

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. D. Mecke

Replikation an der Kernmatrix von SV40-infizierten CV1 Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Florian Prinz
aus Stuttgart

2001

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Probst
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Jahn

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Simian Virus 40	2
1.3	Zellkern und Kernmatrix	4
1.4	Synchronisation der SV40-Replikation in vivo	6
1.5	Ziel der Arbeit	7
2	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Materialien.....	9
2.1.1	Zellen	9
2.1.2	Viren	9
2.1.3	Kulturgefäße	9
2.1.4	Kulturmedien	10
2.1.4.1	Zellkulturmedium	10
2.1.4.2	Bakterienmedien	10
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	11
2.1.5.1	Allgemeine Lösungen	11
2.1.5.2	Lösungen für Agarosegelelektrophorese	11
2.1.5.3	Lösungen für Hybridisierungen	12
2.1.5.4	Lösungen für die Säurefällung von DNA	13
2.1.6	Radiochemikalien	13
2.1.7	Enzyme	13
2.1.8	Gase	14
2.1.9	Szintillatoren, Filter, Membranen und Filme	14

2.1.10	Gelmaterial	14
2.1.11	Sonstige Chemikalien	15
2.1.12	Sonstige Materialien	15
2.1.13	Geräte.....	15
2.1.14	M13-Sonden	15
2.2	Methoden.....	17
2.2.1	Zellkultur	17
2.2.2	SV40-Viruskulturen.....	17
2.2.2.1	Infektion von CV1-Zellen mit SV40	17
2.2.2.2	Herstellung von SV40-Stocklysaten.....	17
2.2.2.3	Isolierung von SV40-DNA aus Stocklysaten und StyI-Verdau von SV40-DNA	18
2.2.3	Durchführung eines Hypoxieversuchs.....	19
2.2.4	Agarosegelelektrophorese.....	20
2.2.4.1	Neutrale Agarosegele.....	20
2.2.4.2	Alkalische Agarosegele	20
2.2.5	Phenol- und Chloroformextraktion.....	21
2.2.6	Ethanol-fällung von DNA.....	21
2.2.7	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	22
2.2.8	Abschätzen sehr kleiner DNA-Konzentrationen in Agarosegelen	22
2.2.9	Southern Transfer	22
2.2.10	DNA-DNA-Hybridisierung	23
2.2.11	Autoradiographie	23
2.2.12	Radioaktive Markierung von Gensonden	24
2.2.12.1	Markierung durch Polynucleotid-Kinase.....	24
2.2.12.2	Random Primed Labeling	24
2.2.13	Reinigung von DNA durch Spindialyse (Gelfiltration).....	25
2.2.14	Säurefällbare Radioaktivität in wässrigen DNA-Lösungen.....	26
2.2.15	Präparation der einzelsträngigen Sonden auf der Basis von M13- Bakteriophagen	26
2.2.15.1	Transformation von <i>E. coli</i> GW5100-Zellen.....	26
2.2.15.2	Überprüfung der präparierten Sonden	27

2.2.16	Isolierung kernmatrixassoziierter DNA.....	28
2.2.16.1	Präparation der matrixgeschützten DNA aus isolierten Kernen.....	28
2.2.16.2	<i>In situ</i> Präparation der matrixgeschützten DNA mit DNaseI	29
2.2.16.3	<i>In situ</i> Präparation der matrixgeschützten DNA mit Mikrokokusnuklease.....	30
2.2.16.4	Direkte DNA-Längenbestimmung.....	31
2.2.17	Umgekehrte Hybridisierung	31
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	33
3.1	Präparationsbedingungen und Analysemethoden für kernmatrix- geschützte DNA	34
3.1.1	Funktionsfähigkeit von Nukleasen zur Präparation von kernmatrix- geschützter DNA unter verschiedenen Puffer- und Salzbedingungen.....	34
3.1.2	Darstellbarkeit der präparierten DNA: Qualitätskontrolle durch analytische Gele und Southern Blot	38
3.2	Protokolle zur Präparation der Kernmatrix	41
3.2.1	Matrixpräparation aus isolierten Kernen	41
3.2.2	<i>In Situ</i> Präparation der Kernmatrix.....	47
3.2.2.1	Bilanzierung der Abreicherung nicht verdaugeschützter DNA.....	48
3.2.2.2	Größenverteilung der ³ H-markierten DNA.....	53
3.2.2.3	Größenverteilung der ³² P-markierten DNA	55
3.2.3	Hochsalzresistenz von SV40-DNA in infizierten Zellen durch schrittweise Hochsalzextraktion.....	60
3.3	Umgekehrte Hybridisierung.....	64
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	71
5	LITERATUR	73

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Calf intestine alkaline phosphatase)
cpm	Impulse pro Minute (Counts per minute)
dATP	3'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	3'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	3'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dd	doppelt destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (...-tetraacetic acid)
FCS	Fötale Kälber-Serum (Foetal calf serum)
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kB	Kilobasen
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
min	Minute(n)
Mio	Millionen
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NaPP _i	Natriumpyrophosphat
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
S-Phase	Synthese-Phase
sc	überspiralisiert (supercoiled)
sec	Sekunde(n)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (Sodium dodecylsulfate)
SSC	Standard Sodium Saline
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA (.../Acetic acid/...)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/ETDA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit (Enzymaktivität)
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

In der gesamten belebten Natur ist die identische Verdoppelung (Replikation) der Genome Voraussetzung für Wachstum und Vermehrung.

Am besten untersucht sind die molekularen Mechanismen der Replikation des ringförmigen, etwa $4,2 \times 10^6$ Basenpaare großen DNA-Genoms von *Escherichia coli*. Man kann die Replikation von DNA-Genomen in drei Phasen unterteilen:

- in eine Initiationsphase, in der die Replikation an einem bestimmten Replikationsursprung (Origin) beginnt,
- in eine Elongationsphase, bei der sich zwei Replikationsgabeln in entgegengesetzter Richtung vom Replikationsursprung weg bewegen und
- in eine Terminationsphase, in deren Verlauf die beiden selbständigen Tochtergenome entstehen.

Die DNA-Synthese zellulärer Genome höherer Zellen findet meist nach dem Replikationsgabel-Mechanismus statt. Dabei kommt es zunächst zur Bindung eines oder mehrerer Proteine an den Replikationsursprung und zur lokalen DNA-Entwindung, anschließend wird ein RNA-Primer gebildet und davon ausgehend DNA synthetisiert. Die DNA-Synthese erfolgt immer in 5' → 3'-Richtung. Dabei entsteht der eine Strang kontinuierlich, der andere aber diskontinuierlich in Form kurzer, RNA-"geprimter" Stücke, sogenannter Okazaki Fragmente (Voet, 1995).

Während es bei Prokaryoten nur einen einzigen Replikationsursprung (Origin) im Hauptgenom gibt, von dem aus sich die beiden Replikationsgabeln bidirektional in entgegengesetzte Richtungen bewegen, beginnt die eukaryotische DNA-Synthese an vielen Stellen gleichzeitig. Dies ist notwendig, da beispielsweise das haploide menschliche Genom rund $2,9 \times 10^9$ Basenpaare enthält, so daß eine Replikation von einem einzigen Ursprung aus unverträglich lange Zeit dauern würde.

Bei höheren Zellen ist daher eine übergeordnete zeitliche Koordination und Regulation vieler tausend Replikationseinheiten (Replikons) nötig. Dabei darf die Expression

wichtiger Gene während der mehrere Stunden dauernden S-Phase nicht lange unterbrochen werden.

Die Aufklärung der Mechanismen der eukaryotischen Replikation ist bis heute noch nicht in allen Einzelheiten gelungen. Dies liegt unter anderem an der Komplexität des eukaryotischen Genoms, der zeitlichen Organisation der Replikation verschiedener Replikons und an der Tatsache, daß Origins höherer Eukaryoten noch nicht mit Sicherheit identifiziert werden konnten (Prinz, 1995).

Als Modellsysteme für die Untersuchung eukaryotischer Replikationsmechanismen werden deshalb virale Systeme verwendet, da diese nur einen definierten Replikationsursprung pro Genom haben, der bei verschiedenen Viren sehr gut bekannt ist. Darüber hinaus wird in infizierten Zellen in späteren Stadien überwiegend nur virale DNA repliziert. Dies erleichtert die Analyse im Vergleich zur Replikation zellulärer DNA sehr, wo extrem viele unterschiedliche Replikationseinheiten gleichzeitig aktiv sind.

1.2 Simian Virus 40

Das Papovavirus SV40 (simian virus 40) ist ein Doppelstrang-DNA-Virus. Sein 5243 bp großes Genom liegt in Form eines geschlossenen Rings vor und bildet - mit zellulären Histonen assoziiert - ein "Minichromosom" (Voet, 1995). Das Genom des SV40 kodiert für wenige Proteine: drei Strukturproteine sowie das kleine und das große Tumor-Antigen (T-Antigen).

Die Replikation des SV40 erfolgt - abgesehen vom großen T-Antigen, das als Erkennungsprotein für den Replikationsursprung, als Ursprungsschmelzprotein und als Helikase fungiert - ausschließlich mittels zellulärer Proteine des Wirtes, so daß sich dieses System sehr gut als vereinfachtes Modellsystem für die zelluläre Replikation eignet (Schirmbeck, 1991). Das große T-Antigen bildet dabei Komplexe mit zellulären Molekülen, wie z.B. DNA-Polymerase α (Gannon, 1987; Harper, 1985). Darüber hinaus tritt das große T-Antigen mit zellulärem Chromatin und der Kernmatrix in Wechselwirkung, so daß es in Assoziation mit diesen Strukturen gefunden werden kann (Harper, 1985; Staufenbiel, 1983; Schirmbeck, 1987).

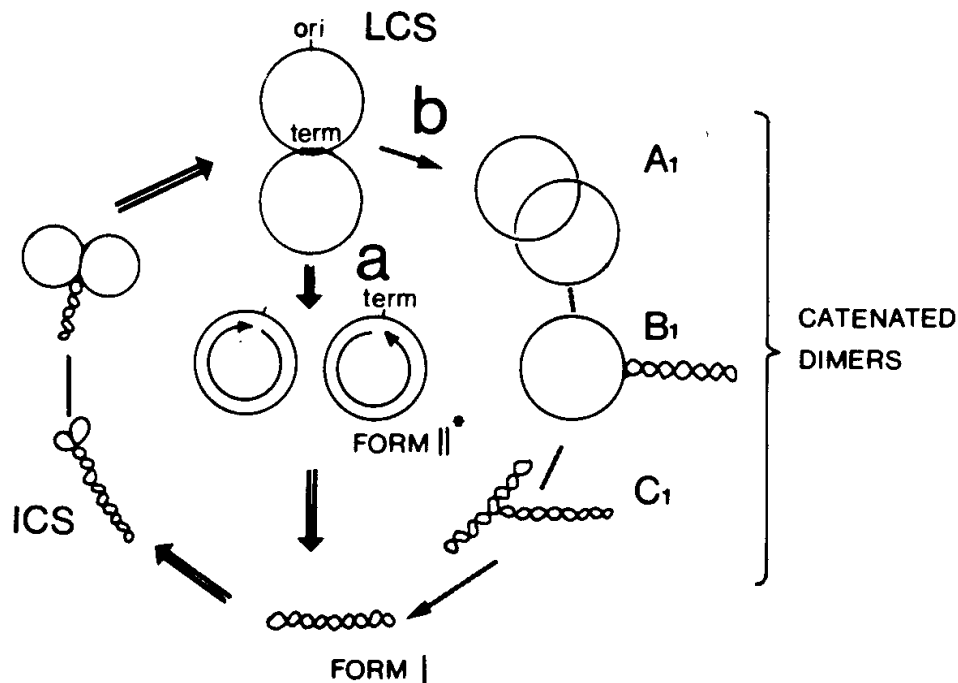


Abb. 1: Charakterisierung replizierender SV40 DNA Intermediate. Die Replikation des SV40 beginnt an einem Replikationsursprung (ori) auf superspiralisierten Form I-DNA-Molekülen. Die bidirektionale DNA-Synthese erzeugt intermediäre Cairns-Strukturen (ICS), die aus zwei relaxierten Ringen der wachsenden DNA besteht, während die "Mutter"-DNA ihre superhelikale Struktur beibehält. Die Elongation der wachsenden DNA-Ketten setzt sich fort, bis etwa 90% der DNA synthetisiert ist. Dann stoppen die Replikationsgabelapparate und es werden späte Cairns-Strukturen (LCS) gebildet. Die Trennung der beiden Tochterstränge aus den LCS erfolgt hauptsächlich über Form II*-Moleküle (a), die eine kleine Lücke in ihrer Terminationsregion (term) besitzen, die dann bei der Bildung reifer superspiralisierter Minichromosomen aufgefüllt wird. Daneben kann die Termination auch über eine dimere Katenat-Struktur erfolgen (b) (nach Deppert, 1995).

Untersuchungen zur Verteilung von reifer und replizierender SV40-DNA im Zellkern ergaben, daß replizierende Intermediate fest und quantitativ mit der Kernmatrix assoziiert sind (Schirmbeck, 1991) und daß sowohl die Replikation als auch die Termination an der Matrix ablaufen. Ein Großteil der neu synthetisierten reifen DNA bleibt mit der Matrix verbunden, während ein kleinerer Teil mit dem Chromatin assoziiert vorliegt. Ab etwa 36 Stunden nach der Infektion wird auch ein Nachweis der Viren im Cytoplasma möglich (Deppert, 1995).

1.3 Zellkern und Kernmatrix

Der Zellkern stellt eine komplexe dreidimensionale Struktur dar, der eine Vielzahl von Aufgaben, unter anderem bei der Organisation des Chromatins, der Regulation der Transkription, dem RNA-Splicing und der Genexpression, der DNA-Replikation und der DNA-Reparatur, wahrnimmt (Berezney, 1995).

Dabei sind die verschiedenen Vorgänge auf bestimmte räumliche Bereiche des Zellkerns beschränkt. Die Organisation der Kerndomänen scheint durch die sogenannte Kernmatrix (s.u.) vermittelt zu werden. Im Elektronenmikroskop stellt sich die strukturelle Komponente als stark verzweigtes filamentöses Kernskelett dar (He, 1990). Bei diesen Fasern findet man, ähnlich wie bei anderen Cytoskelett-Bestandteilen, eine sich wiederholende axiale Strukturierung (Jackson, 1988). Daneben findet man funktionell abgegrenzte Bereiche, z.B. sogenannte Replikations- und Transkriptions-"Fabriken" (Jackson, 1995).

Neuere Erkenntnisse zeigen, daß die eukaryotische Replikation an sehr großen Strukturen stattfindet, die neben allen wesentlichen Replikationsenzymen (unter anderem Polymerasen (Nakamura, 1986; Nakayasu, 1989)) auch Zellzyklusproteine, beispielsweise Cyclin A und cdk2 (Nickerson, 1995; Cardoso, 1993) enthalten. Diese Replikationsmaschinerie konnte auch elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Hozak, 1993).

Eine Markierung der frisch synthetisierten DNA erscheint zunächst an diesen relativ ortsfesten Replikationszentren (Hozak, 1993) und wird im weiteren Verlauf der Replikation in die umgebenden Bereiche verteilt, was darauf hinweist, daß sich die DNA während der Replikation durch die in der Maschinerie ortsfesten Replikationsgabeln hindurch bewegt (Hozak, 1993; Hozak, 1995).

In den Replikationszentren findet man Aggregate zahlreicher Doppelgabelapparate, die durch *in situ* Markierung nachgewiesen werden können. Eine gemeinsame Regulation mehrerer Replikationsursprünge während der S-Phase ist somit möglich.

Nach der Salzextraktion von Chromatinproteinen und des löslichen Kernmaterials behalten die DNA und einige Proteine der Replikationsgabeln ihre räumliche Anordnung innerhalb des Zellkerns bei, was darauf hindeutet, daß sie an einer gegen Hochsalzextraktion stabilen Struktur, die man Kernmatrix genannt hat, befestigt sind (Jackson, 1986; Pardoll, 1980; Berezney, 1982).

Bislang ist die Kernmatrix am besten operationell zu definieren: Es handelt sich um eine stabile, proteinhaltige Zellkernstruktur, die nach Nukleaseverdau und einer Reihe von Extraktionen, insbesondere durch hohe Konzentrationen an Neutralsalzen, erhalten werden kann (Berezney, 1974). Während dieser Extraktionen wird ein Großteil der Proteine, der RNA und der DNA, aus dem Zellkern entfernt.

Die einheitliche Definition der Kernmatrix stellt ein großes Problem dar, da die Kernmatrix meist über die Isolationsprotokolle definiert wird. Eine Vielzahl von verschiedenen Isolationsprotokollen liefert somit auch viele verschiedene "Matrices" mit unterschiedlicher Morphologie und Zusammensetzung. Bisher ist noch kein Protokoll entwickelt worden, das die Matrix, die im Zellkern einer lebenden Zelle existiert, eindeutig definiert (Nickerson, 1995).

Für die Bewertung eines Matrixisolationsprotokolls werden meist die biochemische Zusammensetzung und das morphologische Erscheinungsbild herangezogen.

Für die **biochemische Untersuchung** wird die relative Retention eines Proteins, beispielsweise RNA Polymerase II (Bikle, 1978), während der Matrixpräparation überprüft (Nickerson, 1995). Allerdings bleibt dabei unklar, ob es sich bei dem Ergebnis um ein Artefakt handelt oder nicht.

Die Wechselwirkung von Proteinen mit der Matrix kann durch spezielle Protokolle stabilisiert werden. Dies kann bei bereits bekannten Matrixproteinen angewandt werden (Belgrader, 1991), ist aber im Hinblick auf die Untersuchung neuer Matrixproteine problematisch, da hierbei unspezifische Wechselwirkungen stabilisiert oder neue erzeugt werden können.

Es ist auch möglich, daß durch Manipulationen oder Pufferbedingungen bei der Matrixpräparation Artefakte entstehen. So konnte gezeigt werden, daß sich die Länge von DNA-Schleifen zwischen zwei Anheftungsstellen der DNA an die Matrix in HeLa-Zellen allein durch Veränderung der Salzkonzentration zwischen 15 und 125 kB verändert (Jackson, 1990).

Die zweite Methode zur Bewertung von Matrixisolationsprotokollen besteht darin, das **Erscheinungsbild der präparierten Matrix** zu untersuchen und mit der Matrix intakter Zellen zu vergleichen. Bei der Isolation soll die Ultrastruktur im Zellkern abgebaut werden, die Matrixarchitektur aber unverändert bleiben. Der Vergleich kann lichtmikroskopisch mittels fluoreszierender Antikörper erfolgen. Eine sehr viel feinere Untersu-

chung erfolgt mittels Elektronenmikroskop, wofür spezielle Methoden entwickelt wurden (Capco, 1982; Fey, 1986; Capco, 1984; Pennman, 1995).

In der Praxis wird im wesentlichen zwischen zwei Matrixpräparationsverfahren unterschieden. Einerseits können zunächst Zellkerne isoliert werden, aus denen dann in mehreren Extraktionsschritten die Matrix präpariert wird. Bei der zweiten Methode (*in situ* Matrixpräparation nach Staufenbiel und Deppert) werden auf einer Petrischale festgewachsene Zellen verwendet und alle Schritte auf der Petrischale durchgeführt (Staufenbiel, 1984). Zahlreiche Untersuchungen haben die Vorzüge der *in situ* Matrixpräparation gegenüber konventionellen Methoden, die auf isolierten Zellkernen beruhen, in bezug auf Kernmorphologie und biochemische Eigenschaften gezeigt (Berezney, 1995).

1.4 Synchronisation der SV40-Replikation in vivo

Die Hypoxie, also das Absenken des Sauerstoffpartialdruckes, stellt eine schonende Methode der Synchronisierung des Zellzyklus dar. Es wird diskutiert, ob die Hypoxie auch eine regulatorische Funktion bei Tumorwachstum und bei der sehr frühen embryonalen Entwicklung hat (Probst, 1988).

Replikon-Initiationen lassen sich durch Absenken des Sauerstoffpartialdrucks auf 200 - 400 ppm reversibel hemmen, bereits initiierte Replikons werden unter diesen Bedingungen ("Hypoxie") teilweise verlangsamt zu Ende repliziert (Probst, 1988).

Bei Rückkehr zum normalen Sauerstoffpartialdruck im Medium ("Reoxygenierung") beginnen hypoxisch kultivierte Zellen synchron mit der Replikation der aufgestauten Replikons. Dabei sind alle für die Initiation notwendigen Faktoren bereits in der Zelle vorgebildet, eine mRNA- oder Proteinsynthese ist für die Initiation nicht mehr notwendig (Riedinger, 1991; Riedinger, 1992). Eine Hemmung der Proteinsynthese, beispielsweise durch Cycloheximid, bringt jedoch die Neuintiation von Replikons rasch zum Erliegen, so daß die Beteiligung eines kurzlebigen Proteins an der Initiation wahrscheinlich ist (Riedinger, 1991).

In SV40-infizierten Zellen wird die Replikation der viralen Replikons (=Genome) in gleicher Weise durch Hypoxie und Reoxygenierung beeinflußt, so daß eine Synchronisation der Virusreplikation in infizierten Zellkulturen möglich wird (Dreier, 1993).

Die Grundidee bei dieser Arbeit basiert auf der inzwischen gut abgesicherten Hypothese, daß die Replikation an der Kernmatrix abläuft (Nickerson, 1995) und daß die gerade in Replikation befindlichen DNA-Bereiche durch die Replikationsmaschinerie selektiv vor einem Angriff durch Nukleasen geschützt werden. Nach einem Nukleaseverdau sollten dann diese "verdaugeschützten" DNA-Bereiche als einzige noch intakt und an der Matrix gebunden zurückbleiben. Somit sollte durch Verdau der nichtgeschützten Bereiche eine Anreicherung der DNA-Sequenzen, die gerade repliziert werden, erreicht werden.

Zunächst sollten verschiedene Protokolle zur Isolation der verdaugeschützten DNA-Abschnitte erprobt, optimiert und miteinander verglichen werden. Insbesondere sollte dabei überprüft werden, ob und inwieweit es zu einer Anreicherung replizierender DNA überhaupt kommt.

An synchronisierten SV40-infizierten CV1-Zellen (Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze, eines natürlichen Wirtes des SV40) sollte dann das Vorrücken der geschützten Bereiche und damit der Replikationsgabel zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Beginn einer synchronen Replikationsrunde verfolgt werden. Dazu sollten mit SV40 infizierte CV1-Zellen zunächst durch Hypoxie synchronisiert werden. Nach Reoxygenierung der Zellen sollten zu bestimmten Zeitpunkten die Replikation beendet und die zu den jeweiligen Zeitpunkten verdaugeschützten DNA-Bereiche isoliert werden. Anschließend sollten diese DNA-Bereiche mit ^{32}P endmarkiert und gegen definierte Bereiche des SV40-Genoms hybridisiert werden. Es wurde erwartet, daß in hypoxischen Zellkulturen zunächst evtl. nur der Replikationsursprung durch die Replikationsmaschinerie geschützt wird. Im Verlauf der synchronen Replikationsrunde sollten sich dann die geschützten Bereiche immer weiter vom Replikationsursprung entfernen; theoretisch sollte sogar der verdaugeschützte Bereich bei einer Geschwindigkeit der Replikationsgabel von etwa 50 Nukleotide pro Minute zu bestimmten Zeitpunkten voraussagbar sein.

Insgesamt sollte auf diese Weise untersucht werden, ob es möglich ist, ein System zu entwickeln, mit dem Momentaufnahmen der synchronen Replikation des SV40 zu bestimmten Zeitpunkten möglich sind.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Zellen

Affennierenzellen (african green monkey cells) der Zelllinie CV1 (ATCC CCL 70).

Escherichia coli GW 5100.

2.1.2 Viren

SV40 Wildtyp Stamm SVS.

M13mp18- und M13mp19-Bakteriophagen. Diese Phagenvektoren sind von M13-Phagen abgeleitet. Die Vektoren besitzen zusätzlich zur M13-Sequenz die regulatorische Sequenz und die kodierende Region für die ersten 146 Aminosäuren des β -Galaktosidasegens. In diesem Gen befindet sich eine "Polyklonierungsregion" mit Schnittstellen von 13 Restriktionsenzymen. Dies ermöglicht einerseits den Einbau von DNA in diese Vektoren; andererseits wird durch das β -Galaktosidasegen - in Kombination mit entsprechenden E. coli-Stämmen - eine Farbselektion der Phagen ermöglicht, die eine Fremdsequenz in ihre DNA eingebaut haben. Die Phagenvektoren M13mp18 und M13mp19 stellen ein Paar von Vektoren dar, die sich nur in der Orientierung der "Polyklonierungsregion" unterscheiden. Da die M13-Phagen jeweils nur den (+) Strang in Phagenpartikel einbauen, kann durch die Verwendung des mp18/mp19-Paares eine DNA-Sequenz in beiden möglichen Orientierungen als Einzelstrang erhalten werden (Maniatis, 1989).

2.1.3 Kulturgefäße

- 650 ml Gewebekulturflaschen (TC-Qualität), Greiner.
- 145/20 Kunststoffpetrischalen (TC-Qualität), Greiner.

- 145/20 Steriplan Glaspetrischalen von Kühn und Bayer. Diese werden 1 h mit 1 M NaOH behandelt, mit destilliertem Wasser gewaschen, getrocknet und 2 h bei 200°C gebrannt.

2.1.4 Kulturmedien

2.1.4.1 Zellkulturmedium

Die CV1 Zellen werden in Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM, Boehringer) mit 10% FCS (fetal calf serum), Penicillin (50000 U/ml) und Streptomycin (50 mg/ml) kultiviert.

2.1.4.2 Bakterienmedien

LB-Medium

		g/l Medium
Bactotrypton (Difco)	1%	10
Bactoyeast (Difco)	0.5%	5
NaCl	0.5%	5

pH 7.6

In Wasser lösen und autoklavieren.

LB-Amp-Medium

Wie LB-Medium, jedoch zusätzlich 80 mg/l Ampicillin (aus sterilfiltrierter Stammlösung, 80 mg/ml. Zugabe nach dem Autoklavieren des Mediums).

LB-Agar

Dem LB-Medium wird 15 g/l Agar zugesetzt, und anschließend wird autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf etwa 55°C wird bei Bedarf Ampicillin zugegeben und der Agar in Petrischalen (Durchmesser 9,4 cm; Greiner; ca. 20 ml pro Platte) gegossen.

2.1.5 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit aqua bidest angesetzt und bei 4°C gelagert.

2.1.5.1 Allgemeine Lösungen

PBS (10 x)

	(g/l)
NaCl	80
KCl	2
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	17,3
KH ₂ PO ₄	2,4
pH 7.4	

TE (100 x)

		(g/l)
Tris/HCl	1 M	121
EDTA	100 mM	37
pH 7.4 oder 8.0		

2.1.5.2 Lösungen für Agarosegelelektrophorese

TAE (20 x)

		(g/l)
Tris	0,8 M	96,8
EDTA	0,02M	8,2
NaAcetat	0,1 M	7,4
pH 7.9		

10x DNA-Ladepuffer

Ficoll (Typ 400)	25% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
EDTA	10 mM

6x alkalischer DNA-Ladepuffer

NaOH	300 μ M
EDTA	6 mM
Ficoll	18% (w/v)
Xylencyanol FF	0,25% (w/v)

H₂O dd ad 10 ml

2.1.5.3 Lösungen für HybridisierungenSSC (20x)

		(g/l)
NaCl	3,0 M	175,3
Na-Citrat x 2H ₂ O	0,3 M	88,2

pH 7.0; Lagerung bei Raumtemperatur.

Waschlösungen (Hohe Stringenz)

2x SSC, 01% SDS (w/v)

0,1x SSC, 0,1% SDS (w/v).

Denhardt's Lösung (100x)

		Pro 250 ml
Ficoll	2% (w/v)	5,0 g
Polyvinylpyrrolidon	2% (w/v)	5,0 g
BSA	2% (w/v)	5,0 g

Vorhybridisierungslösung

	Endkonzentration	Pro 100 ml
SSC (20x)	5x	25 ml
Denhardt's Lösung (100x)	5x	5 ml
1 M HEPES, pH 7.0	50 mM	5 ml
SDS (10%)	0,1% (w/v)	5 ml
Formamid	50% (v/v)	50 ml
Heringssperma-DNA (15 mg/ml) (beschallt, denaturiert)	100 µg/ml	2 ml
H ₂ O dd		8 ml

Hybridisierungslösung

Wie Vorhybridisierungslösung, nur Zugabe der markierten Sonde (i.a. 25 ng ³²P-markierte DNA).

2.1.5.4 Lösungen für die Säurefällung von DNA

TCA	50% (w/v)
NaOH/NaPP _i (w/v)	0,2 M NaOH, 5% Na-Pyrophosphat
Carrier-DNA	Heringssperma-DNA, 4 mg/ml in 0,05 M Tris, pH 7.5

2.1.6 Radiochemikalien

α[³²P]-dATP: 3000 Ci/mMol; Amersham Buchler (Braunschweig).

γ[³²P]-ATP: 4500 Ci/mMol; Amersham Buchler (Braunschweig) und ICN Biomedicals Inc.

Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.1.7 Enzyme

Alle Enzyme wurden von den Firmen Boehringer, Pharmacia oder Amersham bezogen; die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.1.8 Gase

Die Gasgemische wurden aus hochreinen Komponenten (99,999%) durch Zusammenpressen unter manometrischer Kontrolle selbst hergestellt.

<u>Euoxisches Gasgemisch:</u>	Sauerstoff	20%
	Stickstoff	75%
	CO ₂	5%
<u>Hypoxisches Gasgemisch:</u>	Sauerstoff	200 ppm
	Argon	95%
	CO ₂	5%
<u>Reoxygenierungsgemisch:</u>	Sauerstoff	95%
	CO ₂	5%

2.1.9 Szintillatoren, Filter, Membranen und Filme

Szintillator: Packard UltimaGold™XR.

Glasfaserfilter: Whatman GF/C.

Membranen für Hybridisierungen: Amersham Hybond N⁺-Nylonmembranen (200x200 mm); 0,45 µm.

Filme für Autoradiographien: Amersham Hyperfilm™MP.

2.1.10 Gelmaterial

Bio-Gel® P6 DG: Bio-Rad, Ausschlußgrenze 6 kD. Das Gelmaterial wurde mehrmals in sterilem TE-Puffer, pH 8.0, suspendiert; danach wurden die "fines" nach jeweils etwa 10 min abdekantiert. Anschließend wurde über Nacht in sterilem TE-Puffer äquilibriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in frischem TE.

Agarose: NA Agarose: Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden.

2.1.11 Sonstige Chemikalien

Thymidin: Boehringer.

Alle anderen Chemikalien stammten von den Firmen Boehringer, Merck, Serva oder Sigma in p.a. Qualität.

2.1.12 Sonstige Materialien

Zentrifugenröhrchen:

Für TL100: Beckman Polyallomer Centrifuge Tubes, 1,5 ml (9,5 x 38 mm).

Für SW40-Gradienten: Beckman Polyallomer Centrifuge Tubes (9,5 x 140 mm).

Dialyseschlauch:

SpectraPor^R Membrane, MWCO 3500, Spectrum Medical Industries, Inc., Houston, TX 77073.

2.1.13 Geräte

Radioaktivitätszählgerät: Packard Tri-Carb 1900 TR Liquid Szintillation Analyzer

Vakuum-Konzentrator: Savant SpeedVac Concentrator

Zentrifugen: Eppendorf Centrifuge 5415C

Heraeus Sepatech Varifuge RF

Beckman TL100 Ultracentrifuge

Beckman Model L5.75 Ultracentrifuge

Kontron Instruments Centrikon H-401B

2.1.14 M13-Sonden

Für Hybridisierungsexperimente, in denen SV40 spezifische DNA nachgewiesen werden sollte, wurde ein Satz aus insgesamt 8 verschiedenen Sonden, die definierte Teile

des SV40-Genoms in beiden möglichen Orientierungen repräsentierten, verwendet. Dazu war das SV40 Genom mit Restriktionsenzymen in Fragmente zerteilt und anschließend in M13-Sonden kloniert worden. Abb. 2 (S. 7) stellt eine Genkarte des SV40 Genoms dar. Es sind die Schnittstellen dargestellt, an denen die Sonden aus der SV40 DNA herausgeschnitten wurden. Der Sondensatz repräsentiert das gesamte Genom des SV40.

Es ergibt sich daraus folgende Tabelle, in der die jeweilige Bezeichnung der Sonden, deren Längen und die erste und letzte Base im SV40 Genom (s. Abb. 2) angegeben sind.

Fragment	3li	2li	1li	1a	1re	2re	3re	4
Länge [bp]	1275	1018	361	93	257	538	956	745
Nummer des ersten und letzten Basenpaares des Fragmentes im SV40 Genom	2533 3808	3808 4826	4826 5187	5187 37	37 294	294 832	832 1782	1782 2533

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die CV1-Zellen wurden in DMEM mit 10% FCS in 650 ml Gewebekulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Wassersättigung als Monolayer kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage bei einer Dichte von 6 bis 10 Millionen Zellen pro Kulturflasche halbiert.

Zum Ablösen der Zellen von der Kulturflasche wurden 8 ml 0,05% Trypsinlösung in die Flasche gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37°C und gelegentlichem Losklopfen der Zellen wurden diese nach mehrfachem Aufziehen der Zellsuspension in einer sterilen 10 ml Pipette auf zwei Kulturflaschen oder sterile Glaspetrischalen verteilt.

2.2.2 SV40 Viruskulturen

2.2.2.1 Infektion von CV1-Zellen mit SV40

Die Infektion von CV1-Zellen wurde in 145 mm Glaspetrischalen durchgeführt, die vor dem Sterilisieren für eine Stunde mit 1 M NaOH angeätzt wurden, um einen besseren Halt der Zellen auf der Platte zu gewährleisten.

Es wurden 3 bis 5 Millionen Zellen in 20 ml Kulturmedium auf die Schalen ausgebracht. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und 5 ml Stocklysate zugegeben. Zur Adsorption der Viren an die Zellen wurden die Schalen während 90 min im Brutschrank alle 15 min bewegt, um das Stocklysate neu zu verteilen. Anschließend wurden 20 ml frisches Medium zugegeben.

2.2.2.2 Herstellung von SV40-Stocklysaten

Für das Infizieren der Zellen für die Versuche wurden Stocklysate des SV40 eingesetzt, die bei -80°C nahezu unbegrenzt haltbar sind. Um zu verhindern, daß Virusmutanten durch einen Helfereffekt von Wildtyp-SV40 entstanden, wurden die Zellkulturen für die

Herstellung von Stocklysaten mit einer 1:1000 Verdünnung alter Stocklysate infiziert (wobei eine Co-Infektion mutierter und Wildtyp-SV40 in einem frühen Stadium der Infektion unwahrscheinlich ist). Das so erzeugte Stocklysate wurde durch StyI-Verdau auf Einheitlichkeit überprüft.

Für Stocklysate wurden 3 bis 5 Millionen CV1-Zellen in 20 ml Medium auf 145 mm Kunststoffschalen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 5 ml 1:1000 mit Medium verdünntem Stocklysate infiziert. Zur Adsorption der Viren wurden die Schalen 90 min bei 37°C inkubiert und das Stocklysate dabei alle 15 min neu verteilt. Anschließend wurden 10 ml Medium zugegeben. Nach Ablauf von 5 Tagen wurden weitere 10 ml frisches Medium zugegeben, um verbrauchte Substanzen wieder zuzuführen.

2.2.2.3 Isolierung von SV40-DNA aus Stocklysaten und StyI-Verdau von SV40-DNA

Die hergestellten Stocklysate wurden durch einen StyI-Verdau und anschließende Agarosegelelektrophorese überprüft. Dabei sollte festgestellt werden, ob es sich bei den Viren des Stocklysates um Wildtypviren handelt, ob durch Mutationen Schnittstellen für das Restriktionsenzym StyI dazugekommen oder verlorengegangen sind oder ob sich die Länge der Verdaufragmente verändert hat.

In einem UZ-tauglichen Eppendorfcup wurden 890 µl SV40-Stocklysate, 10 µl 1 M Tris/HCl, pH 7.4, 40 µl 0,25 M EDTA und 60 µl 10% SDS 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl 5 M NaCl wurde 40 min bei -20°C gefällt und anschließend 45 min bei 45000 rpm in einer Beckman TL100-Zentrifuge bei 4°C abzentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde mit 0,6 Vol i-Propanol über Nacht bei -20°C gefällt. Der Ansatz wurde 10 min bei 4°C in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert und das Pellet in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Nach einer Phenol-/ Chloroformextraktion (vgl. 2.2.5) wurde eine Ethanol-fällung (2.2.6) durchgeführt. Das Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

10 μ l der gefällten DNA wurden mit 2 μ l Restriktionsenzym-Inkubationspuffer H (Boehringer), 7 μ l dd H₂O und 1 μ l StyI (10 U) für 2 h bei 37°C inkubiert. Der Verdauungserfolg wurde auf einem 2% Agarose-Minigel überprüft.

2.2.3 Durchführung eines Hypoxieversuchs

Die Synchronisation der Virusvermehrung erfolgte durch vorübergehende Hypoxie und anschließende Reoxygenierung. Dabei wurde der Sauerstoffpartialdruck für 6 Stunden auf 400 ppm gesenkt. Dadurch wurde die Initiation der Replikation gehemmt. Nach Reoxygenierung begann die Replikation einer größeren Anzahl Virusgenome synchron, so daß eine zeitliche Analyse der Replikation möglich wurde.

Hypoxie und Aufheben der Hypoxie

Für einen Hypoxieversuch wurden CV1-Zellen auf 145 mm Glaspetrischalen ausgesät und mit SV40 infiziert.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn (24 bzw. 36 h p.i.) wurde das Medium in den Glasschalen von 25 auf 12 ml reduziert. Die Glasschalen wurden in gasdichten Aluminiumkammern im Wärmerraum bei 37°C mit selbstgemischtem und angefeuchtetem Gasgemisch begast.

Zunächst wurden die Zellen für 6 h mit hypoxischem Gasgemisch (400 ppm Sauerstoff) begast. Anschließend wurde der hypoxischen Kultur 1/4 Volumen 37°C warmes und für 20 min mit Reoxygenierungsgemisch begastes und damit sauerstoffgesättigtes Medium zugegeben. Die Zellen wurden anschließend für die gewünschte Zeit mit euoxischem Gasgemisch weiter begast.

Zum gewünschten Zeitpunkt wurde die Replikation durch Kühlung auf Eis beendet, das Medium rasch abgesaugt und die Platte zweifach mit eiskalter PBS gewaschen. Ein rein hypoxischer Ansatz wurde in der Aluminiumkammer unter andauernder Begasung auf Eis abgekühlt; anschließend wurde das Medium auf Eis abgesaugt und die Platte zweifach mit eiskalter PBS gewaschen.

Die weiteren Präparationsschritte erfolgten im Kühlraum bei 4°C.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

2.2.4.1 Neutrale Agarosegele

Zur schnellen Überprüfung einer DNA-Präparation und zur Konzentrationsbestimmung wurden Minigele (7,5 x 5,0 x 0,5 cm, ca. 20 ml Gel) verwendet. Im allgemeinen handelte es sich um Gele mit 2% (w/v) Agarose (Pharmacia NA) in 1x TAE-Puffer.

Die Probenvolumina betragen 10 µl und enthielten 10% 10x DNA-Ladepuffer. Der Lauf erfolgte bei 1,2 V/cm.

Für die Größenanalyse der präparierten DNA wurden mittlere Gele (11 x 14 x 0,6 cm, ca. 100 ml Gelvolumen) mit 2% Agarose (w/v) verwendet, die Probenvolumina betragen bis zu 30 µl, der Lauf erfolgte bei 4°C und 3 V/cm.

Nach dem Lauf wurde das Gel zunächst in einer 2 µg/ml Ethidiumbromid enthaltenden wässrigen Lösung für 10 min gefärbt, anschließend in destilliertem Wasser 15 min entfärbt und auf einem Transilluminator bei 302 nm betrachtet.

Bei ³²P-endmarkierten Proben wurde statt der Ethidiumbromidfärbung eine Autoradiographie durchgeführt. Dazu wurde das Gel zunächst 60 min in 10% Essigsäure unter mehrfachem Austausch der Lösung fixiert, anschließend auf ein Whatman 3MM Papier gelegt, etwa 1 cm saugfähiges Papier darunter gelegt, das Gel mit einer Haushaltsfolie abgedeckt und im Vakuummeltdrockner 1-2 h mit Wasserstrahlvakuum ohne Heizung und anschließend noch 1-2 h bei Wasserstrahlvakuum mit Heizung (35°C) getrocknet. Während des Trocknens wurden die Filterpapiere mehrmals ausgewechselt. Anschließend wurde das Gel in Haushaltsfolie verpackt und in einer Röntgenkassette - mit einem Amersham Hyperfilm MP und einer Verstärkerfolie bedeckt - zwischen 3 Stunden und 8 Tagen bei -80°C exponiert.

Die Entwicklung der Filme erfolgte wie in 2.2.11 beschrieben.

2.2.4.2 Alkalische Agarosegele

Zum Auftrennen reassoziierter DNA und der Längenanalyse solcher Fragmente wurden alkalische Agarosegele eingesetzt. Dabei wurde als Gel- und Laufpuffer 50 mM NaOH

mit 1 mM EDTA verwendet. Zum Gießen des Gels wurde die Agarose zunächst mit Wasser aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf 60°C abgekühlt war, wurden 5 M NaOH zu einer Endkonzentration von 50 mM und 0,5 M EDTA, pH 8,0, zu einer Endkonzentration von 1 mM dazugegeben. Nach Mischen wurde das Gel gegossen. Der Lauf mußte wegen der sehr hohen Leitfähigkeit des Gels mit einer geringeren Spannung und im Kühlraum durchgeführt werden. Die Laufzeit betrug für ein 2% Minigel bei einer Spannung von 22 V etwa 5 Stunden, wobei auch im unteren Massenbereich eine gute Auftrennung gewährleistet war.

Die in alkalischen Gelen aufgetrennte DNA war entweder ^{32}P -markiert (in diesem Fall wurde nach dem Trocknen des Gels eine Autoradiographie durchgeführt, vgl. 2.2.11), oder die DNA wurde nach kurzem Waschen in H_2O bidest, 10 min Depurinisieren in 0,25 M HCl und Umpuffern auf 1 M NaCl / 0,4 M NaOH auf eine Hybond N^+ -Membran gebロットet (2.2.9) und anschließend gegen SV40-DNA hybridisiert.

2.2.5 Phenol- und Chloroformextraktion

Die Phenol-/Chloroformextraktion dient zum Entfernen von Proteinen nach erfolgtem Restriktions- oder Phosphataseverdau. Zunächst werden mit Phenol die Proteine extrahiert, anschließend wird durch Chloroformextraktion das verbliebene Phenol entfernt.

Das "Chloroform" ist eine 24:1 Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol, was der Einfachheit halber als "Chloroform" bezeichnet wird.

Nach Abschluß des Verdau wurde 1 Vol. organische Phase zugegeben und 20 sec gevortext. Anschließend wurde 2 min in einer Eppendorfzentrifuge bei höchster Drehzahl abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Cup überführt, die organische Phase mit 10 μl TE rückextrahiert (20 sec vortexen, 2 min zentrifugieren, wässrige Phase abnehmen). Anschließend wurde mit dem nächsten Lösungsmittel analog vorgegangen und schließlich eine Ethanol-fällung durchgeführt.

2.2.6 Ethanol-fällung von DNA

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetatlösung, pH 5,3, und 2,5 Vol. -20°C kaltem Ethanol versetzt und gemischt. Nach einer Fällung über Nacht bei -20°C wurde die DNA 20 min bei 13000x g und 4°C in einer Eppendorfzentrifuge abzentrifu-

giert, mit auf -20°C gekühltem 70% Ethanol gewaschen und in einem Vakuumkonzentrator getrocknet. Das Pellet wurde in sterilem TE-Puffer aufgenommen.

2.2.7 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die zu messende DNA-Probe wurde bei Bedarf mit 1x TE verdünnt. Die Messung erfolgte bei 260 nm und bei 280 nm gegen einen Leerwert von 1x TE. Ein Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ von größer als 1,8 zeigt die Abwesenheit von Phenol oder größerer Mengen von Proteinen an. Die Konzentration der Probe errechnet sich nach:

$$\text{Konz} [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{OD}_{260} \times 0,05$$

2.2.8 Abschätzen sehr kleiner DNA-Konzentrationen in Agarosegelen

Die DNA-Konzentration der isolierten DNA wurde in Minigelen (2.2.4.1) durch Vergleich der Fluoreszenzintensität mit dem Längenstandard VIII (Boehringer) abgeschätzt, von dem 300 ng mitaufgetragen wurden.

2.2.9 Southern Transfer

Die Auftrennung der zu untersuchenden DNA erfolgte entweder in neutralen oder alkalischen 2% Agarosegelen (Minigele oder mittlere Gele).

Nach dem Lauf wurde das Gel für einen alkalischen Transfer vorbereitet: Die DNA im Gel wurde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler in 0,4 M NaOH/ 1 M NaCl 15 min denaturiert, danach die Lösung erneuert und weitere 20 min geschüttelt.

Der Transfer wurde als Kapillar-Blotting durchgeführt; dabei wurde die DNA durch einen kapillaren Flüssigkeitsstrom aus dem Gel auf eine Hybond-N⁺-Nylonmembran transportiert.

Die Transferlösung bestand aus 0,4 M NaOH/ 1 M NaCl.

Das Gel wurde mit der Unterseite nach oben auf 2 Lagen mit Transferlösung getränktem 3MM Papier gelegt, die auf beiden Seiten in einen mit Transferlösung gefüllten Trog reichten. Auf das Gel wurde luftblasenfrei eine gleich große, mit Transferlösung benetzte Hybond-N⁺-Nylonmembran gelegt. Darüber wurden zwei mit Transferlösung getränkte Lagen 3MM Papier gleicher Größe und auf diese wiederum 2 Lagen trockenes 3MM Papier aufgebracht. Schließlich wurde das Sandwich mit Papierhandtüchern in einer Schichtdicke von etwa 10 cm bedeckt, die mit einem Gewicht von etwa 800 g beschwert wurden. Der Transfer erfolgte über Nacht.

Die Hybond-N⁺-Membran wurde anschließend 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und mit einer Energie von 10 mJ in einem UV-Stratalinker 1800 (Stratagene) auf der Membran fixiert.

2.2.10 DNA-DNA-Hybridisierung

Die Träger mit der fixierten DNA (Hybond N⁺-Membran nach Southern Transfer, vgl. 2.2.9, oder Filter für die "umgekehrte Hybridisierung", vgl. 2.2.17) wurden für 3 h bei 42°C in Vorhybridisierungslösung unter Schütteln vorhybridisiert. Anschließend wurde die für 10 min bei 100°C denaturierte und auf Eis abgekühlte radioaktiv markierte Probe in Vorhybridisierungslösung dazugegeben und die Hybridisierung über Nacht bei 42°C unter langsamer Bewegung durchgeführt.

Die Träger wurden 2x 10 min mit 2x SSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur und 2x 15 min mit 0,1x SSC/0,1% SDS bei 42°C gewaschen. Anschließend wurden die Filter 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und in UltimaGold™ ausgezählt.

2.2.11 Autoradiographie

In Haushaltsfolie verpackte, getrocknete Elektrophorese-Gele wurden in einer Röntgenkassette mit einem Amersham Hyperfilm MP und einer Verstärkerfolie bedeckt und 3 bis 8 Tage bei -80°C exponiert.

Die Entwicklung des Films wurde 5 min in Röntgen (Tetenal, 1:3,5 verdünnt) bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde der Film kurz in essigsauerm Wasser (2%) abgestoppt und für 10 min in Acidofix fixiert. Die fertig fixierten Filme wurden gut mit destilliertem Wasser abgespült und an der Luft getrocknet.

2.2.12 Radioaktive Markierung von Gensonden

2.2.12.1 Markierung durch Polynucleotid-Kinase

Die Markierung mit der Polynucleotidkinase liefert DNA-Fragmente, die mit ca. 2×10^4 cpm pro ng DNA markiert sind. Um eine möglichst hohe Markierungseffizienz zu erreichen, wurde die zu markierende DNA zuvor mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt, um eventuell vorhandene 5'-Phosphatgruppen zu entfernen.

Die gesamte matrixgeschützte DNA einer Präparation wurde in einem Volumen von 80 μ l in CIP-Dephosphorylierungspuffer (Boehringer) mit 20 Units CIP für 120 min bei 37°C verdaut; nach erneuter Zugabe von weiteren 5 Units wurde für weitere 30 min bei 37°C nachverdaut. Die Entfernung der alkalischen Phosphatase erfolgte durch Extraktion mit Phenol und mit Chloroform (2.2.5). Anschließend wurde die DNA mindestens eine Stunde bei -20°C mit Ethanol gefällt (2.2.6).

Für die radioaktive Markierung wurde ein Aliquot der CIP-verdauten DNA in einem Volumen von 40 μ l T4 Polynucleotidkinase-Puffer (Amersham), 10 U T4 Polynucleotidkinase und 20 μ Ci γ [32 P]-ATP für 60 min bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend durch Inkubation bei 70°C für 10 min inaktiviert. Nicht umgesetztes γ [32 P]-ATP wurde durch Gelfiltration (2.2.13) entfernt.

2.2.12.2 Random Primed Labeling

Eine sehr effektive Methode zur Markierung von DNA-Sequenzen stellt das Random Primed Labeling dar (bis etwa 2×10^6 cpm pro ng DNA). Dabei wird ein Hexanucleotidgemisch als Zufallsprimer eingesetzt; man erhält ein Gemisch von Fragmenten unter-

schiedlicher Länge, die komplementär zur eingesetzten Sequenz sind, so daß diese Methode sich nicht für Längenanalysen eignet.

Zur Markierung wurde der "Random Primed DNA Labeling Kit" von Boehringer Mannheim verwendet.

Zunächst wurde die zu markierende DNA 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Es wurde folgender Ansatz in Tropfen an den Rand eines Eppendorfcups pipettiert und durch Zusammenzentrifugieren und Antippen des Cups gemischt:

DNA (25 ng)	5 µl
10x Reaktionsmix	4 µl
Nukleotidmix (dCTP, dGTP, dTTP; je 0,5 mM)	6 µl
α [³² P]-dATP (50 µCi)	5 µl
H ₂ O dd	17 µl
Klenow-Enzym (4 U)	2 µl

Die Reaktion wurde 30 min bei 37°C inkubiert, das Klenow-Enzym durch eine Inkubation bei 65°C für 10 min inaktiviert und das nicht umgesetzte α [³²P]-dATP durch Gelfiltration (2.2.13) abgetrennt. Vor einem Einsatz für eine Hybridisierung mußte die markierte DNA für 10 min bei 100°C denaturiert werden.

2.2.13 Reinigung von DNA durch Spindialyse (Gelfiltration)

Zum Entfernen von nicht umgesetzten radioaktiven Nukleotiden bei ³²P-Markierungen oder zum Entsalzen von Lösungen wurden Gelfiltrationssäulchen eingesetzt. In ein steriles 0,5 ml Eppendorfcup wurde mit einer heißen Kanüle Nr. 1 (Durchmesser 0,9 mm) ein Loch gestochen. Der Boden wurde mit möglichst wenig silanisierter Glaswolle bedeckt und mit in TE-Puffer, pH 8,0, äquilibriertem Biogel P6DG Material bis zum Rand gefüllt. Das so präparierte Eppendorfcup wurde in ein 2 ml Eppendorfcup gestellt und 5 min bei 2000 x g in einer Ausschwingtischzentrifuge (IEC; Needham, Massachusetts) gepackt. Auf die Säule wurde nun die Probe aufgetragen, die beladene Säule in ein frisches 1,5 ml Eppendorfcup gestellt und 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. Das maximal auftragbare Probenvolumen beträgt 80 µl.

2.2.14 Säurefällbare Radioaktivität in wässrigen DNA-Lösungen

Zu 1 bis 50 µl der zu untersuchenden wässrigen DNA-Probe wurden 500 µl 0,2 M NaOH/5% NaPP_i und 100 µg Carrier-DNA pipettiert, durch Vortexen gemischt und nach Zugabe von 500 µl 50% TCA erneut gevortext. Der Ansatz wurde 30 min bei 4°C inkubiert und über einen GF/C-Glasfaserfilter abgesaugt; danach wurde das Röhrchen noch zwei- bis dreimal mit 1% TCA, 4°C, nachgespült und schließlich 1x mit Ethanol gewaschen. Der Filter wurde 20 min bei 70°C getrocknet und anschließend in 5 ml UltimaGold-Szintillator ausgezählt.

2.2.15 Präparation der einzelsträngigen Sonden auf der Basis von M13-Bakteriophagen

2.2.15.1 Transformation von *E. coli* GW5100-Zellen

Für die Analyse der kernmatrixgeschützten DNA wurde diese gegen Teile des SV40-Genoms hybridisiert, die zur Vermehrung der Fragmente und zur Herstellung definierter Einzelstränge in M13-Phagen-Vektoren inkloniert waren.

Die M13-Phagenvektoren (mp18 und mp19) wurden in der doppelsträngigen Form wie Plasmide in die Bakterien transformiert, die dafür zunächst kompetent gemacht werden mußten. Dazu wurde eine Übernachtskultur von *Escherichia coli* GW5100 in 2 ml LB-Medium angelegt; damit wurden 100 ml vorgewärmtes LB-Medium beimpft und die Bakterien bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 herangezogen. Die Bakterien wurden in einer Stockzentrifuge 10 min bei 4°C und 1500x g abzentrifugiert, in 15 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 3 min bei 4°C und 1500x g abzentrifugiert und dann sehr vorsichtig in 4 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 2 bis 24 h auf Eis konnten die Zellen entweder mit sterilem Glycerin (ad 14% Glycerin) versetzt und in 200 µl-Portionen bei -80°C schockgefroren werden, oder die Zellen wurden sofort mit 0,5 bis 2 ng doppelsträngiger M13-DNA, die ein SV40-Insert trug, transformiert.

Dazu wurde die DNA zu 200 µl der Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 90 sec auf 42°C erhitzt, sofort wieder 2 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 100 µl einer dicht gewachsenen GW5100-Kultur mit 5 ml Topagar (42°C) gemischt und auf eine 90 mm LB-Agar-Platte ausgebracht. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden pro Platte etwa 100 bis 200 Plaques erhalten.

Zur weiteren Präparation wurden jeweils 3 Plaques ausgestochen.

2.2.15.2 Überprüfung der präparierten Sonden

Zur Überprüfung der Anwesenheit des gewünschten Inserts wurden die Phagen mit jeweils 100 µl LB-Medium 1 h bei 37°C eluiert und nach Vortexen 10 µl des Überstandes mit 1,5 ml LB-Medium und 20 µl einer GW5100-Übernachtskultur für 6 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden dann 5 min bei 4°C in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand abdekantiert, die Zellen in 100 µl Glukosepuffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Bakterien-Lysepuffer zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde dann durch Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat, pH 5.3, neutralisiert. Dabei fiel ein Niederschlag aus hochmolekularer DNA, RNA, Proteinen und SDS aus. Dieser wurde nach 15 min Inkubation bei 0°C bei 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit dem gleichen Volumen eines Gemischs aus Chloroform und Phenol extrahiert und die wässrige Phase dann zur Ausfällung der Phagen-DNA mit 1 ml Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert.

Die gefällte DNA wurde 10 min bei 4°C abzentrifugiert, einmal mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, in der Vakuumentrifuge 8 Minuten getrocknet und in 10 µl TE aufgenommen. 5 µl wurden dann mit je 10 U *EcoRI* und *BamHI* sowie 0,1 mg/ml RNaseA 2 h bei 37°C verdaut. Der Verdau wurde schließlich auf einem 2% analytischen Minigel überprüft.

2.2.16 Isolierung kernmatrixassoziierter DNA

Für eine Präparation kernmatrixassoziierter DNA wurden CV1 Zellen 24 h bzw. 36 h vor Präparation mit SV40 infiziert. Um die Isolationsfortschritte verfolgen zu können, wurde eine ^3H -Langzeitmarkierung durchgeführt, indem zum Medium 16 h vor Beginn der Hypoxie (also 8 bzw. 20 h p.i.) $10\ \mu\text{Ci}\ ^3\text{H}$ -Thymidin pro 145 mm Schale und kaltes Thymidin in einer Endkonzentration von $4\ \mu\text{M}$ zugegeben wurden.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beendigung der Hypoxie wurde die Replikation durch rasches Absaugen des Mediums, zweifaches Waschen mit eiskalter PBS und Überführen der Glasschale auf Eis gestoppt. Bei rein hypoxischer Inkubation wurden die Hypoxiekammern mit den Glasschalen unter andauernder Begasung innerhalb von 30 min auf Eis abgekühlt, so daß es beim Kontakt mit Sauerstoff zu keiner Replikation mehr kommen konnte.

2.2.16.1 Präparation der matrixgeschützten DNA aus isolierten Kernen

Nach dem Waschen der Platten wurden die PBS-Reste sorgfältig entfernt und die Kulturen 30 min mit eiskaltem hypotonem Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM MgCl_2 , pH 7.0) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und mit 30 Stößen in einem Dounce-Homogenisator lysiert. Die Freisetzung der Zellkerne wurde mikroskopisch überprüft. Die Zellkerne wurden für 5 min in einer Varifuge bei 1700 rpm und 4°C abzentrifugiert und zweimal mit Kernmatrix-(KM-)Puffer (10 mM MOPS, 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl_2 , pH 7.0) gewaschen. Anschließend wurden die Kerne in 1 ml KM-Puffer aufgenommen und mit $50\ \mu\text{g}$ DNaseI (1000 U) pro 10 Millionen Zellen verdaut. Danach wurde ein vierfaches Volumen 4 M NaCl-Lösung zugegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde 10 min bei 14000 rpm in einer Kontron Centrikon H401B abzentrifugiert und das Pellet anschließend in KM-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde nochmals mit $50\ \mu\text{g}$ DNaseI und $100\ \mu\text{g}$ RNase in 1 ml KM-Puffer für 30 min bei 37°C verdaut und nach Zugabe eines vierfachen Volumens 4 M NaCl für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet gewaschen und in 1 ml Proteinase K-Puffer (10 mM Tris/HCl, 0,2% SDS, 20 mM

EDTA, pH 7.0) und 200 µg Proteinase K 2 h bei 60°C verdaut. Anschließend wurde eine Phenol-/ Chloroformextraktion durchgeführt und die Lösung über Nacht gegen 0,1x TE-Puffer dialysiert. Zum Dialysat wurden 0,1 Vol. 10x Dephosphorylierungspuffer (Boehringer) und 50 U alkalische Phosphatase (CIP) gegeben und 2 h bei 37°C verdaut. Nach einem Nachverdau mit 10 weiteren Units CIP für 30 min bei 37°C wurde eine Phenol-/ Chloroformextraktion durchgeführt und über Nacht gegen 10 µM EDTA, pH 8.0 dialysiert. Das Dialysat wurde in einer Vakuumzentrifuge eingeengt und anschließend mit γ [³²P]-ATP endmarkiert.

2.2.16.2 *In situ* Präparation der matrixgeschützten DNA mit DNaseI

Bei dieser Präparationsmethode erfolgt die gesamte Isolation der Kernmatrix *in situ* auf den Glasschalen, indem die verschiedenen Lösungen vorsichtig zugegeben und anschließend wieder vorsichtig abgenommen werden. Auch die DNase- und RNase-Verdau laufen auf den Glasschalen ab. Alle Schritte, sofern nicht anders angegeben, werden bei 4°C durchgeführt.

Die abgestoppten Zellkulturen wurden zunächst dreimal mit eiskaltem KM-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, pH 7.0) gewaschen. Anschließend wurden 5 ml KM-Puffer mit 1% Nonidet NP40, 1 mM EGTA und 5 mM DTT zugegeben. Nach einer Inkubation von 3 min wurde vorsichtig abgesaugt und mit weiteren 10 ml derselben Lösung 27 min inkubiert. Anschließend wurde erneut abgesaugt, vier Mal mit KM-Puffer gewaschen und mit 200 U DNaseI/ ml, 100 µg RNase/ ml in KM-Puffer 30 min bei 37°C verdaut. Nach Entfernen der Verdaulösung wurden 10 ml KM-Puffer mit 2 M NaCl und 1 mM EGTA und 5 mM DTT zugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde, wie oben beschrieben, wieder vier Mal mit KM-Puffer gewaschen und erneut ein DNaseI-/ RNase-Verdau (5 ml KM-Puffer, 200 U DNaseI/ ml, 100 µg RNase/ ml) für 60 min bei 37°C durchgeführt. Bei einer sog. "Hochsalzschaukel" wurde dieser Verdau-/ Hochsalzextraktionszyklus insgesamt dreimal wiederholt und anschließend ein letzter Verdau Schritt mit DNaseI/ RNase durchgeführt. Zum Ablösen der an der Schale haftenden Kernmatrix wurde dann für 30 min in Proteinase K-Puffer (10

mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 0,2% SDS, pH 8.0) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die so erhaltene Lösung wurde in ein Einmalreagenzglas (14 ml, Greiner) überführt, Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 200 µg pro ml zugegeben und für 2 h bei 60°C inkubiert. Zum Entfernen der Proteinase K wurde zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert (2.2.5), wobei die organische Phase jeweils mit 500 µl TE rückextrahiert wurde. Anschließend wurde das Volumen durch Ausschütteln mit Butanol auf etwa 300 µl eingengt und eine Ethanol-fällung mit 30 µg *E. coli* tRNA als Carrier durchgeführt (2.2.6). Nach Abzentrifugieren für 1 h in einer Beckman TL100-Zentrifuge in einem TLA45-Rotor bei 45000 rpm und 4°C, Waschen und Trocknen des Pellets wurde dieses in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und die tRNA durch Zugabe von 1 M NaOH bis zu einer Endkonzentration von 0,1 M NaOH und anschließende Inkubation für 1 h bei 80°C hydrolysiert. Die NaOH wurde durch Gelfiltration entfernt (2.2.13). Anschließend erfolgte ein Verdau mit alkalischer Phosphatase und eine radioaktive Markierung mit γ [³²P]-ATP nach 2.2.12.1 .

2.2.16.3 *In situ* Präparation der matrixgeschützten DNA mit Mikrokokkusnuklease

Die Mikrokokkusnuklease ist eine sequenzunspezifische Nuklease, die gerade Doppelstrangsnitte macht; es kann somit nicht zu einer Reassoziaton überlappender Enden kommen.

Die Präparation der matrixgeschützten DNA mit Mikrokokkusnuklease erfolgt prinzipiell wie die Präparation mit DNaseI (2.2.16.2). Als Wasch- und Verdau-puffer wurde 10 mM Tris/HCl, pH 7.4 und 1 mM CaCl₂ verwendet, da das Enzym Ca²⁺-Ionen bevorzugt. Die übrigen Schritte sind identisch. Es wurde eine Enzymkonzentration von 100 U Mikrokokkusnuklease und 100 µg RNase pro ml bei den Verdau-schritten eingesetzt, das Verdauvolumen betrug 5 ml.

2.2.16.4 Direkte DNA-Längenbestimmung

Da die infizierten CV1-Zellen vor der Matrixpräparation für 16 Stunden mit ^3H -Thymidin markiert wurden, konnte die Größenverteilung der isolierten DNA nach Auftrennung in einem Agarosegel anhand der Verteilung der ^3H -Radioaktivität im Gel bestimmt werden.

Dann wurde nach Beendigung des Gellaufes die Probenspur aus dem Gel herausgeschnitten und in 0,5 cm breite Streifen zerteilt. Jedes der so erhaltenen Gelstücke wurde innerhalb von zwei Stunden in 750 μl 0,5 M HCl in einem Szintillationsgläschen bei 80°C aufgelöst und nach Abkühlen mit 7 ml UltimaGold[®] ausgezählt. Zur Größenbestimmung wurden je 300 ng Längenstandard III und VIII (Boehringer) im selben Gel aufgetrennt; nach Ethidiumbromidfärbung wurde die Laufstrecke der einzelnen Fragmente bestimmt.

2.2.17 Umgekehrte Hybridisierung

Die "umgekehrte Hybridisierung" ist eine Variante der DNA-Hybridisierung; sie ist besonders zum Nachweis kleiner Mengen spezifischer DNA-Sequenzen, die allerdings radioaktiv markiert sein müssen, in großen Probenvolumina geeignet. Dabei wird die Sonde auf der Membran fixiert und das Untersuchungsmaterial nach seiner radioaktiven Markierung mit der Sonde hybridisiert.

Als Sonden wurden in M13-Phagenvektoren klonierte Fragmente des SV40 verwendet. Die DNA lag als Einzelstrang vor.

In jedem Ansatz wurden 500 ng Sonde in 300 μl 10 x SSC-Puffer aufgenommen, für 10 min bei 100°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis auf Hybond N⁺-Filter aufgebracht. Das Auftragen der Sonden auf die Membran erfolgte mittels einer eigens für diese Versuche hergestellten "Kapillarblotanlage". Diese bestand aus zwei 7 mm dicken Plexiglasscheiben, in die je 10 Löcher mit einem Durchmesser von 15 mm gebohrt waren. Auf die untere Scheibe wurden 4 Lagen saugkräftiges Papier und darauf die Hybond N⁺-Nylonmembran gelegt. Nach Auflegen der oberen Scheibe wurde die Apparatur durch Schrauben festgezogen; dadurch wurde ein seitliches Austreten von Flüssig-

keit verhindert. Die Lage der Löcher auf der Membran wurde für das später erfolgende Ausstanzen mit Bleistift markiert, und die Filter wurden beschriftet. In jedes der Löcher konnte nun die im Puffer gelöste Sonde gegeben werden. Die Flüssigkeit wurde innerhalb weniger Minuten von den Filterpapieren aufgesaugt. Anschließend wurde die Nylonmembran luftgetrocknet und die Sonde durch Bestrahlung mit 10 mJ UV-Licht in einem Stratalinker 1800 (Stratagene) auf der Membran fixiert. Die Filter wurden danach mit einem Locheisen (Durchmesser: 15 mm) aus der Membran ausgestanzt. Das weitere Vorgehen für die DNA-DNA-Hybridisierung ist in 2.2.10 beschrieben.

3 Ergebnisse und Diskussion

Folgende Punkte sollten in der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

- Ausarbeitung von verschiedenen Protokollen zur Präparation kernmatrixgeschützter DNA. Dabei mußten u.a. Protokolle aus der Literatur, die dort in erster Linie zur Gewinnung von Kernmatrixproteinen dienten, für die Präparation von kernmatrixgebundener DNA optimiert werden.
- Vergleich der verschiedenen Protokolle zur Präparation von durch die Kernmatrix "verdaugeschützter" DNA, insbesondere unter der Fragestellung, ob sich die erhaltene DNA zur Replikationsanalyse des SV40 eignet.
- Analyse replizierender, matrixassoziierter SV40-DNA durch "umgekehrte Hybridisierung". Dabei sollte untersucht werden, ob sich an synchronisierten SV40 infizierten Zellkulturen ein Vorrücken der matrixassozierten Bereiche auf dem SV40-Genom beobachten läßt.

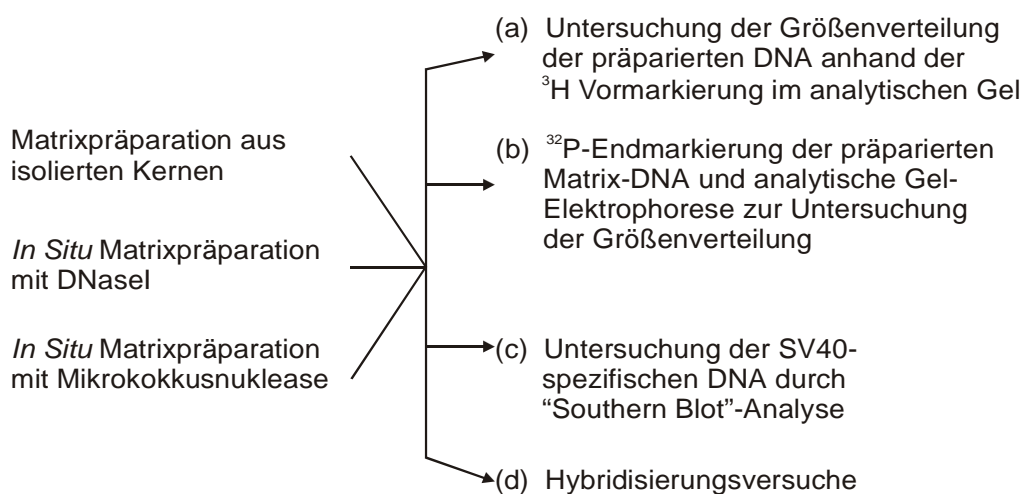
Es wurde nach folgendem Arbeitsplan vorgegangen:

1) Allgemeine Untersuchung der Methode

Funktionsfähigkeit der Nukleasen unter den verwendeten Puffer- und Salzbedingungen

Darstellbarkeit der gewünschten präparierten DNA zur Qualitätskontrolle der Präparation in analytischen Agarosegelen und Southern Blots

2) Spezielle Untersuchungen: Verschiedene Matrixpräparationsprotokolle



Untersuchung der Hochsalzresistenz von SV40-DNA in infizierten Zellen durch schrittweise Hochsalzextraktion

3) Hybridisierungsversuche zur Darstellung der Replikation des SV40

3.1 Präparationsbedingungen und Analysemethoden für kernmatrix-geschützte DNA

3.1.1 Funktionsfähigkeit von Nukleasen zur Präparation von kernmatrix-geschützter DNA unter verschiedenen Puffer- und Salzbedingungen

In der vorliegenden Arbeit sollte DNA aufgereinigt werden, die an die Kernmatrix gebunden und dadurch vor einem Abbau durch Nukleasen geschützt ist. Die Präparation dieser kernmatrixgebundenen DNA basiert auf zwei unterschiedlichen Prinzipien: Zum einen wird durch einen Verdau mit Nukleasen nur die DNA, welche nicht durch Proteine geschützt ist, degradiert. Zum anderen werden nichtkovalente Wechselwirkungen von Proteinen und Proteinen mit DNA durch eine Hochsalzbehandlung aufgehoben. Somit kann differentiell die DNA, die zwar an Proteine, nicht aber an die definitionsgemäß hochsalzresistente Kernmatrix gebunden ist, abgetrennt werden.

Hierbei ist von entscheidender Bedeutung, daß die verwendeten Enzyme unter den eingesetzten Bedingungen ausreichend aktiv sind, so daß der Anteil der DNA, welcher nicht durch gebundene Proteine vor einem Nukleaseverdau geschützt ist, vollständig entfernt wird.

Das in der Literatur am häufigsten zur Matrixpräparation eingesetzte Enzym ist die DNaseI. In den hier dargestellten Versuchen wurde DNaseI aus Rinderpankreas (Boehringer Mannheim) verwendet. DNaseI ist eine Endonuklease, die sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA spaltet, wodurch ein Gemisch aus Mono- und Oligonukleotiden entsteht (Maniatis, 1989). In Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen findet die Spaltung unabhängig voneinander in beiden DNA-Strängen statt, die Spaltungsstellen sind statistisch verteilt. In Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen dagegen findet ein Doppelstrangsnchnitt statt, der stumpfe oder um ein bis zwei Nukleotide überlappende Enden liefert (Melgar, 1968). Die Präparation der verdaugeschützten DNA wurde in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen durchgeführt.

Zusätzlich wurde eine weitere unspezifische Nuklease untersucht, nämlich Mikrokokusnuklease. Mikrokokusnuklease ist ein doppelstrangspezifisches Enzym, das beide

DNA-Stränge auf einmal schneidet. Für die volle Aktivität des Enzyms sind zweiwertige Ionen erforderlich, am effektivsten sind Ca^{2+} -Ionen.

Die Aktivität der DNaseI und der Mikrokokkusnuklease wurde unter verschiedenen Pufferbedingungen mit SV40-DNA überprüft. Unterschiedliche Verdauerpuffer waren notwendig, da ein Probeverdau mit Mikrokokkusnuklease im KM-Puffer (2.2.16.2), welcher für DNaseI-Verdauschritte verwendet wurde und keine Ca^{2+} -Ionen enthielt, nach 15 Minuten bei 37°C noch deutlich nachweisbare Spuren DNA mit einer Länge zwischen 100 und 300 bp ergab (nicht gezeigt). Bei den Matrixpräparationen mittels Mikrokokkusnuklease bzw. DNaseI mußten also, um einen vollständigen Abbau der nicht geschützten DNA zu gewährleisten, unterschiedliche Verdauerpuffer verwendet werden.

Bei den Versuchen wurde das Verhältnis von SV40-DNA zu Nuklease den Matrixpräparationsbedingungen angepaßt (Hagmann, 1977). Dabei wurden 200 ng SV40-DNA und 2 U DNaseI bzw. 1 U Mikrokokkusnuklease für verschiedene Zeiten bei 37°C inkubiert.

Sowohl bei Verwendung von DNaseI als auch von Mikrokokkusnuklease war in den jeweiligen Niedrigsalzpuffern bereits nach 5 Minuten keine SV40-DNA mit Ethidiumbromid mehr nachweisbar (Abb. 3, Spur 2 und Abb. 4, Spur 4). Bei Pufferbedingungen während der Matrixpräparation zeigen die Enzyme somit die erforderliche Aktivität.

Höhere Salzkonzentrationen wirken auf beide Enzyme hemmend (Abb. 3, Spuren 4-7 und Abb. 4, Spuren 6-9). Die Mikrokokkusnuklease ist bereits bei 1 M NaCl praktisch inaktiv (Abb. 4), die DNaseI baut bei 1 M bzw. 2 M NaCl noch SV40-DNA ab, jedoch sehr viel weniger effektiv (Abb. 3). Bereits bei 1 M NaCl ist die Aktivität so weit gesunken, daß sie unter Hochsalzbedingungen nicht für Präparationszwecke eingesetzt werden kann. Man erkennt jedoch deutlich, daß beide Enzyme unter den Bedingungen, unter denen sie zum Einsatz kommen, die erforderliche Aktivität besitzen.

Als Ergebnis ergibt sich, daß sowohl DNaseI als auch Mikrokokkusnuklease für die Präparation der Kernmatrix-DNA unter 1 M NaCl eingesetzt werden müssen.

KM-Puffer	+	0M NaCl		1M NaCl		2M NaCl			
		↔		↔		↔			
Verdauzeit [min]		5	30	5	30	5	30		
Spur		1	2	3	4	5	6	7	8

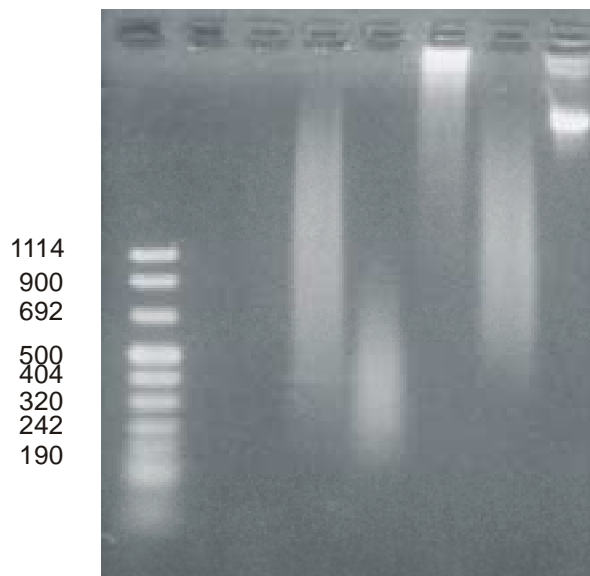


Abb. 3: Verdau von 200 ng SV40-DNA mit DNase I. Die SV40-DNA wurde für 5 Minuten (Spuren 2, 4 und 6) bzw. 30 Minuten (Spuren 3, 5 und 7) in KM-Puffer bei NaCl-Konzentrationen von 0 M (Spuren 2 und 3), 1 M (Spuren 4 und 5) oder 2 M (Spuren 6 und 7) bei 37°C inkubiert und anschließend in einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Als Vergleich ist unverdaute SV40-DNA (Spur 8) aufgetragen. Der Längenstandard ist LS VIII (Spur1) von Boehringer.

Mikrokokkus- nukleasepuffer	+	0M NaCl		1M NaCl		2M NaCl			
Verdauzeit [min]			5	30	5	30	5	30	
Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9

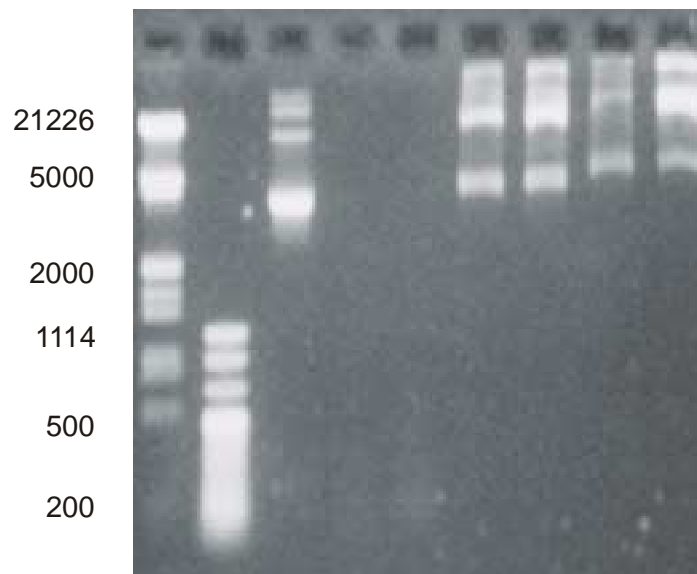


Abb. 4: Verdau von 200 ng SV40-DNA mit Mikrokokkusnuklease. Die SV40-DNA wurde für 5 Minuten (Spuren 4, 6 und 8) bzw. 30 Minuten (Spuren 5, 7 und 9) in Mikrokokkusnukleasepuffer bei NaCl-Konzentrationen von 0 M (Spuren 4 und 5), 1 M (Spuren 6 und 7) oder 2 M (Spuren 8 und 9) bei 37°C inkubiert und anschließend in einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Als Vergleich ist unverdaute SV40-DNA (Spur 3) aufgetragen. Die Längenstandards sind LSIII (Spur1) und LSVIII (Spur 2) von Boehringer.

Bei der Matrixpräparation arbeiten DNaseI bzw. Mikrokokkusnuklease allerdings vermutlich nicht unter den optimalen Bedingungen der Vorversuche. Zum einen wird während der Präparation der Zutritt des Enzyms zur DNA sterisch behindert, zum anderen läßt die Anwesenheit von Proteinen, die an die DNA gebunden sind, nur Schnitte zwischen diesen zu.

Um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten, wurde daher bei den Matrixpräparationen die Verdauzeit gegenüber den Vorversuchen verfünffacht. Wie nachfolgend in den Kapiteln 3.2.1 und 3.2.2.1 gezeigt wird, wurde nach dem ersten Verdauerschritt keine nennenswerte Radioaktivität mehr freigesetzt, so daß von einem vollständigen Verdau ausgegangen werden kann. Offensichtlich werden also bei jedem Enzymverdauerschritt die maximal zugänglichen Schnittstellen erreicht.

3.1.2 Darstellbarkeit der präparierten DNA: Qualitätskontrolle durch analytische Gele und Southern Blot

Durch die Präparation von "kernmatrixgeschützter" DNA sollte differentiell die DNA isoliert werden, die gerade repliziert wird und somit von der matrixgebundenen Replikationsmaschinerie vor einem Abbau durch Nukleasen geschützt ist. Dabei wird der in Replikation befindliche Bereich um so genauer dargestellt, je kleiner der geschützte Bereich ist. Die Analyse der Replikation des SV40-Genoms sollte durch Hybridisierung der radioaktiv markierten präparierten DNA gegen Sonden, welche verschiedene Teilbereiche aus dem SV40-Genom repräsentieren, erfolgen. Kurze matrixgeschützte DNA-Stücke werden dabei nur von einer Sonde erkannt, während längere Fragmente mit mehreren Sonden überlappen können. Kurze Fragmente liefern somit die schärferen Aussagen.

Daher ist es notwendig zu wissen, inwieweit sich die kurzkettige DNA sowohl in der Agarosegelelektrophorese als auch durch Southern Blotting darstellen läßt.

Zunächst wurde das Verhalten kurzer, ^{32}P -endmarkierter DNA-Stücke bei der Autoradiographie untersucht. Dazu wurde ein ^{32}P -endmarkierter Massenmarker (LS VIII; Boehringer) in einem Agarose-Minigel aufgetrennt. Das Gel wurde in 10%-iger Essigsäure fixiert und anschließend vakuumgetrocknet. Da das Gel beim Trocknen auf Filterpapieren liegt und diese einen kapillaren Flüssigkeitsstrom erzeugen, wurde zuvor eine Hybond N^+ -Membran unter das zu trocknende Gel gelegt, um aus dem Gel auswandernde DNA-Fragmente zu binden. Die Hybond N^+ -Membran wurde stets zusammen mit dem Gel autoradiographiert.

Die mittels Autoradiographie gewonnenen Aufnahmen stimmen mit denen von ethidiumbromidgefärbten Gelen überein. Es gehen also beim Trocknen der Gele keine DNA-Stücke verloren (nicht gezeigt).

Auf den Filterpapieren, die unter das Gel und die Hybond N^+ -Membran gelegt wurden, konnte keine Radioaktivität gefunden werden. Auch dies zeigt, daß es beim Trocknen der Gele zu keinem DNA-Verlust kommt.

Als Modell für den Southern-Transfer wurde ein *StyI*-Verdau von SV40-DNA ausgewählt, der Fragmente des SV40-Genoms mit Längen zwischen 93 und 1734 bp ergibt. Da alle Fragmente in gleicher Häufigkeit in dem Verdau vorkommen, erhält man einen geeigneten Überblick über die Blotting- und Hybridisierungseffizienzen.

Bei ^{32}P -endmarkierter DNA ist die Intensität der Schwärzungen zur Anzahl der DNA-Moleküle einer Bande proportional (im Southern Blot: proportional zur Anzahl der gebundenen Sonden-DNA-Moleküle und diese wiederum zur Anzahl der in der Bande vorhandenen "passenden" DNA-Moleküle). Bei der *StyI*-verdauten SV40 DNA erscheinen alle Fragmente mit vergleichbarer Intensität, was bedeutet, daß die Blotting- und Hybridisierungseffizienzen im Bereich zwischen 200 und 1700 bp also etwa gleich hoch sind. Die einzige Ausnahme dabei bildet das 93 bp-Fragment, das sich immer sehr schwach darstellt: Aufgrund der geringen Größe der DNA ist diese Bande deutlich unschärfer und auch auf einem ethidiumbromidgefärbten Agarosegel nur schwer erkennbar (Abb. 5).

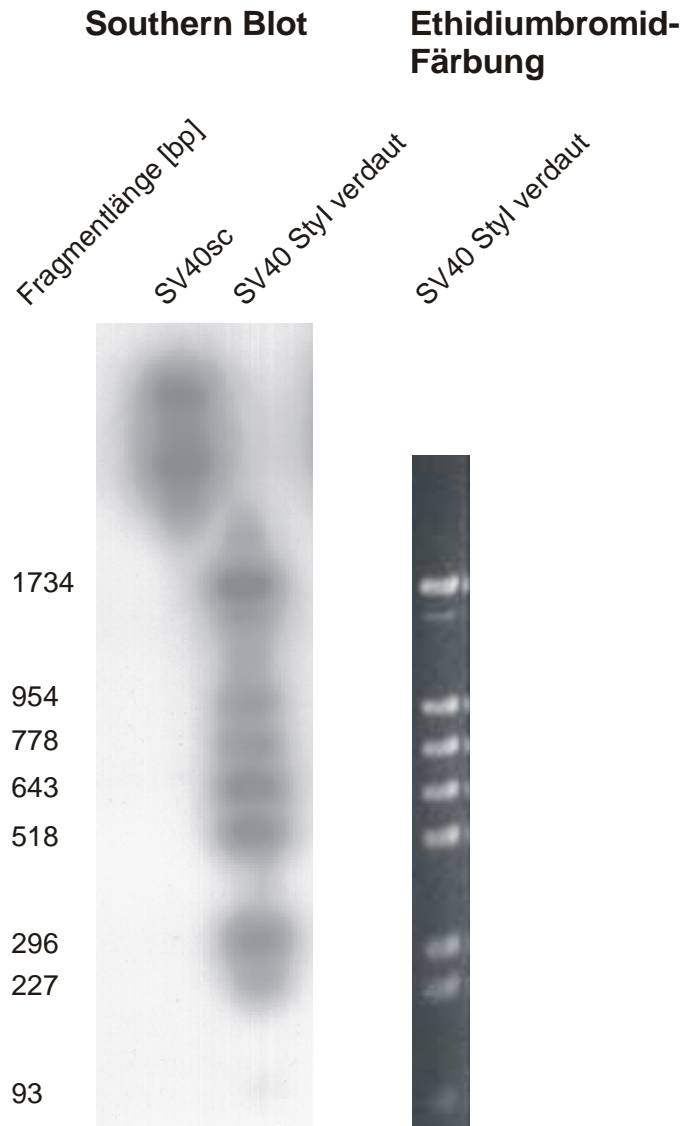


Abb. 5: *Southern Blot eines StyI-Verdaus von SV40-DNA und SV40 Gesamt-DNA.*

Ungeschnittene (SV40sc) sowie mit *StyI* verdaute SV40-DNA wurde in einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA auf eine Hybond N⁺-Membran übertragen und mit ³²P-endmarkierter SV40-DNA hybridisiert.

Insgesamt gleicht das Fragmentmuster des Southern Blots dem eines ethidiumbromidgefärbten Gels. Damit wurde gezeigt, daß der Southern Blot auch im gewünschten kurzkettigen Bereich die tatsächliche Situation repräsentiert und als Analyseverfahren für die Matrixpräparationen eingesetzt werden kann.

3.2 Protokolle zur Präparation der Kernmatrix

Die Größenverteilung der durch die Kernmatrixpräparation gewonnenen verdaugeschützten DNA-Stücke ist von entscheidender Bedeutung für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Replikation des SV40-Genoms an der Kernmatrix. Die Analyse des Fortschreitens der Replikationsmaschinerie erfolgte durch Hybridisierung der präparierten und anschließend radioaktiv markierten DNA gegen 16 verschiedene Sonden, die jeweils einem Teil des SV40-Genoms in definierter Orientierung entsprachen. Da sehr lange DNA-Stücke mit mehreren Sonden überlappen können, ist eine eindeutige Zuordnung des verdaugeschützten Bereichs zu einem Teil des SV40-Genoms nicht möglich. Die Analyse der Größenverteilung der präparierten DNA ist daher neben der Überprüfung eines ausreichenden Nukleaseverdaus von entscheidender Bedeutung.

3.2.1 Matrixpräparation aus isolierten Kernen

Für die Untersuchungen zur SV40-Replikation wurde die Zelllinie CV1 (Nierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze, einem natürlichen Wirt des SV40) verwendet. Zur Präparation matrixassoziierter DNA aus Zellkernen wurden die Kerne von SV40-infizierten CV1-Zellen zunächst durch Homogenisieren in einem Dounce-Homogenisator freigesetzt und unter Niedrigsalzbedingungen ein DNaseI-Verdau (30 min bei 37°C) durchgeführt. Anschließend wurde die Proteinmatrix abzentrifugiert und eine Hochsalzextraktion durchgeführt, um Proteine, die durch ionische Wechselwirkungen an die DNA gebunden waren, zu entfernen. Nach dem Waschen der Hochsalzextraktion erfolgte nochmals ein kombinierter DNaseI-/ RNase-Verdau unter Niedrigsalzbedingungen, um DNA, die nach der Proteinextraktion einem Nukleaseverdau zugänglich geworden war, zu entfernen. Die Matrix wurde erneut abzentrifugiert und der Proteinanteil durch einen Proteinase K-Verdau entfernt. Schließlich wurde Phenol-/ Chloroformextrahiert und die 5'-Phosphatgruppen durch alkalische Phosphatase (CIP) entfernt, so daß die isolierte DNA nach Aufkonzentrieren in einer Vakuumzentrifuge durch ³²P-Endmarkierung oder Southern Blotting charakterisiert werden konnte.

Tabelle 1 zeigt als Beispiel die Meßwerte der radioaktiven Markierung einer Präparation. Die Zellen wurden vor dem Versuch für 16 h mit ^3H -Thymidin markiert, um den Verlauf der einzelnen Präparationsschritte verfolgen zu können. Die angegebenen Meßwerte wurden durch direktes Auszählen eines Aliquots des Materials des jeweiligen Präparationsschrittes bestimmt und auf die Gesamtmenge hochgerechnet. Die Meßwerte stellen also den noch in der Präparation verbleibenden Anteil an Radioaktivität und somit den Fortgang der Abreicherung der "bulk"-DNA dar. Die in den präparierten Kernen gefundene Radioaktivität wurde gleich 100% gesetzt und alle folgenden Meßwerte darauf bezogen.

Tab.: 1: Bilanzierung einer Matrixpräparation aus isolierten Kernen. Die Zellen wurden vor der Aufarbeitung für 16 h mit ^3H -Thymidin markiert. Es wurden von den jeweiligen Schritten Aliquots entnommen und die darin enthaltene ^3H -Aktivität bestimmt. Die angegebenen Gesamt-cpm und die Prozentwerte stellen die gesamten noch in der Präparation enthaltenen ^3H -cpm dar. Der beim 2. DNaseI-Verdau zu beobachtende sehr niedrige cpm-Wert ist dadurch zu erklären, daß sich das Pellet während der Präparation nicht mehr vollständig in Lösung bringen läßt; erst nach dem Resuspendieren im SDS-haltigen Proteinase K-Puffer geht das Pellet wieder vollständig in Lösung.

Schritt	Gesamt-cpm	% der ursprünglich vorhandenen cpm
Kerne in 1 ml KM-Puffer	109825	100
1. DNaseI-Verdau + 4 M NaCl	11388	10,4
2. DNaseI-Verdau + 4 M NaCl	1305	1,2
Proteinase K-Verdau	2484	2,3
CIP-Verdau	2490	2,3
Einengen in Speedvac	1510	1,4

Die aus isolierten Kernen präparierte verdaugeschützte DNA enthielt in den durchgeführten Präparationen noch zwischen 1,8 und 0,4% der ursprünglichen ^3H -Aktivität.

Zur Überprüfung der Größe der erhaltenen DNA wurde eine ^{32}P -Endmarkierung durchgeführt und die DNA über ein Agarosegel aufgetrennt. In Abb. 6 ist eine Autoradiographie eines solchen Agarosegels dargestellt.

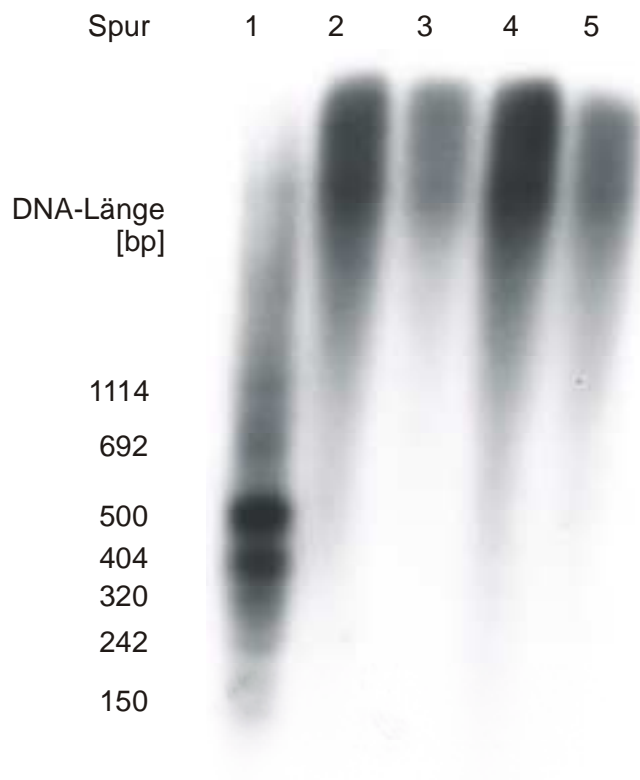


Abb. 6: Autoradiographie eines 2% Agarosegels mit kernmatrixgeschützter DNA aus isolierten Kernen. Es wurden zunächst Kerne präpariert und anschließend ein DNaseI-Verdau, eine Hochsalzextraktion und ein DNaseI-/ RNase-Verdau durchgeführt. Die DNA wurde nach Verdau der Proteinmatrix mit γ [32 P]-ATP endmarkiert. Spur 1 ist Längenstandard VIII (Boehringer Mannheim), die Spuren 2 bis 5 zeigen DNA von verschiedenen Präparationen.

Die Kettenlänge der erhaltenen DNA war deutlich größer als 100 bis 300 bp, die bei einem vollständigen Verdau aller nicht von einer Proteinmatrix geschützten Bereiche erwartet wurde.

Um festzustellen, ob diese große Kettenlänge evtl. durch unvollständige Verdauungsschritte verursacht wurde und somit auf unzureichende Präparationsbedingungen zurückzuführen war, wurde eine Präparation mit zeitlich gestaffelten Verdauungsschritten durchgeführt und die DNA der verschiedenen Präparationsschritte auf ihre Größenverteilung in einem Agarosegel untersucht (Abb. 7).

Für diese Untersuchung wurden ca. 10 Millionen Zellkerne durch Homogenisieren mit einem Dounce-Homogenisator hergestellt.

Für den ersten Teil der Untersuchung wurden jeweils 1 Mio Kerne (ca. 10 µg DNA) für 15, 30, 60 bzw. 120 min mit DNaseI verdaut. Nach der Verdauzeit wurde ein vierfaches Volumen 4 M NaCl zugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurde die Proteinmatrix mit Proteinase K verdaut.

Die Ergebnisse des ersten DNaseI-Verdau sind in Abb. 7 in den Spuren 2 bis 5 zu sehen. Man erkennt eine langsame Abnahme der DNA-Menge mit zunehmender Verdauzeit, jedoch bleibt die Größenverteilung unbeeinflusst. In den Spuren 12 und 13 sind die Überstände des Verdau nach 15 und nach 60 min aufgetragen. Die freigesetzte DNA ist vollständig verdaut.

In einem weiteren Ansatz wurden 4 Mio Kerne für 30 min bei 4°C mit einem vierfachen Volumen 4 M NaCl hochsalzextrahiert, die Matrix abzentrifugiert und nach Waschen und Lösen in DNaseI-Puffer aliquotiert und für 15, 30 und 60 min mit DNaseI verdaut. Anschließend erfolgte eine weitere Hochsalzextraktion und nach Abzentrifugieren ein Proteinase K-Verdau. Die Ergebnisse sind in den Spuren 7 bis 9 in Abb. 7 zu sehen: Bedingt durch die Hochsalzextraktion bleibt deutlich weniger DNA übrig. Die Größenverteilung entspricht jedoch derjenigen des ersten DNaseI-Verdau und der Gesamtpräparation.

Zum Vergleich wurde eine vollständige Matrixpräparation mit 2 Mio Kernen mit einem DNaseI-Verdau, einer Hochsalzextraktion und einem zweiten DNaseI-Verdau durchgeführt. Diese ist in Spur 10 zu sehen. Die Größenverteilung entspricht in etwa dem Präparationsschritt mit nur einem DNaseI-Verdau, allerdings ist bei der vollständigen Präparation der kürzere Bereich zwischen 300 und 2000 bp Länge stärker betont. In Spur 11 ist der Überstand nach der Hochsalzextraktion aufgetragen. Dieser Überstand enthält nur sehr langkettige DNA. Der Überstand nach dem ersten DNaseI-Verdau in den Spuren 12 und 13 dagegen ist frei von erkennbarer DNA, d.h. die beim Verdau von der Matrix freigesetzte DNA wird vollständig abgebaut.

Somit ergibt sich, daß die verwendeten Verdaubedingungen mit DNaseI nicht zur gewünschten Fragmentlänge der DNA führten.

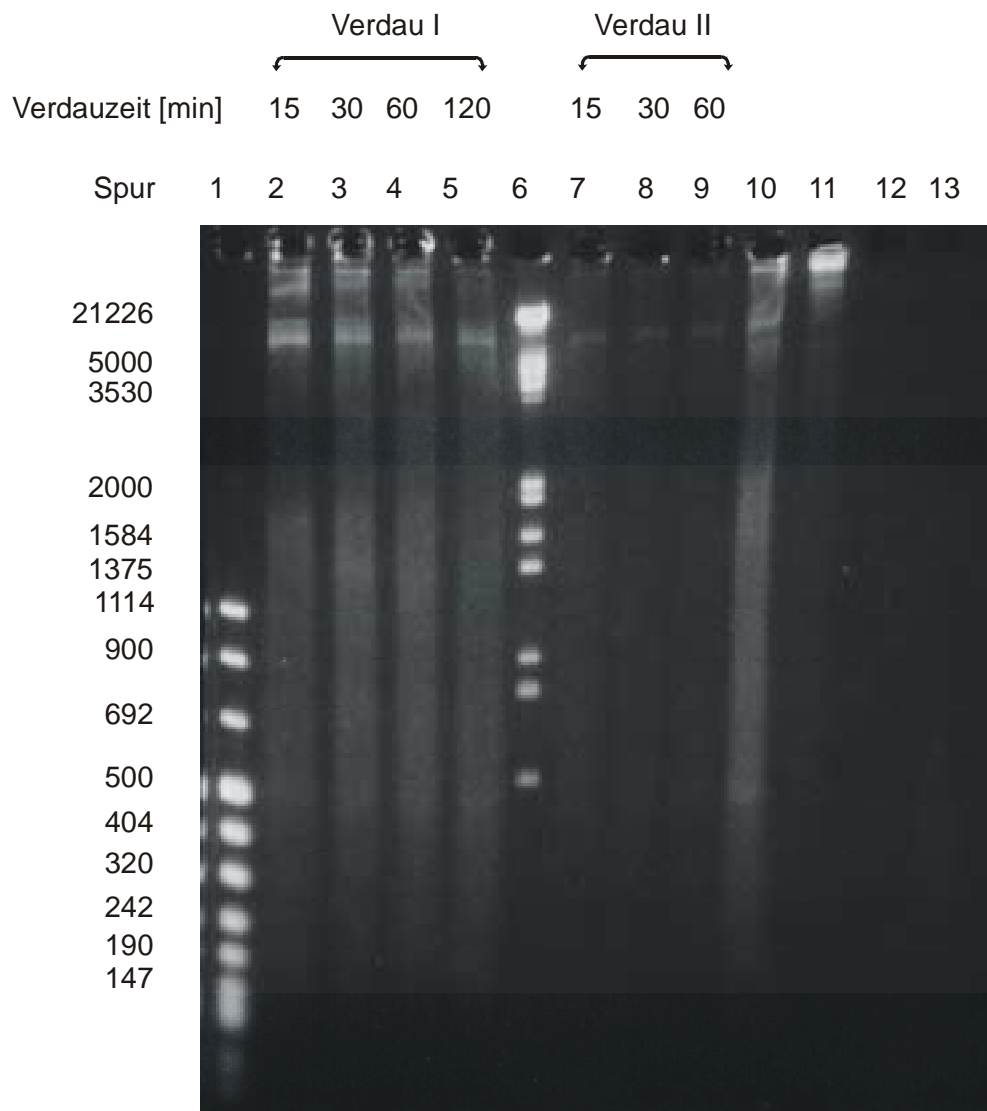


Abb. 7: 2% Agarosegel einer schrittweisen Matrixpräparation, Ethidiumbromid-Färbung. Es wurde eine Matrixpräparation aus isolierten Kernen mit unterschiedlichen DNaseI-Verdauzeiten durchgeführt. Die jeweils nach den entsprechenden Schritten gewonnene DNA wurde nach dem Entfernen von Proteinen durch Proteinase K-Verdau auf das Gel aufgetragen. Spur 1: Längenstandard VIII (Boehringer); Spuren 2-5: erster DNaseI-Verdau, Verdauzeiten: 15, 30, 60 und 120 min; Spur 6: Längenstandard III (Boehringer); Spuren 7-9: DNaseI-Verdau nach Hochsalzextraktion, Verdauzeiten: 15, 30 und 60 min; Spur 10: Vollständig präparierte Matrix; Spur 11: Überstand nach 4 M NaCl-Hochsalzextraktion; Spuren 12-13: Überstände nach DNaseI-Verdau von einer Gesamtpräparation mit 15 bzw. 60 min DNaseI-Verdau.

Ein nicht unwesentliches Problem bei der Präparation matrixassoziierter DNA stellte ein durch austretendes Chromatin verursachtes "Verklumpen" der Kerne dar. Durch die zahlreichen Zentrifugationsschritte bildete sich ein sehr festes Pellet, das sich weder durch DNaseI-Verdau noch durch starkes Auf- und Abpipettieren wieder vollständig in Lösung bringen ließ. Dies erklärt Schwankungen bei der Bestimmung der ^3H -Aktivität (Tab. 1 in 3.2). Zudem sind beim wiederholten Aufziehen mit der Pipette Verluste von Matrix-DNA, die an der Pipettenspitze verbleibt, nicht zu vermeiden. Somit ist die Bilanzierung der Matrixpräparation aus isolierten Kernen mit größeren Fehlern behaftet als die *in Situ* Matrixpräparation (3.2.2), bei der es zu keinen nennenswerten Materialverlusten kommt.

Durch die Bildung nicht mehr resuspendierbarer Pellets konnte zudem nicht ausgeschlossen werden, daß sich im Inneren des Pellets Nuklease-unzugängliche Bereiche befinden, die somit verdau-"geschützt" und von tatsächlich verdaugeschützter DNA nicht unterscheidbar sind.

Insgesamt eignet sich die Präparation aus isolierten Kernen für eine nachfolgende Analyse der verdaugeschützten DNA somit nicht. Deshalb wurde die Präparation matrixgeschützter DNA aus isolierten Kernen zugunsten der *in Situ* Präparation (3.2.2) nicht weiterverfolgt.

3.2.2 In Situ Präparation der Kernmatrix

Eine geeignete Methode zur Präparation der Kernmatrix stellt die *in Situ* Matrixpräparation nach Staufenbiel und Deppert (Staufenbiel, 1984) dar. Dabei werden sämtliche Schritte während der Präparation auf einer mit Zellen bewachsenen Glaspetrischale durchgeführt, indem die Wasch-, Verdau- oder Hochsalzlösungen vorsichtig auf die Platte gegeben und nach Umschwenken oder einer Inkubationszeit wieder rasch und vollständig abgesaugt werden. Die Zellen behalten somit während der gesamten Präparationszeit ihre ursprüngliche Morphologie bei. Dabei erscheinen die Zellkerne, insbesondere nach der ersten Hochsalzextraktion, aufgrund des Proteinverlustes bei Betrachtung im Phasenkontrastmikroskop transparent.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode gegenüber der Präparation aus isolierten Kernen liegt darin, daß die Zellen während der Matrixpräparation stets als Monolayer vorliegen; somit wird ein Verkleben der Kerne miteinander durch austretendes Chromatin verhindert. Für den Zutritt der Nukleasen bestehen also geeignete Bedingungen.

Zudem ist bei Anwendung dieser Methode auch ein mehrfaches Wiederholen der enzymatischen Verdauerschritte mit anschließender Hochsalzextraktion ohne Zellverluste möglich.

Generell wird nach jedem Präparationsschritt der Zellrasen unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet, um ein eventuelles Ablösen von Zellen während der Präparation zu erkennen. Es wurden jedoch keine erkennbaren Ablösungen beobachtet.

Auch bei der *in Situ* Matrixpräparation wurde eine ^3H -Vormarkierung durchgeführt, um den Fortgang der Präparation verfolgen zu können. Die Bestimmung der ^3H -Werte erfolgte hierbei aus dem Überstand, so daß die durch den Verdau oder die Hochsalzextraktion freigesetzte DNA analysiert wird. Die bei den einzelnen Schritten freigesetzte ^3H -Radioaktivität bildet somit - im Gegensatz zu der Präparation aus Kernen, bei denen ein Aliquot des Präparationsansatzes ausgezählt wird - tatsächlich den Fortgang der Matrixpräparation ab.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden die unspezifischen Nukleasen DNaseI und Mikrokokkusnuklease verwendet, um die nicht durch Proteine verdaugeschützte DNA abzubauen.

3.2.2.1 Bilanzierung der Abreicherung nicht verdaugeschützter DNA

Zur *in Situ* Matrixpräparation mit DNaseI bzw. Mikrokokkusnuklease wurden mit SV40 infizierte CV1-Zellen 24 bzw. 36 h nach der Infektion mit SV40-Viren aufgearbeitet bzw. unter hypoxische Bedingungen gesetzt. Die Zellen wurden bei der Präparation zunächst auf der Glaspetrischale mit dem nichtionischen Detergens Nonidet NP40 permeabilisiert. Anschließend wurde ein Nuklease-Verdau (DNaseI bzw. Mikrokokkusnuklease und RNase) unter Niedrigsalzbedingungen (0,01 M NaCl) durchgeführt. Daran schloß sich eine Hochsalzextraktion (2 M NaCl) an. Bei einer "Hochsalzschaukel" wurden der Nuklease-Verdau und die Hochsalzextraktion jeweils dreimal wiederholt. Nach der letzten Hochsalzextraktion wurde noch ein Nuklease-Verdau vorgenommen; schließlich wurden die Zellreste mittels SDS-haltigen Proteinase K-Verdaupuffers von der Glasschale abgelöst. Die Proteinmatrix wurde durch Proteinase K degradiert, mit Phenol und Chloroform extrahiert und die so gewonnene DNA nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase ^{32}P -endmarkiert.

Um den Verlauf und den Fortschritt der Matrixpräparation verfolgen zu können, wurden die Zellen 16 h vor dem Aufarbeiten mit ^3H -Thymidin (in der Regel jeweils 10 μCi) und nichtradioaktivem, "kaltem" Thymidin in einer Endkonzentration von 4 mM vormarkiert. Die in den Tabellen wiedergegebenen ^3H -Meßwerte wurden durch Auszählen eines Aliquots der jeweiligen Überstände in Szintillator gewonnen und auf das Gesamtvolumen aufgerechnet. Die Summe aller so errechneten ^3H -Meßwerte ergibt 100% der eingebauten Aktivität. Während der Lyse der Zellen zu Beginn der Präparation durch NP40 wurde keine säurefällbare Radioaktivität freigesetzt. Dies rechtfertigt, daß in den folgenden Schritten auf eine Säurefällung der DNA verzichtet wurde, zumal durch die Anwesenheit der Nukleasen in den Verdaupuffern nicht mehr säurefällbare Fragmente entstehen.

Zunächst sollte die *in Situ* Matrixpräparation nach Deppert *et al.* (Staufenbiel, 1984), die zwei DNaseI-Verdauschritte und eine Hochsalzextraktion beinhaltet, untersucht werden (Tab. 2).

Tab. 2: *In Situ* Matrixpräparation mit DNaseI, 10 Mio. Zellen, 145 mm Petrischale. Vormarkierung: 10 μ Ci und 16 h 3 H-Thymidin und 4 mM "kaltes" Thymidin für 16 h in Spalte 1, 20 μ Ci und 1 h 3 H-Thymidin und 1 mM "kaltes" Thymidin für 1 h in Spalte 2. Präparationsbedingungen: Lyse der Zellen, 2x DNaseI-Verdau, 1x Hochsalzextraktion

	Präparation 36 h p.i. Markierung: 16 h; 10 μ Ci	Präparation 36 h p.i. Markierung: 1 h; 20 μ Ci
Schritt	% der ursprünglich vorhandenen cpm	% der ursprünglich vorhandenen cpm
DNase, 1. Schritt	54,6	78,2
Hochsalzextraktion	37,4	20,4
DNase, 2. Schritt	3,5	1,0
Proteinase K-Verdau	4,5	0,4

Als Resultat ergibt sich, daß bei Präparation mit langer Vormarkierungszeit (16 h) nach dem finalen Präparationsschritt sich noch 4,5% der insgesamt eingebauten Radioaktivität in der geschützten DNA befindet. Durch den ersten Verdauerschritt und die Hochsalzextraktion werden bereits über 90% der Radioaktivität freigesetzt (Tab. 2, Spalte 1).

Markiert man die DNA dagegen nur eine Stunde vor der Aufarbeitung mit achtfacher spezifischer Radioaktivität des 3 H-Thymidins, wird eine etwa dreimal so hohe Gesamtaktivität erreicht; zudem wird ein deutlich höherer Prozentsatz der markierten DNA durch den ersten DNaseI-Verdau freigesetzt. In der präparierten Matrix findet sich nur noch 0,4% der gebundenen Radioaktivität (Tab. 2, Spalte 2).

Zusammenfassend ergibt sich, daß eine lange Vormarkierungszeit zu einer vollständigen Durchmarkierung der DNA führt. Der in der Präparation zurückbleibende Anteil an 3 H-Counts stellt also den Anteil der DNA dar, der nach den Nukleaseverdauen noch übrig bleibt. Eine kürzere Markierungszeit führt dazu, daß nur die frisch replizierte DNA markiert wird. Bei der Matrixpräparation nach Kurzmarkierung erhält man so nur 0,4% der Gesamtradioaktivität in der Präparation, während eine 16-stündige Vormarkierung rund 4,5% des Gesamtanteils liefert. Dennoch erhält man bei beiden Präparationen

gleich viel DNA (3.2.2.3). Ein Teil der replizierten DNA wird demnach nach der Replikation in einen hochsalz- und nukleaseresistenten Zustand überführt. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Verpackung der SV40-DNA in Viruspartikel.

In den nachfolgenden Matrixpräparationen wurde eine sogenannte "Hochsalzschaukel" durchgeführt, d.h. es wurden abwechselnd insgesamt vier Nuklease-Verdauschritte und drei Hochsalzextraktionen mit 2 M NaCl vorgenommen. Dabei sollten die nach einer Hochsalzextraktion von Proteinen befreiten DNA-Abschnitte einem Nuklease-Verdau zugänglich werden, aus dem nach dem Entfernen der bisher geschützten DNA möglicherweise eine Extraktion weiterer Proteine möglich sein könnte. In Tab. 3 sind die durch die Präparation freigesetzten ³H-Counts von repräsentativen Matrixpräparationen mit DNaseI 24 h bzw. 36 h nach Infektion der Zellen mit SV40 verglichen.

Tab. 3: *In Situ Matrixpräparationen mit DNaseI*, 10 Mio. Zellen; 145 mm Petrischale. Vormarkierung: 10 µCi ³H-Thymidin sowie 4 mM "kaltes" Thymidin für 16 h. Präparationsbedingungen: Lyse der Zellen, 4x DNaseI-Verdau, 3x Hochsalzextraktion ("Hochsalzschaukel").

	Präparation 24 h p.i.	Präparation 36 p.i.
Schritt	% der ursprünglich vorhandenen cpm	% der ursprünglich vorhandenen cpm
DNase, 1. Schritt	74,9	80,0
Hochsalz 1	24,3	16,5
DNase, 2. Schritt	0,6	1,3
Hochsalz 2	0,07	0,3
DNase, 3. Schritt	0,02	0,2
Hochsalz 3	0,04	0,1
DNase, 4. Schritt	0,02	0,1
Proteinase K-Verdau	0,1	1,5

In Tab. 4 sind die Ergebnisse von repräsentativen Matrixpräparationen mit Mikrokokusnuklease als Enzym nach gleicher Infektionsdauer der Zellen gezeigt.

Tab. 4: *In Situ* Matrixpräparationen mit Mikrokokusnuklease, 10 Mio Zellen, 145 mm Petrischale. Vormarkierung: 10 μCi ^3H -Thymidin und 4 mM "kaltes" Thymidin für 16 h. Präparationsbedingungen: Lyse der Zellen, 4x DNaseI-Verdau, 3x Hochsalzextraktion ("Hochsalzschaukel").
 μN : Mikrokokusnuklease.

	Präparation 24 h p.i.	Präparation 36 h p.i.
Schritt	% der ursprünglich vorhandenen cpm	% der ursprünglich vorhandenen cpm
μN , 1. Schritt	49,3	76,3
Hochsalz 1	47,4	19,2
μN , 2. Schritt	1,6	2,2
Hochsalz 2	1,6	0,7
μN , 3. Schritt	0,2	0,4
Hochsalz 3	0,07	0,2
μN , 4. Schritt	0,04	0,2
Proteinase K-Verdau	0,1	0,8

Im Ergebnis erwies sich bei der Präparation kernmatrixassoziierter DNA mit **DNaseI** die Verwendung der "Hochsalzschaukel" als sinnvoll. Bei nur einer Hochsalzextraktion 36 h nach Infektion der Zellen mit SV40 wurden 95,5% der ^3H -Vormarkierung entfernt (Tab. 2). Dagegen konnten durch eine dreifache Hochsalzextraktion mit insgesamt vier Verdauenschritten 98,5% der Vormarkierung entfernt werden (Tab. 3).

Führt man die Präparation bereits 24 h nach Infektion mit SV40 durch, werden 99,9% der Vormarkierung entfernt (Tab. 3). Dies kann man darauf zurückführen, daß nach 36 h bereits sehr viel mehr Viruspartikel fertig verpackt und somit vor einem Verdau ge-

schützt sind. 20 Stunden p.i. sind die meisten Virusgenome noch unverpackt und damit DNase-sensitiv (Deppert, 1995). Ab 30 Stunden nach Infektion mit SV40 steigt der Anteil der in Virionen verpackten SV40-DNA stark an, so daß ein höherer Anteil fertiger SV40-Partikel matrixgebunden ist und daher mitpräpariert wird (Deppert, 1995).

Diese Beobachtung stimmt auch mit den Ergebnissen bei kurzer Vormarkierungszeit überein (3.2.2.1): In beiden Fällen ist nur wenig markierte DNA in Virionen verpackt worden, so daß ein deutlich höherer Prozentsatz der Vormarkierung entfernt werden kann.

Bei einer Präparation verdaugeschützter DNA mit **Mikrokokkusnuklease** werden 36 h nach Infektion mit SV40 99,2% einer ^3H -Vormarkierung entfernt (Tab. 4). Diese Methode der Präparation liefert somit nur etwa die halbe Menge an DNA, die man bei der Präparation mit DNaseI erhält (0,8% mit Mikrokokkusnuklease gegenüber 1,5% mit DNaseI). Dies kann zwei Ursachen haben: Einerseits ist denkbar, daß Mikrokokkusnuklease die ungeschützte DNA vollständiger entfernt, was bedeuten würde, daß die Verwendung dieses Enzyms eine bessere Präparationsmethode darstellt. Andererseits kann es, wie von Jackson (Jackson, 1990) gezeigt, in Abhängigkeit vom Salzgehalt der Puffer (in diesem Fall: die unterschiedliche Zusammensetzung der beiden Verdaupuffer) entweder zu einem Ablösen von DNA von der Proteinmatrix oder aber zu einem Auftreten neuer Protein-DNA-Wechselwirkungen kommen. Wie in 3.1. beschrieben, war aber die Verwendung unterschiedlicher Verdaupuffer bei beiden Enzymen notwendig.

Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten ist nicht möglich.

Beide Nukleasen liefern 24 h nach Infektion ähnliche Ergebnisse. Bei Verdau mit Mikrokokkusnuklease und DNaseI wurden 99,9% der Vormarkierung entfernt (Tab. 3 und 4).

Vergleicht man die Ergebnisse 36 h p.i., dann sind Unterschiede bei Verwendung der verschiedenen Enzyme zu erkennen: Der bei der Präparation mit DNaseI verbleibende Anteil der ^3H -Aktivität ist etwa doppelt so hoch wie der mit Mikrokokkusnuklease.

Insgesamt ergibt sich, daß ein bestimmter Anteil der DNA im Zeitraum zwischen 24 h p.i. und 36 h p.i. in einen hochsalz- und nukleaseresistenten Zustand überführt wird. Die plausibelste Erklärung dafür ist, wie bereits erwähnt, das Verpacken von SV40-DNA in Viruspartikel.

3.2.2.2 Größenverteilung der ^3H -markierten DNA

Eine Möglichkeit, die Größenverteilung der dargestellten DNA zu untersuchen, besteht darin, die ^3H -Radioaktivität einer vormarkierten, verdaugeschützten DNA-Präparation direkt aus einem Agarosegel zu bestimmen. Dafür wurde von *in Situ* Matrixpräparationen mit DNaseI (Präparation 36 h p.i.) resultierende DNA in einem Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechenden Spuren wurden nach dem Gellauf ausgeschnitten, in 0,5 cm lange Stücke zerteilt und anschließend in 0,5 M HCl aufgelöst. Die Lösungen wurden nach Versetzen mit Szintillator-Flüssigkeit im ^3H -Kanal ausgezählt.

% der gesamten cpm

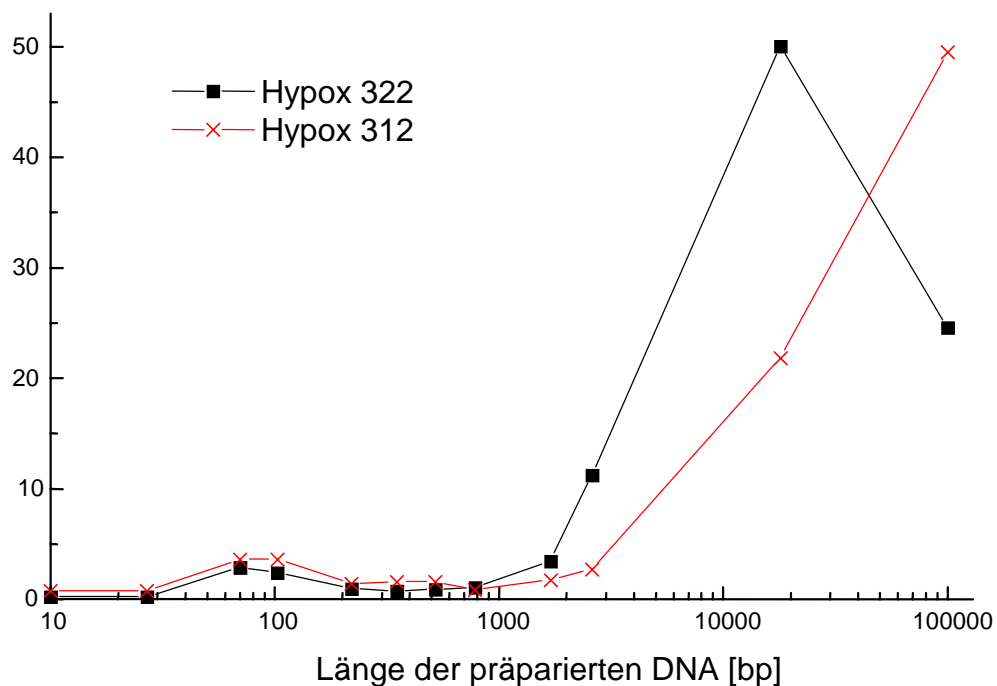


Abb. 8: DNA-Größenverteilung matrixgeschützter DNA zweier hypoxischer Matrixpräparationen mit DNaseI (Hypox 312 und Hypox 322). Nach Auftrennung der ^3H -markierten DNA in einem 2%-igen Agarosegel wurden die Gelspuren ausgeschnitten, in 0,5 cm lange Stücke zerteilt und in 0,5 M HCl aufgelöst. Für die Bestimmung der Laufstrecken wurden die Längensstandards III und VIII von Boehringer verwendet. Die mittlere Länge der präparierten Matrix-DNA in einem Gelstück wurde anhand der zurückgelegten Laufstrecke bestimmt.

Es ergibt sich, daß 85 bis 90% der präparierten DNA größer als 2 kB ist (Abb. 8). Die restliche Aktivität verteilt sich über den übrigen Größenbereich. Ein kleinerer Aktivitätsanstieg mit etwa 5% der Gesamtaktivität zeigt sich im Bereich von 40 bis 250 bp in allen untersuchten Präparationen. Dieses Ergebnis findet sich auch nach Auftrennung ³²P-endmarkierter DNA (3.2.2.3).

DNA im Größenbereich zwischen 40 und 250 bp stellt die gewünschte Größe der durch Matrixassoziation verdaugeschützten DNA dar, jedoch ist der erhaltene Anteil mit rund 5% sehr gering.

Im Hinblick auf eine Untersuchung der DNA-Replikation durch Hybridisierung (3.3) bedeutet dies, daß das spezifische Signal im Hintergrund des Gesamthybridisierungssignals verschwimmt und nicht für quantitative Untersuchungen verwendet werden kann.

3.2.2.3 Größenverteilung der ^{32}P -markierten DNA

Eine im Vergleich zum Auszählen der ^3H -Aktivität in Gelstreifen feinere Auflösung und damit eine bessere Analyse der Größenverteilung der präparierten verdaugeschützten DNA ist durch Autoradiographie eines Agarosegels möglich, in dem eine mit $\gamma[^{32}\text{P}]$ -ATP endmarkierte DNA-Präparation aufgetrennt wird. Dabei wird die markierte DNA nach der Auftrennung in einem Agarosegel zunächst in 10%-iger Essigsäure fixiert und anschließend unter Vakuum getrocknet. Die ^{32}P -endmarkierte DNA wird durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Geschlossene DNA-Ringe (sc DNA) können nicht endmarkiert werden, da die DNA kein freies 5'-Ende besitzt. Somit stellt sich das zirkulär geschlossene, komplette SV40-Virusgenom in den ^{32}P -Autoradiographien nicht dar.

Eine weitere Untersuchung ist durch Southern Blot-Analyse möglich. Dabei wird unmarkierte DNA einer Matrixpräparation in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die auf der Membran gebundene DNA wird anschließend mit ^{32}P -markierter SV40-DNA hybridisiert. Dadurch wird es möglich, spezifisch nur die SV40-DNA einer Präparation darzustellen.

In Abb. 9 ist eine Autoradiographie eines Agarosegels gezeigt, in dem die DNA verschiedener Matrixpräparationen aufgetrennt wurde. Abb. 10 zeigt den Southern Blot derselben Präparationen. Es wurden (mit Ausnahme der Spur 5 in Abb. 10) gleiche Anteile der Präparationen aufgetragen, so daß ein direkter DNA-Mengenvergleich möglich ist. Im analytischen Gel ist ^{32}P -endmarkierte DNA aus verschiedenen *in Situ* Matrixpräparationen mit DNaseI (Spuren 3 und 4 in Abb. 9 und Spuren 3 bis 5 in Abb. 10) und Mikrokokkusnuklease (Spuren 1 und 2 in Abb. 9 und Abb. 10) dargestellt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte 24 h p.i. (Spuren 1 bis 3 in Abb. 9 und Spuren 1 bis 4 in Abb. 10) bzw. 36 h p.i. (Spur 4 in Abb. 9 und Spur 5 in Abb. 10). Als Präparationsmethode wurde eine "Hochsalzschaukel" (Spuren 2 und 3 in Abb. 9 und Abb. 10) bzw. nur eine Hochsalzextraktion (Spuren 1 und 4 in Abb. 9 und Spuren 1 und 5 in Abb. 10) oder gar kein Hochsalzschritt (Spur 4 in Abb. 10) verwendet.

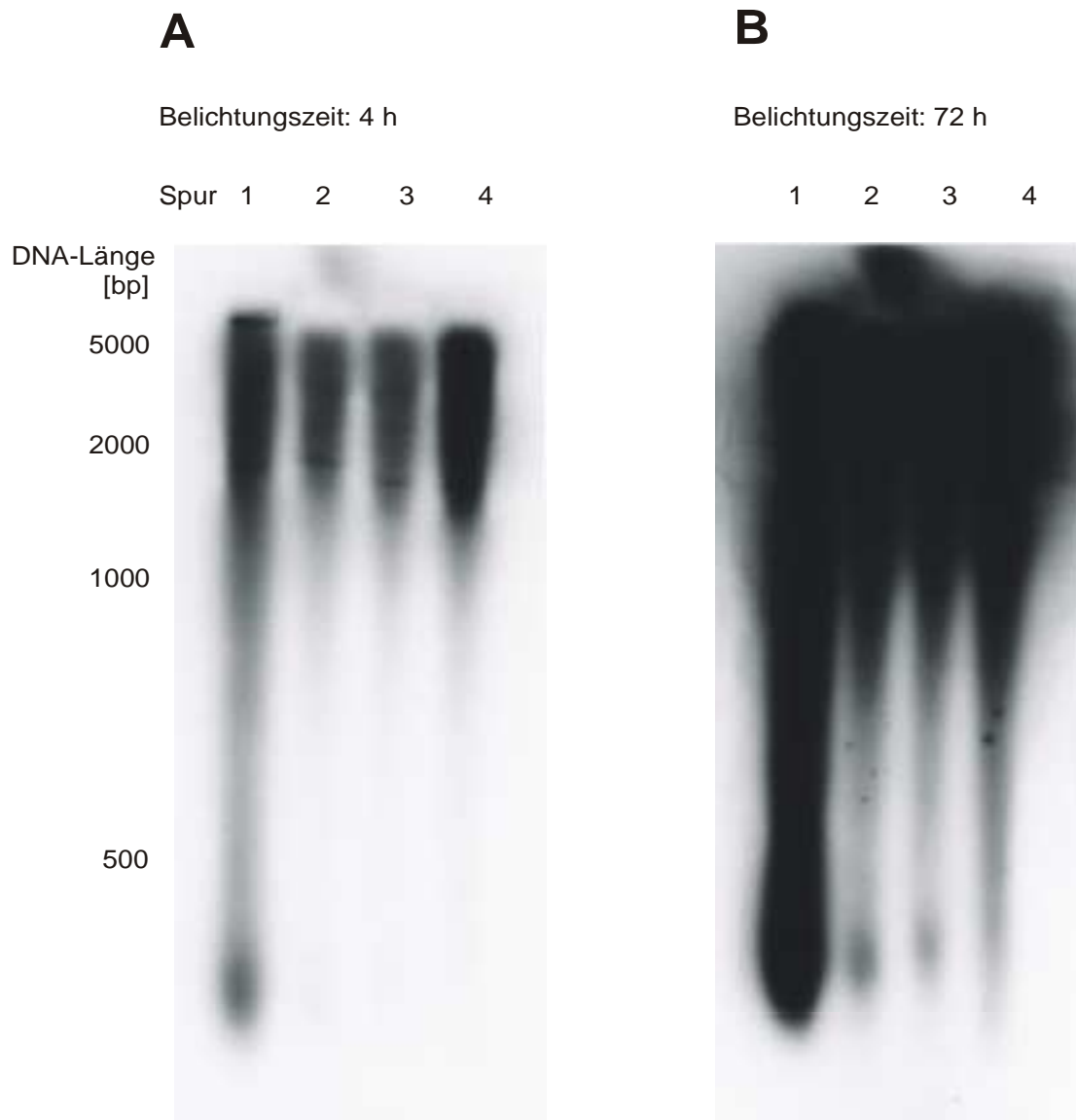


Abb. 9: Autoradiographie eines Agarosegels mit ^{32}P -endmarkierter DNA nach 4 h (A) bzw. 72 h (B) Belichtungszeit.

DNA von verschiedenen Matrixpräparationen wurde mit $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ endmarkiert und auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde die DNA mit 10% Essigsäure im Gel fixiert und nach dem Trocknen des Gels eine Autoradiographie durchgeführt.

Als Proben wurden zwei Präparationen mit Mikrokokkusnuklease (Spuren 1 und 2) und zwei Präparationen mit DNase I (Spuren 3 und 4) verwendet. Bei den Präparationen in den Spuren 2 und 3 wurde eine Hochsalzschaukel durchgeführt, bei den Präparationen in den Spuren 1 und 4 einmal hochsalzextrahiert. Die Proben wurden 24 h p.i. (Spuren 1 bis 3) bzw. 36 h (Spur 4) nach Infektion mit SV40 aufgearbeitet.

Die Größenangaben der DNA wurden aus einem im Gel aufgetrennten, nichtradioaktiven Längenstandard bestimmt.

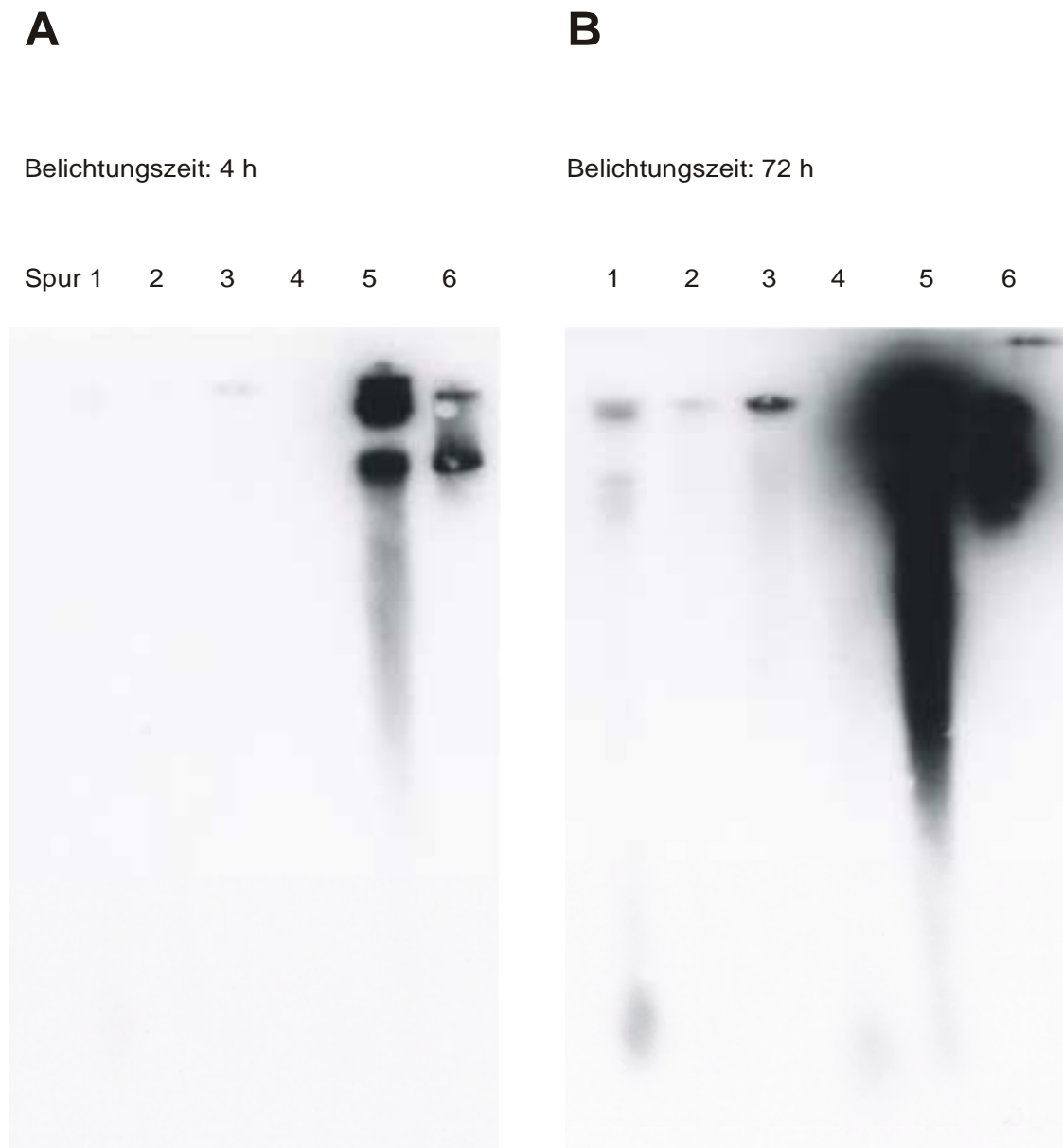


Abb. 10: *Autoradiographie eines Southern Blots* nach 4 h (A) bzw. 72 h (B) Belichtungszeit. DNA aus verschiedenen Matrixpräparationen wurde in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und nach Übertragung der DNA auf eine Hybond N⁺-Membran (Amersham) mit ³²P-markierter SV40-DNA hybridisiert.

Es wurden Matrixpräparationen mit Mikrokokusnuklease (Spuren 1 und 2) und DNaseI (Spuren 3 bis 5) aufgetragen. Bei den Präparationen in den Spuren 1, 4 und 5 wurde einmal hochsalzextrahiert, bei den Präparationen in den Spuren 2 und 3 eine Hochsalzschaukel durchgeführt. In Spur 4 ist eine Präparation ohne jede Hochsalzextraktion gezeigt. Die Proben wurden 24 h (Spuren 1 bis 4) bzw. 36 h (Spur 5) nach Infektion mit SV40 aufgearbeitet. Zur deutlicheren Darstellung wurde in Spur 5 die zehnfache Menge DNA aufgetragen.

Als Standard wurde cäsiumchloridgereinigte SV40-DNA verwendet (Spur 6).

Abb. 9 zeigt, daß 95 bis 99% der DNA größer als 2 kB ist, unabhängig davon, ob die Matrixpräparation 24 oder 36 h nach Infektion mit SV40 durchgeführt wurde. Auch die Verwendung der "Hochsalzschaukel" verändert das Erscheinungsbild nicht, lediglich die Gesamtmenge an DNA wird reduziert.

Wie erst nach sehr langer Belichtungszeit deutlich wird, ist die aufgereinigte DNA bei allen Präparationen tatsächlich über den gesamten Größenbereich verteilt (Abb. 9). Ein zweiter, schwach ausgeprägter Schwerpunkt der Aktivität findet sich im Bereich von 80 bis 250 bp. Der Anteil dieser Aktivität kann aufgrund der Intensität der Schwärzung auf unter 5% geschätzt werden.

Folgende zwei Beobachtungen zeigen, daß es sich bei der hochmolekularen DNA wirklich um langkettige DNA handelt und nicht um reassozierte DNA, was nach einem enzymatische Verdau, bei dem überhängende Enden entstehen (beispielsweise durch die versetzten Einzelstrangsnitte durch DNaseI), theoretisch denkbar wäre: Bei der Präparation "verdaugeschützter" DNA mit Mikrokokkusnuklease erhält man eine DNA, die auf einem analytischen Gel nicht von einer Präparation mit DNaseI zu unterscheiden ist, bei der also ebenfalls über 95% der DNA größer ist als 2 kB (Abb. 9). Die Mikrokokkusnuklease führt jedoch Doppelstrangsnitte durch. Außerdem führt die Auftrennung der mit DNaseI präparierten DNA in einem alkalischen Agarosegel, in welchem nicht-kovalente Bindungen der DNA aufgehoben werden, zum gleichen Ergebnis wie mit einem neutralen Gel: Über 95% der DNA ist größer als 2 kB (nicht gezeigt).

Der Vergleich der Ergebnisse der ^{32}P - mit denen der ^3H -Markierung zeigt, daß sich die gleichen Schlüsse ergeben. Dies trifft sowohl für die Größenverteilung als auch für die relativen Verhältnisse der beiden Gipfel bei 2 kB und ca. 100-250 bp zueinander zu.

Weder im analytischen Gel (Abb. 9) noch im Southern Blot (Abb. 10) fallen zwischen den Präparationen mit und ohne Hochsalzschaukel qualitative Unterschiede auf.

Die Southern Blot-Analysen in Abb. 10 zeigen, daß die SV40-DNA fast ausschließlich in Form kompletter Genome vorliegt, die in verschiedenen topologischen Formen vorkommen und sich im Gel aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten auftrennen lassen. Dabei handelt es sich um superspiralisierte und relaxierte Ringe. Dies kann in einem Vergleichsexperiment mit parallel aufgetragener, cäsiumchloridgereinigter superspiralierter SV40-DNA gezeigt werden (Spur 6 in Abb. 10).

Diese starken Banden der SV40-Genome sind in den ^{32}P -Autoradiographien nicht sichtbar (Abb. 9), da sie nicht durch Polynukleotidkinase endmarkierbar sind.

Es ist anzunehmen, daß die gesamte vollständige SV40-DNA einer Präparation superspiralisiert vorliegt (Deppert, 1995) und die relaxierten Ringe ein Isolationsartefakt sind, da bereits ein Einzelstrangbruch ausreicht, um die Relaxation eines superspiralisierten Ringes zu ermöglichen. Dies ist teilweise auch bei der cäsiumchloridgeinigten Vergleichs-SV40-DNA nach der Zentrifugation geschehen, deshalb ist dort auch mehr als eine Bande zu erkennen (Spur 6, Abb. 10).

Neben vollständiger SV40-DNA findet sich bei der Southern Blot-Analyse, ähnlich wie bei der gelelektrophoretischen Auftrennung, ein über den gesamten Größenbereich verteilter Schmier (Spur 5 in Abb. 10). Diese Intensitätsverteilung ist der aus Abb. 9 sehr ähnlich (Spur 4 in Abb. 9 und Spur 5 in Abb. 10 bei 72 h Belichtungszeit; beide Spuren zeigen die gleiche Präparation). Daneben findet man einen zweiten, sehr schwachen Aktivitätsgipfel im Größenbereich von etwa 100 bis 200 bp (Spuren 1 bis 5 in Abb. 10). Dieser kleine Aktivitätsgipfel, der in analytischen ^{32}P -endmarkierten Gelen und in ^3H -Gelen gefunden wird, zeigt sich also auch im Southern Blot.

Im Anschluß an den Proteinase K-Verdau, welcher bei jeder Präparation als letzter Schritt durchgeführt wird, ist die gesamte DNA einer Matrixpräparation bei Verwendung von DNaseI vollständig abbaubar und somit nicht mehr in einem Agarosegel darstellbar (nicht gezeigt). Dies beweist, neben der grundsätzlichen Markierbarkeit durch Polynukleotidkinase (Abb. 9), daß es sich bei den in den Autoradiographien dargestellten Schwärzungen um DNA und nicht um Verunreinigungen handelt.

Zusammenfassend läßt sich festhalten: Alle durchgeführten Untersuchungen der präparierten verdaugeschützten DNA zeigen dasselbe Ergebnis. Etwa 95% der DNA, die bei einer Präparation matrixassoziierter DNA gewonnen wird, ist mit über 2 kB unerwartet groß. Die SV40-spezifische DNA liegt fast ausschließlich in Form von vollständigen, superspiralisierten Genomen vor. Sie stammt wahrscheinlich aus zum Zeitpunkt der Matrixpräparation bereits in Virionen verpackter SV40-DNA. Damit konnte das angestrebte Ziel, kurze verdaugeschützte DNA-Fragmente herzustellen, mit keiner der untersuchten Präparationsmethoden erreicht werden.

3.2.3 Hochsalzresistenz von SV40-DNA in infizierten Zellen durch schrittweise Hochsalzextraktion

Durch die Hochsalzextraktion der Matrixpräparationen werden nichtkovalente Protein-Protein- bzw. Protein-DNA-Assoziationen aufgehoben, bei denen unter anderem ionische Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Dadurch werden vorher geschützte DNA-Bereiche dem enzymatischen Verdau zugänglich gemacht und können in einem erneuten Verdauschritt entfernt werden. Die Hochsalzextraktion stellt einen kritischen Schritt der Matrixpräparation dar, da DNA-Protein-Bindungen neu geschaffen oder verändert werden können (Jackson, 1990). Andererseits ist aber eine genügend hohe Salzkonzentration notwendig, um locker gebundene Proteine zu entfernen.

Um festzustellen, wie hoch die benötigte Salzkonzentration während der Hochsalzextraktion sein muß, wurden *in situ* Matrixpräparationen mit DNaseI 36 h nach Infektion mit SV40 durchgeführt. Es sollte nur die zuletzt synthetisierte DNA vormarkiert werden, so daß eine ^3H -Vormarkierung für 60 min durchgeführt wurde. Zur Bestimmung der Effizienz der Salzextraktion bei verschiedenen Salzkonzentrationen wurde nach dem ersten DNaseI-Verdau, beginnend mit 0,25 M NaCl, mit zunehmend höherer NaCl-Konzentration extrahiert. Die NaCl-Lösung verblieb dazu jeweils für 15 Minuten bei 4°C auf der Platte. Die gesamte Lösung wurde anschließend abgenommen, aufgearbeitet und die Salzlösung mit der nächst höheren Konzentration zugegeben. Die beiden DNase-Verdauschritte wurden jeweils 30 min bei 37°C durchgeführt. Die in den Lösungen enthaltene ^3H -Aktivität der Vormarkierung wurde direkt durch Auszählen eines Aliquots mit Szintillator bestimmt. Zur Charakterisierung der DNA wurden die Lösungen zweifach mit Phenol und anschließend einmal mit Chloroform extrahiert, durch Dialyse entsalzt, mit Butanol eingengt und die DNA mit Ethanol gefällt. Die DNA wurde auf 2%-igen Agarosegelen sowohl neutral als auch alkalisch aufgetrennt und nach einem Transfer auf Hybond N⁺-Membranen gegen ^{32}P -markierte SV40-DNA hybridisiert.

In Tab. 5 ist der Verlauf einer Präparation anhand der freigesetzten ^3H -Counts dargestellt.

Schritt:	% der eingebauten cpm
DNaseI, 1. Schritt	89,6
Hochsalz 0,25 M	3,4
Hochsalz 0,5 M	3,3
Hochsalz 0,75 M	2,6
Hochsalz 1 M	0,7
Hochsalz 1,25 M	0,2
Hochsalz 1,5 M	0,03
Hochsalz 1,75 M	Leerwert
Hochsalz 2 M	Leerwert
DNaseI, 2. Schritt	Leerwert
Proteinase K-Verdau	0,1

Tab. 5: *In situ* Matrixpräparation mit DNaseI und einer schrittweisen Hochsalzextraktion, 36 h p.i.

^3H -Vormarkierung: 20 μCi ^3H -Thymidin und 1 mM "kaltes" Thymidin für 60 min.

Die Hochsalzextraktion wurde in 0,25 M NaCl-Konzentrationschritten durchgeführt. Es wurde jeweils ein Aliquot der Überstände der einzelnen Extraktions- und Verdauschritte ausgezählt und daraus die ^3H -Radioaktivität der Gesamtpräparation berechnet.

Es ergibt sich, daß 99,9% der markierten DNA bis zu einer NaCl-Konzentration von 1,5 M entfernt wurde, wobei fast ausschließlich superspiralisierte SV40-DNA freigesetzt wurde (Abb. 11). Höhere Salzkonzentrationen als 1,5 M NaCl lieferten lediglich einen ^3H -Leerwert, es wurde also keine weitere DNA freigesetzt.

Für die Präparation salzlöslicher DNA sind also NaCl-Konzentrationen von mindestens 1,25 M notwendig.

Nach Permeabilisierung der Zellmembranen mit NP40 tritt keine säurefällbare ^3H -Radioaktivität aus den Zellen aus. Dies bedeutet, daß keine Viruspartikel frei im Cytoplasma vorliegen. Nach dem ersten DNaseI-Verdau wird jedoch 90% der eingebauten Radioaktivität freigesetzt. Die Southern Blot-Analyse (Abb. 11) zeigt, daß der SV40 spezifische Anteil der freigesetzten DNA aus vollständigen SV40-Genomen besteht. Die Nukleaseresistenz der SV40-DNA deutet darauf hin, daß die DNA bereits in SV40-Virionen verpackt ist. Der große Anteil der durch den DNaseI-Verdau freigesetzten SV40-Virionen ist dadurch zu erklären, daß diese SV40-Virionen am Chromatin

verankert sind und, nachdem die DNA durch Nuklease fragmentiert wurde, in Lösung gehen und damit extrahiert werden können.

Zum Zeitpunkt 36 h p.i. findet man etwas mehr matrixgebundene als chromatingebundene SV40-Virionen; das Verhältnis verschiebt sich aber in den folgenden Stunden stark zugunsten der matrixgebundenen Virionen (Deppert, 1995).

In Abb. 11 ist die durch die jeweiligen Präparationsschritte freigesetzte SV40-DNA durch Southern Blot-Analyse dargestellt. Es handelt sich dabei fast ausschließlich um vollständige SV40-DNA in verschiedenen topologischen Formen. Der Großteil der DNA wird bei einer Salzkonzentration von bis zu 1,25 M NaCl freigesetzt, in Übereinstimmung mit den ^3H -Meßwerten in Tab. 5. Bei jedem Extraktionsschritt werden allerdings geringe Mengen an SV40-DNA freigesetzt. Bis zu einer Salzkonzentration von 1 M NaCl findet man auch SV40-DNA im Bereich von unter 50 bp. Diese kurze DNA fehlt dagegen bei den höheren Salzkonzentrationen.

Bei den Verdauungsschritten mit DNaseI findet man in den Überständen keine kurz-kettigen DNA-Fragmente; dies deckt sich mit Vorversuchen, in denen gezeigt wurde, daß DNaseI innerhalb von fünf Minuten freigesetzte DNA vollständig verdaut (3.1.1).

Eine Degradation der Kernmatrix durch eine zu hohe Salzkonzentration würde sich in einem plötzlichen und massiven Ablösen von DNA bemerkbar machen. Zu keinem Zeitpunkt der Salzextraktion kommt es jedoch zu dieser massiven DNA-Freisetzung. Somit konnte gezeigt werden, daß keine zu hohe Salzkonzentration für die Präparation der kernmatrixgebundenen DNA verwendet wurde.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die in den Matrixpräparationen verwendete Salzkonzentration ausreichend war. Kurz-kettige SV40-Fragmente wurden nicht vorzeitig durch die Hochsalzextraktion abgelöst und bleiben folglich während der Präparation erhalten.

Die präparierte matrixgeschützte DNA stellt also tatsächlich die gewünschte hochsalz- und nukleaseresistente DNA dar.

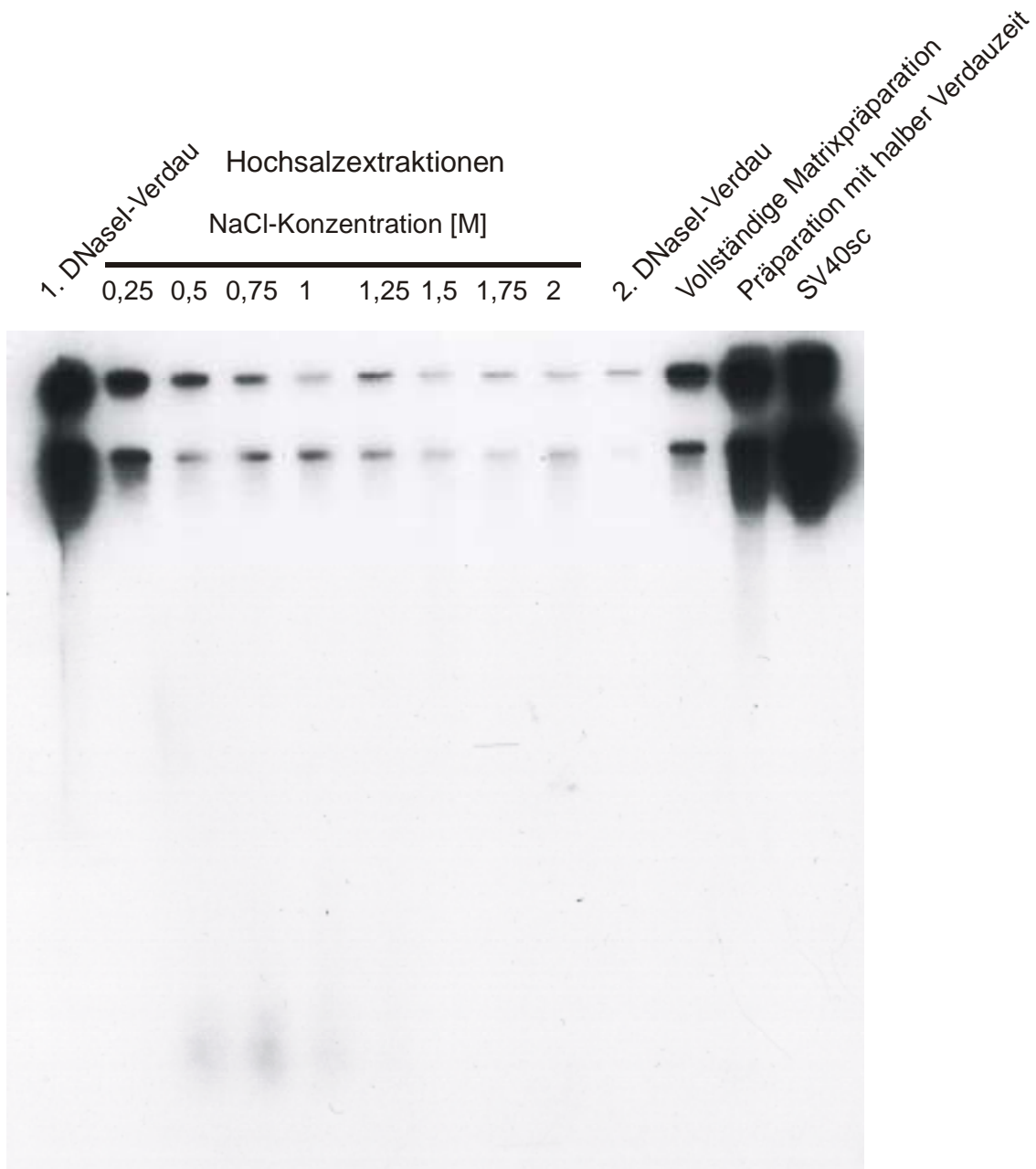


Abb. 11: *Southern Blot-Analyse der Fraktionen einer in situ Matrixpräparation mit DNaseI*, 36 h p.i., Hochsalzextraktion in 0,25 M NaCl-Konzentrationsschritten. Dargestellt sind die freigesetzte DNA der verschiedenen DNaseI-Verdausschritte, die bei den unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen freigesetzte DNA und die durch die Präparation gewonnene Matrix-DNA. In der vorletzten Spur ist eine mit halben DNaseI-Verdauzeiten (je 15 min) präparierte Matrix-DNA aufgetragen, in der letzten Spur eine cäsiumchloridgereinigte superspiralisierte SV40-Vergleichs-DNA.

3.3 Umgekehrte Hybridisierung

Die Replikation des SV40 läuft nach Untersuchungen von Schirmbeck und Deppert (Deppert, 1995) an der Kernmatrix ab. Die DNA wird durch den an der Matrix gebundenen Replikationsapparat hindurchgezogen und dabei dupliziert. Das Fortschreiten der Replikationsgabel läßt sich im Prinzip durch die Lokalisierung der zu einem bestimmten Zeitpunkt matrixgebundenen und damit nukleaseverdaugeschützten SV40-Sequenzen zeigen.

Voraussetzung hierfür ist die Synchronisation der SV40-Replikation, die sich durch Hypoxie und nachfolgende Reoxygenierung erreichen läßt. In SV40-infizierten CV1-Zellen wurde zunächst durch 6 Stunden Hypoxie und anschließende Reoxygenierung die SV40-Replikation synchron gestartet. Zu einem definierten Zeitpunkt wurde die Replikation durch Abkühlen abgebrochen und eine *in situ* Matrixpräparation durchgeführt. Die Bestimmung der zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Reoxygenierung in der Replikation befindlichen und damit verdaugeschützten SV40-Genom-Abschnitte erfolgte durch Matrix-DNA-Präparation, anschließende ^{32}P -Endmarkierung und Hybridisierung gegen einzelsträngige, in M13mp18- bzw. M13mp19-Phagenvektoren inklonierte SV40-Genomfragmente.

Die Analyse der verdaugeschützten DNA erfolgte dabei durch "umgekehrte Hybridisierung". Dabei werden nicht, wie meist üblich, die zu untersuchenden Proben auf einer Membran fixiert und gegen eine bekannte radioaktiv markierte Sonde hybridisiert. Statt dessen wird die Sonde im Überschuß auf einem Träger fixiert und die radioaktive Ziel-DNA durch Hybridisierung selektiv gebunden. Die gebundene DNA kann durch Auszählen im Flüssigszintillator quantifiziert werden.

Trotz der sehr großen DNA-Stücke, die bei den Präparationen entstanden, sollte untersucht werden, ob eine Hybridisierung der ^{32}P -markierten Matrix-DNA gegen die SV40-Sonden durchführbar ist. Die superhelikale und geschlossene SV40-DNA ist, wie bereits erwähnt, nicht mit ^{32}P endmarkierbar und daher bei einer Hybridisierung nicht sichtbar. Somit sollten vollständige SV40-Genome die Hybridisierung zwar als Kompetitor, aber, soweit die DNA noch ringförmig und ungebrochen vorliegt, nicht als Zusatzsignal stören.

Für die Hybridisierungen wurde ein nach Winter (Winter, 1995) optimiertes Protokoll verwendet.

Zur Auswertung wird die ^{32}P -Aktivitätsmenge auf die Länge der jeweiligen SV40-Sonde (Tab. 6) normiert, da längere Sonden mehr unterschiedliche matrixgeschützte Sequenzen und somit insgesamt mehr ^{32}P -markierte DNA binden können. Dabei ist aber auch zu beachten, daß sich bei kleinen Sonden Meßfehler sehr stark auswirken können.

Tab. 6: Länge der für die Hybridisierungen verwendeten SV40-Sonden.

Die Positionen der Sonden im SV40-Genom sind in Abb. 2 dargestellt.

Sonde	3li	2li	1li	1a	1re	2re	3re	4
Länge [bp]	1275	1018	361	93	257	538	956	745

In Abb. 12 bis 15 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Hybridisierungsexperiments dargestellt. Die jeweils obere Abbildung stellt die absoluten ^{32}P -Zählwerte, die untere die auf die Fragmentlänge normierten Werte dar.

Nach der Normierung der ^{32}P -cpm auf die Längen der SV40-Sonden wurden keine signifikanten Unterschiede bei unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten gefunden (Abb. 12 bis 15). Insgesamt wurden alle Fragmente etwa gleich stark von radioaktiven Sonden erkannt. Ausnahmen dazu werden wie folgt diskutiert: Die Sonde 1li normal (1 li n) zeigte stets sehr niedrige normierte Werte, und auch die Sonde 3re normal (3 re n) lag bei allen Hybridisierungen im unteren Bereich der normierten ^{32}P -Zerfälle. Demgegenüber waren die normierten Werte der Sonden 2re komplementär (2 re k) und 3re komplementär (3 re k) immer erhöht. Da diese Abweichungen aber bei allen Präparationen,

Umgekehrte Hybridisierung: unsynchronisierte Zellen

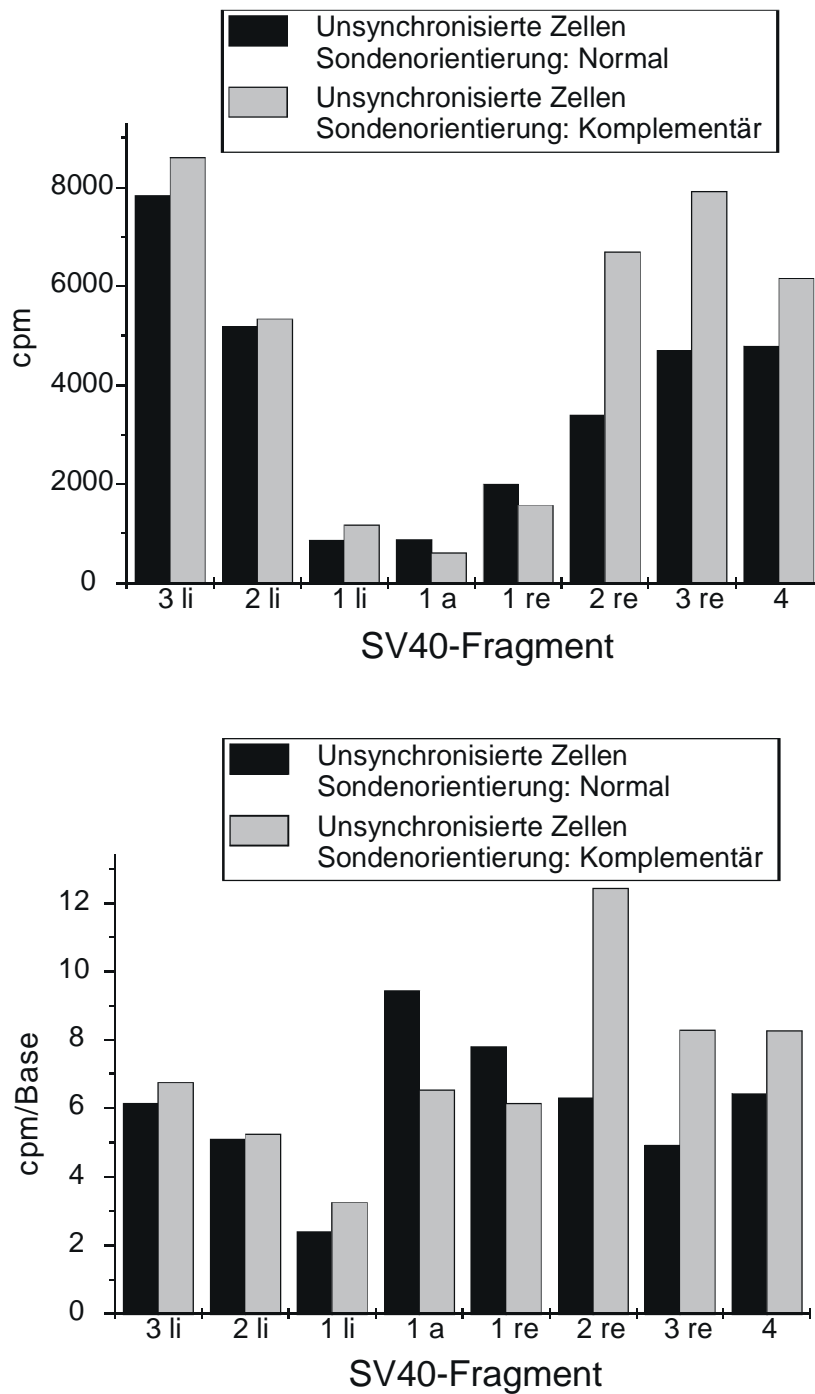


Abb.: 12: Umgekehrte Hybridisierung. Matrix-DNA wurde aus unsynchronisierten Zellen hergestellt. Die präparierte Matrix-DNA wurde mit γ - ^{32}P -ATP endmarkiert und gegen Sonden, die bestimmte Teile des SV40-Genoms in bekannten Orientierungen ("normale" und "komplementäre" Orientierung) enthalten, hybridisiert. Dargestellt sind jeweils in der oberen Abbildung die absoluten ^{32}P -cpm und in der unteren Abbildung die auf die Länge der Sonde bezogenen ^{32}P -cpm (cpm/Base).

**Umgekehrte Hybridisierung:
Synchronisierte Zellen, bereit zur Initiation der Replikation (6 h Hypoxie)**

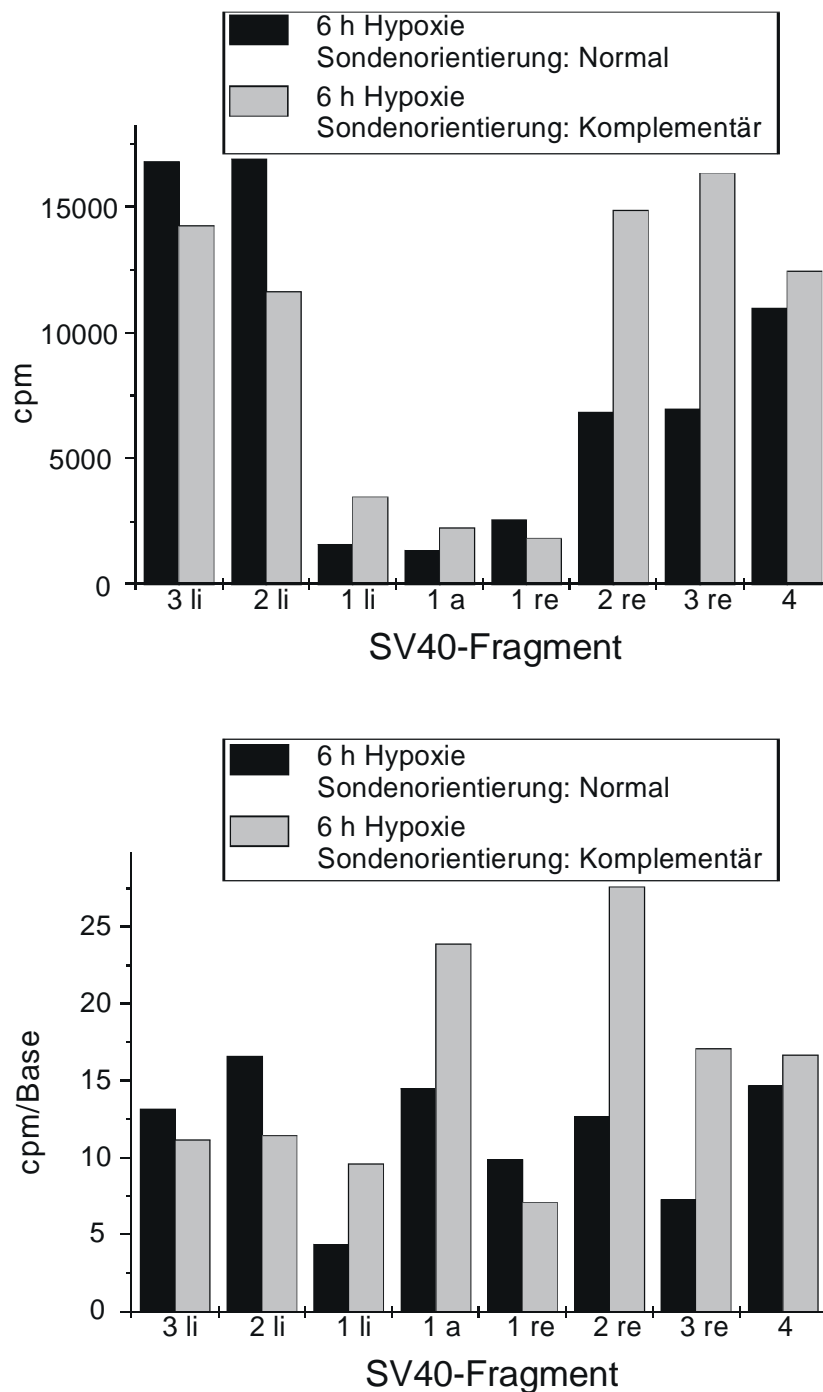


Abb. 13: Umgekehrte Hybridisierung. Matrix-DNA wurde aus synchronisierten Zellen hergestellt, die vor der Präparation für 6 h hypoxisch (400 ppm O₂) begast wurden. Die präparierte Matrix-DNA wurde, wie in der Legende zu Abb. 12 beschrieben, markiert und hybridisiert. Dargestellt sind jeweils in der oberen Abbildung die absoluten ^{32}P -cpm und in der unteren Abbildung die auf die Länge der Sonde bezogenen ^{32}P -cpm (cpm/Base).

Umgekehrte Hybridisierung: Synchronisierte Initiation der Replikation (6 h Hypoxie und 4 min Reoxygenierung)

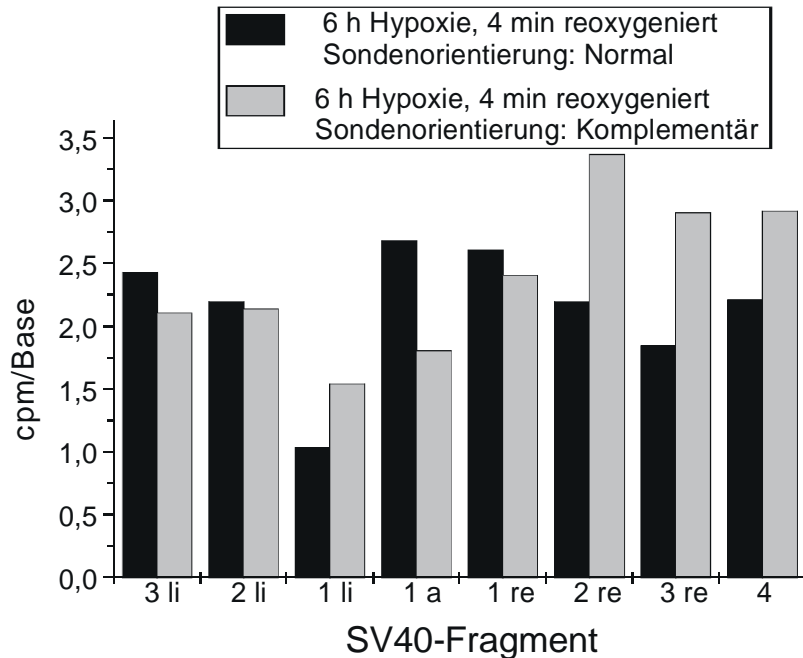
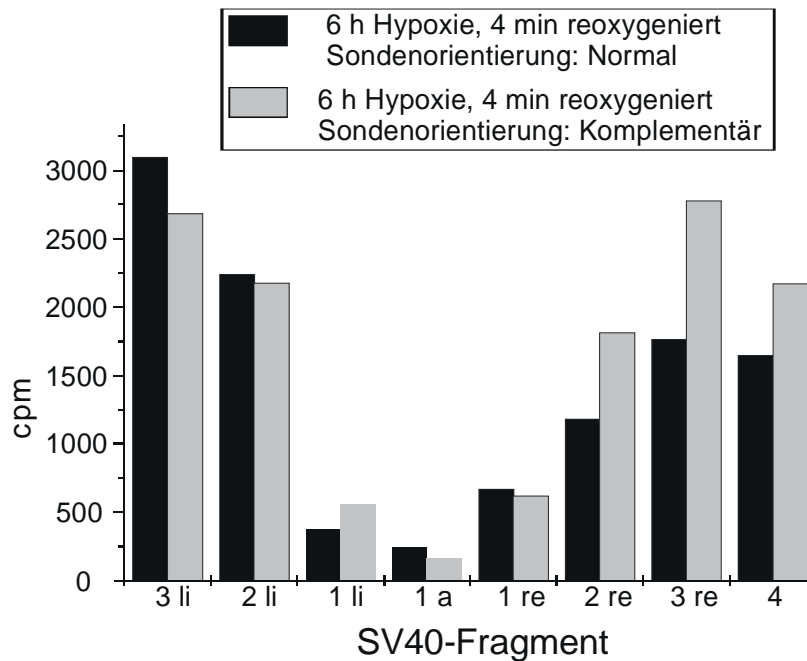


Abb.: 14: Umgekehrte Hybridisierung. Matrix-DNA wurde aus synchronisierten Zellen hergestellt, die vor der Präparation nach 6 h Hypoxie für 4 Minuten reoxygeniert wurden. Die präparierte Matrix-DNA wurde, wie in der Legende zu Abb. 12 beschrieben, markiert und hybridisiert. Dargestellt sind jeweils in der oberen Abbildung die absoluten ^{32}P -cpm und in der unteren Abbildung die auf die Länge der Sonde bezogenen ^{32}P -cpm (cpm/Base).

Umgekehrte Hybridisierung: Synchronisierte Initiation der Replikation (6 h Hypoxie und 12 min Reoxygenierung)

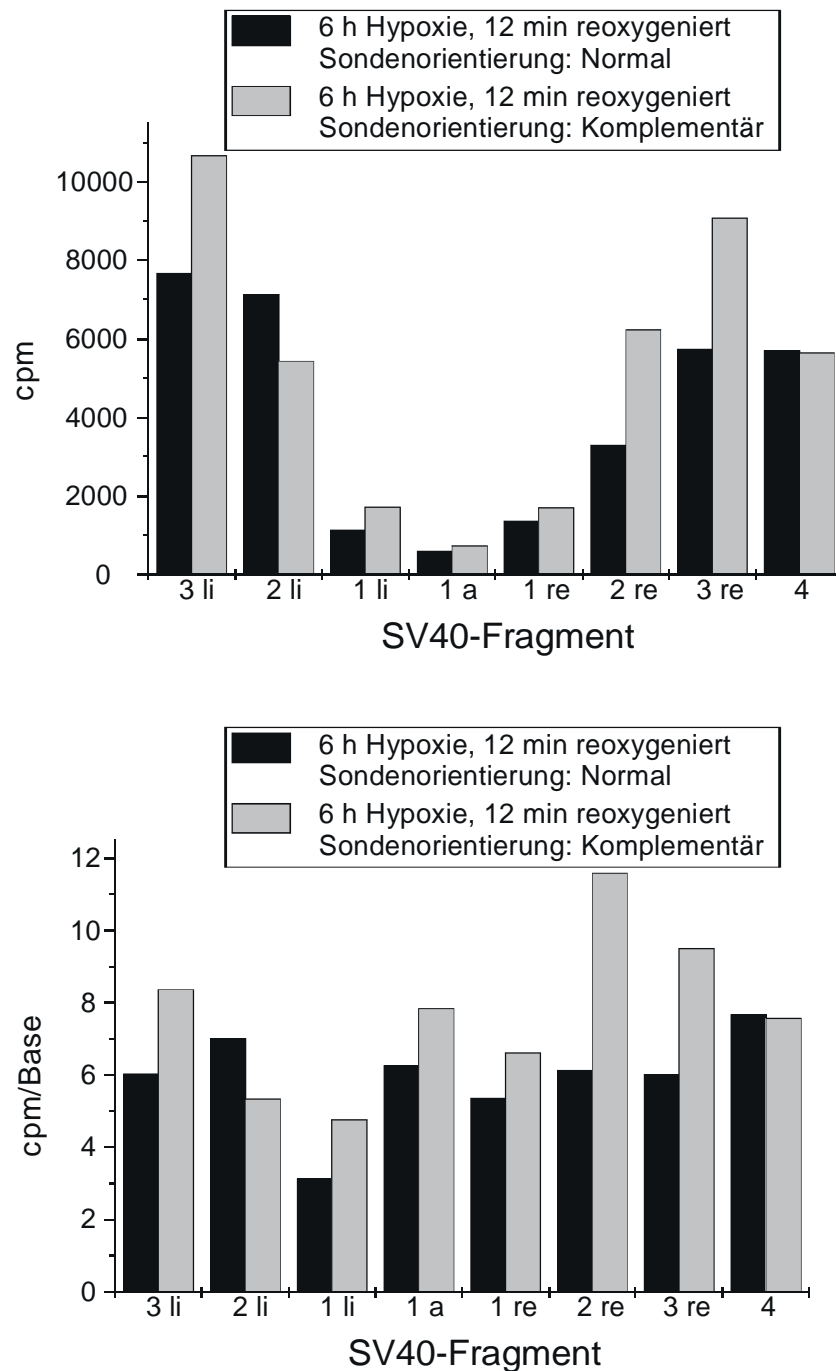


Abb.: 15: Umgekehrte Hybridisierung. Matrix-DNA wurde aus synchronisierten Zellen hergestellt, die vor der Präparation nach 6 h Hypoxie für 12 Minuten reoxygeniert wurden. Die präparierte Matrix-DNA wurde, wie in der Legende zu Abb. 12 beschrieben, markiert und hybridisiert. Dargestellt sind jeweils in der oberen Abbildung die absoluten ^{32}P -cpm und in der unteren Abbildung die auf die Länge der Sonde bezogenen ^{32}P -cpm (cpm/Base).

also bei unsynchronisierten, hypoxischen (= zur synchronen Initiation der Replikation bereiten) und reoxygenierten (= bei der Replikation synchron gestarteten) Zellen, stets gleichzeitig auftraten, sind hier Charakteristika der jeweiligen Sonden anzunehmen, welche eine besonders gute oder schlechte Hybridisierung ermöglichen.

Durch das Fortschreiten des Replikationskomplexes im zeitlichen Verlauf der Replikation wäre zu erwarten gewesen, daß im Verlauf der synchronen Replikation die DNA-Bereiche, welche verdaugeschützt sind, immer weiter vom Replikationsursprung entfernt liegen (Dreier, 1995). Dies ließ sich jedoch nicht nachweisen, da vermutlich die durch die Präparationen gewonnene DNA zu lang für die Analyse war (vgl. 3.2).

Insgesamt ergibt sich somit, daß eine Analyse der Replikation des SV40 durch die Präparation von DNA-Bereichen, welche durch die Kernmatrix verdaugeschützt sind, in den verwendeten experimentellen Systemen nicht möglich ist.

4 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die fortschreitende Replikation des SV40-Genoms im Verlauf einer synchronen Replikationsrunde in einer entsprechenden Bewegung durch Kernmatrix-Assoziation gegen Nuklease-Verdau geschützter Bereiche über das Genom hinweg widerspiegelt. Dafür wurden CV1 Zellen mit SV40-Viren infiziert und die Replikation durch vorübergehende Hypoxie synchronisiert.

Es wurden zunächst verschiedene Methoden der Kernmatrixpräparation auf ihre Eignung untersucht. Durch Nukleasen und Hochsalzextraktionen wurde ein Großteil der Nukleinsäuren und Proteine entfernt. Die Längenverteilungen der so gewonnenen verdaugeschützten DNA-Bereiche wurden nach ^{32}P -Markierung mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese und anschließender Autoradiographie der getrockneten Gele analysiert. Durch Southern Blotting und Hybridisieren gegen SV40-DNA wurde der SV40 spezifische Anteil in der Präparation erfaßt.

Der durch die verschiedenen Präparationsverfahren von der Matrix ablösbare Anteil der DNA lag zwischen 95 und 99,9%.

Die unterschiedlichen Matrixpräparationsprotokolle lieferten alle dieselben Ergebnisse. Es wurde fast ausschließlich langkettige DNA mit einer Länge von über 2 kB gefunden. Lediglich etwa 5% der DNA war im interessierenden Größenbereich von 250 bis 80 bp Länge.

Die SV40-spezifischen Sequenzen lagen überwiegend als vollständige Genome vor. Das Auftreten von verschiedenen topologischen Formen und die Nukleaseresistenz lassen vermuten, daß die verdaugeschützte und hochsalzresistente DNA vermutlich bereits in Viruspartikel verpackt vorliegt und daß diese Viruspartikel hochsalzresistent an der Proteinmatrix verankert und außerdem evtl. selbst hochsalzresistent sind. Nach Proteinase K-Behandlung war die Nukleaseresistenz verloren.

Die verdaugeschützte DNA euoxischer, hypoxischer und verschieden lang reoxygenierter SV40-infizierter Zellkulturen wurde außerdem nach Endmarkierung mit $\gamma[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ gegen membranfixierte definierte und strangspezifische Sonden, die zusammen das ge-

samte SV40 Genom repräsentieren, hybridisiert. Nach Normierung auf die Länge der membranfixierten Sonden zeigten sich keine erkennbaren Unterschiede in der Hybridisierung der verdaugeschützten DNA aus den verschiedenen vorbehandelten SV40-infizierten CV1-Zellkulturen. Alle Bereiche des SV40-Genoms wurden zu allen untersuchten Zeiten eines synchron gestarteten Replikationszyklus gleichmäßig in der verdaugeschützten DNA erkannt.

Durch diese Arbeit wurde gezeigt, daß die *in vivo* Replikation von SV40 kein geeignetes Modell ist, um die Kernmatrix-Assoziation des Replikationsapparates zu untersuchen. 0,1-0,5% der in den Zellen vorhandenen vollständigen Virusgenome ist offenbar hochsalzresistent verpackt. Es ist nicht auszuschließen, daß replizierende SV40-DNA so mit der Kernmatrix assoziiert ist, daß sie auf ganzer Länge nach Hochsalz-Behandlung gegen Nuklease-Verdau geschützt bleibt. Dies würde bedeuten, daß das SV40-Genom einfach zu klein ist, um eine selektive Matrix-Assoziation replikativer Anteile zu zeigen.

5 LITERATUR

1. Bikle, D.D., Zolock, D.T., Morrissey, R.L., and Herman, R.H., (1978) Independence of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated calcium transport from de novo RNA and protein synthesis, *J. Biol. Chem.* **253**, 484-488
2. Belgrader, P., Siegel, A.J., and Berezny, R., (1991) A comprehensive study on the isolation and characterization of the HeLa S3 nuclear matrix, *J. Cell Sci.* **98**, 281-291
3. Berezney, R., and Coffey, D.S., (1974) Identification of a nuclear protein matrix, *Biochem. Biophys. Acta* **60**, 1410-1417
4. Berezney, R., Mortillaro, M.J., Ma, H., Wie, X., and Samarabandu, J., (1995) The nuclear matrix: A structural milieu for genomic function, in: *International Review of Cytology* (Berezny, R and Jeon, K.W., ed.), Vol. 162A, pp 1-65. Academic Press, San Diego.
5. Capco, D.G., Wan, K.M., and Penman, S., (1982) The nuclear matrix: Three-dimensional architecture and protein composition, *Cell* **29**, 847-858
6. Capco, D.G., Krocmalnic, G., and Penman, S., (1984) A new method for preparing embedment-free sections for transmission electron microscopy: Applications to the cytoskeletal framework and other three-dimensional networks, *J. Cell Biol.* **98**, 1878-1885
7. Cardoso, M.C., Leonhargt, H., and Nadal-Ginard, B., (1993) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: Cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication, *Cell* **74**, 979-992
8. Deppert, W., and Schirmbeck, R., (1995) The nuclear matrix and virus function, in: *International Review of Cytology* (Berezny, R. and Jeon, K.W., ed.), Vol. 162A, pp 485-537. Academic Press, San Diego

9. Dreier, T., (1995) Auswirkungen von Hypoxie und Inhibitoren der DNA-Synthese auf die SV40-Replikation in vivo und in vitro, Dissertation, Universität Tübingen
10. Dreier, T., Scheidtmann, K.H., and Probst, H., (1993) Synchronous replication of SV 40 DNA in virus infected TC 7 cells induced by transient hypoxia, FEBS-Lett. **336**, 445-451
11. Eger, F., (1995) Durch Staphylococcus- α -Toxin permeabilisierte Zellen als System des Studiums der DNA-Replikation, Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen
12. Fey, E.G., Wan, K.M., and Penman, S., (1984) Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: Three dimensional organization and protein composition, J. Cell Biol. **98**, 1973-1984
13. Fey, E.G., Krochmalnic, G., and Penman, S., (1986) The non-chromatin substructures of the nucleus: The ribonucleoprotein (RNP)-containing and RNP-depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy, J. Cell Biol. **102**, 1654-1665
14. Fiers, W., Contreras, R., Haegeman, G., Rogiers, R., van der Voorde, A., van Heuverswyn, H., van Herreweghe, J., Volckaert, G., and Ysebaert, M., (1978) The complete nucleotide sequence of SV40 DNA, Nature **273**, 113-120
15. Gannon, J.V., and Lane, D.P., (1987) p53 and DNA-polymerase α compete for binding to SV40 T antigen, Nature **329**, 456-458
16. Glazkov, M.V., (1995) Loop-domain gene structure in eukaryotic chromosomes, Mol. Biol. **29**, 965-982
17. Hagmann, W., (1977) Versuche zur Fraktionierung von Chromatin aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen
18. Harper, F., Florentin, Y., and Puvion, E., (1985) Large T antigen-rich viral DNA replication loci in SV40-infected monkey kidney cells, Exp. Cell Res. **161**, 434-444

19. He, D., Nickerson, J.A., and Penman, S., (1990) Core filaments of the nuclear matrix, *J. Cell Biol.* **110**, 569-580
20. Hozák, P., Hassan, A.B., Jackson, D.A., and Cook, P.R., (1993) Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton, *Cell* **73**, 361-373
21. Hozák, P., Jackson, D.A., and Cook, P.R., (1994) Replication factories and nuclear bodies: The ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle, *J. Cell Sci.* **107**, 2191-2202
22. Hozák, P., Jackson, D.A., and Cook, P.R., (1995) Role of nuclear structure in DNA replication, in: *Eukaryotic DNA Replication - Frontiers in Molecular Biology* (Blow, J., ed.), IRL Press, Oxford
23. Hughes, T.A., Pombo, A., McManus, J., Hozák, P., Jackson, D.A., and Cook, P.R., (1995) On the structure of replication and transcription factories, *J. Cell Sci., Supplement* 19, 59-65
24. Jackson, D.A., and Cook, P.R., (1988) Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat, *EMBO J.* **7**, 3667-3677
25. Jackson, D.A., and Cook, P.R., (1995) The structural basis of nuclear function, in: *International Review of Cytology* (Berezny, R. and Jeon, K.W., ed.), Vol. 162A, pp 125-149. Academic Press, San Diego
26. Jackson, D.A., Dickinson, P., and Cook, P.R., (1990) The size of chromatin loops in HeLa cells, *EMBO J.* **9**, 567-571
27. Kaletta, T., (1994) Kernmatrix-Assoziation replizierender SV40-DNA in virusinfizierten CCL 70-Zellen unter vorübergehender Hypoxie, Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen
28. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., (1989) *Molecular Cloning*, New York, Cold Spring Harbour Laboratory

-
29. Melgar, E., and Goldthwait, D.A., (1968) Deoxyribonucleic acid nucleases, II: The effects of metals on the mechanism of action of deoxyribonuclease I, *J. Biol. Chem.* **243**, 4409-4416
 30. Nakamura, H., Morita, T., and Sato, C., (1986) Structural organization of replicon domains during DNA synthesis phase in mammalian nucleus, *Exp. Cell. Res.* **165**, 291-297
 31. Nakayasu, H., and Berezny, R., (1989) Mapping replication sites in the eukaryotic cell nucleus, *J. Cell Biol.* **108**, 1-11
 32. Nickerson, J.A., Blencowe, B.J., and Penman, S., (1995) The architectural organization of nuclear metabolism, in: *International Review of Cytology* (Berezny, R and Jeon, K.W., ed.), Vol. 162A, pp 1-65. Academic Press, San Diego
 33. Penman, S., (1995) Rethinking cell structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5251-5257
 34. Prinz, F., (1995) Charakterisierung einer Minigenbank mit putativen Initiationsregionen früh replizierender DNA aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, *Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen*
 35. Probst, H., and Gekeler, V., (1980) Reversible inhibition of replicon initiation in Ehrlich ascites cells by anaerobiosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **94**, 55-60
 36. Probst, H., Schiffer, H., Gekeler, V., Kienzle-Pfeilsticker, H., Stötzer, K.-E., and Frenzel-Stötzer, I., (1988) Oxygen dependent regulation of DNA synthesis and growth of Ehrlich ascites tumor cells in vitro and in vivo, *Cancer Res.* **48**, 2053-2060
 37. Riedinger, H.J., (1991) Genexpression im Zusammenhang mit der sauerstoffabhängigen Regulation der DNA-Replikation in Eherlich-Ascites-Tumorzellen, *Dissertation, Universität Tübingen*

-
38. Riedinger, H.J., Gekeler, V., and Probst, H., (1992) Reversible shutdown of replication by transient hypoxia in Ehrlich ascites cells, *Eur. J. Biochem.* **210**, 389-398
 39. Scheer, U., Thiry, M., and Goessens, G., (1993) Structure, function and assembly of the nucleolus, *Trends Cell Biol.* **3**, 236-241
 40. Schirmbeck, R., and Deppert, W., (1987) Specific interaction of simian virus 40 large T antigen with cellular chromatin and nuclear matrix during the course of lytic infection, *J. Virol.* **61**, 3561-3569
 41. Schirmbeck, R., and Deppert, W., (1991) Structural topography of simian virus 40 DNA replication, *J. Virol.* **65**, 2578-2588
 42. Staufenbiel, M., and Deppert, W. (1983) Different structural systems of the nucleus are targets for SV40 large T antigen, *Cell* **33**, 173-181
 43. Staufenbiel, M., and Deppert, W. (1984) Preparation of nuclear matrices from cultured cells: subfractionation of nuclei in situ, *J. Cell Biol.* **98**, 1886-1894
 44. Tubo, R.A., and Berezny, R. (1987) Identification of 100 S and 150 S polymerase alpha-primase megacomplexes solubilized from the nuclear matrix of regenerating rat liver, *J. Biol. Chem.* **262**, 5857-5865
 45. Voet, D., Voet, J., (1995) *Biochemistry*, 2nd ed., John Wiley and sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
 46. Winnacker, E.L., 1985, *Gene und Klone, Einführung in die Gentechnologie*. VCH
 47. Winter, S., (1995) *Untersuchungen zur Kernmatrixassoziation von SV40-DNA im Verlauf einer synchronen Replikationsrunde*, Biochemische Diplomarbeit, Universität Tübingen

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Florian Prinz

geboren am 19.01.1969 in Stuttgart

Schulbildung/Studium:

September 1975 - Juli 1978
September 1978 - Juli 1979
September 1979 - Juni 1988

Deutsche Schule Addis Abeba, Äthiopien
Schiller-Grundschule, Fellbach-Oeffingen
Gustav-Stresemann-Gymnasium, Fellbach-Schmidlen
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Juli 1988 - September 1989

Grundwehrdienst in Calw

Oktober 1989 - Juli 1995

Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität,
Tübingen

Seit April 1993

Parallelstudium Humanmedizin an der Eberhard-Karls-
Universität, Tübingen

August 1994 - Oktober 1994

mündliche Diplomprüfungen in den Fächern
Organische Chemie, Biochemie und Mikrobiologie,
Abschluß: Diplom-Biochemiker

November 1994 - Juli 1995

Diplomarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Probst am
Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen

Thema der Diplomarbeit:

"Charakterisierung einer Minigenbank mit putativen Initiationsre-
gionen früh replizierender DNA aus Ehrlich-Ascites-Tumorzellen"

Juli/August 1995

Ärztliche Vorprüfung

August 1996

1. Staatsexamen in Medizin

September 2000

2. Staatsexamen in Medizin

Oktober 2000 - September 2001

Praktisches Jahr

November 2001

3. Staatsexamen in Medizin

Promotionen:

September 1995 - Oktober 1996

Praktischer Teil der medizinischen Doktorarbeit unter der Leitung
von Herrn Prof. Dr. H. Probst am Physiologisch-chemischen
Institut der Universität Tübingen

Thema der med. Doktorarbeit:

"Replikation an der Kernmatrix von SV40-infizierten CV1 Zellen"

November 1996 – Februar 2001

Naturwissenschaftliche Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe für
Somatische Lebergentherapie, Abteilung I für Innere Medizin,
Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen

Thema der biochem. Doktorarbeit:

"Mechanismen des Sendai Virus-induzierten Zelltodes"

Danksagung

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Probst in der Zeit von Juli 1995 bis Oktober 1996 am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Probst möchte ich für die Bereitstellung von Thema und Arbeitsplatz, sein großes Interesse, seine ständige Diskussionsbereitschaft, seine Ideen, seine praktischen Ratschläge und seinen technischen Erfindungsreichtum danken.

Herrn Dr. H.-J. Riedinger danke ich für die großartige Betreuung und alle die Tips, die das tägliche Arbeiten um so viel einfacher gemacht haben.

Herrn Dipl. Biochem. Frank Eger danke ich für das in jeder Hinsicht angenehme Arbeitsklima und für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dipl. Biochem Ioannis Gkantiragas danke ich für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft.

Frau Dipl. Biochem. Maria van Betteraey danke ich für eine Einführung in die Arbeiten der Zellkultur.

Herrn Dipl. Biochem. Wolfgang Wybranietz danke ich für liebevolles Korrekturlesen der Arbeit und viele konstruktive Anregungen.

Schließlich möchte ich mich für die finanzielle Förderung durch das *fortune*-Förderprogramm für Nachwuchswissenschaftler der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen von November 1996 bis Dezember 1998 und durch das „*Glaxo Wellcome Stipendium für Klinische Virologie*“ der Firma Glaxo Wellcome vom Januar 1999 bis Dezember 2000 bedanken.