

**Untersuchung des molekularen Mechanismus
der schnellen Regulation der DNA-Replikation
an mit Alpha-Toxin aus *S. aureus*
permeabilisierten Kulturzellen**

Dissertation

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

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2001

vorgelegt von

Peter Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2001

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Probst

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Weber

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Betreuung von Prof. Dr. H. Probst am Physiologisch Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Probst für die Überlassung des Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe, und vor allem für seine intensive Betreuung der Arbeit danken. Seine ständige Bereitschaft, sich mit aufgetretenen Fragen auseinanderzusetzen und seine tatkräftige Hilfe bei technischen und organisatorischen Problemen waren von besonders grossem Wert.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. H.-J. Riedinger für seine ständige Hilfsbereitschaft und für die Einarbeitung in verschiedene Arbeitstechniken.

Frau Dr. M. van Betteraey-Nikoleit möchte ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft bei Problemen und für ihre Diskussionsbereitschaft in allen Fragen danken.

Herrn F. Eger möchte ich für die Einarbeitung in die Arbeitstechniken der Zellpermeabilisierung und der Isolierung des α -Toxins danken.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dirk Lass danken für seine kompetente Beratung und aktive Hilfe bei Fragen des Layouts. Sein Einsatz beim Korrekturlesen und bei der Vorbereitung der Publikation der vorliegenden Arbeit war heldenhaft!

“Hallo!” said Piglet, “what are *you* doing?”

“Hunting,” said Pooh.

“Hunting what?”

“Tracking something,” said Winnie-the-Pooh very mysteriously.

“Tracking what?” said Piglet, coming closer.

“That’s just what I ask myself. I ask myself, What?”

“What do you think you’ll answer?”

“I shall have to wait until I catch up with it,” said Winnie-the-Pooh.

(A. A. Milne, Winnie-The-Pooh)

für P.U.X.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die Replikation in eukaryontischen Zellen.....	1
1.2. Regulation der Replikation in vivo	2
1.2.1. Replikation unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck.....	2
1.2.2. Replikation unter Hemmung der Proteinbiosynthese.....	3
1.3. In vitro Systeme zur Untersuchung der Replikation	4
1.4. Permeabilisierung von Zellen mit α -Toxin aus Staphylococcus aureus.....	4
1.5. Fragestellung der Arbeit	5
2. Materialien und Methoden.....	7
2.1. Material	7
2.1.1. Reaktionsgefäße.....	7
2.1.2. Szintillatoren, Filter und Röntgenfilme	7
2.1.3. Gase und Gasmischungen.....	7
2.2. Zellen und Bakterien	8
2.3. Chemikalien	8
2.3.1. Radiochemikalien.....	8
2.4. Puffer und Lösungen	9
2.4.1. Lösungen für zellbiologische Methoden	9
2.4.1.1. Lösungen für die Zellkultur allgemein.....	9
2.4.1.2. Lösungen für in vivo Markierungen.....	9
2.4.1.3. Lösungen für Permeabilisierung von Zellen	10
2.4.1.4. Lösungen für die Herstellung von Cytosolen.....	12
2.4.2. Lösungen für Säurefällung	13
2.4.3. Lösungen für Ultrazentrifugationstechniken	13
2.4.3.1. alkalische Rohrzuckergradienten	13

2.4.3.2.	Lösungen für alkalische Cs ₂ SO ₄ Gradienten.....	14
2.4.3.3.	Lösungen für neutrale Cs ₂ SO ₄ und CsCl Gradienten	14
2.4.4.	Lösungen für denaturierende Gelelektrophorese von Replikationsintermediaten	14
2.4.5.	Sonstige Lösungen	15
2.5.	Methoden	16
2.5.1.	HeLa-Zellkultur	16
2.5.2.	CCRF-CEM Zellkultur	16
2.5.3.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	16
2.5.4.	Radioaktive Markierung zellulärer DNA.....	17
2.5.4.1.	Langzeitmarkierung.....	17
2.5.4.2.	Einbaukurven mit Dauermarkierung.....	17
2.5.4.3.	Puls Experimente	18
2.5.4.4.	Puls-Chase Experimente	18
2.5.4.5.	Abstoppen von Kulturen	18
2.5.5.	Permeabilisierung von Zellen	18
2.5.5.1.	Dauermarkierungen	19
2.5.5.2.	Puls-Markierungen.....	19
2.5.5.3.	Puls-Chase Experimente	19
2.5.6.	Hypoxie.....	19
2.5.6.1.	Hypoxie in vivo.....	19
2.5.6.2.	Hypoxie bei permeabilisierten Zellen	19
2.5.7.	Reoxygenierung.....	20
2.5.8.	Inkubationen mit Hemmstoffen	20
2.5.9.	Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität	20
2.5.10.	Längenanalyse von Replikationsintermediaten mit alkalischen Rohrzuckergradienten	21

2.5.11. Dichteanalysen mit isopyknischen Gradienten.....	22
2.5.11.1. Alkalische Cs ₂ SO ₄ Gradienten.....	22
2.5.11.2. Neutrale CsCl Gradienten	22
2.5.12. Analyse kurzkettiger Replikationsintermediate durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	23
2.5.12.1. Radioaktive Endmarkierung des DNA-Längenstandards	23
2.5.13. Präparation zellulärer Extrakte.....	24
2.5.13.1. Cytosolischer Extrakt	24
2.5.13.1.1. Proteinbestimmung nach Bradford	25
2.5.13.2. Methanol Extrakt.....	25
3. Ergebnisse.....	27
3.1. Replikation in α -Toxin permeabilisierten HeLa-Zellen.....	27
3.1.1. Ungehemmte Replikation	27
3.1.2. Replikation in permeabilisierten HeLa-Zellen unter hemmenden Bedingungen	30
3.1.2.1. Hemmung der DNA-Polymerisation.....	30
3.1.2.1.1. Hemmung durch Aphidicolin	30
3.1.2.1.2. Hemmung durch Ara-CTP	32
3.1.2.2. Auswirkung von Hydroxyharnstoff.....	33
3.1.2.3. Einfluss von vermindertem Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie).....	34
3.1.2.3.1. Permeabilisierung hypoxischer HeLa-Zellen	35
3.1.2.3.2. Hypoxische Begasung von permeabilisierten HeLa-Zellen	38
3.1.2.4. Hemmung der Proteinbiosynthese.....	39
3.1.2.4.1. Cycloheximid	39
3.1.2.4.2. Puromycin.....	43
3.1.2.4.3. Diphtherie-Toxin	45
3.1.3. Auftreten kurzkettiger Intermediate.....	47

3.1.3.1.	Größenbestimmung.....	47
3.1.3.1.1.	Isopyknische Dichtegradientenzentrifugation	48
3.1.3.1.2.	Elektrophoretische Analyse.....	49
3.1.3.2.	Untersuchung zur biochemischen Natur des Materials	52
3.1.3.2.1.	Hydrolyse-Versuche	52
3.1.3.3.	Bedingungen für das Auftreten der kurzkettigen Intermediate	55
3.1.3.3.1.	Variation der α -Toxin-Konzentration.....	55
3.1.3.3.2.	Verschiedene Hemmsituationen	58
3.1.4.	Verwertung der angebotenen Nukleotid-Bausteine.....	60
3.1.4.1.	Dichteverschiebung im isopyknischen Gradienten	60
3.1.4.2.	Markierung mit radioaktiven Ribonukleotiden	62
3.1.5.	Zusammenfassung der Befunde über die DNA Replikation in permeabilisierten HeLa-Zellen	63
3.2.	Versuche die durch die Permeabilisierung verlorengegangene schnelle Replikationsregulation wiederherzustellen.....	64
3.2.1.	Einfluss von Rückständen aus dem Kulturmedium.....	64
3.2.2.	Einfluss von normalen Konsequenzen der Permeabilisierung der Plasmamembran	66
3.2.2.1.	Einfluss des Plasmamembranpotentials.....	66
3.2.2.2.	Einfluss des pH-Wertes des Permeabilisierungsmediums.....	68
3.2.2.3.	Einfluss von Calcium	69
3.2.2.4.	Einfluss des Redoxzustandes der Proteine	70
3.2.2.4.1.	Einfluss von DTT.....	71
3.2.2.4.2.	Einfluss von Glutathion.....	72
3.2.2.4.3.	Einfluss von H ₂ O ₂	73
3.2.3.	Einfluss der Variation der Konzentration von Nukleotiden	73
3.2.3.1.	Einfluss der Konzentration einzelner Desoxynukleosidtriphosphate.....	74

3.2.3.2.	Einfluss der Konzentration der Desoxynukleosiddiphosphate	76
3.2.4.	Einfluss zellulärer Extrakte	76
3.2.4.1.	Versuch der Vorkonditionierung von Permeabilisierungsmedium	77
3.2.4.2.	Versuch mit rohem Zellextrakt Extrakt aus HeLa-Zellen.....	78
3.2.4.3.	Versuch mit Cytosol	79
3.2.5.	Einfluss einer Auswahl niedermolekularer Substanzen	80
3.2.5.1.	Einfluss des NAD/NADH Verhältnisses.....	80
3.2.5.2.	Einfluss der Konzentration von Adenosintriphosphat.....	81
3.2.5.3.	Einfluss von zyklischem Guanosinmonophosphat	83
3.2.5.4.	Einfluss von Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin	83
3.2.5.5.	Einfluss von Diadenosinoligophosphaten.....	85
3.2.5.6.	Einfluss von Polyaminen	85
3.2.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Replikationsregulation.....	86
4.	Diskussion	89
4.1.	Ungehemmte Replikation in permeabilisierten HeLa-Zellen	89
4.2.	Replikation unter hemmenden Bedingungen.....	90
4.2.1.	Direkte Hemmung der prozessiven DNA-Polymerisation.....	91
4.2.2.	Hemmung der Proteinbiosynthese.....	92
4.2.3.	Hypoxie.....	95
4.2.4.	Hydroxyharnstoff	96
4.3.	Auftreten von kurzkettigen Intermediaten	97
4.4.	Verwertung der angebotenen Nukleotidbausteine	101
4.5.	Versuche zur Wiederherstellung der Hemmbarkeit	102
4.5.1.	Einfluss der Rückstände aus dem Kulturmedium RPMI	103
4.5.2.	Einfluss des pH-Wertes	104
4.5.3.	Einfluss des Membranpotentials auf die Replikationsaktivität	105
4.5.4.	Einfluss der Ca ⁺⁺ -Konzentration.....	106

4.5.5.	Einfluss des Redoxzustandes von Thiolgruppen der Proteine	106
4.5.6.	Einfluss der Konzentration von Nukleotiden.....	107
4.5.6.1.	Konzentration der Desoxynukleosidtriphosphate	108
4.5.6.2.	Konzentration der Desoxynukleosiddiphosphate.....	108
4.5.7.	Einfluss cytosolischer Extrakte.....	109
4.5.7.1.	Konditionierung des Permeabilisierungsmediums	109
4.5.7.2.	Roher Zellextrakt durch methanolische Extraktion	110
4.5.7.3.	Cytosol.....	110
4.5.8.	Einfluss verschiedener niedermolekularer Substanzen.....	111
4.5.8.1.	Das NAD ⁺ /NADH Verhältnis	111
4.5.8.2.	Adenosintriphosphat-Gehalt des Permeabilisierungsmediums	112
4.5.8.3.	Zyklisches Guanosinmonophosphat	112
4.5.8.4.	Uridindiphosphat-N-Actylglucosamin.....	113
4.5.8.5.	Diadenosinoligophosphate als Signalübertragungsmoleküle	114
4.6.	Abschliessende Bewertung.....	115
5.	Zusammenfassung.....	119
6.	Literaturverzeichnis	121

1. Einleitung

1.1. Die Replikation in eukaryontischen Zellen

Die meisten eukaryontischen Zellen sind in der Lage, sich zu teilen. Das Produkt der Zellteilung sind zwei Zellen, die mit der ursprünglichen Zelle identisch sind und insbesondere die gleiche genetische Information tragen. Damit eine Zelle bei der Zellteilung jeder Tochterzelle ihre vollständige genetische Information mitgeben kann, muss sie diese zuvor verdoppeln. Die Replikation der chromosomalen DNA der Zelle ist der Vorgang der Verdopplung des genetischen Materials. Dieser Vorgang findet in der S-Phase des Zellzyklus statt. Dieser Abschnitt des Zellzyklus nimmt aber trotz der grossen Menge an genetischer Information, die im eukaryontischen Genom gespeichert ist, nicht den grössten Teil des Zellzyklus ein. Durch die komplexe Organisation der Replikation des Genoms kann das Kopieren der DNA in wenigen Stunden erfolgen. Es gibt nämlich nicht wie bei Prokaryonten nur einen Startpunkt für die Replikation jedes Chromosoms. Vielmehr enthält jedes eukaryontische Chromosom viele Origins der Replikation und ist so in viele Replikationseinheiten, die Replikons, unterteilt¹.

Die Replikation erfolgt dabei nach dem Prinzip der Untergliederung der zu replizierenden Einheiten. Es wird also nicht alle gleichzeitig oder aber in einer Reihe fort repliziert. Vielmehr sind zwanzig bis achtzig benachbarte Replikons jeweils zu Clustern zusammengeordnet, die simultan repliziert werden. Diese zeitsparende Methode birgt jedoch die Gefahr, dass einzelne Sequenzen mehrfach repliziert werden. Die sogenannte Rereplikation von Replikons wird durch die ausgefeilte Kontrolle der Replikation unterbunden, die zwischen bereits replizierten und nicht replizierten Replikons unterscheidet. So kann gewährleistet werden, dass am Ende der Replikation jedes Replikon genau einmal kopiert wurde.

Der Ablauf der Replikation eines Replikons kann funktionell wiederum in einzelne Schritte unterteilt werden. Der Beginn der Replikation eines Replikons wird als Initiation bezeichnet. Die Fortführung der Replikation bezeichnet man als Elongation. Für diesen Vorgang sind zum Teil andere Proteine zuständig als für den Abschnitt der Initiation. Den Abschluss der Replikation der Replikons und die Zusammenfügung einzelner Replikons zu einem geschlossenen DNA-Strang bezeichnet man als Termination.

¹ Hand, R. 1978, Eucaryotic DNA: organisation ...

1.2. Regulation der Replikation in vivo

Für die Zellen stellt die Replikation der DNA einen sehr energieaufwändigen Prozess dar. Deshalb ist es für Zellen sinnvoll, die Replikation nur dann durchzuführen, wenn gewährleistet ist, dass genügend Energie zur Verfügung steht um auch die Zellteilung zu Ende zu bringen. Wenn diese Kopplung der Replikation nicht vorhanden wäre bestünde die Gefahr, dass Zellen trotz knapper Energievorräte in die Replikation eintreten. Dadurch würde die Zelle an Energie depletiert, was den Tod der Zelle zur Folge hätte. Deshalb sind die Regulationsmechanismen, durch welche die Replikation mit anderen energieliefernden Stoffwechselwegen verbunden ist, sehr wichtig.

Die meisten Zelllinien treten unter Mangelbedingungen nicht in die S-Phase ein. Sie gehen in eine Wartephase, die G^0 -Phase über, die sie bei verbesserten Bedingungen wieder verlassen können. Ist jedoch eine Zelle bereits in die S-Phase eingetreten und wird dann einer Mangelsituation, zum Beispiel Sauerstoffmangel oder die Gabe eines Antibiotikums, ausgesetzt, so ist es den meisten Zelllinien möglich, die Replikation reversibel abzuschalten.

1.2.1. Replikation unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck

Wenn asynchrone Zellkultur-Zellen unter Sauerstoffpartialdrücken zwischen 2000 und 200 ppm O_2 (kontrollierte Hypoxie)² inkubiert werden, vermindern sie ihre DNA-Syntheserate. Bei erneuter Sauerstoffgabe wird dann eine verstärkte DNA-Syntheserate beobachtet, die sogar diejenige der Kontrolle übersteigt.³ Dieser Anstieg der DNA-Syntheserate kann jedoch nicht beobachtet werden, wenn während des vorübergehenden Sauerstoffmangels der Sauerstoffgehalt des Gases zu niedrig war. Wenn durch den Sauerstoffgehalt die mitochondriale Atmung nicht mehr ermöglicht wird (unter 150 ppm O_2) und so ein Zusammenbruch der Versorgung mit ATP verursacht wird, führt dies zu einer Schädigung der Zellen. Der Stillstand der DNA-Synthese ist dann nicht reversibel.⁴

Bei kontrolliertem Sauerstoffmangel zeigt sich, dass während der hypoxischen Begasung die Initiationen der Replikation bei den Zellen völlig ausbleiben.⁵ Die verstärkte Replikationsaktivität nach Reoxygenierung zeichnet sich durch ein verstärktes Auftreten von Initiationen aus.

² Probst, H., Gekeler, V., 1988 / Riedinger, H.-J., Gekeler, V., 1992,

³ Probst, H., Gekeler, V., 1988,

⁴ Probst, H., Gekeler, V., 1988

⁵ Probst, H., Gekeler, V., 1980

Dieses wird darauf zurückgeführt, dass mit steigender Hypoxiezeit immer mehr Replikons zur Initiation bereit wurden. Da offenbar unter Hypoxie die Initiation nicht möglich ist, wurden diese Replikons aufgestaut. Nach Zutreten des Sauerstoffs treten dann alle diese über einen längeren Zeitraum hinweg aufgestauten Replikons in die Initiation ein. Hierdurch wird im Verlauf von 2–5 Minuten⁶ ein sprunghafter Anstieg der Replikationsaktivität der Zellen verursacht.

1.2.2. Replikation unter Hemmung der Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese von Zellkulturzellen kann durch das Antibiotikum Cycloheximid sehr effektiv und innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne gehemmt werden. Diese Hemmung hat dann eine ebenso schnelle und intensive Hemmung der DNA-Replikation mit einer zeitlichen Verzögerung von 4–5 Minuten zur Folge.⁷ Nach entfernen des Antibiotikums aus dem Kulturmedium findet ein zügiger Anstieg der Replikationsaktivität statt, der sich durch verstärkte Initiationen auszeichnet. Auch unter der Hemmung der Proteinbiosynthese liegt also eine Initiationshemmung für die Replikation vor. Die initiationsbereiten Replikons werden aufgestaut und nach Entfernung der Hemmsituation vorwiegend gemeinsam initiiert.

Einen Angriffspunkt für die Regulation der Replikation einzelner Replikons ist also auf der Ebene der Initiation zu sehen. Dies zeigt sich besonders durch das verstärkte Auftreten von Neuinitiationen nach der Aufhebung von Hemmsituationen.

Sowohl die Hemmung der Replikon-Initiation als auch die Aufhebung der Hemmung finden mit einer sehr kurzen zeitlichen Verzögerung nach dem Eintritt oder dem Wegfallen einer Hemmsituation auf. Es handelt sich hierbei also um eine schnelle Regulation der Replikation, die es der Zelle ermöglicht, auf plötzlich auftretende Veränderungen im Umfeld zu reagieren. Die beschriebene Zeitspanne, die für die Hemmung erforderlich ist, beträgt 5 Minuten. Innerhalb dieses Zeitraumes ist eine Veränderung der Genexpression oder auch die Expression eines effektorischen Proteins kaum denkbar. Deshalb erscheint es möglich, dass die beschriebene Form der Regulation der Replikationsregulation auf der Stufe der Initiation durch einen niedermolekularen Stoff erfolgt.

⁶ Probst, H., Gekeler, V., 1980 / Probst, H., Gekeler, V., 1984 / Probst, H., Schiffer, H., 1988 etc

⁷ Probst, G., Riedinger, H.-J., 1999

1.3. In vitro Systeme zur Untersuchung der Replikation

Bei intakten Zellen stellt die Untersuchung des Einflusses niedermolekularer Substanzen auf zelluläre Vorgänge oft ein Problem dar. Zum einen gelangen viele Stoffe in der Form, in der sie intrazellulär wirksam sind nicht durch Zellmembran hindurch; andererseits werden die Substanzen in intakten Zellen nicht nur in der beabsichtigten Weise verwertet, und kommen deshalb vielleicht nicht am intendierten Wirkort an. Aus diesem Grund werden zur Untersuchung einzelner Stoffwechselwege in eukaryontischen Zellen ex vivo oder in vitro Systeme verwendet. Im einfachsten Fall bestehen solche Systeme aus einem Gemisch von Enzymen und den dazugehörigen Substraten und Kofaktoren.

Komplexe Abläufe wie die DNA-Polymerisation oder die Replikation können in einfachsten in vitro Ansätzen nicht realisiert werden. Um einen Ablauf dieser Vorgänge – wie sie in vivo stattfinden – simulieren zu können, ist es offenbar notwendig, vielerlei Faktoren aus dem zellulären Umfeld mitzubringen. Deshalb wurden verschiedene Systeme zur Replikation in vitro getestet. Durch Zusatz zellfreier Extrakte liess sich für die Replikation des Simian Virus 40 Minichromosoms ein funktionsfähiges in vitro System etablieren. Auf diese Weise konnten wichtige Informationen über die Replikation dieses Modells für die eukaryontische Replikation erhalten werden⁸.

1.4. Permeabilisierung von Zellen mit α -Toxin aus *Staphylococcus aureus*

Das α -Toxin der *Staphylococcus aureus* ist ein porenbildendes Protein.⁹ Dieses lagert sich in die Membranen eukaryontischer Zellen ein und fungiert dort selbst als Transmembranpore¹⁰. Diese Pore ist ein wassergefüllter Kanal, der bis zu einer Molekülgrösse von etwa zwei kDa durchlässig ist. Bei Anwesenheit dieser Poren können also niedermolekulare wasserlösliche Stoffe, die durch die Membran nicht hindurch könnten, in eukaryontische Zellen hineingelangen. Dies bietet die Möglichkeit unter Erhaltung aller makromolekularen zellulären Bestandteile ein System zu etablieren, dessen Zusammensetzung an niedermolekularen Stoffen durch den Experimentator bestimmt werden kann.

Ein solches System wurde für die Replikation des Simian Virus 40 Minichromosoms erfolg-

⁸ Dreier, T., 1995

⁹ Bayley, H., 1997

¹⁰ Langzhou, S., 1996

reich angewendet.¹¹ Es wurde gezeigt, dass dieses ex vivo System zur Replikation auf der Basis der Permeabilisierung von Zellen mit α -Toxin von *Staphylococcus aureus* sich auch auf die Untersuchung der Replikation der eukaryontischen chromosomale Replikation übertragen lässt. Durch Permeabilisierung von HeLa-Zellen in dem auch für die Simian Virus 40 Replikation eingesetzten Inkubations-Medium konnte die Replikationsfähigkeit der Zellen nach der Permeabilisierung erhalten werden.¹² Es konnte also ein System zur Verfügung gestellt werden, das offenbar DNA-Replikation der Chromosomalen eukaryontischen DNA betreibt und das für niedermolekulare Stoffe zugänglich ist.

Mit Hilfe dieses Systems sollte es möglich sein, die Charakterisierung von niedermolekularen Substanzen, die eine Regulation der Replikationsinitiation ermöglichen, durchzuführen.

1.5. Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, den Weg zu identifizieren, auf dem die Hemmung und Enthemmung der Replikationsinitiation als Antwort auf Mangelsituationen ausgelöst wird. Von vorausgegangen Studien war bekannt, dass die zeitliche Kopplung zwischen dem Eintreten einer Hemmsituation wie Hypoxie oder Proteinbiosynthesehemmung und Initiationshemmung sehr kurz ist. Es vergeht nur sehr wenig Zeit zwischen dem auslösenden Ereignis und dem Erfolg der Replikation. Diese Zeitspanne von fünf Minuten ist für alle weitreichenden Regulationsmechanismen mit Veränderung der Genexpression, wie sie für die Steuerung des Zellzyklus berichtet werden, zu kurz. Allenfalls ist an die Biosynthese eines regulatorischen Proteins zu denken. Am ehesten jedoch erscheint eine derart kurze Zeit durch einen niedermolekularen Stoff erklärbar zu sein.

Ein solcher Stoff müsste entweder im hemmenden Sinn unter Hemmsituationen wirksam sein, oder aber aktivierend im nicht gehemmten Zustand vorhanden sein. In beiden Fällen erscheint es denkbar, dass die regulierende Substanz sich frei diffusibel im Cytosol der Zelle aufhält und so Stoffwechselprozesse, die an unterschiedlichen Orten des Zellinneren stattfinden, miteinander verbinden kann.

Wenngleich die Zahl an niedermolekularen Substanzen, die in Zellen vorkommen unüberschaubar gross ist, so könnte die Identifikation des gesuchten Stoffes durch Eingrenzung der

¹¹ Trummler, K., 1995, Eger, F., 1995

¹² Martin, P., 1997

Kandidaten erleichtert werden. Es sollten solche Stoffe in erster Linie herangezogen werden, die in unmittelbarem Zusammenhang mit einem der hier beteiligten Stoffwechselwegen stehen. Optimalerweise sollten Stoffe gefunden werden, die eine gemeinsame Verbindung zwischen den verschiedenen Stoffwechselwegen darstellen.

Zur Untersuchung der Wirkung von niedermolekularen Stoffen auf die Replikationsinitiation soll das System permeabilisierter HeLa-Zellen eingesetzt werden. Vorab sollte jedoch eine genauere Charakterisierung der Replikationsaktivität dieses Systems durchgeführt werden.

Für das ex vivo System sollten Methoden gefunden werden, durch die die Hemmsituationen Hypoxie und Proteinbiosynthesehemmung gewährleistet werden. Dies heisst für die Hypoxie, dass versucht werden sollte, die kontrollierte Verminderung des Sauerstoffgehaltes zu ermöglichen. In Bezug auf die Proteinbiosynthese sollte vorab sichergestellt werden, dass das System zur Proteinbiosynthese in der Lage ist. Auch sollte eine Hemmung der Proteinbiosynthese im System möglich sein.

Insbesondere sollte die Replikation im ex vivo Replikationssystem unter hemmenden Bedingungen überprüft werden. Dabei war zuerst zu untersuchen, ob auch in permeabilisierten Zellen die Initiation der Replikation als Folge von vermindertem Sauerstoffpartialdruck oder gehemmter Proteinbiosynthese gehemmt wird.

Danach sollte versucht werden, einen Effekt auf die Replikation-Initiation bei permeabilisierten Zellen durch Cytosol oder Zellextrakte aus gehemmten Zellen hervorzurufen. Bei Vorhandensein eines solchen Effektes sollte dann versucht werden, durch nachfolgende Fraktionierungen und chemische Behandlungen die biochemische Identität des effektorischen Stoffes einzugrenzen und diesen so letztendlich zu charakterisieren und identifizieren.

Sofern sich kein Effekt von cytosolischen Extrakten zeigen sollte, wäre alternativ die Wirkung von verschiedenen in Frage stehenden Substanzen direkt im permeabilisierten System zu testen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Reaktionsgefäße

Die verwendeten Kunststoff-Reaktionsgefäße stammen, soweit nicht anders angegeben von den Firmen Greiner und Sarstedt. Für die Zellkultur wurden Kulturflaschen von den Firmen Greiner und Falcon eingesetzt. Für die Versuche wurden die Zelllinien auf 35 mm Kunststoffpetrischalen in TC-Qualität von der Firma Greiner ausgesät. Für Hypoxie-Versuche wurden 35 mm Glaspetrischalen verwendet, die 2 h lang mit 1 M NaOH angeätzt und anschließend 2 h bei 220 °C sterilisiert wurden.

2.1.2. Szintillatoren, Filter und Röntgenfilme

Glasfaserfilter GF/C Whatman

Ultima Gold (Packard)

Hyperfilm MP (Amersham)

2.1.3. Gase und Gasmischungen

Argon	Argon 5.0 (Messer Griesheim GmbH)
Kohlendioxid	medizinische Qualität (Buse)
Sauerstoff	Narkose Qualität (Linde)
Stickstoff	Stickstoff 5.0 (Messer Griesheim GmbH)
euoxisches Gasgemisch	5 % CO ₂ , 20 % O ₂ , 75 % N ₂
euoxisches Gas für Pemeabilisierung	Pressluft
hypoxisches Gasgemisch	5 % CO ₂ , 200 ppm O ₂ , Argon ad 100 %
hypoxisches Gas für Permabilisierung	200 ppm O ₂ , Argon ad 100 %

2.2. Zellen und Bakterien

Die Replikationsversuche wurden mit den Zelllinien CCRF-CEM und HeLa durchgeführt. Beide Zelllinien wurden auch für Permeabilisierungsexperimente eingesetzt.

HeLa	ATCC CCL 2
CCRF CEM	ATCC CCL 119

Das verwendete α -Toxin wurde aus dem Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* Wood 46, wie bei Zoller 1991 und Martin 1997 beschrieben, isoliert und bei -80 °C gelagert.

2.3. Chemikalien

Die in vorliegender Arbeit eingesetzten Salze für Lösungen und Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Sigma und Fluka bezogen. Die eingesetzten Biochemikalien und Enzyme stammen von den Firmen Boehringer und Sigma. Das eingesetzte Diphtherie-Toxin wurde von der Firma Calbiochem bezogen.

2.3.1. Radiochemikalien

Die verwendeten Radiochemikalien wurden von den Firmen ICN und Amersham bezogen:

[Methyl- ³ H]-Thymidin	82 Ci/mmol
α -[³² P]-dATP	3000 Ci/mmol
2-[¹⁴ C]-Thymidin	50 mCi/mmol
[³⁵ S]Methionin	1000 Ci/mmol

2.4. Puffer und Lösungen

2.4.1. Lösungen für Zellbiologische Methoden

2.4.1.1. Lösungen für die Zellkultur allgemein

RPMI 1640 Medium	fötale Kälberserum	10 % (v/v)
	Penicillin	500 U/ml
	Streptomycin	500 µg/ml
	RPMI Medium	ad 100 %

Trypsin Lösung	Trypsin	0,05 %
		in PBS _{def.}

Einfriermedium	RPMI 1640 Medium	wie oben beschrieben
	DMSO	ad 7 %

2.4.1.2. Lösungen für in vivo Markierungen

PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	8 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	CaCl ₂	0,7 mM
	pH 7,4 (evtl. mit HCl korrigiert)	

PBS _{def.}	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	8 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	pH 7,4 (evtl. mit HCl korrigiert)	

HANKS-Lösung	NaCl	8,00 g/l
	KCl	0,40 g/l
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,10 g/l
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,10 g/l
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,06 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,06 g/l
	Glucose x 2 H ₂ O	1,00 g/l
	NaHCO ₃	0,30 g/l
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,18 g/l

NaOH-Lyselösung	NaOH	0,2 M
-----------------	------	-------

2.4.1.3. Lösungen für Permeabilisierung von Zellen

Kalium Glutamat Puffer	Kalium Glutamat	150 mM
	EGTA	0,5 mM
	NTA	5 mM
	PIPES	10 mM
	pH 7,2 (KOH)	

Permeabilisierungslösungen (10x)

Lösung I	Kalium Glutamat	1,2 M
	NTA	40 mM
	EGTA	4 mM
	PIPES	160 mM
	Mg ⁺⁺	85 mM
	Ca ⁺⁺	10 mM
Lösung II	dATP	1 mM
	dCTP	1 mM
	dGTP	1 mM
	dTTP	1 mM
	ATP	28 mM
	CTP	1 mM
	GTP	1 mM
	UTP	1 mM
Lösung II für Dichtemarkierung mit BrdUTP	wie Lösung II nur :	
	BrdUTP	1 mM
	dTTP	0 mM
Lösung III	Creatinphosphat	500 mM
	Creatinkinase	0,1 %
α -Toxin (5x)	α -Toxin 1500 hU	in 0,001 TE

NaOH-Lyselösung	NaOH	0,2 M
	Natriumpyrophosphat	1 %
Ascorbatlösung (10 x)	Ascorbinsäure	70 mM
Ascorbatoxidase-Lösung (10 x)	Ascorbatoxidase (Lyophyllisiert)	0,3 U/ μ l in H ₂ O _{dd}
Hydrogencarbonatlösung (10 x)	NaHCO ₃	140 mM

2.4.1.4. Lösungen für die Herstellung von Cytosolen

hypotoner Puffer	Hepes	20 mM
	Kalium Acetat	5 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	DTT	0,5 mM
	pH 7,8 (autoklaviert ohne DTT gelagert)	
TCC-Puffer	Rohrzucker	250 mM
	Tris	20 mM
	NaCl	137 mM
	KCl	5 mM
	CaCl ₂	1 mM
	MgCl ₂	0,5 mM
	pH 7,4 (Rohrzucker wird nach dem Auto- klavieren zugegeben)	

2.4.2. Lösungen für Säurefällung

TCA Lösung für Fällungen	TCA	15 %
	Natrium Pyrophosphat	1 %
TCA Lösung zum Waschen	TCA	1 %
	Natriumpyrophosphat	0,02 %
neutrale Carrier DNA	Heringssperma DNA	0,25 g/l in H ₂ O _{dd}

2.4.3. Lösungen für Ultrazentrifugationstechniken

2.4.3.1. alkalische Rohrzuckergradienten

alkalische Rohrzuckerlösungen	NaOH	250 mM
	NaCl	600 mM
	EDTA	1 mM
	Sarkosyl	0,1 % (w/v)
	Rohrzucker (Südzucker Einmachzucker)	15 % (158,9 g/l) bzw.:
		30 % (338,1 g/l)
Base Lösung	NaOH	1 M
	EDTA	0,2 M
Lyse Lösung	Sarkosyl	1 %
	EDTA	0,2 M
Blaue Rohrzuckerlösung	Rohrzucker	65 %
	Methylenblau	(wenig zum Anfärben)

2.4.3.2. Lösungen für alkalische Cs₂SO₄ Gradienten

alkalische Lösung	NaOH	0,08 M
für Cs ₂ SO ₄ Gradienten	Na ₃ PO ₄	0,02 M

2.4.3.3. Lösungen für neutrale Cs₂SO₄ und CsCl Gradienten

Lysemedium	Tris/HCl pH 8,0	20 mM
	EDTA	10 mM
	Na-N-Laurosyl-	
	sarkosin	0,5 %
	Proteinase K	100 µg/ml
TE Puffer	Tris/HCl pH 7,4	10 mM
	EDTA	0,1 M

2.4.4. Lösungen für denaturierende Gelelektrophorese von Replikationsintermediaten

TBE-Puffer 1x	Tris-Base	90 mM
	Borsäure	87 mM
	EDTA	2,5 mM
Acrylamid-Stammlösung	Acrylamid/Bis-	20 %
	Acrylamid (19:1)	
	Harnstoff	8 M
	TBE-Puffer	1 x

Formamid-Auftragspuffer	EDTA pH 7,4	20 mM
	Formamid	92 %
	Bromphenolblau	0,02 %
	Xylencyanol	0,02 %

2.4.5. Sonstige Lösungen

Bradford-Reagenz	Coomassie	0,01 %
	Brillant Blue G 250	0,01 %
	Ethanol	5 %
	Phosphorsäure	8,5 %

2.5. Methoden

2.5.1. HeLa-Zellkultur

Die in den Versuchen eingesetzten HeLa-Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in RPMI 1640 Medium geführt. Für die dauernde Führung der Kultur wurden 250 ml Kulturflaschen verwendet. Konfluente Zellrasen wurden nach Entfernen des Kulturmediums mit 0,05 % Trypsin vom Untergrund abgelöst. Nach Verdünnen der Zellsuspension mit Kulturmedium und Bestimmen der Zelldichte unter dem Mikroskop in einer Neubauer Zählkammer wurde mit der gewünschten Zelldichte ausgesät. Für Versuche wurde auf 35 mm Ø Schälchen aus Kunststoff oder Glas mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen / ml in 2 ml Kulturmedium ausgesät. Aussaat erfolgte 18–22 Stunden vor dem Versuch. Dann konnte bei Annahme einer Verdoppelungszeit von 20 h von knapp 10^6 Zellen / eingesetzter Kulturschale ausgegangen werden.

2.5.2. CCRF-CEM Zellkultur

CCRF-CEM Zellen wurden ebenfalls in RPMI 1640 Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden als Suspensionskultur in 250 ml Zellkulturflaschen gehalten. Aussaat für Versuche erfolgte 18 Stunden vor dem Versuch mit einer Dichte von 8×10^5 Zellen / ml Medium. Eine Stunde vor dem Versuch wurde die Zelldichte mit temperiertem voräquilibriertem RPMI Medium auf 10^6 Zellen / ml eingestellt. Die Inkubation für Versuche erfolgte in Glas oder Kunststoff Zentrifugenröhrchen. Für längere Inkubationen wurden die Röhrchen durch Löcher im Deckel begast. Bei kurzen Inkubationen bis zu 10 Min. wurde auf eine Begasung verzichtet.

2.5.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die zum Einfrieren vorgesehenen Zellen wurden bis zu ungefähr 90 % Konfluenz kultiviert. Sodann wurden die Zellen vorsichtig trypsiniert. Die Zellen wurden bei 500 g sedimentiert und in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen aus einer 250 ml Kulturflasche wurden in 3 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Suspension wurde vorsichtig homogenisiert und auf Einfriereröhrchen verteilt. In jedes Röhrchen wurden 1,8–1,9 ml eingefüllt. Die befüllten Röhrchen wurden in Eis verpackt und über Nacht auf -80 °C abgekühlt. Dann wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt, in welchen sie gelagert wurden.

Zum Auftauen wurde ein Cryotube aus dem Stickstofftank entnommen. In warmem Wasser wurde die Zellsuspension aufgetaut, bis sie nur noch ein kleines Eisstück enthielt. Sodann wurde der Inhalt in eine Kulturflasche mit Medium überführt. Nachdem die Zellen festgewachsen waren, wurde das Medium gewechselt, um Reste des DMSO zu entfernen.

2.5.4. Radioaktive Markierung zellulärer DNA

2.5.4.1. Langzeitmarkierung

Bei Einbauversuchen mit HeLa- und CCRF-CEM-Zellen wurde den Zellen bei der Aussaat ^{14}C Thymidin zugegeben. Der Marker wurde mit einer Aktivität von $0,05 \mu\text{Ci/ml}$ eingesetzt. Die Markierung dient als interner Standard.

Die absolute Präcursor-Einbaurrate bei radioaktiven Markierungen der DNA von Zellkulturen wird unter anderem durch die Replikationsaktivität der Zellen bestimmt. Eine Differenz des Einbaus zwischen zwei Kulturschalen kann auch auf unterschiedliche Zelldichte oder unterschiedliche Ausbeute bei der Zellernte zurückzuführen sein. Solche Schwankungen, die Schwankungen der Replikationsaktivität vortäuschen, können durch den internen Standard korrigiert werden. Vor der Aussaat wurde der Zellsuspension, die bereits auf die gewünschte Zelldichte eingestellt wurde, der radioaktive Marker zugegeben. Sodann wurde die homogene Suspension auf die Kulturschalen ausgesät. Schwankungen im Aussaatvolumen treten dann als Schwankung der Gesamtradioaktivität auf. Der Verlust von Zellen bei der Zellernte macht sich durch Radioaktivitätsverlust bemerkbar. Wenn die erhaltenen Einbauwerte mit Hilfe des internen Standards normiert werden, fallen so auftretende Schwankungen weg.

2.5.4.2. Einbaukurven mit Dauermarkierung

Dauermarkierungen wurden mit $5 \mu\text{Ci}$ [Methyl- ^3H]-Thymidin/ml Medium durchgeführt. Um einen konstanten Einbau über längere Zeiträume hinweg zu gewährleisten, musste der radioaktive ^3H -Thymidin Marker mit unmarkierten Thymidin verdünnt werden. Üblicherweise wurden $2 \mu\text{M}$ Thymidin eingesetzt. Hierdurch wurde eine über mehrere Stunden konstante Thymidin-Konzentration im Medium erreicht. Bei Dauermarkierungs-Einbaukurven wurde der Marker bei allen Proben zu Beginn der Inkubationszeit direkt zum Medium gegeben. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden Proben entnommen und gestoppt.

2.5.4.3. Puls Experimente

Bei Puls-Experimenten wurde eine Aktivität von 5 μCi [Methyl- ^3H]-Thymidin / ml Medium eingesetzt. Hier wurde die Aktivität nicht verdünnt. Die Dauer von Pulsmarkierungen betrug, sofern nicht anders angegeben, 8 Minuten. Die Zugabe des Markers erfolgte zu Beginn der Markierungszeit direkt zum Kulturmedium. Das Abstoppen der Kultur erfolgte wie unten beschrieben.

2.5.4.4. Puls-Chase Experimente

Für Puls-Chase Experimente wurde eine Pulsmarkierung wie beschrieben durchgeführt. Am Ende der Markierungszeit wurde das gesamte Medium von der Kultur entfernt. Bei Monolayerkulturen durch Absaugen, bei Suspensionskultur durch Zentrifugation bei 37 °C unter Aufrechterhaltung der Begasungsbedingungen. Die Kultur wurde dann zweimal mit Kulturmedium, das sich bis zu diesem Zeitpunkt auf einer unmarkierten Kontrollkultur befunden hatte, gewaschen. Hierauf wurde in ebensolchem voräquilibriertem Medium für die als Chasedauer angegebene Zeit weiterinkubiert. Danach erfolgte Abstoppen in der beschriebenen Weise.

2.5.4.5. Abstoppen von Kulturen

Zum Abstoppen wurden die Kulturschälchen am Ende der Inkubationszeit auf Eis gestellt. Im Eisbad wurden die Zellrasen zweimal mit eiskalter HANKS-Lösung (bei permeabilisierten Zellen mit KG-Puffer) gewaschen. Hierauf wurden die Zellen bis zur Weiterverarbeitung auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

2.5.5. Permeabilisierung von Zellen

Für die Permeabilisierung von Zellen wurden Zellkulturen verwendet, die wie beschrieben ausgesät und vorbehandelt wurden. Das eingesetzte Permeabilisierungsmedium wurde nicht mehr als eine Stunde vor dem Versuch aus den bei -80 °C gelagerten Komponenten zusammengesetzt und bis zum Einsatz auf Eis gelagert. Zur Permeabilisierung wurde das Kulturmedium möglichst vollständig mit der Wasserstrahlpumpe abgezogen. Danach wurden zügig 100 μl angewärmtes Permeabilisierungsmedium über den gesamten Zellrasen verteilt. Abziehen des Mediums, Zugabe des Permeabilisierungsmediums und vollständige Benetzung des Zellrasens wurden innerhalb von höchstens 20 Sekunden ausgeführt. Die Permeabilisierungszeit wurde ab der vollständigen Verteilung des Mediums auf den Zellrasen berechnet.

2.5.5.1. Dauermarkierungen

Für Dauermarkierungen wurde die Radioaktivität direkt dem Permeabilisierungsmedium zugesetzt. Es wurde, wenn nicht anders angegeben, eine Aktivität von 10 μCi α -[^{32}P]-dATP / ml Permeabilisierungsmedium eingesetzt.

2.5.5.2. Puls-Markierungen

Für Puls-Markierungen wurden in der Regel 50 μCi α -[^{32}P]-dATP / ml Permeabilisierungsmedium eingesetzt. Zur Zugabe wurde die Radioaktivität 1:10 mit Permeabilisierungsmedium ohne α -Toxin verdünnt. Die Pulsdauer war, wenn nicht anders angegeben, 8 Minuten. Die Zugabe des Markers erfolgte direkt in das Permeabilisierungsmedium auf der Schale.

2.5.5.3. Puls-Chase Experimente

Puls-Chase Experimente wurden bei permeabilisierten Zellen analog dem Vorgehen bei in vivo Zellen durchgeführt.

2.5.6. Hypoxie

2.5.6.1. Hypoxie in vivo

Für Hypoxie-Experimente wurden die Zellen auf Glaspetrischalen ausgesät. Die Inkubation wurde in speziellen Aluminiumbegasungskammern unter Begasung mit angefeuchtetem hypoxischem Gas bei 37 °C durchführt.

Vor Beginn der Hypoxie wurden die Kulturschalen eine Stunde lang mit euoxischem Gas vorbegas. Mit dem Umstellen des Gases auf hypoxisches Gas begann die Hypoxiezeit. Die Radioaktivitäts- und Wirkstoffzugabe erfolgte in eingetrocknetem Zustand auf Glaslöffeln.

2.5.6.2. Hypoxie bei permeabilisierten Zellen

Für die Permeabilisierung unter Hypoxie wurde das Medium mittels einer Kanüle durch ein Septum im Deckel der Begasungskammer abgesaugt. Das Permeabilisierungsmedium wurde 10 Minuten mit hypoxischem Gas begast und dann mit einer Hamiltonspritze auf die Kulturen verteilt.

Wenn Sauerstoff vollständig aus dem Permeabilisierungsmedium entfernt werden sollte, wurde dies durch Ascorbat / Ascorbatoxidase bewirkt. Hierfür wurde je ein Volumen Ascorbatlösung (10x), Ascorbatoxidaselösung (10x) und Hydrogencarbonatlösung (10x) in kleinen Tropfen nebeneinander auf eine Glasschale pipettiert. Die Tropfen durften sich nicht durchmischen. Das Schälchen wurde in eine Begasungskammer eingebracht und für wenige Minuten hypoxisch begast. Dann wurde das 10-fache Volumen Permeabilisierungsmedium mit einer Glasspritze zugegeben, so dass alle drei Tropfen darin aufgenommen wurden. Mit der Spritze wurde gut vermischt. Das Permeabilisierungsmedium wurde nun 10 Minuten mit hypoxischem Gas weiterbegast. Zur Permeabilisierung wurde das Medium mit einer Hamiltonspritze auf die von Medium befreiten hypoxischen Zellen überführt und gleichmässig auf den Zellen verteilt. Für hypoxische Begasung permeabilisierter Zellen wurde hypoxisches Gas ohne CO₂ eingesetzt. Die Radioaktivitätszugabe erfolgte auch hier eingetrocknet von Glaslöffeln.

2.5.7. Reoxygenierung

Für die Reoxygenierung von hypoxisch begasteten Zellen wurde die Begasungskammer mit starkem Luftstrom mit euoxischem Gas durchspült. Zusätzlich wurde kurz mit der Wasserstrahlpumpe mit einer Kanüle Luft vom Boden der Begasungskammer abgesaugt, um den vollständigen Austausch des Gases zu gewährleisten. Von der Kultur wurde ein Drittel des Kulturmediums abgezogen und durch Kulturmedium, das zuvor 30 Minuten lang mit Reoxygenierungsgas gesättigt wurde, ersetzt.

2.5.8. Inkubationen mit Hemmstoffen

Die Zugabe von Hemmstoffen erfolgte bei euoxischen Inkubationen direkt zum Kulturmedium aus frisch hergestellten 100-fach konzentrierten Lösungen des Hemmstoffes. Unter Hypoxie wurden Hemmstoffe, auf Glaslöffeln eingetrocknet, zugegeben. Die Auswaschung von Hemmstoffen wie Cycloheximid erfolgte analog zu Chase-Experimenten. Bei permeabilisierten Zellen wurden Wirkstoffe, wenn nicht anders angegeben, dem Permeabilisierungsmedium beigegeben.

2.5.9. Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität

Zur Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität wurden die markierten, gewaschenen Kulturen mit 1 ml 0,2 M NaOH lysiert. Die Fällung der DNA erfolgte mit 1 ml 17 %iger TCA auf

Eis für 20 Minuten. Die gefällte DNA wurde auf Glasfaserfiltern GF/C abgesaugt und die Filter für 20 Minuten bei 80 °C im Brennschrank getrocknet. Danach erfolgte die Auszählung der säurefällbaren Radioaktivität in Szintillator im Szintillationszähler. Die Zählzeit betrug, wenn nicht anders angegeben, 4 Minuten. Die Einstellung der Zählkanäle wurde wie folgt vorgenommen.

Kanal A	0 – 13 keV	^3H
Kanal B	18,5 – 156 keV	^{14}C und ^{35}S
Kanal C	156 – 1700 keV	^{32}P

Dabei ergab sich eine Kreuzkontamination für ^{14}C Markierungen in den ^3H Kanal in Höhe von 36 % des in Kanal B gezählten Wertes. Die Kreuzkontamination für ^{32}P Markierungen in den $^{14}\text{C}/^{35}\text{S}$ Kanal betrug bei den obigen Einstellungen 16 % des in Kanal C gemessenen Wertes. Die Kreuzkontamination von ^{32}P Markierungen in Kanal A betrug 0,05 % des Wertes in Kanal C und kann deshalb in der Regel vernachlässigt werden. Aufwärtkontamination wurde bei allen gemessenen Isotopen nicht registriert.

2.5.10. Längenanalyse von Replikationsintermediaten mit alkalischen Rohrzuckergradienten

Die Längenanalyse von Replikationsintermediaten aus CCRF-CEM und HeLa-Zellen wurden mit Hilfe linearer alkalischer Rohrzuckergradienten durchgeführt. Markierte Zellen wurden hierfür nach der Inkubation wie beschrieben abgestoppt und gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 200 μl Trypsinlösung vom Untergrund gelöst und sofort auf einen linearen Rohrzuckergradienten aufgetragen (s. u.). Die Gradienten wurden mit Hilfe eines ISCO-Gradientenmischers Model 570 nach Vorlage von 500 μl 30 % Rohrzuckerlösung automatisch in SW 28 Polyallomer-Röhrchen aufgebaut. Über die Gradienten wurden 500 μl Lyselösung überschichtet. Hierauf wurden die abtrypsinierten Zellen überschichtet. Nach einer Lysezeit von 15 Minuten wurden 500 μl Baselösung überschichtet. Nun blieben die Gradienten unter Lichtausschluss 6 Stunden zur Strangentwindung der DNA stehen. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 22.000 rpm für acht Stunden.

Die zentrifugierten Gradienten wurden mit Hilfe eines ISCO-Gradienten Fraktionators Model 640 durch Unterschichten mit 65 %iger blauer Rohrzuckerlösung in 31 Fraktionen mit je 1,2 ml fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit 250 μl Carrier-DNA versetzt und dann mit 750 μl 17 % TCA gefällt. Die Weiterverarbeitung erfolgte wie bei „Bestimmung der

säurefällbaren Radioaktivität“ beschrieben. Bei diesen Gradienten ergab sich (nach Studier) eine Verteilung für Sedimentationskoeffizienten und DNA-Kettenlänge über den Gradienten wie bei Dreier 1995, Seite 33 beschrieben.

2.5.11. Dichteanalysen mit isopyknischen Gradienten

2.5.11.1. Alkalische Cs₂SO₄ Gradienten

Für alkalische Cs₂SO₄ Gradienten wurden je Gradient 4,77 g Cs₂SO₄ in 6,03 g alkalischer Lösung aufgenommen. Diese Lösung wurde in Polyallomer-Röhrchen für den Rotor 70.1 Ti gefüllt und die Deckel verschraubt. Die inkubierten und gewaschenen Zellen wurden in 1 ml Lysemedium (ohne Proteinase K) lysiert und dann mit Hilfe eines dünnen Siliconschlauches, der auf eine Pipettenspitze gesteckt wurde, durch das Deckelloch in die Gradientenröhrchen einpipettiert. Die mittlere Ausgangsdichte der so präparierten Gradienten beträgt 1,475 g/cm³. Die Gradienten wurden mit Paraffinöl überschichtet, bis sich keine Luft mehr im Röhrchen befand. Nach Kontrolle der Massenkongruenz der Zentrifugationsröhrchen wurde die Zentrifugation gestartet. Es wurde für 70 Stunden bei 33.000 rpm zentrifugiert. Nach Einstellung des Dichte-Gleichgewichtes wurden die Gradienten in 40 Fraktionen zu 200 µl getrennt. Hierfür wurde in den Boden des Zentrifugenröhrchens ein Loch gebohrt. Durch das Deckelloch wurde nun Paraffinöl in das Röhrchen gepresst und die unten austretenden Gradientenfraktionen gesammelt. Von jeder zehnten Fraktion des Gradienten wurden 10 % abgenommen, um den Brechungsindex zu bestimmen. Nach Zugabe von Carrier-DNA wurden die Fraktionen gefällt und wie oben beschrieben weiteranalysiert.

2.5.11.2. Neutrale CsCl Gradienten

Für neutrale CsCl Gradienten wurden die vorbereiteten Zellen mit 1 ml Lyselösung lysiert. Danach wurde eine Stunde bei 37 °C zum Abbau der Proteine durch Proteinase K inkubiert. Das Lysat wurde dann auf Gradienten aufgetragen (resultierende mittlere Ausgangsdichte 1,72 g/cm³). Die Zentrifugation erfolgte bei 36.000 rpm für 70 Stunden. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben für alkalische Cs₂SO₄-Gradienten beschrieben.

2.5.12. Analyse kurzkettiger Replikationsintermediate durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Analyse kurzkettiger Replikationsintermediate auf denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (F. Uhlmann, 1994) wurden permeabilisierte HeLa Zellen mit 1000 $\mu\text{Ci/ml}$ Permeabilisierungsmedium markiert. Nach der Markierung wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von 50 μl Formamidauftragspuffer lysiert. Das Lysat wurde für 5 Min. auf 95 °C erhitzt und dann auf denaturierende 8 %ige oder 20 %ige Gele aufgetragen.

Die Polyacrylamidgele wurden mit einer Dicke von 1,8 mm zwischen zwei Glasplatten von 20 x 25 cm Größe gegossen. Hierfür wurde eine Lösung von 6M Harnstoff und 20 % Acrylamid in 1 x TBE verwendet. Zur Polymerisation wurde der Acrylamid Lösung 0,08 % TEMED und 0,08 % APS zugesetzt. Für eine Gelstärke von 8 % Acrylamid wurde die 20 %ige Stammlösung entsprechend mit einer Lösung von 8M Harnstoff in 1 x TBE verdünnt. Auf der vorderen Platte des vertikal montierten Geles wurde eine Thermostatisierplatte aus Aluminium befestigt. Als Elektrodenpuffer diente 1 x TBE-Puffer. Es wurde kein Vorlauf des Geles durchgeführt. Vor dem Probenauftrag wurden die Auftragstaschen mit Elektrodenpuffer gespült. Der Gellauf erfolgte für 1,5 h bei 36 Watt Leistung. Nach dem Lauf wurden die Gele in Frischhaltefolie verpackt.

Die Darstellung der radioaktiv markierten Replikationsintermediate erfolgte durch Autoradiographie. Hierfür wurde ein Amersham Hyperfilm MP Röntgenfilm auf das in Frischhaltefolie verpackte Gel gelegt, und beides in eine Expositionskassette verpackt. Die Exposition erfolgte bei -80 °C über Nacht oder nach Bedarf auch länger. Exponierte Filme wurden 5 Min. in einem Tank mit Tetenal Roentgen Entwickler entwickelt, in 3 % Essigsäure gestoppt und 10 Min. in Agfa Acidofix fixiert. Die Filme wurden mit Aqua_{dest.} gespült und anschließend zum Trocknen aufgehängt.

2.5.12.1. Radioaktive Endmarkierung des DNA-Längenstandards

Für die autoradiographische Darstellung wurde Boehringer DNA-Längenstandard VIII durch die Polynucleotidkinasereaktion am 5'-Ende mit ^{32}P markiert (F. Uhlmann 1994). Der Längenstandard enthielt DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die alle glatte Enden oder überhängende 5'-Enden aufweisen, und somit Substrate der Polynucleotidkinase sind. Zur Markierung wurde die Polynucleotidkinasereaktion als Austauschreaktion eingesetzt, da der Phosphorylierungszustand der einzelnen Fragmente nicht bekannt war, und auf eine Dephosphorylierung verzichtet werden sollte.

Der Kinasierungsansatz wurde folgendermaßen zusammengesetzt:

- 12 μ l Boehringer DNA-Längenstandard VIII (3 μ g, entsprechend ~20 pmol 5'-Enden)
- 2 μ l 10 x Polynukleotidkinasepuffer für die Austauschreaktion
- 2 μ l 10 mM ADP
- 3 μ l γ -[³²P]-ATP (30 μ Ci)
- 1 μ l T4-Polynukleotidkinase

10 x Polynukleotidkinasepuffer für die Austauschreaktion besteht aus 500 mM Imidazol/HCl pH 6,4; 180 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 1 mM Spermidinhydrochlorid und 1 mM EDTA.

Der Ansatz wurde 1,5 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wurde in Formamid-Auftragspuffer aufgenommen und direkt eingesetzt.

2.5.13. Präparation zellulärer Extrakte

2.5.13.1. Cytosolischer Extrakt

Für die Herstellung des cytosolischen Zellextraktes (T. Dreier 1995) wurden knapp konfluent bewachsene 145 mm \varnothing Schalen mit ~20–25 Millionen Zellen eingesetzt. 4–8 Stunden vor der Präparation wurde die Hälfte des Kulturmediums auf den Schalen durch voräquilibriertes frisches Medium ersetzt. Die Zellkulturschalen wurden zur Präparation auf Eis gestellt und in den Kühlraum überführt. Die weitere Präparation fand im Kühlraum statt. Nach Abgiessen des Mediums wurden die Zellen 2 x unter vorsichtigem Schwenken mit 15 ml eiskaltem TCC-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen dreimal mit 10 ml hypotonem Puffer gewaschen. Das letzte Mal blieb der hypotone Puffer für 10 Min. auf den Zellen. Danach wurde der Puffer abgezogen und die Schalen schräg gestellt, so dass letzte Reste des Puffers ablaufen konnten. Diese Reste wurden sorgfältig abgezogen. Hierauf wurden die Zellen zum Schwellen 15 Min. auf Eis stehen gelassen, anschließend mit dem Zellschaber von der Platte geschabt und mit der Pipette in einen Dounce-Homogenisator überführt. Hier wurden die Zellen auf Eis durch 20 vorsichtige Auf- und Ab-Bewegungen des Stempels aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde weitere 15 Min. auf Eis inkubiert und dann in Ultrazentrifugencups überführt. Es wurde für 25 Min. bei 35.000 rpm im TLA 45-Rotor zentrifugiert. Dabei sedimentierten Zellkerne mit zellulärem Chromatin, Zelltrümmer und verschiedene Organellen. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Von einem Aliquot

wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Der Proteingehalt lag bei 9–13 mg Protein/ml.

2.5.13.1.1. Proteinbestimmung nach Bradford

1 ml Bradford-Reagenz wurde in einer Kunststoffküvette mit 10 µl Probe (~1–5 µg Protein) versetzt und gut gemischt. Nach 10 Min wurde die Extinktion gegen einen Reagenzienleerwert bei 595 nm bestimmt.

2.5.13.2. Methanol Extrakt

Für die Herstellung des Methanolextraktes wurden knapp konfluente HeLa-Kulturen in 650 ml Kulturflaschen (~4 x 10⁷ Zellen pro Flasche) dreimal mit HANKS-Lösung gewaschen. Dann wurden in jede Flasche 5 ml Methanol gegeben und verteilt. Die Extraktion erfolgte über Nacht bei -80 °C. Der methanolische Überstand wurde abgezogen und in einem Vakuumkonzentrator in Aliquots zu 1 ml über 6 h getrocknet. Bei der Annahme eines Zellvolumens von 1 x 10⁻⁸ ml für HeLa Zellen resultieren 400 µl Zellvolumen für eine Kulturflasche. Der Extrakt von einer Flasche wurde deshalb in 200 µl 1/5 x Permeabilisierungslösung I (zweifache Endkonzentration) aufgenommen, um auch von den extrahierten Substanzen eine doppelte Konzentration zu erhalten. Der Extrakt wurde aliquotiert und schockgefroren bei -80 °C gelagert.

3. Ergebnisse

3.1. Replikation in α -Toxin permeabilisierten HeLa-Zellen

3.1.1. Ungehemmte Replikation

HeLa-Zellen sollten vorliegend permeabilisiert werden, um so als Modell für die Untersuchung der DNA-Replikation zu dienen. In vivo wird die Markierung mit radioaktiven DNA-Bausteinen für Studien über das Replikationsverhalten eingesetzt. Dies sollte auch bei permeabilisierten HeLa-Zellen geschehen. Als radioaktiver Marker wurde α -[^{32}P]-dATP eingesetzt. Um zu erfahren, ob die Zellen nach der Permeabilisierung noch Replikationsaktivität zeigen, wurden Dauereinbaukurven aufgenommen. Es zeigt sich, dass nach Permeabilisierung bei HeLa-Zellen ein signifikanter Einbau von α -[^{32}P]-dATP in säurefällbares Material stattfindet. Abbildung zeigt eine Dauermarkierungs-Einbaukurve. Die gemessene säurefällbare α -[^{32}P]-dATP Radioaktivität in Abhängigkeit von der Zeit steigt über einen Bereich von mehr als zwei Stunden annähernd linear an.

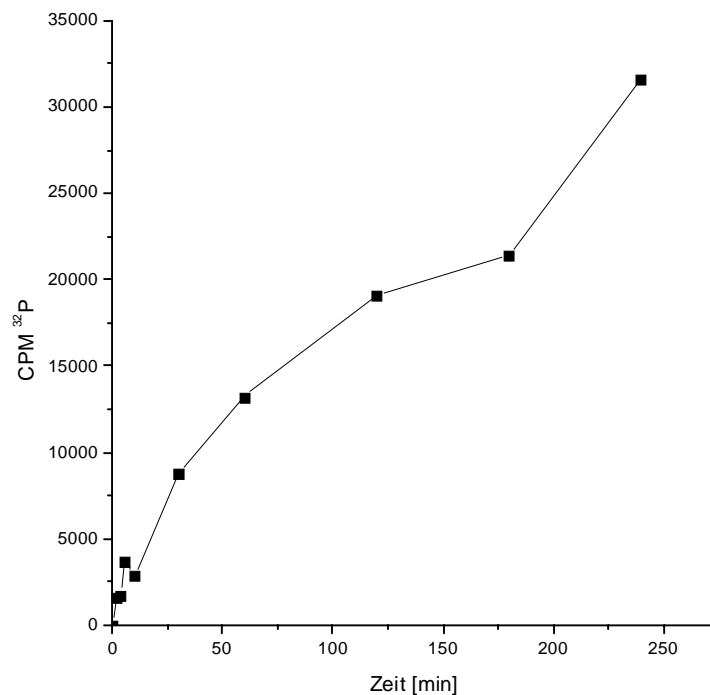


Abb. 1: Dauereinbaukurve mit permeabilisierten HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden ab der Permeabilisierung für die gegebenen Zeiten mit α -[^{32}P]-dATP (10 $\mu\text{Ci/ml}$ Permeabilisierungsmedium) inkubiert.

Dieses Verhalten deutet auf aktive Replikationstätigkeit der Zellen nach der Permeabilisierung hin. Anhand der Einbaukurve ist jedoch nicht auszuschliessen, dass der Anstieg der gemessenen säurefällbaren Radioaktivität in einem anderen Prozess als der Replikation von DNA begründet ist. Hierfür sind weitere Untersuchungen des markierten Materials nötig. Das Sedimentationsverhalten replizierender DNA von HeLa-Zellen ist auf alkalischem Rohrzuckergradienten eingehend untersucht worden.¹³ Ein Vergleich mit replikativen Produkten der in vivo Replikation ist somit leicht möglich. Deshalb sollte zunächst das Sedimentationsverhalten der markierten Produkte aus den permeabilisierten HeLa-Zellen dargestellt werden. Hierfür wurden permeabilisierte HeLa-Zellen mit dem radioaktiven Marker pulsmarkiert. Zusätzliche Information über das Schicksal der radioaktiv markierten Spezies wurde erlangt, indem die so pulsmarkierten permeabilisierten Zellen einem Chase von zwei Stunden unterworfen wurden.

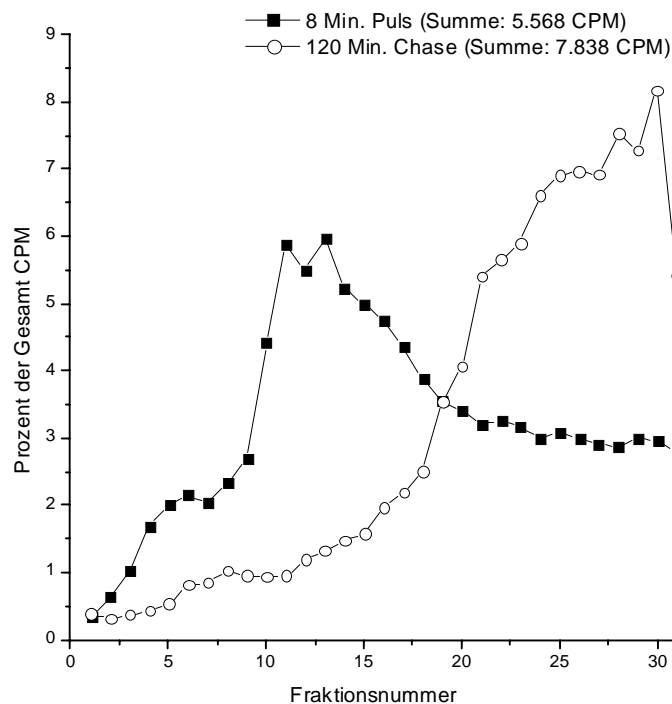


Abb.: 2: Puls-Chase Experiment mit permeabilisierten HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden nach Permeabilisierung für 8 Min. mit α - ^{32}P -dATP-pulsmarkiert. Eine Probe wurde direkt nach dem Puls auf Eis gestoppt und die radioaktiv markierten Produkte auf alkalischem Rohrzuckergradienten aufgetrennt. Bei einer weiteren Probe wurde dem Puls ein Chase ohne radioaktiven Marker von 120 Min. Dauer angeschlossen. Die markierten Produkte wurden dann auf den Gradienten aufgetragen. Zu sehen ist das Profil der gemessenen säurefällbaren Radioaktivität in den einzelnen Gradientenfraktionen. Fraktion 1 ist die oberste Fraktion.

¹³ Probst, G., Riedinger, H.-J., 1999

Abbildung 2 zeigt die Sedimentationsprofile von α -[^{32}P]-dATP markiertem Material aus permeabilisierten HeLa-Zellen, die Puls-markiert und in einem Fall einem Chase unterworfen wurden. Die eingebaute Radioaktivität verhält sich im isokinetischen Rohrzuckergradienten analog der [^3H]-Thymidin markierte DNA aus in vivo Versuchen.

Das Sedimentationsprofil der Pulsmarkierung aus den permeabilisierten Zellen ist mit vergleichbaren Profilen aus HeLa-Zellen beinahe deckungsgleich. Auch die Verschiebung der Markierung durch den Chase zu grösseren Sedimentations-Koeffizienten hin entspricht dem Verhalten der in vivo markierten DNA. Die Tatsache, dass die Markierung, die bei Puls Versuchen in säurefällbares Material mit niedrigen Sedimentationskoeffizienten eingebaut wurde durch nachfolgenden Chase wachsen, und so einen höheren Sedimentationskoeffizienten annehmen, deutet stark darauf hin, dass es sich bei dem markierten Material tatsächlich um replizierende-DNA handelt.

Auch die Darstellung der markierten Produkte mit Hilfe der Faserautoradiographie stützt diesen Eindruck. Die Replikation in HeLa-Zellen in vivo wurde durch die Faserautoradiographie eingehend dokumentiert, so dass hier ebenfalls auf umfangreiches Vergleichs-Material zurückgegriffen werden kann. Die durch permeabilisierte HeLa-Zellen erhaltenen Bilder entsprechen denjenigen aus in vivo Versuchen gut.¹⁴ Es handelt sich bei dem vorliegend beobachteten markierten Material offenbar um das gleiche wie bei in vivo Faserautoradiographiversuchen.

Die gezeigten Ergebnisse belegen, dass der Vorgang des fortschreitenden Einbaus von radioaktiven DNA-Bausteinen in säurefällbares Material, wie er in Abb. 1 gezeigt wurde, Replikation von DNA in den permeabilisierten Zellen darstellt.

Durch genauere Analyse des Sedimentationsverhaltens der erhaltenen α -[^{32}P]-dATP markierten DNA auf alkalischen Rohrzuckergradienten konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsgeschwindigkeit in permeabilisierten Zellen etwa der Hälfte der in vivo festgestellten Gabelgeschwindigkeit entspricht.

Im ungehemmten Zustand zeigen permeabilisierte HeLa-Zellen also eine verlangsamte, sonst jedoch mit der in vivo Situation vergleichbare Replikationsaktivität.

¹⁴ Ergebnisse hier nicht gezeigt

3.1.2. Replikation in permeabilisierten HeLa-Zellen unter hemmenden Bedingungen

Bei HeLa-Zellen wurden in vivo umfangreiche Studien über das Replikationsverhalten unter dem Einfluss von verschiedenen Hemmsituationen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zellen in Fällen der Hemmung zentraler Stoffwechselwege auch mit einer Hemmung der Replikationsaktivität reagieren. Zur Frage, inwiefern permeabilisierte Zellen in der Lage sind, auf hemmende Bedingungen in ähnlicher Weise zu reagieren, wurden unterschiedliche Situationen, unter denen die Replikation in vivo gehemmt ist, bei permeabilisierten HeLa-Zellen getestet.

3.1.2.1. Hemmung der DNA-Polymerisation

Bevor die Auswirkung der Hemmung von einzelnen Stoffwechselwegen auf die DNA-Replikation untersucht werden kann, ist festzustellen, ob bei permeabilisierten Zellen überhaupt eine Hemmung des beobachteten α -[^{32}P]-dATP-Einbaus und damit der DNA-Polymerisation hervorgerufen werden kann. Die Replikation kann in HeLa-Zellen in vivo unmittelbar durch Eingriff in die DNA-Polymerisation gehemmt werden. Dies kann durch Hemmung der DNA-Polymerasen geschehen. Als Hemmstoffe stehen hier Aphidicolin oder Ara-CTP zur Verfügung.¹⁵ Durch beide Hemmstoffe werden sowohl Polymerase α als auch die Polymerasen δ und ϵ gehemmt. Hierdurch wird die DNA-Polymerisation, wie sie für die Replikation des Leit- und auch Folgestranges erforderlich ist, ausgeschaltet. Die Aktivität der Primase bleibt jedoch unberührt. Dies hat zur Folge, dass säurefällbares Material von geringem Molekulargewicht erzeugt werden kann. Diese beiden Hemmstoffe wurden vorliegend bei permeabilisierten HeLa-Zellen auf ihre Wirksamkeit getestet.

3.1.2.1.1. Hemmung durch Aphidicolin

Bei HeLa-Zellen in vivo wird durch Aphidicolin die DNA-Polymerisation unterbunden und somit die Replikation gehemmt. Dies zeigt sich durch ausbleibenden Einbau von radioaktiven DNA-Bausteinen in säurefällbares Material in der Dauereinbaukurve und durch ein Sedimentationsprofil, das kein hochmolekulares Material aufweist. Fraglich ist jedoch die Wirkung dieses Hemmstoffes bei permeabilisierten Zellen. Um zu erfahren, wie der Effekt von Aphidicolin bei permeabilisierten Zellen ist, wurden HeLa-Zellen in Gegenwart von Aphidicolin permeabilisiert

¹⁵ Catapano, C. et al. 1991

und für acht Minuten mit α -[32 P]-dATP markiert. Die permeabilisierten Zellen wurden auf alkalische Rohrzuckergradienten aufgetragen und unter den Standardbedingungen ultrazentrifugiert.

Abbildung 3 zeigt das Sedimentationsprofil des α -[32 P]-dATP-markierten Materials. Daneben ist das Sedimentationsprofil einer Probe, die als Kontrolle inkubiert wurde aufgetragen. Es zeigt sich, dass unter dem Einfluss des Hemmstoffes nur Material markiert wurde, das in den Fraktionen 1 bis 5 des Gradienten wiederzufinden ist. Es handelt sich dabei um sehr kleine Polynukleotid-Ketten bis zu einer Größe von 7 kB. Bei der Kontrolle dagegen ist der Peak in Fraktion 13 angesiedelt und repräsentiert damit eine Kettenlänge von mehr als 100 kB.¹⁶ Durch die Gegenwart des Hemmstoffes wurde der Einbau von radioaktivem Marker in hochmolekulare DNA unterbunden. Offenbar wurde durch Aphidicolin die DNA-Polymerisation in den permeabilisierten Zellen gehemmt.

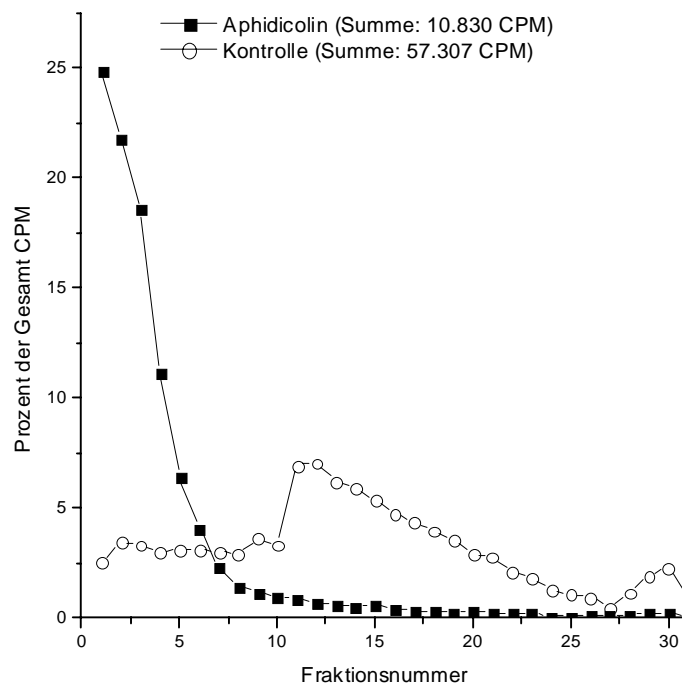


Abbildung 3: Sedimentationsprofil von permeabilisierten HeLa-Zellen: Die Zellen wurden in Gegenwart von Aphidicolin permeabilisiert und von Beginn der Permeabilisierung an markiert. Gezeigt ist das Sedimentationsverhalten von Material, da unter Einwirkung des Hemmstoffes markiert wurde. Daneben ist das Verhalten von Kontrollmaterial zu sehen.

Die Hemmung der Replikation durch den Hemmstoff Aphidicolin ist bei permeabilisierten Zellen möglich.

¹⁶ vgl. hierzu Tabelle bei Dreier T. 1995, S. 33

3.1.2.1.2. Hemmung durch Ara-CTP

Auch durch Ara-CTP wird bei HeLa-Zellen in vivo eine Hemmung der DNA-Polymerisation bewirkt, durch die die Replikation unterbunden wird. Um zu überprüfen, ob auch bei permeabilisierten Zellen eine solche Hemmung infolge von Ara-CTP auftritt, wurden Dauereinbauwerte aufgenommen. Hierbei zeigt sich, dass der Einbau durch die Gegenwart von Ara-CTP stark vermindert wird. Ara-CTP wurde dabei in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt. Bei der Sedimentationsanalyse des unter dem Einfluss des Hemmstoffes markierten Materials (Abb. 4) zeigt sich, wie schon bei Aphidicolin, nur Radioaktivität in den ersten Gradientenfractionen. Offenbar wurde durch den Hemmstoff der Einbau in hochmolekulares Material verhindert.

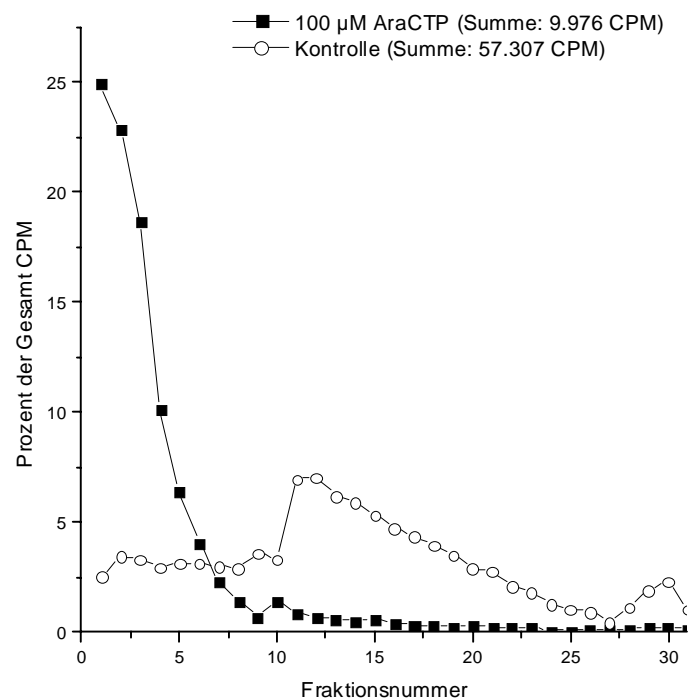


Abbildung 4: Sedimentationsprofil von permeabilisierten HeLa-Zellen: Die Zellen wurden unter 100 μM Ara-CTP permeabilisiert und von Beginn der Permeabilisierung an für 8 Minuten mit α - ^{32}P -dATP markiert. Daneben ist das Sedimentationsverhalten von Kontrollmaterial, das ohne Hemmstoff markiert wurde, gezeigt.

Auch durch den Hemmstoff Ara-CTP konnte der Einbau von α - ^{32}P -dATP in permeabilisierten HeLa-Zellen inhibiert werden. Dies zeigt deutlich, dass der Einbau vorliegend durch die Aktivität der DNA-Polymerasen hervorgerufen wird. Es handelt sich also um DNA-Polymerisation im Zuge der Replikation. Auch im ex vivo System ist die Hemmung der Replikation durch Hemmstoffe, die direkt an der DNA-Polymerisation angreifen möglich.

3.1.2.2. Auswirkung von Hydroxyharnstoff

Hydroxyharnstoff ist ein Hemmstoff, der an der Ribonukleotidreduktase angreift. Durch Hemmung dieses Enzyms wird der Nachschub an Bausteinen für die DNA-Synthese unterbrochen. Bei HeLa-Zellen in vivo bewirkt Hydroxyharnstoff eine Hemmung der Replikation.

Der Einsatz von Hydroxyharnstoff bei permeabilisierten Zellen bereitet keine Schwierigkeiten. Um den Effekt des Hemmstoffes auf die Replikation zu überprüfen, wurden Einbauversuche und Sedimentationsanalysen auf alkalischen Rohrzuckergradienten durchgeführt. Bei einem Dauereinbauversuch über 30 Minuten wird durch die Gegenwart von Hydroxyharnstoff im Permeabilisierungsmedium der Einbauwert an säurefällbarer α - ^{32}P -dATP Radioaktivität nicht beeinflusst. Abbildung 5 zeigt das Sedimentationsprofil des α - ^{32}P -dATP-markierten Materials aus permeabilisierten Zellen unter Hydroxyharnstoff. Dieses Sedimentationsprofil entspricht demjenigen permeabilisierter HeLa-Zellen, die ohne Hemmstoff inkubiert wurden.

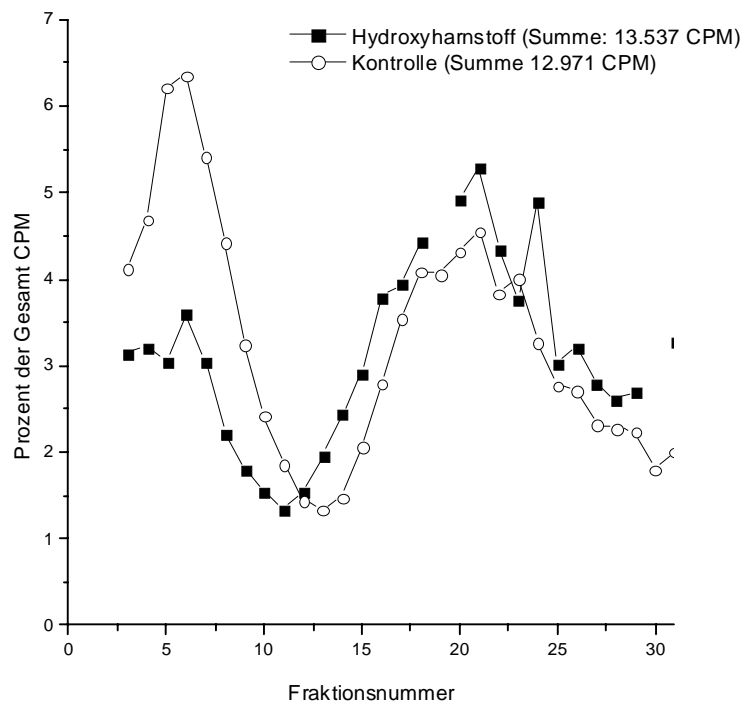


Abb. 5: Sedimentationsprofil von permeabilisierten HeLa-Zellen: HeLa Zellen wurden 10 Minuten unter Hydroxyharnstoff inkubiert und anschließend in Gegenwart von Hydroxyharnstoff permeabilisiert. Daneben ist das Sedimentationsverhalten von markiertem Material aus permeabilisierten Zellen ohne Hydroxyharnstoff gezeigt. Die Pulsdauer betrug jeweils 8 Minuten.

Das Sedimentationsprofil zeigt zwei getrennte Peaks. Einen bei Fraktion 6 und einen bei Fraktion 21. Dies entspricht nicht vollständig dem Verhalten, wie es für permeabilisierte Zellen gezeigt wurde. Da jedoch hier ebenfalls eine Kontrolle ohne Zusatz von Hemmstoff mitge-

führt wurde, die das gleiche Sedimentationsprofil aufweist, ist davon auszugehen, dass das beobachtete Verhalten nicht auf Hydroxyharnstoff zurückgeführt werden kann.

Das Sedimentationsverhalten im alkalischen Rohrzuckergradienten legt den Schluss nahe, dass das gesamte replikative Verhalten der permeabilisierten Zellen durch Hydroxyharnstoff nicht beeinflusst wird. Die Einbaurrate in Dauereinbaukurven entspricht der von Kontrollzellen ohne Hydroxyharnstoff. Auch das Sedimentationsprofil im alkalischen Rohrzuckergradienten ist im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Die Replikation bei permeabilisierten HeLa-Zellen ist offenbar von der Kopplung an die Funktion der Ribonukleotidreduktase losgelöst.

3.1.2.3. Einfluss von vermindertem Sauerstoffpartialdruck (Hypoxie)

Der als Hypoxie bezeichnete kontrollierte Sauerstoffmangel stellt auch eine Situation dar, in der bei HeLa-Zellen *in vivo* eine Hemmung der DNA-Replikation auftritt.¹⁷ Notwendige Voraussetzung für die Untersuchung des Hypoxie-Effektes ist die Kontrolle des Sauerstoffgehaltes nicht nur im Gasraum über dem Inkubationsmedium, sondern auch des Sauerstoffgehaltes im Medium und somit unmittelbar um die untersuchten Zellen herum. Die Einstellung des Sauerstoffgehaltes im Gasraum wird durch die Inkubation der Zellkulturschalen in Begasungskammern mit definierten Gasmischungen erreicht. Die Einstellung des Sauerstoffgehaltes im Inkubationsmedium könnte theoretisch durch Gleichgewichtseinstellung mit dem Gasraum erfolgen. *In vivo* kann durch längere Inkubation unter hypoxischer Begasung infolge der Zellatmung, die dem Medium ständig Sauerstoff entzieht, eine solche Einstellung einfacher erreicht werden. Bei permeabilisierten Zellen würde jedoch diese Gleichgewichtseinstellung während der Inkubation zu lange dauern. Schließlich unterstützt das Medium die Replikation nur über einen begrenzten Zeitraum hinweg. Es besteht jedoch die Möglichkeit, das Permeabilisierungsmedium vor der Permeabilisierung der Zellen bereits über einige Zeit hinweg mit dem hypoxischen Gas ins Gleichgewicht zu setzen. Aufgrund des sehr geringen Volumens kann diese Gleichgewichtseinstellung hier auch erreicht werden. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch die schlechte Kontrollierbarkeit des Sauerstoffgehaltes. Deshalb wurde für die Versuche mit permeabilisierten Zellen unter Hypoxie nach einer Methode gesucht, den Sauerstoffgehalt des Mediums in kurzer Zeit in definierter Form zu verringern. Dies ist auf enzymatischem Weg mit Hilfe von Ascorbat und Ascorbatoxidase, wie bei Frank Eger¹⁸ beschrieben,

¹⁷ Probst, G., Riedinger, H.-J., 1999

¹⁸ Eger, Frank, Dissertation 2001

möglich. Durch die Gegenwart der eingesetzten Reagenzien wird der Einbau der Permeabilisierten Zellen nicht beeinflusst. Es liegt offenbar kein direkter Effekt einer der Substanzen, die für das Ascorbat / Ascorbatoxidase-System notwendig sind, auf die Replikation vor. Vorliegend wurden die Versuche unter Hypoxie mit permeabilisierten Zellen in Gegenwart von Ascorbat und Ascorbatoxidase durchgeführt.

Bei der Untersuchung des Einflusses von kontrolliertem Sauerstoffmangel, wie er in vivo bei HeLa-Zellen eine Hemmung der Replikation zur Folge hat, auf permeabilisierte Zellen sind zweierlei Fragestellungen von Interesse. Erstens ist zu fragen, wie sich euoxisch permeabilisierte Zellen verhalten, wenn ihnen während der Permeabilisierung der Sauerstoff entzogen wird. Diese Fragestellung kann Aufschluss darüber geben, ob permeabilisierte Zellen in der Lage sind, den hypoxischen Zustand zu etablieren.

Zum anderen ist zu testen, welchen Einfluss die Permeabilisierung auf gehemmte Zellen unter Hypoxie hat. Hierbei kann Aufschluss darüber erlangt werden, ob der hemmende Effekt, der sich in vivo durch die Hypoxie entfaltet hat, durch die Permeabilisierung aufgehoben wird.

3.1.2.3.1. Permeabilisierung hypoxischer HeLa-Zellen

Durch Hypoxie wird bei HeLa-Zellen in vivo die Replikationsaktivität stark vermindert. Wenn der Sauerstoffgehalt wieder auf physiologische Bedingungen eingestellt wird, steigt die Replikationstätigkeit der Zellen rasch wieder an¹⁹. Fraglich ist nun, ob HeLa-Zellen, die nach 6 Stunden hypoxischer Begasung unter Aufrechterhaltung der Hypoxie permeabilisiert werden, auch nach der Permeabilisierung noch in der Replikation gehemmt sind. Es wäre denkbar, dass die Zellen infolge der Permeabilisierung ihre Replikationstätigkeit wieder aufnehmen als wären sie mit Sauerstoff reoxygeniert worden.

¹⁹ Probst, H., Gekeler, V., 1988

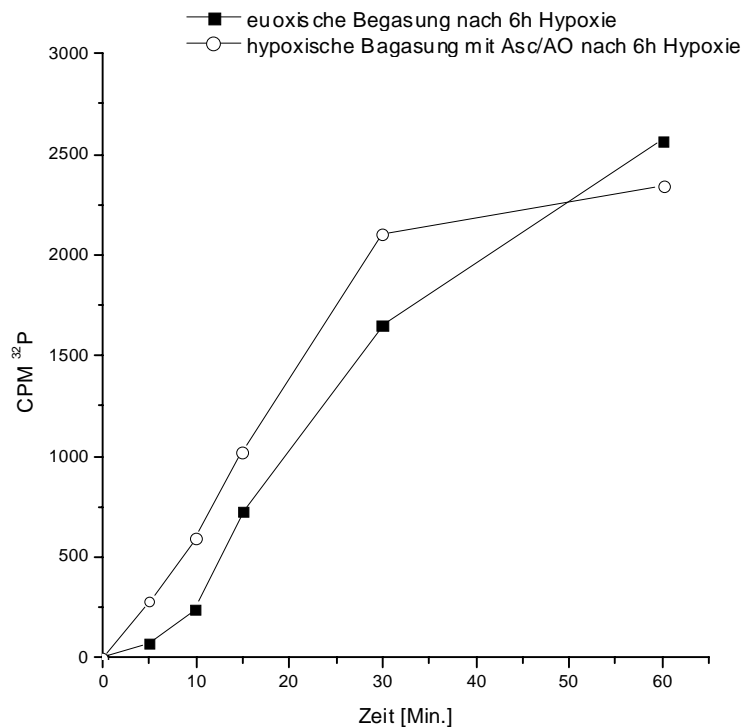


Abb. 6: Einbaukurve mit HeLa-Zellen, die nach 6h Hypoxie permeabilisiert wurden: Gezeigt ist der Einbau von Zellen, die während der Inkubation euoxisch begast wurden; Daneben ist der Einbau in Gegenwart von Ascorbat/Ascorbatoxidase unter hypoxischer Begasung zu sehen.

Abbildung 6 zeigt eine Einbaukurve von permeabilisierten HeLa-Zellen, die unter hypoxischer Begasung in Gegenwart von Ascorbat und Ascorbatoxidase permeabilisiert worden sind. Als Kontrolle wurde hierzu eine Einbaukurve mit permeabilisierten HeLa-Zellen aufgenommen, die nach 6 Stunden Hypoxie unter euoxischer Begasung permeabilisiert wurden. Der Verlauf der hypoxisch durchgeführten Einbaukurve ist dem der Kontrolleinbaukurve sehr ähnlich. Insbesondere kann hier keine geringere Einbaurrate unter hypoxischer Begasung festgestellt werden. Wenn HeLa-Zellen nach 6 Stunden Hypoxie permeabilisiert werden, ist also die α -[³²P]-dATP Einbaurrate kaum durch die Anwesenheit oder Abwesenheit von Sauerstoff beeinflusst. Da die Zellen durch vorhergehende Hypoxie in ungünstigen Zustand sind, ist der Einbau jedoch viel niedriger als bei Zellen, die nach euoxischer Vorinkubation permeabilisiert werden. (vgl. Abb. 9) Um sicherzustellen, dass es sich bei dem hier markierten Material um frisch replizierte DNA handelt, wurde eine Sedimentationsanalyse damit durchgeführt.

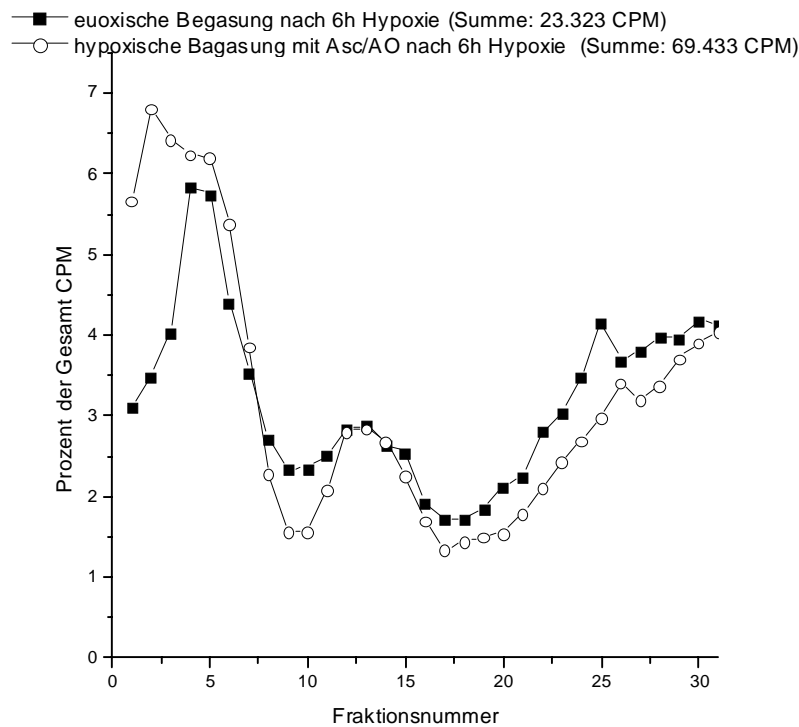


Abb. 7: Sedimentationsprofil von permeabilisierten HeLa-Zellen: Gezeigt ist das Sedimentationsprofil für das α -[32 P]-dATP markierte Material aus HeLa-Zellen, die nach 6 Stunden Hypoxie permeabilisiert wurden. Eine Probe wurde unter Aufrechterhaltung der Hypoxie in Gegenwart von Ascorbat/Ascorbatoxidase permeabilisiert und markiert. Die zweite Probe wurde nach 6 Stunden Hypoxie euoxisch permeabilisiert und markiert.

Abbildung 7 zeigt das Sedimentationsprofil der säurefällbaren α -[32 P]-dATP Radioaktivität aus permeabilisierten HeLa-Zellen, die zuvor 6 Stunden hypoxisch begast wurden. Das Sedimentationsprofil, das von den hypoxisch begasten Zellen erhalten wurde unterscheidet sich nicht wesentlich von demjenigen der euoxisch permeabilisierten Kontrolle. Beide Sedimentationsprofile entsprechen nicht dem gewohnten Bild für permeabilisierte Zellen. Dies ist auf die zuvor für mindestens zwei Stunden stark gehemmte Replikation der Zellen zurückzuführen. Das Sedimentationsprofil zeigt zweifelsfrei, dass hier hochmolekulares Material markiert wurde, das unter den für den Gradienten angewendeten Bedingungen nur DNA sein kann.

Offenbar findet in beiden Fällen in gleichem Masse Replikation statt. Durch die Permeabilisierung wird der Effekt der Hypoxie aufgehoben, so dass durch Hypoxie gehemmte HeLa-Zellen, die hypoxisch permeabilisiert werden, auch ohne Zutreten von Sauerstoff die Replikationsaktivität aufnehmen.

3.1.2.3.2. Hypoxische Begasung von permeabilisierten HeLa-Zellen

Der Effekt, den die Entfernung des Sauerstoffs aus dem Inkubationsmedium bei permeabilisierten Zellen auf den α -[32 P]-dATP Einbau hat, sollte durch eine Einbaukurve aufgezeigt werden.

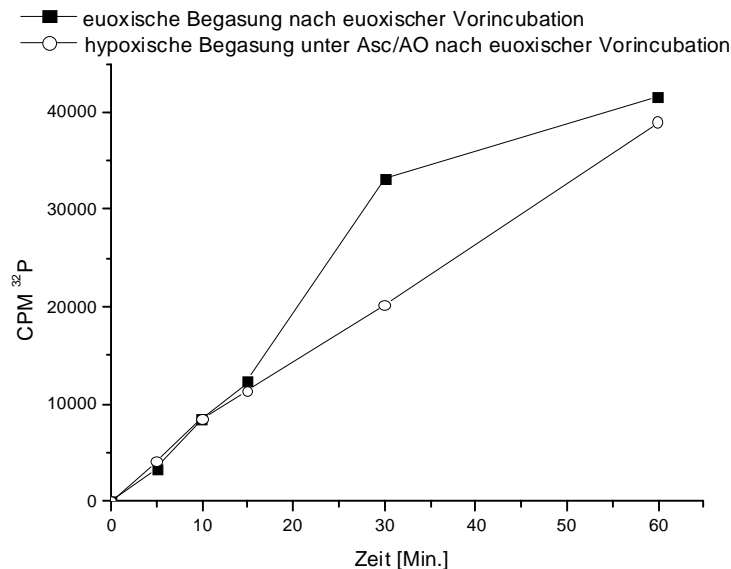


Abb. 8: Einbau bei HeLa-Zellen, die nach euoxischer Vorincubation permeabilisiert wurden: HeLa-Zellen wurden für die gegebenen Zeitspannen oder unter hypoxischer Begasung mit Ascorbat und Ascorbatoxidase inkubiert. Für die hypoxische Inkubation wurde nach 5 Minuten nach Permeabilisierung die Hypoxie etabliert.

Abbildung 8 zeigt die Dauereinbaukurven mit HeLa-Zellen, die nach Permeabilisierung unter Hypoxie gesetzt wurden. Die Hypoxie wurde nach fünf Minuten durch Zugabe von Ascorbat und Ascorbatoxidase zum Permeabilisierungsmedium und Starten der hypoxischen Begasung eingestellt. Daneben ist die Einbaukurve aus euoxisch inkubierten permeabilisierten Zellen zu sehen. Die Verläufe der beiden Kurven weichen nicht signifikant voneinander ab.

Werden euoxische HeLa-Zellen permeabilisiert und danach unter hypoxischer Begasung der Sauerstoff mittels Ascorbat und Ascorbatoxidase aus dem Medium entfernt, so findet Replikation statt wie bei permeabilisierten HeLa-Zellen, die euoxische begast werden. Bei permeabilisierten HeLa-Zellen kann durch entfernen des Sauerstoffs aus dem Kulturmedium kein Effekt auf die Replikationsaktivität erzielt werden.

Die Versuche konnten zeigen, dass durch Sauerstoffmangel bei permeabilisierten HeLa-Zellen kein Einfluss auf den Einbau an α -[32 P]-dATP genommen werden kann. Die Replikationsaktivität von permeabilisierten HeLa-Zellen erweist sich als vom Sauerstoff unabhängig. Da der bestehende Effekt der Hypoxie, der in vivo erzeugt worden ist, durch Permeabilisierung aufgehoben werden

kann, wird hier offenbar die Kopplung der Replikations-Aktivität an den Zustand des Sauerstoffmangels unterbrochen. Dies scheint direkt durch den Akt der Permeabilisierung zu geschehen.

3.1.2.4. Hemmung der Proteinbiosynthese

Die Proteinbiosynthese als zentraler Stoffwechselweg der Zelle stellt einen Angriffspunkt für verschiedene Hemmstoffe dar. Sofern durch einen Hemmstoff eine vollständige Hemmung der Proteinbiosynthese bewirkt wird, zieht dies *in vivo* auch eine Hemmung der DNA-Replikation nach sich. Dies wurde insbesondere für Cycloheximid und Puromycin berichtet²⁰. Beide Hemmstoffe bewirken eine reversible Hemmung des Proteinbiosynthese-Apparates. Nach Auswaschen des Hemmstoffes stellen sich nach einiger Zeit wieder normale Verhältnisse ein. Daneben ist durch Diphtherie-Toxin auch eine irreversible Hemmung der Proteinbiosynthese möglich. Nach Gabe dieses Hemmstoffes kann sich die Zelle nicht wieder erholen. Dadurch ist sichergestellt, dass der Effekt des Hemmstoffes nicht durch die Permeabilisierung vermindert wird, und so gleichsam eine Aufhebung der Hemmung durch Permeabilisierung eintritt.

Vorliegend sollte die Wirkung von Cycloheximid (CHX), von Puromycin und Diphtherie-Toxin, also von drei Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen, bei permeabilisierten HeLa-Zellen getestet werden.

Bevor allerdings die Hemmung der Proteinbiosynthes nach Permeabilisierung untersucht werden konnte, musste überprüft werden, ob in permeabilisierten Zellen Proteinbiosynthese stattfindet. Zu diesem Zweck wurden permeabilisierte Zellen in einem Permeabilisierungsmedium, das zu den normalen Bestandteilen auch einen Aminosäuremix enthielt, mit [³⁵S]-Methionin inkubiert. Daneben wurden auch HeLa-Zellen *in vivo* mit [³⁵S]-Methionin markiert. Beide Ansätze wurden durch PAA-Gelelektrophorese auf einem 8 %igen Gel aufgetrennt und die frischmarkierten Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass Proteine in den permeabilisierten Zellen synthetisiert werden und dass keine auffälligen Unterschiede in der Aktivität im Vergleich zur Situation *in vivo* vorliegen.

3.1.2.4.1. Cycloheximid

In vivo zeigt sich bei HeLa-Zellen eine schnelle Reaktion auf die Gabe von CHX in einer

²⁰ Schulte, D., Knippers, R., 1975;/ Probst, H., Riedinger, H.-J., 1999

Konzentration von 30 μM . Sowohl der Einbau von [^{35}S]-Methionin als auch der Methyl-[^3H]-Thymidin-Einbau werden stark gehemmt.

Dies zeigt, dass sowohl Proteinbiosynthese als auch Replikation bei HeLa-Zellen *in vivo* durch CHX in weniger als 2 Minuten auf unter 5% der Kontrollaktivität gesenkt werden können. Im Sedimentationsprofil zeigt sich ein völliges Ausbleiben von säurefällbarer Radioaktivität in dem Bereich des Gradienten, der für aktiv replizierende Zellen ein Maximum darstellt.²¹

HeLa-Zellen reagieren *in vivo* auf Gabe von CHX mit stark verminderter Replikations- und Proteinbiosyntheseaktivität.

Für eine Untersuchung der Wirkung von Cycloheximid bei den permeabilisierten Zellen sollte zuerst festgestellt werden, in welcher Konzentration dieser Stoff seine Wirkung entfaltet. Zu diesem Zweck wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve für Cycloheximid bei permeabilisierten HeLa-Zellen aufgenommen. Es wurde der Einbau von α -[^{32}P]-dATP und [^{35}S]-Methionin in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration von Cycloheximid im Permeabilisierungsmedium gemessen.

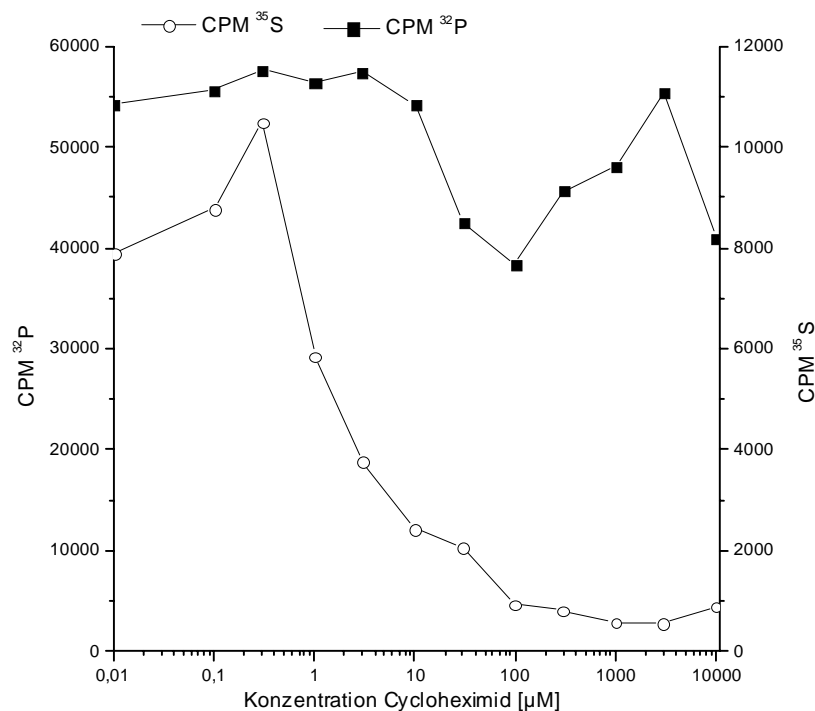


Abb. 9: Dosis-Wirkungs-Kurve für CHX bei permeabilisierten HeLa-Zellen: Gezeigt ist der Einbau an α -[^{32}P]-dATP und [^{35}S]-Methionin bei permeabilisierten HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an Cycloheximid (CHX).

²¹ vgl. hierzu G. Probst et al. 1999

Abbildung 9 zeigt diese Dosis-Wirkungs-Kurve. Es ist zu sehen, dass bei einer Konzentration von 100 μM Cycloheximid im Permeabilisierungsmedium der Einbau von [^{35}S]-Methionin vollständig unterbunden wird. Bei dieser Konzentration liegt vollständige Hemmung der Proteinbiosynthese vor. Der Einbau von α -[^{32}P]-dATP wird durch diese Konzentration dagegen nicht vermindert. Auch eine Erhöhung der Cycloheximid-Konzentration um zwei Zehnerpotenzen vermag diesen Einbau nicht vollständig zu hemmen. Dies könnte darauf hindeuten, dass DNA-Replikation vorliegend durch Cycloheximid nicht signifikant gehemmt wird.

Um dies weiter zu untersuchen, sollten unter 10 mM Cycloheximid weitere Untersuchungen durchgeführt werden, die zeigen sollten, dass der beobachtete Einbau auf DNA-Replikation zurückzuführen ist.

Durch eine Dauereinbaukurve sollte festgestellt werden, ob die erhaltenen Einbauwerte durch stetiges Einbauverhalten der Zellen, wie es auch bei ungehemmten permeabilisierten Zellen vorliegt, zustandekommen. Es wurden deshalb Einbaukurven aufgenommen, bei denen permeabilisierte HeLa-Zellen unter 10 mM Cycloheximid unterschiedlich lange inkubiert wurden. Hierbei wurden Einbauwerte für α -[^{32}P]-dATP und für [^{35}S]-Methionin aufgenommen. Neben der Probe mit Cycloheximid wurde auch eine Kontrolle ohne Hemmstoff inkubiert. (vgl. Abb. 10)

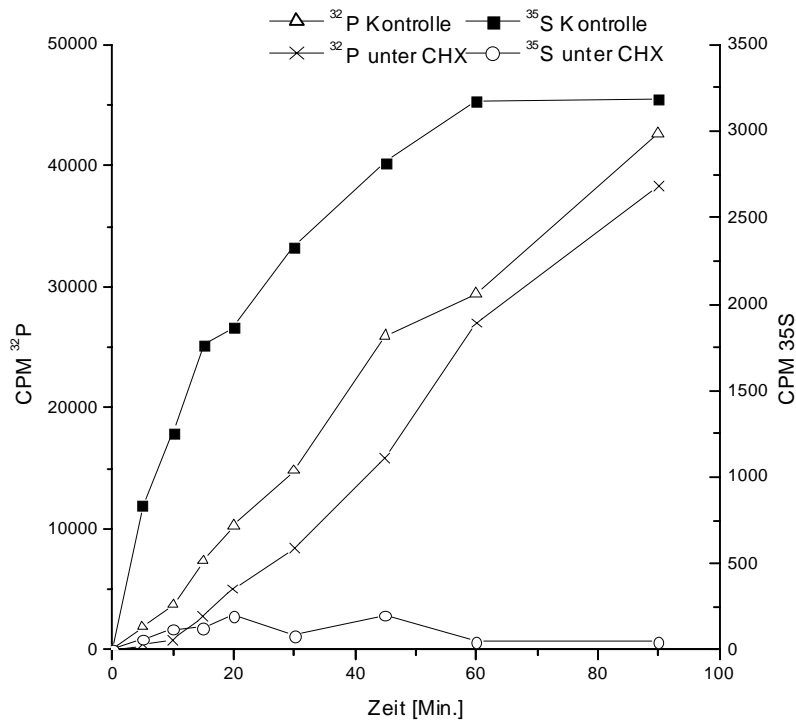


Abb. 10: Dauereinbaukurven mit permeabilisierten HeLa-Zellen unter Cycloheximid: Gezeigt ist der Einbau an α - ^{32}P -dATP und ^{35}S -Methionin unter 10 mM Cycloheximid und ohne Hemmstoff.

Die Einbaukurve zeigt über den Bereich von 90 Minuten, der hier untersucht wurde, einen stetigen Anstieg der gemessenen Werte an säurefällbarem α - ^{32}P -dATP markiertem Material sowohl bei der Probe mit Hemmstoff als auch bei der Kontrolle. In Gegenwart von Cycloheximid ist der Einbau an ^{35}S -Methionin dagegen vollständig gehemmt. Bei der Kontrolle ist stetiger Einbau an ^{35}S -Methionin über den gesamten beobachteten Zeitraum zu verzeichnen.

Die Dauereinbaukurve zeigt, dass durch 10 mM Cycloheximid bei permeabilisierten HeLa-Zellen zwar die Proteinbiosynthese vollständig gehemmt werden kann, jedoch der Einbau an α - ^{32}P -dATP nicht beeinflusst wird. Die Einbaurrate entspricht dabei derjenigen permeabilisierter Zellen ohne Hemmstoff und könnte durch DNA-Replikation verursacht sein.

Die Analyse des unter Cycloheximid mit α - ^{32}P -dATP markierten Materials auf alkalischen Rohrzuckergradienten sollte überprüft werden, um weiteren Aufschluss darüber zu geben, ob es sich dabei um neu replizierte DNA aus HeLa-Zellen handelt. Deshalb wurden permeabilisierte HeLa-Zellen unter Kontrollbedingungen und unter 10 mM Cycloheximid mit α - ^{32}P -dATP pulsmarkiert und das markierte Material durch Sedimentationsanalyse untersucht.

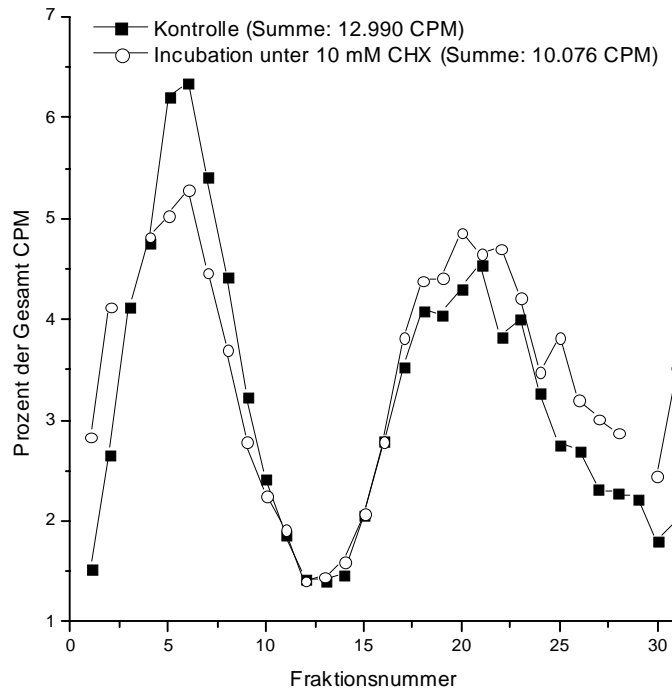


Abb. 11: Sedimentationsprofil von permeabilisierten HeLa-Zellen: Gezeigt ist das Sedimentationsprofil der säurefällbaren α -[32 P]-dATP Radioaktivität aus Zellen, die unter 10 mM CHX inkubiert wurden und dasjenige aus Kontrollzellen.

Die in Abbildung 11 dargestellten Sedimentationsprofile zeigen nur geringe Unterschiede zwischen der Kontrolle ohne CHX und der Probe, die mit 10 mM CHX inkubiert worden war.

Das markierte Material aus gehemmten Zellen verhält sich genau wie die neureplizierte DNA aus HeLa-Zellen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Einbauaktivität unter Hemmung der Proteinbiosynthese hier durch DNA-Replikation verursacht wird.

Eine Hemmung der Replikationsaktivität kann bei permeabilisierten HeLa-Zellen durch CHX nicht in dem Ausmass wie in vivo erzeugt werden, obwohl offenbar eine Hemmung der Proteinbiosynthese durch den Hemmstoff herbeigeführt wird. Selbst wenn die Konzentration des Hemmstoffes um den Faktor 100 gesteigert wird, liegt keine Auswirkung auf die Replikationsfähigkeit vor.

3.1.2.4.2. Puromycin

Die mit dem Hemmstoff Cycloheximid erhaltenen Ergebnisse sollten durch zusätzliche Untersuchungen mit anderen Hemmstoffen der Proteinbiosynthese abgesichert werden. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass das Ausbleiben der Hemmung auf einen spezifischen Ef-

fekt des eingesetzten Hemmstoffs zurückzuführen ist. Als zweiter Hemmstoff wurde Puromycin eingesetzt, das einen von Cycloheximid grundverschiedenen Wirkmechanismus hat. Für diesen Inhibitor der Proteinbiosynthese wurde lediglich eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufgenommen. Diese wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt wie bei Cycloheximid. (vgl. Abb. 12)

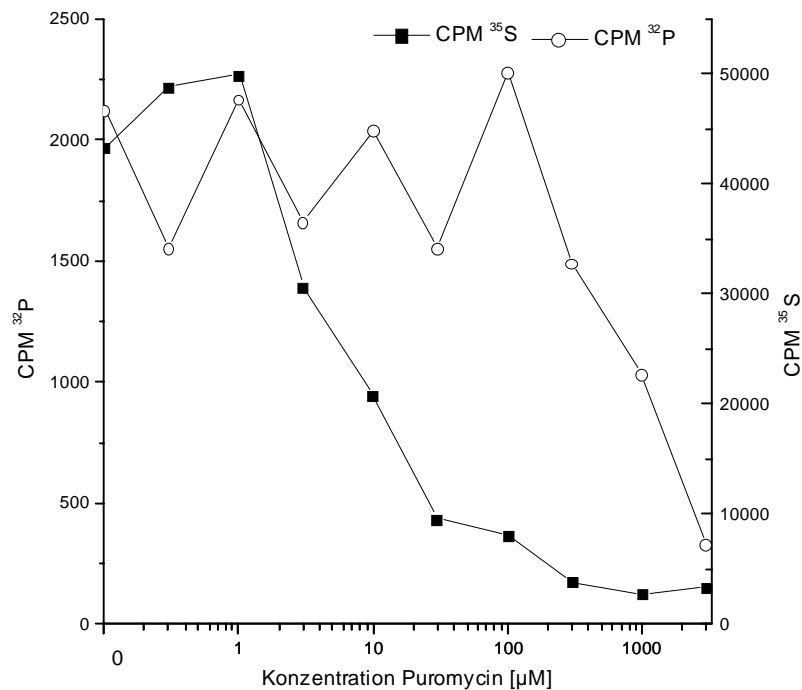


Abb. 12: Dosis Wirkungs Kurve für Puromycin bei permeabilisierten HeLa-Zellen: Gezeigt ist der Einbau von α -[³²P]-dATP und [³⁵S]-Methionin in Abhängigkeit von der Puromycin-Konzentration im Permeabilisierungsmedium

Die Dosis-Wirkungs-Kurve für Puromycin in Abbildung 12 zeigt, dass bei permeabilisierten HeLa-Zellen die Proteinbiosynthese durch 30 µM Puromycin gehemmt werden kann. Es zeigt sich hier auch eine Hemmbarkeit des α -[³²P]-dATP Einbaus. Die Hemmung wird allerdings erst bei einer sehr hohen Konzentration (1 mM) signifikant. Für [³⁵S]-Methionin ist bei einer Hemmstoffkonzentration unter 1 mM Puromycin noch geringfügiger Einbau zu verzeichnen. Es ist fraglich, ob für die Hemmung der DNA-Replikation eine teilweise Hemmung der Proteinbiosynthese nicht ausreichend ist. Wenn dies der Fall wäre, müsste ein Hemmstoff, der zur vollständigen irreversiblen Ausschaltung des Proteinbiosynthese-Apparates führt, auch eine Hemmung der Replikation nach sich ziehen.

3.1.2.4.3. Diphtherie-Toxin

Um auszuschliessen, dass das zuvor beobachtete Ausbleiben der Hemmung der DNA-Replikation infolge der Hemmung der Proteinbiosynthese auf unzureichende Hemmung der Proteinbiosynthese zurückzuführen ist, wurden Versuche mit Diphtherie-Toxin, das eine irreversible Hemmung der Proteinbiosynthese bewirkt, durchgeführt. Hierfür wurden HeLa-Zellen in vivo solange mit dem Toxin inkubiert, bis in vivo eine vollständige Hemmung der Proteinbiosynthese eingetreten war. Dann wurden die Zellen permeabilisiert und mit [³⁵S]-Methionin und α-[³²P]-dATP markiert. Die Markierung erfolgte in Form einer Dauereinbaukurve.

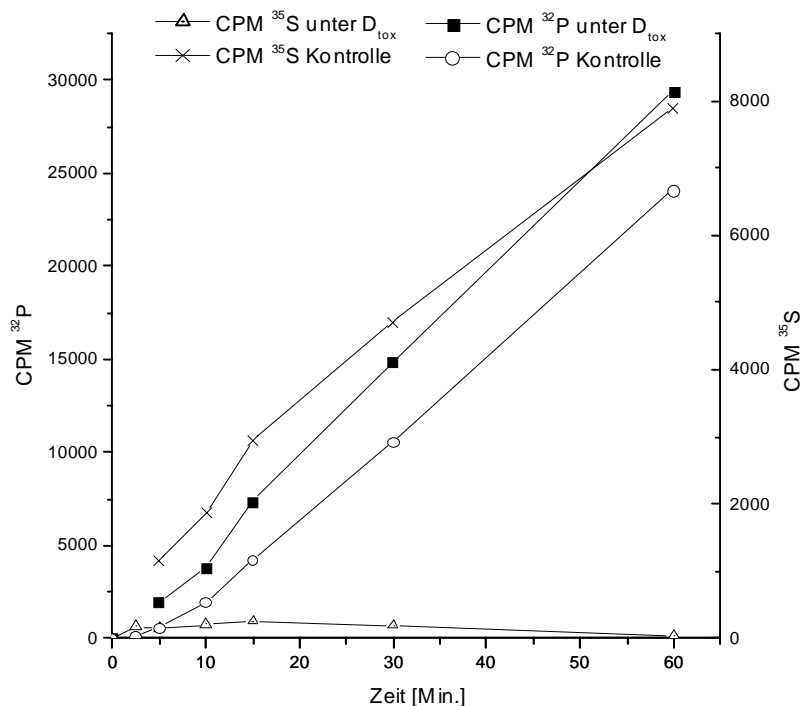


Abb. 13: Dauereinbaukurve mit permeabilisierten HeLa-Zellen: Gezeigt sind Einbaukurven mit permeabilisierten HeLa-Zellen, die 60 Minuten nach Diphtherie-Toxin-Gabe permeabilisiert wurden. Dabei wurde mit α-[³²P]-dATP und [³⁵S]-Methionin markiert. Daneben wurde eine Kontrollmarkierung mit ungehemmten Zellen ohne Diphtherie-Toxin durchgeführt.

Abbildung 13 zeigt die Einbaukurve unter Hemmung durch Diphtherie-Toxin und die entsprechende Kontroll-Einbaukurve. Durch die Einwirkung von Diphtherie-Toxin wird der Einbau von [³⁵S]-Methionin vorliegend auch nach Permeabilisierung vollständig unterbunden. Unter ungehemmten Kontrollbedingungen findet über den getesteten Zeitraum hinweg linearer Einbau dieses Markers statt. Für den Einbau an α-[³²P]-dATP dagegen ist kein Unterschied zwischen dem Verhalten der Kontrollzellen und den durch das Toxin gehemmten Zellen zu erkennen.

Hier konnte festgestellt werden, dass trotz vollständigem Ausbleiben des Einbaus von $[^{35}\text{S}]$ -Methionin keine Hemmung des α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP-Einbaus auftritt. Um sicherzustellen, dass der hier beobachtete Einbau auf die zu untersuchende DNA-Synthese zurückzuführen ist, wurde das markierte Material auch durch Sedimentationsanalyse auf alkalischen Rohrzuckergradienten untersucht.

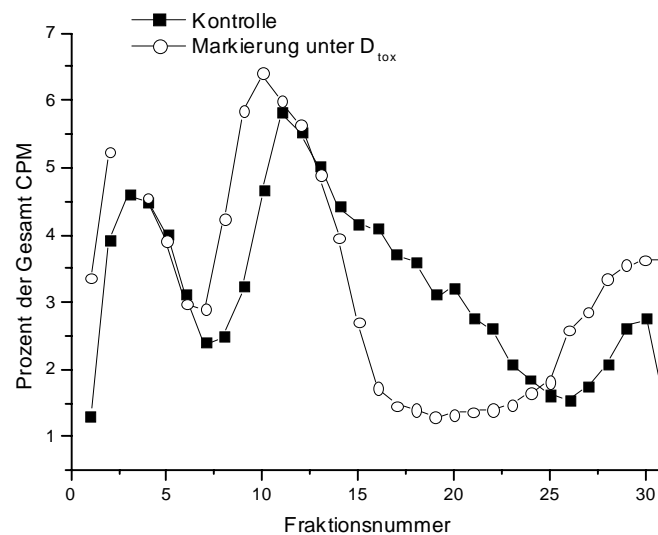


Abb. 14: Sedimentationsprofil auf alkalischem Rohrzuckergradienten: Gezeigt ist die Auftrennung von Material, das in permeabilisierten Zellen unter Einfluss von Diphtherie-Toxin markiert wurde.

Abbildung 14 zeigt das Sedimentationsprofil von α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP markiertem Material aus permeabilisierten Zellen, die 60 Minuten vor Permeabilisierung mit Diphtherie-Toxin inkubiert waren. Der Verlauf des Sedimentationsprofils unterscheidet sich nicht von demjenigen aus Zellen, die ohne Hemmstoff inkubiert wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die eingebaute α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP Radioaktivität sich wie die von Kontrollzellen eingebaute Radioaktivität verhält. Dies stellt sicher, dass der Einbau auch unter Hemmung der Proteinbiosynthese durch Diphtherie-Toxin auf DNA-Replikation zurückzuführen ist.

Die Untersuchungen zur Hemmung der Proteinbiosynthese haben gezeigt, dass permeabilisierte HeLa-Zellen in der Lage sind, Proteinbiosynthese zu betreiben. Die Hemmung der Proteinbiosynthese durch die eingesetzten Hemmstoffe ist nach der Permeabilisierung durchaus möglich. Jedoch wirkt sich dies nicht auf die Replikationsaktivität aus.

3.1.3. Auftreten kurzkettiger Intermediate

Bei den zuvor gezeigten Ergebnissen zur Replikation bei permeabilisierten HeLa-Zellen ist aufgefallen, dass das Sedimentationsprofil nicht immer demjenigen der Replikation in vivo entspricht. In vivo befindet sich die meiste säurefällbare Radioaktivität in den Fraktionen 10 bis 13. Bei Permeabilisierten Zellen ist neben diesem Hauptpeak noch ein zweiter Peak bei Fraktionen 2 bis 5 zu sehen. In diesen Fraktionen ist DNA zu finden, die maximal eine Grösse von 7 kb hat. Fraglich ist nun, wodurch dieser zweite Gipfel bei permeabilisierten Zellen hervorgerufen wird.

3.1.3.1. Grössenbestimmung

Um die Natur des Materials, welches sich im alkalischen Rohrzuckergradienten in diesen Fraktionen zeigt, zu klären, wurden verschiedene Analyse-Methoden angewendet. Zuerst sollte jedoch das Sedimentationsverhalten genauer geklärt werden.

In alkalischen Rohrzuckergradienten tritt bei HeLa-Zellen in vivo ein Gipfel bei Fraktion 10 bis 13 auf. Nach Permeabilisierung erscheint neben diesem auch noch ein Gipfel bei Fraktion 3–5. Zunächst sollte festgestellt werden, wie gross das Material, das sich in dem ersten Peak befindet, ist. Hierzu wurden alkalische Sedimentationsanalysen durchgeführt, bei denen radioaktive DNA bekannter diskreter Grösse mitgeführt wurde. Als Marker wurde DNA des λ -Phagen und linearisierte SV40-DNA eingesetzt. Zuerst wurden beide Marker auf den auch sonst eingesetzten SW28-Gradienten analysiert. Durch Eichung dieser Gradienten mit SV40-DNA konnte gezeigt werden, dass in den fraglichen Fraktionen Material auftritt, das kleiner als 4 kb ist. Eine Auftrennung ist jedoch in diesen oberen Fraktionen des eingesetzten Gradienten nicht möglich. Aus diesem Grund wurde eine Analyse auf SW40-Gradienten durchgeführt, der zur Analyse kleinerer DNA geeignet ist. Für diese Sedimentationsanalyse wurde wiederum α - ^{32}P -dATP-markierte DNA aus permeabilisierten Zellen eingesetzt. Die Radioaktivität, die sich im SW28-Gradienten in den ersten Fraktionen findet wird auch hier nicht zur Sedimentation gebracht und bleibt so in den Fraktionen 2–5. Eine Grössenbestimmung des Materials ist also auch durch Sedimentation auf einem Gradienten, der für die Auftrennung kleinerer DNA-Moleküle eingerichtet wurde, nicht möglich.

Da auch hier keine Sedimentation des Materials stattzufinden scheint, und der Gipfel in den ersten Fraktionen des Gradienten verharrt, ist fraglich, ob das vorliegende Material reine Nukleinsäure ist. Der niedrige Sedimentationskoeffizient des Materials könnte auf einen Proteinanteil in Verbindung mit Nukleinsäuren hindeuten.

3.1.3.1.1. Isopyknische Dichtegradientenzentrifugation

Um dies zu überprüfen, wurde eine Analyse auf einem isopyknischem Gradienten, der DNA, RNA und Protein gleichzeitig darstellt, durchgeführt. Hierfür wurde zur Einstellung des Dichtegleichgewichts eine neutrale Cs_2SO_4 eingesetzt. Die Dichte und die Zentrifugationsbedingungen wurden so eingestellt, dass alle zu analysierenden Stoffklassen durch den Gradienten dargestellt werden können. Als Marker für Protein wurde mit $[^3\text{H}]$ -Leucin markiertes Protein aus CCRF-CEM Zellen eingesetzt. Die DNA aus permeabilisierten Zellen wurde für 30 Minuten mit α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP inkubiert.

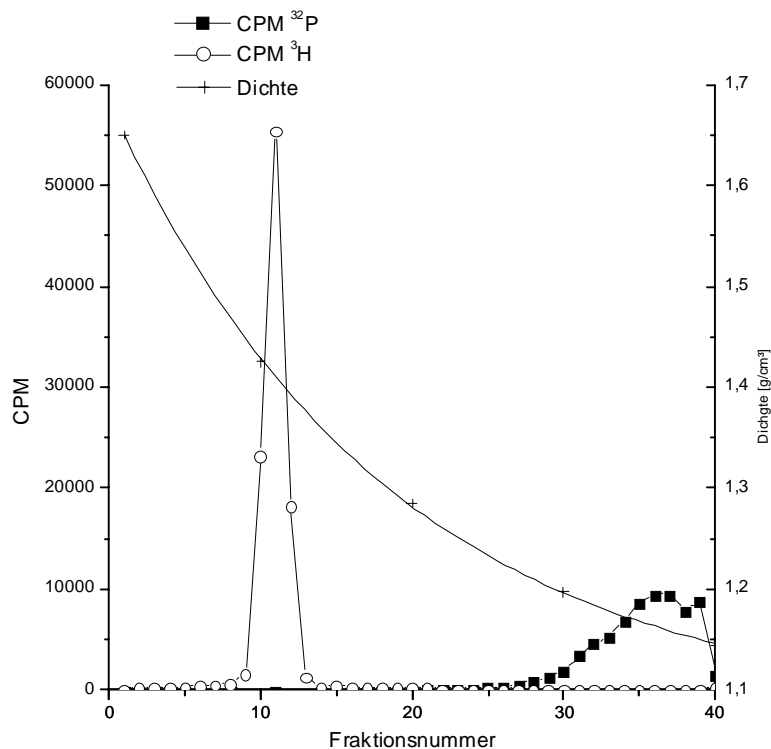


Abb. 15: Dichtegradient mit Material aus permeabilisierten HeLa-Zellen: Verteilung der säurefällbaren Radioaktivität aus permeabilisierten HeLa-Zellen auf einem isopyknischen neutralen Cs_2SO_4 Gradienten der Ausgangsdichte $1,325 \text{ g/cm}^3$, der für 70 Stunden bei 50.000 rpm zentrifugiert wurde. Gezeigt ist der Verlauf der $[^3\text{H}]$ -Leucin-Radioaktivität und der α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP Radioaktivität; daneben ist der Verlauf des Dichtegradienten aufgetragen.

Abbildung 15 zeigt den Gehalt an säurefällbarer Radioaktivität der einzelnen Gradientenfraktionen. ^3H findet sich in den obersten Fraktionen, bei geringer Dichte. In diesen Fraktionen ist kein α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP Marker zu finden. Die α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP-Markierung findet sich bei höherer Dichte in Fraktion 10. Diese Fraktion enthält keinen ^3H -Marker. Zwischen beiden Peaks findet sich kaum radioaktives Material. Es wurde demnach auch kein Material von einer Dichte zwischen derjenigen von reiner DNA und reinem Protein gebildet, das beide Marker trägt.

Es zeigt sich also, dass das beobachtete Material nicht mit dem Protein zusammen bandet. Die α - ^{32}P -dATP-Markierung stellt demnach keine Nukleoproteine oder mit Proteinen kovalent verbundene DNA-Bausteine dar. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die Dichte der α - ^{32}P -dATP-Markierung hier der Dichte reiner DNA entspricht. Aus der Breite des erhaltenen Peaks muss geschlossen werden, dass das Material bei neutralem pH-Wert auch keine ausgesprochen kurze Kettenlänge aufweisen kann.

3.1.3.1.2. Elektrophoretische Analyse

Durch die Analyse mittels Ultrazentrifugation konnten keine genauen Aussagen über die Grösse des α - ^{32}P -dATP markierten Materials aus den ersten Fraktionen der alkalischen Rohrzuckergradienten gemacht werden. Zur genaueren Analyse wurde deshalb Zellysat auf denaturierenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Die Grössenbestimmung erfolgte hier mit Hilfe eines radioaktiv endmarkierten Längenstandards, der ebenso wie das untersuchte Material durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden kann. Hierbei konnte eine genaue Grössenbestimmung durchgeführt werden.

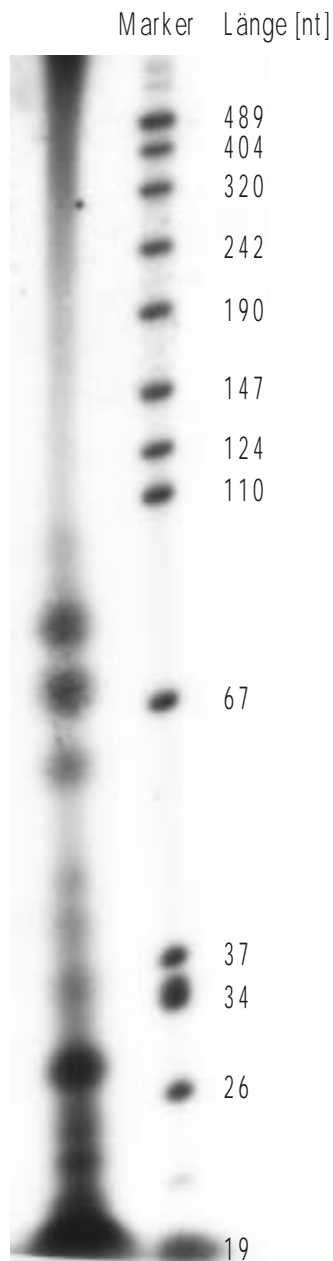


Abb. 16: Autoradiographische Darstellung des α -[32 P]-dATP-markierten Materials aus permeabilisierten HeLa-Zellen: HeLa Zellen wurden mit 98 % Formamid lysiert und das erhaltene Lysat nach Erhitzen auf einem denaturierenden 8 % PAA-Gel aufgetrennt.

Abbildung 16 zeigt die autoradiographische Darstellung des durch Elektrophorese aufgetrennten Zellysates. Es ist zu erkennen, dass im Bereich zwischen 10 und 60 Basen eine Reihe diskreter Banden auftritt. Der unterste Bereich bei 19 nt kann auf dieser Darstellung nicht gezeigt werden, da das verwendete Gel diesen Bereich nicht ausreichend auftrennt. Um den unteren Bereich aufzutrennen, wurde ein Gel mit 15 % PAA verwendet. Hier wurde zusätzlich zum Längenstandard noch ein synthetisches Oligonukleotid von 18 nt Grösse eingesetzt. Dieses wurde auch endmarkiert. Aufgrund von Fehlern bei der Synthese enthält das Oligonukleotid Verunreinigung von kürzeren Oligonukleotiden. Diese bilden eine Leiter von Banden mit 1 nt

Abstand. Mit Hilfe dieser Leiter lässt sich eine genaue Grössenbestimmung im unteren Bereich des Geles durchführen.

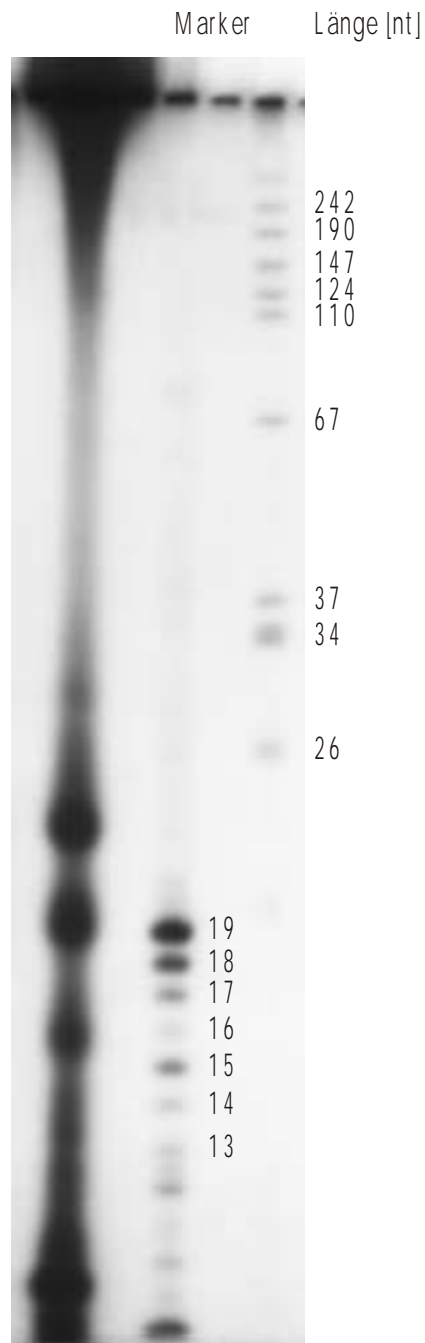


Abb. 17: Autoradiographische Darstellung des α - ^{32}P -dATP-markierten Materials aus permeabilisierten HeLa-Zellen: Das Material wurde wie bei Abbildung 16 gewonnen aber auf einem denaturierenden 15 % PAA-Gel aufgetrennt.

Abbildung 17 zeigt die Autoradiographie eines Gels, das unter den beschriebenen Bedingungen eingesetzt wurde. Die Hauptfraktion der radioaktiv markierten Produkte läuft hier bei einer Grösse von 19 nt. Von dieser Grösse zeigt sich aufsteigend eine Leiter weiterer Produkte.

Es tritt kein kontinuierliches Gemisch von unterschiedlich grossen Fragmenten auf. Die Banden lassen sich auf dem Gel sehr scharf trennen. Offenbar liegt eine diskrete Gössenverteilung zwischen den einzelnen Produkten vor.

3.1.3.2. Untersuchung zur biochemischen Natur des Materials

Durch die beschriebene Methode konnte gezeigt werden, dass in permeabilisierten HeLa-Zellen neben der replizierenden DNA, wie sie auch *in vivo* auftritt, auch sehr kurze Nukleinsäureketten mit radioaktiven Marker versehen werden. Die Grösse dieser DNA-Ketten verteilt sich über einen weiten Bereich in Form diskreter Banden. Die Hauptfraktion liegt dabei zwischen 19 und 60 Nukleotiden Kettenlänge. Im folgenden sollte der Frage nachgegangen werden, ob diese kurzen Ketten Intermediate der Replikation sind, wie sie auch *in vivo* auftreten können, oder ob es sich dabei um Artefakte der permeabilisierten Zellen handelt.

Anhand der Grösse der beobachteten α -[^{32}P]-dATP-markierten Ketten ergibt sich die Vermutung, dass es sich bei diesen um Primer der Replikation handelt. Typisch für diese Primer ist die Hybrid-Natur aus DNA mit einem kurzen RNA-Anteil. Sofern sich bei den beobachteten Molekülen ein solcher kurzer RNA-Anteil nachweisen liesse, wäre dies ein starker Hinweis darauf, dass hier Replikationsprimer vorliegen.

3.1.3.2.1. Hydrolyse-Versuche

Die Gegenwart eines RNA-Anteils könnte gezeigt werden, wenn durch alkalische Hydrolyse, oder durch Verdau mit RNase sich die beobachteten Moleküle um einige Nukleotide verkleinern liessen. Zur Klärung dieser Frage wurde markiertes Material aus permeabilisierten Zellen zur Hälfte mit Natronlauge hydrolysiert und zur anderen Hälfte unbehandelt gelassen. Beide Proben wurden nach Einstellung des pH Wertes und Angleichung der Ionenstärke nebeneinander auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt.

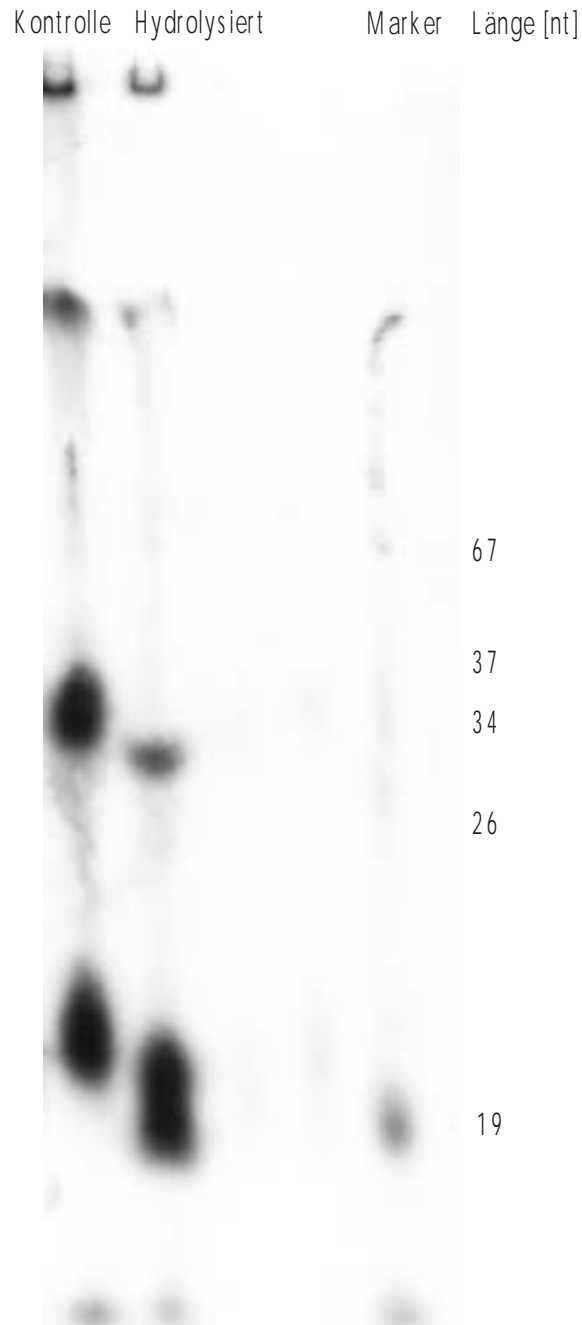


Abb. 18: Autoradiographische Darstellung des α -[32 P]-dATP-markierten Materials aus permeabilisierten HeLa-Zellen: Das Material wurde auf einem denaturierenden 8 % PAA-Gel aufgetrennt und zum Teil vor dem Auftrag auf das Gel mit NaOH hydrolysiert.

Abbildung 18 zeigt die Autoradiographie eines solchen Geles. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch die Hydrolyse eine Verschiebung der Bande erzielt wird. Die hydrolysierte Bande läuft schneller und enthält damit kleineres Material als die unhydrolysierte Bande. Es liegt somit ein alkalilabiler Anteil vor. Dies deutet stark darauf hin, dass hier ein RNA-Anteil in dem Molekül vorhanden ist. Offenbar handelt es sich bei den beobachteten kurzen Nukleinsäure-Ketten um Primer der Replikation.

Um auszuschliessen, dass die kurzkettingen markierten Produkte Folge abgebrochener Elongation sind, die nicht weiter in die DNA integriert werden, sollte ein Puls Chase Experiment durch Gelelektrophorese analysiert werden.

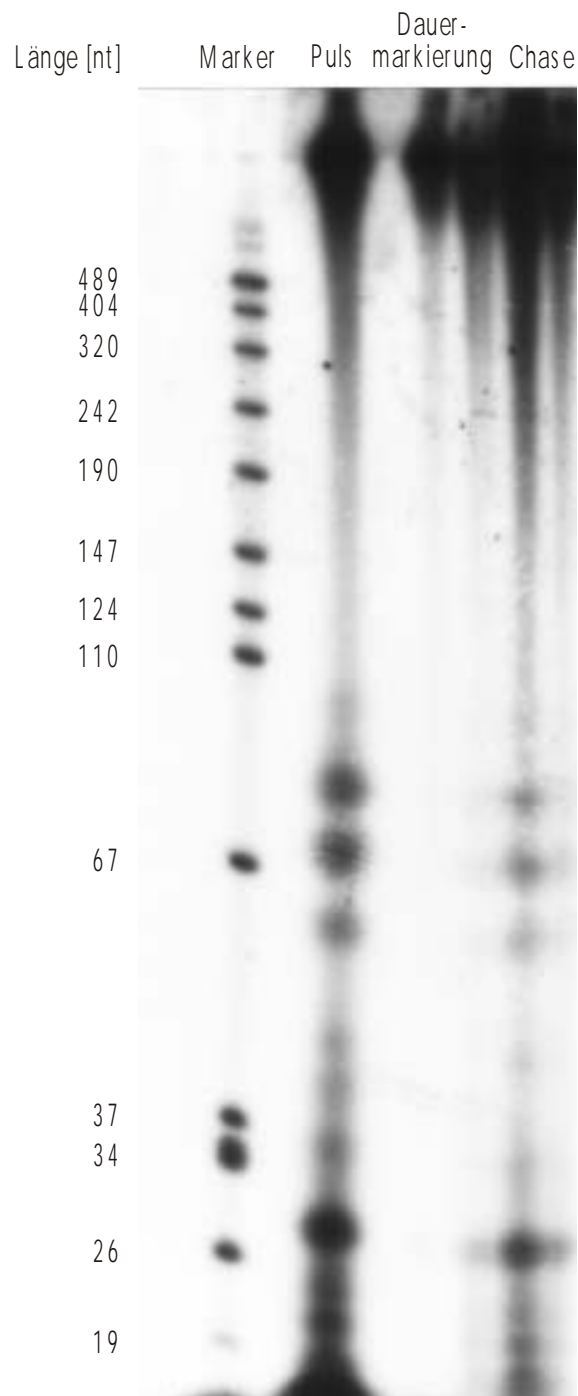


Abb. 19: Autoradiographische Darstellung des α - ^{32}P -dATP-markierten Materials aus permeabilisierten HeLa-Zellen: HeLa Zellen wurden mit 98 % Formamid lysiert. Das Lysat wurde 5 Minuten gekocht und anschließend auf einem denaturierenden 8 % PAA-Gel aufgetrennt. Zu sehen ist eine Puls Markierung, von 8 Minuten Dauer; eine ebensolche Pulsmarkierung, die einem Chase von 120 Minuten Dauer unterworfen wurde und eine Dauermarkierung von 120 Minuten Dauer.

Abbildung 19 zeigt die autordiographische Darstellung eines Gels, auf dem eine pulsmarkierte Probe und eine Probe, die nach dem Puls für 60 Minuten einem Chase unterworfen wurde, nebeneinander aufgetragen wurden. Ausserdem ist eine Dauermarkierung aufgetragen worden. Es zeigt sich, dass das α -[^{32}P]-dATP-markierte Material durch Chase vollständig aus dem Bereich unter 60 nt verschwindet. Es ist nur noch Material höherer Kettenlänge zu sehen. Bei der Dauermarkierung ist das Bandenmuster mit dem der Pulsmarkierung vergleichbar. Es ist kein Unterschied in der Intensität zu erkennen, wie er durch die 10-fache Inkubationszeit bei einer reinen Akkumulation der Produkte zu erwarten wäre.

Die Ergebnisse zeigen, dass das kurzkettige Material tatsächlich ein Zwischenprodukt der Replikation ist. Der endgültige Beweis könnte jedoch nur geführt werden, wenn eben das gezeigt kleine Material in gereifte DNA eingebaut werden könnte. Jedoch deutet dieser Befund zusammen mit dem RNA-Anteil und der festgestellten Grösse stark darauf hin, dass es sich hier um Primer der Replikation handelt.

3.1.3.3. Bedingungen für das Auftreten der kurzkettigen Intermediate

Da die kurzkettigen Intermediate, die als Replikationsprimer dargestellt werden konnten nach Permeabilisierung in verstärktem Mass auftreten und in vivo nicht auffällig hervortreten, sollte untersucht werden, ob durch Variation verschiedener Parameter der Permeabilisierung Verhältnisse der Replikation wie in vivo hergestellt werden können.

3.1.3.3.1. Variation der α -Toxin-Konzentration

Zuerst sollte überprüft werden, ob das Auftreten der kurzkettigen Intermediate auf übermässige oder zu geringe Permeabilisierung zurückzuführen sein könnte. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an α -Toxin permeabilisiert. Während der permeabilisierten Inkubation wurde mit α -[^{32}P]-dATP markiert. Das markierte Material wurde durch Sedimentationsanalyse und durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

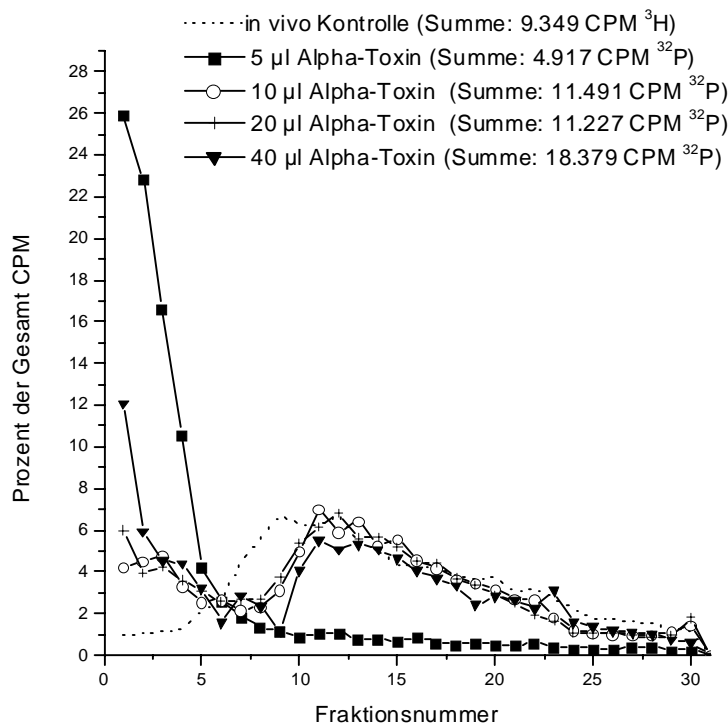


Abb. 20: Sedimentationsprofile permeabilisierter HeLa-Zellen. Dargestellt sind die Sedimentationsprofile pulsmarkierter DNA aus HeLa-Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen α -Toxin permeabilisiert wurden. Die Pulsdauer betrug 8 Minuten.

Abbildung 20 zeigt die Sedimentationsprofile des Materials, das durch Pulsmarkierung bei Permeabilisierung mit unterschiedlichen α -Toxin-Konzentrationen radioaktiv markiert wurde. Daneben ist das Sedimentationsprofil einer Pulsmarkierung von HeLa-Zellen in vivo, die im selben Versuch durchgeführt wurde aufgetragen.

Bei der niedrigsten eingesetzten α -Toxin Konzentration ist nur in den ersten Fraktionen säurefällbare Radioaktivität vorhanden. Bei 10 μ l α -Toxin, was der Hälfte der standardmässig eingesetzten Menge entspricht, tritt in einem Bereich, der in Vergleich zum Sedimentationsprofil der Kontrolle um 3 Fraktionen nach höherem Sedimentationskoeffizienten verschoben ist, ein Gipfel auf. Daneben ist auch in den ersten Fraktionen Radioaktivität zu finden. Prozentual tritt sie jedoch nicht so stark hervor, wie bei der niedrigeren α -Toxin Konzentration. Bei Einsatz der üblichen Konzentration des Toxins sieht das Sedimentationsprofil demjenigen, das bei Einsatz von 10 μ l Toxin erhalten wurde, sehr ähnlich. Bei Einsatz von 40 μ l Toxinlösung tritt der Gipfel in den ersten Fraktionen des Gradienten wieder stärker in den Vordergrund. Jedoch ist im erwünschten Bereich um den Kontrollpeak aus der in vivo Markierung herum auch ein Gipfel zu finden.

Es zeigt sich, dass durch die Variation der α -Toxin Konzentration Einfluss auf das Sedimentationsprofil genommen werden kann. Durch wenig Toxin werden die Zellen nicht stark permeabilisiert. Als Folge davon tritt nur kleines markiertes Material auf. Der Gipfel, wie er für aktive Replikation in vivo charakteristisch ist, bleibt dann völlig aus. In einem weiten Bereich um die üblicherweise eingesetzte Konzentration herum tritt der Gipfel für die Replikation in ähnlicher Weise wie in vivo auf. Daneben findet sich jedoch immer auch Radioaktivität in nicht zu geringem Umfang in den ersten Fraktionen des Gradienten. In vivo wird dies nie beobachtet. Wenn bei Permeabilisierung die α -Toxin-Konzentration stark gesteigert wird, so tritt der Anteil des kleinen Materials in den ersten Fraktionen wieder stärker hervor. Eine vollständige Vermeidung der kurzketigen Intermediate durch eine bestimmte Konzentration an Toxin konnte vorliegend nicht beobachtet werden.

Fraglich ist, ob die beobachteten Veränderungen im Sedimentationsprofil sich in gleicher Weise auch in der gelelektrophoretischen Darstellung abbilden.

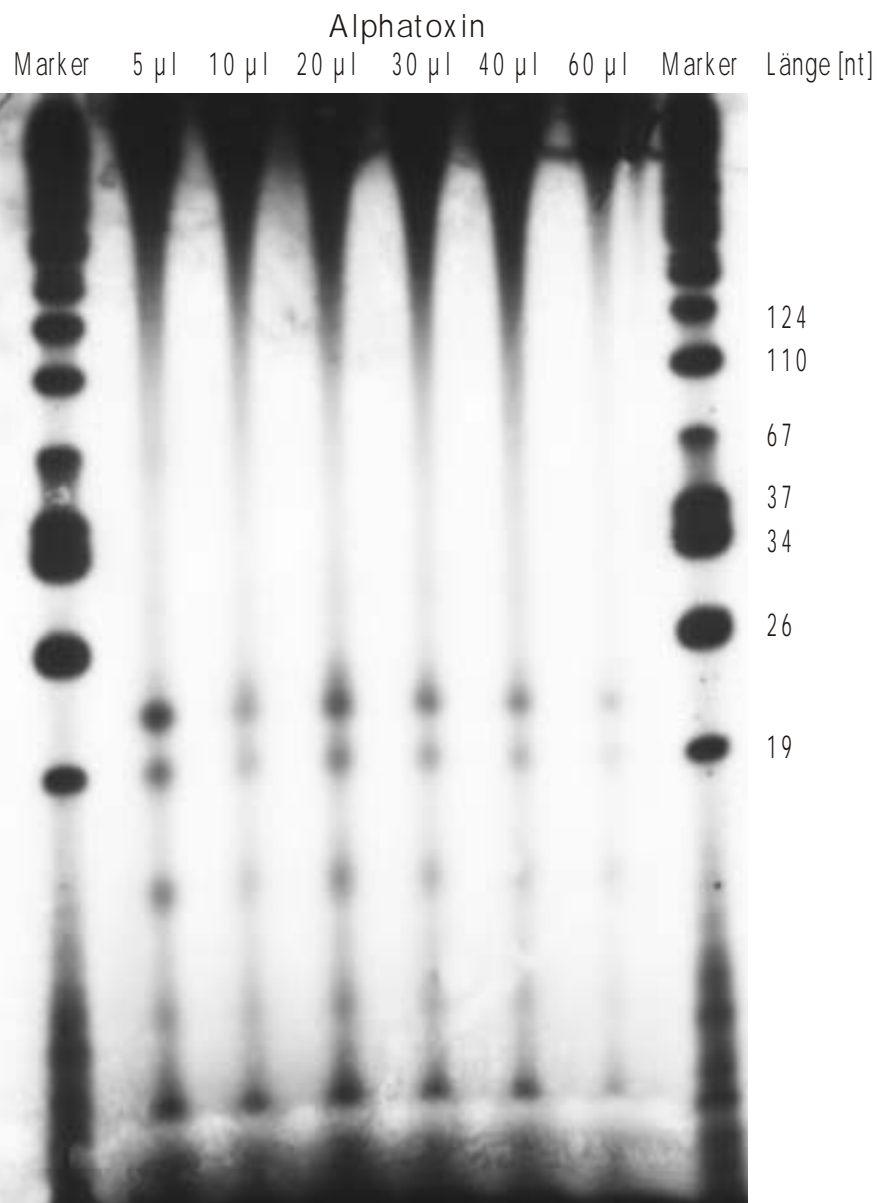


Abbildung 21: Autoradiographische Darstellung des α - ^{32}P -dATP-markierten Materials aus permeabilisierten HeLa-Zellen: Das Material wurde auf einem denaturierenden 8 % PAA-Gel aufgetrennt. Zu sehen sind die Produkte, die bei verschiedenen α -Toxin-Konzentrationen markiert wurden.

Abbildung 21 zeigt die Autoradiographie eines Gels, auf dem Proben aufgetrennt wurden, die denjenigen der zuvor gezeigten Sedimentationsanalyse entsprechen. In der Stärke der vorhandenen Banden kann kein signifikanter Unterschied gesehen werden. Offenbar wird die Menge an Primern, die markiert werden, durch die eingesetzte α -Toxin Konzentration nicht beeinflusst.

3.1.3.3.2. Verschiedene Hemmsituationen

Der Gipfel in den ersten Fraktionen der alkalischen Rohrzuckergradienten ist nicht nur unter ungehemmten Bedingungen beobachtet worden, sondern ganz besonders unter

hemmenden Bedingungen. Es sollte gezeigt werden, dass der dort aufgetretene Gipfel auch gelelektrophoretisch kurzkettige DNA aufzeigt.

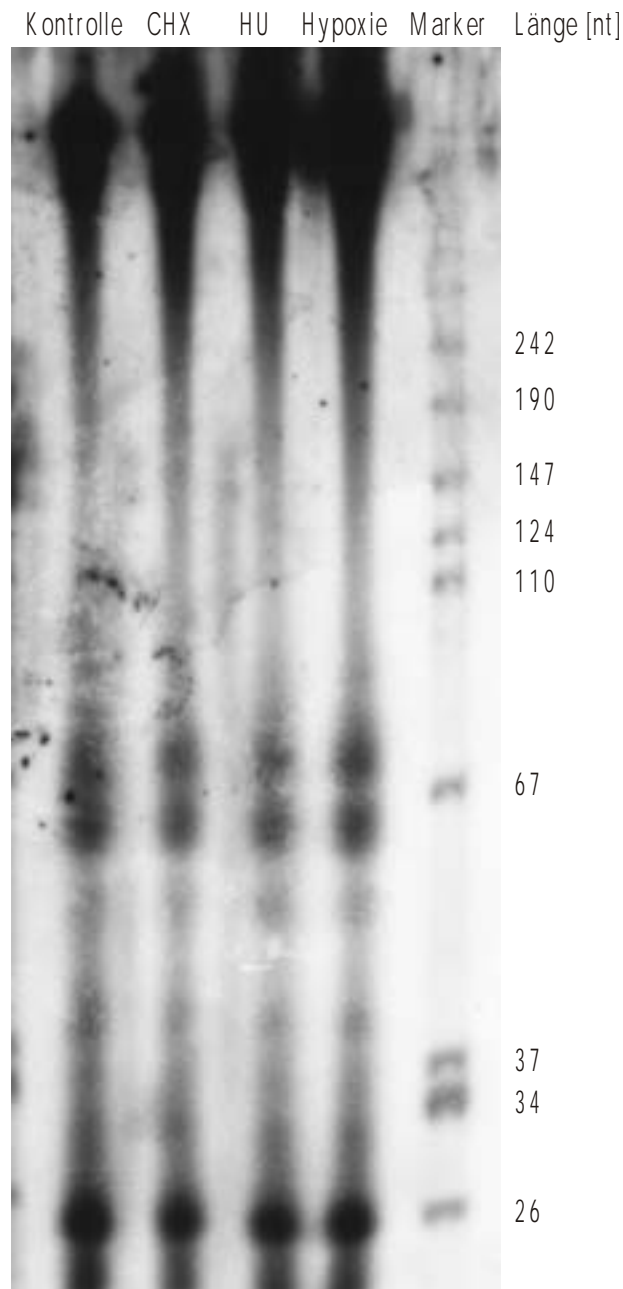


Abb. 22: Autoradiographische Darstellung des α -[32 P]-dATP-markierten Materials aus permeabilisierten HeLa-Zellen: Das Material wurde auf einem denaturierenden 8 % PAA-Gel aufgetrennt. Die Markierung erfolgte unter verschiedenen hemmenden Bedingungen.

Das Bandenmuster in Abbildung 22 wird vorliegend nicht durch die Gegenwart von Hemmstoffen beeinflusst.

3.1.4. Verwertung der angebotenen Nukleotid-Bausteine

Bei den Studien des Replikationsverhaltens von permeabilisierten HeLa-Zellen ist auch von Interesse, in welchem Umfang die permeabilisierten Zellen die Bausteine für die produzierte DNA aus dem zelleigenen Nukleotidpool beziehen. Die Tatsache, dass die säurefällbare Radioaktivität bei Pulsen sich nicht proportional zur eingesetzten spezifischen Radioaktivität des Markers verhält, weist darauf hin, dass die DNA nicht vollständig aus dem zur Verfügung gestellten Permeabilisierungsmedium aufgebaut wird.

3.1.4.1. Dichteverschiebung im isopyknischen Gradienten

Um die Verwertung der angebotenen Bausteine zu überprüfen, erscheint der Substitutionsgrad an Dichtemarker bei DNA geeignet. Es wurde untersucht, ob ein Unterschied im Substitutionsgrad auftritt, wenn permeabilisierte HeLa-Zellen mit Hydroxyharnstoff inkubiert werden. Unter diesem Hemmstoff wird die Eigensynthese von Desoxythymidin durch die Zelle verhindert. Da die Dichtemarkierung mit Bromdesoxyuridintriphosphat durchgeführt wird zeigt sich eine Veränderung in der Versorgung mit zelleigenen Bausteinen direkt in der Dichte der DNA. Es wurde eine Markierung bei Gegenwart von 100 μ M BrdUTP unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden isopyknisch auf Cs₂SO₄-Gradienten analysiert.

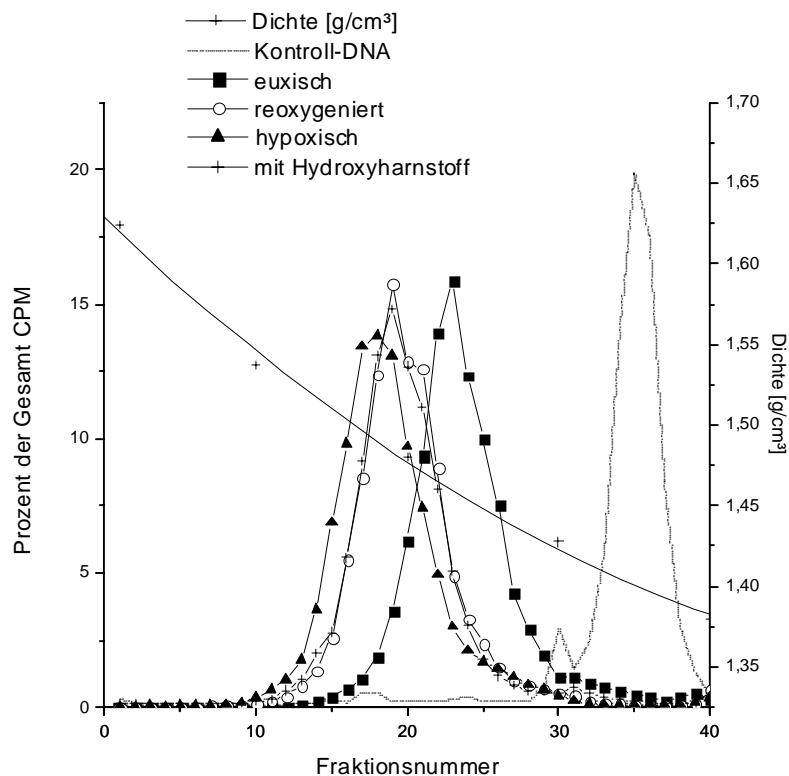


Abb. 23: Isopyknische Gradienten mit permeabilisierten HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden unter verschiedenen Bedingungen mit $100\mu\text{M}$ BrdUTP dichtemarkiert und gleichzeitig mit radioaktivem Marker versehen. Die Zellysate wurden auf alkalischen Cs_2SO_4 Gradienten analysiert.

Abbildung 23 zeigt die Verteilung der säurefällbaren Radioaktivität in den einzelnen Gradienten. Um die unterschiedliche Verschiebung zu verdeutlichen, wurden die Profile gemeinsam in einem Diagramm aufgetragen. Es ist zu sehen, dass permeabilisierte HeLa-Zellen unter Hydroxyharnstoff eine stärkere Dichterverschiebung zeigen als solche ohne den Hemmstoff. Dies zeigt, dass die permeabilisierten Zellen noch in der Lage sind, Nukleotidbausteine für die DNA-Synthese selbst herzustellen. Die produzierte DNA besteht nicht allein aus den Nukleotiden des Permeabilisierungsmediums. Auch unter Hypoxie zeigen die permeabilisierten Zellen eine stärkere Verschiebung als euoxisch, die jedoch nicht so stark ist wie mit Hydroxyharnstoff. Die Dichterverschiebung lässt sich durch Reoxygenierung der permeabilisierten Zellen nicht umkehren. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine Re-radikalisierung der Ribonukleotidreduktase unter Permeabilisierung nicht möglich ist. Dies könnte im Fehlen des Fe^{++} Ions begründet sein. Jedoch kann auch bei Anwesenheit von Fe^{++} kein Reoxygenierungseffekt beobachtet werden. Der Versuch zeigt jedoch, dass sowohl Hypoxie als auch Hydroxyharnstoff den gleichen Effekt auf die Ribonukleotidreduktase der permeabilisierten Zellen zu haben scheinen. Die Auswirkung auf die DNA-Replikation in Form der Hemmung bleibt jedoch aus.

3.1.4.2. Markierung mit radioaktiven Ribonukleotiden

Um das Ausmass abschätzen zu können, in dem die Zellen ihre Bausteine selbst herstellen wurde eine Markierung mit $[^3\text{H}]$ -rCDP durchgeführt. Da dieser Baustein nur eingebaut werden kann, wenn er selbst von den Zellen durch die Ribonukleotidreduktase reduziert und dann zu dCTP aufphosphoryliert wird, kann hierbei abgeschätzt werden in welchem Ausmass die Synthese der Zellen stattfindet, wenn nebenher mit bekannter spezifischer Aktivität α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP eingesetzt wird.

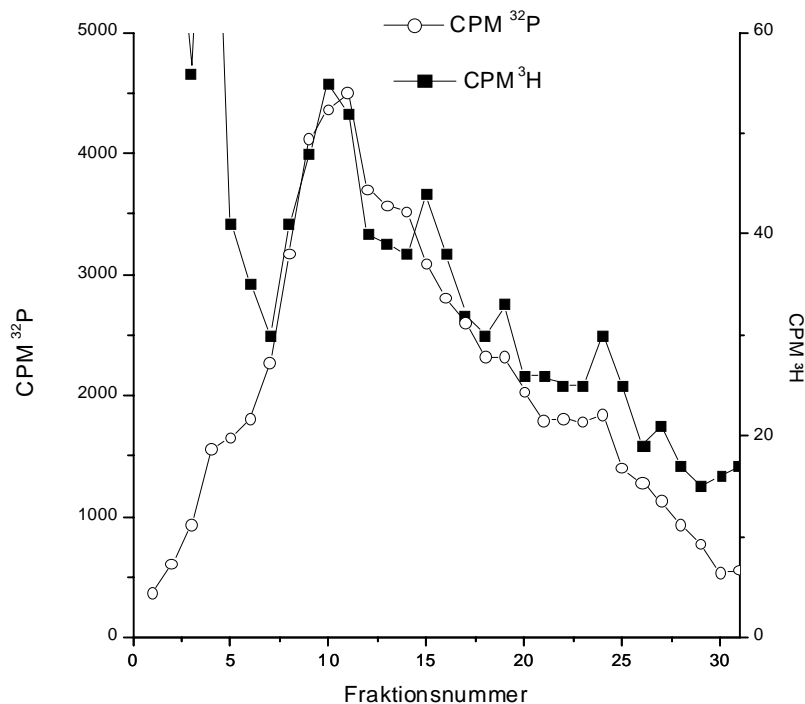


Abb. 24: Sedimentationsprofile von ^3H rCDP markiertem Material aus permeabilisierten HeLa-Zellen: Gezeigt ist eine Pulsmarkierung von 8 Minuten Dauer. Die Markierung erfolgte mit $[^3\text{H}]$ -rCDP und α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP in einem Ansatz.

Im Sedimentationsprofil zeigt sich bei $[^3\text{H}]$ -rCDP Markierung zwar nur wenig Radioaktivität, diese sedimentiert allerdings genau wie die Kontroll Aktivität. Nur in den Fraktionen 1 – 5 findet sich prozentual mehr Radioaktivität als bei der α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP Markierung. Eine Kreuzkontamination von ^{32}P nach ^3H kann bei den benutzten Kanaleinstellungen ausgeschlossen werden. Es ist also davon auszugehen, dass $[^3\text{H}]$ -rCDP in die DNA der permeabilisierten HeLa-Zellen eingebaut wird. Auch wird die als Pulsmarkierung eingebaute Radioaktivität durch einen Chase zu grösseren Sedimentationskoeffizienten hin verschoben.

Es zeigt sich bei diesem Einbauversuch, dass Markierung, die als Ribonukleotid angeboten wird in geringem Ausmass in die frischreplizierte DNA eingebaut wird. Die Replikation der permeabilisierten HeLa-Zellen wird demnach nicht nur mit den dNTP, die im Medium enthalten sind betrieben.

3.1.5. Zusammenfassung der Befunde über die DNA Replikation in permeabilisierten HeLa-Zellen

HeLa-Zellen zeigen nach Permeabilisierung mit α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* noch Replikationsaktivität. Diese ist über einen grösseren Zeitraum konstant und auch von der Replikationsgeschwindigkeit her mit der Situation *in vivo* vergleichbar. Hemmung der Replikation ist bei permeabilisierten HeLa-Zellen prinzipiell möglich. Dies zeigen die Versuche mit den Hemmstoffen Aphidicolin und Ara-CTP. Jedoch scheint diese Hemmung nur dann aufzutreten, wenn unmittelbar an der DNA-Polymerisation angreift. Denn Hemmstoffe, die auf anderen Ebenen des zellulären Stoffwechsels angreifen, die aber *in vivo* dennoch zu einer Hemmung der Replikation führen, haben nach Permeabilisierung diese Wirkung nicht mehr. So konnte gezeigt werden, dass durch Hydroxyharnstoff keine Hemmung der Replikationsaktivität erzielt wird, obwohl davon ausgegangen werden kann, dass der Hemmstoff seine hemmende Wirkung auf die Ribonukleotidreduktase auch in permeabilisierten Zellen entfaltet. Auch durch Hypoxie kann keine Effekt auf die Replikation erzielt werden. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass permeabilisierte Zellen zur Proteinbiosynthese in der Lage sind. Auch kann diese Proteinbiosynthese durch verschiedene Substanzen gehemmt werden. Eine Hemmung der Replikation ist bei permeabilisierten Zellen allerdings nicht als Folge der Proteinbiosynthese Hemmung zu beobachten. Insgesamt zeigt sich, dass eine mittelbare Hemmung der Replikation bei permeabilisierten HeLa-Zellen nicht mehr möglich ist. Die Kopplung zwischen der Regulation der DNA-Replikation und der Aktivität der untersuchten Stoffwechselwege geht offenbar durch die Permeabilisierung verloren.

Des weiteren kann bei der Replikation in permeabilisierten Zellen neben den gewohnten Replikationsprodukten eine Klasse kurzkettiger Produkte nachgewiesen werden. Diese Produkte treten *in vivo* in sehr geringem Ausmass auf, werden aber nach Permeabilisierung so vermehrt, dass mehr als 50 % des radioaktiv markierten säurefällbaren Materials ausmachen können. Nach der Permeabilisierung sind HeLa-Zellen noch zur Synthese von Nukleotidbausteinen für die DNA-Synthese in der Lage. Dies lässt sich durch Hemmung der Enzyme,

die an der Synthese der entsprechenden Bausteine beteiligt sind zeigen. Auch können Ribonukleotiddiphosphate in DNA incorporiert werden und schließlich in gereifter DNA auftauchen.

3.2. Versuche, die durch die Permeabilisierung verlorengangene schnelle Replikationsregulation wiederherzustellen

Wie zuvor gezeigt wurde, sind nach der Permeabilisierung die Merkmale der schnellen Replikationsregulation nicht mehr vorhanden. Da das Ziel der vorliegenden Arbeit darin besteht die Regulation zu untersuchen, sollte versucht werden, die Regulierbarkeit wiederherzustellen. Der Verlust der Koppelung der DNA-Replikation an Hemmsituationen könnte im vorliegenden Fall auf dem Vorhandensein eines enthemmenden Stoffes im Permeabilisierungsmedium oder aber auf dem Herausdiffundieren eines niedermolekularen regulatorischen Hemmstoffes aus der Zelle beruhen. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt.

3.2.1. Einfluss von Rückständen aus dem Kulturmedium

Zuerst sollte untersucht werden, ob das Fehlen der Regulierbarkeit auf einer Verunreinigung des Permeabilisierungsmediums, die durch auf den Zellen verbliebenes Kulturmedium eingeschleppt wurde, zurückzuführen ist. Hierfür wurden die Zellen vor der Permeabilisierung mehrfach mit PBS gewaschen, so dass Rückstände ausgeschlossen werden konnten. Mit den so vorbehandelten Zellen wurden Dauereinbaukurven über 60 Minuten durchgeführt.

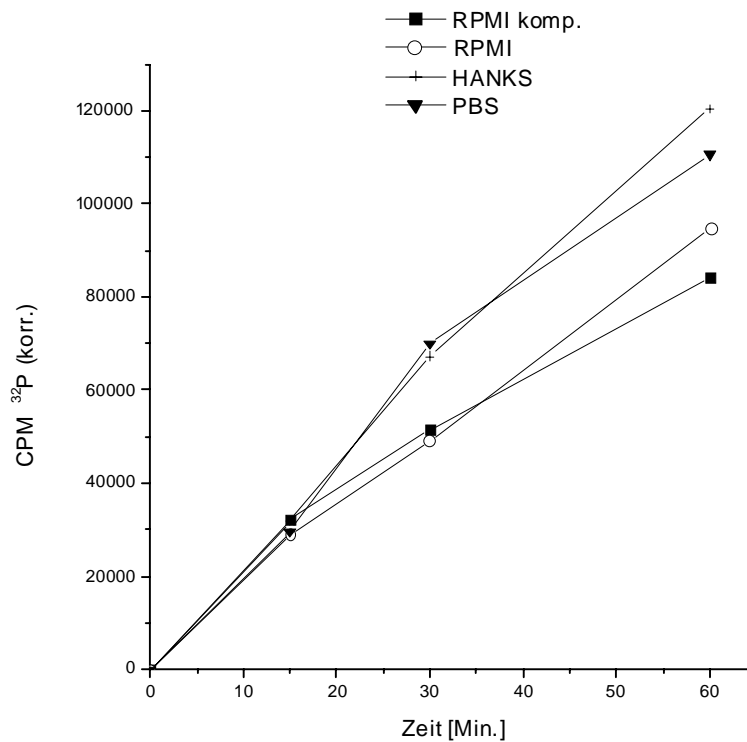


Abb. 25: Einbaukurven mit permeabilisierten HeLa-Zellen: Die Zellen wurden vor der Permeabilisierung mit unterschiedlichen Medien 3x gewaschen. Anschließend wurde mit normalem Permeabilisierungsmedium inkubiert.

Abbildung 25 zeigt die Einbaukurven der unterschiedlich vorbehandelten HeLa-Zellen. Die Kurven verlaufen über einen Zeitraum von 60 Minuten hin weitgehend linear. Im gezeigten Fall ist der Einbau bei den mit PBS und HANKS-Lösung gewaschenen Zellen besser als bei denjenigen, die mit Medium gewaschen wurden. Bei einem zweiten Durchlauf dieses Versuches konnte das gegenteilige Ergebnis erhalten werden. Offenbar ist der Unterschied in der Einbauhöhe nach längerer Zeit hier nicht als signifikant zu werten. Zwischen den einzelnen Proben kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei diesen Versuchen konnte kein Effekt der Medium-Rückstände auf die Netto-DNA-Synthese in permeabilisierten Zellen festgestellt werden.

3.2.2. Einfluss von normalen Konsequenzen der Permeabilisierung der Plasmamembran

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Deregulation eine direkte Folge der Permeabilisierung der Zellwand ist. Dabei wurden der Verlust des Plasmamembranpotentials, die Veränderung des Ionenmilieus, die Veränderung des intrazellulären pH-Wertes und Änderung des Redoxzustandes intrazellulärer Proteine in Betracht gezogen.

3.2.2.1. Einfluss des Plasmamembranpotentials

Um den Einfluss des Membranpotentials auf die Regulierbarkeit des DNA-Replikation bei HeLa-Zellen zu untersuchen wurden Versuche bei HeLa-Zellen *in vivo* durchgeführt. Das Membranpotential lässt sich bei den Zellen mit Hilfe von Ouabain zerstören. Um festzustellen, ob Ouabain sich von sich aus auf die Replikationstätigkeit auswirkt sollte zuerst eine Dosis-Wirkungskurve aufgenommen werden. Der Wirkungsbereich für Ouabain liegt nach der Literatur bei 2–12 mM. Aus diesem Grund wurde für die Dosis-Wirkungs-Kurve ein Bereich von $0-10^{-3}$ M erfasst.

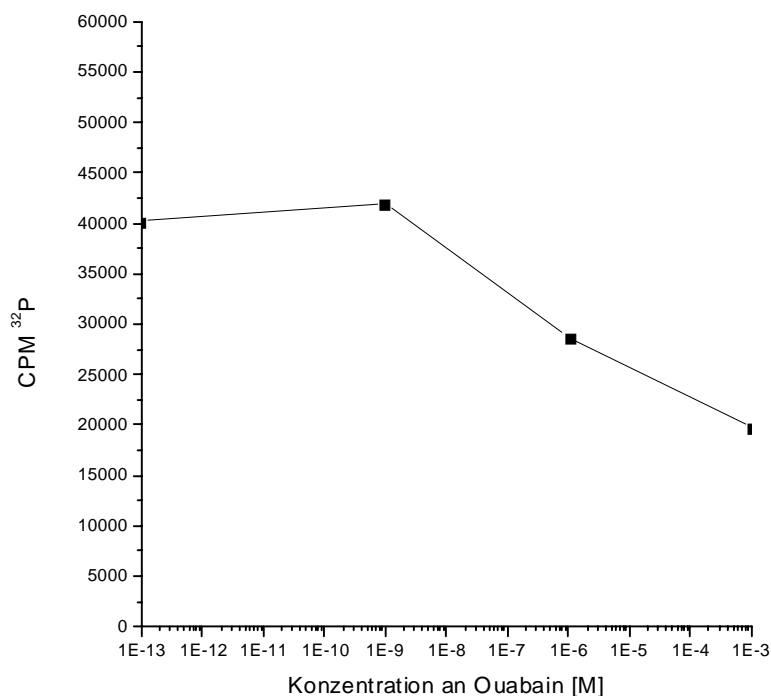


Abb. 26: Wirkkurve für Ouabain bei HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden 30 Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ouabain inkubiert. Danach erfolgte Markierung mit [³H]-Thymidin für 10 Minuten.

Die in Abbildung 26 dargestellte Wirkkurve für Ouabain zeigt, dass bei höherer Konzentration des Stoffes ein verminderter Einbau stattfindet. Eine vollständige Hemmung der Replikationsfähigkeit liegt jedoch nicht vor.

Für eine Einschätzung der Wirkung dieses Stoffes auf die Hemmbarkeit der Replikationsfähigkeit bei HeLa-Zellen wurden Zellen, welche 30 Minuten lang mit 5 mM Ouabain behandelt waren, verschiedenen Inkubationsbedingungen unterworfen.

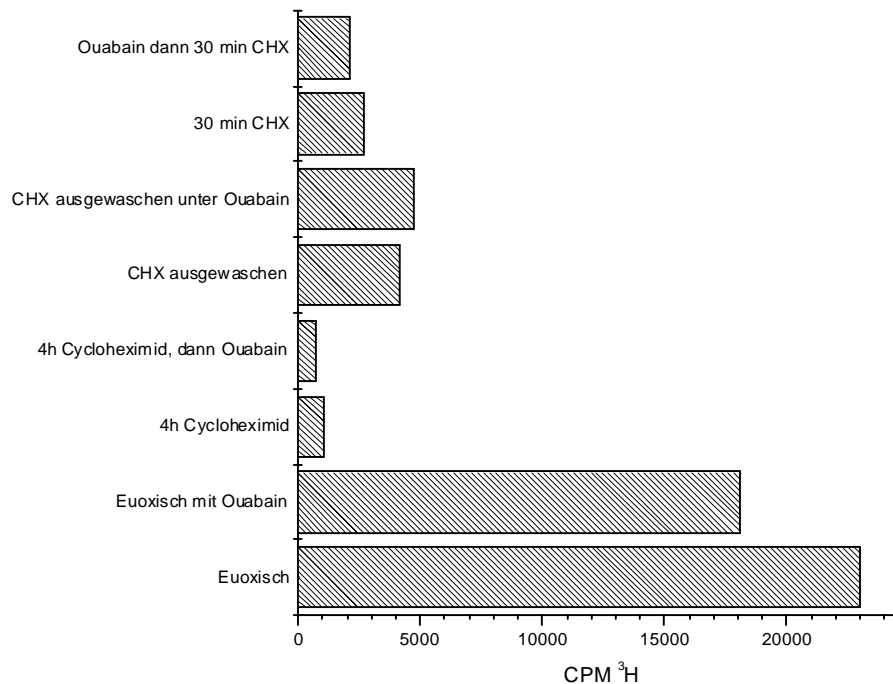


Abb. 27: Einbauwerte mit HeLa-Zellen unter Ouabain. Der Einfluss verschiedener Hemmsituation in Verbindung mit Ouabain wurde durch den Einbauwert aus 10 Minuten Inkubation mit [³H]-Thymidin getestet. Ouabain wurde 5mM eingesetzt, und wirkte jeweils 30 Minuten auf die Zellen ein.

Bei Kontrollzellen zeigt sich hier eine mässige Hemmung des Einbaus durch das Toxin. Bei Zellen, die 4 Stunden durch Cycloheximid vorgehemmt waren, wird durch Ouabain auch noch eine geringe zusätzliche Verminderung des Einbaus hervorgerufen. Wird nach der Inkubation mit Ouabain das Cycloheximid ausgewaschen, so kann ein Anstieg des Einbaus verzeichnet werden, wie er auch bei Abwesenheit von Ouabain eintritt. Wenn Cycloheximid nach 30 Minuten Inkubation mit Ouabain auf die Zellen gegeben wird tritt dennoch eine Hemmung ein, wie sie auch ohne Ouabain auftritt. In allen getesteten Situationen kann also der Effekt des eingesetzten Hemmstoffes auch in Gegenwart von Ouabain erzielt werden. Es konnten keine Effekte von Ouabain auf die Regulierbarkeit der Replikation festgestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit, das Membranpotential zu beeinflussen besteht darin, das Ionenmilieu im Medium stark zu verändern. So kann bei Weglassen von Na^+ im Aussenmedium kein Membranpotential aufgebaut werden. Der Effekt von Cycloheximid sollte deshalb bei veränderter Ionenzusammensetzung des Inkubationsmediums getestet werden.

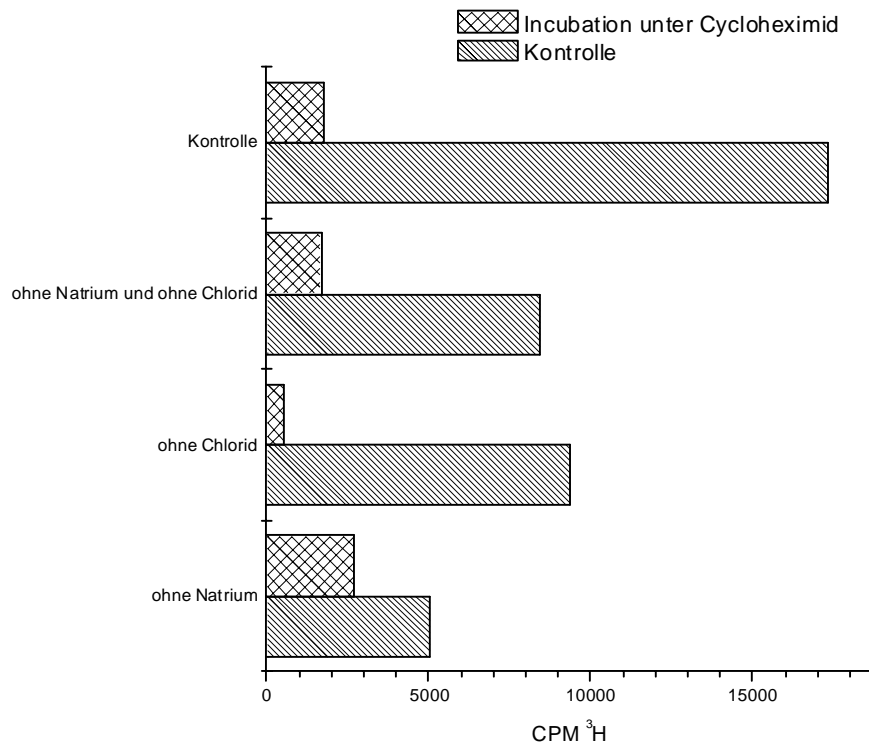


Abb. 28: Einbauwerte bei HeLa-Zellen in Inkubationsmedium mit veränderter Ionenzusammensetzung: HeLa-Zellen wurden in Medium mit veränderter Ionenzusammensetzung inkubiert. Weggelassene Anionen wurden durch Glutamat substituiert; als Ersatz für Kationen wurde Kalium eingesetzt.

Abbildung 28 zeigt die Einbauwerte, die unter den genannten Bedingungen erhalten wurden. Es zeigt sich, dass in allen Fällen durch Cycloheximid eine Hemmung erreicht werden kann, die sich im Einbauwert deutlich niederschlägt. Die Veränderung der Ionenzusammensetzung bewirkt jedoch eine Störung des Einbaus. Dies ist allerdings auch zu erwarten. Bei dieser Versuchskonstellation konnte wiederum kein Einfluss des fehlenden Membranpotentials auf die Hemmbarkeit durch CHX festgestellt werden.

3.2.2.2. Einfluss des pH-Wertes des Permeabilisierungsmediums

Eine weitere Veränderung, welche unmittelbar durch die Permeabilisierung hervorgerufen wird betrifft den pH-Wert des Cytosols. Fraglich ist, ob der bei permeabilisierten Zellen be-

obachtete Effekt auf die Veränderung des intrazellulären pH zurückzuführen ist. Um dies zu testen, wurden Permeabilisierungsmedien mit verschiedenen pH-Werten angesetzt. HeLa-Zellen wurden in den Medien mit variiertem pH permeabilisiert und für 30 Minuten inkubiert. Während der Inkubation wurde zur Kontrolle der DNA-Polymerisationsaktivität mit α -[32 P]-dATP markiert.

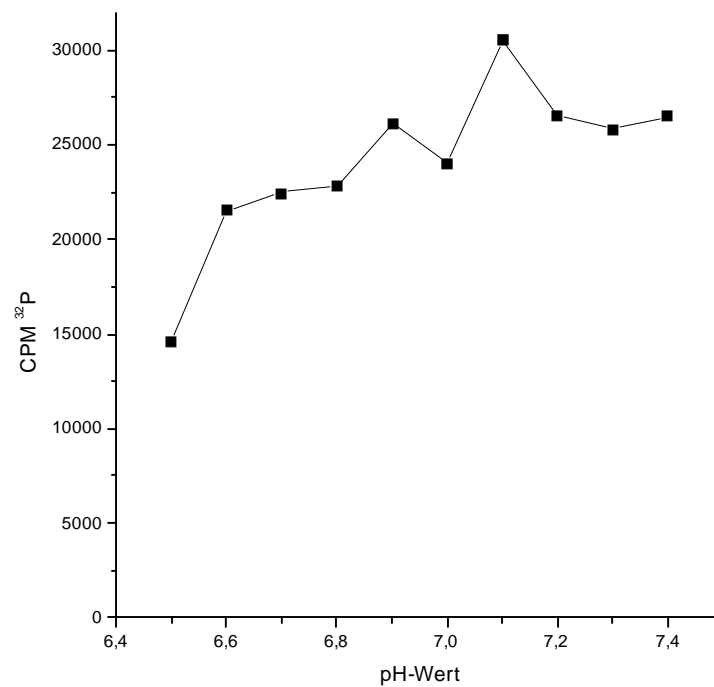


Abb. 29: Darstellung des Einbaus bei permeabilisierten HeLa-Zellen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Permeabilisierungsmediums: HeLa-Zellen wurden in Permeabilisierungsmedium mit verschiedenen pH-Werten für 30 Minuten inkubiert und mit α -[32 P]-dATP markiert.

Abbildung 29 zeigt die Abhängigkeit des Einbaus an α -[32 P]-dATP vom pH-Wert des Permeabilisierungsmediums. Bei saurem pH sinkt die Einbauaktivität. Im physiologischen Bereich kann keine starke Veränderung der Einbautätigkeit festgestellt werden. Beim Einbautest ergibt sich insgesamt keine starke Veränderung in Abhängigkeit vom pH. Eine regulatorische Wirkung von pH-Veränderungen, wie sie vorliegend physiologisch denkbar sind, wird dadurch ebenfalls weniger wahrscheinlich.

3.2.2.3. Einfluss von Calcium

Es sollte geprüft werden, inwiefern durch die Konzentration von Ca^{++} ein regulatorischer Effekt auf die Replikationsaktivität der permeabilisierten HeLa-Zellen ausgeübt werden kann.

Hierfür wurde Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ca^{++} ohne EGTA in einem Dauereinbauversuch eingesetzt. Als Kontrolle diente Medium mit $100 \mu\text{M}$ Ca^{++} mit EGTA.

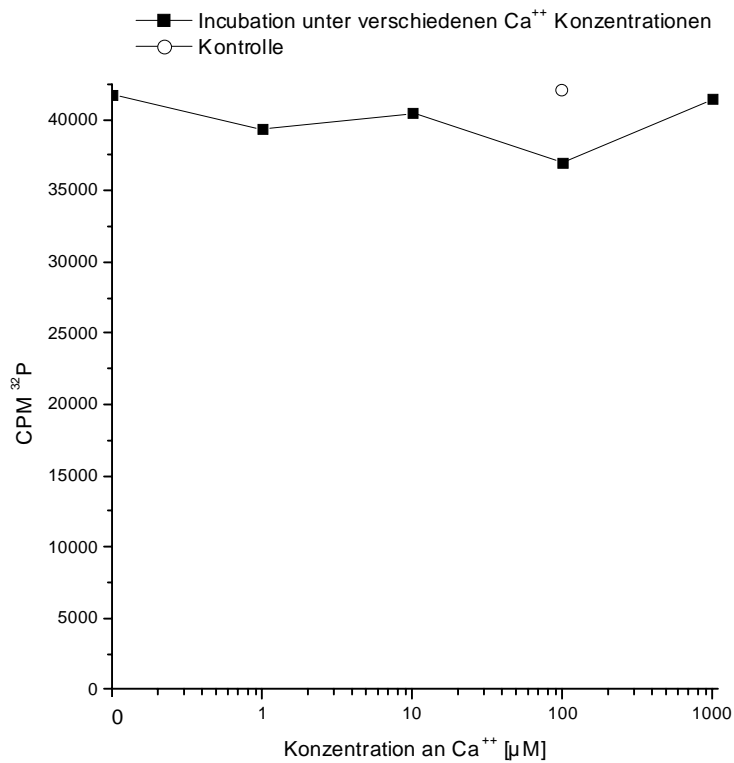


Abb. 30: Einbau in permeabilisierten HeLa-Zellen unter verschiedenen Ca^{++} Konzentrationen: Gezeigt sind die Einbauwerte aus 30 minütigen Inkubationen mit den angegebenen Ca^{++} Konzentrationen.

Abbildung 30 zeigt, dass durch Veränderung der Ca^{++} Konzentration im mikromolaren Bereich kein Effekt auf die Einbauaktivität der permeabilisierten HeLa-Zellen für α - ^{32}P -dATP hervorgerufen werden kann.

3.2.2.4. Einfluss des Redoxzustandes der Proteine

Möglicherweise wird durch die Permeabilisierung der Zelle der Redoxzustand intrazellulärer Proteine verändert. Hierdurch könnte die Replikationsaktivität der Zellen beeinflusst werden. Um den Redoxzustand der Proteine zu kontrollieren wurden die reduzierenden Agentien DTT und GSH und H_2O_2 als Oxidationsmittel in unterschiedlichen Versuchsansätzen eingesetzt.

3.2.2.4.1. Einfluss von DTT

Um festzustellen, ob durch das Reduktionsmittel DTT eine Veränderung in der Einbaurrate bei permeabilisierten HeLa-Zellen bewirkt werden kann, wurde eine Dosis Wirkungs Kurve aufgenommen. Abb. 31 zeigt diese Dosis Wirkungs Kurve von 0–5 μM DTT.

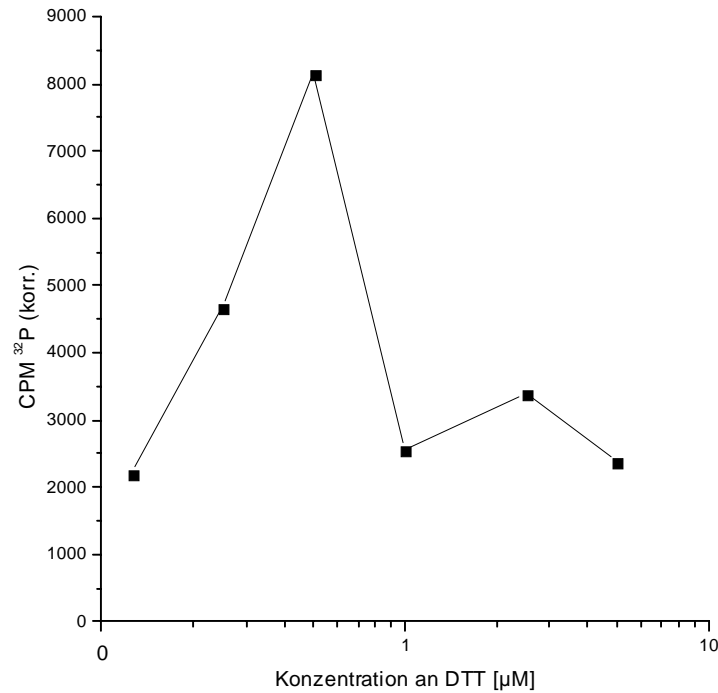


Abb. 31: Dosis-Wirkungs-Kurve für DTT bei permeabilisierten HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden in Permeabilisierungsmedium mit unterschiedlicher Konzentration an DTT inkubiert und radioaktiv markiert.

Es zeigt sich ein klares Einbaumaximum bei 0,5 μM DTT. Offenbar kann durch die Anwesenheit des reduzierenden Agens ein positiver Einfluss auf die Replikationstätigkeit bewirkt werden. Jedoch tritt dieser nur bei sehr geringen Konzentrationen zu Tage. Zu hohe Konzentrationen führen wieder zu vermindertem Einbau.

3.2.2.4.2. Einfluss von Glutathion

Da GSH das in vivo vorkommende Redox-System ist, sollte auch der Einfluss hiervon überprüft werden. Auch hier wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufgenommen (vgl. Abb. 32).

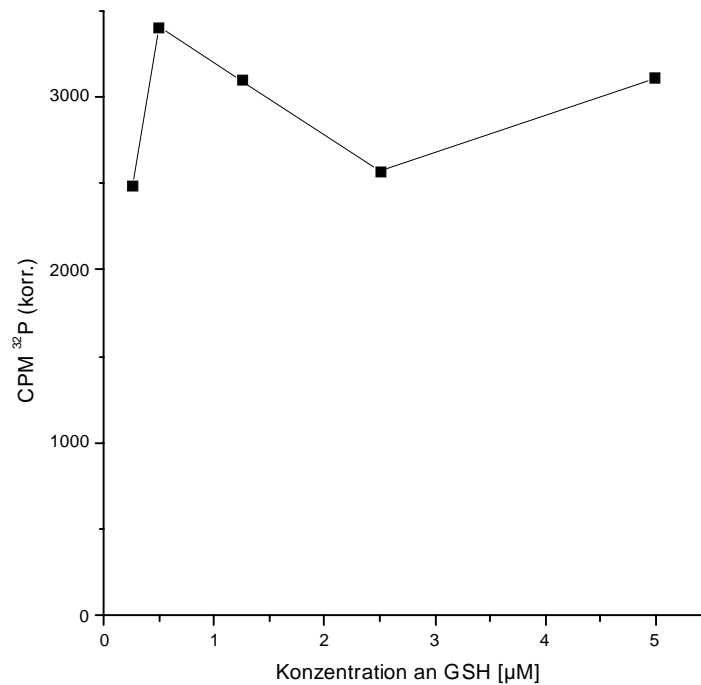


Abbildung 32: Dosis-Wirkungs-Kurve für Glutathion bei permeabilisierten HeLa-Zellen.

Hierbei ergab sich kein ausgesprochenes Maximum bei einer bestimmten Konzentration. Der Einbau ist vielmehr über den gesamten getesteten Bereich weitgehend konstant. Ein Einfluss von Glutathion auf den α -[³²P]-dATP Einbau konnte hier nicht festgestellt werden.

3.2.2.4.3. Einfluss von H₂O₂

Auch für H₂O₂ wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufgenommen. (Abb. 33)

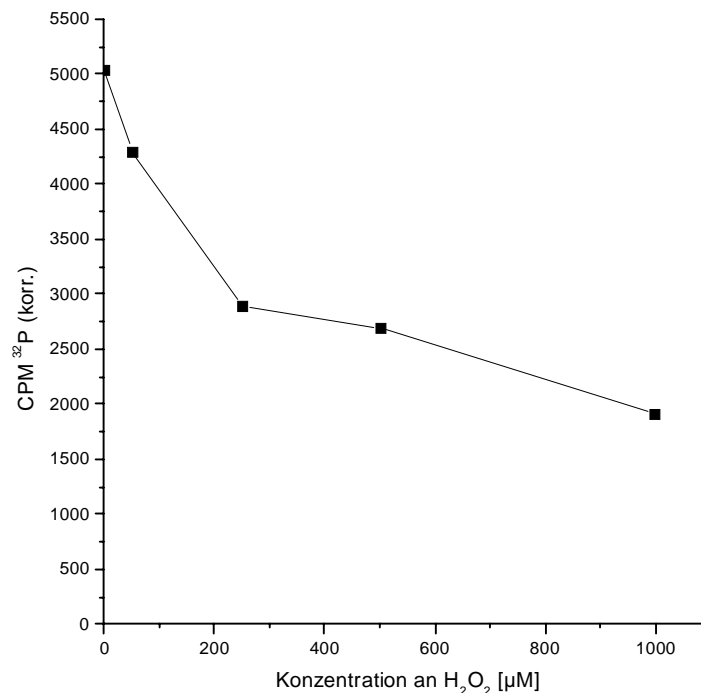


Abb. 33: Dosis-Wirkungs-Kurve für Wasserstoffperoxid bei permeabilisierten HeLa-Zellen: Aufgetragen ist der Einbau von α -[³²P]-dATP in Abhängigkeit von der Konzentration von H₂O₂.

Es zeigt sich, dass mit steigender Konzentration des Oxidationsmittels der Einbau stark zurückgeht. Dies könnte durch den schädigenden Effekt der starken Oxidation bewirkt werden.

Insgesamt kann die Vermutung, dass die fehlende Hemmbarkeit auf Veränderung im Redoxzustand von Proteinen nach Permeabilisierung zurückzuführen ist, nicht bestätigt werden. Zwar wird die Einbaurrate generell durch die Anwesenheit von DTT beeinflusst. Jedoch ist DTT im Standardansatz in der gefundenen Konzentration vorhanden. Die gesuchte Hemmbarkeit ist jedoch sowohl im Standardmedium als auch in solchem ohne DTT nicht vorhanden. Ein Hinweis auf einen Einfluss auf die schnelle Replikationsregulation kann den vorliegenden Ergebnissen also nicht entnommen werden.

3.2.3. Einfluss der Variation der Konzentration von Nukleotiden

In vivo konnte gezeigt werden, dass der Effekt von hypoxischer Begasung durch Zugabe von Desoxycytidin zum Kulturmedium aufgehoben werden kann. Dies legt die Vermutung nahe,

dass die Konzentration von Desoxyribonucleosidphosphaten einen Einfluss auf die Hemmung der Replikation haben könnte. Das permeabilisierte System erscheint zur Erforschung solcher Zusammenhänge besonders geeignet, da sich hier die Zusammensetzung des Nucleotidpools willkürlich wählen lässt. Hier wurden die Konzentrationen aller dNTP und dNDP variiert und bei einzelnen ausgesuchten Nucleotiden, für die eine effektorische Wirkung besonders nahe liegend erschien, wurden darüberhinausgehende Studien durchgeführt. Zusätzlich wurde auch der Effekt der Konzentrationsänderung von Ribonucleotiden und Variationen im Verhältnis von Ribo- und Desoxyribonucleotiden untersucht.

3.2.3.1. Einfluss der Konzentration einzelner Desoxynucleosidtriphosphate

Zur Untersuchung des Einflusses der Desoxynucleosidtriphosphate wurde jeweils eines variiert und die anderen konstant gehalten. Bei dCTP, dGTP und dTTP wurde mit α -[32 P]-dATP markiert. Bei dATP wurde mit 32 P-dCTP markiert. (vgl. Abb. 34)

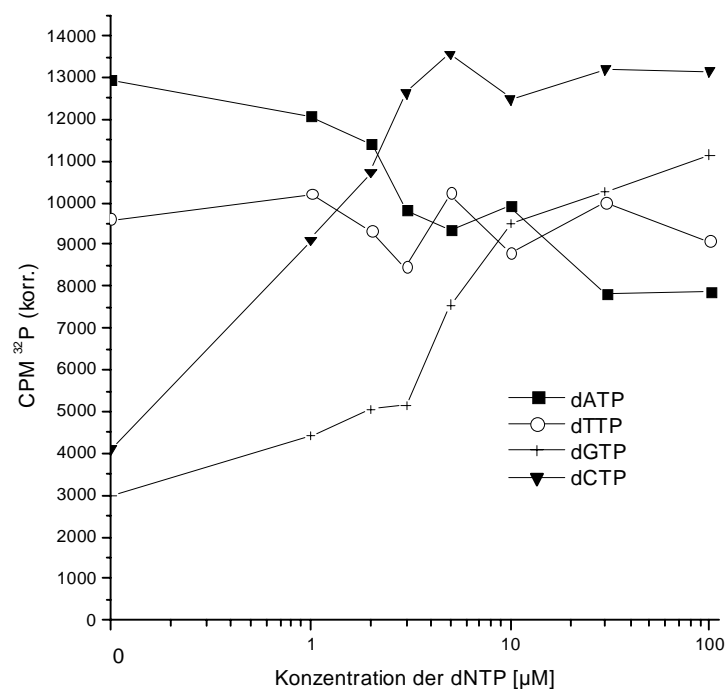


Abb. 34: Einbau unter verschiedenen Konzentrationen an dNTP: HeLa-Zellen wurden für 30 Minuten in einem Permeabilisierungsmedium inkubiert, in welchem jeweils die Konzentration eines dNTP variiert wurde. Aufgetragen sind die erhaltenen Einbauwerte in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an dNTP.

Abbildung 34 zeigt die Einbauwerte für die einzelnen Konzentrationen an Desoxynucleosidtriphosphaten. Für den Einbau bei Variation von dATP und dTTP zeigt sich kein signifi-

kanter Unterschied. Bei Variation von dGTP und dCTP dagegen kann ein deutlicher Anstieg des Einbaus in Abhängigkeit von der Konzentration der Desoxynukleotidtriphosphate verzeichnet werden. Dieser Anstieg kann auch bei Dauereinbaukurven mit unterschiedlichen Konzentrationen dieser dNTP reproduziert werden.

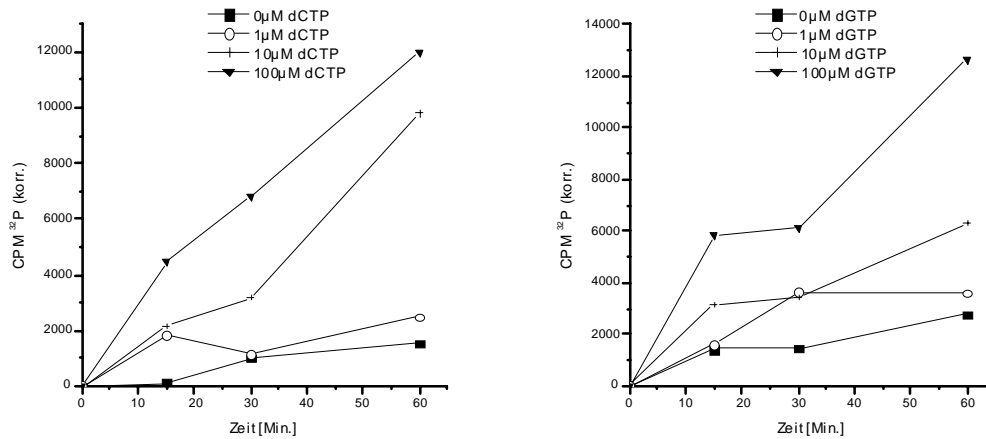


Abb. 35: Einbaukurven mit unterschiedlichen Konzentrationen für dCTP und dGTP: Mit permeabilisierten HeLa-Zellen wurden Einbaukurven in Permeabilisierungsmedien mit variierten Konzentrationen an dCTP und dGTP aufgenommen. Als Marker wurde α -[³²P]-dATP eingesetzt.

Durch die Variation von dGTP und dCTP kann die Einbaurrate von permeabilisierten HeLa-Zellen beeinflusst werden. Für dCTP wird bei 100 μ M im Vergleich zur Probe ohne dCTP der zehnfache Einbauwert erreicht. Bei dGTP tritt eine Steigerung um den Faktor vier auf. Fraglich ist jedoch, ob diese Steigerung auf eine regulatorische Wirkung der Substanzen zurückzuführen ist. Auch durch enzymkinetische Effekte infolge der Verarmung an einem Substrat kann ein solcher Unterschied in der Enzymaktivität hervorgerufen werden.

3.2.3.2. Einfluss der Konzentration der Desoxynukleosiddiphosphate

Der Einfluss der Desoxynukleosiddiphosphate auf die Replikationsaktivität wurde durch Dosis-Wirkungs-Kurven für je ein Nukleotid bei ungehemmten HeLa-Zellen getestet.

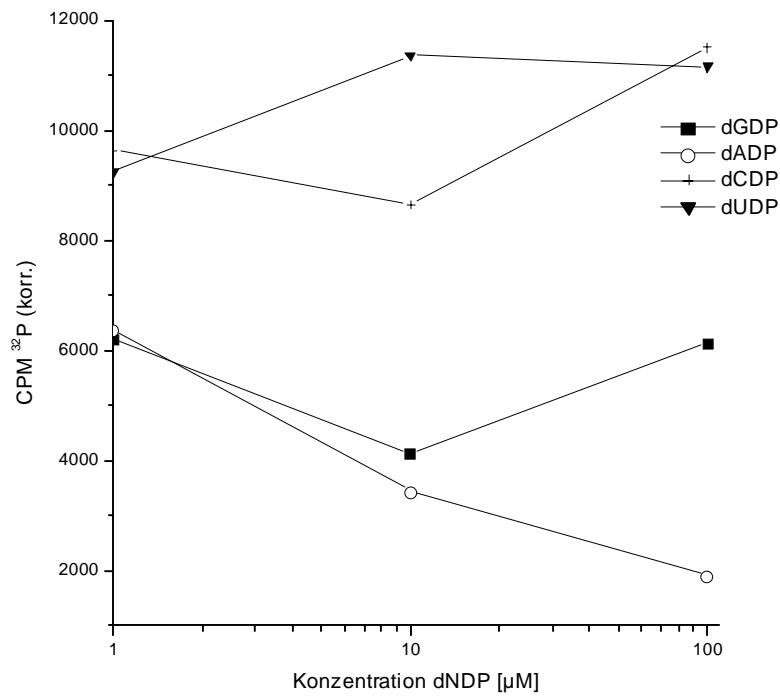


Abb. 36: Einbau unter Variation der Konzentration an dNDP bei permeabilisierten HeLa-Zellen: HeLa Zellen wurden in Permeabilisierungsmedium mit variiert Konzentration an dNDP für 30 Minuten inkubiert.

Abbildung 36 zeigt die Auftragung des erhaltenen Einbauwertes bei 30 Minuten Inkubation gegen die eingesetzte Konzentration an dNDP. Dabei kann keine starke Veränderung der Einbaurates in Abhängigkeit von der Konzentration der zugesetzten Substanzen festgestellt werden. Ein Einfluss der Desoxynukleosiddiphosphatkonzentration scheint nicht vorzuliegen.

3.2.4. Einfluss zellulärer Extrakte

Bei der Untersuchung des replikativen Verhaltens der permeabilisierten HeLa Zellen war festgestellt worden, dass diese nicht auf Hemmsituationen reagieren. Als mögliche Ursache hierfür kommt die Verdünnung eines cytosolischen Stoffes durch das Permeabilisierungsmedium infolge der Permeabilisierung in Betracht. Dieser Effekt müsste sich dann durch die Aufkonzentrierung dieser Substanz im Aussenmedium oder durch Extraktion derselben aus dem Cytosol umkehren lassen.

3.2.4.1. Versuch der Vorkonditionierung von Permeabilisierungsmedium

Es wurde getestet, ob das Replikationsverhalten der HeLa-Zellen durch Vorkonditionierung des Mediums verändert werden kann. Dafür wurde Permeabilisierungsmedium unterschiedlich lange auf HeLa-Zellen belassen und anschließend zur Permeabilisierung neuer Zellen verwendet. Bei diesen wurde dann der Einbau getestet. (Abb. 37)

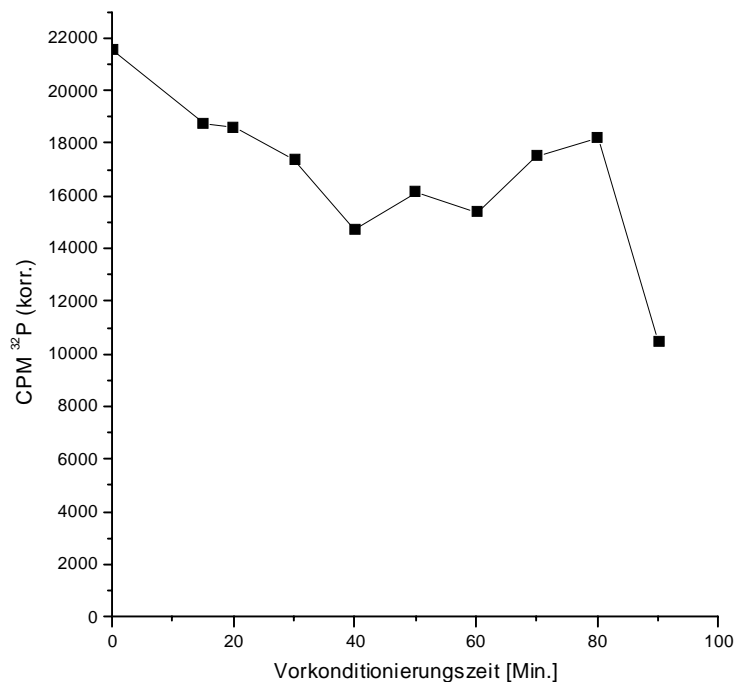


Abbildung 37: Einbau bei permeabilisierten HeLa-Zellen in ‚vorkonditioniertem‘ Medium: Das für die Markierung der Zellen eingesetzte Medium wurde zuvor zur Permeabilisierung von Zellen eingesetzt und für die angegebene Zeit auf diesen Zellen belassen. Danach wurden die zur Markierung vorgesehenen Zellen in diesem Medium 30 Minuten inkubiert und radioaktiv markiert.

Abbildung 37 zeigt die Einbauwerte, die in vorkonditioniertem Medium erhalten wurden. Es zeigt sich eine Abhängigkeit der Einbaurates von der Dauer der Vorkonditionierung. Mit steigender Dauer der Vorkonditionierung wird der Einbau geringer. Offenbar wird durch dieses Verfahren keine Anreicherung von effektorischen Substanzen im Permeabilisierungsmedium erreicht. Vielmehr wird das Medium an den für die Replikation notwendigen Substanzen depletiert.

3.2.4.2. Versuch mit rohem Zellextrakt aus HeLa-Zellen

Die Anreicherung von cytosolischen Substanzen kann auf dem Weg des methanolischen Extraktion aus Zellen erreicht werden. Dabei kann ein roher Zellextrakt erhalten werden, der alle niedermolekularen Substanzen aus dem Cytosol enthält. Vorliegend wurde ein Methanolextrakt aus HeLa-Zellen eingesetzt, um damit das Permeabilisierungsmedium an cytosolischen Substanzen anzureichern. Mit dem so veränderten Permeabilisierungsmedium wurden Einbautests durchgeführt. (Herstellung des Methanolextraktes vgl. 2.5.13.2) Der erhaltenen rohe Zellextrakt wurde zu 50 % (v/v) der Permeabilisierungslösung eingesetzt.

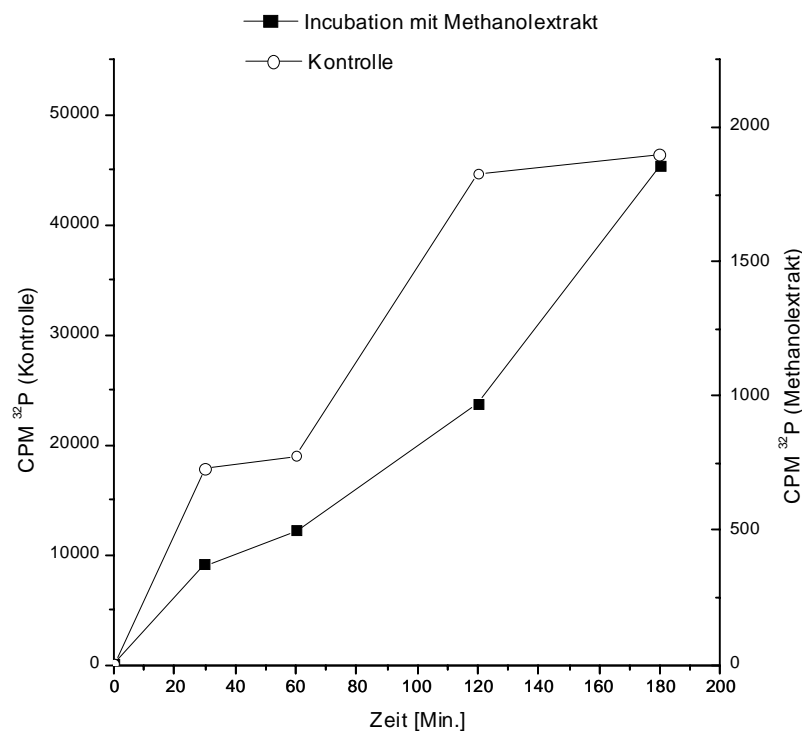


Abb. 38: Einbaukurve mit rohem Zellextrakt im Permeabilisierungsmedium: Gezeigt ist der Einbau von permeabilisierten HeLa-Zellen in Permeabilisierungsmedium, das mit 50 % (v/v) Methanolextrakt versetzt war. Daneben ist der Einbau von HeLa-Zellen, die unter Kontrollbedingungen inkubiert wurden, zu sehen.

Abbildung 38 zeigt die Einbaukurve von HeLa-Zellen, die in Permeabilisierungsmedium mit Methanolextrakt inkubiert wurden. Es ist ein konstanter Anstieg der säurefällbaren Radioaktivität zu beobachten. Allerdings ist der Einbau um den Faktor zwanzig niedriger als bei der Kontrolle in gewöhnlichem Permeabilisierungsmedium. Der Zusatz von Methanolextrakt wirkt sich negativ auf die Replikationsaktivität aus. Im Vergleich zur Kontrolle bauen die Zellen mit Methanolextrakt nur einen Bruchteil ein. Dies könnte Folge eines hemmenden cytosolischen Faktors im Methanolextrakt sein. Da der Methanolextrakt jedoch aus ungehemmten aktiv replizierenden Zellen stammt, erscheint dies

unwahrscheinlich. Eine Erklärung für den gestörten Einbau könnte die Anwesenheit von Zellwandbestandteilen im Extrakt sein, die zusätzlich als Detergenzien wirken, und so die Zellen schädigen. Die Methanolextraktion wäre dann für den vorliegenden Zweck nicht geeignet. In jedem Fall sind die erzielten Einbauwerte für Untersuchungen über die Hemmbarkeit nicht ausreichend.

3.2.4.3. Versuch mit Cytosol

Durch Ultrazentrifugation lässt sich ein Extrakt aus Zellen gewinnen, der alle cytosolischen Bestandteile enthält.²² Ein solcher Extrakt wurde für Einbauversuche unter verschiedenen Bedingungen mit α -Toxin versetzt, mit dem energieregenerierenden System ausgestattet und zusätzlich an Nukleotidbausteinen angereichert. Um zu zeigen, ob im cytosolischen Permeabilisierungsmedium mit cytosolischem Extrakt eine Hemmbarkeit der Replikation gegeben ist, sollten Cycloheximid gehemmte Zellen eingesetzt werden. Diese sollten in Permeabilisierungsmedium inkubiert werden, das einen cytosolischen Extrakt aus Cycloheximid gehemmten Zellen und zusätzlich noch Cycloheximid enthielt.

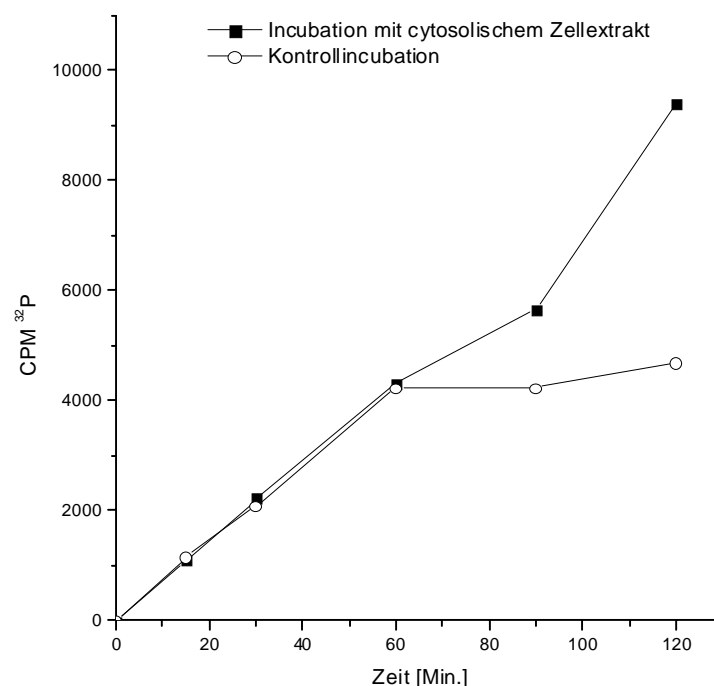


Abb. 39: Einbaukurve mit permeabilisierten HeLa-Zellen in Medium mit cytosolischem Extrakt: CHX vorgehemmte Zellen wurden in Permeabilisierungsmedium mit cytosolischem Extrakt, der aus CHX gehemmten Zellen stammt, unter Zusatz von CHX inkubiert. Daneben wurden vorgehemmte Zellen unter CHX in Permeabilisierungsmedium ohne Zusatz von Zellextrakten inkubiert.

²² Beschreibung der methode bei Dreier, T., 1995

Abbildung 39 zeigt eine Einbaukurve in CHX-haltigem Permeabilisierungsmedium mit Cytosol aus CHX gehemmten Zellen. Es ist zu erkennen, dass in den Zellen Einbau von α -[32 P]-dATP stattfindet. Der Einbau ist mit dem von Zellen in Permeabilisierungsmedium vergleichbar. Als Kontrolle wurden hier ebenfalls vorgehemmte Zellen eingesetzt. Deren Einbauverhalten kann mit demjenigen der untersuchten Situation besser verglichen werden. Bei permeabilisierten Zellen findet nach Hemmung in Gegenwart von CHX – wie oben gezeigt – Replikation statt.

Im Medium mit Cytosol zeigt sich ebenfalls kein Einfluss von CHX auf die Replikationsaktivität der permeabilisierten Zellen. Auch wenn das Medium aus gehemmten Zellen gewonnen wurde, konnte hierdurch keine Hemmung bei den permeabilisierten Zellen erzeugt werden.

3.2.5. Einfluss einer Auswahl niedermolekularer Substanzen

Neben den bisher getesteten Parametern kommen eine Reihe niedermolekularer Substanzen als Effektoren in Frage. Im folgenden sollen solche niedermolekularen Substanzen auf ihre Wirksamkeit bezüglich der Einbauaktivität bei permeabilisierten HeLa-Zellen getestet werden.

3.2.5.1. Einfluss des NAD/NADH Verhältnisses

Da durch die hemmenden Situationen, durch welche die Replikationsaktivität der Zelle in vivo gehemmt wird, stets ein zentraler Stoffwechselweg betroffen ist, wirken sich die Hemmsituationen auch auf das NAD/NADH Verhältnis der Zelle aus. Es ist davon auszugehen, dass dieses unter Hemmsituation nicht demjenigen unter Kontrollbedingungen entspricht. Es wäre demnach möglich, dass die Hemmung der Replikation direkt durch dieses Verhältnis vermittelt wird. Um den Einfluss des NAD/NADH Verhältnisses auf die Replikationsaktivität zu testen, wurden beide Substanzen in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und dann Einbauversuche durchgeführt. (vgl. Abb. 40)

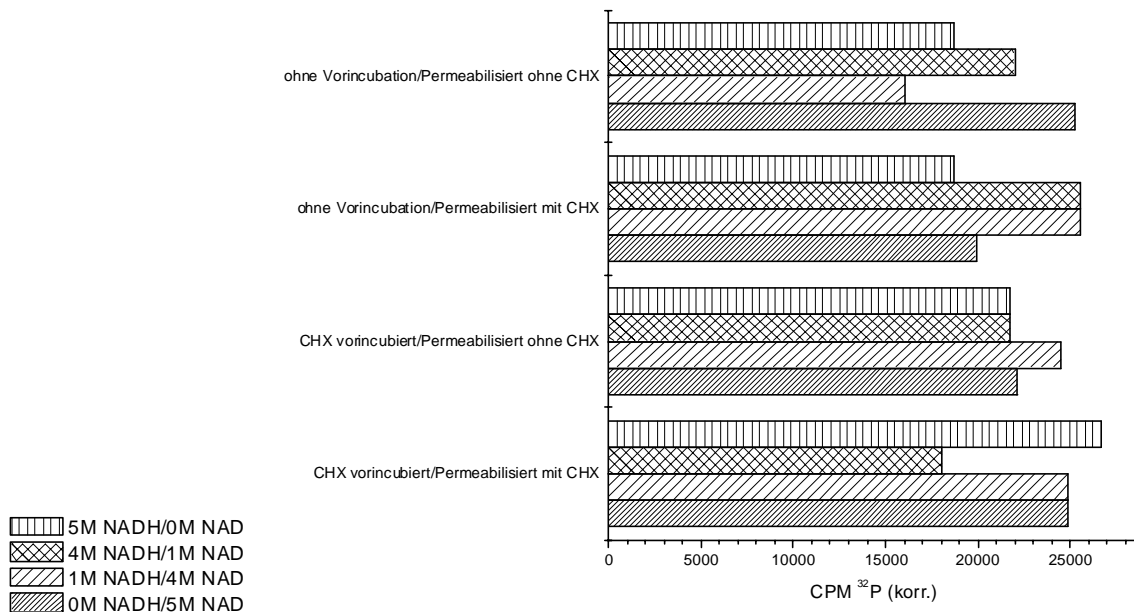


Abb. 40: Einbau mit permeabilisierten HeLa-Zellen unter verschiedenen Konzentrationen von NAD/NADH: HeLa-Zellen wurden in Permeabilisierungsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an NADH und NAD inkubiert. Inkubationsdauer betrug 30 Minuten. Markiert wurde mit α -[³²P]-dATP.

Abbildung 40 zeigt die Einbauwerte, die erhalten werden, wenn HeLa-Zellen in Permeabilisierungsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an NAD und NADH inkubiert werden. Bei den erhaltenen Ergebnissen treten grössere Schwankungen der Einbauwerte auf. Eine signifikante Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der getesteten Substanzen ergibt sich jedoch nicht. Ein Hinweis auf eine Abhängigkeit der DNA-Replikationsaktivität vom NAD/NADH-Verhältnis in der Zelle konnte hier nicht beobachtet werden.

3.2.5.2. Einfluss der Konzentration von Adenosintriphosphat

Auch das ATP/ADP Verhältnis wird durch den veränderten Stoffwechsel der Zelle unter hemmenden Bedingungen verändert. Es ist deshalb auch denkbar, dass dieser Quotient als effektorisches Element die Replikationsaktivität der Zelle steuert. Im folgenden soll deshalb die Erhöhung von ATP getestet werden. Eine Verminderung des ATP-Gehaltes erscheint nicht praktikabel, weil dadurch alleine die Reaktionsgeschwindigkeit der für die Replikation notwendigen Reaktionen herabgesetzt würde, und so auch der Einbau vermindert würde. Der eingesetzte ATP-Gehalt des Permeabilisierungsmediums wurde bei der Etablierung des Systems durch Eger als derjenige gefunden, bei dem die Reaktionen optimal unterstützt werden. Es soll hier untersucht werden, ob sich durch starke Erhöhung des ATP-Gehaltes eine auffäl-

lige Veränderung des replikativen Verhaltens ergibt. In jedem Fall erscheint es nicht sinnvoll, in diesem Fall reine Einbauwerte heranzuziehen, um Information über das replikative Verhalten zu bekommen. Deshalb wurden hier Sedimentationsanalysen von markiertem Material durchgeführt.

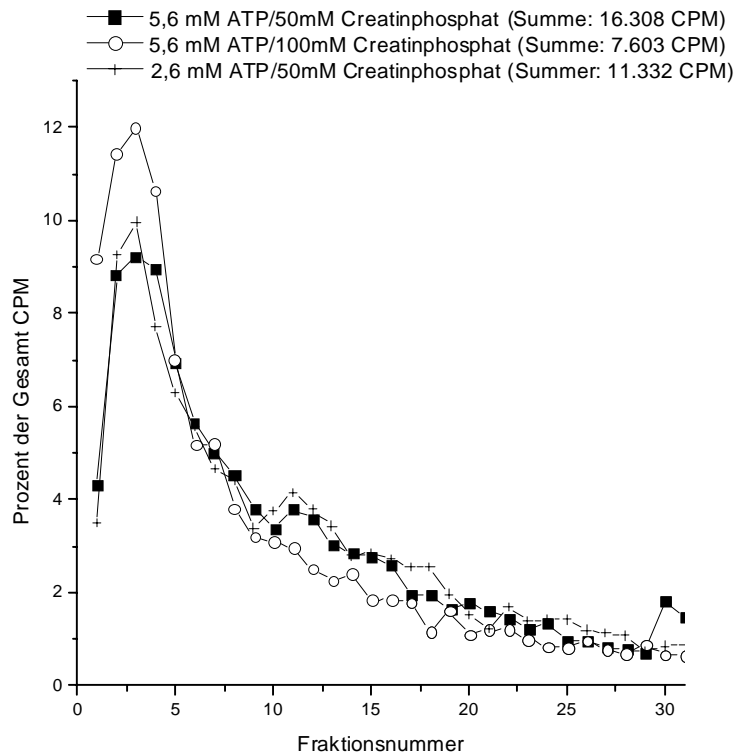


Abb. 41 : Sedimentationsprofil von markiertem Material aus permeabilisierten HeLa-Zellen: HeLa Zellen wurden mit verschiedenen ATP Konzentrationen und unterschiedlicher Konzentration an Creatinphosphat inkubiert. Markierung erfolgte mit ^{32}P -dATP. Das markierte Material wurde auf alkalischen Rohrzuckergradienten analysiert.

Abbildung 41 zeigt die Sedimentationsprofile von markierten Produkten aus permeabilisierten Zellen, die mit erhöhtem ATP-Gehalt permeabilisiert wurden. Durch Erhöhung des ATP-Gehaltes des Permeabilisierungsmedium kann jedoch auch kein signifikanter Einfluss auf die Replikationsaktivität erzielt werden. Es zeigt sich im Sedimentationsprofil kein Unterschied zur Kontrollsituation. Das Ausbleiben signifikanter Veränderungen infolge der Modifikation des ATP-Gehaltes lässt den ATP-Spiegel als regulatorischen Parameter für die Replikationsregulation unwahrscheinlich erscheinen.

3.2.5.3. Einfluss von zyklischem Guanosinmonophosphat

Zyklisches Guanosinmonophosphat ist eine Substanz, die auf eine Reihe von Signalübertragungswegen, die Proteinkinasen involvieren, Einfluss hat. Ein potentieller Einfluss von cGMP auf die DNA-Replikation sollte vorliegend durch Dosis-Wirkungskurven zu verschiedenen Zeiten nach Permeabilisierung abgeklärt werden.

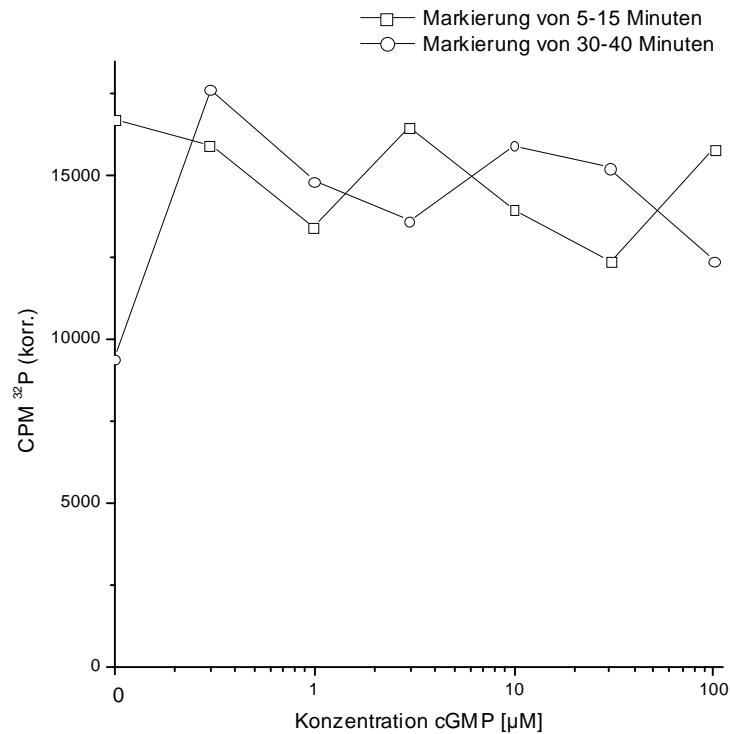


Abb. 42: Dosis Wirkungs-Kurve für cGMP bei permeabilisierten Zellen; HeLa-Zellen wurden in Permeabilisierungsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an cGMP inkubiert. Dabei wurde zu den angegebenen Zeiten nach Beginn der Permeabilisierung markiert und danach sofort abgestoppt.

Abbildung 42 zeigt den Einbau von α - ^{32}P -dATP unter Einwirkung von cGMP. Es zeigt sich kein Effekt von cGMP auf die Einbauaktivität der permeabilisierten HeLa-Zellen.

3.2.5.4. Einfluss von Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin

Als eine reziproke Möglichkeit zur Regulation der biochemischen Aktivität von Proteinen wird die N-Acetylglucosaminylierung berichtet.²³ Es erscheint daher möglich, dass eine Hemmung der Initiation durch die N-Acetylglucosaminylierung von Aminosäureresten von Proteinen bewirkt wird. Diese Modifikation wird durch UDPAG bewirkt.

²³ Schmitz, B., Griffith, L., 1998

Für UDPAG wurden deshalb Dosis-Wirkungs-Kurven unter verschiedenen Bedingungen aufgenommen. Es sollte überprüft werden, ob die Hemmung von CHX durch UDPAG aufrechterhalten werden kann. Deshalb wurden Zellen, die CHX vorgehemmt waren unter CHX permeabilisiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen ohne CHX.

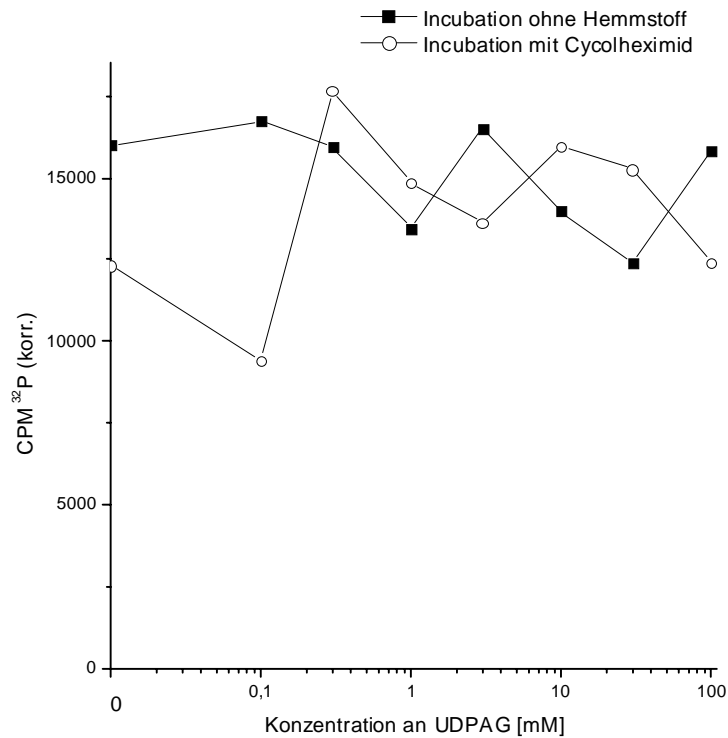


Abb. 43: Einbau bei permeabilisierten HeLa-Zellen unter dem Einfluss von CHX und UDPAG: HeLa-Zellen wurden für 30 Minuten in Gegenwart von verschiedenen Konzentration an UDPAG inkubiert und radioaktiv markiert. Dabei wurde dem Inkubationsmedium einerseits der Hemmstoff Cycloheximid zugesetzt, und andererseits ungehemmt inkubiert.

Bei den vorgehemmten Zellen, die unter CHX permeabilisiert wurden zeigt sich ein beträchtliches Ausmass an Einbau. Dies ist zwar niedriger als bei den ungehemmten Inkubationen, jedoch zeigt sich deutlich, dass die Zellen durch CHX in der Replikationstätigkeit nicht vollständig gehemmt sind. Vor allem zeigt sich kein Effekt von UDPAG auf die Hemmbarkeit der Replikation.

3.2.5.5. Einfluss von Diadenosinoligophosphaten

Um den Einfluss von Diadenosinoligophosphaten zu überprüfen, wurden die Stoffe Ap₃A und Ap₄A unter gehemmten und unter ungehemmten Bedingungen für Einbaukurven eingesetzt. Beide Substanzen wurden in Gegenwart von NAD und NADH getestet.

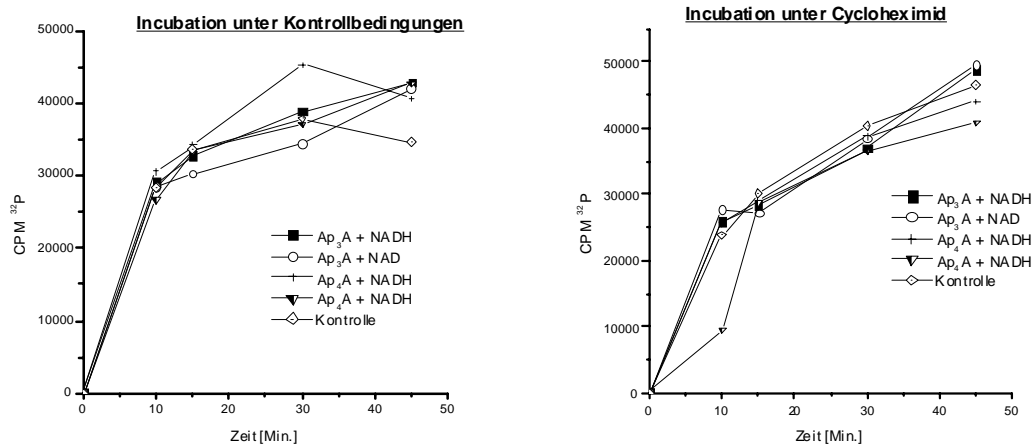


Abb. 44: Einbaukurven in Permeabilisierten HeLa-Zellen mit Ap₃A bzw. Ap₄A: Gezeigt sind Einbaukurven mit permeabilisierten HeLa-Zellen. Im Permeabilisierungsmedium befanden sich die Ap_nA (je 200µM) und gegebenenfalls NAD oder NADH (je 2mM). Die Markierung erfolgte von Beginn der Permeabilisierung an.

Die Einbaukurven in Abbildung 44 fallen in allen Fällen mit der Kontrollkurve zusammen. Es zeigt sich hierbei kein Einfluss der getesteten Stoffe bei permeabilisierten HeLa-Zellen in bezug auf den Einbau von α -[³²P]-dATP.

3.2.5.6. Einfluss von Polyaminen

Auch für die Polyamine Spermin und Spermidin konnten wachstumshemmende Eigenschaften bei Tumorzellen festgestellt werden. Daneben wird ein förderlicher Einfluss der Polyamine auf die Apoptose von Zellen berichtet. Es erscheint möglich, dass auch die Replikationsregulation in eukaryontischen Zellen in Zusammenhang mit den Polyaminen steht. Deshalb soll hier der Einfluss von Spermin und von Spermidin auf die Replikation in permeabilisierten HeLa-Zellen untersucht werden. Zur Überprüfung des Einflusses der biologischen Polyamine wurden Dosis-Wirkungs-Kurven von Spermin und Spermidin bei permeabilisierten Zellen aufgenommen.

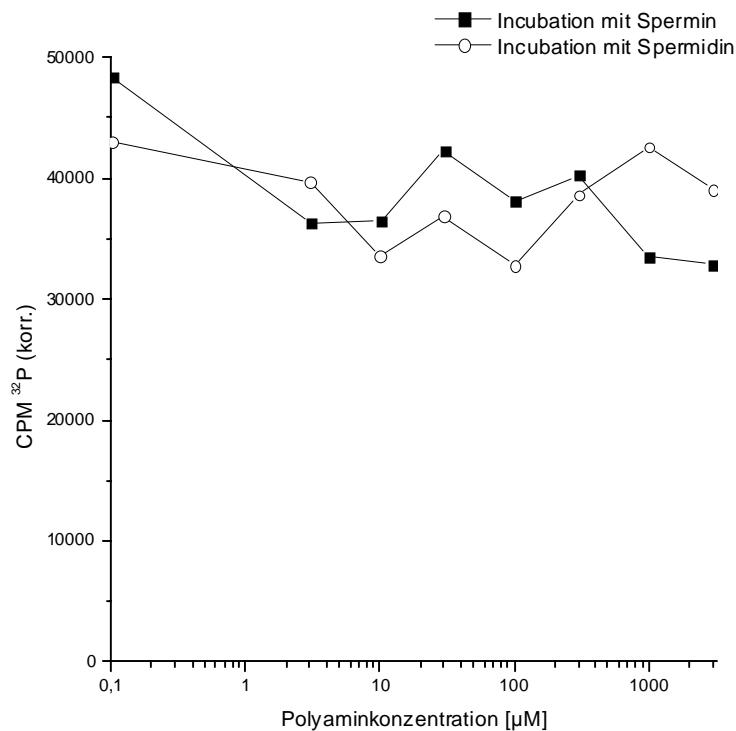


Abb. 45: Einbau bei permeabilisierten HeLa-Zellen unter verschiedenen Konzentrationen von Polyaminen: Gezeigt ist der Einbau unter dem Einfluss von Spermin und unter dem Einfluss von Spermidin. Die markierung erfolgte für 30 Minuten. Die Polyamine befanden sich von Anfang an im Permeabilisierungsmedium.

Abbildung 45 zeigt den Einbau an α -[³²P]-dATP bei permeabilisierten HeLa-Zellen unter verschiedenen Konzentrationen von Spermin und Spermidin. Die Einbauwerte differieren dabei nur gering. Die Konzentration der Polyamine zeigt keinen Einfluss auf den Einbau an α -[³²P]-dATP bei permeabilisierten HeLa-Zellen. Allein durch die Variation dieser Substanzen kann kein regulatorischer Effekt auf die Replikation bei permeabilisierten HeLa-Zellen beobachtet werden.

3.2.6. Zusammenfassung der Ergebnisse zur Replikationsregulation

Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust der Replikationsregulation in permeabilisierten HeLa-Zellen nicht eine direkte Folge der Permeabilisierung der Plasmamembran an sich ist.

Auch konnte in bezug auf die Nukleotide durch die durchgeführten Versuche kein Einfluss auf die Replikationsregulation festgestellt werden.

Hierauf wurde versucht, das Permeabilisierungsmedium durch zelluläre Extrakte zu kompletieren. Jedoch konnte auch durch diesen Versuch keine Regulierbarkeit der DNA-Synthese

infolge Hemmsituationen erzeugt werden. Schließlich wurden verschiedene niedermolekulare Substanzen, welche als regulatorische Effektoren in Frage kommen, in unterschiedlichen Konzentrationen dem Medium zugesetzt und deren Effekt beobachtet. Durch keine der getesteten Substanzen wurde die Hemmbarkeit der Replikation, wie sie in vivo besteht, hergestellt. Vorliegend ist es nicht gelungen, in permeabilisierten HeLa-Zellen eine Hemmung der DNA-Replikation anders als durch Inhibition der prozessiven DNA-Polymerisation zu erreichen. Die Regulierbarkeit der Replikation, wie sie in vivo beobachtet wird, geht durch die Permeabilisierung verloren. Da es nicht gelungen ist, die Verhältnisse wie in vivo herzustellen, kann der Signalübertragungsweg für die Hemmung im vorliegenden System nicht untersucht werden.

4. Diskussion

4.1. Ungehemmte Replikation in permeabilisierten HeLa-Zellen

Die Replikation der permeabilisierten HeLa-Zellen wurde hier anhand des Einbaus von α -[^{32}P]-dATP verfolgt. Das angebotene radioaktive Nukleotid wurde von den permeabilisierten HeLa-Zellen in säurefällbarer Form fixiert. Dies gilt sowohl bei Einbaukurven über einen längeren Zeitraum als auch bei kurzzeitigen Pulsen. Diese nur quantitative Auswertung des markierten Materials durch Lyse der Zellen und anschließende Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität gibt jedoch keinen Aufschluss über die biochemische Form, in der die fixierte Radioaktivität vorliegt. Aufgrund der Natur des Markers als Baustein für die DNA-Synthese liegt der Verdacht nahe, dass die fixierte Radioaktivität in Form von DNA vorliegt. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die erhaltenen Produkte durch alkalische Sedimentationsanalyse analysiert. Diese Methode ist in der Lage, die Grössenverteilung der markierten DNA in Form eines Sedimentationsprofils aufzuzeigen.

Durch die Markierung mit α -[^{32}P]-dATP wird bei den permeabilisierten Zellen eine biochemische Molekülklasse erfasst, die das gleiche Sedimentationsverhalten zeigt, wie in vivo durch Methyl-[^3H]-Thymidin markierte DNA. Das markierte Material ist also frisch replizierte zelluläre DNA der untersuchten HeLa-Zellen. Anhand der Sedimentationsprofile lassen sich darüber hinaus auch einige Aussagen über das Replikationsverhalten der HeLa-Zellen nach der Permeabilisierung machen.

Der Peak im Sedimentationsprofil der pulsmarkierten DNA befindet sich bei einem Sedimentationskoeffizienten von ungefähr 50 S. Diese Position ist bei einer Pulsdauer von acht Minuten nur dann möglich, wenn neben der Elongation von bereits replizierender DNA auch Neuintiationen stattfinden. Sofern die Initiation durch Hemmstoffe unterbunden wird, ergibt sich bei der gegebenen Pulsdauer ein Sedimentationsprofil, das zu höheren Sedimentationskoeffizienten verschoben ist. Demnach sind die unter den hiesigen Bedingungen permeabilisierten HeLa-Zellen sowohl zur Elongation wie auch zur Initiation der DNA-Polymerisation in der Lage. Die Position des Peaks nach 120 Min. Chasedauer befindet sich in einem Bereich von mehr als 100 S. Dem entspricht eine Kettenlänge der DNA von über 400 kB. Solche Kettenlängen werden nur von gereifter genomischer DNA erreicht. Das ex vivo System ist vorliegend auch zur Reifung und damit zur Integration der elongierten DNA ins replizierte Genom befähigt. Dieses Ergebnis wird auch durch das Bild der Faserautoradiographie bestätigt, das alle replikativen Strukturen aufweist, die auch in vivo auftreten.

Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass bei permeabilisierten HeLa-Zellen alle an der Replikation der genomischen DNA beteiligten Reaktionen unterstützt werden und auch tatsächlich stattfinden.

Weiterhin konnte anhand von Chase-Studien mit der pulsmarkierten DNA aus permeabilisierten HeLa-Zellen gezeigt werden, dass die Gabelgeschwindigkeit in permeabilisierten Zellen etwa die Hälfte des in vivo gemessenen Wertes beträgt. Auch die Reaktionsgeschwindigkeit, mit der die Replikation im untersuchten ex vivo System vonstatten geht entspricht innerhalb eines gewissen Toleranzrahmens den zellulären Bedingungen. Insgesamt wurde gezeigt, dass das Replikationsverhalten der permeabilisierten Zellen demjenigen der HeLa-Zellen in vivo sehr ähnlich ist. Die Permeabilisierung stellt also keine wesentliche Störung des untersuchten Verhaltens dar. Da die Replikation bei den permeabilisierten Zellen über einen Zeitraum von mindestens zwei Stunden linear voranschreitet, liegt offenbar kein Mangel an notwendigen Stoffen vor. Das Permeabilisierungsmedium unterstützt die zur Replikation der zellulären DNA notwendigen Reaktionen über diesen Zeitraum in ausreichender Weise und stellt Vorräte aller notwendigen Substanzen in genügendem Ausmass zur Verfügung.

Das System scheint deshalb zur Untersuchung replikativer Vorgänge geeignet zu sein.

4.2. Replikation unter hemmenden Bedingungen

In vivo ist es möglich, die Replikation in verschiedenen Zellkultur-Zelllinien mittelbar durch die Hemmung von zentralen biochemischen Stoffwechselwegen der Zelle zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Proteinbiosynthese auch zu einer Hemmung der DNA-Replikation führt. Auch hemmende Situationen, die sich auf den gesamten zellulären Stoffwechsel auswirken, wie Sauerstoffmangel, bewirken in vivo eine Hemmung der Replikation.

Da im permeabilisierten System die Replikation offenbar gut unterstützt wird und über längere Zeit ähnlich wie in vivo stattfinden kann, sollten Untersuchungen zur Hemmung möglich sein. Jedoch muss bei der Erforschung von sekundären Effekten auf die Replikation jeweils auch sichergestellt sein, dass der jeweils gehemmte Stoffwechselweg in der permeabilisierten Zelle noch stattfindet. Desweiteren muss zur Untersuchung der Replikation unter hemmenden Bedingungen der jeweilige Hemmstoff in das Untersuchungs-System eingebracht werden. Um dabei Verhältnisse, wie sie in vivo vorherrschen erzeugen zu können ist es nötig, die intrazellulären Konzentrationen der eingesetzten Hemmstoffe zu kennen. Dies ist unproblematisch,

sofern der Hemmstoff sich zwischen Aussenmedium und Cytosol ins Gleichgewicht setzt und auf beiden Seiten der Zellmembran in gleicher Konzentration vorhanden ist. Dann kann die eingesetzte Konzentration als die Wirkkonzentration angenommen werden. Anders ist die Situation, wenn Hemmstoffe durch die Zelle aufkonzentriert werden. In diesem Fall kann nur eine im Vergleich zur Aussenkonzentration erhöhte für den cytosolischen Raum angenommen werden. Genaue Konzentrationen können nur geschätzt werden. Generell gilt dies für den Fall, dass Effektoren in der Zelle lokal angereichert werden und nicht einheitlich verteilt sind. Für solche Fälle ist es immer nötig bei permeabilisierten Zellen eine Dosis-Wirkungs-Kurve der eingesetzten Substanz durchzuführen. Hierbei kann festgestellt werden, in welcher Konzentration eine maximale Wirkung erzielt wird. Vorliegend wurde für jeden eingesetzten Stoff, bei dem sich eine direkte Wirkung auf Einbauwerte der DNA-Synthese feststellen lässt eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufgenommen. Ein weiteres Problem tritt bei Hemmstoffen auf, die sehr schwer wasserlöslich sind. Die Zugabe solcher Hemmstoff kann beim permeabilisierten System unmöglich sein, da die Replikationsfähigkeit der permeabilisierten Zellen bereits durch sehr geringen Konzentrationen an DMSO oder durch mehr als 5 % Ethanol zerstört wird. Die Zugabe von Staurosporin in genügender Konzentration war aus genanntem Grund bei permeabilisierten Zellen nicht möglich.

4.2.1. Direkte Hemmung der prozessiven DNA-Polymerisation

Durch die Hemmstoffe Ara-CTP und Aphidicolin wird die DNA-Synthese direkt durch Hemmung der DNA-Polymerase unterbunden. Dies äussert sich in der Form, dass der eingesetzte radioaktive Marker in Gegenwart des Hemmstoffes nicht in DNA-Moleküle von der Grösse, wie sie in ungehemmten Zellen auftreten, eingebaut wird. Vielmehr finden sich nur sehr kurze DNA Ketten. Es findet somit keine Elongation der DNA-Stränge statt. Dies steht mit Ergebnissen zur Wirkung der verwendeten Hemmstoffe in Einklang. Es wurde gezeigt, dass durch Aphidicolin und Ara-CTP diejenigen DNA-Polymerasen gehemmt werden, die an der Elongation der DNA beteiligt sind. Die Initiation auf der Stufe der Primer-Synthese dagegen wird durch die Hemmstoffe nicht unterbunden. So bleibt die Polymerisation auf der Stufe der Initiation, genauer des Primings, stehen.

Bei permeabilisierten Zellen konnte gezeigt werden, dass unter Einfluss von Aphidicolin und Ara-CTP ebenfalls nur kurze DNA-Ketten synthetisiert werden können. Eine Hemmung der Elongation auf diesem Weg ist offensichtlich auch bei permeabilisierten Zellen möglich. Auch

hier konnte gezeigt werden, dass kein Einbau von α - ^{32}P -dATP in hochmolekulare DNA stattfindet.

Dieses Ergebnis verwirft zum einen den Verdacht, dass der beobachtete α - ^{32}P -dATP Einbau nicht auf DNA-Replikation zurückzuführen ist. Da nämlich die Hemmung durch direkte Einfluss der DNA-Polymerisation erfolgt, ist anzunehmen, dass der Einbau auch auf DNA-Polymerisation zurückzuführen ist.

Darüber hinaus konnte so gezeigt werden, dass die Replikation, wie sie nach Permeabilisierung gefunden wurde, durch Hemmstoffe, die auch *in vivo* wirksam sind, gehemmt werden kann. Offenbar wird die Replikation auch nach Permeabilisierung noch durch die *in vivo* aktiven Polymerasen ausgeführt. Die in permeabilisierten Zellen beobachtete Replikationsreaktion ist demnach weitgehend identisch mit der *in vivo* beobachteten.

4.2.2. Hemmung der Proteinbiosynthese

Durch Einbaukurven mit ^{35}S -Methionin mit permeabilisierten Zellen wurde gezeigt, dass die Proteinbiosynthese, sofern diese durch Anwesenheit von Aminosäuren im Medium unterstützt wird, ablaufen kann. Wenn die markierten Proteine aus permeabilisierten Zellen neben einer Markierung aus *in vivo* Zellen elektrophoretisch analysiert werden, so zeigt sich hier kein Unterschied im Bandenmuster. Offenbar findet die Proteinbiosynthese auch nach Permeabilisierung in vergleichbarer Form statt wie *in vivo*. Ebenso wie *in vivo* ist diese auch nach Permeabilisierung hemmbar. Durch Gabe von den einzelnen getesteten Hemmstoffen konnte der Einbau von ^{35}S -Methionin praktisch vollständig gehemmt werden. Diese verbleibende Einbaurate an ^{35}S -Methionin in säurefällbares Material ist hier eventuell auf die hohe spezifische Aktivität, mit der der radioaktive Marker eingesetzt ist, zurückzuführen. Ähnliche Einbauraten, wie sie hier bei permeabilisierten Zellen beobachtet wurden, finden sich auch bei *in vivo* Einbauversuchen unter Hemmstoffen, wenn die spezifische Aktivität des radioaktiven Markers entsprechend hoch angesetzt wird. Da dieses Ansteigen der säurefällbaren ^{35}S -Radioaktivität bei längeren Inkubationen auftritt ist es möglich, dass es nicht auf spezifische Reaktionen der Proteinbiosynthese zurückzuführen ist, sondern auf Verbindung der angebotenen Aminosäure mit t-RNA oder auch auf kovalente Verknüpfung der Aminosäure mit Thiol-Gruppen von zellulären Proteinen. Ausserdem kommt Methionin auch in anderen Stoffwechselwegen als der Proteinbiosynthese zum Einsatz, so dass der geringe Einbau, der unter starker Hemmung der Ribosomen beobachtet wurde auch auf andere Stoffwechselwege

zurückgeführt werden kann. Die Hemmung mit Cycloheximid und Puromycin ist unter diesem Gesichtspunkt als ebenso erfolgreich anzusehen wie mit Diphtherie-Toxin. Insgesamt ist die Hemmung der Proteinbiosynthese in permeabilisierten Zellen mit den gleichen Substanzen möglich wie *in vivo*. Jedoch sind erhöhte Konzentrationen der Hemmstoffe nötig, um eine vollständige Hemmung zu erzielen. Dies könnte Folge der Anreicherung des Hemmstoffes bei intakten Zellen im Cytosol sein.

Cycloheximid hemmt die Proteinbiosynthese durch Wechselwirkung mit der 60 S Untereinheit des Ribosoms. Es bewirkt dabei eine Hemmung der Translokation der Peptidyl-tRNA und auch eine Hemmung der Termination des Peptidsynthese. Diese Befunde wurden mit *in vitro* Translationssystemen erarbeitet. Auch mit dem vorliegenden *ex vivo* System der permeabilisierten Zellen konnte eine Hemmung des [³⁵S]-Methionin Einbaus registriert werden. Ein völliges Ausbleiben des Einbaus scheint nicht erreicht zu werden. Dies ist eventuell auf die oben genannten Gründe zurückzuführen. Dennoch wird eine Hemmung des ³⁵S Einbaus um mehr als eine Zehnerpotenz erreicht, und es ist von einer weitgehenden Hemmung der Proteinbiosynthese auszugehen.

Puromycin führt bei der Proteinbiosynthese zu Kettenabbruch. Der Hemmstoff fungiert als Analogon des 3' Endes der Aminoacyl-tRNA und interagiert so mit der Akzeptor-Stelle der 60S Untereinheit des Ribosoms. Der Hemmstoff wird anschließend transpetidiert. Eine weitere Synthese ist an einem solchen Peptid nicht mehr möglich. Es kommt zu abgebrochenen Peptidketten, die an ihrem Ende ein Puromycinmolekül tragen. Dieser Mechanismus kann auch bei permeabilisierten Zellen stattfinden. So kann auch in der Dosis-Wirkungskurve gezeigt werden, dass eine Hemmung des ³⁵S Methionin bewirkt wird. Der α -[³²P]-dATP Einbau wird hierbei nicht beeinflusst. Hier kann eine starke Hemmung der Proteinbiosynthese hervorgerufen werden, wie sie auch *in vivo* auftritt. Dies steht in Einklang damit, dass für Puromycin keine Anreicherung im Zellinneren angenommen wird.

Diphtherie-Toxin schließlich inhibiert die Proteinbiosynthese irreversibel, indem es den eukaryontischen Elongationsfaktor 2 (eEF 2) mit Hilfe von NAD⁺ ADP-ribosyliert und dadurch inaktiviert. Diese Hemmung ist absolut irreversibel und kann nur durch Neusynthese des eEF2 aufgehoben werden. Dies ist jedoch wegen der Hemmung der Proteinbiosynthese unmöglich. Eine Hemmung, die *in vivo* eingetreten ist wirkt somit in den danach permeabilisierten Zellen fort. Diese theoretischen Annahmen können durch das Ausbleiben des ³⁵S-Methionin Einbaus in Diphtherie-Toxin gehemmten Zellen bestätigt werden.

Es konnte also gezeigt werden, dass in permeabilisierten Zellen durch verschiedene Hemmstoffe eine Verminderung der Proteinbiosyntheseaktivität bis hin zur vollständigen Hemmung möglich ist. Analog zur Situation *in vivo* war nun zu erwarten, dass hierdurch auch eine Hemmung der DNA-Replikation und damit des α -[^{32}P]-dATP Einbaus bewirkt wird. Dies konnte jedoch hier nicht beobachtet werden. In den verschiedenen Situationen findet Einbau an α -[^{32}P]-dATP statt. Durch qualitative Analyse der radioaktiv markierten Produkte konnte sichergestellt werden, dass es sich dabei um frischreplizierte DNA aus HeLa-Zellen handelt. Trotz der Hemmung wird in permeabilisierten Zellen also DNA-repliziert. Durch den Einsatz verschiedener Hemmstoffe, die biochemisch sehr unterschiedlich sind und auch auf verschiedene Weise in die Proteinbiosynthese eingreifen, konnte sichergestellt werden, dass das beobachtete Ausbleiben der mittelbaren Hemmung kein Effekt eines einzelnen Hemmstoffes ist. Auch konnte durch die extrem hohen Konzentrationen der eingesetzten Hemmstoffe, die dennoch keine Auswirkung auf die Replikation haben, gezeigt werden, dass kein direkter hemmender Einfluss der Stoffe auf die Replikation für die *in vivo* beobachtete Hemmung verantwortlich ist. Dort tritt die Hemmung also sekundär als Folge der Proteinbiosynthesehemmung auf. Dieser Sekundäreffekt bleibt nach Permeabilisierung aus. Das Fehlen dieses Sekundäreffektes geht so weit, dass Zellen, die *in vivo* durch Diphtherie-Toxin in bezug auf Proteinbiosynthese und auch Replikation gehemmt waren, nach Permeabilisierung die DNA-Synthese aufnehmen. Die Tatsache, dass die *in vivo* vorhandene mittelbare Hemmung nach der Permeabilisierung nicht mehr aufrechterhalten wird, zeigt eine Unterbindung der Signalübertragung zwischen der gehemmten Proteinbiosynthese und der Replikation. *In vivo* könnte auf nicht bekanntem Wege die Hemmung der Proteinbiosynthese durch einen regulatorischen Hemmstoff auf die DNA-Replikation übertragen werden. Der Weg der Informationsübermittlung zwischen beiden Stoffwechselwegen, der zur Koppelung führt, wird durch die Permeabilisierung unterbrochen. Die Wirkung dieser Unterbrechung setzt offensichtlich sehr schnell ein, da zwischen dem Verlauf der Einbaukurve unter Diphtherie-Toxin und der Kontrollkurve kein Unterschied zu erkennen ist. Als Permeabilisierungsdauer wird eine Zeit von 2 Minuten angenommen, bis die Zellen gleichmäßig mit Poren durchsetzt sind. Aufgrund der gezeigten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass in eben dieser Zeit auch der koppelnde Informationsweg unterbrochen wird. Dies kann dann nur als unmittelbare Folge des Permeabilisierungsaktes geschehen.

Eine Hemmung der DNA-Replikation durch gehemmte Proteinbiosynthese in reinen *in vitro* Systemen ist nicht verwunderlich. Dort fehlt eine Vielzahl an cytosolischen und anderen in-

trazellulären Komponenten, die zur Signalübertragung von einem biochemischen Weg zum anderen notwendig sind. Das hier eingesetzte System beinhaltet jedoch die gesamte Zelle, und macht diese lediglich durch Poren in der Membran von aussen zugänglich für niedermolekulare Stoffe. Deshalb wäre zu erwarten gewesen, dass eine Signalübertragung zwischen den beobachteten Phänomenen DNA-Synthese und Proteinbiosynthese ähnlich wie *in vivo* ablaufen kann. Der Faktor, der die Kopplung zwischen der Proteinbiosynthese und der DNA-Replikation *in vivo* vermittelt, muss durch die Permeabilisierung unmittelbar betroffen sein, in einer Weise, dass die Übertragung der Information ‚Hemmung‘ unterbrochen ist.

Trotz der erfolgreichen Hemmung der Proteinbiosynthese im permeabilisierten System kann kein Einfluss auf die DNA-Replikation festgestellt werden. Die Einbaurrate an α -[³²P]-dATP wird nicht parallel zur ³⁵S Einbaurrate gesenkt, sondern bleibt weiter konstant oder setzt sogar nach Permeabilisierung wieder ein. Auch das Sedimentationsprofil des erzeugten radioaktiv markierten Materials entspricht dem aus ungehemmten Zellen.

4.2.3. Hypoxie

Der Zustand der transienten Hypoxie bei HeLa-Zellen ist in der Literatur eingehend charakterisiert worden. Bei der Etablierung des hypoxischen Zustandes *in vivo* macht man sich die Atmungsaktivität der Zellen zunutze, durch die der Sauerstoff aus dem Inkubationsmedium entfernt wird. Dieser Vorgang benötigt allerdings einen Zeitraum bis zu vier Stunden.

Da der Erhalt der Replikationsfähigkeit im permeabilisierten Zustand bis maximal vier Stunden möglich ist, ist es nötig, den Sauerstoff hier auf anderem Wege zu entfernen. Vorliegend geschieht dies durch den Einsatz von Ascorbat und Ascorbatoxidase. Durch dieses enzymatische System wird der im Medium vorhandene Sauerstoff vollständig in einer oxidativen Reaktion aufgebraucht und so dem Medium entzogen. Die Entfernung des Sauerstoffes aus dem Kulturmedium konnte mittels Sauerstoffelektrode dargestellt werden. Auch wurde überprüft, inwiefern die in dieser Reaktion zur Entfernung des Sauerstoffs zum Einsatz kommenden Agenzien selbst einen Einfluss auf die Replikation ausüben. Durch Einbauversuche konnte sichergestellt werden, dass die hier eingesetzten Reagenzien keinen hemmenden Einfluss auf den Einbau von α -[³²P]-dATP haben. Es scheint kein toxischer Effekt vorzuliegen. Das eingesetzte System von Ascorbat und Ascorbatoxidase erscheint demnach geeignet, um Versuche mit permeabilisierten Zellen unter Sauerstoffmangel durchzuführen. Es stellt sicher, dass der Sauerstoff entfernt wird, und behindert nicht per se die Replikationstätigkeit.

Dieses System wurde eingesetzt, um bei ungehemmten Zellen nach Permeabilisierung schnell hypoxische Verhältnisse zu erzeugen. Daneben wurden Versuche mit Zellen, die zuvor längere Zeit hypoxisch gehalten waren durchgeführt. In allen Fällen replizieren hypoxisch permeabilisierte HeLa-Zellen in gleicher Weise wie euoxische Kontrollen mit gleicher Vorbehandlung. Eine Hemmung der Replikation, wie sie *in vivo* beobachtet wird bleibt nach Permeabilisierung völlig aus. Auch kann kein Phänomen, das der Reoxygenierung ähnlich wäre, bei permeabilisierten Zellen beobachtet werden. Nach erneutem Zutritt von Sauerstoff zu permeabilisierten Zellen, die nach 6h Hypoxie *in vivo* permeabilisiert worden waren, wird die Replikationstätigkeit der Zellen vielmehr immer mehr vermindert. Dies könnte auf oxidative Schädigung der Zellen zurückgeführt werden. Offenbar haben die Zellen durch den langen Sauerstoffentzug die Mechanismen zum Schutz vor Oxidation zurückgefahren, und sind nach Permeabilisierung nicht in der Lage, die nötigen Enzyme schnell genug wieder zu synthetisieren. Der Effekt von vermindertem Sauerstoff, wie er *in vivo* eintritt, kann bei permeabilisierten Zellen nicht gezeigt werden. Das Ausbleiben des hemmenden Effektes bei permeabilisierten Zellen kann nur direkt als Folge der Permeabilisierung angesehen werden, da bei ungehemmten Zellen durch die Bestandteile des Mediums kein Effekt bewirkt wird. Auch tritt die Aufhebung der Hemmung direkt infolge der Permeabilisierung ein, ohne dass weiteres nötig wäre. Offenbar ist auch hier die Kopplung des hemmenden Zustandes der Hypoxie an die Replikationstätigkeit der Zellen durch den permeabilisierten Zustand unterbrochen.

4.2.4. Hydroxyharnstoff

Durch den Hemmstoff Hydroxyharnstoff wird der Ribonukleotidreduktase das für die enzymatische Aktivität nötige Radikal entzogen. Aufgrund der Inaktivität des Enzyms können keine DNA-Bausteine mehr zur Verfügung gestellt werden. Durch die Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase kann die Replikation *in vivo* gehemmt werden. *In vivo* hat die Hemmung des Enzyms durch Hydroxyharnstoff direkt eine Veränderung des Desoxynukleotidpools zur Folge. Da die Reaktion zur Reduktion der Ribonukleotide gestoppt ist, muss auch die Produktion der Desoxynukleotide vermindert sein. Da die Desoxynukleotidtriphosphate als Substrate für die DNA-Polymerasen dienen, liegt hier die Vermutung nahe, dass die Hemmung durch eine Substratverarmung auftritt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Zellen, die *in vivo* gehemmt waren und unter Aufrechterhaltung oder Erhöhung der Hydroxyharnstoffkonzentration permeabilisiert werden, dennoch die Replikationstätigkeit einsetzt. Auch hier ist offenbar allein die Permeabilisierung und das einge-

setzte Permeabilisierungsmedium Auslöser für die Aufhebung der Hemmung. In vorliegenden Fall bietet die Zusammensetzung des Permeabilisierungsmediums eine Erklärung für die aktive Replikation. Da im Permeabilisierungsmedium die Konzentration an Desoxyribonukleotiden eingesetzt wird, wie sie bei aktiv replizierenden Zellen anzutreffen ist, wird hier ein hemmender Effekt, der durch veränderte Zusammensetzung des Desoxynukleotidpools hervorgerufen wird, aufgehoben.

4.3. Auftreten von kurzkettigen Intermediaten

Bei der Untersuchung des Replikationsverhaltens der permeabilisierten HeLa-Zellen konnten α -[^{32}P]-dATP-markierte säurefällbare Moleküle von geringem Sedimentationskoeffizienten und hoher Wanderungsgeschwindigkeit im 15 % PAA Gel beobachtet werden. Diese Moleküle treten als einzige markierte Spezies auf, wenn die DNA-Polymerisation durch Aphidicolin gehemmt ist. Jedoch konnten diese DNA-Moleküle auch unter Standardbedingungen ungehemmter Replikation markiert und gezeigt werden. Das Auftreten unter ungehemmten Bedingungen unterlag dabei Schwankungen.

Es konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Moleküle von einer Grösse sind, die durch die zur Verfügung stehenden Rohrzuckergradienten nicht mehr aufgelöst werden kann. In allen Fällen befindet sich die säurefällbare Radioaktivität in den ersten Gradientenfraktionen. Es konnte durch die Zentrifugation nicht über die Auftragsfraktionen hinaus bewegt werden. Das Material konnte durch die angewendeten Bedingungen also nicht zur Sedimentation gebracht werden. Durch Einsatz von radioaktiv markierten Vergleichsproben auf Gradienten konnte gezeigt werden, dass die beobachteten DNA Moleküle deutlich kleinere Sedimentationskoeffizienten aufweisen müssen als in der Replikation befindliche Tochterstränge des SV40.

Da die Sedimentationsanalyse auf alkalischen Rohrzuckergradienten nicht direkt die Grösse des entsprechenden markierten Moleküls darstellt sondern Aussagen über den Sedimentationskoeffizienten der Moleküle macht, ist hieraus nicht direkt eine Aussage zur Grösse möglich. Sofern das beobachtete Material nicht DNA sondern andere α -[^{32}P]-dATP-markierte Moleküle enthielte, wäre die übliche Grössenzuordnung auf dem Gradienten nicht möglich. Durch Dichteanalyse auf isopyknischen Cs_2SO_4 Dichtegradienten konnte jedoch gezeigt werden, dass die beobachtete α -[^{32}P]-dATP-Markierung die Dichte von reiner DNA aufweist. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass es sich um eine andere Molekülklasse als DNA handelt, die unter Permeabilisierung durch α -[^{32}P]-dATP markiert wurde. Diese Annahme wird auch durch das beschriebene Einbauverhalten unwahrscheinlich.

Da das beobachtete markierte Material DNA ist und für Analyse durch Ultrazentrifugation zu klein ist, wurde eine elektrophoretische Analyse zur Klärung der Grösse der DNA angeschlossen. Dabei ergab sich, dass der grösste Teil der radioaktiv markierten Moleküle unter 100 nt gross ist. Durch Analyse auf unterschiedlich starken Polyacrylamidgelen wurde deutlich, dass eine diskrete Grössenverteilung der DNA vorliegt.

Bei 15%igen Gelen, die den Bereich unter 30 nt gut auftrennen, werden 3 starke und einige weitere schwächere Banden aufgetrennt. Die stärkste Bande findet sich bei 19 nt. Daneben sind eine Bande bei 16 nt und eine weitere bei 23 nt zu sehen. Weitere schwächere Banden treten bei 25 nt und 29 nt auf. Die Auflösung des Bereichs bis 100 nt auf 8%igen Gelen zeigt neben diesen Banden grössere Polynukleotide der Grössen 34 nt, 46 nt, 57 nt und 67 nt. Die Nukleotide darüber treten nicht als diskrete Banden auf sondern verlaufen zu einer kontinuierlichen Schwärzung.

Für SV40 wurde berichtet, dass die Okazaki-Fragmente durch Ligation kürzerer Vorgänger Ketten synthetisiert werden. Dabei werden Fragmente der hier beobachteten Grössen aufgezeigt. Diese kürzeren Vorläufer Ketten werden als Replikations-Primer charakterisiert, deren Entstehung durch Einsatz von Aphidicolin nicht unterdrückt werden kann. Insbesondere zeichnen sich diese Primer durch Anwesenheit eines kurzen RNA-Anteils aus. Dieser rührt von der Initiation der DNA-Polymerisation her. Es handelt sich um die Initiator-RNA (iRNA), die bei der Polymerisation um einige zehn Desoxynukleotidmonophosphate verlängert wird.

Vorliegend konnte gezeigt werden, dass die kurzkettingen Intermediate nach Hydrolyse mit NaOH bei anschließender Auftrennung auf PAA-Gelen schneller wandern als die nicht hydrolysierte Kontrolle. Die Differenz zwischen der hydrolysierten und der nicht hydrolysierten Bande beträgt dabei jeweils 7 nt. Es zeigt sich also, dass die kurzkettingen Intermediate einen ungefähr 7 nt langen alkalilabilen Anteil haben. Dies deutet darauf hin, dass hier ein Anteil von Ribonukleotiden in der Kette vorhanden ist. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen iRNA mit einer Länge von ungefähr 10 nt zwar quantitativ nicht genau. Jedoch stimmt das Vorhandensein eines RNA-Anteils von konstanter Länge in den beobachteten verschiedenen Banden mit der vorgelegten Theorie überein. Die iRNA wird durch eine DNA-Polymerase mit dNTP verlängert. Danach werden einzelne Intermediate miteinander verbunden. Die beobachteten Längen könnten wie folgt entstanden sein:

Grösse des beobachteten Oligonukleotids: Mögliche Zusammensetzung: (Dabei werden die gemessenen Grössen mit einer Genauigkeit von +/- 1nt angenommen)

16		23 - 7	→
19 →	25 - 7	
23		16 + 7 →
25		19 + 7 →
29		23 + 7 →
34		25 + 7 →
46		23 + 23 →
57		23 + 34	... →
67		34 + 34	

Zeichenerklärung: → DNA-Strang (Aphidicolin resistent)
 alkalilabiler Anteil (iRNA)
 = in DNA umgewandelter iRNA-Anteil (Aphidicolin sensitive DNA-Synthese)

Es konnten mindestens zwei verschiedene Spezies nachgewiesen werden, die einen RNA-Anteil aufweisen. Deren Synthese ist nicht Aphidicolin sensitiv. Die übrigen grösseren Intermediate könnten in Einklang mit der bei Nethanel 1991 dargestellten Theorie verschiedene Stadien der Weiterverarbeitung darstellen. Offenbar treten jedoch bei den permeabilisierten Zellen im kürzesten Bereich mehrere verschiedene Grössenklassen auf. Nicht nur wie dort beschrieben zwei verschiedene. Dies kann auf einer Besonderheit des permeabilisierten Systems oder aber auf hier erfolgter genauerer Auftrennung der Intermediate beruhen.

Ausgehend von den so erhaltenen Daten über die kurzketigen Intermediate wurden die Bedingungen für deren Auftreten näher charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei einem längeren Chase die Intermediate vollständig verschwinden. Dies stellt sicher, dass es sich dabei nicht um Abfallprodukte der Replikation handelt. Diese würden akkumulieren und nicht weiterverarbeitet werden. Dies wird auch durch das Verhalten bei einer Langzeitmarkie-

rung belegt. Vorliegend wurde eine Langzeitmarkierung von 120 Minuten mit gleicher spezifischer Aktivität markiert wie eine Pulsmarkierung von 10 Minuten. Bei der Langzeitmarkierung wird keine stärkere Schwärzung der einzelnen auftretenden Banden festgestellt als bei einer Pulsmarkierung. Ein solches Verhalten kann nur durch eine steady state Konzentration erklärt werden. Offenbar liegen die markierten kurzkettigen Intermediate immer in ungefähr der gleichen Konzentration vor. Sie werden also im gleichem Masse synthetisiert wie auch weiterverarbeitet oder abgebaut. Die Schwärzung bei markiertem Material, das zu gross ist um vom Gel aufgetrennt zu werden, ist bei der Dauermarkierung auch deutlich stärker als bei der Pulsmarkierung. Höhermolekulare DNA wird also bei der Dauermarkierung stärker markiert. Dies spricht für eine Inkorporation der kurzkettigen Intermediate in die höhermolekulare DNA. Dies konnte auch durch das Sedimentationsverhalten auf alkalischen Rohrzuckergradienten gezeigt werden. Denn Chase Versuche zeigen dort, dass die auftretenden kurzkettigen Moleküle tatsächlich weiterverarbeitet und in die höhermolekulare DNA integriert werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Integration der kurzen Ketten unter Einfluss von Hemmstoffen, die DNA-Polymerasen hemmen, nicht stattfinden kann. Darüberhinaus konnte kein Einfluss von Hemmstoffen auf deren Auftreten gezeigt werden. Egal welcher Hemmstoff eingesetzt wurde treten die kurzkettigen Intermediate in gleicher Weise auf wie bei einer Kontrolle. Dies stimmt mit dem Bild über die Beeinflussbarkeit der Replikation bei permeabilisierten Zellen an sich überein. Einfluss auf die Replikation kann nach der Permeabilisierung nur durch Antibiotica genommen werden, die direkt an DNA-Polymerasen angreifen. Indirekte Auswirkungen auf die Replikation infolge der Hemmung eines Stoffwechselweges der Zelle durch Antibiotica kann bei permeabilisierten Zellen weder in Bezug auf die grossen Replikons noch in Bezug auf die kurzkettigen Intermediate der Replikation bewirkt werden. Da die kurzkettigen Intermediate nach Permeabilisierung in besonders starkem Ausmass auftreten, sollte versucht werden zu ergründen, wodurch deren Auftreten verstärkt wird. Ein Hinweis ergab sich aus der Sedimentationsanalyse von Material, da unter Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen von α -Toxin markiert wurde. Dabei zeigt sich, dass bei sehr niedrigen und bei sehr hohen Konzentrationen in verstärktem Masse kurzkettige Intermediate produziert wurden. In dem Bereich, der normalerweise in Versuchen mit permeabilisierten Zellen eingesetzt wird jedoch trat im Vergleich hierzu kaum kurzkettiges markiertes Material auf. Dies könnte auf ungenügende oder übermässige Permeabilisierung der Zellen zurückzuführen sein. Bei zu geringer Permeabilisierung wäre es möglich, dass die Zellen nicht schnell genug mit dem Permeabilisierungsmedium ins Gleichgewicht gesetzt werden können. Als Folge hiervon

könnte Mangel an Substanzen, die darin enthalten sind auftreten. Bei übermässiger Permeabilisierung könnten die Poren so gross werden, dass auch Protein und hochmolekulare Substanzen austreten. So wäre die Integrität der Zelle vollständig zerstört. In diesem Fall würde die Replikation durch Fehlen von Substanzen, die im Medium nicht enthalten sind gestört. Bei der Analyse von markiertem Material auf PAA-Gel, das unter den beschriebenen Bedingungen markiert wurde, konnte jedoch kein Unterschied in der Stärke der einzelnen Banden in Abhängigkeit von der α -Toxin-Konzentration gesehen werden. Dies deutet darauf hin, dass das verstärkte Auftreten der Replikationsprimer im permeabilisierten System nicht eine Folge von zu starker oder zu schwacher Permeabilisierung ist.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das kurzkettige Material sich verhält wie die in der Literatur für SV40 beschriebenen Primer der Replikation. Diese Primer treten nach Permeabilisierung sehr stark vermehrt auf. Das Auftreten wurde in wechselndem Ausmass beobachtet. Jedoch war immer eine kleine Fraktion vorhanden. Deren Ausmass konnte jedoch so weit anwachsen, dass der grösste Anteil der markierten DNA sich in den ersten Fraktionen der SW28 Gradienten fand. Die Ursache für das vermehrte und unterschiedliche Auftreten konnte vorliegend nicht geklärt werden.

4.4. Verwertung der angebotenen Nukleotidbausteine

Die bisher dargestellten Ergebnisse wurden alle mit Hilfe des Einbaus von α -[^{32}P]-dATP erhalten. Bei Versuchen mit variiertem spezifischer Radioaktivität des Markers war jedoch festgestellt worden, dass keine lineare Abhängigkeit der Einbauraten von der angebotenen Aktivität besteht.

Es konnte gezeigt werden, dass bei Gegenwart des Antibiotikums Hydroxyharnstoff die markierte DNA stärker mit dem Dichtemarker BrdUTP substituiert wird als unter ungehemmten Bedingungen. Dasselbe gilt auch unter hypoxischen Bedingungen.

Die beiden getesteten Situationen unterbinden die Synthese von Desoxynukleotidbausteinen aus Ribonukleotidbausteinen, indem sie das Enzym Ribonukleotidreduktase inhibieren. Hierdurch können durch den Stoffwechsel der Zelle keine DNA-Bausteine mehr zur Verfügung gestellt werden. Die Replikation ist in permeabilisierten Zellen dann vollständig von den Nukleotiden, die das Medium zur Verfügung stellt abhängig. Da bei aktiver Ribonukleotidreduktase und möglicher Eigensynthese durch die Zellen der Substitutionsgrad geringer ist als unter Hemmung, ist davon auszugehen, dass eine Verdünnung der im Permeabilisierungsme-

dium angebotenen Marker durch Bausteine, die die Zelle aus dem eigenen Stoffwechsel zur Verfügung stellt, erfolgt. Bei Ausschalten dieser Möglichkeit tritt eine höhere spezifische Aktivität des Dichtemarkers und damit ein stärkerer Substitutionsgrad zu Tage.

Bei Reoxygenierung nach Permeabilisierung konnte jedoch der Substitutionsgrad nicht wieder auf den Zustand der euoxischen Kontrolle gebracht werden. Offenbar ist es den permeabilisierten Zellen nicht möglich, die Aktivität der Ribonukleotidreduktase wieder herzustellen. Möglicherweise fehlt hierfür ein Kofaktor, oder das verlorene Eisen kann wegen der zu starken Verdünnung nicht wieder eingesetzt werden. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass Zellen, die hypoxisch permeabilisiert und anschließend euoxisch begast werden, über längere Zeit nicht die Einbaurate halten können, die die hypoxisch begaste Kontrollen aufweisen.

Es zeigt sich also, dass permeabilisierte Zellen in der Lage sind, aus Ribonukleotiden DNA-Bausteine herzustellen. Dies konnte insbesondere durch eine Markierung mit [³H]-rCDP gezeigt werden.

Das Sedimentationsprofil des [³H]-rCDP-pulsmarkierten Materials auf alkalischen Rohruckergradienten gleicht dem der α -[³²P]-dATP Markierung, die gleichzeitig bei denselben Zellen durchgeführt wurde. Es handelt sich dabei also um neureplizierte Tochterstrang-DNA aus den HeLa-Zellen. Diese kann die Markierung nur tragen, wenn das eingesetzte Ribonukleotid reduziert wurde. Eine Ribonukleotidmarkierung wäre auf dem alkalischen Gradienten nicht stabil und könnte nicht säuregefällt werden. Dieses Ergebnis belegt eindeutig die Aktivität der Ribonukleotidreduktase der permeabilisierten Zellen.

Es konnte also gezeigt werden, dass die DNA-Synthese in permeabilisierten HeLa-Zellen nicht vollständig von den zur Verfügung gestellten Nukleotidbausteinen abhängt. Ein geringer Anteil stammt auch aus der eigenen Biosynthese.

4.5. Versuche zur Wiederherstellung der Hemmbarkeit

Grundsätzlich stellt sich die Frage, wie die Versuche durchgeführt werden sollen, mit denen überprüft wird, ob eine in Frage stehende Situation einen hemmenden oder steigernden Effekt auf die Replikation in den permeabilisierten Zellen aufweist.

Es ist davon auszugehen, dass eine Situation, die einen hemmenden Effekt aufweist zu geringerer Einbaurate im Dauereinbauversuch mit den permeabilisierten Zellen führt. Die Untersuchung der Einbaurate der Zellen unter dem Einfluss der fraglichen Substanz soll deshalb im

folgenden immer als Eingangsexperiment dienen. Wenn bei einer solchen Einbaukurve signifikante Veränderungen der Einbaurrate beobachtet werden, so ist diese Veränderung durch andere Analysemethoden weiter zu verfolgen.

Sofern sich bei einer getesteten Substanz keinerlei Veränderungen der Aktivität im Vergleich zur Kontrollsituation ergeben, so kann nach Abwägung der an den Versuch gestellten Prämissen und etwaigen Möglichkeiten eine Wirkung der Substanz ausgeschlossen werden.

4.5.1. Einfluss der Rückstände aus dem Kulturmedium RPMI

Zu Beginn der Versuche zur Regulierung der Replikation in permeabilisierten Zellen stellte sich die Frage, ob nicht Bestandteile des Kulturmediums für die Zellkultur Ursache für die ungehemmte Replikation sein könnten. Durch die Poren wäre ein verstärkter Eintritt Wachstumsvermittelnder Substanzen aus dem Medium in das Zellinnere denkbar. Als solche Substanzen kommen Nukleotide in Frage, die auch von den Zellen selbst in das umgebende Medium abgegeben worden sein können. Solche Substanzen könnten in nicht geringer Konzentration in das Permeabilisierungsmedium verschleppt werden, da zwischen dem Entfernen des Kulturmediums und der Permeabilisierung kein Waschschrift eingeschaltet wird. Durch Versuche mit zusätzlichem Waschen konnte gezeigt werden, dass kein Einfluss von verbliebenen Mediumbestandteilen auf die Replikationstätigkeit in den permeabilisierten Zellen zu sehen ist. Dabei konnte durch Waschen mit RPMI ohne FKS ein Einfluss von verbliebenen Bestandteilen des Kälberserums ausgeschlossen werden. Da hierbei auch keine Antibiotika im Waschmedium anwesend waren, kann auch ein Effekt durch diese Substanzen ausgeschlossen werden. Durch dieses Waschen mit frischem Medium konnten auch Effekte von Substanzen, die durch die Zellen selbst während der Kulturdauer ins Medium abgegeben wurden ausgeschlossen werden. Offenbar wird also auch durch Substanzen, mit denen die Zellen sich ihr Medium selbst konditionieren kein feststellbarer Effekt auf die Replikation ausgeübt. Das Ausbleiben eines Effektes beim Waschen mit Puffern wie PBS oder HANKS Lösung schließlich zeigt, dass auch die Bestandteile des Medium RPMI 1640 keinen Einfluss auf die Einbaurrate unter den gegebenen Bedingungen haben.

Die Ausgangsbeobachtung für die Versuche zur Wirkung des Mediums war eine ungehemmte Replikation. Diese wies nicht die in vivo gegebene Replikationsregulation auf. Als Erklärung hierfür wäre wie gezeigt eine aktivierende Substanz, die in die Zellen eindringt, oder aber eine hemmende Substanz, welche die Zellen verlässt denkbar. Für die Rückstände aus dem RPMI-

Medium, die als potentiell immer vorhanden anzusehen sind, wäre also nur die Möglichkeit einer aktivierenden Wirkung auf die Replikation denkbar gewesen. Dann wäre zu erwarten gewesen, dass bei Wegfallen dieser aktivierenden Situation ein Rückgang der Replikation zu verzeichnen ist. Da dies vorliegend nicht gefunden wurde, kann ein aktivierender Effekt, den die Mediumrückstände auf die Replikation ausüben, ausgeschlossen werden. Die festgestellte ungehemmte Replikation tritt also nicht als Artefakt infolge einer Verunreinigung der Permeabilisierungsmediums mit Rückständen aus dem Permeabilisierungsmedium auf.

4.5.2. Einfluss des pH-Wertes

Für jede biochemische Reaktion gibt es einen pH-Wert, bei dem die grösste Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden kann. Damit in intakten Zellen die notwendigen Reaktionen optimal ablaufen können, ist es natürlich nötig, dass dabei auch jeweils das pH-Optimum der beteiligten Enzyme eingehalten wird. Andererseits kann durch eine Veränderung des pH-Wertes vom Optimum weg auch eine Hemmung der enzymatischen Aktivität erreicht werden.

Durch die Permeabilisierung wird der intrazelluläre pH-Wert auf den pH-Wert des Permeabilisierungsmedium eingestellt. Die Anwesenheit des Puffers PIPES verhindert eine Veränderung des pH sehr effektiv. Deshalb ist nicht davon auszugehen, dass pH-Unterschiede, wie sie im Inneren von Zellen unter physiologischen Bedingungen infolge der Kompartimentierung auftreten, nach Permeabilisierung noch möglich sind. Vielmehr ist davon auszugehen, dass im gesamten Cytosol und auch im damit in Verbindung stehenden Kernraum, der einheitliche pH-Wert des Permeabilisierungsmediums vorherrscht.

Auf der Grundlage dieser Überlegungen wurde gezeigt, dass in einem weiten Bereich von physiologisch denkbaren pH-Werten keine drastische Veränderung der Einbauaktivität bei permeabilisierten HeLa-Zellen auftritt. Sowohl eine zu starke Ansäuerung als auch zu starke Alkalisierung des Mediums erscheint dabei nicht sinnvoll, weil dadurch Zellbestandteile geschädigt werden könnten. Dies könnte einen Effekt auf die Replikation vortäuschen.

Die Einbauwerte, die in Abhängigkeit von dem pH-Wert des Permeabilisierungsmedium erhalten wurden, zeigen ein schwaches Optimum bei den physiologisch üblichen Werten um pH 7,2. Durch den Einfluss von Hemmstoffen der Proteinbiosynthese wird jedoch *in vivo* eine drastische Verminderung der Einbauaktivität an ^3H -dThd bewirkt. Unter Cycloheximid sinken die Einbauwerte unter 5 % der Kontrolle ab. Bei Hypoxie ist ein Absinken auf 20 % der Kontrolle üblich. Solche starken Veränderungen sind hier nicht zu verzeichnen.

Es ist also nicht davon auszugehen, dass die Hemmung *in vivo* durch eine Veränderung des pH-Wertes erreicht wird. Die Hemmbarkeit geht dann im Permeabilisierungsmedium nicht infolge des starren, durch einen Puffer gehaltenen pH-Wertes verloren. Dies ermöglicht, dass die weiteren Versuche in dem üblichen Permeabilisierungsmedium mit pH 7,2 durchgeführt werden.

4.5.3. Einfluss des Membranpotentials auf die Replikationsaktivität

Eine unmittelbare Folge der Bildung von Poren in der Membran von Zellen ist es, dass das Potential, das sich über die Membran hinweg unter physiologischen Bedingungen einstellt nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Ein Effekt, der unmittelbar in Zusammenhang mit der Porenbildung in der Plasmamembran auftritt, könnte also durchaus auf den Zusammenbruch des Membranpotentials zurückzuführen sein. Eine Untersuchung dieser Zusammenhänge ist bei permeabilisierten Zellen jedoch nicht möglich, da es auch künstlich nicht mehr möglich ist, ein Membranpotential über die von Poren durchsetzte Membran hinweg zu erzeugen.

Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen zur Auswirkung des Membranpotentials auf die Replikation in HeLa-Zellen an Zellen *in vivo* durchgeführt.

Dort bieten sich verschiedene Möglichkeiten das Membranpotential zu beeinflussen. Zum einen kann eine Ausbildung des Membranpotentials dadurch verhindert werden, dass die Ionenzusammensetzung des Aussenmedium stark verändert wird. Zum anderen können die Ionenkanäle der Zelle durch Ouabain vergiftet werden.

Für beide Möglichkeiten konnte durch Einbauwerte unter verschiedenen Inkubationsbedingungen gezeigt werden, dass die Hemmbarkeit der Replikationsaktivität bei HeLa-Zellen auch bei fehlendem Membranpotential besteht.

Es wurde gezeigt, dass Zellen, die durch Cycloheximid gehemmt sind, durch Zerstörung des Membranpotentials nicht zu einer ungehemmten Replikationsaktivität angeregt werden können. Auch kann nach Zerstörung des Membranpotentials eine Hemmung durch Cycloheximid bewirkt werden. Bei ungehemmten Zellen wirkt sich die Zerstörung des Membranpotentials innerhalb des beobachteten Zeitraumes nicht auf die Replikationstätigkeit der Zellen aus. Diese Beobachtungen wurden bei beiden Möglichkeiten zur Zerstörung des Membranpotentials gemacht. In beiden Fällen wurde trotz des drastischen Eingriffs der jeweiligen Bedingungen in den Zellstoffwechsel keine Auswirkung auf die Regulation der Replikationstätigkeit festgestellt. Dies gilt sowohl für die Einbauaktivität der Zellen, als auch für das Erscheinungsbild der markierten DNA.

Es konnte gezeigt werden, dass in vivo der Regulationsmechanismus, der zur Hemmung der DNA-Replikation infolge der Proteinbiosynthesehemmung durch Cycloheximid führt, nicht durch das Zusammenbrechen des Membranpotentials beeinflusst werden kann. Dies führt zu dem Schluss, dass auch bei den permeabilisierten Zellen nicht die Zerstörung des Membranpotentials durch die Poren die Ursache für die beobachtete ungehemmte Replikation sein kann.

4.5.4. Einfluss der Ca^{++} -Konzentration

Aufgrund der Tatsache, dass das zweiwertige Ion Calcium in eukaryontischen Zellen kompartimentiert und nicht gleichförmig in der gesamten Zelle in einer Konzentration vorliegt, und Calcium außerdem in Signalübertragungswegen eine Rolle spielt, sollte hier speziell seine Auswirkung auf die Replikationsaktivität getestet werden.

Dabei sollte durch das Weglassen des Chelators EGTA sichergestellt werden, dass die eingesetzten Konzentrationen auch wirklich in freier Form vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Variation der Calcium-Konzentration im Permeabilisierungsmedium keinerlei Effekt auf die Einbauaktivität ausgeübt werden kann. Die Einbauwerte sind alle weitgehend gleich, und stimmen auch mit dem Kontrollwert für Calcium, wie es im Standard-Permeabilisierungsmedium vorliegt, überein.

Offenbar wird die indirekte Hemmbarkeit der Replikation nicht durch die im Permeabilisierungsmedium eingesetzte Calcium-Konzentration verhindert. Calcium kommt demnach auch nicht als die gesuchte Übermittlersubstanz für die Regulation der Replikationsinitiation in Frage.

4.5.5. Einfluss des Redoxzustandes von Thiolgruppen der Proteine

Eine weitere direkte Folge der Permeabilisierung der Zellen könnte die Veränderung des Redoxzustandes zellulärer Proteine sein. Dies wäre dadurch zu erklären, dass das physiologische System zur Erhaltung des Redoxzustandes von Thiolgruppen, Glutathion, in den permeabilisierten Zellen nicht mehr aktiv ist.

Vorliegend wurden verschiedene reduzierende Agenzien und auch ein Oxidationsmittel eingesetzt, um deren Wirkung in bezug auf die Replikationsaktivität zu testen. Es konnte gezeigt werden, dass die Replikation bei einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ DTT ein Optimum aufweist. Für GSH konnte kein Einfluss auf die Replikation festgestellt werden. Bei Einwirken von Wasserstoffperoxyd konnte eine sehr starke Abnahme der Einbauaktivität bei hohen Konzentrationen beobachtet werden.

Die gezeigte Auswirkung von DTT auf die Einbauaktivität entspricht im Ausmass dem Effekt, der bei Hemmstoffen auf die Replikation beobachtet wird. Hypoxie senkt die Replikationsaktivität auf weniger als ein Drittel ab. Hier ist eine Steigerung durch DTT auf das vierfache zu verzeichnen. Das Ausmass der beobachteten Veränderung entspricht also dem Erwarteten. Durch Sedimentationsanalyse des Materials, das unter DTT und in Abwesenheit von DTT markiert wurde konnte gezeigt werden, dass der Unterschied im Einbau hier nicht durch eine Hemmung der Replikation, wie sie in vivo auftritt, verursacht ist. Das Sedimentationsprofil entspricht demjenigen ungehemmter Replikation. Auch ohne DTT findet also Initiation statt. Die Steigerung des Einbaus in den permeabilisierten HeLa-Zellen geht also nicht mit dem Verlust der Hemmbarkeit der Initiation einher. Vielmehr ist auch in Abwesenheit von DTT keine Hemmbarkeit vorhanden. Auch wenn sich kein DTT im Permeabilisierungsmedium befindet, betreiben die permeabilisierten HeLa-Zellen DNA-Replikation. Der Einbauunterschied ist demnach auf verlangsamte Reaktionen zurückzuführen.

Für die Aktivität des physiologischen Reduktors Glutathion konnte in einer Dosis-Wirkungskurve gezeigt werden, dass keinerlei Einfluss durch Variation der Konzentration auf den α -[³²P]-dATP-Einbau ausgeübt werden kann. Dies deutet darauf hin, dass der Redoxzustand von Proteinen mit Thiolgruppen, der durch dieses Agens beeinflusst wird, keine Rolle für die Replikationstätigkeit spielt.

Die Tatsache, dass durch hohe Konzentration an H₂O₂ die Replikation gehemmt wird, verwundert nicht. Schließlich wird eine Vielzahl zellulärer Stoffe durch das starke Oxidationsmittel geschädigt.

Die erhaltenen Daten zeigen, dass durch den Redoxzustand von Thiolgruppen zellulärer Proteine kein Einfluss auf die Replikation ausgeübt wird.

4.5.6. Einfluss der Konzentration von Nukleotiden

Die Konzentrationen der vier Desoxynukleosidtriphosphate befinden sich in vivo in einem komplexen Gleichgewicht.²⁴ Die Konzentrationen der vier Nukleotide differieren dabei untereinander zum Teil stark. Auch treten Variationen der Konzentrationen in Abhängigkeit vom Zellzyklus auf. Veränderungen der natürlichen Gegebenheiten können direkt die DNA-Synthese beeinflussen. So führen Ungleichgewichte zu erhöhter Mutationsrate. Als Substrate für die DNA-Polymerasen bestimmen die dNTP auch deren Reaktionsgeschwindigkeiten.

²⁴ Albert, D., Gudas, L., 1985.

Aufgrund der komplexen und für die einzelnen Nukleotide unterschiedlichen Regulation der jeweiligen Konzentration erscheint es möglich, dass die Hemmung und Aktivierung der Replikation durch Bestandteile der Nukleotidpools bewirkt wird.

Die einfachste denkbare Möglichkeit besteht darin, dass die Konzentration eines einzigen Nukleotides bei Konstanthaltung der übrigen eine effektorische Wirkung zeigt.

4.5.6.1. Konzentration der Desoxynukleosidtriphosphate

Ein direkter Einfluss auf die DNA-Replikation ist in direktester Weise für die Desoxynukleosidtriphosphat denkbar, die selbst Substrate für die DNA-Polymerasen sind.

Der Effekt der einzelnen Desoxynukleosidtriphosphate wurde vorliegend durch Dosis-Wirkungs-Kurven für jedes der vier bei konstanter Konzentration der übrigen und durch Einbaukurven mit verschiedenen Konzentrationen für dGTP und dCTP gezeigt. Für dATP und dTTP konnte keine Abhängigkeit der ^{32}P -Einbauaktivität von der eingesetzten dNTP-Konzentration gefunden werden. Für die Basen Cytosin und Guanin wurde dagegen gezeigt, dass durch eine Steigerung von deren Konzentration auch eine Einbausteigerung bewirkt werden kann. Dieses Ergebnis konnte auch durch Einbaukurven mit unterschiedlichen Konzentrationen der Nukleotide bestätigt werden.

Das Ausmass der Einbausteigerung liegt allerdings nicht in einer Grössenordnung vor, dass von einem regulatorischen Effekt der getesteten Substanzen ausgegangen werden kann. Vielmehr beeinflussen die eingesetzten Substanzen als Substrate der beobachteten Reaktion deren Ausmass automatisch mit. Die beobachtete Steigerung könnte also auf enzymkinetischen Effekten beruhen. Ein regulatorischer Effekt auf die DNA-Replikation durch die Konzentration eines der dNTP erscheint anhand der erhaltenen Ergebnisse nicht wahrscheinlich.

4.5.6.2. Konzentration der Desoxynukleosiddiphosphate

Die Desoxynukleosiddiphosphate sind die Produkte der Reduktionsreaktion durch die Ribonukleotidreduktase. Sie sind selbst keine Substrate für die DNA-Polymerisation. Die dNTP werden aber unmittelbar aus diesen durch Phosphorylierung hergestellt. Bei diesen Vorläufern der DNA ist also ein unmittelbarer Zusammenhang gegeben. Jedoch scheiden direkte kinetische Effekte auf die DNA-Polymerisation aus.

Durch Dosis-Wirkungs-Kurven aller vier dNDPs konnte keine Abhängigkeit des α - ^{32}P -

dATP-Einbaus von deren Konzentration gezeigt werden. Da alle Markierungen mit α -[^{32}P]-dATP durchgeführt wurden, erklärt sich der Einbaurückgang bei dADP mit steigender Konzentration durch die Verdünnung des radioaktiven Markers durch phosphoryliertes dADP.

Insgesamt konnte also kein Effekt der Variation der Konzentration einzelner Desoxynukleotide festgestellt werden. Es kann also ausgeschlossen werden, dass die ungehemmte Replikation der permeabilisierten Zelle in Gegenwart von Hemmern der Proteinbiosynthese oder unter vermindertem Sauerstoffpartialdruck allein auf die Verfügbarkeit der Nukleotide aus dem Permeabilisierungsmedium zurückzuführen ist.

4.5.7. Einfluss cytosolischer Extrakte

Die andere Alternative zur Erklärung des replikativen Verhaltens der HeLa-Zellen nach der Permeabilisierung geht davon aus, dass eine hemmende Substanz durch die Poren in der Membran die Zelle verlässt. Infolge dieses Austritts gehen die Zellen in einen ungehemmten Zustand über. Die erneute Hemmung nach Permeabilisierung ist dann nicht möglich, weil entweder die Substanz nicht mehr synthetisiert werden kann, oder, weil sie ins Umgebende Permeabilisierungsmedium verdünnt wird und so in zu geringer Konzentration vorliegt.

Sofern eine solche intrazelluläre Substanz in stabiler Form vorliegt, sollte sie auch aus den Zellen isoliert werden können. Vorliegend wurde nun versucht, auf verschiedene Weise niedermolekulare Zellextrakte zu erzeugen, und diese dem Permeabilisierungsmedium zuzusetzen.

4.5.7.1. Konditionierung des Permeabilisierungsmediums

Die vorliegende Annahme ist also, dass permeabilisierten Zellen durch die Poren eine Substanz in das Permeabilisierungsmedium abgeben, die die Hemmung ermöglichen könnte. Um dies zu untersuchen, wurde Permeabilisierungsmedium längere Zeit mit Zellen inkubiert, in der Absicht, diese austretenden Substanzen darin anzureichern. Als das so gewonnene konditionierte Permeabilisierungsmedium auf weiteren Zellen eingesetzt wurde, konnte festgestellt werden, dass mit steigender Vorconditionierungszeit ein allmählicher Rückgang der Einbauaktivität zu verzeichnen war. Aufgrund der langen Inkubationszeit von Zellen in dem jeweiligen Medium ist jedoch davon auszugehen, dass dieser Rückgang eine Folge der Verarmung des Mediums an ATP und DNA-Bausteinen ist. Da also in einem kurzen Konditionierungszeitraum keine Effekte gezeigt werden können, erweist sich die Methode als ungeeignet um die Anreicherung von austretenden Substanzen zu verfolgen.

4.5.7.2. Roher Zellextrakt durch methanolische Extraktion

Mit Methanol lassen sich niedermolekulare Substanzen auf einfache Weise aus Zellen extrahieren. Deshalb sollte versucht werden, ob durch einen methanolischen Extrakt aus gehemmten HeLa-Zellen eine Hemmung bei den permeabilisierten Zellen erzeugt werden kann.

Bei einer Dauereinbaukurve, die methanolischen Extrakt aus ungehemmten Zellen enthielt, wurde ein Einbau erhalten, der etwa 5 % des Einbauwertes der Kontrolle betrug. Der methanolische Extrakt aus ungehemmten Zellen bewirkt also eine Hemmung der α -[³²P]-dATP-Einbauaktivität bei permeabilisierten HeLa-Zellen. Aus diesem Grund ist es hier nicht möglich, den Effekt, den der Extrakt aus gehemmten Zellen hat zu untersuchen.

Die Hemmung der DNA-Polymerisation durch den methanolischen Extrakt kann darauf zurückgeführt werden, dass dieser neben den niedermolekularen intrazellulären Substanzen auch Membranbestandteile enthält. Aufgrund dieser Bestandteile des methanolischen Extraktes werden die Zellmembranen der permeabilisierten Zellen zusätzlich zur Porenbildung geschädigt. Auch kann der Extrakt möglicherweise Reste an Methanol enthalten. Dieses wirkt dann toxisch auf die permeabilisierten HeLa-Zellen, die sich als empfindlich gegenüber alkoholischen Lösungsmitteln erwiesen haben. Eine Replikation wie in kontrolliert permeabilisierten Zellen ist in diesen stärker geschädigten Zellen nicht mehr möglich.

Die Gewinnung eines rohen Extraktes mit Methanol scheint also nicht geeignet um eine Anreicherung einer regulatorischen Substanz aus HeLa-Zellen zu bewirken.

4.5.7.3. Cytosol

Eine weitere Möglichkeit, cytosolische Extrakte aus HeLa-Zellen zu gewinnen besteht darin, die Zellen aufzuschliessen und dann durch Ultrazentrifugation das Cytosol zu gewinnen. Diese Methode wurde vorliegend für die Gewinnung von Cytosolen aus ungehemmten und Cycloheximid gehemmten HeLa-Zellen eingesetzt. Das Cytosol wurde dann dem Permeabilisierungsmedium zugegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass Cycloheximid vorgehemmte Zellen über einen Zeitraum von 90 Minuten hinweg in gleichem Masse α -[³²P]-dATP einbauen, egal ob das Permeabilisierungsmedium den cytosolischen Extrakt aus gehemmten Zellen enthielt, oder ob es ein Kontrollmedium war. In beiden Fällen wird die Hemmung der Replikation durch die Permeabilisierung aufgehoben. Dies zeigt, dass durch den Zusatz des cytosolischen Extraktes kein Ein-

fluss auf die Regulation der Replikation in permeabilisierten Zellen genommen werden kann. In der eingesetzten Weise kann also die Anwesenheit von Faktoren, die die Replikationsregulation vermitteln, im Cytosol nicht gezeigt werden.

4.5.8. Einfluss verschiedener niedermolekularer Substanzen

Die Hemmsituationen, deren Einfluss auf die Replikation vorliegend untersucht werden soll, haben alle direkten Einfluss auf den metabolischen Zustand der Zelle. Durch die Hemmung von Biosynthesewegen wird in den Energiehaushalt der Zelle eingegriffen. Das Verhältnis der zellulären Redoxäquivalente NAD^+/NADH oder der Phosphorylierungsäquivalente ATP/ADP wird in eine Richtung aus dem physiologischen Zustand heraus verschoben. Deshalb scheint es möglich, dass die Regulation der Replikation direkt durch die genannten Verhältnisse gesteuert wird. Um dies zu überprüfen, wurde der Einbau von permeabilisierten HeLa-Zellen unter Variation dieser genannten Verhältnisse untersucht.

4.5.8.1. Das NAD^+/NADH Verhältnis

In einer Vielzahl biochemischer Reaktionen wird NADH oder die oxidierte Form NAD eingesetzt. Dadurch, dass alle Reaktionen in einem geregelten Ausmass ablaufen, entsteht so eine balancierte Konzentration von NAD und NADH in der Zelle. Es stellt sich als steady state ein bestimmter Quotient der beiden Formen ein. Wenn nun ein wichtiger Stoffwechselweg unterbrochen wird, kann dies dazu führen, dass der Umsatz der genannten Kofaktoren verändert wird. Als Folge verändert sich der Quotient aus den Konzentrationen der beiden Formen. Dieser Quotient könnte also ein direktes Mass für die normale Funktion aller wichtigen Stoffwechselwege in der Zelle darstellen. Die Veränderung desselben könnte als direktes Signal für eine essentielle Störung des Zellstoffwechsels gewertet werden. Hierin könnte eine einfache Möglichkeit bestehen, die Aktivität von verschiedenen Stoffwechselwegen aufeinander abzustimmen. So könnte auch die Regulation der Initiation der Replikation durch den genannten Quotienten vermittelt sein.

Für das Verhältnis von oxidiertem und reduziertem NAD können in Abhängigkeit von einer Hemmsituation keine genauen Prognosen abgegeben werden, da zu viele verschiedene Parameter auf dieses Verhältnis einwirken. Deshalb wurden hier Einbauwerte mit einer Reihe

unterschiedlicher Verhältnisse unter variierten Einbaubedingungen aufgenommen. Es zeigt sich dabei eine relativ weite Streuung der Einbauwerte. Jedoch sind die beobachteten Unterschiede nicht so gross, wie es für eine gehemmte und nichtgehemmte Replikation zu erwarten wäre. Ausserdem sind die Schwankungen nicht in eine Korrelation zu den angelegten Bedingungen zu bringen. Eine einfache Regulation durch das angelegte Verhältnis der beiden Substanzen konnte damit nicht gezeigt werden.

4.5.8.2. Adenosintriphosphat-Gehalt des Permeabilisierungsmediums

Auch ATP wird in den meisten Stoffwechselwegen verbraucht oder aber erzeugt. Dies hat auch hier einen definierten Quotienten von ATP zu ADP und AMP für die normale Funktion aller Stoffwechselwege zur Folge. Eine Prognose für die Veränderung des Verhältnisses der Konzentrationen der Triphosphate zu niedrigeren Phosphorylierungszuständen ist hier gut möglich. Bei der Hemmung von biosynthetischen Wegen, die ATP verbrauchen kommt es zu einer Erhöhung des zellulären ATP-Gehaltes. So ist es auch für die hier hauptsächlich untersuchte Hemmung der Proteinbiosynthese zu erwarten. Die Versuche zur Vermittlung der Hemmung der Replikationsinitiation sollten hier vor allem mit erhöhten ATP Gehalten durchgeführt werden. Desweiteren führt eine ATP Absenkung durch ihren Einfluss auf die Aktivität der Enzyme, die an der Replikationsgabel engagiert sind, zu einem verminderten Einbau an α -[³²P]-dATP. Deshalb wurde vorliegend der Effekt von ATP durch eine Erhöhung der ATP-Konzentration untersucht. Auch wurden für die Analyse nicht Einbaukurven sondern Rohrzuckergradienten eingesetzt. Durch Vergleich der erhaltenen Sedimentationsprofile konnte gezeigt werden, dass durch die Veränderung der ATP Konzentration keine Hemmung der Replikationsinitiation bewirkt werden kann.

4.5.8.3. Zyklisches Guanosinmonophosphat

In vielen Fällen werden Signale in Zellen durch Proteinmodifikationen übertragen. So finden bei Replikationsproteinen Phosphorylierungen statt, durch die die Aktivität modifiziert werden kann. Die Phosphorylierungen werden dabei durch eine Reihe komplex regulierter Proteinkinase durchgeführt. Die Aktivitäten der beteiligten Proteinkinasen können dabei durch bestimmte Botenstoffe beeinflusst. Ein Botenstoff, der speziell auf das Protein G-Kinase, das am Anfang einer Kaskade steht, welche zur Phosphorylierung von Kernproteinen führt, einwirkt und dieses aktiviert ist cGMP. Durch cGMP kann in vivo bei verschiedenen Zelltypen die

Proliferation der Zellen gehemmt werden.²⁵ Die Wirkung wird dabei über eine Reihe von Proteinphosphorylierungen vermittelt. cGMP als niedermolekulare Substanz, die einen hemmenden Einfluss auf die Zellteilung hat, könnte auch die Replikation hemmend beeinflussen. Auch würde diese Substanz nach der Permeabilisierung die Zelle verlassen können. Der hemmende Effekt könnte also durch die Poren in der Zellmembran aufgehoben werden.

Hier sollte nun überprüft werden, ob durch diese niedermolekulare Substanz im speziellen auch die Initiation der Replikation, die im Laufe der Zellproliferation einen unerlässlichen Schritt darstellt, beeinflusst wird.

Durch Dosis-Wirkungs-Kurven mit cGMP konnte jedoch kein Einfluss auf den α -[³²P]-dATP-Einbau festgestellt werden. Durch diesen Stoff kann also in permeabilisierten HeLa-Zellen keine Hemmung der Replikation-Initiation erfolgen. Da davon auszugehen ist, dass die Proteine, die für die Weiterübermittlung in der Signaltransduktionskette an der cGMP teilnimmt verantwortlich sind die Zelle nicht verlassen können, ist dies ein Hinweis, dass kein Einfluss durch diesen Signalübertragungsweg auf die Replikation-Initiation vorliegt.

4.5.8.4. Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin

Einen alternativen Weg zur Signalübertragung durch Proteinphosphorylierung stellt die N-Acetylglucosaminylierung von Proteinen dar. Diese Modifikation des Proteins tritt dabei zum Teil in einer zur Phosphorylierung reziproken Weise auf. Die gleichen Aminosäurereste des Proteins können dabei Angriffspunkt für Phosphorylierungen und O-Glucosamin-N-Acylierungen sein. Diese Arten der Modifikation wurden für eine Reihe von Proteinen gezeigt, die an der Replikation in eukaryontischen Zellen beteiligt sind. Als Ausgangsstoff für die Modifikation der Proteine dient Uridindiphosphat-N-Acetyl-Glucosamin. Dies ist ein niedermolekularer Stoff und könnte deshalb nach Permeabilisierung aus den Zellen austreten. Die Modifikation von Proteinen durch O-Glc-NAc-Modifikation wäre dann nicht mehr möglich. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob durch Zusatz von UDPAG zum Permeabilisierungsmedium ein notwendiger Signalübertragungsweg wieder ermöglicht und die Hemmbarkeit so wieder hergestellt werden kann.

Durch eine Dosis-Wirkungs-Kurve für UDPAG konnte gezeigt werden, dass die Hemmbarkeit durch CHX in Anwesenheit dieser Substanz nicht wie in vivo vorliegt. Zwar ist der Ein-

²⁵ Yu, S., Hung, L., 1997

bau bei der Inkubation mit CHX niedriger als bei der Kontrolle. Es hat sich jedoch bei allen Einbauversuchen gezeigt, dass Zellen, die nach längerer Hemmung durch CHX permeabilisiert werden einen geringeren Einbau zeigen als Zellen, die nicht vorgehemmt waren. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Zellen sich in einer ungünstigeren Ausgangsposition für das Einbauexperiment befunden haben. Deutlich zu sehen ist jedoch, dass hier Einbau bei den vorgehemmten Zellen in Gegenwart von UDPAG stattfindet. Dies wäre nicht der Fall, wenn die Hemmung, wie sie in vivo besteht auch nach der Permeabilisierung noch aufrechterhalten werden könnte. Der Versuch zeigt also, dass auch in Gegenwart von UDPAG die Hemmung durch CHX nicht aufrechterhalten werden kann. Die Hemmung wird also offenbar nicht durch Proteinmodifikation mit N-Acetyl-Glucosamin übermittelt.

Die beiden Möglichkeiten zur Proteinmodifikation, die vorliegend untersucht wurden, konnten also nicht den gesuchten Effekt zeitigen, dass eine Hemmbarkeit der Replikon-Initiation bei permeabilisierten HeLa-Zellen infolge der Hemmung der Proteinbiosynthese auftritt.

4.5.8.5. Diadenosinoligophosphate als Signalübertragungsmoleküle

Eine Klasse von Signalübertragungsmolekülen, deren intrazelluläre Konzentration sich im Laufe des Zellzyklus stark verändert sind die Diadenosinoligophosphate²⁶. Die Wirkungen, die bei Zellen durch verschiedene Ap_nA erzielt werden sind mannigfaltig. Es werden verschiedene Funktionen im Zellkern für Ap_3A und Ap_4A berichtet. Dazu gehören auch Vorgänge wie die Steuerung der Zellteilung und die Vermittlung der Wachstumshemmung bei Krebszellen nach Einwirkung von Interferon. Ap_nA sind Moleküle von der Grösse, wie sie problemlos durch die α -Toxin Pore durchtreten können. Eine Verdünnung dieser Moleküle in das die Zellen umgebende Permeabilisierungsmedium ist deshalb möglich. Vorliegend sollte durch Zusatz von Ap_3A und Ap_4A zum Permeabilisierungsmedium festgestellt werden, ob ein Effekt dieser Substanzen vorliegt. In der Literatur wird eine Assoziation von Ap_nA mit kernständiger GAPDH berichtet. GAPDH findet sich dabei im Kern in direkter Assoziation an der Gabel der DNA-Replikation. Da GAPDH mit dem Kofaktor NAD oder NADH beladen ist, sollte vorliegend für die Versuche mit Ap_nA auch jeweils NAD oder NADH zugesetzt werden.

Bei Einbaukurven mit Ap_nA und entweder NAD oder NADH konnten vorliegend keine Unterschiede in der Einbauaktivität festgestellt werden. Offenbar kann durch den Zusatz dieser

²⁶ Kisselev, et. al., 1998

Substanzen die Hemmbarkeit nicht ermöglicht werden. Möglicherweise ist dafür eine komplexere Zusammensetzung aus verschiedenen A_p_nA nötig. Dies liegt nahe, da in vivo durch den Einfluss von Zellzyklus oder von Stoffen wie Interferon eine Veränderung der Konzentration mehrerer Diadenosinoligophosphate berichtet wird.²⁷ Dies führt dann jeweils zu einer Veränderung in deren Konzentrationsverhältnis. Durch den einfachen Zusatz eines der Diadenosinoligophosphate kann die Hemmbarkeit der Replikon-Initiation bei permeabilisierten Zellen nicht bewirkt werden.

4.6. Abschliessende Bewertung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei permeabilisierten HeLa-Zellen die Initiation der Replikation der zellulären DNA nicht gehemmt werden kann. Zwar besteht Hemmbarkeit des Einbaus von α -[³²P]-dATP durch Hemmstoffe die an der DNA-Polymerase angreifen. Durch diese Hemmstoffe wird jedoch nicht die Initiation der Replikons sondern deren Elongation gehemmt. Eine Hemmung der Replikationsinitiation, wie sie in vivo als Folge verschiedener Hemmsituationen auftritt, ist in permeabilisierten Zellen nicht beobachtet worden.

Bei den Versuchen, diese Hemmbarkeit auch in permeabilisierten Zellen wiederherzustellen, wurde zuerst untersucht, ob das Fehlen der Replikationsregulation durch einen Bestandteil des Mediums oder durch eine physiko-chemische Veränderung der Zellen infolge der Permeabilisierung hervorgerufen wird. Bei diesen Versuchen konnte keiner der getesteten Faktoren als Ursache für das Ausbleiben der Initiationshemmung identifiziert werden. Danach sollte versucht werden ausfindig zu machen, ob eine Beeinflussung der Initiationstätigkeit durch Nukleotide möglich ist. Jedoch wurde auch hier kein aufschlussreiches Ergebnis erhalten. Hierauf wurde getestet, ob cytosolische Extrakte aus gehemmten Zellen eine Substanz enthalten, die die Initiation hemmen. Da keinerlei hemmender Effekt der Extrakte festgestellt werden konnte, musste diese Möglichkeit ausgeschlossen werden. Schließlich sollte untersucht werden, ob der metabolische Zustand der Zelle, der sich in Form der Quotienten der Konzentrationen von ATP und ADP und zum anderem der Konzentrationen von NAD und NADH ausdrückt, einen Einfluss auf die Replikon-Initiation hat. Bei diesen Versuchen konnte wiederum kein Einfluss auf die Replikation gezeigt werden. Zuletzt wurden noch einige niederno-

²⁷ Kisselev, et al., 1998

lekulare Signalübertragungstoffe auf ihre Wirksamkeit in bezug auf die Replikationsinitiation getestet. Auch hier konnte kein Effekt beobachtet werden.

Mit den untersuchten Faktoren ist also eine Herstellung der Hemmbarkeit der Replikationsinitiation nicht möglich.

Dieses Ergebnis kann zweierlei bedeuten.

Die erste Möglichkeit für die Erklärung der fehlenden Hemmbarkeit der Replikations-Initiation postuliert, dass das Permeabilisierungsmedium einen aktivierenden Parameter enthalte. Bei den hier angestellten Untersuchungen konnte kein einzelner Faktor, der durch die Permeabilisierung verändert wird, als ursächlich für das von der in vivo Situation abweichende Verhalten befunden werden. Da für jede einzelne Substanz Einbauwerte in deren Abwesenheit und in deren Gegenwart durchgeführt wurden, kann ausgeschlossen werden, dass eine der Substanzen eine aktivierende Auswirkung hat. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass ein Parameter der Zellen – sei es ein Verhältnis verschiedener Substanzen oder eine einzelne Substanz – der in vivo die Hemmung bewirkt, in den Zellen durch Permeabilisierung verändert wird, oder aus den Zellen austritt. Infolgedessen findet nach Permeabilisierung ungehemmte Replikation statt. Dieser Hypothese folgend kann vermutet werden, dass diese gesuchte Substanz in einem Gesamt-Cytosol aus gehemmten Zellen vorhanden ist. Dies konnte jedoch nicht gezeigt werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es sich um eine kurzlebige Substanz handelt, die bei der Gewinnung der Extrakte, oder auch beim Einsatz im Permeabilisierungsmedium inaktiviert wird. Dies könnte durch schnelle Zerstörung der Substanz bei der Extraktion geschehen. Eine andere Möglichkeit ist die Reaktion mit Bestandteilen des Permeabilisierungsmediums. Auch erscheint es möglich, dass die hemmende Substanz in vivo nicht frei existiert, sondern in einer assoziierten Form im Kern vorliegt. Dann würde sich die Substanz der Extraktion mit den angewendeten Methoden entziehen.

Das Ergebnis, dass kein Effekt der cytosolischen Extrakte gezeigt werden konnte, schließt in jedem Fall die Anwesenheit einer hemmenden Substanz in den gehemmten Zellen nicht aus. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass in dem erhaltenen Extrakt keine aktive Substanz vorhanden ist. Aus diesem Grund war es sinnvoll, weitere Parameter, die einen hemmenden Einfluss haben könnten dem Permeabilisierungsmedium zuzusetzen. Bei diesen Untersuchungen konnte jedoch keine Hemmbarkeit erhalten werden. Dies zeigt, dass keine der Substanzen

in der eingesetzten Form die gesuchte Aktivität zeigt. Der Grund dafür kann darin liegen, dass auch *in vivo* tatsächlich keine dieser Substanzen an der Regulation beteiligt ist. Es ist jedoch auch denkbar, dass für die Aktivität der getesteten Substanzen ein komplexes Verhältnis verschiedener Einzelsubstanzen erforderlich ist. Dann müssten weitere Bemühungen um die Regulierbarkeit sich auf die Untersuchung sinnvoller Kombinationen effektorischer Substanzen konzentrieren. Auch die Gegenwart von Spurenelementen im Permeabilisierungsmedium sollte dabei erwogen werden.

Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass der Zustand, in dem sich der regulierende Parameter *in vivo* befindet durch Inhaltstoffe aus dem Permeabilisierungsmedium verändert wird. Dies würde bedeuten, dass durch die Zusätze, die das Permeabilisierungsmedium mitbringt so stark in den Zustand der Zelle eingegriffen wird, dass diese zu den physiologischen Regulationswegen nicht mehr in der Lage ist. In diesem Fall wäre das vorliegende System zur Untersuchung der Replikation mit permeabilisierten HeLa-Zellen ungeeignet, um die Regulation der Replikon-Initiation zu verfolgen.

5. Zusammenfassung

HeLa-Zellen können durch α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* für niedermolekulare Substanzen bis ungefähr 2 kD permeabel gemacht werden. Durch die Bereitstellung eines geeigneten Mediums kann in HeLa-Zellen, die auf diese Weise permeabilisiert wurden, Replikation stattfinden. Nach der Permeabilisierung replizieren HeLa-Zellen im Vergleich zu intakten Zellen verlangsamt. Die einzelnen Schritte der Replikation – Initiation, Elongation, Termination – finden jedoch in geregeltem Ablauf wie in vivo statt.

Die Replikation in permeabilisierten HeLa-Zellen kann durch Hemmung der prozessiven DNA-Polymerisation unterbunden werden. Durch Hemmung der Proteinbiosynthese, Hypoxie oder Hydroxyharnstoff kann jedoch kein Einfluss auf die Replikation genommen werden. Nach der Permeabilisierung ist die Replikation also nicht mehr in gleicher Weise wie in vivo regulierbar.

Bei der radioaktiven Markierung von replizierender DNA in permeabilisierten HeLa-Zellen akkumuliert eine Klasse kurzketziger Moleküle. Die Länge dieser Nukleotidketten beträgt von 16–100 nt. Es treten diskrete Grössenklassen von Molekülen auf. Diese können bei verlängerter Inkubation in gereifte DNA eingebaut werden. Auch enthalten diese Moleküle einen alkalilabilen Anteil. Bei diesen Intermediaten handelt es sich wahrscheinlich um Primer der Replikation.

Die nach der Permeabilisierung synthetisierte DNA wird offenbar nicht vollständig aus den im Permeabilisierungsmedium enthaltenen Nukleotidbausteinen hergestellt. Die Zelle scheint nach der Permeabilisierung noch zur Synthese von Bausteinen in der Lage zu sein. Dies ist am ehesten denkbar, wenn man ein Chanelling der Intermediate von der Ausgangsverbindung bis zur DNA-Polymerase annimmt. Andernfalls würden die Biosyntheseprodukte sehr stark durch das angebotene Medium verdünnt.

Der Unterschied in der Regulierbarkeit zwischen intakten HeLa-Zellen und permeabilisierten Zellen konnte nicht auf direkte Effekte der Zerstörung der Zellwand zurückgeführt werden. Auch konnte unter Zuhilfenahme einer grossen Zahl von in Frage kommenden Parametern keine Möglichkeit gefunden werden, diesen Unterschied aufzuheben.

Das Replikationssystem der mit α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* permeabilisierten HeLa-Zellen ist also zur Darstellung der Replikation gut geeignet.

Die Regulation der Replikation ist jedoch im Vergleich zur in vivo Kontrolle verändert. Das System ist in der vorliegenden Form nicht geeignet, die Regulation der Initiation der Replikation zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

- Albert, D. A., Gudas, L. J. (1985): Ribonucleotide Reductase Activity and Deoxyribonucleoside Triphosphate Metabolism during the Cell Cycle of S 49 Wild-type and Mutant Mouse T-lymphoma Cells. *Journal of Biological Chemistry* 260, pp. 676–684.
- Bambara, R. A., Murante, R. S., Henricksen, L.A. (1997): Enzymes and Reactions at the Eukaryotic DNA Replication Fork. *Journal of Biological Chemistry* 272, pp. 4647–4650.
- Barlow, T., Eliasson, R., et al. (1983): Enzymic modification of a tyrosine residue to a stable free radical in ribonucleotide reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, pp. 1492–1495.
- Bayley, H. (1997): Künstliche Membranporen. *Spektrum der Wissenschaft*. S. 74–79.
- Bollinger, J. M., Edmondson, D. E. et al. (1991): Mechanism of Assembly of the Tyrosyl Radical-Dinuclear Iron Cluster Cofactor of Ribonucleotide Reductase. *Science* 253, pp. 292–298.
- Brischwein, K., Engelcke, M., Riedinger, H.- J., und Probst, H., 1997, Role of ribonucleotide reductase and deoxynucleotide pools in the oxygen-dependent control of DNA replication in Ehrlich ascites cells, *Eur. J. Biochem.* 379.
- Carlberg, U., Nilsson, A, et al. (1991): Increased Activity of the eEF-2 Specific, Ca²⁺ and Calmodulin Dependent Protein Kinase III During the S-phase in Ehrlich Ascites Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 180, pp. 1372–1376.
- Carlberg, U., Nilsson, A., Nygård, O. (1990): Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *FEBS Letters* 191, pp. 639–645.
- Catapano, C. V., Kimberley, B., et al. (1991): Inhibition of Primer RNA Formation in CCRF-CEM Leukemia Cells by Fludarabine Triphosphate. *Cancer Research* 51, pp. 1829–1835.
- Coleman, G. (1984): Short Communication. *Journal of General Microbiology* 131, pp. 405–408.
- Davydova, E. K., Malinin, N. L., Ovchinnikov, L. P. (1993): Ribosomes terminated in vitro are in a tight association with non-phosphorylated elongation factor 2 (eEF-2) and GDP. *FEBS Letters* 215, pp. 291–296.

- Dutia, B. M., Frame, M. C., et al. (1986): Specific inhibition of herpesvirus ribonucleotide reductase by synthetic peptides. *Nature* 321, pp. 439–443.
- Eger, F. (1995): Durch Staphylococcus α -Toxin permeabilisierte Zellen als System des Studiums der DNA-Replikation, Diplomarbeit an der Universität Tübingen.
- Eliasson, R., Fontecave, M. et al. (1990): The anaerobic ribonucleoside triphosphate reductase from *Escherichia coli* requires S-adenosylmethionine als a cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, pp. 3314–3318.
- Eliasson, R., Jörnvall, H., Reichard, P. (1986): Superoxide dismutase participates in the enzymatic formation of the tyrosine radical of ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, pp. 2373–2377.
- Elledge, S. J., Zhou, Z., et al. (1993): DNA Damage and Cell Cycle Regulation of Ribonucleotide Reductase. *BioEssays* 15, pp. 333–338.
- Eriksson, S., Gräslund, A., et al (1984): Cell Cycle-dependent Regulation of Mammalian Ribonucleotide Reductase. *Journal of Biological Chemistry* 259, pp. 11695–11700.
- Fontecave, M., Eliasson, R., Reichard, P. (1987): NAD(P)H: Flavin Oxidoreductase of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 262, pp. 12325–12331.
- Gekeler, V. (1982): Synchronisation von Replikationseinheiten von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, Dissertation an der Universität Tübingen.
- Gekeler, V., Epple, J, Kleymann, G., Probst, H. (1993): Selective and Synchronous Activation of Early-S-Phase Replicon of Ehrlich Ascites Cells. *Molecular and Cellular Biology* 13, pp. 5020–5033.
- Gekeler, V., Epple, J., Kleymann, G. und Probst, H. (1993): Selective and Synchronous Activation of early-S-Phase replicons of Ehrlich Ascites Cells, *Mol. And Cell. Biol.* 13, pp. 5020–5033
- Gekeler, V., Wilisch, A., Probst, G., Kugel, A., Brischwein, K., Engelcke, M., und Probst, H. (1993): Staurosporine suppresses replicon initiation in mammalian cells, *FEBS Letters* 327, pp. 150–156.
- Gilbert, D. M., Neilson, A. et al. (1995): Mimosine Arrests DNA Synthesis at Replication Forks by Inhibiting Deoxyribonucleotide Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 270, pp. 9597–9606.

- Gouaux, J. E., Braha, O. et al. (1994): Subunit stoichiometry of staphylococcal α -hemolysin in crystals and on membranes: A heptameric transmembrane pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, pp. 12828–12831.
- Griffiths, N. M., Ogden, P. H., Cormack, R., Lamb, J.F. (1991): Discrepancy between the short and long term effects of ouabain on the sodium pumps of human cells grown in culture. *Br. J. Pharmacol* 104, pp. 419–427.
- Gschwendt, M., Kittstein, W., Marks, F. (1994): Elongation factor-2 kinase: effective inhibition by the novel protein kinase inhibitor rottlerin and relative insensitivity towards staurosporine. *FEBS Letters* 338. Pp. 85–88.
- Hand, R. (1968): Eucaryotic DNA: organisation of the genome replication. *Cell* 15, pp. 217–325.
- Hausser, H.-J. (1984): Untersuchung zum diskontinuierlichen DNA-Wachstum in Ehrlich-Ascites-Zellen in Vivo, Diplomarbeit an der Universität Tübingen.
- Jonas, D., Walev, I., et al. (1994): Novel Path to Apoptosis: Small Transmembrane Pores Created by Staphylococcal Alpha-Toxin in T Lymphocytes Evoke Internucleosomal DNA Degradation. *Infection and Immunity* 62, pp. 1304–1312.
- Kauppi, B., Nielsen, B., et al. (1996): The Three-dimensional Structure of Mammalian Ribonucleotide Reductase Protein R2 Reveals a More-accessible Iron-radical Site than *Escherichia coli* R2. *JMB* 262, pp. 706–720.
- Kisselev, L. :, Justesen, J., et al. (1998): Diadenosine oligophosphates (Ap_nA), a novel class of signalling molecules? *FEBS Letters* 427. Pp. 157–163.
- Krasilnikov, O. V., Capistrano, M.-F. P. et al. (1997): Influence of Cys-130 *S. aureus* Alpha-toxin on Planar Lipid Bilayer an Erythrocyte Membranes. *Journal of Membrane Biology* 156, pp. 157–172.
- Krude, T., Jackman, M., et al. (1997): Cyclin/Cdk-Dependent Initiation of DNA Replication in a Human Cell-Free System, *Cell* 88, pp. 109–119.
- London, E. (1992) Diphtheria toxin: membrane interaction and membrane translocation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1113, pp. 25–51.
- Ludlum, Warner (1965): *J. Biol. Chem.* 240, p. 2961.

- Magnusson, G., Winnacker, E.-L., Eliasson, R. und Reichard, P. (1972): Replication of Polyoma DNA in Isolated Nuclei, *J. Mol. Biol.* 72, pp. 539–552.
- 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 an der Universität Tübingen.
- Mosca, P. J., Lin, H.-B., Hamlin, J. L. (1995): Mimosine, a novel inhibitor of DNA replication, binds to a 50 kDa protein in Chinese hamster cells. *Nucleic acids Research* 23, pp. 261–268.
- Nethanel, T, Reisfeld, S., et al. (1988): An Okazaki Piece of Simian Virus 40 may be Synthesized by Ligation of Shorter Precursor Chains. *Journal of Virology* 62. Pp. 2867–2873.
- Nethanel, T., Kaufmann, G. (1990): Two DNA Polymerases May be required for Synthesis of the Lagging DNA Strand of Simian Virus 40. *Journal of Virology* 64. Pp. 5912–5918.
- Nethanel, T., Zlotkin, T., Kaufmann, G. (1992): Assembly of Simian Virus 40 Okazaki Pieces from DNA Primers Is Reversibly Arrested by ATP Depletion. *Journal of Virology* 66, pp- 6634–6640.
- Nilsson, A., Nygård, O. (1995): Phosphorylation of eukaryotic elongation factor 2 in differentiating and proliferating HL-60 cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1268, pp. 263–268.
- Nilsson, L., Nygård, O. (1992): Reduced puromycin sensitivity of translocated polysomes after the addition of elongation factor 2 and non-hydrolysable GTP analogues. *FEBS Letters* 309. pp. 89–91.
- Olofsson, A., Kavéus, U. (1992): The Three-Dimensional Structure of Trypsin-Treated *Staphylococcus aureus* α - Toxin. *Journal of Structural Biology* 108, pp. 238–244.
- Olofsson, A., Herbert, H., Thelestam, M. (1991): The Structure of *Staphylococcus aureus* α -toxin: Effects of Trypsin Treatment. *Journal of Structural Biology* 106, pp. 199–204.
- Palmquist, K., Riis, B., et al. (1994): Interaction of the calcium and calmodulin regulated eEF-2 kinase with heat shock protein 90. *FEBS Letters* 349, pp. 239–242.
- Pappenheimer, A. M. jr. (1977): Diphtheria Toxin. *Ann. Rev. Biochem* 46, pp. 69–94.

- Probst, G., Riedinger, H.-J. et al. (1999): Fast control of DNA replication of HeLa cells responding to hypoxia and to inhibited protein synthesis.
- Probst, H., Gekeler, V. (1980): Reversible Inhibition of Replicon Initiation in Ehrlich Ascites Cells by Anaerobiosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94, pp. 55–60.
- Probst, H., Gekeler, V. (1988): Oxygen Dependent Regulation of DNA Replication of Ehrlich Ascites Cells In Vitro and In Vivo. *Oxygen Sensing in Tissues*, pp. 78–92.
- Probst, H., Riedinger, H.-J., Gekeler, V. (1989): No Significant Overreplicaion Occurs in Ehrlich Ascites Cells during and after Reversal of Hypoxia. *Experimental Cell Research* 180, pp. 563–568.
- Probst, H., Schiffer, H. et al. (1988): Oxygen Dependent Regulation of DNA Synthesis an Growth of Ehrlich Ascites Tumor Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Research* 48, pp. 2053–2060.
- Probst, H., Schiffer, H., Gekeler, V., Kienzle-Pfeilsticher, H., Stropp, U., Stötzer, K.-E., und Frenzel-Stötzer, I. (1988): Oxygen Dependent Regulation fo DNA Synthesis and Growth of Ehrlich Ascites tumor Cells in Vitro and in Vivo, *Cancer Research* 48, pp. 2053–2060.
- Redpath, N. T., Price, N. T. et al. (1993): Regulation of elongation factor-2 by multisite phosphorylation. *FEBS Letters* 213. Pp. 689–699.
- Reichard, P. (1987): Regulation of Deoxyribotide Synthesis. *Biochemistry* 26, pp. 3245–3248.
- Riedinger, H.-J., Gekeler, V., Probst, H. (1992): Reversible shutdown of replicon initiation by transcient hypoxia in Ehrlich ascites cells. *FEBS Letters* 210, pp. 389–398.
- Riedinger, H.-J., Gekeler, V., und Probst H. (1992): Reversible, shutdown of replicon initiation by transient hypoxia in Ehrlich ascites cells, *Eur. J. Biochem.* 210, pp. 389–398
- Ryazanov, A. G., Rudkin, B. B., Spirin, A. S. (1991), Regulation of protein synthesis at the elongation stage. New insights into the control of gene expression in eukaryotes. *FEBS Letters* 285. pp. 170–175.
- Schmitz, B, Griffith, L. S. (1998): *Biospektrum* 4 . S. 25–28.

- Schulte, D., Knippers, R., et al. (1992): Cycloheximide inhibits cellular, but not SV 40, DNA replication, FEBS Letters 299, pp.149–154.
- Shestakova, E. A., Motuz, L. P., Gavrilova, L. P. (1993): Co-Localization of Components of the protein-synthesizing Machinery with the Cytoskeleton in G₀-arrested Cells. Cell Biology International 17, pp. 417–422.
- Song, L., Hobaugh, M. R. et al (1996): Structure of Staphylococcal α -Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore. Science 274. pp. 1859–1866.
- Stubbe, J. A. (1989): Protein radical Involvement in biological Catalysis? Annu. Rev. Biochem. 58, pp. 257–285.
- Stubbe, J. A. (1990): Ribonucleotide Reductases: Amazing and Confusing. Journal of Biological Chemistry 265, pp. 5329–5332.
- Sushasini, M., Li, H., et al. (1997): Cyclic-GMP-Dependent Protein Kinase Inhibits the Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. Molecular and Cellular Biology 18. pp. 6983–6994.
- Thelander, M., Gräslund, S., Thelander, L. (1985): Subunit M2 of Mammalian Ribonucleotide Reductase. Journal of Biological Chemistry 260, pp. 2737–2741.
- Tomita, T., Kamio, Y. (1997): Molecular Biology of the Pore-forming Cytolysins from Staphylococcus aureus, α - and γ -Hemolysins and Leukocidin. Biosci. Biotech. Biochem. 61, pp. 565–572.
- Trinkle-Mulcahy, L., Siegman, M. J., Butler, Th. M. (1994): Metabolic characteristics of α -toxin-permeabilized smooth muscle. American Physiological Society, pp. 1673–1683.
- Trummler, K. (1995): Untersuchungen zur Eignung permeabilisierter Zellen zum Studium der eukaryontischen DNA-Replikation unter Sauerstoffmangel, Diplomarbeit an der Universität Tübingen.
- Uhlmann, F. (1994): Diplomarbeit an der Universität Tübingen.
- Valeva, A, Weisser, A., et al. (1995): Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal α -toxin. EMBO-Journal 15, pp. 1857–1864.

- Vandana S., Raje, M., Krishnasastry, M. V. (1997): The Role of the Amino Terminus in the Kinetics and Assembly of α -Hemolysin of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 272. pp. 24858–24863.
- Vásquez, D.: *Inhibitors of protein biosynthesis*. Springer Verlag 1979.
- Venter, B. R., Kaplan, N. O. (1976): Diphtheria Toxin Effects on Human Cells in Tissue Culture. *Cancer Research* 36. pp. 4590–4594.
- Walker, B., Krishnasastry, M., Bayley, H. (1993): Functional Complementation of Staphylococcal α -Hemolysin Fragments. *Journal of Biological Chemistry* 268, pp. 5285–5292.
- Yu, S. M., Hung, L. M., Lin, C. C. (1997): cGMP-elevating agents suppress proliferation of vascular smooth muscle cells...*Circulation* 95, pp. 1269–1277.
- Zachary, I. (1997): Focal Adhesion Kinase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, pp. 929–934.
- Zoller, H.-J. (1991): *Reinigung von alpha-Toxin von Staphylococcus aureus und dessen zellbiologische Anwendung*, Dissertation an der Universität Ulm.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren:

Anatomie	Reutter
Anorganische Biochemie	Weser
Anorganische Chemie	Lindner, Strähle, Weser
Biochemie	Bohley, Eisele, Hamprecht, Mecke, Probst, Weber, Weser, Wiesinger
Botanik	Mayer, Metzner, Ninnemann
Enzymologie	Bisswanger
Genetik	Büsen, Pelling, Schöffel
Immunologie	Anderer
Mathematik	Pommer
Mikrobiologie	Braun, Poralla, Winkelmann
Organische Chemie	Bayer, Hagenmaier, Hanack, Jung
Pflanzenphysiologie	Ninnemann, Schilde
Pharmakologie und Toxikologie	Breyer-Pfaff, Pfaff, Werringloer
Physikalische Chemie	Hoffmann, Gauglitz,
Physik	Nakel, Wagner
Physikalische Biochemie	Voelter
Strahlenschutzkunde	Bohley, Kallee, Reinecke, Probst
Theoretische Chemie	Seelig
Zoologie	Günzel, Pfeiffer

Tabellarischer Lebenslauf:

Name:	Peter Erwin Martin
Geboren:	14. April 1971 in Schweinfurt
Eltern	Friedmund Martin Amanda Martin geb. Saalmüller
Familienstand:	verheiratet, zwei Kinder
Schulbildung:	1977–1981 Grundschule Schonungen 1981–1990 Alexander-von-Humboldt-Gymnasium Schweinfurt
Wehrdienst.	1990–1991 Alfred-Delp-Kaserne Donauwörth
Studium	1991–1997 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen Oktober 1992 1. Teil der Diplomvorprüfung April 1994 2. Teil der Diplomvorprüfung März 1997 Diplomhauptprüfung 1993–1997 Studium der Informatik an der Eberhard-Karls- Universität Tübingen 1997–2001 Studium der Rechtswissenschaft an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen März 2001 1. Juristische Staatsprüfung
Diplomarbeit:	April 1997–November 1997 am Physiologisch-Chemischen Institut der Uni- versität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Probst über den Einsatz der Per- meabilisierung von HeLa-Zellen mit Alpha- Toxin aus Staphylococcus aureus zur Untersu- chung der zellulären Replikation.
Dissertation:	Januar 1998–Mai 2001 unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Probst am Physiologisch-Chemischen Institut der Univer- sität Tübingen mit dem Thema: Untersuchung des molekularen Mechanismus der schnellen Regulation der DNA-Replikation an mit Alpha-Toxin aus S. aureus permeabili- sierten Kulturzellen

