

Durch *Staphylococcus-aureus*- α -Toxin permeabilisierte,
mit *Simian Virus 40* infizierte CV1-Zellen als Modellsystem
zum Studium der DNA-Replikation höherer Zellen

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

Frank Eger

Tag der mündlichen Prüfung:

13.06.2001

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Probst

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. K.-U. Fröhlich

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Probst von Januar 1996 bis Mai 2001 am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Probst gilt mein besonderer Dank für die Überlassung von Thema und Arbeitsplatz, seine wertvolle Hilfe und sein ständiges Interesse an meinen Fortschritten. Er unterstützte mich stets bei Organisation, Technik und Finanzierung und war jederzeit diskussionsbereit.

Herrn Dr. Hans-Jörg Riedinger möchte ich für seine hilfreiche und geduldige Unterstützung danken und dafür, daß er sich für die Korrektur dieser Arbeit viel Zeit nahm.

Herrn Dr. Florian Prinz möchte ich für ausgezeichnetes Arbeitsklima, die gemeinsame Aufbruchsstimmung und zahlreiche Hinweise zur Standortwahl, Materialbeschaffung und die ausführliche Korrektur dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Frank Madeo möchte ich für die ausführliche Korrektur dieser Arbeit danken.

Bei den restlichen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für gutes Arbeitsklima und ständiges An-einem-Strang-ziehen.

Ausdrücklich möchte ich auch dem Land Baden-Württemberg für die Unterstützung durch ein Promotionsstipendium von Oktober 1997 bis September 1999 danken.

Meiner Frau Regina, meinen Kindern Hannah, Benedikt und Antonia und meinen Eltern Liesel und Alfred möchte ich danken für ihr Verständnis, ihre Ermunterung und fortwährende Opferbereitschaft und ihre Unterstützung meines Studiums und dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2	EINLEITUNG	2
2.1	DIE REPLIKATION EUKARYONTISCHER ZELLEN	2
2.2	DAS SIMIAN VIRUS 40 (SV40)	4
2.3	ZELLPERMEABILISIERUNG MIT ALPHATOXIN (α -TOXIN).....	5
2.4	SYNCHRONISATION DER REPLIKATION DURCH TRANSIENTE HYPOXIE.....	6
2.5	ZIELE DIESER DISSERTATION.....	7
3	MATERIALIEN UND METHODEN	8
3.1	MATERIALIEN.....	8
3.1.1	Viren und Zellen.....	8
3.1.1.1	SV40-Viren	8
3.1.1.2	CV1-Zellen.....	8
3.1.1.3	Staphylococcus aureus.....	8
3.1.2	Puffer und Lösungen	9
3.1.3	Kulturmedien, -bestandteile und Enzyme.....	9
3.1.4	Gase und Gasmischungen	9
3.2	METHODEN	9
3.2.1	Zellkulturen, Extrakte aus Zellen, Permeabilisierung.....	9
3.2.1.1	CV1-Zellen	10
3.2.1.2	HeLa-Zellen	10
3.2.1.3	CCRF-CEM-Zellen.....	10
3.2.1.4	Einfrieren und Auftauen der Zellen	11
3.2.1.5	Staphylococcus aureus.....	11
3.2.1.6	Methanolextrakte	11
3.2.2	SV40-Viren.....	12
3.2.2.1	Stocklysate	12
3.2.2.2	Urstocklysate und Infektion.....	13
3.2.2.3	Qualitätsbestimmung von Stocklysaten.....	14
3.2.2.4	Isolierung von Gesamt-DNA aus virusinfizierten Zellen	15
3.2.2.5	DNA-Isolierung nach Hirt und DNA-Reinigung	15
3.2.3	Markierung der DNA	16
3.2.3.1	Markierung in intakten Zellen mit [Methyl- ³ H]-Thymidin	16
3.2.3.2	Markierung permeabilisierter Zellen mit [α - ³² P]-dATP	16
3.2.3.3	Markierung permeabilisierter Zellen mit BrdUTP.....	17
3.2.3.4	Ermittlung der Verwertbarkeit der Radioaktivität	17
3.2.4	Markierung von Proteinen.....	18
3.2.5	Ultrazentrifugation von Replikationsintermediaten.....	18
3.2.5.1	Isokinetische Zentrifugation	18
3.2.5.2	Isopyknische Zentrifugation auf CsCl-Gradienten	19
3.2.6	Säurefällbare Radioaktivität.....	20
3.2.6.1	Ganze Zellen.....	20

3.2.6.2	Verdünnte, wäßrige DNA-Lösungen	20
3.2.6.3	Hirt-Überstände	21
3.2.6.4	Hirt-Rückstände	21
3.2.7	Gelelektrophoresen	21
3.2.7.1	Analytische Gelelektrophorese	21
3.2.7.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	21
3.2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
3.2.7.4	Chloroquin-Gelelektrophorese, Nachweis von „Form U“	24
3.2.8	Southern Blotting	25
3.2.9	Proteinbestimmung.....	26
3.2.10	α -Toxin-Isolierung, -Aufbewahrung, -Charakterisierung.....	27
3.2.10.1	Reinigung.....	27
3.2.10.2	Mikrodialyse kleiner Mengen α -Toxins	29
3.2.10.3	Halbquantitative Bestimmung der hämolytischen Aktivität	29
3.2.10.4	Herstellung standardisierter Erythrozytensuspensionen.....	29
3.2.10.5	Quantitativer Hämolysetest.....	30
3.2.11	O ₂ -Messung mit der Clark-Sauerstoffelektrode	30
3.2.11.1	Vorbereitung der Elektrode	30
3.2.11.2	Eichung der Clark-Sauerstoffelektrode.....	31
3.2.12	Ablauf von Permeabilisierungsversuchen.....	31
3.2.12.1	Bevorratung und Einsatz von Stammlösungen.....	31
3.2.12.2	Permeabilisierung von Zellen für Replikations-Versuche	32
3.2.12.3	Begasung von Zellkulturen, Aufhebung von Hypoxie	33
3.2.12.4	Adaptation der Begasungseinrichtungen auf Kunststoff.....	33
3.2.12.5	Das optimierte Permeabilisierungsmedium	34
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	35
4.1	ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON α -TOXIN.....	35
4.1.1	Anzucht des <i>Staphylococcus aureus</i>	35
4.1.2	Nachweis und Bestimmung von α -Toxin	35
4.1.3	Reinigung über die CM-Cellulose	35
4.1.4	Reinigung über die Cu-Chelat-Säule	36
4.1.5	Fällung mit Ammoniumsulfat.....	37
4.1.6	Gesamtergebnis der Reinigung.....	37
4.1.7	Dialyse, Aufbewahrung, Dosierung	37
4.2	REPLIKATION IN PERMEABILISIERTEN ZELLEN UNTER NORMOXISCHEN BEDINGUNGEN .	38
4.2.1	Untersuchungsmethoden	38
4.2.1.1	Messung des Einbaus radioaktiver Vorstufen	38
4.2.1.2	Alkalische Rohrzuckergradienten	39
4.2.1.3	Analyse dichtemarkierter DNA durch isopyknische Zentrifugation	40
4.2.1.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	40
4.2.2	Zusammensetzung des Testsystems.....	40
4.2.2.2	α -Toxinkonzentration	41
4.2.2.2	Replikation bei verschiedenen Zelldichten.....	44
4.2.2.3	DTT-Zusatz.....	45
4.2.2.4	Zusatz von Zellextrakten und 10000g-Überständen	47
4.2.2.5	Weitere Medienbestandteile bzw. -zusätze	48
4.2.2.6	Variationen der Standardinkubationsbedingungen	54
4.2.2.7	Proteinbiosynthese in permeabilisierten Zellen.....	58
4.2.2.8	Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase.....	61

4.2.3	Charakterisierung des optimierten Systems	63
4.2.3.1	Gleichzeitige Markierung mit [³ H]-Thd und [α - ³² P]-dATP	63
4.2.3.2	Einfluß der Kultivierungsdauer von CV1-Zellen auf die SV40-Replikation nach Permeabilisierung	65
4.2.3.3	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	66
4.3	REREPLIKATION IN PERMEABILISIERTEN ZELLEN	68
4.3.1	Beeinflussung der Replikation durch BrdUTP	68
4.3.2	Isopyknische Zentrifugation zum Rereplikationsnachweis	69
4.4	REPLIKATION IN PERMEABILISIERTEN ZELLEN UNTER HYPOXISCHEN BEDINGUNGEN ..	71
4.4.1	Zielsetzungen.....	71
4.4.2	O ₂ -Messungen mit der Clark-Elektrode.....	72
4.4.2.1	Messungen in Permeabilisierungsmedium.....	72
4.4.2.2	Messungen in DMEM	74
4.4.2.3	Wirkung von Na ₂ -Dithionit in Kulturmedium	75
4.4.3	Etablierung von Hypoxie in permeabilisierten CV1-Zellen.....	76
4.4.4	Allgemeine Wirkungen von Hypoxie auf die SV40-Replikation in CV1-Zellen	77
4.4.4.1	Übersicht.....	77
4.4.4.2	Toxizität von Ascorbatoxidase und Ascorbinsäure in permeabilisierten Zellen .	78
4.4.5	Permeabilisierung normoxischer CV1-Zellen mit anschließender Hypoxie ...	80
4.4.5.1	Hypoxie durch Begasung allein	80
4.4.5.2	Ascorbinsäure- und Ascorbatoxidase-Wirkung auf SV40-infizierte CV1-Zellen mit und ohne hypoxische Begasung.....	81
4.4.5.3	Normoxische Zellen, Permeabilisierung unter hypoxischer Begasung in Gegenwart von Ascorbat und Ascorbatoxidase.....	83
4.4.5.4	[Methyl- ³ H]-Thd/[α - ³² P]-dATP-Doppelmarkierung unter Hypoxie und Zugabe von Ascorbat und Ascorbatoxidase.....	85
4.4.6	Hypoxische Vorbegasung <i>in-vivo</i> ohne Ascorbinsäure	86
4.4.7	Hypoxische Begasung <i>in vivo</i> , hypoxische Permeabilisierung.....	87
4.5	REOXIGENIERUNG PERMEABILISierter ZELLEN.....	89
4.5.1	Permeabilisierung vor hypoxischer Begasung, Konditionierung des Permeabilisierungsmediums	89
4.5.2	Permeabilisierung 1 min nach Reoxigenierung <i>in vivo</i>	91
4.5.3	Reoxigenierung gleichzeitig mit Permeabilisierung	92
4.5.4	[³ H]-/[³² P]-Doppelmarkierung nach Reoxigenierung	94
4.5.5	Reoxigenierung in Gegenwart von BrdUTP	95
4.5.6	Nachweis von „Form U“ in permeabilisierten CV1-Zellen.....	96
4.6	MEDIENZUSÄTZE UND HYPOXIE	97
4.6.1	Einfluß von Glucose.....	97
4.6.2	Einfluß von Desoxycytidin (dCyd).....	97
4.6.3	Einfluß von Desferroxamin und Hydroxyharnstoff	98
5	LITERATUR.....	100

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildungen
AS	Aminosäuren
ATCC	American Type Culture Collection
bidest	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel, Zerfälle pro Sekunde
bzw.	beziehungsweise
CCL	<i>culture collection list</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
Da	Dalton
d. h.	das heißt
DNA	<i>desoxyribo nucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxytriphosphate
EAT	Ehrlich-Aszites-Tumorzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
i. p.	intraperitoneal
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KG-Puffer	Kalium-Glutamat-Puffer
LS	Längenstandard
LSC	<i>liquid scintillation counter</i> (Flüssigkeits-Szintillationszähler)
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
MW	<i>molecular weight</i>
μ g	Mikrogramm
nm	Nanometer
NTA	Nitriloessigsäure
NTP	Nucleosidtriphosphate
OD	optische Dichte
p. a.	pro analysi
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PS	Pferdeserum
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RF-A	<i>replication factor A</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunde
Sty I	Restriktionsenzym
SV 40	<i>simian virus 40</i>
t-Ag	kleines T-Antigen
T-Ag	großes T-Antigen
U	Unit (Enzymaktivität)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UZ	Ultrazentrifugation
Vol.	Volumen
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht

1 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die eukaryontische Replikation mit Hilfe der α -Toxin-Permeabilisierung unter Verwendung des Modellsystems der SV40-Replikation unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen untersucht. Das bereits bei Eger 1995 benutzte Kalium-Glutamat-PIPES-Puffersystem für permeabilisierte Zellen wurde weiter optimiert, um die *in-vivo*-Replikation von SV40 in CV1-Wirtszellen so gut wie möglich zu imitieren. Die Nachweisverfahren für die SV40-Replikationsprodukte und die Etablierung und Aufrechterhaltung von Hypoxie (u.a. durch Zugabe von Ascorbinsäure, Ascorbatoxidase und NaHCO_3 und hypoxische Begasung der untersuchten Zellen im Wärmerraum) wurden erweitert bzw. verfeinert.

Folgende Feststellungen werden durch die erhaltenen Daten gestützt:

1. Prä-Initiation und Initiation finden in permeabilisierten Zellen statt.
2. Die DNA-Elongation in permeabilisierten Zellen ist der *in vivo* vergleichbar.
3. Der hypoxisch arreterte Zustand der SV40-Replikation in intakten Wirtszellen läßt sich sowohl durch normoxische als auch durch hypoxische Permeabilisierung hypoxischer Zellen aufheben. Nach Reoxigenierung kurz vor Permeabilisierung wird allerdings der stärkste Effekt beobachtet.
4. In hypoxischen, permeabilisierten, SV40-infizierten CV1-Zellen ist die Etablierung eines Zustands der DNA-Replikation möglich, der dem Zustand in hypoxischen, intakten, SV40-infizierten CV1-Zellen entspricht. Dies widerspricht der Hypothese, daß dCTP den hypoxisch verursachten Replikaufstau verhindert bzw. aufhebt.
5. Zugabe verschiedener Substanzen (z.B. cAMP, Emetin) steigert bzw. verringert die Replikation in permeabilisierten Zellen z.T. erheblich.
6. Hypoxische Zustände können durch Zugabe von Ascorbinsäure, NaHCO_3 und Ascorbatoxidase ins Permeabilisierungsmedium schneller etabliert werden als durch ausschließliche hypoxische Begasung.
7. Die Zugabe von Na-Dithionit in DMEM etabliert ohne längere hypoxische Begasung keinen hypoxischen Zustand der Replikation *in vivo*.

2 EINLEITUNG

2.1 DIE REPLIKATION EUKARYONTISCHER ZELLEN

Voraussetzung für Wachstum und Vermehrung in der Natur ist die Zellteilung. Eingeleitet wird diese durch die identische Verdoppelung der Erbinformation durch semikonservative Replikation. Bei eukaryontischen Zellen dauert dieser Vorgang mehrere Stunden. Der eukaryontische Zellzyklus gliedert sich in Gap-Phase 1 (G1), Synthesephase (S), Gap-Phase 2 (G2) und Mitosephase (M). Ob die Zelle diesen Zyklus vollständig durchläuft und sich schließlich teilt oder nach erfolgter Zellteilung in einen replikationsfreien Ruhezustand (G0-Phase) übergeht, entscheidet sich in der G1-Phase und hängt u.a. von der Nährstoffversorgung, dem O₂-Partialdruck und dem Vorhandensein von Wachstumsfaktoren ab. Eukaryontische Zellkulturen verdoppeln sich alle 9-26 h, Zellen in Organismen benötigen hierfür zwischen 2 h und 100 Tagen. Viele terminal differenzierte Zellen teilen sich nicht mehr (Pardee 1989).

Die DNA-Replikation beginnt bei allen Organismen an Replikationsursprüngen, sogenannten Origins. Die Synthese erfolgt in 5'→3'-Richtung. Dabei wird einer der beiden neu entstehenden DNA-Stränge kontinuierlich, der andere diskontinuierlich repliziert. Das Genom der meisten Prokaryonten und vieler Viren besitzt nur einen Origin, die Replikationsgabeln bewegen sich bidirektional in entgegengesetzte Richtungen auf den Terminationspunkt zu.

Das menschliche Genom besteht aus ca. 2.9×10^9 Basenpaaren. Um Genome dieser Größenordnung in wenigen Stunden replizieren zu können, startet die Replikation gleichzeitig in vielen diskreten Genomeinheiten, sogenannten Replikons. Die DNA-Synthese erfolgt zeitlich und räumlich geordnet. Die Ursprünge der Replikons sind zwischen 10 und 1000 kb voneinander entfernt und in sogenannten Clustern organisiert, die aus bis zu mehreren hundert Replikons bestehen können. Die Replikons eines Clusters beginnen gleichzeitig zu replizieren. Verschiedene Cluster replizieren zu unterschiedlichen Zeiten während der S-Phase. Die zeitliche Abfolge der Aktivierung einzelner Cluster ist dabei festgelegt (Hand 1978). Die Assoziation mit der Kernmatrix scheint dabei für den Ablauf und die Organisation der Replikation von Bedeutung zu sein (DeBruyn 1988, Jackson 1986, Nakayasu 1989). Elementare Aufgaben des Genoms (Genexpression, Hormonantwort) müssen auch während der S-Phase aufrechterhalten werden (Vemuri 1993, Prinz 1995).

Auf der Ebene der Replikons lässt sich die Replikation in 4 Phasen einteilen:

- Prä-Initiationsphase: Ausbildung eines Multi-Protein-Komplexes am Origin nach Stimulation durch Replikationssignale.
- Initiation: Entwindung der DNA, Stabilisierung der Einzelstrang-DNA. Primerbildung am Origin. Die Primer werden zu Okazaki-Fragmenten und schließlich zu kompletten Tochtersträngen verlängert (Nethanel 1988).

- Elongation: Zwei Replikationsgabel-Apparate bewegen sich in entgegengesetzter Richtung vom Origin weg auf ihre Terminationszone hin. Eine scharfe Grenze zwischen Initiation und Elongation kann nicht gezogen werden.
- Termination: selbständige Tochtergenome entstehen, bei Eukaryonten verschmelzen die Replikons miteinander.

Die Phasen laufen unabhängig voneinander ab und lassen sich auf verschiedenen Ebenen beeinflussen, beispielsweise bei der Wundheilung, während der frühen Embryonalentwicklung oder beim Wachstum von Tumoren (Geider 1981, Gellert 1981, Kornberg 1992, Probst 1988 a + b, Ogawa 1980, Wormer 1995). Die Initiation der Replikation ist der wahrscheinlich wichtigste Angriffspunkt einer Regulation (Lewin 1994).

Originsequenzen waren bis vor kurzem lediglich bei Prokaryonten, Hefen, Bakteriophagen und eukaryontischen Viren (z.B. SV40) identifiziert (Moriya 1985, Nossal 1983, Baldacci 1984). Gegenstand der Forschung ist derzeit einerseits, die Orte der Initiation zu definieren und andererseits die an der Initiation beteiligten Proteine zu identifizieren. Bei höheren eukaryontischen Zellen wurden spezifische Origin-Sequenzen im humanen Lamin-B2-Locus und im DHFR-Locus nachgewiesen (Abdurashidova 2000, Altman 2001). Die identifizierten Replicons bestehen aus einer core-Sequenz, die Bindestellen für Initiations-Proteinen und DUEs (DNA unwinding elements) enthält und zusätzlichen Sequenzen, die die Effizienz der Initiation erhöhen (DePamphilis 1996, Newlon 1996). In *S. cerevisiae* erfordert die Initiation der Replikation eine ARS-Region (autonomously replicating sequence in cis-Stellung in der Nähe von DUE-Regionen und Bindestellen für den ORC (origin recognition complex) und weiteren Initiations-Proteinen (Bielinsky 1998 und 1999).

In unserer Arbeitsgruppe wurde entdeckt, daß ein entscheidender Schaltvorgang bei der Replikation in Säugetierzellen vom Sauerstoffpartialdruck (pO_2) in der direkten Umgebung der Zellen abhängt (Riedinger 1991 und 1992, Amellem 1991 und 1993, Gekeler 1993). Der pO_2 ist in Geweben ein verlässlicher Indikator für die Qualität der Nährstoffversorgung einer Zelle durch den Blutkreislauf (Giaccia 1996). Diese Regulation hat eine große medizinische Bedeutung, z.B. im Hinblick auf Tumorentstehung und -wachstum. Aufgrund vorausgegangener Untersuchungen (Engelcke 1992, Probst, G. 1999) wird vermutet, daß die O_2 -abhängige regulatorische Antwort durch Veränderungen der Desoxynukleotid-Pools der Zellen ausgelöst werden kann. Um dies zu überprüfen, müssen die zellulären niedermolekularen Pools von außen manipuliert werden können, ohne die strukturelle Organisation der Zelle und ihren Gehalt an Proteinen und anderen biologischen Makromolekülen zu verändern. Voruntersuchungen bestätigten die Vermutung, daß dieses Ziel mit Hilfe des porenbildenden α -Toxins von *Staphylococcus aureus* erreichbar ist (Eger 1995).

2.2 DAS SIMIAN VIRUS 40 (SV40)

Aufgrund der Größe und der komplexen Organisation eukaryontischer Genome bedient man sich einfacher Modellsysteme. Das doppelsträngige DNA-Virus Simian Virus 40 (SV40) ist das bestcharakterisierte Modellsystem zum Studium der DNA-Replikation in Säugetierzellen (Stillman 1989). SV40 ist ein DNA-Tumorvirus aus der Gruppe der Papovaviren. Der natürliche Wirt ist die afrikanische grüne Meerkatze. Das 5243 bp große, ringförmig geschlossene Genom des SV40 codiert für 6 Genprodukte: Im Verlauf des Replikationszyklus werden zunächst die „frühen“ Genprodukte gebildet, das multifunktionelle große Tumorantigen (T-Ag) und das kleine Tumorantigen (t-Ag). Danach wird die virale DNA repliziert. Anschließend werden die „späten“ Genprodukte gebildet (das Agnoprotein sowie VP1, VP2 und VP3, Salzmann 1988). Letztere sind zur Verpackung der viralen DNA notwendig. Schließlich werden die Viruspartikel durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt (Winnacker 1985). Zellen, in denen dieser Replikationszyklus stattfinden kann, werden als permissiv bezeichnet. SV40 kann aber auch nicht-permissive Zellen infizieren (z.B. Maus und Hamster). Die Virus-DNA kann dann in das Wirts-Genom integrieren und nach T-Ag-Expression die Transformation der Wirtszelle verursachen (Knippers 1990, Martin 1981, Stahl 1983 a und b, Tooze 1981).

Das SV40 hat mehrere Eigenschaften, durch die es sich in besonderer Weise als Modell für die eukaryontische Replikation eignet:

- Das Virusgenom assoziiert mit Histonen, es entsteht ein Minichromosom aus 22-28 Nukleosomen (Jakobovits 1980, Sogo 1986, Varshavsky 1979).
- Das Virusgenom besteht aus genau einem Replikon mit definiertem Origin.
- Außer dem T-Ag werden keine weiteren viralen Replikationsfaktoren benötigt. Etwa 90% des T-Ag befinden sich im Zellkern, 10% im Cytoplasma. Teilsequenzen werden auf der Zelloberfläche präsentiert. Das T-Ag reguliert die Transkription viraler Genprodukte (Contreras 1982, Harzell 1984, Mitchell 1987, Rio 1983, Tack 1985, Wildemann 1989), induziert zelluläre DNA-Replikation und wirkt als DNA-Helicase (Hiscott 1988, Schutzbank 1982, Scott 1983, Segawa 1987, Soprano 1983, Stahl 1986).
- Die Replikation des viralen Genoms erfolgt im Zellkern der Wirtszelle unter Beteiligung zellulärer DNA-Polymerasen und Replikationsfaktoren; die Virusreplikation ähnelt dadurch weitgehend der zellulären. Durch Hemmstoffe wie Aphidicolin oder durch transiente Hypoxie läßt sich die virale SV40-Replikation in gleicher Weise beeinflussen wie die zelluläre (Dreier 1991, 1993 und 1995).
- Das Virusgenom kann *in vitro* repliziert werden (Li+Kelly 1984, Waga 1994, Uhlmann 1994).
- Die Isolierung des SV40-Genoms erfolgt schnell und einfach (Hirt 1967).
- Das Genom eukaryontischer Zellen wird in jeder S-Phase nur ein Mal repliziert, das SV40-Genom viel häufiger. Dies führt zu einer sehr großen Zahl von SV40-Genomen in jeder infizierten Zelle (bis zu 200.000 Genome/Zelle). Isolierung und Charakterisierung wird durch die große Anzahl an SV40-Genomen vereinfacht (Riedinger 1995).

Die SV40-Replikation erfolgt, ausgehend vom Origin, semikonservativ und bidirektional:

Zwei T-Ag-Hexamere, Topoisomerasen und der Replikationsfaktor A (RF-A) entwinden unter ATP-Verbrauch den Origin-Bereich (Borowiec 1991, Dreier 1993, Fanning 1992, Moarefi 1993, Scheidtmann 1991). Dabei vermittelt das T-Ag das Zusammentreten des Prä-Initiationskomplexes. Es wirkt als Schmelzprotein und als Helicase (DePamphilis 1986 und 93, Dean 1987, Fanning 1992, Murakami 1993, Stahl 1986, Wold 1987). Die Replikation der viralen DNA unterscheidet sich von der der zellulären DNA durch die Beteiligung des T-Ags. Nach Aufwindung des Origins bildet die DNA-Polymerase α /Primase kurze Primer aus ca. 10 Ribonukleotiden, an deren Ende sich ca. 26 Desoxyribonukleotide anschließen (Nethanel 1988 und 1992, Dennis 1993, Bullock 1989 und 1991).

Die Elongation erfolgt durch Polymerase δ unter Mitwirkung von ¹PNCA und ²RFC, die Synthese beider Stränge ist dabei gekoppelt (Prelich 1988, Waga 1994). Aus den Okazakistücken entstehen nach Abbau der RNA-Anteile und Ligation durch DNA-Ligase I (Ogawa 1980) vollständige Tochterstränge. Die große Anzahl beteiligter Replikationsfaktoren eröffnet viele Möglichkeiten der Regulation der Replikation (Erdile 1991, Nethanel 1988, 1990 und 1992, Pan 1993).

In der Terminationsregion verlangsamt sich die Replikationsgeschwindigkeit (Danna 1972, Lai 1975, Tapper 1979), die DNA-Stränge werden durch Topoisomerasen getrennt. Neben dem Hauptprodukt des superhelikalen Virusgenoms entstehen Nebenprodukte (Katenane, Dimere), nachweisbar auf zweidimensionalen Gelen (Eger 1995, Snapka 1988, Sundin 1980 und 1981, Weather 1985, Yang 1987).

2.3 ZELLPERMEABILISIERUNG MIT ALPHATOXIN (α -TOXIN)

Eukaryontische Zellen sind von einer Membran umgeben, die aus einer Lipiddoppelschicht unterschiedlicher Zusammensetzung sowie integralen und peripheren Membranproteinen bestehen. Polare Stoffe wie Nukleosidtriphosphate und Analoga (z.B. BrdUTP) können lediglich in nenneswertem Ausmaß ins Zellinnere gelangen, wenn spezielle Transportproteine in der Membran vorhanden sind. Höhere Eukaryontenzellen exprimieren i.d.R. keine derartigen Transportproteine (Voet 1995). Bisher war es nahezu unmöglich, niedermolekulare Stoffe hoher Ladung in die Zelle zu transportieren, ohne die Vitalität der Zelle stark zu beeinträchtigen (Ahnert-Hilger 1989 a, Trummler 1995).

U. a. durch *Anlegen hoher Spannung* (Baker 1978 und 1982), *Permeabilisierung mittels Detergentien* wie z.B. Digitonin (Brooks 1983, Dunn 1983) und *Zellpermeabilisierung mittels porenbildender Proteine* (α -Toxin, Streptolysin O: Ahnert-Hilger 1985, a und b und

¹PNCA: proliferating nuclear cell antigen. Die Bindung von PNCA an die DNA-Polymerase δ steigert deren Prozessivität erheblich

²RFC: Replikationsfaktor C

1989, b und c, Bader 1986, Howell 1987, Wilson 1983, Dayanithi 1994) können polare Substanzen in die Zelle transportiert werden.

α -Toxin ist ein Exotoxin, das von *Staphylococcus aureus* sezerniert wird. Die Exotoxine von *Staphylococcus aureus* bilden den Hauptpathogenitätsfaktor dieses Organismus. Die Porenbildung ist ein ungeordneter Prozeß, bei dem sich die Monomeren (Molekulargewicht 34 kD) nach Einlagerung in die Membran zu Tetra- bis Heptameren zusammenfinden und Poren unterschiedlicher Eigenschaften und Lebensdauer bilden können (Menestrina 1991, Jonas 1994, Bortoletto 1998, Krasilnikov 1999).

α -Toxin wurde zur Permeabilisierung verschiedener Zellsysteme (Hepatocyten, PC 12, CCRF, HeLa, Ehrlich-Aszites, CV1) verwendet (McEwen 1985, Eger 1995, Martin 1997). Es bindet bereits in geringen Konzentrationen (<100nM) an bestimmte Zellen (Kaninchenerythrozyten, humane Blutplättchen, Monozyten, Endothelzellen) über vermutete hochaffine Akzeptorproteine. Bei höheren Konzentrationen bindet α -Toxin dagegen über eine unspezifische Absorption an alle Lipidmembranen (Bhakdi 1991).

α -Toxin kann als Werkzeug benutzt werden, um das intrazelluläre Milieu zu beeinflussen. Poren aus 5-7 Monomeren entstehen nach wenigen Minuten und weisen einen Durchmesser von 1-2nm auf. Durch diese können polare Stoffe bis ca. 2kDa Molekulargewicht hindurchgelangen. Die inneren Membranen der Zellen (Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Golgi-System) bleiben intakt, Proteine treten nicht aus. Die Replikation der Zellen wird bei richtiger Wahl des umgebenden Mediums nicht beeinträchtigt, in Einzelfällen sogar beschleunigt. Die Replikation findet auch noch Stunden nach Permeabilisierung durch α -Toxin statt. Grad und Fortschritt der Permeabilisierung kann durch luminometrische Messung des austretenden ATPs verfolgt werden. Replizierende DNA kann direkt durch Zugabe radioaktiver oder dichtemarkierter Nukleotide markiert werden (Föhr 1993, Trummler 1995, Eger 1995)

2.4 SYNCHRONISATION DER REPLIKATION DURCH TRANSIENTE HYPOXIE

Die DNA-Replikation eines jeden Organismus unterliegt der Kontrolle auf verschiedenen regulatorischen Ebenen. Ein die Initiation betreffender Schaltvorgang hängt in Säugetierzellen vom Sauerstoffpartialdruck (pO_2) in der direkten Umgebung der Zellen ab (Brischwein 1996, Gekeler 1988, Probst 1980, 1984 und 1989), was bedeutet, daß der pO_2 an der physiologischen Kontrolle der normalen oder krankhaften Zellproliferation bei Säugetieren beteiligt ist (Embryonal-Entwicklung, Wundheilung, Tumorentwicklung, -wachstum und -bekämpfung sowie Metastasenbildung: Bedford 1976, Green 1998 und 2001, Ludlow 1993, Pettersen 1983, Tannock 1992). Der pO_2 ist in Geweben ein verlässlicher Indikator für die Güte der Nährstoffversorgung einer Zelle durch den Blutkreislauf. In vielen größeren Tumoren existiert eine hypoxische innere Zone, die 100-150 μ m vom nächsten Blutgefäß entfernt beginnt. Die dort befindlichen Tumorzellen proliferieren kaum, sind in der G1/S-Phase arretiert und können durch Chemotherapeutika kaum bekämpft werden (Siemann 1988, Tannock 1968). Diese pO_2 -abhängige regulatorische

Antwort könnte durch Veränderungen der Desoxynukleotid-Pools der Zellen ausgelöst werden. Bei dauerhafter Unterschreitung eines bestimmten pO_2 wird die Ribonukleotidreduktase inaktiv (Thelander, 1983). Längere Hypoxie mit 200 ppm O_2 führt deshalb zu einer Verarmung der Zelle an dNTPs, insbesondere dCTP. Neben der Funktion als DNA-Baustein wird dCTP in der Zelle auch eine regulatorische Funktion bei der DNA-Replikation (v.a. Initiation) zugeschrieben. Ein Absinken des dCTP-Spiegels geht mit Hemmung der Replikoninitiationen einher (Engelcke 1992, Probst 1999). In CCRF-, He-La- und Ehrlich-Aszites-Zellen lässt sich die Replikoninitiation durch Zugabe von dCyd zu hypoxischen Zellen wieder starten (Probst 1999, Brischwein 1997, Probst 1989).

Der dCTP-Spiegel der Zelle könnte Bindeglied zwischen pO_2 und Initiation der Replikation sein. Sollte er das alleinige Bindeglied sein, könnte in permeabilisierten Zellen eine Hemmung der Replikation durch Hypoxie verhindert werden, da alle dNTP in ausreichender Konzentration zur Verfügung gestellt werden können (Loffler 1987).

2.5 ZIELE DIESER DISSERTATION

In dieser Arbeit wurde ein Modellsystem zum Studium der Regulation der DNA-Replikation geschaffen und optimiert. Es besteht aus SV40-infizierten CV1-Zellen, die mit Hilfe von *Staphylococcus-aureus*- α -Toxin permeabilisiert werden. Das Verständnis über die Regulation der Zellvermehrung soll mit Hilfe dieses Modellsystems vertieft werden. Dabei bildet die Möglichkeit der Untersuchung der sauerstoffabhängigen Veränderungen der zellulären Replikation einen Forschungsschwerpunkt. Dadurch wurden Grundlagen erarbeitet, deren Berücksichtigung für die Ausarbeitung optimaler Therapieprotokolle, beispielsweise bei Tumorerkrankungen, wichtig ist.

Folgende Punkte sollten im Rahmen dieser Arbeit im Besonderen untersucht werden:

- Isolierung von hochreinem α -Toxin hoher hämolytischer Aktivität unter Modifikation bislang bekannter Isolierungs- und Kultivierungsverfahren.
- Optimierung der Bedingungen für die α -Toxin-Permeabilisierung SV40-infizierter CV1-Zellen zum Studium der DNA-Replikation unter hypoxischen, normoxischen und reoxigenierten Bedingungen.
- Untersuchung der Prä-Initiation und Initiation in permeabilisierten Zellen. Etablierung und Anpassung der entsprechenden Nachweismethoden auf permeabilisierte Zellen.
- Untersuchung der Rolle von dCTP als Bindeglied für die Regulation der Replikation.
- Etablierung der Hypoxie in permeabilisierten Zellen.
- Zielgerichtete Veränderung der Konzentration der Bestandteile des Permeabilisierungsmediums und Untersuchung der Bedeutung weiterer Substanzen, z.B. von Cytosolbestandteilen anderer Zellen, für die Replikation.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 Viren und Zellen

3.1.1.1 SV40-Viren

CV1-Zellen wurden für diese Arbeit mit SVS-Wildtyp des SV40 infiziert. SV40 neigt bei Infektionen höherer Multiplizität zur Rekombination. Die DNA des vorhandenen und von R. Knippers, Konstanz, bezogenen Virusmaterials hatte sich beim Verdau mit Restriktionsenzymen als heterogen erwiesen. Deshalb wurde durch Dreier SV40-Wildtyp-DNA aus dem Plasmid pSV40 isoliert, welches aus dem Vektor pAT 153 besteht, in dessen BamHI-Schnittstelle das komplette SV40-Genom einkloniert ist. Die nach Restriktionsverdau gewonnene DNA wurde religiert und in TC7-Zellen transfiziert. Das Zelllysate lieferte nach „plaque purification“ einheitliche SV40-Wildtyp-Stocklysate (Dreier, 1995, Winter, 1995). Nur diese SV40-Wildtyp-Stocklysate („Primär-Stocklysate“) eignen sich zur Infektion von CV1-Zellen mit geringer Multiplizität zur Herstellung von „Sekundär-Stocklysaten“. Mit diesen werden CV1-Zellen mit hoher Multiplizität infiziert.

3.1.1.2 CV1-Zellen

Als Wirte von SV40 dienten CV1-Zellen (ATCC-Nr. CCL 70). Diese immortalisierten Zellen entstammen der Niere einer afrikanischen Grünen Meerkatze (1964, african green monkey kidney cells, Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 53, 1964). CV1-Zellen sind nahezu diploid (\emptyset 60 Chromosomen) und sie wachsen mit Kontaktinhibition. Die verwendeten CV1-Zellen wurden im Januar 1994 von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen und seitdem als Monolayer in DME-Medium in Kultur gehalten. Die Vermehrung von SV40 in CV1-Zellen oder Subzelllinien ist etabliert (Dreier, 1995).

3.1.1.3 Staphylococcus aureus

Zur Produktion und Isolierung des in dieser Arbeit verwendeten α -Toxins wurde *Staphylococcus aureus*, Wood 46 verwendet. Der Stamm wurde von M. Gratzl, Ulm, bezogen. *Staphylococcus aureus* sezerniert, neben weiteren Exotoxinen, α -Toxin in den Kulturüberstand. Die α -Toxin-Monomere (MW 34 kDa) lagern sich rezeptorvermittelt oder spontan in die Membran ein und bilden dort ringförmige, porenbildende Oligomere. Diese können aus 4-7 Monomeren bestehen (Zoller, 1992, Bortoleto, 1998, Bobich + Zheng, 1998, Krasilnikov, 1999).

Eukaryontische Zellmembranen sind für viele Kleinmoleküle wie z.B. dATP impermeabel und werden durch α -Toxin dafür permeabilisiert. Die Poren bilden sich nach wenigen Minuten und weisen einen Durchmesser von 1-2 nm auf. Durch sie können Moleküle bis 2 kDa entsprechend ihres Konzentrationsgradienten diffundieren.

3.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden grundsätzlich mit entionisiertem, bidestilliertem Wasser hergestellt. Dieses Wasser wird möglichst frisch hergestellt. Alle Chemikalien wurden alle in der Qualitätsstufe *pro analysi* oder gleichwertigen Qualitäten bezogen. Alle Puffer und Lösungen wurden in frisch gebrannten Flaschen angesetzt. Auf die Zusammensetzung der verschiedenen Medien wird bei der jeweiligen Methode eingegangen.

3.1.3 Kulturmedien, -bestandteile und Enzyme

Die nachfolgenden Medien und Medienkomponenten wurden von den Firmen Gibco oder Seromed bezogen und mit fötalem Kälberserum (FKS) oder Pferdeserum (PS), sowie mit Antibiotika versetzt. Alle Enzyme wurden von der Firma Boehringer Mannheim bezogen und bei -20°C gelagert.

3.1.4 Gase und Gasmischungen

Argon 5.0	AGA Edelgas GmbH
Stickstoff 5.0	AGA Edelgas GmbH
Kohlendioxid („medizinische Qualität“)	Buse
Sauerstoff („Narkose-Qualität“)	Linde
„Normoxische“ Gasmischung mit CO ₂	5% CO ₂ 20% O ₂ 75% N ₂
„Normoxische“ Gasmischung ohne CO ₂	20% O ₂ 80% N ₂
„Hypoxische“ Gasmischung mit CO ₂	5% CO ₂ 200 bzw. 400 ppm O ₂ Rest Argon
„Hypoxische“ Gasmischung ohne CO ₂	200 bzw. 400 ppm O ₂ Rest Argon
„Reoxigenierende“ Gasmischung mit CO ₂	5% CO ₂ 95% O ₂
„Reoxigenierende“ Gasmischung ohne CO ₂	100% O ₂

3.2 METHODEN

3.2.1 Zellkulturen, Extrakte aus Zellen, Permeabilisierung

Der pH-Wert in einer DMEM-Zellkultur (pH 7,4) wurde durch Bicarbonat-Pufferung bei Begasung mit 5% CO₂ (v/v) aufrechterhalten. Dies galt sowohl für die Anzucht der Zellen im Brutschrank als auch für die Begasung während der Versuche. Es ließ sich nicht vermeiden, die Zellen für einige Minuten zur Passage, zum Transport oder zur Infektion mit SV40 der Raumtemperatur und -atmosphäre auszusetzen. Die Kultivierung der CV1-, HeLa-, CCRF-CEM-, und Ehrlich-Aszites-Tumorzellen erfolgte bei 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit und 37°C (EAT mit DMEM und 10% PS kultiviert).

Die Zugabe von FKS in das vorgemischte und bei 4°C aufbewahrte DMEM leitete einen Alterungsprozeß des Mediums ein. Permeabilisierte, SV40-infizierte CV1-Zellen zeigten einen um bis zu 70% höheren Einbau (120 min Dauermarkierung mit [α -³²P]-dATP), wenn das DMEM weniger als 2 Wochen vor Versuchsbeginn mit FKS versetzt wurde (möglicherweise wegen einer höheren Proteinbiosynthese in frischem DMEM). Der [α -³²P]-dATP-Einbau in permeabilisierten Zellen, bei denen das DMEM 20-24 h nach erfolgter SV40-Infektion komplett und nochmals 2-4 h vor Versuchsbeginn zur Hälfte ausgetauscht wurde erhöhte sich nur um 5-10% gegenüber dem Einbau in Zellen, bei denen das DMEM nach Infektion nicht ausgetauscht wurde. Auf den kompletten Wechsel 20-24 h nach Infektion wurde deshalb verzichtet, 2-4 h vor Versuchsbeginn wurde die Hälfte des DMEM gegen vorgewärmtes DMEM gewechselt.

3.2.1.1 CV1-Zellen

CV1-Zellen wurden in DMEM mit 10% FKS, 90U/ml Penicillin G und 90 µg/ml Streptomycin kultiviert. Sie wurden in 250- oder 650-ml-Kunststoffkulturflaschen oder für Versuche oder zur Viruspropagation in 145/20mm- bzw. 35/10-mm-Kulturschalen aus Kunststoff oder Glas (Fa. Greiner bzw. Schott) gehalten. Konfluente Zellkulturen bestehen aus ca. 10 Mio Zellen je 650-ml-Kulturflasche bzw. 145-mm-Kulturschale oder ca. 3 Mio Zellen je 250-ml-Kulturflasche. Die Zellen wurden nach Absaugen des Kulturmediums durch Zugabe von 3 ml je 250-ml- und 6-8 ml je 650-ml-Kulturflasche 0,05%iger Trypsinlösung in PBS für 5 min bei 37°C vom Boden abgelöst. Am Boden anhaftende Zellen konnten durch verlängertes Trypsinisieren bei 37°C, durch Scherkräfte oder durch vorsichtiges Pipettieren abgelöst werden. Die Zelldichte der Trypsin-Zellsuspension wurde durch Auszählen eines Aliquots in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop bestimmt. $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{5}$ der Zellen wurden weiter passagiert. Danach wurde die Zelldichte durch Zugabe von DME-Medium auf 150000 bis 200000 Zellen je ml DMEM eingestellt. Die Zellzahl verdoppelte sich etwa alle 24 h (s. auch Dreier 1991 und 1995).

3.2.1.2 HeLa-Zellen

Die Kultur von HeLa-Monolayern wurde analog Engelke, 1992 bzw. Dreier, 1995 durchgeführt. 4 h vor Versuchsbeginn wurde das Medium zur Hälfte ausgetauscht.

3.2.1.3 CCRF-CEM-Zellen

CCRF-CEM-Suspensionszellen wurden vermehrt wie bei Wilisch, 1992 beschrieben. Zwei Tage vor Versuchsbeginn wurde die Zelldichte mit frischem Medium auf 700000/ml eingestellt, um sicherzustellen, daß sich die Zellen in logarithmischer Wachstumsphase befinden. 2-3 h vor Versuchsbeginn wurde 1/3 Vol. vorgewärmtes RPMI, ggf. mit [Methyl-³H]-Thd, zugegeben.

3.2.1.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Befinden sich Zellen in der Phase logarithmischen Wachstums, können diese zur Vorratshaltung eingefroren werden. Dabei wurden bei CV1-Zellen zu 80-90% konfluente Monolayer verwendet.

Die Zellen wurden durch Trypsinbehandlung vom Flaschen- oder Schalenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Kunststoffgefäß (Greiner) mit ca. 8 ml vorgelegtem DMEM überführt und 5 min mit 135 x g (800U/ min, Heraeus-Varifuge) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in eiskaltem DMEM mit 8% DMSO resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Die Einfrierröhrchen mit Inhalt wurden auf Eis gestellt und langsam auf -80°C gekühlt. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Eine 650ml-Kulturflasche (8 Mio Zellen, 80% konfluent) wurde auf zwei Einfrierröhrchen verteilt.

Beim Auftauen wurden die Einfrierröhrchen aus flüssigem Stickstoff entnommen und in ca. 37°C warmem Wasser erwärmt bis 1/3 der Zellsuspension aufgetaut war. Das Röhrchen wurde durch Eintauchen in 70%iges Ethanol sterilisiert. Nach Abtropfen des Ethanols wurde kurz abgeflammt und die Zellsuspension in eine 250-ml-Kulturflasche gegeben, in die 20 ml kaltes DMEM vorgelegt worden war. Das DMSO wurde nicht ausgewaschen.

3.2.1.5 *Staphylococcus aureus*

Die Produktion von α -Toxin wurde bei *Staphylococcus aureus*, „Wood 46“, DSM 20491, angeregt. Eine bei -80°C gelagerte Dauerkultur in Glycerin wurde auf Schafsbloodagarplatten (Unipath) ausgestrichen. Die nach 24-48h bei 37°C entstehenden Kulturen mit den größten Hämolysehöfen wurden über mehrere Generationen vereinzelt. Sobald die Größe des Hämolysehofes nicht mehr steigerungsfähig war, wurde eine Übernachtskultur in 10 ml 3% TSB-Medium (Difco) angeimpft. Nach 14h wurde je 0.35% (v/v) der Vorkultur in 2.4-6.5l Hauptkultur in 3%igem TSB gegeben. Nach Erreichen einer OD_{578} von 4.8-7.4 wurde diese Hauptkultur durch Zugabe von NaN_3 und EDTA abgestoppt (Zoller, 1992). Durch Zugabe von bis zu 10 mM Glucose zum TSB-Medium konnte das Wachstum von *Staphylococcus aureus* beschleunigt werden.

3.2.1.6 Methanolextrakte

Um dem Permeabilisierungsmedium Zellbestandteile zuzugeben, die bei der Permeabilisierung der Zellen aus diesen hindurchdiffundieren, wurden Methanolextrakte von Zellkulturen gewonnen.

Dazu wurden 550 ml einer CCRF-Zellkultur mit einer Zelldichte von 1.15 Mio Zellen/ml durch ¼ Vol. vorgewärmtes RPMI verdünnt und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die gesamte Kultur wurde zu einer Mischung aus 400 ml Hanks-Eiswürfeln in 500 ml eiskalter Hanks-Lösung gegeben und gerührt, bis sich das Eis gelöst hatte. Anschließend wurde die Zellsuspension im Kühlraum zentrifugiert (2 min, ca. 800 x g), das Pellet mit wenig eiskaltem RPMI aufgenommen und in kleine 14-ml-Kunststoffröhrchen (Greiner) über-

führt. Nach 10minütiger Zentrifugation im Kühlraum (800 x g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 8 ml 60% Methanol versetzt. Die Suspension wurde über Nacht bei -20°C inkubiert und anschließend im Beckman Ti 50-Rotor 30 min bei 40000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in 400-µl-Aliquots in Eppendorf-Cups überführt und in einer Vakuumzentrifuge in 2.5 h bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit dem 0.1fachen des ursprünglichen Zellvolumens Kaliumglutamatpuffer (480 mM) resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Zellbestandteile aus HeLa-Monolayern wurden in ähnlicher Weise herausgelöst. Dazu wurden die Zellen 3 Mal mit eiskalter HANKS-Lösung gewaschen. Nach vollständigem Abziehen der Waschlösung wurden je 650-ml-Flasche 5 ml Methanol (100%, p.a.) zugegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert. Der Methanolextrakt wurde in 400-µl-Aliquots wie oben beschrieben eingetrocknet. Der Extrakt wurde in 20 µl 10 x KG-Puffer in zehnfacher zellulärer Konzentration aufgenommen und bei -80°C gelagert.

HANKS-Lösung (1 x)	NaCl	137 mM	8 g/l
	KCl	5,4 mM	0,4 g/l
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,8 mM	0.115 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,055 g/l
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,5 mM	0,1 g/l
	MgSO ₄	0,4 mM	0,048 g/l
	NaHCO ₃	4 mM	0.336 g/l
	CaCl ₂	1,25 mM	0,18 g/l
	Glucose	5,5 mM	0,991 g/l
	pH 7.4		
10xKG-Gebrauchspuffer:	K-Glutamat	1,2 M	2.226 g/l
	NTA	40 mM	76.6 mg
	EGTA	5 mM	19.02 mg
	PIPES	160 mM	483.1 mg
	MgCl ₂	85 mM	176.6 mg
	CaCl ₂	10 mM	14.7 mg

Es wurden 8 ml H₂O zugegeben, der pH mit 5M KOH auf 7,2 eingestellt und auf 10 ml aufgefüllt.

3.2.2 SV40-Viren

3.2.2.1 Stocklysate

30-40 h nach Aussaat von 4-7 Mio CV1-Zellen je 145-mm-Schale wurden diese mit 3 ml eines durch „plaque purification“ aufgereinigten SV40-Urstocklysats infiziert. Um das Auftreten von SV40-Rekombinanten zurückzudrängen, muß das Stocklysat so verdünnt sein, daß die Zellen von nicht mehr als einem Virion infiziert werden (Virus/Zell-Verhältnis <1). Diese SV40-Rekombinanten weisen eine andere DNA-Sequenz auf, die vollständige Information für die Verpackungsproteine oder das T-Antigen kann fehlen. Sie können sich deshalb nur bei Doppelinfektion einer Zelle mit Wildtyp-SV40 als Helfervirus vermehren. Nach Zugabe des Urstocklysats wurden die Zellen 90 min im Brutschrank inkubiert

und alle 15 min umgeschwenkt. Nach Adsorption der Viren an die Zellen wurden 16-22 ml DMEM zugegeben, umgeschwenkt und weiter im Brutschrank inkubiert.

Im weiteren Verlauf lösten sich zunehmend Zellen vom Schalenboden ab, die meisten Zellen wiesen eine starke Vakuolisierung auf. 6-12 Tage nach Infektion lösten sich mehr als die Hälfte der Zellen vom Schalenboden. Die vollständige Freisetzung der Viren erfolgte durch dreimaliges Einfrieren bei -80°C und Wiederauftauen der Zellen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (5 min, 135 x g) sedimentiert und der Überstand in einem sterilen, verschließbaren Kunststoffgefäß (Greiner) bei -80°C eingefroren. Die Homogenität des SV40-Genoms wurde durch Restriktionsverdau (Sty I) und Analysen der verdauten und unverdauten SV40-DNA mittels analytischer Gelelektrophorese überprüft.

3.2.2.2 Urstocklysate und Infektion

Die „plaque purification“ diente dazu, genomisch einheitliche, nicht rekombinante SV40-Populationen zu erzeugen. Aus der Zahl der Plaques, die bei einer bestimmten Stocklysatverdünnung auftreten, kann man den Virustiter als Plaque-formende Einheiten (plaqueforming units) bestimmen, d. h. die Zahl an infektiösen Viren je ml Stocklysat (analog Dreier 1995).

Die Herstellung von Urstocklysaten erfolgte mit kleinerem Virustiter als bei der Herstellung normaler Stocklysate:

30-40 h vor Infektion wurden 2-4 Mio CV1-Zellen in 15 ml DMEM auf 145-mm-Kulturschalen ausgesät. Mit einer mehrfach ausgeglühten Impföse wurden durch Einstechen in einzelne, gut von anderen abgegrenzten Plaques SV40-Viren durch Umschwenken der Öse ins Medium der vortags ausgesäten CV1-Zellkultur übertragen. Zwei mal jede Woche wurde die Hälfte des Mediums gegen frisches ausgetauscht.

2-3 Wochen nach Infektion lysierten mehr als 50% der Zellen. Die Viren wurden durch wiederholtes Einfrieren und Wiederauftauen freigesetzt, das Medium wurde durch Sedimentation mit 135 x g von Zelltrümmern befreit. Diese Urstocklysate wurden in 10²-10⁴facher Verdünnung zur Herstellung von Gebrauchsstocklysaten verwendet.

Agar Noble (Difco)			2 % in H ₂ O
100 x DMEM-Vitamine:			
Cholinchlorid	20 mg/50 ml	Folsäure	20 mg/50 ml
i-Inosit	36 mg/50 ml	Nicotinamid	20 mg/50 ml
D-Ca-Panthenat	20 mg/50 ml	Pyridoxal x HCl	20 mg/50 ml
Riboflavin	2 mg/50 ml	Thiamin x HCl	20 mg/50 ml
100 x DMEM-Aminosäuren 1 (100 x AS 1):		L-Histidin x HCl	210 mg/50 ml
L-Arginin x HCl	420 mg/50 ml	L-Lysin x HCl	730 mg/50 ml
L-Isoleucin	525 mg/50 ml	L-Phenylalanin	330 mg/50 ml
L-Threonin	475 mg/50 ml	L-Tryptophan	80 mg/50 ml
L-Valin	470 mg/50 ml	L-Leucin	525 mg/50 ml
50 x DMEM-Aminosäuren 2 (50 x AS 2):		L-Tyrosin	180 mg/50 ml
L-Cystin	120 mg/50 ml		
100 x DMEM-Aminosäuren 3 (100 x AS 3):		L-Serin	210 mg/50 ml
Glycin	150 mg/50 ml	L-Glutamin	2900 mg/50 ml
L-Methionin	150 mg/50 ml		

Zum Zeitpunkt der Infektion von CV1-Zellen wurde eine Zelldichte von 8-10 Mio Zellen je 145-mm-Kulturschale bzw. 4-500000 Zellen je 35-mm-Kulturschale angestrebt. Zur Infektion wurde das Kulturmedium entfernt und je 145-mm-Kulturschale 2-3 ml, je 35-mm-Kulturschale 300 µl unverdünntes SV40-Stocklysate zugegeben. Die Adsorption der Viren erfolgte für 90 min im Brutschrank bei 37°C und unter Umschwenken alle 15 min. Anschließend wurden 17-23 ml DMEM zugegeben und vorsichtig verteilt. Bei Verwendung anderer Kulturschalen wurden die Mengen entsprechend der Fläche des jeweiligen Schalenbodens angepaßt.

3.2.2.3 Qualitätsbestimmung von Stocklysaten

Vorbereitung der Proben

Mit je 600 µl der zu prüfenden Stock- und Urstocklysate wurden CV1-Zellkulturen in 35-mm-Kulturschalen angeimpft. 43h nach Infektion wurde das DMEM entfernt und die Kultur mit je 300 µl Hirt-Lösung (s. 3.2.2.5) lysiert. Der Hirt-Überstand wurde wie in 3.2.2.5 beschrieben gewonnen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Versetzen und Mischen mit je ½Vol. Chloroform und ½Vol. mit TE, pH 8.0, äquilibriertem Phenol wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt (3 min, 14000 U/min). 350 µl der wäßrigen Phase wurden mit je 875 µl Ethanol über Nacht bei 4°C gefällt. Der ethanolische Überstand wurde nach Zentrifugation (15 min, 14000 U/min, 0°C) entfernt und das Pellet zwei Mal mit je 200 µl 70% Ethanol vorsichtig gewaschen. Die DNA wurde in der Vakuumzentrifuge 8 min am Wasserstrahlvakuum getrocknet, in 10 µl TE gelöst und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Nach 3.2.7.1 wurde ein 1%iges NA-Agarose-Minigel hergestellt und mit TAE-Puffer 5-mm überschichtet. 2 µl der Proben wurden mit 1 µl 10 x Probenauftragspuffer und 7 µl Wasser versetzt und auf das Gel neben 3 µl Längenstandard 3 (Boehringer, ≅ 300ng DNA, mit Probenauftragspuffer) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte entsprechend 3.2.7.1. Nach dem Gellauf wurde die DNA 5 min in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml) gefärbt und das Gel 10 min in Wasser entfärbt. Die Konzentration der Proben-DNA und damit die Effizienz der Hirt-Isolierung wurde durch Vergleich mit der bekannten Konzentration des Längenstandards auf dem Transilluminator abgeschätzt. Außerdem konnte beurteilt werden, ob SV40-Rekombinanten auftreten.

Sty I-Verdau und Auftrennung auf dem Gel

500 ng SV40-DNA wurden mit 5 U (0,5 µl) Sty I (Boehringer) und 0,3 µl RNase-Lösung (3 µg) in 10 µl Verdaupuffer für 2-4h bei 37°C verdaut. Nach Zugabe von 1 µl Probenauftragspuffer wurden die DNA-Fragmente in einem 2%igen analytischen Minigel aufgetrennt (3.2.7.1). Nach Färbung in Ethidiumbromid wurde der Restriktionsverdau und die Reinheit der SV40-Stocklysate auf dem Transilluminator bei 302 nm überprüft.

Sty I

10 U/µl

RNAse A (Rinderpankreas): 10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, pH 7.0, 15 mM NaCl. Die RNAse-Lösung wurde 15 min auf 100°C erhitzt, langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und bei -20°C eingefroren

3.2.2.4 Isolierung von Gesamt-DNA aus virusinfizierten Zellen

Nach Abstoppen der Kulturen durch Waschen mit PBS wurden 5 ml auf 55°C vorgewärmte Lyselösung je 145-mm-Kulturschale zugegeben, das Lysat vollständig in ein verschließbares Gefäß überführt und im Wasserbad oder Backofen 3 h bei 55°C inkubiert.

Anschließend wurde 1 Vol. Phenol (Roth, fertig äquilibriert mit TE-Puffer pH 8) zugegeben, gut vermischt und 5 min bei 850 x g zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit je ½ Vol Phenol und ½ Vol Chloroform vermischt und wie oben zentrifugiert. Die DNA-Lösung wurde durch mehrmaliges Ausschütteln mit jeweils 2-3 Vol. Butanol auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Anschließend wurde gegen 2000 Vol. 0,1 x TE 4 h dialysiert.

Das Dialysat wurde in der Vakuumzentrifuge bis zur DNA-Konzentration von 1µg/µl eingengt. Die Lösung wurde sofort verwendet, bei 4°C aufbewahrt oder bei -20°C eingefroren. Die so gewonnene DNA wurde u.a. in zweidimensionalen Gelen analysiert.

TE-Puffer (100 x)	Tris	1 M	121,14 g/l
	EDTA	100 mM	3,7 g/l
	mit HCl	auf pH 8,0	
Lyselösung	SDS		1 %
	EDTA	60 mM	2,22 g/l

3.2.2.5 DNA-Isolierung nach Hirt und DNA-Reinigung

Die von B. Hirt bereits 1967 beschriebene Methode der DNA-Extraktion von Polyoma-DNA aus infizierten Mauszellen ist in leichten Abwandlungen auch für Extraktionen von SV40-DNA aus CV1-Zellen anwendbar (Dreier, 1995).

Die Replikation wurde durch Zugabe von 1 ml eiskalter PBS gestoppt, das PBS anschließend vollständig entfernt. Danach wurde je 145-mm- 1600 µl, je 95-mm-Kulturschale 800 µl Hirt-Lösung gegeben und durch Umschwenken mehrmals über alle Zellen verteilt. Nach 20 min bei Raumtemperatur wurden die Lysate in ultrazentrifugeneignete Eppendorf-Cups (Beckman) überführt, ¼ Vol 5M NaCl zugegeben und gut gemischt. Die zelluläre DNA wurde 40 min bei -20°C oder über Nacht bei 4°C gefällt, bevor sie 45 min bei 45000 g und 4°C pelletiert wurden. Die DNA im „Hirt“-Überstand wurde durch Zugabe von 0.6-0.9 Vol. Isopropanol oder 2.5 Vol. Ethanol (-20°C) präzipitiert. Die Zentrifugation erfolgte für 5 min bei 14000 U/min im Kühlraum. Das Pellet wurde 2 Mal mit -20°C kaltem 70%igen Ethanol vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde die DNA getrocknet und in 20 µl Wasser oder TE gelöst. In dieser Form wurde die DNA maximal 7 Tage lang bei 4°C gelagert.

Hirt-Lösung	Tris	10 mM	121 mg/100 ml
	EDTA	10 mM	372 mg/100 ml
	SDS	0,6 %	600 mg/100 ml
	mit HCl	auf pH 8,0	

$[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{-dATP}$

1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ und 1000-3000 Ci/mMol

Ebenso wurde $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{-dATP}$ bei gleicher Aktivität von 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ (>1000 Ci/mMol) zur Markierung der DNA permeabilisierter Zellen wie oben beschrieben eingesetzt.

3.2.3.3 Markierung permeabilisierter Zellen mit BrdUTP

Durch Zellpermeabilisierung mit α -Toxin wurde eine Doppelmarkierung der DNA durch BrdUTP und $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ über mehrere Stunden möglich:

Eine frisch angesetzte, unter Lichtschutz auf Eis gehaltene, 10 mM BrdUTP-Stammlösung wurde mit Inkubationsmedium auf eine BrdUTP-Endkonzentration von 300-500 μM verdünnt. Ca. 10 min vor Versuchsbeginn wurde diese Permeabilisierungslösung auf 37°C erwärmt. Je 35-mm-Kulturschale wurde 300 μl Permeabilisierungsmedium zugegeben, die DNA wird zunächst nur dichtemarkiert. Nach einer Vorinkubationszeit von 20 min wurde die DNA durch Medienwechsel oder durch Zugabe von $\frac{1}{4}$ Volumen $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -haltigen Permeabilisierungsmediums zusätzlich radioaktiv markiert. $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ kann in Mengen bis zu 1% des Gesamtvolumens direkt ins Medium zugegeben werden. Bei Pulse-Chase-Experimenten wurde nach radioaktiver Markierung durch kompletten Medienwechsel gegen BrdUTP-haltiges, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -freies Permeabilisierungsmediums die Dichtemarkierung weitergeführt.

3.2.3.4 Ermittlung der Verwertbarkeit der Radioaktivität

Neben dem radioaktiven ^{32}P -Zerfall nimmt die Menge der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -Moleküle durch Radiolyse ab. Um die spezifische Radioaktivität exakt bestimmen zu können, mußte die ^{32}P -Menge ermittelt werden, die in intakten $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -Molekülen zum Einbau in die DNA zur Verfügung steht ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -Verwertbarkeit). Dazu wurde der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -Einbau in die DNA mit dem Einbau von $[\text{H}^3]\text{-dATP}$ verglichen ($[\text{H}^3]\text{-dATP}$, 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ und 80 Ci/mMol), das laut Herstellerangaben zu 100% verwertbar ist und keiner Radiolyse unterliegt. Je 1 μCi $[\text{H}^3]\text{-dATP}$ und 0,5 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ wurden zu 250 μl gebrauchsfertiger Permeabilisierungslösung zugegeben (je 35-mm-Kulturschale). Nach Permeabilisierung von SV40-infizierten CV1-Zellen wurde 30 bzw. 90 min dauermarkiert.

Anschließend wurden je 10% (25 μl) der Permeabilisierungsüberstände in ein Szintivial gegeben und mit 5%iger TCA auf 1 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden gründlich mit Kaliumglutamat-Puffer gewaschen, mit je 950 μl 0.3M NaOH/Schale lysiert und die entstandene DNA-Lösung wurde auf zwei Mal mit je 1 ml kaltem H_2O in ein Kunststoffreagenzglas überführt. Nach Zugabe von 0.5 ml 15%iger-TCA/2%iger-Pyrophosphat-Lösung wurde die doppelmarkierte DNA 30 min gefällt, über Whatman GF/C-Filter abgesaugt und zweimal mit 1%iger TCA und einmal mit Ethanol nachgewaschen.

Die getrockneten Filter wurden zusammen mit 25 μl Wasser und 975 μl 5%iger TCA in ein Szintivial gegeben und wie die Permeabilisierungsüberstände gut verschlossen je 2h auf 80-85°C erhitzt. Nach Abkühlen und Zugabe von 10 ml Ultima Gold Szintillator in

jedes Szintivial wurden ^3H und ^{32}P ausgezählt. Nach Korrektur der Kreuzkontamination ergibt sich der

- Quotient der Permeabilisierungsüberstände durch Division von ^{32}P -cpm/ ^3H -cpm der Überstände (A) und der
- Quotient der in die DNA eingebauten Radioaktivität durch Division von ^{32}P -cpm/ ^3H -cpm der säurefällbaren Radioaktivität (B).
- Der verwertbare Anteil an $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ errechnet sich durch Division von B / A

Packard Ultima Gold™ XR
Packard Optifluor™ O
Whatman GF/C

für wässrige Proben
für filterfixierte Proben
Glasfaserfilter

3.2.4 Markierung von Proteinen

Aminosäuren können in durch α -Toxin-permeabilisierte Zellen hinein- und hinausdiffundieren. Die Proteinbiosynthese in permeabilisierten Zellen wurde durch die Zugabe von ^3H -Leucin zum Permeabilisierungsmedium überprüft. Dazu wurde eine 20 mM Leucin-Stammlösung frisch hergestellt. Zu 12 μl dieser Stammlösung wurden 20 μl $[2,3,4,5\text{-}^3\text{H}]\text{-Leucin}$ (Amersham Buchler, 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ und 80 Ci/mMol) gegeben und die Zelle für 20 min mit dieser Mischung (8 μl auf jede 35-mm-Kulturschale, Endkonzentration 100 μM Leucin, 617 Bq/ μl) inkubiert. ^3H -leucinbeladene tRNAs entstehen bei einem solchen Vorgehen ebenfalls und werden während des Absaugens auf GF/C-Filtern zurückgehalten. Durch 1stündige Hydrolyse der Filter mit 5% TCA bei 80°C und zweimaligem Waschen mit 5%iger TCA werden die tRNAs zerstört und verfälschen das Ergebnis der Messung im LSC nicht.

3.2.5 Ultrazentrifugation von Replikationsintermediaten

3.2.5.1 Isokinetische Zentrifugation

Die Längenanalyse zellulärer und viraler DNA erfolgte durch Zonenzentrifugation im alkalischen, linearen Rohrzuckergradienten. Die Längenanalyse mit dem SW40-Rotor (Beckmann) wurde wie folgt durchgeführt:

Nach ^{32}P -Markierung der DNA wurden die permeabilisierten Zellen mit 300 μl Baselösung je 35-mm-Kulturschale versetzt. 5-40%ige (w/w) Rohrzuckergradienten wurden kurz vor DNA-Zugabe mit Hilfe eines ISCO-Gradientenformers, Modell 570, automatisch aufgebaut. In jedes SW40-Polyallomer-Röhrchen (Beckman) wurde zuvor 0.5 ml 40%ige alkalische Sucrose vorgelegt. Das Volumen des Gradienten betrug 12 ml. Die basischen DNA-Proben werden 10 min nach Zugabe der Baselösung von der Kulturschale abgeschabt und nach Triturieren langsam auf die Gradienten aufgebracht (Eger 1995). Durch Zugabe weiterer Baselösung wurde das Gewicht der Röhrchen austariert. Die Gradienten wurden in die Zentrifuge gestellt und diese nach 1 h gestartet.

Die Zentrifugation erfolgte für 16 h bei 36000 U/min in einem Beckman SW40-Rotor (L5-75-Zentrifuge, Beckman). Anschließend wurden von den Gradienten mit Hilfe des

ISCO Density Gradient Fractionator, Modell 640, durch Unterschichten mit 65%iger blauer Sucroslösung (Flußrate 2 ml/min) je 20 Fraktionen à 0,6 ml angefertigt und die säurefällbare Radioaktivität der einzelnen Fraktionen analog 3.2.6.2 bestimmt.

Unter Berücksichtigung der Zusammenhänge zwischen Zentrifugationsbedingungen, Sedimentationskoeffizienten und DNA-Kettenlänge ergab sich unter alkalischen Bedingungen nach Studier (Studier 1965) eine spezifische Längen- und Molekulargewichtsverteilung auf die verschiedenen Fraktionen (Dreier, 1995). Der S-Wert stieg um ca. 1.7 pro Fraktion, DNA wurde erstmals in der 3. Fraktion nachgewiesen.

Baselösung f. SV 40	EDTA	50 mM	4,65 g/250 ml
	NaOH	200 mM	2 g/250 ml
Blaue Sucroslösung	65% w/v	650 g/l	Sucrose, angefärbt mit Methylenblau
15% Sucroslösung	NaOH	250 mM	10 g/l
	NaCl	600 mM	35,07 g/l
	EDTA	1 mM	372 mg/l
	Sarcosyl	0,1%	1 g/l
	Sucrose	15%(w/w)	158,9 g/l
5% Sucroslösung	wie 15%-Lösung, nur 51 g Sucrose je l H ₂ O		
30% Sucroslösung	wie 15%-Lösung, nur 338,1 g Sucrose je l H ₂ O		
40% Sucroslösung	wie 15%-Lösung, nur 470,6 g Sucrose je l H ₂ O		

3.2.5.2 Isopyknische Zentrifugation auf CsCl-Gradienten

BrdUTP-/[α -³²P]-dATP-doppelmarkierte DNA (s. 3.2.3) kann nach Dichte in CsCl-Gradienten aufgetrennt werden. Dabei sind neben nicht dichtemarkierter Kontroll-DNA zur Hälfte dichtemarkierte und komplett dichtemarkierte DNA-Spezies auftrennbar.

Nach BrdUTP-Markierung ist die DNA sehr lichtempfindlich und muß sofort zentrifugiert werden, da sonst Radiolyse- und Lumolyseschäden auftreten. Gleichzeitig mit Inkubation der Proben wurden geeignete Zentrifugenröhrchen für den Rotor Ti 70.1 komplett mit Deckel und Kern pärchenweise vorbereitet (<10 mg Gewichts Differenz) und der dichte Sitz der Kerne durch vorsichtiges Drücken geprüft. In diese Röhrchen wurden je 8.15 g Cäsiumchlorid eingewogen und mit zugehörigem Deckel und Kern nach Anleitung (Beckman) verschlossen.

Jede 35-mm-Kulturschale wurde nach Entfernen des kalten KG-Puffers mit 1500 µl 37°C warmem Lysemedium (0.5% Sarcosyl, 60 mM EDTA, pH 8.0) inklusive Proteinase K (20 mg/ml-Stammlösung in H₂O, Endkonzentration im Ansatz 100 µg/ml) versetzt und jeweils 20 min lang durch Umschwenken bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate mit einem Gummischaber abgeschabt und in je ein Kunststoff-Reagenzglas gegeben, mit TE auf 2 ml verdünnt und zur Scherung der zellulären DNA je fünf Mal durch eine 21-G-Kanüle auf- und abgezogen.

100 µl des gescherten Lysats wurden mit Wasser auf 2 ml verdünnt, je 50 µg Carrier-DNA zugegeben, mit 1 ml 15%iger-TCA/2%iger-PP_i-Lösung gemischt, 30 min bei 0°C gefällt und die enthaltene säurefällbare Radioaktivität bestimmt.

Vom restlichen Lysat wurden jeweils gleiche Radioaktivitätsmengen mit einer in gleicher Weise vorbehandelten, [Methyl-³H]-Thd-markierten Referenz-DNA (nicht dichtemar-

kiert) versetzt und die Mischung mit TE auf 6,5 ml aufgefüllt. 6.00 g dieser verdünnten Lysate wurden mit einer Einmalspritze durch das Deckelloch in die vorbereiteten Zentrifugenröhrchen gegeben. Vom Rest wurden 100 µl entnommen, mit Wasser auf 2 ml verdünnt und wie oben die säurefällbare Radioaktivität bestimmt.

Die Zentrifugenröhrchen wurden mit den vorbereiteten Titandeckeln verschlossen und mit einem Drehmoment von 100 Inchpounds verschraubt. Anschließend wurde das vorgelegte Cäsiumchlorid nach Eindrehen des Kerns durch Umschwenken vollständig gelöst. Die Bestimmung der Brechungsindices erfolgte im Refraktometer mit 20 µl der Lösung, die Ausgangsdichte lag bei 1.403 g/cm³. Der über der DNA-Lösung verbliebene Luftraum in den Zentrifugenröhrchen wurde mit Paraffinöl blasenfrei aufgefüllt, die Proben paarweise abgewogen und austariert. Nach Verschluss der Röhrchen mit Titankernen wurde die Dichtigkeit durch leichtes Drücken überprüft. Die Röhrchen wurden in einen Beckman Ti 70.1-Rotor eingesetzt, der Rotor-Deckel wurde fest verschlossen. Die Zentrifugation erfolgte für 60 h bei 36000 rpm und 20°C.

Nach dem Lauf wurden die Gradienten sofort durch Verdrängung mit Paraffinöl nach unten fraktioniert. Es wurden 40 Fraktionen à 200 µl gesammelt. Die Dichte jeder 5. Fraktion wurde mit Hilfe folgender Formel refraktometrisch bestimmt:

$$\rho = a \cdot \mu - b$$

ρ = Dichte [g/cm³]

a = 10.9276 (10.8601) bei 20°C (25°C)

μ = Brechungsindex_{25°C}

b = 13.593 (13.497) bei 20°C (25°C)

Nach Fraktionierung wurde jede Probe mit je 25 µg Carrier-DNA versetzt und durch Zugabe von 500 µl 15%iger-TCA/2%iger-PP_i-Lösung 30 min bei 0°C gefällt. Die Menge markierter säurefällbarer DNA wurde nach 3.2.6.2 bestimmt.

3.2.6 Säurefällbare Radioaktivität

3.2.6.1 Ganze Zellen

Die nach 3.2.3 markierten und gewaschenen Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml 0,3 N NaOH 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde das Lysat in ein Kunststoffröhrchen gegeben, 2 Mal mit je 1 ml Wasser nachgespült und die Waschfraktionen mit dem Lysat vereinigt. Nach Zugabe von 0,5 ml 15%iger-TCA/2%iger-PP_i-Lösung und Vermischen fiel die DNA innerhalb von 30 min auf Eis aus. Die wäßrige DNA-Lösung wurde durch GF/C-Filter abgesaugt und 2 Mal mit 1%iger TCA und 1 Mal mit Ethanol nachgespült. Die Filter wurden 20 min bei 80°C getrocknet. Die säurefällbare Radioaktivität wurde nach Zugabe von 5 ml Szintillator (Optifluor O) im LSC bestimmt.

15% TCA + 2% PP_i

1g PP_i in 50 ml 15%iger TCA gelöst

3.2.6.2 Verdünnte, wäßrige DNA-Lösungen

Fraktionen aus der Gradientenzentrifugation wurden mit 50 µg neutraler Carrier-DNA versetzt und gut gemischt. Durch Zugabe von je 250 µl eiskalter 15%iger TCA wurde die DNA in 30 min auf Eis gefällt und die säurefällbare Radioaktivität wie in 3.2.6.1 bestimmt.

Carrier-DNA-Lösung

0.25 g Heringssperma-DNA in 1 l Wasser + CHCl₃

3.2.6.3 Hirt-Überstände

Hirt-Überstände wurden wie Fraktionen aus der Gradientenzentrifugation gefällt (3.2.6.2), die Zugabe von Carrier-DNA entfiel.

3.2.6.4 Hirt-Rückstände

Die Radioaktivität des Hirt-Rückstandes zur Überprüfung der Effizienz der DNA-Isolierung nach Hirt wurde wie folgt bestimmt: Die Hirt-Rückstände aus einer 145-mm-Kulturschale wurden nach vollständigem Entfernen der Überstände durch Zugabe von 2 ml 0,3 M NaOH und einstündiger Inkubation bei 72°C gelöst. Die DNA von 200 µl dieser Lösung wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur durch Zugabe von 100 µl 15%iger TCA für 30 min bei 0°C gefällt. Die säurefällbare Radioaktivität wurde wie die der Hirt-Überstände bestimmt (3.2.6.2).

3.2.7 Gelelektrophoresen

3.2.7.1 Analytische Gelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle der SV40-DNA und von Restriktionsverdau wurde eine analytische Gelelektrophorese auf Minigelen durchgeführt. Für die Trennung von DNA der Größe 1-10 kb ist ein 1%iges, für die Trennung von 0.2-2 kb langer DNA ein 2%iges NA-Agarose-Gel in 1 x TAE erforderlich. 300-500 ng DNA wurden auf ein Volumen von 10 µl gebracht, mit 1 µl Probenauftragspuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 50 V (3 V/cm) und 100 mA für 90 min bei Raumtemperatur, in den ersten 4 min nach Auftrag wurden 100 V (6 V/cm) und 190 mA angelegt.

Nach dem Lauf wurde die DNA in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) für 5 min angefärbt, das Gel in Wasser für 10 min entfärbt und die Gele auf einem Transilluminator (Anregungswellenlänge 302 nm) mit Rotfilter (Cenei 55, 8 x) auf Polaroid Type 667 fotografiert (Blende 11, Belichtungszeit 2-4 s).

TAE (20 x)	Tris	0,8 M	96,8 g/l
	EDTA	22 mM	8,2 g/l
	Natriumacetat-Essigsäure	100 mM	7,4 g/l pH 7,9
Minigel	75 x 50 x 5 mm, 17 ml Gel		
	1-2% (w/v) NA-Agarose (Pharmacia) in 1 x TAE, pH 7.9		
Laufpuffer	1 x TAE, pH 7.9		

3.2.7.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die nach 3.2.2.4 bzw. 3.2.2.5 isolierte, ³H-, ³⁵S-, ³³P- bzw. ³²P-markierte DNA wurde in großen Gelen (140 x 170 x 5,7 mm, 135 ml Gelbettvolumen) in zwei Dimensionen aufgetrennt. Die Auftrennung der SV40-DNA erfolgte in der ersten Dimension bei einer Agarosekonzentration von 0.8%. Nach Überschichtung des Gels mit Elektrodenpuffer 1 wurden von jeder Probe in 2 Geltaschen je 3 µg DNA in 11 µl und in je einer Tasche 10-15 µg DNA in 11-16 µl Probenvolumen aufgetragen. Als Vergleich diente 10 µl gebrauchsferti-

ger Längenstandard 3 (Boehringer). Der Gellauf erfolgte für 18-24 h bei 0.8-1 V/cm. Die Temperatur wurde in der 1. Dimension nicht reguliert.

Nach Beendigung des Gellaufs wurde die Spur mit hoher und eine der Spuren mit niedrigerer DNA-Konzentration 6 mm breit mit einem Skalpell vom übrigen Gel abgetrennt. Die Spur mit hoher DNA-Konzentration wurde für 3 h bei Raumtemperatur oder 2 h bei 37°C in Elektrodenpuffer 2 umgepuffert (15-20minütiger Wechsel der Pufferlösung). Die Spur niedriger DNA-Konzentration wurde bei ³H-Markierung zur Fixierung der DNA im Gel über Nacht in Essigsäure/PPO-Lösung gelegt. Bei ³⁵S-, ³³P- oder ³²P-Markierung wurde die Spur bis zur Weiterverwendung bei 0°C aufbewahrt. Die weiteren Spuren niedriger DNA-Konzentration wurden wie die Spur mit Längenstandard 3, für 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml) gefärbt, das Gel 40 min in Wasser entfärbt und auf einem Transilluminator (Anregungswellenlänge 302 nm) mit Rotfilter (Cenei 55, 8 x) auf Polaroid Type 667 fotografiert (Blende 11, Belichtungszeit 4-6 s).

In der zweiten Dimension wurden Gele mit gleichen Abmessungen und gleichen Gelbettvolumina verwendet. Die Agarosekonzentration betrug 1.5% bei denaturierenden Bedingungen (pH 12.5, 2 mM EDTA). Beim Gießen des Gels wurde eine einzige Geltasche (120 x 7 mm) ausgespart, in die nach Erstarren die umgepufferte Gelspur eingelegt und in Laufrichtung blasenfrei angepreßt wurde. Die Lücken wurden mit 60°C warmem Sealing-Gel aufgefüllt. Nach Erstarren des Sealing-Gels (nach 20 min) wurde das Gel mit Elektrodenpuffer 2 überschichtet. Die Laufzeit betrug 16 h bei 1,3 V/cm bzw. 8.5 h bei 2.5 V/cm. Zum Abführen der bei 2.5 V/cm entstehenden Wärme wurde die Temperatur während des Gellaufs auf 24-28°C reguliert.

Sofort nach dem Gellauf wurde ³H-markierte DNA im Gel durch 12stündige Inkubation in Essigsäure/PPO fixiert. Aus dem Gel und dem zuvor in Essigsäure/PPO inkubierten Gelstreifen wurde anschließend die Essigsäure unter langsam fließendem Wasser in 24 h ausgewaschen. Bei ³⁵S-, ³³P- und ³²P-markierter DNA entfiel dieser Schritt.

Das Gel wurde über Whatman-Papier auf einem Aldo-Xer-Vakuummgeltrockner 1.5 h bei Raumtemperatur am Wasserstrahlvakuum und weitere 3 h bei 40-50°C getrocknet. Die Fluorographie (³H) bzw. Autoradiographie des getrockneten Gels erfolgte bei -80°C in einer Röntgenkassette mittels eines β-Max-Films oder eines vorbelichteten Hyperfilm MP (beides Amersham). Die Expositionszeit betrug 3-15 Tage.

EDTA	500 mM,	pH 7,4 (mit KOH)	37,2 g/200 ml
EGTA	100 mM		7,6 g/200 ml
Essigsäure/PPO-Lösung		40 g PPO in 2 l konz. Essigsäure	
Gel der 1. Dimension	TAE (20 x, s.3.2.7.1)		6,75 ml
	NA-Agarose		1,08 g
	SDS (10 % (w/v))		405 µl
	H ₂ O	auf	135 ml
Elektrodenpuffer (1. Dim.)	TAE (20 x)		80 ml
	SDS (10 %)		4,8 ml
	H ₂ O	auf	1,6 l
Gel der 2. Dimension	EDTA (0,5 M)		540 µl
	EGTA (0,1 M)		1,35 ml

	NA-Agarose		2,04	g
	NaOH (5 M)		810	µl
	H ₂ O	auf	135	ml
Elektrodenpuffer (2. Dim.)	NaOH (5 N)		12	ml
	EDTA (0,5 M)		8,04	ml
	EGTA (0,1 M)		20	ml
	H ₂ O	auf	2	l
Probenauftragspuffer (10x) für DNA	Ficoll		25	%
	EDTA		10	mM
	Bromphenolblau		0,25	%
Sealing-Gel	EDTA (0,5 M)		40	µl
	EGTA (0,1 M)		100	µl
	NA-Agarose		0,04	g
	NaOH (5 M)		60	µl
	H ₂ O	auf	10	ml
Entwickler:	Tetenal (Roentogen)			
Fixierer:	Acidofix (Agfa)			

3.2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Dokumentation von Proteinreinigungen wie z.B. die von α -Toxin wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit 7.5%igen Trenn- und 3%igen Sammelgelen (Martin 1997) durchgeführt. Die Proteinproben wurden vor Auftrag auf das Gel über Nacht gegen 0.01 x TE dialysiert (Spectrum[®], Spectra/Por[®], Ausschlußgröße 3 kDa) und danach im Wasserstrahlvakuum eingetrocknet. Nach Aufnahmen von jeweils 1.5-10 µg Protein in 10 µl Wasser wurden die Proben mit Auftragspuffer 1:1 verdünnt und aufs Gel (Gelgröße 160 x 160 x 8 mm) aufgetragen. Daneben wurden 6 µg Markerprotein als Referenz aufgetragen. Die Laufzeit betrug 2 h bei 60 V. Das Färben und Entfärben erfolgte nach Eger, 1995 mittels der unten aufgeführten Lösungen.

Trenngel:	Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, 20% (w/v))	7.5	ml
	TRIS / HCl (1.5 M, pH 8.8)	7.5	ml
	H ₂ O	14.54	ml
	SDS (10% (w/v))	300	µl
	TEMED	20	µl
	APS (10% (w/v))	140	µl
Sammelgel:	Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, 20% (w/v))	2.5	ml
	TRIS / HCl (0.5 M, pH 6.8)	3.7	ml
	H ₂ O	8.4	ml
	SDS (10% (w/v))	150	µl
	TEMED	10	µl
	APS (10% (w/v))	200	µl
Auftragspuffer:	TRIS / HCl (0.5 M, pH 6.8)	2	ml
	SDS (10% (w/v))	4	ml
	Glycerin	2	ml
	Mercaptoethanol	1	ml
	Bromphenolblau (0.5% (w/v))	400	µl
	H ₂ O	0.6	ml
	DTT	50	mM

Laufpuffer:	Glycin		15	g
	TRIS		6	g
	SDS		1.5	g
	H ₂ O		ad 1	l
Coomassie-Färbelsg:	Coomassie brilliant blue R 250		0.8	g
	Methanol		200	ml
	Essigsäure		40	ml
	H ₂ O		200	ml
Entfärbelösung:	Methanol		250	ml
	Essigsäure		100	ml
	H ₂ O		ad 1	l
Markerproteine:	α2-Macroglobulin	MW 340.000	0.1	µg/µl
	Phosphorylase b	MW 97.400	0.1	µg/µl
	Glutamat-Dehydrogenase	MW 55.400	0.1	µg/µl
	Lactat-Dehydrogenase	MW 36.500	0.1	µg/µl
	Trypsin Inhibitor	MW 20.100	0.1	µg/µl

3.2.7.4 Chloroquin-Gelelektrophorese, Nachweis von „Form U“

Bei der SV40-Replikation entsteht während der Initiation eine unterwundene Form des SV40 („Form U“). Aphidicolin, ein Diterpenoid aus Pilzen, hemmt in CV1-Zellen Polymerase δ und α . Durch Zugabe von Aphidicolin zum Kulturmedium 15 min vor Permeabilisierung und in gleicher Konzentration zum Permeabilisierungsmedium konnte die Form U aufgestaut und nachgewiesen werden (Sarkar, 1987). Über den Nachweis von Form U gelang der Nachweis von Neuinitiationen der SV40-DNA (v.Betteraey 1999).

Das DMEM von SV40-infizierten CV1-Zellen wurde 24 h nach Infektion durch vorgewärmtes DMEM-Mangelmedium ersetzt (Gibco BRL DMEM w/o Arg, Cys, Gluc, Glut, Inos, Leuc, Meth, Phos, Cat. Nr. 11963022). Die Zellen wurden in den Wärmerraum überführt und dort 1.5 h normoxisch begast. Danach wurden sie für 10 h *in vivo* hypoxisch (200 ppm) begast. Anschließend wurde Aphidicolin hypoxisch in einer Endkonzentration von 2 µg/ml ins DMEM gegeben und nach weiteren 10 min wurden die Zellen hypoxisch permeabilisiert und anschließend reoxigeniert (s. Abb. 54).

10 min nach Reoxigenierung wurde die DNA isoliert:

Zum Abstoppen der Inkubation wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml eiskalter PBS gewaschen. Die Kulturschälchen wurden dann bis zur Lyse nach Hirt (3.2.2.5) auf Eis gestellt.

Anschließend erfolgte die Auftrennung auf chloroquinhaltigen Gelen (190 x 240 mm):

Zum Gießen des Gels wurden 2.4 g NA-Agarose in 300 ml Gelpuffer geschmolzen und die klare Lösung nach Abkühlen auf 60°C mit Chloroquin in einer Endkonzentration von 20 µg/ml versetzt. Das Gel wurde bis zum Lauf im Kühlraum aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Lauf wurde die Gelkammer mit 3 l (kaltem) Laufpuffer gefüllt. Die DNA's wurden mit 1/10 Vol. DNA-Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde in jede Geltasche 10 µl unverdünnter DNA-Auftragspuffer gegeben.

Als Spannung wurde zunächst für 5 min bei 4 V/cm und anschließend für 18 h 2 V/cm angelegt und die Temperatur auf 4°C konstant gehalten. Nach dem Lauf wurde das Gel für 30 min gewässert, um überschüssiges Chloroquin zu entfernen.

Die Vorbereitung für den Transfer und der Transfer selbst erfolgten nach v. Betteraey 1999 und Riedinger 1999.

Insbesondere bei zunächst hypoxisch permeabilisierten und nach weiteren 15 min durch Medien austausch reoxigenierten und 10 min danach abgestoppten CV1-Zellen wurden hohe Konzentrationen von Form U nachgewiesen.

Der Vergleich (10 min nach Aphidicolin zugabe durch Zugabe von ¼ Volumen O₂-gesättigtem DMEM (inklusive 2 µM Aphidicolin) reoxigeniert und weitere 15 min später abgestoppt) enthielt vergleichbar viel Form U.

Form U konnte auch nachgewiesen werden, wenn sich im Inkubationsmedium mit Ausnahme von 2.8 mM ATP keine NTPs und dNTPs befanden (vgl. Abb. 54).

Weitere Vergleiche s. 4.5.6 und Abb. 54.

Chloroquingelpuffer	(10 x) TRIS	360 mM	43.56 g/l
	NaH ₂ PO ₄	300 mM	36.0 g/l
	EDTA	10 mM	3.72 g/l
PBS:	NaCl	150 mM	8.7 g/l
	NaH ₂ PO ₄	10 mM	1.2 g/l
	pH	7,4	
Chloroquingel	Chloroquingelpuffer (10 x)		30 ml
	Wasser		270 ml
	Na-Agarose		2.4 g
	Chloroquin-Stammlösung (20 mg/ml)		0.3 ml
Laufpuffer	10 x Chloroquingelpuffer		300 ml
	Wasser		2700 ml
	Chloroquin-Stammlösung (20 mg/ml)		3 ml
Lyselösung	Proteinase K	100 µg/ml	
	EDTA	60 mM	2.23 g/100 ml
	Sarcosyl	0.5 %	0.5 g/100 ml

3.2.8 Southern Blotting

Der Transfer der im Chloroquingel aufgetrennten SV40-DNA vom Gel auf eine Nylonmembran („Southern Transfer“) wurde als alkalischer Kapillarblot durchgeführt (Sambrook 1989). Nach 10 min Inkubation in 0.2 M HCl und zweifachem einminütigem Waschen mit H₂O erfolgte die Vorinkubation des Chloroquingels 1 x 15 min und 1 x 20 min in Transferpuffer. „Hybond-N+“-Nylonmembranen wurden durch 5minütiger Inkubation in H₂O und anschließender 5minütiger Inkubation in Transferpuffer vorbereitet. In einem Kunststoffbehälter (40 x 50 x 12 cm) wurden 1,5 l alkalischer Transferpuffer (0.4 M NaOH, 1 M NaCl) eingefüllt und mit Kunststoffblöcken eine Glasscheibe 2 cm über der Pufferoberfläche befestigt. Auf diese wurde ein Whatman-3MM-Papier gelegt, dessen Rand sich im Transferpuffer befand. Dieses Papier wurde mit Transferpuffer gut angefeuchtet und anschließend das Chloroquingel luftblasenfrei aufgelegt. Auf das Gel wurde

eine 0.5 cm über das Gel hinausragende Hybond-N+-Membran luftblasenfrei aufgelegt. Unter den Rand des Gels wurden Folienstreifen (Parafilm) gelegt, um zu verhindern, daß der Puffer um das Gel herumfließt. Auf das Gel wurden ein Whatman-3MM-Papier und darauf 5 cm Saugpapiere gelegt. Der ganze Aufbau wurde mit 2 kg beschwert und befestigt. Nach 8 h wurde der Kapillarblot beendet.

Die Hybond-N+-Membran wurde neutralisiert und anschließend in 150 ml 42°C warmer Vorhybridisierungslösung für 2h auf einem Schüttler bei 20 U/min inkubiert. Parallel zur Vorhybridisierung wurde eine ³²P-markierte SV40-DNA-Sonde vorbereitet (v. Betterae 1999) angefertigt, kurz vor Gebrauch 10 min lang im Heizblock bei 100°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und zu 50 ml 42°C warmer Hybridisierungslösung gegeben. In dieser Lösung wurde die Membran über Nacht bei 42°C bei 20 U/min inkubiert und anschließend 2 x 5 min mit 2fach SSC/0.1% SDS und 2 x 10 min mit 0.1fach SSC/0.1% SDS bei 45°C gewaschen. Nach Trocknung der Membran wurde ein Hyperfilm MP aufgelegt und 1-5 Tage bei -80°C exponiert.

Neutralisierungslösung	TRIS	0.5 M	60.5 g/l
	NaCl	1.5 M	87.66 g/l
	mit HCl	auf	pH 7.0
alkalischer Transferpuffer	NaOH	0.4 M	16 g/l
	NaCl	1 M	58.44 g/l
Vorhybridisierungslösung	H ₂ O		21 ml
	Na-Phosphat 1 M pH 7.2		25 ml
	NaCl	5 M	5 ml
	EDTA	500 mM	0.2 ml
	SDS		3.5 g
	Formamid		45 ml
20 x SSC-Lösung	NaCl	3 M	175.3 g/l
	Na ₃ -Citrat	0.3 M	88.23 g/l

3.2.9 Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach Bradford, 1981 durchgeführt. Die Proben wurden auf 1-50 µg Protein in 50 oder 100 µl Probenvolumen verdünnt und in einer Halbmikrovette mit 900 bzw. 950 µl Bradford-Reagenz vermischt. Nach 10-30 min wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde durch Vergleich mit einer BSA-Eichgeraden errechnet.

Bradford Reagens (Stammlösung)	Serva Blue G	1 g
	Orthophosphorsäure	200 ml
	Ethanol	100 ml
Bradford Reagens (Gebrauchslösung)	Stammlösung	30 ml
	Orthophosphorsäure	80 ml
	Ethanol	40 ml
	mit H ₂ O auf	600 ml

3.2.10 α -Toxin-Isolierung, -Aufbewahrung, -Charakterisierung

3.2.10.1 Reinigung

Nach Anzucht einer Kultur von *Staphylococcus aureus*, „Wood 46“, DSM 20491 auf Blutagarplatten (Oxoid/Unipath) und in 3% TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) nach Zoller, 1992 erfolgte die Reinigung des im Kulturüberstand befindlichen α -Toxins wie folgt:

Isoelektrische Fällung

Die mit NaN_3 abgestoppte Suspensionskultur wurde durch Zugabe von Essigsäure auf pH 5.0 eingestellt. Anschließend wurde 1.5 Vol. Lösung A zugegeben und 3 h bei 4°C gefällt. Das Sediment wurde vom klaren Überstand durch Zentrifugation (6000 rpm, 10000 x g, 15 min, Centricon H-401B, Rotor: Kontron Hermle A 6.14) abgetrennt.

Kationentauscher CM 52

3-5 l des klaren Überstandes wurden über je 200-300 ml CM 52 Kationenaustauschermaterial (Carboxymethylcellulose) gereinigt, die Bindung an den Kationenaustauscher erfolgte im Batch-Verfahren über einen Zeitraum von 1 h. Nach Absetzen des Kationenaustauschers wurde der Überstand, der keine hämolytische Aktivität aufwies, verworfen, und α -Toxin-beladene CM-Cellulose in eine Säule gefüllt (Länge 60 cm, Innendurchmesser 3 cm). Die Gelbetthöhe betrug 30-42 cm. Das Säulenmaterial wurde mit 1 l Lösung A und 2 l Lösung B gewaschen (Flußrate jeweils 150 ml/h). Die Elution erfolgte mit Lösung C (Flußrate 100-120 ml/h). Das Eluat wurde in Fraktionen zu 8-12 ml gesammelt. Die Regeneration der CM-Cellulose erfolgte mit Lösung A (1.5 l, Einlagerung im Kühlraum mit 8 mM NaN_3).

Kupfer-Chelat-Affinitätschromatographie

Zur weiteren Aufreinigung von α -Toxin wurde eine Säule (2 cm Innendurchmesser, Länge 30 cm) mit Kupfer-Chelat-Sepharose auf eine Gelbetthöhe von 20 cm gefüllt und das Säulenmaterial durch Zugabe von 100 ml Lösung E in einer Flußrate von 70 ml/h mit Cu^{2+} beladen. Danach wurde die Säule nacheinander mit 150 ml Lösung F und 150 ml Lösung I gewaschen und mit 200 ml Lösung F voräquilibriert (Flußraten 70 ml/h).

Die 8-10 Fraktionen des CM-Cellulose-Eluats, die die höchsten hämolytischen Aktivitäten aufwiesen wurden mit einer Flußrate von 40-50 ml/h auf die Säule aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit gleicher Flußrate durch 100 ml Lösung G, 200 ml Lösung H und 300 ml Lösung I. Als Fraktionsgröße wurden 6-8 ml gewählt, die Regeneration der Säule erfolgte mit Lösung J, die Einlagerung in Lösung D.

Ammoniumsulfatfällung

Die hämolytisch aktiven Fraktionen des Cu-Chelat-Eluats wurden vereinigt, mit EDTA versetzt (Endkonzentration 5 mM) und mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu 90%iger Sättigung zugegeben (66,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu je 100 ml Eluat bei 4°C). Ein erster Niederschlag bei 88%iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung enthielt α -Toxin in geringen Mengen. Der Niederschlag löste sich durch weiteres Rühren wieder auf. Nach Zugabe des restlichen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fiel α -Toxin

innerhalb weniger Stunden auf Eis aus. Dieser Niederschlag wurde mehrmals mit 90%iger Ammoniumsulfatlösung mit 2 mM EDTA, pH 7.0, 0°C gewaschen, bevor er zur weiteren Charakterisierung aliquotiert und bei -80°C gelagert wurde.

Dialyse

Der (NH₄)₂SO₄-Niederschlag wurde über Nacht gegen 0.05 x TE, pH 7.5 dialysiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration auf 600 bzw. 1800 µg/ml eingestellt und Aliquots à 200 µl ohne weitere Maßnahmen bei -80°C gelagert.

Lösung A:	Essigsäure	10 mM
	NaN ₃	8 mM
	mit KOH auf	pH 5.0
Lösung B:	NaH ₂ PO ₄	10 mM
	NaN ₃	8 mM
	mit KOH auf	pH 6.5
Lösung C:	NaCl	500 mM
	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	Imidazol	1 mM
	NaN ₃	8 mM
	mit KOH auf	pH 7.0
Lösung D:	TRIS	50 mM
	Ethanol	20 % (v/v)
	NaN ₃	8 mM
	mit HCl auf	pH 8.0
Lösung E:	CuSO ₄	25 mM
	NaCl	1 M
	mit HAc auf	pH 3.4
Lösung F:	NaCl	500 mM
	Essigsäure	50 mM
	Imidazol	1 mM
	NaN ₃	8 mM
	mit HAc auf	pH 4.5
Lösung G:	NaCl	500 mM
	Essigsäure	50 mM
	Imidazol	11 mM
	NaN ₃	8 mM
	mit HAc auf	pH 4.5
Lösung H:	NaCl	500 mM
	Essigsäure	50 mM
	Imidazol	50.5 mM
	NaN ₃	8 mM
	mit HAc auf	pH 4.5
Lösung I:	NaCl	500 mM
	Essigsäure	50 mM
	Imidazol	300 mM
	NaN ₃	8 mM
	mit HAc auf	pH 4.5
Lösung J:	EDTA	50 mM
	Na ₃ -Citrat	50 mM
	NaCl	1 M
	mit KOH auf	pH 7.0

Isotone Na ₃ -Citrat-Lsg:	Na ₃ -Citrat NaCl BSA mit HCl auf	50 mM 150 mM 0.2% (w/v) pH 4.5
Kationenaustauscher:	Carboxymethylcellulose, CM 52,	Whatman
Cu-Chelat-Affinitätschr.:	Chelating Sepharose [®] Fast Flow,	Pharmacia Biotech
Dialyse:	Spectrum [®] Spectra/Por [®]	Spectrum companies

3.2.10.2 Mikrodialyse kleiner Mengen α -Toxins

Um die Ammoniumsulfatkonzentration nach Lösen des (NH₄)₂SO₄- α -Toxin-Niederschlags in Wasser schnell zu verringern, wurde zunächst ein etabliertes Mikrodialyseverfahren verwendet (Uhlmann 1995). Um größere α -Toxin-Mengen möglichst schnell zu dialysieren, wurde dieses weiterentwickelt.

In den Deckel von 1.5-ml-Reaktionsgefäßen wurde jeweils ein Loch mit 7 mm Durchmesser gestanzt und das spitze Ende der Reaktionsgefäße abgeschnitten. Ein in 0.05 x TE eingelegter SpektraporTM-Schlauch wurde aufgeschnitten und mittig über die Innenseite des geöffneten Deckels gelegt. Der Deckel wurde geschlossen, der Schlauch lag an der Innenseite des Eppendorf-Cups glatt auf und wurde durch die Seitenränder gespannt. Überstehende Schlauchteile wurden abgeschnitten, der Deckel mit einem Streifen Gewebe-Klebeband (Tesa) fixiert. In ein ca. 10 x 10 x 1 cm großes Styroporplättchen wurden Löcher von 9 mm Durchmesser im Abstand von 2-3 cm gebohrt. In diese Löcher wurden die Mikrodialyse-Gefäße eingesteckt und mit der Deckelseite nach unten in 2 l und 4°C kalte 0.05 x TE-Lösung, pH 7.5, eingetaucht. Die entstehenden Luftblasen zwischen Deckelrand und SpektraporTM-Membran wurden durch Ausspülen entfernt. Von oben wurden α -Toxin-haltige Lösungen zugegeben und in 4-5 h unter ständigem Umrühren dialysiert.

3.2.10.3 Halbquantitative Bestimmung der hämolytischen Aktivität

Die halbquantitative Bestimmung der hämolytischen Aktivität einer α -Toxin-haltigen Probe erfolgte durch Bestimmung des Hämolysehofes, der auf Schafsblutagarplatten (Oxoid/Unipath) entstand. Zuvor wurden in die Schafsblutagarplatten Löcher von 3 mm Durchmesser in einem Abstand von 2.5 cm gestanzt und mit einem Tropfen 2%iger Agrose in PBS nach unten abgedichtet. In diese Ausstanzungen wurden je 10 μ l Probe aufgetragen. Nach einer Stunde wurden erste Hämolysehöfe sichtbar, nach 12 h war die halbquantitative Auswertung möglich.

3.2.10.4 Herstellung standardisierter Erythrozytensuspensionen

0.5-1 ml Blut aus der Ohrvene eines Kaninchens wurde direkt in 3 ml vorgelegte isotonische Natrium-Citrat-Lösung gegeben. Diese Suspension wurde zentrifugiert (2 min, 750 x g, Raumtemperatur) und das Pellet dreimal mit PBS gewaschen. Zur Standardisierung wurde das Pellet in Natrium-Citrat-Lösung so verdünnt, daß der Extinktionsunterschied bei 412 nm vor und nach vollständiger Hämolyse 1.0 Δ OD beträgt. Dies ist bei einer

3%igen Suspension der Fall. Die vollständige Hämolyse erfolgte durch Zugabe von 5 µl 2%ige SDS-Lösung zu 50 µl Erythrozytensuspension in 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Vor der Extinktionsmessung wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (5 min, 2000 x g) pelletiert. Der Leerwert wurde mit PBS statt SDS-Lösung ermittelt.

3.2.10.5 Quantitativer Hämolysetest

Zur Durchführung des quantitativen Hämolysetests nach Zoller wurden 10-100 µg/ml α -Toxin/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Niederschlag gelöst. Nach Proteinbestimmung wurden Verdünnungen der Ausgangslösung zwischen 1:1 und 1:45000 mit Wasser bei jeweiliger Halbierung der Konzentration hergestellt. 5 µl dieser Verdünnungen wurden zu 50 µl standardisierter Erythrozytensuspension gegeben und 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 5 min bei 2000 x g zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden mit 200 µl Wasser verdünnt und in einer Mikroküvette die Extinktion bei 412 nm im Photometer gemessen. Halbmaximale Extinktion entspricht halbmaximaler Hämolyse. Die α -Toxin-Menge, die genau halbmaximale Hämolyse in diesem Testansatz verursacht, entspricht einer hämolytischen Einheit (Ahnert-Hilger, 1985 a). Durch Proteinbestimmung der α -Toxin-Stammlösung wurde die Aktivität des α -Toxins in hämolytischen Einheiten je mg Protein (hU/mg) bestimmt.

3.2.11 O₂-Messung mit der Clark-Sauerstoffelektrode

3.2.11.1 Vorbereitung der Elektrode

Die Sauerstoffmessung wurde mit einer Clark-O₂-Elektrode (Fa. Bachofer, Typ DW1) durchgeführt. Die Kathode der Clark-Sauerstoffelektrode wurde mit einem Tropfen 3M KCl-Lösung benetzt und anschließend mit einem nitritfreien (über Nacht in 3M KCl-Lösung eingeweichten) Zigarettenpapier (es dient als Elektrolyt-Brücke und als Spacer) der Größe 25 x 25 mm belegt. Die Anode, die sich in einer Vertiefung befindet, wurde mit KCl-Lösung bedeckt. Sofort darauf wurde eine 25 x 25 mm große Teflonmembran auf die Kathode gelegt. Dabei sollte sich die Adhäsion des Teflons an das getränkte Papier ohne Unterbrechung des Flüssigkeitsfilmes über die ganze Fläche erstrecken.

Der O-Ring-13-g zur Fixierung der Membran wurde auf den Zylinder des Membran-Applikators gesetzt, dessen Ausfräsung komplementär zur Kathode ist und senkrecht auf die Kathodenkuppel gesetzt. Durch Herunterdrücken des Applikators wurde der Ring in die Einschnürung der Kuppe gedrückt, der O-Ring spannte Teflonmembran und Papier ohne Luftblasen über der Kathode und hielt beides in der KCl-getränkten Anodenrinne fest. Die Teflonmembran wurde vor Auflegen des O-Ring-13-h zurechtgeschnitten, damit sie nicht über die Anodenrinne hinausragte.

Schließlich wurde der Reaktionsraum auf die Elektrodenplatte geschraubt und mit Wasser gefüllt. Nach Dichtigkeitsprüfung wurde die Geschwindigkeit des Magnetrührers langsam erhöht, bis die Drehung periodisch bleibt. Die Polarisationsspannung wird von

einem netzunabhängigen Stromversorgungsgerät geliefert. Nach Erreichen konstanter Anzeige (30-60 min) wurde mit der Messung begonnen (Bild s. Gkantiragas 1997).

3.2.11.2 Eichung der Clark-Sauerstoffelektrode

Der Schreiber wurde unter normoxischen Bedingungen (noch nicht eingesetzter Stempel, ständiges Rühren mit dem Magnetrührer) bei 37°C auf 100% eingestellt.

Nach Einsetzen des Stempels, der nach unten geschraubt wurde, bis der Flüssigkeitsfilm in die Kapillare des Kolbens stieg, wurde der anoxische Wert (0% O₂-Konzentration) durch Zugabe von Na₂-Dithionit ad 10 mM eingestellt. Der Schreiber wurde auf 0% O₂ justiert. Nachdem keine Potentialänderung mehr meßbar war, wurde der erreichte Punkt als Nullwert definiert. Nach Absaugen der gemessenen Lösung und Spülen der Apparatur wurden die Messungen durchgeführt.

3.2.12 Ablauf von Permeabilisierungsversuchen

3.2.12.1 Bevorratung und Einsatz von Stammlösungen

Das Permeabilisierungsmedium für SV40-infizierte CV1-Zellen wurde im Vergleich zu Eger, 1995 weiter optimiert, das Lösungsverfahren wie folgt geändert:

Kaliumglutamat, NTA, EGTA, PIPES, MgCl₂ und CaCl₂ wurden in entsprechender Menge eingewogen, mit H₂O gelöst, mit KOH auf pH 7.2 eingestellt und mit H₂O aufgefüllt. Nach Einwiegen der Triphosphate CTP, GTP und UTP und der Desoxytriphosphate dCTP, dGTP, dTTP und dATP in Reaktionsgefäße wurden diese mit KG-PIPES-Puffer ad 10 mM gelöst. ATP wurde in ein größeres, steriles Gefäß eingewogen und mit je 1 ml der gelösten Triphosphate und Desoxytriphosphate gelöst. Mit KG-PIPES-Puffer wurde auf 9 ml aufgefüllt, der pH-Wert nochmals kontrolliert und adjustiert. Creatinkinase und Creatinphosphat wurden wie in Eger, 1995 gelöst und aliquotiert.

ATP-Stammlösung	250	mM	152	mg in 1 ml
CTP-Stammlösung	10	mM	5,27	mg in 1 ml
dATP-Stammlösung	10	mM	6,18	mg in 1 ml
dCTP-Stammlösung	10	mM	5,11	mg in 1 ml
dGTP-Stammlösung	10	mM	5,51	mg in 1 ml
dTTP-Stammlösung	10	mM	5,7	mg in 1 ml
GTP-Stammlösung	10	mM	5,67	mg in 1 ml
UTP-Stammlösung	10	mM	5,5	mg in 1 ml
Creatinphosphat	350	mM	129,6	mg in 1 ml
Creatinkinase			10	mg in 1 ml
CaCl ₂ -Stammlösung	100	mM	147	mg in 10 ml
Dithiothreitol-Stammlösung	25	mM	3,86	mg in 1 ml
EGTA-Stammlösung	0,5	mM	19	mg/ 10 ml mit KOH pH 7,4
MgCl ₂ -Stammlösung	100	mM	203	mg/ 10 ml
NTA-Stammlösung	50	mM	287	mg/300 ml mit KOH pH 7,4
PIPES-Stammlösung	100	mM	907	mg/300 ml mit KOH pH 7,4

3.2.12.2 Permeabilisierung von Zellen für Replikations-Versuche

Nach Kultivierung von CV1-Zellen zur Konfluenz (vgl. 3.2.1.1) wurden diese auf Kunststoffpetrischalen, Suspensionskulturen in Kunststoff- oder Glasgefäßen in den Wärmeraum überführt und zunächst mit einer barometrischen Gasmischung aus 20% O₂, 5% CO₂ und 75% N₂ begast, die, durch eine Begasungsvorrichtung (Dreier 1995, Gkantiragas 1997) befeuchtet, von unten zu den Zellkulturen geleitet wurde. Nach mindestens 1.5 h wurde das Kulturmedium vollständig abgesaugt. Suspensionskulturen wurden mit 1600 g x min zentrifugiert. Anschließend wurde die Begasung verändert: Bei normoxischen Versuchen mit permeabilisierten Zellen wurde eine befeuchtete Mischung aus 20% O₂ und 80% N₂ von unten zu den Zellkulturen geleitet. Bei hypoxischen Versuchen eine Mischung aus 200 oder 400 ppm O₂ und Argon befeuchtet und von unten zugeleitet. Argon verdrängt in kurzer Zeit die normoxische Luft nach oben. Nach Abziehen des DMEM wurden 0,1-0,2 Vol. Permeabilisierungsmedium vorsichtig zugegeben und verteilt. Das Permeabilisierungsmedium für SV40-infizierte CV1-Zellen enthielt zwischen 500 und 5000 hU/ml α -Toxin. Für die Permeabilisierung von HeLa-Zellen wurden 3000-15000 hU/ml eingesetzt. Die schnelle Einstellung der Hypoxie wurde unterstützt durch Zugabe von 700 μ M Ascorbinsäure, 1400 μ M NaHCO₃ und 3 U/ml Ascorbatoxidase. Das Medium wurde bei Monolayern alle 10-20 min durch Schwenken neu verteilt, um die Austrocknung der Zellen zu verhindern.

Die Pulsmarkierung permeabilisierter Zellen erfolgte durch direkte Zugabe von [α -³²P]-dATP, [α -³³P]-dATP, [α -³²P]-dCTP oder [α -³⁵S]-dATP zum Permeabilisierungsmedium. Das am häufigsten verwendete [α -³²P]-dATP wurde in einer Aktivität von 10 μ Ci/ μ l (370000 Bq/ μ l, d. i. 3×10^6 Ci/Mol ($1,11 \times 10^{17}$ Bq/Mol)) geliefert. Aufgrund der hohen spezifischen Radioaktivität konnte auf osmotischen Ausgleich bei Zugabe in das Medium verzichtet werden. Die Markierungsdichten variierten stark und werden in den einzelnen Versuchen beschrieben. ³H-/³²P-Doppelmarkierungen wurden durch Zugabe oben genannter Isotopenträger zusammen mit [Methyl-³H]-Thymidin zu 200-300 μ l Permeabilisierungsmedium je 35-mm-Kulturschale und 1.5-3 ml je 145-mm-Kulturschale durchgeführt. Nach abgeschlossener Inkubation wurde das Permeabilisierungsmedium entfernt und die Zellen je zwei Mal mit 0.5 ml eisgekühltem KG-Puffer gewaschen.

KG-Waschpuffer	K-Glutamat	1500 mM	27,8 g/l
	EGTA	5 mM	190,2 mg/l
	NTA	50 mM	957 mg/l
	PIPES	160 mM	3,02 g/l mit KOH auf pH 7,2
Ascorbinsäure-Stammlösung		70 mM	12,33 mg/ml
BrdUTP-Stammlösung		10 mM	5,47 mg in 1 ml
NaHCO ₃ -Stammlösung		1400 mM	11,76 mg/ml
Emetin-Stammlösung		10 mM	55,4 mg/ml 80 mM KOH

3.2.12.3 Begasung von Zellkulturen, Aufhebung von Hypoxie

Die Begasung der verwendeten Kulturen erfolgte analog Gekeler 1982 und Dreier 1995. Zur Aufhebung von Hypoxie (Reoxigenierung) wurden nicht permeabilisierten hypoxischen Kulturen $\frac{1}{4}$ Vol. warmes, für 15 min mit 95% O₂, 5% CO₂ bei 37°C begastes Kulturmedium zugegeben. Hypoxische Kulturen aus permeabilisierten Zellen wurden auf verschiedene Weisen reoxigeniert (s. Darstellung im Ergebnisteil bei den jeweiligen Versuchen). Die weitere Begasung erfolgte normoxisch ohne CO₂.

Für hypoxische Permeabilisierungen wurde das Permeabilisierungsmedium in ein Glasgefäß in einer separaten Begasungskammer aus Aluminium gegeben, in dem die gewünschte Menge wässrig gelöstes NaHCO₃, Ascorbat und Ascorbatoxidase in drei separaten Tropfen vorgelegt wurde. Die Mischung erfolgte durch Zugabe des Permeabilisierungsmediums, die hypoxische Begasung dauerte 15-20 min lang. Anschließend wurde eine kleine Glasspritze (1-2 ml), abgedichtet mit wenig Silikon, durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen in hypoxischer Atmosphäre mit hypoxischem Gas gefüllt. Mit dieser wurde durch ein Diaphragma das nun hypoxische Permeabilisierungsmedium aufgenommen und durch ein weiteres Diaphragma in das Reaktionsgefäß gegeben. Der erste Tropfen wurde am Außenrand eines Kulturgefäßes abgestreift, der Rest auf die Zellen gegeben, deren Medium kurz zuvor entfernt worden war.

3.2.12.4 Adaptation der Begasungseinrichtungen auf Kunststoff

O₂-Gas kann Glas nicht permeieren und wird in diesem nicht gelöst. Zur Etablierung von Hypoxie werden deshalb i.d.R. Glaspetrischalen (bei Monolayern) bzw. Glasreaktionsgläser (bei Suspensionskulturen) verwendet. Reoxigenierungen von SV40-infizierten, permeabilisierten CV1-Zellen nach Hypoxie führten jedoch zur Ablösung großer Teile der CV1-Monolayer (bis 95% der Zellen). Die *in-vivo*-Vormarkierung der DNA mit [Methyl-³H]-Thd zur Normierung dieses Verlustes stellte zwar eine große Verringerung dieses Fehlers, jedoch keine völlig befriedigende Lösung dar.

Andere Monolayer-Zellkulturen (z.B. HeLa) wurden von einer solchen Ablösung nicht in dem Maß betroffen. Vermutlich weisen diese Zellen mehr „Anheftungspunkte“ auf als CV1-Zellen. Deshalb wurden hypoxische Inkubationen SV40-infizierter, permeabilisierter CV1-Zellen auf Polystyrol-Petrischalen (Greiner) durchgeführt. Kunststoffe weisen i.d.R. eine hohe O₂-Löslichkeit auf. Alternativ wurden Kupferleitungen verwendet.

Die zur Zellkultur verwendeten Kunststoffpetrischalen aus PS der Fa. Greiner wiesen einen 0.5 mm großen Rand unterhalb des Petrischalenbodens auf. Der Gasaustausch dieses Luftreservoirs mit einströmendem hypoxischem Gas dauert auf einer planen Fläche zu lange. Deshalb wurde in der „Karussell“ genannten Begasungskammer an Stelle des planen Bleches (nähere Beschreibung s. Dreier, 1995, Wormer, 1995), auf dem die Kulturen im Kreis gedreht werden können, ein dünneres Blech montiert, auf dem in 3 mm Abstand ein Lochblech (2 mm Lochdurchmesser, 8 mm Abstand) angebracht wurde. So wurde ein Umströmen der Kunststoffschalen (auch direkt von unten) ermöglicht.

In den Aluminiumkammern wurde ein feinmaschiges Nirosta-Netz auf kleinen Füßchen aus Schrauben unter die Kunststoffschalen gestellt, durch das das Gas ungehindert strömen konnte. Größere Kunststoffschälchen wurden für hypoxische Begasung in großen Aluminiumkammern auf ein grobmaschiges Aluminiumgitter gestellt, das auf ein Aluminiumgestell gelegt wurde.

3.2.12.5 Das optimierte Permeabilisierungsmedium

Das für die replikationsunterstützende Permeabilisierung von CV1-Zellen optimierte Inkubationsmedium wurde bei allen hier beschriebenen Untersuchungen verwendet und setzt sich wie folgt zusammen:

120	mM	Kaliumglutamat-Puffer, pH 7.2
8,5	mM	MgCl ₂
1	mM	CaCl ₂
2,8	mM	ATP
100	µM	CTP, GTP und UTP
100	µM	dATP, dCTP, dGTP und dTTP
400	µM	EGTA
4	mM	NTA
16	mM	PIPES
1	mg/ml	Creatinkinase
50	mM	Creatinphosphat

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON α -TOXIN

4.1.1 Anzucht des *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus („Wood 46“, DSM 20491) wurde entsprechend 3.2.1.4 und 3.2.11 zunächst auf Schafsblutagarplatten bis zur Hämolysehofgröße von 16 mm kultiviert. Über-Nacht-Kulturen in TSB-Flüssigmedium aus Kulturen, die besonders große Hämolysehöfe produzierten, wiesen nach 10.5 h Kultivierung bei 37°C ca. 1.8×10^9 Bakterien je ml Lösung auf. Von diesen Reagenzglasvorkulturen wurde die Hauptkultur in 3% TSB beimpft (Zugabe von 0.003 Vol.). Die maximale α -Toxinproduktion wurde nach 24 h bei einer optischen Dichte von 7,2 (578 nm, $\Delta OD_{578nm} = 1.0$ (d = 1.0 cm) $\approx 7 \times 10^9$ Zellen ≈ 0.3 g/l Bakterientrockengewicht und Gesamtproteingehalt ≈ 0.17 g/l, Zoller, 1992) erhalten. Glucosezusatz zu TSB-Medium beschleunigte das Wachstum von *Staphylococcus aureus* und die Produktion von α -Toxin. In allen Isolierungen nach 1996 wurde 10 mM Glucose in einer Endkonzentration von 10 mM steril zugesetzt. Reinheit und Qualität des isolierten α -Toxins wurden dadurch nicht verändert.

Die Freisetzung von α -Toxin ins Kulturmedium erfolgte in nennenswertem Ausmaß erst nach Erreichen der stationären Wachstumsphase, 15-19 h nach Inokulation.

4.1.2 Nachweis und Bestimmung von α -Toxin

Folgende qualitative, halbquantitative und quantitative Nachweise von α -Toxin wurden verwendet:

Als Schnelltest für halbquantitative Bestimmungen des α -Toxingehalts von Lösungen diente ein Hämolysetest auf Schafsblutagarplatten (3.2.10.3). Die Hämolysehöfe vergrößerten sich mit steigender Inkubationsdauer. Der Logarithmus des Durchmessers war proportional der in der Probe befindlichen α -Toxinkonzentration.

α -Toxin wurde in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und dieses anschließend gefärbt (Coomassie bzw. Silber). Mit Hilfe von Vergleichsproteinen konnte α -Toxin zusammen mit weiteren Verfahren in vorgereinigten Proben nachgewiesen werden. Die α -Toxin-Bande befand sich an derselben Stelle wie der 34-kDa-Proteinmarker.

Die quantitative Bestimmung von α -Toxin erfolgte über Hämolyse von Kaninchen-Erythrozyten, die besonders empfindlich auf α -Toxin reagieren (Arbuthnott 1970, Thelestam 1988). Der Kehrwert der α -Toxinkonzentration, bei der >50% der Kaninchenerythrozyten lysieren wurde als hämolytische Einheit (hU) definiert.

4.1.3 Reinigung über die CM-Cellulose

Die Kultur wurde entsprechend 3.2.10.1 abgestoppt und der klare Kulturüberstand auf pH 5.0 eingestellt. Nach Versetzen mit Lösung A betrug das Volumen des klaren Kulturüberstandes das 2.35fache des Kulturvolumens.

Der klare Kulturüberstand (kK) wurde mit CM-Cellulose-Säulenmaterial versetzt, dessen Volumen im vorgequollenen Zustand 6% des kKs ausmacht. Die Proteine wurden im Batch-Verfahren geladen und nach Umfüllung der CM-Cellulose in eine Säule eluiert. Fraktionsgröße war 8-12 ml, die Elution der Proteine erfolgte in einem scharfen Maximum. Nur wenige Fraktionen enthielten α -Toxin in auswertbarer Konzentration, das aufgetragene α -Toxin ist im Eluat quantitativ enthalten (Abb. 1):

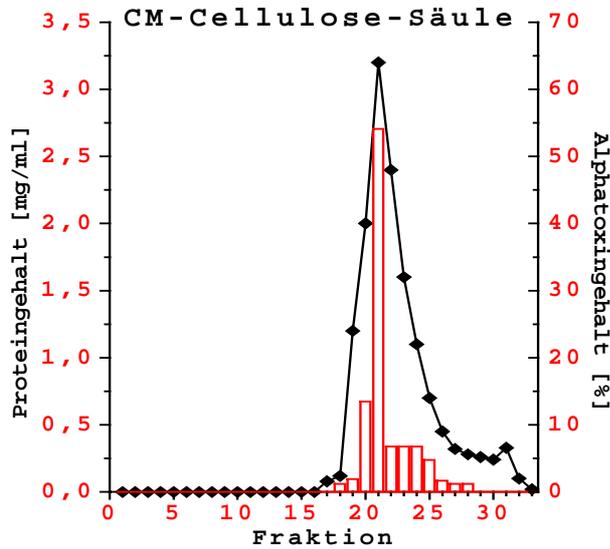


Abb. 1: Profil einer α -Toxinreinigung über eine CM-Cellulose-Säule

α -Toxinherstellung durch *Staph. aureus* in 24-h-Kultur (3.2.11)

Fraktion 1: letzte reine Lösung B

□: α -Toxinkonzentration [% d. Gesamtkonzentration des Reinigungsschrittes], gemessen als log der Eindringtiefe in Blutagarplatten

—◇—: Gesamtproteingehalt einzelner Fraktionen [mg/ml] (280-nm-Extinktion)

Fraktionsgröße: 12 ml

Nach Elution des α -Toxins von der CM-Cellulose wurden die Fraktionen 19-26 vereinigt, sie enthielten 97.7-98.9% des α -Toxins. Das Elutionsprofil bei mehreren Isolierungen war vergleichbar. Die Regeneration der Säule erfolgte nach Anleitung und 3.2.10.

4.1.4 Reinigung über die Cu-Chelat-Säule

Das α -Toxinhaltige CM-Cellulose-Eluat wurde entsprechend 3.2.11 auf die Cu-Chelat-Säule aufgetragen und eluiert. Fraktionsgröße war 8 ml. In diesem Reinigungsschritt befand sich α -Toxin in 32 Fraktionen, weitere Proteine befanden sich in den Fraktionen 18-51. Die Fraktionen 28-38 enthielten den Hauptteil des α -Toxin und wurden vereinigt (Abb. 2):

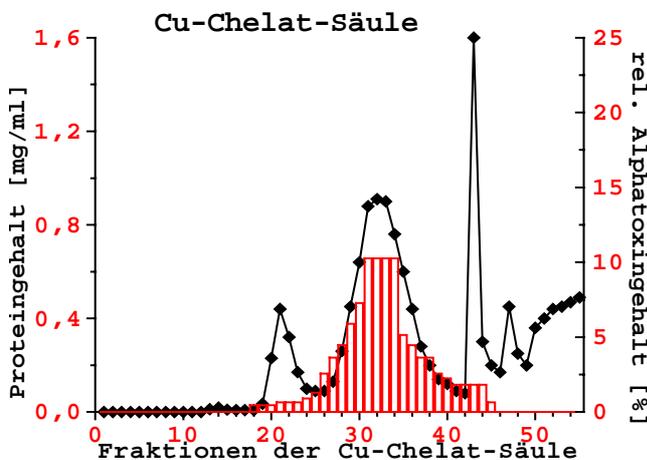


Abb. 2: Profil einer exemplarischen α -Toxinreinigung über eine Cu-Chelat-Säule

α -Toxinherstellung: *Staph. aureus* in 24-h-Kultur (s. 3.2.1.5)

Fraktion 1: erste Spuren von Lösung G

□: α -Toxinkonzentration [% der Gesamtkonzentration des Reinigungsschrittes], gemessen als log der Eindringtiefe in Schafsbloodagarplatten

—◇—: Gesamtproteingehalt einzelner Fraktionen [mg/ml] (Extinktion 280 nm)

Gesamtprotein bezogen auf Serumalbumin, eine Extinktionseinheit \cong 1 mg/ml

Auf die vereinigten Fraktionen entfielen 85% des aufgetragenen α -Toxins.

4.1.5 Fällung mit Ammoniumsulfat

Die vereinigten Fraktionen des Cu-Chelat-Eluats wurden auf 5 mM EDTA eingestellt und langsam mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zur 90%igen Sättigung (66,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu je 100 ml Eluat bei 4°C) versetzt. Der vor Erreichen der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sollkonzentration fallende α -Toxinhaltige Niederschlag löste sich nach einigen Minuten wieder. Erst danach und der restlichen Zugabe der erforderlichen Menge Ammoniumsulfat wurde ein nicht mehr lösbarer Niederschlag manifest, der α -Toxin in hoher Konzentration enthielt.

4.1.6 Gesamtergebnis der Reinigung

Tabelle 1 listet die Daten einer repräsentativen Isolierung auf, die den Daten anderer Isolierungen in kleiner Variation entsprechen.

Tabelle 1: Dokumentation von α -Toxinproduktion und -reinigung

Probe	Protein [$\mu\text{g/ml}$]	Volumen [ml]	Gesamtes Protein [mg]	hämolytische Aktivität [%]	spezifische Aktivität [hU/ μg]
Kultur nach 24 h	1000	2000	2000	100	3,96
klarer Kulturüberst.	186	4700	876	98	8,85
klarer Kulturüberst. nach CM-Cellulose	39,9	4700	278		
in CM-Cellulose			597		max. 12,99
CM-Cellulose-Eluat	1600	96	154	43,7	22,455
Cu-Chelat-Eluat	840	89	74,8	39,7	42
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung			22,8	12,1	42
Waschlösungen		680	52	27,6	12

4.1.7 Dialyse, Aufbewahrung, Dosierung

Das isolierte α -Toxin wurde entsprechend Literaturangaben (Zoller, 1992) als $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Niederschlag bei -80°C aufbewahrt. Dabei wurde auch nach 12-18 Monaten Lagerung kein Aktivitätsverlust von mehr als 10% festgestellt. In den nachfolgend beschriebenen Permeabilisierungsversuchen mit SV40-infizierten CV1-Zellen wurde gezeigt, daß hohe α -Toxin-Konzentrationen nicht durch Lösung des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Niederschlages im Permeabilisierungsmedium erreicht wurden, da dann die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration zu hoch wurde: Bei 60minütiger Dauermarkierung permeabilisierter Zellen in Gegenwart von [α - ^{32}P]-dATP hemmte 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Permeabilisierungsansatz den dATP-Einbau in neugebildete DNA um 75% im Vergleich zum gleichen Ansatz, in dem das α -Toxin vor Einsatz dialysiert wurde.

0.3-2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ im Permeabilisierungsmedium führte zu Ablösung der SV40-infizierten CV1-Zellen bei zunehmender Inkubationsdauer.

Zur Reduktion der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration der α -Toxin-Lösung wurde nach Auftauen des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Niederschlages eine Mikrodialyse gegen 0,05 x TE durchgeführt. Für die schnelle Mikrodialyse kleiner Mengen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -haltigen α -Toxin wurde das 3.2.11.2 beschriebene Verfahren entwickelt. Durch Dialyse wurde die DNA-Synthese in permeabilisierten Zellen um bis zu 300% gesteigert und Zellablösungen reduziert. Die Dialyse erfolgte in 4-5 h direkt vor Versuchsbeginn.

Nach Feststellung, daß die dialysierten α -Toxin-Lösungen nach mehrmonatiger Aufbewahrung bei -80°C keine nennenswerten Aktivitätsverluste zeigen, wurden alle $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - α -Toxin-Niederschläge gegen 0.05 x TE dialysiert und in einer Konzentration von 0.6 bzw. 1.8 mg/ml aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Dialysiertes α -Toxin konnte über mehrere Wochen in diesen Konzentrationen bei 4°C ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

4.2 REPLIKATION IN PERMEABILISIERTEN ZELLEN UNTER NORMOXISCHEN BEDINGUNGEN

4.2.1 Untersuchungsmethoden

4.2.1.1 Messung des Einbaus radioaktiver Vorstufen

Die Markierung der DNA nichtpermeabilisierter Zellen erfolgte durch radioaktiv markierte Moleküle, die durch die Zellmembran aufgenommen werden (z.B. [Methyl- ^3H]-Thymidin). Diese werden in der Zelle phosphoryliert, bevor sie in die DNA eingebaut werden. Nukleotide werden von intakten Zellen nicht aufgenommen. Die Permeabilisierung mit α -Toxin ermöglichte die Markierung der DNA mit radioaktiven Nukleosid-Triphosphaten in Form von Dauermarkierungen oder Pulsmarkierungen von verschiedener Dauer und in verschiedenen Intervallen.

Dauermarkierungen

Zellen wurden durch Zugabe radioaktiv markierter Nukleotide ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -, $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]$ -dATP bzw. $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP) zum Permeabilisierungsmedium dauermarkiert. Nach Zugabe des Permeabilisierungsmediums zu den Zellen gelangte das radioaktive Molekül zusammen mit allen anderen für die Replikation erforderlichen Kleinmolekülen nach einer kurzen, mit der α -Toxin-Permeabilisierung der Zelle zusammenhängenden Verzögerung von 1-3 min bis zum verstetigten Einbau in die Zelle und wurde in die DNA eingebaut.

Durch Variationen der Markierungszeit konnte die für die Permeabilisierung notwendige Zeit und den Einfluß von Substanzen auf die Replikation untersucht werden.

Durch Variation von Dauer und Beginn der Markierung nach Permeabilisierung konnten die optimalen Bedingungen ermittelt werden, unter denen permeabilisierte Zellen längere Zeit auf hohem Niveau replizieren. Eine Verringerung des Einbaus mit zunehmender Zeit nach Permeabilisierung konnte in Abhängigkeit der Konzentration verschiedener Zusätze zum Inkubationsmedium (z.B. rGTP, cAMP) minimiert werden. Kurzfristige Änderungen der Replikation, insbesondere bei schnellem Wirkungseintritt eines nach

Permeabilisierung zugegebenen Stoffes (z.B. Cycloheximid, Emetin) wurden mit Dauermarkierungen verfolgt, die vor Zugabe des Wirkstoffs begonnen wurden.

Markierung durch kurze Pulse

Die radioaktive Markierung wurde hierbei nach erfolgter Permeabilisierung in Form eines „Pulses“ durchgeführt. Sie wurde durch Wechsel des Mediums oder durch Abstoppen der Inkubation beendet. Durch eine Pulsmarkierung wurde die Replikation während eines kurzen Zeitintervalls untersucht.

Markierung durch zeitlich gestaffelte kurze Pulse

Durch Folgen von kurzen Pulsen konnten besonders viele Informationen über die Replikation erhalten werden. Es wurden kurzfristige Schwankungen der Replikation nach einer bestimmten Zeit nach Permeabilisierung detektierbar. Eine Pulsmarkierungskurve kann durch Integration der Meßwerte rekonstruiert werden und mit durch Dauermarkierungen erhaltenen Kurven verglichen werden.

Insbesondere nicht kontinuierliches Ansteigen und Nachlassen der Replikation ist durch Dauermarkierungen schlecht nachweisbar und kann nur durch längere Folgen von kurzen Pulsen nachvollzogen werden. Ein Schneller Wirkungseintritt dagegen wird durch Dauermarkierungen besser erfaßt.

Kontrolle

Unspezifische, nicht auf Replikation basierende Effekte können Ergebnisse von Replikationsuntersuchungen mit permeabilisierten Zellen beeinflussen. Es wurde deshalb regelmäßig der radioaktive Einbau von Zellen gemessen, die mit Permeabilisierungsbeginn sofort auf Eis gestellt wurden, da bei Temperaturen unter 10°C in Eukaryonten keinerlei Replikation mehr stattfindet. Die Dauermarkierung bei 0°C erfolgte ähnlich der bei 37°C, die fixierte Radioaktivität war aber deutlich geringer: Nach 10 min wurden 3.2%, nach 30 bzw. 90 min 1.9% bzw. 1.2% des 37°C-Referenzwertes erreicht (Abb. 3).

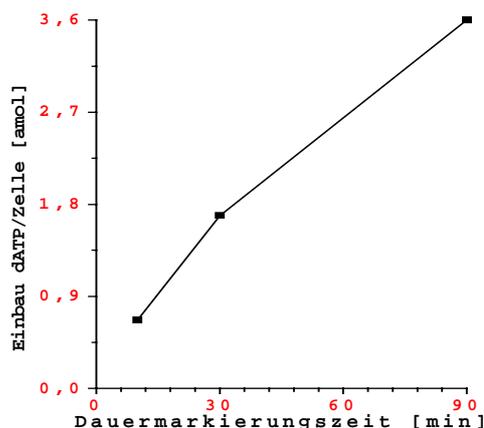


Abb. 3: Radioaktive Markierung in „Eiswerten“

Normoxisch vorbegaste SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3.2.12.2 permeabilisiert, sofort auf Eis gestellt und gleichzeitig 10-90 min mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ dauermarkiert.

α -Toxin: frisch dialysiert, 149 hU/ml Endkonz.

^{32}P -Markierung: 10-90 min, Dauermarkierung mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$

eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz::
746 Bq/ μl Permeabilisierungsmedium

4.2.1.2 Alkalische Rohrzuckergradienten

Analog 3.2.5.1 erfolgte die Analyse von zellulären und SV40-Replikationsintermediaten und -produkten durch isokinetische Zonenzentrifugation im alkalischen Rohrzuckergradienten. Die Größenverteilung neusynthetisierter Tochterstrang-DNA wur-

de auf diese Weise ermittelt. Dabei wurden lineare Sucrosegradienten hergestellt und je nach Trennproblem variiert.

4.2.1.3 Analyse dichtemarkierter DNA durch isopyknische Zentrifugation

Die in 3.2.5.2 beschriebene Methode der isopyknischen Zentrifugation mit BrdUTP dichtemarkierter DNA im CsCl-Gradienten wurde verwendet, um nicht dichtemarkierte Referenz-DNA von halbdichtemarkierter SV40-DNA (nach einer Replikationsrunde) und volldichtemarkierter SV40-DNA (nach mehreren Replikationsrunden auftretend) zu unterscheiden. Die Dichteverschiebung der BrdU-markierten DNA gilt als Maß für den Grad der Vollständigkeit der Substitution des Thymidins durch BrdUTP, die Zeit bis zur Bildung voll substituierter DNA als Maß für die Geschwindigkeit der Replikation in permeabilisierten Zellsystemen.

4.2.1.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

DNA kann nach verschiedenen Trennprinzipien in zwei Dimensionen aufgetrennt, verschiedene DNA-Spezies können dann besser voneinander unterschieden werden. Dies wurde in jüngerer Zeit insbesondere bei SV40-DNA angewendet (Snapka 1986, 1988, 1991 a und b, Sundin 1980, 1981). Doppelsträngige ringförmige DNA (z.B. virale Replikationsintermediate) wurde in der ersten Dimension auf neutralen Agarosegelen nach Größe und Kompaktheit aufgetrennt.

Die Laufrichtung der zweiten Dimension erfolgte im rechten Winkel zur ersten. Die DNA wurde durch alkalische Puffer denaturiert. Alternativ kann die Topologie und mit ihr die elektrophoretische Beweglichkeit durch Verwendung von Interkalatoren, z.B. Chloroquin oder Ethidiumbromid, verändert werden. Dadurch konnte DNA, die in der ersten Dimension die gleiche Laufstrecke aufwies und sich übereinander abbildete, in der zweiten Dimension getrennt werden (Snapka 1991 a).

Durch neutrale/alkalische 2D-Gelelektrophorese können zahlreiche Fragestellungen untersucht werden: Die Richtung der Replikationsgabel kann über Hybridisierung mit kurzen Probesequenzen untersucht werden (Nawotka 1988), Proteinassoziierte DNA kann aufgelöst werden (Snapka 1991 b). Auch nach Hirt isolierte SV40-DNA kann nach Proteinase-K-Verdau zur Aufdeckung provozierter Replikationsfehler aufgetrennt werden (Hirt 1967, Snapka 1993). Kovalente Bindungen können in einer Phase aufgelöst werden (Gourlie 1983, Snapka 1991 a).

4.2.2 Zusammensetzung des Testsystems

Fast alle Ergebnisse wurden durch Vormarkierung der Zellen mit [Methyl-³H]-Thymidin (3.2.3.1) normiert, wodurch der Einfluß von Vitalitätsunterschieden, Unterschieden der Zelldichte bei Aussaat und Wachstum, Unterschiede bei der Infektion mit SV40-Stocklysat und eventueller partieller Ablösungen des Monolayers durch Medienwechsel

bzw. bei Waschschrinen nach Abstoppen der Replikation oder durch Manipulationen unter Hypoxie berücksichtigt werden konnte.

³²P-markierte Nukleosidtriphosphate wurden zu verschiedenen Zeiten nach Herstellung und Lieferung verwendet. Neben dem natürlichen Zerfall des Isotops tritt zusätzlich eine Radiolyse der [α -³²P]-dATP-Nukleotide auf. Dies wurde durch eine Bestimmung der biologischen Verwertbarkeit (3.2.3.4) berücksichtigt. Unabhängig, von welcher Charge und welchem Lieferanten die Nukleotide stammten, betrug die Verfügbarkeit von [α -³²P]-dATP im Durchschnitt 88.6%. Durch Radiolyse wurden im Durchschnitt 12.4% der ³²P-markierten Moleküle zerstört. Dieser Anteil blieb bei Alterung der Proben weitgehend konstant, was den Schluß nahelegt, daß die Radiolyse insbesondere bei der Herstellung bei wesentlich höheren spezifischen Radioaktivitäten und noch ohne Stabilisierung der Lösungen stattfindet. Diese Ergebnisse wurden bei allen Mengenangaben über den Einbau berücksichtigt, ältere Berechnungen korrigiert.

4.2.2.1 α -Toxinkonzentration

Zellen gelten hier als vollständig permeabilisiert, wenn eine weitere Erhöhung der α -Toxin-Konzentration zu keiner weiteren Steigerung des Einbaus radioaktiv markierter Nukleotide in die DNA der permeabilisierten Zelle in den ersten 30 min nach Permeabilisierung führt.

α -Toxin wurde in Konzentrationen verwendet, die bei SV40-infizierten CV1-Zellen nach derzeit vorliegenden Erkenntnissen zur vollständigen Permeabilisierung führten. Die α -Toxin-Menge wurde bei verschiedenen Anwendungen zwischen 100-3000 hämolytischen Units je ml im Endansatz, wie jeweils angegeben, variiert.

Im Verlauf dieser Dissertation wurden mehrere α -Toxin-Isolierungen durchgeführt, der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - α -Toxin-Niederschlag jeweils charakterisiert und aliquotiert und zunächst direkt im Permeabilisierungsmedium gelöst. Nach Feststellung des Einflusses hoher $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen auf die Replikation, wurde den Untersuchungen die Mikrodialyse des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - α -Toxin-Niederschlages gegen 0,05 TE vorangestellt (3.2.10.2). Nachdem verdünnte α -Toxin-Lösungen nach Schockgefrieren keinen Aktivitätsverlust zeigten, wurde das isolierte α -Toxin einer Präparation direkt nach Isolierung gegen 0,05 TE dialysiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Von diesen Aliquots wurden jeweils gleiche Mengen (in [hU/ml] und [$\mu\text{g}/\text{ml}$]) eingesetzt.

Im Vergleich verschiedener α -Toxin-Chargen zeigte sich folgende Abhängigkeit des Einbaus von der α -Toxin-Konzentration im Permeabilisierungsmedium (Abb. 4):

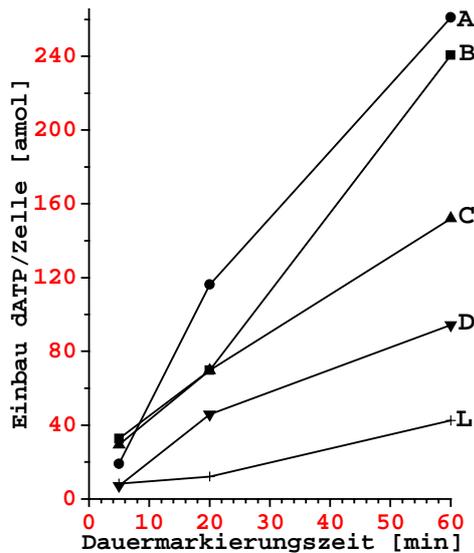


Abb. 4: Test verschiedener α -Toxin-Präparationen: SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach normoxischer Vormarkierung nach 3.2.12.2 mit 14-260 hU α -Toxin/ml im Endansatz permeabilisiert und gleichzeitig nach 3.2.3.2 normoxisch 5-60 min mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ dauermarkiert.

α -Toxin: frisch dialysiert, 14-260 hU/ml
 ^3H -Markierung: 2h Dauermarkierung *in vivo*
 ^{32}P -Markierung: 5-60 min Dauermarkierung
eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz:
162Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}/\mu\text{l}$ Permeabilisierungsmedium
A: 1. α -Toxin, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nicht dial. 300 hU/ml, B: 2. α -Toxin, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dialysiert 98 hU/ml, C: 2. α -Toxin, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dialysiert 31 hU/ml
D: 2. α -Toxin, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dialysiert 14.5 hU/ml, L: Leerwert ohne α -Toxin

Abb. 4 veranschaulicht die starke Abhängigkeit des $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -Einbaus von der α -Toxinmenge: Bei nicht vollständiger Permeabilisierung (<50 hU/ml) sinkt die Einbaurrate deutlich ab. Zwischen 50 und 500 hU/ml ist ein hoher Einbau zu verzeichnen, der bei weiterer Steigerung der α -Toxinkonzentration über 500 hU/ml bei längerer Markierungszeit etwas zurückgeht (nicht gezeigt). Dies war in den oben gezeigten Fällen wahrscheinlich auf steigende $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen bei direkter Lösung des α -Toxins in der Permeabilisierungslösung zurückzuführen; durch Dialyse des α -Toxins gegen 0.05 x TE konnte dies verhindert werden.

Kritische Konzentrationen von α -Toxin

Eine geringe α -Toxinkonzentration führte bei menschlichen T-Lymphozyten zur Einlagerung von α -Toxin in die Membran und zur Ausbildung von Heptamer-Poren, die die Replikation der Zellen kurzfristig nicht behindert. Wurde die Konzentration erhöht, kam es zu DNA-Degradation (kritische α -Toxin-Konzentration). Bei weiterer Erhöhung der α -Toxin-Konzentration über 300 nM hinaus traten solche Effekte nicht auf, dATP wurde stetig zunehmend in die DNA eingebaut (Jonas 1994). Die normoxische Dauermarkierung von CV1-Zellen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ bei verschiedenen α -Toxin-Konzentrationen und Inkubationszeiten zeigte folgende Effekte (Abb. 5).

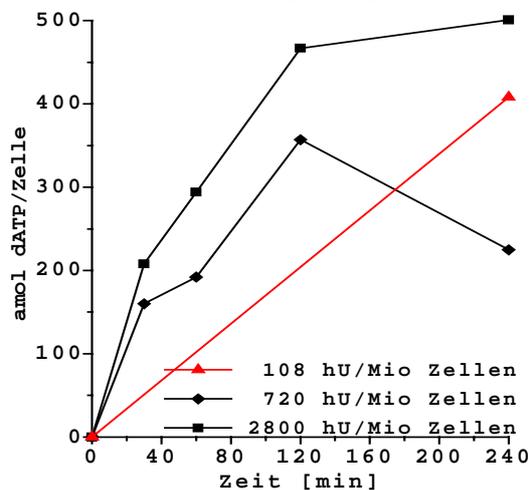


Abb. 5: kritische α -Toxin-Konzentrationen: SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3stündiger normoxischer Vormarkierung mit $[\text{Methyl-}^3\text{H}]\text{-Thd}$ (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 mit 180-4600 hU α -Toxin/ml permeabilisiert und gleichzeitig nach 3.2.3.2 durch $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ normoxisch dauermarkiert. α -Toxin: 180-4600 hU/ml
 ^3H -Markierung: 180 min normoxisch *in vivo*
 ^{32}P -Markierung: 30-180-min-Dauermarkierung
einges. Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 23 Bq $[\text{Methyl-}^3\text{H}]\text{-Thd}/\mu\text{l}$, 140 Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}/\mu\text{l}$

Bei kritischer α -Toxin-Konzentration ließ sich ferner nach Permeabilisierung der Abbau vor Permeabilisierung markierter DNA nachweisen. Zur Ermittlung der optimalen Konzentration oberhalb der kritischen Konzentration wurden mehrere Dauer- und Pulsmarkierungen durchgeführt:

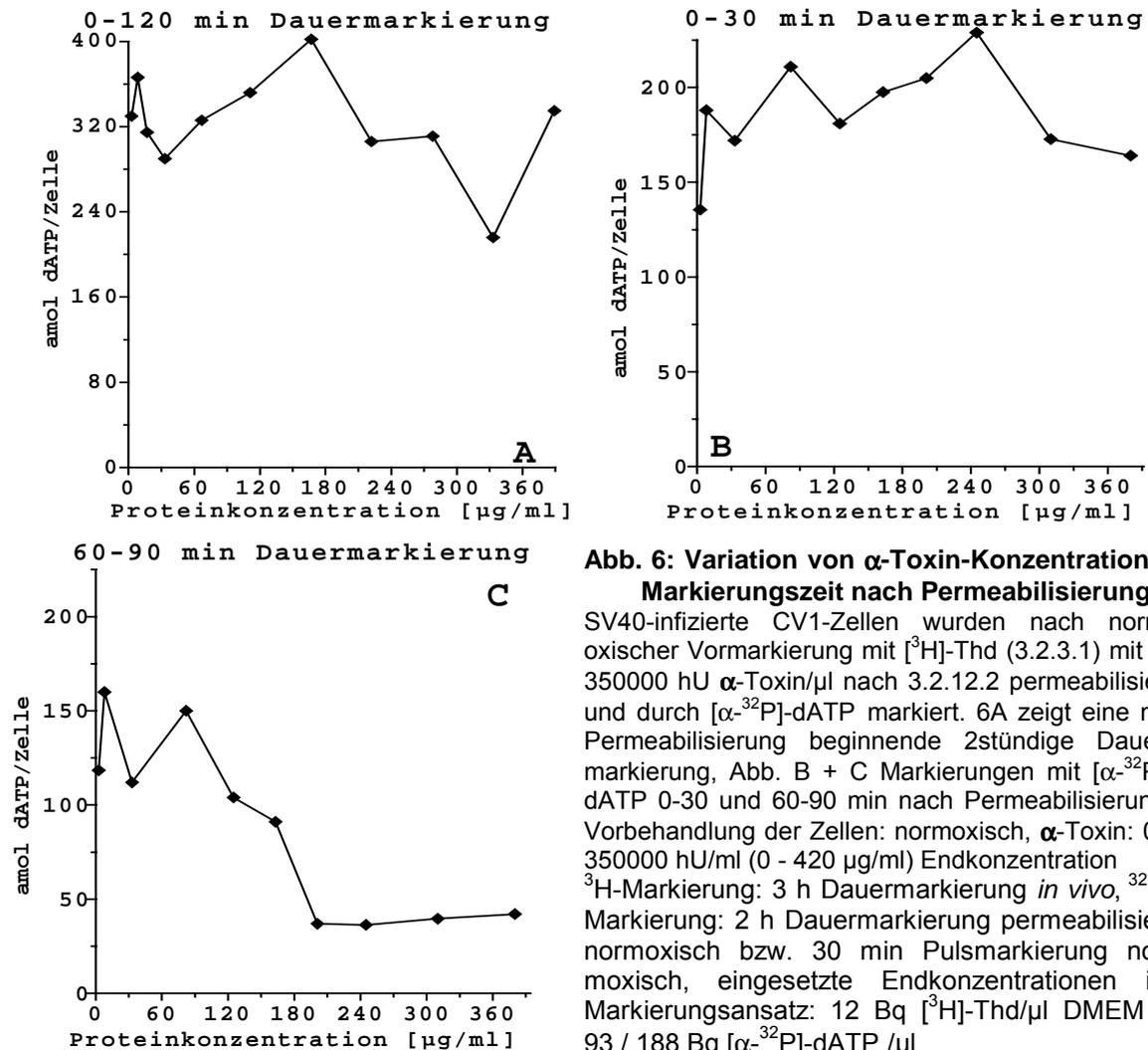


Abb. 6: Variation von α -Toxin-Konzentration + Markierungszeit nach Permeabilisierung

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach normoxischer Vormarkierung mit [^3H]-Thd (3.2.3.1) mit 0-350000 hU α -Toxin/ μl nach 3.2.12.2 permeabilisiert und durch [α - ^{32}P]-dATP markiert. 6A zeigt eine mit Permeabilisierung beginnende 2stündige Dauermarkierung, Abb. B + C Markierungen mit [α - ^{32}P]-dATP 0-30 und 60-90 min nach Permeabilisierung, Vorbehandlung der Zellen: normoxisch, α -Toxin: 0 - 350000 hU/ml (0 - 420 $\mu\text{g/ml}$) Endkonzentration ^3H -Markierung: 3 h Dauermarkierung *in vivo*, ^{32}P -Markierung: 2 h Dauermarkierung permeabilisiert normoxisch bzw. 30 min Pulsmarkierung normoxisch, eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 12 Bq [^3H]-Thd/ μl DMEM + 93 / 188 Bq [α - ^{32}P]-dATP / μl

Bei sehr hoher α -Toxin-Konzentration ließ der Einbau mit der Zeit deutlich stärker nach als dies in früheren Experimenten mit geringerer α -Toxin-Konzentration nachgewiesen werden konnte (Eger 1995). Die Einbaukurve bildet relative Maxima bei 10, 70 und 260 μg α -Toxin/ml Permeabilisierungsmedium. Nur bei geringen α -Toxin-Konzentrationen blieb der Einbau über eine mehrstündige Dauer konstant (Abb. 6 B). Bei höheren Konzentrationen läßt er hingegen stark nach. Voll permeabilisierte Zellen bauen offenbar bereits nach 60-90 min deutlich weniger ein als frisch permeabilisierte bzw. als weniger stark permeabilisierte nach dieser Zeit.

Dies konnte durch SW-40-Sucrosegradienten bestätigt werden (Abb. 7):

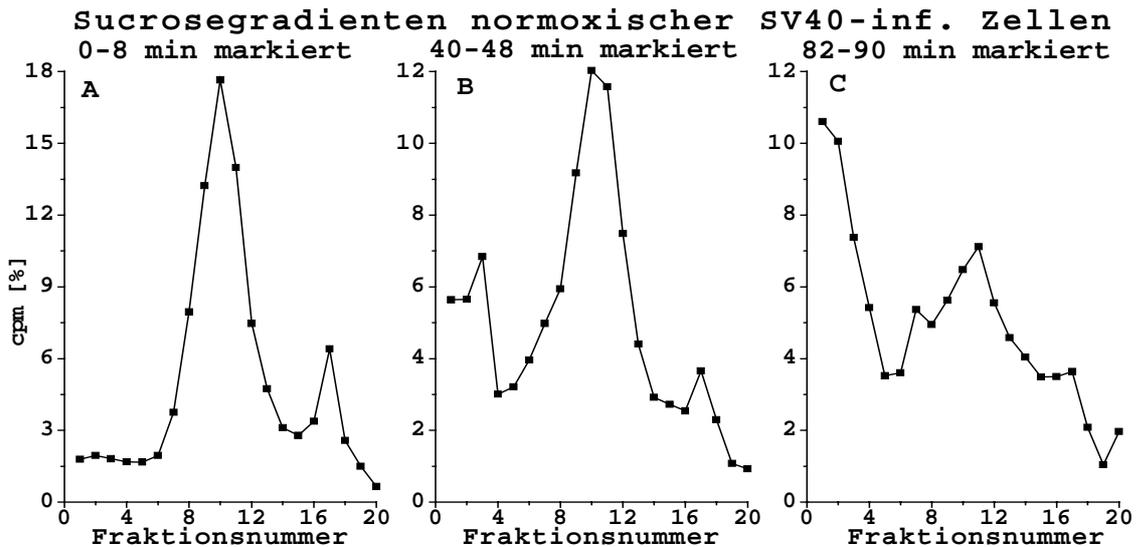


Abb. 7: [α - 32 P]-dATP-Pulsmarkierungen zu verschiedenen Zeiten nach Permeabilisierung, DNA aufgetrennt auf SW40-Sucrosegradienten

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3stündiger normoxischer Vormarkierung mit [3 H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 mit 150 hU α -Toxin/ml permeabilisiert und normoxisch weiterbegast. 0, 40 und 82 min nach Permeabilisierung wurde nach 3.2.3.2 durch [α - 32 P]-dATP für 8 min pulsmarkiert
 Zusammensetzung des Mediums: Standard, α -Toxin: 150 hU/ml
 3 H-Markierung: 3 h normoxische Dauermarkierung *in vivo*
 32 P-Markierung: 8 min Pulsmarkierung in permeabilisierten Zellen
 eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 11.2 Bq [3 H]-Thd/ μ l DMEM, 407 Bq [α - 32 P]-dATP/ μ l, Σ CPM: 0-8 min: 10423.7 cpm, 40-48 min: 3058.6 cpm, 82-90 min: 1542.6 cpm

Je länger Markierungszeit und Permeabilisierungsbeginn auseinanderlagen, desto höher war der Anteil kürzerer DNA-Stücke an der Gesamtmarkierung, erkennbar daran, daß in niedrigeren Fraktionsnummern ein immer höherer prozentualer Anteil der säurefällbaren Radioaktivität gefunden wird. Der Anteil der fertig replizierten SV40-DNA sank gleichzeitig. Möglicherweise wurden entweder kurze DNA-Stücke mit zunehmender Permeabilisierungszeit in immer geringerem Maße verlängert oder ein Teil der markierten längeren DNA wurde wieder abgebaut.

2-Dimensionale Gelelektrophorese:

Durch Zugabe von 500-1000 hU α -Toxin/ml Permeabilisierungsmedium im Endansatz wurden CV1-Zellen permeabilisiert und die DNA nach 3.2.3.2 mittels [α - 32 P]-dATP radioaktiv markiert. Diese DNA konnte in zweidimensionalen Gelen so aufgetrennt werden, daß alle Replikationsintermediate nachweisbar waren (s. Abb. 30 E + F, 4.2.3.3).

4.2.2.2 Replikation bei verschiedenen Zelldichten

Die Aussaat von 4 – 6 x 10⁵ CV1-Zellen je 35-mm-Kunststoffkulturschale, führte nach Permeabilisierung und radioaktiver Markierung mit [α - 32 P]-dATP zu einer ähnlichen Markierungsdichte je Zelle. Wurden die CV1-Zellen wesentlich dünner ausgesät, war der Einbau je Zelle jedoch signifikant geringer (Abb. 8).

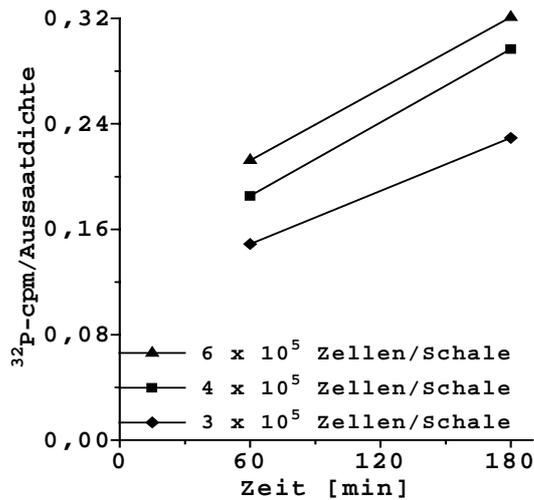


Abb. 8: Einfluß der Zelldichte

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd (3.2.3.6), nach 3.2.12.2 permeabilisiert und normoxisch für 60 bzw. 180 min nach 3.2.3.2 mit [α -³²P]-dATP dauermarkiert. Vorbehandlung der Zellen: normoxisch
Zusammensetzung Medium: Standard
 α -Toxin: frisch dialysiert, 260 hU/ml
³H-Markierung: 2h Dauermarkierung *in vivo*
³²P-Markierung: 60+180 min Dauermarkierung
eingesetzte Endkonz. im Markierungsansatz: 22.2 Bq [³H]-Thd/ μ l, 879 Bq/ μ l [α -³²P]-dATP

Für alle hier dargelegten Versuchsreihen wurden aufgrund dieser Ergebnisse zwischen 0.4 und 0.5 Mio Zellen je 35-mm- bzw. 4.5-6 Mio Zellen je 145-mm-Kulturschale (0.23-0.33 Mio Zellen/ml DMEM) ausgesät.

4.2.2.3 DTT-Zusatz

DTT ist ein Reduktionsmittel, das eingesetzt wird, um Thiolreste von Proteinen vor Oxidation zu schützen. Höhere Konzentrationen von DTT sind in der Lage, Disulfidbrücken in Proteinen zu reduzieren. Die einschlägig diskutierte Verwendung von DTT in *in-vitro*-Systemen wurde deshalb auf ihre Notwendigkeit hin untersucht. Dazu wurde die DTT-Konzentration im Permeabilisierungsmedium kontinuierlich erhöht. Zwischen 0 und 2.5 mM DTT erhöhte sich der Einbau ohne DTT bereits nach 40 min Dauermarkierung gegenüber dem Ansatz mit DTT. Dieser Unterschied verstärkt sich mit zunehmender Permeabilisierungsdauer (240 min) auf 400% (Abb. 9).

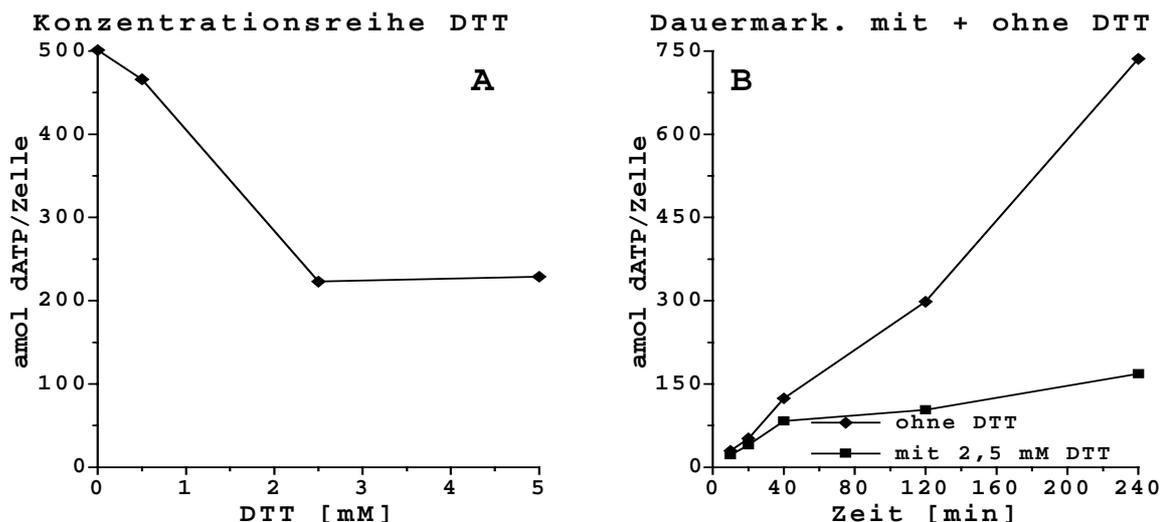


Abb.9: Einfluß von DTT unter normoxischen Bedingungen zu diversen Markierungszeiten

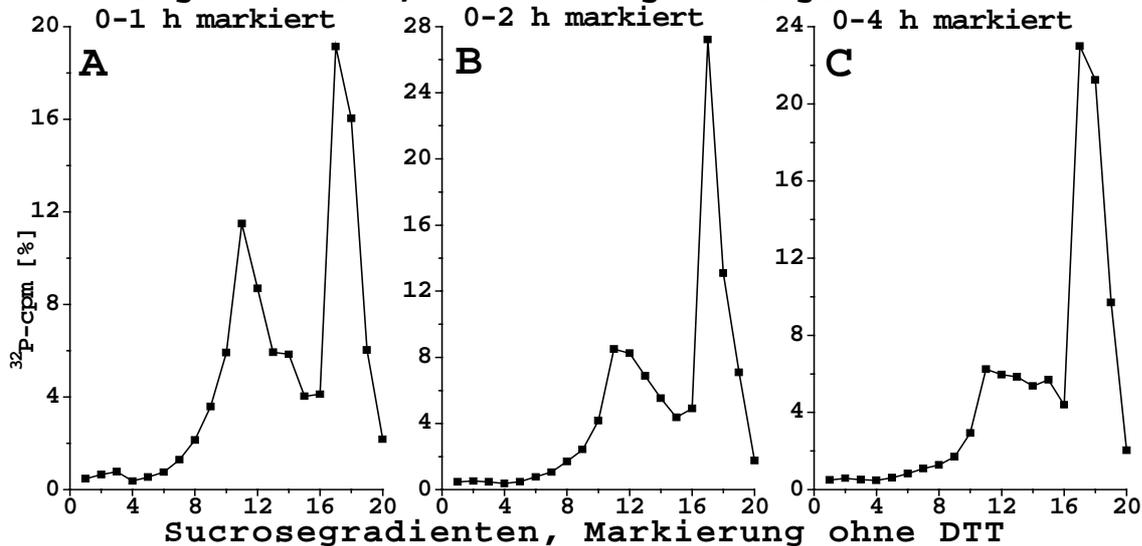
SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2.5stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd permeabilisiert und gleichzeitig nach 3.2.3.2 für 10-240 min mit [α -³²P]-dATP normoxisch dauermarkiert. Vorbehandlung der Zellen: normoxische Begasung Zusammensetzung des Mediums: Standard + DTT, α -Toxin: je 390 hU/ml, DTT-Konzentrationsreihe 10 khU/ml
³H-Markierung: 1.5 bzw. 2.5h Dauermarkierung, ³²P-Markierung: 10-240 min Dauermarkierung

eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 23.2 Bq [^3H]-Thd/ μl (a, 1.5 h), 37 Bq [^3H]-Thd/ μl (b, 2.5h), 140 Bq [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]-dATP/ μl (a), 617 Bq [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]-dATP / μl (b)

Ohne DTT unterstützte das Permeabilisierungsmedium die Replikation länger als mit 2.5 mM DTT, die DNA-Synthese war viel stärker als mit DTT. Geringe DTT-Konzentrationen beeinflussten die Replikation bei einer α -Toxinkonzentration von 6000 hU/Mio CV1-Zellen (10.000 hU/ml Permeabilisierungsmedium) nicht. Durch Zugabe von 2,5 bzw. 5 mM DTT sank die Replikation jeweils um mehr als 50%.

In linearen alkalischen Sucrosegradienten aufgetrennt, zeigte normoxisch markierte SV40-DNA aus permeabilisierten CV1-Zellen mit DTT ein deutlicheres Nachlassen der Replikation nach der zweiten Stunde als ohne DTT. Ohne DTT traten Replikationsintermediate entsprechender Molekülgrößen (Fraktion 10) nach 4h Dauermarkierung in permeabilisierten Zellen gegenüber der gereiften SV40-DNA (Fraktion 18) in den Hintergrund (Abb. 10).

Sucrosegradienten, Markierung in Gegenwart von DTT



Sucrosegradienten, Markierung ohne DTT

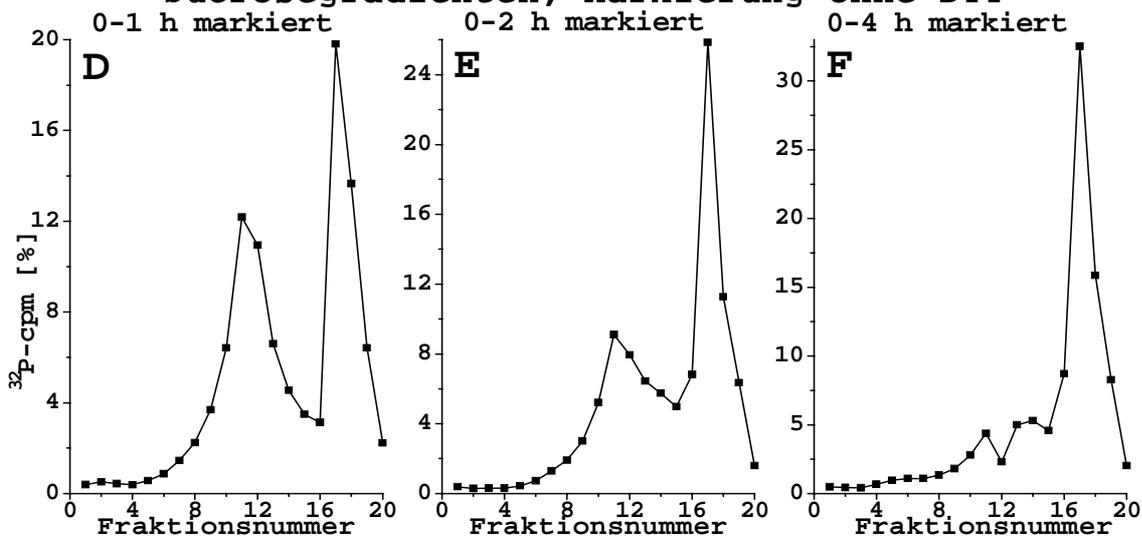


Abb.10: Einfluß von DTT bei Dauermarkierungen verschiedener Dauer: Vergleich der DNA im alkalischen, linearen Sucrosegradienten

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach einstündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl- ^3H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig nach 3.2.3.2 für 60-240 min nor-

moxisch mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ dauermarkiert. Vorbehandlung der Zellen: Normoxische Vorbegasung, nach Permeabilisierung normoxische Begasung ohne CO_2 .

Zusammensetzung des Mediums: Standard, bei A - C incl. 2.5 mM DTT (frisch gelöst)

$\alpha\text{-Toxin}$: je 390 hU/ml, ^3H -Markierung: [Methyl- ^3H]-Thd-Dauermarkierung normoxisch 1 h *in vivo*

^{32}P -Markierung: $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -Dauermarkierung 1-4 h

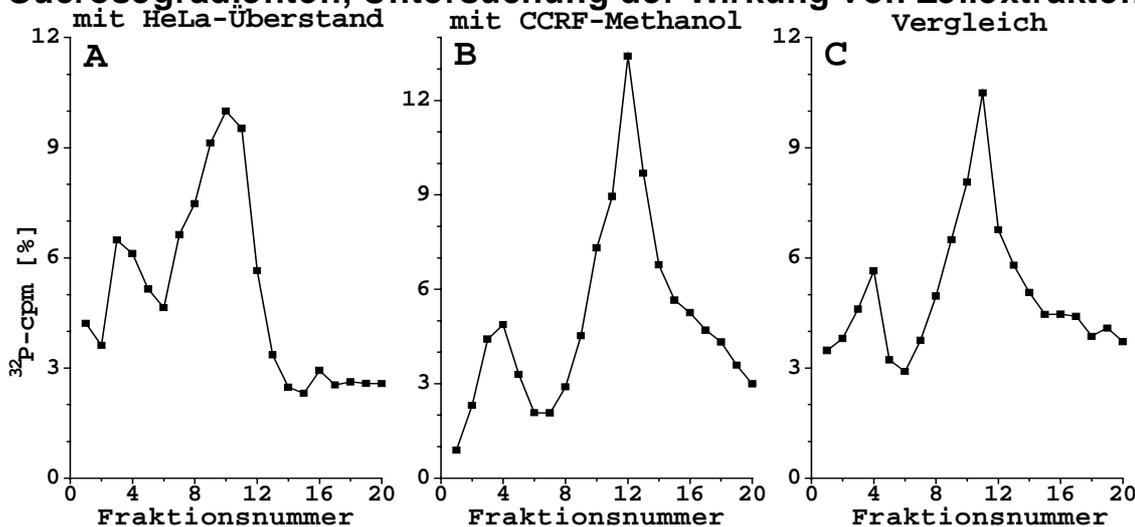
eingesetzte Endkonz. im Markierungsansatz: 57.8 Bq ^3H -Thd/ μl DMEM, 2718 Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}/\mu\text{l}$

Σ CPM: A: 36185, B: 42682, C: 43755, D: 82403, E: 165171, F: 202021

4.2.2.4 Zusatz von Zellextrakten und 100000-g-Überständen

Zelluläre Extrakte haben in *in-vitro*-Replikationssystemen oft große replikationssteigernde oder -vermindernde Wirkungen. Einige *in-vitro*-Systeme replizieren ohne Zusatz zellulärer Komponenten nicht (Uhlmann 1995). Darum wurde untersucht, ob methanolische CCRF-Zellextrakte oder HeLa-100000-g-Überstände replikationssteigernde bzw. -verlängernde Wirkung bei permeabilisierten CV1-Zellen ausüben (Abb. 11).

Sucrosegradienten, Untersuchung der Wirkung von Zellextrakten



Test von Zellextrakten

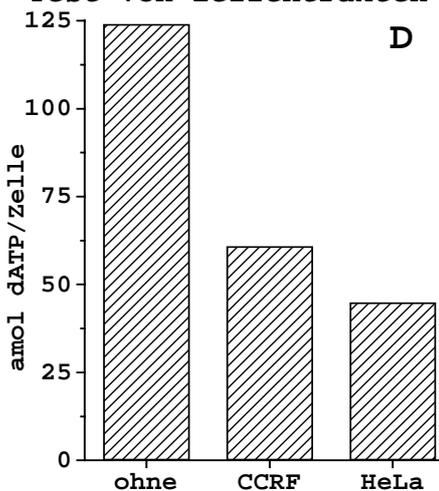


Abb. 11: Wirkung von Zellextrakten auf die DNA-Synthese in permeabilisierten Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2.5stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl- ^3H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig in 15 min mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ pulsmarkiert. Vorbehandlung der Zellen: nach Permeabilisierung normoxische Begasung ohne CO_2 . Zusammensetzung Medium: Standard, mit CCRF-Methanol-Extrakt bzw. HeLa-100000-g-Überstand

$\alpha\text{-Toxin}$: 400 hU/ml, ^3H -Markierung: 2.5h Dauermarkierung *in vivo*, ^{32}P -Markierung: 15-min-Puls, eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz: 37 Bq $[\text{H}^3]\text{-Thd}/\mu\text{l}$ DMEM, 2755 Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}/\mu\text{l}$, Σ CPM: HeLa-100000g: 3084.6, CCRF-Methanol-Extrakt: 3265, Vergleich: 2415.8

Gezeigt: A - C: Sucrosegradienten, D: Einbaumessungen. Je Mio CV1-Zellen wurden CCRF-Methanol-Extrakte aus $1,5 \times 10^7$ CCRF- und HeLa-100000-g-Überstände aus 4×10^6 HeLa-Zellen eingesetzt.

Der Einbau in die DNA permeabilisierter CV1-Zellen erhöhte sich weder durch Zugabe von CCRF-Methanolextrakten noch von HeLa-100000-g-Überständen zum Permeabilisierungsmedium. Die Replikation wurde im Gegenteil sogar durch Zugabe des CCRF-

Methanol-Extrakt um 50% und durch Zugabe des HeLa-100000-g-Überstandes um 60% reduziert (Abb. 11 D).

Die Auftrennung der DNA auf alkalischen Sucrosegradienten zeigte geringe Veränderungen der Elongationsgeschwindigkeit nach Zugabe der o. g. Zusätze. Die Fraktionen, in denen die aufgetrennten Maxima der eingebauten Radioaktivität gesammelt wurden, verschoben sich durch Zugabe von HeLa-100000-g-Überständen um eine Fraktion hin zu geringeren, bei CCRF-Methanol-Extrakten um eine Fraktion hin zu größeren DNA-Längen. Da die Zugabe zellulärer Inhaltsstoffe zum Inkubationsmedium keine replikationssteigernde Wirkung zeigte, wurde auf diese Zugabe verzichtet.

4.2.2.5 Weitere Medienbestandteile bzw. -zusätze

Mit dem Ziel, die Replikation permeabilisierter Zellen in Einbaurate bzw. sogar Dauer weiter zu optimieren und verschiedene Untersuchungen einzuleiten, wurden mehrere Substanzen getestet. Standen die zum Erreichen eines deutlichen Effekts notwendigen Konzentrationen (z.B. bei cAMP) in krassem Mißverhältnis zur normalen, in der intakten Zelle vorkommenden Konzentration, wurden diese Substanzen lediglich vorübergehend und nur für die Dauer der jeweiligen Untersuchung zugesetzt.

Folgende Substanzen zeigten einen nennenswerten Einfluß auf die Replikation permeabilisierter CV1-Zellen. Im folgenden werden die Ergebnisse diskutiert (Tab 2).

Tabelle 2: Mit dem Ziel der Erhöhung des Einbaus zum Permeabilisierungsmedium zugesetzte Substanzen

getestete Substanz	norm. Konz. im Inkubationsmedium	Stärkster positiver Effekt bei	Bandbreite der erzielbaren Veränderung des Einbaus	signifikanteste Veränderung des Einbaus ggü. Normalkonzentration
dCTP	100 µM	100 µM	0-2,1 mM, 0 bis -65 %	2,1 mM, -65 %
rGTP	100 µM	2 mM	0-2 mM, +40 bis +65 %	2 mM, +65 %
cAMP	0 µM	2 mM	0-10 mM, -55 bis +88 %	2 mM, +88 %
dUrd	0 µM	100 µM	0-100 µM, +33 bis +41 %	100 µM, +41 %
dUMP	0 µM	100 µM	0-100 µM, 0 bis +22 %	5 µM, +18 %
Cholin	0 µM	200 µM	0-200 µM, 0 bis -49 %	200 µM, -49 %
Ethanolamin	0 µM	200 µM	0-200 µM, 0 bis -46 %	200 µM, -46 %
BSA	0 %	0 %	0-1 % (w/v), 0 bis -60 %	1 % (w/v), -60 bis -2 %
CaCl ₂	1 mM	1 mM	0-2 mM, -18 bis +5 %	2 mM, +5 %
EGTA	0.4 mM	0.4 mM	0-0,8 mM, -6 bis 0 %	0.8 mM, +1 %
NTA	4 mM	4 mM	0-8 mM, -9 bis 0 %	8 mM, +19 %
PIPES	16 mM	16 mM	0-32 mM, -27 bis 0 %	8 mM, -10 %

Desoxyribo-CTP (dCTP) ist eine direkte DNA-Vorstufe. Die Zugabe von Cytosin zum Medium von hypoxischer HeLa-, Ehrlich-Aszites- und CCRF-Zellen hebt die O₂-abhängige Hemmung der Replikation auf (Probst 1999, Brischwein 1997, Probst 1989). Eine

Beeinflussung der Replikation SV40-infizierter CV1-Zellen durch dCTP-Zugabe zum Permeabilisierungsmedium wäre zwar denkbar, beeinflusste in normoxischen permeabilisierten Zellen die Replikation jedoch nicht (Abb. 12).

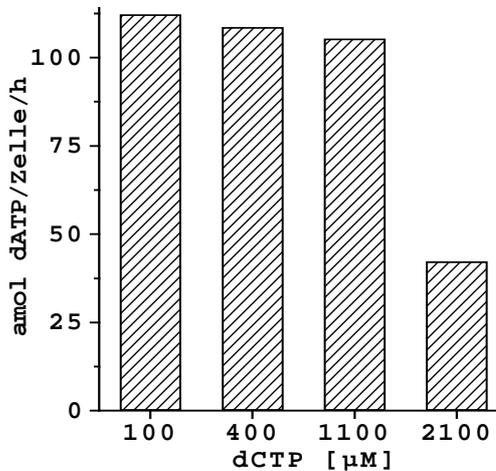


Abb. 12: Einfluß von dCTP auf permeabilisierte Zellen
 SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1.5stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd 2.5h hypoxisch begast, hypoxisch permeabilisiert und weitere 3h hypoxisch weiterbegast. Die Hypoxie war dabei noch nicht voll ausgeprägt. Die DNA wurde mit [α -³²P]-dATP 10 min pulsmarkiert. Vorbehandlung d. Zellen: Hypoxie *in vivo* + perm., α -Toxin: 2600 hU/ml
³H-Markierung: 1.5 h Dauermarkierung *in vivo*
³²P-Markierung: 10-min-Puls permeabilisiert
 einges. Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 123 Bq [³H]-Thd/ μ l DMEM, 1106 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Ribo-GTP (rGTP) ist eine RNA-Vorstufe und wird in jeder Zelle bei der Primersynthese verwendet. Darüber hinaus kann rGDP in dGDP umgewandelt werden. Außerdem ist rGTP an vielen Stoffwechselfvorgängen und Signalwegen beteiligt. Inwiefern eine weitere Steigerung der rGTP-Konzentration über den Standard von 100 μ M hinaus eine weitere Steigerung der Replikation permeabilisierter Zellen zur Folge hat, wurde unter normoxischen Bedingungen geprüft (Abb. 13):

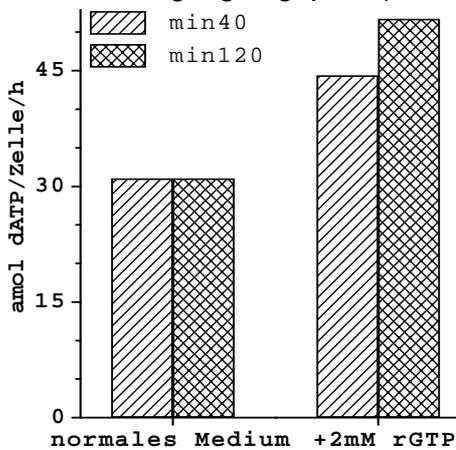


Abb. 13: Einfluß von rGTP auf permeabilisierte Zellen
 SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig nach 3.2.3.2 für 40 bzw. 120 min mit [α -³²P]-dATP dauermarkiert. Zusammensetzung des Mediums: Standard bzw. Standard mit 2 mM rGTP+2 mM MgCl₂
 α -Toxin: frisch dialysiert, 95 hU/ml
³H-Markierung: 1 h Dauermarkierung *in vivo*
³²P-Markierung: 40- und 120-min-Dauermarkierung
 eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 1205 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Die Steigerung des Einbaus nach Erhöhung der rGTP-Konzentration warf die Frage auf, ob das Nachlassen der Replikation nach längerer Permeabilisierung auf mangelnde rGTP-Versorgung der Zelle zurückzuführen ist. Ein Einfluß von rGTP auf die porenbildende Wirkung von α -Toxin bzw. auf den Abbau der Poren in der Membran und einer aus diesem Grund verlängerten Einschleusung der im Permeabilisierungsmedium vorgehaltenen Stoffe wäre denkbar. Ziel der Permeabilisierung von Zellen war die Untersuchung der Replikation unter Bedingungen, die denen in nichtpermeabilisierten Zellen möglichst ähnlich sind. Trotz der erheblichen Steigerung der Replikation wurde die rGTP-Konzentration deshalb bei 100 μ M belassen, zumal bei einer Steigerung der rGTP-Konzentration auch weitere Komponenten (MgCl₂, PIPES, EGTA, NTA) hätten angepaßt werden müssen. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, daß außer ATP alle weiteren Ribo- und Desoxyribonukleosidtriphosphate in gleicher Konzentration vorhanden sind.

Versuche mit erhöhter dNTP- und rNTP-Konzentration führten zu verminderter Replikation (Eger, 1995).

Cyclo-AMP (cAMP) kommt in allen Eukaryonten vor und ist ein bedeutender second messenger. In der Zelle entsteht es in einem Schritt aus ATP und ist in Abwesenheit von Phosphodiesterase sehr stabil. Hohe cAMP-Spiegel stimulieren den aktiven Austransport von Ionen (z.B. Na^+) und kontrollieren das Zellwachstum.

Es wurde untersucht, ob cAMP die Replikation permeabilisierter Zellen steigert. Die MgCl_2 -Konzentration wurde in gleichen Verhältnissen erhöht (Abb. 14).

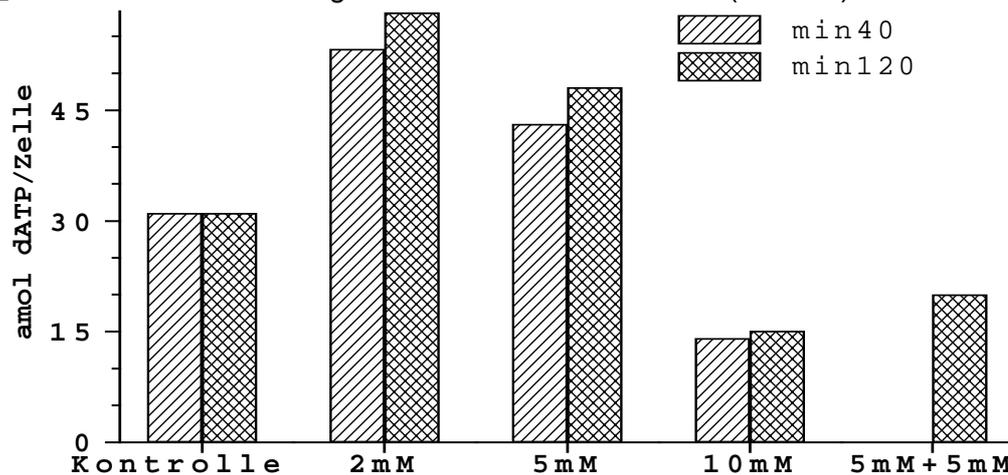


Abb. 14: Einfluß von cAMP auf permeabilisierte Zellen in 40- und 120-min-Dauermarkierungen
 SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl- ^3H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig nach 3.2.3.2 mit [α - ^{32}P]-dATP 40- bzw. 120 min normoxisch pulsmarkiert. Vorbehandlung der Zellen: normoxische Begasung
 Zusammensetzung des Mediums: Standard + 0-10 mM cAMP (bei 8.5-18.5 mM MgCl_2 Endkonz.)
 α -Toxin: frisch dialysiert, 95 hU/ml
 ^3H -Markierung: 1 h DMK in vivo, ^{32}P -Markierung: 40- und 120-min-Dauermark. permeabilisiert
 eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz: 1205 Bq [α - ^{32}P]-dATP/ μl

Man erkennt in der Abbildung, daß cAMP den radioaktiven Einbau in permeabilisierte CV1-Zellen um bis zu 88% gegenüber der Kontrolle steigerte. Dieses Maximum stellte sich bei einer Endkonzentration im Markierungsansatz von 2 mM ein. Bei weiterer Erhöhung der cAMP-Konzentration wurde die Replikation wieder schwächer und sank bei 10 mM gegenüber der Kontrolle um 45%. Die Ursache der Replikationssteigerung bei permeabilisierten Zellen wurde nicht näher untersucht. Ein Einfluß von cAMP auf die porenbildende Wirkung von α -Toxin bzw. auf den Abbau der Poren in der Membran und einer deshalb verlängerten Einschleusung der im Permeabilisierungsmedium vorgehaltenen Stoffe kann nicht ausgeschlossen werden.

Auf eine dauernde Zugabe von cAMP ins Medium permeabilisierter Zellen wurde nach ähnlichen Überlegungen wie für rGTP verzichtet, der Einbau, der mit dem hier beschriebenen Permeabilisierungsmedium erzielt wurde, genügt für die Untersuchung der Replikation in normoxischen und hypoxischen Zellen.

Desoxy-Urd (dUrd) stand aufgrund von *in-vivo*-Studien im Verdacht, Wirkungen, die hypoxische Begasung auf verschiedene Zellen ausübt, aufzuheben. Inwieweit die Zugabe von dUrd die Replikation permeabilisierter Zellen beeinflusst, auch im Hinblick etwaiger Anwendungen bei permeabilisierten hypoxischen Zellen, wurde durch Zugabe von dUrd

zum Permeabilisierungsmedium untersucht. Da dUrd Mg^{2+} kaum komplexiert, wurde auf äquimolare Zugabe von $MgCl_2$ verzichtet (Abb. 15).

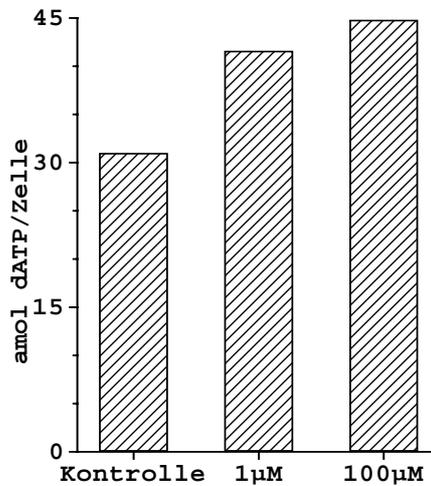


Abb. 15: Einfluß von dUrd auf permeabilisierte Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl- 3H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig mit [α - ^{32}P]-dATP nach 3.2.3.2 für 120 min dauermarkiert. Vorbehandlung der Zellen: normoxische Begasung
Zusammensetzung Medium: Standard + dUrd
 α -Toxin: frisch dialysiert, 95 hU/ml
 3H -Markierung: 1h Dauermarkierung in vivo
 ^{32}P -Markierung: 120-min-Dauermarkierung permeabilisiert
eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz: 1205 Bq [α - ^{32}P]-dATP/ μ l Permeabilisierungsmedium

Die Zugabe von dUrd zum Medium permeabilisierter CV1-Zellen steigerte den radioaktiven Einbau um bis zu 41%. Diese Steigerung des Einbaus in normoxischen Verhältnissen wurde bislang nicht näher untersucht. Ein Einfluß von dUrd auf die porenbildende Wirkung von α -Toxin bzw. auf den Abbau der Poren in der Membran einhergehend mit verlängerter Einschleusung der im Medium vorgehaltenen Stoffe wird nicht ausgeschlossen. Die Verringerung des DNA-Abbaus in permeabilisierten Zellen erscheint möglich. Der Einfluß auf hypoxische Zellen wurde gesondert untersucht. Auf eine permanente Zugabe von dUrd ins Standardmedium wurde verzichtet.

Die Replikation permeabilisierter Zellen läßt im Verlauf mehrerer Stunden immer stärker nach. Als ein möglicher Erklärungsansatz hierfür wird das Entweichen eines bei der Replikation benötigten Stoffes aus der Zelle diskutiert. Aufgrund von FPLC-Messungen bei replizierenden CCRF-Zellen (Probst 1997) steht **dUMP** im Verdacht, bei Unterschreiten einer bestimmten Konzentration die Replikation zu hemmen. Deshalb wurde die Wirkung einer Zugabe von dUMP zum Permeabilisierungsmedium auf die Replikation untersucht (Abb. 16).

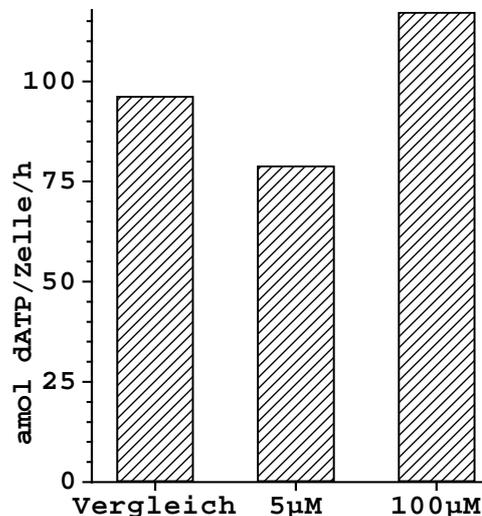


Abb. 16: Einfluß von dUMP auf permeabilisierte Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl- 3H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig mit [α - ^{32}P]-dATP in 180 min normoxisch dauermarkiert. Vorbehandlung d. Zellen: normoxische Begasung
Zusammensetzung des Mediums: Standard
 α -Toxin: frisch dialysiert, 260 hU/ml
 3H -Markierung: 2 h Dauermarkierung in vivo
 ^{32}P -Markierung: 180-min-Dauermarkierung
eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz: 22.2 Bq [3H]-Thd/ μ l DMEM, 879 Bq [α - ^{32}P]-dATP/ μ l

Der Steigerung der Replikation von 15-20% bei 100 μM dUMP steht eine Reduzierung der Replikation bei höheren Konzentrationen ($<500 \mu\text{M}$) gegenüber. Ein Einfluß von dUMP auf die porenbildende Wirkung von α -Toxin bzw. auf den Abbau der Poren in der Membran ist bei 100 μM dUMP unwahrscheinlich und bislang nicht untersucht worden. Da die Replikation längere Zeit nach Permeabilisierung durch dUMP nicht so unterstützt werden konnte, daß eine signifikante Steigerung erzielbar war, wurde dUMP dem Standard-Permeabilisierungsmedium nicht zugefügt.

Cholin und **Ethanolamin** sind Alkohole, die als Bausteine von Phosphoglyceriden Membraneigenschaften verändern. Daneben ist Cholin ein Baustein des Neurotransmitters Acetylcholin. Die Nukleotidfraktion von Mausfibroblasten-Zellkulturen enthält dCDP-Ethanolamin und dCDP-Cholin wie auch die entsprechenden Riboliponukleotide, ein Pool, der vorzugsweise vom Desoxycytidin her aufgefüllt wird (Spyrou 1987). Obwohl es wahrscheinlich erscheint, daß Desoxyliponukleotide und DNA aus verschiedenen dCTP-Pools gespeist werden (Nicander 1983), könnten sowohl Cholin als auch Ethanolamin die Replikation normoxischer und insbesondere hypoxischer permeabilisierter Zellen beeinflussen. Deshalb wurden beide Stoffe in einer Endkonzentration von je 200 μM zum Permeabilisierungsmedium gegeben (Abb. 17).

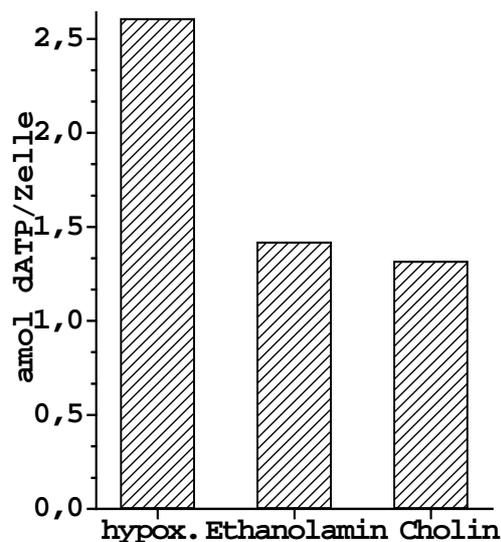


Abb. 17: Einfluß von Cholin und Ethanolamin in hypoxischen, permeabilisierten Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 25minütiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl- ^3H]-Thd (3.2.3.1) 7h hypoxisch begast, danach nach 3.2.12.2 hypoxisch permeabilisiert und nach 3.2.3.2 mit [α - ^{32}P]-dATP 60 min dauermarkiert. Vorbehandlung der Zellen: hypoxisch begast, hypoxisch permeabilisiert
Zusammensetzung des Mediums: Standard + 200 μM Cholin oder 200 μM Ethanolamin
 α -Toxin: frisch dialysiert, 58,3 hU/ml
 ^3H -Markierung: 25-min-Dauermarkierung *in vivo*
 ^{32}P -Markierung: 60-min-Dauermarkierung
eingesetzte Endkonz. im Markierungsansatz: 1.5 Bq [^3H]-Thd/ μl DMEM, 491 Bq [α - ^{32}P]-dATP/ μl

Die Verringerung des ohnehin bereits sehr geringen Einbaus unter hypoxischen Bedingungen spricht möglicherweise dafür, daß Cholin und Ethanolamin CTP in den permeabilisierten CV1-Zellen binden, was deren Replikation zusätzlich hemmt. Weitere Experimente müßten diese hochspekulative Annahme jedoch unterstützen. Auch die negative Beeinflussung der Replikation durch unphysiologische Konzentrationen an Cholin und Ethanolamin ist möglich.

„**Bovine Serum Albumine**“ (BSA) wurde früher verwendet, um verdünnte α -Toxin-Lösungen während der Lagerung bei -80°C zu stabilisieren und die schonende Mischung mit den aliquotierten und teilweise getrennt gelagerten Bestandteilen des Inkubationsmediums zu erleichtern. Wenn BSA die Replikation permeabilisierter Zellen nicht beeinflussen würde, ließe sich BSA- α -Toxin-Lösung direkt mit den anderen Permeabili-

sierungssubstanzen mischen und einsetzen. Da die BSA-Zugabe zum Inkubationsmedium den Einbau um bis zu 60% reduzierte, wurde BSA normalerweise nicht zugesetzt.

CaCl₂ wurde bereits in vielen *in-vitro*-Replikationssystemen zur Unterstützung der Replikation eingesetzt (Uhlmann 1995). In der intakten Zelle ist Ca²⁺ in Konzentrationen um 0.1 µM vorhanden. Es bindet an Proteine und dient als Second Messenger. Für kein permeabilisierendes, replikationsunterstützendes Medium wurde bislang eine nötige, minimale Ca²⁺-Konzentration nachgewiesen. Dies kann zum einen daran liegen, daß intrazelluläre Speicher trotz eventuellen Ca²⁺-Ausstroms die Ca²⁺-Konzentration auf einem Niveau halten, das die Replikation ermöglicht. Außerdem wurde bei hohen α-Toxinkonzentrationen ein Ca²⁺-Einstrom in die Zelle nachgewiesen (Jonas 1994), ein Ausstrom durch α-Toxinporen bislang nicht. Derzeit wird eine Anionenselektivität beim Einstrom in die Zelle durch α-Toxinporen diskutiert. Bei hohen Ca²⁺-Konzentrationen wurde vereinzelt eine starke Fragmentierung der DNA permeabilisierter Zellen festgestellt, möglicherweise verursacht durch die Aktivierung endogener Endonucleasen (Hameed 1989, Kaminskas 1989, Jonas 1994). Die bereits bei Eger, 1995 beschriebene Ca²⁺-Konzentration von 1 mM wurde nach weiteren Untersuchungen beibehalten.

EGTA (Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat) bindet Ca²⁺ spezifisch und mit hoher Affinität und puffert weitere zweiwertige Ionen mit geringerer Affinität. Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen werden so in ausreichender Konzentration zur Verfügung gestellt, um Komplexe mit Triphosphaten und Desoxytriphosphaten zu bilden und mit Replikationsenzymen zu reagieren. Möglicherweise kann durch EGTA auch die durch Ca²⁺- bzw. Mg²⁺-katalysierte Fragmentierung der DNA durch Endonucleasen (Hameed 1989, Kaminskas 1989 und Jonas 1994) weitgehend unterdrückt werden. Eine EGTA-Konzentration von 0.4 mM wies von allen getesteten Konzentrationen die beste einbau-erhöhende Wirkung auf und wurde im Standardmedium verwendet.

NTA (Nitriloessigsäure) puffert sowohl ein- als auch zweiwertige Ionen und wird bei vielen *in-vitro*-Replikationssystemen beschrieben. Es bestätigte sich, daß die NTA-Konzentration von 4 mM bei permeabilisierten SV40-infizierten CV1-Zellen replikationsunterstützend wirkte. 4 mM NTA verursachte keine zuweilen beobachtete DNA-Fragmentierung.

PIPES (Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)) ist bei pH 7.2 im Permeabilisierungsmedium die wichtigste pH-puffernde Substanz, Kalium-Glutamat (pK_a 2.10, 4.07 und 9.47) puffert – obwohl im Permeabilisierungsmedium wesentlich höher konzentriert – nur gering bei pH 7.2. Eine PIPES-Konzentration von 16 mM wurde im optimierten Permeabilisierungsmedium verwendet und nicht weiter reduziert, dies insbesondere mit Hinblick auf den Anwendungsbereich der Hypoxie, wo Änderungen des Gasgemisches nötig wurden und permeabilisierte Zellen auf höhere Kapazitäten des Puffers angewiesen waren. Darüber hinaus war der Einbau bei 16 mM PIPES deutlich höher als bei geringeren Konzentrationen.

Es wurde darauf geachtet, die Konzentrationen der eingesetzten Substanzen möglichst nahe an den Verhältnissen der intakten Zelle zu belassen, da unphysiologisch hohe Konzentrationen von Substanzen (2-5 mM cAMP oder rGTP) die Übertragbarkeit auf die

Replikation der nichtpermeabilisierten Zelle verringern, deren Erforschung das Ziel war. Auf die Verhinderung der vielen Arbeiten beschriebenen, durch Mg^{2+} und Ca^{2+} katalysierte und durch EDTA verhinderbare Fragmentierung der DNA permeabilisierter Zellen durch endogene Endonucleasen (Hameed 1989, Kaminskas 1989, Jonas 1994) wurde bei der Festlegung der Standardkonzentrationen geachtet. Nach Optimierung des Permeabilisierungsmediums wurden in den ersten 60-90 min nach Permeabilisierung keine stärkeren Fragmentierungen der DNA beobachtet. Veränderte Konzentrationen der oben beschriebenen Substanzen bewirkten häufig eine Verringerung des Einbaus bei längerer Dauermarkierungszeit (oft schon 30 min nach Permeabilisierung), was auf DNA-Fragmentierung hindeuten könnte.

Die Standardkonzentration jeder Substanz wurde entsprechend 3.2.12.5 festgelegt. Im Vergleich zum zuvor beschriebenen Permeabilisierungsmedium wurden die Konzentrationen von $CaCl_2$, EGTA, NTA und PIPES verändert. Trotz teilweise erheblicher Steigerung der Replikation wurde auf die Veränderung der Konzentrationen aller weiteren oben beschriebenen Substanzen im Vergleich zu Eger, 1995 verzichtet. Einerseits erhöht sich die Vergleichbarkeit mit früheren Ergebnissen, andererseits kommen so die Replikationsbedingungen denen *in vivo* möglichst nahe.

4.2.2.6 Variationen der Standardinkubationsbedingungen

Regelmäßiger Austausch des Permeabilisierungsmediums

Thelestam und Möllby (1983) wiesen nach, daß sich Zellkulturen von α -Toxingaben wieder erholen können, indem sie die Integrität ihrer Doppelmembran wiederherstellen. Um herauszufinden, ob und inwiefern SV40-infizierte CV1-Zellen dazu in der Lage sind und ob sich ggf. Bestandteile des Permeabilisierungsmediums während längerer Inkubationen erschöpfen, wurde das Permeabilisierungsmedium im Verlauf längerer Dauermarkierungen gegen frisches ausgetauscht (Abb. 18).

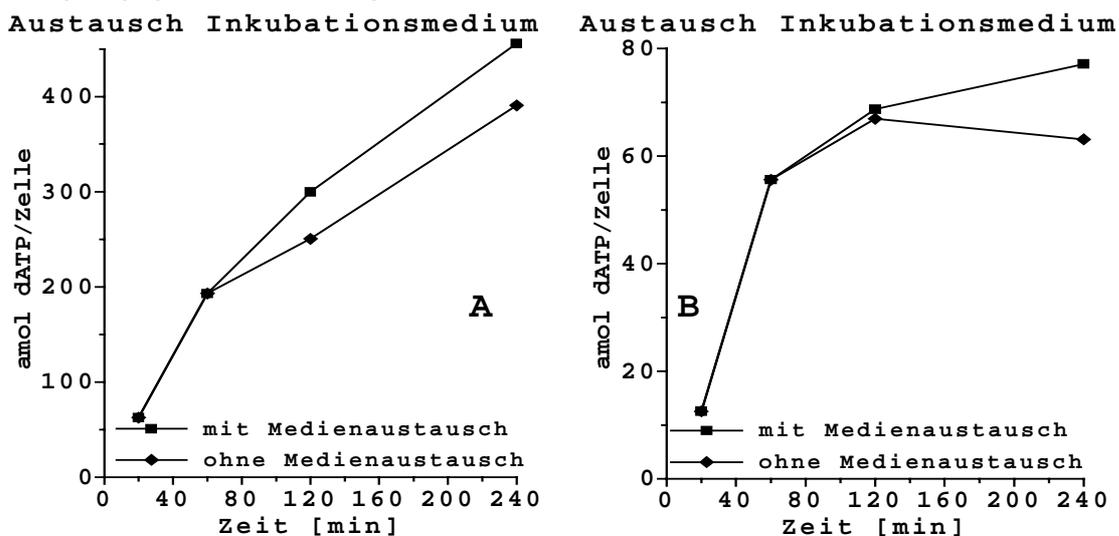


Abb. 18: Medienersatz im Verlauf von radioaktiven Dauermarkierungen mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$
 SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2.5stündiger normoxischer Vorinkubation mit $[\text{Methyl-}^3\text{H}]\text{-Thd}$ (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ nach 3.2.3.1 20-240 min normoxisch dauermarkiert, Vorbehandlung der Zellen: normoxische Begasung, A: 270 000 Zellen/ml, B: 160 000 Zellen/ml DMEM ausgesät, je 1.5 ml je 35-mm-Kulturschale
 α -Toxin: frisch dialysiert, 264 bzw. 344 hU/ml Endkonzentration, Medienersatz alle 60 min

³H-Markierung: 2.5h Dauermarkierung *in vivo*, ³²P-Markierung: 20-240-min-Dauermarkierung
inges. Endkonz. im Markierungsansatz: [³H]-Thd: 21.1/15.4 Bq/μl, [α-³²P]-dATP: 1233/484 Bq/μl

Bei längeren Dauermarkierungen und hohen Zelldichten führte der regelmäßige Austausch des Permeabilisierungsmediums (inklusive der jeweils gleichen Menge α-Toxins) zur deutlichen Erhöhung des radioaktiven Einbaus in die DNA. In Abb. 18 A wurde die Replikation bei höherer Zelldichte (270000 Zellen/ml DMEM, 1.5 ml / 35-mm-Schale) dargestellt als in Abb. 18 B (2,5 x 10⁵ Zellen / 35-mm-Kunststoffschale). Nach 120 min bewirkte der Medienaustausch bei einer Aussaatdichte von 4 x 10⁵ Zellen / 35-mm-Kunststoffschale eine 20%ige Steigerung des Einbaus, bei geringeren Zelldichten verbesserte sich der insgesamt geringere Einbau nach 120 min nur um durchschnittlich 4% (vgl. hierzu auch 4.2.2.4). 240 min nach Permeabilisierungsbeginn lag die Erhöhung des Einbaus in beiden Ansätzen bei 20-25%. Die Veränderung der Menge des standardisierten Permeabilisierungsmediums je Kulturschale (150-500 μl / 35-mm-Kunststoffschale) wirkte sich nicht signifikant auf die Höhe des Einbaus aus (nicht abgebildet).

Da die Mehrzahl der Replikationsuntersuchungen in permeabilisierten Zellen innerhalb der ersten 60-90 min nach Beginn der Permeabilisierung durchgeführt und abgeschlossen wurde, erschien ein regelmäßiger Medienaustausch nach bestimmten Zeitintervallen nach den hier gewonnenen Erkenntnissen nicht sinnvoll.

Wiederholte Verwendung des Permeabilisierungsmediums

Bei hoher α-Toxinkonzentration läßt der radioaktive Einbau in permeabilisierte CV1-Zellen bereits nach 40-120 min deutlich nach. 200-360 min nach Permeabilisierungsbeginn geht die Menge der säurefällbaren Radioaktivität bei weiter steigenden Markierungszeiten zurück. Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen besteht darin, daß in permeabilisierten Zellen zu jeder Zeit Replikation und DNA-Abbau in einem bestimmten Verhältnis stehen und mit Nachlassen der Synthese der Abbau gegenüber dem Aufbau überwiegt und daher die säurefällbare Radioaktivität einer dauermarkierten Probe wieder nachläßt. Es war zu klären, ob dieser Rückgang auf den Verlust der Aktivität des α-Toxins im Verlauf der Inkubationszeit bei 37°C, auf mangelnde Energieversorgung der Zellen oder auf die nachlassende Fähigkeit der Zellen zur Replikation zurückzuführen ist (ggf. durch Abbau von an der Replikation beteiligter Proteinen ohne daß in ausreichendem Maß für einen Ersatz dieser Proteine durch Neusynthese gesorgt werden kann, s. 4.2.2.9).

Um diese Fragestellung zu klären, wurde untersucht, wie stark der Einbau in die DNA bei Mehrfachverwendung von radioaktivem Permeabilisierungsmedium nachließ (Abb. 19 A). Ferner wurde untersucht, ob das Medium durch Zugabe von jeweils 50% der ursprünglich eingesetzten α-Toxinmenge bei jedem Transfer „aufgefrischt“ werden konnte (Abb. 19 B) und welchen Einfluß die Verdreifachung der Konzentration aller Bestandteile des Inkubationsmediums unter den beschriebenen Transferbedingungen auf den Einbau ausübt (Abb. 19 C).

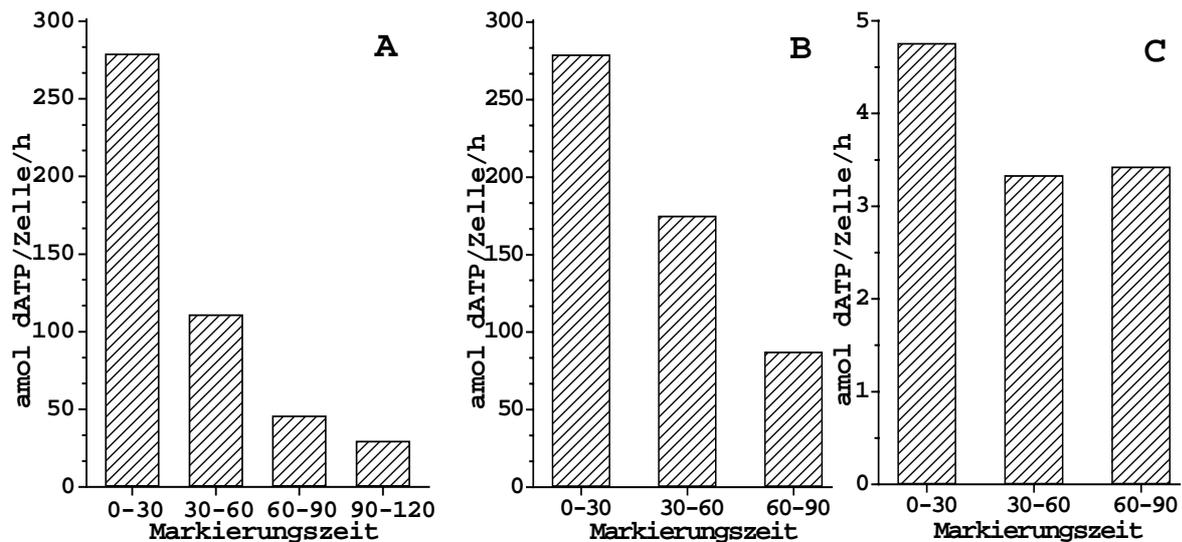


Abb. 19 A - C: Mehrfachverwendung des Mediums

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3.25-4.75-stündiger normoxischer Vorinkubation mit [Methyl-³H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und mit [α -³²P]-dATP normoxisch 30 min markiert. Zusammensetzung des Mediums: Standard + bei B: α -Toxin-Zugabe bei Medientransfer (17.500 hU/ml), c: 3.3fach konzentriert, α -Toxin: A und B: (1fach) ca. 35000, C: 10000 hU/ml ³H-Markierung: 3.25-4.75-h-Dauermarkierung *in vivo*, ³²P-Markierung: 30 min Pulsmarkierung einges. Endkonz. im Markierungsansatz: 15 Bq [³H]-Thd/ μ l, 141 / 2766 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Nach 30minütiger Markierung wurde das Permeabilisierungsmedium auf nicht permeabilisierte CV1-Zellen überführt, was noch zwei Mal wiederholt wurde (Abb. 19 A). Dieses Permeabilisierungsmedium wurde bei Übertragung nicht durch α -Toxin „aufgefrischt“. Der radioaktive Einbau war in der zweiten 30minütigen Inkubation um 65%, in der dritten und vierten um 87 bzw. 93% geringer als bei der ersten. Wurde bei jeder Übertragung die Hälfte des ursprünglich vorhandenen α -Toxins zum Permeabilisierungsmedium zugegeben, war die Markierung höher als ohne diese „Auffrischung“, ließ gegenüber der ersten 30minütigen Inkubation jedoch ebenfalls nach (37 nach der ersten und 68% nach zweiten Übertragung, Abb. 19 B). Eine Erhöhung der α -Toxin-Konzentration bereits vor der ersten Permeabilisierung um 50% veränderte den Einbau im Vergleich zum nicht aufgefrischtem Medium nicht. Die Verringerung des Einbaus bei längeren Markierungen könnte zumindest teilweise auf die Verringerung der Fähigkeit des α -Toxins zur Permeabilisierung der Membran zurückzuführen sein. Bei längerer Permeabilisierungszeit bei 37°C nimmt die Oligomerbildung bei hoher α -Toxinkonzentration zu. α -Toxinoligomere können sich weder die Membran einlagern noch diese permeabilisieren.

Wurden die Konzentrationen aller Substanzen im Permeabilisierungsmedium verdreifacht, betrug der Einbau nach 30 min nur 1,7% des Vergleiches. Danach verringerte sich dieser niedrige Einbau kaum noch (Abb. 19 C).

Minimieren des Medienvolumens

Würden einzelne, in der intakten Zelle zur Replikation in einer bestimmten Mindestkonzentration benötigte Substanzen nach Permeabilisierung mit α -Toxin durch Diffusion unter dieses Niveau verdünnt, würde dies zu einem schnellen Nachlassen der Replikation führen. Umgekehrt würde eine Verringerung des Inkubationsvolumens die am Ort der

Replikation verfügbare Konzentration dieser Substanzen erhöhen und die Replikation auf höherem Niveau halten. Um dies zu untersuchen wurde das Permeabilisierungsmedium für Inkubationen auf 35-mm-Kunststoffschalen auf 10 µl, d.h. 4% des Standardvolumens reduziert. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurde ein Deckglas auf den Flüssigkeitsfilm über den Zellen gelegt. Die spezifische [α - 32 P]-dATP-Aktivität war unverändert. Das Deckglas bedeckte 30% aller Zellen, die anderen trockneten größtenteils aus und lösten sich beim Waschen ab (Abb. 20).

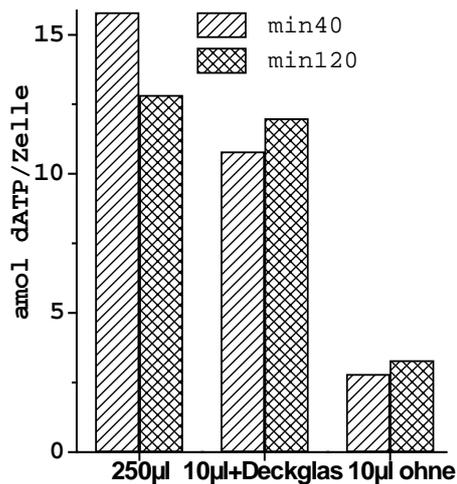


Abb. 20: Reduktion des Permeabilisierungsvolumens mit und ohne Deckglas über den Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2ständiger normoxischer Vorinkubation nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig mit [α - 32 P]-dATP 40 bzw. 120 min dauermarkiert („min40“ bzw. „min120“, DB=Deckglas). Vorbehandlung der Zellen: normoxische Begasung
Zusammensetzung des Mediums: Standard
 α -Toxin: frisch dialysiert, 150-300 hU/ml
 32 P-Markierung: 40- und 120-min-Dauermarkierung einges. Endkonzentration im Markierungsansatz: 246 Bq (250µl), 6150 Bq (10µl) [α - 32 P]-dATP/µl

Wurden die Zellen sofort nach Permeabilisierung mit 4% des Standardvolumens mit einem Deckglas zum Schutz vor Austrocknung abgedeckt, lag die Menge der säurefällbaren Radioaktivität je Kulturschale zwar deutlich geringer, der Einbau dATP/Zellen aber knapp auf Höhe des Vergleichs (250 µl Medium, kein Deckglas), wenn die 30%ige Überdeckung der Zellen berücksichtigt wird. Die reduzierte Diffusion im Medium, die mangelnde Sauerstoffversorgung der Zellen unter dem Deckglas und die geringere α -Toxinkonzentration pro Zelle (α -Toxinkonzentration wurde bei reduzierter Medienmenge um 60% erhöht) wurden nicht berücksichtigt. Da diese Faktoren die säurefällbare Radioaktivität u.U. deutlich reduzieren, ist ein Vorteil der Medienreduktion gegenüber der Permeabilisierung mit 250 µl postulierbar, jedoch schlecht nachweisbar.

Ohne Deckglas war der Einbau bei 10 µl Permeabilisierungsmedium geringer, da zahlreiche Zellen während der Inkubation ausgetrocknet waren.

Die Annahme, daß für die Replikation benötigte zelluläre Substanzen durch α -Toxinporen aus der Zelle diffundieren, wurde durch diese Ergebnisse nicht widerlegt, jedoch auch nicht eindeutig gestützt. Die Kapazität des Permeabilisierungsmediums für die Unterstützung der Replikation längere Zeit nach Permeabilisierung ist bei Standardkonzentrationen ausreichend: Bei 120 min Dauermarkierung steigt der Vorteil der Medienreduktion gegenüber dem Vergleich.

Die viel kompliziertere transiente Abdeckung der Zellen mit einem Deckglas und die mangelnde Kontrolle der Begasung unter dem Deckglas, sowie die Unmöglichkeit von Medienwechseln oder -veränderungen verhinderte den standardisierten Einsatz dieser Methode, zumal sich zwar die Menge des eingebauten dATPs je Zelle erhöhte, die Men-

ge der säurefällbaren Radioaktivität jedoch weitgehend unverändert blieb. Das beschriebene Permeabilisierungsverfahren mit Deckblatt bietet Vorteile, sobald das Medienvolumen klein oder die spezifische Radioaktivität groß gewählt werden soll.

4.2.2.7 Proteinbiosynthese in permeabilisierten Zellen

Zusatz von Aminosäuren zum Permeabilisierungsmedium

Nach Permeabilisierung von Zellen höherer Eukaryonten läßt die Proteinbiosynthese schnell nach (Negrutskii 1993). Um die Replikation nach Permeabilisierung möglichst lange auf hohem Niveau zu stabilisieren, muß das Inkubationsmedium die Proteinbiosynthese unterstützen, da auch kurzlebige Proteine benötigt werden (Riedinger 1991).

Da durch α -Toxinporen in der Zelle vorhandene Aminosäuren ins Inkubationsmedium austreten können, wurden dem Permeabilisierungsmedium zur Unterstützung der Proteinbiosynthese jeweils 100 μ M aller biogenen Aminosäuren frisch zugesetzt. Mit der Zugabe von ^3H -Leucin zum Inkubationsmedium wurde die Fähigkeit der Zellen zur Proteinbiosynthese untersucht (Abb. 21).

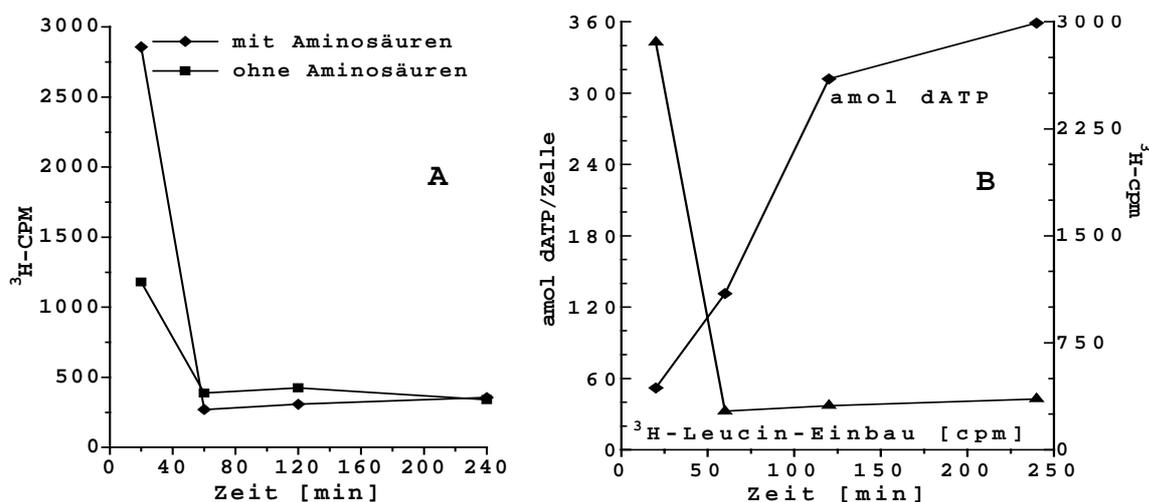


Abb. 21: normoxische ^3H -Leucin-Markierung permeabilisierter Zellen mit + ohne Aminosäuren
 SV40-infizierte CV1-Zellen nach 2stündiger normoxischer Vorinkubation nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 20-240 min dauermarkiert. 20 min vor dem Abstoppen der radioaktiven Dauermarkierung wurde durch Zugabe von ^3H -Leucin zusätzlich pulsmarkiert.
 Zusammensetzung des Mediums: Standard + 100 μ M aller biogenen Aminosäuren
 α -Toxin: frisch dialysiert, 211 hU/ml, ^{32}P -Markierung: 20-240-min-Dauermarkierung
 ^3H -Markierung: keine [Methyl- ^3H]-Thd-Vormarkierung *in vivo*, ^3H -Leucin wurde 20 min vor Ende der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -Markierung ins Permeabilisierungsmedium zugegeben.
 A: ^3H -Leucin-Einbau, B: $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ -Einbau in die DNA
 einges. Endkonzentration im Markierungsansatz: 617 Bq ^3H -Leucin/ μ l, 1233 Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}/\mu$ l

Bereits wenige Minuten nach Beginn der Permeabilisierung sank der ^3H -Leucin-Einbau stark ab (Abb. 21 A). Durch Zugabe aller biogenen Aminosäuren in einer Konzentration von 100 μ M konnte der ^3H -Leucin-Einbau während der ersten 20 min nach Permeabilisierung mehr als verdoppelt werden. Im weiteren Verlauf sank der Einbau jedoch auf das gleiche niedrige Niveau wie im Ansatz ohne Aminosäuren.

In den meisten gängigen Medien zur Anzucht von Zellen sind viele der biogenen Aminosäuren in ausreichender Konzentration enthalten. Damit die verwendeten CV1-Zellen

auch nach der Permeabilisierung auf identische Konzentrationen der Aminosäuren zurückgreifen können, wurden die im DMEM enthaltenen Konzentrationen ins Inkubationsmedium übernommen. Die selektive Aufnahme der Aminosäuren in nicht permeabilisierte Zellen durch verschiedene Transportsysteme führt allerdings zu veränderten intrazellulären Konzentrationen (Abb. 22).

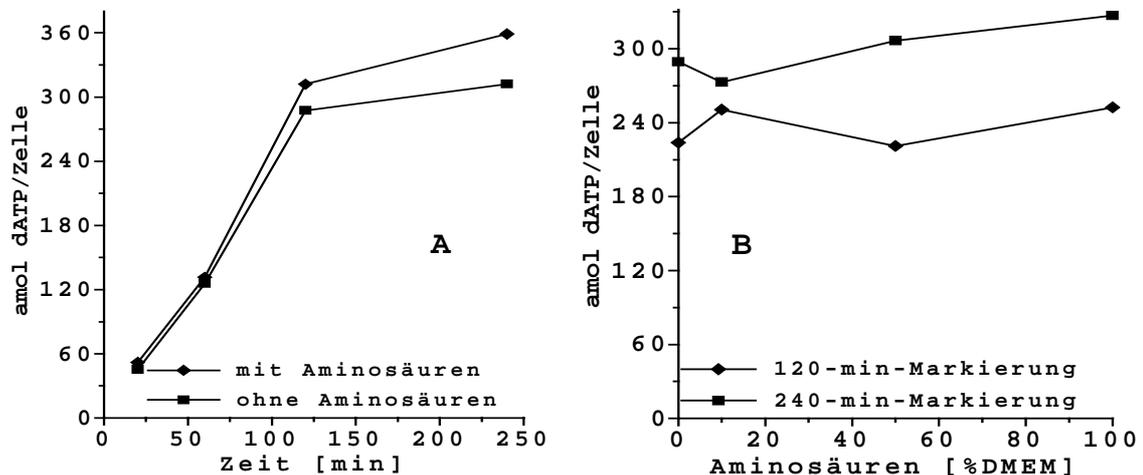


Abb. 22: Einfluß von Aminosäuren und Vitaminen auf normoxische ^{32}P -Dauermarkierung
 SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2.5stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl- ^3H]-Thd permeabilisiert und gleichzeitig mit [α - ^{32}P]-dATP 120-240 min dauermarkiert.
 Zusammensetzung des Mediums: Standard und Aminosäuren (AS) und Vitamine
 A: Dauermarkierung mit und ohne Aminosäurezusatz zum Permeabilisierungsmedium (100 μM); B: Variation der Aminosäure- und Vitaminkonzentration als Zusatz zum Permeabilisierungsmedium zwischen 0 und 100% der Aminosäure-Endkonzentrationen bzw. 50% der Vitamin-Endkonzentrationen des normalen DMEM
 α -Toxin: frisch dialysiert, 344 hU/ml, ^3H -Markierung: 2.5 h Dauermarkierung *in vivo*
 ^{32}P -Markierung: 120- bzw. 240-min-Dauermarkierung permeabilisiert, eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 16 Bq [^3H]-Thd/ μl (2.5 h), 1233 bzw. 484 Bq [α - ^{32}P]-dATP/ μl

Durch Zugabe von Aminosäuren bzw. einigen Vitaminen konnte das Nachlassen der Replikation 120-240 min nach Beginn der Permeabilisierung reduziert werden. Dieses Ergebnis könnte durch verbesserte Proteinbiosynthese oder durch Wechselwirkungen zwischen den zugegebenen Substanzen und α -Toxin bewirkt worden sein. Da die beobachteten Effekte gering ausfielen, wurden Aminosäuren bzw. Vitamine nicht zugesetzt. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß Proteinbiosynthese in permeabilisierten, SV40-infizierten CV1-Zellen nur noch auf geringem Niveau stattfindet.

Einfluß von Emetin

Emetin ist ein dem Cycloheximid strukturanaloger Hemmstoff der Proteinbiosynthese. Die Zugabe von Emetin zu permeabilisierten Zellen reduziert die Proteinbiosynthese. Um zu untersuchen, wie sich das Unterbrechen der Proteinbiosynthese vor und während Permeabilisierung auf die Replikation auswirkt, wurde Emetin vor (30 μM , 30 min) und nach Permeabilisierung von CV1-Zellen zugegeben (Abb. 23 und 24).

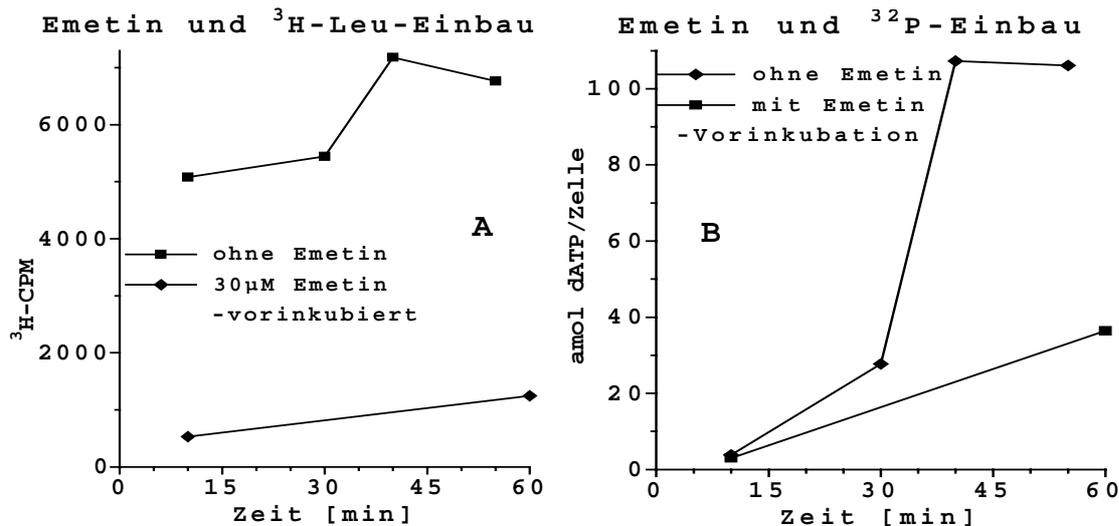


Abb. 23: Vorinkubation von Zellen mit Emetin

Zu SV40-infizierten CV1-Zellen wurden während einer 2stündigen normoxischen Vorinkubation im Wärmerraum 30 min vor Permeabilisierung 30µM Emetin gegeben. Danach wurde in Gegenwart von 30µM Emetin nach 3.2.12.2 permeabilisiert und mit [α -³²P]-dATP bzw. [³H]-Leucin 10-60 min dauermarkiert. Zusammensetzung des Inkubationsmediums: Standard + 30µM Emetin

α -Toxin: frisch dialysiert, >500 hU/ml

³H-Markierung: [³H]-Leucin-Dauermarkierung 10-60 min ab Permeabilisierungsbeginn (A)

³²P-Markierung: [α -³²P]-dATP-Dauermarkierung 10-55 min ab Permeabilisierungsbeginn (B)

eingesetzte Endkonz. im Markierungsansatz: 14.5 Bq [³H]-Leucin/ μ l, 456 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Die 30minütige Vorinkubation der Zellen mit 30 µM Emetin hemmte die Proteinbiosynthese der permeabilisierten Zellen, der ³H-Leucin-Einbau der gehemmten Zellen betrug nach Permeabilisierung 10% des ³H-Leucin-Einbaus der unbehandelten Zellen. Der [α -³²P]-dATP-Einbau in die permeabilisierten Zellen wurde nach Emetin-Vorinkubation stark gehemmt (Abb. 23 B). Bei längerer Inkubation befand sich der ³H-Leucin-Einbau mit und ohne Emetin-Vorbehandlung auf dem gleichen Niveau, der [α -³²P]-dATP-Einbau der unbehandelten Zellen lag aber deutlich höher.

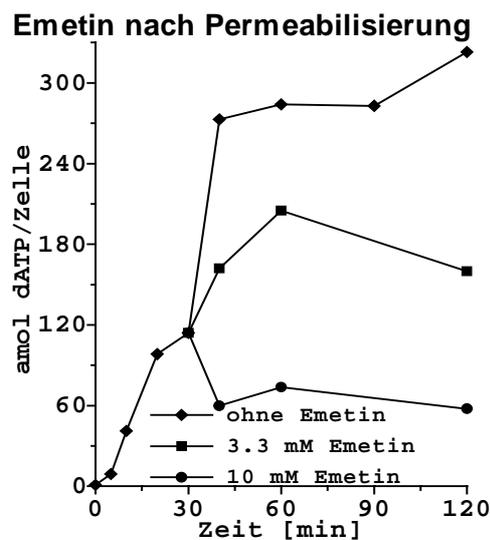


Abb. 24: Zugabe von Emetin nach Permeabilisierung

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd nach 3.2.12.2 permeabilisiert und mit [α -³²P]-dATP 0-120 min dauermarkiert. 30 min nach Permeabilisierungsbeginn erfolgte die Emetinzugabe ins Medium.

Zusammensetzung des Mediums: Standard, Zugabe von bis zu 10 mM Emetin direkt ins Medium

α -Toxin: frisch dialysiert, >500 hU/ml

³H-Markierung: 2h Dauermarkierung *in vivo*

³²P-Markierung: 0-120-min-Dauermarkierung
eingesetzte Endkonz. im Markierungsansatz: 17.6 Bq [³H]-Thd/ μ l DMEM, 234 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Die Zugabe von 3.3 mM Emetin 30 min nach Beginn der Permeabilisierung direkt in das radioaktive Inkubationsmedium bewirkte bereits nach 10 min eine Verringerung der Replikation (Abb. 24). 30 min nach Zugabe war kein weiterer radioaktiver Einbau mehr fest-

stellbar. Die Zugabe von 10 mM Emetin bewirkte eine sofortige Unterbrechung des Einbaus in die DNA. Die Menge der bereits radioaktiv markierten, säurefällbaren DNA verringerte sich sofort, wie es sich z.B. bei einer DNA-Degradation zeigen würde.

Wurde Emetin zu bereits permeabilisierten Zellen zugegeben, waren wesentlich höhere Konzentrationen an Emetin nötig (>1 mM), um einen signifikanten Hemmeffekt zu verursachen. Bei der Zugabe zu nichtpermeabilisierten Zellen reichten dazu Konzentrationen von 30 µM aus. Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, daß Emetin bei der Aufnahme durch intakte CV1-Zellmembranen konzentriert wird. Die α-Toxin-Permeabilisierung bewirkte offenbar eine Verdünnung des Emetins.

Wirkung von Cycloheximid

Cycloheximid hemmt die Proteinbiosynthese in nichtpermeabilisierten Zellen ab einer Konzentration von 30µM, die SV40-Replikation scheint dadurch jedoch nicht beeinträchtigt zu werden (Schulte, 1992). Soll die Proteinbiosynthese in permeabilisierten Zellen gehemmt werden, sind deutlich höhere Konzentrationen notwendig. Die Zugabe von Cycloheximid in einer Konzentration von 3 mM direkt zum Permeabilisierungsmedium bewirkte folgende Veränderungen der Proteinbiosynthese (Abb. 25).

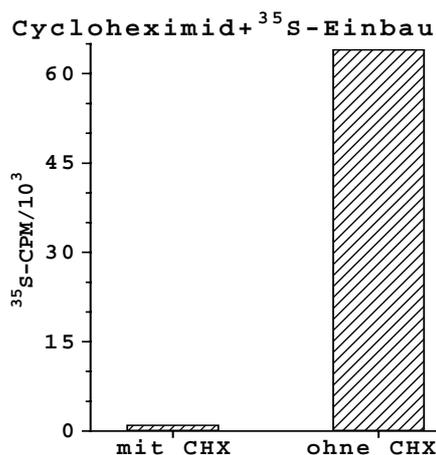


Abb. 25: Markierung von CV1-Zellen mit ³⁵S-Cys und ³⁵S-Met

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2stündiger normoxischer Vorinkubation nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig 30 min in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 3 mM Cycloheximid (CHX) ³⁵S-dauermarkiert.

Zusammensetzung des Mediums: Standard + CHX

α-Toxin: 8330 hU/ml

³⁵S-Markierung: Zugabe von ³⁵S-markierten Cys und Met zum normalen Permeabilisierungsmedium, 30-min-Dauermarkierung, eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz: 89 Bq ³⁵S/µl

In Gegenwart von 3 mM Cycloheximid im Inkubationsmedium erfolgte nur eine geringe Proteinmarkierung. Ohne Cycloheximid fand dagegen eine deutliche Markierung von Proteinen durch [³⁵S]-Cystein und [³⁵S]-Methionin statt. Der Vergleich mit der Proteinbiosynthese nicht permeabilisierter Zellen gilt bei diesem Versuchsansatz nur bedingt, da die sich Konzentration diverser Kleinmoleküle deutlich unterscheidet. Nach Permeabilisierung hemmte auch Cycloheximid analog Emetin die Proteinbiosynthese erst bei deutlich höheren Konzentrationen (>1 mM). Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, daß Cycloheximid durch intakte Zellmembranen bei der Aufnahme konzentriert wird.

4.2.2.8 Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase

Die Ribonukleotid-Reduktase (RNR) stellt aus Ribonukleosiddiphosphaten 2'-Desoxyribonukleosiddiphosphate her. In intakten Zellen ist dies sehr wichtig, da so der Nachschub an DNA-Bausteinen für die Replikation hergestellt wird. Säugetier-RNR ent-

hält ein Tyrosylradikal im Aktivitätszentrum, das zur Regenerierung Sauerstoff und Eisen benötigt (Thelander 1983). Da in α -Toxin-permeabilisierten CV1-Zellen alle notwendigen DNA-Bausteine durch das Inkubationssmedium bereitgestellt werden, sollte der RNR keine bedeutende Funktion zukommen. Es wird ein direkter Zugang der RNR über ein „channeling“ in einem Multienzymkomplex (Replikase) diskutiert (Riedinger 1991, Reddy 1980 und 1982, Mathews 1986, Hammond 1989). Wird die RNR inaktiviert und führt dies zu erhöhtem Einbau von (extern angebotenem) $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ in die DNA, so könnte dies auf ein „channeling“ hindeuten.

Hydroxyharnstoff (HH)

Hydroxyharnstoff wirkt als Radikalfänger. Die B_2 -Untereinheit der Ribonukleotid-Reduktase enthält ein stabiles organisches freies Tyrosylradikal, das als vorübergehender „Radikaldonor“ dient (Reichard 1983, Brischwein 1997). Dieses Tyrosylradikal kann durch Hydroxyharnstoff inaktiviert werden, die katalytische Aktivität der RNR geht verloren und die Zellen können rNDPs nicht mehr zu dNDPs reduzieren. Der Zusatz von Hydroxyharnstoff zum Permeabilisierungsmedium wurde deshalb unter norm- und hypoxischen Bedingungen mit Dauermarkierungen und Pulsmarkierungen bei verschiedenen α -Toxinkonzentrationen untersucht (Abb. 26).

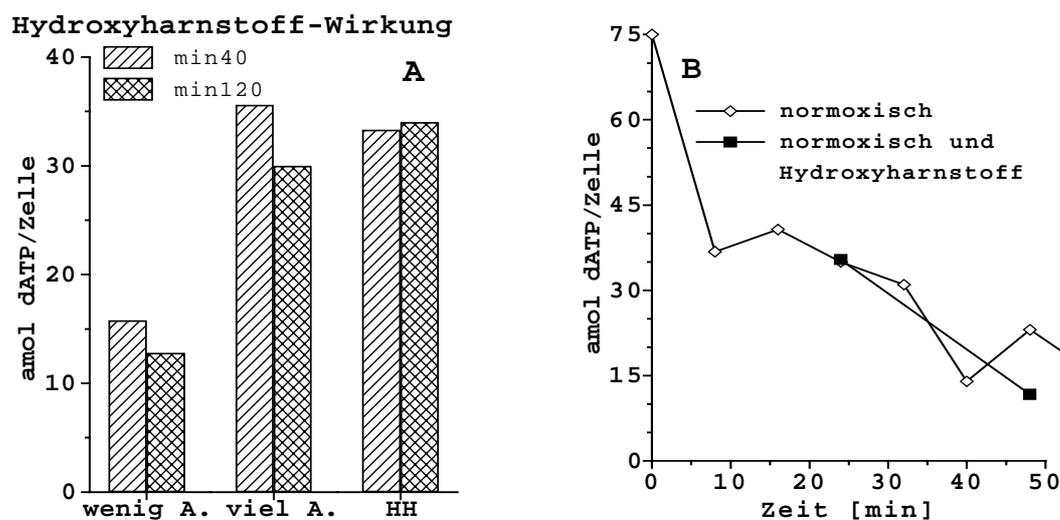


Abb. 26: Einfluß von Hydroxyharnstoff auf die Markierung normoxischer permeabilis. Zellen SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1-3.5ständiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl- ^3H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 0-120 min dauermarkiert (A) bzw. verschiedene Zeiträume nach Permeabilisierung mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ für 8 min pulsmarkiert (B). Zusammensetzung des Mediums: Standard mit und ohne Hydroxyharnstoff α -Toxin: (A): frisch dialysiert, 15 („wenig A.“), 150 („viel A.“ + „HH“) hU/ml, (B): 4440 hU/ml ^3H -Markierung: (A): 1h Dauermarkierung, (B): 3.5h Dauermarkierung ^{32}P -Markierung: (A): 40/120 min Dauermarkierung, (B): 8-min-Pulse, einges. Endkonzentration im Markierungsansatz: (A): 103, (B): 4.92 Bq $[\text{H}^3]\text{-Thd}/\mu\text{l}$; (A): 246, (B): 407 Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}/\mu\text{l}$

Unter normoxischen Verhältnissen beeinflusste Hydroxyharnstoff die Replikation permeabilisierter CV1-Zellen nicht wesentlich, die Replikation ließ bei anhaltender Permeabilisierung jedoch in geringerem Umfang nach (Abb. 26 A). Bei DNA-Markierungen durch kurze Pulse zeigte die Zugabe von Hydroxyharnstoff weder bei norm- noch bei hypoxisch

vorinkubierten bzw. hypoxisch permeabilisierten Zellen Auswirkungen auf die Höhe des Einbaus (Abb. 27, s. auch 4.5 und 4.6.4).

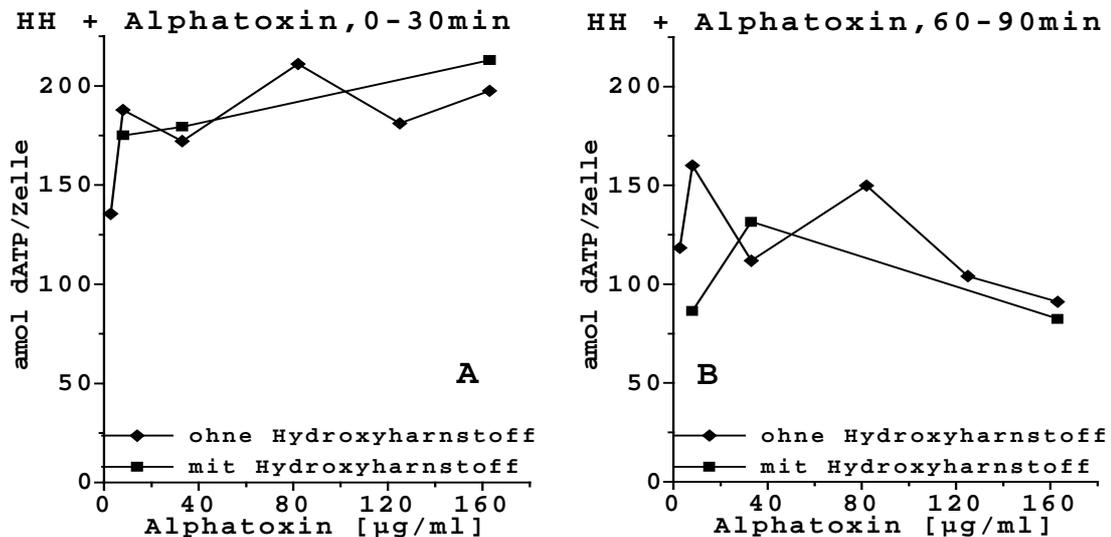


Abb. 27: Auswirkungen von Hydroxyharnstoff bei unterschiedlicher α -Toxin-Konzentration
SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3.5stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl- ^3H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und mit [α - ^{32}P]-dATP für 30 min pulsmarkiert. 20 min vor Permeabilisierungsbeginn erfolgte die Hydroxyharnstoff-Zugabe ad 30 μM ins DMEM. Das Permeabilisierungsmedium enthielt 3 mM Hydroxyharnstoff. A: Pulsmarkierung 0-30 min, B: Pulsmarkierung 60-90 min nach Permeabilisierung. Zusammensetzung des Inkubationsmediums: Standard bei verschiedenen α -Toxinkonzentrationen + 3 mM Hydroxyharnstoff
 α -Toxin: 2,5-150 hU/ml, ^3H -Markierung: 3.5 h Dauermarkierung, ^{32}P -Markierung: 30-min-Pulsmarkierung, Endkonz. im Markierungsansatz: 12.3 Bq [^3H]-Thd/ μl , 188 Bq [α - ^{32}P]-dATP/ μl

Die Zugabe von 3 mM Hydroxyharnstoff zum Inkubationsmedium bewirkte unter normoxischen Bedingungen keine Modulation des Einbaus, die Wirkungen variiertes α -Toxin-Konzentrationen auf die DNA-Markierung veränderten sich nicht. Eine aktive Ribonukleotid-Reduktase schien für die Replikation in permeabilisierten Zellen nicht zwingend notwendig zu sein, der Nukleotidpool wurde aus dem großen Reservoir des Inkubationsmediums außerhalb der Zelle gespeist.

4.2.3 Charakterisierung des optimierten Systems

4.2.3.1 Gleichzeitige Markierung mit [^3H]-Thd und [α - ^{32}P]-dATP

[Methyl- ^3H]-Thd-/ [α - ^{32}P]-dATP-Doppelmarkierungen permeabilisierter Zellen zeigten ein differenziertes Einbauverhalten beider Isotope in die DNA. Um dieses Einbauverhalten näher zu untersuchen, wurden mehrstündige Dauermarkierungen durchgeführt. Der Vergleich mit früheren Ergebnissen (Eger, 1995) zeigte die Auswirkungen des höheren Optimierungsgrades des Inkubationsmediums auf. Eine DNA-Degradation (Jonas 1994, Kaminskas 1989) nach Permeabilisierung durch α -Toxin kommt eventuell in Betracht (Abb. 28).

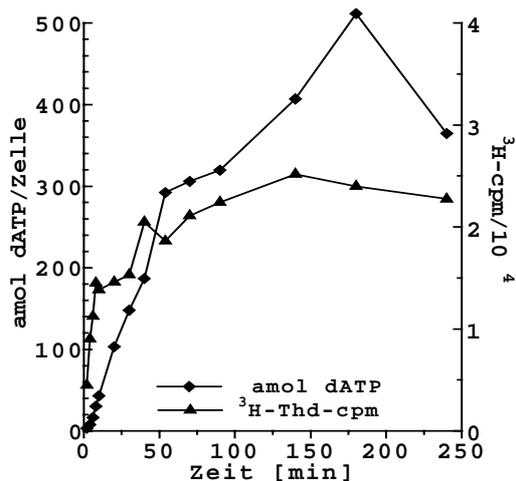


Abb. 28: Gleichzeitige DNA-Markierung permeabilisierter Zellen mit [³H]-Thd + [α-³²P]-dATP

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2stündiger normoxischer Vorinkubation nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig mit [Methyl-³H]-Thd und [α-³²P]-dATP 0-240 min doppelmarkiert.

Zusammensetzung des Mediums: Standard α-Toxin: 8000 hU/ml, ³H- und ³²P-Markierung: 0-240-min-Dauermarkierung permeabilisiert eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz: 1540 Bq [³H]-Thd/μl, 254 Bq [α-³²P]-dATP/μl

Der größte Teil des [Methyl-³H]-Thd wurde in den ersten 8 min nach Permeabilisierung in die DNA eingebaut. Nach 40 min verringerte sich der [Methyl-³H]-Thd-Einbau auf ein fast nicht nachweisbares Niveau. Dies bestätigen auch SW40-Sucrosegradienten von Pulsmarkierungen (Abb. 29).

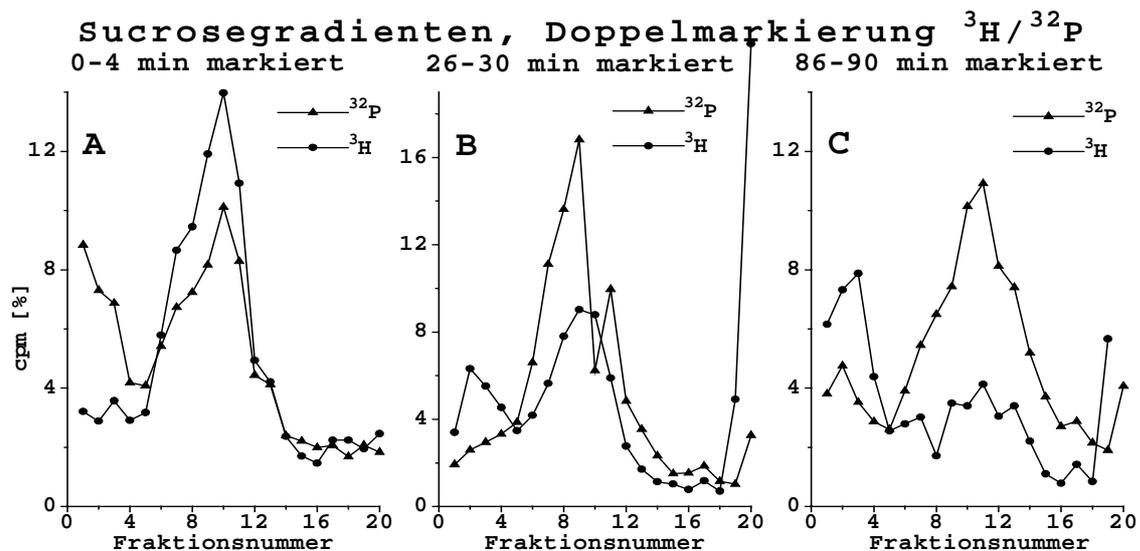


Abb. 29: Sucrosegradienten von doppelmarkierter DNA permeabilisierter normoxischer Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2stündiger normoxischer Vorinkubation nach 3.2.12.2 permeabilisiert und in 4-min-Pulsen mit [Methyl-³H]-Thd und [α-³²P]-dATP doppelmarkiert (Start der Pulse: 0-86 min nach Permeabilisierungsbeginn). Anschließend wurde die DNA auf SW40-Gradienten aufgetrennt. Zusammensetzung des Mediums: Standard, α-Toxin: 8900 hU/ml ³H- und ³²P-Markierung: 4-min-Pulse, 0-86 min nach Permeabilisierungsbeginn einges. Endkonzentration im Markierungsansatz: 4200 Bq [³H]-Thd/μl, 703 Bq [α-³²P]-dATP/μl Σ cpm: A: [³H]-Thd: 6466, [α-³²P]-dATP: 1186; B: [³H]-Thd: 1359, [α-³²P]-dATP: 3096, C: [³H]-Thd: 689, [α-³²P]-dATP: 1451

Die Markierung der neusynthetisierten SV40-DNA erfolgte mit zunehmender Zeit nach Permeabilisierungsbeginn immer ausschließlicher durch [α-³²P]-dATP. Ein immer höherer Prozentsatz der [Methyl-³H]-Thd-Markierung sedimentierte in Fraktion 20 (86-90 min nach Permeabilisierung 35% der gesamten säurefällbaren [³H]-Radioaktivität), die jedoch nicht sehr aussagekräftig ist.

Die Zugabe von [Methyl-³H]-Thd gleichzeitig mit der Permeabilisierung zum Markierungsansatz bewirkte eine stärkere [³H]-Markierung der DNA als eine spätere [³H]-Thd-Zugabe. Die Längenverteilung der ³H- und ³²P-markierten DNA war bei frühen Pulsen gleich, bei Pulsen nach längerer Permeabilisierung unterschieden sich die Pulse deutlich (Abb. 29 C). Bei späten [³H]-Thd-Zugaben stieg der Anteil kleiner und sehr großer DNA-Moleküle (Fraktion 1-5, Fraktion 20) an der gesamten säurefällbaren [³H]-Aktivität. Dies könnte auf Primersynthese oder unspezifische Adhäsionen von [³H]-Thd an DNA oder Proteine hindeuten. Eine noch nicht vollständige Permeabilisierung könnte eine Konzentrationsänderung und Aufphosphorylierung von [³H]-Thd in der Zelle bewirken.

4.2.3.2 Einfluß der Kultivierungsdauer von CV1-Zellen auf die SV40-Replikation nach Permeabilisierung

Bei SV40-infizierten CV1-Zellkulturen können, abhängig von der Kultivierungsdauer nach Auftauen der Zellen, durch kurz aufeinanderfolgende Serienpulsmarkierungen bei mehrstündigen Permeabilisierungsversuchen die im folgenden gezeigten Replikationsphasen nachgewiesen werden (Abb. 30 A und C).

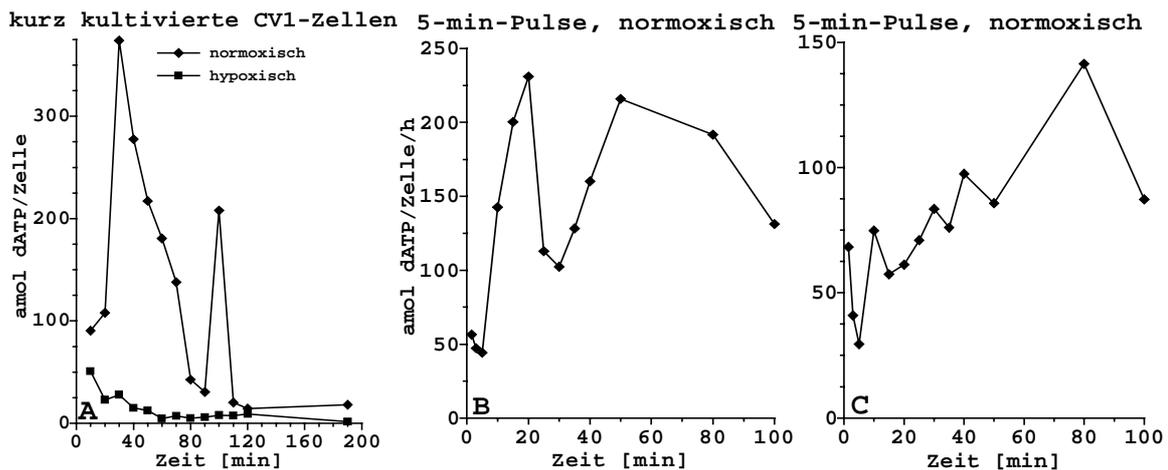


Abb. 30: Permeabilisierung von nur kurz kultivierten CV1-Zellen, markiert durch kurze Pulse.

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3-4stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig in 10- (A) bzw. 1.5-5-min-Pulsen (B + C) [α -³²P]-dATP markiert (Start der Pulse: 0-180 min nach Permeabilisierungsbeginn). Vorbehandlung der Zellen: 3-5 (A) bzw. 9 (B) -18 (C) normoxische Kulturpassagen nach Auftauen
Zusammensetzung des Mediums: Standard, α -Toxin: A: 1560 hU/ml, B: 1200, C: 3600 hU/ml
³H-Markierung: A: 4 h Dauermarkierung *in vivo*, B + C: 3 h Dauermarkierung *in vivo*
³²P-Markierung: A: 10-min-Pulse permeabilisiert, B + C: 1.5-5-min-Pulse
eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: A: 4.9 Bq [³H]-Thd/ μ l DMEM, 165 Bq [α -³²P]-dATP, B+C: 11 Bq [³H]-Thd/ μ l DMEM, B:510 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l, C: 284 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Die CV1-Zellen, die 3-5 Passagen nach Kultivierungsbeginn mit SV40 infiziert wurden, zeigten 20-30 min nach Beginn der Permeabilisierung einen sprunghaften Anstieg der Replikation auf 400 amol dATP/Zelle innerhalb eines 10-min-Pulses (Abb. 30 A). Die durchschnittliche Replikation in den ersten 120 min der Permeabilisierung führte zum Einbau von 25-50 amol dATP/Zelle in jeweils 10 min. Die Replikation normalisierte sich, bevor ca. 60-100 min nach Permeabilisierungsbeginn ein nicht mehr ganz so extremer Anstieg der Replikation stattfand, dem auch eine schnelle Normalisierung folgte.

Hypoxisch permeabilisierte, zuvor normoxische CV1-Zellen zeigten diese Schwankungen nicht, deren normale Replikation lag bei 40-60% des Vergleichs (nicht gezeigt). Die „exzessive“ Replikation wurde nur bei normoxischen Zellen beobachtet.

Mit zunehmender Kultivierungsdauer der CV1-Zellen wurden die beobachteten Replikationsphasen immer flacher (Abb. 30 B und C). Vor Infektion 9 Generationszyklen in Kultur gehaltene CV1-Zellen (Abb. 30 B im Vergleich zu 30 A) zeigten deutliche Replikationsphasen, die sich in noch kürzerer Zeit nach Permeabilisierung manifestierten (1. Spitze 15-20 min, Normalisierung 20-40 min, 2. Spitze 50-70 min nach Permeabilisierungsbeginn). 100 min nach Permeabilisierungsbeginn pendelte sich die Replikation auf niedrigere Niveaus ein. Je länger die CV1-Zellen in Kultur gehalten wurden (<15 Generationen), desto geringer fielen diese Replikationsphasen aus.

Die rechnerische Integration der Werte der säurefällbaren Radioaktivität nach Pulsmarkierung führte zu einer Darstellung, die dem Informationsgehalt von Dauermarkierungsdarstellungen entspricht (s. Abb. 41 B). Hier zeigte sich der Vorteil von Puls gegenüber Dauermarkierungen: bei Dauermarkierungen blieb die Phasigkeit der Replikation bislang verborgen.

Diese so nicht erwarteten Ergebnisse wurden mehrfach reproduziert. Die Phasigkeit der Replikation könnte verursacht werden durch

- a) synchrone SV40-Replikationsrunden mit anschließender Erschöpfung der Replikationsfähigkeit permeabilisierter Zellen (s. Abb. 41 B),
- b) erhebliche Beschleunigung der Elongationsrate und zwischenzeitlichem Mangel an initiationsbereiter SV40-Virus-DNA oder
- c) Vorliegen einer kritischen α -Toxin-Konzentration:

α -Toxin-Monomere dringen in die Membran ein und permeabilisieren nach Oligomerisierung die Zelle. Die α -Toxin-Rezeptoren sind größtenteils belegt. Nach einer bestimmten Zeit schließen sich die Poren wieder, neue α -Toxin-Moleküle lagern sich erst wieder in die Membranen der Zellen ein, wenn die Rezeptoren wieder in der Lage sind, das Einlagern von α -Toxin in die Membran zu ermöglichen. In dieser Zwischenzeit sind statistisch über die Anzahl der Zellen verteilt weniger Poren offen, weniger Kleinmoleküle können zur Unterstützung der Replikation in die Zellen eintransportiert werden, die Einbaurate in die Zellen ist in dieser Zeit geringer. Sind wieder mehr Poren offen, steigt der Einbau wieder an.

Da die Phasigkeit der Replikation permeabilisierter Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer abnimmt, ist die Hypothese c) die unwahrscheinlichste.

4.2.3.3 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Möglichkeiten der Auftrennung von DNA durch zweidimensionale Gelelektrophorese nach verschiedenen Trennprinzipien wurde in den letzten Jahren häufig untersucht und beschrieben (Gourlie 1983, Hirt 1967, Nawotka 1988, Snapka 1991 a - c, 1986, 1988 und 1993, Sundin 1980 und 1981, Eger, 1995).

Mit dieser Technik können die SV40-Replikation in CV1-Zellen und die Einflüsse verschiedener Substanzen detailliert untersucht werden. Auf den Vergleich zwischen nicht permeabilisierten, [Methyl-³H]-Thd-markierten und α -Toxin-permeabilisierten, SV40-infizierten CV1-Zellen wurde bereits eingegangen (Eger 1995). Im Verlauf dieser Arbeit wurden CV1-Zellen mehrmals *in vivo* hypoxisch begast und entweder hypoxisch permeabilisiert und ³²P-markiert (nicht gezeigt, da nur geringer Einbau) oder entweder während oder kurz vor Permeabilisierung reoxigeniert. Mittels kurzer und längerer Pulse konnte der Wiederbeginn der Replikation verfolgt werden bzw. die Konzentration der einzelnen Replikationsintermediate zu verschiedenen Zeiten nach Reoxigenierung abgeschätzt werden (Abb. 30 F im Vergleich zu normoxischen, permeabilisierten SV40-infizierten CV1-Zellen, Abb. 30 E).

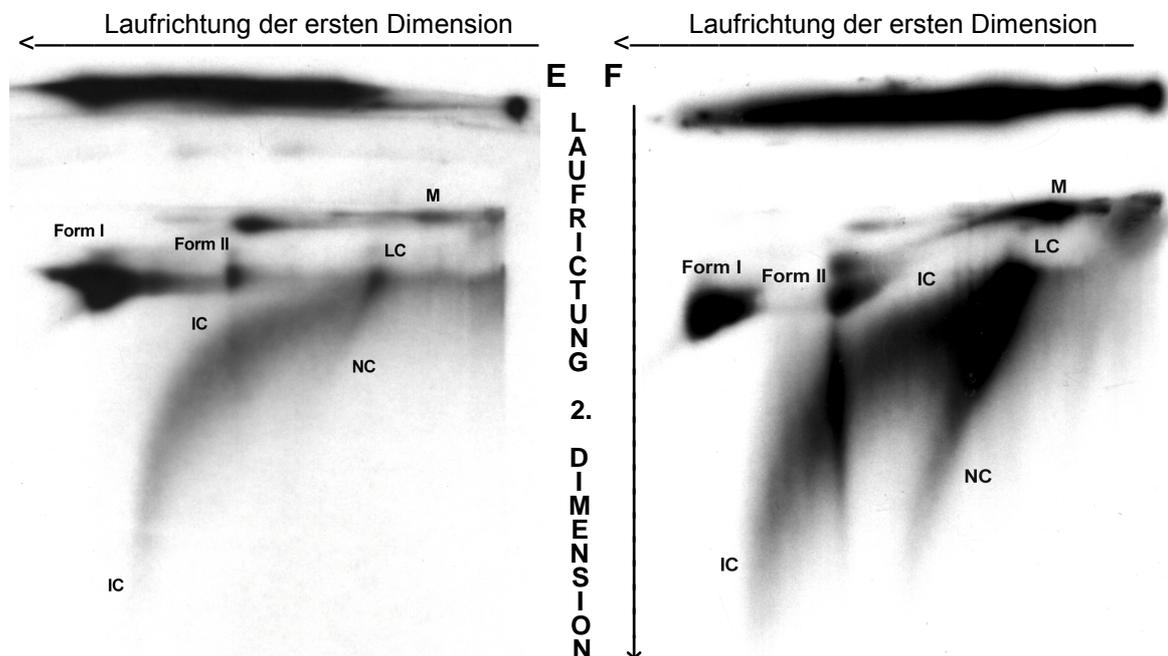


Abb. 30: Zweidimensionale Gelelektrophorese mit DNA aus normoxisch (E) und durch Permeabilisierung reoxigenierten (F) Zellen, darüber der Gelstreifen der 1. Dimension

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden entweder (E) nach 3,5stündiger normoxischer Inkubation permeabilisiert oder (F) nach 2stündiger normoxischer Inkubation 6h *in vivo* hypoxisch begast, bevor sie durch Zugabe von ¼ Vol. O₂-gesättigtem Medium reoxigeniert wurden. Anschließend wurde durch Zugabe von 3 ml Permeabilisierungsmedium je 145-mm-Kulturschale permeabilisiert. Die Pulsmarkierung mit [α -³²P]-dATP erfolgte gleichzeitig und wurde nach 20 min (E) bzw. 12 min (F) beendet. Über die Spuren der 2. Dimension wurde zum Vergleich ein Gelstreifen der 1. Dimension abgebildet. Rechter Rand der 1. Dimension = Auftragschale (auch in der 2. Dimension sichtbar), Mt = mitochondriale DNA, LC = Late Cairns (späte Replikationsintermediate), IC = Intermediate Cairns (Replikationsintermediate), NC = Nicked Cairns (Replikationsintermediate mit Einzelstrangbruch im unreplicierten Teil), Form I = hochunterwundenes, circular geschlossenes Genom, Form II = entspanntes circular Genom, Form III = durch Doppelstrangbruch lineares Genom.
 Vorbehandlung der Zellen: normoxische Begasung (E), 6h hypoxische Begasung (F)
 α -Toxin: frisch dialysiert, 1440 hU/ml (E), 1000 hU/ml (F)
³²P-Markierung: E: 20-min-Pulsmarkierung, F: 12-min-Pulsmarkierung
 Eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz: E: 1070 Bq, F: 1250 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Nicht zirkulär geschlossene Einzelstränge stellen die neureplizierten, markierten Tochterstränge aller Cairns-Intermediate dar, deren Länge mit dem Volumen der Cairnsstruktur während der Replikation zunimmt. Daher setzten die in der ersten Dimension

kurz gewanderten, großen Cairns-Intermediate in der zweiten Dimension unterschiedlich lang replizierte Einzelstränge frei. Daraus ergibt sich der „Schweif“, ausgehend von den aus den LC freigesetzten Tochtersträngen bis hin zu Ministrängen, die aus dem noch fast voll umwundenen, gerade erst initiierten Muttergenom freigesetzt wurden (auf einer Linie in der ersten Dimension mit Form 1). Der zunehmenden Radioaktivität in wachsenden Tochtersträngen entspricht auch die Verbreiterung und zunehmende Schwärzung des Schweifes von den frühen IC zu den LC. Alle weiteren sichtbaren Spuren wurden bereits früher eingehend erläutert (Eger 1995).

Nach Reoxigenierung sind alle bei normoxischen Zellen nachweisbaren Replikationsintermediate ebenso vorhanden. Der Einbau war trotz kürzerer Markierungszeit i.d.R. bei fast allen Replikationsintermediaten gleichmäßig kräftiger und entsprach daher den Erwartungen. Die überproportional stark ausgeprägte Spur der „nicked cairns“ dürfte einerseits in der Replikationshemmung unter Hypoxie und andererseits in der höheren Einbaudichte nach Reoxigenierung begründet sein.

4.3 REREPLIKATION IN PERMEABILISIERTEN ZELLEN

4.3.1 Beeinflussung der Replikation durch BrdUTP

In ersten Vorversuchen wurde zunächst untersucht, welche Auswirkungen die Zugabe von BrdUTP zum normalen Permeabilisierungsmedium auf die Replikation ausübt – neben dem Ersatz von dT durch BrdUrd in der DNA. Ebenfalls wurde untersucht, wie die Menge der säurefällbaren [³²P]-Radioaktivität durch verschiedene BrdUTP-Konzentrationen relativ zu einer [³H]-Vormarkierung verändert wurde (Abb. 31 A).

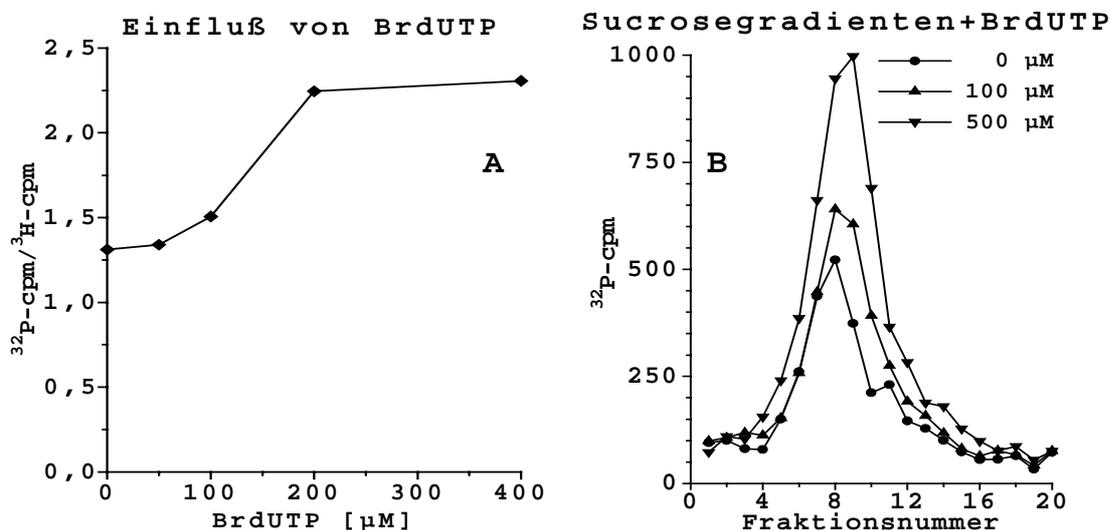


Abb. 31: Einfluß von BrdUTP auf die Replikation permeabilisierter Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1.5-2.5stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd (3.2.3.1) entsprechend 3.2.12.2 mit BrdUTPhaltigem Inkubationsmedium permeabilisiert und gleichzeitig in 120 min [α -³²P]-dATP dauermarkiert.

Zusammensetzung des Mediums: Standard + verschiedene BrdUTP-Konzentrationen (o.a.)

α -Toxin: frisch dialysiert, a: 250, b: 1300 hU/ml

³H-Markierung: A: 2.5stündige, B: 1.5stündige normoxische Dauermarkierung *in vivo*

³²P-Markierung: A + B: 120-min-Dauermarkierung normoxisch

einges. Endkonz. im Markierungsansatz: 17 Bq / 123 Bq [³H]-Thd/µl, 617 Bq / 2200 Bq [α -³²P]-dATP/µl

Der dATP-Einbau normoxisch permeabilisierter, SV40-infizierter CV1-Zellen (Abb. 31 A) wurde durch Erhöhung der BrdUTP-Konzentration auf 400 - 500 μM um 82% gesteigert. Dies könnte damit zusammenhängen, daß BrdUTP ähnlich wie dTTP auf die Ribonukleotidreduktase einen allosterischen Einfluß ausübt, der bewirkt, daß die RNR GDP-spezifischer arbeitet. Postuliert man gleichzeitig ein „Channeling“, wird auf diesem Weg weniger internes und mehr externes dATP in die DNA eingebaut.

Bei der Auftrennung der durch $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ markierten DNA im SW40-Sucrose-Gradienten deutete sich eine mit der Zunahme der BrdUTP-Konzentration einhergehende Verschiebung der Hauptfraktionen in Richtung längerer DNA-Fragmente an. Möglicherweise ist ein Anstieg der Gabelgeschwindigkeit ein Grund hierfür, ein weiterer könnte im zunehmenden BrdUrd-Substitutionsgrad der DNA liegen.

4.3.2 Isopyknische Zentrifugation zum Rereplikationsnachweis

Die Rereplikation, d.h. das Wiederanwerfen der Replikation nach hypoxieinduzierem Replikationsstau in permeabilisierten Zellen ist gleichzeitig ein Beweis für Initiationen nach Permeabilisierung. BrdUTP-markierte DNA kann auf isopyknischen CsCl- oder Cs_2SO_4 -Dichtegradienten nach dem Grad ihrer Dichtemarkierung aufgetrennt werden: Nach Permeabilisierung nicht mehr replizierte DNA enthält keine BrdUTP-Moleküle und wird im folgenden als nicht dichtemarkierte DNA bezeichnet. Ist die semikonservative Replikation SV40-infizierter CV1-Zellen nach Permeabilisierung so erfolgt, daß eine Replikationsrunde begonnen und vollständig beendet wurde, entsteht eine Hybrid-DNA aus nicht dichtemarkierter Parental-DNA ohne BrdUTP und dichtemarkierter Tochter-DNA, bei der ein bestimmter Anteil der Thyminbasen durch BrdUrd ersetzt wurde. Dieser Substitutionsgrad bleibt bei einem vorgegebenen BrdUTP/dTTP-Verhältnis gleich. Die beiden Stränge bleiben bei der Lösung in CsCl oder Cs_2SO_4 und der Zentrifugation im Gradienten umeinander gewunden und nehmen gemeinsam ihren isopyknischen Punkt ein, der dem Durchschnitt beider Dichten entspricht (z. T. dichtemarkierte DNA-Doppelstränge).

In einer zweiten Replikationsrunde entstehen wiederum dichtemarkierte Tochterstränge, was dazu führt, daß aus dem nicht dichtemarkierten Parentalstrang und einem neu synthetisierten, markierten Tochterstrang wieder teilweise dichtemarkierte Doppelstränge, aus dem dichtemarkierten Parental- und einem Tochterstrang aber ein voll dichtemarkierter DNA-Doppelstrang entsteht. Letzterer bewegt sich zu einem anderen, schwereren isopyknischen Punkt als der teilweise dichtemarkierte DNA-Doppelstrang. Der Nachweis einer doppelt BrdUTP-markierten DNA gilt als Nachweis für Initiation und Rereplikation in permeabilisierten Zellen. Zum besseren Nachweis wurde die DNA radioaktiv markiert. Die Analyse der Fraktionen im Flüssigszintillator ermöglichte bei permeabilisierten Zellen eine Puls-, Puls-Chase- oder Dauermarkierung mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ gleichzeitig oder nach einer BrdUTP-Markierung.

Der Nachweis BrdU- und ^{32}P -doppeltmarkierter DNA erforderte eine möglichst lange Markierungsdauer. Die zeitgleiche Doppelmarkierung der DNA mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ und BrdUTP führte zu einem mit steigender Markierungsdauer steigenden Anteil der doppelt BrdU-markierten DNA an der gesamten markierten DNA („Aufaddierung“). Die Dich-

temarkierung der DNA erfolgte gleichzeitig mit Permeabilisierung durch Zugabe von BrdUTP in einer Endkonzentration von 500 μM zum Inkubationsmedium. Die radioaktive Markierung erfolgte 30-360 min nach Permeabilisierung durch Zugabe von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$. Eine zu großflächige Ablösung des Zellrasens durch häufige Medienwechsel erforderte den Verzicht auf Nachmarkierung der DNA mit BrdUTP ohne $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ („Chase“). Die DNA wurde analog 3.2.5.2 vorbereitet, zusammen mit Referenz-DNA (^3H -Markierung, keine Dichtemarkierung) im CsCl-Gradienten isopyknisch aufgetrennt, in 40 Fraktionen aufgeteilt und im LSC ausgezählt (Abb. 32).

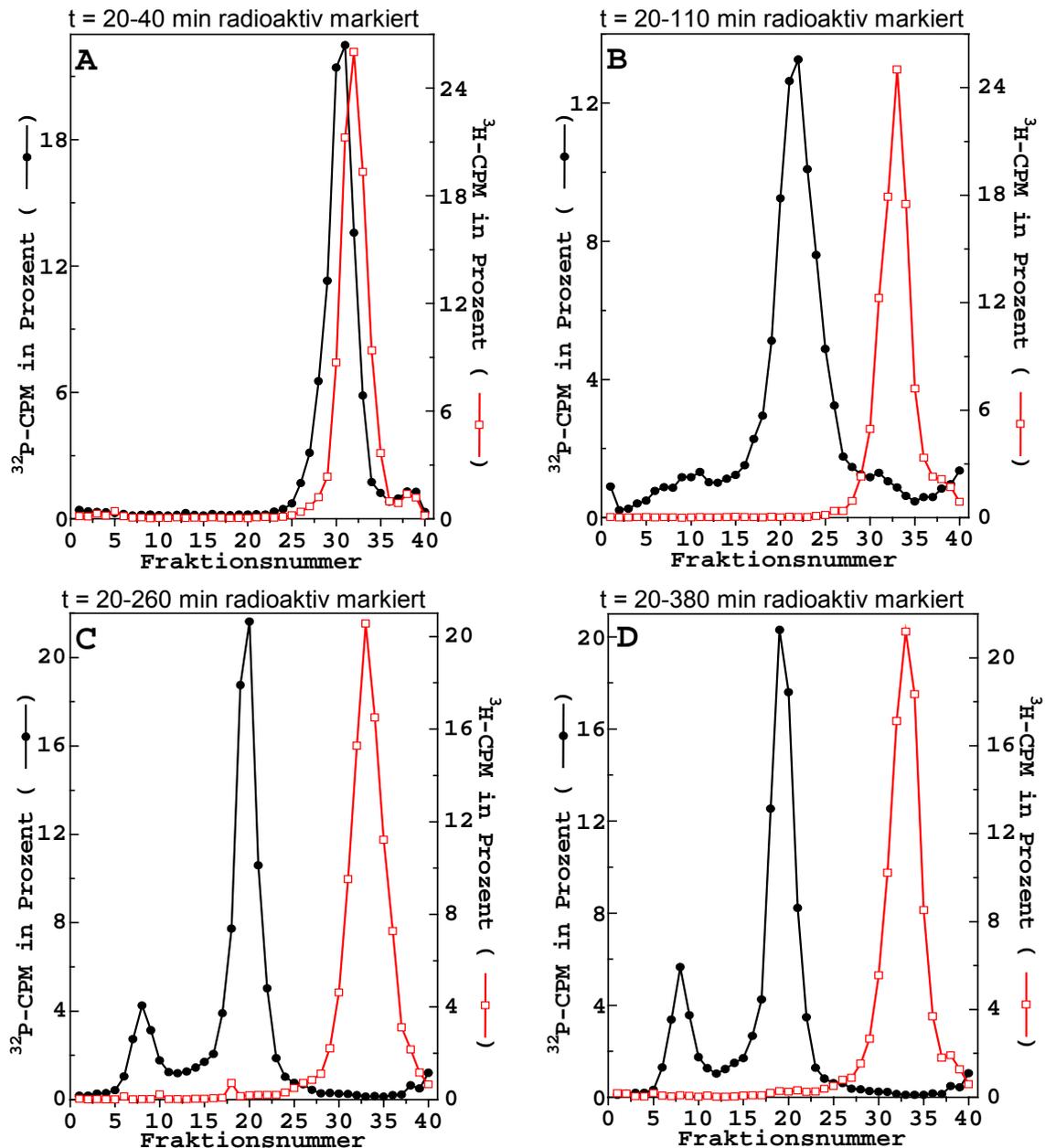


Abb. 32: CsCl-Gradienten dichtemarkierter DNA

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 90minütiger normoxischer Vorinkubation (3.2.3.1) nach 3.2.12.2. permeabilisiert und gleichzeitig nach 3.2.3.3 mit BrdUTP dichtemarkiert. 20 min nach Beginn der Permeabilisierung wurde die DNA durch Austausch des Mediums mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ für weitere 20 min (A), 90 min (B), 240 min (C) bzw. 360 min (D) zusätzlich radioaktiv und gleichzeitig weiterhin BrdU-dichtemarkiert. Nicht BrdU-markierte Vergleichs-DNA wurde durch Markierung wie oben vorbehandelter CV1-Zellen mit $[\text{Methyl-}^3\text{H}]\text{-Thd}$ nach 3.2.3.1 für 240 min *in vivo* normoxisch

gewonnen. 1/15 dieser Vergleichs-DNA wurde jeder Probe zugesetzt. „t“ beginnt mit Permeabilisierung. Zusammensetzung Medium: Standard + 400 μM BrdUTP, α -Toxin: 2800 hU/ml
 ^3H -Markierung: Vergleichs-DNA 240 min dauermarkiert, 6.7 % eingesetzt
 ^{32}P -Markierung: 20-360-min-Dauermarkierung, 20 min nach Permeabilisierungsbeginn
inges. Endkonz. im Markierungsansatz: 1233 Bq [^3H]-Thd/ μl , 2766 Bq [α - ^{32}P]-dATP/ μl ; Σ cpm:
[^3H], A, B, C, D: 11078, 11518, 11706, 12033; [^{32}P], A, B, C, D: 10785, 14427, 95117, 172136

Eine 40minütige Dichtemarkierung führte zur Verschiebung der Dichtemaxima der teilweise dichtemarkierten gegenüber der nicht dichtemarkierten Referenz-DNA um ca. $0,01 \text{ g/cm}^3$. Voll dichtemarkierte DNA (weitere Verschiebung um ca. $0,04$ - $0,05 \text{ g/cm}^3$) war noch nicht nachweisbar, eine 110minütige Dichtemarkierung führte zum ersten deutlichen Nachweis voll dichtemarkierter DNA, in diesem Fall um $0,039 \text{ g/cm}^3$ gegenüber der teilweise dichtemarkierten DNA verschoben (Daten nicht im Diagramm gezeigt).

Der Anteil voll dichtemarkierter DNA an der Gesamt-DNA stieg mit steigender Markierungszeit stetig. Ebenso stabilisierte sich die Dichteverschiebung der voll dichtemarkierten DNA: Gegenüber der hälftig dichtemarkierten DNA betrug die Verschiebung nach 260minütiger Dichtemarkierung $0,049 \text{ g/cm}^3$, was bei längerer Markierungsdauer konstant blieb. Die mittlere Dichteverschiebung zwischen nicht und hälftig dichtemarkierter DNA betrug in allen Dichtemarkierungen mit einem BrdUTP/dTTP-Verhältnis von 5:1 nach mindestens 90 min Dichtemarkierung $0,04372 \text{ g/cm}^3$. Die mittlere Dichteverschiebung (nach ebenfalls mindestens 90minütiger Dichtemarkierung) zwischen hälftig und voll dichtemarkierter DNA betrug $0,04388 \text{ g/cm}^3$. Beide Replikationsrunden hatten somit die gleiche dichteverschiebende Wirkung, der BrdUTP/TTP-Substitutionsgrad war somit in beiden DNA-Strängen gleich hoch.

Einbaukurven unter gleichen Bedingungen zeigten, daß die Replikation in normoxischen permeabilisierten Zellen über mindestens 3 h auf hohem Niveau unterstützt wurde und daß auch nach mehr als 2 h nach Permeabilisierung noch Initiationen stattfanden.

4.4 REPLIKATION IN PERMEABILISIERTEN ZELLEN UNTER HYPOXISCHEN BEDINGUNGEN

4.4.1 Zielsetzungen

Die DNA-Replikation unterliegt in allen Organismen der Kontrolle auf verschiedenen regulatorischen Ebenen. Eine regulatorische Ebene ist die An- oder Abschaltung der Initiation der Replikons in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck ($p\text{O}_2$) in der direkten Umgebung der Zellen (Brischwein 1997, Gekeler 1988, Probst 1989 und 1984, Probst 1980). Neben der Funktion als DNA-Baustein wird dCTP eine regulatorische Funktion bei der DNA-Replikation, möglicherweise als Bindeglied zwischen $p\text{O}_2$ und Initiation der Replikation zugeschrieben. Sinkt der dCTP-Spiegel, führt dies zur Hemmung der Replikoninitiationen (Probst 1999, Engelcke 1992). In CCRF-, HeLa- und Ehrlich-Aszites-Zellen läßt sich die Replikoninitiation durch Zugabe von dCyd zu hypoxischen Zellen wieder starten (Probst 1999, Brischwein 1997, Probst 1989).

In vivo ließ sich die Replikation SV40-infizierter CV1- bzw. TC7-Zellen durch transiente Hypoxie synchronisieren (Dreier 1993). Für permeabilisierte CV1-Zellen, in die alle für die Replikation benötigten dNTPs, auch dCTP, in ausreichender Menge hineindiffundieren können, sollte ein Replikationsblock durch Hypoxie unmöglich sein. Nach hypoxi-

scher Permeabilisierung sollten hypoxische Zellen deshalb wieder mit Initiationen beginnen.

Ascorbat und Ascorbatoxidase in permeabilisierten Zellen

Um den Sauerstoffpartialdruck (pO_2) in permeabilisierten Zellen möglichst schnell und effizient zu reduzieren, wurden mehrere Verfahren untersucht:

Hypoxische Begasung allein verursachte ein Absinken des pO_2 im Inkubationsmedium erst nach langer Zeit (> 12 h mit 200 ppm O_2 bei 37°C, s. 3.2.12.3). Danach konnte das Inkubationsmedium die Replikation nicht mehr ausreichend unterstützen.

Wurde die Reduktion des pO_2 durch hypoxische Begasung des Permeabilisierungsmediums über einer Zellkultur (Unterstützung durch Zellatmung !) unterstützt, begann der Hypoxieblock bereits nach 3-4 h. Dies war zu lang, als das die Replikation durch das Permeabilisierungsmedium noch ausreichend unterstützt werden konnte.

Die pO_2 -Reduktion durch chemische Stoffe (beispielsweise Dithionit) wurde in *in-vitro*- und zellpermeabilisierenden Systemen wiederholt untersucht. In α -Toxin - permeabilisierten CV1-Zellen beeinträchtigten pO_2 -reduzierende Chemikalien die Replikation der permeabilisierten Zellen jedoch zu stark (vgl. auch Trummler, 1994).

Die pO_2 -Verminderung durch natürliche Oxidasen war eine Möglichkeit, schnell und schonend Hypoxie im Inkubationsmedium zu etablieren. Zahlreiche in der Natur vorkommende Oxidasen (Superoxid-Dismutase) produzieren jedoch O° - oder $O_2^{\circ-}$ - bzw. O_2 -Radikale. Deren hochkonzentriertes Auftreten verbot den Einsatz dieser Oxidasen in permeabilisierten Zellen, da zu beobachtende Effekte durch Beeinträchtigungen der Nukleotid-Pools und der Störung der Replikation verfälscht wurden.

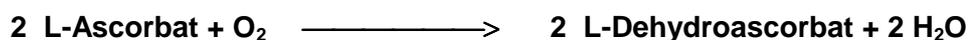
Ascorbat und Ascorbatoxidase [EC 1.10.3.3: L-Ascorbat: Sauerstoff-Oxireduktase] wurden mehrfach in *in-vitro*- und zellpermeabilisierenden Systemen verwendet (Nakamura 1968) und können in großen Mengen gewonnen bzw. beschafft werden. Mehrere Vorversuche zeigten, daß beide Substanzen die Replikation permeabilisierter CV1-Zellen nicht beeinträchtigten. Die Zugabe von 700 μM Ascorbat, 2U/ml Ascorbatoxidase und 1400 μM $NaHCO_3$ führte zur pO_2 -Senkung auf unter 2000 ppm in wenigen Minuten.

4.4.2 O_2 -Messungen mit der Clark-Elektrode

4.4.2.1 Messungen in Permeabilisierungsmedium

Mit Hilfe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase wurde in beliebigen wäßrigen Medien Hypoxie viel schneller etabliert als durch einfache Begasung (Gkantiragas, 1997).

Bei 37°C beträgt die O_2 -Konzentration in einer isotonischen Kochsalzlösung ca. 170 μM (Truesdale and Downing, 1954). Betrachtet man das stöchiometrische Verhältnis, mit dem Ascorbinsäure unter Mithilfe von Ascorbatoxidase nach der Reaktionsgleichung



oxidiert und der Sauerstoff zu H_2O reduziert wird, werden 340 μM Ascorbinsäure benötigt, um allen gelösten Sauerstoff aus einer mit atmosphärischem O_2 äquilibrierten wäßrigen Lösung zu entfernen.

Bei Vorinkubation des Permeabilisierungsmediums in einem Glasgefäß in einer separaten Begasungskammer aus Aluminium (3.2.12.3) und Überführung dieses Mediums mit einer kleinen Glasspritze zum Inkubationsgefäß kommen weitere, aus der Umgebungsluft hineindiffundierende Anteile Sauerstoff hinzu, die bei Berechnung der benötigten Ascorbinsäurekonzentration mitberücksichtigt werden müssen.

Der pO_2 in einem Medium oder in Wasser wurde mit Hilfe einer Clark- O_2 -Elektrode nach Eichung mit Na-Dithionit untersucht (Tab. 3).

Tabelle 3: Veränderung des pO_2 durch Zugabe von Ascorbinsäure, Ascorbatoxidase + $NaHCO_3$ zu Wasser und Inkubationsmedium mit und ohne α -Toxin

O_2 -Reduktion in	O_2 -Reduktion durch	Endpunkt	Zeit bis Erreichung des Endpunktes
Wasser	10 mM Na-Dithionit	< 1000 ppm O_2	2 min
Wasser	700 μ M Ascorbat, 1,4 μ M $NaHCO_3$, 2 U/ml Ascorbatoxidase	< 1000 ppm O_2	3,5 min
Permeabilisierungsmedium	10 mM Na-Dithionit	Kein definierter Endpunkt	Dynamischer, länger dauernder Prozeß
Permeabilisierungsmedium	300 μ M Ascorbat, 1 U/ml Ascorbatoxidase, 600 μ M $NaHCO_3$	40000 ppm O_2	> 30 min
Permeabilisierungsmedium	500 μ M Ascorbat, 1 U/ml Ascorbatoxidase, 1000 μ M $NaHCO_3$	< 1000 ppm O_2	8 min
Wasser	500 μ M Ascorbat, 1 U/ml Ascorbatoxidase, 1000 μ M $NaHCO_3$	< 1000 ppm O_2	8 min
Inkubationsmedium ohne α -Toxin	700 μ M Ascorbat, 2 U/ml Ascorbatoxidase, 1400 μ M $NaHCO_3$	< 1000 ppm O_2	4.5 min
Permeabilisierungsmedium	700 μ M Ascorbat, 2 U/ml Ascorbatoxidase, 1400 μ M $NaHCO_3$	< 500 ppm O_2	4.5 min

Na-Dithionit reduzierte den in Wasser und Permeabilisierungsmedium gelösten Sauerstoff innerhalb von 2 min um mehr als 99.5% des Ausgangswertes, was einem Gleichgewicht mit 1000 ppm O_2 in der Gasphase entspricht.

340 μ M Ascorbinsäure müßten nach Truesdale und Downing, 1954, die exakte Titration des O_2 , der bei 37°C im Medium gelöst ist, ermöglichen. Mit 340 μ M Ascorbinsäure konnten aber hypoxische Verhältnisse (Gleichgewicht mit \leq 2000 ppm O_2 in der Gasphase) nicht etabliert werden. Selbst nach Inkubationszeiten von mehr als 30 min sank der pO_2 nur auf 20% des Ausgangswertes. Nach Zugabe weiterer Ascorbinsäure, wurde der verbliebene Sauerstoff weitestgehend verbraucht.

Bei Zugabe von 500 μ M Ascorbinsäure und 1U/ml Ascorbatoxidase zum Permeabilisierungsmedium wurde der gelöste Sauerstoff innerhalb von 8 min bis zum Grenzwert verbraucht. Das Medium blieb auch danach für längere Zeit hypoxisch.

In Wasser wurde Sauerstoff ebenso in 8 min durch 500 μ M Ascorbinsäure wirksam verbraucht. Die sonstigen Bestandteile des Permeabilisierungsmediums übten offenbar keinen Einfluß auf die pO_2 -Reduktion durch Ascorbinsäure aus.

Sowohl in Inkubationsmedium ohne α -Toxin als auch in komplettem Permeabilisierungsmedium mit α -Toxin wurde der pO_2 durch 700 μ M Ascorbinsäure und 2 U/ml Ascorbatoxidase in 4.5 min auf \leq 1000 ppm verringert. Auch bei längerer Inkubation blieb die O_2 -Konzentration auf hypoxischem Niveau.

Sowohl für Wasser als auch für Permeabilisierungsmedium konnte gezeigt werden, daß Ascorbinsäure in Verbindung mit Ascorbatoxidase in wenigen Minuten einen hypoxischen Zustand erzeugen und unterstützen kann. Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase wurden deshalb zur Unterstützung von Hypoxie standardisiert verwendet.

4.4.2.2 Messungen in DMEM

Zu Vergleichszwecken wurden die Effekte von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase auf DMEM mit der Clark-Elektrode verfolgt (Tab. 4).

Tabelle 4: Veränderung des pO_2 durch Zugabe von Ascorbinsäure, Ascorbatoxidase und $NaHCO_3$ zu DMEM

O_2 -Reduktion in	O_2 -Reduktion durch	Endpunkt	Zeit bis Erreichung des Endpunktes
DMEM	500 μ M Ascorbat, 1000 μ M $NaHCO_3$, 1 U/ml Ascorbatoxidase	ca. 5000 ppm	2 min
DMEM	700 μ M Ascorbat, 1400 μ M $NaHCO_3$, 2 U/ml Ascorbatoxidase	ca. 5000 ppm	1.5 min
DMEM	900 μ M Ascorbat, 1800 μ M $NaHCO_3$, 2.5 U/ml Ascorbatoxidase	ca. 5000 ppm	1.5 min

Durch Zugabe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase zu DMEM war eine O_2 -Reduktion auf 2.6% möglich (entspricht einem Gleichgewicht mit 5000 ppm O_2 in der Gasphase). Dieser Endpunkt wurde bereits 1.5 min nach Zugabe erreicht. Eine stärkere O_2 -Reduzierung wurde auch durch Erhöhung der Ascorbinsäure-Konzentration nicht erreicht. Dies hängt mit der Zusammensetzung des fertigen DMEM zusammen, in dem u.a. auch zahlreiche Proteine (aus dem zugesetzten FKS) gelöst sind. Diese Proteine oder andere Substanzen im FKS (Vitamine, Aminosäuren, etc.) haben evtl. die Eigenschaft, O_2 zu binden und speichern. Unter Berücksichtigung der O_2 -Dissoziationskonstante der Ascorbatoxidase ($K_{m_{Ascorbatoxidase/O_2}} = 35$ mM O_2 , Gkantiragas, 1997) waren Ascorbat und Ascorbatoxidase bei geringem pO_2 offenbar nicht in der Lage, diesen Restsauerstoffgehalt zügig weiter zu verringern. Die Messung in zellfreiem DMEM legt nahe, daß die Unterschreitung von 5000 ppm O_2 bei Einsatz von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase für mindestens 60 min verhindert wird. In Zellkulturen kann durch Zellatmung und hypoxischer Begasung mit 200 ppm O_2 der pO_2 auf deutlich unter 5000 ppm verringert werden.

Ein Verbrauch der Ascorbinsäure in Zellkulturen durch Prozesse, die keinen Einfluß auf den pO_2 haben, kann nicht ausgeschlossen werden. Da auch erneute Zugaben so-

wohl von Ascorbatoxidase als auch von Ascorbinsäure keine weitere Absenkung des pO_2 zur Folge hatten, kann wahrscheinlich ausgeschlossen werden, daß im FKS evtl. enthaltene Proteasen zur Inaktivierung der Ascorbatoxidase führen.

4.4.2.3 Wirkung von Na_2 -Dithionit in Kulturmedium

Die Wirkungen, die die Zugabe von Na-Dithionit zu Zellkulturen und zu DMEM auslöste, sind paradox (Trummler, 1995, Uhlmann, 1995): Nach der Zugabe sank der gemessene pO_2 zunächst schnell ab, um nach wenigen Minuten wieder auf ca. 60% des normoxischen pO_2 anzusteigen. Um mit Hilfe der Clark- O_2 -Elektrode diese Effekte zu untersuchen, wurden die Wirkungen von Na-Dithionit in Wasser, Permeabilisierungsmedium und DMEM in An- und Abwesenheit von Ascorbat und Ascorbatoxidase untersucht (Tab. 5).

Tabelle 5: Veränderung des pO_2 durch Zugabe von Ascorbinsäure, Ascorbatoxidase, $NaHCO_3$ + Na-Dithionit zu DMEM, Wasser und Inkubationsmedium

O_2 -Reduktion in	O_2 -Reduktion durch	Beschreibung d. beobachteten Effektes
Wasser	1. Ascorbat, $NaHCO_3$, Ascorbatoxidase, 2. Na-Dithionit	O_2 -Reduktion durch Ascorbat innerhalb von 1.5 min auf <1000 ppm, nach Zugabe von Na-Dithionit starke Erhöhung des gemessenen pO_2 auf ca. 30%.
Permeabilisierungsmedium	1. Ascorbat, $NaHCO_3$, Ascorbatoxidase 2. Na-Dithionit	O_2 -Reduktion durch Ascorbat innerhalb von 2 min auf <1000 ppm, nach Zugabe von Na-Dithionit starke Erhöhung des gemessenen pO_2 auf ca. 30%
DMEM	1. Ascorbat, $NaHCO_3$, Ascorbatoxidase 2. Na-Dithionit	O_2 -Reduktion durch Ascorbat innerhalb von 3 min auf \approx 5000 ppm, nach Zugabe von Na-Dithionit starke Erhöhung des gemessenen pO_2 auf >60%

Nach anfänglicher pO_2 -Verringerung mit Hilfe von Ascorbinsäure, $NaHCO_3$ und Ascorbatoxidase wurde nach Stabilisierung des pO_2 Na-Dithionit zugegeben. Dadurch kehrte sich, insbesondere in DMEM, in etwas geringerem Ausmaß aber auch in Wasser und Inkubationsmedium der Prozeß der O_2 -Reduktion scheinbar um, es erhöhte sich der pO_2 umso mehr, je mehr Na-Dithionit zugegeben wurde. In DMEM war dieser Effekt so stark, daß bis zu 90% des vor Versuchsbeginn vorhandenen pO_2 gemessen wurde. Auch ohne vorherige Zugabe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase führte die Zugabe von Na-Dithionit zu DMEM nach initialer pO_2 -Verringerung zu einer Erhöhung des pO_2 im weiteren Verlauf. Die Ursache wurde nicht näher untersucht, es sind mehrere Reaktionen zwischen Na-Dithionit und Ascorbinsäure, insbesondere in Verbindung mit den im DMEM über FKS vorkommenden Proteinen denkbar.

4.4.3 Etablierung von Hypoxie in permeabilisierten CV1-Zellen

Wie bereits in 3.2.13.3 und 3.2.13.4 ausgeführt und aufgrund der Tatsache, daß wegen der Ablösung SV40-infizierter, permeabilisierter CV1-Zellen von Glasschälchen unter Hypoxie Kunststoffschalen aus Polystyrol (PS) verwendet werden mußten, war es notwendig, neue Versuchsprotokolle zu entwickeln, um ein ausreichendes Absinken der Replikation unter Hypoxie zu erreichen. O₂ löst sich in PS und wird während der Hypoxie unkontrolliert abgegeben. In der „Karussell“ genannten Begasungseinrichtung wurden SV40-infizierte CV1-Zellen nach Permeabilisierung verglichen (Abb. 33).

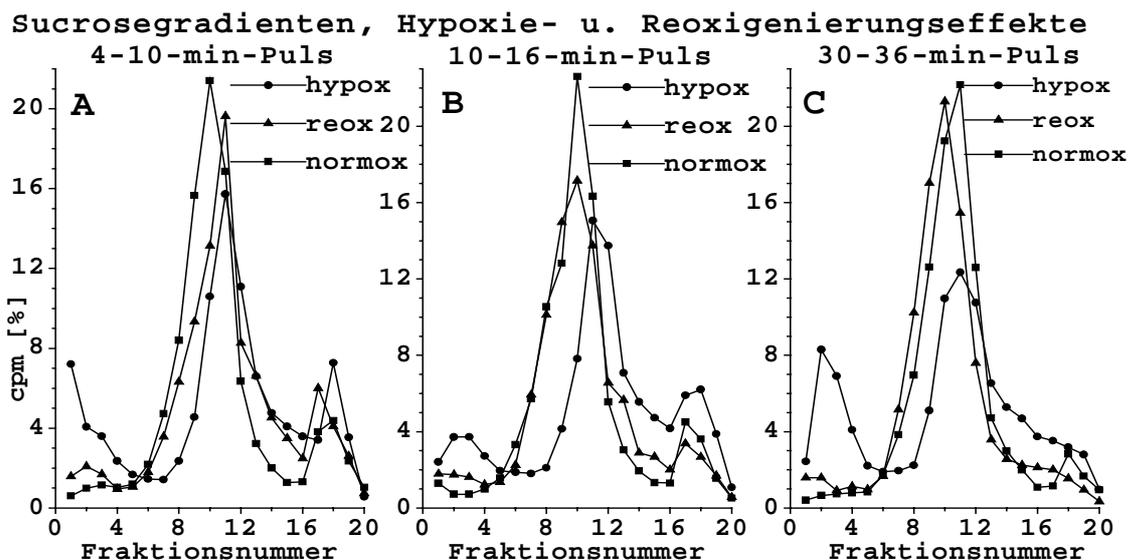


Abb. 33: Überprüfung von Hypoxie- und Reoxigenierungseffekten im SW40-Sucrosegradienten
 SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1.5stündiger normoxischer Vorinkubation 6 h hypoxisch begast („hypox“ + „reox“) oder 3 h normoxisch begast („normox“). Anschließend wurde hypoxisch („hypox“ + „reox“) oder normoxisch („normox“) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und in 6 min [α -³²P]-dATP pulsmarkiert. Beginn der Pulsmarkierung war 4, 10 und 30 min nach Permeabilisierungs- bzw. Reoxigenierungsbeginn. Reoxigenierung 10 min nach Permeabilisierungsbeginn durch Medien- und Begasungswechsel. α -Toxin: 1160-1440 hU/ml, ³²P-Markierung: 6-min-Pulsmarkierung einges. Endkonz. im Markierungsansatz: 2300 (hypox), 1150 (reox) bzw. 2950 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l
 Σ cpm: hypox: 4, 10, 30 min: 12949.75, 4269.25, 3620.5; reox: 4, 10, 30 min: 16503, 19773, 27055; normox: 4, 10, 30 min: 33944, 25616, 41821

Die DNA-Längenanalysen der hypoxischen, der reoxigenierten und der normoxisch permeabilisierten Vergleichszellen im Sucrosegradienten unterscheiden sich nur wenig. Eine Verschiebung der Fraktion, in der sich die höchste Radioaktivität befindet wäre jedoch zu erwarten gewesen (Dreier, 1995). Werden SV40-infizierte CV1-Zellen auf Kunststoffpetrischalen kultiviert, reichen 6 h hypoxische Begasung mit 200 ppm offensichtlich nicht aus, damit der niedrige pO₂ die Replikation hemmt.

Mit dem Ziel, die Dauer hypoxischer Begasung in akzeptablem Rahmen zu halten und gleichzeitig die hypoxieinduzierte Replikationshemmung zu erreichen, wurde die Bauart des Karussells und aller sonstigen Begasungskammern für Kunststoffpetrischalen optimiert (vgl. 3.2.12.4). Dadurch konnten hypoxische Zustände bei nur wenig verlängerter Begasungsdauer erreicht werden (Abb. 34 A und B).

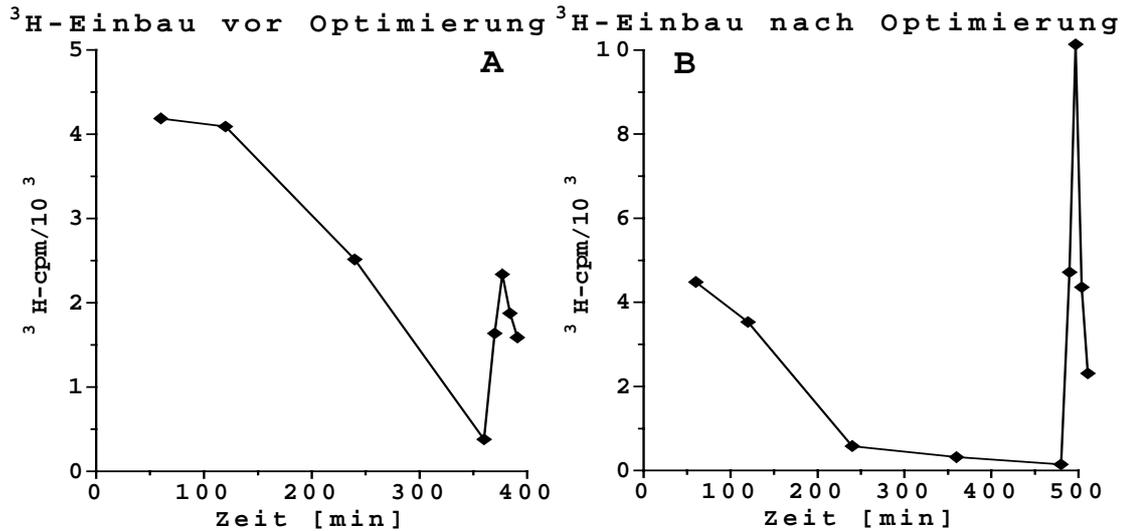


Abb. 34: Hypoxie und Reoxigenierung von SV40-infizierten CV1-Zellen in Kunststoffschalen
 CV1-Zellen wurden direkt nach SV40-Virusinfektion 34.5 h normoxisch mit [¹⁴C]-Thd im Brutschrank dauermarkiert (analog 3.2.3.1 und Riedinger, 1991). Nach weiteren 1.2 h normoxischer Vorinkubation im Wärmerraum wurden die Proben im Karussell alter Bauart 6.5 h (A) bzw. im Karussell neuer Bauart 8 h (B) hypoxisch begast. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von ¼ Vol. O₂-gesättigtem DMEM reoxigeniert. Zu verschiedenen Zeiten unter Hypoxie bzw. nach Reoxigenierung wurde 10 min mit [Methyl-³H]-Thd pulsmarkiert.
 Zusammensetzung des Mediums: DMEM, keine Permeabilisierung, α-Toxin: keines
¹⁴C-Markierung: 36 h normoxische Dauermarkierung direkt nach SV40-Infektion der CV1-Zellen
³H-Markierung: 10-min-Pulse mit [Methyl-³H]-Thd *in vivo* hypoxisch bzw. reoxigeniert
 einges. Endkonz. im Markierungsansatz: 256 Bq [³H]-Thd/µl DMEM, 4.7 Bq [¹⁴C]-Thd/µl DMEM

Wie Abb. 34 A gezeigt, waren bei Verwendung des Karussells alter Bauart und von Kunststoffpetrischalen 6.5 h Hypoxie gerade ausreichend, die hypoxieinduzierte Replikationshemmung zu erreichen. Diese Begasungszeit reichte jedoch nicht aus, die Replikons hinreichend lange aufzustauen; der Einbau nach Reoxigenierung erreichte den normoxischen Vergleich (nicht gezeigt, jeweils bei ca. 5000 ³H-cpm) nicht.

Nach der in 3.2.12.4 beschriebenen Veränderung der Konstruktion der Begasungskammern wurde bereits nach 4 h hypoxischer Begasung eine gute Replikationshemmung erreicht. Nach weiteren 2-3 h (>7 h Hypoxie) fand darüber hinaus ein beachtlicher Aufstau an initiationsbereiten Replikons statt, nach Reoxigenierung wurde der normoxische Vergleich um mehr als 100% übertroffen (nicht gezeigt).

4.4.4 Allgemeine Wirkungen von Hypoxie auf die SV40-Replikation in CV1-Zellen

4.4.4.1 Übersicht

Hypoxische Bedingungen bei ganzen Zellen wurden durch Begasung mit hypoxischem Gas (150-2000 ppm O₂) incl. 5% CO₂ etabliert. Die beschleunigte Verringerung des Sauerstoffpartialdrucks (pO₂) wurde durch Zugabe von Enzymen erreicht (s. 4.4.1).

Die einfache hypoxische Begasung permeabilisierter Zellen erfolgte ohne CO₂, die Verringerung des pO₂ konnte chemisch oder durch Enzyme beschleunigt werden.

Die Reoxygenierung erfolgte entweder nach hypoxischer Begasung der ganzen Zelle (*in vivo*) durch normoxische Permeabilisierung oder nach hypoxischer Permeabilisierung durch Ersatz des hypoxischen durch normoxisches Permeabilisierungsmedium (*ex vivo*).

Darüber hinaus konnten hypoxische permeabilisierte Zellen wegen des geringen Volumens (geringe Schichtdicke) des Permeabilisierungsmediums in wenigen Minuten auch durch beschleunigte Begasung mit reinem O₂ reoxygeniert werden.

4.4.4.2 Toxizität von Ascorbatoxidase und Ascorbinsäure in permeabilisierten Zellen

In dieser Arbeit wurde die Etablierung der Hypoxie permeabilisierter Zellen i. d. R. durch Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase unterstützt. Zuvor wurde untersucht, ob die käuflich zu erwerbenden Ascorbatoxidase-Präparationen (von Boehringer oder Sigma) für den Einsatz in permeabilisierten CV1-Zellen ausreichend rein vorliegen oder toxisch wirken, da im käuflichen Rohextrakt weitere Inhaltsstoffe vorhanden sind. In diesem Fall wäre eine weitere Aufreinigung erforderlich (Abb. 35).

Einfluß der Ascorbatoxidase

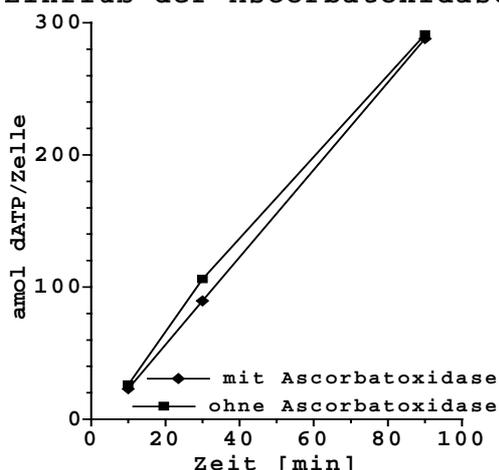


Abb. 35: Einfluß von Ascorbatoxidase

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 permeabilisiert und gleichzeitig in 10-90 min [α -³²P]-dATP-dauermarkiert.

Zusammensetzung d. Mediums: Standard + 20U/ml Ascorbatoxidase, α -Toxin: frisch dialys., 149 hU/ml ³H-Markierung: 38 h Dauermarkierung *in vivo*
³²P-Markierung: 10-, 30- und 90-min-Dauermark.

Einges. Endkonzentrationen im Markierungsansatz:
 1.67 Bq [³H]-Thd/ μ l, 780 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Nach 90 min Dauermarkierung unter normoxischer Begasung wurden selbst bei Zugabe der 10fachen Normal-Dosis des Ascorbatoxidase-Rohextraktes zum Inkubationsmedium keine toxische Wirkungen auf permeabilisierte CV1-Zellen festgestellt.

Ascorbinsäure und NaHCO₃ wurden ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen in normoxischen permeabilisierten CV1-Zellen getestet. Hierbei zeigten sie einzeln und in Kombination nur geringe Auswirkungen auf die Replikation. Mit steigender Ascorbinsäurekonzentration (ohne NaHCO₃) wurde das Permeabilisierungsmedium zunehmend saurer, was die Replikation verringerte. Bei einem Ascorbat/NaHCO₃-Verhältnis von 1:2 war die pH-Veränderung des Inkubationsmediums gering. 1000 μ M Ascorbat und 2000 μ M NaHCO₃ führten zu Replikationseinbußen von lediglich <6%. Die Zugabe von Ascorbinsäure zum Inkubationsmedium unter normoxischer Begasung führte ohne Ascorbatoxidase zu keiner pO₂-Reduktion, toxische Wirkungen wurden nicht beobachtet. Abb. 36 verdeutlicht den Einfluß von Ascorbinsäure, NaHCO₃ und >0.3 U/ml Ascorbatoxidase:

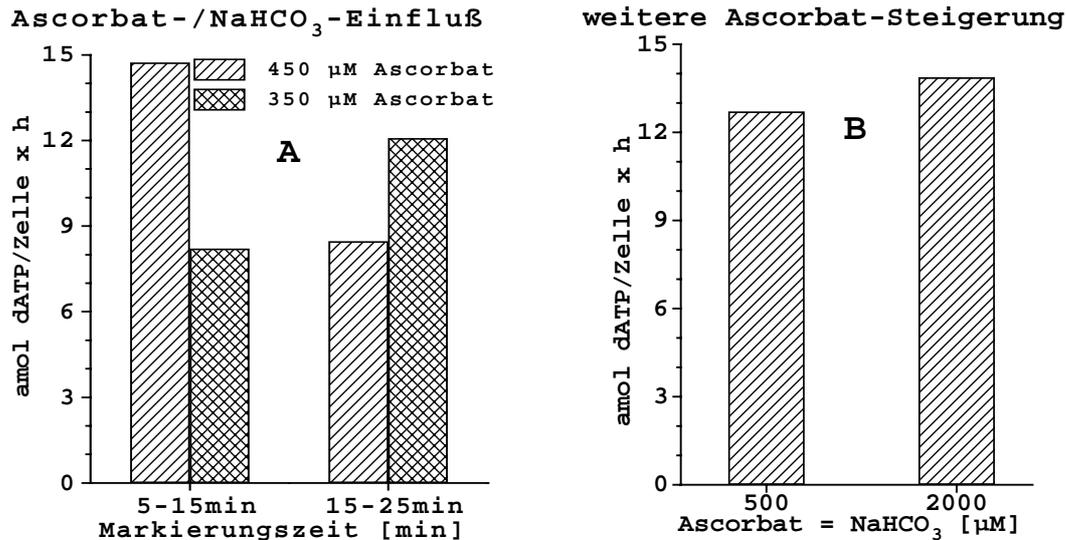


Abb. 36: Wirkung von Ascorbinsäure, Ascorbatoxidase und NaHCO₃ unter Hypoxie

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach einstündiger normoxischer Inkubation im Wärmerraum 7 h hypoxisch begast und nach 3.2.12.2 hypoxisch mit 350-2000 µM Ascorbinsäure, der doppelten Konzentration an NaHCO₃ und 1-4 U/ml Ascorbatoxidase permeabilisiert. 5-15 min und 15-25 min (A) bzw. 8-12 min (B) danach wurde gemäß 3.2.3.2 mit [α -³²P]-dATP pulsmarkiert und die Replikation anschließend sofort abgestoppt. Vorbehandlung der Zellen: 7 h hypoxische Begasung
Medienzusammensetzung: Standard + Ascorbinsäure, NaHCO₃, Ascorbatoxidase. α -Toxin: a: 230 hU/µl, b: 386 hU/ml. ³²P-Markierung: 10- bzw. 4-min-Pulsmarkierung permeabilisiert hypoxisch
Eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 1460 bzw. 1230 Bq [α -³²P]-dATP/µl

Die Zugabe von 500 µM Ascorbinsäure und NaHCO₃ und 1 U/ml Ascorbatoxidase führte bei gleichzeitiger hypoxischer Begasung mit 200 ppm O₂ schon nach 20-30 min zu einer Reduktion des dATP-Einbaus auf 5-8% des normoxischen Vergleichs (vgl. 4.3.2.3, Abb. 30 A). Die Steigerung der Endkonzentration von Ascorbinsäure und NaHCO₃ von 350 auf 450 µM (weiter 1 U/ml Ascorbatoxidase) führte erst nach 10-15 min eine weitere Verringerung des ³²P-Einbaus, die Kapazität von 350 µM Ascorbinsäure und NaHCO₃ reichte bei 15minütiger Vorinkubation des Permeabilisierungsmediums und Überführung auf die Zellen in einer Glasspritze bis zu diesem Zeitpunkt aus. Eine Steigerung der Ascorbinsäurekonzentration über 500 µM hinaus bewirkte kurz nach hypoxischer Permeabilisierung keine weitere Reduktion des Einbaus, der pO₂ verringerte sich nicht weiter (K_M Ascorbatoxidase = 35 µM, Gkantiragas 1997). Dadurch stieg jedoch sofort die Kapazität des hypoxischen Permeabilisierungsmediums gegen O₂-Eintrag.

Toxische Wirkungen von Ascorbinsäure oder NaHCO₃ wurden nicht nachgewiesen.

SV40-infizierte CV1-Zellen, die 7 h hypoxisch begast worden waren und mit normoxischem Inkubationsmedium permeabilisiert wurden, wiesen das 4-7fache, CV1-Zellen, die nach 7 h hypoxischer Begasung durch Inkubationsmedium permeabilisiert wurden, dessen O₂-Gehalt durch 30minütige hypoxische Begasung reduziert wurde, wiesen das 2-4fache des oben beschriebenen Einbaus auf (nicht gezeigt).

Die Zugabe von 2000 µM Ascorbinsäure bewirkte bei längeren Dauermarkierungen (60-120 min nach hypoxischer Permeabilisierung) einen geringeren Einbau als die Zugabe von 500 µM Ascorbinsäure (jeweils 4U/ml Ascorbatoxidase, Abb. 37).

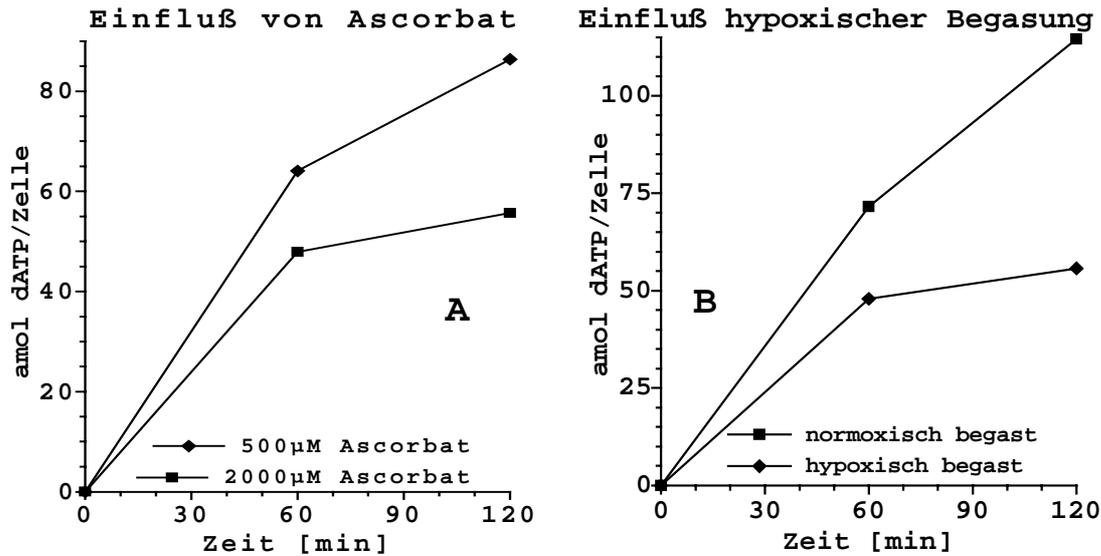


Abb. 37: Variation der Ascorbinsäure-Konzentration und der Begasungsart

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 4stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 hypoxisch (a + b) oder normoxisch (b, „euox.“) permeabilisiert und gleichzeitig 0-120 min [α -³²P]-dATP-dauermarkiert; α -Toxin: 2100 hU/ml
 Zusammensetzung des Mediums: Standard + 500-2000 μ M Ascorbat, NaHCO₃, 1-4 U/ml AO
³H-Markierung: 4 h Dauermarkierung *in vivo* normoxisch
³²P-Markierung: 0-120-min-Dauermarkierung hypoxisch oder normoxisch permeabilisiert
 Einges. Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 26.4 Bq [³H]-Thd/ μ l, 398 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Normoxische Begasung führte nach Zugabe von 2000 μ M Ascorbinsäure, 4000 μ M NaHCO₃ und 4 U/ml Ascorbatoxidase nach 120minütiger Dauermarkierung zum doppelten Einbau im Vergleich zur hypoxischen Begasung. Die Einbaurate blieb aber um 70% unter dem normoxischen Vergleich ohne Ascorbinsäure (vgl. Abb. 5 bzw. 4.2.2.1).

Diese und die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse führten zur standardmäßigen Unterstützung der Hypoxie in permeabilisierten Zellen nach 3.2.12 durch Zugabe von 700 μ M Ascorbinsäure, 1400 μ M NaHCO₃ und 2 U/ml Ascorbatoxidase.

4.4.5 Permeabilisierung normoxischer CV1-Zellen mit anschließender Hypoxie

4.4.5.1 Hypoxie durch Begasung allein

Ohne Unterstützung durch Ascorbinsäure, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase verringerte sich der pO₂ durch Begasung nur langsam. Nach Permeabilisierung normoxischer Zellen durch 30 min hypoxisch vorbe-gastes Permeabilisierungsmedium bei hypoxischer Begasung sank dennoch bereits nach 1,5 h der ³²P-Einbau in die DNA ab (Abb. 38).

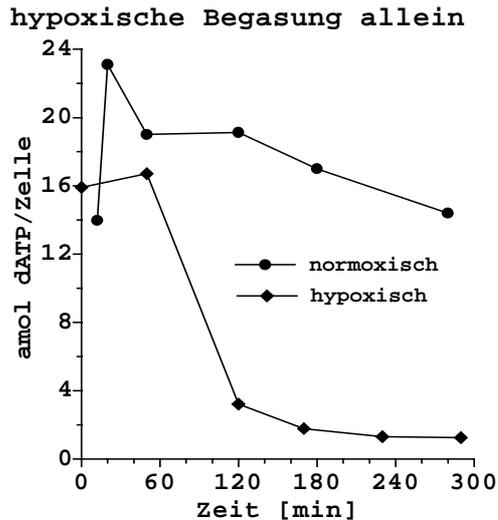


Abb. 38: ohne Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase hypoxisch permeabilisierte normoxische Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 5stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd (3.2.3.1) durch normoxisches oder hypoxisch vorbe-gastes Permeabilisierungsmedium nach 3.2.12.2 permeabilisiert und mit [α -³²P]-dATP in 10 min puls-markiert. Der normoxische Vergleich wurde aus einer Dauermarkierung errechnet. Vorbehandlung der hypoxisch begasteten Zellen: 5 h normoxische Begasung vor hypoxischer Permeabilisierung, Inkubationsmedi-um ca. 30 min hypoxisch begast. α -Toxin: 1670 hU/ml ³H-Markierung: 5 h Dauermarkierung *in vivo*, ³²P-Markierung: 10-min-Pulsmarkierung
Eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 18.5 Bq [³H]-Thd/ μ l, 285 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Nach 60 min hypoxischer Begasung war noch keine Verringerung des Einbaus feststellbar, die Reduktion des O₂ im Medium allein mit Hilfe der Zellatmung erfolgte wesentlich langsamer als nach Zugabe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase. 120 min nach Beginn der hypoxischen Permeabilisierung war der Einbau gegenüber dem normoxischen Vergleich bereits um 80%, nach 3 h um 90% reduziert. Die Replikation permeabilisierter, SV40-infizierter CV1-Zellen konnte auch ohne Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase allein durch hypoxische Begasung gehemmt werden. Die Toleranz des Systems gegen Sauerstoffeintrag war geringer und die Zeit bis zur Hemmung der Replikation war höher als nach Zugabe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase. Außerdem verharrte der Einbau auf einem höheren Niveau als mit Ascorbinsäure.

4.4.5.2 Ascorbinsäure- und Ascorbatoxidase-Wirkung auf SV40-infizierte CV1-Zellen mit und ohne hypoxische Begasung

Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) in Medien wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Dies sind neben anderen hypoxische Begasung, Zugabe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase und die Veratmung des Sauerstoffs durch Zellen in Kultur. Durch hypoxische Begasung allein verringert sich der pO₂ langsamer als unter Mitwirkung der Stoffwechsellistung von Zellen. Die Veränderung des pO₂ durch hypoxische Begasung und Zugabe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase ohne Mitwirkung von Zellen wurde bereits in 4.4.2 beschrieben. Die Zugabe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase zu 10 min zuvor permeabilisierten, SV40-infizierten CV1-Zellen bewirkte eine beschleunigte Absenkung des pO₂. Der Verlauf des dATP-Einbaus in die DNA permeabilisierter Zellen wurde mit und ohne Zugabe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase und unter hypoxischer und normoxischer Begasung untersucht (Abb. 39).

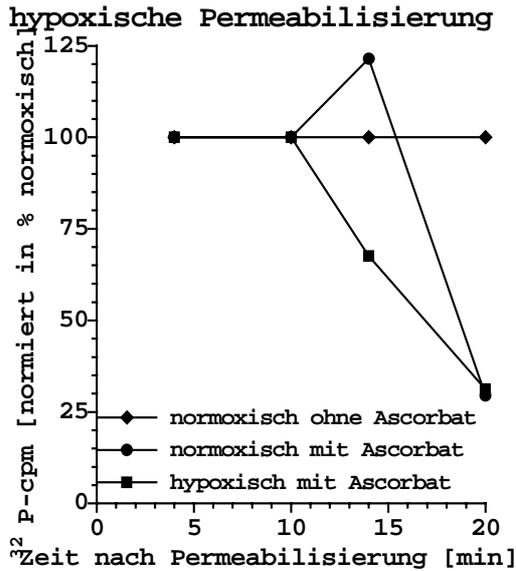


Abb. 39: normoxische + hypoxische Begasung mit Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3ständiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 normoxisch permeabilisiert. 10 min nach Permeabilisierung erfolgte die Zugabe von Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase, die DNA wurde in 4minütigen Pulsen mit [α-³²P]-dATP markiert. Die Darstellung wurde normiert auf % des normoxischen Vergleichs. α-Toxin: 2780 hU/ml
Medienzusammensetzung: Standard + 0.7 mM Ascorbat, 1.4 M NaHCO₃, 2 U/ml Ascorbatoxidase
³H-Markierung: 3 h Dauermarkierung normoxisch, ³²P-Markierung: 4-min-Pulsmarkierung
Eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 12.3 Bq [³H]-Thd/μl, 923 Bq [α-³²P]-dATP/μl

Nach Zugabe von Ascorbinsäure auf 700 μM, NaHCO₃ auf 1400 μM und Ascorbatoxidase auf 2 U/ml sank der ³²P-Einbau in die DNA bei hypoxischer Begasung schnell gegenüber dem normoxischen Vergleich auf 25% ab. Bei normoxischer Begasung stieg der ³²P-Einbau zunächst leicht an, mit Verzögerung von 5 min sank auch hier der Einbau auf ca. 25% des normoxischen Vergleichs.

Durch Kombination von hypoxischer Begasung mit der Zugabe von Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase und der Zellatmung konnte die pO₂-Reduktion in kürzester Zeit gewährleistet werden. Permeabilisierte Zellen zeigten sich wenig anfällig für O₂-Eintrag (z.B. durch Undichtigkeiten oder Medienwechsel, vgl. auch 4.4.5.1 + 4.4.5.3).

Der Einfluß der Zugabe von Ascorbinsäure, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase auf die Hypoxie wurde bei längerer hypoxischer Begasung im Vergleich zur hypoxischen Begasung ohne Unterstützung wie folgt untersucht: Normoxische Zellen wurden nach 5minütiger hypoxischer Begasung (um eine hypoxische Atmosphäre zu schaffen) 1. mit 30 min hypoxisch vorbegeatet ohne bzw. 2. mit 15 min hypoxisch vorbegeatetem Permeabilisierungsmedium mit Ascorbinsäure, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase permeabilisiert. In regelmäßigen Abständen wurde DNA mit [α-³²P]-dATP pulsmarkiert (Abb. 40).

pO₂-Reduktion durch Ascorbat

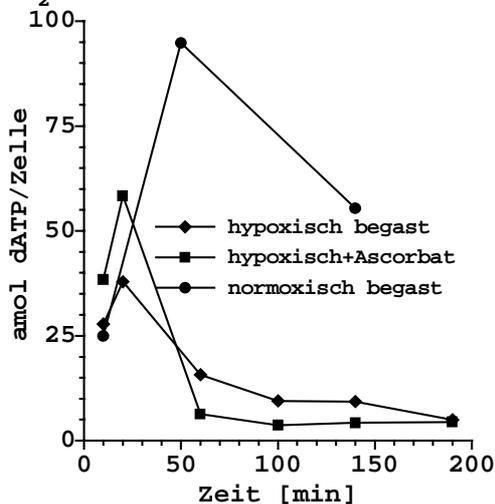


Abb. 40: hypoxisch begaste permeabilisierte Zellen mit und ohne Ascorbat und Ascorbatoxidase

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 4ständiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd hypoxisch ohne bzw. mit Ascorbat nach 3.2.12.2 permeabilisiert, danach hypoxisch begast und mit [α-³²P]-dATP 10 min pulsmarkiert, α-Toxin: 1390 hU/ml, Zusammensetzung des Mediums: Standard
³H-Markierung: 4 h Dauermarkierung normoxisch
³²P-Markierung: 10-min-Pulse hypoxisch
Eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 12.3 Bq [³H]-Thd/μl, 317 Bq [α-³²P]-dATP

Die Zugabe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase verursachte 0-10 und 10-20 min nach Permeabilisierung einen Anstieg des Einbaus. 50-60 min nach Permeabilisierung war der Einbau jedoch 90% geringer als beim normoxischen Vergleich. Die hypoxische Permeabilisierung durch 30 min hypoxisch vorbegeastes Permeabilisierungsmedium bewirkte nach weiteren 50-60 min hypoxischer Begasung eine Reduktion des Einbaus um 83% gegenüber dem normoxischen Vergleich. Der Einbau verringerte sich danach weiter, blieb jedoch etwa doppelt so hoch wie nach Zugabe von Ascorbinsäure.

Durch Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase konnte bei hypoxischer Begasung mit 200 ppm O₂ bereits 60 min nach Permeabilisierung ein hypoxieinduzierter Replikationsblock gesetzt werden. Damit konnten die Inkubationszeiten bei Untersuchungen permeabilisierter Zellen deutlich reduziert werden. Der im Vergleich zum Ausgangswert anfangs höhere ³²P-Einbau in die DNA könnte evtl. auf eine stärkere Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase zurückzuführen sein. Bei geringem pO₂ würde die RNR inaktiviert und dadurch vermehrt externe Nukleotide in die DNA eingebaut. Die durchschnittliche spezifische Radioaktivität am Replikationsort stiege an, der ³²P-Einbau im gleichen Maß.

4.4.5.3 Normoxische Zellen, Permeabilisierung unter hypoxischer Begasung in Gegenwart von Ascorbat und Ascorbatoxidase

Je schneller die Replikation durch Hypoxie gehemmt werden kann, desto besser kann sie untersucht werden. Deshalb wurden die Faktoren gesucht, die die Geschwindigkeit der Etablierung eines Replikationsblocks determinieren (Abb. 41).

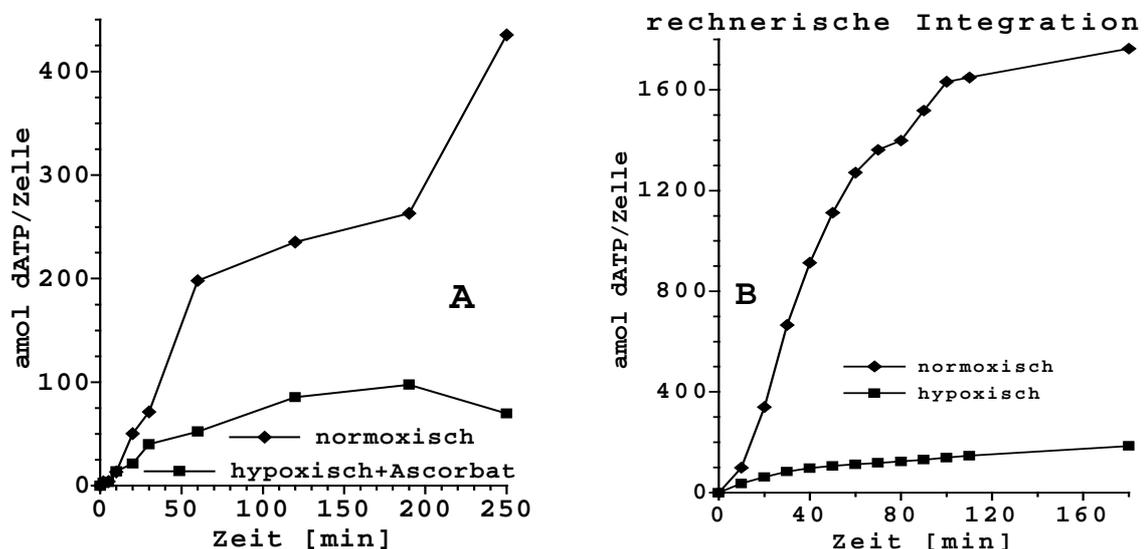


Abb. 41: Vergleich hypoxisch und normoxisch begaster, permeabilisierter CV1-Zellen
 SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3.5stündiger normoxischer Vormarkierung mit [Methyl-³H]-Thd (3.2.3.1) nach 3.2.12.2 hypoxisch unter Zugabe von Ascorbat oder normoxisch permeabilisiert und gleichzeitig mit [α -³²P]-dATP nach 3.2.3.2 dauer- (A) oder in 10 min pulsmarkiert (B) mit [α -³²P]-dATP (Start der Pulse: 0-180 min nach Permeabilisierungsbeginn). Die Darstellung B ist die rechnerische Integration der Pulsmarkierungsergebnisse, α -Toxin: A: 830, B: 1560 hU/ml
 Medienbestandteile: Standard + 700 μ M Ascorbat, 1400 μ M NaHCO₃, 2U/ml Ascorbatoxidase
³H-Markierung: 3.5 h Dauermarkierung *in vivo*, ³²P-Markierung: 0-250 min Dauermarkierung
 Eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: A: 12.3 Bq [³H]-Thd/ μ l, 213 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l, B: 4.9 Bq [³H]-Thd/ μ l DMEM, 165 Bq [α -³²P]-dATP.

Wurden normoxische CV1-Zellen 5 min vor hypoxischer Permeabilisierung hypoxisch begast, anschließend hypoxisch unter Zugabe von Ascorbinsäure und Ascorbatoxidase permeabilisiert, weiter hypoxisch begast (dann ohne CO₂) und dauermarkiert, ist die nach bestimmten Zeiten in die DNA eingebaute Radioaktivität im Vergleich zu normoxischen permeabilisierten Zellen in jedem Zeitintervall geringer.

Der normoxische Vergleich zeigte eine häufig beobachtete triphasische Einbaucharakteristik: hoher linearer Einbau bis ca. 60 min, geringerer Einbau zwischen 60-180 min nach Permeabilisierung gefolgt von einem wieder stärkeren Einbau (Abb. 41 A). Bei der Darstellung der rechnerischen Integration der Pulsmarkierungs-Ergebnisse (Abb. 41 B) sind die ersten beiden Phasen gut zu erkennen. Mit Ascorbinsäure hypoxisch permeabilisierte Zellen zeigten bis 12 min nach Permeabilisierung keinen Unterschied zum normoxischen Vergleich (vgl. auch 4.4.2 und 4.2.3.2, Abb. 30 A). Danach war der Einbau in der Dauermarkierung um 50-85% geringer als beim normoxischen Vergleich, der Anstieg verlangsamte sich zwischen 10 und 20 min auf ¼ des Vergleichs. 180 min nach Permeabilisierungsbeginn ging die säurefällbare Radioaktivität sogar zurück, während normoxische Zellen diese weiter steigerten. 700 µM Ascorbinsäure bewirkten schnell eine Verringerung des dATP-Einbaus. Deutlich belegen dies auch Sucrosegradienten pulsmarkierter DNA (Abb. 42, vgl. auch 4.4.5.2 und Abb. 40).

SW40-Gradienten, normoxische Zellen, hypoxisch permeabilisiert

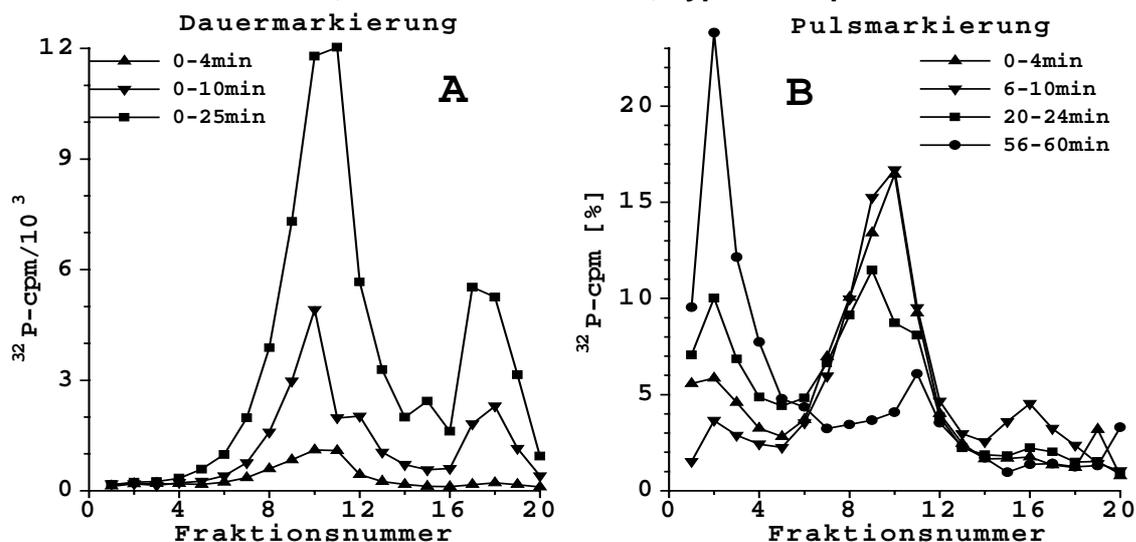


Abb. 42: hypoxische Permeabilisierung normoxischer Zellen.

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 4stündiger normoxischer Begasung im Inkubationsgefäß hypoxisch unter Zugabe von Ascorbat und Ascorbatoxidase permeabilisiert und mit [α -³²P]-dATP pulsmarkiert. Zusammensetzung des Mediums: Standard + z.T. 700 µM Ascorbat + 2 U/ml AO.

α -Toxin: 8330 (A), 2800 (B) hU/ml, ³²P-Markierung: A: 4-25-min-Dauermark., B: 4-min-Pulse Einges. Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 394 Bq (A), 2766 Bq (B) [α -³²P]-dATP/ μ l
 Σ cpm: A: 0-4, 0-10, 0-25 min: 6182.6, 24222, 69378.6; B: 0-4, 6-10, 20-24, 56-60 min: 3925.4, 9110.4, 3830.5, 950.5

Durch die Methode der Dauermarkierung können nach hypoxischer Permeabilisierung normoxischer SV40-infizierter CV1-Zellen keine Neuintiationen nachgewiesen werden. Ein mit Markierungsdauer steigender Anteil der säurefällbaren Radioaktivität bandete in den selben SW-40-Fractionen wie replizierende, nicht gereifte SV40-DNA. Reife SV40-DNA wurde in noch stärker zunehmendem Maß markiert.

Durch Pulsmarkierungen konnten Neuintiationen nachgewiesen werden. Der Einbau stieg 6-10 min nach Permeabilisierung stark an und sank 20-24 min auf 40% bzw. 56-60 min auf 11% dieses Maximums ab. Bis 30 min nach Permeabilisierung wurde verstärkt nicht reife SV40-DNA markiert. In Pulsen 6-10 min nach Permeabilisierung konnte erstmals auch gereifte SV40-DNA markiert werden. Diese war jedoch 20-24 min nach Permeabilisierung nicht mehr markierbar. 60 min nach hypoxischer Permeabilisierung ließ der Einbau stark nach, der Großteil der säurefällbaren Radioaktivität trat in kurzen DNA-Strängen auf, was auf Primermarkierung hindeutet.

Durch Zugabe von dCyd zum Medium verschiedener Zellen können die Wirkungen hypoxischer Begasung aufgehoben werden (Riedinger 1991, Probst 1983, 1988 a + b, Probst, G. 1999). In SV40-infizierten CV1-Zellen ist dies nicht gelungen. Da nach α -Toxin-Permeabilisierung dCTP vom Inkubationsmedium in die Zelle nachgeliefert wird, sollte die hypoxische Begasung wenig Wirkung zeigen. Wie hypoxische Dauer- und Pulsmarkierungen aber zeigten, wurde die Replikation gegenüber dem normoxischen Vergleich um 90% reduziert. Möglicherweise liegt dies u. a. an einem „channeling“ innerhalb der Zelle.

4.4.5.4 [Methyl-³H]-Thd/[α -³²P]-dATP-Doppelmarkierung unter Hypoxie und Zugabe von Ascorbat und Ascorbatoxidase

Wie früher gezeigt (Eger 1995) erfolgte die [Methyl-³H]-Thd-Markierung permeabilisierter CV1-Zellen nur so lange, wie die Permeabilisierung noch nicht voll ausgeprägt ist. Danach ist eine Markierung, z.B. durch [α -³²P]-dATP, weiterhin möglich, die spätere Zugabe von [Methyl-³H]-Thd führte jedoch nur noch zu geringer Markierung der DNA.

Die Unterschiede zwischen hypoxischer und normoxischer Markierung der DNA permeabilisierter CV1-Zellen wurde durch [Methyl-³H]-Thd/[α -³²P]-dATP-Doppelmarkierungen herausgearbeitet (Abb. 43).

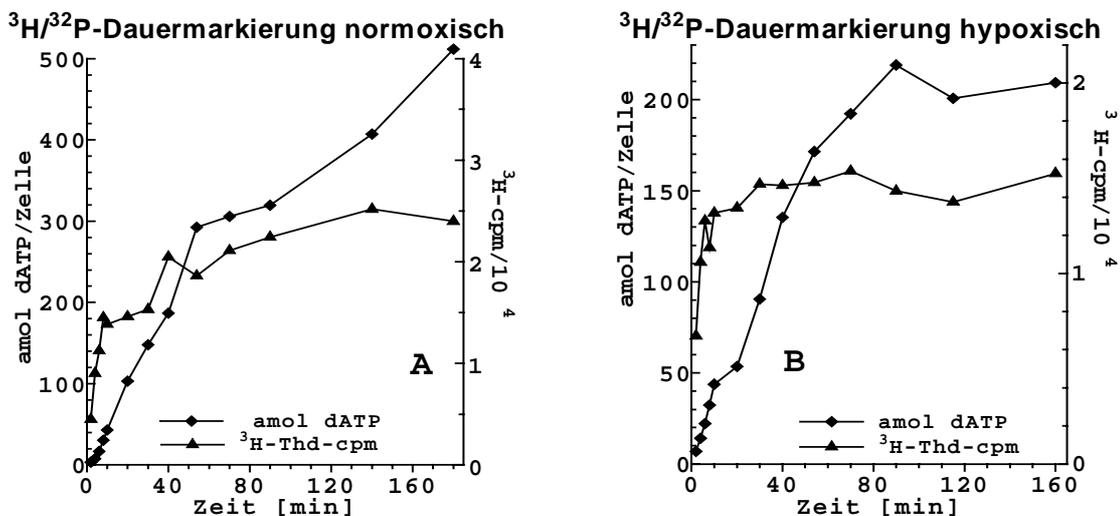


Abb. 43: [Methyl-³H]-Thd/[α -³²P]-dATP -Doppelmarkierung unter hypoxischen Bedingungen SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1.5-2stündiger normoxischer Vorinkubation normoxisch oder unter Zugabe von Ascorbat und Ascorbatoxidase hypoxisch nach 3.2.12 permeabilisiert und

gleichzeitig mit [α - ^{32}P]-dATP und [Methyl- ^3H]-Thd dauermarkiert. Vor hypoxischer Permeabilisierung wurden die Zellen 8 min hypoxisch vorbegeast. α -Toxin: A: 8000, B: 8330 hU/ml
Zusammensetzung des Mediums: Standard + ggf. 700 μM Ascorbat, 1400 μM NaHCO_3 , 2 U/ml Ascorbatoxidase, $^3\text{H}/^{32}\text{P}$ -Markierung: 0-160-min-Dauermarkierung
Eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: A: 1540 Bq [^3H]-Thd/ μl , 254 Bq [α - ^{32}P]-dATP/ μl , B: 1400 Bq [^3H]-Thd/ μl , 394 Bq [α - ^{32}P]-dATP/ μl

Normoxische CV1-Zellen bauten in den ersten 40 min nach Permeabilisierung 80% des innerhalb von 180 min insgesamt in die DNA eingebauten [Methyl- ^3H]-Thd ein, bis 140 min nach Permeabilisierung wurden die restlichen 20% eingebaut. Anschließend kam der [^3H]-Thd-Einbau in die DNA zum Stillstand (vgl. auch Eger, 1995).

Hypoxisch permeabilisierte CV1-Zellen bauten 87% des innerhalb von 160 min insgesamt in die DNA eingebauten [Methyl- ^3H]-Thd, aber nur 16% des ^{32}P -Gesamteinbaus in den ersten 6 min nach Permeabilisierung ein (vgl. auch Abb. 42 in 4.4.5.3). 10 min nach hypoxischer Permeabilisierung kam der ^3H -Einbau fast völlig zum Erliegen. Dies ist deutlich früher als beim normoxischen Vergleich. Der stetige ^{32}P -Einbau in die DNA läßt erst 90 min nach Permeabilisierungsbeginn nach.

Die frühe Reduktion des [Methyl- ^3H]-Thd-Einbaus in die DNA unter Hypoxie könnte u.a. damit zusammenhängen, daß nach vollständiger Permeabilisierung [^3H]-dTTP in das gegenüber dem Zellvolumen ca. 500fach größere Volumen des Inkubationsmediums verdünnt wird. Berücksichtigt man jedoch die unterschiedlichen Verzögerungen bis zum annähernd konstanten [α - ^{32}P]-dATP-Einbau in die DNA, könnte daraus geschlossen werden, daß die Permeabilisierung der CV1-Zellen durch α -Toxin unter Hypoxie langsamer stattfindet als im normoxischen Zustand. Dies würde bedeuten, daß der [Methyl- ^3H]-Thd-Einbau bei hypoxischen Zellen länger andauern müßte als bei normoxischen. Dies ist nicht der Fall. Möglicherweise wurde die Replikation nach hypoxischer Permeabilisierung aber bereits stark beeinträchtigt, so daß trotz höherer [Methyl- ^3H]-Thd-Konzentration in der Zelle kein länger andauernder Einbau stattfindet.

4.4.6 Hypoxische Vorbegeastung *in-vivo* ohne Ascorbinsäure

Um die Wirkung aller relevanten Substanzen auf die Replikation in permeabilisierten Zellen untersuchen zu können, wurden Alternativen zur Unterstützung der hypoxischen Begasung durch Zugabe von Ascorbinsäure, NaHCO_3 und Ascorbatoxidase gesucht.

Beispielsweise wurde ein Teil der hypoxischen Begasung (1-2h) bereits vor der Permeabilisierung durchgeführt. Die Zeit bis zur hypoxieinduzierten Replikationshemmung konnte so deutlich reduziert werden. Das Permeabilisierungsmedium wurde für 30 min hypoxisch vorbegeast, um den im Medium gelösten Sauerstoff so weit wie möglich zu reduzieren. Danach wurden Zellen mit diesem Medium permeabilisiert. Die hypoxische Begasung minimierte den pO_2 im Medium so stark, daß die Replikation der O_2 -verarmten, 1-2 h hypoxisch vorbegeasten CV1-Zellen – auch unter Mitwirkung der Zellatmung – in wesentlich kürzerer Zeit gehemmt wurde als ohne Vorbegeastung. Die so permeabilisierten Zellen wurden weiter hypoxisch begast und konnten durch Austausch des Mediums reoxigeniert werden (Abb. 44).

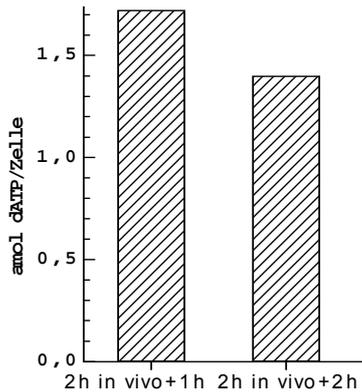


Abb. 44: Hypoxie vor und nach Permeabilisierung

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1stündiger normoxischer Vorinkubation 2 h hypoxisch begast und gleichzeitig [Methyl-³H]-Thd-vormarkiert (3.2.3.1), danach ohne Ascorbat hypoxisch permeabilisiert (analog 3.2.12.2), hypoxisch weiterbegast und nach weiteren 1 bzw. 2 h mit [α -³²P]-dATP 10 min pulsmarkiert.

Vorbehandlung der Zellen: 2h hypoxische Begasung *in vivo*, hypoxische Permeabilisierung, α -Toxin: 1041 hU/ml

³H-Markierung: 2 h *in vivo* unter hypoxischer Begasung

³²P-Markierung: 10-min-Pulsmarkierung permeabilisiert

Eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 11.6 Bq [³H]-Thd/ μ l, 553 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Der Einbau von dATP in die DNA hypoxisch vorinkubierter und hypoxisch permeabilisierter Zellen betrug 3-10% des normoxischen Vergleich (nicht hier gezeigt, vgl. 4.2.2.3, Abb. 4). Nach insgesamt 3-4 h hypoxischer Begasung lag der Einbau auf dem Niveau von 7 h *in vivo* hypoxisch permeabilisierten Zellen. So war auch ohne Zugabe von Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase eine beschleunigte Verringerung des pO₂ möglich.

Der Einbau schwankte jedoch so stark, daß davon ausgegangen werden muß, daß dieses Verfahren die Vitalität der Zellen sehr stark beeinträchtigte. So zeigte sich das Einbauverhalten u.a. abhängig von der Vitalität der Zellen, ihrer Fähigkeit O₂ schnell zu veratmen und der Anzahl der Passagen, die die CV1-Zellen seit dem Auftauen in Kultur verbracht hatten. Die Anfälligkeit des Systems gegen O₂-Eintrag war ebenfalls groß. Nach Reoxigenierung erreichte der Einbau das normoxische Niveau nicht, während *in vivo* bis zum Vierfachen dieses Niveaus erreicht wurde (4.4.3, Abb. 34). Deshalb wurde die hypoxische Vorbegasung *in vivo* selten angewandt.

4.4.7 Hypoxische Begasung *in vivo*, hypoxische Permeabilisierung

Die Zugabe von dCyd zum Medium diverser Zellen kann die hypoxieinduzierte Replikationshemmung aufheben (Riedinger 1991, Probst 1983 + 1988 a + b, Probst, G. 1999). Für SV40-infizierte CV1-Zellen existiert ein solcher Nachweis bislang nicht. Sollte dCyd bei CV1-Zellen das gleiche bewirken, müßten der dATP-Einbau bei CV1-Zellen mit hypoxieinduziertem Replikationsblock *in vivo*, ähnlich wie bei einer Reoxigenierung, durch Permeabilisierung stark ansteigen. Die Hypoxie kann durch Zugabe von Ascorbinsäure, NaHCO₃ und AO unterstützt werden (Abb. 45).

hypoxische Begasung *in vivo*

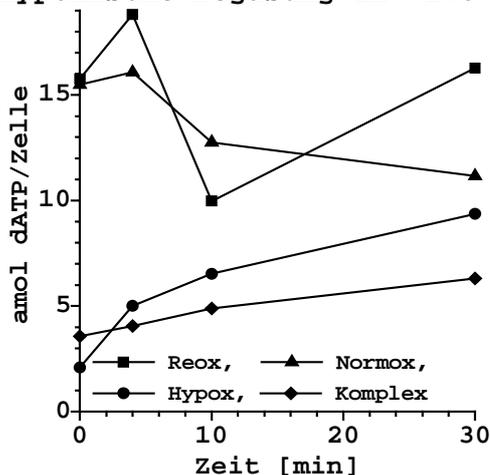


Abb. 45: Hypoxische Permeabilisierung nach hypoxischer Begasung; Reoxigenierung

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden 7 h hypoxisch begast und zwischen SV40-Infektion und Permeabilisierung mit [¹⁴C]-Thd dauermarkiert. 15 min nach Zugabe von Ascorbinsäure, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase zum hypoxisch begastem Permeabilisierungsmedium wurden die Zellen nach 3.2.12 hypoxisch permeabilisiert. Die 6-min-Pulse mit [α -³²P]-dATP starteten bei den hypoxischen („Hypox“) und den reoxigenierten („Reox“) Zellen 0, 4, 10 und 30 min nach Beginn der Permeabilisierung, bei den verzögert reoxigenierten Zellen („Komplex“) nach Reoxigenierung durch Austausch des Mediums (10 min nach hypox. Permeabilisierung). Die normoxische Kontrolle („Normox“) wurde normoxisch begast und gleich nach Permeabilisierung mit [α -³²P]-dATP markiert. α -Toxin: 463 hU/ml

Zusammensetzung des Inkubationsmediums: Standard + bei „Hypox“ und „Komplex“ 500 µM Ascorbinsäure, 1 mM NaHCO₃, 1,5 U/ml Ascorbatoxidase.

¹⁴C-: 39.5 h Dauermarkierung *in vivo*, ³²P-Markierung: 6-min-Pulsmarkierung permeabilisiert
Eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 0.1 Bq [¹⁴C]-Thd/µl, 617 Bq [α-³²P]-dATP

7 h *in vivo* hypoxisch begaste, mit Unterstützung von Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase hypoxisch permeabilisierte CV1-Zellen zeigten direkt nach Permeabilisierung einen gegenüber dem normoxischen Vergleich um 80% reduzierten Einbau (Abb. 45). 30 min nach Permeabilisierung glichen sich die Einbauniveaus durch Erhöhung des Einbaus der hypoxischen und Verringerung des Einbaus der normoxischen Zellen bis auf eine Differenz von 30% an. Danach reduzierte sich der Einbau bei hypoxischen Zellen wieder, während der der normoxischen konstant blieb (nicht gezeigt).

Wurden hypoxische CV1-Zellen 10 min nach hypoxischer Permeabilisierung (incl. Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase) durch Zugabe normoxischen Permeabilisierungsmediums reoxigeniert, lag die Höhe des Einbaus zunächst in der Größenordnung des Einbaus der hypoxischen Zellen direkt nach hypoxischer Permeabilisierung. Typische Reoxigenierungseffekte traten nicht auf, 25-30 min nach Permeabilisierung war der Einbau sogar geringer als beim hypoxischen Vergleich.

Mit Hilfe von Sucrosegradientenzentrifugation wurde untersucht, wie Initiation und Elongation bei SV40-infizierten CV1-Zellen durch die Zugabe von Ascorbinsäure, NaHCO₃ und AO in verschiedenen Begasungsverhältnissen beeinflusst werden (Abb. 46).

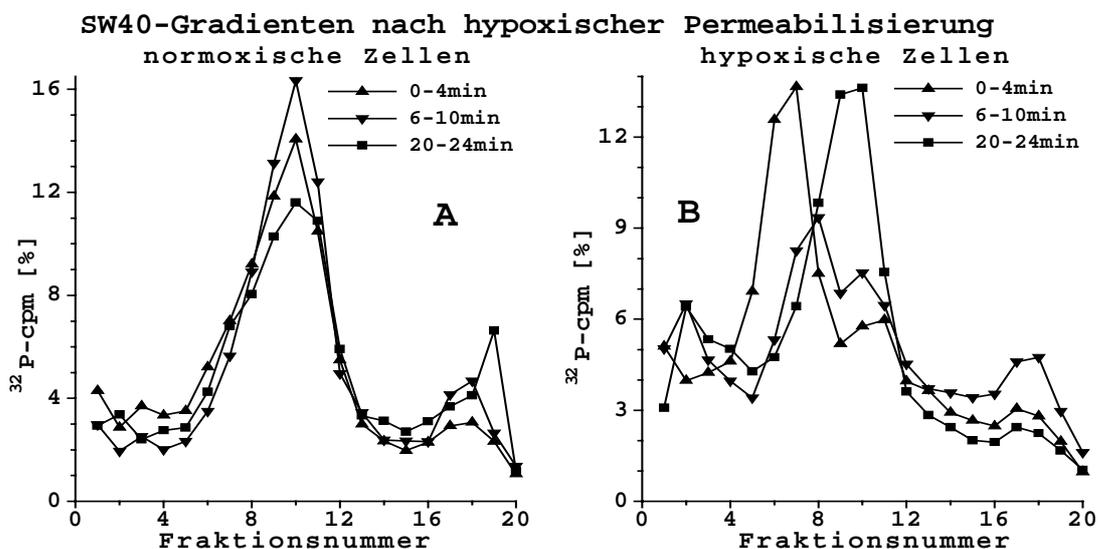


Abb. 46: hypoxische Permeabilisierung hypoxischer Zellen, normoxischer Vergleich

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 4stündiger normoxischer oder 1stündiger normoxischer mit anschließender 8stündiger hypoxischer Begasung normoxisch bzw. hypoxisch mit Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase analog 3.2.12 permeabilisiert u. mit [α-³²P]-dATP pulsmarkiert.

Vorbehandlung der Zellen: 4 h normoxische oder 8 h hypoxische Begasung *in vivo*

Zusammensetzung des Mediums: Standard + 700 µM Ascorbat, 1.4 mM NaHCO₃, 2 U/ml Ascorbatoxidase im hypoxischen Permeabilisierungsmedium, α-Toxin: 2800 hU/ml, ³²P-Markierung: 4-min-Pulse, Eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz: 3423 Bq [α-³²P]-dATP/µl

Σ cpm: A: 0-4, 6-10, 20-24 min: 6709, 5024, 4005; B: 0-4, 6-10, 20-24 min: 10167, 1756, 4242

Hypoxische CV1-Zellen, die hypoxisch permeabilisiert und begast wurden, zeigten deutliche „Reoxigenierungseffekte“. Intrazelluläre Konzentrationsänderungen der Nucleotide durch die Permeabilisierung könnten Ursachen hierfür sein. Neuinitiationen wa-

ren insbesondere in den ersten 5 min nach Permeabilisierung in nennenswertem Ausmaß feststellbar. Anschließend traten weniger Initiationen auf, die Elongation verlief im Vergleich zu reoxigenierten Zellen (s. 4.5.2) langsamer. Der Einbau ließ im Verlauf nach. Die SV40-DNA reifte unabhängig von der Zugabe von Ascorbinsäure, NaHCO_3 und Ascorbatoxidase. Die gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, daß die Replikation nach hypoxischer Permeabilisierung hypoxischer Zellen für kurze Zeit wieder initiiert wurde.

4.5 REOXIGENIERUNG PERMEABILISierter ZELLEN

4.5.1 Permeabilisierung vor hypoxischer Begasung, Konditionierung des Permeabilisierungsmediums

Die Reoxigenierung *in vivo* hypoxisch begaster CV1-Zellen durch Zugabe normoxischen Permeabilisierungsmediums verursachte einen vergleichsweise geringen $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP-Einbau. Die Reoxigenierung hypoxisch permeabilisierter CV1-Zellen durch normoxisches Permeabilisierungsmedium erbrachte keine besseren Ergebnisse. Dies könnte an der langen Kultivierungsdauer unter hypoxischen Bedingungen und der direkt anschließenden Permeabilisierung liegen, was den Zellen keine Möglichkeit zur Erholung von der Hypoxie ließ.

Um die Replikation hypoxischer und hypoxisch permeabilisierter CV1-Zellen zu unterstützen, wurde normoxisches Permeabilisierungsmedium zunächst für 1.5 h zur Permeabilisierung normoxischer CV1-Zellen verwendet. Mit dem so konditionierten Medium wurde das hypoxische Permeabilisierungsmedium von Zellen ersetzt, die unter Zugabe von Ascorbinsäure, NaHCO_3 und Ascorbatoxidase hypoxisch permeabilisiert worden waren. Nach Medienwechsel wurde normoxisch weiterbegast (Abb. 47).

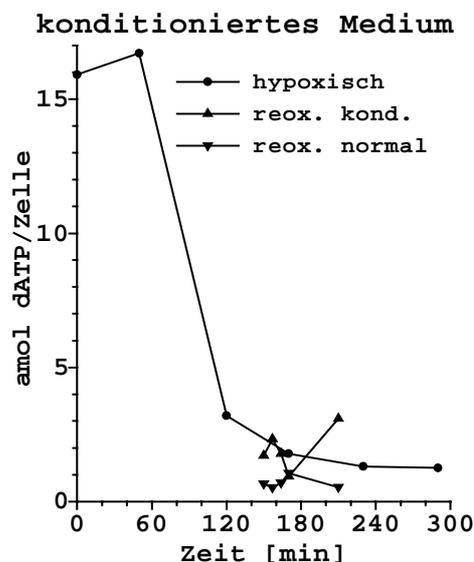


Abb. 47: Reoxigenierung durch normales und konditioniertes Permeabilisierungsmedium

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden in 3stündiger norm- und 2.5stündiger hypoxischer Begasung nach 3.2.3.1 [Methyl- ^3H]-Thd-markiert. Nach hypoxischer Permeabilisierung (3.2.12) ohne Ascorbat und 3 h hypox Begasung wurde durch Austausch gegen normoxisch konditioniertes Medium reoxigeniert und mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP pulsmarkiert (7- bzw. 10-min-Pulse). α -Toxin: 1670 hU/ml Vorbehandlung der Zellen: 3 h norm- und 2.5 h hypox. Begasung *in vivo*, 2.5 h hypox Begasung permeabilisiert ^3H -Markierung: 5.5 h Dauermarkierung *in vivo* ^{32}P -Markierung: 7- (beide „reox“) bzw. 10-min-Pulse Eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz: 18.5 Bq $[\text{H}^3]$ -Thd/ μl , 285 Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP/ μl

Der Austausch des hypoxischen gegen normoxisch konditioniertes Permeabilisierungsmedium führte zu einer geringen Reoxigenierungsreaktion. Der Austausch gegen nicht konditioniertes normoxisches Medium führte zu einem noch niedrigeren Einbau (im Maximum betrug der Einbau nach Zugabe von konditioniertem Medium 300% des Einbaus nach Zugabe von nichtkonditioniertem). Der Einbau mit nicht konditioniertem Medi-

um blieb auch unter dem Einbau des hypoxischen Vergleichs. Die so gewonnene ^{32}P -markierte DNA bandete in SW40-Sucrosegradienten entsprechend Abb. 48.

SW40-Gradienten: nach hypoxischer Permeabilisierung reoxigiert

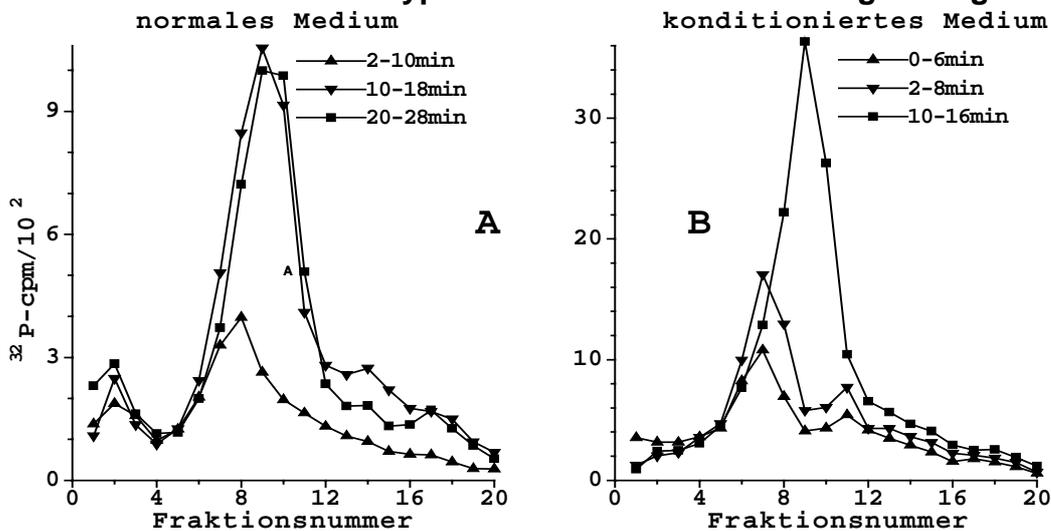


Abb. 48: SW40-Sucrosegradienten hypoxisch permeabilisierter, dann reoxigierter CV1-Zellen
SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3stündiger normoxischer und 2.5stündiger hypoxischer Begasung hypoxisch analog 3.2.12.2 permeabilisiert (ohne Ascorbat, NaHCO_3 und Ascorbatoxidase). Nach weiteren 3h hypoxischer Begasung wurde mit normoxisch konditioniertem bzw. nicht konditioniertem Medium reoxigiert (3.2.12.3) und mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP pulsmarkiert (8- (A) bzw. 6-min-Pulse (B)). α -Toxin: 1670 (A) bzw. 833 (B) hU/ml

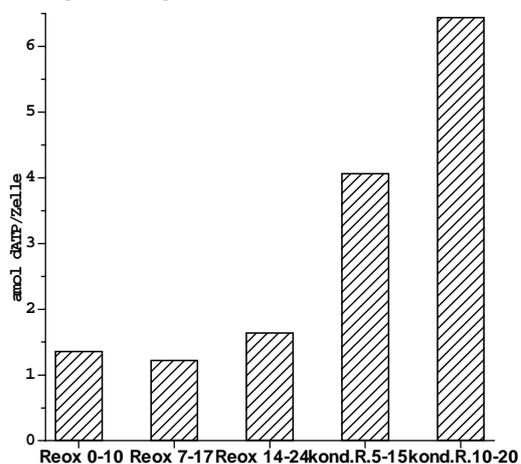
^{32}P -Markierung: 6 bzw. 8-min-Pulsmarkierung (Beginn 0, 2, 10 + 20 min nach Reoxigenierung)

Eingesetzte Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 418 Bq (A), 328 Bq (B) $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP/ μl

Σ cpm: A 0-8, 10-18, 20-28 min: 2893, 6372, 6004, B 0-6, 2-8, 10-16 min: 7711, 9710, 16129

Die Reoxigenierung hypoxisch permeabilisierter CV1-Zellen durch normoxisch konditioniertes Permeabilisierungsmedium führte zu einer Aufhebung der Replikationshemmung, der Einbau wurde deutlich gesteigert. Die Fraktion mit dem höchsten Anteil der säurefällbaren Radioaktivität war in Richtung längerer DNA verschoben, was auf eine – gegenüber nicht konditioniertem Medium – beschleunigte Elongation hindeutet. Die Konditionierung des Mediums schien einen positiven Einfluß auf die Reoxigenierbarkeit hypoxisch permeabilisierter CV1-Zellen auszuüben. Dies bestätigte sich am Verlauf des Einbaus nach Reoxigenierung pulsmarkierter Zellen (Abb. 49).

Reoxigenierung durch konditioniertes Medium



Einges. Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 11.6 Bq $[\text{}^3\text{H}]$ -Thd/ μl , 553 Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP/ μl

Abb. 49: Hypoxie *in vivo* und permeabilisiert, Reoxigenierung mit konditioniertem Medium

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach einstündiger norm- bzw. 2stündiger hypoxischer Begasung *in vivo* bei paralleler Markierung mit $[\text{Methyl-}^3\text{H}]$ -Thd nach 3.2.12.2 hypoxisch permeabilisiert (ohne Ascorbat) und 3 h hypoxisch weiterbegast. Die Reoxigenierung erfolgte durch Austausch des Permeabilisierungsmediums gegen konditioniertes bzw. nichtkonditioniertes normoxisches. Die Pulsmarkierung erfolgte mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP (3.2.3.2).

Vorbehandlung der Zellen: 2 h hypoxische Begasung *in vivo*, hypoxische Permeabilisierung Zusammensetzung des Mediums: Standard, α -Toxin: 1041 hU/ml, ^3H -Markierung: 3 h Dauermarkierung *in vivo*, ^{32}P -Markierung: 10-min-Pulsmarkierung

Die Reoxigenierung von *in vivo* hypoxisch begasten, hypoxisch permeabilisierten CV1-Zellen durch Austausch des hypoxischen gegen normoxisches aber nicht konditioniertes Permeabilisierungsmedium führte nicht zu einer Erhöhung des ^{32}P -Einbaus in die DNA (vgl. Abb. 44 mit Abb. 49, 4.4.6). Der ^{32}P -Einbau wurde jedoch dann deutlich erhöht, wenn durch Austausch des Permeabilisierungsmediums gegen normoxisch konditioniertes (1.5 h auf CV1-Zellen) reoxigeniert wurde. Der Einbau vervierfachte sich und führte teilweise deutlich über den hypoxischen Vergleich hinaus.

4.5.2 Permeabilisierung 1 min nach Reoxigenierung *in vivo*

Zur Untersuchung von Reoxigenierungseffekten wurden CV1-Zellen 0.5-2 min vor normoxischer Permeabilisierung *in vivo* reoxigeniert. Dies geschah durch Zugabe von $\frac{1}{4}$ Vol. frischem, O_2 -gesättigtem DMEM zum hypoxischen Inkubationsmedium der Zellen. Dadurch entsprach der pO_2 sofort nach Zugabe dem normoxischen pO_2 (Probst, 1988 b, Probst + Gekeler, 1988, Riedinger, 1991, Gekeler, 1982). Anschließend wurde mit nicht konditioniertem Permeabilisierungsmedium permeabilisiert und die DNA pulsmarkiert. Die markierte DNA wurde durch Sucrosegradientenzentrifugation aufgetrennt (Abb. 50).

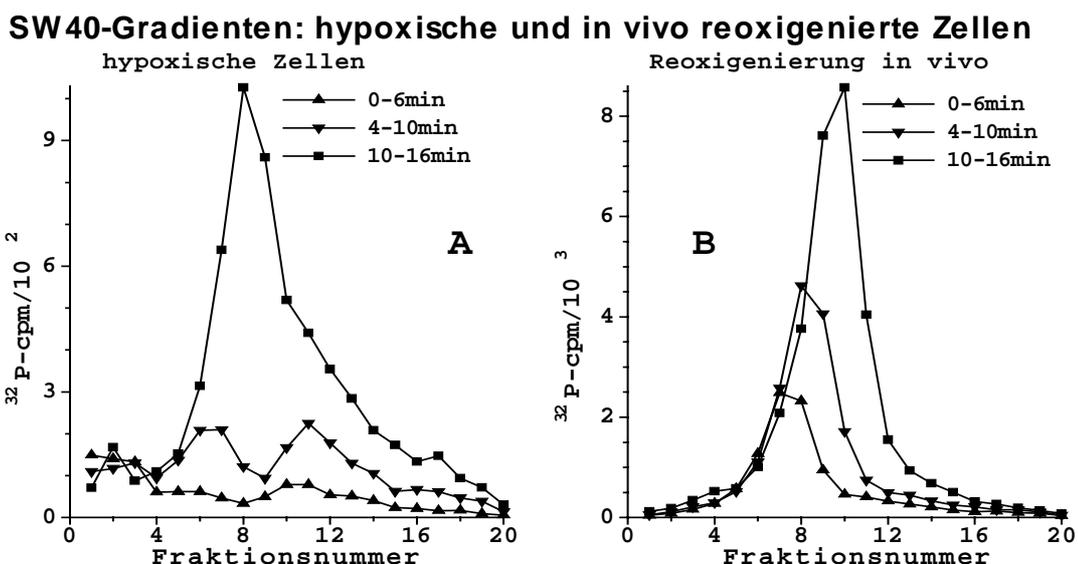


Abb. 50: *In vivo* reoxigenierte, normoxisch permeabilisierte im Vergleich mit hypoxisch perm. Zellen
 SV40-infizierte CV1-Zellen wurden *in vivo* 8 h hypoxisch begast und anschließend entweder unter Zugabe von Ascorbat, NaHCO_3 und Ascorbatoxidase hypoxisch permeabilisiert (A) oder *in vivo* 2 min reoxigeniert und danach permeabilisiert (B). Die anschließende 6-min-Pulsmarkierung erfolgte mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$. Zusammensetzung d. Mediums: Standard + Ascorbat, NaHCO_3 + AO, α -Toxin: 463 hU/ml
 Vorbehandlung der Zellen: 8 h hypoxische Begasung, 2 min Reox. *in vivo*, normoxisch permeabilisiert
 ^{32}P -Markierung: 6-min-Pulsmarkierung, einges. Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 1850 Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}/\mu\text{l}$, Σ cpm (0-6, 4-10, 10-16 min) A: 1132, 2317, 5886, B: 10469, 18231, 33498

Hypoxisch permeabilisierte Zellen zeigten ein ähnliches Einbauverhalten wie *in vivo* hypoxisch begaste Zellen: Der Einbau war auch längere Zeit nach Permeabilisierung gering, was darauf hindeuten könnte, daß nur wenige Replikons aktiv waren bzw. die Elongation im Vergleich zu *in vivo* reoxigenierten Zellen langsamer verlief. Durch den Medienwechsel unter Hypoxie in Verbindung mit der Permeabilisierung könnte die Replikation so stark gestört worden sein, daß die CV1-Zellen trotz geringer Erhöhung des pO_2 (O_2 -Eintrag) unter diesen Umständen nicht mehr reoxigenierbar waren.

In vivo reoxigenierte und danach permeabilisierte CV1-Zellen zeigten ein ähnliches Einbauverhalten wie *in vivo* reoxigenierte, [³H]-markierte CV1-Zellen: Der Einbau in die DNA war um mehr als den Faktor 10 höher als bei hypoxischen CV1-Zellen, im Verlauf von 10-12 min wurde ein Maximum erreicht, danach ließ der Einbau wieder nach. „Aufgestaute“ Replikons wurden elongiert, die Replikation war schneller als unter Hypoxie, Neinitiationen waren in erheblichem Umfang zu beobachten.

Die hier dargestellten Ergebnisse wiesen die Reoxigenierbarkeit permeabilisierter CV1-Zellen nach. Die beobachteten Effekte waren vergleichbar mit den Effekten, die bei *in vivo* reoxigenierten und markierten und bei durch konditioniertes Medium direkt durch Permeabilisierung reoxigenierten CV1-Zellen feststellbar waren (vgl. Abb. 47).

4.5.3 Reoxigenierung gleichzeitig mit Permeabilisierung

Um die Replikation in permeabilisierten Zellen direkt nach Reoxigenierung untersuchen zu können, wurde nach 8ständiger hypoxischer Begasung *in vivo* nach Abnahme des hypoxischen DMEM normoxisches Permeabilisierungsmedium zugegeben. Danach wurde die DNA durch sehr kurze Pulse radioaktiv markiert und durch isokinetische Zentrifugation in Sucrosegradienten aufgetrennt (Abb. 51).

SW40-Gradienten: Hypoxie *in vivo* vor hyp- oder normoxischer Permeabilisierung

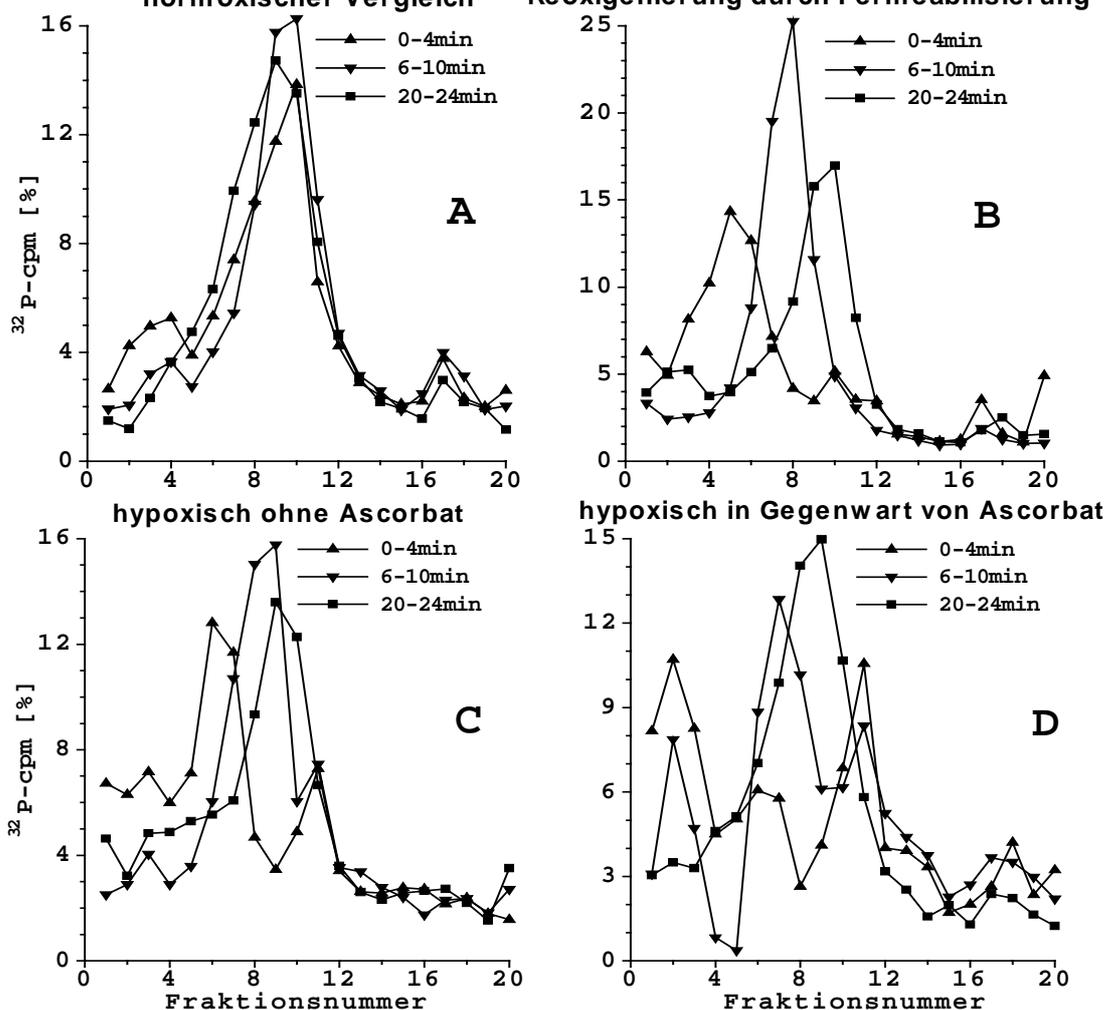


Abb. 51: *In-vivo* hypoxisch begaste, durch Permeabilisierung reoxigenierte Zellen im Vergleich

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden während 1stündiger normoxischer und 8stündiger hypoxischer (hypoxische bzw. reoxigenierte Zellen) bzw. 3stündiger normoxischer Begasung (normoxischer Vergleich) mit [Methyl-³H]-Thd vormarkiert und anschließend hypoxisch (mit (D) und ohne (C) Ascorbinsäure, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase) bzw. normoxisch permeabilisiert (A + B). Die Reoxigenierung erfolgte durch Zugabe von normoxisch konditioniertem Permeabilisierungsmedium. Anschließend wurde mit [α -³²P]-dATP pulsmarkiert (3.2.3.2). α -Toxin: 2780 hU/ml
Zusammensetzung des Mediums: Standard + (nur D) Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase
³H-Markierung: 3 h Dauermarkierung normoxisch oder 1 h normoxisch + 8 h hypoxisch
³²P-Markierung: 4-min-Pulsmarkierung, Einges. Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 15.4 Bq [³H]-Thd/ μ l, 827 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l, Σ cpm: Reihenfolge jeweils 0-4, 6-10, 20-24 min: A: 1178, 1984, 2372; B: 570, 2389, 1173; C: 1017, 781, 484; D: 409, 828, 1196

Die CV1-Zellen, die gleichzeitig mit Permeabilisierung reoxigeniert wurden (B), zeigten bei der Auftrennung der markierten DNA durch isokinetische Zentrifugation eine Verschiebung der Fraktionsnummer, in der sich der größte Anteil der markierten DNA befand, in Richtung längerer DNA (ähnlich der, die bei *in vivo* reoxigenierten und dann permeabilisierten CV1-Zellen zu beobachten war). Die Fraktionsnummer verschob sich von Fraktion 5 (0-4 min) über Fraktion 8 (6-10 min) auf Fraktion 10 (20-24 min nach Reoxigenierung). Der Einbau war 6-10 min nach Reoxigenierung am höchsten.

³²P-Markierung von DNA nach hypoxischer Permeabilisierung (unter Zugabe von Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase) hypoxischer CV1-Zellen führte nach Auftrennung durch isokinetische Zentrifugation (SW40-Rotor) zu einer Konzentration der säurefällbaren Radioaktivität in den Fraktionen 6, 8 oder 9 – 4, 10 bzw. 24 min nach Permeabilisierung. Dies könnte auf eine langsamere Elongation hindeuten. Der Einbau war nach 20-24 min am höchsten, blieb aber um 50% unter dem normoxischen Vergleich. Auch dies könnte mit einer verminderten Elongationsgeschwindigkeit zusammenhängen.

Ein ähnliches Längenverteilungsmuster zeigte die DNA hypoxisch permeabilisierter CV1-Zellen, deren Permeabilisierungsmedium ohne Ascorbatzugabe 30 min hypoxisch begast wurde. Hier lagen die Hauptfraktionen bei durchschnittlich 6, 8.6 und 9.4, der Effekt war geringer als durch ascorbatunterstützte Hypoxie. Dies könnte an einem höherem pO₂ im zugegebenen Permeabilisierungsmedium gelegen haben.

Zu einem geringeren Gesamteinbau (im Durchschnitt 75%) führte die Reoxigenierung durch normoxische Permeabilisierung, im Gegensatz zur Reoxigenierung *in vivo* kurz vor Permeabilisierung (im Durchschnitt 125% des normoxischen Vergleichs). Die Elongationsgeschwindigkeit könnte sich ähnlich verhalten (vgl. 4.5.2). Offensichtlich entscheiden die ersten 30-120 s nach Reoxigenierung über die Höhe des Einbaus, sowie möglicherweise über die Anzahl an Replikons, die elongiert werden. Anzahl und Zustand der Proteine bei *in vivo* reoxigenierten Zellen könnten besser für die Elongation zahlreicher Replikons geeignet als dies in Zellen der Fall ist, die durch normoxisches Permeabilisierungsmedium reoxigeniert wurden. Die Geschwindigkeit der Elongation schien bei den untersuchten CV1-Zellen vom pO₂ abhängig zu sein: Zellen, die unter Zugabe von Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase hypoxisch permeabilisiert wurden, replizierten langsam, ohne Ascorbat-Zugabe schien die Gabelgeschwindigkeit 20-30% schneller zu sein während der pO₂ deutlich höher war. Das Einbauverhalten bei Permeabilisierung reoxigenerter CV1-Zellen ließ nach Sucrosegradientenzentrifugation eine um den Faktor 1.5 höhere Elongationsgeschwindigkeit vermuten.

4.5.4 [³H]-/[³²P]-Doppelmarkierung nach Reoxigenierung

Um einen Vergleich zwischen der Replikation in permeabilisierten Zellen nach Reoxigenierung und der Replikation normoxischer permeabilisierter Zellen ziehen zu können, wurden in Anlehnung an die in 4.2.3 beschriebenen Versuche reoxigenierte, SV40-infizierte Zellen mit [Methyl-³H]-Thd und gleichzeitig mit [α -³²P]-dATP markiert (Abb. 52).

Doppelmarkierung nach Reoxigenierung

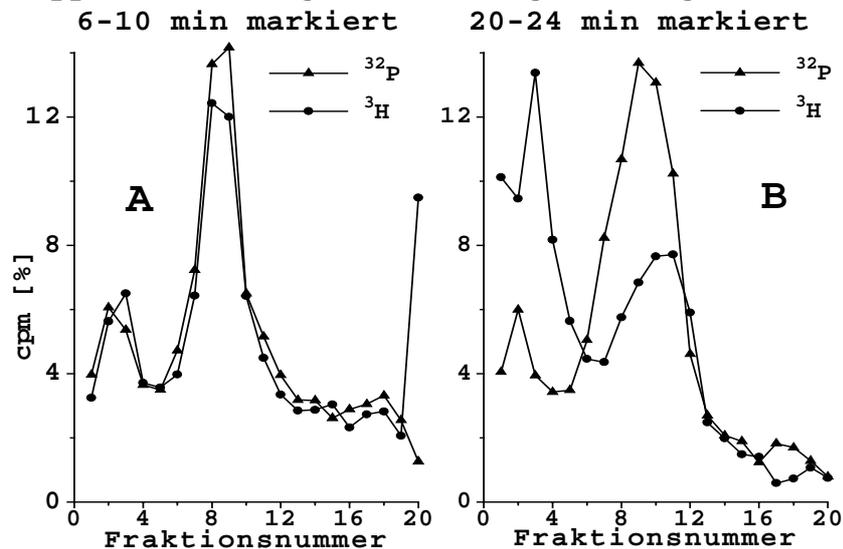


Abb. 52: SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1stündiger normoxischer und 7.5stündiger hypoxischer Begasung, 30s *in vivo* reoxigeniert, permeabilisiert und in 4-min-Pulsen mit [Methyl-³H]-Thd u. [α -³²P]-dATP markiert (Start Markierung: 6 + 20 min nach Beginn der Permeabilisierung). Anschließend wurde die DNA nach 3.2.5.1 durch SW40-Gradienten aufgetrennt, α -Toxin: 8330 hU/ml, ³H-Markierung: 4-min-Pulse, ³²P-Markierung: 4-min-Pulse

Einges. Endkonzentrationen im Markierungsansatz: 4060 Bq [³H]-Thd/ μ l, 1150 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l
 Σ cpm: 6-10 min (A): [³H]: 1544; [³²P]: 2443; 20-24 min (B): [³H]: 1449; [³²P]: 4847

Wurde [Methyl-³H]-Thd nach Permeabilisierung zugegeben, erfolgte nur eine geringe Markierung der neusynthetisierten SV40-DNA. Eine zuvor etablierte Hypoxie beeinträchtigte die Replikation der untersuchten CV1-Zellen nach Permeabilisierung trotz Reoxigenierung *in vivo* deutlich. Nach Auswertung vieler Verzögerungen bis zur Verstetigung des [α -³²P]-dATP-Einbaus und deren Vergleich mit der α -Toxinmenge, wurde der Eindruck gewonnen, daß Hypoxie die Permeabilisierung durch α -Toxin verlangsamte.

Wurde [Methyl-³H]-Thd vor vollständiger Permeabilisierung zu den Proben zugegeben, konnte ³H in hoher Konzentration in die DNA eingebaut werden, die Verteilung ³H- bzw. ³²P-Markierungen über die verschiedenen DNA-Längen war ähnlich. Die Höhe des [α -³²P]-dATP-Einbaus war geringer als bei vollständiger Permeabilisierung (nicht gezeigt).

Vermutlich wurde vor vollständiger Permeabilisierung [Methyl-³H]-Thd in der Zelle konzentriert. Nach vollständiger Permeabilisierung verdünnte sich [Methyl-³H]-Thd ins Inkubationsmedium, dessen Volumen das 10² bis 10³fache des Cytosols der CV1-Zellen betrug. So gelangten nur geringe [³H]-Thd-Mengen an den Ort der Replikation und in die DNA; die Konzentration an [α -³²P]-dATP erhöhte sich jedoch mit zunehmender Permeabilisierung. Längere Zeit nach Permeabilisierung war eine ³H-Markierung neusynthetisierter SV40-DNA kaum noch nachweisbar. ³H-Markierungen bei kleinen DNA-Molekülen (Fraktion 1-5) durch Primersynthese, unspezifische Adhäsionen von [³H]-Thd an DNA oder Proteine etc. waren auch längere Zeit nach vollständiger Permeabilisierung gut nachweisbar. In SW40-Sucrosegradienten traten häufig ³H-markierte Pellets auf, was auf DNA-Protein-Aggregate oder zelluläre ³H-markierte DNA hindeutet.

4.5.5 Reoxigenierung in Gegenwart von BrdUTP

Durch Markierung der DNA normoxischer permeabilisierter Zellen mit BrdU wurde Rereplikation bereits nachgewiesen (vgl. 4.3, Abb. 32). Die Untersuchung hypoxischer CV1-Zellen auf Rereplikation schloß die Untersuchung der Wirkungen der BrdUTP-Zugabe auf den Einbau ein. ^3H -vormarkierte CV1-Zellen wurden nach *in-vivo*-Hypoxie mit hypoxischem Permeabilisierungsmedium inkubiert, das neben 100 μM dTTP auch 500 μM BrdUTP enthält. 2.5 h nach hypoxischer Permeabilisierung wurden die CV1-Zellen reoxigeniert, die DNA durch Zugabe von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ 10-120 min lang markiert und durch Zonenzentrifugation (SW40-Rotor) in Sucrosegradienten aufgetrennt (Abb. 53).

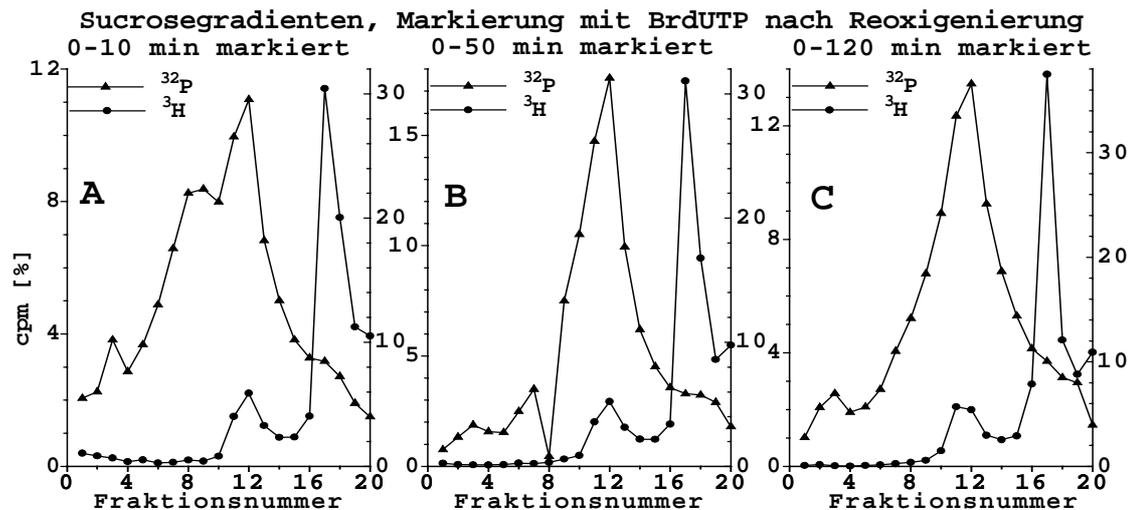


Abb. 53: SW40-Gradienten BrdUTP-markierter permeabilisiert reoxigener CV1-Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 1.5stündiger normoxischer Begasung während 2.5stündiger hypoxischer Begasung *in vivo* [Methyl- ^3H]-Thd-markiert. Anschließend wurde durch 20 min hypoxisch vorbeegasetes Medium hypoxisch permeabilisiert (3.2.12.2). Nach weiteren 2.5 h hypoxischer Begasung erfolgte die Reoxigenierung durch Austausch des hypoxischen gegen normoxisches Permeabilisierungsmedium, das 500 μM BrdUTP enthält. Anschließend wurde mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (3.2.3.2) 10-120 min markiert und danach die Replikation beendet. Zusammensetzung des Mediums: Standard + 500 μM BrdUTP nach Reoxigenierung, α -Toxin: 3500 hU/ml
 ^3H -Markierung: 2.5 h Dauermarkierung *in vivo* mit Beginn der hypoxischen Begasung, ^{32}P -Markierung: 10-120-min-Dauermarkierung permeabilisiert, $t = 0$ (Zeitpunkt der Reoxigenierung)
 Eingesetzte Endkonz. im Markierungsansatz: 23 Bq $[\text{Methyl-}^3\text{H}]\text{-Thd}/\mu\text{l}$ DMEM, 140 Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}/\mu\text{l}$
 Σ cpm: 10 min: ^3H : 3396, ^{32}P : 4460; 50 min: ^3H : 3486, ^{32}P : 16994; 120 min: ^3H : 3302, ^{32}P : 16252

In DNA, die nach Permeabilisierung 10-min-pulsmarkiert wurde, waren per SW-40-Sucrosegradienten kurze DNA-Ketten wie nach stattgehabten Initiationen nachweisbar. Nach 50minütiger Pulsmarkierung bestand der Großteil der markierten DNA aus gereifter SV40-DNA; nach 120-min-Pulsen ging im Vergleich zu 50-min-Pulsen der Gesamteinbau zurück und es entstanden vermehrt kürzere DNA-Fragmente. Dies könnte auf einen DNA-Abbau oder erfolgter DNA-Reparatursynthese hindeuten. Dieser Effekt war – unabhängig von der Gegenwart von BrdUTP – bei längeren Markierungszeiten nach Hypoxie häufig feststellbar. Eine Beschleunigung der Elongation durch BrdUTP (wie bei normoxischen Zellen vermutet), konnte weder eindeutig bestätigt noch ausgeschlossen werden.

4.5.6 Nachweis von „Form U“ in permeabilisierten CV1-Zellen

Aphidicolin (ein Diterpenoid aus Pilzen) hemmt in CV1-Zellen bevorzugt die Polymerase δ , eine Primer-Synthese ist jedoch noch möglich. Die Polymerase α von CV1-Zellen wird ebenfalls gehemmt. Durch Zugabe von Aphidicolin zum Kulturmedium 15 min vor Permeabilisierung und in gleicher Konzentration zum Permeabilisierungsmedium konnte ein gehäuftes Auftreten von „Form U“, einem stark unterwundenen SV40-Topoisomer, provoziert werden (Sarkar, 1987). Dieses wurde analog 3.2.7.4 nachgewiesen und diente als direkter Initiationsnachweis (s. Riedinger 1999 Abb. 54).



Abb. 54: „Form U“ in permeabilisierten und nichtpermeabilisierten, SV40-infizierten CV1-Zellen

Das DMEM von SV40-infizierten CV1-Zellen wurde 24h nach Infektion durch vorgewärmtes DMEM-Mangelmedium ersetzt (Gibco BRL DMEM w/o Arg, Cys, Gluc, Glut, Inos, Leuc, Meth, Phos, Cat. Nr. 11963022), die Zellen in den Wärmerraum überführt und dort 1.5h normoxisch begast. Danach wurden die Zellen 10 h hypoxisch begast. Anschließend hypoxisch Aphidicolin (2 μ g/ml DMEM) zugegeben und 10 min lang darauf belassen. **Probe 1** wurde danach hypoxisch permeabilisiert und nach weiteren 15 min durch Medien austausch reoxigeniert. 10 min nach Reoxigenierung wurde die Probe abgestoppt und aufgearbeitet. Die Proben 2-6 und 8 wurden nicht reoxigeniert. Die hypoxische **Probe 8** war – als negative Referenz gedacht – 10 min nach hypoxischer Aphidicolinzugabe beendet worden.

Probe 7 wurde 10 min nach Aphidicolinzugabe durch Zugabe von $\frac{1}{4}$ Volumen O_2 -gesättigtem DMEM (inklusive 2 μ M Aphidicolin) reoxigeniert und weitere 15 min später beendet.

Die Proben 2-6 wurden 10 min nach Aphidicolinzugabe hypoxisch unter Variation des Inkubationsmediums permeabilisiert, das Inkubationsmedium enthielt ebenso 2 μ M Aphidicolin:

Probe 2 wurde ohne Nukleosid- noch Desoxynukleosid-Triphosphate permeabilisiert.

Probe 3 wurde permeabilisiert unter zusätzlichem Zugeben von 10 mM EDTA.

Probe 4 wurde permeabilisiert wie Probe 2 mit der Ausnahme, daß sich im Inkubationsmedium 2.8 mM ATP befand.

Probe 5 wurde mit normalem Inkubationsmedium permeabilisiert (zusätzlich 2 μ M Aphidicolin).

Bei **Probe 6** enthielt das ansonsten normale Inkubationsmedium (zusätzlich 2 μ M Aphidicolin) kein α -Toxin.

Eine [α - 32 P]-dATP-Markierung erfolgte nicht. Die Hybridisierung mit [32 P]-markierter SV40-DNA wurde entsprechend 3.2.7.4 und Riedinger, 1999 durchgeführt. α -Toxin: 2800 hU/ml.

Vorbehandlung der Zellen: 24 h p.i. 1.5 h normoxische und 10 h hypoxische Begasung

Zusammensetzung des Mediums: Standard + Aphidicolin (2 μ g/ml).

Wie durch die Hybridisierung von Probe 1 gut erkennbar ist, konnte auch in permeabilisierten Zellen Form U nachgewiesen werden. Es wird jedoch zumindest ATP benötigt, die Zugabe von EDTA verhinderte die Replikation. In nicht permeabilisierten Zellen trat Form U nur nach Reoxigenierung auf, wenn sich die Zellen in DMEM befinden, der Aus-

tausch des DMEM gegen Permeabilisierungsmedium ohne α -Toxin verhinderte Form U ebenso. Ohne Aphidicolin-Zugabe gelang ein Nachweis bislang nicht. In durch Permeabilisierung reoxigenierten hypoxischen CV1-Zellen gelang sowohl mit als auch ohne Aphidicolin der eindeutige Nachweis von Form U. Mit Aphidicolin ließ die Schwärzung des Films auf eine etwa 6fach höhere Konzentration der Form U schließen als bei gleicher Versuchsanordnung (Abstoppen nach 6 min statt nach 10 min) ohne Aphidicolin. Die in permeabilisierten Zellen nachzuweisbaren Form-U-Konzentrationen lagen auf gleichem Niveau als die, die bei nichtpermeabilisierten hypoxischen CV1-Zellen nach Reoxigenierung auftraten.

4.6 MEDIENZUSÄTZE UND HYPOXIE

4.6.1 Einfluß von Glucose

Riedinger konnte nachweisen, daß die DNA-Replikation SV40-infizierter CV1-Zellen nur dann durch hypoxische Begasung *in vivo* gehemmt wurde, wenn die Glucosekonzentration im DMEM weniger als ca. 300 $\mu\text{g/ml}$ betrug. Die ursprüngliche Konzentration in frischem DMEM beträgt 1 mg/ml, sie muß durch Verbrauch unter die o. g. Grenze verringert werden (Riedinger, 1998).

Ob die Replikation dieser Zellen auch nach Permeabilisierung nur unterhalb einer bestimmten Glucosekonzentration durch Hypoxie hemmbar ist, wurde durch Zugabe von 1 mg/ml Glucose in das Permeabilisierungsmedium vor hypoxischer Permeabilisierung unter Zugabe von Ascorbat, NaHCO_3 und Ascorbatoxidase untersucht (Abb. 55).

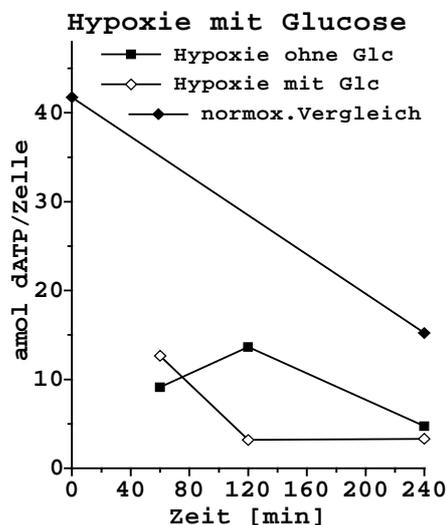


Abb. 55: Hypoxie bei erhöhter Glucosekonzentration

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 2,5stündiger normoxischer [Methyl- ^3H]-Thd-Vormarkierung (3.2.3.1) normoxisch bzw. hypoxisch unter Zugabe von Ascorbat, NaHCO_3 und Ascorbatoxidase permeabilisiert (3.2.12.2) und weiterbegast. Die Pulsmarkierung erfolgte für 5 min mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$. Zusammensetzung des Mediums: Standard + 1 mg/ml Glucose, α -Toxin: 1300 hU/ml
 ^3H -Markierung: 2,5 h Dauermarkierung *in vivo*
 ^{32}P -Markierung: 5-min-Pulsmarkierung
 Eingesetzte Endkonzentration im Markierungsansatz: 9.25 Bq ^3H -Thd/ μl , 741 Bq $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}/\mu\text{l}$

Die Gegenwart von 1 mM Glucose im Permeabilisierungsmedium beeinträchtigte die Wirkung hypoxischer Begasung auf die Replikation von CV1-Zellen nicht wesentlich.

4.6.2 Einfluß von Desoxycytidin (dCyd)

In verschiedenen Zelllinien (CCRF, HeLa, EAT) wurde nachgewiesen, daß durch Zugabe von dCyd der Einfluß der Hypoxie auf die Replikation aufgehoben werden kann (Probst 1983, Probst 1999, Engelcke 1992). Wie sich die Zugabe von dCyd zum Per-

meabilisierungsmedium unter Hypoxie auf die Replikation permeabilisierter CV1-Zellen auswirkt, wurde im Folgenden untersucht (Abb. 56).

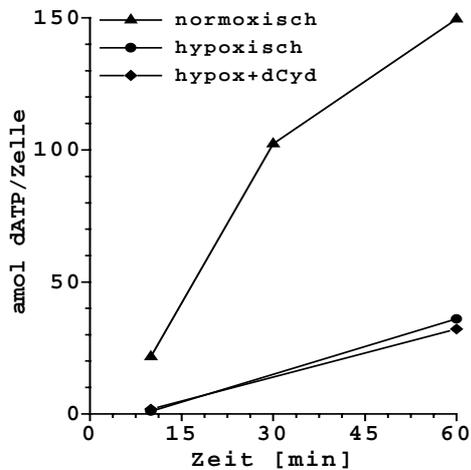


Abb. 56: Einfluß von dCyd auf hypoxisch permeabilisierte Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 3stündiger normoxischer [Methyl-³H]-Thd-Markierung hypoxisch unter Zugabe von Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase bzw. normoxisch permeabilisiert und mit [α-³²P]-dATP dauermarkiert, α-Toxin: frisch dialysiert, 98.8 hU/ml, Zusammensetzung des Mediums: Standard mit und ohne 100 µM dCytidin

³H-Markierung: 22 min Dauermarkierung *in vivo*

³²P-Markierung: 0-60-min-Dauermarkierung permeabil.

Einges. Endkonzoncentration im Markierungsansatz: 1740 Bq [³H]-Thd/µl, 1066 Bq [α-³²P]-dATP/µl

Abb. 57 zeigt, daß die Zugabe von dCyd zum hypoxischen Permeabilisierungsmedium keinerlei Auswirkungen auf die Replikation von SV40-infizierte CV1-Zellen hatte. Höhere dCyd-Konzentrationen könnten evtl. einen Einfluß auf die Replikation haben.

4.6.3 Einfluß von Desferroxamin und Hydroxyharnstoff

Der Radikalfänger Hydroxyharnstoff (HH) kann das Tyrosylradikal der Ribonukleotidreduktase zerstören, Desferroxamin kann als Eisenchelator die Funktion der Ribonukleotidreduktase beeinflussen. Die Beeinträchtigung der Replikation von CV1-Zellen durch *In-vivo*-Vorinkubation mit Hydroxyharnstoff bzw. Desferroxamin, wurde unter hypoxischen Bedingungen getestet (Abb. 57).

Hydroxyharnstoff oder Desferroxamin

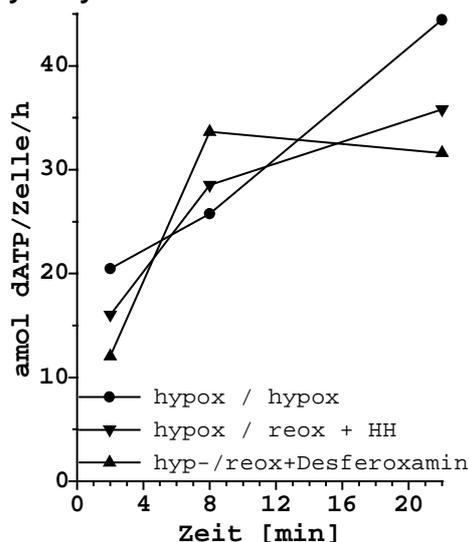


Abb. 57: Einfluß von Hydroxyharnstoff und Desferroxamin auf hypoxische, permeabilisierte Zellen

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden nach 8stündiger hypoxischer Begasung *in vivo* entweder hypoxisch (mit Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase) oder nach 20minütiger Vorinkubation mit Hydroxyharnstoff (3 mM) bzw. 90minütiger Vorinkubation mit Desferroxamin (1 mM) normoxisch permeabilisiert. Die 4-min-Puls-Doppelmarkierung erfolgte gleichzeitig mit [Methyl-³H]-Thd und [α-³²P]-dATP. α-Toxin: 8330 hU/ml

Zusammensetzung des Mediums: Standard + 1 mM Desferroxamin oder 3 mM Hydroxyharnstoff

³H-/³²P-Markierung: 4-min-Pulsmarkierung

Einges. Endkonzoncentration im Markierungsansatz: 1110 Bq [³H]-Thd/µl, 561 Bq [α-³²P]-dATP/µl

Sowohl durch Zugabe von Hydroxyharnstoff als auch von Desferroxamin konnte eine Reaktion der Replikation auf die Reoxigenierung unterdrückt werden. Der Einbau markierter Nukleotide in die DNA in 4minütigen Pulsmarkierungen überstieg das Niveau hypoxisch permeabilisierter Vergleichszellen nicht.

Welche Auswirkungen die Reoxygenierung der Zellen 10 min nach hypoxischer Permeabilisierung in Gegenwart von Hydroxyharnstoff auf die Replikation hat ("verzögerte Reoxygenierung", Abb. 58) wurde anschließend untersucht (analog zu 4.4.7, vgl. Abb. 45, „Komplex“):

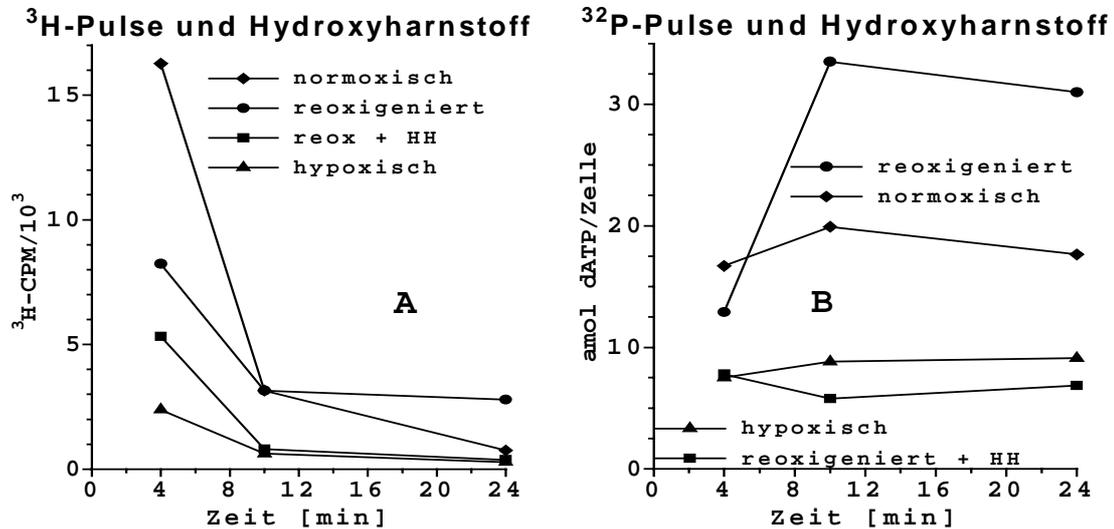


Abb. 58: Reoxygenierung mit Hydroxyharnstoff

SV40-infizierte CV1-Zellen wurden 1. nach 3.5stündiger normoxischer Inkubation permeabilisiert oder 2. 2 h normoxisch und anschließend 7.5 h *in vivo* hypoxisch begast bevor die Zellen hypoxisch permeabilisiert wurden (unter Zugabe von Ascorbat, NaHCO₃ und Ascorbatoxidase). Die Reoxygenierung erfolgte über Medien austausch, Hydroxyharnstoff wurde jeweils 20 min vor Reoxygenierung zugegeben. Die Pulsmarkierung erfolgte in jeweils 4 min mit [α -³²P]-dATP und [Methyl-³H]-Thd gleichzeitig. α -Toxin: 8330 hU/ml, ³H-/³²P-Markierung: 4-min-Pulsmarkierung
Zusammensetzung d. Mediums: Standard, Variationen von α -Toxin + Hydroxyharnstoff
Einges. Endkonzentration im Markierungsansatz: 1480 Bq [³H]-Thd/ μ l, 163 Bq [α -³²P]-dATP/ μ l

Bei der Doppelmarkierung reoxygenierter Zellen durch sehr kurze Pulse (4 min) mit [α -³²P]-dATP und [Methyl-³H]-Thd ist der Einbau in die DNA in Gegenwart von Hydroxyharnstoff deutlich geringer als bei normoxisch begasteten bzw. bei reoxygenierten Zellen ohne Hydroxyharnstoff. Der Einbau lag auf dem Niveau hypoxisch vorbegasteter und hypoxisch permeabilisierter Zellen. Hydroxyharnstoff scheint die Reoxygenierungseffekte zuvor hypoxischer Zellen zu unterdrücken: Reoxygenierte und gleichzeitig permeabilisierte, SV40-infizierte CV1-Zellen ohne Hydroxyharnstoff bauten 6-10 min nach Reoxygenierung die 5.8fache Menge markierter Nukleotide wie mit Hydroxyharnstoff behandelte, reoxygenierte Zellen ein.

Nach Vorlage aller Ergebnisse ließ sich die Replikation permeabilisierter CV1-Zellen durch Hydroxyharnstoff nicht beeinflussen. Dies liegt möglicherweise an dem im Vergleich mit dem Zellvolumen umfangreichen Reservoir außerhalb der Zelle, daß der Nukleotidpool aus einem im Vergleich zum Zellvolumen sehr großen Reservoir des Inkubationsmediums außerhalb der Zellen gespeist wird. Unter diesen Umständen wirkt sich eine eventuelle Inaktivität der Ribonukleotid-Reduktase nicht aus. Die Replikation reoxygenierter Zellen konnte jedoch sehr wohl durch Hydroxyharnstoff beeinflusst werden (vgl. auch 4.2.2.8).

5 LITERATUR

- Abdurashidova, G.**, Deganuto, M., Klima, R., Riva, S., Biamonti, G., Giaccia, M. und Falaschi, A., 2000: Start sites of bidirectional DNA synthesis at human lamin B2 origin, **Science** **287**: 2023-2026
- Adams, R.L.P.**, Knowler, J.T. und Leader, D.P., 1992: The biochemistry of the nucleic acids, 11. Ausg., **Chapman & Hall**, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras
- Ahnert-Hilger, G.**, Bhakdi, S. und Gratzl, M., 1985 a: minimal requirements for exocytosis: a study using PC 12 cells permeabilized with staphylococcal alpha-toxin, **J. Biol. Chem.** **260**: 12730-12734
- Ahnert-Hilger, G.**, Bhakdi, S. und Gratzl, M., 1985 b: Alpha-toxin permeabilized rat pheochromocytoma cells: a new approach to investigate stimulus-secretion coupling, **Neurosci. Lett.** **58**: 107-110
- Ahnert-Hilger, G.**, Mach, W., Föhr, K.J. und Gratzl, M., 1989 a: Poration by α -Toxin + Streptolysin O: An approach to analyze intracellular processes, **Meth. Cell Biol.** **Vol. 31**: 63-89
- Ahnert-Hilger, G.**, Bader, M.F., Bhakdi, S. und Gratzl, M., 1989 b: Introduction of macromolecules into bovine adrenal medullary chromaffin cells + rat pheochromocytoma cells (PC 12) by permeabilization with streptolysin O: inhibitory effect of tetanus toxin on catecholamine secretion, **J. Neurochem.** **52**: 1751-1758
- Ahnert-Hilger, G.**, Weller, U., Dauzenroth, M.E., Habermann, E. und Gratzl, M., 1989 c: The tetanus toxin light chain inhibits exocytosis, **Fedn. Eur. biochem. Socs. Lett.** **242**: 245-248
- Altman, A.L.**, Fanning, E., 2001: The chinese hamster dihydrofolate reductase replication origin beta is active at multiple ecotopic chromosomal locations and requires specific DNA sequence elements for activity, **Mol. Cell. Biol.** **Vol. 21, No. 4**, 02/2001: 1098-1110
- Amellem, O.** und Pettersen E.O., 1991: Cell inactivation and cell cycle inhibition as induced by extreme hypoxia: The possible role of cell cycle arrest as a protection against hypoxia-induced lethal damage, **Cell. Prolif.** **24**: 127-141
- Amellem, O.** und Pettersen E.O., 1993: Cell cycle progression in human cells following reoxygenation after extreme hypoxia: Consequences concerning initiation of DNA synthesis, **Cell. Prolif.** **26**: 25-35
- Arbuthnott, J.P.**, 1970: Staphylococcal alpha-toxin. In: Montie, T.C., Kadis, S., Ajl, S.J. (Hrsg.), **Microbial Toxins Vol. 3**, Academic Press, New York: 189-226
- Arbuthnott, J.P.**, Freer, J.H. und Bernheimer, A.W., 1967: *Staphylococcal* toxins in human disease, **J. Appl. Bacteriol.** **94**: 1170-1177
- Arbuthnott, J.P.**, Freer, J.H. und Billcliffe, B., 1973: Lipid-induced polymerization of *staphylococcal* alpha-toxin, **J. Gen. Microbiol.** **75**: 309-319

- Bader, M.-F.**, Thierse, D., Aunis, D., Ahnert-Hilger, G. und Gratzl, M., 1986: Characterization of hormone and protein release from alpha-toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture, **J. Biol. Chem.** **261**: 5777-5783
- Baker, P.F.** und Knight, D.E., 1978: Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes, **Nature** **276**: 620-622
- Baldacci, H.**, Cherif-Zahar, B. und Bernardi, G., 1984: The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast, **EMBO J.** **3**: 2115-2120
- Bedford, J.S.** und Michell, J.B., 1976: The effect of hypoxia on the growth and radiation response of mammalian cells in culture, **Br. J. Radiol.** **47**: 687-696
- Bhakdi, S.** und Tranum-Jensen, J., 1991: Alphatoxin of *Staphylococcus aureus*, **Microbiol.** **55 (4)**: 733-51
- Bhakdi, S.**, Muhly, M. und Füssle, R., 1984: Correlation between toxin binding and hemolytic activity in membrane damage by *staphylococcal* alpha-toxin, **Infect. Immun.** **46**: 318-323
- Bielinsky, A.-K.** und Gerbi, S.A., 1998: Discrete start sites for DNA synthesis in the yeast ARS1 origin, **Science** **279**: 95-98
- Bielinsky, A.-K.** und Gerbi, S.A., 1999: Chromosomal ARS1 has a single leading strand start site, **Mol. Cell** **3**: 477-486
- Bladergroen, B.A.**, Geelen, M.J., Reddy, A.C., Declercq, P.E. und Van Golde L.M., 1998: Channelling of intermediates in the biosynthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells, **Biochem. J.**, **15**, **334 (Pt 3)**: 511-17
- Bobich, J.A.** und Zheng, X., 1988: [³H]-noradrenaline secretion from rat cortex synaptosomes perforated with *staphylococcus aureus* alphatoxin, **J. Neurosci. Methods.**, **20**; **79(2)**: 151-159
- Borowiec, J.A.**, Dean, F.B. und Hurwitz, J., 1991: Differential Induction of structural changes in *simian virus 40* origin of replication by T antigen, **J. Virol.** **65**: 1228-1235
- Bortoleto, R.K.**, de Oliveira, A.H., Ruller, R., Arni, R.K. und Ward, R.J., 1998: Tertiary structural changes of the alpha-hemolysin from *Staphylococcus aureus* on association with liposome membranes, **Arch. Biochem. Biophys.** **351(1)**: 47-52
- Bradford, M.M.**, 1981: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins, **Analyt. Biochem.** **72**: 248-254
- Brischwein, K.**, 1996: Beeinflussung der DNA-Synthese und des Histon-mRNA-Spiegels von Säugetierzellen durch vorübergehende Hypoxie und Inhibitoren, **Dissertation**, Universität Tübingen

- Brischwein, K.**, Engelcke, M., Riedinger, H.-J. und Probst, H, 1997: Role of ribonucleotide reductase and desoxy-nucleotide pools in the oxygen-dependent control of DNA-replication of Ehrlich ascites cells, **Eur. J. Biochem.** **244**: 286-293
- Brooks, J.** und Trembl. S., 1983: Catecholamine secretion by chemically skinned cultured chromaffin cells, **J. Neurochem.** **40**: 468-474
- Bullock, P.A.**, Seo, Y.S. und Hurwitz, J., 1989: Initiation of Simian Virus 40 DNA replication *in vitro*: Pulse-chase experiments identify the first labeled species as topologically unwound, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **86**: 3944-3948
- Bullock, P.A.**, Seo, Y.S. und Hurwitz, J., 1991: Initiation of Simian Virus 40 DNA synthesis *in vitro*, **Mol. Cell Biol.** **11**: 2350-2361
- Carey, M.F.**, Singh, K., Botchan, M. und Cozzarelli, 1986: Induction of specific transcription by RNA polymerase III in transformed cells, **Mol. Cell. Biol.** **6**: 3068-3076
- Cassidy, P.** und Harshman, S., 1976: Studies on the binding of staphylococcal I-125-labelled alpha-toxin bound to rabbit erythrocytes, **Biochemistry** **15**: 2348-2355
- Contreras, R.**, Gheysen, D., Knowland, J., van der Voorde, A. und Fiers, W., 1982: Evidence for the direct involvement of DNA replication origin in synthesis of late SV 40 RNA, **Nature** **300**: 500-505
- Coverley, D.**, Laskey, R.A., 1994: Eukaryotic DNA replication, **Ann. Rev. Biochem.** **63**: 745-776
- Dalen, A. B.**, 1976: A simple procedure for the purification of staphylococcal alpha-toxin, **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B** **84**: 326-332
- Danna, K.J.** und Nathans, D., 1972: Studies of SV 40 DNA. IV. Bidirectional replication of SV40 DNA, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **69**: 3097 ff
- Dayanithi, G.**, Stecher, B., Höhne-Zell, B., Yamasaki, S., Binz, T., Weller, U., Niemann, H. und Gratzl, M., 1994: Exploring the functional domain and the target of the tetanus toxin light chain in neurohypophysial terminals, **Neurosci. Vol.** **58, 2**: 423-431
- Dean, F.B.**, Bullock, P., Murakami, Y., Wobble, C.R., Weissbach, L. und Hurwitz, J., 1987: Simian Virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication, **Proc. Natl. Acad. Sci.** **84**: 16
- DeBruyn Kops, A.** und Knipe, D.M., 1988: Formation of DNA replication structures in herpes virus-infected cells requires a viral binding protein, **Cell** **55**: 857-868
- Dennis, D.** und Bullock, P.A., 1993: Primer DNA formation during simian virus 40 DNA replication *in vitro*, **Mol. Cell Biol.** **13**: 2882-2890
- DePamphilis, M.L.** und Bradley, M.K., 1986: Replication of SV40 and polyoma virus chromosomes, in: The Papovaviridae (Salzman, N.P.F.-C. Hrsg., 1988) 99-245, **Plenum Press**, New York, London

- DePamphilis, M.L.**, 1993: Eucaryotic DNA replication: Anatomy of an origin, **Ann. Rev. Biochem.** 62: 29-63
- DePamphilis, M.L.**, 1996: Origins of DNA replication, S. 45-86. In M.L. DePamphilis (ed.), DNA replication in eucaryotic cells. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Dreier, T.**, 1991: Einfluß vorübergehender Hemmung der Proteinbiosynthese auf die Replikation von TC 7-Zellen und von SV 40, **Diplomarbeit**, Universität Tübingen
- Dreier, T.**, 1995: Auswirkungen von Hypoxie und Inhibitoren der DNA-Synthese auf die SV40-Replikation *in vivo* und *in vitro*, **Dissertation**, Universität Tübingen
- Dreier, T.**, Scheidtmann, K.H., und Probst, H., 1993: Synchronous replication of SV40 DNA in virus infected TC7 cells induced by transient hypoxia, **FEBS Lett.** **336**: 445-451
- Dunn, L.** und Holz, R., 1983: Catecholamine secretion from digitonin-permeabilized adrenal medullary chromaffin cells, **J. Biol. Chem.** 258: 4989-4993
- Eger, F.**, 1995: durch Staphylococcus- α -Toxin permeabilisierte Zellen als System des Studiums der DNA-Replikation, **Diplomarbeit**, Universität Tübingen
- Engelcke, M.**, 1992: Verhalten der Desoxynukleotid-Pools bei der O₂-abhängigen Regulation der Replikation von Säugetierzellen, **Dissertation**, Universität Tübingen
- Erdile, L.F.** et al., 1991: Initiation of SV 40 DNA replication: Mechanism and control, **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biologie** **56**: 303-312
- Fanning, E.** und Knippers, R., 1992: Structure and function of Simian Virus 40 Large Tumor Antigen, **Annu. Rev. Biochem.** **61**: 55-85
- Föhr, K.J.**, Warchol, W. u. Gratzl, M., 1993: Calculation and control of free divalent cations in solutions used for membrane fusion studies, **Meth. Enzym.** **Vol.221**:149-156
- Foley, G.E.**, Lazarus, H., Farber, S., Uzman, B., Boone, B. und McCarthy, R., 1965: Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia, **Cancer** **18**: 522-529
- Forti, S.** und Menestrina, G., 1989: Staphylococcal alpha-toxin increase the permeability of lipid vesicles by cholesterol - and pH - dependent assembly of oligomeric channels, **Eur. J. Biochem.** **181**: 767-773
- Freer, J.H.** und Arbuthnott, J.P., 1986: Toxins of *Staphylococcus aureus*. In: Dorner, F., Drews, J. (Hrsg.), Pharmacology of Bacterial toxins, **International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics Sect. 119**, Pergamon Press, Oxford; 581-634
- Freer, J.H.**, Arbuthnott, J.P. und Bernheimer, A.W., 1968: Interaction of staphylococcal alpha-toxin with artificial and natural membranes, **J. Bacteriol.** **95**: 1153-1168

- Füssle, R.**, Bhakdi, S., Sziegoleit, A., Trantum-Jensen, J., Kranz, T. und Wellensiek, H.J., 1981: On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin, **J. Cell. Biol.** **91**: 83-94
- Geider, K.** und Hoffmann-Berling, H., 1981: Proteins controlling the helical structure of DNA, **Ann. Rev. Biochem.** **50**: 233-260
- Gekeler, V.**, 1982: Synchronisation von Replikationseinheiten in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, **Dissertation**, Universität Tübingen
- Gekeler, V.** und Probst, H., 1988: Synchronisation of replicons in Ehrlich ascites cells. **Exp. Cell Res.**, **175**: 97-108
- Gekeler, V.**, Eppele, J., Kleymann, G. und weitere, 1993: Selective and synchronous activation of early S-phase replicons of Ehrlich ascites cells. **Mol. Cell. Biol.** **13**: 5020-5033
- Gellert, M.**, 1981: DNA topoisomerases, **Ann. Rev. Biochem** **50**: 879-910
- Gkantiragas, I.**, 1997: Untersuchungen zur Wirkung von Staurosporin auf DNA-Replikation und T-Antigen-Expression in SV40-infizierten CV1-Zellen, **Diplomarbeit**, Univ. Tübingen
- Gourlie, B.B.** und Pigiet, V.P., 1983: Polyoma virus minichromosomes: characterization of the products of in vitro DNA synthesis, **J. Virol.** **45(2)**: 585-593
- Gray, G.S.** und Kehoe, M., 1984: Primary sequence of the alpha-toxin gene from *Staphylococcus aureus*, Wood 46, **Infect. Immun.** **46**: 615-618
- Green, S.L.** und Giaccia, A.J., 1998: Tumor hypoxia and the cell cycle: implications for malignant progression and response to therapy, **Cancer J. Sci. Am.** **4**: 218-223
- Green, S.L.**, Freiberg, R.A. und Giaccia, A.J., 2001: p21^{Cip1} and p27^{Kip1} regulate cell cycle reentry after hypoxic stress but are not necessary für hypoxia-induced arrest, **Mol. Cell. Biol.** **Vol. 21, No.4**: 1196-1206
- Hameed, A.**, Olsen, K.J., Lee, M., Lichtenheld, M.G. und Podack, E.R., 1989: Cytolysis by Ca-permeable transmembrane channels. Pore formation causes extensive DNA degradation and cell lysis, **J. Exp. Med.** **169**: 76-77
- Hammond, R.A.**, Miller, M.R., Gray, M.S. und Reddy, G.V.P., 1989: Association of 3'-5'-Exodesoxyribonuclease activity with DNA replikase complex from S-phase chinese hamster embryo fibroblast cells, **Exp. Cell. Res.** **183**: 284-293
- Hand, R.**, 1978: Eukaryotic DNA: Organization of the genome for replication, **Cell** **15**: 317-325
- Harzell, S.W.**, Byrne, B.J. und Subramanian, N.K., 1984: The simian virus 40 minimal origin and the 72-base-pair repeat are required simultaneously for efficient induction of late gene expression with large tumor antigen, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **81**: 6335-6339

- Hildebrand, A.**, Pohl, M., Bhakdi, S., 1991, *Staphylococcus aureus* alpha-toxin - Dual mechanism of binding to target cells, **J. Biol. Chem.** **266**: 17195-17200
- Hirt, B.**, 1967, Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures, **J. Mol. Biol.** **26**: 365-369
- Hiscott, J.**, Wong, A., Alper, D. und Xanthoudakis, S., 1988: Trans activation of type 1 interferon promoters by simian virus 40 T antigen, **Mol. Cell. Biol.** **8**: 3397-3404
- Howell, T.W.**, Cockcroft, S. und Gomperts, B.D., 1987: Essential synergy between Ca²⁺ and guanine nucleotides in exocytotic secretion from permeabilized rat mast cells, **J. Cell Biol.** **105**: 191-197
- Howell, T.W.** und Gomperts, B., 1987: Rat mast cells permeabilized with streptolysin O secrete histamine in response to Ca²⁺ at concentrations buffered in the micromolar range, **Biochim. Biophys. Acta** **927**: 177-183
- Huges, T.A.** und Cook, P.R., 1996: Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase, **Exp. Cell Res.**, **222(2)**: 275-80
- Ikigai, H.** und Nakae, T., 1985: Conformational alteration in alpha-toxin from *Staphylococcus aureus* concomitant with the transformation of the water soluble monomer to the membrane oligomer, **Biochem. Biophys. res. Commun.** **130**: 175-181
- Jackson, D.A.** und Cook, P.R., 1986: Replication occurs at a nucleoskeleton, **EMBO J.** **5**: 1403-1410
- Jakobovits, E.G.**, Bratosin, S. und Aloni, Y., 1980: A nucleosome-free region in SV40 minichromosomes, **Nature** **285**: 263-265
- Jonas, D.**, Walev, I., Berger, T., Liebetrau, M., Palmer, M. und Bhakdi, S., 1994: Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation, **Infect. Immun.**, **62 (4)**: 1304-12
- Kaletta, J.T.**, 1994: Kernmatrix-Assoziation replizierender SV40-DNA in virusinfizierten CCL70-Zellen unter vorübergehender Hypoxie, **Diplomarbeit**, Universität Tübingen
- Kaminskas, E.** und Li, J.C., 1989: DNA fragmentation in permeabilized cells and nuclei, **Biochem. J.** **261**: 17-21
- Karzel, K.**, 1965: Über einen in vitro in Suspension wachsenden permanenten Stamm von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen, **Med. Pharmakol. Exp.** **12**: 137-146
- Kelly, J.J.**, Munholland, J.M. und Wildeman, A.G., 1989: Comeasurement of simian virus 40 early and late promotor activity in HeLa and 293 cells in the presence of T antigen, **J. Virol.** **63**: 283-391
- Knight, D.** und Baker, P., 1982: Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields, **J. Membr. Biol.** **68**: 107-140

- Knippers, R.**, 1990: Molekulare Genetik, **Georg Thieme Verlag**, Stuttgart
- Kornberg, A.** und Baker, T.A., 1992: DNA replication, 2. Aufl., **Freeman W.H. and company**, N.Y.
- Kowalski, J.** und Cheevers, W.P., 1976: Synthesis of high molecular weight DNA strands during S phase, **J. Mol. Biol.** **104**: 603-615
- Krasilnikov, O.V.**, Sabirov, R.Z., Ternovsky, V.I., Merzliak, P.G. und Tashmukhamedor, B.A., 1988: The structure of *staphylococcus aureus* alpha-toxin-induced ionic channel, **Gen. Physiol. Biophys.** **7**: 467-473
- Krasilnikov, O.V.**, Merzliak, P.G., Yuldasheva, L.N., Rodrigues, C.G. und Nogueira, R.A., 1999: Heparin influence on *alpha-staphylo toxin* formed channel, **Biochim. Biophys. Acta.**, **1417 (1)**: 167-182
- Lai, C.-J.** und Nathans, D., 1975: Non-specific termination of SV 40 DNA replication, **J. Mol. Biol.** **97**: 113 ff
- Lewin, B.**, 1994: Genes V, 5. Aufl., **John Wiley and sons**, inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
- Li, J.J.** und Kelly, T.J., 1984: Simian Virus 40 DNA replication in vitro, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **81**: 6973-6977
- Lind, I.**, Ahnert-Hilger, G., Fuchs, G. und Gratzl, M., 1986: Purification of alpha-toxin from *Staphylococcus aureus* and application to cell permeabilization, **Analyt. Bioch.** **164**: 84-89
- Loffler, M.**, 1987: Restimulation of cell cycle progression by hypoxic cells with deoxynucleosides requires ppm oxygen tension, **Exp. Cell Res.** **169**: 255-261
- Ludlow, J.W.**, Howell, R.L. und Smith, H.C., 1993: Hypoxic stress induces reversible hypophosphorylation of pRB and reduction in cyclin A abundance independent of cell cycle progression, **Oncogene** **8**: 331-339
- Martin, P.**, 1999, unveröffentlichte Daten
- Martin, P.**, 1997: „Kleinmolekül-spezifische“ Permeabilisierung durch α -Toxin von *Staphylococcus aureus* als Werkzeug für das Studium von Mechanismus und Regulation der Replikation der zellulären DNA von CCRF-CEM- und HeLa-Zellen, **Diplomarbeit**, Universität Tübingen
- Martin, R.G.**, 1981: The transformation of cell growth and transmigration of DNA synthesis by simian virus 40, **Adv. Cancer Res.** **34**: 1-68
- Mathews, C.K.** und Slabaugh, M.B., 1986: Eucaryotic DNA metabolism are deoxynucleotides channeled to replication sites ?, **Exp. Cell. Res.** **162**: 285-295
- McEwen, B. F.** und Arion, W. J., 1985: Permeabilization of rat hepatocytes with *Staphylococcus aureus* alpha-toxin, **J. Cell Biol.** **100**: 1922-1929

- Menestrina, G.**, 1986: Ionic channels formed by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: voltage-dependent inhibition by divalent and trivalent cations, **J. Membr. Biol.** **90**: 177-190
- Menestrina, G.**, 1988: Pore formation by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: a study using planar bilayers, **Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. Abt. I Suppl.** **17**: 295-302
- Menestrina, G.**, 1991: Pore-forming cytolysins studied with planar lipid membranes, **Period. Biol.** **93**: 201-206
- Miller, R.M.** und Chinault, D.N., 1982: The roles of DNA polymerases alpha, beta, and gamma in DNA repair synthesis induced in hamster and human cells by different DNA damaging agents, **J. Biol. Chem.** **257 (17)**: 10204-10209
- Mitchell, P.J.**, Wang, C. und Tijan, R., 1987: Positive and negative regulation transcription *in vitro*: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV 40 T antigen, **Cell** **50**: 847-861
- Moarefi, I.F.**, Small, D., Gilbert, I., Hoepfner, M., Randal, S.K., Schneider, C., Russo, A.A.R., Ramsperger, U., Arthur, A.K., Stahl, H., Kelly, T.J. und Fanning, E., 1993: Mutation of the cyclin-dependent kinase phosphorylation site in simian virus 40 (SV40) large T antigen specifically blocks SV 40 origin DNA unwinding, **J. Virol.** **67**: 4992-5002
- Moore, G.E.**, Gerner, R.E. und Franklin, H.A., 1967: Culture of normal human leukocytes, **J. Am. Assoc.** **199**: 519-524
- Moriya, S.**, Ogasawara, N., Yoshikawa, H., 1985, Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. Nucleotide sequence of some 10000 base pairs in the origin region. **Nucleic Acid Res.** **13**: 2251-2266
- Moses, R.E.**, 1995: Permeabilized cells, **Meth.-Enzym.** **262**: 497-499
- Murakami, Y.** und Hurwitz, J., 1992: Functional interactions between SV40 T antigen and other replication proteins at the replication fork, **J. Biol. Chem.** **268**: 11008-11017
- Nakamura, T.**, Makino, N. und Ogura, Y., 1968: Purification and properties of ascorbate oxidase from cucumber, **J. Biochem. Tokyo** **64 (2)**: 189-195
- Nakayasu, H.** und Berezney, R., 1989: Mapping replicational sites in the eukaryotic cell nucleus, **J. Cell Biol.** **108**: 1-11
- Nawotka, K.A.** und Huberman, J.A., 1988: Two-dimensional gel electrophoretic method for mapping DNA replicons, **Mol. Cell. Biol.** **Vol. 8, 4**: 1408-1413
- Negrutskii, B.S.**, Stapulionis, R. und Deutscher, M.P., 1993: Supramolecular organization of the mammalian translation system, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **91**: 964-969
- Nethanel, T.**, Reisfeld, S., Dinter-Gottlieb, G. und Kaufmann, G., 1988: An Okazaki piece of simian virus 40 may be synthesized by ligation of shorter precursor chains, **J. Virol.** **62**: 2867-2873

- Nethanel, T.** und Kaufmann, G., 1990: Two DNA polymerases may be required for synthesis of the Lagging DNA Strand of Simian Virus 40, **J. Virol.** **64**: 5912-5918
- Nethanel, T.**, Zlotkin, T. und Kaufmann, G., 1992: Assembly of SV 40 Okazaki pieces from DNA primers is reversibly arrested by ATP depletion, **J. Virol.** **62**: 6634-6640
- Newlon, C.S.**, 1996: DNA replication in yeast, S. 873-914. In: M.L. DePamphilis (Hrsg.), DNA replication in eucaryotic cells. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Nicander, B.** und Reichard, P., 1983: Dynamics of pyrimidine deoxynucleoside triphosphate pools in relationship to DNA synthesis in 3T6 mouse fibroblasts, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **80 (5)**: 1347-1351
- Nordlund, P.**, B. M. Sjöberg und H. Eklund, 1990: Three-dimensional structure of the free radical protein of ribonucleotid reductase, **Nature** **345**: 593-598
- Nossal, N.G.**, 1983: Prokaryotic DNA replication systems, **Ann. Rev. Biochem.** **52**: 581-615
- Ogawa, T.** u. Okasaki, T., 1980: Discontinuous DNA replication, **Ann. Rev. Biochem.** **49**: 421-457
- Pan, Z.-Q.**, Chen, M. und Hurwitz, J., 1993: The subunits of activator 1 (replication factor C) carry out multiple functions essential for proliferating-cell nuclear antigen-dependent DNA synthesis, **Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **90**: 6-10
- Pardee, A.B.**, 1989: G₁ events and regulation of cell proliferation, **Science** **246**: 603-608
- Pettersen, E.O.** und Lindmo, T., 1983: Inhibition of cell-cycle progression by acute treatment with various degrees of hypoxia: Modifications induced by low concentrations of misonidazole present during hypoxia, **Br. J. Cancer** **48**: 809-817
- Prelich, G.** und Stillman, B., 1988: Coordinated leading and lagging strand synthesis during SV 40 DNA replication *in vitro* requires PNCA, **Cell.** **53**: 117-126
- Prinz, F.O.**, 1995: Charakterisierung einer Minigenbank mit putativen Initiationsregionen früh replizierender DNA aus Ehrlich-Aszites-Tumorzellen, **Diplomarbeit**, Universität Tübingen
- Probst, G.**, Riedinger, H.-J., Engelcke, M., Brischwein, K. und Probst, H., 1999: Fast control of DNA replication in response to hypoxia and to inhibited protein synthesis in CCRF-CEM and HeLa cells, **Biol. Chem.** **380 (12)**: 1371-1382
- Probst, H.** und Maisenbacher, J., 1973: Use of zonal centrifugation for preparing synchronous cultures from Ehrlich Ascites cells grown *in vivo*, **Exp. Cell. Res.** **78**: 335-344
- Probst, H.**, Blutters, R. und Fielitz, J., 1980 a: DNA replication in asynchronous and synchronous Ehrlich ascites cells in different conditions of growth, **Exp. Cell. Res.** **130 (1)**: 1-13

- Probst, H.** und Gekeler, V., 1980 b: Reversible inhibition of replicon initiation in Ehrlich ascites cells by anaerobiosis, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **94 (1)**: 55-60
- Probst, H.**, Hofstaetter, T., Jenke, H.-S., Gentner, P.R. und Müller-Scholz, D., 1983 a: metabolism and non-random occurrence of nonnascent short chains in the DNA of Ehrlich ascites cells, **Biochim. Biophys. Acta.** **740**: 200-211
- Probst, H.**, Hamprecht, K., und Gekeler, V., 1983 b, Replicon initiation frequency and intracellular levels of ATP, ADP, AMP and diadenosine 5', 5'''-P1,P4-tetraphosphate in Ehrlich ascites cells cultured aerobically and anaerobically. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **110**: 688-693.
- Probst, H.**, Gekeler, V. und Helftenbein, E., 1984: Oxygen dependence of nuclear DNA replication in Ehrlich ascites cells, **Exp. Cell Res.** **154**: 327-341.
- Probst, H.** und Gekeler, V., 1988 a: Oxygen dependent regulation of DNA replication of Ehrlich ascites cells *in vitro* and *in vivo*. In: Acker, H. (Hrsg.), **Oxygen sensing in tissues**, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 79-92
- Probst, H.**, Schiffer, H., Gekeler, V., Kienzle-Pfeilsticker, H., Stropp, U., Stötzer, K.E. und Frenzel-Stötzer, I., 1988 b: Oxygen dependent regulation of DNA replication of Ehrlich ascites cells *in vitro* and *in vivo*, **Cancer Res.** **48**: 2053-2060
- Probst, H.**, Schiffer, H., Gekeler, V., and Scheffler, K., 1989: Oxygen dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase *in vivo* and possible significance for replicon initiation, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **163**: 334-340
- Probst, H.**, 1995: persönliche Mitteilung
- Probst, H.**, 1997: persönliche Mitteilung
- Puck, T.T.**, Marcus, P.I. und Cieciura, S.J., 1956: Clonal growth of mammalian cells *in vitro*, growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a „feeder“ layer, **J.Exp.Med.** **46**: 3075-3081
- Raja, S.M.**, Rawat, S.S., Chattopadhyay, A. und Lala, A.K., 1999: Localization and environment of tryptophans in soluble and membrane-bound states of a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*, **Biophys. J.**, **76 (3)**: 1469-79
- Rawlins, D.R.**, Rosenfeld, P.J., Wides, R.J., Challberg, M.D. und Kelly, T.J., 1984: Structure and function of the adenovirus origin of replication, **Cell** **37**: 309-319
- Reddy, G.V.P.** und Pardee, A.B., 1980: Multienzyme complex for metabolic channeling in mammalian DNA replication, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **77**: 3312-3316
- Reddy, G.V.P.** und Pardee, A.B., 1982: Coupled ribonucleoside diphosphate reduction, channeling, and incorporation into DNA of mammalian cells, **J. Biol. Chem.** **257**: 12526-12531
- Reichard, P.** und Ehrenberg, A., 1983: Ribonucleotide reductase – a radical enzyme, **Science** **221 (4610)**: 514-519

- Riedinger, H.-J.**, 1991: Genexpression im Zusammenhang mit der Sauerstoffabhängigen Regulation der DNA-Replikation in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, **Dissertation**, Universität Tübingen
- Riedinger, H.-J.**, Gekeler, V. und Probst, H., 1992: Reversible shutdown of replication initiation by transient hypoxia in Ehrlich ascites cells: Dependence on short-lived protein. **Eur. J. Biochem.** **210**: 389-398.
- Riedinger, H.-J.**, 1995: persönliche Mitteilung
- Riedinger, H.-J.**, 1997: persönliche Mitteilung
- Riedinger, H.-J.**, 1998 a: persönliche Mitteilung
- Riedinger, H.-J.**, 1998 b: unveröffentlichte Daten
- Riedinger, H.-J.**, van Betteray, M. und Probst, 1999: Hypoxia blocks in vivo initiation of simian virus 40 replication at a stage preceding origin unwinding, **J. Virol.** **73**: 2243-2252.
- Rio, D.** und Tjian, R., 1983: SV 40 T antigen binding site mutations that affect autoregulation, **Cell** **32**: 1227-1240
- Salzman, N.P.**, 1988: The Papovaviridae, Fraenkel-Conrat, Hrsg., Plenum Press, New York, London
- Sambrook, J.**, Fritsch, E.F. und Maniatis, T., 1989: Molecular cloning: a laboratory manual, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sarkar, N.**, List, J.F. und Banfalvi, G., 1987: Replication of the origin region of simian virus 40 DNA in permeabilized monkey cells, **Eur. J. Biochem.** **168**: 263-268.
- Scheffner, M.**, Knippers, R. und Stahl, H., 1989: RNA unwinding activity of SV40 large T antigen, **Cell** **57**: 955-963
- Scheffner, M.**, Knippers, R. und Stahl, H., 1991: Simian-virus-40-large-T-antigen-catalyzed DNA and RNA unwinding reactions, **Eur. J. Biochem.** **195**: 49-54
- Scheidtmann, K.H.**, Virshup, D.M. und Kelly, T.J., 1991: Protein phosphatase 2A dephosphorylates simian virus 40 large T antigen specifically at residues involved in regulation of DNA-binding activity, **J. Virol.** **65**: 2098-2101
- Schulte, D.**, Knippers, R., Dreier, T., Probst, G., und Probst, H., 1992: Cycloheximide inhibits cellular, but not SV40, DNA replication, **FEBS Lett.** **299**: 149-154.
- Schutzbank, T.**, Robinson, R., Oren, M und Levine, A. J., 1982: SV 40 large tumor antigen can regulate some cellular transcripts in a positive fashion, **Cell** **30**, 481-490
- Scott, M.R.D.**, Westphal, K.H. und Rigby, P.W.J., 1983: Activation of mouse genes in transformed cells, **Cell** **34**, 557-567
- Segawa, K.** und Yamaguchi, N, 1987: Induction of c-Ha-ras transcription in rat cells by simian virus 40 large T antigen, **Mol. Cell. Biol.** **7**: 556-559

- Siemann, D.W.**, Keng, P.C., 1988: Characterization of radiation resistant hypoxic cell subpopulations in KHT sarcomas. (ii) Cell sorting, **Br. J. Cancer** **58**: 296-300
- Snapka, R. M.**, 1986: Topoisomerase inhibitors can selectively interfere with different stages of simian virus 40 DNA replication, **Mol. Cell. Biol.** **6(12)**: 4221-4227
- Snapka, R. M.**, Powelson, M.A. und Strayer, J.M., 1988: Swiveling and decatenation of replicating simian virus 40 genomes *in vivo*, **Mol. Cell. Biol.** **8**: 515-521
- Snapka, R.M.**, Permana, P.A., Marquitt, G. und Shin, C.-G., 1991 a: Two-dimensional agarose gel analysis of simian virus 40 DNA replication intermediates, **Meth.: Comp. Meth. Enzym.** **Vol. 3, 2**: 73-82
- Snapka, R.M.**, Shin, C.-G., Permana, P.A. und Strayer, J., 1991b: Aphidicolin-induced topological and recombinational events in simian virus 40, **Nucl. Acids Res.** **Vol. 19, 18**: 5065-5072
- Snapka, R.M.** und Permana, P.A, 1993: SV40 DNA replication intermediates: Analysis of drugs which target mammalian DNA replication, **BioEssays** **Vol. 15, 2**: 121-126
- Sogo, J.M.**, Stahl, H., Koller, T. und Knippers, R., 1986: Structure of replicating simian virus 40 minichromosomes. The replication fork, core histone segregation and terminal structures, **J. Mol. Biol.** **189**: 189-204
- Soprano, K.J.**, Galanti, N., Jonak, G.J., McKercher, S., Pipas, J.M., 1983: Mutational analysis of simian virus 40 T antigen: stimulation of cellular DNA synthesis and activation of rRNA genes by mutants with deletions in the t antigen gene, **Mol. Cell. Biol.** **3**: 214-219
- Spyrou, G.** und Reichard, P, 1983: Ribonucleotides are not channeled into DNA in permeabilized mammalian cells, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **115 (3)**: 1022-1026
- Spyrou, G.** und Reichard, P, 1987: Compartmentation of dCTP pools. Evidence from desoxyliponucleotide synthesis, **J. Biol. Chem.** **262 (34)**: 16425-16432
- Stahl, H.** u. Knippers, R., 1983 a: Simian virus 40 large tumor antigen in replicating viral chromatin. Tight binding and localization on the viral genome, **J. Virol.** **47**: 65-76
- Stahl, H.**, Bauer, M. und Knippers, R., 1983 b: The simian virus 40 large tumor antigen in replicating viral chromatin. A salt resistant protein-DNA interaction, **Eur. J. Biochem.** **134**: 55-61
- Stahl, H.**, Droge, P. und Knippers, R., 1986: DNA helicase activity of SV 40 large tumor antigen, **EMBO J.** **5**: 1939-1944
- Stillman, B.**, 1989: Initiation of eukaryotic DNA replication *in vitro*, **Ann. Rev. Cell Biol.** **5**: 197-245
- Studier, F.W.**, 1965: Sedimentation studies of the size and shape of DNA, **J. Mol. Biol.** **11**: 33-51

- Sundin, O.** und Varshavsky, A., 1980: Terminal stages of SV 40 DNA replication proceed via multiple intertwined catenated dimers, **Cell 21**: 103-114
- Sundin O.** und Varshavsky, A., 1981: Arrest of segregation leads to accumulations of highly intertwined catenated dimers: Dissection of the final stages of SV40 DNA replication, **Cell 25**: 659-669
- Sziegoleit, A.,** Füssle, R., Bhakdi, S. und Wellensiek, H.J., 1981: On the pore size of a trans-membrane channel induced by alpha-staphylolysin: a marker release study, **Zbl. Bakt. Suppl. 10**: 231-234
- Tack, L. C.** und Beard, P., 1985: Both trans-acting factors and chromatin structure are involved in the regulation of transcription from the early and late promoters in simian virus 40 chromosomes, **J. Virol. 54**: 207-218
- Tannock, I.F.,** 1968: The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumor, **Br. J. Cancer 22**: 258-273
- Tannock, I.F.,** Hill, R.P. (Hrsg.), 1992: The basic science of oncology, 2. Ausg. **McGraw-Hill, Inc. N.Y.**
- Tapper, D.,** Anderson, S. und DePamphilis, M.L., 1979: Maturation of replicating simian virus 40 DNA molecules in isolated nuclei by continued bidirectional replication to the normal termination region, **Biochim. Biophys. Acta 565**: 84-97
- Thelander, L.,** Graslund, A. und Thelander, M., 1983: Continual presence of oxygen and iron required for mammalian ribonucleotide reduction: possible regulation mechanism, **Biochem. Biophys. Res. Commun. 110**: 859-865
- Thelestam, M.** und Blomquist, L., 1988: Staphylococcal alpha-toxin-recent advances (review), **Toxicon 26**: 51-65
- Thelestam, M.** und Möllby, R., 1983: Survival of cultured cells after functional and structural desorganization of plasma membrane by bacterial hemolysins and phospholipases, **Toxicon 21**: 805-815
- Tobkes, N.,** Wallace, B.A., Bayley, H., 1985: Secondary structure and assembly mechanism of an oligomeric channel protein, **Biochemistry 24**: 1915-1920
- Tooze, J.,** 1981: Molecular biology of tumor viruses, Teil 2, rev., DNA Tumor Viruses, **Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory**
- Trummler, K.J.,** 1995: Untersuchung zur Eignung permeabilisierter Zellen zum Studium der eukaryontischen DNA-Replikation unter Sauerstoffmangel, **Diplomarbeit, Universität Tübingen**
- Uhlmann, F.,** 1994: *In vitro*-Studien zum Wirkungsmechanismus von Sauerstoffmangel auf die SV40-Replikation, **Diplomarbeit, Universität Tübingen**
- Van Betteraey-Nikoleit,** 1999: Veränderungen in SV40 Minichromosomen bei der Initiation der Replikation *in vivo*, **Dissertation, Universität Tübingen**

- Varshavsky, A.J.**, Sundin, O.H. und Bohn, M.J., 1979: A stretch of „late“ SV40 viral DNA about 400 bp long which includes the origin of replication is specifically exposed in SV40 minichromosomes, **Cell 16**: 453-466
- Vemuri, M.C.**, Raju, N.N. und Malhotra, S.K., 1993: Recent advances in nuclear matrix function, **Cytobios 76 (305)**: 117-128
- Voet, D.** und Voet, J., 1995: Biochemistry, 2. Aufl., **John Wiley and sons**, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
- Waga, S.**, Bauer, G. und Stillman, B., 1994: Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors, **J. Biol. Chem. 269**, 10923-10934
- Waga, S.** und Stillman, B., 1994: Anatomy of a DNA replication fork revealed by reconstitution of SV 40 DNA replication *in vitro*, **Nature, Vol. 369**: 207-212
- Weather, D.T.**, Fields-Berry, S.C und DePamphilis, M.L., 1985: The termination region for SV40 DNA replication directs the mode of separation for the two sibling molecules, **Cell 41**: 565-575
- Wildeman, A.G.**, 1989: Transactivation of both early and late simian virus 40 promoters by large tumor antigen does not require nuclear localization of the protein, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86**: 2123-2127
- Wilson, S.P.** und Kirshner, N., 1983: Calcium-evoked secretion from digitonin-permeabilized adrenal medullary chromaffin cells, **J. Biol. Chem. 258**: 4994-5000
- Winnacker, E.L.**, 1985: Gene und Klone, Einführung in die Gentechnologie, **VCH**
- Winter, S.**, 1995: Untersuchungen zur Kernmatrixassoziation von SV40 DNA im Verlauf einer synchronen Replikationsrunde, **Diplomarbeit**, Universität Tübingen
- Wold, M.S.**, Li, J.J. und Kelly, T.J., 1987: Initiation of simian virus 40 DNA replication *in vitro*: Large-tumor-antigen and origin dependent unwinding of the template, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84**: 3643
- Wormer, E.**, 1995: Analyse kurzketziger Intermediate der DNA-Synthese von Säugerzellen, **Diplomarbeit**, Universität Tübingen
- Yang, B.L.**, Wold, M.S., Li, J.J., Kelly, T.J. und Liu, L.F., 1987: Roles of DNA topoisomerases in simian virus 40 DNA replication *in vitro*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84**: 950-954
- Zoller, H.-J.**, 1992: Reinigung von alpha-Toxin von *staphylococcus aureus* und dessen zellbiologische Anwendung, **Dissertation**, Universität Ulm

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

Kongressbeiträge:

Eger, F., Trummler, K., Probst, H. und Riedinger, H.-J. (1997): DNA replication in cells permeabilized for small molecules, **Biol. Chem. (suppl.) 13**: 112

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren:

Anatomie:	Reutter
Anorganische Biochemie:	Hartmann, Weser
Anorganische Chemie:	Lindner, Strähle, Weser
Biochemie:	Bohley, Eisele, Fröhlich, Guglielmi, Hamprecht, Mecke, Probst, Weber, Wiesinger
Botanik und Pflanzenbiochemie:	Mayer, Metzner, Ninnemann
Enzymologie:	Bisswanger, Gebhard, Fröhlich
Genetik:	Büsen, Hemleben, Pelling, Schöffl
Immunologie:	Anderer
Mathematik:	Pommer
Mikrobiologie:	Braun, Götz, Poralla, Zähler
Organische Chemie:	Bayer, Häfelinger, Hagenmaier, Hanack, Jung, Rundel, Schurig, Stegmann
Pharmakologie und Toxikologie:	Bock, Breyer-Pfaff, Pfaff, Schwarz, Werringloer
Physikalische Chemie:	Gauglitz, Göpel, Oberhammer, Oelkrug
Physik	Nakel, Staudt
Physikalische Biochemie:	Voelter
Strahlenschutzkunde:	Feine, Kallee, Reinecke
Tierphysiologie:	Schnitzler
Zoologie:	Günzl, Pfeiffer

TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Name:	Frank Hans Werner Eger
Geburtstag / -ort:	14.08.1966 in Heidelberg
Eltern:	Liesel Eger, geb. Müller Alfred Eger
Familienstand:	verheiratet mit Regina Schmid-Eger
Schulbildung:	1973 - 1977 Waldpark-Grundschule Heidelberg, Boxberg 1977 - 1986 Hölderlin-Gymnasium Heidelberg, Abschluß Abitur
Berufsausbildung:	ab 09 / 1986 Ausbildung zum Beamten des Polizeivollzugsdienstes ab 07 / 1989 Beurlaubung zum Zwecke des Studiums
Studium:	1989 - 1995 Biochemiestudium an der Eberhard-Karls- Universität, in Tübingen 10 / 1990 Diplom-Vorprüfung Teil 1 10 / 1992 Diplom-Vorprüfung Teil 2 10 / 1994 Diplom-Hauptprüfung Teil 1 in Organischer Chemie 02 / 1995 Diplom-Hauptprüfung Teil 2 in Biochemie und Pharmakologie
Diplomarbeit:	3 - 11 / 1995 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Probst am Physiologisch-Chemischen Institut der Eberhard- Karls-Universität in Tübingen mit dem Thema: „Durch <i>Staphylococcus-α-Toxin</i> permeabilisierte Zellen als System des Studiums der DNA- Replikation.“
Dissertation:	ab 01 / 1996 unter der Leitung von Prof. Dr. H. Probst Thema: „Durch <i>Staphylococcus-aureus-α-Toxin</i> permeabilisierte, mit <i>Simian Virus 40</i> infizierte CV1- Zellen als Modellsystem zum Studium der DNA- Replikation höherer Zellen.“ 1997 - 1999 Förderung durch ein Promotionsstipendium nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz des Landes Baden-Württemberg

Selbstverlegt von

Frank Eger

Stäudach 107

72074 Tübingen