_2 und G_2/M entsprechen (Abb.4.3). Zunächst wurde die Assoziation der Pre-RC-Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 an das Dyad-Symmetry-Element mittels Chromatin-Immunpräzipitation bestimmt (Abb.4.28). Als Referenzregion wurde *oriLyt* gewählt, und als Beispiel für eine nicht Zellzyklus-regulierte DS-Proteinbindung wurde EBNA1 verwendet.

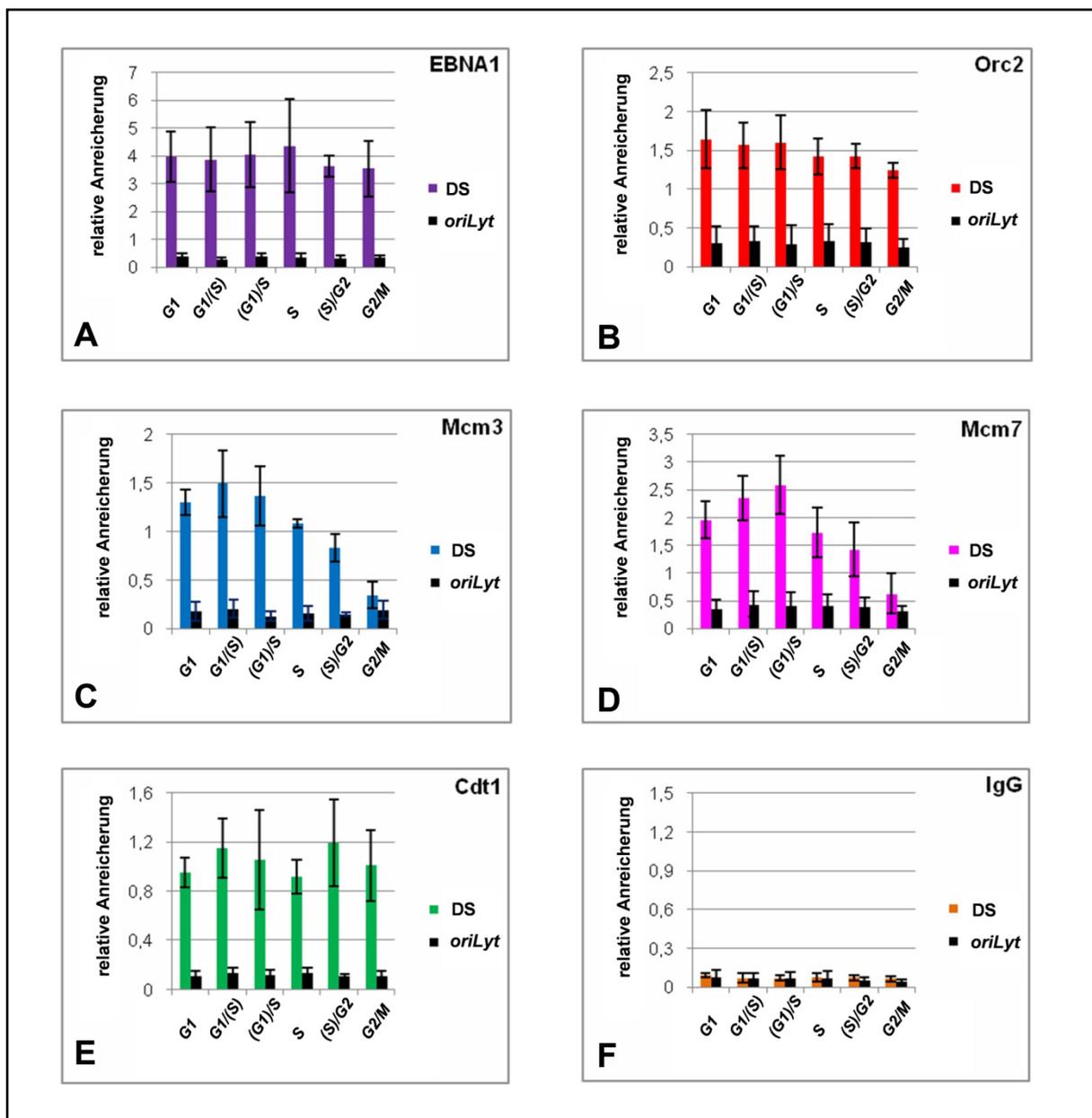


Abb.4.28: Zellzykluskinetik der humanen Pre-RC Komponenten Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 sowie des viralen Proteins EBNA1 an DS und *oriLyt*

- (A) **EBNA1 Zellzykluskinetik:** relative Anreicherung nach ChIP für EBNA1 an *oriP* und *oriLyt* in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus; Chromatin-Immunpräzipitationen aus elutrierten Raji-Zellfraktionen (G₁, G₁/(S), (G₁)/S, S, S/(G₂), G₂/M). Mittelwerte von mindestens drei voneinander unabhängigen biologischen Replikaten mit Standardabweichung.
- (B) **Orc2 Zellzykluskinetik:** relative Anreicherung für Orc2; Experiment wie in (A).
- (C) **Mcm3 Zellzykluskinetik:** relative Anreicherung für Mcm3; Experiment wie in (A).
- (D) **Mcm7 Zellzykluskinetik:** relative Anreicherung für Mcm7; Experiment wie in (A).
- (E) **Cdt1 Zellzykluskinetik:** relative Anreicherung für Cdt1; Experiment wie in (A).
- (F) **IgG Zellzykluskinetik:** relative Anreicherung für Kaninchen IgG; Experiment wie in (A).

EBNA1 zeigt über den gesamten Zellzyklus hinweg eine konstant hohe Anreicherung an DS gegenüber der Referenzregion *oriLyt* (Abb.4.28 A). Unerwartet für einen Replikationsursprung ist bei Orc2 keine bzw. nur eine geringe Zellzyklus-abhängige Bindung an *oriP* zu erkennen. Orc2 kann in jeder Zellzyklusphase an *oriP* signifikant angereichert gegenüber *oriLyt* detektiert werden (Abb.4.28 B). Überraschenderweise zeigt auch das Protein Cdt1 eine Zellzyklus-unabhängige Bindung an *oriP* (Abb.4.28 E). Cdt1 dient als Ladefaktor für den MCM2-7-Komplex. Wenn das Replikator-Element DS konstant mit ORC und Cdt1 besetzt ist, besteht die Möglichkeit, dass auch der MCM2-7-Komplex eine konstante DS-Assoziation aufweist. Die ChIP-Analysen für Mcm3 und Mcm7 ergeben jedoch eine Zellzyklus-abhängige Bindung der potentiellen Helikase (Abb.4.28 C, D). Mcm3 und Mcm7 zeigen in der G₁-Phase und am G₁/S Übergang – wie für einen lizenzierten Replikationsursprung erwartet – die höchsten Anreicherungs-werte. Während der anschließenden S- und G₂-Phase reduzieren sich die Werte annähernd auf das Niveau der Referenzregion *oriLyt*. In der IgG-Kontrolle (α-Kaninchen-IgG) ist weder für *oriP* noch für *oriLyt* eine signifikante Anreicherungen detektierbar. Für eine strikt Zellzyklus-regulierte Origin-Assoziation müsste sich die Anreicherung von Orc2 und Cdt1 an *oriP* in den Phasen nach erfolgter DNA-Replikation deutlich verringern, und wie bei Mcm3 und Mcm7 auf das Niveau des Referenzbereiches *oriLyt* absinken. Im Fall von Orc2 kann die konstante Anreicherung an *oriP* durch die direkte Interaktion des „Origin-Recognition-Complex“ mit EBNA1 erklärt werden. Eine konstante Anreicherung von Cdt1 an *oriP* ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Möglicherweise wird Cdt1 – wie auch Orc2 – über direkte Protein-Protein-Interaktion konstant an *oriP* gehalten. Als Bindungspartner kämen Orc2 oder EBNA1 in Betracht.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass der lokal fixierte Replikationsursprung *oriP* Zellzyklus-abhängig humane Pre-RCs ausbildet. Die Bindung des MCM2-7-Komplexes an *oriP* ist Zellzyklus-reguliert. EBNA1 bleibt als Helferprotein konstant an DS gebunden. Auch Orc2 und Cdt1 sind unabhängig von der Zellzyklus-Phase an DS nachzuweisen. Die These, dass Cdt1 konstant durch Protein-Protein Interaktion mit entweder Orc2 oder EBNA1 an *oriP* bindet, wird in Abschnitt 4.5 weiter untersucht.

4.4.2 Nukleosomen-Position und Chromatin-Remodeling an DS

Eine flexible Organisation des Chromatins ist für die Zugänglichkeit der DNA von großer Bedeutung. Durch Öffnen und Schließen lokaler Chromatinstrukturen werden Promotoren zugänglich für Transkriptionsfaktoren, was entscheidend zur Kontrolle der Genexpression beiträgt (Tabancay und Forsburg, 2006). Ähnliche regulatorische Mechanismen werden auch für den Aufbau von Replikationskomplexen auf der DNA postuliert. Im Folgenden werden am DS-Element die Position einzelner Nukleosomen sowie die Bedeutung des Remodeling-Faktors Snf2h analysiert.

Nukleosomen-Position an DS

Bereits im Jahr 2001 wurde beobachtet, dass das virale Protein EBNA1 am DS-Element Nukleosomen positioniert und somit die Chromatinstruktur beeinflusst (Avolio-Hunter et al., 2001). Im Jahr 2005 demonstrierten Zhou et al., dass das „Dyad-Symmetry-Element“ ein dynamisches Muster der flankierenden Nukleosomen aufweist. Diese werden durch zwei Paare von EBNA1-Proteinen positioniert, können aber spezifisch am G₁/S-Phase Übergang durch den Remodeling-Faktor Snf2h repositioniert werden (Zhou et al., 2005).

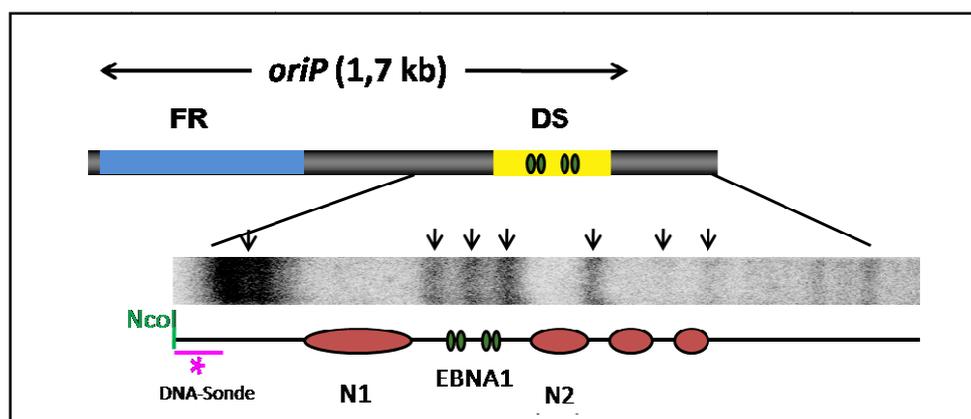


Abb.4.29: Nukleosomenpositionen an DS

Raji-Chromatin wurde für 5min bei 37°C mit 75U MNase inkubiert und die Proteine durch Proteinase-K-Behandlung entfernt. Dem folgte eine NcoI-Spaltung (NcoI: grün). Die DNA-Fragmente wurden für 12h bei 30V in einem 1,4% TBE-Agarosegel aufgetrennt und über Nacht auf eine Nylonmembran transferiert und abschließend mit einer P32-markierten DNA-Sonde (rosa) inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie. Das Schnittmuster der MNase ist in der Autoradiografie mit Pfeilen markiert. FR (blau), DS (gelb) sowie Nukleosomen-Position (rot) und EBNA1 (grün) sich schematisch dargestellt.

Abb.4.29 zeigt einen Nukleosomen-Footprint der Region an DS, der das Ergebnis von Zhou et al. bestätigt. Das Prinzip eines Nukleosomen-Footprints beruht auf der Eigenschaft des Enzyms MNase, spezifisch DNA zu schneiden, die nicht von Proteinkomplexen (in der Regel von Nukleosomen) besetzt ist. MNase gespaltene DNA-Fragmente werden isoliert, und das Schnittmuster zwischen den Nukleosomen mittels Southern Blot und Autoradiographie sichtbar gemacht.

Das DS-Element besitzt zwei Paare von EBNA1-Bindestellen. Je zwei EBNA1-Bindestellen erscheinen in diesem Footprint als Einheit und visualisieren das DS-Element. Sowohl zwischen den beiden EBNA1-Bindestellen als auch im 5'- und 3'-Bereich von DS sind Schnittstellen detektierbar (markiert mit Pfeilen). Die Region 5' von DS wird von Nukleosom N1 vor der Spaltung geschützt und weist keine Schnittstelle auf. Die Seite stromabwärts von DS wird von Nukleosom N2 geschützt, gefolgt von weiteren Nukleosomen (Abb.4.29).

Der Chromatin-Remodeling-Faktor Snf2h lokalisiert an DS

Snf2h ist eine zentrale ATPase der ISWI-Familie von Chromatin-Remodeling-Faktoren und ein potentieller Kandidat für die Mobilisierung von Nukleosomen an Origins (Zhou et al., 2005). Um diese Hypothese zu überprüfen sollten zunächst ChIP-Experimente für den Chromatin-Remodeling-Faktor Snf2h an *oriP* etabliert und im Folgenden Snf2h durch EBV-spezifische ChIP-Chip-Analysen mit weiteren potentiellen viralen Origins korreliert werden. In Kooperation mit Elisabeth Kremmer (Helmholtz Zentrum München) wurde ein Snf2h-spezifischer Antikörper hergestellt. Während der Antikörper-Etablierung wurde in Co-IP-Experimenten eine direkte Interaktion von Snf2h mit Cdt1 beobachtet (Abb.30 A). Diese Interaktion wurde inzwischen auch von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt (Sugimoto et al., 2008). Mit dem Antikörper konnte auch die Präsenz von Snf2h an *oriP* mittels ChIP-Analyse erfolgreich reproduziert werden (Abb.4.30 B). Snf2h ChIP-Chip-Experimente für Raji-G₁/S-Phase-Chromatin wurden als Replikat auf dem EBV-PCR-Mikroarray hybridisiert. Der Mittelwert der Signale wurde gegen den Mittelwert von IgG normalisiert.

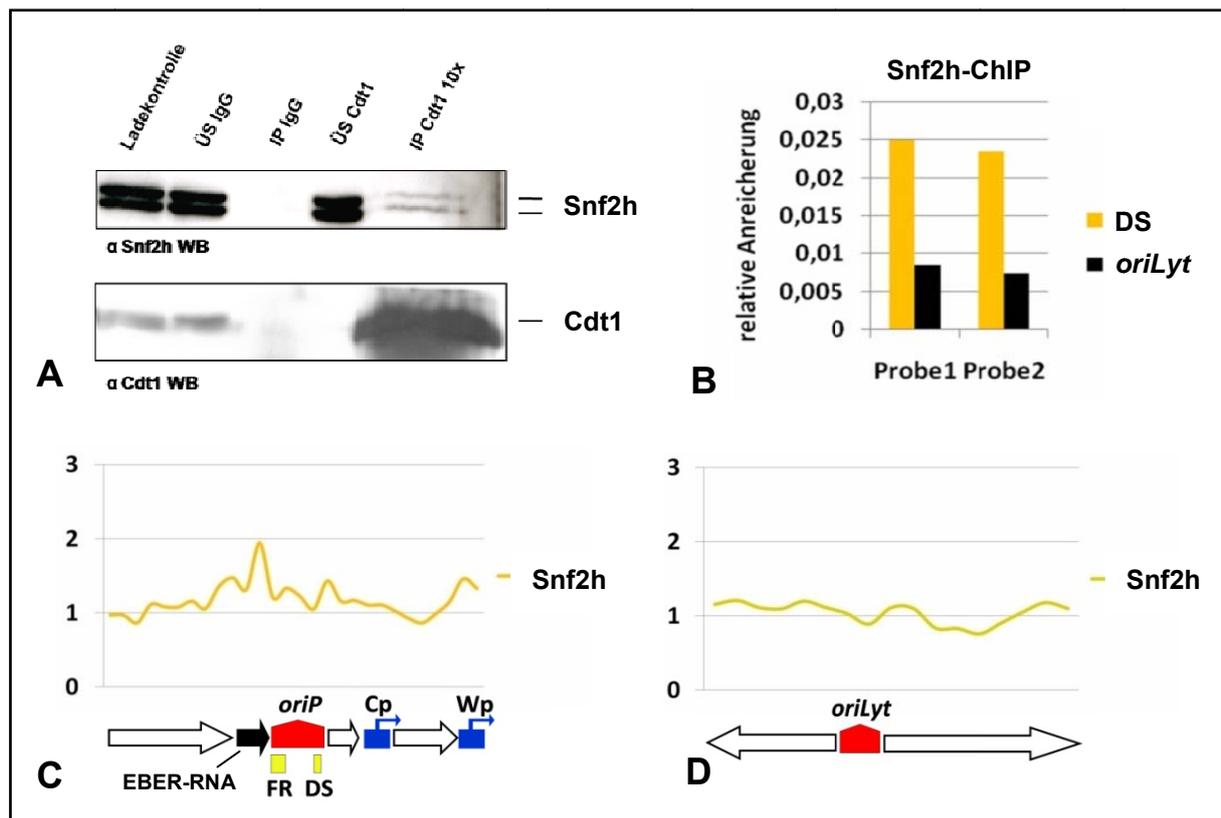


Abb.4.30: Snf2h interagiert mit Cdt1 und lokalisiert an *oriP*

- (A) **α-Cdt1-Immünpräzipitation:** IP aus 2×10^7 Raji-Zellen. **Spur Ladekontrolle:** entspricht 5×10^5 Zellen; **Spur ÜS IgG:** α-Kaninchen IgG, Überstand 5×10^5 Zellen; **Spur IP IgG:** α-Kaninchen IgG, IP 5×10^5 Zellen; **Spur ÜS Cdt1:** α-Cdt1, Überstand 5×10^5 Zellen; **Spur IP IgG:** α-Cdt1 IP, IP 5×10^6 Zellen.
- (B) **Snf2h-Anreicherung an *oriP*:** relative DNA-Anreicherung an *oriP* und *oriLyt* nach Chromatin-Immünpräzipitation von Snf2h; Biologische Replikate (Probe 1 und 2) aus G₁/S-Phase spezifischem Raji-Chromatin (Elutriationsfraktion: 50 ml/min). Quantitative Real-Time-PCR-Analyse vor PCR-Amplifikation.
- (C) **Snf2h in der G₁/S-Phase an *oriP* (EBV-PCR-Array)**
y-Achse entspricht der relativen Anreicherung; x-Achse entspricht der Position auf dem EBV PCR-Array. Schwarzer Pfeil: in Latenz transkribierte EBER-RNA. Weiße Pfeile: in Latenz nicht exprimierte Gene; rotes Fünfeck: *oriP*; blaue Quadrate: Promotoren Cp, Wp.
- (D) **Snf2h in der G₁/S-Phase an *oriLyt* (EBV-PCR-Array)**
Beschriftung wie in (C).

In Abb.4.30 C ist das ChIP-Chip-Signalprofil für Snf2h an *oriP* und in Abb.4.30 D an *oriLyt* dargestellt. Die Region an *oriP* weist zwei moderate Signalspitzen auf. Zum einen ist ein Signalanstieg 5' von *oriP* zu erkennen, der mit einem Bereich für EBER-RNA (EBV-encoded RNA) korreliert. EBER-RNA wird während der Latenz des EBV konstitutiv transkribiert (Felton-Edkins et al., 2006). Das ChIP-Chip-Ergebnis deutet darauf hin, dass Snf2h als aktiver Remodeling-Faktor zur konstanten Transkription der EBER-RNA beitragen könnte. Desweiteren ist eine kleine aber

signifikante Signalanreicherung 3' von DS zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass Snf2h spezifisch die Nukleosomen 3' von DS repositionieren könnte. Diese These steht im Einklang mit den Daten von Zhou und Kollegen (Zhou et al., 2005), in denen eine spezifische Repositionierung der Nukleosomen 3' von DS beobachtet wurde. Eine Genom-weite Korrelation von Snf2h mit weiteren potentiellen Origins auf dem EBV-Genom konnte nicht durchgeführt werden, da in den ChIP-Chip-Analysen (Abschnitt 4.2) keine Bereiche im EBV-Genom identifiziert werden konnten, die eine eindeutige Pre-RC-Ausbildung aufwiesen.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass das DS Element sowohl 5' als auch 3' von Nukleosomen besetzt ist, aber das DS-Element selbst Nukleosomen frei ist. Das in diesem Experiment vorgestellte Nukleosomen-Muster entspricht auch den Daten von Zhou et al., 2005. Des Weiteren konnte ein Snf2h-spezifischer Antikörper hergestellt werden, mit dem Snf2h an *oriP* nachgewiesen werden kann. Zudem wurde die Interaktion zwischen Snf2h und Cdt1 beobachtet. Das ChIP-Chip-Bindungsprofil für Snf2h im Bereich um *oriP* deutet an, dass Snf2h an der konstitutiven Transkription viraler EBER-RNA beteiligt sein könnte. Zudem deutet die Signalanreicherung für Snf2h an DS auf eine Beteiligung an der Nukleosomen-Repositionierung 3' von DS hin.

4.4.3 Histon-Modifikationen an DS

Zhou und Kollegen haben gezeigt, dass die Nukleosomen N1 und N2 im Zellzyklus flexibel an Histon H3 acetyliert bzw. deacetyliert werden können (Zhou et al., 2005). Eine spezifisch HDAC2-vermittelte H3-Deacetylierung wurde für die G₁/S-Phase beschrieben. Weiterhin konnte die Trimethylierung des Lysins4 an H3 (H3K4me₃) als DS-spezifische Nukleosomen-Modifikation nachgewiesen werden.

Im folgenden Abschnitt wurde mittels ChIP-Experimenten analysiert, ob auch flexible Acetylierungen für Histon H4 an DS-Nukleosomen nachzuweisen sind. Histon H4-Acetylierungen werden mit transkriptioneller Aktivierung (Tabancay und Forsburg, 2006) und mit aktiver Replikation (Aggarwal und Calvi, 2004) verbunden und könnten daher eine Rolle bei der Ausbildung von Pre-RCs spielen. Des Weiteren wurde die Modifikation H3K4me₃ sowohl an DS, als auch Genom-weit mittels ChIP-Chip-Analysen untersucht. Bereits mehrere Studien in unterschiedlichen Organismen

haben gezeigt, dass viele Replikationsursprünge in Regionen mit aktiven Promotern und hoher H3 Lysin4-Trimethylierung liegen (Cadoret et al., 2008; Sequeira-Mendes et al., 2009). Diese Modifikation könnte daher entweder einen direkten Einfluss auf die Etablierung von Replikationskomplexen besitzen, oder indirekt mit Chromatinstrukturen korrelieren, die die Ausbildung von Pre-RCs begünstigen.

Histon H4-Acetylierung an DS und *oriLyt*

Zur näheren Charakterisierung der Bedeutung einer Histon H4-Acetylierung (H4ac) für die DNA-Replikation an DS wurden zunächst ChIP-Experimente mit einem H4 Antikörper durchgeführt, der mehrere acetylierte Seitenketten erkennt. Um Acetylierungen zu identifizieren, die entweder zur Ausbildung eines Pre-RC in der G₁-Phase oder zur Aktivierung des Replikationskomplexes in der S-Phase beitragen können, wurden sechs unterschiedliche Raji-Zellzyklusphasen untersucht, die durch Zentrifugal-Elutriation isoliert wurden (G₁, G₁/S, (G₁)/S, S, (S)/G₂ und G₂/M). Abb.4.31 zeigt das Profil der Acetylierung von Histon-Untereinheit H4 während des Zellzyklus an dem DS-Nukleosom N2 und als Referenz an *oriLyt*.

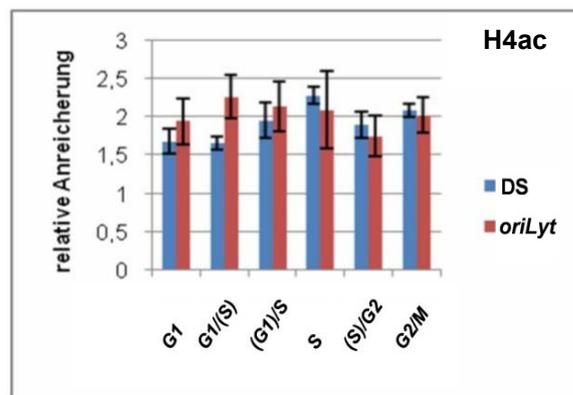


Abb.4.31: Zellzykluskinetik der Histon-Modifikation H4ac an *oriP* und *oriLyt*

Die Chromatinpräparation erfolgte aus elutrierten Raji-Zellfraktionen. Es wurden 250µg Chromatin je ChIP-Experiment und 2,5µg Antikörper H4ac eingesetzt. Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei biologisch unabhängigen Experimenten. Das Primepaar DS ist spezifisch für Nukleosom N2 an DS.

Nukleosom 2 weist in der S-Phase einen höheren Acetylierungsgrad an H4 auf als in der G₁-Phase auf (relative Anreicherung: G₁-Phase mit 1,7 gegenüber S-Phase mit 2,3). Das Niveau der H4-Acetylierung fällt in der späten S-Phase knapp unter das Niveau der S-Phase. *OriLyt* zeigt gegenüber *oriP* bereits in der frühen und

mittleren G₁-Phase eine stärkere Anreicherung von acetyliertem H4, die in G₁/S und S leicht abnimmt. Wie *oriP* zeigt auch *oriLyt* die geringste Anreicherung von acetyliertem H4 in der S/G₂-Phase und ebenfalls einen Anstieg in G₂. Die Zellzyklusdaten für die Acetylierung des DS-Nukleosom 2 lassen die Tendenz zu einer erhöhten Histon-H4-Acetylierung in der S-Phase erkennen. Jedoch zeigt auch *oriLyt* eine Zellzyklus-abhängige H4ac-Variation, die in der S-Phase am prägnantesten ist.

Der Antikörper H4ac erkennt mehrere acetylierte Seitenketten. Daher könnten G₁-Phase spezifische singuläre Acetylierungen für DS maskiert werden. Zudem sind bei der Analyse von H4-Acetylierungen an Replikationsursprüngen die einzelnen Modifikationen genauer zu differenzieren. Nach der DNA-Replikation werden sowohl parentale als auch neu synthetisierte Nukleosomen an DNA gebunden. Neu synthetisierte Histone H4 sind an den Lysinen K5 und K12 acetyliert (Tabancay und Forsburg, 2006). Diese Epitope werden auch von dem H4ac Antikörper erkannt. Somit könnten spezifisch Zellzyklus-regulierte aktivierende Modifikationen durch den Einbau neu synthetisierter Nukleosomen in der S-Phase nicht detektiert werden. Der Einbau acetylierter Nukleosomen nach DNA-Replikation könnte auch die Tendenz erhöhter H4-Acetylierung in der S-Phase erklären.

Histon H4 Lysin8-Acetylierung an DS und *oriLyt*

Als nächster Schritt wurde die Histon H4 Lysin8-Acetylierung (H4K8ac) untersucht. H4K8ac ist eine Modifikation, die sich nicht an neu synthetisierten Nukleosomen befindet, die direkt nach der DNA-Replikation eingebaut werden (Tabancay und Forsburg, 2006). Somit könnte eine potentielle Zellzyklus-abhängige Regulierung dieser Modifikation auch am G₁/S Übergang und während der S-Phase detektiert werden. Zudem ist H4K8ac ein aussichtsreicher Kandidat für Origin-spezifische Nukleosomen-Acetylierung, da diese Modifikation indirekt über den Histonacetyltransferase-Komplex ING5/Hbo1 mit der Etablierung und Aktivierung von Pre-RCs in Verbindung gebracht werden kann (Doyon et al., 2006). H4K8 wird durch ING5/Hbo1 acetyliert. Hbo1 ist eine spezifische Histon-H4-Acetyltransferase (HAT), die mit Orc1 (Hbo1: Histon Acetyltransferase Bound to QRC) und Mcm2 interagieren kann (Iizuka und Stillman, 1999; Burke et al., 2001).

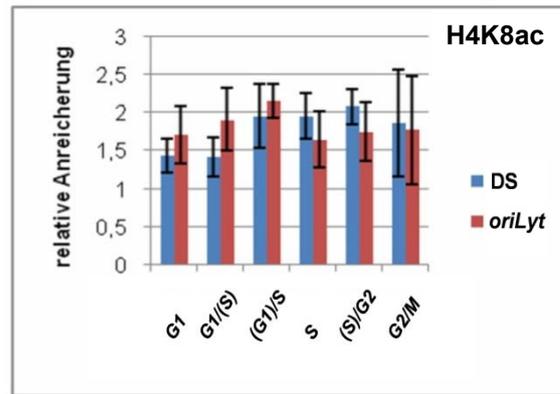


Abb.4.32: Zellzykluskinetik der Histon-Modifikation H4K8ac an DS und *oriLyt*

Die Chromatinpräparation erfolgte aus elutrierten Raji-Zellfraktionen. Es wurden 250µg Chromatin je CHIP-Experiment und 2,5µg Antikörper H4K8ac eingesetzt. Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Primerpaar DS ist spezifisch für Nukleosom N2 an DS.

Die Histon-Modifikation H4K8ac (Abb.4.32) an DS weist ein mit H4ac vergleichbares Zellzyklus-Profil auf. Die Acetylierung von H4K8 ist in der G₁/S gegenüber der G₁-Phase erhöht, und bleibt bis zum Ende der S-Phase nahezu konstant. *oriLyt* zeigt in der G₁- und G₁/S-Phase eine erhöhte Anreicherung.

Die Ergebnisse aus Abb.4.32 lassen keine klare Aussage über eine mögliche regulierte H4K8ac-Modifikation an DS zu. Für H4K8ac ist ab dem G₁/S-Übergang ein Anstieg zu erkennen, der auch weiter in der S und S/G₂ Phase erhalten bleibt. Dies könnte eine spezifische Modifikation darstellen, die auch zur Aktivität des Replikationsursprungs in der S-Phase beitragen könnte. Auch *oriLyt* weist eine Zellzyklus-abhängige Variation auf. Eine Analyse von Hbo1 konnte nicht durchgeführt werden. Kommerziell erhältliche Hbo1-Antikörper waren für ChIP-Experimente nicht geeignet.

Histon H3 Lysin4 Trimethylierung an DS und *oriLyt* sowie Genom-weit an EBV

Von EBV ist bereits bekannt, dass die Nukleosomen konstant am DS-Element durch eine Trimethylierung des Histons H3 an Lysin4 (H3K4me3) modifiziert sind (Zhou et al., 2005). Diese Daten konnten durch eigene ChIP-Experimente reproduziert werden (Abb.4.33). DS zeigt im Vergleich zu *oriLyt* eine konstant hohe Anreicherung von H3K4me3.

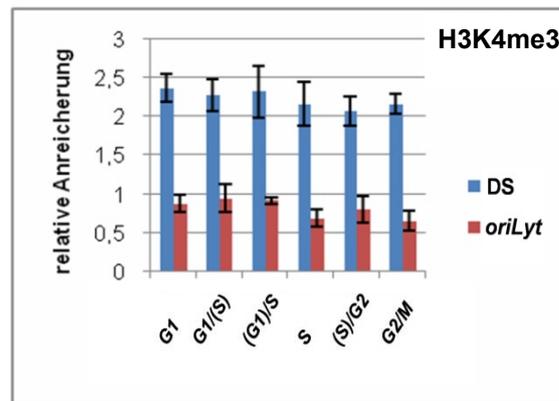


Abb.4.33: Zellzykluskinetik der Histon-Modifikation H3K4me3 an DS und *oriLyt*

Die Chromatinpräparation erfolgte aus elutrierten Raji-Zellfraktionen. Es wurden 250µg Chromatin je CHIP-Experiment und 2,5µg Antikörper H3K4me3 eingesetzt. Mittelwerte mit Standardabweichungen aus mindestens drei biologisch unabhängigen Experimenten. Das Primerpaar DS ist spezifisch für Nukleosom N2 an DS.

Anhand von EBV ChIP-Chip-Analysen sollte im Folgenden die Genom-weite Verbindung von H3K4me3 und Replikationsursprüngen genauer untersucht werden. Zentrifugale Elutriation, CHIP-Experiment auf G₁-Phase Chromatin und DNA Amplifikation erfolgten wie in Kapitel 4.1 beschrieben. Für die Analyse wurde ein EBV-PCR-Mikroarray verwendet. Abb.4.34 zeigt das Signal einer einzigen Hybridisierung für H3K4me3 mit einer Überlagerung für Orc2 und Mcm3 (A) und einer Überlagerung mit Cdt1 und EBNA1 (B). Das Signal für H3K4me3 wurde gegen die Probe IgG-1 normalisiert. Das Genom-weite Profil von H3K4me3 auf dem EBV-Genom zeigt sowohl für *oriP* als auch für den Q-Promoter eine deutliche Anreicherung. Das Signal an *oriLyt* liegt auf Basisniveau. Das Hybridisierungsprofil lässt erkennen, dass Nukleosomen an *oriP* H3K4me3 modifiziert vorliegen. Das H3K4me3 Signal erstreckt sich bis weit in den 5' Bereich von *oriP* hinein. Bereits 3' von *oriP* fällt das Signal auf Basisniveau. Neben *oriP* weist auch der Q-Promoter H3K4me3 modifizierte Nukleosomen auf. Zudem korreliert die Histon-Modifikation an Qp mit der Lokalisation von EBNA1 und dem Pre-RC-Protein Cdt1. Des Weiteren sind für H3K4me3 mehrere signifikante Signalanreicherungen 5' von *oriP* zu erkennen. Diese korrelieren mit der Promotorregion des Gens LMP1 sowie den annotierten genomischen Bereichen BNLF2B sowie BALF2 und einer bisher nicht annotierten Region. In diesen Bereich sind jedoch keine Anreicherungen für Pre-RC-Komponenten zu erkennen.

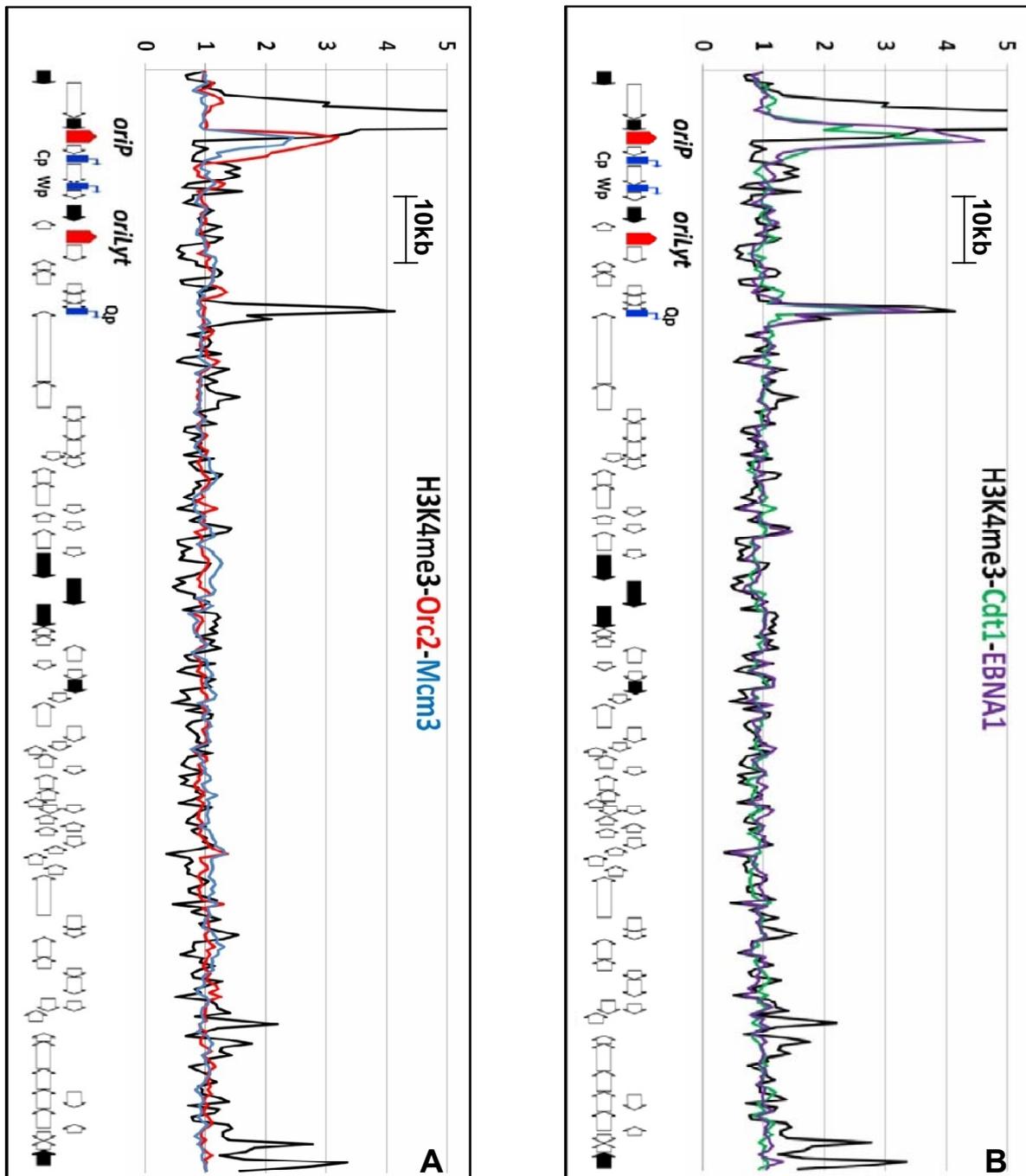


Abb.4.34: H3K4me3 in der G_1 -Phase auf dem EBV-Genom (EBV-PCR-Array)

- (A) normalisierte Signale für H3K4me3, Orc2 und Mcm3: y-Achse entspricht der relativen Anreicherung; x-Achse entspricht der Position auf dem EBV-PCR-Array. Schwarze Pfeile: in Latenz exprimierte Gene und EBER-RNA. Weiße Pfeile: in Latenz nicht exprimierte Gene; rote Fünfecke: *oriP* und *oriLyt*; blaue Quadrate: Promotoren Cp, Wp und Qp.
- (B) normalisierte Signale für H3K4me3, Cdt1 und EBNA1: Beschriftung wie (A).

Aus den in diesem Abschnitt beschriebenen Experimenten geht hervor, dass das Nukleosom N2 am 3'-Ende von DS während der S-Phase eine leicht erhöhte Gesamt-Acetylierung aufweist, die jedoch nicht mit der Ausbildung oder Aktivierung des Replikationsursprungs *oriP* korreliert werden kann. Der erhöhte Acetylierungszustand könnte auf den Einbau neu synthetisierter Nukleosomen während der DNA-Replikation zurückzuführen sein, die bereits durch Acetylierungen an K5 und K12 modifiziert sind. N2 zeigt weiterhin die Tendenz einer schwachen Zellzyklus-regulierten H4K8-Acetylierung. Diese ist in der G₁/S und S-Phase gegenüber der G₁-Phase erhöht. Eine ähnliche Tendenz ist jedoch auch für den Referenzbereich *oriLyt* zu verzeichnen. Des Weiteren zeigt das Nukleosom N2 an DS eine Zellzyklus-unabhängige H3-Lysin4-Trimethylierung. Genom-weite ChIP-Chip-Analysen bestätigen, dass H3K4me3 signifikant am Bereich *oriP* angereichert ist. Zudem ist H3K4me3 signifikant am Q-Promoter sowie an weiteren EBV-Regionen angereichert.

4.5 Der Q-Promoter: ein viraler Replikationsursprung

Im letzten Teil dieser Arbeit werden Beobachtungen aus den Abschnitten 4.2 und 4.4 aufgegriffen, die das Protein Cdt1 sowie den viralen Q-Promoter betreffen. Die Genom-weiten EBV ChIP-Chip-Analysen aus Abschnitt 4.2 zeigen, dass das virale Protein EBNA1 sowie das humane Pre-RC-Protein Cdt1 am Q-Promoter hoch angereichert vorliegen (Abb.4.14, 4.15, 4.20, 4.21; je A, D). Eine signifikante Signalüberlagerung für EBNA1 und Cdt1 wurde auch am FR-Element von *oriP* beobachtet (Abb.4.14, 4.15, 4.20, 4.21; je A, B). Zudem weist Cdt1 – wie EBNA1 – an DS keine Zellzyklus-regulierte Bindung auf (Abb.4.28). Dies lässt darauf schließen, dass Cdt1 möglicherweise mit EBNA1 interagiert und so an *oriP* und Qp gebunden wird. Diese These wird im nächsten Abschnitt überprüft.

Interaktion von EBNA1 mit Cdt1

In den Genom-weiten EBV Mikroarray-Experimenten weisen die Bindungsprofile für EBNA1 und Cdt1 große Übereinstimmungen auf. Vor allem an *oriP* und am Q-Promoter sind deutlich kolokalisierende Signalintensitäten zu erkennen. Um zu überprüfen, ob diese Signalähnlichkeit auf eine direkte Interaktion

zwischen EBNA1 und Cdt1 zurückzuführen ist, wurden Co-Immünpräzipitations-Versuche durchgeführt. Aus Raji-Kernextrakten wurden die Proteine EBNA1 und Cdt1 immunpräzipitiert und mittels Western-Blot überprüft, ob EBNA1 mit einem α -Cdt1-spezifischen Antikörper kopräzipitiert werden kann (Abb.4.35).

Die Spuren 1, 2 und 3 entsprechen Ladekontrollen. Die Spuren 4 (Üs) und 5 (Elu) zeigen die IgG Isotypkontrolle (α -Ratte-IgG) für den Ratten α -EBNA1 Antikörper. Die Spuren 6 (Üs) und 7 (Elu) zeigen die Präzipitation von EBNA1. Die Präzipitationseffizienz war nicht quantitativ, da EBNA1 noch im Überstand (Spur 6) detektiert werden kann, jedoch ausreichend, um EBNA1 nachweisbar zu präzipitieren (Spur 7). In den Spuren 8 und 9 sind der Überstand bzw. das Eluat der Kontroll-Immünpräzipitation geladen, welche mit einem Kontroll-IgG-Antikörper durchgeführt wurde. In den Spuren 10 und 11 sind der Überstand bzw. das Eluat der α -Cdt1 IP geladen. In Spur 11 kann mit Cdt1 kopräzipitiertes EBNA1 deutlich nachgewiesen werden.

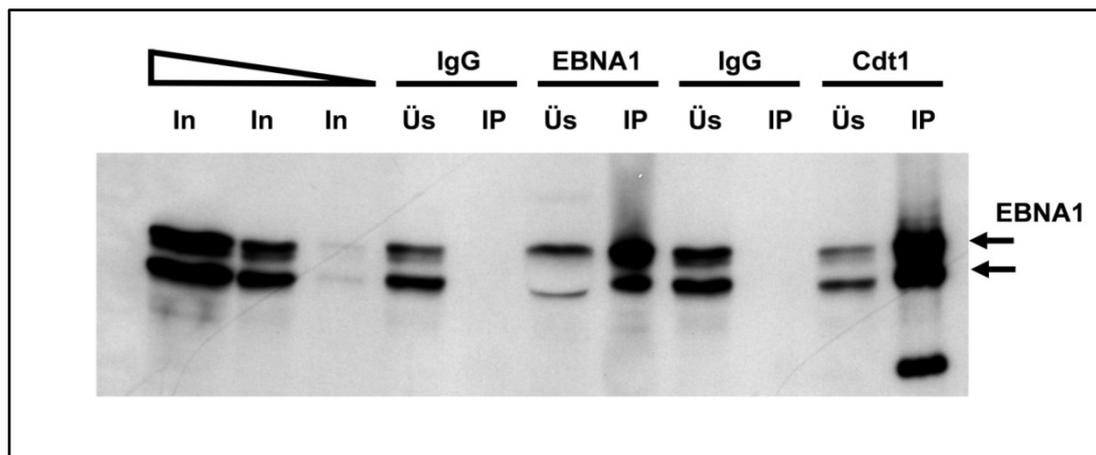


Abb.4.35: EBNA1 interagiert mit Cdt1

Für jede Immunpräzipitation wurden Raji-Kernextrakte aus 2×10^7 Zellen verwendet. **Spur 1:** Input aus 5×10^6 Zellen; **Spur 2:** Input aus 1×10^6 Zellen; **Spur 3:** Input: 1×10^5 Zellen; **Spur 4** Üs der IP mit Ratten-IgG aus 1×10^6 Zellen; **Spur 5:** Eluat der IP mit Ratten-IgG (IgG2a) aus 1×10^7 Zellen; **Spur 6:** Üs der α -EBNA1-IP (IgG2a) aus 1×10^6 Zellen; **Spur 7** Eluat der α -EBNA1-IP aus 1×10^7 Zellen; **Spur 8** Üs der IP mit einem Kaninchen IgG aus 1×10^6 Zellen; **Spur 9** Eluat der IP mit einem Kaninchen IgG aus 1×10^7 Zellen; **Spur 10** Üs der α -Cdt1-IP (Kaninchen IgG) aus 1×10^6 Zellen; **Spur 11** Eluat der α -Cdt1-IP aus 1×10^7 Zellen.

Das Co-Immünpräzipitationsexperiment zeigt, dass EBNA1 mit Cdt1 interagiert. Dies erklärt die Cdt1-Anreicherung an der „Family of Repeats“ in *oriP* und ebenfalls am Q-Promoter.

Replikationsinitiation am Q-Promoter

Mit EBNA1 und Cdt1 binden zwei Proteine an Qp, die für die virale DNA-Replikation von großer Bedeutung sind. Cdt1 fungiert zusammen mit ORC und Cdc6 als Ladekomplex für die putative Helikase MCM2-7. Des Weiteren kann EBNA1 durch Interaktion mit ORC (Chaudhuri et al 2001) zur Ausbildung eines Pre-RCs beitragen. Daher stellte sich die Frage, ob am Q-Promoter auch DNA-Replikation initiieren kann.

Um diese These zu überprüfen wurde naszierende DNA (nsDNA) aus Raji-Zellen isoliert. Zunächst wurde am humanen Replikationsursprung HPRT überprüft, dass naszierende DNA angereichert wurde, und dass die Proben auch für die Analyse viraler Replikationsinitiation geeignet waren (siehe Anhang Abb.9.4).

Daraufhin wurden die gleichen Raji-nsDNA-Isolate mit einer Auswahl von Primern für das EBV-Genom analysiert (Abb.4.36).

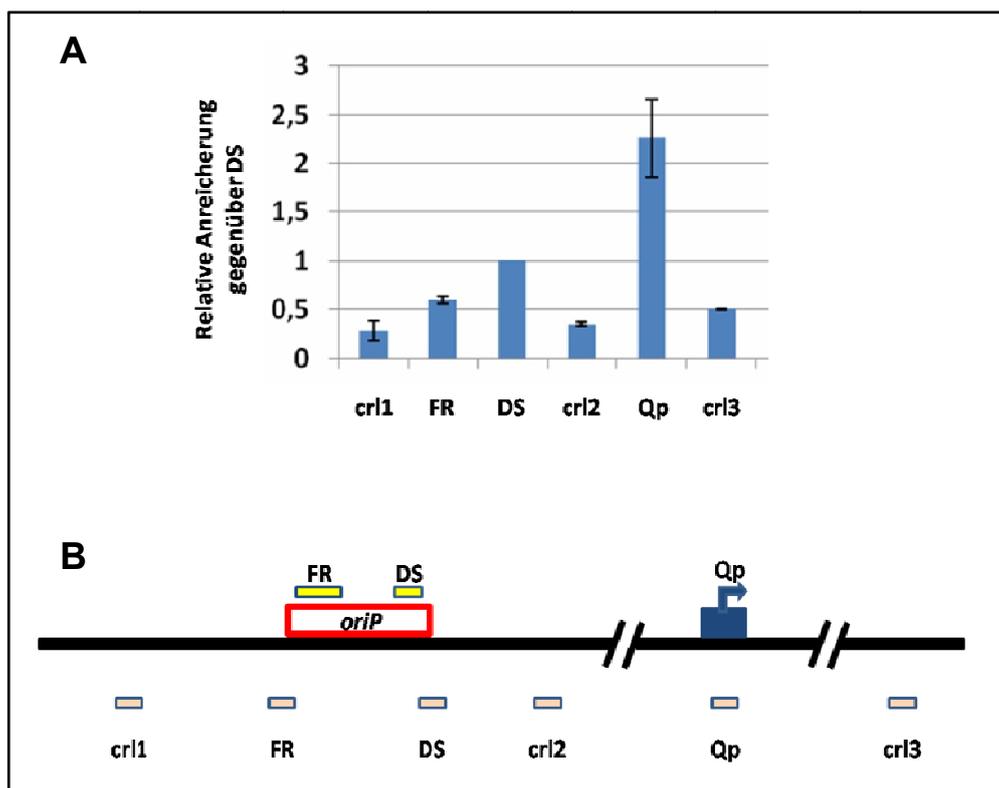


Abb.4.36: Naszierende DNA an Qp und DS

- (A) Quantitative Real-Time-PCR mit naszierender DNA:** Der Mittelwert der rel. Anreicherung naszierender DNA wurde für das DS-Element auf 1 gesetzt. Als Referenzregionen wurden die viralen Regionen crl1, FR, crl2 und crl3 verwendet.
- (B) Übersicht der Amplikons auf dem EBV-Genom:** schematisch ist ein Teil des EBV-Genoms mit der Lage der analysierten Genom-Bereiche dargestellt.

Hier wurden die Anreicherungen relativ zu DS (Wert 1) berechnet. DS zeigt gegenüber FR einen Anreicherungsfaktor von 1,7 und gegenüber den Referenzregionen *cr11* und *cr12* die Faktoren 3,6 bzw. 2,9. *cr13* liegt mit 1,7 ungefähr bei der Anreicherung wie an FR. Der Q-Promoter zeigt überraschend eine deutlich höhere Anreicherung naszierender DNA gegenüber dem DS-Element in *oriP* (Faktor 2,25). Dieses Ergebnis spricht für aktive Replikations-Initiation an Qp.

Replikationsinitiation an Qp ohne nachweisbare Pre-RC-Ausbildung

Der Q-Promoter weist eine signifikant hohe Anreicherung naszierender DNA auf, was dafür spricht, dass an oder in der Nähe von Qp ein aktiver Replikationskomplex die Initiation der DNA vermittelt. Betrachtet man jedoch die EBV-ChIP-Chip-Signalprofile an Qp, so lassen sich neben EBNA1 und Cdt1 keine weiteren Pre-RC-Proteine detektieren, deren Signalintensität über dem Genomweiten Basisniveau liegt (Abb.4.37 A).

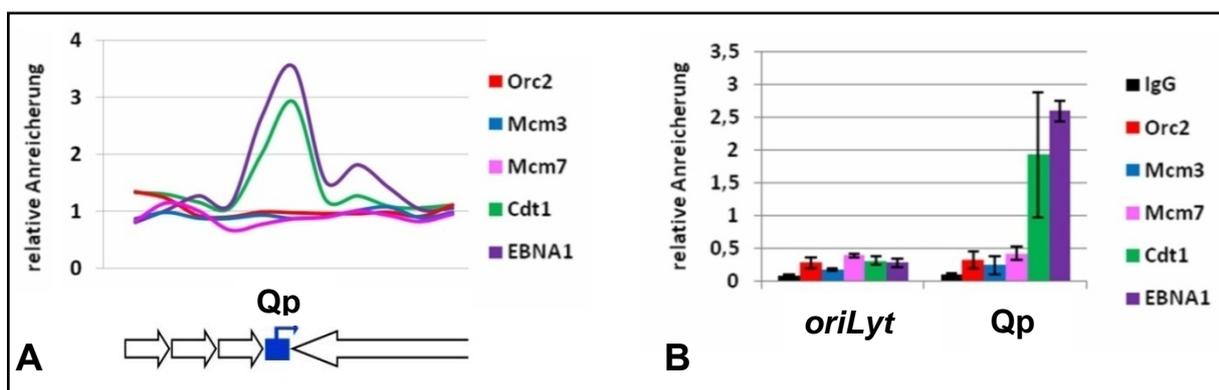


Abb.4.37: Nur EBNA1 und Cdt1 sind am Q-Promoter angereichert

- (A) Signalüberlagerung an Qp:** (EBV-PCR-Array) EBNA1 und Cdt1 zeigen ein überlappendes Signalprofil an Qp. Orc2, Mcm3 und Mcm7 sind nicht detektierbar.
- (B) ChIP-Analyse der Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 für Qp:** EBNA1 und Cdt1 können in Raji-Zellen am Q-Promoter nachgewiesen werden. Die Anreicherungswerte für Orc2, Mcm3 und Mcm7 an Qp liegen auf dem Niveau der Referenzposition *oriLyt*.

Um auszuschließen, dass die Sensitivität der ChIP-Chip-Experimente nicht ausreichend war, um weitere Pre-RC-Komponenten an Qp zu detektieren, wurden auch sensitivere Einzel-ChIP-Experimente durchgeführt. Unabhängig von den EBV-ChIP-Chip-Proben wurde Chromatin aus Raji-Zellen (G_1 -Phase) präpariert und

Einzel-ChIP-Experimente für Orc2, Mcm3, Mcm7, Cdt1 und EBNA1 durchgeführt. Diese qRT-PCR Analysen bestätigen die ChIP-Chip-Ergebnisse. Orc2, Mcm3 und Mcm7 sind nicht über dem Basisniveau, das exemplarisch durch *oriLyt* aufgezeigt wird, an Qp angereichert. EBNA1 und Cdt1 sind jedoch deutlich nachweisbar (Abb.4.37 B).

Die im letzten Abschnitt dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen die direkte Interaktion des viralen Proteins EBNA1 mit dem humanen Replikationsprotein Cdt1. Beide Proteine binden am viralen Q-Promoter, wobei Qp als aktiver Replikationsursprung identifiziert werden konnte. Qp weist eine wichtige Tendenz auf, die für die Genom-weite Interpretation der EBV- sowie humanen ChIP-Chip-Daten von großer Bedeutung ist. Trotz aktiver Replikationsinitiation können an Qp neben Cdt1 keine weiteren Pre-RC-Komponenten wie Orc2, Mcm3 und Mcm7 detektiert werden. Die Tatsache, dass an Qp keine Pre-RC-Ausbildung detektiert werden kann, führt zu der Hypothese, dass mittels ChIP und ChIP-Chip-Analysen nur Proteinpositionen nachgewiesen werden können, wenn diese lokal fixiert auf der DNA vorliegen. Im Fall von Qp ist der Nachweis von EBNA1 damit zu erklären, dass EBNA1 sequenzabhängig an lokal fixierte Bindestellen von Qp bindet. Auch Cdt1 kann daher mittels ChIP und ChIP-Chip detektiert werden, da es durch die Interaktion mit EBNA1 lokal fixiert an Qp vorliegt. Da für aktive Replikationsinitiation die Ausbildung eines Pre-Replikationskomplexes notwendig ist, könnte eine Genom-weit flexible Pre-RC-Bindung den Nachweis von weiteren Replikationsproteinen an Qp maskieren. Eine flexible und somit nicht lokal fixierte Ausbildung von Replikationskomplexen an DNA könnte erklären, warum auf dem EBV- und dem Human-Genom keine signifikanten Anreicherungen für Pre-Replikationskomplexe identifiziert werden können. Diese These wird Kapitel 5 anhand von möglichen Protein-Bindungsmodellen diskutiert.

5. Diskussion

In höheren Eukaryonten wie dem Menschen wurden bisher keine einheitlichen Kriterien identifiziert, die erklären könnten, warum DNA-Replikation an bestimmten Bereichen auf dem Genom initiiert. Dies liegt vor allem an der geringen Anzahl bisher bekannter DNA-Regionen, an denen Pre-RCs ausgebildet werden, sowie noch weitgehend unbekanntem Mechanismen, die Genom-weit zur Ausbildung von Replikationsursprüngen beitragen. Im Unterschied zu niederen Eukaryonten ist beim Menschen die DNA-Sequenz kein ausreichendes Kriterium um einen Replikationsursprung zu definieren. In der Literatur werden zusätzliche Parameter wie lokale Chromatinstrukturen, übergeordnete DNA-Topologie oder Helferproteine diskutiert, die zur Ausbildung von Replikationskomplexen auf der DNA beitragen.

In dieser Arbeit wurde die Pre-RC-Etablierung im Kontext lokaler Chromatinstrukturen am EBV-Replikationsursprung *oriP* studiert. Im folgenden Abschnitt wird anhand dieses Modell-Origins der potentielle Einfluss von Nukleosomen-Positionierung und Histon-Modifizierung auf die Etablierung von Replikationsursprüngen erörtert. Zudem wird am Beispiel des DNA-Bereiches zwischen *oriP* und dem viralen C-Promoter der Einfluss übergeordneter DNA-Topologie auf die Positionierung von Replikationskomplexen diskutiert.

Für die humane Pre-RC-Komponente Cdt1 konnte das virale Protein EBNA1 als Interaktionspartner identifiziert werden. Die Bedeutung von EBNA1 als Helferprotein für die Etablierung von Origins wird im Folgenden anhand von *oriP* sowie des neu identifizierten viralen Replikationsursprungs Q_p erörtert.

Desweiteren war es Ziel dieser Dissertation ChIP-Chip-Analysen zu etablieren, um auf dem EBV- sowie dem Human-Genom Binderegionen von Pre-Replikationskomplexen Genom-weit zu identifizieren. Die homogen verteilten ChIP-Chip-Signale lassen vermuten, dass die Etablierung von potentiellen Replikationsursprüngen sehr flexibel erfolgen kann. Diese Theorie wird anhand der Hybridisierungsprofile erörtert. Abschließend werden Modelle vorgestellt, die erklären könnten, warum Replikationsursprünge nicht oder nur unzureichend mit der ChIP-Chip-Technik identifiziert werden können.

5.1 Pre-RC-Dynamik und Chromatinstruktur an einem Modell-Origin

In höheren Eukaryonten sind die Mechanismen für die Lizenzierung und für die Aktivierung von Replikationsursprüngen noch weitgehend unverstanden. An bekannten Origins können durch die Analyse der Dynamik von Replikationskomplexen sowie dem Einfluss von Chromatin-Remodeling und Histon-Modifikationen mögliche Kriterien studiert werden, die dazu beitragen, Genom-weit Replikationsursprünge auszubilden.

DS ist in der Literatur als Origin beschrieben, der durch die Bindung von EBNA1 als Helferprotein lokal auf der DNA fixiert ist. EBNA1 interagiert mit ORC und führt so zur Rekrutierung weiterer Pre-RC-Proteine. Desweiteren trägt EBNA1 durch seine Fähigkeit, Nukleosomen zu positionieren, zur Ausbildung von Pre-RCs bei.

In dieser Arbeit wurde die Assoziation der Proteine EBNA1, Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 am EBV-Replikatorelement DS analysiert. Es zeigte sich, dass der Replikationsursprung DS während des Zellzyklus sowohl typische als auch atypische Replikationsprotein-Bindungen aufweist. Diese werden im Kontext von Pre-RC-Bindungen an weiteren Replikationsursprüngen erörtert.

Zudem werden anhand der in Kapitel 4 dargelegten Daten sowie der bestehenden Literatur der Einfluss lokaler Chromatin-Remodelierung und lokaler Histon-Modifizierung auf die Ausbildung eines Replikationsursprunges diskutiert.

5.1.1 Das DS-Element in *oriP* als Modell für eine Helferprotein-vermittelte Pre-RC-Ausbildung

Das DS-Element in *oriP* besitzt zwei Paar EBNA1-Bindestellen (Yates et al., 1984) an welche das virale Protein EBNA1 Zellzyklus-unabhängig gebunden ist (Ritzi et al., 2003). In dieser Arbeit konnte sowohl EBNA1 als auch Orc2 in jeder Zellzyklus-Phase hoch angereichert an DS detektiert werden (Abb.4.28 A, B). Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Ritzi et al. überein, dass Kernkomponenten des „Origin-Recognition-Complex“ (Orc2-5) konstant an DS gebunden vorliegen (Ritzi et al., 2003). ORC fungiert während der Lizenzierung eines Origins in der S-Phase als Plattform, um weitere Pre-RC-Komponenten zu laden

(Bell und Dutta, 2002; Blow und Dutta, 2005). Im Einklang mit dem Prinzip einer Zellzyklus-abhängigen Lizenzierung eines Origins wurde an eukaryonten Replikationsursprüngen bereits mehrfach eine Zellzyklus-abhängige ORC-Bindung beschrieben (Abdurashidova et al., 2003; McNairn et al., 2005; Gerhardt et al., 2006). Mittels ChIP-Experimenten lässt sich ORC nach der S-Phase nicht mehr an humanen Replikationsursprüngen nachweisen. Die Ausbildung eines Pre-Replikationskomplexes erfolgt demnach in jeder G₁-Phase aufs Neue.

Im scheinbaren Widerspruch zu dieser Zellzyklus-abhängigen Dynamik steht die konstante Präsenz von ORC an DS. Von Dahr und Kollegen wurde eine Protein-Protein-Interaktion von EBNA1 mit Orc2 beschrieben (Dhar et al., 2001). Es ist denkbar, dass diese Interaktion zusammen mit der konstanten Bindung von EBNA1 an DS für diese unerwartete Zellzyklus-Dynamik verantwortlich ist. Da ORC in jeder Zellzyklusphase konstant an DS nachzuweisen war, stellte sich die Frage, ob weitere Komponenten des Pre-RC ähnlich Zellzyklus-unabhängige DS-Bindung aufweisen. Im Folgenden wurde die Bindung der Pre-RC-Proteine Mcm3 und Mcm7 an DS studiert. Diese weisen – wie für die Lizenzierung eines Origins erwartet – eine Zellzyklus-abhängige Assoziation an DS auf (Abb.4.28 C, D). Es wurde bereits beschrieben, dass MCM2-7-Proteine für die kontinuierliche Bewegung der Replikationsgabel in der S-Phase benötigt werden (Aparicio et al., 1997; Labib et al., 2000). Auch die hier durchgeführten Experimente zeigen eine Abnahme von Mcm3 und Mcm7 in der S-Phase. Dies spricht dafür, dass beide Proteine mit Beginn der Aktivierung des Replikationsursprungs mobilisiert werden und sich der aktive Replikationskomplex auflöst. Dieses Ergebnis belegt, dass auch DS nur ein Mal pro Zellzyklus lizenziert wird, obwohl ORC2-5 konstant an DS gebunden bleibt.

Cdt1 zeigte an DS ebenfalls ein unerwartet Zellzyklus-unabhängiges Verhalten und konnte konstant an DS detektiert werden (Abb.4.28 E). Eine Zellzyklus-unabhängige Assoziation von Cdt1 an einen Origin ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Cdt1 kommt bei der Lizenzierung eines Origins eine entscheidende Rolle zu. Zusammen mit ORC und Cdc6 kann Cdt1 den MCM2-7-Komplex an Origins rekrutieren und somit einen Pre-RC etablieren. Die Assoziation von Cdt1 an DNA wurde von Maiorano und Kollegen als strikt ORC-abhängig beschrieben (Maiorano et al., 2000). Dies hat die Frage aufgeworfen, ob Cdt1 aufgrund der Interaktion mit ORC ebenfalls Zellzyklus-unabhängig an DS gebunden

wird. In EBV-ChIP-Chip-Experimenten konnte Cdt1 außer an *oriP* auch signifikant am Q-Promoter angereichert nachgewiesen werden (Abb.4.14, 4.20; je A, D). In weiteren ChIP-Chip- (Abb.4.11-4.13; je A, D und Abb.4.17-4.19; je A, D) sowie Einzel-Chip-Experimenten (Abb.4.37 B) konnte an Qp jedoch kein ORC detektiert werden, das die Lokalisation von Cdt1 an Qp erklären könnte. Qp wies aber eine signifikante EBNA1-Anreicherung auf (Abb.4.15, 4.21; je A, D). Dies ließ vermuten, dass die Kolo-kalisation von Cdt1 und EBNA1 auf eine direkte Interaktion beider Proteine zurückzuführen ist. Anhand von Ko-Immünpräzipitationen wurde im Folgenden die Interaktion von Cdt1 und EBNA1 bestätigt (Abb.4.35). Diese Interaktion ist in der Literatur bisher nicht beschrieben und legt neue interessante Mechanismen nahe, wie ein Pre-RC-Protein im EBV-Kontext und möglicherweise auch auf chromosomaler Ebene an Origins rekrutiert werden kann. Auf die Bedeutung der Cdt1-EBNA1 Interaktion, speziell für den viralen Q-Promoter als aktiven viralen Origin, wird im Abschnitt 5.3 gesondert eingegangen.

Es stellt sich im Folgenden die Frage, warum neben ORC auch Cdt1 konstant in jeder Zellzyklusphase an DS nachgewiesen werden kann. Cdt1 ist in der Literatur als Protein beschrieben, dem neben der Lizenzierung von Replikationsursprüngen auch eine wichtige Rolle bei der Verhinderung von Re-Replikation zukommt. Wurde die Replikation in der S-Phase initiiert, wird Cdt1 durch die Aktivität der S-Phase-CDKs phosphoryliert und in einem Ubiquitin-Ligase vermittelten Mechanismus durch das Proteasom abgebaut (Liu et al., 2004; Nishitani et al., 2006). Eine Reduktion des Cdt1-Niveaus an DS ist anhand der ChIP-Analysen nicht ersichtlich (Abb.4.28 E). Die ChIP-Experimente zeigten für Mcm3 und Mcm7 die erwartete Reduktion der Anreicherung an DS in den späten Zellzyklusphasen (Abb.4.28 C, D). Somit kann die konstante Cdt1-Präsenz an DS nicht durch unzureichende Zellzyklussynchronisation erklärt werden. Auch potentielle Kontaminationen mit EBV-DNA während der ChIP-Experimente, die eine Änderung der Anreicherung überdecken würden, können ausgeschlossen werden, da die Referenzposition *oriLyt* (Abb.4.28 E) sowie die IgG-Kontrolle (Abb.4.28 F) eine entsprechend niedrige Anreicherung aufweisen. Eine mögliche Erklärung für die Zellzyklus-unabhängige *oriP*-Assoziation von Cdt1 wäre, dass Cdt1 durch die Bindung an EBNA1 vor dem proteolytischen Abbau geschützt wird. Darüber hinaus kommt in den für diese Experimente verwendeten Raji-Zellen ein Defekt beim proteolytischen Abbau in Betracht, was eine Cdt1-Überexpression

zur Folge haben könnte und dadurch eine Überrepräsentation von Cdt1 an *oriP* erklären würde.

Das Dyad-Symmetry-Element stellt somit einen Origin-Typ dar, der durch EBNA1-DNA-Bindestellen lokal fixiert wird.

5.1.2 Chromatin-Dynamik an DS

In dieser Arbeit wurde weiterhin analysiert, ob lokale Änderungen in der Chromatinstruktur die Etablierung eines Replikationsursprunges beeinflussen können. Die Struktur des Chromatins hat Einfluss auf die Zugänglichkeit DNA-bindender Proteine. Dies ist auf dem Gebiet der Promotor-Regulation bisher am besten untersucht. Die Kombination von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren, Chromatin-Remodeling-Komplexen und Histon-Modifikationen können die Promotoraktivität flexibel regulieren. Analog zur Transkription stellte sich die Frage, ob ähnliche Prozesse auch für die Lizenzierung oder Aktivierung von Replikationsursprüngen genutzt werden.

Nukleosomen-Position und Chromatin-Remodeling an DS

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des ATP-abhängigen Chromatin-Remodeling-Faktors Snf2h auf die Lizenzierung von *oriP* und auf Genom-weit verteilte Replikationsursprünge in EBV analysiert werden. Snf2h ist bereits von Zhou und Kollegen als aktiver Chromatin-Remodeling-Faktor charakterisiert worden, dem bei der Lizenzierung von *oriP* während der G₁-Phase eine entscheidende Rolle zukommt (Zhou et al., 2005). Mit einem für ChIP und ChIP-Chip-Analysen etablierten monoklonalen Antikörper konnte Snf2h in der G₁-Phase ebenfalls an DS detektiert werden (Abb.4.30 B). Die isolierte DNA zeigte an DS jedoch eine sehr geringe Anreicherung. Diese ist möglicherweise auf eine ineffiziente Epitop-Erkennung des etablierten monoklonalen Ratten-Antikörpers bei ChIP-Experimenten zurückzuführen. Die niedrige Anreicherung Snf2h gebundener DNA-Bereiche spiegelte sich auch in dem Bindungsprofil der ChIP-Chip-Analyse wieder. Trotz der geringen Signalwerte sind für den Remodeling-Faktor Snf2h Positionen an *oriP* detektierbar, die eine signifikante Anreicherung gegenüber dem Genom-weiten Basisniveau zeigen (Abb.4.30 C, D).

Aufgrund der Unschärfe der Signalprofile des EBV-PCR-Arrays sowie der geringen Anreicherung von Snf2h können die Positionen nicht detaillierter bestimmt werden. Eine signifikante Snf2h-Anreicherung kann stromaufwärts von FR detektiert werden. Dieses Signal korreliert mit der Position von EBER-RNA Transkripten. EBER-RNA trägt zur Aufrechterhaltung der latenten Phase von EBV bei und wird kontinuierlich transkribiert (Felton-Edkins et al., 2006). Das Signalprofil lässt vermuten, dass Snf2h auch zur Nukleosomen-Mobilisierung im Bereich der EBER-RNA beiträgt. Desweiteren kann eine moderate Signalspitze 3' von DS detektiert werden. Eine Anreicherung an dieser Position korreliert mit der Beobachtung von Zhou und Kollegen, die eine Mobilisierung des Nukleosoms stromabwärts von DS in der G₁/S-Phase beschreiben (Zhou et al., 2005).

Die durch ChIP- und ChIP-Chip-Analysen erworbene Datenlage reicht nicht aus, um die Bedeutung des Remodeling-Faktors Snf2h Genom-weit für EBV weiter zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurde Cdt1 als Protein identifiziert, das mit Snf2h interagiert (Abb.4.30 A). Diese Interaktion wurde ebenfalls in einer anderen Arbeitsgruppe detektiert und publiziert (Sugimoto et al., 2008). Denkbar wäre, dass Snf2h über Cdt1 an DS rekrutiert wird, dort die Chromatinstruktur durch Mobilisierung der Nukleosomen an DS öffnet und so die Assoziation des MCM2-7-Komplexes ermöglicht.

Um die Bedeutung einer Snf2h vermittelten Lizenzierung oder Aktivierung von Replikationsursprüngen in EBV detaillierter zu charakterisieren, sollten ChIP-Chip-Analysen mit einem effizienteren Snf2h-Antikörper und einem sensitiveren DNA-Mikroarray wiederholt werden.

Histon-Modifikationen an DS

Neben Nukleosomen-Remodeling besteht die Möglichkeit, dass Lizenzierung und Aktivierung von Replikationsursprüngen über die Regulation des Chromatinzustandes durch aktivierende Histon-Modifikationen erfolgt.

Eine Beziehung zwischen Histon-Acetylierung und Replikationsaktivierung wurde in der Literatur bereits mehrfach postuliert. Aggarwal und Kollegen berichten, dass in *Drosophila* durch Histon-Acetylierung die Replikationseffizienz am Chorion-Origin verstärkt wurde, wohingegen eine Deacetylierung die Replikationsinitiation reprimiert (Aggarwal und Calvi, 2004). Desweiteren konnten durch Analysen der

Histon modifizierenden Enzyme (HAT: „histone acetyl transferase“ und HDAC: „histone deacetylase“) Verbindungen zur DNA-Replikation aufgezeigt werden. Werden Histon-Acetyltransferasen an Replikationsursprünge von Hefe (Vogelauer et al., 2002) und des Polyoma Virus (Xie et al., 2002) geleitet, so kann die Replikationseffizienz gesteigert werden. Ein Kandidat, der im humanen System eine Verbindung zwischen Histon-Acetylierung und Origin-Lizensierung darstellt, ist die Histon-Acetyltransferase Hbo1 (Hbo1: „histone acetyltransferase binding to Orc1“). Hbo1 interagiert mit Orc1 und Mcm2 (Iizuka und Stillman, 1999; Burke et al., 2001). Zudem wird die Funktion von Hbo1 benötigt, um den MCM2-7-Komplex effektiv an Replikationsursprünge zu rekrutieren. Hbo1 kann im Komplex mit ING5 (ING: inhibition of growth) das Lysin 8 des Histons H4 acetylieren (Doyon et al., 2006). Wird ING5 depletiert, kann kein BrdU Einbau mehr detektiert werden. Dies spricht für eine essentielle Rolle des Hbo1/ING5 Komplexes für die DNA-Replikation. Um zu überprüfen, ob Hbo1/ING5 zur Lizensierung von *oriP* beiträgt, wurden ChIP-Zellzyklusanalysen der Histon-Modifikation H4 pan (gesamte H4-Acetylierung) und H4K8ac durchgeführt. Die relativen Anreicherungen sowohl der H4-gesamt-Acetylierung als auch der Hbo1/ING5 spezifischen H4K8ac zeigen keine signifikanten Änderungen in der G₁- oder G₁/S-Phase (Abb.4.31 und Abb.4.32). Die Daten lassen vermuten, dass Hbo1 nicht durch H4 spezifische Histon-Acetylierung zur Lizensierung oder Aktivierung von *oriP* beiträgt.

Auch die Methylierung von H3K4 wurde in der Literatur bereits als Histon-Modifikation beschrieben, die mit der Position von Replikationsursprüngen korrelieren kann. Die Histone am EBV-Replikator-Element DS liegen konstant H3K4me₃ modifiziert vor (Zhou et al., 2005). Auch im humanen System wurde bereits eine Korrelation von aktiver Replikationsinitiation und H3K4me₃ beschrieben. Anhand von DNA-Mikroarray-Experimenten mit isolierter naszierender DNA konnten Cadoret und Kollegen 283 Bereiche identifizieren, die aktive Replikationsinitiation aufweisen. Die Hälfte dieser Bereiche wiesen auch H3K4me₃-Modifikationen auf (Cadoret et al., 2008).

H3K4me₃ wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl spezifisch an DS als auch Genom-weit auf dem EBV- und dem Human-Genom analysiert. Die Zellzyklus-Analysen an DS bestätigen die Beobachtung von Zhou und Kollegen. H3K4me₃ kann in jeder Zellzyklus-Phase konstant hoch angereichert an DS detektiert werden

(Abb.4.33). Zudem zeigten die Genom-weiten ChIP-Chip-Experimente eine signifikante H3K4me3 Anreicherung am Q-Promoter (Abb.4.34). Durch die Analyse naszierender DNA wurde Qp als Bereich aktiver Replikationsinitiation identifiziert (Abb.4.36). Ein direkter Beitrag von H3K4me3 zur Etablierung von Replikationsursprüngen ist bisher in der Literatur für höhere Eukaryonten nicht beschrieben. Kan und Kollegen konnten jedoch in *S. cerevisiae* zeigen, dass Bäckerhefe-ORC direkt mit K3K4me3-modifizierten Histonen interagieren kann (Kan et al., 2008). Die gleiche Gruppe zeigte, dass ScORC mit Spp1, einer Untereinheit der Histon-Methyltransferase Set1 interagieren kann. Zudem berichteten sie, dass der humane ORC-Komplex mit dem *S. cerevisiae* Homolog von Spp1, hCGBP (CpG island-binding protein), interagieren kann (Kan et al., 2008).

Diese Erkenntnisse sowie die an *oriP* und Qp gewonnenen Daten legen somit einen Beitrag von H3K4me3 zur Lokalisation von ORC und der Etablierung von Replikationsursprüngen nahe.

5.2 Die DNA-Struktur zwischen FR und Cp begünstigt die Ausbildung von Replikationskomplexen

Anhand von ChIP-Chip-Experimenten sollte in dieser Arbeit die Genom-weite Verteilung von Pre-RCs auf dem EBV-Genom in Raji-Zellen bestimmt werden. Dies eröffnete auch die Möglichkeit, die Positionierung der einzelnen Pre-RC-Komponenten an *oriP* im Detail zu studieren. Der Bereich zwischen der „Family of Repeats“ und dem C-Promoter wies bei allen analysierten Proben deutliche Signale auf, deren Positionen sich entweder signifikant ähnelten oder voneinander unterschieden. In Abbildung 5.1 sind die Elemente „Family of Repeats“, „Dyad-Symmetry-Element“, Rep* und der C-Promoter vergrößert dargestellt. Die Funktion dieser Elemente wird im Folgenden im Kontext der Signalüberlagerungen für Orc2/Mcm3, Cdt1/EBNA1 und Mcm3/Mcm7 erörtert.

Am FR-Element können die Proteine EBNA1 und Cdt1 hoch angereichert detektiert werden, wobei weitere Pre-RC-Proteine wie Orc2, Mcm3 und Mcm7 keine Bindung aufweisen. Das FR-Element besitzt 20 EBNA1 Bindestellen. Leight und Sugden berichten, dass FR in Plasmid-Replikations-Experimenten nicht zur DNA-Replikation beiträgt (Leight und Sugden, 2001). Es wird vermutet, dass der Abstand

der einzelnen EBNA1-Bindestellen (30bp in FR statt 21bp in DS) für aktive DNA-Replikation nicht geeignet ist (Harrison et al., 1994). Diese Aussagen werden durch die Bindungsprofile von Orc2, Mcm3 und Mcm7 gestützt, da sie an FR nicht detektiert werden können. Die Präsenz von Cdt1 ist auf die direkte Interaktion mit EBNA1 zurückzuführen und scheint an FR nicht zur Replikation beizutragen. Dies unterstützt die These, dass die DNA-Struktur an FR nicht geeignet ist, einen Replikationskomplex auszubilden.

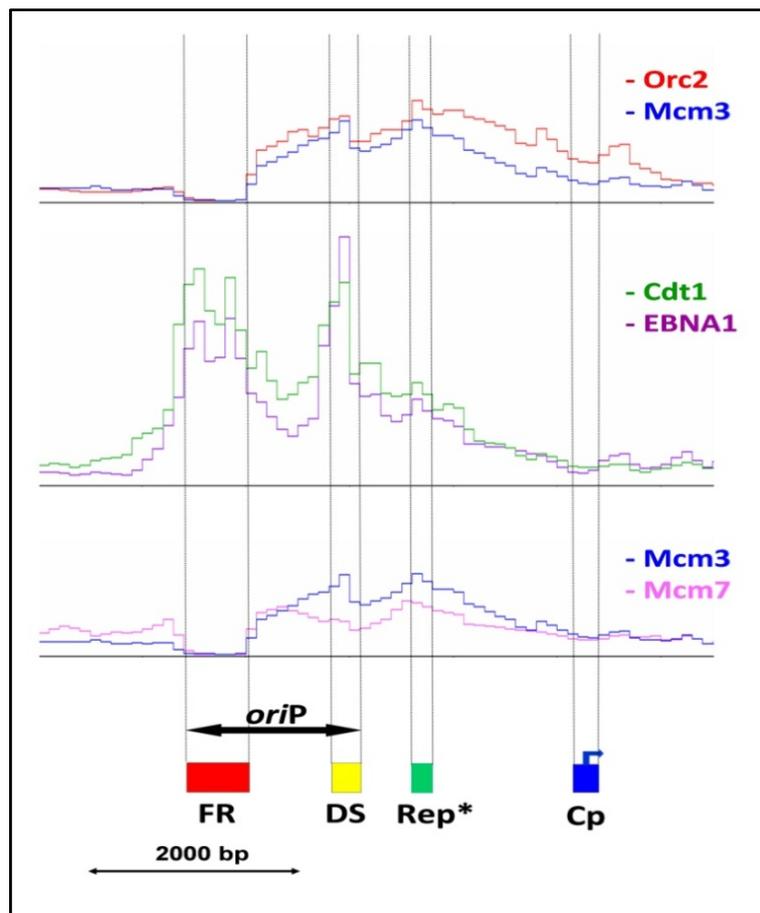


Abb.5.1: Signalüberlagerung für die Pre-RC Komponenten Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 sowie EBNA1 am Bereich *oriP* bis Cp (EBV-Oligonukleotid-Array).

Am DS-Element können Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 sowie EBNA1 nachgewiesen werden. Die Struktur von DS in *oriP* wurde von mehreren Arbeitsgruppen bereits genauer charakterisiert, mit dem Ergebnis, dass es der exakten Positionierung des Rekrutierungsfaktors EBNA1 bedarf, um effektiv Replikation zu initiieren (Wang et al., 2006). Es wird postuliert, dass eine kooperative Bindung von EBNA1 an die beiden Dyaden in DS zu einer DNA-Beugung führt, die

die Replikationsinitiation an DS begünstigt (Bashaw und Yates, 2001). Die Signalprofile in Abb.5.1 sowie die Zellzyklusexperimente aus Abschnitt 4.4 bestätigen, dass am DS-Element Replikationskomplexe ausgebildet werden können.

Die Signalprofile in Abb.5.1 weisen für den Bereich Rep* ebenfalls eine signifikante Anreicherung sowohl für EBNA1 als auch die Pre-RC-Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 auf. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Rep*, wenn es multimerisiert vorliegt, ebenfalls als Origin auf Plasmiden fungieren kann (Kirchmaier und Sugden, 1998). Rep* besitzt zwei EBNA1 Bindestellen (Wang et al., 2006) und kann somit als eigenständiges Replikator-Element angesehen werden, das eine ORC-Bindung und somit eine Pre-RC-Ausbildung ermöglicht. Diese Aussagen werden durch die Hybridisierungssignale gestützt, da der Bereich an Rep* eine deutliche Anreicherung aller analysierten Pre-RC-Proteine aufweist.

Die Hybridisierungssignale für Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 zeigen, dass die Pre-RC-Komponenten nicht nur spezifisch an DS und Rep* angereichert vorliegen, sondern dass zwischen FR und dem C-Promoter ein allgemein hohes Bindungsniveau detektiert werden kann. Dies lässt vermuten, dass die gesamte DNA-Region zwischen FR und Cp die Ausbildung von Pre-RCs begünstigt. Dies könnte durch die mögliche Interaktion des FR-Elements mit dem C-Promoter erklärt werden. Die „Family of Repeats“ ist – neben der Funktion bei der Episomen-Segregation – auch als Regulator-Element für nahe gelegene Promotoren beschrieben (Reisman und Sugden, 1986; Nilsson et al., 2001; Zetterberg et al., 2004). Postuliert wurde eine EBNA1-vermittelte Schleifenbildung zwischen FR und Cp, wodurch EBNA1 einen transaktivierenden Einfluss auf Cp ausübt. Obwohl – wie oben dargestellt – das FR-Element alleine keine Replikationskompetenz vermittelt, wurden bereits Bedingungen beschrieben, in denen FR auch die Replikation an *oriP* unterstützt. Vermittelt durch EBNA1 können FR und DS ebenfalls eine Schleifenstruktur ausbilden (Frappier und O'Donnell, 1991; Su et al., 1991), welche die Bindung von ORC begünstigt und zur Replikationsinitiation an *oriP* beiträgt (Wysokenski und Yates, 1989). Die Bindungssignale aus Abb.5.1 lassen vermuten, dass durch Regulator- (FR) und Promoter- (Cp) Interaktion eine ähnliche Schleifenstruktur ausgebildet werden kann, die den Aufbau von Pre-RCs zwischen FR und Cp begünstigt (Abb.5.2). Dies könnte die signifikante Anreicherung von Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 zwischen FR und Cp erklären.

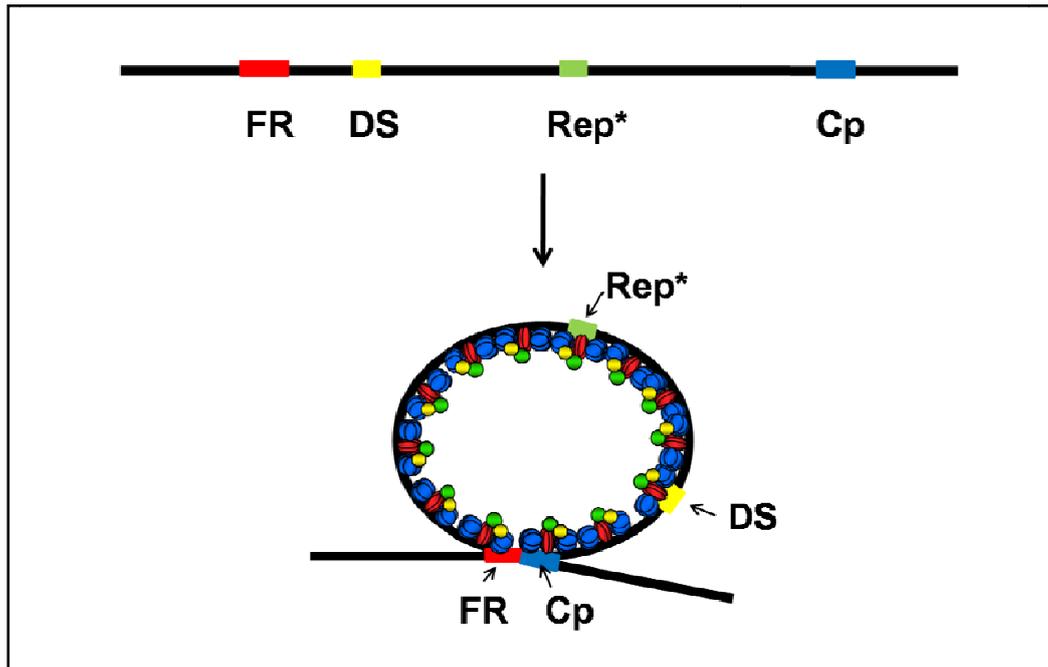


Abb.5.2: Modell einer DNA-Schleife zwischen FR und Cp

Eine DNA-Schleife zwischen FR und Cp könnte eine DNA-Region bilden, die die Bindung von Replikationsproteinen begünstigt.

5.3 Die ChIP-Chip-Technik zur Identifizierung von Replikationsursprüngen

Ein Ziel dieser Dissertation war es, potentielle Replikationsursprünge in EBV und dem Menschen mittels ChIP-Chip-Experimenten zu identifizieren. Mit Ausnahme des viralen Replikationsursprungs *oriP* konnten keine Bereiche auf dem EBV- oder dem Human-Genom detektiert werden, die eine signifikant hohe Anreicherung an Replikationsproteinen aufwiesen. Im letzten Kapitel der Diskussion wird am Beispiel der ChIP-Chip-Bindungssignale des viralen Q-Promoters gezeigt, dass aktive Replikationsursprünge nicht unbedingt eine lokal erhöhte Anreicherung von Pre-RC-Proteinen aufweisen müssen. Anschließend ist anhand von Modellen dargestellt, warum Replikationsursprünge mittels ChIP-Chip wahrscheinlich nicht oder nur sehr schwer zu identifizieren sind. Hierbei wird die These vertreten, dass Origins so flexibel auf dem EBV- und dem Human-Genom etabliert werden können, dass der Nachweis einer lokalen Pre-RC-Präsenz durch ChIP-Chip-Analysen nicht oder nur sehr schwer möglich ist.

5.3.1 Qp: ein effizienter Replikationsursprung ohne signifikante Pre-RC-Ausbildung

Am Q-Promoter zeigt sich eine Tendenz, die für die Interpretation der genomischen ChIP-Chip-Experimente von entscheidender Bedeutung ist. Obwohl im Bereich von Qp aktive Replikationsinitiation detektiert werden kann (Abb.4.36), sind keine signifikanten Anreicherungen für Orc2, Mcm3 oder Mcm7 nachweisbar (Abb.4.11-4.13 und Abb.4.17-4.19; je A, D). Der Bereich des Q-Promoters ist in Abb.5.3 detailliert dargestellt. Die relative Anreicherung für Cdt1 liegt über dem Faktor 4 und erscheint daher abgeschnitten. Für Orc2 ist an Qp im Bereich von 49900bp – 50100bp ein geringer Anstieg der relativen Anreicherung zu erkennen. Derartige Signalvarianzen lassen sich jedoch auch für die Bereiche bei 47500bp und 52500bp – 53800bp sowie multiple weitere Regionen auf dem EBV-Genom erkennen (Abb.4.17 A und Anhang Abb.9.2 A). Auch Mcm3 und Mcm7 zeigen – obgleich geringer – sowohl an Qp als auch Genom-weit ähnliche Signalschwankungen.

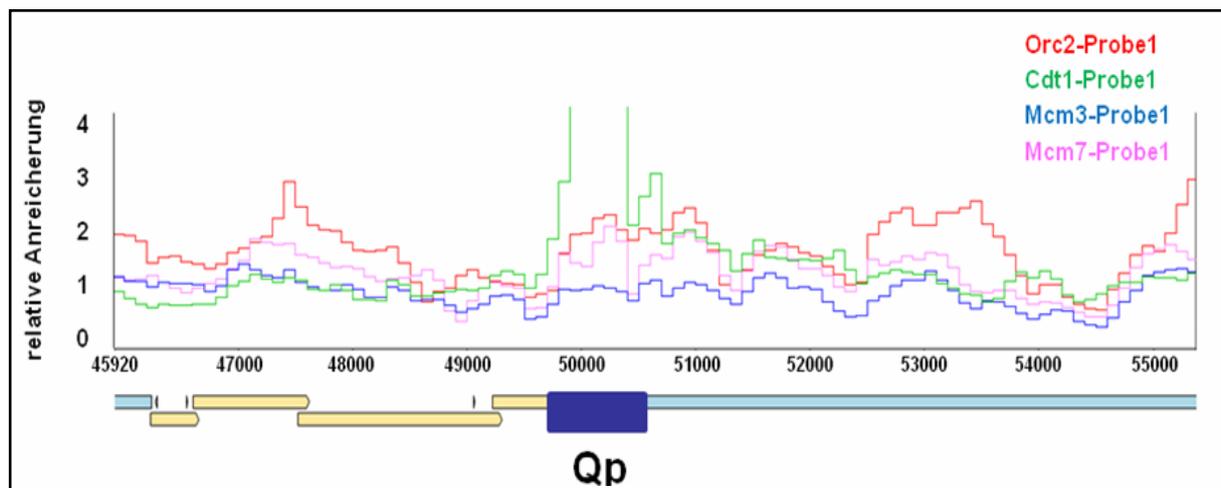


Abb.5.3: Signalüberlagerung für Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 (EBV-Oligonukleotid-Array)

Dadurch wird die Frage aufgeworfen, ob die Signale an Qp auf die Präsenz eines Pre-RC zurückzuführen sind. Die Etablierung eines Pre-RC ist für die Initiation der Replikation Voraussetzung. Dass die Initiation der DNA-Replikation an Qp allein durch EBNA1 und Cdt1 vermittelt wird, ist als eher unwahrscheinlich zu erachten. Setzt man die Präsenz eines Pre-RC an oder in unmittelbarer Nähe eines Replikationsursprungs wie Qp voraus, so ergeben sich unterschiedliche

Interpretationsmöglichkeiten, die im Folgenden auch die Genom-weiten ChIP-Chip-Analysen betreffen. Es wäre denkbar, dass Pre-RC-Komponenten Genom-weit von Zelle zu Zelle flexibel verteilt auf der DNA vorliegen können. Demnach erscheinen Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 stochastisch auf dem EBV-Genom verteilt, und sind somit durch ChIP-Chip-Experimente nicht anhand lokaler Signalanreicherungen nachweisbar. Dies könnte das Genom-weit recht homogene Verteilungsmuster der Pre-RC-Komponenten sowohl auf dem EBV-Genom (Abb.4.11-4.14 und Abb.4.17-4.20) als auch auf dem Human-Genom (Abb.4.25, 4.26) erklären.

5.3.2 Variable Lizenzierung und Aktivierung von Replikationsursprüngen

Im letzten Abschnitt der Diskussion soll die im vorherigen Abschnitt aufgestellte These, dass in EBV und höheren Eukaryonten wie dem Menschen, die Etablierung von Pre-Replikationskomplexen auf DNA sehr variabel und zum Großteil rein stochastisch erfolgen kann, erörtert werden. Desweiteren wird postuliert, dass delokalisierte Proteinbindungen – wie für die Pre-RC-Proteine vorgeschlagen – mittels ChIP-Chip-Analysen nicht effektiv bestimmt werden können.

Mit ChIP-Chip bietet sich die Möglichkeit eine Vielzahl von Protein-Bindestellen innerhalb großer DNA-Regionen oder sogar ganzer Genome zu kartieren. Die Genom-weite Identifizierung von potentiellen Origins anhand von Pre-RC-Bindestellen war bei niederen Eukaryonten, wie der Hefe, sehr erfolgreich. (Wyrick et al., 2001; Newlon und Theis, 2002; Hayashi et al., 2007). Auf dem Human-Genom erscheint die Identifizierung ungleich schwerer. In der Literatur sind bisher keine ChIP-Chip-Analysen beschrieben, anhand derer potentielle humane Origins kartiert wurden. Selbst bei den wenigen bisher bekannten humanen Replikationsursprüngen konnte lediglich bei 9 die Anreicherung von Replikationsproteinen durch Chromatin-Immunpräzipitation bestätigt werden. Dies zeigt, dass Chip- bzw. ChIP-Chip-Experimente von Replikationsproteinen auf dem Human-Genom keine etablierten Standard-Methoden darstellen, um Origins zu identifizieren (Schepers und Papior, 2009).

ChIP-Chip-Experimente beruhen auf dem Prinzip der Analyse von DNA-Fragmenten, die durch Chromatin-Immunpräzipitation angereichert wurden. Ist die

Position eines Proteins durch z.B. bestimmte Konsensussequenzen vorgegeben, kann die Binderegion innerhalb diskreter Grenzen durch ChIP-Chip detektiert werden. Während dieser Dissertation konnten erfolgreich ChIP-Chip-Experimente sowohl auf dem EBV- als auch dem Human-Genom durchgeführt werden. Der virale Replikationsursprung *oriP* zeigte für alle analysierten Proteine hohe Signalanreicherungen (Abb.4.11-4.21). Auch die lokale Anreicherung von EBNA1 - zusammen mit dem Interaktionspartner Cdt1 – am Q-Promoter konnte detektiert werden (Abb.4.14, 4.15, 4.20, 4.21; je A, D). Desweiteren war es möglich die Histon-Modifikation H3K4me3 (Abb.4.23) sowie den Transkriptionsfaktor NC2 (siehe Anhang Abb.9.3) auf dem humanen ENCODE-Array an Promotoren nachzuweisen. Alle diese Protein-DNA-Bindungen besitzen ein gemeinsames Kriterium: **Sie sind lokal fixiert auf dem Genom positioniert.** Diese Tatsache erleichtert wahrscheinlich ihre Detektion durch ChIP-Chip-Experimente, da sie in jeder Zelle nur innerhalb diskreter Grenzen zu finden sind. Eine derartige Situation und ein hypothetisches ChIP-Chip-Bindungsprofil sind in Abb.5.4 schematisch mit Bild A dargestellt.

Die Genom-weite Suche nach Pre-RC-Positionen in EBV und dem Menschen hat sich jedoch als weniger erfolgreich dargestellt. Die Hybridisierungsexperimente, die die Position der Pre-RC-Komponenten Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 Genom-weit in EBV nachweisen sollten, zeigten eine relativ homogene Signalverteilung. Abgesehen von wenigen moderaten Signalspitzen konnten keine Bereiche identifiziert werden, die eine signifikante Pre-RC-Anreicherung aufwiesen. Analoge Experimente auf dem Human-Genom bestätigten eine homogene Signalverteilung. Eine mögliche Erklärung für die recht homogene Signalverteilung könnte in dem Prinzip einer **flexiblen und stochastisch verteilten Etablierung von Pre-RCs** liegen.

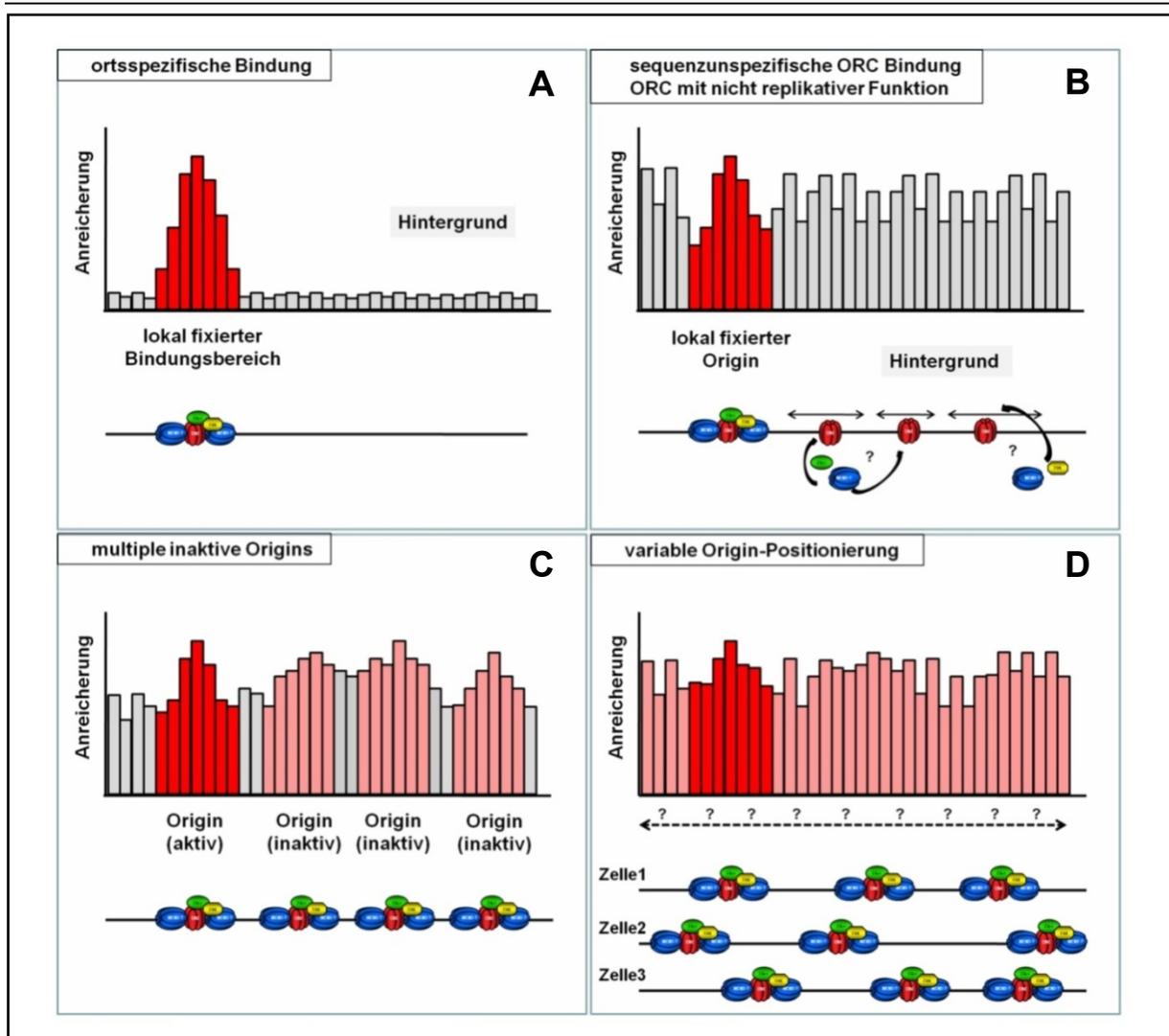


Abb.5.4: Modell für ChIP-Chip-Bindungsprofile für Pre-Replikationskomplexe bei (A) ortsspezifischer Protein-DNA-Bindung, (B) sequenzunspezifischer ORC-DNA-Bindung, (C) multipel inaktiven Origins, (D) variabler Origin-Positionierung.

Gründe für eine mögliche flexible und stochastische Verteilung von Pre-Replikationskomplexen lassen sich in den biologischen Bindeeigenschaften des Origin Recognition Complex finden. Anders als DNA-bindende Proteine wie Transkriptionsfaktoren bindet ORC sequenzunabhängig an DNA (Vashee et al., 2003). Dies könnte zu einer Genom-weit unspezifischen ORC-Verteilung führen. Da ORC als Plattform für die Assemblierung des Pre-RC dient, ist nicht auszuschließen, dass unspezifische ORC-DNA-Bindungen auch eine unspezifische Verteilung von weiteren Pre-RC-Komponenten auf der DNA zur Folge haben. Somit könnten in ChIP-Chip-Analysen replikationsrelevante Pre-RC-Bindungen an Origins (Abb.5.4 B [dunkel-rot markiert]) durch einen hohen unspezifischen Hintergrund (Abb.5.4 B [grau

markiert]) maskiert werden. Zudem wurden für ORC – neben der Bedeutung in der DNA-Replikation – weitere nukleäre Funktionen beschrieben. Hierzu zählen „gene silencing“, Aufbau von Heterochromatin, „Chromatid-Cohesion“ und auch Zytokinese (Fox et al., 1995; Huang et al., 1998; Prasanth et al., 2002; Gillespie und Hirano, 2004; Prasanth et al., 2004; Chesnokov, 2007). Wenn diese zusätzlichen Funktionen über ORC-DNA Bindungen vermittelt werden, und ORC als Assemblierungsplattform für Pre-RC-Komponenten weiterhin zugänglich ist, werden auch diese replikationsirrelevanten Interaktionen spezifische Pre-RC-Origin-Verbindungen überdecken (Abb.5.4 B [grau markiert]).

Ein weiterer Grund, der die Analyse von Pre-RC-Bindestellen erschweren könnte, ist die Tatsache, dass mehr Replikationsursprünge in der G₁-Phase lizenziert als in der S-Phase aktiviert werden (Santocanale et al., 1999; Anglana et al., 2003; Ge et al., 2007; Blow und Ge, 2008). Eine hohe Anzahl von Replikationsproteinen auf der DNA kann möglicherweise in ChIP-Chip-Analysen nicht mehr detailliert aufgelöst werden. Auch dies könnte zu einem Genom-weit homogen verteilten Bindungsprofil in ChIP-Chip-Experimenten beitragen. Das Hintergrundsignal inaktiver Replikationsursprünge ist in Abb.5.4 C hell-rot, das Signal eines aktiven Origins dunkel-rot dargestellt.

Erfolgt die Etablierung von Replikationsursprüngen durch die Ausbildung von Pre-RCs ohne besondere Auswahlkriterien von Zelle zu Zelle unterschiedlich, so könnte kein Bereich auf der DNA als „Pre-RC frei“ angesehen werden. Dies ist schematisch in Abb.5.4 D dargestellt. Das überlagerte Bindungsprofil mehrerer Zellen bei variabler Pre-RC-Positionierung ist hell-rot markiert. In eukaryonten Systemen wie Mensch und Maus ist es jedoch möglich, aktive Origins anhand von Replikationsintermediaten wie naszierender DNA zu detektieren (Cadoret et al., 2008). Dies lässt vermuten, dass trotz variabler Pre-RC-Positionierung eine selektive und bevorzugte Auswahl von bestimmten Pre-RCs stattfindet, die in der S-Phase aktiviert, und somit detektiert werden können. Diese Position ist in Abb.5.4 D dunkel-rot markiert. Mögliche Origin-Auswahlmechanismen lägen somit bei Kriterien, die an bestimmten Pre-RC-Positionen die Ausbildung aktiver Replisomen begünstigen.

Zieht man in Betracht, dass die unter Abb.5.4 A-D aufgeführten möglichen Mechanismen sich gegenseitig nicht ausschließen müssen, wird die Problematik einer delokalisierten Pre-RC-Ausbildung für ChIP-Chip-Analysen deutlich.

5.4. Ausblick

Im vorangegangenen Abschnitt wurden mögliche Faktoren dargelegt, die die Detektion von Pre-RCs durch ChIP-Chip-Experimente stark erschweren und die Genom-weit niedrigen Signalintensitäten der Pre-RC-Protein-Bindungsprofile erklären könnten. Bei genauer Betrachtung der einzelnen Bindungsprofile lassen sich auf dem EBV-Genom vor allem für Orc2 und Mcm3 und Mcm7 Regelmäßigkeiten in den Genom-weiten Signalschwankungen erkennen. Es stellt sich somit die Frage, ob diese Signalschwankungen eine biologische Relevanz besitzen.

Während der schriftlichen Abhandlung dieser Dissertation wurden die EBV-Bindungsprofile in unserem Labor weiter analysiert. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Fragestellung, ob sich die Positionen der moderaten Signalanreicherungen mit aktiver DNA-Replikationsinitiation korrelieren lassen. Hierfür wurden diese Regionen auf die Anreicherung naszierender DNA hin überprüft. Exemplarisch wird in Abb.5.5 erneut das Bindungsprofil für Orc2-Probe1 auf dem EBV-Oligonukleotid-Array (Abb.5.5 A) und eine Vergrößerung 5' von *oriP* gezeigt (Abb.5.5 B). Für die Signalanreicherung an Position A konnte eine signifikant erhöhte Menge naszierender DNA detektiert werden (schematisch in Abb.5.5 C). Dies zeigt, dass trotz Genom-weit niedriger Signalintensitäten den Bindungsprofilen der Pre-RC-Komponenten eine biologische Funktion zugeordnet werden kann. Um einen Genom-weiten Vergleich zwischen Replikationsprotein-Bindungsprofilen und aktiven Origins zu erhalten, werden in unserem Labor gegenwärtig Techniken etabliert, die es ermöglichen werden, naszierende DNA auf Mikroarrays zu analysieren. Dies könnte abschließend die Signifikanz der in dieser Dissertation erarbeiteten Replikationsprotein-Bindungsprofile verifizieren.

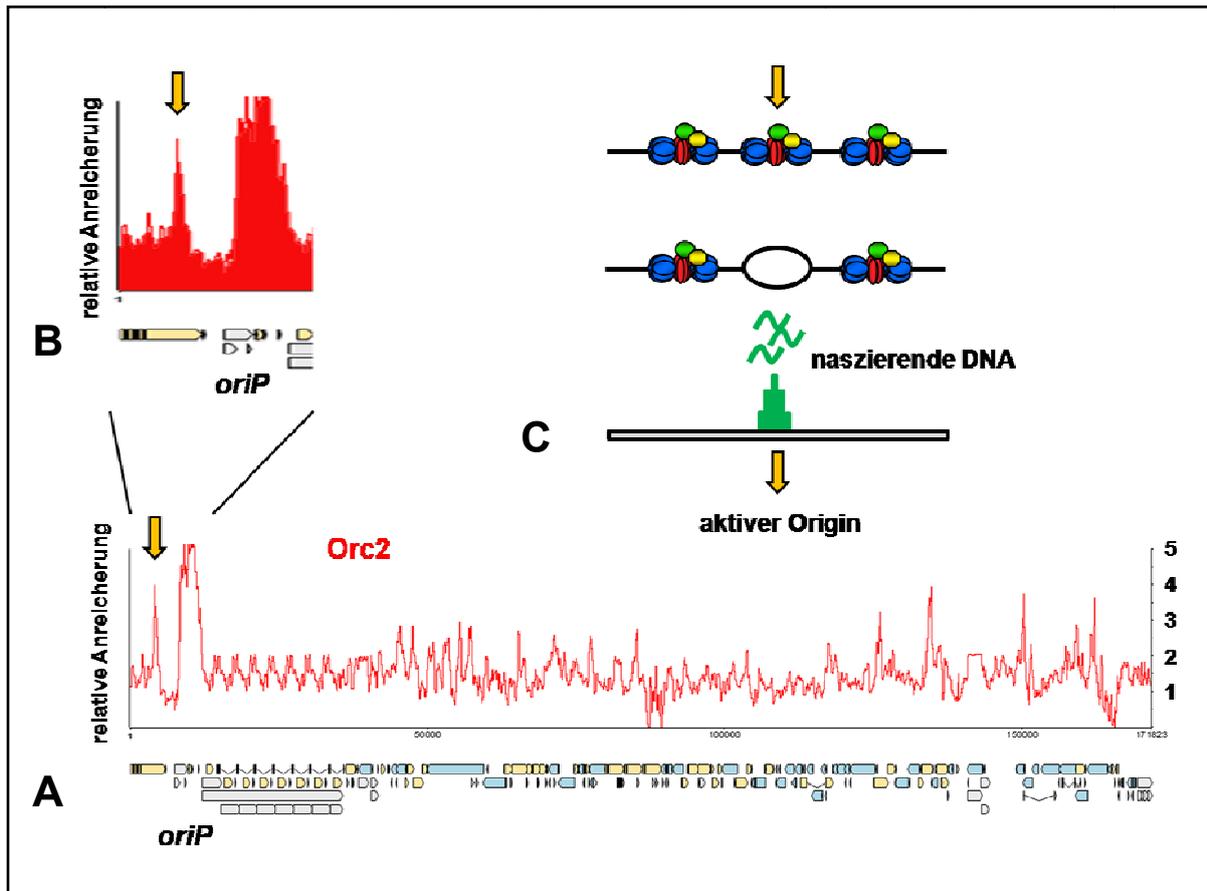


Abb.5.5: Biologische Signifikanz der EBV-Oligonukleotid-Bindungsprofile

- (A) Orc2-Probe1 (EBV-Oligonukleotid-Array).
- (B) Vergrößerung von *oriP* und der Region 5' stromaufwärts von *oriP*.
- (C) Schematische Analyse naszierender DNA in EBV am Bereich A.

6. Zusammenfassung

Die Replikationskompetenz eines eukaryonten Genoms wird in der G₁-Phase des Zellzyklus durch die Ausbildung von Pre-Replikationskomplexen (Pre-RCs) auf der DNA festgelegt, wobei nur ein geringer Anteil in der S-Phase aktiviert wird. In höheren Eukaryonten sind die Kriterien, die die Positionen von Replikationsursprüngen auf dem Genom festlegen, nur unzureichend charakterisiert. Zudem sind die Faktoren, die bei der selektiven Aktivierung eines Pre-RCs eine Rolle spielen, noch weitgehend unverstanden. Der limitierende Faktor, der die Analyse von Replikationsursprüngen auf dem Human-Genom bisher erschwert, ist die geringe Anzahl bisher bekannter Pre-RC-Bindestellen.

Ziel dieser Arbeit war es, durch Genom-weite ChIP-Chip-Analysen potentielle Replikationsursprünge anhand von Pre-RC-Bindestellen identifizieren und Kriterien zu analysieren, die zur Ausbildung von Replikationskomplexen beitragen. Die Experimente erfolgten auf 1% des Human-Genoms sowie Genom-weit in EBV (Epstein-Barr-Virus), das in Latenz die humane Replikationsmaschinerie nutzt. Es konnten erfolgreich ChIP- und ChIP-Chip-Techniken etabliert werden. Die humanen Pre-RC-Proteine Orc2, Mcm3, Mcm7 und Cdt1 sowie das EBV-Protein EBNA1 wurden spezifisch am viralen Replikationsursprung *oriP* angereichert nachgewiesen. Das Replikator-Element DS in *oriP* zeigt eine Zellzyklus-abhängige Pre-RC-Ausbildung sowie 3' von DS eine lokale Anreicherung des Remodeling-Faktors Snf2h in der G₁-Phase und eine Zellzyklus-unabhängige Histon H4-Lysin3-Trimethylierung. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das virale Protein EBNA1 mit dem humanen Pre-RC-Protein Cdt1 interagiert und so Cdt1 lokal an EBNA1-Bindestellen auf dem EBV-Genom rekrutiert. Ferner wurde in EBV der Q-Promoter (Qp) als aktiver Replikationsursprung identifiziert, wobei EBNA1 und Cdt1 sowie die Histon-Modifikation H3K4me3 lokal angereichert an Qp nachgewiesen wurden. Qp lässt in ChIP-Chip-Analysen jedoch keine spezifische Ausbildung von Pre-RCs erkennen. Analog zu dem Replikationsursprung Qp zeigen auch die Genom-weiten Bindungsprofile der Pre-RC-Komponenten in EBV und dem Menschen eine insgesamt sehr niedrige Signalintensitäten ohne signifikante Signalanreicherungen.

Anhand der Pre-RC-Bindungsprofile wird postuliert, dass die Ausbildung von Pre-Replikationskomplexen auf dem EBV- und dem Human-Genom sehr flexibel und delokalisiert erfolgt und daher mittels ChIP-Chip nur schwer nachzuweisen ist.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aff. ger.	affinitätsgereinigt
APS	Ammoniumperoxidisulfat
bp	Basenpaare
kb	Kilobasen
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
bzw.	beziehungsweise
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
ChIP-Chip	Chromatin-Immunpräzipitation mit Chip Analyse
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
Cp	C-Promoter
DHRF	Dehydrofolat Reduktase-Gen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS-Element	Dyad-Symmetry-Element
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBER-RNA	EBV-encoded RNA
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Formaldehyd
FCS	Fötale Kälberserum
FR	Family of Repeats
HP1	Heterochromatin Protein 1
HPRT	Hydroxy-Phosphoribosyl-Transferase-Gen
HRP	gekoppelte Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“)
IF	Immunofluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
Kan.	Kaninchen
kb	Kilobasen(e)

kDa	Kilodalton
KE	Kernextrakt
L	Liter
L.	Leichte Kette eines Antikörpers
LMNB2	LaminB2-Gen
LCR	<u>l</u> ocus <u>c</u> ontroll- <u>r</u> egion der β -Globin-Gene
M	molar
m	milli
mA	Milliampere
MCM-Proteine	„mini chromosome maintenance“-Proteine
min.	Minute
MNase	Mikrokokken-Nuklease
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
nm	Nanometer
ORC	„Origin Recognition Complex“
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung + Tween 1%
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PI	Propidium-Iodid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pre-IC	Prä-Initiations-Komplex
Pre-RC	Prä-Replikations-Komplex
Qp	Q-Promoter
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S.pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Sek.	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S/MAR	<u>s</u> caffold <u>m</u> atrix <u>a</u> ttachment <u>r</u> egion
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIMM13	<u>t</u> ransport <u>i</u> nnner <u>m</u> itochondrial <u>m</u> embrane-Gen
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand

UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
Verd.	Verdünnung
Vol.	Volumen
Wp	W-Promoter
z. B.	zum Beispiel
α	anti
μ	mikro

8. Literaturverzeichnis

Abdurashidova, G., M. Deganuto, R. Klima, S. Riva, G. Biamonti, M. Giacca and A. Falaschi (2000). "Start sites of bidirectional DNA synthesis at the human lamin B2 origin." Science **287**(5460): 2023-6.

Abdurashidova, G., M. B. Danailov, A. Ochem, G. Triolo, V. Djeliova, S. Radulescu, A. Vindigni, S. Riva and A. Falaschi (2003). "Localization of proteins bound to a replication origin of human DNA along the cell cycle." Embo J **22**(16): 4294-303.

Adams, A. (1987). "Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells." J Virol **61**(5): 1743-6.

Aggarwal, B. D. and B. R. Calvi (2004). "Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells." Nature **430**(6997): 372-6.

Aladjem, M. I., M. Groudine, L. L. Brody, E. S. Dieken, R. E. Fournier, G. M. Wahl and E. M. Epner (1995). "Participation of the human beta-globin locus control region in initiation of DNA replication." Science **270**(5237): 815-9.

Aladjem, M. I., L. W. Rodewald, J. L. Kolman and G. M. Wahl (1998). "Genetic dissection of a mammalian replicator in the human beta-globin locus." Science **281**(5379): 1005-9.

Aladjem, M. I., L. W. Rodewald, C. M. Lin, S. Bowman, D. M. Cimborra, L. L. Brody, E. M. Epner, M. Groudine and G. M. Wahl (2002). "Replication initiation patterns in the beta-globin loci of totipotent and differentiated murine cells: evidence for multiple initiation regions." Mol Cell Biol **22**(2): 442-52.

Albiez, H., M. Cremer, C. Tiberi, L. Vecchio, L. Schermelleh, S. Dittrich, K. Kupper, B. Joffe, T. Thormeyer, J. von Hase, S. Yang, K. Rohr, H. Leonhardt, I. Solovei, C. Cremer, S. Fakan and T. Cremer (2006). "Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks." Chromosome Res **14**(7): 707-33.

Altman, A. L. and E. Fanning (2001). "The Chinese hamster dihydrofolate reductase replication origin beta is active at multiple ectopic chromosomal locations and requires specific DNA sequence elements for activity." Mol Cell Biol **21**(4): 1098-110.

Altman, A. L. and E. Fanning (2004). "Defined sequence modules and an architectural element cooperate to promote initiation at an ectopic mammalian chromosomal replication origin." Mol Cell Biol **24**(10): 4138-50.

Amon, A., S. Irniger and K. Nasmyth (1994). "Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle." Cell **77**(7): 1037-50.

- Anglana, M., F. Apiou, A. Bensimon and M. Debatisse (2003). "Dynamics of DNA replication in mammalian somatic cells: nucleotide pool modulates origin choice and interorigin spacing." Cell **114**(3): 385-94.
- Aparicio, O. M., D. M. Weinstein and S. P. Bell (1997). "Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase." Cell **91**(1): 59-69.
- Aparicio, T., A. Ibarra and J. Mendez (2006). "Cdc45-MCM-GINS, a new power player for DNA replication." Cell Div **1**: 18.
- Arellano, M. and S. Moreno (1997). "Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle." Int J Biochem Cell Biol **29**(4): 559-73.
- Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty (1979). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III." J Exp Med **149**(2): 297-326.
- Avery, O. T., C. M. MacLeod and M. McCarty (1995). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. 1944." Mol Med **1**(4): 344-65.
- Avery, O. T., C. M. Macleod and M. McCarty (2000). "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. Oswald Theodore Avery (1877-1955)." Clin Orthop Relat Res(379 Suppl): S3-8.
- Bartova, E., J. Krejci, A. Harnicarova and S. Kozubek (2008). "Differentiation of human embryonic stem cells induces condensation of chromosome territories and formation of heterochromatin protein 1 foci." Differentiation **76**(1): 24-32.
- Bashaw, J. M. and J. L. Yates (2001). "Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires exact spacing of two bound dimers of EBNA1 which bend DNA." J Virol **75**(22): 10603-11.
- Berezney, R., D. D. Dubey and J. A. Huberman (2000). "Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci." Chromosoma **108**(8): 471-84.
- Bell, S. P. and A. Dutta (2002). "DNA replication in eukaryotic cells." Annu Rev Biochem **71**: 333-74.
- Bell, S. P. and B. Stillman (1992). "ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex." Nature **357**(6374): 128-34.
- Besson, A., S. F. Dowdy and J. M. Roberts (2008). "CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond." Dev Cell **14**(2): 159-69.
- Blow, J. J. and A. Dutta (2005). "Preventing re-replication of chromosomal DNA." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 476-86.

- Blow, J. J. and X. Q. Ge (2008). "Replication forks, chromatin loops and dormant replication origins." Genome Biol **9**(12): 244.
- Bozhenok, L., P. A. Wade and P. Varga-Weisz (2002). "WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci." Embo J **21**(9): 2231-41.
- Burhans, W. C., L. T. Vassilev, M. S. Caddle, N. H. Heintz and M. L. DePamphilis (1990). "Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes." Cell **62**(5): 955-65.
- Burke, T. W., J. G. Cook, M. Asano and J. R. Nevins (2001). "Replication factors MCM2 and ORC1 interact with the histone acetyltransferase HBO1." J Biol Chem **276**(18): 15397-408.
- Buzina, A., M. I. Aladjem, J. L. Kolman, G. M. Wahl and J. Ellis (2005). "Initiation of DNA replication at the human beta-globin 3' enhancer." Nucleic Acids Res **33**(14): 4412-24.
- Cadoret, J. C., F. Meisch, V. Hassan-Zadeh, I. Luyten, C. Guillet, L. Duret, H. Quesneville and M. N. Prioleau (2008). "Genome-wide studies highlight indirect links between human replication origins and gene regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(41): 15837-42.
- Cassuto, E. and E. Chargaff (1969). "Role of base-pairing in the control of an enzyme reaction." Proc Natl Acad Sci U S A **62**(3): 808-12.
- Chambeyron, S. and W. A. Bickmore (2004). "Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription." Genes Dev **18**(10): 1119-30.
- Chaudhuri, B., H. Xu, I. Todorov, A. Dutta and J. L. Yates (2001). "Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10085-9.
- Chesnokov, I. N. (2007). "Multiple functions of the origin recognition complex." Int Rev Cytol **256**: 69-109.
- Chuang, R. Y. and T. J. Kelly (1999). "The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2656-61.
- Church, G. M. and W. Gilbert (1984). "Genomic sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(7): 1991-5.
- Cohen, S. M., B. P. Brylawski, M. Cordeiro-Stone and D. G. Kaufman (2002). "Mapping of an origin of DNA replication near the transcriptional promoter of the human HPRT gene." J Cell Biochem **85**(2): 346-56.

- Collins, N., R. A. Poot, I. Kukimoto, C. Garcia-Jimenez, G. Dellaire and P. D. Varga-Weisz (2002). "An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin." Nat Genet **32**(4): 627-32.
- Cosgrove, M. S. and C. Wolberger (2005). "How does the histone code work?" Biochem Cell Biol **83**(4): 468-76.
- Cremer, T., M. Cremer, S. Dietzel, S. Muller, I. Solovei and S. Fakan (2006). "Chromosome territories--a functional nuclear landscape." Curr Opin Cell Biol **18**(3): 307-16.
- Day, L., C. M. Chau, M. Nebozhyn, A. J. Rennekamp, M. Showe and P. M. Lieberman (2007). "Chromatin profiling of Epstein-Barr virus latency control region." J Virol **81**(12): 6389-401.
- DePamphilis, M. L. (1993). "Eukaryotic DNA replication: anatomy of an origin." Annu Rev Biochem **62**: 29-63.
- DePamphilis, M. L. (1993). "Origins of DNA replication in metazoan chromosomes." J Biol Chem **268**(1): 1-4.
- Dhar, S. K., K. Yoshida, Y. Machida, P. Khaira, B. Chaudhuri, J. A. Wohlschlegel, M. Leffak, J. Yates and A. Dutta (2001). "Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin." Cell **106**(3): 287-96.
- Diffley, J. F. (1995). "The initiation of DNA replication in the budding yeast cell division cycle." Yeast **11**(16): 1651-70.
- Dijkwel, P. A., J. P. Vaughn and J. L. Hamlin (1994). "Replication initiation sites are distributed widely in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain." Nucleic Acids Res **22**(23): 4989-96.
- Dijkwel, P. A., S. Wang and J. L. Hamlin (2002). "Initiation sites are distributed at frequent intervals in the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin of replication but are used with very different efficiencies." Mol Cell Biol **22**(9): 3053-65.
- Dirscherl, S. S. and J. E. Krebs (2004). "Functional diversity of ISWI complexes." Biochem Cell Biol **82**(4): 482-9.
- Doyon, Y., C. Cayrou, M. Ullah, A. J. Landry, V. Cote, W. Selleck, W. S. Lane, S. Tan, X. J. Yang and J. Cote (2006). "ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation." Mol Cell **21**(1): 51-64.
- Eberharter, A. and P. B. Becker (2004). "ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions." J Cell Sci **117**(Pt 17): 3707-11.
- Ehrenhofer-Murray, A. E., M. Gossen, D. T. Pak, M. R. Botchan and J. Rine (1995). "Separation of origin recognition complex functions by cross-species complementation." Science **270**(5242): 1671-4.

- Falbo, K. B. and X. Shen (2006). "Chromatin remodeling in DNA replication." J Cell Biochem **97**(4): 684-9.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." Anal Biochem **132**(1): 6-13.
- Felton-Edkins, Z. A., A. Kondrashov, D. Karali, J. A. Fairley, C. W. Dawson, J. R. Arrand, L. S. Young and R. J. White (2006). "Epstein-Barr virus induces cellular transcription factors to allow active expression of EBER genes by RNA polymerase III." J Biol Chem **281**(45): 33871-80.
- Feng, W., D. Collingwood, M. E. Boeck, L. A. Fox, G. M. Alvino, W. L. Fangman, M. K. Raghuraman and B. J. Brewer (2006). "Genomic mapping of single-stranded DNA in hydroxyurea-challenged yeasts identifies origins of replication." Nat Cell Biol **8**(2): 148-55.
- Ferenbach, A., A. Li, M. Brito-Martins and J. J. Blow (2005). "Functional domains of the Xenopus replication licensing factor Cdt1." Nucleic Acids Res **33**(1): 316-24.
- Fox, C. A., S. Loo, A. Dillin and J. Rine (1995). "The origin recognition complex has essential functions in transcriptional silencing and chromosomal replication." Genes Dev **9**(8): 911-24.
- Francis, L. I., J. C. Randell, T. J. Takara, L. Uchima and S. P. Bell (2009). "Incorporation into the prereplicative complex activates the Mcm2-7 helicase for Cdc7-Dbf4 phosphorylation." Genes Dev **23**(5): 643-54.
- Frappier, L. and M. O'Donnell (1991). "Epstein-Barr nuclear antigen 1 mediates a DNA loop within the latent replication origin of Epstein-Barr virus." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10875-9.
- Fujita, M. Q., H. Yoshikawa and N. Ogasawara (1992). "Structure of the dnaA and DnaA-box region in the Mycoplasma capricolum chromosome: conservation and variations in the course of evolution." Gene **110**(1): 17-23.
- Fyodorov, D. V. and J. T. Kadonaga (2001). "The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription." Cell **106**(5): 523-5.
- Gambus, A., R. C. Jones, A. Sanchez-Diaz, M. Kanemaki, F. van Deursen, R. D. Edmondson and K. Labib (2006). "GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks." Nat Cell Biol **8**(4): 358-66.
- Gavin, K. A., M. Hidaka and B. Stillman (1995). "Conserved initiator proteins in eukaryotes." Science **270**(5242): 1667-71.
- Ge, X. Q., D. A. Jackson and J. J. Blow (2007). "Dormant origins licensed by excess Mcm2-7 are required for human cells to survive replicative stress." Genes Dev **21**(24): 3331-41.

- Gerber, P., F. K. Nkrumah, R. Pritchett and E. Kieff (1976). "Comparative studies of Epstein-Barr virus strains from Ghana and the United States." Int J Cancer **17**(1): 71-81.
- Gerhardt, J., S. Jafar, M. P. Spindler, E. Ott and A. Schepers (2006). "Identification of new human origins of DNA replication by an origin-trapping assay." Mol Cell Biol **26**(20): 7731-46.
- Ghosh, M., G. Liu, G. Randall, J. Bevington and M. Leffak (2004). "Transcription factor binding and induced transcription alter chromosomal c-myc replicator activity." Mol Cell Biol **24**(23): 10193-207.
- Ghosh, M., M. Kemp, G. Liu, M. Ritzi, A. Schepers and M. Leffak (2006). "Differential binding of replication proteins across the human c-myc replicator." Mol Cell Biol **26**(14): 5270-83.
- Ghosh, M., G. Liu, G. Randall, J. Bevington and M. Leffak (2004). "Transcription factor binding and induced transcription alter chromosomal c-myc replicator activity." Mol Cell Biol **24**(23): 10193-207.
- Giacca, M., C. Pelizon and A. Falaschi (1997). "Mapping replication origins by quantifying relative abundance of nascent DNA strands using competitive polymerase chain reaction." Methods **13**(3): 301-12.
- Giacca, M., L. Zentilin, P. Norio, S. Diviacco, D. Dimitrova, G. Contreas, G. Biamonti, G. Perini, F. Weighardt, S. Riva and et al. (1994). "Fine mapping of a replication origin of human DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7119-23.
- Gilbert, D. M. (2004). "In search of the holy replicator." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 848-55.
- Gillespie, P. J. and T. Hirano (2004). "Scc2 couples replication licensing to sister chromatid cohesion in *Xenopus* egg extracts." Curr Biol **14**(17): 1598-603.
- Giordano-Coltart, J., C. Y. Ying, J. Gautier and J. Hurwitz (2005). "Studies of the properties of human origin recognition complex and its Walker A motif mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(1): 69-74.
- Gossen, M., D. T. Pak, S. K. Hansen, J. K. Acharya and M. R. Botchan (1995). "A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex." Science **270**(5242): 1674-7.
- Gray, S. J., G. Liu, A. L. Altman, L. E. Small and E. Fanning (2007). "Discrete functional elements required for initiation activity of the Chinese hamster dihydrofolate reductase origin beta at ectopic chromosomal sites." Exp Cell Res **313**(1): 109-20.
- Handeli, S., A. Klar, M. Meuth and H. Cedar (1989). "Mapping replication units in animal cells." Cell **57**(6): 909-20.

- Harrison, S., K. Fisenne and J. Hearing (1994). "Sequence requirements of the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication." J Virol **68**(3): 1913-25.
- Hartwell, L. H., R. K. Mortimer, J. Culotti and M. Culotti (1973). "Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast: V. Genetic Analysis of cdc Mutants." Genetics **74**(2): 267-286.
- Hayashi, M., Y. Katou, T. Itoh, A. Tazumi, Y. Yamada, T. Takahashi, T. Nakagawa, K. Shirahige and H. Masukata (2007). "Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast." Embo J **26**(5): 1327-39.
- Hayles, J., D. Fisher, A. Woollard and P. Nurse (1994). "Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex." Cell **78**(5): 813-22.
- Heichinger, C., C. J. Penkett, J. Bahler and P. Nurse (2006). "Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins." Embo J **25**(21): 5171-9.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." Biotechnology (N Y) **11**(9): 1026-30.
- Hofmann, J. F. and D. Beach (1994). "cdt1 is an essential target of the Cdc10/Sct1 transcription factor: requirement for DNA replication and inhibition of mitosis." Embo J **13**(2): 425-34.
- Hsieh, D. J., S. M. Camiolo and J. L. Yates (1993). "Constitutive binding of EBNA1 protein to the Epstein-Barr virus replication origin, oriP, with distortion of DNA structure during latent infection." Embo J **12**(13): 4933-44.
- Huang, R. Y. and D. Kowalski (1993). "A DNA unwinding element and an ARS consensus comprise a replication origin within a yeast chromosome." Embo J **12**(12): 4521-31.
- Huang, R. Y. and D. Kowalski (1996). "Multiple DNA elements in ARS305 determine replication origin activity in a yeast chromosome." Nucleic Acids Res **24**(5): 816-23.
- Huang, D. W., L. Fanti, D. T. Pak, M. R. Botchan, S. Pimpinelli and R. Kellum (1998). "Distinct cytoplasmic and nuclear fractions of Drosophila heterochromatin protein 1: their phosphorylation levels and associations with origin recognition complex proteins." J Cell Biol **142**(2): 307-18.
- Huberman, J. A. and A. D. Riggs (1968). "On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes." J Mol Biol **32**(2): 327-41.
- Iizuka, M. and B. Stillman (1999). "Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein." J Biol Chem **274**(33): 23027-34.
- Jacob, F. and S. Brenner (1963). "[On the regulation of DNA synthesis in bacteria: the hypothesis of the replicon.]" C R Hebd Seances Acad Sci **256**: 298-300.

- Jacob, R. J., L. S. Morse and B. Roizman (1979). "Anatomy of herpes simplex virus DNA. XII. Accumulation of head-to-tail concatemers in nuclei of infected cells and their role in the generation of the four isomeric arrangements of viral DNA." J Virol **29**(2): 448-57.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-80.
- Kan, J., L. Zou, J. Zhang, R. Wu, Z. Wang and C. Liang (2008). "Origin recognition complex (ORC) mediates histone 3 lysine 4 methylation through cooperation with Spp1 in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **283**(49): 33803-7.
- Kanter, D. M., I. Bruck and D. L. Kaplan (2008). "Mcm subunits can assemble into two different active unwinding complexes." J Biol Chem **283**(45): 31172-82.
- Kaplan, D. L., M. J. Davey and M. O'Donnell (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**(49): 49171-82.
- Kim, S. M. and J. A. Huberman (1998). "Multiple orientation-dependent, synergistically interacting, similar domains in the ribosomal DNA replication origin of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*." Mol Cell Biol **18**(12): 7294-303.
- Kim, S. M., D. Y. Zhang and J. A. Huberman (2001). "Multiple redundant sequence elements within the fission yeast *ura4* replication origin enhancer." BMC Mol Biol **2**: 1.
- Kirchmaier, A. L. and B. Sugden (1998). "Rep*: a viral element that can partially replace the origin of plasmid DNA synthesis of Epstein-Barr virus." J Virol **72**(6): 4657-66.
- Koch, C. M., R. M. Andrews, P. Flicek, S. C. Dillon, U. Karaoz, G. K. Clelland, S. Wilcox, D. M. Beare, J. C. Fowler, P. Couttet, K. D. James, G. C. Lefebvre, A. W. Bruce, O. M. Dovey, P. D. Ellis, P. Dhami, C. F. Langford, Z. Weng, E. Birney, N. P. Carter, D. Vetric and I. Dunham (2007). "The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines." Genome Res **17**(6): 691-707.
- Kong, D. and M. L. DePamphilis (2001). "Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit." Mol Cell Biol **21**(23): 8095-103.
- Kong, D. and M. L. DePamphilis (2002). "Site-specific ORC binding, pre-replication complex assembly and DNA synthesis at *Schizosaccharomyces pombe* replication origins." Embo J **21**(20): 5567-76.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.

- Krude, T. (1999). "Mimosine arrests proliferating human cells before onset of DNA replication in a dose-dependent manner." Exp Cell Res **247**(1): 148-59.
- Krysan, P. J. and M. P. Calos (1991). "Replication initiates at multiple locations on an autonomously replicating plasmid in human cells." Mol Cell Biol **11**(3): 1464-72.
- Labib, K. and J. F. Diffley (2001). "Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase?" Curr Opin Genet Dev **11**(1): 64-70.
- Labib, K., J. A. Tercero and J. F. Diffley (2000). "Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression." Science **288**(5471): 1643-7.
- Laskey, R. A. and M. A. Madine (2003). "A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks." EMBO Rep **4**(1): 26-30.
- Lee, J. K., K. Y. Moon, Y. Jiang and J. Hurwitz (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**(24): 13589-94.
- Leight, E. R. and B. Sugden (2001). "The cis-acting family of repeats can inhibit as well as stimulate establishment of an oriP replicon." J Virol **75**(22): 10709-20.
- Little, R. D. and C. L. Schildkraut (1995). "Initiation of latent DNA replication in the Epstein-Barr virus genome can occur at sites other than the genetically defined origin." Mol Cell Biol **15**(5): 2893-903.
- Liu, E., X. Li, F. Yan, Q. Zhao and X. Wu (2004). "Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation." J Biol Chem **279**(17): 17283-8.
- Liu, G., M. Malott and M. Leffak (2003). "Multiple functional elements comprise a Mammalian chromosomal replicator." Mol Cell Biol **23**(5): 1832-42.
- Lu, L. and J. Tower (1997). "A transcriptional insulator element, the su(Hw) binding site, protects a chromosomal DNA replication origin from position effects." Mol Cell Biol **17**(4): 2202-6.
- Lu, L., H. Zhang and J. Tower (2001). "Functionally distinct, sequence-specific replicator and origin elements are required for Drosophila chorion gene amplification." Genes Dev **15**(2): 134-46.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." Nature **389**(6648): 251-60.
- Maiorano, D., J. Moreau and M. Mechali (2000). "XCdT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in Xenopus laevis." Nature **404**(6778): 622-5.

- Marahrens, Y. and B. Stillman (1992). "A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements." Science **255**(5046): 817-23.
- McNairn, A. J., Y. Okuno, T. Misteli and D. M. Gilbert (2005). "Chinese hamster ORC subunits dynamically associate with chromatin throughout the cell-cycle." Exp Cell Res **308**(2): 345-56.
- Mendel, 1866 G. Mendel, Versuche über Pflanzenhybriden, *Verh. Nat.forsch. Ver. Brünn* **4** (1866), pp. 3–47.
- Meselson, M. and F. W. Stahl (1958). "The replication of DNA." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **23**: 9-12.
- Miescher, 1869a F. Miescher, Letter I; to Wilhelm His; Tübingen, February 26th, 1869. In: W. His *et al.*, Editors, *Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten von Friedrich Miescher—Aus dem wissenschaftlichen Briefwechsel von F. Miescher* vol. **1**, F.C.W. Vogel, Leipzig (1869), pp. 33–38.
- Minami, H., J. Takahashi, A. Suto, Y. Saitoh and K. Tsutsumi (2006). "Binding of AIF-C, an Orc1-binding transcriptional regulator, enhances replicator activity of the rat aldolase B origin." Mol Cell Biol **26**(23): 8770-80.
- Moyer, S. E., P. W. Lewis and M. R. Botchan (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**(27): 10236-41.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Muck, J. and D. Zink (2009). "Nuclear organization and dynamics of DNA replication in eukaryotes." Front Biosci **14**: 5361-71.
- Nasmyth, K. and T. Hunt (1993). "Cell cycle. Dams and sluices." Nature **366**(6456): 634-5.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge and E. V. Koonin (1999). "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." Genome Res **9**(1): 27-43.
- Newlon, C. S. and J. F. Theis (2002). "DNA replication joins the revolution: whole-genome views of DNA replication in budding yeast." Bioessays **24**(4): 300-4.
- Nigg, E. A. (1995). "Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle." Bioessays **17**(6): 471-80.
- Nilsson, T., H. Zetterberg, Y. C. Wang and L. Rymo (2001). "Promoter-proximal regulatory elements involved in oriP-EBNA1-independent and -dependent activation of the Epstein-Barr virus C promoter in B-lymphoid cell lines." J Virol **75**(13): 8116-8111.

- Nishitani, H. and Z. Lygerou (2002). "Control of DNA replication licensing in a cell cycle." Genes Cells **7**(6): 523-34.
- Nishitani, H., N. Sugimoto, V. Roukos, Y. Nakanishi, M. Saijo, C. Obuse, T. Tsurimoto, K. I. Nakayama, K. Nakayama, M. Fujita, Z. Lygerou and T. Nishimoto (2006). "Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis." Embo J **25**(5): 1126-36.
- Nonoyama, M., C. H. Huang, J. S. Pagano, G. Klein and S. Singh (1973). "DNA of Epstein-Barr virus detected in tissue of Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(11): 3265-8.
- Norio, P. and C. L. Schildkraut (2001). "Visualization of DNA replication on individual Epstein-Barr virus episomes." Science **294**(5550): 2361-4.
- Norio, P. and C. L. Schildkraut (2004). "Plasticity of DNA replication initiation in Epstein-Barr virus episomes." PLoS Biol **2**(6): e152.
- Norio, P., C. L. Schildkraut and J. L. Yates (2000). "Initiation of DNA replication within oriP is dispensable for stable replication of the latent Epstein-Barr virus chromosome after infection of established cell lines." J Virol **74**(18): 8563-74.
- Norseen, J., F. B. Johnson and P. M. Lieberman (2009). "Role for G-quadruplex RNA binding by Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in DNA replication and metaphase chromosome attachment." J Virol **83**(20): 10336-46.
- Ogasawara, N., S. Moriya and H. Yoshikawa (1991). "Initiation of chromosome replication: structure and function of oriC and DnaA protein in eubacteria." Res Microbiol **142**(7-8): 851-9.
- Okuno, Y., H. Satoh, M. Sekiguchi and H. Masukata (1999). "Clustered adenine/thymine stretches are essential for function of a fission yeast replication origin." Mol Cell Biol **19**(10): 6699-709.
- Orlando, V. (2000). "Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation." Trends Biochem Sci **25**(3): 99-104.
- Orlando, V. and R. Paro (1993). "Mapping Polycomb-repressed domains in the bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin." Cell **75**(6): 1187-98.
- Paixao, S., I. N. Colaluca, M. Cubells, F. A. Peverali, A. Destro, S. Giadrossi, M. Giacca, A. Falaschi, S. Riva and G. Biamonti (2004). "Modular structure of the human lamin B2 replicator." Mol Cell Biol **24**(7): 2958-67.
- Pelizon, C., S. Diviacco, A. Falaschi and M. Giacca (1996). "High-resolution mapping of the origin of DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene domain by competitive PCR." Mol Cell Biol **16**(10): 5358-64.

- Perkins, G. and J. F. Diffley (1998). "Nucleotide-dependent prereplicative complex assembly by Cdc6p, a homolog of eukaryotic and prokaryotic clamp-loaders." Mol Cell **2**(1): 23-32.
- Peterson, C. L. and J. Cote (2004). "Cellular machineries for chromosomal DNA repair." Genes Dev **18**(6): 602-16.
- Pich, D., S. Humme, M. P. Spindler, A. Schepers and W. Hammerschmidt (2008). "Conditional gene vectors regulated in cis." Nucleic Acids Res **36**(13): e83.
- Poot, R. A., L. Bozhenok, D. L. van den Berg, N. Hawkes and P. D. Varga-Weisz (2005). "Chromatin remodeling by WSTF-ISWI at the replication site: opening a window of opportunity for epigenetic inheritance?" Cell Cycle **4**(4): 543-6.
- Poot, R. A., L. Bozhenok, D. L. van den Berg, S. Steffensen, F. Ferreira, M. Grimaldi, N. Gilbert, J. Ferreira and P. D. Varga-Weisz (2004). "The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci." Nat Cell Biol **6**(12): 1236-44.
- Prasanth, S. G., K. V. Prasanth, K. Siddiqui, D. L. Spector and B. Stillman (2004). "Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance." Embo J **23**(13): 2651-63.
- Prasanth, S. G., K. V. Prasanth and B. Stillman (2002). "Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis." Science **297**(5583): 1026-31.
- Probst, A. V., E. Dunleavy and G. Almouzni (2009). "Epigenetic inheritance during the cell cycle." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(3): 192-206.
- Raghuraman, M. K., E. A. Winzeler, D. Collingwood, S. Hunt, L. Wodicka, A. Conway, D. J. Lockhart, R. W. Davis, B. J. Brewer and W. L. Fangman (2001). "Replication dynamics of the yeast genome." Science **294**(5540): 115-21.
- Randell, J. C., J. L. Bowers, H. K. Rodriguez and S. P. Bell (2006). "Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase." Mol Cell **21**(1): 29-39.
- Ranjan, A. and M. Gossen (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**(13): 4864-9.
- Rao, H., Y. Marahrens and B. Stillman (1994). "Functional conservation of multiple elements in yeast chromosomal replicators." Mol Cell Biol **14**(11): 7643-51.
- Reisman, D. and B. Sugden (1986). "trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1." Mol Cell Biol **6**(11): 3838-46.

- Reisman, D., J. Yates and B. Sugden (1985). "A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components." Mol Cell Biol **5**(8): 1822-32.
- Remus, D., E. L. Beall and M. R. Botchan (2004). "DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding." Embo J **23**(4): 897-907.
- Remus, D. and J. F. Diffley (2009). "Eukaryotic DNA replication control: Lock and load, then fire." Curr Opin Cell Biol.
- Rippe, K., A. Schrader, P. Riede, R. Strohner, E. Lehmann and G. Langst (2007). "DNA sequence- and conformation-directed positioning of nucleosomes by chromatin-remodeling complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15635-40.
- Ritzi, M., K. Tillack, J. Gerhardt, E. Ott, S. Humme, E. Kremmer, W. Hammerschmidt and A. Schepers (2003). "Complex protein-DNA dynamics at the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus." J Cell Sci **116**(Pt 19): 3971-84.
- Saha, S., Y. Shan, L. D. Mesner and J. L. Hamlin (2004). "The promoter of the Chinese hamster ovary dihydrofolate reductase gene regulates the activity of the local origin and helps define its boundaries." Genes Dev **18**(4): 397-410.
- Santocanale, C., K. Sharma and J. F. Diffley (1999). "Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast." Genes Dev **13**(18): 2360-4.
- Schaarschmidt, D., J. Baltin, I. M. Stehle, H. J. Lipps and R. Knippers (2004). "An episomal mammalian replicon: sequence-independent binding of the origin recognition complex." Embo J **23**(1): 191-201.
- Schepers, A. and P. Papior (2009). "Why are we where we are? Understanding replication origins and initiation sites in eukaryotes using ChIP-approaches." Chromosome Res.
- Schepers, A., M. Ritzi, K. Bousset, E. Kremmer, J. L. Yates, J. Harwood, J. F. Diffley and W. Hammerschmidt (2001). "Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus." Embo J **20**(16): 4588-602.
- Sequeira-Mendes, J., R. Diaz-Uriarte, A. Apedaile, D. Huntley, N. Brockdorff and M. Gomez (2009). "Transcription initiation activity sets replication origin efficiency in mammalian cells." PLoS Genet **5**(4): e1000446.
- Shirakata, M. and K. Hirai (1998). "Identification of minimal oriP of Epstein-Barr virus required for DNA replication." J Biochem **123**(1): 175-81.
- Shogren-Knaak, M. and C. L. Peterson (2006). "Switching on chromatin: mechanistic role of histone H4-K16 acetylation." Cell Cycle **5**(13): 1361-5.

- Sibani, S., G. B. Price and M. Zannis-Hadjopoulos (2005). "Ku80 binds to human replication origins prior to the assembly of the ORC complex." Biochemistry **44**(21): 7885-96.
- Solomon, M. J., P. L. Larsen and A. Varshavsky (1988). "Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene." Cell **53**(6): 937-47.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.
- Speck, C., Z. Chen, H. Li and B. Stillman (2005). "ATPase-dependent cooperative binding of ORC and Cdc6 to origin DNA." Nat Struct Mol Biol **12**(11): 965-71.
- Speck, C. and B. Stillman (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**(16): 11705-14.
- Stinchcomb, D. T., K. Struhl and R. W. Davis (1979). "Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator." Nature **282**(5734): 39-43.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-5.
- Su, W., T. Middleton, B. Sugden and H. Echols (1991). "DNA looping between the origin of replication of Epstein-Barr virus and its enhancer site: stabilization of an origin complex with Epstein-Barr nuclear antigen 1." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10870-4.
- Sugimoto, N., I. Kitabayashi, S. Osano, Y. Tatsumi, T. Yugawa, M. Narisawa-Saito, A. Matsukage, T. Kiyono and M. Fujita (2008). "Identification of novel human Cdt1-binding proteins by a proteomics approach: proteolytic regulation by APC/CCdh1." Mol Biol Cell **19**(3): 1007-21.
- Tabancay, A. P., Jr. and S. L. Forsburg (2006). "Eukaryotic DNA replication in a chromatin context." Curr Top Dev Biol **76**: 129-84.
- Takahashi, T. and H. Masukata (2001). "Interaction of fission yeast ORC with essential adenine/thymine stretches in replication origins." Genes Cells **6**(10): 837-49.
- Takahashi, T. S., D. B. Wigley and J. C. Walter (2005). "Pumps, paradoxes and ploughshares: mechanism of the MCM2-7 DNA helicase." Trends Biochem Sci **30**(8): 437-44.
- Tanaka, S. and J. F. Diffley (2002). "Deregulated G1-cyclin expression induces genomic instability by preventing efficient pre-RC formation." Genes Dev **16**(20): 2639-49.

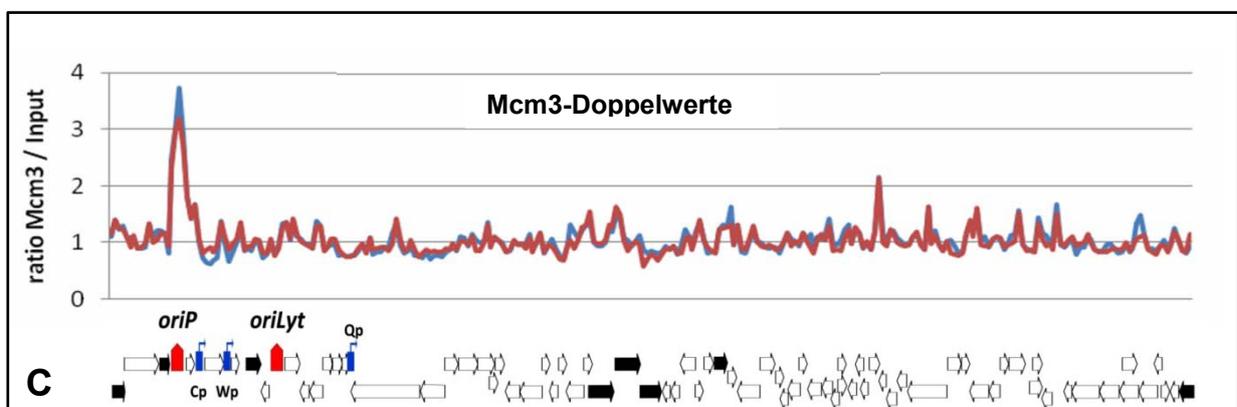
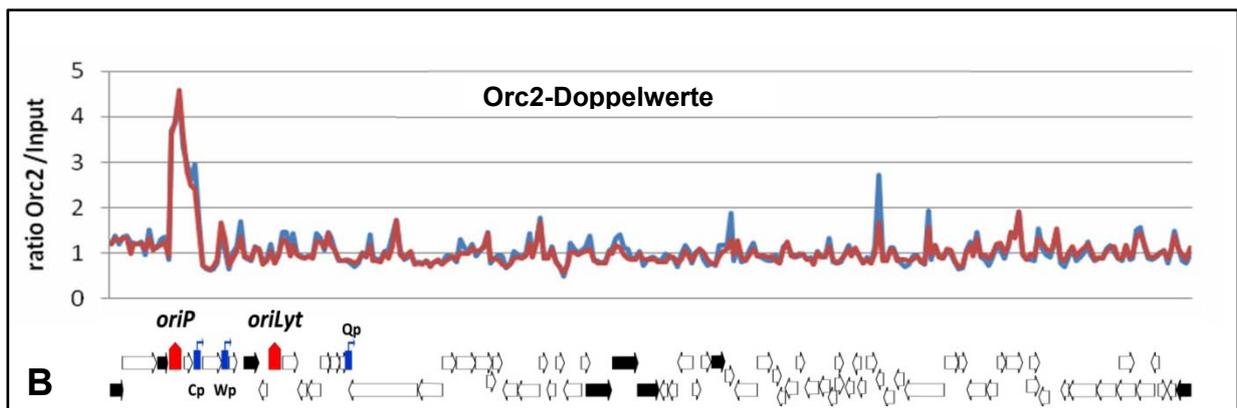
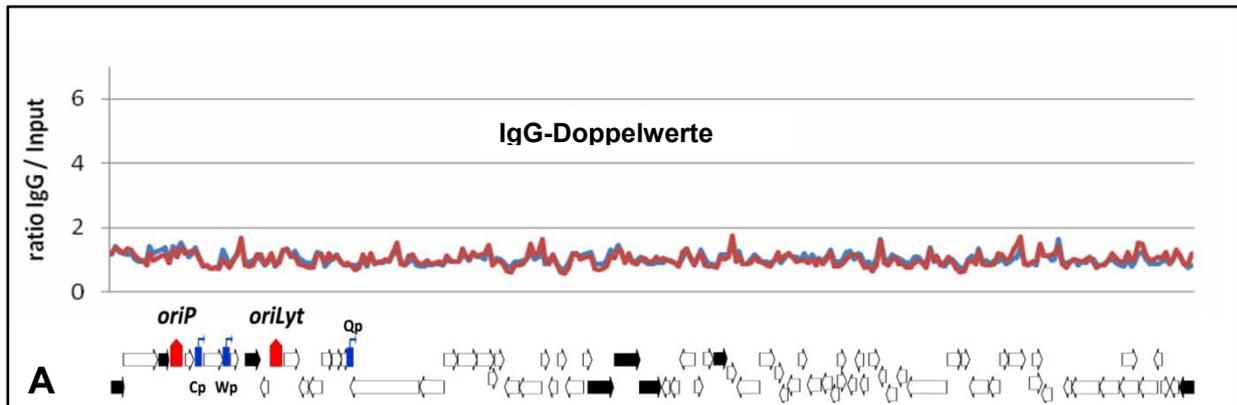
- Tanaka, S. and J. F. Diffley (2002). "Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase." Nat Cell Biol **4**(3): 198-207.
- Theis, J. F. and C. S. Newlon (1994). "Domain B of ARS307 contains two functional elements and contributes to chromosomal replication origin function." Mol Cell Biol **14**(11): 7652-9.
- Todorovic, V., S. Giadrossi, C. Pelizon, R. Mendoza-Maldonado, H. Masai and M. Giacca (2005). "Human origins of DNA replication selected from a library of nascent DNA." Mol Cell **19**(4): 567-75.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tower, J. (2004). "Developmental gene amplification and origin regulation." Annu Rev Genet **38**: 273-304.
- Trivedi, A., S. E. Waltz, S. Kamath and M. Leffak (1998). "Multiple initiations in the c-myc replication origin independent of chromosomal location." DNA Cell Biol **17**(10): 885-96.
- Tsuji, T., S. B. Ficarro and W. Jiang (2006). "Essential role of phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the initiation of DNA replication in mammalian cells." Mol Biol Cell **17**(10): 4459-72.
- Tsukiyama, T. (2002). "The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 422-9.
- Tye, B. K. (1999). "Minichromosome maintenance as a genetic assay for defects in DNA replication." Methods **18**(3): 329-34.
- Varga-Weisz, P. (2005). "Chromatin remodeling factors and DNA replication." Prog Mol Subcell Biol **38**: 1-30.
- Vashee, S., C. Cvetic, W. Lu, P. Simancek, T. J. Kelly and J. C. Walter (2003). "Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex." Genes Dev **17**(15): 1894-908.
- Vaughn, J. P., P. A. Dijkwel and J. L. Hamlin (1990). "Replication initiates in a broad zone in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain." Cell **61**(6): 1075-87.
- Verbovaia, L. and S. V. Razin (1995). "Analysis of the replication direction through the domain of alpha-globin-encoding chicken genes." Gene **166**(2): 255-9.
- Vindigni, A., G. Abdurashidova and A. Falaschi (2004). "Identification of start sites of bi-directional DNA synthesis at eukaryotic DNA replication origins." Methods Mol Biol **240**: 105-22.

- Vogelauer, M., L. Rubbi, I. Lucas, B. J. Brewer and M. Grunstein (2002). "Histone acetylation regulates the time of replication origin firing." Mol Cell **10**(5): 1223-33.
- Wang, L., C. M. Lin, S. Brooks, D. Cimborá, M. Groudine and M. I. Aladjem (2004). "The human beta-globin replication initiation region consists of two modular independent replicators." Mol Cell Biol **24**(8): 3373-86.
- Wang, L., C. M. Lin, J. O. Lopreiato and M. I. Aladjem (2006). "Cooperative sequence modules determine replication initiation sites at the human beta-globin locus." Hum Mol Genet **15**(17): 2613-22.
- Wang, J., S. E. Lindner, E. R. Leight and B. Sugden (2006). "Essential elements of a licensed, mammalian plasmid origin of DNA synthesis." Mol Cell Biol **26**(3): 1124-34.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." Nature **171**(4356): 737-8.
- Weinreich, M., C. Liang and B. Stillman (1999). "The Cdc6p nucleotide-binding motif is required for loading mcm proteins onto chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 441-6.
- Whittaker, A. J., I. Royzman and T. L. Orr-Weaver (2000). "Drosophila double parked: a conserved, essential replication protein that colocalizes with the origin recognition complex and links DNA replication with mitosis and the down-regulation of S phase transcripts." Genes Dev **14**(14): 1765-76.
- Wohlschlegel, J. A., B. T. Dwyer, S. K. Dhar, C. Cvetic, J. C. Walter and A. Dutta (2000). "Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1." Science **290**(5500): 2309-12.
- Wyrick, J. J., J. G. Aparicio, T. Chen, J. D. Barnett, E. G. Jennings, R. A. Young, S. P. Bell and O. M. Aparicio (2001). "Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins." Science **294**(5550): 2357-60.
- Wysocki, D. A. and J. L. Yates (1989). "Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus." J Virol **63**(6): 2657-66.
- Xie, A. Y., V. P. Bermudez and W. R. Folk (2002). "Stimulation of DNA replication from the polyomavirus origin by PCAF and GCN5 acetyltransferases: acetylation of large T antigen." Mol Cell Biol **22**(22): 7907-18.
- Xu, W., J. G. Aparicio, O. M. Aparicio and S. Tavare (2006). "Genome-wide mapping of ORC and Mcm2p binding sites on tiling arrays and identification of essential ARS consensus sequences in *S. cerevisiae*." BMC Genomics **7**: 276.
- Yanagi, K., T. Mizuno, Z. You and F. Hanaoka (2002). "Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity." J Biol Chem **277**(43): 40871-80.

- Yasuda, S. and Y. Hirota (1977). "Cloning and mapping of the replication origin of *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5458-62.
- Yates, J., N. Warren, D. Reisman and B. Sugden (1984). "A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(12): 3806-10.
- Yates, J. L. and N. Guan (1991). "Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells." J Virol **65**(1): 483-8.
- Zahn, G. and W. Messer (1979). "Control of the initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. II. Function of the *dnaA* product." Mol Gen Genet **168**(2): 197-209.
- Zetterberg, H., C. Borestrom, T. Nilsson and L. Rymo (2004). "Multiple EBNA1-binding sites within oriPI are required for EBNA1-dependent transactivation of the Epstein-Barr virus C promoter." Int J Oncol **25**(3): 693-6.
- Zhang, H. and J. Tower (2004). "Sequence requirements for function of the *Drosophila* chorion gene locus ACE3 replicator and ori-beta origin elements." Development **131**(9): 2089-99.
- Zhou, J., C. M. Chau, Z. Deng, R. Shiekhattar, M. P. Spindler, A. Schepers and P. M. Lieberman (2005). "Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication." Embo J **24**(7): 1406-17.
- Zhu, J., D. L. Carlson, D. D. Dubey, K. Sharma and J. A. Huberman (1994). "Comparison of the two major ARS elements of the *ura4* replication origin region with other ARS elements in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*." Chromosoma **103**(6): 414-22.

9. Anhang

9.1 Signalüberlagerung der Replikate auf dem EBV-PCR-Array



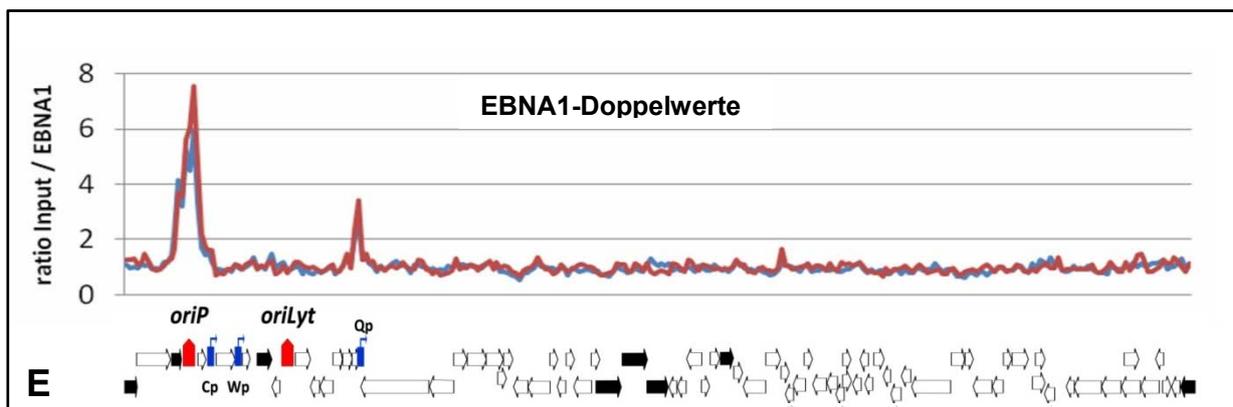
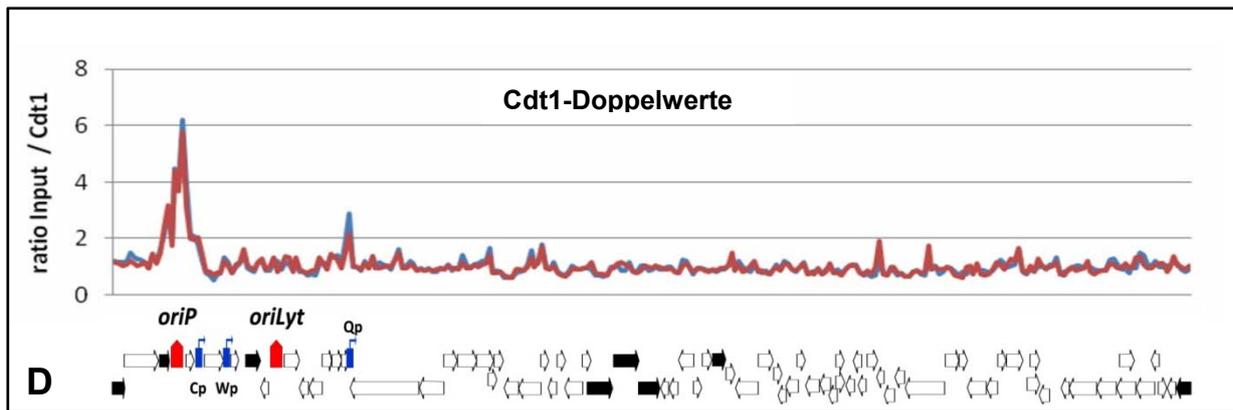


Abb.9.1: Replikate auf dem EBV-PCR-Array

- (A) **IgG-Signale:** Die y-Achse entspricht der relativen Anreicherung. Die x-Achse entspricht der Position auf dem EBV-PCR-Array. Schwarze Pfeile: latente Gene. Weiße Pfeile: lytische Gene; rotes Fünfeck: *oriP* und *oriLyt*, blaue Quadrate: Promotoren Cp, Wp und Qp.
- (B) **Orc2-Signale:** Beschriftung wie in (A).
- (C) **Mcm3-Signale:** Beschriftung wie in (A).
- (D) **Cdt1-Signale:** Beschriftung wie in (A).
- (E) **EBNA1-Signale:** Beschriftung wie in (A).

9.2 Signale der Serie 2 auf dem EBV-Oligonukleotid-Array

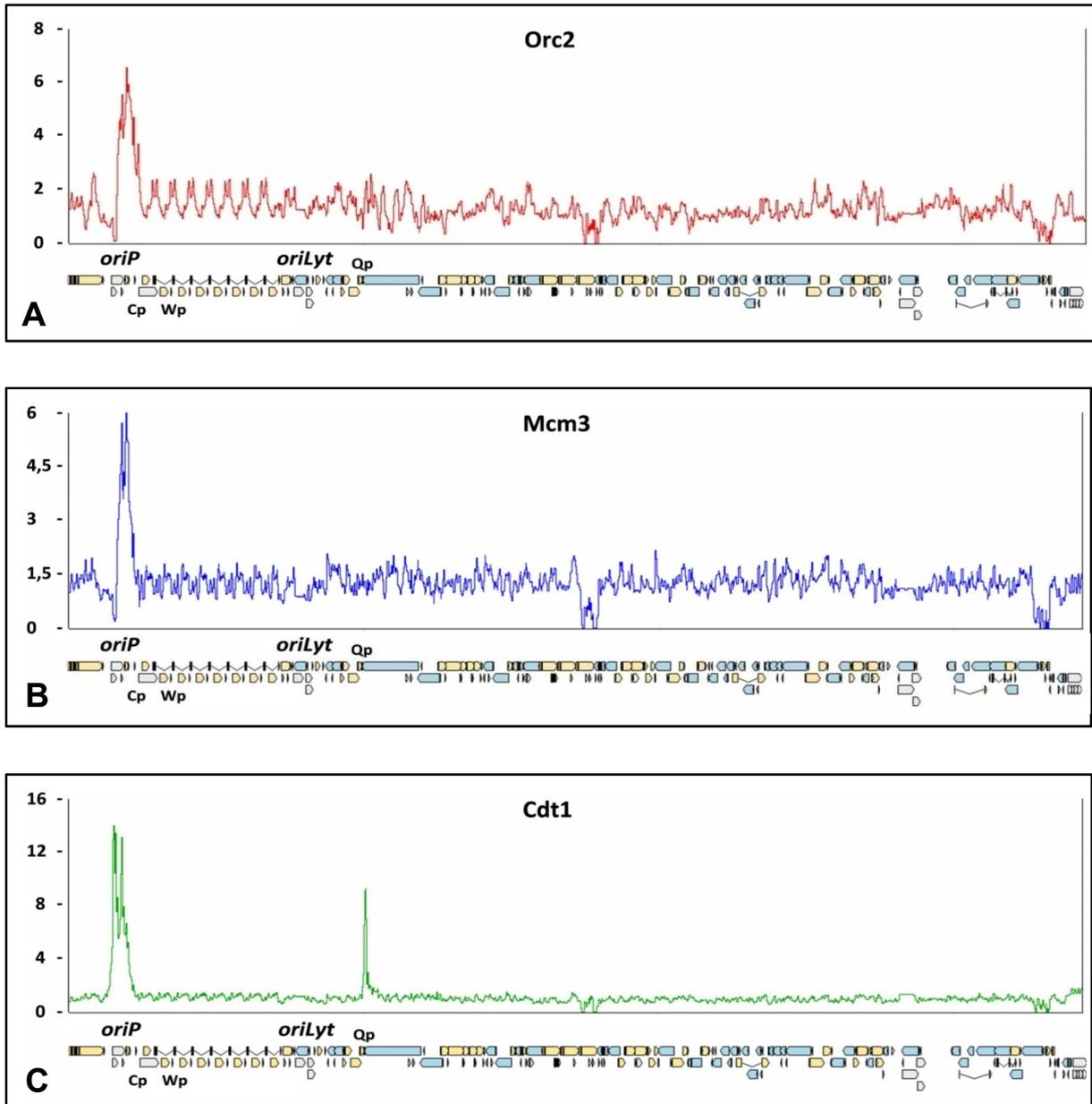


Abb.9.2: Orc2, Mcm3 und Cdt1 in der G₁-Phase auf dem EBV-Genom (EBV-Oligonukleotid-Array: Serie2)

- (A) **Normalisiertes Orc2-Signal:** Die y-Achse entspricht der relativen Anreicherung. Die x-Achse entspricht der Position auf dem EBV-PCR-Array. Schwarze Pfeile: latente Gene. Weiße Pfeile: lytische Gene; rotes Fünfeck: *oriP* und *oriLyt*, blaue Quadrate: Promotoren Cp, Wp und Qp. (Normalisiert gegen IgG-Probe2)
- (B) **Normalisiertes Mcm3-Signal:** Beschriftung wie in (A).
- (C) **Normalisiertes Cdt1-Signal:** Beschriftung wie in (A).

9.3 Negative-Cofactor 2 auf dem ENCODE-Array

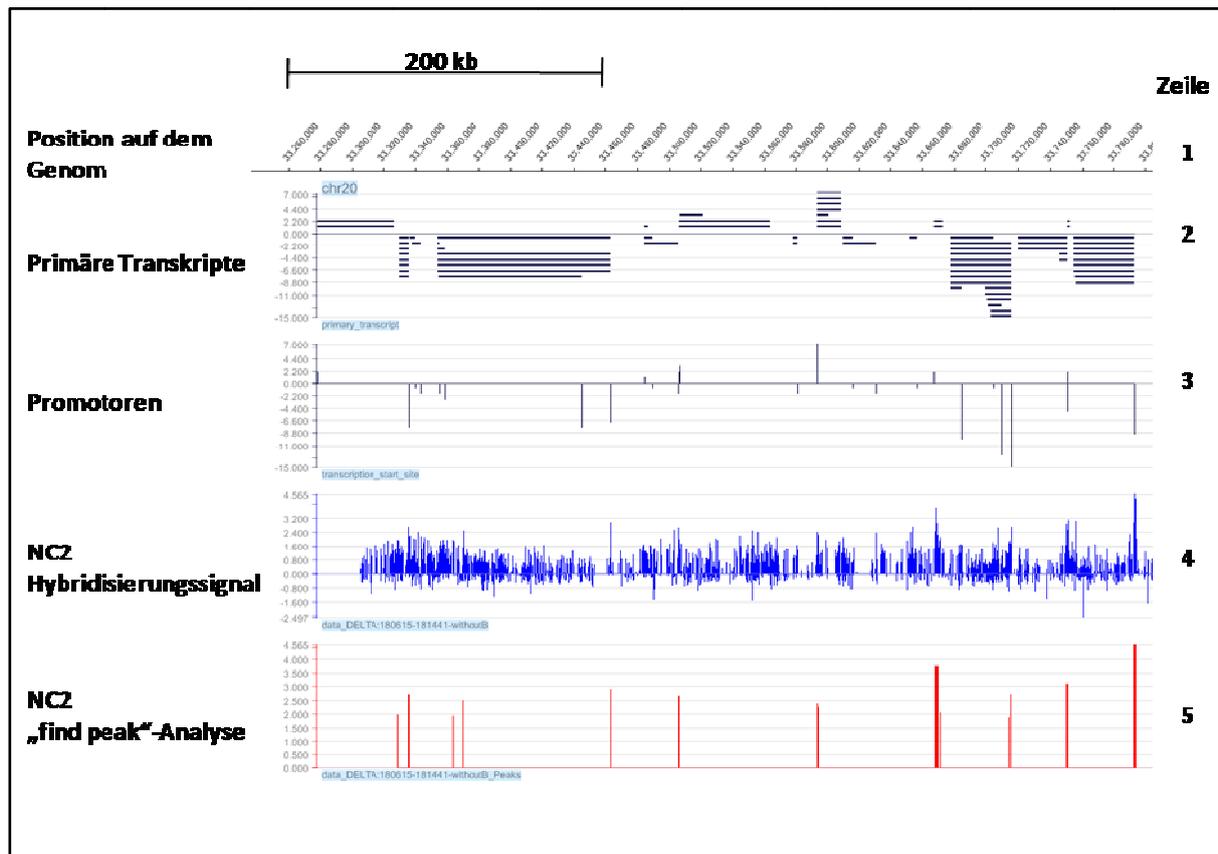


Abb.9.3: NC2-Profil der humanen ENCODE-Region des Chromosoms 20 für HeLa-Zellen

Zeile 1: humane ENCODE-Region des Chromosoms 20 (chr20: 33,304,929bp-33,804,928bp); **Zeile 2:** bekannte Transkripte für die Region; **Zeile 3:** Promotoren als Balken dargestellt (Balken nach oben [unten] für Transkription auf dem oberen [unteren] DNA-Strang); **Zeile 4:** normalisiertes Signal für NC2; **Zeile 5:** Genomregionen mit signifikanter Anreicherung für NC2. Bioinformatisch mittels einer „find peak“ Option des Programms „SignalMap“ ermittelt (peak window size bei 500bp und threshold bei 1).

9.4 Naszierende DNA am HPRT-Origin in Raji-Zellen

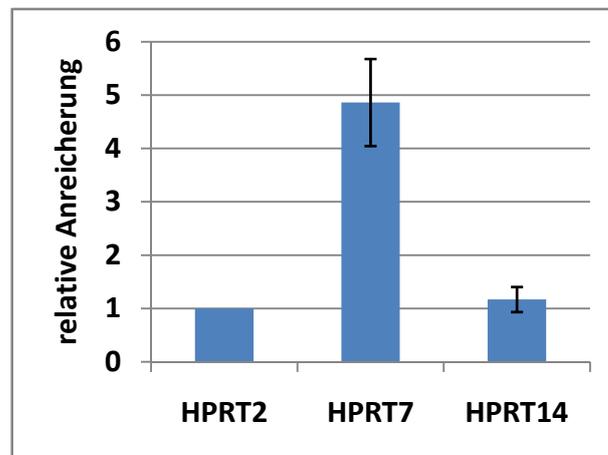


Abb.9.4: Naszierende DNA am HPRT-Origin (Raji-Zellen)

Quantitative Real-Time -PCR mit naszierender DNA: Der Mittelwert der rel. Anreicherung naszierender DNA wurde für den Referenzbereich HPRT2 auf eins gesetzt. Der Replikationsursprung HPRT7 ist um den Faktor 4,8 gegenüber Referenz HPRT2 und um den Faktor 4 gegenüber Referenz HPRT14 angereichert. Zur Detailansicht des Replikationsursprungs HPRT7 und der Referenzbereiche HPRT2 sowie HPRT14 siehe auch Abb.4.24 C.

9.5 Publikationen

Deutsch, M.J., Ott, E., **P. Papior** and Schepers, A. (2009) "The plasmid origin of replication of Epstein-Barr virus directs viral genomes to transcriptionally active regions of the nucleus." J. Virol. (in Revision).

Everett, R. D., S. Rechter, **P. Papior**, N. Tavalai, T. Stamminger and A. Orr (2006). "PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0." J Virol **80**(16): 7995-8005.

Maetzel, D., S. Denzel, B. Mack, M. Canis, P. Went, M. Benk, C. Kieu, **P. Papior**, P. A. Baeuerle, M. Munz and O. Gires (2009). "Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM." Nat Cell Biol **11**(2): 162-71.

Schepers, A. and **P. Papior** (2009). "Why are we where we are? Understanding replication origins and initiation sites in eukaryotes using ChIP-approaches." Chromosome Res.

Tavalai, N., **P. Papior**, S. Rechter, M. Leis and T. Stamminger (2006). "Evidence for a role of the cellular ND10 protein PML in mediating intrinsic immunity against human cytomegalovirus infections." J Virol **80**(16): 8006-18.

Tavalai, N., **P. Papior**, S. Rechter and T. Stamminger (2008). "Nuclear domain 10 components promyelocytic leukemia protein and hDaxx independently contribute to an intrinsic antiviral defense against human cytomegalovirus infection." J Virol **82**(1): 126-37.

9.6 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Die Ausbildung von Pre-Replikationskomplexen im Epstein-Barr-Virus und dem Menschen: Eine Genom-weite Analyse“

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 November 2009

Peer Papior