

Tessa Schliephacke

**Beziehungen zwischen der
Chromatinstruktur und Apoptose-
bedingter DNA-Fragmentierung**

Beziehungen zwischen der Chromatinstruktur und Apoptose-bedingter DNA-Fragmentierung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
TESSA SCHLIEPHACKE, geb. Elbert
aus Wasserlos, jetzt Alzenau

Göttingen 2000

D7	
Referent: Korreferent: Tag der mündlichen Prüfung:	Prof. Dr. Jungermann Prof. Dr. Grossbach

I. INHALTSVERZEICHNIS

<u>I. INHALTSVERZEICHNIS.....</u>	<u>I</u>
--	-----------------

<u>II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>VIII</u>
--	--------------------

<u>III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>XI</u>
---	------------------

<u>1 EINLEITUNG.....</u>	<u>1</u>
---------------------------------	-----------------

1.1 DIE APOPTOSE.....	1
-----------------------	---

1.1.1 MORPHOLOGIE.....	3
------------------------	---

1.1.2 SIGNALWEG.....	4
----------------------	---

1.2 DAS CHROMATIN.....	10
------------------------	----

1.2.1 DIE BEREICHE DES CHROMATINS.....	11
--	----

1.2.1.1 Nukleosomen.....	12
--------------------------	----

1.2.1.2 Höhere Strukturen.....	13
--------------------------------	----

1.2.1.3 Matrixanheftungsregionen.....	14
---------------------------------------	----

1.2.1.4 Der Aufbau der Kernmatrix.....	16
--	----

1.2.2 FUNKTIONELLE BETRACHTUNG DES CHROMATINS.....	17
--	----

1.3 DIE APOPTOSE-BEDINGTE DNA-FRAGMENTIERUNG DES CHROMATINS.....	18
--	----

<u>2 KONZEPT DER ARBEIT.....</u>	<u>19</u>
---	------------------

<u>3 MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>20</u>
--	------------------

3.1 MATERIAL.....	20
-------------------	----

3.1.1 GERÄTE.....	20
-------------------	----

3.1.2 CHEMIKALIEN.....	21
------------------------	----

3.1.3 REAGENZIENSÄTZE.....	23
----------------------------	----

3.1.4 ENZYME.....	23
-------------------	----

3.1.4.1 Restriktionsendonukleasen.....	23
3.1.4.2 DNA-modifizierende Enzyme	24
3.1.4.3 Sonstige Enzyme.....	24
3.1.4.4 Antikörper	24
3.1.5 LÖSUNGEN UND PUFFER.....	25
3.1.6 MEDIEN.....	27
3.1.6.1 Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien	27
3.1.6.2 Nährmedien zur Kultivierung von Hefen	28
3.1.6.3 Nährmedien für die Zellkultur	28
3.1.7 OLIGONUKLEOTIDE.....	29
3.1.7.1 Sequenzier-Primer.....	29
3.1.7.2 PCR-Primer.....	29
3.1.8 GRÖSSENSTANDARDS	30
3.1.9 VEKTOREN.....	30
3.1.10 MIKROORGANISMEN.....	30
3.1.11 ZELLINIEN	31
3.1.12 FOTOMATERIALIEN UND MEMBRANEN.....	31
3.2 METHODEN.....	32
3.2.1 ALLGEMEINE ARBEITSBEDINGUNGEN UND HINWEISE.....	32
3.2.2 KULTUR VON BAKTERIENSTÄMMEN.....	32
3.2.2.1 Zellanzucht in Flüssig- und Festkultur.....	32
3.2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien.....	33
3.2.2.3 Transformation von Bakterien	33
3.2.2.4 Anlegen von Dauerkulturen.....	34
3.2.3 KULTUR MENSCHLICHER ZELLINIEN	34
3.2.3.1 Inaktivieren von FCS	34
3.2.3.2 Auftauen von Zellen	35
3.2.3.3 Einfrieren von Zellen.....	35
3.2.3.4 Passagieren von Zellen	35
3.2.3.4.1 Zellen in Suspensionskultur	35
3.2.3.4.2 Adhärenz Zellen.....	35
3.2.3.5 Zellzählung	36
3.2.3.6 Mykoplasmentest	36
3.2.3.7 Induktion von Apoptose.....	36
3.2.4 SYNCHRONISIERUNG DES ZELLYKLUS EINER ZELLPOPULATION.....	37

3.2.5 FACS-ANALYSE – DURCHFLUßZYTOMETRIE IM FLUORESCENZ AKTIVIERTEN ZELLSORTIERER	38
3.2.5.1 Untersuchung des Zelltods nach der TUNEL-Methode	38
3.2.5.2 PI-Färbung	40
3.2.6 ZYTOSPIN-ZENTRIFUGATION	40
3.2.7 DAPI-FÄRBUNG.....	41
3.2.8 GIEMSA-FÄRBUNG	41
3.2.9 ZELLFRAKTIONIERUNG MIT DEM MACS-SYSTEM	41
3.2.10 GEWINNUNG VON ZELLBESTANDTEILEN	42
3.2.10.1 Gewinnung von Zellkernen nach Hewish und Burgoyne (1973).....	42
3.2.10.2 Herstellung von Zytoplasmaextrakten nach Lazebnik et al. (1993)	44
3.2.10.3 Nukleosomenpräparation	44
3.2.10.3.1.1 Präparation nach Hewish und Burgoyne (1973)	44
3.2.10.3.1.2 Präparation nach Noll (1974b)	45
3.2.11 GEWINNUNG VON DNA	46
3.2.11.1 Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	46
3.2.11.1.1 Analytische Plasmidisolierung mit Tris-EDTA-LiCl-Triton (TELT).....	46
3.2.11.1.2 Präparative Plasmidisolierung über Qiagen-Säulen	47
3.2.11.2 Genomische DNA aus humanen Zellkulturen	48
3.2.11.3 DNA aus apoptotischen Zellen	49
3.2.11.3.1 Niedermolekulare DNA	49
3.2.11.3.1.1 Modifizierte Präparation nach Sellins und Cohen (1987)	49
3.2.11.3.1.2 Präparation nach Enari et al. (1998)	50
3.2.11.3.1.3 Präparation nach Beere et al. (1995)	50
3.2.11.3.2 Präparation der hochmolekularen DNA nach Filipski et al. (1990)	51
3.2.11.3.3 Präparation der Größenstandards für die Pulsfeldgelelektrophorese	51
3.2.12 DNA-SPALTUNG UND MODIFIKATION	53
3.2.12.1 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	53
3.2.12.2 Dephosphorylierung von Vektoren	54
3.2.12.3 Ligation von DNA-Fragmenten	54
3.2.13 AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN	55
3.2.13.1 Konventionelle Agarose-Gelelektrophorese	56
3.2.13.2 Pulsfeldgelelektrophorese.....	56
3.2.13.3 Nicht denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese zur Darstellung von Mononukleosomen und Oligonukleotiden.....	58
3.2.13.4 DNA-Auftrennung über Nick TM -Säulen.....	59

3.2.14 TRANSFER VON DNA AUF NYLONMEMBRANEN (SOUTHERN-BLOT, SOUTHERN, 1975)	59
3.2.15 ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN	61
3.2.15.1 Aufreinigung, Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA	61
3.2.15.2 Phenolextraktion	61
3.2.15.3 Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion/Sevag-Extraktion	62
3.2.15.4 Ethanol-Präzipitation.....	62
3.2.15.5 Isopropanol-Präzipitation	62
3.2.15.6 DNA-Konzentrationsbestimmung durch UV-Spektrometrie.....	63
3.2.15.7 DNA-Konzentrationsbestimmung durch Geltitration.....	63
3.2.16 VERVIELFÄLTIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN DURCH PCR	63
3.2.16.1 Amplifikation aus genomischer DNA	64
3.2.16.2 Amplifikation aus c-DNA.....	65
3.2.16.3 Amplifikation aus Bakterienkolonien	65
3.2.16.4 Amplifikation ohne DNA-Matrize.....	66
3.2.16.5 Reinigung von PCR-Produkten	66
3.2.17 SEQUENZIERUNG VON DNA MIT DEM AUTOMATISCHEN DNA SEQUENZIERER	67
3.2.17.1 Vorbereitung des 4% (w/v) Polyacrylamid-DNA-Sequenziergels.....	67
3.2.17.2 Sequenzierungsreaktion	68
3.2.17.3 Probenreinigung, automatische Sequenzierung und EDV-gestützte Auswertung	69
3.2.18 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA MIT DER RANDOM-PRIME-METHODE (FEINBERG UND VOGELSTEIN, 1983)	70
3.2.19 RADIOAKTIVE ENDMARKIERUNG VON DNA MIT DER T4-POLYNUKLEOTIDKINASE (MAXAM und GILBERT, 1977).....	71
3.2.20 RADIOAKTIVE HYBRIDISIERUNG MEMBRANGEBUNDENER DNA	72
3.2.21 MAR-SUCHE NACH DEM „TOPOISOMERASE-MEDIATED LOOP EXCISION PROTOCOL“ (FAJKUS et al., 1998).....	74
3.2.22 DER „IN VITRO“-VERSUCHSANSATZ MIT ISOLIERTEN KERNEN.....	75
3.2.23 ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN	76
3.2.23.1 aus Hefe: Caspase-Präparation.....	76
3.2.23.1.1 Expression und Isolierung	76
3.2.23.1.2 Reinigung über Nickelsäule	77
3.2.23.2 aus Zelllinien.....	77
3.2.23.2.1 PARP.....	77
3.2.23.2.2 Histone	78

3.2.24 AUFTRENNUNG VON PROTEINEN DURCH SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970)	78
3.2.25 TRANSFER VON PROTEINEN AUF NITROZELLULOSE DURCH ELEKTROBLOTTING (TOWBIN et al., 1979).....	80
3.2.26 NACHWEIS VON PROTEINEN	81
3.2.26.1 Färbung der Proteine mit Coomassie	81
3.2.26.2 Immunchemischer Nachweis mit spezifischen Antikörpern	81
<u>4 ERGEBNISSE.....</u>	83
4.1 ZELLKULTIVIERUNG UND APOPTOSE-INDUKTION	83
4.2 OPTIMIERUNG DER APOPTOSERATE	83
4.2.1 VERSUCHE OHNE SYNCHRONISIERUNG	84
4.2.1.1 HL60-Zellen	85
4.2.1.2 U937-Zellen	91
4.2.1.3 K562-Zellen	92
4.2.2 VERSUCHE MIT SYNCHRONISIERUNG.....	93
4.2.3 DNA-FRAGMENTIERUNG IM „IN VITRO“-ANSATZ MIT ISOLIERTEN KERNEN	97
4.2.3.1 DNA-Fragmentierung im „in vitro“-Ansatz mit Zytoplasma aus apoptotischen Zellen.....	97
4.2.3.2 DNA-Fragmentierung in den „in vitro“-Versuchen mit rekombinant exprimierter Caspase 3 aus Hefe	98
4.2.4 ZUSAMMENFASSUNG DES ABSCHNITTES OPTIMIERUNG DER APOPTOSERATE (4.2).....	101
4.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG.....	102
4.3.1 KINETIK DER SPALTUNG IN HOCHMOLEKULARE DNA-FRAGMENTE.....	103
4.3.2 KINETIK DER DNA-SPALTUNG IN NIEDERMOLEKULARE FRAGMENTE	105
4.3.3 VERGLEICH DER KINETIK DER DNA-FRAGMENTIERUNG MIT DER MORPHOLOGIE DER ZELLEN NACH INDUKTION VON APOPTOSE	106
4.3.4 KINETIK DER DNA-FRAGMENTIERUNG IM „IN VITRO“-ANSATZ MIT CASPASE 3	107
4.3.5 VERGLEICH DER KINETIK DER DNA-FRAGMENTIERUNG MIT DER PARP-SPALTUNG ALS PROTEOLYTISCHEM PROZESS WÄHREND DER APOPTOSE	108
4.3.6 ZUSAMMENFASSUNG DES ABSCHNITTES UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG (4.3)	109

4.4 VERSUCHE ZUM NACHWEIS VON BEVORZUGTEN APOPTOTISCHEN SCHNITTSTELLEN IN EINER MODELLREGION	111
4.4.1 VERSUCHE ZUM NACHWEIS EINER BEVORZUGTEN SCHNITTSTELLE IM HISTONGENCLUSTER	112
4.4.1.1 In den unsynchronisierten Systemen ist keine bevorzugte Schnittstelle im Histongencluster nachweisbar	113
4.4.1.2 Die Anreicherung apoptotischer Zellen durch das MACS-System ergibt ebenfalls keinen bevorzugten Schnittpunkt im Histongencluster	116
4.4.1.3 Auch die synchronisierten Systeme mit optimierter Apoptoserate zeigen keinen bevorzugten Schnittpunkt im Histongencluster	118
4.4.1.4 Die „ <i>in vitro</i> “-Versuche mit isolierten Kernen zeigen ebenfalls, daß die DNA fragmentiert wird, jedoch kein bevorzugter Schnittpunkt im Histongencluster auftritt	120
4.4.2 KONTROLLE DURCH DEN NACHWEIS DES MLL-BCR-SCHNITTPUNKTES	122
4.4.2.1 Herstellung der MLL-bcr-Sonde.....	123
4.4.2.2 In den Zelllinien Jurkat und HL60 ist der MLL-bcr-Schnittpunkt nicht nachweisbar	123
4.4.2.3 Der gesuchte Schnittpunkt ist nur in der Zelllinie CEM mit Etoposid als Apoptose-Induktor nachweisbar	124
4.4.3 ZUSAMMENFASSUNG DES ABSCHNITTES VERSUCHE ZUM NACHWEIS VON BEVORZUGTEN APOPTOTISCHEN SCHNITTSTELLEN IN EINER MODELLREGION (4.4.1 UND 4.4.2)	127
4.4.4 VERSUCHE ZUM NACHWEIS VON MARS IM HISTONGENCLUSTER	128
4.4.4.1 Im Histongencluster konnten keine MARs nachgewiesen werden.....	129
4.4.4.2 Der Nachweis der HPRT-Gen-MAR als Positivkontrolle	130
4.4.5 ZUSAMMENFASSUNG DES ABSCHNITTES VERSUCHE ZUM NACHWEIS VON MARS IM HISTONGENCLUSTER (4.4.4).....	134
4.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR ORTSSPEZIFITÄT DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG	135
4.5.1 SONDENKLONIERUNG	135
4.5.2 DNA-SPALTUNG IN HOCHMOLEKULARE FRAGMENTE.....	139
4.5.3 DNA-SPALTUNG IN NIEDERMOLEKULARE FRAGMENTE	144
4.5.4 UNTERSUCHUNG DER NUKLEOSOMALEN ORGANISATION DER TELOMERREGION IM GENOM HUMANER ZELLINIEN	150
4.5.4.1 Nukleosomenpräparation aus nicht apoptotischen Zellen	151
4.5.4.2 Nukleosomenpräparation aus apoptotischen Zellen	152
4.5.5 ZUSAMMENFASSUNG DES ABSCHNITTES UNTERSUCHUNGEN ZUR ORTSSPEZIFITÄT DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG (4.5)	154

<u>5 DISKUSSION</u>	<u>155</u>
5.1 DIE INDUKTION VON APOPTOSE ZUR UNTERSUCHUNG DER DNA-FRAGMENTIERUNG	155
5.2 DIE KINETIK DER SPALTUNG IN HOCH- UND NIEDERMOLEKULARE DNA-FRAGMENTE	164
5.3 DIE SUCHE NACH BEVORZUGTEN APOPTOTISCHEN SCHNITTSTELLEN	167
5.4 DIE SUCHE NACH MATRIXANHEFTUNGSREGIONEN	169
5.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR ORTSSPEZIFITÄT DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG IN DEN VERSCHIEDENEN BEREICHEN DES GENOMS	172
5.6 ENTWICKLUNG EINES MODELLS ZUR DNA-FRAGMENTIERUNG WÄHREND DER APOPTOSE	179
<u>6 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>181</u>
<u>IV. LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</u>

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: MORPHOLOGISCHER VERGLEICH VON APOPTOSE UND NEKROSE (VERÄNDERT NACH PRODUKTKATALOG BOEHRINGER MANNHEIM)	4
ABBILDUNG 2: APOPTOTISCHE SIGNALKASKADE (MODIFIZIERT NACH HENGARTNER, 2000)	8
ABBILDUNG 3: DIE DNA-FRAGMENTIERUNG WÄHREND DER APOPTOSE ERZEUGT FRAGMENTE IN ZWEI VERSCHIEDENEN GRÖßENORDNUNGEN (ABBILDUNG MODIFIZIERT NACH HUGHES UND CIDLOWSKI, 2000)	10
ABBILDUNG 4: DIE ORGANISATION DER DNA IN DNA-SCHLEIFEN	15
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TUNEL-METHODE	39
ABBILDUNG 6: PRINZIP DER ISOLIERUNG APOPTOTISCHER ZELLEN ÜBER DAS MACS-SYSTEM (ENTNOMMEN AUS DER PRODUKTINFORMATION DER FIRMA MILTENYI BIOTEC)	42
ABBILDUNG 7: VERGLEICHENDE DARSTELLUNG APOPTOTISCHER UND NICHT APOPTOTISCHER HL60-ZELLEN NACH GIEMSA-FÄRBUNG	85
ABBILDUNG 8: MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DES KERNS IM VERLAUF DER APOPTOSE	86
ABBILDUNG 9: DARSTELLUNG EINER NEKROTISCHEN ZELLE	86
ABBILDUNG 10: AUFGRUND DER GRÖßENVERTEILUNG DER ZELLEN IN DER CASY-ZÄHLUNG IST EINE ABSCHÄTZUNG DER APOPTOSERATE BEI HL60-ZELLEN MÖGLICH	87
ABBILDUNG 11: DETEKTION DER 3'-OH-ENDEN DURCH TUNEL-FÄRBUNG UND FACS-ANALYSE	88
ABBILDUNG 12: APOPTOTISCHE DNA-FRAGMENTIERUNG IN HL60-ZELLEN	89
ABBILDUNG 13: DIE INDUKTION DER APOPTOSE IN HL60-ZELLEN MIT TNF- α UND CYCLOHEXIMID RUFT EBENFALLS EINE SPALTUNG DER DNA IM HOCHMOLEKULARE FRAGMENTE HERVOR	90
ABBILDUNG 14: DNA-FRAGMENTIERUNG IN U937-ZELLEN INDUZIERT DURCH DEN TOPOISOMERASE I-HEMMSTOFF TOPOTECAN	91
ABBILDUNG 15: IN DER ZELLINIE K562 TRITT MIT DEM INDUKTOR TOPOTECAN KEINE APOPTOSE-BEDINGTE DNA-FRAGMENTIERUNG AUF	92
ABBILDUNG 16: MEBREIHE ZUR OPTIMALEN SYNCHRONISIERUNG VON HL60-ZELLEN MIT APHIDICOLIN	94
ABBILDUNG 17: MESSUNG DER APOPTOSERATE VON SYNCHRONISIERTEN HL60-ZELLEN	95
ABBILDUNG 18: MESSUNG DES GRÖßENPROFILS SYNCHRONISierter HL60-ZELLEN BEI APOPTOSE-AUSLÖSUNG MIT DEM S-PHASE-SPEZIFISCHEN TOPOISOMERASE I-INHIBITOR TOPOTECAN	96
ABBILDUNG 19: DARSTELLUNG DER DNA-FRAGMENTIERUNG IM „IN VITRO“-VERSUCH MIT ISOLIERTEN KERNEN UND ISOLIERTEM ZYTOPLASMA AUS APOPTOTISCHEN HL60-ZELLEN	98
ABBILDUNG 20: REAKTIONSKASKADE ZUR AKTIVIERUNG DER DNA-FRAGMENTIERUNG	99
ABBILDUNG 21: DARSTELLUNG DER DNA-SPALTUNG IN HOCH- UND NIEDERMOLEKULARE FRAGMENTE ERZEUGT MIT CASPASE 3, ZYTOPLASMA UND KERNEN IM „IN VITRO“-VERSUCH V5	100
ABBILDUNG 22: DARSTELLUNG DER SPALTUNG IN HOCHMOLEKULARE FRAGMENTE IM „IN VITRO“-VERSUCH V8	101
ABBILDUNG 23: SIGNALKASKADE DER APOPTOSE MIT SCHWERPUNKT AUF DER DNA-FRAGMENTIERUNG	102
ABBILDUNG 24: KINETIK DER DNA-SPALTUNG IN HOCHMOLEKULARE FRAGMENTE IN UNSYNCHRONISIERTEN HL60-ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN APOPTOSE-INDUKTOREN	103

ABBILDUNG 25: KINETIK DER SPALTUNG IN HOCHMOLEKULARE DNA-FRAGMENTE IN SYNCHRONISIERTEN ZELLEN MIT TOPOTECAN ALS APOPTOSE-INDUKTOR.....	104
ABBILDUNG 26: KINETIK DER DNA-SPALTUNG IN NIEDERMOLEKULARE FRAGMENTE IN UNSYNCHRONISIERTEN HL60-ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN INDUKTOREN	105
ABBILDUNG 27: KINETIK DER DNA-SPALTUNG IN NIEDERMOLEKULARE FRAGMENTE IN SYNCHRONISIERTEN HL60-ZELLEN MIT DEM S-PHASE-SPEZIFISCHEN TOPOTECAN ALS APOPTOSE-INDUKTOR	106
ABBILDUNG 28: VERGLEICH DER ZELLMORPHOLOGIE WÄHREND DER APOPTOSE MIT DEM AUFTRETEN DER VERSCHIEDENEN DNA-FRAGMENTGRÖßEN	107
ABBILDUNG 29: KINETIK DER DNA-FRAGMENTIERUNG DER „ <i>IN VITRO</i> “-VERSUCHE MIT ISOLIERTEN KERNEN, ZYTOPLASMA UND CASPASE 3	108
ABBILDUNG 30: NACHWEIS DER PARP-SPALTUNG WÄHREND DER APOPTOSE	109
ABBILDUNG 31: DER GROßE HISTONGENCLUSTER AUF CHROMOSOM 6.....	111
ABBILDUNG 32: PRINZIP DER INDIREKTEN ENDMARKIERUNG	112
ABBILDUNG 33: BEZUGSPUNKTE DER SONDEN ZUR INDIREKTEN ENDMARKIERUNG DES HISTONGENCLUSTERS.....	113
ABBILDUNG 34: SUCHE NACH BEVORZUGTEN SCHNITTPUNKTEN IM HISTONGENCLUSTER IN UNSYNCHRONISIERTEN HL60-ZELLEN MIT TOPOTECAN (150 NG/ML) ALS APOPTOSE-INDUKTOR	114
ABBILDUNG 35: SUCHE NACH BEVORZUGTEN SCHNITTPUNKTEN IN HL60-ZELLEN MIT TNF- α /CYCLOHEXIMID ALS APOPTOSE-INDUKTOREN	115
ABBILDUNG 36: SUCHE NACH BEVORZUGTEN, APOPTOTISCHEN SCHNITTPUNKTEN IN CEM-ZELLEN	116
ABBILDUNG 37: MESSUNG DER ZELLGRÖßE IM ZELLZÄHLGERÄT VOR UND NACH MACS-SEPARATION APOPTOTISCHER ZELLEN.....	117
ABBILDUNG 38: INDIREKTE ENDMARKIERUNG NACH ANREICHERUNG APOPTOTISCHER ZELLEN IM MACS-SYSTEM MIT DER SONDE 3 ZUM NACHWEIS EINER BEVORZUGTEN SCHNITTSTELLE IM HISTONGENCLUSTER	118
ABBILDUNG 39: DNA-FRAGMENTIERUNG IM BEREICH DES HISTONGENCLUSTERS IN SYNCHRONISIERTEN HL60-ZELLEN MIT TOPOTECAN (150 NG/ML) ALS APOPTOSE-INDUKTOR	119
ABBILDUNG 40: SUCHE NACH BEVORZUGTEN APOPTOTISCHEN SCHNITTPUNKTEN IM HISTONGENCLUSTER IN SYNCHRONISIERTEN HL60-ZELLEN MIT DEM APOPTOSE-INDUKTOR TOPOTECAN.....	120
ABBILDUNG 41: SUCHE NACH BEVORZUGTEN, APOPTOTISCHEN SCHNITTPUNKTEN IM „ <i>IN VITRO</i> “-SYSTEM MIT ISOLIERTEN KERNEN	121
ABBILDUNG 42: TROTZ MASSIVEN ABBAUS DER DNA AUCH IM HISTONGENCLUSTER IST KEINE BEVORZUGTE SCHNITTSTELLE ZU BEOBACHTEN.....	122
ABBILDUNG 43: RESTRIKTIONSKARTE DES MLL-GENS (ENTNOMMEN AUS STANULLA ET AL., 1997)	123
ABBILDUNG 44: DER BRUCHPUNKT IM MLL-GEN IST IN JURKAT-ZELLEN NICHT NACHWEISBAR	124
ABBILDUNG 45: MESSUNG DES GRÖßENPROFILS IN CEM-ZELLEN MIT TOPOTECAN ALS APOPTOSE-INDUKTOR	125
ABBILDUNG 46: KINETIK DER DNA-FRAGMENTIERUNG IN CEM-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ADHÄRENZ.....	126
ABBILDUNG 47: NACHWEIS DES MLL-SCHNITTPUNKTES IN CEM-ZELLEN MIT ETOPOSID (10 μ M) ALS INDUKTOR.....	127
ABBILDUNG 48: VERSUCH DES NACHWEISES VON MARS IM HISTONGENCLUSTER DURCH DAS "TOPOISOMERASE II MEDIATED LOOP EXCISION PROTOCOL"	129

ABBILDUNG 49: AUCH BEI VERWENDUNG VON ETOPOSID ALS TOPOISOMERASE II-INHIBITOR TRETEN KEINE ANHALTSPUNKTE FÜR MARS IM HISTONGENCLUSTER AUF	130
ABBILDUNG 50: RESTRIKTIONSKARTE EINES AUSSCHNITTS DES HPRT-GENBEREICHS (ENTNOMMEN AUS FAJKUS ET AL., 1998)	131
ABBILDUNG 51: ÜBERPRÜFUNG DER SONDEN FÜR DIE HPRT-GENREGION	132
ABBILDUNG 52: SUCHE NACH DER MAR IM HPRT-GEN VON K562-ZELLEN MIT TENIPOSID ALS INHIBITOR	134
ABBILDUNG 53: ZUORDNUNG DER BEGRIFFE HETEROCHROMATIN UND EUCHROMATIN ZU DEN GENOMBEREICHEN	136
ABBILDUNG 54: EINTEILUNG DES GENOMS IN VERSCHIEDENE BEREICHE NACH HÄUFIGKEIT UND STRUKTUR	137
ABBILDUNG 55: VERGLEICH DER HYBRIDISIERUNGSMUSTER NICHT CODIERENDER GENOMREGIONEN BEI DER SPALTUNG IN HOCHMOLEKULARE, APOPTOTISCHE DNA-FRAGMENTE	140
ABBILDUNG 56: VERGLEICH DER HYBRIDISIERUNGSMUSTER CODIERENDER UND NICHT CODIERENDER GENOMREGIONEN BEI DER SPALTUNG IN HOCHMOLEKULARE DNA-FRAGMENTE NACH <i>MLUI</i> -VERDAUUNG	142
ABBILDUNG 57: LANGZEITKINETIK ZUR UNTERSUCHUNG DER ORTSSPEZIFITÄT DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG IN DEN NICHT CODIERENDEN BEREICHEN DES GENOMS	143
ABBILDUNG 58: LANGZEITKINETIK ZUR UNTERSUCHUNG DER ORTSSPEZIFITÄT DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG IN CODIERENDEN GENBEREICHEN	144
ABBILDUNG 59: UNTERSUCHUNGEN ZUR ORTSSPEZIFITÄT DER SPALTUNG IN NIEDERMOLEKULARE DNA-FRAGMENTE IN DEN VERSCHIEDENEN REGIONEN DES GENOMS	145
ABBILDUNG 60: LANGZEITKINETIK ZUR UNTERSUCHUNG DER SPALTUNG DER VERSCHIEDENEN GENOMBEREICHE IN NIEDERMOLEKULARE DNA-FRAGMENTE	147
ABBILDUNG 61: DAS FRAGMENTIERUNGSMUSTER DER VERSCHIEDENEN GENOMBEREICHE BEI DER SPALTUNG IN NIEDERMOLEKULARE DNA-FRAGMENTE IN U937-ZELLEN MIT TOPOTECAN ALS APOPTOSE-INDUKTOR	148
ABBILDUNG 62: ÜBERPRÜFUNG DES FRAGMENTIERUNGSMUSTERS DER VERSCHIEDENEN GENOMBEREICHE NACH INDUKTION DER APOPTOSE DURCH ANDERE INDUKTOREN ALS TOPOTECAN	149
ABBILDUNG 63: ÜBERPRÜFUNG DER PRÄPARATIONSMETHODE DER DNA-LEITER	150
ABBILDUNG 64: ÜBERPRÜFUNG DER NUKLEOSOMALEN ORGANISATION DER ZENTROMERREGION IM VERGLEICH ZUR TELOMERREGION	151
ABBILDUNG 65: VERGLEICH DER GRÖÖE DER NUKLEOSOMALEN EINHEITEN DER TELOMERREGION MIT DER ZENTROMERREGION	152
ABBILDUNG 66: NUKLEOSOMENPRÄPARATION AUS APOPTOTISCHEN HL60-ZELLEN IM VERGLEICH ZUR APOPTOTISCHEN DNA-LEITER	153
TABELLE A: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE ZELLINIEN UND APOPTOSE-INDUKTOREN	37
TABELLE B: KLASSIFIZIERUNG DER VERWENDETEN APOPTOSE-INDUKTOREN	83
TABELLE C: ÜBERBLICK ÜBER DURCHFÜHRTE NACHWEISMETHODEN DER APOPTOSE	84
TABELLE D: VERSUCHSVARIATIONEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MARS NACH DEM „TOPOISOMERASE II MEDIATED LOOP EXCISION PROTOCOL“	133

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	
A	Adenin
A. bidest	AQUA BIDEST (ZWEIFACH DESTILLIERTES WASSER)
abs.	absolut
Ac	Acetat
A. dest	einfach destilliertes Wasser
AIF	Apoptosis inducing factor
Ak	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
APH	Aphidicolin
APS	Ammoniumpersulfat
ARBP	Attachment region binding protein
ARC	Apoptosis repressor with caspase recruiting domain
ATP	Adenosintriphosphat
B	
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bidest.	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C	
C	Cytosin
CAD	Caspase activated DNase
CARD	Caspase activating and recruiting domain
C.	<i>Caenorhabditis (elegans)</i>
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CTP	Cytosintriphosphat

Cyc	Cycloheximid
D	
DAPI	Diamidino-2-Phenylindol
dATP	2'-desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	2'-desoxy-Cytidintriphosphat
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DFF	DNA-Fragmentierungs-Faktor
dGTP	2'-desoxy-Guanosintriphosphat
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI
DIG	Digoxygenin
DISC	Death inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-desoxy-Nukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang (double strand)
DTT	Dithiothreitol
E	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-Glycol-bis (β-Aminoethyl-ether) N,N',N',N'-Tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
F	
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FLIP	FADD like ICE inhibitory protein
G	

x g	multipliziert mit der Erdbeschleunigung	O	
G	Guanin	OD	optische Dichte
GTP	Guanosintriphosphat	P	
H		p	Plasmid
HMG	High mobility group	p ³²	radioaktives Phosphorisotop
I		PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
IAP	Inhibitor of apoptosis	PBS	Phosphate buffered saline
ICAD	Inhibitor of caspase activated DNase	PCR	Polymerase chain reaction
IgG	Immunglobulin G	PEG	Polyethylenglykol
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid	PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
K		PK	Proteinkinase
kb	Kilobasenpaar(e)	PKC	Proteinkinase C
kDa	Kilodalton	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
k.o.	knock out (ausgeschaltet)	R	
L		RB	Retinoblastomprotein
LB	Luria Bertani	rH	relative Luftfeuchtigkeit
LINE	Long interspersed repeated element	RNA	Ribonukleinsäure
LMP	Low melting point	RNase	Ribonuklease
M		ROFAGE	Rotating field agarose gel electrophoresis
MAR	Matrix attachment region – Matrixanheftungsregion	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Mb	Megabasenpaar(e)	RT	Raumtemperatur
mdr	Multi-drug-resistance	S	
MEM	Minimum Essential Medium	S	Svedberg-Einheiten
MLL	myeloisch-lymphatische Leukämie	SAF-A	Scaffold attachment factor A
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure	SAR	Scaffold attachment region – Gerüstanheftungsregion
mRNA	messenger RNA	SDS	Sodiumdodecylsulfat
N		SINE	Short interspersed repeated element
NaAc	Natriumacetat	Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium (Chlorid)	SSC	Standard-Salz-Citrat-Lösung
Ni-NTA	Nickel-Nitril-Triessigsäure	T	
NLS	Kernlokalisierungssignal	T	Thymin
NP-40	Nonidet P40	TAE	Tris-Acetat-EDTA
Nt	Nukleotid(e)	TBE	Tris-Borsäure-EDTA
		TBS	Tris buffered saline

TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Amino- methan
TTP	Thymidintriphosphat
U	
U	Uracil
üN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	
VM-26	Teniposid
VP-16	Etoposid
v/v	volume per volume
W	
w/v	weight per volume
X	
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D- galaktopyranosid
Y	
YAC	Yeast artificial chromosome

1 EINLEITUNG

Die Prozesse, die an der Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Kern eukaryonter Zellen ablaufen, finden nicht an nackter DNA, sondern an den DNA-Protein-Komplexen des Chromatins statt. Die Struktur des Chromatins, das sicherlich eines der komplexesten biologischen Moleküle darstellt, ist trotz intensiver Forschung noch in vielen Details ungeklärt. Auch so wichtige Vorgänge im Chromatin wie die Transkription und Replikation sind noch nicht im Detail bekannt. Während der Apoptose, dem sog. programmierten Zelltod, kommt es zu einer Degradation des Chromatins. Durch die Untersuchung des Ablaufs einzelner Schritte der apoptotischen Chromatin-Degradation können daher nicht nur Daten zur Apoptose, sondern auch Aussagen über die Organisation des Chromatins gewonnen werden. Im folgenden wird eine kurze thematische Einführung in den Prozeß der Apoptose, in die Struktur des Chromatins und dessen Apoptose-bedingter Fragmentierung gegeben. Im darauffolgenden Kapitel wird die Zielsetzung dieser Arbeit umrissen.

1.1 DIE APOPTOSE

Bekannt ist das Phänomen der Apoptose bereits seit dem 19. Jahrhundert, als Carl Vogt die sterbenden Zellen des neuronalen Systems sich entwickelnder Kröten-Embryonen beschrieb (VOGT, 1842). Geprägt wurde der Begriff der Apoptose 1972 von Kerr, Wyllie und Currie (KERR et al., 1972), welche die Morphologie von Leberzellen, die mit Toxinen behandelt worden waren, mit der von Lymphozyten verglichen, die sie mit Hormonen behandelten. Während erstere eine nekrotische Morphologie zeigten ($\nu\epsilon\kappa\rho\sigma\iota\varsigma$ - Tod, Tötung, Absterben), zeigten zweitere eine Morphologie, die als apoptotisch bezeichnet und beschrieben wurde. Das griechische $\alpha\pi\omicron\pi\tau\omicron\sigma\iota\varsigma$ bedeutet „das Abfallen welker Blätter“. Wie gut dieser Begriff tatsächlich paßt, wurde erst Jahre später deutlich, als entdeckt wurde, daß alle multizellulären Organismen, Tiere wie Pflanzen, diese evolutionär hoch konservierte Art des Sterbens von Zellen benutzen; so ist sie auch Ursache für das Abfallen des Laubs im Herbst. Kerr et al. (1972) definierten Apoptose als „das geordnete Muster von zytoplasmatischen und nukleären Veränderungen, das zu einer Selbsterstörung einer einzelnen Zelle und deren Entfernung aus dem Gewebe führt“.

Apoptose ist ein physiologischer Prozeß des Zellsterbens, an dem die Zelle aktiv teilnimmt (KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1984). Er verhindert Schäden im Organismus durch entartete oder kranke und überflüssige Zellen und ermöglicht das Fortbestehen des Gesamtorganismus. Nekrose dagegen ist ein degenerativer, passiv-responsiver Prozeß. Er wird hervorgerufen durch schwere und plötzliche Schädigung der Zellen, wie sie durch Ischämie, Hypoxie, Hyperthermie oder physikalische bzw. chemische Traumata erzeugt werden. Im Gegensatz zur Apoptose läßt die Nekrose keine Programmierung oder Steuerung erkennen.

Apoptose ist ein wichtiger physiologischer Prozeß im Körper, der zusammen mit Proliferation und Differenzierung den Organismus zur Homöostase befähigt. Ohne Apoptose wäre das Leben multizellulärer

Organismen genauso wenig denkbar wie ohne Proliferation und Differenzierung von Zellen. So ist Apoptose sowohl in der Embryogenese und der Entwicklung des Fötus z.B. bei solch natürlichen Prozessen wie der Rückbildung der embryonal angelegten Schwimnhäute zwischen Fingern (HINCHLIFFE, 1981) und der Ausbildung des Nervensystems, das seine komplexe Form und Funktion erst durch massive Apoptose erhält (OPPENHEIM, 1985; HURLE, 1988), als auch im juvenilen Stadium z.B. in der Metamorphose der Insekten und Amphibien (KERR et al., 1974) zu finden. Zudem ist sie wichtiger Bestandteil im Immunsystem z.B. bei der Deletion autoreaktiver T-Zellklone während der Reifung im Thymus (SHI et al., 1989), oder dem Absterben von Zielzellen durch die Aktion von zytotoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (z.B. STACEY et al., 1985). Sie spielt eine große Rolle in den Hormon- und Wachstumsfaktor-abhängigen Geweben und Organen bei Zugabe oder Wegnahme der entsprechenden Regulationsfaktoren (z.B. im Thymus, Prostata, Uterus, dem adrenalen Cortex, den Granulosazellen sowie den erythroiden und lymphoiden Zellen, den Embryonenzellen und neuronalen Zellen, zusammengestellt in SCHWARTZMAN und CIDLOWSKI, 1993). Gerät dieser Mechanismus aus seinem Gleichgewicht, so kommt es zur Ausbildung von Krankheiten. Ein „Zuviel“ an Apoptose prägt die HIV-Erkrankung (TERAI et al., 1991) und neurodegenerative Krankheiten (z.B. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, LOO et al., 1993; TAKASHIMA et al., 1993), ein „Zuwenig“ z.B. die Entstehung von Tumoren (STRASSER et al., 1990; HOLLOWOOD und MACARTNEY, 1991; MCDONNELL und KORSMEYER, 1991; WILLIAMS, G. T., 1991; STRASSER et al., 1994), Autoimmunkrankheiten (STRASSER et al., 1991) und virale Infektionen (z.B. mit Herpes- oder Adenoviren, LEVINE et al., 1993).

Vielleicht die faszinierendste Erkenntnis der Apoptose-Forschung ist, daß jede Zelle zeit ihres Lebens ein jederzeit abrufbares Programm zu ihrer eigenen Zerstörung enthält (RAFF, 1992; RAFF et al., 1993). Dieses ist – vermutlich um eine sofortige Reaktion auf Veränderungen ermöglichen zu können – nicht nur genetisch manifestiert, sondern es existieren zahlreiche Vorläuferformen von zu aktivierenden Enzymen, eine ganze Reihe pro- und antiapoptotischer Faktoren, die sich in der Zelle im Normalzustand in einem ausgeklügelten Gleichgewicht befinden. Eine Störung dieser Homöostase führt zum geordneten Absterben der Zelle (RAFF, 1992; RAFF et al., 1993, basierend auf der Theorie von PURVES et al., 1988 und OPPENHEIM, 1991). Gezeigt wurde dies für *C. elegans* von HENGARTNER und HORVITZ (1994a, b). Die Zellen sind damit jederzeit bereit zu sterben, ohne daß eine weitere Proteinsynthese erfolgen muß (RAFF et al., 1993; JACOBSON et al., 1994). Der Tod der Zellen – in der Regel sind es nur einzelne oder wenige Zellen, die meist asynchron in Apoptose gehen (WYLLIE et al., 1981; WALKER, N. I. et al., 1988) - hinterläßt praktisch keine Spuren der einmal vorhandenen Zelle; sie wird von Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen. Dabei kommt es weder zu einer inflammatorischen Reaktion, noch zu einer Beeinträchtigung der phagozytierenden Zellen (SAVILL und FADOK, 2000). Ist das Programm erst einmal gestartet, kommt es innerhalb recht kurzer Zeit zum geordneten Abbau der Zelle in ihre nahezu kleinsten und vor allem für den Rest des Organismus ungefährlichen Bestandteile (HOLMGREN et al., 1999). Allerdings sind nicht alle Bestandteile des Apoptose-Programms wirklich wichtig für den Tod der Zelle. Es existieren eine ganze Reihe von Sicherungsmechanismen, welche die Bedeutung der Apoptose für das Leben eines Organismus zusätzlich unterstreichen. Die Apoptose ist zudem ein hoch konservierter Prozeß,

was die Erforschung dieses Gebiets selbst am Beispiel des Nematoden *Caenorhabditis elegans* ermöglicht. Hieraus konnten auch im Menschen wichtige Erkenntnisse über dieses Phänomen gewonnen werden (ELLIS et al., 1991a; HENGARTNER et al., 1992; YUAN und HORVITZ, 1992).

1.1.1 MORPHOLOGIE

In apoptotischen Zellen läuft eine charakteristische Folge von morphologischen Veränderungen ab. Zunächst schrumpfen die Zellen aufgrund von Wasserverlust und iso-osmotischem Verlust von Ionen (insbesondere K^+) im Zytoplasma und der Zell-Zell-Kontakt geht verloren (BORTNER et al., 1997; BORTNER und CIDLOWSKI, 1999; HUGHES und CIDLOWSKI, 1999; BORTNER und CIDLOWSKI, 2000; GOMEZ-ANGELATS et al., 2000). Der genaue Mechanismus ist unklar. Die Zelle rundet sich ab und löst sich von der perizellulären Matrix. Das Chromatin kondensiert am Rand des Zellkerns zu einer typischen halbmondförmigen Struktur („Pyknosis“) und die Zytoskelett-Struktur kollabiert. Im nächsten Schritt werden Zellkern und Zytoplasma zu „apoptotic bodies“ fragmentiert („cell blebbing“ oder „Karyorrhexis“). Die DNA wird in Oligonukleosomen geschnitten, die in der Gelelektrophorese die typische DNA-Leiter-Struktur zeigen (KERR, 1971; KERR et al., 1972; WYLLIE et al., 1980). Die Mitochondrien und Lysosomen bleiben intakt. Die apoptotischen Körperchen sind verschlossen und behalten ihre osmotischen Gradienten, evtl. durch die Aktivität vernetzender Enzyme, wie die Transglutaminase, zur Verhinderung der Lyse (FESUS, 1991). Die apoptotischen Zellen werden nach Präsentation sog. „eat me“-Signale von Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert (SAVILL und FADOK, 2000).

Biochemisch sind apoptotische Zellen durch die Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials charakterisiert. Es kommt zu einer intrazellulären Ansäuerung, der Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen und der Externalisierung von Phosphatidylserin in der Membran-Doppelschicht. Bestimmte zelluläre Proteine werden einer selektiven Proteolyse unterzogen. Die DNA wird in hoch- und niedermolekulare Fragmente gespalten (WYLLIE et al., 1984; LAZEBNIK et al., 1994; WALKER und SIKORSKA, 1994; WALKER et al., 1994; GOTTLIEB und FENNEWALD, 1996; ZAMZAMI et al., 1996). Apoptose ist also ein energieabhängiger, in den Zellen genetisch verankerter Prozeß, der durch interne und externe Faktoren beeinflusst werden kann.

Im Gegensatz dazu ist die Nekrose gekennzeichnet durch den Verlust der Membranintegrität und das Anschwellen von Zytoplasma und Mitochondrien. Dies ist auf die Unfähigkeit zur Aufrechterhaltung der Ionen-Homöostase zurückzuführen. Schließlich kommt es zur völligen Lyse der Zelle. Durch die Lyse der Zelle werden die zytoplasmatischen Inhalte der Zelle in die Extrazellulärflüssigkeit freigesetzt und es kommt zu einer signifikanten inflammatorischen Antwort in Form von massiven Entzündungsreaktionen. Die DNA wird nach Lyse der Zelle bzw. Zellorganellen nach dem Zufallsprinzip abgebaut und zeigt in der Agarose-Gelelektrophorese einen Schmier von DNA verschiedenster Größe (WYLLIE et al., 1980; SUN, D. Y. et al., 1994a).

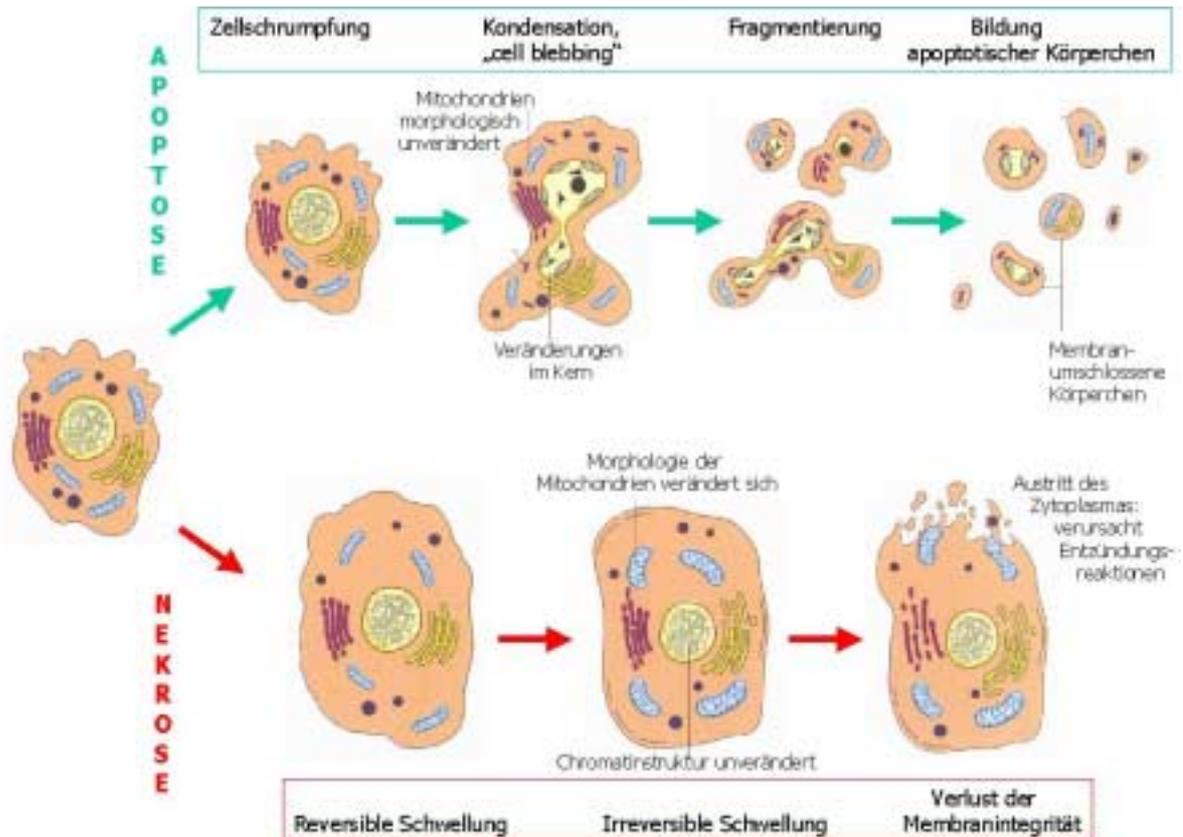


Abbildung 1: Morphologischer Vergleich von Apoptose und Nekrose (verändert nach Produktkatalog Boehringer Mannheim)

In Zellkultur kommt es aufgrund des Fehlens phagozytierender Zellen zu einer Abspaltung von apoptotischen Körperchen. Diese apoptotischen Körperchen zeigen eine progressive Erweiterung und den Abbau zytoplasmatischer Organellen, was – nicht ganz treffend - auch als „sekundäre Nekrose“ bezeichnet wird (SEARLE et al., 1975; DON et al., 1977). Die apoptotischen Körperchen sind membranumschlossen, so daß weiterhin eine Exposition zellulärer Inhalte im Extrazellularraum vermieden wird und somit auch eine mögliche Entzündungsreaktion (SHERIDAN et al., 1981).

1.1.2 SIGNALWEG

Die charakteristischen Manifestierungen der Apoptose reflektieren die Aktivierung eines intrinsischen Zelltod-Apparates, der über die Evolution hinweg stark konserviert blieb (*Caenorhabditis elegans*-Studien, ELLIS et al., 1991a; HENGARTNER et al., 1992; YUAN und HORVITZ, 1992). Viele der Erkenntnisse über den Mechanismus des Zelltodes stammen aus der Analyse des Nematoden *Caenorhabditis elegans* (zusammengestellt z.B. in VAUX et al., 1994; VAUX und KORSMEYER, 1999 u.a.). Der Signalweg läßt sich unterteilen in die Auslösung durch sogenannte Effektoren, die Weiterleitung über die Aktion von Adaptoren und Regulatoren und schließlich die ausführenden Elemente, die zu den beobachteten morphologischen und biochemischen Phänomenen der Apoptose führen.

Im Zentrum der Signalkaskade steht die Familie der Caspasen, eine Familie von Cystein-Proteasen, die eine Spaltungsspezifität für die Peptidbindung nach der Aminosäure Aspartat besitzen (daher der Name Caspase aus „CysteinyI aspartate-specific proteinase“, ALNEMRI et al., 1996; NICHOLSON und THORNBERRY, 1997; WANG, S. et al., 1998). Die 14 zur Zeit bekannten Caspasen können nach ihrem bevorzugten Substrat, ihrer Sequenzidentität und strukturellen Ähnlichkeiten in zwei große Unterfamilien geteilt werden (zusammengestellt in TALANIAN et al., 1997; CRYNS und YUAN, 1998; NICHOLSON und THORNBERRY, 1997). Etwa zwei Drittel der bekannten Caspasen spielen eine Rolle während der Apoptose (THORNBERRY und LAZEBNIK, 1998; EARNSHAW, 1999; EARNSHAW et al., 1999). In der Zelle kommen sie als inaktive Vorläuferformen (Zymogene), genannt Procaspasen vor, die sich gegenseitig in einer Kaskade ähnlich des Komplementsystems durch Spaltung aktivieren können. Wie wichtig sie tatsächlich für die Apoptose sind, zeigen Caspase-Knockout-Mäuse (z.B. KUIDA et al., 1998, zusammengestellt in VAUX und KORSMEYER, 1999) und die Wirkung von Caspase-Inhibitoren auf die Ausführung der Apoptose (CRYNS und YUAN, 1998). Auch bestimmte Krankheitsbilder konnten in direkten Zusammenhang mit Caspase-Aktivitäten gebracht werden (z.B. Morbus Alzheimer mit Caspase 3, GERVAIS et al., 1999).

Zur Auslösung der Apoptose existieren eine ganze Reihe von Mechanismen. Darunter befindet sich der Wegfall von wichtigen Überlebensfaktoren (wie z.B. Wachstumsfaktoren) bzw. die Auslösung durch Todesfaktoren, wie sie der Fas-Ligand, der Tumornekrosefaktor TNF und TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) darstellen. Genotoxische Substanzen (wie z.B. Zytostatika) oder γ -Strahlung, sowie oxidativer Streß führen zur Auslösung von Apoptose durch DNA-Schäden (zusammengestellt z.B. in THOMPSON, 1995).

Besonders gut untersucht ist die Auslösung der Apoptose durch die sog. Zelloberflächen-Rezeptor-Agonisten (WALLACH et al., 1997). Hier werden nach Art der ausgelösten Signalkaskade zwei Typen unterschieden: zum einen die Agonisten des Oberflächenrezeptors für TNF- α , zum anderen die Liganden des Oberflächenrezeptors APO/Fas/CD95 (TRAUTH et al., 1989; NAGATA und GOLSTEIN, 1995; VANDENABEELE et al., 1995). Diese Substanzen sind bereits bekannt, da sie an einer Reihe immunologischer, inflammatorischer und pathologischer Prozesse beteiligt sind. Ein wichtiges Beispiel aus der Gruppe der TNF-Liganden ist das in dieser Arbeit verwendete Zytokin TNF- α , bzw. aus der Gruppe der Fas-Liganden der Anti-APO/Fas-Antikörper. Durch die Bindung von Liganden an die entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche kommt es zu einer Trimerisierung der Rezeptoren (NAGATA und GOLSTEIN, 1995; VANDENABEELE et al., 1995; ASHKENAZI und DIXIT, 1998). Diese binden mit ihren intrazellulären Todesdomänen (Death Domains – DD) Adaptorproteine, wie z.B. FADD/MORT1 (zusammengestellt in GOLSTEIN, 1997; BOLDIN et al., 1995; CHINNAIYAN et al., 1995; NAGATA, 1997; Yuan und Cryns, 1998). Dieser den Tod induzierende Komplex wird auch DISC genannt (Death Inducing Signalling Complex). Die Adaptorproteine rekrutieren über ihre sogenannten Todeseffektordomänen (Death Effector Domains – DED) Procaspasen, wie die Procaspasen 8 und 10. Diese werden proteolytisch aktiviert und initiieren so die proteolytische Caspase-Kaskade, weswegen sie auch als Initiatorcaspasen bezeichnet werden (u.a. WALLACH et al., 1997; CRYNS und YUAN, 1998; THORNBERRY, 1998).

Ein weiterer Weg der Apoptose-Signalkaskade verläuft über die Mitochondrien. Dieser Signalweg wird z.B.

über Topoisomerase-Hemmstoffe ausgelöst, die zu DNA-Schäden führen. Topoisomerasen sind nukleäre Enzyme, die vorübergehend Einzel- oder Doppelstrangbrüche in den DNA-Molekülen erzeugen, wobei die Bruchstücke kovalent mit dem Protein verbunden bleiben. Neben der Transkription und der Reparatur der DNA sind sie an der DNA-Replikation beteiligt, indem sie die Torsionsspannung des DNA-Doppelstrangs durch Strangbruch und Entdrillung lösen (WANG, J.C., 1987). Der in dieser Arbeit am häufigsten verwendete Apoptose-Induktor ist die Substanz Topotecan. Topotecan ist ein Camptothecin-Derivat und gehört wie dieses zu den Topoisomerase I-Inhibitoren (ENG et al., 1988). Im Unterschied zur Topoisomerase II verursacht die Topoisomerase I nur Einzelstrangbrüche. Beide ermöglichen eine Entspiralisierung und damit einen Zugriff der DNA-Polymerase auf den zu replizierenden Strang. Die hauptsächlichen Schritte dieses komplexen Prozesses sind die Bindung der Topoisomerase I an spezifische DNA-Abschnitte und die Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats eines DNA-Strangs. Hierbei bildet ein Tyrosin-Rest des Enzyms ein kovalentes Intermediärprodukt mit dem 3'-Phosphatende des gespaltenen DNA-Strangs. Nach Relaxation der DNA wird die Phosphodiesterbindung wiederhergestellt und die Topoisomerase I dissoziiert von der DNA. Dadurch kann sich die Replikationsgabel fortbewegen und der Replikationsmechanismus durchgeführt werden. Die Wirkung des Topotecans beruht darauf, daß Topotecan irreversibel an den kovalenten Komplex aus Enzym und DNA-Doppelstrang bindet. Durch das Fortschreiten der Replikationsgabel erfolgt ein proteinassoziierter Bruch der DNA-Einzelstränge (HORWITZ und HORWITZ, 1973; LIU, L. F., 1989; ZHANG, H. et al., 1990; CAPRANICO, 1992).

Ähnliches gilt für die Topoisomerase II-Inhibitoren Etoposid und Teniposid, die in die Gruppe der semisynthetischen Podophyllotoxine gehören (CHEN, G. L. et al., 1984; LONN et al., 1989). Durch die Topoisomerase II kommt es zu einem Doppelstrangbruch. Auch hier kommt es zu keiner DNA-Bindung der Inhibitoren, sondern lediglich zu einer Inhibierung der Strangentdrillung und DNA-Ligase-Aktivität der Topoisomerase II. Der weitere Weg von den vereinzelt entstandenen Strangbrüchen bis zur Auslösung der gesamten apoptotischen Maschinerie ist noch nicht vollends aufgeklärt.

Weitere intrazellulär wirkende Induktionsformen verlaufen über Substanzen, die über eine Schädigung der Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirken (BOSSY-WETZEL et al., 1998). Durch solche Todesstimuli kommt es nach Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials zur mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom c, Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor-1) und AIF (Apoptosis Inducing Factor). Cytochrom c (eine Kernkomponente der mitochondrialen Elektronentransportkette!!) bindet im Zytoplasma an Apaf-1, das unter Bildung des Apoptosoms sowohl mit der Procaspase 9 als auch mit dem Todesantagonisten Bcl-X_L interagiert (PAN et al., 1998). Durch proteolytische Aktivierung der Procaspase 9 zur aktiven Caspase 9 kommt es zur Auslösung der Caspase-Kaskade (BOSSY-WETZEL et al., 1998), die Bildung des Apoptosoms stimuliert die Aktivierung der Caspase 3 (LIU, X. et al., 1996; LI, P. et al., 1997; ZHOU, Q. et al., 1997).

Der mitochondriale und der ligandenvermittelte Weg sind über die weitere Caspase-Kaskade miteinander gekoppelt. Sie führt schließlich zur Spaltung intrazellulärer Zielmoleküle. In der Caspase-Kaskade kommt es zur gegenseitigen Aktivierung der bekannten Caspasen. Davon gehören die Caspasen 8 und 10 sowie 2 und 9 zu den initial aktivierten Caspasen. Die Caspasen 8 und 10 besitzen eine DED-Domäne (Death

Effector Domain), während die Caspasen 2 und 9 über eine CARD-Domäne (Caspase Activating and Recruiting Domain) verfügen. Die Caspasen 3, 6 und 7 bilden die Gruppe der sogenannten „Executioner“-Caspasen. Sie sind zuständig für die proteolytische Spaltung weiterer Signal- und ausführender Proteine. So spaltet Caspase 3 z.B. die Topoisomerasen I und II, Aktin, Fodrin, Gelsolin, PARP und die DNA-abhängige Proteinkinase, sowie ICAD, den Inhibitor der DNase CAD (Caspase Activated DNase). CAD wird dadurch aktiviert und ist schließlich für die DNA-Fragmentierung während der Apoptose (mit-?)verantwortlich (LAZEBNIK et al., 1994; KOTHAKOTA et al., 1997; THORNBERRY, 1997; SAKAHIRA et al., 1998). Die Liste der Caspase-Substrate umfaßte 1999 knapp 100 Proteine, mit deutlich steigender Tendenz (STROH und SCHULZE-OSTHOFF, 1998; EARNSHAW et al., 1999; NICHOLSON, 1999). Auch diese Spaltungen sind spezifisch und geordnet. Sie führen zu den biochemischen und morphologischen Veränderungen der apoptotischen Zelle.

Regulatoren

Apoptose ist ein streng regulierter Prozeß, an dem pro- und antiapoptotische Moleküle beteiligt sind. Die regulatorischen Moleküle lassen sich aufgrund ihres Eingreifens in die Apoptose in drei Gruppen einteilen: zum einen die Moleküle, welche die Zelle im Normalzustand vor Apoptose bewahren, zum anderen die Moleküle, die auf der Ebene der Auslösung eingreifen und zum dritten die Inhibitoren der Caspasen.

Zur ersten und zweiten Gruppe gehören die Mitglieder der Bcl-2-Familie (zusammengestellt in REED, J. C. et al., 1996; ANTONSSON und MARTINOU, 2000; ADAMS und CORY, 1998; TSUJIMOTO und SHIMIZU, 2000; HENGARTNER, 2000). Sie enthalten sowohl antiapoptotisch (Bcl-2, HOCKENBERY et al., 1990; KORSMEYER et al., 1990; KORSMEYER, 1992) als auch proapoptotisch (wie z.B. Bid, Bax, Bim, Bad, Bcl-X_L, BOISE et al., 1993; OLTVAI et al., 1993; YANG et al., 1995) wirkende Moleküle. Diese halten sich in der Zelle im Normalzustand die Waage. So finden sich sowohl pro- als auch antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie an der Oberfläche der Mitochondrien. Dort regulieren sie die Freisetzung von Cytochrom c (der genaue Mechanismus ist nicht bekannt). Hier ist insbesondere Bid zu nennen, das als proapoptotisches Bcl-2-Familienmitglied von Caspase 8 gespalten wird. Es transloziert in das Mitochondrium und stimuliert dort die Freisetzung von Cytochrom c (LI, H. et al., 1998). Es kann wiederum von Bcl-X_L inhibiert werden. Die Wechselwirkung zwischen den beiden großen Signalwegen der Apoptose hat allerdings nur ein minimales Ausmaß, so daß beide Signalwege größtenteils unabhängig voneinander ablaufen (GROSS et al., 1999; YIN et al., 1999).

In die zweite Gruppe gehören Kofaktoren und Adaptoren wie Apaf-1 und FADD sowie Inhibitoren wie virale und zelluläre FLIPs, ARCs und IAPs. FLIPs (FADD like ICE inhibitory proteins, IRMLER et al., 1997; SHU et al., 1997; THORNBERRY und LAZEBNIK, 1998) sind Moleküle, die ähnlich wie die Caspase 8 aufgebaut sind, jedoch keine katalytische Funktion besitzen und damit die Aktivierung der Procaspase 8 inhibieren. ARCs (apoptosis repressors with caspase recruitment domain, KOSEKI et al., 1998) sind Proteine, die eine CARD-Domäne enthalten und somit die Interaktion zwischen den verschiedenen CARD enthaltenden Proteinen blockieren.

Zu den Inhibitoren der Caspasen gehören vor allem Mitglieder der sogenannten IAP-Familie (inhibitors of

apoptosis, UREN et al., 1998). Der zentrale Mechanismus verläuft über direkte Inhibierung vor allem der Caspasen 3 und 7 (zusammengestellt in LACASSE et al., 1998). Diese wiederum können von IAP-Inhibitoren wie z.B. Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) oder DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI) inhibiert werden.

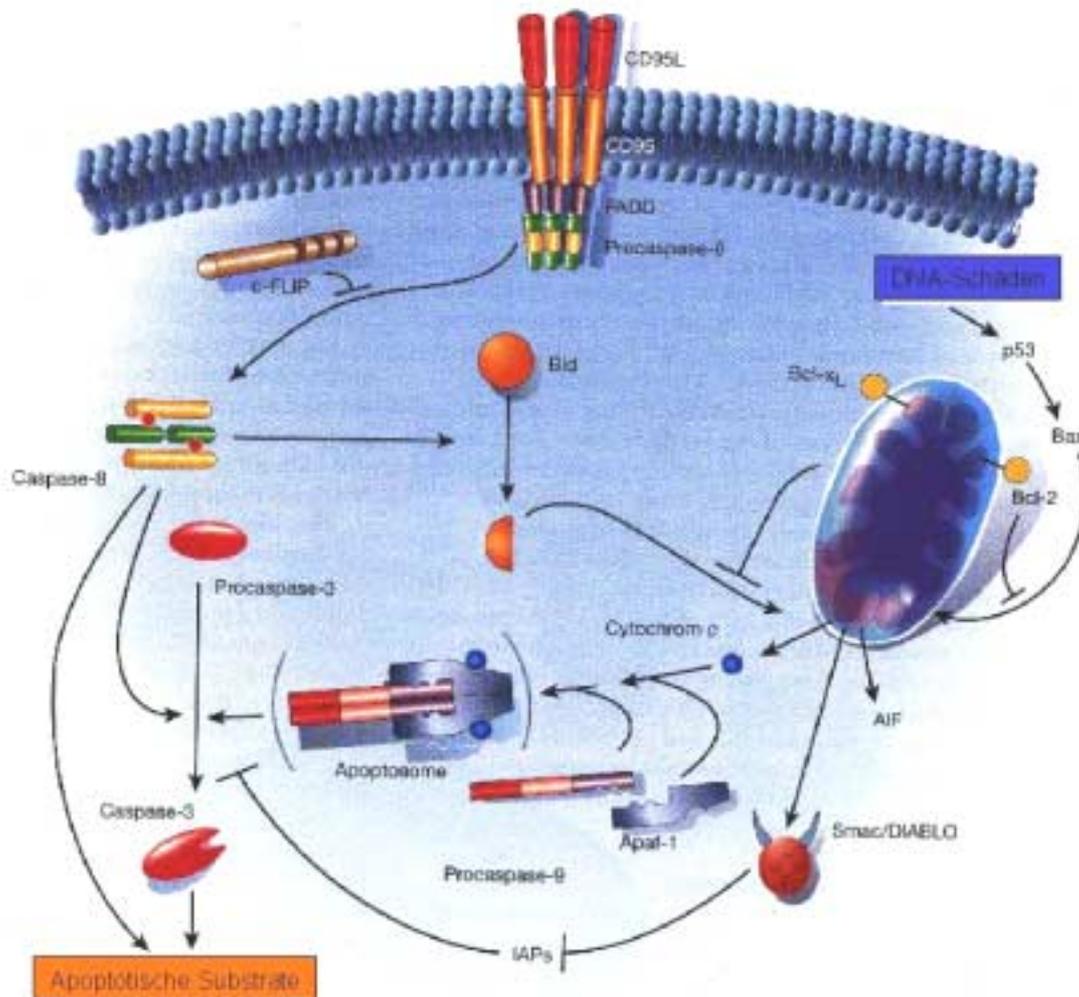


Abbildung 2: Apoptotische Signalkaskade (modifiziert nach HENGARTNER, 2000)

Effekte

Von den bereits genannten biochemischen und morphologischen Effektoren ist für die vorliegende Arbeit neben der Kondensation des Chromatins insbesondere die Fragmentierung der nukleären DNA von Bedeutung. Die Kondensation des Chromatins während der Apoptose ist im Gegensatz zur Chromatinkondensation bei der Mitose ein passiver Prozeß, der aus dem Verlust der strukturellen Integrität von Euchromatin, der Kernmatrix und der Kernlamina resultiert. Dadurch kann das Heterochromatin aggregieren und die DNA-Fragmentierung einsetzen (HENDZEL et al., 1998; ROBERTSON et al., 2000). Als potentielle Kandidaten für die Kondensation wurden die Moleküle Acinus und AIF

identifiziert. Acinus („Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus“, SAHARA et al., 1999) ist ein durch Caspase 3 und eine weitere, unbekannte Protease aktiviertes Protein. AIF („Apoptosis Inducing Factor“, SUSIN et al., 1999) ist ein Faktor, der aus den Mitochondrien freigesetzt wird und in den Kern transloziert. Daneben könnten auch CAD, eine für die DNA-Fragmentierung verantwortliche DNase (siehe unten), sowie die DNasen I und II, die L-DNase II und Cathepsin B eine Rolle spielen (zusammengestellt in ZAMZAMI und KROEMER, 1999). Auch der Abbau der Lamine (durch Caspase 6, LAZEBNIK et al., 1994; LAZEBNIK et al., 1995; TAKAHASHI et al., 1996) und evtl. anderer Proteine könnte hierzu beitragen (OBERHAMMER et al., 1994; GHIBELLI et al., 1995; WEAVER et al., 1996). ALLERA et al. (1997) vermuten aufgrund der Chromatinstruktur während der frühen Apoptose eine Chromatin-Umorganisation durch spezifische Konformationsänderungen auf Ebene der Nukleosomen. Diese sollen unabhängig von und vor der DNA-Spaltung geschehen. Sie basieren auf der Beobachtung, daß sich aufgrund von „face to face“-Interaktionen der Core-Partikel schmale 11 nm Filamente bilden, die zu einem eng verwobenen Netzwerk gefaltet werden. Insgesamt läßt sich zum Ablauf der apoptotischen Kondensation des Chromatins noch keine eindeutige Aussage treffen, auch wenn sicherlich mehrere Faktoren eine Rolle spielen (und weitere gefunden werden, wie z.B. der mögliche Einfluß der Topoisomerase II, DURRIEU et al., 2000). Da mit AIF ein Caspase-unabhängiger Faktor gefunden wurde, wird davon ausgegangen, daß die Kondensation des Chromatins teilweise unabhängig von dem Abbau der chromosomalen DNA kontrolliert wird (SAKAHIRA et al., 1999).

Aus verschiedenen bahnbrechenden Untersuchungen, vor allem der Gruppe um Nagata, ist bekannt, daß die DNA-Fragmentierung zumindest zum Teil auf die Aktivierung einer endogenen DNase zurückzuführen ist (ENARI et al., 1995; ENARI et al., 1998; SAKAHIRA et al., 1998; SAMEJIMA und EARNSHAW, 1998; SAMEJIMA et al., 1998; NAGATA, 2000). Sie kommt sowohl im Zytoplasma als auch im Kern in inaktiver Form im Komplex mit ICAD vor, das zugleich Chaperon für die korrekte Faltung der CAD und ihr Inhibitor ist. Durch Caspase 3 wird der Inhibitor während Apoptose gespalten und so die DNase aktiviert. Daher wird sie auch als CAD bezeichnet (Caspase Activated DNase). Im Menschen ist sie als DFF40 (von DNA-Fragmentierungs-Faktor mit der Molekularmasse 40 kDa) definiert. Ihr Inhibitor wird entsprechend als ICAD (Inhibitor von CAD) bzw. DFF45 (DNA-Fragmentierungs-Faktor mit der Molekularmasse 45 kDa) bezeichnet. In dieser Arbeit werden aufgrund der Klarheit nur die Begriffe CAD bzw. ICAD verwendet. Ist CAD aktiviert, so kommt es zur internukleosomalen Spaltung der DNA am DNA-Linker. Es entstehen Mono- und Oligonukleosomen, die nach elektrophoretischer Auftrennung die typische DNA-Leiter-Struktur zeigen (Abbildung 3). Während der Apoptose kommt es jedoch nicht nur zu DNA-Fragmenten dieser geringen Größe, sondern auch zu hochmolekularen Fragmenten, deren Entstehungsweise nicht bekannt ist. Es ist jedoch anzunehmen, daß die Organisation des Chromatins einen wichtigen Effekt auf die Entstehung der zwei Größenordnungen von Fragmenten während der Apoptose ausübt.

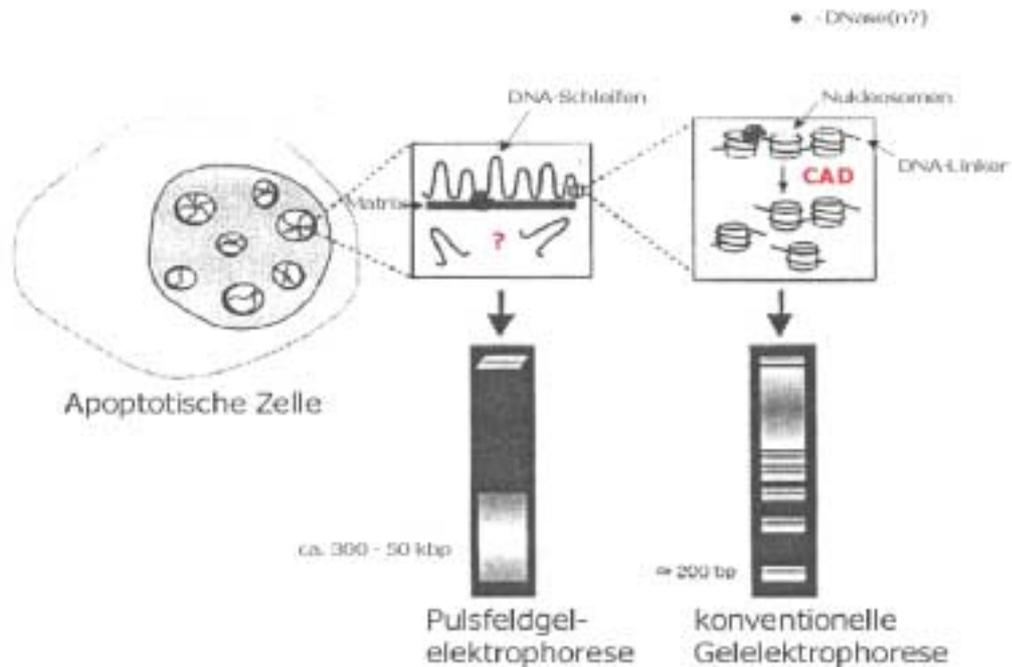


Abbildung 3: Die DNA-Fragmentierung während der Apoptose erzeugt Fragmente in zwei verschiedenen Größenordnungen (Abbildung modifiziert nach HUGHES und CIDLOWSKI, 2000)

Durch die Spaltung mit einer noch nicht identifizierten Endonuklease kommt es während der Apoptose zur Bildung hochmolekularer DNA-Fragmente, die durch die Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt werden können und eine Größe zwischen 50 und 300 kb aufweisen. Es wird vermutet, daß diese Spaltungen an den Matrixanheftungsregionen der DNA-Schleifen stattfinden könnten (vgl. 4.4.4 und 5.4). Die niedermolekularen DNA-Fragmente entstehen durch Spaltung an der Linker-DNA zwischen den Nukleosomen durch CAD und bestehen aus Mono- und Oligonukleosomen. Diese zeigen nach gelelektrophoretischer Auftrennung die sog. DNA-Leiter.

1.2 DAS CHROMATIN

Um das Ausmaß der Komplexität anzudeuten, die mit der Organisation, den Strukturen und Funktionen von eukaryotischen Chromosomen zusammenhängt, genügt es, sich vorzustellen, daß das diploide humane Genom, welches 6×10^9 Basenpaare enthält und damit mehr als 2 m DNA-Länge aufweist, in 46 Chromosomen verpackt ist. Jedes von ihnen ist in der Metaphase nur wenige Mikrometer lang und nur einen halben Mikrometer dick (DAVIE, 1995). Einzelne Stufen dieser Verpackung konnten trotz intensiver Forschung bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt werden.

Das Chromatin besteht neben der DNA aus einem etwa gleichen Anteil an Histonen und darüber hinaus den sogenannten Nicht-Histon-Proteinen. Die Nicht-Histon-Proteine sind in chromosomale Funktionen und Strukturen, in die Chromosomenorganisation und in die Kernarchitektur involviert. Dabei bilden sie die sogenannte Kernmatrix oder das Kernskelett. Die Histone, die zunächst nur für passive Strukturproteine mit wenig Effekt auf die DNA-Funktionen gehalten wurden, sind als Ziel chemischer Modifikationen wieder in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Zu den chemischen Modifikationen zählen Acetylierungen, Methylierungen, Ubiquitinylierungen und Phosphorylierungen. Sie können die Transkription der Gene und andere Prozesse beeinflussen (zusammengestellt in BRADBURY, 1998, sowie

WOLFFE und GUSCHIN, 2000). Am Chromatin finden insbesondere die Prozesse der Transkription, Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur statt.

1.2.1 DIE BEREICHE DES CHROMATINS

Nach seiner Anfärbarkeit können in der Interphase des Zellzyklus zwei verschiedene „Arten“ des Chromatins unterschieden werden: das Heterochromatin als transkriptionell inaktives, dicht gepacktes Chromatin und das Euchromatin als transkriptionell aktives Chromatin, das eine offenere Struktur aufweist (HENIKOFF, 1990; PARDUE und HENNIG, 1990; HENIKOFF, 1994).

Das Heterochromatin macht etwa 15% der menschlichen DNA aus und findet sich in allen multizellulären eukaryotischen Genomen. Es enthält einen hohen Prozentsatz repetitiver DNA, hat reduzierte Rekombinationsraten, einen geringen Anteil an Protein-codierenden Regionen und wird in der späten S-Phase repliziert. Das Heterochromatin bleibt während des Zellzyklus kondensiert. Auf in der Nähe gelegene euchromatische Gene kann es Repressionseffekte ausüben (KARPEN, 1994; WEILER und WAKIMOTO, 1995). Eine weitere vermutete Rolle spielt es in der Chromosomenpaarung (RENAULD, 1997) und der Kompartimentierung des Kerns (SADONI et al., 1999). Heterochromatische Bereiche finden sich gehäuft insbesondere am und um das Zentromer und an den Telomeren der Chromosomen. Die Chromosomen zeigen eine jeweils charakteristische Bänderung nach Färbung mit Giemsa-Farbstoff oder Quinacrin (BERNARDI, 1993): Dunkle Banden (auch G oder Q-Banden genannt) zeigen die relativ AT-reichen, DNase-unempfindlichen und Gen-armen Bereiche, die früh im Zellzyklus kondensiert werden, jedoch spät replizieren. Helle Banden (R-Banden) zeigen dagegen relativ GC-reiche Bereiche, die zudem DNase-empfindlich sind und früh repliziert werden. Sie enthalten viele Gene, darunter nahezu alle sog. „Haushaltsgene“.

Im Genom des Menschen gehören etwa 30% der DNA zu den Genen und verwandten Sequenzen (davon sind wiederum nur etwa 10% der codierenden DNA zuzurechnen, während 90% in die Gruppe der Pseudogene, Genfragmente und Introns sowie untranslatierten Sequenzen gehören). 70% der DNA befindet sich außerhalb der Gen-enthaltenden Bereiche. Davon sind etwa 20% mittel bis stark repetitiv, d.h. die DNA kommt entweder in verstreut liegenden Wiederholungen oder sog. tandemförmigen oder eng benachbarten Wiederholungen (als Cluster) vor. In der Gruppe der verstreut liegenden Wiederholungen kann die Gruppe der SINEs (Short INterspersed repetitive Elements) von den LINEs (Long INterspersed repetitive Elements) unterschieden werden. Zur ersten Gruppe gehört die sogenannte Alu-Familie, zur zweiten Gruppe die sogenannte Kpn-Familie. Bei den tandemförmig oder geclustert vorliegenden Wiederholungen handelt es sich hauptsächlich um Satelliten-DNA und Telomer-DNA.

Die Alu-Familie enthält etwa 700.000 bis 1.000.000 Kopien und ist damit die häufigste Sequenz im menschlichen Genom. Sie hat einen relativ hohen GC-Gehalt und findet sich vor allem in den R-Banden und in euchromatischen Regionen des Genoms. Im Durchschnitt kommt sie alle 4 kb vor, fehlt jedoch in

den codierenden Bereichen. Alu-Elemente treten häufig in nicht-codierenden intragenen Bereichen, in Introns und vereinzelt in Regionen auf, deren Transkripte nicht translatiert werden.

Die **LINE-1-Familie** enthält etwa 60.000 bis 100.000 Kopien (FANNING und SINGER, 1987) und kommt ca. alle 50 kb einmal vor. Viele ihrer Mitglieder können aktiv in andere Bereiche des Genoms springen (HOLMES et al., 1994). Auch sie finden sich in euchromatischen Bereichen, dort jedoch in den G-Banden und fehlen in den codierenden Bereichen.

Die **Satelliten-DNA** ist durch sehr lange Folgen (100 kb bis mehrere Mb) tandemförmiger Wiederholungen von DNA-Sequenzen mit einer einfachen bis mittelkomplexen repetitiven Einheit charakterisiert (SINGER, 1982). Sie wird nicht transkribiert und macht pro Chromosom 3 bis 5% der DNA aus. Neben den α -Satelliten mit einer Grundeinheit von 171 bp gibt es auch β -Satelliten und die Satelliten 1 bis 3. Sie finden sich vor allem im Zentromer und den perizentromerischen Regionen.

Die **Telomer-DNA** besteht beim Menschen aus 2 bis 15 kb großen direkten Wiederholungen des Hexanukleotids (TTAGGG)_n und charakterisiert die Enden der Chromosomen. Wesentlich variabler ist die Minisatelliten-DNA, die sich subtelomerisch befindet und aus etwa 0,1 bis 20 kb langen hypervariablen Folgen besteht. Ihre Funktion ist unklar.

Die Grundeinheit der Chromatinstruktur aller eukaryotischen Zellen ist das Nukleosom (KORNBERG, 1977), in dem die DNA in enger Verbindung mit den basischen Histonen vorliegt. Mehr als 80% der DNA des Zellkerns liegen in Nukleosomen gebunden vor (NOLL, 1974a). Diese Einheiten können Strukturen höherer Ordnung ausbilden, deren genauer Aufbau jedoch nicht bekannt ist. Neben den Assoziationen von DNA und Histonen in Nukleosomen existiert noch die Gruppe der sog. Nicht-Histon-Proteine, zu denen z.B. die HMG-Proteine gehören (High Mobility Group). Zusammen bilden sie die Kernmatrix, die häufig auch als Proteinnetzwerk oder Proteingerüst bezeichnet wird.

1.2.1.1 NUKLEOSOMEN

Biochemische und elektronenmikroskopische Analysen des Chromatin-Aufbaus zeigten, daß 146 bp DNA um ein Histon-Oktamer gewunden sind, so daß 1,75 Windungen einer linksgängigen Superhelix mit einer Ganghöhe von 2,8 nm entstehen (FINCH et al., 1977). Das Histon-Oktamer aus je zwei Molekülen der Histone H2A, H2B, H3 und H4 und die DNA bilden das sogenannte Core-Partikel mit einem Durchmesser von 10 nm (KORNBERG und THOMAS, 1974; KLUG et al., 1980; ARENTS et al., 1991). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen aneinandergereihte Core-Partikel als eine Faser mit „perlschnurartiger“ Struktur (OLINS und OLINS, 1974). Benachbarte Core-Partikel sind mit der sogenannten Linker-DNA untereinander verbunden. An der Ein- und Austrittsstelle der DNA-Doppelhelix am Core-Partikel ist das H1-Histon (Linker-Histon) mit der Linker-DNA assoziiert (CRANE-ROBINSON und PTITSYN, 1989). Durch das H1-Histon erhöht sich die proteingebundene DNA-Menge auf 166 bp. Diese Einheit wird als Chromatosom bezeichnet (SIMPSON, 1978). Die genaue Positionierung des H1-Histons ist allerdings noch unklar. Neuere Untersuchungen von ZHOU et al. (1998) deuten eine asymmetrische Bindung des H1-Histons auf der Außenseite der DNA-Superhelix an. PRUSS et al. (1996) beobachteten die

Bindung des H1-Histons an der Innenseite der DNA-Superhelix. Die sich wiederholenden Einheiten aus Histon-Oktamer mit 146 bp DNA, Linker-DNA und H1-Histon stellen in ihrer Gesamtheit als Nukleosom die elementaren Untereinheiten des Chromatins dar (KORNBERG, 1977).

Der DNA-Gehalt der Nukleosomen ist in verschiedenen Organismen und Zelltypen unterschiedlich. Es können sogar Unterschiede innerhalb einer Zelle gefunden werden (wie bei den Telomer-Nukleosomen). Das Histon-Oktamer bindet immer 146 bp DNA. Die Linker-DNA variiert jedoch in ihrer Länge, sie kann zwischen 6 und 80 bp enthalten (ersteres in Telomeren, zweiteres in anstelle von H1 an Histon H5 gebundenen Nukleosomen, KORNBERG, 1977; ALLAN et al., 1980; STEIN et al., 1994).

Das H1-Histon fixiert die um das Histon-Oktamer gewundene DNA-Doppelhelix und nimmt daher eine Schlüsselfunktion bei der Ausbildung einer Struktur höherer Ordnung und der weiteren Kondensierung der DNA ein (KORNBERG, 1977; THOMA et al., 1979; CARRUTHERS et al., 1998). Die Linker-Histone sind allerdings nicht essentiell für das Chromatin und die Chromosomenausbildung (DASSO et al., 1994; SHEN et al., 1995). Die Histone der Metazoen weisen eine Drei-Domänen-Struktur auf, nämlich eine zentrale globuläre Domäne, die von C- und N-terminalen Regionen flankiert wird. Die globuläre Domäne der Linker-Histone kann mit dem Nukleosom-Core-Partikel auf verschiedene Weise assoziieren (PRUSS et al., 1996; ZHOU et al., 1998). Die N- und C-terminalen Regionen der Linker-Histone binden an die DNA innerhalb des Nukleosom-Core-Partikels und an die Linker-DNA zwischen den Nukleosom-Core-Partikeln. Da die Histone sehr basische Proteine sind, deren basische Aminosäuren insbesondere in den N- und C-terminalen Regionen gehäuft vorkommen, können sie das polyanionische Rückgrat der DNA neutralisieren und so die Faltung der nukleosomalen Einheiten zu Strukturen höherer Ordnung erleichtern (CLARK und KIMURA, 1990). Die N- und C-terminalen Regionen der Histone sind kritisch für die Selbstausbildung von kondensierten Fasern in Strukturen höherer Ordnung. Diese Interaktionen zwischen den terminalen Regionen und der DNA und dem Protein verändern sich bei Faltung oder Kompaktierung der Chromatinfaser (FLETCHER und HANSEN, 1996). Zudem sind posttranslationale Modifizierungen der N-terminalen Regionen vermutlich verantwortlich für spezifische Funktionen und Konformationen der Chromatinfaser, indem sie die Interaktionen der terminalen Regionen der Histone definiert verändern (HANSEN et al., 1998). Unter physiologischen Bedingungen ist die Assoziation des Histons H1 an das Chromatin sehr viel weniger stabil als die der Core-Histone. Die Entfernung des H1 wird daher auch als Möglichkeit angesehen, sowohl die lokale als auch die Chromatinstruktur höherer Ordnung zu destabilisieren und die Interaktion zwischen den Core-Histonen und der DNA zu verändern (WOLFFE und GUSCHIN, 2000).

1.2.1.2 HÖHERE STRUKTUREN

Die Linker-Histone enthaltenden Nukleosomenketten neigen in Anwesenheit von H1-Histonen dazu, unregelmäßige Fasern mit einem Durchmesser von ungefähr 30 nm zu bilden (THOMA et al., 1979). Ihre Architektur und Art der Kompaktierung ist jedoch Grundlage zahlreicher kontroverser Diskussionen (WIDOM, 1989; VAN HOLDE und ZLATANOVA, 1995; FLETCHER und HANSEN, 1996; WOODCOCK und HOROWITZ,

1995). Diese Diskussionen beziehen sich nicht auf die Struktur des Nukleosomen-Core-Partikels, die bereits auf atomarer Ebene untersucht ist (ARENTS und MOUDRIANAKIS, 1993; LUGER et al., 1997), sondern auf die Anordnung und die Interaktionen der Nukleosomen-Core-Partikel in dreidimensionaler Hinsicht sowie die Stellen der Bindung der Linker-DNA und Linker-Histone (VAN HOLDE und ZLATANOVA, 1995; WOODCOCK und HOROWITZ, 1995). Wie wichtig das Verständnis der fundamentalen Faltungseigenschaften der Nukleosomenketten ist, zeigen Berichte, die Evidenzen für eine Schlüsselrolle der Chromatinstruktur höherer Ordnung bei der Bestimmung des transkriptionalen Status der Gene und Genorte sehen (TURNER, 1991; FELSENFELD, 1992; SVAREN und HORZ, 1993; WORKMAN und BUCHMAN, 1993; PARANJAPPE et al., 1994; WOLFFE, 1994; KINGSTON et al., 1996). Bei der Kompaktierung des Chromatins spielen insbesondere Veränderungen der ionischen Umgebung eine Rolle (WIDOM, 1986), die auf elektrostatische Interaktionen zwischen DNA, den Histon-Proteinen und freien Ionen zurückzuführen sind (CLARK und KIMURA, 1990). Durch Elektronen-Kryomikroskopie und Raster-Kraft-Mikroskopie konnten natives Chromatin und definierte Chromatinanordnungen ohne vorherige Fixierung oder Färbung untersucht werden und zeigten ein irreguläres, dreidimensionales Zickzack-Faltungsmuster, das während der Kompaktierung des Chromatins erhalten blieb (STAYNOV et al., 1983; BORDAS et al., 1986b, a; WILLIAMS, S. P. et al., 1986; KUBISTA et al., 1990; WOODCOCK, C. L. et al., 1993; GRAZIANO et al., 1994; HOROWITZ et al., 1994; LEUBA et al., 1994; BEDNAR et al., 1998). Damit sind, anders als im älteren Solenoidmodell (FINCH und KLUG, 1976), aufeinanderfolgende Nukleosomen nicht benachbart und die Linker-DNA-Segmente nicht gewunden. Zudem ist die Chromatinstruktur damit viel unregelmäßiger und komplexer als zunächst angenommen (WOLFFE und GUSCHIN, 2000).

1.2.1.3 MATRIXANHEFTUNGSREGIONEN

Ein attraktives Modell der weiteren Chromatinorganisation stellt die Organisation der DNA in DNA-Schleifen von einer durchschnittlichen Größe von ca. 50 bis 300 kb dar. Diese sollen durch Bindung von AT-reichen DNA-Sequenzen an die Kernmatrix gebildet werden (LAEMMLI, 1978; LAEMMLI et al., 1978; SAITOH und LAEMMLI, 1993). Ein haploides Genom würde danach etwa 60.000 DNA-Schleifen enthalten. Dies liegt im Rahmen der geschätzten Anzahl von menschlichen Genen, die zwischen 50.000 und 100.000 liegt.

DNA-Schleifen entstehen durch die Anheftung von DNA-Sequenzen aufgrund ihrer Affinität an die Kernmatrix. Nach Art der Untersuchung werden sie als MARs (Matrixanheftungsregionen, COCKERILL und GARRARD, 1986; COCKERILL, 1990) oder SARs (von „scaffold attachment regions“, MIRKOVITCH et al., 1984) bezeichnet. Die Ergebnisse beider Methoden sind jedoch dieselben, so daß in dieser Arbeit der Begriff MARs synonym für MARs und SARs gebraucht wird (siehe auch DAVIE, 1995). MARs sind damit definiert als genomische Regionen, welche die Fähigkeit besitzen, *in vitro* an isolierte Kernmatrizes zu binden. Zudem existieren sogenannte *in vivo*-Nachweismethoden: Sie beruhen auf der Beobachtung, daß die Topoisomerase II eine der Hauptkomponenten der Kernmatrix ist. Die enzymatische Aufgabe der Topoisomerase II besteht in der Einführung von Doppelstrangbrüchen in die DNA, die dadurch

superhelicale Torsionen durch Rotation der DNA-Enden entwinden kann. Diese Strangbrüche werden nach der Rotation wieder ligiert. Durch die Verwendung von Topoisomerase II-Inhibitoren kommt es jedoch zu einer Stabilisierung der Doppelstrangbrüche (CHEN, G.L. et al., 1984). Auch hier entstehen Fragmente der Größenordnung 50 bis 300 kb, welche die DNA-Schleifen-Größe demonstrieren sollen.

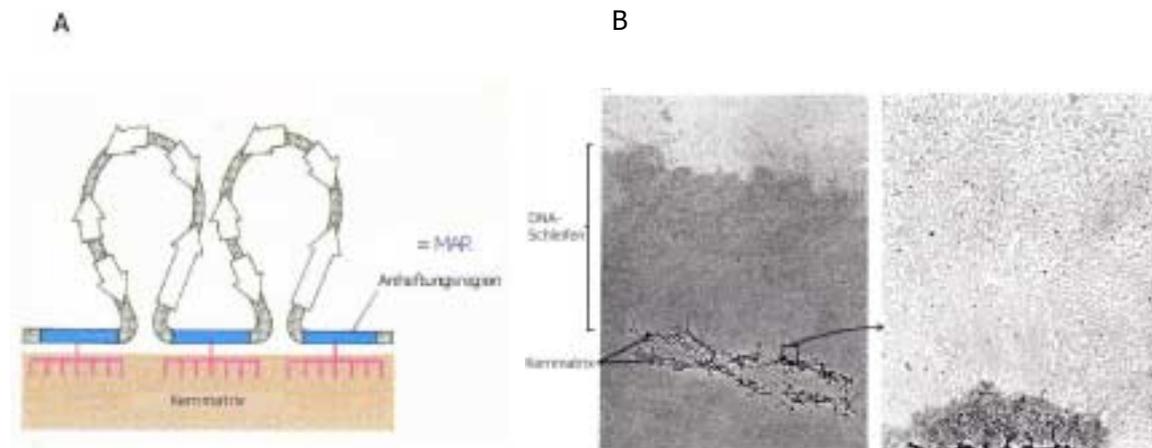


Abbildung 4: Die Organisation der DNA in DNA-Schleifen

A. Schematische Darstellung der Organisation der DNA in Schleifen, die an der Kernmatrix angeheftet sind. Die Pfeile stehen für einzelne Gene, die eventuell - soweit sie sich in einer Schleife befinden - gemeinsam reguliert werden könnten. Im Gegensatz zur Darstellung sind die DNA-Schleifen nicht gleich groß (Abbildung entnommen aus Mathews & van Holde: Biochemistry (1990) the Benjamin Cummings Publishing Company Inc.).

B. Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Metaphasenchromosoms aus HeLa-Zellen nach Entfernung der Histone (entnommen aus PAULSON und LAEMMLI, 1977). Zu sehen sind links die DNA-Schleifen und das Nucleoskelet-Proteingerüst, davon rechts ein Ausschnitt in größerer Vergrößerung, der zeigt, daß die DNA-Schleifen an der Proteinmatrix angeheftet sind.

Es existieren bereits Nachweise für MARs in vielen codierenden Genregionen in einer großen Bandbreite von eukaryotischen Zellen (z.B. GASSER et al., 1989; LAEMMLI et al., 1992). Ein Vergleich der gefundenen MARs zeigt, daß keine eindeutige Sequenzähnlichkeit zwischen einzelnen MARs existiert; typischerweise bestehen sie aus einer ca. 0,3 – 1 kb großen Region einer AT-reichen Sequenz, enthalten zwei oder mehr Kopien des ATATTT-Motivs und enthalten Topoisomerase II-Bindungsstellen (MIRKOVITCH et al., 1984; GASSER und LAEMMLI, 1986; BODE und MAASS, 1988; DIJKWEL und HAMLIN, 1988; LEVY-WILSON, 1990). Zudem existiert oft eine kurze Sequenz, die das Potential besitzt, sich unter superhelicaalem Streß zu entpaaren (COCKERILL et al., 1987; BODE et al., 1992). Häufig sind sie in Introns zu finden (COCKERILL und GARRARD, 1986; COCKERILL et al., 1987; KÄS und CHASIN, 1987; JARMAN und HIGGS, 1988; ROMIG et al., 1994; ROLLINI et al., 1999). Sie enthalten häufig verstreut repetitive Sequenzen, wie z.B. Elemente aus der LINE- oder SINE-Familie (SYKES et al., 1988; CHONG et al., 1995; STRISSEL et al., 1998; ROLLINI et al., 1999). Allerdings sind MARs eher dynamische als statische Interaktionen zwischen DNA und Matrix. Es gibt permanente und transiente MARs. Die transienten MARs treten bei der Transkription und Replikation der DNA auf, verschwinden am Ende dieser Prozesse jedoch (BEREZNEY und COFFEY, 1975; JACKSON und COOK, 1985). Permanente MARs existieren in allen Zellen, auch solchen, die völlig replikations- oder transkriptionsinaktiv sind (RAZIN et al., 1986; GEORGIEV et al., 1991). Zudem finden sich MARs in näherer Umgebung oder an den Replikationsursprüngen (RAZIN et al., 1986). MARs können auch durch

Histonmodifikationen, welche die nukleosomale Struktur verändern, beeinflußt werden (KLEHR et al., 1992).

Sinn und Zweck der Anheftung der DNA in Schleifen an der Kernmatrix ist zunächst sicherlich die Kompaktierung der DNA um den ca. 700fachen Faktor (PIENTA et al., 1991). Durch die Bildung der DNA-Schleifen werden unabhängige, topologisch zusammengefaßte Chromatineinheiten gebildet, welche die Transmission der Topologie von einer Chromatindomäne zur nächsten verhindern. Somit ist jede Domäne von den Regulationsmechanismen zur Transkription und Replikation der Nachbardomänen isoliert und unabhängig (z.B. FERNANDES und CATAPANO, 1995). MARs könnten damit Domänengrenzen darstellen, die funktionelle Chromatineinheiten voneinander trennen (KELLUM und SCHEDL, 1991). Ein experimenteller Hinweis dafür ist, daß sie die Expression von Reportergenen durch Bildung einer Domäne verstärken und dadurch von Effekten benachbarter Domänen abschirmen (ALLEN et al., 1993a; ALLEN et al., 1993b). Zudem könnten sie an der H1-abhängigen Öffnung des Chromatins beteiligt sein, indem sie die Ablösung des H1 vom Chromatin durch Interaktionen z.B. mit HMG-I/Y erleichtern (KÄS et al., 1993; POLJAK et al., 1994), und damit auch bei der H1-abhängigen Kondensation und Dekondensation des Chromatins mitwirken (KÄS et al., 1993; ZHAO et al., 1993). Dem aktuellen Modell der DNA-Schleifen zufolge hängen die Zelltyp- und Differenzierungs-abhängige Genexpression und die zeitliche Abstimmung der Replikation von der Organisation des Chromatins in DNA-Schleifen ab, die an der Kernmatrix angeheftet sind.

1.2.1.4 DER AUFBAU DER KERNMATRIX

Die Kernmatrix definiert die Gestalt des Kerns und ist strukturelle Grundlage für Prozesse wie DNA-Replikation, Transkription und Reparatur (PIENTA et al., 1991). Die Kernmatrix ist definiert als die Kernstruktur, die nach Salzextraktion von Nuklease behandelten Kernen - und damit Extraktion der Histone - zurückbleibt. Untersuchungen der nuklearen Matrix haben ergeben, daß diese aus Nukleoli, dem Kern-Poren-Lamin-Komplex und der sog. internen Kernmatrix zusammengesetzt ist (BEREZNEY und COFFEY, 1974; BEREZNEY, 1991).

Die Proteine der Kernmatrix können nach BOULIKAS (1995) in verschiedene Gruppen eingeteilt werden: (1) Transkriptionsfaktoren mit stringenter DNA-Sequenzspezifität wie Myb, Myc, RFP, C/EBP, AP-1, Sp1 und NMP-1 (ATF) (2) DNA-bindende Proteine, die nicht stringent sequenzspezifisch sind, sondern wie die Topoisomerase II, das Histon H1, das Lamin B1, SAF-A (Scaffold Attachment Factor A) und ARBP (Attachment Region Binding Protein) fähig sind, zwischen MAR- und nicht-MAR-DNA zu unterscheiden. Diese Proteine benötigen zur Erkennung der MAR-DNA eine Mindestlänge von 240 bis 350 bp. Sie können die Schleifenbildung zwischen zwei auseinanderliegenden MARs verursachen. Sie bevorzugen AT-reiche Sequenzen, kommen abundant vor und können auch die MAR-DNA verschiedener Gene erkennen (3) Enzyme des Kerns wie DNA-Polymerasen, Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), Histon-Deacetylasen (4) Matrixadaptoren, die nicht mit der MAR-DNA interagieren, jedoch mit anderen Proteinen der Matrix, z.B. dem RB (Retinoblastom). Sie können zur Bildung großer Komplexe führen und eine Funktion der

Überbrückung der verschiedenen regulatorischen MARs ausüben (5) Strukturproteine wie z.B. Aktin, Fodrin, Gelsolin.

Allerdings gibt es auch Argumente gegen die Existenz einer Kernmatrix (aktuell diskutiert in PEDERSON, 2000) und damit auch gegen die Anheftung von DNA-Schleifen an diese Matrix. Ein weiteres Modell der Kompaktierung der DNA basiert auf einer helicalen Windung der Chromatinfaser, gefolgt von helicaler Faltung in eine resultierende 250 nm Faser (SEDAT und MANUELIDIS, 1978; BELMONT et al., 1987; BELMONT et al., 1989; BELMONT und BRUCE, 1994; ROBINETT et al., 1996). Insbesondere die Existenz einer strikt radialen Symmetrie oder zentralen, durchgehenden Achse für die Anheftung der DNA-Schleifen, wie sie noch von PAULSON und LAEMMLI (1977), SEDAT und MANUELIDIS (1978) und GASSER und LAEMMLI (1986) postuliert wurde, wird immer unwahrscheinlicher. *In vivo* wird eine eher diffuse Organisation von DNA-Schleifen beobachtet, die an Nicht-Histon-Proteine gekoppelt sind. Zudem erscheint der Interchromatinraum in lebenden Zellen als sinusoidales, untereinander verbundenes System, das an die Chromatin-Konturen gebunden ist (KANDA et al., 1998; ZINK et al., 1998; BORNFLETH et al., 1999; MANDERS et al., 1999; POLITZ et al., 1999) und durch das sich die nukleäre RNA durch Diffusion bewegt (DANEHOLT, 1999).

1.2.2 FUNKTIONELLE BETRACHTUNG DES CHROMATINS

In den letzten Jahren hat sich das Bild vom Chromatin von einem zunächst recht starren, statischen Modell (THOMA et al., 1979; RICHMOND et al., 1993) in ein variables, dynamisches und funktionelles Modell verwandelt. Zellbiologische Ansätze zeigten die Kompartimentierung von bestimmten Histonvarianten und Modifikationen zu individuellen Chromosomen und Chromatin-Domänen (HEBBES et al., 1988; TURNER et al., 1992; GROSSBACH, 1995). Genetische Analysen deuteten spezialisierte Funktionen für individuelle Histon-Domänen an bestimmten chromosomalen Stellen an (GRUNSTEIN et al., 1995). Die biochemische Rekonstitution der Chromatinarchitektur zeigte, daß sie die Transkription aktivieren (SCHILD et al., 1993) oder unterdrücken kann (WOLFFE, 1989; CHIPEV und WOLFFE, 1992; HOWE et al., 1998). Dies führte zu der Erkenntnis, daß das Chromatin funktionell spezialisiert und strukturell heterogen ist. Die dynamische Qualität des Chromatins, die für die regulatorische Flexibilität von Prozessen wie Transkription, Replikation, Rekombination und Reparatur verantwortlich ist, rückte in den Brennpunkt der Forschung. Posttranslationale Modifikation der Histone durch Acetylierung der Lysin-Aminosäuren begünstigt die strukturelle Veränderung auf Mononukleosomenebene, die den Zugang zur DNA für Transkriptionsfaktoren erleichtern (NORTON et al., 1989; LEE et al., 1993; TSE, R. et al., 1996; VETTESE-DADEY et al., 1996). Die Fortbewegung der DNA- oder RNA-Polymerase durch das Chromatin verursacht eine Umlagerung der Histone an der DNA. Das Fehlen von H1 und H2A/H2B fördert die Mobilität der Nukleosomen und den Zugang von Transkriptionsfaktoren (CHIPEV und WOLFFE, 1992; HAYES und WOLFFE, 1992; PENNINGNS et al., 1994; URA et al., 1995; TSE, C. et al., 1998). Viele transkriptionale Aktivatoren besitzen Histon-Acetyltransferase-Aktivität (BROWNELL und ALLIS, 1996; BROWNELL et al., 1996; WOLFFE und PRUSS, 1996). Transkriptionale Repressoren rekrutieren Histon-Deacetylasen (TAUNTON et al., 1996; PAZIN

et al., 1997; WOLFFE et al., 1997). So können transkriptionelle Aktivatoren mit acetylierten Histonen (WINSTON und ALLIS, 1999) interagieren, während transkriptionale Repressoren an deacetylierte Histone assoziieren (EDMONDSON et al., 1996). Die Strukturen des aktiven und reprimierten Chromatins weisen sicherlich verschiedene Proteinzusammensetzungen auf; ihre Struktur ist jedoch unbekannt (WOLFFE und GUSCHIN, 2000). Daneben existieren noch Histonmodifikationen in Form von Phosphorylierung, Ubiquitynylierung und ADP-Ribosylierung, die ebenfalls weitere dynamische Aspekte mit ins Spiel bringen (zusammengestellt in WOLFFE und GUSCHIN, 2000).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Regulation der Genexpression ist die kovalente Modifizierung der DNA (KASS et al., 1997b). Das Genom eines adulten Vertebraten enthält 60 bis 90% methylierte Cytosine in den CpG-Dinukleotiden. Durch diese Modifizierung kann die Erkennung der Doppelhelix durch die transkriptionale Maschinerie sowie der strukturellen Proteine, die das Chromatin zusammensetzen, verändert werden (KASS et al., 1997a; NAN et al., 1997). DNA-Methylierung kann die Genaktivität sowohl lokal in Bezug auf einzelne Promotoren oder Enhancer, als auch über weite Strecken hinweg durch einen globalen Mechanismus beeinflussen (TATE und BIRD, 1993). So korreliert die Zunahme methylierter CpG-Dinukleotide mit der Transkriptionsinaktivierung ("Silencing") ganzer Chromosomen, Transgene und teilweise entwicklungsabhängig-regulierter Gene (LI, E. et al., 1993a; LI, E. et al., 1993b; SZYF, 1996). Alle diese Systeme üben epigenetische Effekte auf die Regulation der Transkription aus, in denen identische DNA-Sequenzen innerhalb desselben Zellkerns unterschiedlich verwendet werden. Durch die Methylierung werden diese Bereiche jedoch nicht nur transkriptions-inaktiv, sondern auch Nuklease-resistent (ANTEQUERA et al., 1989; ANTEQUERA et al., 1990). Dies weist auf eine veränderte Struktur des Chromatins in den methylierten Bereichen hin. So konnte nachgewiesen werden, daß individuelle Nukleosomen auf Basis methylierter DNA tatsächlich stabiler miteinander interagieren, als auf Basis unmethylierter DNA (KESHET et al., 1986).

1.3 DIE APOPTOSE-BEDINGTE DNA-FRAGMENTIERUNG DES CHROMATINS

Eine der ersten Erkenntnisse der Apoptose-Forschung war die Beobachtung, daß das Chromatin apoptotischer Zellen fragmentiert wird. Während inzwischen viel über die Signalwege der Apoptose von der Auslösung bis zum Einfluß hemmender und aktivierender intrazellulärer Moleküle in den verschiedensten Organismen bekannt ist, ist die Apoptose-bedingte Fragmentierung des Chromatins kaum erforscht. Es ist nachgewiesen, daß zwei verschiedene Größenordnungen von Fragmenten entstehen (hoch- und niedermolekulare Fragmente). Auch eine der verantwortlichen DNasen (CAD) ist identifiziert worden, doch die Regeln, nach denen das Chromatin während der Apoptose abgebaut wird, sind unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Fragmentierung des Chromatins während der Apoptose zu untersuchen, um Erkenntnisse über den Ablauf und die Zusammenhänge zwischen der Apoptose-bedingten Chromatinfragmentierung und der Chromatinstruktur zu gewinnen.

2 KONZEPT DER ARBEIT

Um ein geeignetes System zur Untersuchung der apoptotischen DNA-Fragmentierung zu finden, sollte zunächst die Auslösung der Apoptose in verschiedenen Zelllinien und mit unterschiedlichen Induktoren untersucht werden. Hierfür wurden Nachweismethoden für die Apoptose etabliert. In der Mehrzahl der Zelllinien entstehen während der Apoptose DNA-Fragmente in zwei verschiedenen Größenordnungen. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, in welcher zeitlichen Reihenfolge die sogenannten hoch- und niedermolekularen DNA-Fragmente entstehen und in welcher Beziehung diese Reihenfolge zu den morphologischen Veränderungen während der Apoptose steht. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen galt es, hypothetische bevorzugte apoptotische Schnittstellen in einer möglichst großen und genau bekannten Modellregion zu identifizieren. Als Modellregion diente der große Histongencluster auf dem menschlichen Chromosom 6 (ALBIG et al., 1997). Angeregt wurde diese Fragestellung durch die Identifizierung einer bevorzugten apoptotischen Schnittstelle in der Bruchpunktregion innerhalb des MLL-Gens (STANULLA et al., 1997), die mit vorher gefundenen Matrixanheftungsregionen in dieser Region (STRISSEL et al., 1998) in Beziehung gesetzt wurde. Daraus wurde die Hypothese entwickelt, daß die Spaltung in hochmolekulare DNA-Fragmente während der Apoptose bevorzugt an den Matrixanheftungsregionen der DNA-Schleifen stattfinden könnte. Aus diesem Grund sollte nach der Identifizierung bevorzugter apoptotischer Schnittstellen auch die Domänenstruktur des Histongenclusters aufgeklärt werden.

Nach den Untersuchungen am Beispiel des Histongenclusters war die Untersuchung des Fragmentierungsmusters ganzer Chromatinbereiche während der Apoptose von Interesse. Da das Genom aus Bereichen verschiedener Struktur und Funktionalität aufgebaut ist, war zu untersuchen, wie diese während der Apoptose fragmentiert werden. Zum einen sollte das Fragmentierungsverhalten codierender Regionen aktiver und nicht aktiver Gene mit nicht codierenden Regionen verglichen werden. Zum anderen war das Verhalten spezifischer Chromosomenbereiche wie Zentromer, Telomer, LINE- und SINE-Elemente zu untersuchen. Insbesondere sollte geklärt werden, ob bestimmte Bereiche früher oder später fragmentiert werden und ob einzelne Bereiche bevorzugt geschnitten werden, oder von der Fragmentierung ausgespart werden. Aus der Kinetik sowie der Ortsspezifität der apoptotischen DNA-Fragmentierung in verschiedenen Chromatinregionen sollten Aussagen über den Zusammenhang zwischen der Chromatinstruktur und der apoptotischen DNA-Fragmentierung gewonnen werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 GERÄTE

Firma AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (Freiburg)

Photometer RNA/DNA-Kalkulator GeneQuant II, Photometer ULTROSPEC 4050

Firma BERTHOLD (Wildbad)

Geigerzähler LB122

Firma BIOMETRA (Göttingen)

Rotaphor R23

Firma EPPENDORF (Hamburg)

Tischzentrifuge 5415

Firma HERAEUS (Hanau)

Biofuge pico, Brutschrank cytoperm 2, Brutschrank Typ B5050, Megafuge 1.0, Sterilbank HERAsafe Typ 18/2, Varifuge 3.OR

Firma HERAEUS SEPATECH (Osterode)

Zytopsystem

Firma KENDRO (Hanau)

Kühlzentrifuge SORVALL® Superspeed RC2-B

Firma NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO. INC (Edison, New Jersey, USA)

Brutschrank Model CO 24, Kulturschüttler Incubator Shaker Model G 25

Firma MOLECULAR DYNAMICS

PhosphorImager

Firma PERKIN ELMER (APPLIED BIOSYSTEMS) (Weiterstadt)

Thermocycler TC 2, DNA-Sequencer Modell 373

Firma PHILIPS (Hamburg)

Szintillationszähler PW4700

Firma SAVANT (Holbrook, NY, USA)
Kühlfalle RVT 100, Speed Vac SC 100

Firma SCHÄRFE SYSTEM (Reutlingen)
elektronisches Zellzählgerät CASY 1 TT

Firma UVP (San Gabriel, Kalifornien, USA)
UV-Schirm Transilluminator Modell TM40

Firma VACUUBRAND (Wertheim)
Vakuumpumpe Typ RZ 5, Vakuumpumpe Typ RD 4

3.1.2 CHEMIKALIEN

Firma AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH (Buckinghamshire, GB)
5´[γ ³²P]-ATP (wäßrige Lösung, spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml)
5´[α ³²P]-dCTP (wäßrige Lösung, spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol; 10 mCi/ml)
Dextransulfat, Rapid-hyb Hybridisierungspuffer, Hybridisierungspuffer in Tablettenform RPN131

Firma BECKMAN Coulter Euro Diagnostics (Krefeld)
Isoton

Firma BIOCHROM (Berlin)
DMEM, FCS, HAM´ s F12, MEM, UPMI 1640

Firma BIOMOL (Hamburg)
BCIP, DTT, IPTG, NBT, Phenol (TE gesättigt), X-gal

Firma BIORAD (München)
AG 501-X8 Resin, Bromphenolblau, DNA-Größenstandard Lambda-Leiter

Firma BOEHRINGER (Mannheim)
Aprotinin, ATP, BCIP, dNTPs, Leupeptin, NBT, Pepstatin

Firma BRISTOL-MYERS SQUIBB (München)
Teniposid-Infusionslösung, Teniposid-Reinsubstanz

Firma CALBIOCHEM (Bad Soden)

Propidiumiodid

Firma DIFCO (Detroit, USA)

Bacto-Agar, Bacto-Hefeextrakt, Bacto-Trypton, Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base

Firma FLUKA (Neu-Ulm)

Aphidicolin, DMSO, Formamid sowie die verwendeten Aminosäuren

Firma GIBCO/BRL (Karlsruhe)

Agarose, FCS, LMP-Agarose, Penicillin/Streptomycin, Trypsin

Firma MERCK (Darmstadt)

Ammoniumacetat, Borsäure, Calciumchlorid, Chloroform, Coomassie Brilliant Blue R-250, Dinatriumhydrogenphosphat, EGTA, Ethanol, Giemsa-Farbstofflösung, Glucose, Formaldehyd, Isoamylalkohol, Isopropanol, Kaisers Glyzeringelatine, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Lithiumchlorid, Magnesiumacetat, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumcitrat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Salzsäure, Trichloressigsäure

Firma PEQLAB (Erlangen)

peq Gold Agarose

Firma PHARMACIA (Freiburg)

Ficoll™, Nick™-Säulen Sephadex G-25

Firma RATIOPHARM (Ulm)

Ampicillin (Binotal®)

Firma R&D SYSTEMS (Wiesbaden)

Rekombinantes, humanes TNF- α

Firma ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)

dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Firma ROTH (Karlsruhe)

Aceton, 30% (w/v) Acrylamid-0,8% (w/v) Bisacrylamid-Stammlösung, Dimethylformamid, Essigsäure, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Tris

Firma SERVA (Heidelberg)

APS, 2-Mercaptoethanol, EDTA, Glycerin, HEPES, Lactatsäure, Magnesiumchlorid, Maltose, Methanol, NP-40, Paraformaldehyd, PMSF, PVP, Saccharose, SDS, Spermidin, Spermin, TCA, TEMED

Firma SIGMA (München)

Benzamidin, BSA, DAPI, Ethidiumbromid, MOPS, N-Lauroylsarkosin, PIPES, Ponceau S, Thimerosal, Triton X-100, Tween-20

Firma SMITHKLINE BEECHAM (München)

Topotecan

3.1.3 REAGENZIENSÄTZE

Firma AMERSHAM (Braunschweig)

Rediprime Random-Prime-Labeling-Kit

Firma MILTENYI BIOTEC (Bergisch-Gladbach)

MACS Apoptotic-Cell-Isolation-Kit

Firma PERKIN ELMER (Weiterstadt)

ABI PRISM™ Big-Dye™-Terminator-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kit mit Ampli-Taq® DNA-Polymerase FS

Firma PHARMINGEN (San Diego, USA)

APO-BrdU™-Kit

Firma PROMEGA (Madison, USA)

pGEM-T Vektor-System I

Firma QIAGEN (Hilden)

QIAEX® II Agarose-Gel-Extraktions-Kit, Qiagen Blood & Cell-Culture-DNA-Kit, Qiagen Midi-Plasmid-DNA-Isolierungs-Kit, QIAquick-PCR-Produkt-Aufreinigungs-Kit

3.1.4 ENZYME

3.1.4.1 RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Firma MBI FERMENTAS (Vilnius, Litauen)

Eco RI, *Hind*III, *Mlu*I

Firma NEW ENGLAND BIOLABS (Schwalbach)

Bam HI, BstE II, Eco RI, FspI, NcoI NotI, PvuII, SacII, SmaI, SpeI

Firma TAKARA (Otsu, Shija, Japan)

PstI

3.1.4.2 DNA-MODIFIZIERENDE ENZYME

Firma BOEHRINGER (Mannheim)

Nuklease S7 aus *Staphylokokkus aureus* (Mikrokokkus-Nuklease)

Firma ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm), T4-DNA-Ligase

Firma MBI/FERMENTAS (Vilnius/Litauen)

T4-Polynukleotidkinase

Firma SIGMA (München)

Red Taq™ Polymerase

3.1.4.3 SONSTIGE ENZYME

Firma BOEHRINGER (Mannheim)

Proteinase K

Firma ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)

RNase A (aus Rinderpankreas)

Firma SIGMA (München)

Lysozym (aus Hühnereiweiß)

3.1.4.4 ANTIKÖRPER

Firma BIOMOL (Hamburg)

Anti-APO/Fas-Antikörper

Erstantikörper

Firma ROCHE DIAGNOSTICS (Mannheim)

Anti-Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, polyklonales Serum vom Kaninchen
Firma QIAGEN (Hilden)
Anti-Tetra-His-Antikörper

Zweitantikörper

Firma DIANOVA (Hamburg)
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, alkalische Phosphatase konjugiert

Firma SIGMA (München)
Anti-Maus IgG, alkalische Phosphatase konjugiert

3.1.5 LÖSUNGEN UND PUFFER

Aminosäure-Mix^{-Leu} (10 x)

Je 200 µg/ml Adenin, Arginin, Isoleucin, Histidin, Lysin, Methionin, Tryptophan, Uracil, 500 µg/ml Phenylalanin, 1,5 mg/ml Valin, 300 µg/ml Tyrosin, gelagert bei -20°C

Ampicillin Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin in A. bidest, sterilfiltriert

APS-Stammlösung

10% (w/v) Ammoniumpersulfat in A. bidest, Aufbewahrung bei -20°C

Kalziumchlorid-Lösung

50 mM CaCl₂ in A. bidest

Cycloheximid-Stammlösung

25 mg/ml Cycloheximid in Ethanol

DAPI-Einbettmedium

10% (v/v) PBS, 90% (v/v) Glycerin, 1 mg/ml Phenylendiamin, 1 µg/ml 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)

Denaturierungspuffer

1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH in A. bidest

EDTA-Lösung

500 mM EDTA in A. bidest, pH 8,0

EGTA-Lösung

500 mM EGTA in A. bidest

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml Ethidiumbromid in A. dest

Etoposid-Stammlösung

50 mM in DMSO

Formamid, deionisiert

500 ml Formamid wurden für 30 min mit 50 g AG 501-X8 Resin im Abzug gerührt, über einen Faltenfilter filtriert und bei -20°C gelagert

Kernpuffer

150 mM NaCl, 2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$, pH 6,4, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl_2

Lysispuffer

10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,5, 25 mM EDTA, 10% (w/v) Lauroylsarkosin, 2 mg/ml Proteinase K

Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym in A. bidest, frisch angesetzt

MOPS-Puffer (10 x)

200 mM MOPS, pH 7,0, 30 mM NaAc, 10 mM EDTA

Natriumacetat

3 M NaAc, pH 4,8

Neutralisierungspuffer

1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,2, 1 mM EDTA

Phosphate Buffered Saline (1 x PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 , pH 7,4

PMSF-Stammlösung

0,1 M PMSF in Isopropanol, Lagerung bei 4°C

Proteinase-K-Stammlösung

10 mg/ml in A. bidest, Lagerung bei -20°C

10 x Reaktionspuffer für Alkalische Phosphatase (ROCHE DIAGNOSTICS)

0,5 M Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA

10 x Reaktionspuffer für T4-DNA-Ligase (ROCHE DIAGNOSTICS)

50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl_2 , 20 mM DTT, 1 mM ATP

10 x Reaktionspuffer für RedTaq-Polymerase

100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 11 mM MgCl_2 , 0,1% Gelatine

10 x Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (MBI FERMENTAS)

Rot: 100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 100 mM MgCl_2 , 1000 mM KCl

10 x Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (NEW ENGLAND BIOLABS)

NEB2: 100 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM MgCl_2 , 500 mM NaCl, 10 mM DTT

NEB3: 500 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM MgCl_2 , 1000 mM NaCl, 10 mM DTT

NEB4: 200 mM Tris-Essigsäure, pH 7,9, 100 mM Mg-Acetat, 500 mM K-Acetat, 10 mM DTT

10 x Reaktionspuffer für Restriktionsendonukleasen (TaKaRa)

Puffer H: 500 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 1000 mM NaCl

RNase A-Stammlösung (DNase-frei)

10 mg/ml RNase, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 15 mM NaCl, 20 min auf 95°C erhitzt, langsam auf RT abgekühlt und bei -20°C gelagert

SDS-Stammlösung (10%)

10 g/100 ml A. bidest

SSC-Puffer (20 x)

3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat

Stripping-Lösung

0,1% SDS in A. dest, kochend

TAE-Puffer (10 x)

0,5 M Tris-Base, pH 7,8 mit HAc, 0,2 M Na-Acetat, 20 mM EDTA

TBE-Puffer (10 x)

0,9 M Tris-Base, pH 8,3, 0,9 M Borsäure, 25 mM EDTA

TE-Puffer (10 x)

100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0

TELT-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 4% (v/v) Triton X-100

Teniposid-Stammlösung

1 mg/ml in DMSO bzw. Ethanol

Thimerosal-Lösung zum Lagern der Membranen

0,01% Thimerosal in 2 x SSC

TNF- α -Stammlösung

5 μ g/ml in PBS mit 0,1% BSA

Topotecan-Stammlösung

1 mg/ml in A. bidest

Tris-HCl

10 mM Tris-HCl, pH 8,5

Trypsin-EDTA (1 x)

0,05% (w/v) Trypsin, 0,53 mM EDTA in 1 x PBS

Waschpuffer 1

2 x SSC, 0,1% SDS in A. dest

Waschpuffer 2

0,2 x SSC, 0,1% SDS in A. dest

3.1.6 MEDIEN**3.1.6.1 NÄHRMEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN****LB-Medium**

1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,2% (w/v) Maltose, der pH wurde mit 10 N NaOH auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Für Dauerkulturen wurden 0,5 ml einer

frisch in LB-Medium gewachsenen Übernachtskultur mit 0,5 ml sterilem Glycerin vermischt und bei -20°C aufbewahrt.

LB-Agar-Platten

Dem LB-Medium wurde vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto-Agar zugegeben. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde dem Medium sterilfiltriertes Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt und das Medium in Petrischalen gegossen.

3.1.6.2 NÄHRMEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON HEFEN

SCD^{-Leu}-Medium

1 x Aminosäuremix^{-Leu}, 0,67% (w/v) Yeast Nitrogen Base, 4% (w/v) Glucose, der pH wurde auf einen pH zwischen 5,0 und 6,0 eingestellt.

SCGL^{-Leu}-Medium

6,75 g/l Yeast Nitrogen Base, 0,1% (w/v) Glucose, 3% (v/v) Glycerol, 2% (w/v) Lactatsäure, 100 ml/l 10 x Aminosäuremix ohne die Aminosäure Leucin, der pH wurde auf einen Wert zwischen 5,0 und 6,0 mit NaOH-Plätzchen eingestellt.

YPGLA-Medium

1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Pepton, 0,2 % (w/v) Glucose, 3% (v/v) Glycerol, 2% (v/v) Lactatsäure, 0,002% (w/v) Adenin, der pH wurde mit NaOH-Plätzchen auf einen Wert zwischen 5,0 und 6,0 eingestellt und das Medium sofort autoklaviert.

3.1.6.3 NÄHRMEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

RPMI-Medium

10,42 g Fertigpulver mit L-Glutamin, 15 mM HEPES, 24 mM NaHCO₃ pH 7,4, A. bidest ad 5 l zur Kultivierung von HL60, CEM, K562 und U937-Zellen

DMEM-Medium

66,9 g Fertigpulver, 18,5 g NaHCO₃, pH 7,4, A. bidest ad 5 l zur Kultivierung von 293-Zellen

MEM-Medium

47,6 g Fertigpulver Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen, 11,25 g NaHCO₃, 11,9 g HEPES, pH 7,4, A. bidest ad 5 l zur Kultivierung von HeLa-Zellen

HAM's F12-Medium

53,45 g Fertigpulver, 5,875 g NaHCO₃, pH 7,4, A. bidest ad 5 l zur Kultivierung von HeLa S3 Zellen

Die Medien wurde jeweils vor Gebrauch mit 10% (v/v) inaktiviertem FCS komplettiert und z.T. mit 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (1 U=1 µg/ml) versetzt. Das FCS wurde vor Gebrauch nach Auftauen 30 min bei 56°C inaktiviert und bei -20°C gelagert, die Medien sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

3.1.7 OLIGONUKLEOTIDE

Firma INTERACTIVA (Ulm)
(in HPLC-gereinigter Form)

Für die Sonde het266:

5'-CCA TTC CAT TCC ATT CCA TTC CAT TCC ATT-3'

Für die Sonde het405:

5'-GAA GAA GCT TTC TGA GAA ACT GCT TAG TG-3'

Für die Sonde LINE:

5'-CAT GGC ACA TGT ATACAT ATG TAA CWA ACC-3'

3.1.7.1 SEQUENZIER-PRIMER

Firma NEW ENGLAND BIOLABS (Bad Schwalbach)

universal 5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'

revers 5' GGA AAC AGC TAT GAC CAT G 3'

(Strang- und Gegenstrangsequenzierprimer der Vektoren pGEM-T und pUC19)

3.1.7.2 PCR-PRIMER

5'OAM1 5' TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GG 3'

3'OAM2 5' CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC TAA 3'

(Primer zur Amplifikation der Telomer-Repeat-Sonde)

5'OW 154 5' CAT CAC AAA GAA GTT TCT GAG AAT GCT TC 3'

3'OW 155 5' TGC ATT CAA CTC ACA GAG TTG AAC CTT CC 3'

(Primer zur Amplifikation der Sau3A-Repeat-Sonde)

DXS10F: 5'-ACC TTG ATC TTT CAC CTA TGG CTG-3'

DXS10R: 5'-CAC ATT CAG ACT TCC TCA GGG ACA-3'

(Primer zur Amplifikation des HPRT-Bereichs)

DXS86F: 5'-TGA CAC CAT TTA CCT AAT GCA C-3'

DXS86R: 5'-GTT GCA GAG GCA CGA TTG GAA CT-3'

(Primer zur Amplifikation des HPRT-Bereichs)

OTE1: 5'-GTC AGC TGC TGG AGT GTA ATA AGT GC-3'

OTE2: 5'-GTG GAT CCA CAG CTC TTA CAG GGA AC-3'

(Primer zur Amplifikation des MLL-bcr-Bereichs. Der Primer enthält eine Schnittstelle für *Pvu* II (OTE1) bzw. *Bam* HI (OTE2), diese ist fettgedruckt.)

3.1.8 GRÖSSENSTANDARDS

Für die Pulsfeldgelelektrophorese:

- YAC-WAY-4A (eigene Präparation, vgl. 3.2.11.3.3)
- λ -Phagen-Konkatemere (BioRad, München)
- λ -*HindIII* (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)

Für die konventionelle Agarose-Gelelektrophorese:

- λ -*Eco* RI/*HindIII* (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
- λ -*HindIII* (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
- pUC19 *Taq/Rsa* (Universität Göttingen, Abteilung Molekularbiologie)
- pSP64 *Hinf* (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen)
- 100 bp-Leiter/1 kb-Leiter (NEW ENGLAND BIOLABS, Schwalbach)

Für Proteingele:

- Proteinmarker (BioRad, München)

3.1.9 VEKTOREN

Firma AMBION (Austin, USA)

pTRIPLEscript™

Firma PROMEGA (Madison, USA)

pGEM-T

3.1.10 MIKROORGANISMEN

Firma CLONTECH (Palo Alto, USA)

Escherichia coli K12 Stamm DH5 α

Firma Promega (Madison, USA)

JM 109

3.1.11 ZELLINIEN

CLS (Heidelberg):

HL60: Akute myeloische Leukämie-Zelllinie, ATCC-Nummer CCL-240, wachsen in Suspension. Referenz: COLLINS et al., 1977

CEM: Akute lymphoblastische Leukämie-Zelllinie, ATCC-Nummer CCL-119 (CCRF), wachsen sowohl adhärent als auch in Suspension. Referenz: MCCARTHY et al., 1965

DSMZ (Braunschweig):

K562: Zelllinie aus dem Pleuraerguß einer 53-jährigen Frau mit chronischer myeloischer Leukämie im akuten Stadium, DSMZ ACC 10, wachsen in Suspensionskultur, exprimieren Hämoglobin. Referenz: LOZZIO und LOZZIO, 1975

U937: monoblastoide Zelllinie aus einem histiocytären Lymphom, in Suspensionskultur mit hoher Teilungsrate wachsend. DSMZ ACC 305. Referenz: SUNDSTROM und NILSSON, 1976

Jurkat: menschliche T-Zelllinie etabliert aus dem Blut eines 14-jährigen Jungen mit ALL (Akuter lymphatischer Leukämie). Referenz: SCHNEIDER et al., 1977

3.1.12 FOTOMATERIALIEN UND MEMBRANEN

Firma DUPONT (Bad Homburg)

Cronex Röntgenfilm

Firma KODAK (Rochester, USA)

Röntgenentwickler, Röntgenfixierer

Firma PALL (Dreieich)

Biodyne B Membran, Gene Screen™ Nylonmembran

Firma QIAGEN (Hilden)

QIAbrane Nylonmembran

Firma SCHLEICHER und SCHUELL (Dassel)

Filterpapier dick 2668, Faltenfilter diverser Größe

3.2 METHODEN

ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 ALLGEMEINE ARBEITSBEDINGUNGEN UND HINWEISE

Molekularbiologische Arbeiten der Sicherheitsstufe S1 wurden in einem dafür ausgewiesenen Labor nach den Richtlinien der Gentechnik-Sicherheits-Verordnung (GenTSV) von 1994 durchgeführt. Alle mit gentechnisch veränderten Organismen in Kontakt gekommenen Gegenstände wurden autoklaviert (120°C, 1,5 h, 1 bar). Medien und Puffer wurden mit bidestilliertem H₂O angesetzt und - soweit notwendig - autoklaviert oder sterilfiltriert.

3.2.2 KULTUR VON BAKTERIENSTÄMMEN

3.2.2.1 ZELLANZUCHT IN FLÜSSIG- UND FESTKULTUR

Die **Anzucht** von *E. coli* Stämmen erfolgte in LB-Medium bei 37°C. Für eine Übernachtskultur wurden 3 ml Medium in einem Reagenzglas steril mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 200 bis 250 UpM geschüttelt. 100 ml Kulturen wurden mit 100 µl Zellsuspension aus einer Vorkultur in einem Schikanekolben angeimpft. Stämme mit Antibiotika-Resistenz wurden immer unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums (Selektionierung auf Plasmide mit Ampicillin, auf Cosmide mit Kanamycin) in einer Endkonzentration von 20 µg/ml angezogen. Die Flüssigkultur wurde bei einer Trübung, die einer optischen Dichte der Kultur von 0,6 bis 0,9 OD₆₀₀ entsprach, geerntet oder entsprechend dem verwendeten Protokoll weiterverarbeitet.

Für **Festkulturplatten** wurden pro Liter LB-Medium 15 g Agar zugesetzt. Die Zugabe eines Antibiotikums erfolgte, nachdem das Medium nach dem Autoklavieren auf ca. 50°C abgekühlt war. Das noch flüssige Medium wurde in sterile Petrischalen gegossen und bei RT erstarren lassen. Anschließend wurden die Platten bei 37°C im Brutschrank getrocknet und waren dann bei 4°C lagerbar.

Zudem wurden **β-Gal-Farbindikatornährböden** verwendet. Zur Herstellung der Farbindikatornährböden wurden LB_{amp}-Platten angewärmt und zunächst mit 35 µl X-Gal-Lösung (20 mg/ml in DMF) bestrichen, diese gut trocknen gelassen und danach mit 35 µl 0,1 M IPTG-Lösung (in A. bidest) bestrichen.

Diese Indikatornährböden wurden benutzt, um in darauf ausgesäten *E.coli*-Kulturen nach plasmidtragenden Kolonien mit intaktem β-Galaktosidase-Gen zu suchen. Kolonien, die ein entsprechendes Plasmid aufgenommen hatten und deren Gen intakt war, exprimierten dieses Enzym, das die zugesetzten Substrate IPTG und X-Gal umsetzte und die jeweilige Kolonie dadurch blau anfärbte.

3.2.2.2 HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN

Als Kompetenz wird die Fähigkeit eines Bakteriums bezeichnet, DNA aufzunehmen. Die natürliche Kompetenz von Bakterien ändert sich mit dem physiologischen Zustand der Zelle und ist in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase am höchsten, sinkt danach aber rasch auf ein Minimum ab (SCHLEGEL, 1985). Durch CaCl_2 -Induktion wird die Fähigkeit der Bakterien, unverpackte DNA aufzunehmen, stark gesteigert. Sie bleibt für Monate bei eingefrorenen Bakterien (-70°C) erhalten (MANDEL und HIGA, 1970). Der Vorgang der DNA-Aufnahme wird als Transformation bezeichnet.

Um Bakterien kompetent zu machen, wurde ein Aliquot *DH5 α* -Zellen in 5 ml LB-Medium über Nacht unter Schütteln (200 UpM) bei 37°C kultiviert. Um die optimale Wachstumsphase der Zellen zur Kompetenzinduktion zu erreichen, wurde 1 ml der Bakteriensuspension anschließend mit 100 ml LB-Medium versetzt und nochmals bei 37°C für einige Zeit inkubiert. In dieser zusätzlichen Proliferationszeit der Bakterien wurden Proben entnommen, um die Dichte der Bakterienkultur durch Messung der Extinktion im Spektralphotometer (Ultraspec[®]3000, PHARMACIA, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm zu bestimmen. Wurde eine OD_{600} von 0,6 bis 0,9 gemessen, hatten sich die Bakterien soweit vermehrt, daß die folgenden Schritte zur Kompetenzinduktion eingeleitet werden konnten. Zuerst wurde eine 30 min Inkubation auf Eis durchgeführt. Die gekühlte Bakteriensuspension wurde anschließend zentrifugiert (4.000 x g, 10 min, 4°C) und das Bakteriensediment wurde in 25 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung aufgenommen. Diese Suspension wurde für weitere 30 min auf Eis inkubiert und ein weiterer Zentrifugationsschritt (4.000 x g, 10 min, 4°C) schloß sich an. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 5 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung aufgenommen, vorsichtig gemischt und für mehrere Stunden auf Eis gestellt. Nach Zugabe von Glycerin in einer Endkonzentration von 15% (v/v) wurden die Bakterien sofort aliquotiert (100 μl /Reaktionsgefäß) und die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die aliquotierten, kompetenten Zellen konnten dann bei -70°C für Monate gelagert werden.

3.2.2.3 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Bei dieser Methode wird zirkuläre DNA zur Amplifikation in kompetente Zellen eingeschleust.

100 μl kompetente Zellen wurden mit dem Ligationsansatz (vgl. 3.2.12.3) für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurde der Transformationsansatz einem Hitzeschock (durch 2 min Inkubation bei 42°C im Wasserbad) ausgesetzt und sofort auf Eis abgekühlt (ca. 5 min). Die Anwesenheit der positiv geladenen Calcium-Ionen neutralisiert dabei die negativen Ladungen der DNA und der Lipopolysaccharide der Bakterienmembran, so daß die Aufnahme der DNA in die Zelle erleichtert wird. Nach Zugabe von 300 μl LB-Medium folgte eine 60 bis 90 min Inkubation bei 37°C zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz. Der Transformationsansatz wurde dann mit einem Drigalskispatel auf einer angewärmten LB_{amp} -Agarplatte ausgestrichen und 12 bis 16 h bei 37°C bebrütet. Die eingesetzte Vektoren besitzen ein β -Lactamase-Gen aus *E. coli*. Nur Bakterien, die einen Vektor aufgenommen haben, sind damit in die Lage versetzt, auf

Ampicillin-behandelten Agarplatten wachsen zu können. Die in den Bakterien enthaltene DNA wurde später isoliert und analysiert (vgl. 3.2.11.1).

3.2.2.4 ANLEGEN VON DAUERKULTUREN

Um Bakterienkulturen länger aufbewahren zu können, wurden Glycerinkulturen angelegt, in denen Bakterien bei -20°C über Jahre lebensfähig bleiben. Eine Glycerinkultur besteht aus Bakteriensuspension mit einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,9 und 50% (v/v) Glycerin.

3.2.3 KULTUR MENSCHLICHER ZELLINIEN

Alle Arbeiten mit Zellkulturen fanden unter den sterilen Bedingungen einer Sicherheits-Arbeitsbank mit sterilen Lösungen und Arbeitsgeräten statt, welche ausschließlich für die Arbeit mit Zellkulturen genutzt wurden.

Menschliche Zelllinien lassen sich in adhärent wachsende Zelllinien und Suspensionszellen unterteilen. Adhärente Zelllinien wachsen als Monolayer auf dem Boden der Kulturflasche. Die Anheftung ist für ihre Proliferation notwendig. Die meisten Zelllinien, die von Geweben abstammen (mit Ausnahme von Blutzellen) sind adhärent wachsende Zellen. Suspensionszellen wie z.B. Leukämiezelllinien leben und proliferieren ohne Anheftung. Viele Tumorzelllinien sind unsterblich und können als kontinuierliche Zelllinie kultiviert werden. Für die Kultivierung werden dem Medium 10% FCS zugesetzt. Die genaue Zusammensetzung des Serums ist nicht bekannt; es enthält Wachstums- und Anheftungsfaktoren, die für das Überleben der Zellen notwendig sind.

Die menschlichen adhärent wachsenden Zelllinien (CEM (RPMI), HeLa (MEM), HeLa S3 (HAM's F12), 293-Zellen (DMEM)) wurden in 650 ml-Kulturflaschen (entspricht 175 cm² Bodenfläche) mit 50 - 100 ml des jeweiligen mit 10% FCS komplettierten Mediums bei 37°C, 21% O₂, 5% CO₂ und 96% rH kultiviert.

Die in Suspensionskultur wachsenden Zelllinien U937, K562 und HL60 wurden in Zelldichten von 2 bis 10 x 10⁵ Zellen/ml in komplettiertem RPMI-Medium ebenfalls in 650 ml-Kulturflaschen in einem Mediumvolumen von 100 bis 160 ml kultiviert.

3.2.3.1 INAKTIVIEREN VON FCS

Die bei -20°C gelagerten Fötalen Kälberseren (FCS) wurden über Nacht bei 4°C aufgetaut, im Wasserbad bei 56°C für 45 min inaktiviert, steril aliquotiert und bei -20°C bis kurz vor Gebrauch gelagert. Im Kühlschrank gelagertes FCS bzw. komplettiertes Medium läßt sich bis zu etwa einer Woche verwenden.

3.2.3.2 AUFTAUEN VON ZELLEN

Die in flüssigem Stickstoff in Kryoröhrchen à 0,5 ml eingefrorenen und gelagerten Zellen konnten – nach Abspülen mit Methanol (100%) zur Verhinderung etwaiger Mykoplasmen-Kontamination - durch schnelles Auftauen bei 37°C in einem Wasserbad revitalisiert werden und wurden danach sofort in 10 ml frisches Kulturmedium überführt. Durch Zentrifugation bei 300 x g für 5 min und Abnahme des Überstands wurde das im Einfriermedium enthaltene DMSO entfernt. Nachfolgend wurden die Zellen in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml bei Suspensionszellen bzw. $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm² bei adhärenenten Zellen in geeignete Kulturgefäße ausgesät. Insbesondere HL60-Zellen und CEM-Zellen zeigten nach dem Auftauen eine Phase von knapp einer Woche, in der sie zunächst langsam wuchsen und im CASY-Zellzählgerät keine einheitliche Größenverteilung und viele tote Zellen zeigten. Nach einer Woche in Kultur zeigten sie jedoch das gewohnte Bild.

3.2.3.3 EINFRIEREN VON ZELLEN

Zur Gefrierkonservierung wurden logarithmisch wachsende Zellen sedimentiert und in Kulturmedium mit auf 20% erhöhten FCS-Gehalt und 10% DMSO-Anteil in einer Dichte von ca. 5×10^6 Zellen/ml aufgenommen. Nach einer Lagerung bei -70°C für 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und konnten so über Jahre gelagert werden.

3.2.3.4 PASSAGIEREN VON ZELLEN

3.2.3.4.1 ZELLEN IN SUSPENSIONSKULTUR

Zur Teilung der Suspensions-Zellkulturen wurden diese bei 300 x g für 7 min sedimentiert und in einem zehnfachen des Kulturvolumens (minimale Dichte nach Teilung: 100.000 Zellen/ml) vor der Teilung aufgenommen. Nach einer Passagenzahl von ca. 20 Passagen wurden die Zellen verworfen und neue aus der Gefrierkultur herangezogen.

3.2.3.4.2 ADHÄRENTE ZELLEN

Nach 2 bis 3 Tagen waren die Zellen zu 80 bis 90% konfluent und wurden durch **Abschaben** mit einem Zellkulturschaber oder Trypsinbehandlung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und mit frischem Medium 1:3 bis 1:5 verdünnt.

Zur Teilung der Zellen durch **Trypsinbehandlung** wurde das Kulturmedium abgesaugt, anhaftende Serumreste durch Waschen mit PBS beseitigt und die Zellen mit einem geringen Volumen Trypsin-EDTA-Lösung vollständig überschichtet. Nach 1 bis 2 min Inkubation bei 37°C wurden die Zellen von der Kunststoffoberfläche abgeklopft und – nach mikroskopischer Überprüfung der Vollständigkeit der Ablösung - in 20 ml frischem Kulturmedium aufgenommen. In der erhaltenen Lösung wurde die Zelldichte

bestimmt und die Zellen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in 20 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden bei 300 x g, 7 min sedimentiert, der Überstand verworfen und der Zellschlag in frischem Kulturmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf neue Kulturbedeälter mit der vier- bis fünffachen Oberfläche verteilt oder in entsprechend geringerer Zellzahl in den ursprünglichen Bedeälter überführt und auf 100 ml Kulturvolumen verdünnt.

3.2.3.5 ZELLZÄHLUNG

Die Zelldichten wurden durch Messung im elektronischen CASY 1-Zellzählgerät ermittelt. Dazu wurde ein 100 µl Aliquot der Zellsuspension entnommen, in 10 ml isotoner Lösung (Isoton) verdünnt und vermessen. Bei Messung von HL60, U937, K562, 293 und CEM-Zellen wurden Zellen mit einem Durchmesser von mehr als 7,5 µm in die Zählung aufgenommen, bei Messung der größeren HeLa und HeLa S3-Zellen Zellen mit einem Durchmesser von mehr als 9 µm.

3.2.3.6 MYKOPLASMENTEST

Zur Überprüfung auf etwaige Kontamination mit Mykoplasmen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 15 min bei 37°C im Dunkeln mit einer methanolischen DAPI-Lösung (0,1 µg/ml) inkubiert, wiederholt mit PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop mit dem 100fachen Ölimmersionsobjektiv auf Mykoplasmen untersucht. Eine Kontamination mit Mykoplasmen zeigt sich durch kleine DAPI gefärbte Punkte außerhalb der Zellen.

3.2.3.7 INDUKTION VON APOPTOSE

Die Zellen wurden wie in Tabelle A angegeben wahlweise mit den Substanzen Topotecan/ Etoposid/Teniposid/TNF-α in Kombination Cycloheximid, Anti-APO/Fas-Antikörper oder Staurosporin behandelt, um Apoptose auszulösen. Dazu wurden jeweils pro Zeitwert zwischen 5 und 10 x 10⁷ Zellen angezogen. In der Regel wurden Zeitkinetiken durchgeführt, d.h. die Zellen wurden zum gleichen Zeitpunkt durch Zugabe des entsprechenden Apoptose-Induktors induziert und nach Ablauf der entsprechenden Inkubationsdauer geerntet. Bei adhärennten Zellen geschah dies wahlweise durch Abschaben oder Trypsinbehandlung. Beide Methoden brachten ähnliche Ergebnisse; in der Regel wurde das Abschaben bevorzugt, da dies bei der großen Anzahl der Zellkulturflaschen die einfacher zu handhabende Methode war. Die Suspensionskulturen wurden in 50 ml-Röhrchen überführt. Jeweils ein Aliquot der Zellsuspensionen wurde im Zellzählgerät CASY-1 ausgewertet und der Rest der Kultur bei 300 x g für 7 min sedimentiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (50 ml) gewaschen und für die nachfolgenden Schritte aliquotiert und vorbereitet. Zur Analyse der DNA wurden die Zellen in der Regel bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Zelllinie	Kultur	Induktor	Konzentration	Lösungsmittel
HL60	Suspension	Topotecan	150 ng/ml	H ₂ O
		Etoposid	10 µM	DMSO
		Staurosporin	1 µM	DMSO
		TNF-α	5 ng/ml	PBS + 0,1% BSA
		Cycloheximid	5 µg/ml	EtOH
		Teniposid	10 µM	DMSO
Jurkat	Suspension	TNF-α	5 ng/ml	PBS + 0.1% BSA
		Cycloheximid	5 µg/ml	EtOH
		APO/Fas-Ak	100 ng/ml	
CEM	Adhärenz	Topotecan	150 ng/ml	H ₂ O
		Etoposid	10 µM	DMSO
K562	Suspension	Topotecan	150 ng/ml	H ₂ O
U937	Suspension	Topotecan	300 ng/ml	H ₂ O

Tabelle A: Übersicht über verwendete Zelllinien und Apoptose-Induktoren

3.2.4 SYNCHRONISIERUNG DES ZELLYKLUS EINER ZELLPULATION

Durch geeignete Kulturmethode ist es in Zellkulturen möglich, Zellen in ihrer Teilungsrate so zu beeinflussen, daß sie synchron in die einzelnen Stadien des Zellzyklus eintreten und diese synchron durchlaufen. Für die synchrone Auslösung der Apoptose wurden die Zellen durch die Behandlung mit einem chemischen Agens am G1/S-Übergang geblockt und dann durch Entfernung des Agens in die S-Phase entlassen.

Aphidicolin (APH), ein reversibler Inhibitor der α und δ Untereinheiten der DNA-Polymerase I (HUBERMAN, 1981; CRUTE et al., 1986; WAHL et al., 1986), unterbindet in mikromolaren Konzentration temporär die Replikationsfähigkeit von Zellen durch Abbruch der DNA-Synthese. Zellen, die sich außerhalb der S-Phase befinden, werden am Übergang von G1 zu S geblockt, Zellen die sich zu Beginn der APH-Behandlung in der S-Phase befinden, werden in diesem Stadium arretiert. Nach Entfernen des APH setzt eine ungehinderte DNA-Synthese verbunden mit einem Fortschreiten der Zellen durch die S-Phase und nachfolgende Stadien des Zellzyklus ein. Die Konzentration des APH im Kulturmedium, bei dem der Inhibitor eine reversible, nicht toxische Wirkung entfaltet, ist für jeden Zelltyp spezifisch und muß experimentell bestimmt werden.

HL60-Zellen wurden in einer Dichte von 0,3 bis 0,5 x 10⁵ Zellen/ml in Zellkulturflaschen ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Nach Erreichen einer Zelldichte von 0,75 x 10⁵ Zellen/ml wurde Aphidicolin (8,61 mM in DMSO als Stammlösung) in der entsprechenden Konzentration hinzu gegeben und für 24 h mit den Zellen inkubiert. HL60-Zellen ließen sich am besten mit 1,5 µM Aphidicolin synchronisieren (vgl. Kap. 4.2.2). Danach wurde das Inhibitor-Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit normalem Kulturmedium (RPMI) gewaschen. Durch Zugabe von RPMI und

weiterer Inkubation unter Standardbedingungen wurden die Zellen aus dem Block entlassen und zum Teil mit dem Apoptose-Induktor Topotecan in einer Endkonzentration von 150 ng/ml behandelt.

3.2.5 FACS-ANALYSE – DURCHFLUßZYTOMETRIE IM FLUORESZENZ-AKTIVIERTEN-ZELLSORTIERER

In der durchflußzytometrischen Analyse von Zellen im Fluoreszenz-aktivierten-Zellsortierer (FACS) wird das Fluoreszenz- und Streulichtverhalten einzelner Zellen aufgezeichnet, die einen Laserstrahl definierter Wellenlänge passieren. Dadurch können biochemische und biophysikalische Eigenschaften von lebenden und toten Zellen ermittelt und Zellpopulationen mit unterschiedlichen Eigenschaften quantitativ getrennt werden. Die Messung des Streulichtverhaltens im 180°Winkel (Forward scatter, FSC) gibt Aufschluß über die Größe der Zellen, während das Streulicht im 90°Winkel (Sideward scatter, SSC) von der Granularität der Zellen bestimmt wird. Die Streu- und Fluoreszenzstrahlungen werden über Spiegelsysteme auf verschiedene, gefilterte Photodetektoren gelenkt und die Signale von Photoverstärkern aufgenommen. Dabei wird die Fluoreszenzstrahlung logarithmisch verstärkt. Jedes Signal wird digitalisiert (A/D-Wandler) und getrennt von den anderen als binärer Wert elektronisch gespeichert. In entsprechenden Computergraphiken lassen sich alle Parameter beliebig gegeneinander auftragen. In der Praxis bedeutet dies, daß es möglich ist, in einer inhomogenen Zellpopulation diejenigen Zellen gezielt herauszusuchen, die bestimmte Eigenschaften besitzen. Sie können statistisch innerhalb der Gesamtpopulation abgegrenzt werden. Die Anregungswellenlänge des hier benutzten Durchflußzytometers (FACScan™ der Firma Becton Dickinson) lag bei 488 nm. Damit konnten emittierte Fluoreszenzen, wie die Grünfluoreszenz von FITC bei 530 nm und die Rotfluoreszenz von PI bei 585 nm, detektiert werden. Die durchflußzytometrische Analyse von Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit dazu benutzt, den Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation der Zellen zu ermitteln.

Für die Messung im Durchflußzytometer wurden pro Ansatz 10.000 bis 20.000 Zellen registriert und mit der entsprechenden Software als „Dot Plot“ ausgewertet. Zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz (Negativkontrolle) wurden ungefärbte Zellen eingesetzt.

3.2.5.1 UNTERSUCHUNG DES ZELL TODS NACH DER TUNEL-METHODE

Eines der charakteristischen Merkmale des programmierten Zelltods (Apoptose) ist der Abbau der genomischen DNA in kleine Fragmente. Diese internukleosomalen DNA-Strangbrüche und damit freie 3'-OH-Gruppen treten bei apoptotischen Zellen wesentlich häufiger auf als bei nicht apoptotischen Zellen. Der Nachweis des Zelltods durch die TUNEL-Methode beruht auf dem Nachweis der vermehrt auftretenden freien 3'-OH-Gruppen in apoptotischen Zellen. Die Terminal-Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT-Polymerase) katalysiert die kovalente Bindung von Desoxynukleotiden an freie 3'-OH-Gruppen. Wird der TdT-Polymerase als Substrat DIG-markiertes Desoxyribonukleotid angeboten, wird es in apoptotischen und nicht apoptotischen Zellen an die DNA-Enden gebunden. Durch einen mit einem

Nachweisz enzym gekoppelten anti-DIG-Antikörper können die Zellen angefärbt und die apoptotischen von den nicht apoptotischen Zellen unterschieden werden.

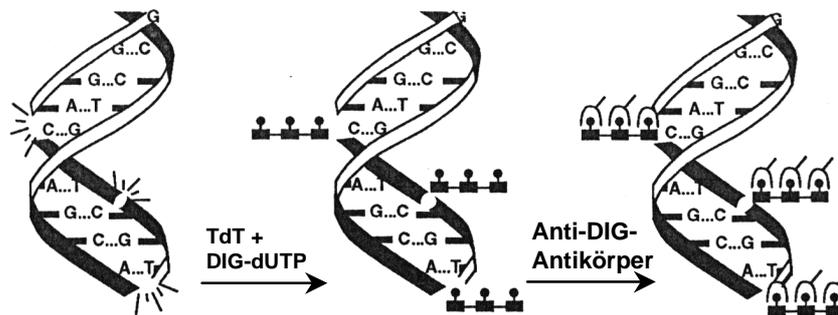


Abbildung 5: Schematische Darstellung der TUNEL-Methode

Das Schema zeigt die Markierung von freien 3'-OH-Gruppen internukleosomaler DNA-Strangbrüche durch die Terminal-Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT-Polymerase) mit DIG-markierten Desoxynukleotiden (modifiziert nach Vorschrift TUNEL-Assay, PharMingen).

Die Markierung der Zellen wurde mit dem APO-BrdU™-Kit der Firma PharMingen nach der beiliegenden Vorschrift durchgeführt. Zunächst wurden 1 bis 2×10^6 Zellen in 0,5 ml PBS aufgenommen und für 15 min auf Eis mit 5 ml 1% (w/v) Paraformaldehyd inkubiert, die Zellen bei 300 x g und 10 min Zentrifugation sedimentiert, wiederholt mit 5 ml PBS gewaschen und in 0,5 ml PBS aufgenommen. Über eine Injektionsnadel wurden die Zellen in 5 ml 70% eiskaltes Ethanol vereinzelt und bei -20°C mindestens 16 h gelagert.

Zur Färbung wurden jeweils 1×10^6 dem Reagenziensatz beigefügte Positiv- und Negativkontrollzellen ebenfalls sedimentiert und das Ethanol entfernt. Kontroll- und zu messende Zellen wurden mit zweimal 1 ml Waschpuffer versetzt, zentrifugiert (300 x g, 10 min) und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in jeweils 50 μl DNA-Markierungslösung resuspendiert und entweder 60 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert oder über Nacht bei 22 bis 24°C inkubiert. Die DNA-Markierungslösung setzt sich zusammen aus je 10 μl TdT-Reaktionspuffer, 0,75 μl TdT-Enzym, 8 μl Br-dUTP und 32,25 μl A. bidest pro Ansatz. Am Ende der Inkubationszeit wurden den Zellen je 1 ml Spülpuffer zugesetzt, die Zellen wie zuvor sedimentiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 0,1 ml Antikörperlösung (bestehend aus 5 μl FITC-markiertem Anti-BrdU und 95 ml Spülpuffer) im Dunkeln für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden 0,9 ml (bei geringer Zelldichte nur 0,5 ml) PI/RNase A-Lösung zugefügt und die Zellen im Dunkeln erneut 30 min inkubiert und anschließend im Durchflußzytometer analysiert. Die Parametereinstellungen aus der Anleitung wurden übernommen (FL 1 – log - 380 V/FL 3 – 1,46 – 414 V/FL 3 Width - .87/FL 4 Area – 3.25, Threshold – FL 3, 40).

3.2.5.2 PI-FÄRBUNG

Der DNA-Gehalt ist ein entscheidender Marker für die Position einer Zelle in einem Stadium des Zellzyklus. In diploiden Zellen indiziert dabei ein DNA-Gehalt, der einem doppelten Chromosomensatz entspricht ($2n$), die Positionierung der Zelle in der G1-Phase. Eine Verdoppelung des DNA-Gehaltes ($4n$) weisen Zellen auf, die sich in der G2- oder M-Phase befinden. Ein DNA-Gehalt, der zwischen diesen Werten liegt ($2n < x < 4n$), ist auf einen in der Zelle ablaufenden DNA-Synthesevorgang während der S-Phase zurückzuführen.

Nach Anfärbung der Nukleinsäure mit der fluoreszierenden Substanz Propidiumiodid (PI) ist die Signalintensität der angefärbten Kerne proportional zu ihrem DNA-Gehalt. Mit einem Durchflußzytometer läßt sich die Signalintensität jedes einzelnen Kerns quantifizieren und in Form eines DNA-Histogramms die Zellzyklusverteilung einer Zellpopulation graphisch darstellen. Diese Methode wurde zum Nachweis des synchronen Wachstums von APH-behandelten HL60-Zellen nach Entlassen aus der Zellzyklusarretierung in der vorliegenden Arbeit herangezogen.

Zur Ernte der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Entlassen aus dem G1/S-Block (vgl. 3.2.4) wurden die Zellen abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und nachfolgend in einer Konzentration von 2 bis 4×10^6 Zellen/ml in PBS aufgenommen. Zur Fixierung der Kerne wurden 0,5 ml dieser Zellsuspension mit einer Injektionsspritze in 5 ml auf -20°C abgekühltes Ethanol injiziert. Diese fixierten Kerne konnten über einen längeren Zeitraum bei -20°C in Ethanol aufbewahrt werden, oder sie wurden sofort im Anschluß weiter analysiert. Dazu wurden sie durch Zentrifugation ($300 \times g$, 7 min) sedimentiert und in $500 \mu\text{l}$ 10% PI-Färbelösung resuspendiert. Zur Spaltung der RNA wurden $500 \mu\text{l}$ RNase A-Lösung zugesetzt und der Ansatz im Dunkeln für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die gefärbte Zellsuspension vorsichtig aufgeschüttelt. Die Intensität der Lichtemission der einzelnen Kerne konnte unter Anregung mit UV-Licht in einem FACScanTM-Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson¹ gemessen werden. Die Auswertung der binären Rohdaten erfolgte auf einem PC-System mit der Software ModFit 5.2 (Fa. Verity Inc., USA).

3.2.6 ZYTOSPIN-ZENTRIFUGATION

Zur Fixierung von Suspensionszellen auf Objektträgern wurden 1×10^6 Zellen mit PBS gewaschen, in $100 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und unter Verwendung des Zytosystems der Firma Heraeus Sepatech (Osterode) mit der Filtermethode auf Objektträger bei 500 UpM für 5 min in der Heraeus-Megafuge 1.0 zentrifugiert und danach sofort mit 3% (v/v) eiskaltem Paraformaldehyd oder 100% eiskaltem Methanol fixiert und wie unter 3.2.7 und 3.2.8 beschrieben gefärbt.

¹ Ich danke der Abteilung Immungenetik unter Leitung von Prof. Dr. E. Günther für die freundlich überlassene Nutzung des Geräts unter Aufsicht von Herrn Dr. Ralf Dressel.

3.2.7 DAPI-FÄRBUNG

Adhärente Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert, Suspensionszellen einer Zytospin-Zentrifugation auf Objektträger (Kapitel 3.2.6) unterzogen. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend entweder für 15 min mit 3% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert, das eine Quervernetzung freier Aminosäuren bewirkt, oder mit 100% eiskaltem Methanol p.A. fixiert. Anschließend erfolgte die Einbettung der Zellen in DAPI-Einbettungsmedium (10% (v/v) PBS, 90% (v/v) Glycerin, 1 mg/ml Phenylendiamin, 1 µg/ml 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)) auf einem Objektträger und die Versiegelung mit Nagellack. Nach Trocknung des Nagellacks konnte die Auswertung unter UV-Anregung an einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop mit DAPI-Filter erfolgen.

3.2.8 GIEMSA-FÄRBUNG

Die Zellen wurden 15 min in 100% Methanol p.A. (RT) fixiert und mit methanolischer Giemsa-Farbstofflösung versetzt. Nach 5 min Inkubation wurde zweimal mit PBS gewaschen und nach Überprüfung der Farbintensität in Kaisers-Glyzeringelatine eingebettet und mit Nagellack versiegelt. Die Auswertung erfolgte im Lichtmikroskop.

3.2.9 ZELLFRAKTIONIERUNG MIT DEM MACS-SYSTEM

Das MACS-System der Firma Miltenyi Biotec sollte zur Selektionierung apoptotischer Zellen etabliert und getestet werden. Grundlage der Selektionierung ist die Kopplung der apoptotischen Zellen über während der Apoptose auf der Außenseite der Zellmembran erscheinendes Phosphatidylserin an Annexin V-gekoppelte Microbeads (kleine magnetische Kügelchen) und Separation im magnetischen Feld des MACS-Separators.

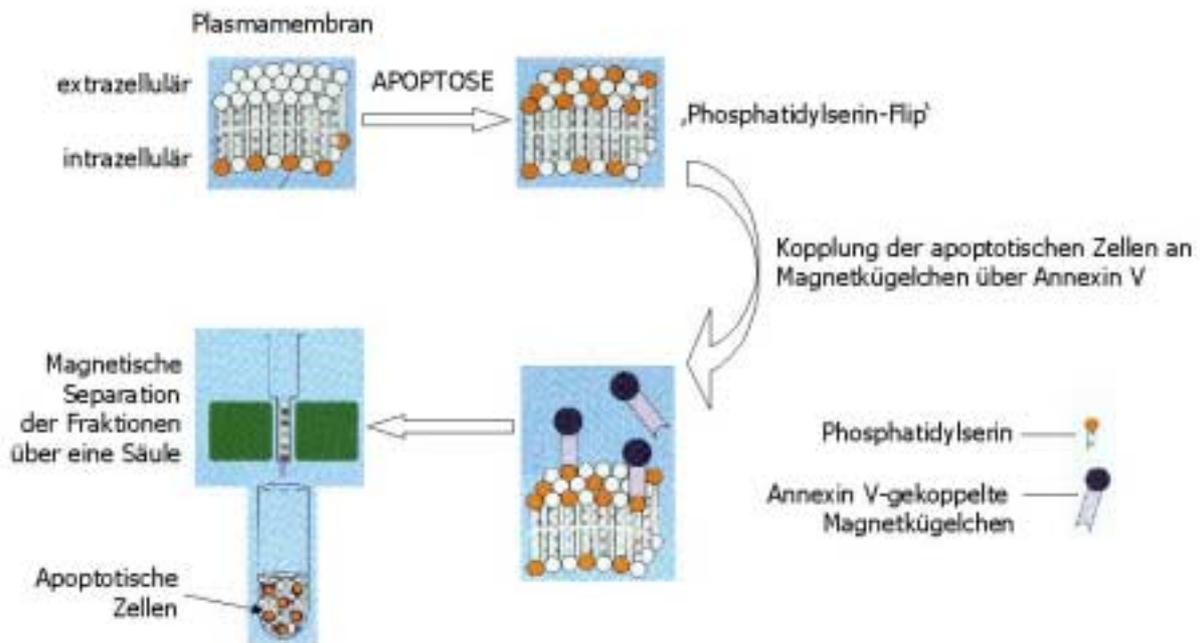


Abbildung 6: Prinzip der Isolierung apoptotischer Zellen über das MACS-System (entnommen aus der Produktinformation der Firma Miltenyi Biotec)

Für 10^7 Zellen wurden 10 ml Annexin V-Bindungspuffer (0,5 ml 20 x Annexin V-Bindungspuffer und 9,5 ml A. bidest) vorbereitet und gekühlt. Apoptose-induzierte Zellen wurden geerntet, mit 2 ml pro 10^7 Zellen gewaschen und zentrifugiert (10 min, 300 x g). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen in 80 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen Annexin V-Bindungspuffer resuspendiert und mit je 20 μl MACS Annexin V-Microbeads gemischt und 15 min bei 6 bis 12°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 800 bis 1.600 μl Annexin V-Bindungspuffer gewaschen, wie zuvor zentrifugiert und erneut in 500 μl Bindungspuffer aufgenommen. Zur magnetischen Separation mit positiven Selektionierungssäulen wurde der Säulentyp MS^+/RS^+ in das magnetische Feld des MACS-Separators gebracht und mit 500 μl Annexin V-Bindungspuffer äquilibriert. Die gekoppelten Zellen wurden aufgetragen; die negativen Zellen passierten die Säule, während die positiven Zellen aufgrund der Microbeads im magnetischen Feld festgehalten wurden. Die Säule wurde dreimal mit 500 μl Annexin V-Bindungspuffer gewaschen und danach aus dem magnetischen Feld entfernt. Die positiven Zellen wurden mit 1 ml Annexin V-Bindungspuffer eluiert und gesammelt.

3.2.10 GEWINNUNG VON ZELLBESTANDTEILEN

3.2.10.1 GEWINNUNG VON ZELLKERNEN NACH HEWISH und BURGOYNE (1973)

Diese Methode wurde zur Isolierung von Nukleosomen entwickelt und besteht zunächst aus der Gewinnung von Zellkernen, die anschließend einer partiellen Mikrokokus-Nuklease-Verdauung unterzogen werden (3.2.10.3). In dieser Arbeit wurden die gewonnenen Zellkerne jedoch auch in den „*in vitro*“-Versuchen eingesetzt.

Puffer I (TSS-Puffer, Tris, Salz, Saccharose)	50 mM 250 mM 10 mM 25 mM 0,02 % (v/v)	Tris-HCl Saccharose MgCl ₂ KCl Triton X-100	pH 7,5
Puffer II	50 mM 2,2 M 10 mM 25 mM 0,02 % (v/v)	Tris-HCl Saccharose MgCl ₂ KCl Triton X-100	pH 7,5
Puffer III (HEWISH & BURGOYNE-Puffer)	60 mM 15 mM 340 mM 15 mM 15 mM 150 µM 500 µM	KCl NaCl Saccharose Tris-HCl β-Mercaptoethanol Spermin Spermidin	pH 7,4 kurz vor Gebrauch zugeben

Die Arbeitsschritte der Kernpräparation wurden generell bei 4°C ausgeführt. 4 bis 6 x 10⁸ Zellen wurden geerntet und zweimal mit 50 ml PBS gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden in 40 ml TSS-Puffer (inkl. 0,02% Triton X-100) resuspendiert und im 15 ml Glashomogenisator (S-Dounce) auf Eis mit 5 Zügen aufgebrochen, 10 min auf Eis stehengelassen und im SS34-Rotor 5 min bei 2.500 UpM und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment in 20 ml Puffer II aufgerührt. Durch je 8 Züge im 10 ml Glashomogenisator (S-Dounce) wurden die Zellen weiter aufgebrochen. Zur Trennung der Kerne von den sonstigen Zellbestandteilen wurde das Homogenisat über ein 7 ml Saccharosekissen (Puffer II) im SW28-Rotor für 90 min bei 25.000 UpM und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die sedimentierten Kerne zunächst in 3 ml Puffer resuspendiert und dann auf 10 ml Endvolumen aufgefüllt. Um die Saccharose zu entfernen, wurden die Kerne 5 min im HB4-Rotor bei 2.500 UpM sedimentiert und der Überstand möglichst quantitativ entfernt. Das Kernsediment wurde in 2,5 bis 3 ml Puffer III resuspendiert und bis zum weiteren Einsatz im „*in vitro*“-Versuch bis zu 2 h auf Eis gelagert.

3.2.10.2 HERSTELLUNG VON ZYTOPLASMAEXTRAKTEN NACH LAZEBNIK et al. (1993)

PIPES-Puffer	50 mM	PIPES	pH 7,4	
	50 mM	KCl		
	5 mM	EGTA		
	2 mM	MgCl ₂		
	1 mM	DTT		frisch
	1 µg/ml	Pepstatin		vor
	1 µg/ml	Leupeptin		Gebrauch
	1 mM	PMSF		zusetzen

2 bis 3 x 10⁸ Zellen wurden geerntet, einmal mit 50 ml PBS und zweimal mit PIPES-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml PIPES-Puffer aufgenommen und in der Regel 3 h auf Eis stehen gelassen, um in der Zwischenzeit die Kernpräparation (3.2.10.1) durchführen zu können. Die Zellen wurden in einen 7 ml S-Glashomogenisator jeweils 5 x in flüssigem Stickstoff eingefroren und beim Auftauen mit dem Pistill homogenisiert. Die erhaltene Suspension wurde 10 min im HB4-Rotor bei 4°C und 8.000 UpM zentrifugiert und der Überstand als Zytoplasmaextrakt sofort in den „*in vitro*“-Ansätzen eingesetzt.

3.2.10.3 NUKLEOSOMENPRÄPARATION

3.2.10.3.1.1 PRÄPARATION NACH HEWISH und BURGOYNE (1973)

PEP-Puffer (Phosphat-EDTA-Puffer)	5 mM	Natriumphosphat	pH 6,8
	200 mM	EDTA	
	250 mM	PMSF	

Die Kerne wurden wie unter 3.2.10.1 beschrieben präpariert und anschließend mit 1/10 Volumen 100 mM CaCl₂-Lösung versetzt und 3 min auf 37°C angewärmt. Für die partielle Mikrokoccus-Nuklease-Verdauung wurden 200 U Nuklease S7 aus *Staphylokokkus aureus* (10.000 U/ml) hinzugegeben und die Kerne bei 37°C inkubiert. Die Verdauung mit Mikrokoccus-Nuklease wurde zu unterschiedlichen Zeiten mit 1/10 Volumen 500 mM EDTA abgestoppt und auf Eis gestellt. Die angedauten Kerne wurden für 5 min bei 5.000 UpM im SS34-Rotor abzentrifugiert und das Sediment in 1 ml Phosphat-EDTA-Puffer (PEP) aufgenommen und ca. 20 x mit einer blauen Pipettenspitze auf- und abpipettiert, um die Nukleosomen freizusetzen. Die erhaltene Suspension wurde wiederum 5 min bei 5.000 UpM zentrifugiert und der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Die Kerne wurden noch mal mit PEP nachextrahiert und die Überstände vereinigt. Zur Darstellung der entstandenen DNA-Fragmente wurde die Lösung auf 1 M NaCl eingestellt, der Ansatz zweimal mit Sevag (3.2.15.3) extrahiert, die DNA mit Ethanol präzipitiert (3.2.15.4) und im gewünschten Volumen TE-Puffer (in der Regel 200 µl) aufgenommen und davon je

10 µl auf einem 1,4% Agarosegel analysiert.

3.2.10.3.1.2 PRÄPARATION NACH NOLL (1974b)

Puffer I	10 mM 300 mM 2 mM 3 mM	Tris-HCl Saccharose MgOAc CaCl ₂	pH 8,0
Puffer II	10 mM 2 M 5 mM	Tris-HCl Saccharose MgOAc	pH 8,0

6 x 10⁸ Zellen wurden geerntet und mit 50 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 50 ml Puffer I aufgenommen, dem zuvor 1% (v/v) Triton X-100 und 0,25 ml DTT zugegeben worden waren. Die Zellen wurden mit 16 Zügen im Glashomogenisator (S-Dounce) aufgebrochen und 1:1 mit Puffer II (komplettiert mit 0,25 ml DTT) gemischt. Die erhaltene Suspension wurde auf ein je 3 ml Saccharosekissen (Puffer II) in Corexröhrchen (4 x 25 ml) gegeben und die Kerne im Sorvall HB4-Rotor 45 min bei 10.000 UpM von den restlichen Zellbestandteilen abgetrennt. Die Kerne wurden einmal mit 10 ml Puffer III (vgl. 3.2.10.1) gewaschen, mit 1/10 Volumen 0,1 M CaCl₂-Lösung versetzt und 2 min bei 37°C vorgewärmt. Für die limitierte Mikrokokus-Nuklease-Verdauung wurden 50 U Nuklease S7 (10.000 U/ml) pro 10⁸ Kerne eingesetzt und in einer Zeitkinetik inkubiert. Nach Erreichen des jeweiligen Zeitpunktes wurde die Verdauung durch Zugabe von 1/10 Volumen 500 mM EDTA gestoppt und auf Eis gestellt. Die angedauten Kerne wurden 5 min bei 5.000 UpM sedimentiert und in 10 ml hypotonen Phosphat-EDTA-Puffer (PEP, vgl. 3.2.10.1) aufgenommen, 20 x im L-Glashomogenisator und 20 x im S-Glashomogenisator homogenisiert. Die Nukleosomen wurden 5 x durch eine gelbe Kanüle (0,90 x 40 mm) und 5 x durch eine graue Kanüle (0,40 x 20 mm) vereinzelt. Die erhaltene Suspension wurde für 5 min bei 15.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand enthielt die DNA und Proteine, die nachfolgend einer Sevag-Extraktion (3.2.15.3) und einer Ethanol-Fällung (3.2.15.4) unterzogen wurden. Jeweils 15 µl der erhaltenen nukleosomalen DNA wurden auf einem 1,4% Agarosegel analysiert.

MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Arbeiten mit DNA

3.2.11 GEWINNUNG VON DNA**3.2.11.1 PLASMID-DNA AUS BAKTERIENKULTUREN**

Es gibt verschiedene Methoden, um Plasmid-DNA zu präparieren. Sie weisen in Bezug auf ihre Qualität, die Ausbeute und den Arbeitsaufwand erhebliche Unterschiede auf. Mit Hilfe der analytischen Plasmid-Präparation (vgl. 3.2.11.1.1) wird Plasmid-DNA gewonnen, die anschließend einer Restriktionsverdauung unterzogen wird, um die Insertion und die Orientierung des DNA-Fragments im Plasmid zu überprüfen. Diese Methode liefert keine große Ausbeute an Plasmid-DNA und die Verunreinigung ist erheblich, es können jedoch viele Bakterienklone in kurzer Zeit analysiert werden. Bei der präparativen Isolierung von Plasmid-DNA (Qiagen-Säulenelution, vgl. 3.2.11.1.2) ergibt sich eine große Ausbeute an Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad.

3.2.11.1.1 ANALYTISCHE PLASMIDISOLIERUNG MIT TRIS-EDTA-LICL-TRITON (TELT)

<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA- <u>L</u> iCl- <u>T</u> riton (TELT)-Lösung	50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	62,5 mM	EDTA
	2,5 M	LiCl
	0,4 % (v/v)	Triton X-100

Die Minipräparation von Plasmid-DNA wurde ausschließlich für analytische Zwecke verwendet. Es wurde eine Übernachtskultur in 3 ml LB_{Amp}-Medium mit einer Einzelkolonie des plasmidtragenden Stammes angeimpft und bei 200 bis 250 UpM geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml der Zellsuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge sedimentiert (3.500 UpM, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 150 µl TELT-Puffer resuspendiert. Dann wurden 25 µl Lysozymbilösung (10 mg/ml) zugegeben. Die Zellen wurden 2 min bei 95°C aufgeköcht, wodurch der Zellaufschluß erfolgte und die meisten bakteriellen Proteine hitzedenaturiert wurden. Anschließend wurden die Proben 5 min auf Eis gestellt. Bei der nachfolgenden Zentrifugation (14.000 UpM, 10 min, 4°C) bildete sich ein Sediment, das aus genomischer DNA, Zelltrümmern und denaturierten Proteinen bestand. Das Sediment wurde mit einer Pinzette entfernt und der Plasmid-DNA-haltige Überstand mit 200 µl Isopropanol (p.A.) gemischt. Die Proben wurden zentrifugiert (14.000 UpM, 15 min, 4°C), der Überstand abgesaugt und das Sediment mit 250 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation (14.000 UpM, 5 min, 4°C) wurde der Überstand erneut abgesaugt. Das Sediment wurde 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und dann in 40 µl A. bidest aufgenommen.

Für eine nachfolgende analytische Restriktionsverdauung wurden 10 µl der Plasmid-DNA eingesetzt. Entstanden bei der Restriktionsspaltung Fragmente, die kleiner als 500 bp waren, wurde anschließend 1 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert, da die bakterielle RNA bei einer Agarose-Gelelektrophorese auf einer DNA-Fragmenthöhe zwischen 200 und 500 bp läuft. Durch die Zugabe von RNase wurde die RNA zu Nukleotiden abgebaut, so daß keine Überlagerung von RNA-Banden mit den DNA-Fragmenten aus der Restriktionsverdauung bei der Elektrophorese entstand.

3.2.11.1.2 PRÄPARATIVE PLASMIDISOLIERUNG ÜBER QIAGEN-SÄULEN

Im QIAGEN® Plasmid-Midi-Kit sind enthalten:		
Lösung P1	50 mM 10 mM 1 µg/ml	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA RNase A
Lösung P2	200 mM 1 % (w/v)	NaOH SDS
Lösung P3	2,55 M	Kalium-Acetat (pH 4,8)
Lösung QBT	750 mM 50 mM 15 % (v/v)	NaCl MOPS (pH 7,0) Ethanol
Lösung QC	1 M 50 mM 15 % (v/v)	NaCl MOPS (pH 7,0) Ethanol
Lösung QF	1,2 M 50 mM 15 % (v/v)	NaCl MOPS (pH 7,0) Ethanol

Mit dieser Methode kann Plasmid-DNA in präparativen Mengen (bis zu 200 µg) aus *E. coli* Zellen isoliert werden. Die Plasmid-DNA wird durch Aufschluß der Bakterien, Denaturierung der Bakterienproteine und anschließende Präzipitation aus den Bakterien isoliert. Da im Präzipitat immer noch genomische DNA, Nukleinsäuren vom RNA-Abbau durch RNasen und Bakterienproteine vorhanden sind, wird die Plasmid-DNA über Silikat-Säulen gereinigt. Die Säulen enthalten Kieselerdpartikel (ungefähre Größe 100 µm), die kovalent mit einer hydrophilen Substanz beschichtet sind. Durch die hohe Ladungsdichte auf der Oberfläche der Partikel entsteht ein weites Separationsspektrum, so daß durch die Veränderung des pH-Wertes und der Ionendichte der Puffer nacheinander Proteine, Metaboliten, Polysaccharide, dNTPs, RNA, einzelsträngige DNA und schließlich doppelsträngige Plasmid-DNA eluiert werden (Produktinformation von Qiagen, Hilden). Die Plasmid-DNA wird mit einem Hochsalz-Puffer eluiert und anschließend durch eine Isopropanol-Fällung konzentriert.

Für die Plasmidpräparation wurde eine Übernachtskultur in 100 ml LB_{Amp}-Medium mit 100 µl einer

Flüssigkultur des plasmidtragenden Klons angeimpft und bei 200 bis 250 UpM geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 30 bis 50 ml der Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (4.000 UpM, 10 min, 4°C) geerntet. Das Medium wurde vollständig abgegossen und die Zellen in 4 ml P1-Puffer resuspendiert. Die Zellyse wurde durch Zugabe von 4 ml P2-Puffer und anschließendes mehrmaliges Schwenken des Röhrchens erreicht. Das Röhrchen sollte nicht geschüttelt werden, um ein Scheren der chromosomalen DNA zu vermeiden. Nach 5 min Inkubation wurden 4 ml P3-Puffer zugegeben und wie zuvor durch rasches, aber vorsichtiges Schwenken des Röhrchens vermischt. Dadurch wird die Lösung neutralisiert, so daß Membranbestandteile, SDS, Proteine und chromosomale DNA gefällt werden. Die gefällten Bestandteile wurden durch Zentrifugation sedimentiert (SS34-Rotor, 12.000 UpM, 30 min, 4°C). Während der Zentrifugation wurden Qiagen-Tip100-Säulen mit 4 ml QBT-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Überstand mit der Plasmid-DNA auf die Säule gegeben. Die Säulenmatrix wurde zweimal mit je 10 ml QC-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und anschließende Zentrifugation (HB4-Rotor, 9.500 UpM, 30 min, 4°C). Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 5 bis 10 min lyophilisiert und dann in 200 µl Tris-HCl (pH 8,0) gelöst. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (vgl. 3.2.15.6).

3.2.11.2 GENOMISCHE DNA AUS HUMANEN ZELLKULTUREN

Im QIAGEN® Blood & Cell-Culture-DNA-Kit sind enthalten:		
Lösung C1	1,28 M 40 mM 20 mM 4 % (v/v)	Saccharose Tris-HCl, pH 7,5 MgCl ₂ Triton X-100
Lösung G2	800 mM 30 mM 5 % (w/v) 0,5 % (v/v)	Guanidin-HCl Tris-HCl, pH 8,0 Tween-20 Triton X-100

Die Puffer QBT, QC und QF entsprechen den unter 3.2.11.1.2 aufgeführten Puffern und sind sowie die Proteinase K ebenfalls im Kit enthalten.

Um genomische DNA aus Zellkulturen zu gewinnen, wurde der QIAGEN® Blood & Cell-Culture-DNA-Reagenziensatz nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Das Prinzip dieser Isolierung besteht in der Lyse der Zellen und Kerne gefolgt von der Bindung der genomischen DNA an die Anionenaustauschersäule unter entsprechenden Niedrigsalz- und pH-Bedingungen. RNA und Proteine werden beim nachfolgenden Waschschrift unter mittleren Salzbedingungen abgetrennt und die genomische DNA durch einen Hochsalz-Puffer eluiert, danach konzentriert und entsalzt durch eine sich anschließende Isopropanolfällung.

Alle Lösungen wurden eisgekühlt verwendet. 4×10^7 bis 1×10^8 Zellen wurden geerntet, zweimal mit 50 ml PBS gewaschen und in eisgekühltem PBS auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml verdünnt. Die Zellen wurden in 1 Volumen Puffer C1 und 3 Volumen eisgekühltem A. bidest durch mehrmaliges Invertieren resuspendiert und 10 min auf Eis stehen gelassen. Nach Zentrifugation bei $1.300 \times g$ und 4°C für 15 min wurde der Überstand abgenommen und das Zellsediment auf einem Vortex-Gerät in 2 ml Puffer C1 und 6 ml A. bidest resuspendiert und wie zuvor sedimentiert. Das Sediment wurde in 10 ml Puffer G2 für 10 bis 30 s auf einem Vortex-Gerät mit höchster Leistungsstufe gemischt, bis die Kerne vollständig resuspendiert waren. Dabei wurden die Kernmembranen zerstört und die meisten Proteine denaturiert. Es erfolgte eine Proteinase K-Verdauung mit $20 \mu\text{g/ml}$ für 60 min bei 50°C . Dabei wurden native und denaturierte Proteine abgebaut. Nach kurzem Schütteln der DNA-haltigen Lösungen wurden diese über Faltenfilter auf die vorher mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierten Genomic Tip 500/G-Säulen gegeben. Anschließend wurde zweimal mit 15 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 15 ml 50°C warmem Puffer QF in ein Glasröhrchen eluiert. Die DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt, mit einem Glasstab gefischt und in TE-Puffer aufgenommen. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 4°C geschüttelt und am nächsten Tag für 2 h bei 55°C geschüttelt, um ein möglichst vollständiges Lösen der DNA zu erreichen.

3.2.11.3 DNA AUS APOPTOTISCHEN ZELLEN

Nach Induktion von Apoptose in den Zellkulturen wurden die Zellen geerntet, mit mind. 50 ml PBS gewaschen und in Aliquots zu je 5×10^7 Zellen in der Regel bei -20°C eingefroren (3.2.3.7). Zur Isolierung der DNA wurden die aliquotierten Zellen aufgetaut und daraus entweder hoch- oder niedermolekulare DNA gewonnen.

3.2.11.3.1 NIEDERMOLEKULARE DNA

Die besten Ergebnisse lieferte die modifizierte Präparation nach SELLINS und COHEN (1987). Daher wurde sie standardmäßig zur Gewinnung der niedermolekularen DNA genutzt. Zum Vergleich wurden jedoch auch Methoden nach Enari und nach Beere verwendet, welche zum Unterschied sowohl nicht fragmentierte DNA als auch fragmentierte DNA aus den Zellen gewinnen.

3.2.11.3.1.1 MODIFIZIERTE PRÄPARATION NACH SELLINS und COHEN (1987)

Dazu wurde das gewonnene Zellsediment eines jeden Zeitwertes mit $450 \mu\text{l}$ vorgewärmten TE-Puffer und 0,2% Triton X-100 aufgetaut. Durch das Detergens kam es zur Zerstörung der Zellwand. Die Proben wurden für 30 min auf Eis gestellt und dabei zwischenzeitlich einige Male über Kopf gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 10 min bei 13.000 UpM. Der die fragmentierte, nukleosomale DNA enthaltende Überstand wurde mit $100 \mu\text{l}$ 10 M LiCl versetzt und mit $450 \mu\text{l}$

Isopropanol bei -20°C für 2 h gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das erhaltene Sediment zweimal mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen, die Proben in der Vakuumentrifuge für 2 min getrocknet und mit 200 µl TE-Puffer versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Sediment resuspendiert und zweimal einer Sevag-Extraktion unterzogen (vgl. 3.2.15.3) und anschließend mit Ethanol präzipitiert (vgl. 3.2.15.4). Die erhaltene niedermolekulare DNA wurde in 30 µl TE gelöst und ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Pro Spur wurden 8 µg DNA auf einem 1,4% Agarosegel analysiert.

3.2.11.3.1.2 PRÄPARATION NACH ENARI et al. (1998)

Lysispuffer	5 mM	EDTA
	100 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	0,2 M	NaCl
	0,2 % (w/v)	SDS
	0,1 mg/ml	Proteinase K

Diese Methode wurde genutzt, um aus den „*in vitro*“-Ansätzen die niedermolekularen DNA-Fragmente darzustellen. Die behandelten Kerne wurden sedimentiert (5 min, 10.000 UpM), in 0,5 ml Lysispuffer resuspendiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde durch Isopropanol-Präzipitation gewonnen (vgl. 3.2.15.5), in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und mit 0,1 mg/ml RNase A 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA auf einem 2% Agarosegel analysiert, wobei die DNA zuerst in die Taschen eingefüllt wurde, mit flüssiger 2% Agarose verschlossen und erst nach Erstarren in die mit Puffer gefüllte Kammer gegeben wurde, um ein Entweichen der Probe aus den Taschen zu vermeiden.

3.2.11.3.1.3 PRÄPARATION NACH BEERE et al. (1995)

Lysispuffer	10 mM	EDTA
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	0,5 % (w/v)	Lauroylsarkosin
	0,5 mg/ml	Proteinase K

Je 1×10^6 Zellen wurden nach Waschen mit PBS in 20 µl Lysispuffer resuspendiert und 1 h bei 50°C inkubiert. Danach wurde DNase-freie RNase A in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugegeben und erneut 1 h bei 50°C inkubiert. Die Verdauung wurde gestoppt durch Zugabe von 10 µl 0,1 M EDTA-Lösung und 1:1 mit 45°C warmer 2% LMP-Agarose (low melting point-Agarose) gemischt und sofort in die Taschen eines 2% Agarosegels gegeben und dort erstarren lassen. Es schlossen sich die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse bei 40 V über 3 bis 4 h an (3.2.13.1).

3.2.11.3.2 PRÄPARATION DER HOCHMOLEKULAREN DNA NACH FILIPSKI et al. (1990)

Hochmolekulare DNA ist aufgrund ihrer Größe Scherkräften ausgesetzt, wie sie z.B. beim Pipettieren auftreten. Daher werden zur Gewinnung hochmolekularer DNA die Zellen in LMP-Agaroseblöckchen gegossen, in denen alle weiteren Schritte stattfinden.

Kernpuffer	150 mM	NaCl
	2 mM	KH ₂ PO ₄ /KOH, pH 6,4
	1 mM	EGTA
	5 mM	MgCl ₂
LMP-Agarose	1,5 % (w/v)	LMP-Agarose in Kernpuffer
	0,4 mg/ml	Proteinase K
Puffer S	10 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 9,5
	25 mM	EDTA
	10 % (w/v)	Lauroylsarkosin
	35 µg/ml	Proteinase K

Für die Präparation eines DNA-enthaltenden Agaroseblöckchen wurden 1×10^7 Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und das Zellsediment auf Eis in 0,25 ml Kernpuffer vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden 2 min bei 4°C bei 2.000 x g zentrifugiert, wiederum in 50 µl Kernpuffer resuspendiert und 10 s bei 4°C bei maximaler Geschwindigkeit sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Sediment erneut in 50 µl Kernpuffer resuspendiert, im Wasserbad für ca. 15 s auf 45°C vorgewärmt und 1:1 mit geschmolzener, 45°C warmer 1,5% LMP-Agarose-Lösung in Kernpuffer (inkl. 0,4 mg/ml Proteinase K) versetzt, gut gemischt und sofort je 125 µl des Gemisches luftblasenfrei in den Blöckchenformer pipettiert, der zuvor auf einer Seite mit Tesafilm verschlossen worden war. Die Blöckchen wurden max. 30 min bis zum Erstarren bei 4°C gelagert, der Tesafilm vom Blöckchenformer entfernt und die Blöckchen in 3 ml Puffer S gegeben und mit 50 µl einer 2 mg/ml enthaltenden Proteinase K-Lösung versetzt. Die Agaroseblöckchen wurden 18 h bei 50°C unter langsamen Rotieren inkubiert, mehrmals mehrere Stunden mit TE-Puffer gewaschen und ebenfalls in sterilem TE-Puffer bei 4°C aufbewahrt, wo sie über Wochen hinweg gelagert werden konnten.

3.2.11.3.3 PRÄPARATION DER GRÖßENSTANDARDS FÜR DIE PULSFELDGELELEKTROPHORESE

Als Größenstandards wurden neben käuflich erworbener λ -Phagenkonkatemere in Agaroseblöckchen (Firma BioRad) YAC-WAY-4A-DNA und λ -HindIII-DNA in Agaroseblöckchen gegossen und als Größenmarker eingesetzt.

LMP-Agarose-Lösung	2 % (w/v) 1 M 20 mM 14 mM	LMP-Agarose Sorbitol EDTA β-Mercaptoethanol
Puffer 1	1 M 20 mM 14 mM 1 mg/ml	Sorbitol EDTA β-Mercaptoethanol Zymolyase
Puffer 2	1 M 20 mM 10 mM 14 mM 1 mg/ml	Sorbitol EDTA Tris-HCl, pH 7,5 β-Mercaptoethanol Zymolyase
Hefe-Lysis-Lösung	1 % (w/v) 100 mM 10 mM	Lithiumdodecylsulfat EDTA Tris-HCl, pH 8,0

YAC-WAY-4A

YAC-tragende Hefen wurden in 10 ml supplementiertem SD-Medium bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von mehr als 1,2 angezogen, bei 1.500 UpM sedimentiert und einmal in 50 mM EDTA pH 8,0 gewaschen, in 400 µl Puffer 1 resuspendiert und mit 500 µl geschmolzener 45°C warmer 2% LMP-Agarose-Lösung gemischt. Die Lösung wurde in den einseitig mit Tesafilm verschlossenen Blöckchenformer pipettiert und bei 4°C erstarren gelassen. Die erstarrten Blöckchen wurden für 2 h in 5 ml Puffer 2 bei 37°C inkubiert. Diese Lösung wurde durch 5 ml sterilfiltrierte Hefe-Lysis-Lösung ersetzt und bei 37°C für 30 bis 60 min inkubiert. Danach wurde diese Lösung erneuert und die Blöckchen über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Lagerung wurden die Blöckchen ebenfalls in Hefe-Lysis-Lösung bei RT aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden sie 2 x 30 min in TE-Puffer bei 50°C und 2 x 30 min bei RT gewaschen und vor Auftragen auf das Gel mit Laufpuffer (0,5 M TBE-Puffer) bei RT äquilibriert.

λ-HindIII

Zur Herstellung dieser Blöckchen wurden *HindIII* verdaute λ-DNA der Firma MBI Fermentas verwendet. Für 20 Blöckchen wurden 40 µg DNA auf 2,3 ml mit TBE-Puffer und mitgelieferten Auftragspuffer auf 1 x-Konzentration verdünnt und mit 2,7 ml 45°C warmer 2% LMP-Agarose-Lösung in 0,5 M TBE-Puffer gemischt, in den Blöckchenformer pipettiert, erstarren lassen und in 0,5 M TBE-Puffer bei 4°C aufbewahrt.

3.2.12 DNA-SPALTUNG UND MODIFIKATION

3.2.12.1 DNA-SPALTUNG MIT RESTRIKTIONSENZYMEN

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die kurze DNA-Abschnitte erkennen und DNA-Stränge durch hydrolytisches Öffnen der Phosphodiesterbrücken spalten. Sie schneiden doppelsträngige DNA an bestimmten Stellen innerhalb oder außerhalb dieser Erkennungssequenzen. Die Erkennungssequenzen sind in der Regel palindromisch aufgebaut und 4 bis 8 Basenpaare lang. In Abhängigkeit vom jeweiligen Restriktionsenzym entstehen bei der Verdauung von DNA glatte, bündige Enden (blunt-ends) oder bedingt durch die versetzten Schnittstellen komplementäre, einzelsträngige Enden. Sie besitzen eine spezifische Affinität zueinander und werden daher als kohäsive Enden (sticky-ends) bezeichnet. Restriktionsendonukleasen wirken abhängig von der Temperatur und der NaCl/KCl-Konzentration im Reaktionsansatz, so daß zu den käuflichen Restriktionsendonukleasen optimierte zehnfach konzentrierte Puffer vom Hersteller mitgeliefert werden. Bei gleichzeitigem Schneiden mit zwei Enzymen, die unterschiedliche optimale Pufferbedingungen benötigen, wurden die Bedingungen so gewählt, daß nach Herstellerangaben mindestens 80% der Enzymaktivität noch vorhanden war. Die Inkubationsdauer und die Enzymmenge wurde in diesen Fällen um 20% erhöht. Grundsätzlich wurde bei Restriktionsverdauung mit mehreren Enzymen (bei Ähnlichkeit der Zusammensetzung der beiden Puffer) zuerst mit dem Enzym geschnitten, welches die niedrigere Salzkonzentration erfordert. Nach Abschluß der ersten Verdauung wurde die Salzkonzentration an die Bedingungen des zweiten Enzyms angeglichen und die zweite Verdauung mit dem entsprechenden Enzym gestartet. Waren die Pufferbedingungen beider Enzyme gleich, so erfolgte die Restriktionsverdauung mit beiden Enzymen gleichzeitig, wobei darauf zu achten war, daß die Konzentration an Begleitsubstanzen nicht zu hoch wurde. Befanden sich gegenseitige Inhibitoren der Enzyme im Reaktionspuffer, wurde eine Phenolextraktion dazwischen geschaltet.

	analytisch	präparativ
dsDNA	1 bis 3 µg	bis zu 10 µg
Reaktionspuffer	1 x	1 x
BSA	je nach Enzym; 100 µg/ml	je nach Enzym; 100 µg/ml
ddH ₂ O	ad 20 µl	ad 100 µl
Enzym	1 bis 5 U	20 U

4 x DNA-Auftragspuffer	40 % (w/v)	Saccharose
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,1 M	EDTA (pH 7,5)

Für analytische Zwecke setzte sich der Restriktionsansatz in der Regel aus 1 bis 3 µg der zu schneidenden DNA, dem jeweiligen Restriktionsenzym und 1/10 Volumen des vom Hersteller

empfohlenen Puffers in einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammen. Falls erforderlich, wurde BSA in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugefügt. Die Menge an Restriktionsenzym, die eingesetzt werden mußte, ist über die Einheit „Unit“ (U) definiert und sollte 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten. Laut Definition verdaut 1 U Enzym vollständig 1 µg Lambda-DNA in einer Stunde bei der für das Enzym optimalen Temperatur.

Für präparative Zwecke wurden bis zu 10 µg DNA in einem Volumen von 100 µl analog der analytischen Restriktionsverdauung geschnitten. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 1 h wurde die enzymatische Verdauung durch Zugabe von 1/4 Volumen Auftragspuffer gestoppt und die unterschiedlichen Fragmentgrößen gelelektrophoretisch voneinander getrennt (vgl. 3.2.13.1).

Die Spaltung hochmolekularer DNA erforderte in der Regel eine Inkubationsdauer über Nacht (ca. 16 h). DNA-Agaroseblöckchen wurden zusätzlich zunächst 2 x 2 h in Spaltungspuffer äquilibriert und mit erhöhter Enzymmenge (50 – 300 U/halbes Blöckchen) versetzt.

Die weitere Verarbeitung des Ansatzes richtete sich nach dem Versuchsziel. Meist wurden die Fragmente der richtigen Länge im Anschluß an eine Agarose-Gelelektrophorese aus dem Gel eluiert (vgl. 3.2.15). Linearisierte Vektoren wurden z.T. auch durch Phenol/Chloroform-Extraktion (vgl. 3.2.15.2 und 3.2.15.3) und anschließende Ethanol-Fällung (vgl. 3.2.15.4) aufgereinigt.

3.2.12.2 DEPHOSPHORYLIERUNG VON VEKTOREN

Bevor ein durch Restriktionsspaltung linearisiertes Vektorfragment zur Ligation eingesetzt werden konnte, wurden die 5'-Enden mit der Alkalischen Phosphatase (AP) dephosphoryliert. Durch die Dephosphorylierung wird eine Religation des Vektors verhindert, da die DNA-Ligase eine Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe an dem anderen Ende schließt und bei dephosphoryliertem 5'-Ende nicht wirksam werden kann. Eine Zirkularisierung des Vektors kann daher nur erfolgen, wenn er mit einem phosphorylierten Insert ligiert wird.

Die Dephosphorylierung konnte in den meisten Fällen direkt im Anschluß an die Restriktionsverdauung stattfinden. Dabei wurden zum Restriktionsansatz 1 U AP pro 5 µg DNA sowie der 10 x AP-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA) in einfacher Konzentration zugegeben und die Proben 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 500 mM EDTA und zehnmütiger Hitzeinaktivierung bei 70°C wurden die Enzyme durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt (vgl. 3.2.15.2 und 3.2.15.3). Die DNA wurde mit Ethanol gefällt (vgl. 3.2.15.4) und konnte dann zur Ligation eingesetzt werden.

3.2.12.3 LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN

Zum Einbau von DNA in einen Vektor wird die Eigenschaft der T4-DNA-Ligase genutzt, zwischen 3'-Hydroxyl-Enden und 5'-Phosphatgruppen in Gegenwart von ATP Phosphodiesterbindungen zwischen dem Vektor und der Fremd-DNA herzustellen. Der Einbau von DNA in einen Vektor verläuft dann am günstigsten, wenn das DNA-Fragment bei überstehenden Enden (sticky-ends) in einem dreifachen bzw.

bei glatten Enden (blunt-ends) in einem fünffachen molaren Überschuß vorliegt (MURRAY et al., 1979; WILSON und MURRAY, 1979). PCR-Produkte haben keine glatten Enden, sondern zeichnen sich durch je ein zusätzliches Adenosin an ihren 3'-Hydroxyl-Enden aus, das durch eine „template“-unabhängige Polymeraseaktivität der Taq-Polymerase angehängt wird. Diese überstehenden Enden werden bei der Klonierung von PCR-Produkten in den pGEM-T-Vektor ausgenutzt. Der Vektor besitzt an den 3'-Hydroxyl-Enden überhängende Thymidine, wodurch eine direkte Ligation nicht-modifizierter PCR-Produkte möglich ist.

10 × Ligationspuffer	300 mM	Tris-HCl (pH 7,8)
	100 mM	MgCl ₂
	100 mM	DTT
	10 mM	ATP
T4-DNA-Ligase	3 U/μl	

Insgesamt 100 ng DNA (pGEM-T-Vektor und PCR-Produkt im entsprechendem Verhältnis) wurden in einem 10 μl Reaktionsansatz mit 1 μl Ligationspuffer (10 ×) und 1 μl T4 DNA Ligase für 16 h bei 4°C inkubiert. Der Ansatz konnte ohne weitere Bearbeitung zur Transformation (vgl. 3.2.2.3) eingesetzt werden. Die Insertion der Fremd-DNA im Plasmid wurde durch das Erstellen eines Restriktionsmusters überprüft.

Bei der Ligation in andere Vektoren ist grundsätzlich darauf zu achten, daß die verwendeten DNA-Fragmente Überhänge haben, die zueinander passen. Dies ist bei glatten Fragmentenden immer der Fall, bei überhängenden Enden müssen die Überhänge von Vektor und Insert jedoch komplementär zueinander sein.

3.2.13 AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Die Gelelektrophorese ermöglicht es, geladene Moleküle entsprechend ihrer Größe und Konformation aufzutrennen. DNA-Moleküle sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit wird dabei durch die angelegte Spannung, die Konzentration der Agarose im Gel und die Temperatur beeinflusst. Durch Variation dieser Bedingungen bietet sich die Möglichkeit, für analytische oder präparative Zwecke eine bestmögliche Auftrennung von DNA-Fragmenten zu erhalten. Da die Laufstrecke der DNA-Moleküle umgekehrt proportional zum Logarithmus der Größe der Fragmente ist (HELLINGER, 1974), kann die Größenbestimmung mit Hilfe von DNA-Fragmenten bekannter Größe (DNA-Marker, vgl. 3.1.8) erfolgen.

3.2.13.1 KONVENTIONELLE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

4 x DNA-Auftragspuffer	40 % (w/v) 0,1 % (w/v) 0,1 M	Saccharose Bromphenolblau EDTA (pH 7,5)
Ethidiumbromid-Lösung	2 mg	in 600 ml A. bidest

Die Konzentration der Agarosegele richtet sich nach dem Größenbereich der aufzutrennenden DNA-Fragmente. In der Regel wurden 0,8% (w/v) bis 1% (w/v) Agarosegele zur Auftrennung von Fragmentgrößen von 20 kb bis 1 kb verwendet und bis zu 2,0% (w/v) Agarosegele für die Auftrennung von Fragmentgrößen von 1,5 kb bis 0,1 kb hergestellt. Dazu wurde je nach Größe des Gelträgers in 1 x TBE-Puffer (für die Auftrennung großer Fragmente oder über Nacht) oder 1 x TAE-Puffer (für die Auftrennung kleiner Fragmente) die entsprechend der Prozentzahl und Volumens berechnete Menge Agarosepulver unter Aufkochen im Mikrowellengerät gelöst. Nachdem die heiße Agaroselösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde sie auf einen mit einem Kamm bestückten Gelträger gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde der Kamm entfernt und das Gel in einer Horizontalelektrophorese-Kammer plziert und mit 1 x TBE oder 1 x TAE überschichtet. Der eingefügte Kamm formte Taschen, in welche die mit DNA-Auftragspuffer (4 x) versetzten Proben aufgetragen werden konnten. Als Längenstandard diente eine Marker-DNA (vgl. 3.1.8), die in Restriktionsfragmente bekannter Größe geschnitten war. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 40 bis 100 V je nach gewünschter Trennschärfe bis zur bestmöglichen Auftrennung der Fragmente durchgeführt. Danach wurde das Gel aus der Kammer genommen und für 10 bis 20 min in ein Ethidiumbromid-Färbebad gelegt. Anschließend konnte das Gel nach kurzem Abspülen mit Wasser unter UV-Licht analysiert werden. Die DNA-Fragmente werden dabei durch das eingelagerte Ethidiumbromid als fluoreszierende Banden sichtbar.

Bei einer präparativen Gelelektrophorese wurden größere Mengen an DNA auf das Gel aufgetragen. Die entsprechende Bande wurde auf dem UV-Schirm mit einem Skalpell möglichst rasch aus dem Gel ausgeschnitten, um eine Schädigung der DNA durch die UV-Strahlung zu vermeiden und anschließend aufgereinigt (vgl. 3.2.15).

3.2.13.2 PULSFELDGELELEKTROPHORESE

Zur Auftrennung von hochmolekularer DNA wurde von SCHWARTZ und CANTOR (1984) die Pulsfeldgelelektrophoresetechnik entwickelt. Hochmolekulare DNA bleibt bei konventionellen Elektrophoresetechniken in den Taschen der Gele liegen, da sie sich aufgrund ihrer Größe nur sehr langsam fortbewegt. Das Prinzip der Pulsfeldgelelektrophorese basiert darauf, daß die DNA sich durch das Gel aufgrund wechselnder Richtung des elektrischen Feldes im Zickzack bewegt. Dieser Vorgang ist im einzelnen jedoch noch ungeklärt und beruht auf empirischen Methoden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Sonderform der PFGE verwendet, die ROFAGE (ROtating Field Agarose Gel Electrophoresis).

Hierbei liegt das Gel unbeweglich in einer horizontalen, puffergefüllten und gekühlten Kammer, während die Elektroden beweglich sind und rotieren können. Der hier verwendete Rotaphor-Typ R23 der Firma Biometra (Göttingen) ermöglicht eine Auftrennung von DNA bis zu einer Größe von 5 Mb. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA wurden die Parameter der Auftrennung unterschiedlich gewählt und z.T. variiert.

Laufpuffer	Stammlösung	Ad 1 A. bidest	Verdünnung
TBE-Puffer	10 x	0,9 M Tris-Base, pH 8,3 0,9 M Borsäure 25 mM EDTA	1:40
Löning-Puffer	10 x	44 g Tris-HCl, pH 7,5 42 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 20 ml 0,5 M EDTA	1:30

Parameterliste	Dauer [h]	Intervall [s]	Winkel [°]	Spannung [V]	Temp. [°C]	Gelkonz. [%]	Puffer	Spannung bei Rotation
PI 4	21	12 ⇄ 2 lin	120 ⇄ 110 lin	130 ⇄ 90 log	10	0,75	Lön.	an
PI 5	21	12 ⇄ 2 lin	120 ⇄ 110 lin	180 ⇄ 120 log	13	0,9	TBE	an
PI 7	24	60 ⇄ 10 log	120 ⇄ 110 lin	180 ⇄ 120 log	13	0,9	TBE	aus
PI 9	24	100 ⇄ 10 log	120 ⇄ 110 lin	200 ⇄ 150 log	13	0,9	TBE	aus
PI 15	72	350 ⇄ 50 log	110 ⇄ 100 lin	120 ⇄ 50 lin	11	0,7	TBE	aus

PI - Parameterliste, lin - linear, log - logarithmisch, Temp. - Temperatur, Gel-konz. - Agarosekonzentration des Gels, Lön. - Löning-Puffer

Zunächst wurden Zellen in Agaroseblöckchen gegossen, um eine Scherung der hochmolekularen DNA zu vermeiden (vgl. 3.2.11.3.2) und die hochmolekulare DNA in den Blöckchen gewonnen. Die Blöckchen wurden anschließend entweder einer Restriktionsverdauung unterzogen oder unverdaut in die Taschen des Agarosegels gegeben. Die Konzentration des Agarosegels richtete sich nach der gewünschten Auftrennung und lag in der Regel bei 0,7 bis 0,9% (w/v) bei einem Volumen von 300 ml in 1:4 verdünnten 1 x TBE-Puffer oder 1 x Löning-Puffer. Die Agarose wurde bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht und im Wasserbad auf 50°C abgekühlt. Der Gelträger wurde spannungsfrei zusammengesetzt und mit geschmolzener Agarose sorgfältig abgedichtet. Nach Trocknen der Abdichtung wurde das Gel gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach ca. 45 min war das Gel erstarrt und der Kamm konnte

gezogen werden. Die DNA-enhaltenden Blöckchen wurden halbiert und sorgfältig luftblasenfrei in die Taschen des Gels überführt. Zudem wurden die DNA-Größenstandards YAC-WAY-4A, λ -HindIII und λ -Phagen-Konkatemere mit aufgetragen. Dabei durften zwischendurch keine Spuren des Gels frei bleiben, an den Enden freibleibende Spuren wurden mit Agarose gefüllt. Die Taschen wurden mit geschmolzener 1,5% LMP-Agarose abgedichtet, um ein Aufschwimmen der Blöckchen zu verhindern. Das Agarosegel wurde an seinen vier Seiten vom Gelträger mit einem Skalpell gelöst und der Gelrahmen abgenommen. Überstehende Agarosereste sowie die Agarose-Abdichtung wurden abgeschnitten, um Pufferbarrieren zu vermeiden. Die Eckspanner wurden aufgesetzt und das Gel auf dem Gelträger in die zuvor mit 2,4 l TBE-Puffer (1:40 verdünnter 10 x Puffer) bzw. Löning-Puffer (1:30 verdünnt) gefüllte und auf 11 bis 13°C gekühlte Gelelektrophoresekammer eingesetzt. Der die rotierenden Elektroden enthaltende Deckel wurde aufgesetzt und die entsprechend der gewünschten Auftrennung gewählten Parameter eingegeben. Nach einer Äquilibrationdauer von 10 bis 30 min wurde die Elektrophorese gestartet. In der Regel wurde die Elektrophorese *MluI*-verdauter DNA für 24 bis 36 h mit der Einstellung PI 9, unverdaute DNA für bis zu 72 h mit der Einstellung PI 15 durchgeführt. Für die Auftrennung kleinerer Fragmente wurden auch die Parametereinstellungen 4, 5 und 7 verwendet. Grundsätzlich zeigte der Rotaphor die Eigenschaft, die DNA nicht so weit aufzutrennen, wie in dem Handbuch zur Benutzung angegeben, daher wurde z.T. bei sonst gleicher Einstellung die Auftrenndauer um bis zu $\frac{1}{3}$ verlängert. Nach Ende der Auftrennung wurde das Gel der Kammer entnommen, die eckständigen Agarose-Füßchen abgeschnitten und für 30 min im frisch angesetzten Ethidiumbromidbad (vgl. 3.1.5) gefärbt. Anschließend wurde das Gel kurz mit Wasser abgespült, auf die minimale Größe zurecht geschnitten und zusammen mit einem Lineal unter UV-Licht fotografiert. Hierbei blieb das Gel bis zu 15 min unter UV-Licht liegen, da die entstehenden DNA-Schäden den nachfolgenden Transfer auf Membranen (vgl. 3.2.14) erleichterten.

3.2.13.3 NICHT DENATURIERENDE POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE ZUR DARSTELLUNG VON MONONUKLEOSOMEN UND OLIGONUKLEOTIDEN

Zur Auftrennung sehr kleiner DNA-Fragmente (wie zur Darstellung von DNA aus Mononukleosomen) und Oligonukleotide wurden auch 15% 1 x TBE-Polyacrylamidgele verwendet. Die Herstellung des Gels erfolgte durch Mischen von 15 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid-Lösung mit 3 ml 10 x TBE-Puffer und 12 ml A. bidest. Zum Starten des Polymerisationsprozesses wurden 200 μ l 10% (w/v) APS und 10 μ l TEMED zugegeben. Die Lösung wurde anschließend sofort zwischen zwei Glasplatten der Größe 10 x 10 x 0,1 cm gegossen und ein Taschenformer eingesteckt. Das Gel war nach knapp einer Stunde vollständig polymerisiert. Vor dem Auftragen wurde an das in die vertikale, 1 x TBE-gefüllte Gelapparatur eingespannte Gel ein Strom von 14 mA angelegt, anschließend die mit 1 x Auftragspuffer versetzten Proben in die Taschen pipettiert und dann für etwa 30 bis 45 min ein Strom von 16 mA angelegt. Das Gel wurde analog den Agarosegelen in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und die DNA-Fragmente - falls gewünscht - per ElektrobloTTing auf eine Membran transferiert (vgl. 3.2.25).

3.2.13.4 DNA-AUFTRENNUNG ÜBER NICK™-SÄULEN

Nick™-Säulen sind zur Auftrennung von markierten DNA-Fragmenten und freien Nukleotiden bzw. Oligonukleotiden geeignet. Die Säulen binden DNA verschiedener Größe unterschiedlich fest, so daß bei fraktionierter Elution der DNA von der Säule, die einzelnen Fragmente ihrer Größe entsprechend in den jeweiligen Fraktionen enthalten sind. Große Fragmente werden dabei in den ersten Fraktionen gebunden, kleine Fragmente und freie Nukleotide in den letzten Fraktionen, da sie besser an die Säulenmatrix binden. Für radioaktiv markierte DNA-Sonden wurde ein Elutionsprofil von neun Fraktionen erstellt, in dem die abgetrennten, relativ reinen, radioaktiv markierten DNA-Fragmente in Fraktion 2 und 3 und die Oligonukleotide und freien Nukleotide in den Fraktionen 6 bis 8 enthalten sind. Zur DNA-Auftrennung über die Nick-Säule wurde diese zweimal mit 1 ml 1 x TE-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf die Säule gegeben und mit jeweils 200 µl TE-Puffer für jede Fraktion nacheinander in neun Fraktionen eluiert. Zur Bestimmung des Elutionsprofils wurde ein Aliquot einer jeden Fraktion abgenommen und im Szintillationszähler gemessen.

3.2.14 TRANSFER VON DNA AUF NYLONMEMBRANEN (SOUTHERN-BLOT, SOUTHERN, 1975)

Nylonmembran QIAbrane		
HCl	0,25 N	
Denaturierungslösung	1,5 M	NaCl
	0,5 M	NaOH
Neutralisierungslösung	3,0 M	NaCl
	0,5 M	Tris-HCl, pH 7,2
	1 mM	EDTA
20 x SSC	0,3 M	NaCitrat
	3,0 M	NaCl
Nylonmembran Gene Screen™		
HCl	0,25 N	
Denaturierungslösung	0,6 M	NaCl
	0,4 M	NaOH
Neutralisierungslösung	1,5 M	NaCl
	0,5 M	Tris-HCl, pH 7,5
20 x SSC	0,3 M	NaCitrat
	3,0 M	NaCl



Um die über Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente vom Gel auf eine Nylonmembran zu transferieren, wurde ein Kapillarblot aufgebaut und mit dem sog. Salztransfer-Protokoll auf die Membran übertragen („geblottet“). Im Laufe der Arbeit wurde die Produktion der ursprünglich verwendeten Membran QIAbране der Firma Qiagen eingestellt. Daher wurde anschließend die Membran Gene Screen™ der Firma PALL über NEN™ Life Science Products bezogen. Die Protokolle beider Hersteller unterscheiden sich geringfügig, die Membranen zeigen jedoch die gleichen Eigenschaften. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt.

In Vorbereitung auf die Blotprozedur wurden konventionelle Agarosegele 20 min und hochmolekulare DNA enthaltende Gele 30 min in 0,25 N Salzsäure geschwenkt, mit A. dest abgespült, um überschüssige Säure zu entfernen, anschließend zweimal für 15 min in Denaturierungspuffer denaturiert und 30 min bis 1 h in Neutralisierungslösung geschwenkt. Die auf die Größe des Gels zurecht geschnittene Membran wurde mit A. dest befeuchtet und 15 min in 10 x SSC-Puffer äquilibriert.

Der Kapillarblot wurde in einer Wanne aufgebaut. Er bestand aus drei Lagen von in 10 x SSC eingeweichten Schwammtüchern, auf denen luftblasenfrei drei Lagen dickes, ebenfalls in 10 x SSC eingeweichtes Filterpapier aufgelegt wurden, dann folgte ebenfalls luftblasenfrei das vorbehandelte Agarosegel, dessen Ränder sorgfältig mit Frischhaltefolie abgedeckt wurden. Auf das Gel wurde wiederum luftblasenfrei die äquilibrierte Nylonmembran gelegt. Auf die Nylonmembran folgten drei weitere Schichten 10 x SSC-getränktes, dickes Filterpapier. Zum Ansaugen des Puffers durch Kapillarkräfte dienten einige Schichten Papiertücher, die mit einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert waren. Nach Zugabe von reichlich 10 x SSC in die Wanne wurde der Transfer der DNA auf die Nylonmembran über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag wurde der Kapillarblot abgebaut, die Maße und die Taschen des Gels auf der Filtermembran mit schwarzem Kugelschreiber markiert, das Gel für 30 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt, um die Vollständigkeit des Transfers zu überprüfen und die Nylonmembran QIAbране für etwa 45 min an der Luft getrocknet. Die transferierte DNA wurde mit 1.200 µJoule UV-Licht auf der Membran vernetzt. Die Gene Screen Membran wurde dagegen noch 1 min in 0,4 N NaOH gegeben, um die DNA zu denaturieren, und 1 min in 0,2 M Tris-HCl, pH 7,5 und 1 x SSC neutralisiert, noch feucht vernetzt und erst anschließend getrocknet.

3.2.15 ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN

QIAEx® II Gel Extraktions-Kit	
	Glasmilchsuspension
	QX1-Puffer
	PE-Puffer

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente durch die Gelelektrophorese (vgl. 3.2.13.1) ist es möglich, einzelne Banden, d.h. einzelne DNA-Fragmente, zu isolieren (DRETZEN et al., 1981), um sie weiter zur Subklonierung oder radioaktiven Markierung einsetzen zu können (vgl. 3.2.18). Es wurde der QIAEx® II Agarose-Gel-Extraktions-Kit der Firma QIAGEN (Hilden) benutzt. Das Gelstück mit dem entsprechenden DNA-Fragment wurde unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und ausgewogen. Für jeweils 100 mg Agarose wurden 300 µl QX1-Puffer zugegeben. Bei Fragmentlängen unter 100 bp wurden pro 100 mg Agarose 600 µl QX1-Puffer zugegeben.

Die QIAEX II-Glasmilchsuspension wurde auf einem Vortex-Gerät resuspendiert und 10 µl zum Ansatz pipettiert. Der Ansatz wurde gemischt und dann für 10 min bei 50°C inkubiert. Während der Inkubationszeit bindet die DNA an die Glasmilchpartikel der QIAEX II-Suspension. Anschließend wurde die Probe in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (13.000 UpM, 1 min, RT), der Überstand abgesaugt und das Sediment mit 500 µl QX1-Puffer gewaschen, um Agarosereste zu entfernen. Dann wurde wie zuvor zentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Anschließend wurde das Sediment zweimal mit PE-Puffer gewaschen, um die durch den QX1-Puffer eingebrachten Salze auszuwaschen.

Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand vollständig entfernt, das Sediment 10 bis 15 min an der Luft getrocknet, dann in 20 µl Tris-HCl (pH 8,5) gelöst und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (12.000 UpM, 3 min, RT) und der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden noch einmal 20 µl Tris-HCl (pH 8,5) zum Sediment gegeben und die letzten Schritte wiederholt. Die Eluate wurden vereinigt. Zur Konzentrationsabschätzung wurde ein Aliquot der gelösten DNA auf ein 1 % (w/v) Agarose-Gel (vgl. 3.2.13.1) aufgetragen und mit der Konzentration der mit aufgetragenen Marker-DNA verglichen.

3.2.15.1 AUFREINIGUNG, FÄLLUNG UND KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA

3.2.15.2 PHENOLEXTRAKTION

Durch eine Extraktion mit Phenol/Chloroform können Proteine, Membranen und weitere hydrophobe Kontaminanten aus einer DNA-Lösung entfernt werden. Zur Extraktion wurde die DNA-Lösung mit ½ Volumen Phenol (TE-gepuffert) und ½ Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und auf einem Vortex-Gerät gemischt. Um die Phasentrennung zu erreichen, erfolgte ein 5 min Zentrifugationsschritt in einer Tischzentrifuge (13.000 UpM, 5 min, RT). Die DNA-haltige wässrige Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang wiederholt. Anschließend

wurde die DNA zweimal mit je 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA konnte dann wie unter 3.2.15.4 beschrieben aus der wäßrigen Oberphase gefällt werden.

3.2.15.3 CHLOROFORM/ISOAMYLAL KOHOL-EXTRAKTION/SEVAG-EXTRAKTION

Zur Reinigung der DNA aus Zellen reichte in der Regel die Sevag-Extraktion aus. Hierbei wurde die wäßrige DNA-Lösung mit 3 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) auf einem Vortex-Gerät gut gemischt und zur Phasentrennung 2 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem die Extraktion wiederholt wurde. 95% der wäßrigen Phase wurden sorgfältig abgenommen, wobei darauf geachtet wurde, daß weder die Interphase, noch die organische Phase mit überführt wurde. Die so erhaltene DNA-Lösung wurden anschließend einer Ethanol-Präzipitation unterzogen.

3.2.15.4 ETHANOL-PRÄZIPITATION

Durch eine Ethanol-Fällung kann DNA von Salzen und freien Nukleotiden gereinigt werden. Dabei wird die Konzentration einwertiger Kationen durch die Zugabe von Natriumacetat erhöht und so die Abstoßung der negativen Ladungen des Phosphodiester-Rückgrats verringert. Die Fällung der DNA wird dann durch einen Lösungsmittelentzug bei Zugabe von Ethanol möglich.

Zur DNA-Präzipitation wurde der Reaktionsansatz mit 0,1 Volumen 3M NaAc, pH 4,8 und 3 Volumen 100% Ethanol gemischt und bei -20°C über Nacht oder 2 h bei -70°C gefällt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 20 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierte DNA mit 3 Volumen 70% Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die DNA im Reaktionsgefäß in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen A. bidest oder 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 aufgenommen.

3.2.15.5 ISOPROPANOL-PRÄZIPITATION

Die Fällung mit Isopropanol erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die Ethanol-Fällung. Für eine Fällung mit Isopropanol sind allerdings schon 0,7 bis 1 Volumen Isopropanol ausreichend. Daher ist die Isopropanolfällung von Vorteil, wenn aus großen Volumina DNA gefällt werden soll.

Nach der Zugabe des Isopropanols wurden die Flüssigkeiten gemischt und dann sofort zentrifugiert (14.000 UpM, 30 min, 4°C). Anschließend wurde die DNA wie nach einer Ethanol-Fällung mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) oder A. bidest aufgenommen.

3.2.15.6 DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DURCH UV-SPEKTROMETRIE

Die Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren ist einerseits durch photometrische Analyse, andererseits durch eine Ethidiumbromid-Fluoreszenzabschätzung möglich.

Die photometrische Analyse erfolgte im Spektralphotometer (Ultrospec[®]3000; PHARMACIA, Freiburg) mit einer Quarzküvette. Zu jeder Messung wurde ein Referenzwert ermittelt (Messung der Lösung, in der die Probe gelöst ist: TE-Puffer oder A. bidest). Die Messung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt, weil das Absorptionsspektrum der Nucleotide AMP und UMP ein Maximum bei 260 nm besitzt. Bei allen Proben wurde zusätzlich die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum der Aminosäure Tryptophan. Über den Quotienten aus beiden Extinktionen (260 nm/280 nm) kann die Verunreinigung der Nucleinsäurelösung durch Proteine ermittelt werden. Im optimalen Fall sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen (MANIATIS, 1985).

3.2.15.7 DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DURCH GELTITRATION

Eine weitere Methode der Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren ist die „Geltitration“. Dabei wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 3.2.13.1) mit einem Aliquot der zu untersuchenden DNA-Lösung und einem Längenstandard bekannter Konzentration durchgeführt. Nach Inkubation im Ethidiumbromid-Bad wurde die Leuchtintensität der Banden unter dem UV-Licht verglichen und die Konzentration der DNA abgeschätzt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß nur geringe Mengen DNA benötigt werden und auch sehr geringe Mengen (≥ 10 ng) DNA nachgewiesen werden können.

3.2.16 VERVIELFÄLTIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN DURCH PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine schnelle Methode, um *in vitro* ein bestimmtes DNA-Fragment enzymatisch zu vervielfältigen (SAIKI et al., 1985).

Der Reaktionsansatz setzt sich aus der zu vervielfältigenden doppelsträngigen DNA, zwei einzelsträngigen Oligonucleotid-Primern (sense und antisense) sowie einer entsprechenden Menge Desoxyribonucleosid-Triphosphaten (dNTPs) zusammen. Weiterhin wird ein Enzym, die thermostabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen marinen Mikroorganismus *Thermus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase), zur DNA-Synthese benötigt. Die Primer-Konzentration ist um ein Vielfaches höher als die Konzentration der zu amplifizierenden DNA. Der Vervielfältigungsprozeß unterliegt drei aufeinanderfolgenden Temperaturschritten, welche für jeden Amplifikationsprozeß optimiert werden müssen und in einem programmierbaren Thermocycler ablaufen. Der erste Schritt dient der Denaturierung der doppelsträngigen DNA. Das Prinzip der PCR-Reaktion besteht aus Anlagerung (*annealing*) und Verlängerung (*elongation*) der beiden Primer, die gegenläufig an die komplementären DNA-Stränge binden und den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C. Nach einem Absenken der Temperatur auf die

Annealingtemperatur, die von den verwendeten Primern abhängig ist, hybridisieren die Primer an die komplementären Sequenzabschnitte. In der *Elongationsphase* verlängert die DNA-Polymerase bei 72°C die Primer komplementär zur Matrize. Es entstehen zwei doppelsträngige Produkte, die exakt der Länge der Primer und der elterlichen DNA zwischen ihnen entsprechen. Jeder Strang ist erneut komplementär zu einem der beiden Primer. Beim Eintritt in den nächsten Zyklus werden Matrize und neu synthetisierter Strang durch Hitzedenaturierung voneinander getrennt und dienen beide als Matrize. Durch aufeinanderfolgende PCR-Zyklen kann die durch die beiden Primer flankierte Sequenz so exponentiell amplifiziert werden. Da für die PCR hitzestabile DNA-Polymerasen wie z.B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet werden, können die DNA-Doppelstränge bei 94°C denaturiert werden, ohne eine irreversible Schädigung der Polymerase zu verursachen.

Eine ideale Polymerase-Kettenreaktion zeichnet sich durch hohe Spezifität, Ausbeute und Genauigkeit aus. Jeder dieser drei Parameter wird durch die zahlreichen Einzelkomponenten der PCR beeinflusst. In diesem Zusammenhang fallen vor allem die Pufferbestandteile, die Amplifikationsbedingungen, insbesondere die „Annealing“-Temperatur, die abhängig von der Schmelztemperatur (T_m) der jeweiligen Primer ist, und die Qualität der Polymerase (CHA und THILLY, 1993) ins Gewicht.

3.2.16.1 AMPLIFIKATION AUS GENOMISCHER DNA

Aus genomischer DNA wurde die DNA für die Sau3A-Repeat-Sonde (aus den Primern OW154 und 155, DUNHAM et al., 1992), für die HPRT-Gen-Sonden DXS10 (aus OTE11 und OTE12) und DXS86 (aus OTE13 und OTE14) amplifiziert (MORRIS et al., 1993). Während das PCR-Produkt für die Sau3A-Repeat-Sonde direkt verwendet wurde, wurden die übrigen in den pGEM-T-Vektor subkloniert.

DNA-Matrize	0,1 bis 1 µg	in A. bidest oder 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
Oligonukleotidprimer	100 pmol/µl	in A. bidest
dNTP-Lösung	2 mM	dATP
	2 mM	dGTP
	2 mM	dCTP
	2 mM	dTTP
10 x Reaktionspuffer	0,1 M	Tris-HCl (pH 8,3)
	0,5 M	KCl
	15 mM	MgCl ₂
	1 mg/ml	Gelatine
Red Taq™ Polymerase	3 U/µl	

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 100 µl durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 100 bis 1.000 ng DNA-Matrize, je 200 pmol Primer, 5 µl dNTPs (2 mM), 10 µl 10 x Puffer und 3 U

Red Taq™ Polymerase eingesetzt. Zudem wurde eine Negativkontrolle ohne DNA-Matrize vervielfältigt. Die Proben wurden in den auf 95°C vorgeheizten PCR-Block gestellt. Die Amplifizierung der gewünschten DNA erfolgte nach 5 min Vordenaturierung unter folgenden Bedingungen:

		Denaturierung	Annealing	Elongation	
Sau3A- Repeat- Sonde		30 Zyklen			
	92°C 3 min	92°C 50 s	64°C 2 min	72°C 3 min	4°C ∞
DXS10/ DXS86		30 Zyklen			
	94°C 5 min	94°C 30 s	55°C 50 s	72°C 2 min	72°C 7 min

Durch eine 7 min Nachelongation wurden unvollständige Abbruchfragmente vervollständigt.

3.2.16.2 AMPLIFIKATION AUS c-DNA

Aus 1,3 µg c-DNA (zur Verfügung gestellt von Dr. Meergans, Konstanz) wurde in der vorliegenden Arbeit die MLL-bcr-Sonde mit den Primern OTE1 und OTE2 amplifiziert und im pGEM-T-Vektor subkloniert. Die Zusammensetzung des Ansatzes entspricht der unter 3.2.16.1 für genomische DNA beschriebenen.

	Denaturierung	Annealing	Elongation	
	25 Zyklen			
94°C 5 min	94°C 1 min	53°C 1 min 30 s	72°C 1 min 30 s	72°C 8 min

3.2.16.3 AMPLIFIKATION AUS BAKTERIENKOLONIEN

Prämix 1 (pro Klon 20 µl)	3 µl	Uni-Primer	[50 pmol]
	3 µl	Rev-Primer	[50 pmol]
	10 µl	A. bidest	
	2 µl	Reaktionspuffer	10 x
	2 µl	dNTPs	2,5 mM
Prämix 2 (pro Klon 2 µl)	0,5 µl	Taq-Polymerase (TaKaRa)	5 U/µl
	1 x	Reaktionspuffer	10 x

Zur schnellen Überprüfung von Bakterienklonen wurden anstelle der analytischen minipräparativen Plasmidisolierung diese mit einem sterilen Zahnstocher angepickt und in einem 20 µl Prämix 1 kurz

umgerührt, zum Aufschluß der Bakterien 3 min bei 95°C inkubiert, 2 µl Prämix 2 zugesetzt und einer PCR mit den folgenden Parametern unterzogen:

Denaturierung	Annealing	Elongation
25 Zyklen		
95°C	55°C	72°C
3 s	40 s	60 s

Anschließend wurde die amplifizierte DNA auf einem 2% TBE-Agarosegel analysiert (vgl. 3.2.13.1).

3.2.16.4 AMPLIFIKATION OHNE DNA-MATRIZE

Eine Amplifikation ohne DNA-Matrize wurde für die Herstellung der Telomer-Repeat-Sonde verwendet. Hierbei wurden lediglich die Primer OAM1 und OAM2 aneinander gehängt. Die besten Ergebnisse erzielte die Verwendung der Taq-Polymerase der Firma Gibco BRL. Die erhaltene DNA wurde 1:5 verdünnt weiter verwendet (nach IJDO et al., 1991).

PCR 1	10 Zyklen			
	94°C 5 min	94°C 1 min	55°C 30 s	72°C 1 min
PCR 2	30 Zyklen			
	94°C 1 min	60°C 30 s	72°C 90 s	72°C 5 min

3.2.16.5 REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN

Die PCR-Produkte wurden entweder über ein präparatives Agarose-Gel (vgl. 3.2.13.1) oder mit dem QIAquick® PCR Purification-Kit aufgereinigt.

Im QIAquick® PCR-Purification-Kit sind enthalten:	
	PB-Puffer PE-Puffer (vor Gebrauch mit 100% Ethanol versetzen) EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) QIAquick® Spin Säulen

Mit dem QIAquick® PCR Purification-Kit können PCR-Produkte zwischen 100 bp und 10 kb von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen gereinigt werden. Zur Aufreinigung wurden 5 Volumen PB-Puffer zu

1 Volumen PCR-Ansatz gegeben und gemischt. Dann wurde die Probe auf eine QIAquick-Säule pipettiert und der Ansatz in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (13.000 UpM, 1 min, RT). Der Durchfluß wurde verworfen und das Säulchen in dasselbe Reaktionsgefäß zurückgestellt. Die DNA wurde mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Der Durchfluß wurde erneut verworfen und das Säulchen in das Reaktionsgefäß zurückgestellt. Es wurde noch einmal 1 min zentrifugiert, um alle Ethanolreste zu entfernen.

Dann wurde das Säulchen in ein sauberes Reaktionsgefäß gestellt. Zur Elution der DNA wurden 30 µl EB-Puffer in die Mitte der Säule pipettiert, 1 min inkubiert und erneut zentrifugiert. Der Durchfluß enthielt das gereinigte PCR-Produkt und konnte direkt zur Ligation oder zur Restriktionsverdauung weiter verwendet werden.

3.2.17 SEQUENZIERUNG VON DNA MIT DEM AUTOMATISCHEN DNA SEQUENZIERER

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA wurde mit dem DNA-Sequenzierungsgerät der Firma ABI (Modell 373 A) durchgeführt. Es wurde die „Taq-Dye DeoxyTM Terminator-Cycle-Sequencing“-Methode entsprechend der Herstellervorschrift angewendet. Bei dieser Methode werden vier mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP, Dye DesoxyTM Terminatoren) mit nicht markierten Desoxynukleosidtriphosphaten gemischt. Die DNA-Matrize wird von einem Oligonukleotid ausgehend durch zyklisches Denaturieren, Anlagern und Synthetisieren immer wieder abgeschrieben. Die so entstandenen, am 3'-Ende mit basenspezifischen Farbstoffen markierten Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und durch ihre Fluoreszenz im Gel nachgewiesen.

3.2.17.1 VORBEREITUNG DES 4% (w/v) POLYACRYLAMID-DNA-SEQUENZIERGELS

Harnstoff		
30% Acrylamidlösung	29:1 % (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung Die Lösung wurde filtriert und in einer lichtgeschützten Flasche bei 4°C gelagert.
APS	10 % (w/v)	
TEMED		
Alconox		
Isopropanol		

Die Glasplatten wurden mit einem Detergens (Alconox) gewaschen, mit H₂O_{bidest.} gespült, mit Isopropanol nachbehandelt und danach getrocknet. Zwischen die trockenen Platten wurden die Abstandhalter gelegt. Für das 4% (w/v) Polyacrylamid-Gel wurden 30 g Harnstoff eingewogen mit 8 ml Acrylamidlösung und

6 ml TBE-Puffer (10 ×) versetzt und auf 60 ml Gesamtvolumen mit H₂O_{bidest.} aufgefüllt. Der Harnstoff wurde durch Rühren und Erwärmen (nicht über 37°C) gelöst und die Lösung danach durch einen Filter (0,2 µm) filtriert und entgast. Die Lösung wurde in ein Becherglas überführt und die Polymerisationsreaktion durch Zugabe von 350 µl APS und 20 µl TEMED gestartet. Die Lösung wurde sofort zwischen die Glasplatten gegossen und ein Kamm zur Bildung der Auftragstaschen eingesetzt. Das Gel polymerisierte 2 h in horizontaler Lage.

3.2.17.2 SEQUENZIERUNGSREAKTION

5 × Terminator Ammonium Cycle Sequencing Puffer (TACS)	400 mM 10 mM 100 mM	Tris-HCl MgCl ₂ (NH ₄) ₂ SO ₄ Die Lösung wurde vom Hersteller mitgeliefert.
dNTP-Mix	150 µM 150 µM 150 µM 150 µM	dATP dCTP dGTP dTTP Die Lösung wurde vom Hersteller mitgeliefert.
Dye Desoxy Terminatoren	900 µM 450 µM 15 µM 4 µM	A Dye Desoxy TM Terminator ddA ^m TP C Dye Desoxy TM Terminator ddC ^m TP G Dye Desoxy TM Terminator ddG ^m TP T Dye Desoxy TM Terminator ddT ^m TP m = Fluoreszenzmarkierung Die Lösung wurde vom Hersteller mitgeliefert.
Die Konzentration der Desoxynukleotide wird unterschiedlich gewählt, da diese durch die Ankopplung eines Farbstoffes mit verschieden hoher Effizienz von der Polymerase eingebaut werden. Die angegebenen Konzentrationen gewährleisten, daß die Desoxynukleotide zu gleichen Anteilen in den synthetisierten DNA-Fragmenten vorkommen.		
Oligonukleotidprimer	10 pmol	
Ampli Taq TM DNA- Polymerase	4 U/µl	

Sequenzier-/Terminations-Mix:	
5 x TACS Puffer	4 µl
dNTP-Mix	1 µl
Dye Desoxy A ddA ^m TP	1 µl
Dye Desoxy T ddT ^m TP	1 µl
Dye Desoxy G ddG ^m TP	1 µl
Dye Desoxy C ddC ^m TP	1 µl
Ampli Taq TM DNA-Polymerase	0,5 µl

Zur Durchführung der Sequenzierungsreaktion wurden 0,5 bis 1 µg DNA-Matrize (Plasmid-Doppelstrang) mit 10 pmol Sequenzier-Primer und 8 µl Terminationsmix/Sequenzier-Mix mit A. bidest auf ein Endvolumen von 20 µl eingestellt. Dieses Gemisch wurde für 25 Zyklen in einem Perkin-Elmer TC1 Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert :

Denaturierung	Annealing	Elongation
25 Zyklen		
96°C 30 s	50°C 15 s	60°C 4 min

Dabei entstanden durch die Kettenabbrüche bei Einbau eines Dideoxynukleotids viele unterschiedlich lange fluoreszenzmarkierte DNA-Einzelstrang-Fragmente.

3.2.17.3 PROBENREINIGUNG, AUTOMATISCHE SEQUENZIERUNG UND EDV-GESTÜTZTE AUSWERTUNG

NaAc	3 M	pH 3,8
EDTA-Lösung	25 mM	pH 8,0
Formamid-Lösung	100 % (w/v)	
Formamid-EDTA-Lösung	1 Teil 5 Teile	Formamid-Lösung EDTA-Lösung Die Lösungen wurden gemischt und bei 4°C gelagert.
Ethanol	70 %	RT

Die DNA wurde im Anschluß an die PCR mit A. bidest auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und dann durch Zugabe von 10 µl 3 M NaAc und 250 µl absolutem Ethanol (RT) und anschließende Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (14.000 UpM, 15 min, 4°C) gefällt. Die DNA wurde mit 250 µl 70% (v/v) Ethanol

gewaschen, 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und dann in 3 µl Formamid/EDTA-Lösung aufgenommen. Die DNA wurde 2 min bei 90°C denaturiert und auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Oligonukleotide wurden durch Hochspannungselektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die vier unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffgruppen, die jeweils an ein bestimmtes Desoxynukleotid gekoppelt waren, wurden durch einen 40 mW Argon-Laser (488 nm und 514 nm) angeregt. Die Fluoreszenzsignale wurden durch ein Detektorsystem des DNA-Sequenzierungsgeräts anhand ihrer unterschiedlichen Emissionswellenlängen identifiziert. Die Gelelektrophorese und Auswertung des Gels erfolgten durch Laserscannerabtastung in einem ABI-Sequencer Modell 373 A und wurde von Andreas Nolte am Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie (Universität Göttingen) durchgeführt.

3.2.18 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA MIT DER RANDOM-PRIME-METHODE (FEINBERG UND VOGELSTEIN, 1983)

Mit dieser Methode werden DNA-Sonden synthetisiert, die über ihre gesamte Länge radioaktiv markiertes dCTP enthalten. Die so hergestellten Sonden weisen eine sehr hohe spezifische Aktivität auf. Feinberg und Vogelstein (1983) führten zur DNA-Synthese die Verwendung von Hexanukleotid-Primern unterschiedlicher Sequenz ein und erreichten damit eine Initiation des Synthesevorgangs an jeglicher DNA zufällig verteilt über die gesamte Länge der eingesetzten DNA-Matrize. Die DNA-Synthese erfolgt durch das Klenow-Fragment der bakteriellen DNA-Polymerase I aus den nicht radioaktiven Nukleotiden dATP, dTTP, dGTP und dem radioaktiven Nukleotid dCTP. Als Reaktionsprodukt entsteht ein Gemisch von unterschiedlich langen, radioaktiv markierten DNA-Strängen, die jeweils mit einem Teilabschnitt der komplementären Matrize gepaart vorliegen. Die Einzelstränge werden durch Hitzedenaturierung erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Markierung der DNA-Sonde mit radioaktivem 5' [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP der Redi-Prime-Markierungskit der Firma Amersham benutzt, der im Unterschied zu der von Feinberg und Vogelstein beschriebenen Methode 9mere als random-Primer enthält.

redi-Prime-Markierungskit (lyophilisierter Enzym-Prämix)	9mer random-Primer Klenow-Enzym dATP, dGTP, dTTP	exonukleasefrei
5' [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP	20 µCi	(4.000 Ci/mmol)
DNA-Matrize	bis zu 100 ng	

Zur DNA-Synthese wurden ca. 25 bis 100 ng einer DNA-Matrize in 45 µl TE-Puffer gelöst. Die DNA wurde 5 min bei 95°C denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Der Enzym-Prämix des redi-Prime-Markierungskits wurde mit 5 µl 5' [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP und der denaturierten DNA-Matrize gemischt. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend über eine NickTM-Säule aufgereinigt (vgl. 3.2.13.4).

3.2.19 RADIOAKTIVE ENDMARKIERUNG VON DNA MIT DER T4-POLYNUKLEOTIDKINASE (MAXAM und GILBERT, 1977)

Die T4-Polynukleotidkinase katalysiert die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf 5'-OH-Gruppen von RNA- und DNA-Molekülen. Eine radioaktive Markierung wird durch Einsatz von 5' [γ^{32} P]-ATP erreicht. In dieser Arbeit wurden die Oligonukleotidsonden het266, het405 und LINE auf diese Weise radioaktiv markiert.

T4-Polynukleotidkinase			1 μ l
10 x Kinasierungspuffer	70 mM 10 mM 5 mM	Tris-HCl, pH 7,6 MgCl ₂ DTT	1 x ad 20 μ l
5' [γ^{32} P]-ATP			10 pmol (3,5 μ l)
Einzelsträngiges Oligonukleotid (het266, het405 und LINE)			4 bis 7 pmol

Es wurde ein Reaktionsansatz mit 4 bis 7 pmol eines einzelsträngigen Oligonukleotids mit 2 μ l 10 x T4-Polynukleotidkinasepuffer, 10 pmol [γ^{32} P]-ATP (gelöst in 3,5 μ l) und 1 μ l T4-Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 20 μ l hergestellt. Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 20 min, um die Reaktion zu stoppen. Die markierten Oligonukleotide wurden direkt im Anschluß über das QIAquick® Nucleotide-Removal-Kit (Qiagen) aufgetrennt.

Im QIAquick® Nucleotide Removal-Kit sind enthalten	
	PN-Puffer PE-Puffer EB-Puffer Spin-Cups

Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 200 μ l PN-Puffer gemischt und auf ein Spin-Cup pipettiert. Die Probe im Spin-Cup wurde in einem 2 ml Gefäß für 1 min bei 6.000 UpM zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die Probe zweimal mit 500 μ l PE-Puffer gewaschen und nach jedem Waschschrift für 1 min bei 6.000 UpM zentrifugiert. An den zweiten Waschschrift schloß sich eine weitere Zentrifugation für 1 min bei 13.000 UpM an. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Anschließend wurde die Probe im Spin-Cup in ein 1,5 ml Gefäß gegeben. Die Oligonukleotide wurden mit 200 μ l EB-Puffer für 1 min bei 13.000 UpM eluiert.

3.2.20 RADIOAKTIVE HYBRIDISIERUNG MEMBRANGEBUNDENER DNA

Um aus der Menge der auf eine Membran transferierten DNA die gewünschte(n) zu erkennen, kann die DNA mit einer radioaktiv markierten ss-Nukleinsäure (vgl. 3.2.18 und 3.2.19) bekannter Sequenz hybridisiert werden. Die dabei gewählte Temperatur bedingt das Maß der Spezifität, mit der die radioaktiv markierte DNA (Sonde) ihre komplementäre DNA auf der Membran erkennt.

Hybridisierungspuffer 1	48 % (v/v)	Formamid, deionisiert
	4,8 x	SSC
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1 % (w/v)	SDS
	1 x	100 x Denhardt's (je 2% (w/v) BSA, Ficoll™, PVP)
	10 % (w/v)	Dextransulfat (bei 80°C in A. bidest lösen)
Hybridisierungspuffer 2	6 x	SSC
	10 mM	NaHPO ₄ , pH 6,8
	1 mM	EDTA, pH 8,0
	0,5 % (w/v)	SDS
	0,1 % (w/v)	Milchpulver
Waschpuffer 1	2 x	SSC
	0,1 % (w/v)	SDS
Waschpuffer 2	0,2 x	SSC
	0,1 % (w/v)	SDS
Waschpuffer 3	2 x	SSC
	0,01 % (w/v)	SDS
Waschpuffer 4	1 x	SSC
	0,01 % (w/v)	SDS
Waschpuffer 5	0,3 x	SSC
	0,01 % (w/v)	SDS

Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde der Blot mit 2 x SSC befeuchtet und für mind. 1 h mit ungefähr 10 bis 15 ml Hybridisierungslösung 1 pro 100 cm² Membranfläche bei 42°C in einem Hybridisierungsröhrchen (Biometra) im Hybridisierungsofen (Biometra) prähybridisiert. Die zu verwendende Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert, mit 1 ml Hybridisierungslösung 1 vermischt und in das Hybridisierungsröhrchen zum Blot gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über ca. 16 h im Hybridisierungsofen bei 42°C. Danach wurde der Blot zweimal 10 min bei Raumtemperatur in

Waschlösung 1 unter Rotation gewaschen. Abschließend wurde der Blot für mind. 30 min bei 65°C mit vorgewärmter Waschlösung 2 im Hybridisierungsröhrchen gewaschen. War die Membran nach dieser Waschprozedur noch sehr stark radioaktiv und ebenso der Waschpuffer, wurde der letzte Schritt wiederholt, bis der Waschpuffer frei von Radioaktivität war. Der Blot wurde in eine Folie eingeschweißt und auf einen PhosphorImager-Screen mindestens über Nacht, je nach Intensität der Markierung auch länger aufgelegt.

Ein etwas abgewandeltes Verfahren wurde zur Hybridisierung mit einer **Oligonukleotid-Sonde** verwendet. Der Blot wurde für 4 h bei 37°C prähybridisiert. Die Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde erfolgte mit Hybridisierungslösung 2 über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurde der Blot jeweils 10 min bei 37°C mit den Waschlösungen 3, 4 und 5 gewaschen. Anschließend wurde auch bei diesem Verfahren der Blot eingeschweißt und auf einen PhosphorImager-Screen aufgelegt.

Um die Membran erneut mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisieren zu können, wurde die vorige radioaktive Sonde so bald wie möglich durch Übergießen mit kochendem „Stripping“-Lösung (0,1% SDS-Lösung in A. dest) und nachfolgendem Abkühlen unter Bewegung auf einer Wippe entfernt. Dieser Prozedur wurde so oft wiederholt, bis keine Radioaktivität mehr meßbar war. Grundsätzlich wurden die Membranen, sobald sie radioaktiv hybridisiert worden waren, immer in feuchtem Zustand eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt. Sollten die Membranen längere Zeit gelagert werden, um später wieder für die Hybridisierung verwendet zu werden, so wurden sie mit 0,01% Thimerosal-Lösung in 2 x SSC befeuchtet, eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

3.2.21 MAR-SUCHE NACH DEM „TOPOISOMERASE-MEDIATED LOOP EXCISION PROTOCOL“ (FAJKUS et al., 1998)

Agaroselösung	1,5 % (w/v)	LMP-Agarose in PBS, aufgekocht und abgekühlt auf 42°C
Lysispuffer	0,2 % 2 M 2 mM 1 mM 20 mM	Nonidet P-40 (frisch zugeben) NaCl EDTA PMSF (frisch zugeben) Tris-HCl, pH 7,5
Waschpuffer	20 mM 0,1 mM 50 mM 10 mM	Tris-HCl, pH 7,5 EDTA KCl MgCl ₂
Spaltungspuffer	20 mM 0,1 mM 50 mM 10 mM 1 mM 20 - 80 µg/ml	Tris-HCl, pH 7,5 EDTA KCl MgCl ₂ ATP Teniposid in DMSO oder EtOH
Stoppuffer	0,4 M 1 % (w/v) 0,9 % (w/v) 500 µg/ml	EDTA, pH 8,0 SDS Sarkosin Proteinase K (frisch zugeben)
Lagerung in	0,1 M	EDTA

Je 1×10^7 Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 50 µl PBS aufgenommen und 1:1 mit 42°C warmer 1,5% LMP-Agarose in PBS gut gemischt und in einen einseitig mit Tesafilm abgedichteten Blöckchenformer gegossen (1 Blöckchen entspricht 100 µl Lösung) und für 5 min bei 4°C erstarren gelassen. Die noch weichen Blöckchen wurden in 20 ml gekühlten Lysispuffer gegeben und bei 4°C unter leichter Bewegung für 1 h inkubiert. Danach wurden die Blöckchen dreimal 30 min in je 20 ml Waschpuffer ebenfalls unter Bewegung bei 4°C gewaschen und in 2 ml Topoisomerase II-Spaltungspuffer unter Zusatz von Inhibitor (Teniposid oder Etoposid) gegeben und dort für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Austausch des Puffers mit 1 ml Stoppuffer gestoppt und die lysierten Zellen 36 h bei 55°C unter Bewegung inkubiert. Durch extensives Waschen mit 0,1 M EDTA-Lösung wurde der Stoppuffer entfernt und die Blöckchen anschließend einer zweimaligen, mehrstündigen Äquilibration mit Restriktionspuffer und einer Restriktionsverdauung über Nacht mit 50 bis 200 U Enzym pro 0,5 ml bei 37°C unterzogen (vgl. 3.2.11.3.2). Die verdauten Blöckchen konnten dann einer Pulsfeldgelelektrophorese unterzogen werden

(vgl. 3.2.13.2), die so aufgetrennte DNA auf Membranen transferiert (vgl. 3.2.14) und mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (vgl. 3.2.18) mittels indirekter Endmarkierung (vgl. Abbildung 32) hybridisiert (vgl. 3.2.20) und analysiert werden.

3.2.22 DER „*IN VITRO*“-VERSUCHSANSATZ MIT ISOLIERTEN KERNEN

Aus HL60-Zellen wurden wie unter 3.2.10.1 und 3.2.10.2 beschrieben Kerne und Zytoplasma extrahiert. Um apoptotisches Zytoplasma zu gewinnen, wurden die Zellen vorher für 4 h mit Topotecan behandelt (vgl. 3.2.3.7) und ihr Größenprofil im Zellzählgerät CASY vermessen (vgl. 3.2.3.5). Die frisch präparierten Extrakte wurden auf Eis je nach Ansatz 1:1 (sowie Variationen davon) gemischt, mit 10 µl Energiemix (zu gleichen Teilen aus Phosphokreatin, Kreatinkinase und ATP), 5 µl 100 mM DTT, 1 µl 1M MgCl₂ und je nach Ansatz mit jeweils neu auszumessender Menge an rekombinant exprimierter Caspase 3 (vgl. 3.2.23.1) versetzt und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zudem wurden Kontrollansätze (nur Zytoplasma mit HEPES-Puffer, nur Kerne mit PIPES-Puffer, nur Kerne und Zytoplasma ohne Caspase 3) über 2 h inkubiert. Die Reaktionen wurden nach verschiedener Dauer gestoppt, mit 5 µl 0,5 M EDTA versetzt und auf Eis gestellt.

Aus den Lösungen wurden sowohl die hochmolekulare (vgl. 3.2.11.3.2) als auch die niedermolekulare DNA (vgl. 3.2.11.3.1.2) gewonnen und analysiert (vgl. 3.2.13.2 und 3.2.13.1).

Arbeiten mit Proteinen

3.2.23 ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN

3.2.23.1 AUS HEFE: CASPASE-PRÄPARATION

3.2.23.1.1 EXPRESSION UND ISOLIERUNG

Puffer A (2 x)	50 mM 400 mM 0,5 mM 1 µg/ml 1 µg/ml 1 µg/ml 1 mM	Tris-HCl, pH 7,9 NaCl PMSF in Isopropanol Pepstatin Leupeptin Aprotinin Benzamidin	Zu 1 x Puffer A frisch zusetzen !
Tris-SO ₄	0,1 M	Tris-SO ₄ , pH 9,2	
Waschpuffer	50 mM 1 x je 1 µl/ml 10 µl/ml 5 µl/ml	Imidazol, pH 8,0 (mit HCl) Puffer A Pepstatin, Aprotinin, Leupeptin Benzamidin PMSF in Isopropanol	
Elutionspuffer 1	wie Waschpuffer, nur mit 150 mM Imidazol		
Elutionspuffer 2	wie Waschpuffer, nur mit 500 mM Imidazol		

50 ml SCD^{-Leu}-Medium wurden mit 2 bis 3 ml der transformierten Hefe pWA 337 angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (150 UpM) herangezogen. Am nächsten Tag wurden aus der Übernachtskultur 200 ml SCD^{-Leu}-Medium angeimpft und weiter bei 30°C kultiviert. Nach Erreichen einer OD_{600 nm} von 1,0 wurden 6 l SCGL^{-Leu}-Medium mit je 200 ml/l angeimpft und erneut über Nacht kultiviert. Nach Erreichen einer OD_{600 nm} von 1,0 wurden je 200 ml YPGA-Medium hinzugefügt und erneut für 3 h bei 30°C und 150 UpM inkubiert. Durch Zugabe von je 8 g Galaktose wurde die Bildung von Caspase 3 induziert. Nach weiteren 5 bis 6 h Inkubation (OD_{600 nm} von 1,2) wurden die Zellen durch Zentrifugation in einer Sorvall RC2-B-Zentrifuge bei 2.900 x g für 10 min sedimentiert, der Überstand erneut über Nacht inkubiert, der Niederschlag anschließend mit 40 ml kaltem 0,1 M Tris-SO₄ gewaschen und wiederum für 5 min bei 4.000 x g in einer Heraeus-Zentrifuge sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 2,5 ml gekühltem Puffer A mit Hilfe einer Impföse resuspendiert, mit 7 ml Glasperlen versetzt und je 4 x 1 min auf einem Vortex-Gerät bei höchster Leistungsstufe gemischt, der Überstand abgenommen und erneut je 4 x 30 s gemischt. Die Überstände wurden vereinigt und 5 min bei 2.000 UpM (Sorvall) zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation im SW41Ti-Rotor bei 30.000 UpM für 1 h unterzogen. Der so

gewonnene Überstand wurde auf eine vorbereitete Nickelmatrix gegeben und damit unter Bewegung für 2 bis 2,5 h bei 4°C inkubiert.

3.2.23.1.2 REINIGUNG ÜBER NICKELSÄULE

Die Lysat-Ni-NTA-Mischung wurde auf eine Säule gegeben und der Durchlauf nochmals aufgetragen. Die Säule wurde mit 20 ml Waschpuffer gewaschen und schließlich zunächst mit 5 ml 150 µM Elutionspuffer und danach mit 500 mM Elutionspuffer eluiert und in Fraktionen à 500 µl aufgefangen. Sowohl vom Durchlauf als auch vom Waschpuffer als auch von den einzelnen Fraktionen wurde ein Aliquot von jeweils 10 µl abgenommen und auf einem 12% SDS-Minigel analysiert (vgl. 3.2.24), transferiert (vgl. 3.2.25) und mit dem Tetra-His-Antikörper die exprimierte Caspase 3 immunchemisch nachgewiesen (vgl. 3.2.26.2). Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils mit 100 µl kaltem Glycerol versetzt, gemischt und bei -20°C aufbewahrt. Die Nickelsäule wurde anschließend bis zu fünfmal regeneriert.

3.2.23.2 AUS ZELLINIEN

3.2.23.2.1 PARP

Probenpuffer	62,5 mM 6 M 10 % (w/v) 2 % (w/v) 0,00125 % (w/v) 5 % (v/v)	Tris-HCl, pH 6,8 Harnstoff Glycerol SDS Bromphenolblau β-Mercaptoethanol
„Blotto“	5 % (w/v)	Trockenmilchpulver in TBST
TBST	50 mM 150 mM 0,3 % (v/v)	Tris-HCl, pH 7,4 NaCl Tween 20
SDS-Minigel	12 %	vgl. 3.2.24
Erstantikörper	10 µl	Serum in 20 ml „Blotto“
Nachweisantikörper	1:5000	Ziege-Anti-Kaninchen IgG

Pro Zeitwert wurden 1×10^7 Zellen vor und nach Apoptose-Induktion mit PBS gewaschen und mit Probenpuffer auf ca. 4×10^6 Zellen/ml verdünnt und 15 s sonifiziert. Anschließend wurde die Lösung 15 min bei 65°C inkubiert und je 20 µl auf einem 12% SDS-Minigel aufgetrennt (vgl. 3.2.24), einem Western-Blot unterzogen (vgl. 3.2.25), die Proteine gefärbt (vgl. 3.2.26.1) und die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase immunchemisch nachgewiesen (vgl. 3.2.26.2).

3.2.23.2.2 HISTONE

Aus den nach 3.2.10.3.1.2 gewonnenen Nukleosomen aus HeLa-Zellen wurden die Histone präpariert, indem die Nukleosomen-enhaltende Lösung mit 6 N H₂SO₄ auf eine 0,4 N Konzentration eingestellt wurde und über Nacht bei 4°C gerührt wurde. Die Lösung wurde auf einem Vortex-Gerät kräftig gemischt und bei 13.000 UpM in der Heraeus-Zentrifuge für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 100% (w/v) TCA auf 20% Endkonzentration eingestellt und 30 min bei RT inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden bei 13.000 UpM für 10 min sedimentiert und zweimal mit 70% (v/v) Ethanol sorgfältig gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl 30 mM HCl über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler gelöst. Ein 10 µl Aliquot der erhaltenen Proteinsuspension wurde anschließend auf einem 15% (v/v) SDS-Gel analysiert (vgl. 3.2.24).

3.2.24 AUFTRENNUNG VON PROTEINEN DURCH SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970)

Glasplatten für Minigele		85 × 105 mm
Stammlösung A	1,5 M 8 mM	Tris-HCl (pH 8,9) EDTA
Stammlösung B	0,5 M 8 mM	Tris-HCl (pH 6,8) EDTA
SDS-Lösung	10 % (w/v)	
APS	10 % (w/v)	
TEMED		
Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung	30:8 (v/v)	
2 × Probenpuffer	200 mM 6 % (w/v) 15 % (v/v) 0,005 % (w/v)	Tris-HCl (pH 6,7) SDS Glycerin Bromphenolblau
Probenpuffer- Gebrauchslösung	0,9 ml 0,1 ml	Probenpuffer (2 ×) β-Mercaptoethanol
5 × Laemmli-Laufpuffer	0,25 M 10 mM 1,9 M 0,5 % (w/v)	Tris-HCl (pH 8,7) EDTA Glycin SDS

Mit dieser Standardmethode der Proteinanalytik ist eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht möglich. Die unterschiedliche Ladung der Proteinmoleküle wird dabei durch die Anlagerung von SDS-Molekülen proportional der Größe der Proteine kompensiert (WEBER und OSBORN, 1969). Somit definiert allein die Molekülgröße der Proteine ihre elektrophoretische Beweglichkeit. Die Auftrennung erfolgt in einer mehr oder weniger stark vernetzten Matrix aus Polyacrylamid. Durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems mit Trenn- und Sammelgel mit unterschiedlichen pH-Bedingungen wird eine Konzentrierung der Probe und damit eine erhöhte Auflösung des Trennsystems erzielt.

Aus den Lösungen A und B wurden nach folgendem Schema die Proteingele hergestellt:

	Sammelgel	Trenngel (12,5% (v/v))	Trenngel (15% (v/v))
Lösung A	-	1,4 ml	1,4 ml
Lösung B	1,25 ml	-	-
SDS-Lösung	0,055 ml	0,055 ml	0,055 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml	0,005 ml
Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung	0,8 ml	2,3 ml	2,775 ml
A. bidest	2,95 ml	1,69 ml	1,215 ml
APS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml

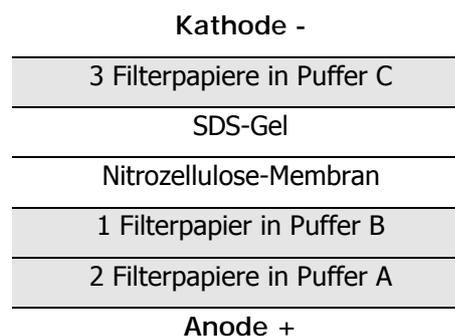
Zwei Minigelglasplatten wurden mit 70% (v/v) Ethanol abgerieben, zusammengebaut und mit einer Gummidichtung abgedichtet. Das Trenngel wurde aus den angegebenen Lösungen gemischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Um einen glatten Abschluß zu erreichen, wurde die Trenngellösung mit absolutem Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wurde der Alkohol abgegossen, das Sammelgel aufgegossen und der Probenkamm zur Bildung der Auftragstaschen eingesteckt. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurde das Dichtungsgummi entfernt und das Gel mit den Glasplatten in eine mit 1 x Laufpuffer gefüllte Vertikal-Elektrophoresekammer eingespannt. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden konnten, wurden sie mit der Probenpuffer-Gebrauchslösung 1:2 verdünnt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 15 mA solange durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht hatte, danach wurde der Spannungsgeber auf 20 mA eingestellt. Die Elektrophorese wurde abgebrochen, sobald die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte.

3.2.25 TRANSFER VON PROTEINEN AUF NITROZELLULOSE DURCH ELEKTROBLOTTING (TOWBIN et al., 1979)

Das Immunoblotverfahren schließt sich an die unter 3.2.24 beschriebene gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen an. Hierbei werden die Proteine in einem elektrischen Feld aus dem Gel auf ein proteinbindendes festes Trägermaterial (Nitrozellulose-Membran) transferiert. Die so immobilisierten Proteine können in einer immunchemischen Reaktion sichtbar gemacht werden.

Puffer A (Anodenpuffer 1)	300 mM 20 % (v/v)	Tris-HCl (pH 10,4) Methanol
Puffer B (Anodenpuffer 2)	25 mM 20 % (v/v)	Tris-HCl (pH 10,4) Methanol
Puffer C (Kathodenpuffer)	25 mM 20 % (v/v)	Tris-HCl (pH 9,4) Methanol
Ponceau-S-Färbelösung	1:10 (v/v)	in A. bidest verdünnt
NaOH	0,2 N	

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine nach dem "semi-dry" Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Nitrozellulose-Membran sowie insgesamt sechs Filterpapiere wurden auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in den entsprechenden Puffern (vgl. Schema unten) äquilibriert. Die Nitrozellulose wurde kurz zur Benetzung in A. dest gelegt. Die „Blotapparatur“ wurde nach folgendem Schema zusammengesetzt.



Zu beachten war, daß die einzelnen Schichten luftblasenfrei zusammengebaut werden mußten. Die ganze Apparatur wurde mit ca. 1 kg Gewicht beschwert, damit stets ein fester Kontakt gewährleistet war. Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde bei 1 mA/cm^2 . Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen, wurde die Membran für 5 min in Ponceau S-Färbelösung inkubiert. Zuvor wurde sie kurz in 0,2 M NaOH gelegt, um die Antigenizität zu erhöhen. Die Färbung wurde durch Spülen mit destilliertem Wasser wieder entfernt.

3.2.26 NACHWEIS VON PROTEINEN

3.2.26.1 FÄRBUNG DER PROTEINE MIT COOMASSIE

Coomassie-Färbelösung	0,15 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250
	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
Entfärberlösung	10 % (v/v)	Methanol
	5 % (v/v)	Essigsäure

Die Gele wurden nach der Elektrophorese für ca. 30 min bei Raumtemperatur mit Coomassie-Blue gefärbt. Danach wurden sie unter ständigem Wechseln der Entfärberlösung bei Raumtemperatur entfärbt.

3.2.26.2 IMMUNCHEMISCHER NACHWEIS MIT SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN

TBS-Tween	20 mM 0,1 % (w/v) 0,05 % (v/v)	Tris-HCl, pH 8,2 NaCl Tween 20
Primärantikörper-Lösung		Primärantikörper in Blocklösung
Nachweisantikörper		Ziege-Anti-Kaninchen-IgG
Blocklösung	10 % (w/v)	Magermilchpulver in TBS-Tween
Puffer III	100 mM 100 mM 50 mM	Tris-HCl, pH 9,5 NaCl MgCl ₂
NBT-Lösung	75 mg/ml	in 70% (v/v) Dimethylformamid
BCIP-Lösung	50 mg/ml	in 100% (v/v) Dimethylformamid

Nach der Immobilisierung der Proteine durch Elektroblothing wurde die Nitrozellulose-Membran stets rechts oben markiert und das restliche SDS-Gel wie unter 3.2.26.1 beschrieben gefärbt. Zur Antikörperdetektion wurde die Membran zuerst für 2 h in 10 ml Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Es folgte die Inkubation der Membran in der Primärantikörper-Lösung. Die Verdünnung des Primärantikörpers richtete sich nach dessen Sensitivität, die für jeden Antikörper vorher bestimmt wurde. Inkubiert wurde für 12 bis 16 h bei 4°C. Um unspezifische Signale zu minimieren, wurde die Membran anschließend besonders gründlich gewaschen (fünfmal für 5 min mit je 15 ml TBS-Tween). Der an alkalische Phosphatase gekoppelte Nachweisantikörper wurde in der Blocklösung 1:10.000 verdünnt und für mindestens 2 h bei RT mit der Membran inkubiert. Nicht gebundenes Konjugat wurde

auch hier wieder fünfmal für 5 min mit TBS-Tween abgewaschen. Das Antigen auf der Membran wurde durch Inkubation mit der Substratlösung (35 μ l BCIP und 45 μ l NBT in 10 ml Puffer III) kolorimetrisch detektiert. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Bildung von farbigen Präzipitaten an den Stellen auf der Membran, an denen der Nachweisantikörper gebunden hat.

4 ERGEBNISSE

4.1 ZELLKULTIVIERUNG UND APOPTOSE-INDUKTION

In Abhängigkeit von Zelllinie und Induktor tritt die Apoptose in unterschiedlichem Ausmaß und Ausprägung auf. Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden in den menschlichen Leukämiezelllinien HL60, U937, CEM, K562 und Jurkat durchgeführt. Auch ohne Vorbehandlung liegt bereits eine geringe Zahl von Zellen in Kultur spontan apoptotisch vor. Je nach Zelllinie beträgt ihr Anteil zwischen 1 bis 10% der Zellen (eigene Beobachtungen (Abbildung 11 und Abbildung 12) sowie TRAGANOS et al., 1993; NAKAMURA et al., 1997; GORCZYCA et al., 1993). Apoptose kann auf den verschiedensten Wegen induziert werden (THOMPSON, 1995; VAUX und KORSMEYER, 1999). Da je nach Art des Induktors auch unterschiedliche Signalwege eine Rolle spielen, werden die Induktoren nach ihrer Wirkungsweise klassifiziert (THORNBERRY, N. A., 1998; WALLACH et al., 1998; DESAGHER und MARTINO, 2000). Die Induktion der Apoptose erfolgte in dieser Arbeit sowohl über intra- als auch extrazelluläre Signale: Zum einen wurden Induktoren aus der Gruppe der DNA-Schäden erzeugenden Topoisomerase-Hemmstoffe sowie der ebenfalls über den mitochondrialen Weg wirkende Proteinkinase C-Hemmstoff Staurosporin verwendet, zum anderen die Rezeptor-Agonisten TNF- α und der Anti-APO/Fas-Antikörper. Dies gewährleistete, daß beobachtete Effekte nicht nur auf einen bestimmten Signalweg der Apoptose zurückzuführen sind, sondern generalisiert den apoptotischen Prozeß per se wiedergeben. Die in dieser Arbeit verwendeten Induktoren sind in Tabelle 4.1—A zusammengestellt.

Induktor	Signalweg
<u>extrazellulär</u>	<u>Rezeptorvermittelter Weg</u>
APO/Fas-Ak	Fas-Rezeptor, u.a. Aktivierung von Caspase 8
TNF- α	TNF-Rezeptor, u.a. Aktivierung von Caspase 8
<u>intrazellulär</u>	<u>Mitochondrialer Weg</u>
Topotecan	Topoisomerase I-Hemmung, DNA-Schäden
Etoposid	Topoisomerase II-Hemmung, DNA-Schäden
Teniposid	Topoisomerase II-Hemmung, DNA-Schäden
Staurosporin	Proteinkinase C-Hemmstoff, u.a. Aktivierung von Caspase 9

Tabelle B: Klassifizierung der verwendeten Apoptose-Induktoren

4.2 OPTIMIERUNG DER APOPTOSERATE

Bei der Untersuchung der Apoptose-induzierten Zellpopulation existiert immer ein Gemisch aus lebenden, normalen Zellen, apoptotischen und auch nekrotischen Zellen (EARNSHAW, 1995). Um über einem möglichst geringen Hintergrund an nicht apoptotischen Zellen arbeiten zu können, mußte zunächst ein

System gefunden und optimiert werden, in dem sich der programmierte Zelltod in einem großen Teil der Zellpopulationen gleichzeitig induzieren ließ. Sowohl der Prozentsatz als auch die Synchronität der ausgelösten Apoptose variieren in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie, deren Sensitivität gegenüber den verschiedenen Induktoren sowie der Wirkungsweise und Konzentration der Induktoren (eigene Beobachtungen, nicht gezeigt, und z.B. DUBREZ et al., 1995).

4.2.1 VERSUCHE OHNE SYNCHRONISIERUNG

Die optimalen Konzentrationen der Apoptose-Induktoren waren im Vorfeld in unserer Arbeitsgruppe ausgetestet worden bzw. aus Publikationen bekannt. In dieser Arbeit wurde der zeitliche Ablauf der Apoptose in den einzelnen Systemen aus Zelllinie und Apoptose-Induktor untersucht. Über den Zeitraum von 15 min bis 48 h nach Zugabe des Induktors wurde in den Zellkulturen Apoptose induziert und die Apoptoserate aufgrund der Morphologie der Zellen und dem Auftreten von hoch- und niedermolekularen DNA-Fragmenten abgeschätzt.

Zum Nachweis der Apoptose gibt es verschiedene Methoden (aktuell zusammengestellt in REED, JC, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden neben den morphologischen Kriterien - bestehend aus Zellbeobachtung, Giemsa und DAPI-Färbung - die Messung der Größenverteilung der Zellen im Zellzählgerät CASY, die Ermittlung freier 3'-OH-Gruppen mittels BrdU-Markierung im Durchflußzytometer, der Nachweis der Spaltung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase und der Nachweis der hoch- und niedermolekularen DNA-Fragmente verwendet. Tabelle C faßt die in dieser Arbeit angewandten Apoptose-Nachweise im Zusammenhang mit den einzelnen Systemen aus Zelllinie und Induktor zusammen. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Nachweismethoden an Beispielen gezeigt.

Zelllinie	Induktor	CASY-Zählung	FACS-Messung	PARP-Nachweis	DNA-Fragmentierung	
					HMW	LMW
HL60	Topotecan	+	+	+	+	+
	Etoposid	+	n.d.	n.d.	+	+
	Staurosporin	+	n.d.	n.d.	+	+
	TNF- α	+	n.d.	n.d.	+	+
	Teniposid	+	n.d.	n.d.	+	+
Jurkat	TNF- α	+	+	n.d.	+	+
	Apo/Fas-Ak	+	+	n.d.	+	+
CEM	Topotecan	0	+	n.d.	+	+
K562	Topotecan	0	n.d.	n.d.	-	-
U937	Topotecan	0	n.d.	n.d.	+	+

Tabelle C: Überblick über durchgeführte Nachweismethoden der Apoptose

HMW: high molecular weight – hochmolekular, LMW: low molecular weight – niedermolekular, (+) positiv, (-) negativ, (0) nicht aussagekräftig, (n.d.) not determined – nicht bestimmt.

Da es Ziel der vorliegenden Arbeit war, nach bevorzugten Schnittstellen im Genom zu suchen, lag das Hauptaugenmerk zunächst darauf, den Zeitraum zu finden, in dem die initiale DNA-Fragmentierung während der Apoptose hochmolekulare Fragmente liefert.

4.2.1.1 HL60-ZELLEN

Morphologie

Morphologisch zeichnen sich nicht apoptotische, lebende HL60-Zellen durch eine unbeschädigte Zellmembran und einen intakten Zellkern aus. Durch Induktion von Apoptose kommt es zu Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Fragmentierung des Kerns, „cell blebbing“ und zur Bildung apoptotischer Körperchen. In der Abbildung 7 sind normale Zellen (links) mit apoptotischen Zellen (rechts) verglichen.

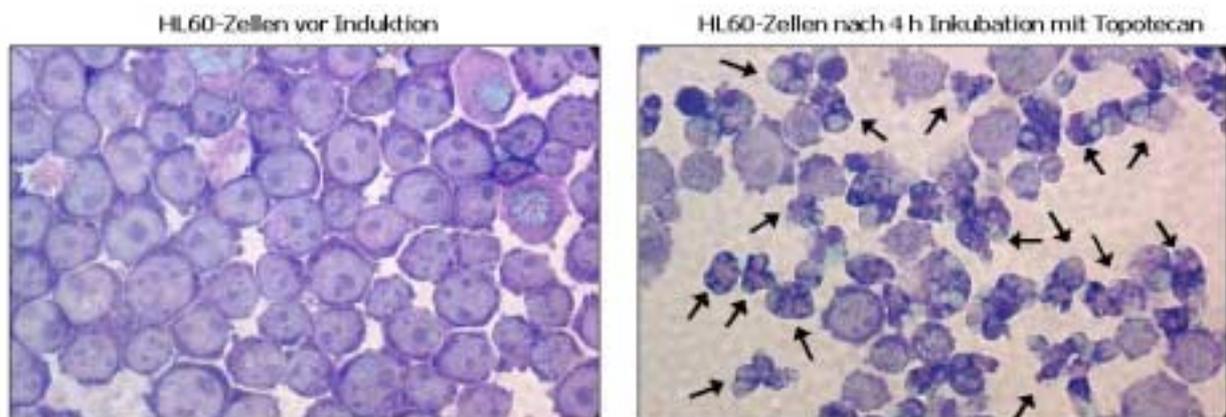


Abbildung 7: Vergleichende Darstellung apoptotischer und nicht apoptotischer HL60-Zellen nach Giemsa-Färbung

Apoptotische und nicht apoptotische HL60-Zellen (induziert mit 150 ng/ml Topotecan für 4 h) wurden auf Objektträger zentrifugiert, mit Methanol fixiert und mit dem Giemsa-Farbstoff gefärbt. Die Mehrzahl der apoptotischen Zellen ist durch Pfeile angedeutet.

Die Beobachtung der Kernmorphologie (Abbildung 8) während Apoptose erlaubt neben der Abschätzung der Apoptoserate auch die Aufnahme einer Kinetik. In dieser Arbeit wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert, dort fixiert und mit DAPI gefärbt. Die Veränderungen der Kernmorphologie sind in 1000-facher Vergrößerung zu den jeweiligen Zeitpunkten dargestellt. Die Morphologie nicht apoptotischer Zellkerne in unbehandelten und bis zu 2 h behandelten HL60-Zellen zeigt Zellkerne mit verteiltem Chromatin, die sich mit zunehmender Inkubationsdauer abrunden. Nach 2 h zeigen die Zellkerne bereits die Kondensation des Chromatins. Nach 3 h finden sich in apoptotische Körperchen zerfallene Zellen.

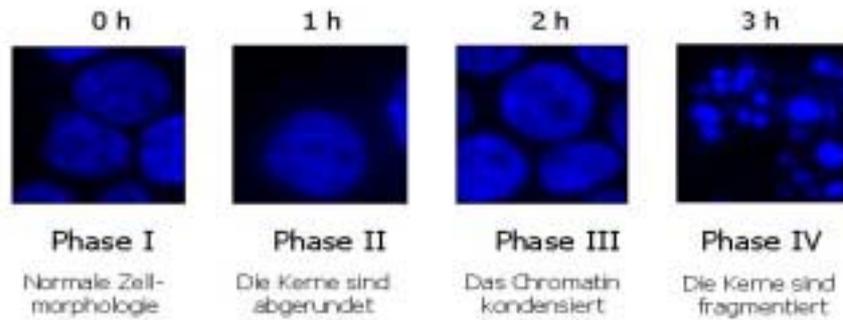


Abbildung 8: Morphologische Veränderungen des Kerns im Verlauf der Apoptose

HL60-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Apoptose-Induktion geerntet, auf Objektträger zentrifugiert und mit DAPI gefärbt. Gezeigt ist jeweils die 1000-fache Vergrößerung und ihre Zuordnung zu den einzelnen Phasen der Apoptose in Anlehnung an GHIBELLI et al. (1998).

Die Apoptose ist von der Nekrose, der Form des Zelltods durch äußere, toxische Einflüsse, zu differenzieren (siehe auch Übersicht in UCHIYAMA, 1995). Die Nekrose ist – wie unter 1.1.1 beschrieben – durch das Anschwellen der Zelle, die Schädigung der Zellmembran und dem Austritt von Zytoplasma, gefolgt von Entzündungsreaktionen gekennzeichnet. Ein Beispiel gibt Abbildung 9 wieder.

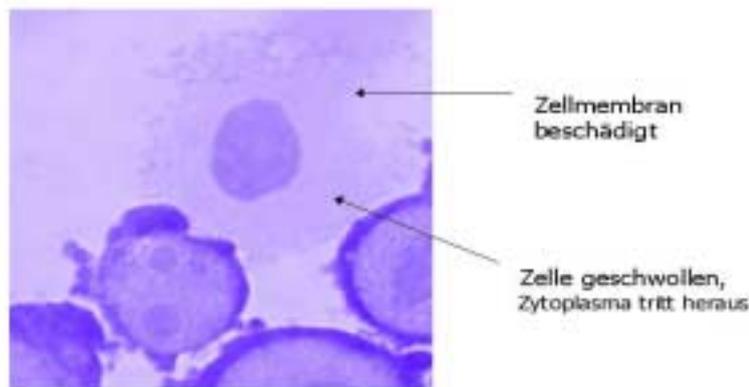


Abbildung 9: Darstellung einer nekrotischen Zelle

Veränderung des Größenprofils

Insbesondere bei HL60-Zellen – wenn auch nicht bei allen Zelllinien – konnte der Fortschritt der Apoptose bereits im Zellzählgerät beobachtet und quantifiziert werden. Mit zunehmender Inkubationsdauer mit Apoptose induzierendem Agens kam es zu einer Verschiebung in der Größenverteilung der Zellen hin zu kleineren Zellen (Durchmesser 7,5 – 10,5 μm). Normale HL60-Zellen weisen einen Durchmesser von ca. 10,5 bis 30 μm auf, derjenige von toten Zellen ist kleiner als 7 μm . Auf diese Weise konnte bereits während der Versuche eine Abschätzung des Beginns der Apoptose und damit der DNA-Fragmentierung erfolgen.

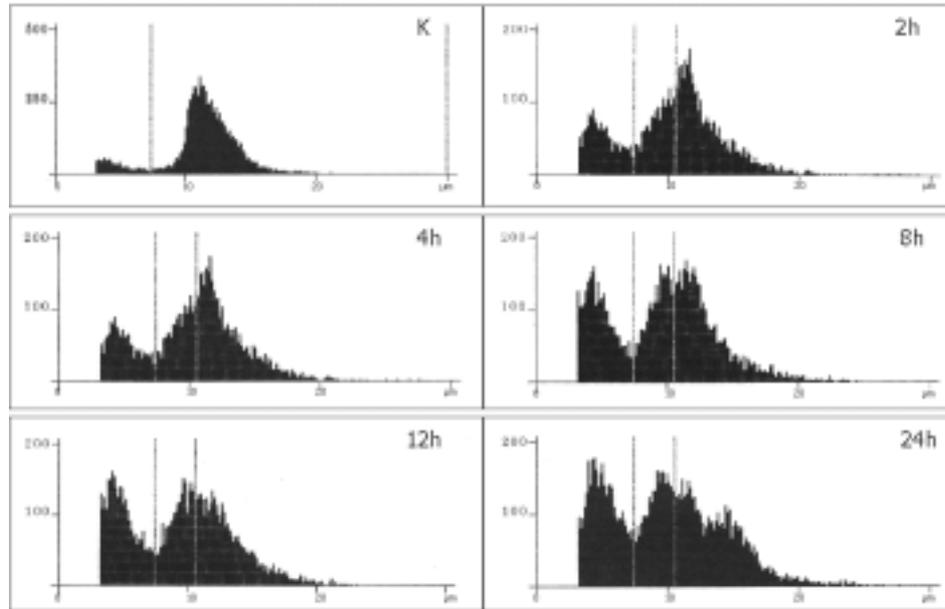


Abbildung 10: Aufgrund der Größenverteilung der Zellen in der CASY-Zählung ist eine Abschätzung der Apoptoserate bei HL60-Zellen möglich

Abgebildet sind Ausdrücke aus dem Zellzählgerät CASY1 von Schärfe Systems. Hierbei wird im Diagramm der Zelldurchmesser gegen die Anzahl der Zellen aufgetragen. Nicht apoptotische HL60-Zellen haben einen Durchmesser von ca. 10,5 bis max. 20 µm; gehen sie in Apoptose, so beginnt eine Schrumpfung der Zelle (7,5 – 10,5 µm) bis hin zu dem Zerfall in apoptotische Körperchen (<7,5 µm). Das Größenprofil erlaubt die Abschätzung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen. Angegeben sind die Profile von unbehandelten Zellen im Vergleich zu 2, 4, 8, 12 und 24 h mit Topotecan (150 ng/ml) induzierten Zellen. Aufgetragen ist die Größe der Zellen gegen ihre Anzahl. Deutlich ist die Zunahme von Zellen der Größenordnung 7,5 bis 10,5 µm zu erkennen; hierbei handelt es sich um apoptotische Zellen. Gleichzeitig nimmt die Menge der nicht apoptotischen Zellen mit einem Durchmesser von mehr als 10,5 µm ab.

FACS-Nachweis

Einen direkten Nachweis für die DNA-Fragmentierung während der Apoptose und die Anzahl der Zellen, die in Apoptose gehen, stellt die Messung der Zellen im Durchflußzytometer nach Färbung mit der APO-BrdU-Methode dar (vgl. Kapitel 3.2.5.1 und Abbildung 11). Durch die DNA-Fragmentierung während der Apoptose kommt es zur Bildung freier 3'-OH-Gruppen. Mittels der TUNEL-Reaktion können an diese durch die terminale Desoxynukleotid-Transferase bromierte Desoxyuridinnukleotide (BrdU) addiert werden. Der Nachweis erfolgt dann durch Fluoreszein-gekoppelten, monoklonalen Anti-BrdU-Antikörper im Durchflußzytometer. Zusätzlich wird die DNA der Zellen mit Propidiumiodid angefärbt, um den DNA-Gehalt der Zellen erfassen zu können. Je mehr Antikörper eine Zelle gebunden hat, desto intensiver ist das Fluoreszenzsignal nach Anregung durch den Laser. Für die Darstellung bedeutet dies, daß sich die Population um so stärker an der y-Achse nach oben verschiebt, je mehr markierte Strangbrüche eine Zelle aufweist (dargestellt durch die Messung der Fluoreszenz FI1). Je kleiner der DNA-Gehalt der Zellen (wie bei Fragmentierung durch Apoptose) ist, desto weiter links befindet sich das Signal im Dot-Blot-Diagramm (dargestellt durch Messung der Fluoreszenz FI3). Im Verlauf der Apoptose in HL60-Zellen läßt sich eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen sowie apoptotischen Körperchen und Zellfragmente verzeichnen. Dies ist zu erkennen an der Zunahme der Punkte („Dots“) in den oberen Quadranten. Währenddessen nimmt die Anzahl der nicht apoptotischen Zellen im unteren rechten Quadranten im

Zeitverlauf deutlich ab. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen reicht vom Basiswert spontaner Apoptose in Zellkultur mit 9% über 38% nach 4 h bis 40% nach 12 h und einer darauffolgenden Abnahme.

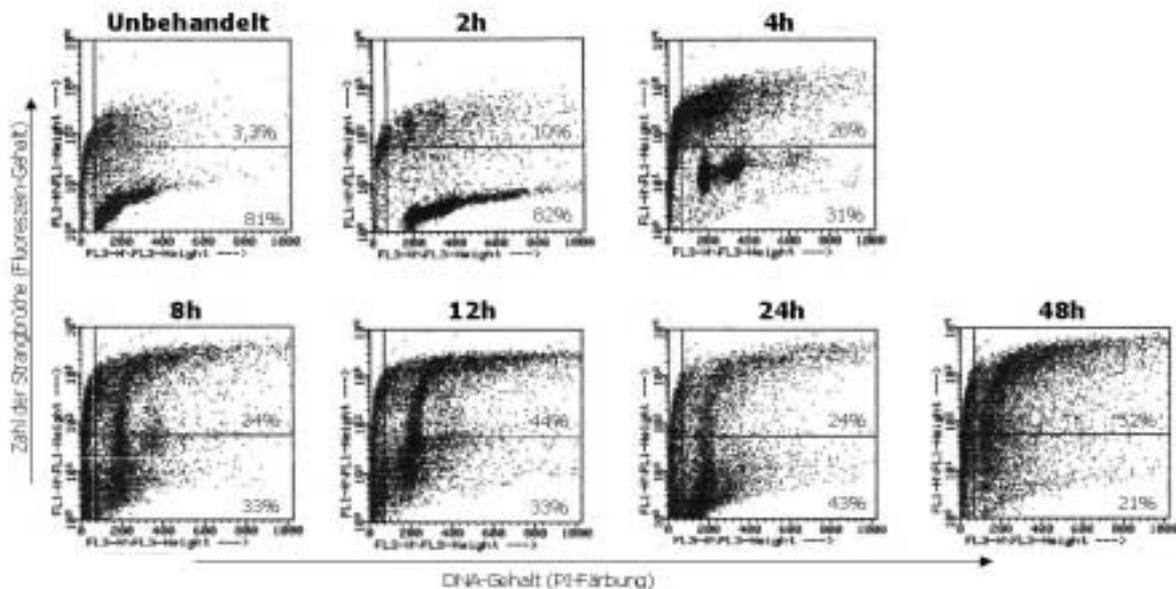


Abbildung 11: Detektion der 3'-OH-Enden durch TUNEL-Färbung und FACS-Analyse

Zellen aus dem in Abbildung 10 vorgestellten Versuchsansatz wurden auch zur Ermittlung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen im Durchflußzytometer verwendet. Zum Nachweis der apoptotischen Zellen (die durch eine Vielzahl von freien 3'-OH-Enden gekennzeichnet sind) wurde der TUNEL-Assay eingesetzt (3.2.5.1). Aufgetragen ist der DNA-Gehalt der Einzelzellen gegen die Zahl der Strangbrüche, so daß jeweils im unteren Fenster die lebenden Zellen, im oberen Fenster die apoptotischen Zellen sowie in den Fenstern links von der senkrechten Linie die toten Zellen und Zellrümpfer wiedergegeben sind. Mit zunehmender Inkubationszeit mit Apoptose-auslösendem Agens steigt der Anteil apoptotischer Zellen bis auf knapp 40%.

DNA-Fragmentierung

Ein recht auffälliger Effekt des programmierten Zelltods ist die Fragmentierung der nukleären DNA (WYLLIE et al., 1980). Es treten zwei Klassen von Fragmentgrößen auf: zum einen die oft als „hallmark of apoptosis“ bezeichnete DNA-Leiter – sie gibt die Klasse der niedermolekularen Fragmente wieder -, zum anderen die Klasse der hochmolekularen DNA-Fragmente (WALKER, P. R. et al., 1991; CANMAN et al., 1992; OBERHAMMER et al., 1993b).

Die niedermolekularen DNA-Fragmente entstehen durch Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen (HEWISH und BURGOYNE, 1973; BURGOYNE et al., 1974; NOLL, 1974b). Die entstehenden DNA-Fragmente entsprechen in ihrer Größe Mono- und Oligonukleosomen, deren DNA 180 bp bis 200 bp sowie ein Vielfaches davon mißt. Diese nukleosomalen Fragmente entstehen nur bei Apoptose. Bei der pathophysiologischen Form des Zelltods, der Nekrose, kommt es zu einer zufälligen DNA-Fragmentierung, die im Gel als „Schmier“ erscheint (WYLLIE et al., 1981; SUN, X. M. et al., 1994b). Damit fungiert die Darstellung der niedermolekularen DNA-Fragmente als wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen Apoptose und Nekrose. Die niedermolekulare DNA-Fragmentierung tritt allerdings nicht bei allen Zelllinien auf (Bsp. siehe OBERHAMMER et al., 1993b; COHEN et al., 1994). Die Präparation der DNA-Leiter ist ausführlich unter 3.2.11.3.1.1 beschrieben. Beispiele zeigen Abbildung 12A und C. Hier wurden HL60-Zellen mit dem Apoptose-Induktor Topotecan (150 ng/ml) für bis zu 24 h bzw. Teniposid (VM-26, 10 µM)

für bis zu 16 h behandelt, die Zellen mit Triton aufgeschlossen, die niedermolekulare DNA extrahiert, gefällt und auf einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt.

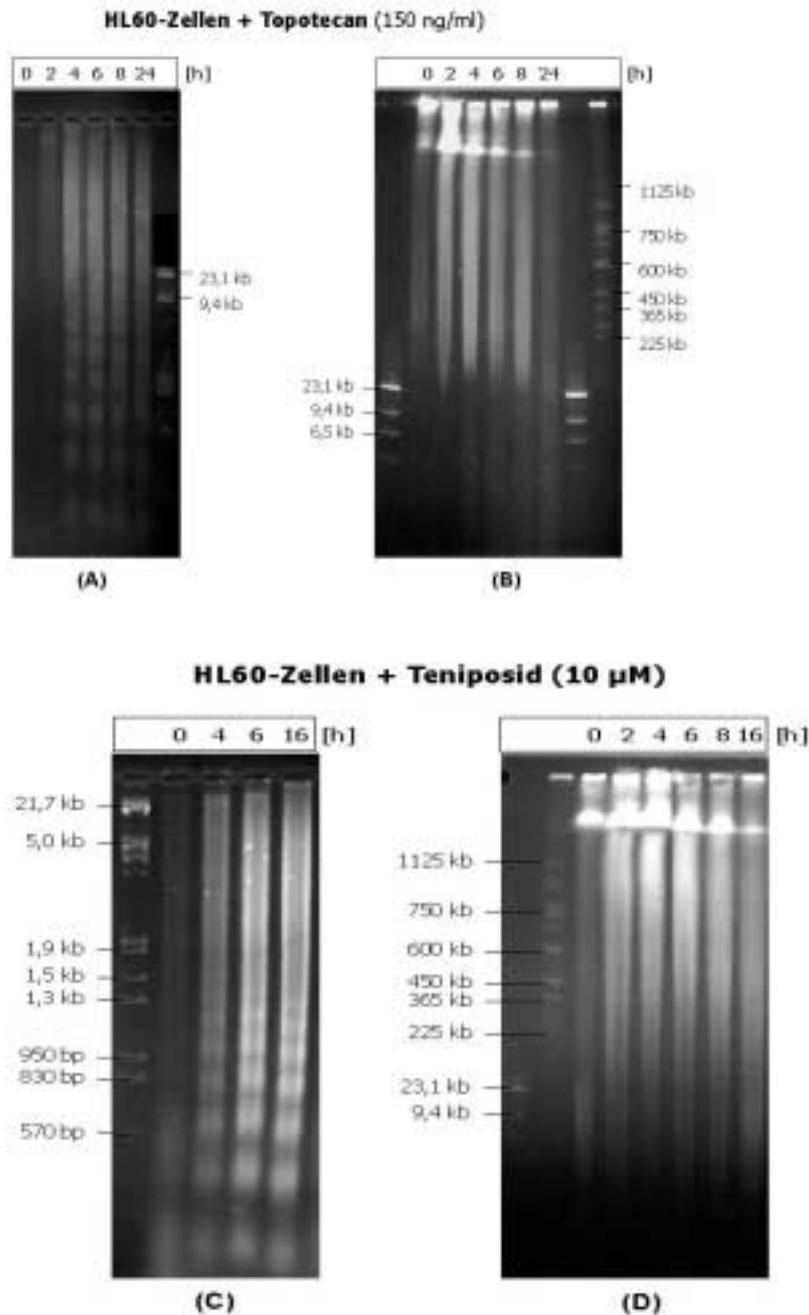


Abbildung 12: Apoptotische DNA-Fragmentierung in HL60-Zellen

HL60-Zellen + Topotecan: Induktion der Apoptose mit Topotecan (150 ng/ml); die DNA-Fragmentierung setzt nach 2 bis 4 h ein. Dies ist an der Entstehung der nukleosomalen Fragmente (links) und der Zunahme der DNA-Menge im Bereich 50 kb bis 2,2 Mb in (rechts) zu erkennen. (A) Darstellung des Abbaus der DNA in niedermolekulare Fragmente als DNA-Leiter. (B) Darstellung des Abbaus der DNA in hochmolekulare Fragmente nach Auftrennung über Pulsfeldgelelektrophorese.

HL60-Zellen + Teniposid: Induktion der Apoptose mit Teniposid (10 µM); hier setzt die DNA-Fragmentierung ebenfalls nach 2 bis 4 h ein. (C) Darstellung des Abbaus der DNA in niedermolekulare Fragmente als DNA-Leiter. (D) Darstellung des Abbaus der DNA in hochmolekulare Fragmente nach Auftrennung über Pulsfeldgelelektrophorese.

Die Spaltung der DNA in hochmolekulare Fragmente zeigt etwa 50 kb bis 2,2 Mb große Fragmente (eigene Beobachtungen (z.B. Abbildung 12) und CHEN, D. L. et al., 1998; QI und SIT, 1998). Ihre

Entstehungsweise ist nicht bekannt. Sie treten jedoch in jeder Zelllinie nach Apoptose-Induktion auf. Aufgrund ihrer Größe können sie nur mit einer speziellen Form der Elektrophorese, der Pulsfeldgelelektrophorese (SCHWARTZ und CANTOR, 1984), aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurde eine Spezialform der Pulsfeldgelelektrophorese angewandt, die „rotating field agarose gel electrophoresis“ oder ROFAGE. Ihr Prinzip ist unter 3.2.13.2 beschrieben. Zur Darstellung der hochmolekularen DNA-Fragmente wurden die Zellen zuvor unterschiedlich lang mit dem Apoptose-Induktor Topotecan (150 ng/ml) oder Teniposid (VM-26, 10 μ M) behandelt, in Agaroseblöckchen gegossen, lysiert und einer Proteinverdauung unterzogen (3.2.11.3.2). In Abbildung 12B und D ist zu erkennen, daß die DNA aus den Kontrollzellen zu groß ist, um im Gel aufgetrennt zu werden; sie bleibt daher in den Taschen und der für die ROFAGE typischen Kompressionsbande liegen (WALKER, P. R. et al., 1991; WALKER, P. R. et al., 1993; KAUFMANN et al., 2000). Im Laufe der Kinetik verschiebt sich die DNA-Menge auf eine Größenordnung von 700 bis 20 kb.

Topotecan und Teniposid entfalten ihre Apoptose-auslösende Wirkung über Hemmung der zellulären Topoisomerase I (Topotecan) bzw. II (Teniposid). Die aus dem apoptotischen Prozeß resultierenden DNA-Fragmente beruhen nicht auf den vereinzelt, durch die Hemmung der Topoisomerasen vermittelten DNA-Schäden. Während letztere reversibel und zudem proteingebunden sind, sind die erzeugten apoptotischen DNA-Fragmente irreversibel. Zum Vergleich wurde auch mit DNA-Schaden-unabhängigen Induktoren Apoptose induziert (hier gezeigt am Beispiel des Cytokins TNF- α in Verbindung mit Cycloheximid, vgl. Abbildung 13), die über den ligandenvermittelten Signalweg Apoptose auslösen.

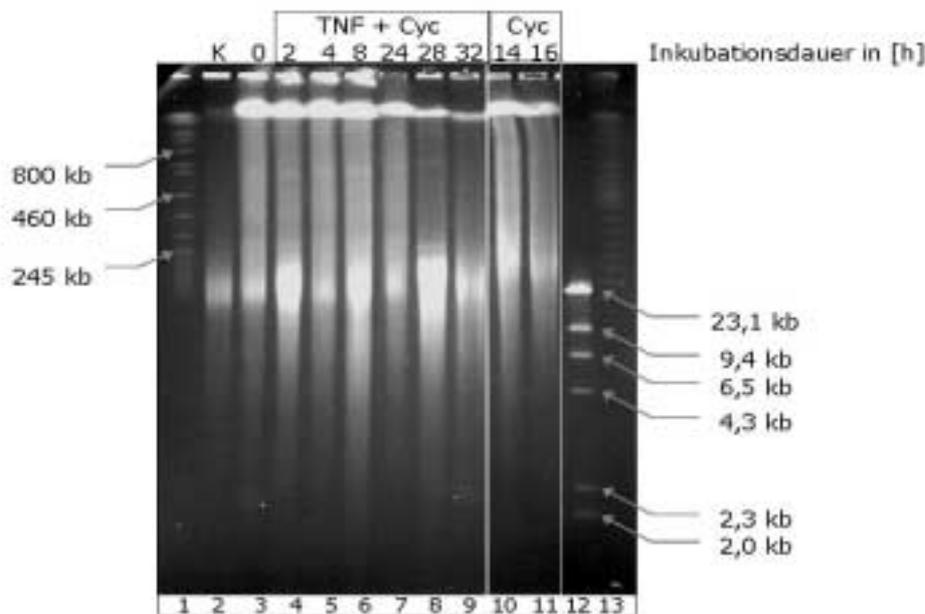


Abbildung 13: Die Induktion der Apoptose in HL60-Zellen mit TNF- α und Cycloheximid ruft ebenfalls eine Spaltung der DNA im hochmolekulare Fragmente hervor

(1) DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A, (2) unverdaute DNA aus unbehandelten HL60-Zellen, (3) bis (8) *MluI* verdaute DNA aus (3) un- (4) 2 h, (5) 4 h, (6) 8 h, (7) 24 h, (8) 28 h, (9) 32 h mit TNF- α /Cycloheximid (5 ng/ml bzw. 5 μ g/ml) behandelten, jedoch unverdauten Zellen, (10) bis (11) DNA aus 14 und 16 h nur mit Cycloheximid (5 μ g/ml) behandelten HL60-Zellen, (12) DNA-Größenstandard λ -*HindIII*, (13) DNA-Größenstandard λ -Konkatemere.

In HL60-Zellen konnte mit allen verwendeten Induktoren Apoptose induziert werden. Da jede Zelllinie eine unterschiedliche molekulare Ausstattung und Sensitivität gegenüber der Induktion der Apoptose zeigt (z.B. DUBREZ et al., 1995), wurden weitere Zelllinien verwendet, um auch Vergleiche mit anderen Zelllinien zu ermöglichen und allgemeingültige Rückschlüsse auf die apoptotische DNA-Fragmentierung in Zelllinien ziehen zu können.

4.2.1.2 U937-ZELLEN

In U937-Zellen ließ sich die Apoptose mit Topoisomerase-Hemmstoffen ähnlich gut induzieren wie in HL60-Zellen (LORICO et al., 1990; BERTRAND et al., 1993). Ein Beispiel der Spaltung in hoch- und niedermolekulare DNA-Fragmente zeigt Abbildung 14. Die Spaltung in niedermolekulare DNA-Fragmente tritt nach 3 h auf. Dies ist zu erkennen am Auftreten der DNA-Leiter.

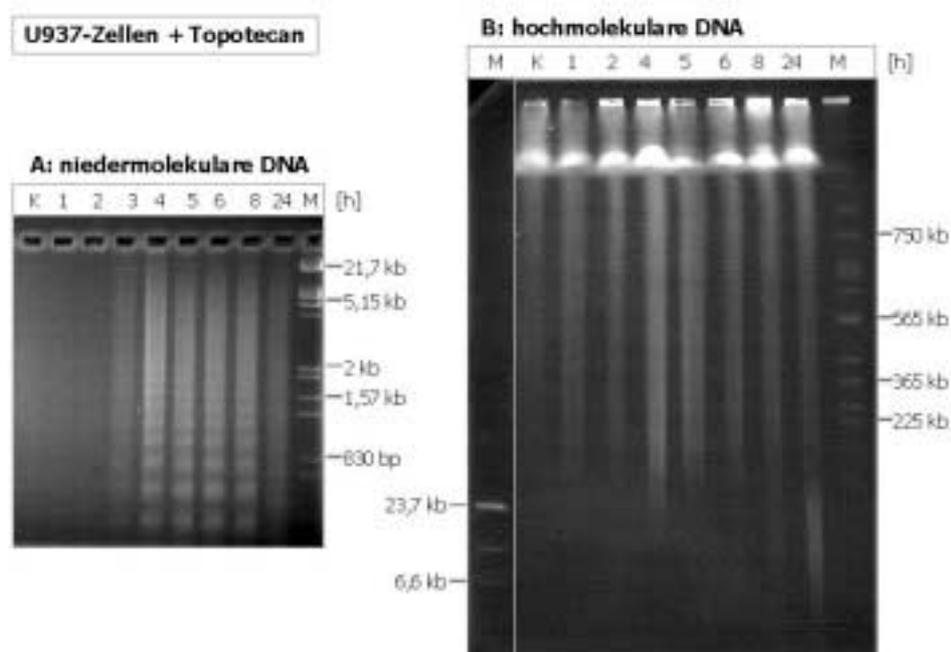


Abbildung 14: DNA-Fragmentierung in U937-Zellen induziert durch den Topoisomerase I-Hemmstoff Topotecan

(A) DNA-Spaltung in niedermolekulare Fragmente in Form der DNA-Leiter: Sie tritt nach 3 h Induktion mit Topotecan (150 ng/ml) auf. (B) Abbau der DNA in hochmolekulare Fragmente: Dargestellt ist die nicht mit Restriktionsenzymen verdaute DNA, die aufgrund ihrer Größe in den Taschen bzw. in der für die Auftrennung typischen Kompressionsbande zu finden ist. Die Auftrennung erfolgte über 38 h mit den Parametern 0,9% Agarosegel, Laufpuffer TBE, Intervall von 100 bis 10 s (logarithmisch), Winkel von 120 bis 110° (linear), Spannung von 200 bis 150 V (logarithmisch). Eine Fragmentierung ist nach 4 h Behandlung mit Topotecan zu sehen. (K) DNA aus unbehandelten Zellen, DNA-Größenstandard *EcoRI*/ λ -*HindIII*, DNA-Größenstandard λ -*HindIII*, DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A.

Die Messung im CASY-Zellzählgerät erlaubte keine Einschätzung des apoptotischen Status, da die Zellen in ihrer Größe bei Apoptose nicht so sehr abnahmen, daß sie vom CASY erfaßt und als apoptotische Zellen identifiziert werden konnten. Morphologisch war jedoch eindeutig Apoptose festzustellen. Die Zellen schrumpften; jedoch reichte dies nicht aus, um im Größenprofil eine ähnliche Verschiebung wie bei

HL60-Zellen zu beobachten. Damit kann in manchen Zelllinien (wie den untersuchten HL60-Zellen, Jurkat und CEM-Zellen) bereits durch die Messung im CASY die Auslösung der Apoptose festgestellt werden, während bei anderen (wie den hier untersuchten K562 und U937-Zellen) in der Größenverteilung apoptotischer im Vergleich zu nicht apoptotischen Zellen keine deutlichen Unterschiede erkennbar werden. Die Änderung der Größenverteilung bei Apoptose-Induktion kann daher als zwar zellspezifisches, dort jedoch eindeutiges und einfach und schnell meßbares Apoptose-Merkmal gewertet werden.

4.2.1.3 K562-ZELLEN

In K562-Zellen konnte mit Topotecan als Induktor keine Apoptose ausgelöst werden. Die DNA-Spaltung in niedermolekulare Fragmente zeigt anstelle einer Leiter aus Mono- und Oligonukleosomen nur einen undefinierten Schmier (Abbildung 15B), die Darstellung der hochmolekularen DNA (Abbildung 15A) weist keine Apoptose-induzierte DNA-Fragmentierung auf. Dies ergibt sich insbesondere aus dem Vergleich der DNA aus unbehandelten Zellen (Spur 0 h in A) mit der DNA aus induzierten Zellen (Spuren 1 bis 10 h in A). Die DNA bleibt aufgrund ihrer Größe in den Taschen des Gels zurück.

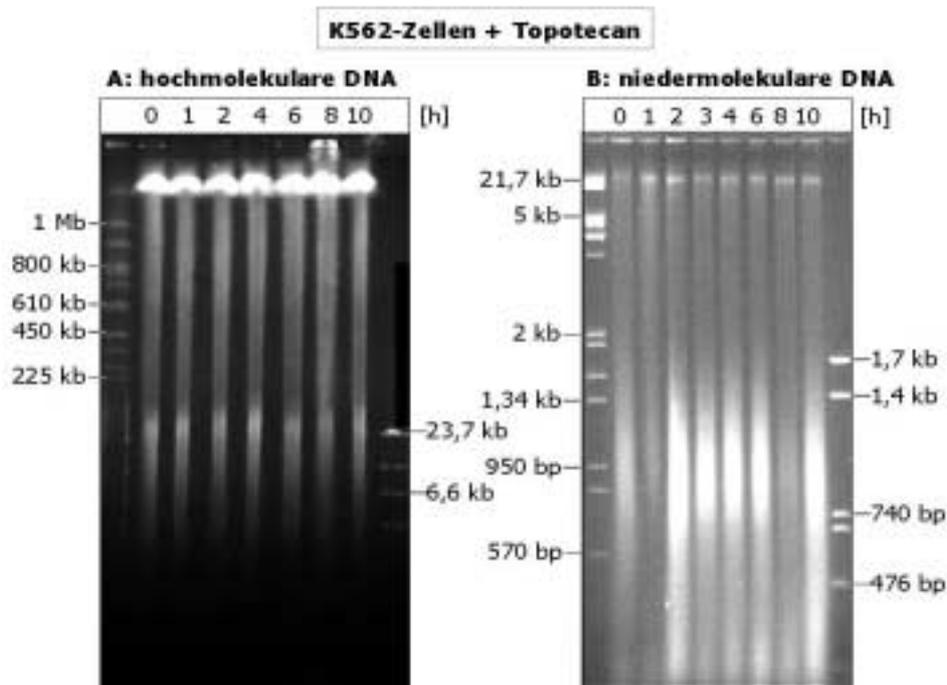


Abbildung 15: In der Zelllinie K562 tritt mit dem Induktor Topotecan keine Apoptosebedingte DNA-Fragmentierung auf

A. hochmolekulare DNA aus K562-Zellen nach Induktion mit Topotecan: Die DNA aus unbehandelten Zellen zeigt das gleiche Laufverhalten wie die DNA der behandelten Zellen. Eine zusätzliche DNA-Fragmentierung durch Apoptose-Induktion hat nicht stattgefunden. DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A, (0) DNA aus unbehandelten Zellen, DNA-Größenstandard λ -HindIII.

B. niedermolekulare DNA: Statt der Apoptose-typischen Leiter ist nur ein undefinierter Schmier zu sehen. Auch dies zeigt, daß in K562 durch Topotecan keine Apoptose-Induktion möglich war (siehe jedoch auch Diskussion im Text). DNA-Größenstandard *Eco RI*/ λ -HindIII, (0) DNA aus unbehandelten Zellen, DNA-Größenstandard pUC19 Taq/Rsa.

Dieses Phänomen beobachteten auch andere Autoren bei der Zelllinie K562. Sie vermuteten darin ein langsames Fortschreiten in der Apoptose-Signalkaskade und ordneten diese Zelllinie daher den weniger

Apoptose-sensitiven Zelllinien zu (DUBREZ et al., 1995). Eine Erklärung für den entstehenden Schmier gaben sie nicht. Daher läßt sich aus den hier beschriebenen Ergebnissen nur schließen, daß hier keine Apoptose ausgelöst werden konnte.

4.2.2 VERSUCHE MIT SYNCHRONISIERUNG

Wie im vorigen Kapitel vorgestellt, kann mit den beschriebenen Systemen Apoptose in max. 40% der behandelten Zellen hervorgerufen werden. Daher werden die Effekte, die für diese Arbeit von Interesse sind, vor einem großen Hintergrund von Zellen durchgeführt, die sich nicht im Prozeß der Apoptose befinden. Diese umfassen sowohl „gesunde“ (nicht apoptotische) als auch nekrotische Zellen. Der Anteil apoptotischer Zellen befindet sich zudem noch in verschiedenen Stadien des apoptotischen Prozesses. Während einige Zellen sofort bei Induktion in Apoptose gehen, gehen andere erst nach einer Verzögerungsphase in Apoptose (morphologische Befunde, nicht gezeigt). Diese Beobachtung wirft die Frage nach dem Grund dieser Verzögerungsphase auf und wie sie umgangen werden kann. Für alle Arten von Induktoren ist dies nicht geklärt. Von den Topoisomerase-Hemmstoffen ist jedoch bekannt, daß sie ihre Wirkung in Abhängigkeit von bestimmten Phasen des Zellzyklus entfalten (HORWITZ und HORWITZ, 1973, zusammengefaßt in KAUFMANN, 1998). Dies liegt an der in Kapitel 1.1.2 beschriebenen Interaktion des entstandenen kovalenten Komplexes aus Topoisomerase und Inhibitor mit der sich fortbewegenden Replikationsgabel. So zeigt Topotecan in seiner Wirksamkeit eine Abhängigkeit von der Phase des Zellzyklus der Zielzelle: Es wirkt S-Phase-spezifisch. Daraus entstand die Idee, die Zellen vor Induktion mit Topoisomerase-Hemmstoffen am Übergang zur S-Phase zu blockieren. Zunächst wurden die Zellen mit Aphidicolin behandelt, was den Zellzyklus am Übergang von der G1 zur S-Phase blockiert. Nach 24 h im Block wurden die Zellen durch mehrmaliges Waschen freigesetzt. Anschließend durchliefen sie weitgehend synchron die S-Phase. Nach Entlassung der Zellen aus der Zellzyklusblockade wurden sie mit Topotecan in gewohnter Konzentration behandelt. Dadurch sollte in einem wesentlich größeren Anteil der Zellen gleichzeitig Apoptose ausgelöst werden. Da eine zu hohe Aphidicolin-Konzentration selbst auch als Apoptose-Induktor wirkt, wurde zunächst die optimale Aphidicolin-Konzentration zur Synchronisierung der HL60-Zellen ermittelt. Als besonders geeignet stellte sich die Behandlung mit 1,5 µM Aphidicolin heraus, da nur wenige Zellen hierdurch in Apoptose gingen. Es kam dennoch zu einer guten Synchronisierung der Zellen, wie Abbildung 16 zeigt. Die roten Flächen beschreiben die G1 bzw. G2-Phase des Zellzyklus, die schraffierte blaue Fläche steht für die S-Phase und die grüne Fläche für die apoptotischen Zellen. Bei höheren Konzentrationen ist zwar die Synchronisierung des Zellzyklus einheitlicher, wie die Verteilung der Zellzyklusphasen zeigt. Entsprechend höher ist auch der Anteil der Zellen, die dadurch in Apoptose gehen. Das zeigt die Zunahme der grünen Fläche. Bei kleineren Konzentrationen an Aphidicolin gelingt dagegen die Synchronisierung nur mäßig, wenngleich keine Apoptose-Induktion sichtbar ist. Daher wurde die Konzentration von 1,5 µM zur Synchronisierung der HL60-Zellen verwendet.

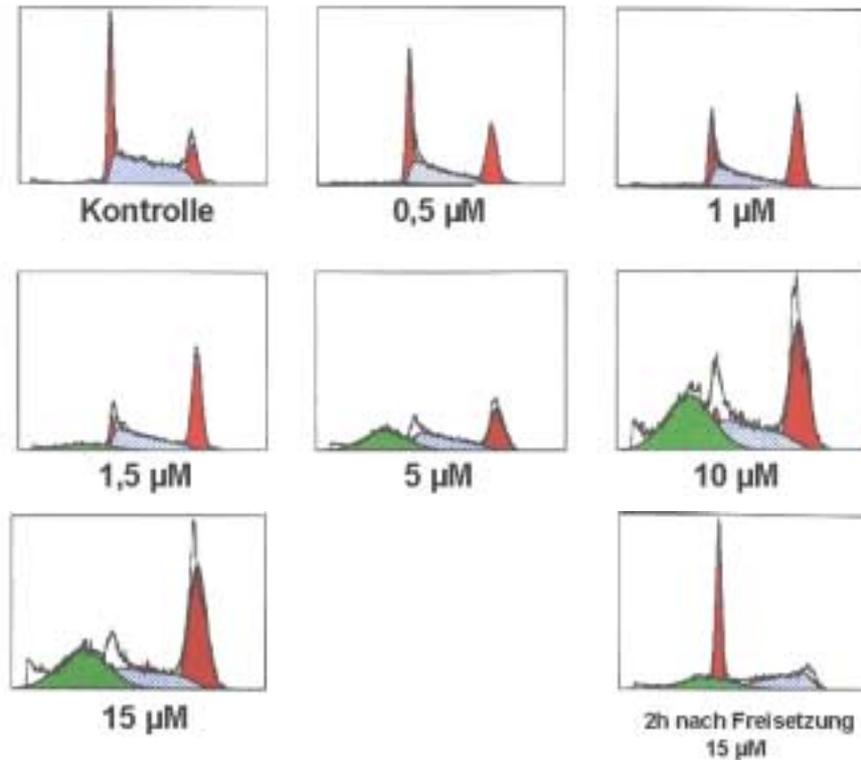


Abbildung 16: Meßreihe zur optimalen Synchronisierung von HL60-Zellen mit Aphidicolin

HL60-Zellen wurden für 24 h mit 0,5, 1, 1,5, 5, 10 und 15 μM Aphidicolin behandelt. Dies führt zu einem Zellzyklus-Block am Übergang G1-S-Phase. Nach Freisetzung aus dem Block wurden die Zellen weitere 8 h in Kulturmedium belassen. Danach wurden Aliquots entnommen, mit 100% Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt (3.2.5.2). Die gefärbten Zellen wurden im Durchflußzytometer auf die Einheitlichkeit ihres DNA-Gehalts überprüft. Die rote Fläche (links) des Durchflußzytogramms entspricht dem relativen Anteil der Zellen in der G0/G1-Phase einer Population, der rote Bereich (rechts) zeigt den relativen Anteil von Zellen in der G2-Phase. Die schraffierte Fläche zwischen beiden Gausskurven spiegelt den Anteil an Zellen wider, der sich in der S-Phase des Zellzyklus befindet. Die durch die Synchronisierung in Apoptose gegangenen Zellen werden durch die grün markierte Fläche wiedergegeben. Bei der Behandlung der Zellen mit 1,5 μM Aphidicolin kommt es zu einer guten Synchronisierung der Zellen bei gleichzeitig minimaler Apoptose-Induktion.

Der Anteil apoptotischer Zellen in synchronisierten Zellpopulationen nach Behandlung mit Topotecan

Mit der Entlassung der Zellen aus der Blockade wurde durch Topotecan-Gabe Apoptose induziert. Im FACS – nach Färbung mit dem Apo-BrdU-Kit (3.2.5.1) - ergab sich eine maximale Apoptoserate von 78% nach 3,5 h Induktion (Abbildung 17). Eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen (obere Hälfte des jeweiligen Dot Plots) ist schon ab 2 h Behandlung mit Topotecan festzustellen, die nach 3,5 h ein Maximum erreicht. Zur Überprüfung des Anteils von Apoptose, der nicht auf der Topotecan-Behandlung, sondern auf der Synchronisierung mit Aphidicolin beruht, wurden auch unbehandelte, synchronisierte Zellen gemessen (gekennzeichnet durch die Zeit nach Freisetzung aus der Zellzyklusblockade in Stunden und -Topotecan). Damit wurde durch die Synchronisierung der Zellen der Anteil der apoptotischen Zellen fast um das Doppelte erhöht und der Hintergrund nicht apoptotischer Zellen deutlich verringert. Dies steigert die Sensitivität des gesamten Ansatzes, zumal sich die Zellen nun weitgehend in der gleichen Phase der apoptotischen Signalkaskade befinden. Das basiert auf der Behandlung mit Topotecan, wodurch eine gleichzeitige Induktion aller in der S-Phase befindlichen Zellen erreicht wurde.

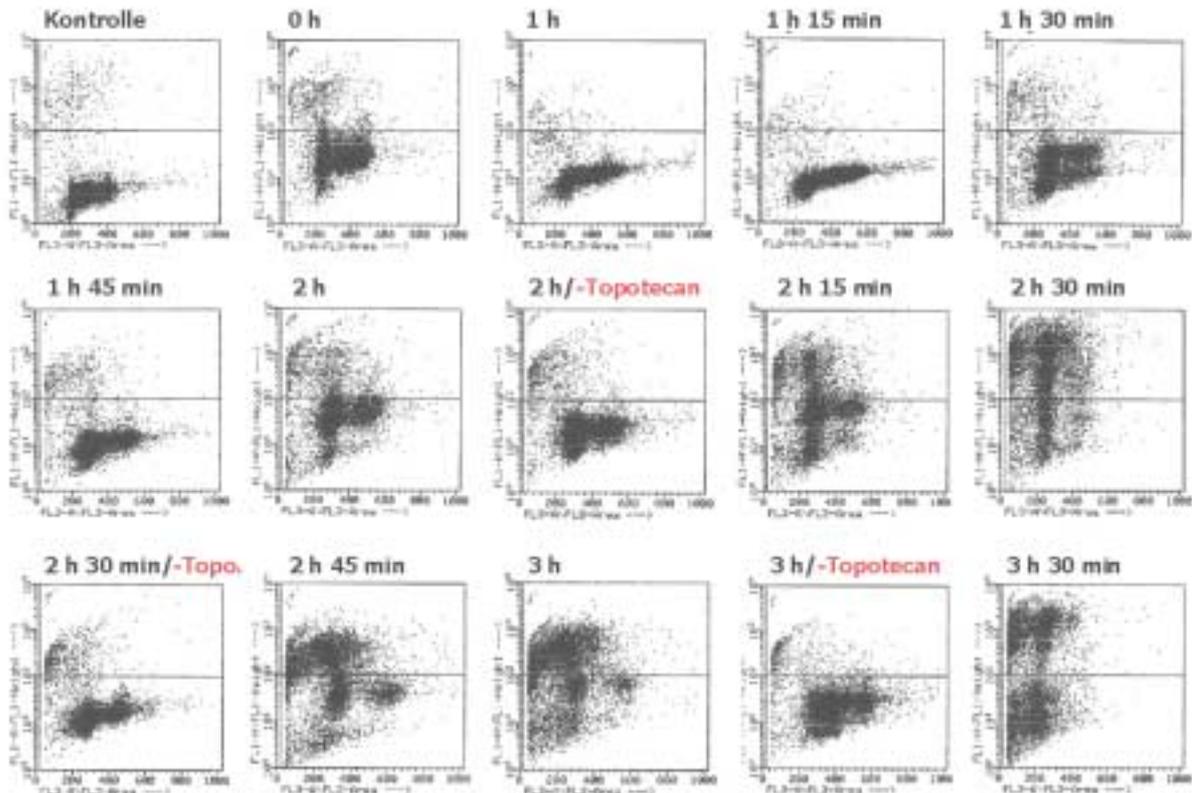


Abbildung 17: Messung der Apoptoserate von synchronisierten HL60-Zellen

HL60-Zellen wurden mit 1,5 μM Aphidicolin für 24 h behandelt. Dadurch erfolgt eine Blockade des Zellzyklus am G1-S-Übergang. Nach Aufhebung der Blockade wurde in den synchronisierten Zellen mit Topotecan (150 ng/ml) Apoptose induziert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, mit der TUNEL-Methode (3.2.5.1) gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Die maximale Apoptoserate nach 3,5 h Induktion beträgt 78%. Die Zahlen geben die Inkubationsdauer nach Aufhebung der Blockade in Stunden an. Mit Minuszeichen und Topotecan gekennzeichnete Werte sind synchronisierte, jedoch nicht mit Topotecan induzierte Zellen zur Überprüfung einer etwaigen Apoptose-Induktion durch die Synchronisierung.

Die Synchronisierung der Zellen hat zudem Einfluß auf die Meßbarkeit der Apoptose durch Abnahme der durchschnittlichen Größe der Zellen im Zellzählgerät (Abbildung 18). Dazu wurden synchronisierte HL60-Zellen gemessen, die im Abstand von jeweils 15 min nach Topotecan-Behandlung entnommen wurden. Die Apoptose im synchronisierten System geht sehr gleichmäßig von statten. Die Zunahme apoptotischer Zellen und infolgedessen auch die Kinetik der Apoptose läßt sich deutlicher verfolgen als in unsynchronisierten Zellen (Abbildung 18). Dies läßt sich dadurch erklären, daß Topotecan bevorzugt Apoptose in Zellen in der S-Phase auslöst. Wenn sich der Großteil der behandelten Zellpopulation bereits am Beginn der S-Phase befindet, kommt es zu einer zeitlich koordinierten Induktion der Zellen. Neben der Rate an apoptotischen Zellen steigt auch die Anzahl der Zellen, die im gleichen Stadium der Apoptose vorliegt und damit die Morphologie der Zellpopulation prägen.

CASY-Messung zur Darstellung des Größenprofils

Die gleichmäßigere Morphologie der behandelten und synchronisierten Zellpopulation zeigt die Darstellung des Größenprofils nach Messung im CASY-Zellzählgerät. Innerhalb weniger Minuten kommt es zu Verschiebungen in der Zellgröße. Die Zahl der Zellen, die aufgrund der Apoptose kleiner werden (7,5

bis $10,5 \mu\text{m}$), nimmt zu, ebenso die Zahl der Zellen, die bereits in apoptotische Körperchen zerfallen ist und dadurch einen kleineren Durchmesser als $7,5 \mu\text{m}$ aufweist (Abbildung 18).

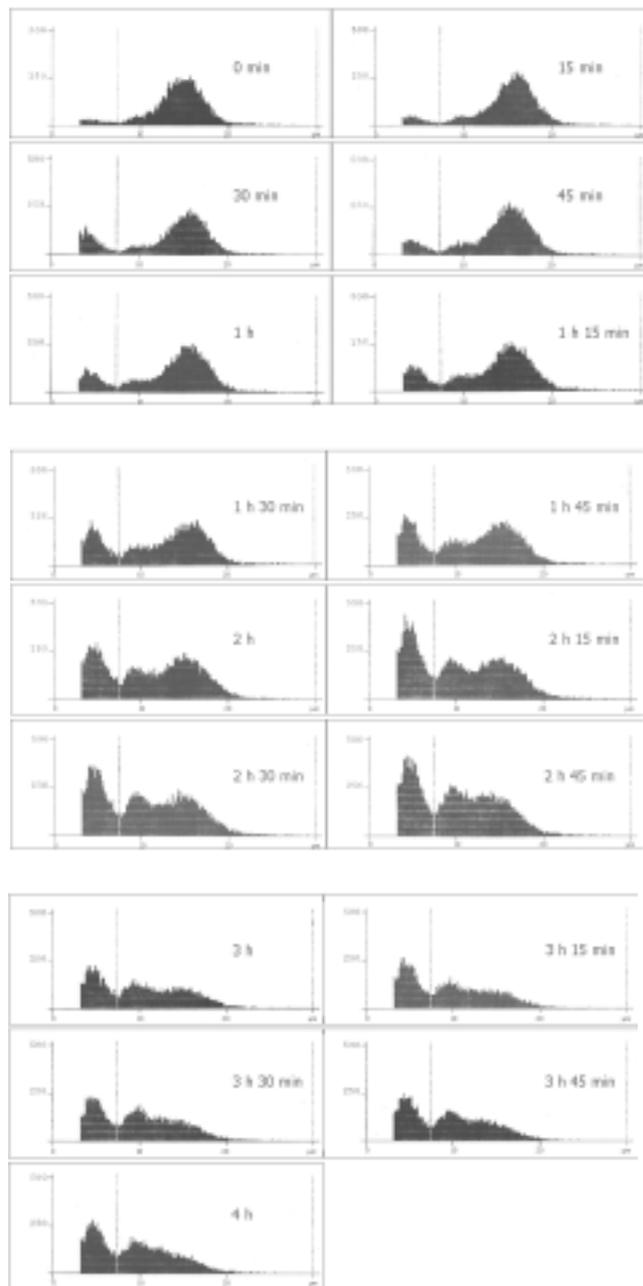


Abbildung 18: Messung des Größenprofils synchronisierter HL60-Zellen bei Apoptose-Auslösung mit dem S-Phase-spezifischen Topoisomerase I-Inhibitor Topotecan

Synchronisierte HL60-Zellen wurden nach Entlassung aus dem Aphidicolin-Block mit 150 ng/ml Topotecan behandelt. Um die apoptotische Veränderung des Größenprofils mit der Veränderung anderer apoptotischer Parameter in Zusammenhang bringen zu können, wurden alle 15 min Proben im Zellzählgerät vermessen. Es zeigt sich eine deutliche Veränderung im Größenprofil hin zu kleineren Zellen. Die Zunahme der apoptotischen Zellen (Durchmesser zwischen $7,5$ und $10,5 \mu\text{m}$) und ihre Verschiebung hin zu apoptotischen Körperchen sowie toten Zellen (Durchmesser kleiner als $7,5 \mu\text{m}$) läßt sich anhand der Veränderung des Größenprofils verfolgen.

Auch die Kernmorphologie der synchronisierten HL60-Zellen (hier nicht gezeigt) bestätigt ein früheres und massiveres Einsetzen der Apoptose, wie auch schon aus der durchflußzytometrischen Messung deutlich geworden ist (Abbildung 17).

4.2.3 DNA-FRAGMENTIERUNG IM „*IN VITRO*“-ANSATZ MIT ISOLIERTEN KERNEN

Die Arbeit mit isolierten Kernen erwies sich als eine weitere Möglichkeit, um möglichst viel DNA in dem gleichen Stadium der apoptotischen Fragmentierung zu gewinnen. Dazu wurden aus nicht apoptotischen HL60-Zellen Kerne nach der Methode von HEWISH und BURGOYNE (1973) isoliert. Der apoptotische Signalweg wurde auf zwei verschiedenen Ebenen ins Spiel gebracht: Zum einen wurde aus Apoptose-induzierten HL60-Zellen nach LAZEBNIK et al. (1993) Zytoplasma präpariert und dieses mit den Kernen zeit- und konzentrationsabhängig inkubiert. Ziel war es, hierdurch den kompletten apoptotischen Signalweg – soweit im Zytoplasma lokalisiert - in Gang zu setzen. Zum anderen wurde aus nicht apoptotischen Zellen Zytoplasma präpariert und zusammen mit den isolierten Kernen inkubiert. Die apoptotische DNA-Fragmentierung wurde durch Zugabe von in Hefe rekombinant exprimierter Caspase 3 gestartet. Dies bedeutet zugleich eine Einschränkung auf Caspase 3-vermittelte Signalwege.

4.2.3.1 DNA-FRAGMENTIERUNG IM „*IN VITRO*“-ANSATZ MIT ZYTOPLASMA AUS APOPTOTISCHEN ZELLEN

Zunächst mußte auch hier die optimale Induktionsdauer mit Topotecan als Apoptose-Induktor ausgetestet werden, um funktionsfähiges apoptotisches Zytoplasma isolieren zu können. Hierbei ergaben sich die besten Ergebnisse mit über 4 h induzierten Zellen (nicht dargestellt). Nach Präparation der Kernfraktion aus nicht apoptotischen Zellen und dem Zytoplasmaextrakt aus apoptotischen Zellen wurden die einzelnen Komponenten nach dem in Abbildung 19 wiedergegebenen Schema inkubiert. Aus den Ansätzen wurde nach Vorschrift (3.2.11.3.2 und 3.2.11.3.1.1) die hochmolekulare und die niedermolekulare DNA gereinigt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung der hochmolekularen DNA (Abbildung 19A) zeigt eine zunehmende DNA-Fragmentierung, zunächst noch sehr schwach ab 3 min, deutlicher ab 60 min Inkubation mit Zytoplasma aus apoptotischen Zellen. Dies wird bestätigt durch die Auftrennung der niedermolekularen DNA, die das Auftreten der DNA-Leiter ebenfalls zu den angesprochenen Zeitwerten zeigt (Abbildung 19B). In der Spur X wurde DNA aus Kernen aus der Präparation des apoptotischen Zytoplasmas aufgetragen, um eine Überprüfung der Apoptose-Induktion zur Zytoplasmapräparation zu gewährleisten.

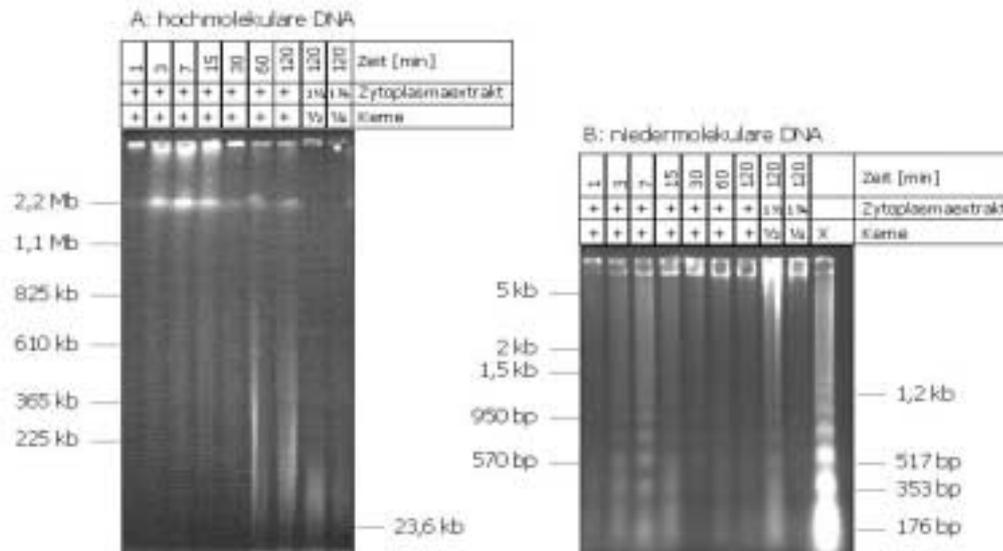


Abbildung 19: Darstellung der DNA-Fragmentierung im „in vitro“-Versuch mit isolierten Kernen und isoliertem Zytoplasma aus apoptotischen HL60-Zellen

A. hochmolekulare DNA, B. niedermolekulare DNA. Die Ansätze sind zusammengesetzt aus 100 μ l Kernsuspension (aus 6×10^8 Zellen), 100 μ l Zytoplasmaextrakt aus 3×10^8 apoptotischen Zellen, bzw. in den als $1/4, 1/2$ etc. angegebenen Aliquots dieses Volumens. Die beginnende DNA-Fragmentierung ist schwach zu erkennen in A ab 3 min Inkubation mit Zytoplasma aus apoptotischen Zellen, in B deutlich als Leiter zu sehen. X. Kerne aus der Präparation des apoptotischen Zytoplasmas zur Kontrolle der Apoptose-Auslösung.

4.2.3.2 DNA-FRAGMENTIERUNG IN DEN „IN VITRO“-VERSUCHEN MIT REKOMBINANT EXPRIMIERTER CASPASE 3 AUS HEFE

Caspase 3 greift in den Signalweg der Apoptose erst in fortgeschrittenem Stadium als sog. „Executioner-Caspase“ (KAUFMANN, 1998) ein. Sie ist als Endglied der Caspase-Kaskade wichtiger Aktivator einer Vielzahl proteolytischer Prozesse und ist darüber hinaus auch an dem DNA-Fragmentierungsprozeß über das CAD/ICAD-System beteiligt. Sie aktiviert die zumindest für die internukleosomale DNA-Spaltung verantwortliche DNase (daher auch Caspase Activated DNase – CAD) durch Spaltung ihres Inhibitors ICAD (Inhibitor of CAD). Durch die Zugabe von Caspase 3 zu isoliertem Zytoplasma und isolierten Kernen wurde die apoptotische Signalkaskade auf der Ebene der Caspase 3 gestartet. Inwieweit retrograd andere Caspasen der Signalkaskade aktiviert werden können, ist nicht bekannt.

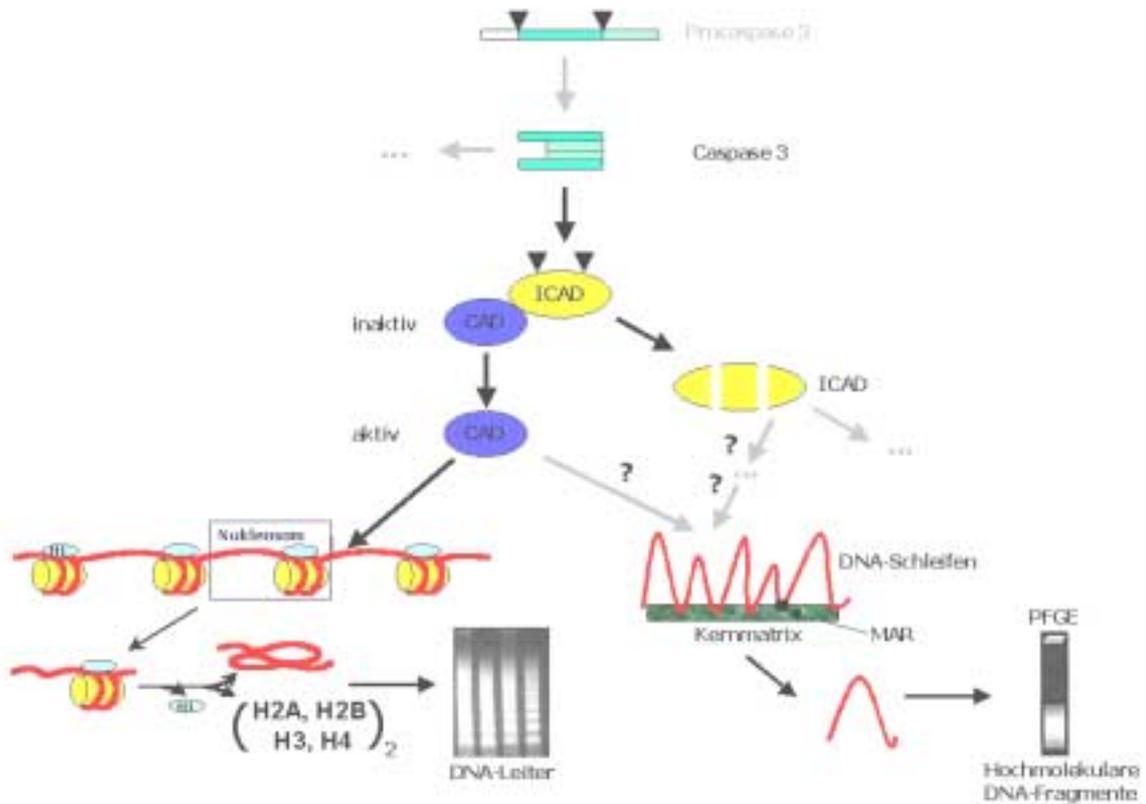


Abbildung 20: Reaktionskaskade zur Aktivierung der DNA-Fragmentierung

Durch die Einführung dieses „*in vitro*“-Ansatzes war es möglich, den initialen Punkt der DNA-Fragmentierung einzugrenzen. Zudem erzeugt dieses Vorgehen in allen Kernen gleichzeitig apoptotische DNA-Fragmentierung, so daß die „Apoptoserate“ (der Anteil apoptotischer Zellen/Kerne an der Gesamtpopulation) hier 100% beträgt. Darüber hinaus befinden sich alle Kerne in derselben Phase der apoptotischen DNA-Fragmentierung, da sie gleichzeitig durch Zugabe der Caspase 3 induziert wurden. Damit besteht insofern ein Vorteil gegenüber den vorher vorgestellten Methoden, als die gesamte untersuchte DNA tatsächlich aus „apoptotischen“ Zellkernen stammt und sich nicht aus apoptotischen und nicht apoptotischen Zellen zusammensetzt. Dadurch sollte die Nachweisempfindlichkeit für die geplante Suche nach bevorzugten Schnittstellen während der Apoptose deutlich ansteigen. In einer Reihe aufeinander aufbauender Versuche wurde ein zeitlich eng umgrenztes Fenster der initialen DNA-Fragmentierung von nur wenigen Minuten definiert, hier gezeigt an zwei Beispielen. Bei den vorliegenden Bedingungen gelang eine Eingrenzung auf nur 15 min.

Tatsächlich zeigt die Auftrennung der DNA aus den Versuchsansätzen eine sehr homogene Spaltung (Abbildung 21B) in Fragmente der Größe von etwa 500 kb bis 20 kb nach 5 min Inkubation mit Caspase 3. Nach 15 min ist bereits die gesamte DNA der Zelle in Fragmente der Größe 100 kb gespalten. In den folgenden 45 min folgt die Spaltung der DNA in die nukleosomalen Fragmente (vgl. Abbildung 21A).

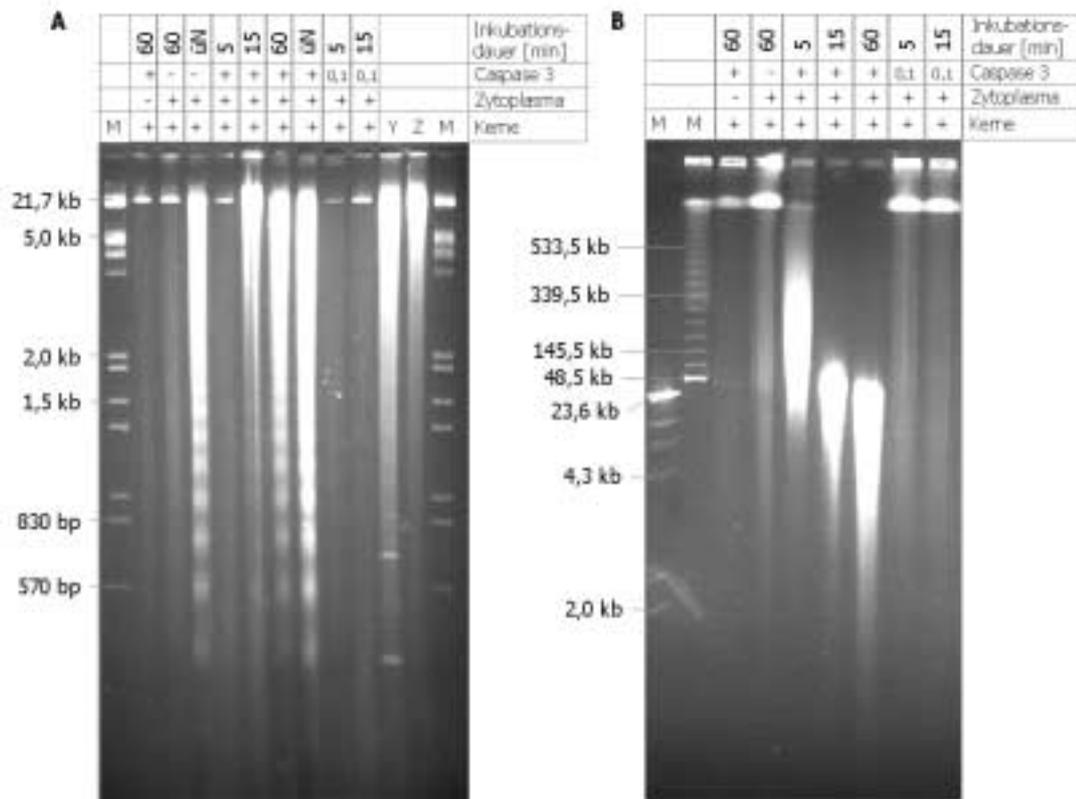


Abbildung 21: Darstellung der DNA-Spaltung in hoch- und niedermolekulare Fragmente erzeugt mit Caspase 3, Zytoplasma und Kernen im „in vitro“-Versuch V5

Die Auftrennung der DNA aus Caspase 3-behandelten Kernen zeigt eine sehr homogene und nahezu alle Kerne umfassende DNA-Fragmentierung. Die Zusammensetzung des Ansatzes besteht aus 200 μ l Kernsuspension (aus 6×10^8 Zellen), 200 μ l Zytoplasmaextrakt (aus 3×10^8 Zellen) und 100 μ l Caspase 3, soweit nicht anders angegeben. 0,1 entspricht einem zugegebenen Caspase 3-Volumen von 10 μ l. A. niedermolekulare DNA, B. hochmolekulare DNA. Insbesondere in der Darstellung der hochmolekularen DNA (B) ist der massive Abbau der DNA zunächst zu einer Größenordnung von 500 bis 50 kb und später auf 100 bis 20 kb deutlich zu verfolgen. (Y) chromosomale DNA, verdaut mit *Eco RI*, (Z) chromosomale DNA, verdaut mit *Bam HI*. uN über Nacht bei 4°C inkubiert, der Rest der Inkubationen erfolgte bei 37°C. Die über Nacht ohne Caspase 3-Zugabe entstandene DNA-Leiter läßt sich durch Aktivierung einer endogenen DNase erklären.

Im zweiten Beispiel wird die Eingrenzung des Zeitfensters der apoptotischen DNA-Fragmentierung besonders deutlich (Abbildung 22). Innerhalb weniger Minuten kommt es nach Aktivierung der DNase(n?) zu einem rapiden Abbau der nukleären DNA auf eine Größe von 2,2 Mb bis 50 kb mit einem Maximum zwischen 300 und 50 kb, die nach 60 min einen zumindest vorläufigen Gleichgewichtsstatus erreicht hat.

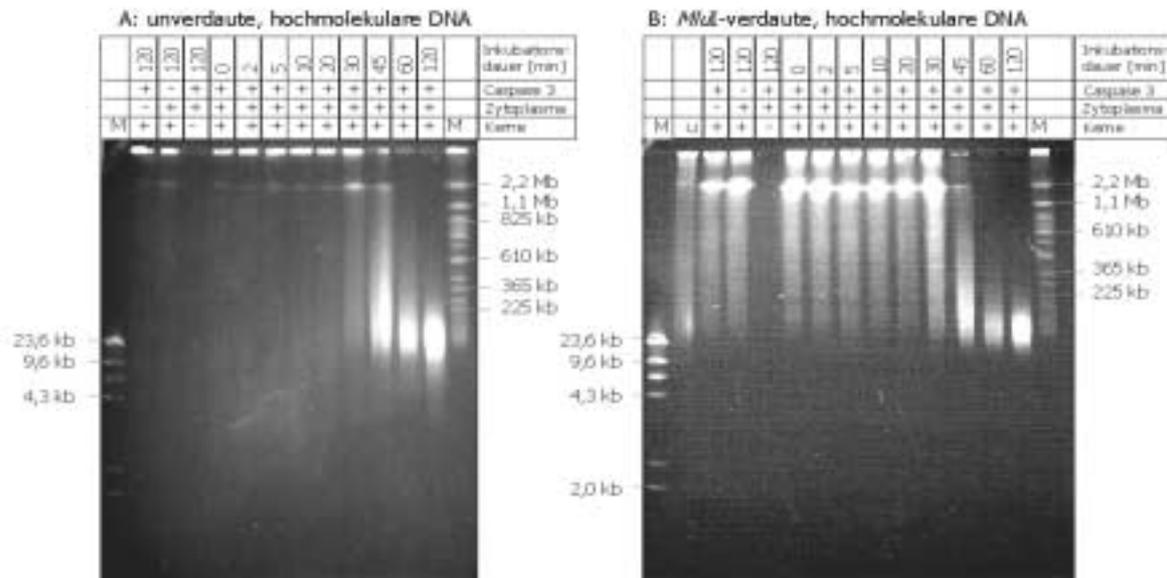


Abbildung 22: Darstellung der Spaltung in hochmolekulare Fragmente im „in vitro“-Versuch V8

Im linken Teil der Abbildung ist die nicht mit Restriktionsenzymen verdaute, hochmolekulare DNA der verschiedenen Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt, im rechten Teil wurden die Agaroseblöckchen vorher mit dem Restriktionsenzym *MluI* inkubiert. Die DNA zeigt nach 30 min Inkubation die zunehmende Fragmentierung zu einer DNA-Größe zwischen 300 und 50 kb zwischen 30 und 45 min. Sie erreicht einen vorübergehenden Gleichgewichtszustand nach 45 min Behandlung, der schon nach 1 h zur Spaltung in kleinere Fragmente fortschreitet. Die Zusammensetzung des Ansatzes besteht aus 110 μ l Kernsuspension (aus 6×10^8 Zellen), 110 μ l Zytoplasmaextrakt (aus 3×10^8 Zellen) und 10 μ l Caspase 3. (M) DNA-Größenstandard λ -*HindIII* bzw. DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A.

4.2.4 ZUSAMMENFASSUNG DES ABSCHNITTES OPTIMIERUNG DER APOPTOSERATE (4.2)

Die Optimierung der Apoptose-induzierenden Systeme ergibt zwei besonders wirkungsvolle Methoden, die im Verlauf dieser Arbeit hauptsächlich verwendet wurden: Zum einen der Einsatz synchronisierter Zellen in Verbindung mit einem spezifisch in der S-Phase des Zellzyklus wirkenden Apoptose-Induktor („in vivo“-Versuche), zum anderen der Einsatz von isolierten Kernen und isoliertem Zytoplasma und Vermittlung der Apoptose über Zugabe von rekombinant exprimierter Caspase 3, einem Effektormolekül der apoptotischen Signalkaskade („in vitro“-Versuche). Beide Ansätze haben den Vorteil, Apoptose in sehr vielen Zellen bzw. Kernen (bis zu 100% bei den „in vitro“-Versuchen) und äußerst gleichmäßig auszulösen. Dadurch ermöglichen sie sowohl die Suche nach bevorzugten Schnittstellen während der Apoptose als auch die Untersuchung der Kinetik und Ortsspezifität der apoptotischen DNA-Fragmentierung.

4.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG

Der Vorgang der DNA-Fragmentierung bei der Apoptose ist ein relativ spät auftretender Prozeß in der Signalkaskade der Apoptose. Über den genauen kinetischen Verlauf, die beteiligten DNasen und den exakten Ablauf ist wenig bekannt, auch wenn von ENARI et al. (1998) die/eine der beteiligten DNasen als die schon erwähnte Caspase Activated DNase oder CAD identifiziert wurde. Daher wurde die Untersuchung sowohl der Kinetik als auch der Ortsspezifität der apoptotischen DNA-Fragmentierung in die Fragestellung dieser Arbeit aufgenommen. Zunächst war im Rahmen der Kinetik der DNA-Fragmentierung von Interesse, ob die Bildung der niedermolekularen DNA-Fragmente früher, später oder gleichzeitig mit jener der hochmolekularen DNA-Fragmente erfolgt. Dies sollte einen ersten Anhaltspunkt dafür geben, ob die DNA-Fragmentierung der beiden Größenordnungen ein gekoppelter Prozeß ist, d.h. ob die niedermolekularen Fragmente aus den hochmolekularen entstehen oder unabhängig davon generiert werden.

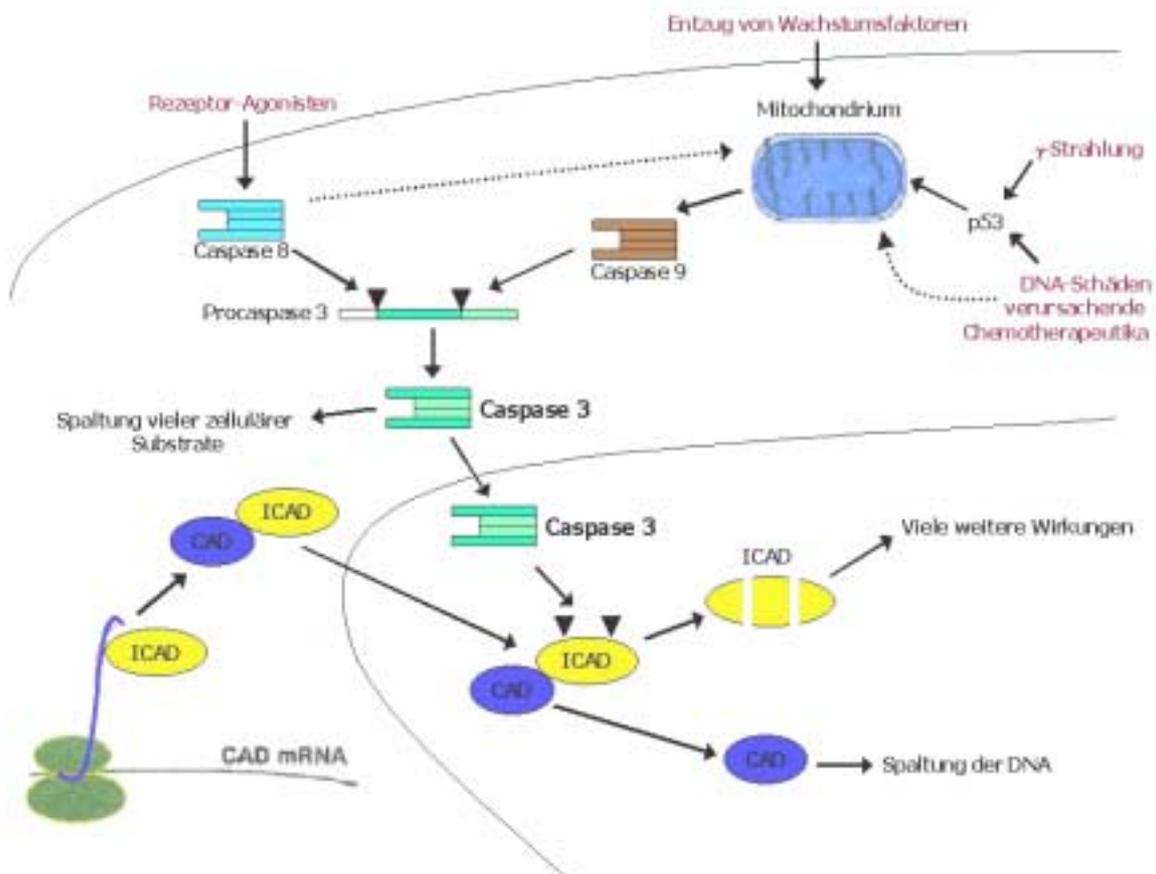


Abbildung 23: Signalkaskade der Apoptose mit Schwerpunkt auf der DNA-Fragmentierung

Um die Kinetik der Spaltung in hoch- und niedermolekulare DNA-Fragmente zu untersuchen, wurde in Zellen Apoptose induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten - neben der Messung im Zellzählgerät sowie anderen Apoptose-Nachweismethoden - die DNA aus den Zellen präpariert. Für die Analyse der hochmolekularen DNA wurden die Zellen in Agaroseblöckchen gegossen, lysiert und die Proteine verdaut (3.2.11.3.2). Zur Untersuchung der niedermolekularen DNA-Fragmente wurden die Zellen mit Triton aufgeschlossen, die DNA extrahiert und gefällt (3.2.11.3.1.1).

4.3.1 KINETIK DER SPALTUNG IN HOCHMOLEKULARE DNA-FRAGMENTE

Die so erhaltene hochmolekulare DNA wurde mittels Pulsfeldgelelektrophorese ohne vorherige Verdauung mit Restriktionsenzymen in Agarose aufgetrennt. Die eintretende DNA-Fragmentierung durch Apoptose ließ sich so anhand der Fragmentgröße und Menge im Gel verfolgen. Sehr hochmolekulare DNA bleibt auch bei dieser hochauflösenden Methode in den Taschen bzw. in der für die ROFAGE typischen Kompressionsbande liegen. Die Kinetik der apoptotischen DNA-Fragmentierung wird stark von der Apoptose-Empfindlichkeit der Zelllinie, ihrer molekularen Ausstattung mit Substanzen aus dem apoptotischen Signalweg und der Art der Induktion beeinflusst. Die ersten hochmolekularen Fragmente im System HL60/Topotecan (Abbildung 24A) und im System HL60/TNF- α /Cycloheximid (Abbildung 24B) treten innerhalb der ersten beiden Stunden nach Induktion auf. Dies ist an der Zunahme der Fragmente im Bereich von 2,2 Mb bis 50 kb zu erkennen.

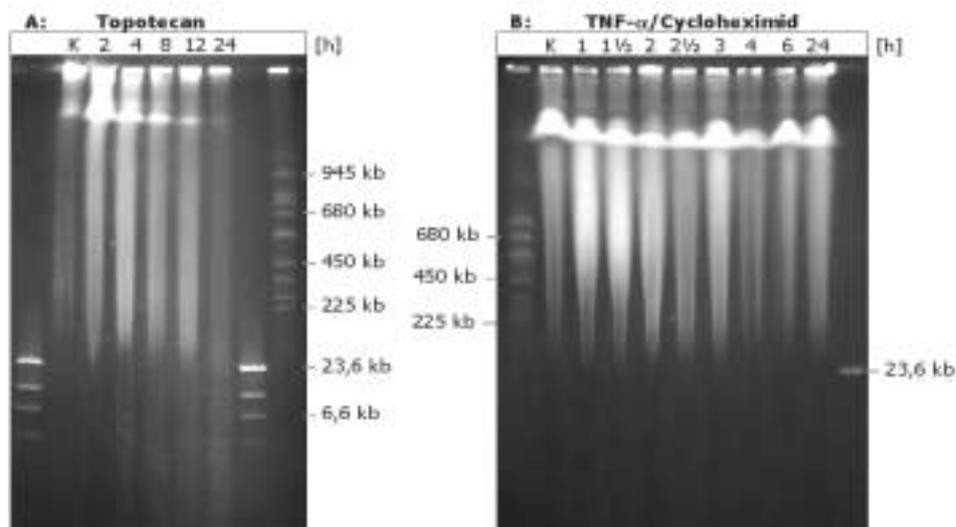


Abbildung 24: Kinetik der DNA-Spaltung in hochmolekulare Fragmente in unsynchronisierten HL60-Zellen mit verschiedenen Apoptose-Induktoren

A. HL60-Zellen und Apoptose-Induktor Topotecan (150 ng/ml). Dargestellt ist unverdaute DNA nach 36 h Auftrennung durch Pulsfeldgelelektrophorese mit den Parametern Intervall von 100 bis 10 s (logarithmisch), Winkel von 120 bis 110° (linear), Spannung von 200 bis 150 V (logarithmisch) in einem 0,7% Agarosegel in Laufpuffer TBE. Erste hochmolekulare DNA-Fragmente entstehen innerhalb der ersten beiden Stunden nach Induktion. DNA-Größenstandard λ -HindIII, DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A. B. HL60-Zellen und Apoptose-Induktor TNF- α /Cycloheximid (5 ng/ml bzw. 5 μ g/ml). Hier erfolgte die Auftrennung in der Pulsfeldgelelektrophorese über 74 h, mit einem logarithmisch abfallenden Intervall von 350 bis 50 s, einer linearen Winkeländerung von 120 bis 110° und einer linear abfallenden Spannung von 120 bis 50 V in einem 0,7% TBE-Agarose-Gel. Die Entstehung hochmolekularer DNA-Fragmente läßt sich hier bereits ab 1 h beobachten. DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A, DNA-Größenstandard λ -HindIII. In B. ist in dem Bereich kleiner als 50 kb keine DNA zu beobachten, da während des Waschens und der Lagerung der Agaroseblöckchen eine Diffusion der Fragmente kleiner als 50 kb stattfindet.

Wie bereits unter 4.2.2 beschrieben, kann durch Synchronisierung des Zellzyklus eine deutliche Steigerung der Apoptoserate (der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation) in HL60-Zellen durch den Apoptose-Induktor Topotecan erreicht werden. Die Zellen werden dabei durch Aphidicolin-Behandlung für 24 h am Übergang von der G1-Phase zur S-Phase des Zellzyklus blockiert. Nach Freisetzung aus der Blockade durchschreiten sie gemeinsam die S-Phase. Durch Zugabe von Topotecan, das als Topoisomerase I-Hemmstoff S-Phase-spezifisch wirkt, wird nun in einem hohen Prozentsatz der Zellen gleichzeitig Apoptose ausgelöst. Dies wirkt sich nicht nur positiv auf die Rate an apoptotischen Zellen aus, sondern auch auf die Beobachtbarkeit der Kinetik der DNA-Fragmentierung. So ist die Entstehung hochmolekularer apoptotischer Fragmente in synchronisierten HL60-Zellen bereits ab 1 h 45 min (Abbildung 25A) zu beobachten.

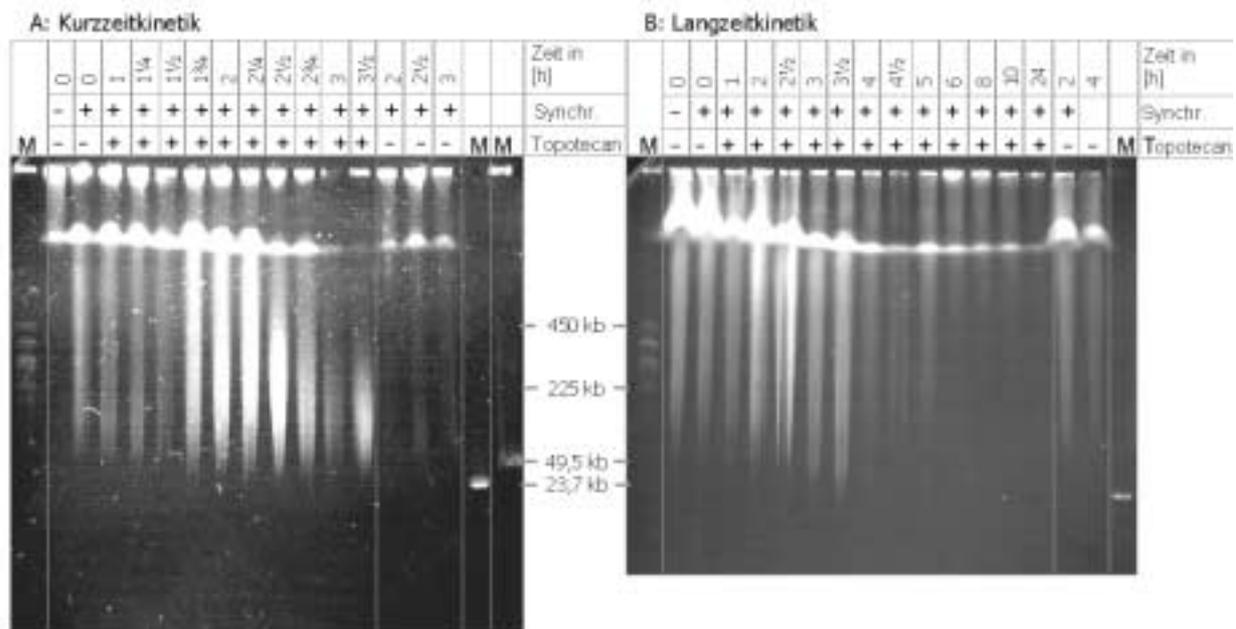


Abbildung 25: Kinetik der Spaltung in hochmolekulare DNA-Fragmente in synchronisierten Zellen mit Topotecan als Apoptose-Induktor

In mit Aphidicolin synchronisierten HL60-Zellen wurde mit Topotecan (150 ng/ml) Apoptose induziert, die Zellen in Agaroseblöckchen gegossen, lysiert und einer Proteinverdauung unterzogen (3.2.11.3.2). Im Verlauf der Kinetik (A) nimmt die DNA-Menge der Größenordnung 50 kb bis 1,1 Mb, die auf apoptotische DNA-Fragmentierung zurückzuführen ist, deutlich zu. Die Spaltung in hochmolekulare Fragmente beginnt nach 1 h 45 min Induktion. (M) DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A, λ -HindIII-Größenstandard, λ -Phagen-Konkatemere als Größenstandard. In (B) wurde der beobachtete Zeitraum noch weiter ausgedehnt, so daß hier Werte bis zu 24 h nach Freisetzung der Zellen aus dem Aphidicolin-Block enthalten sind, in denen die apoptotische DNA-Fragmentierung offensichtlich schon sehr weit fortgeschritten ist. (M) DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A, λ -HindIII-Größenstandard.

4.3.2 KINETIK DER DNA-SPALTUNG IN NIEDERMOLEKULARE FRAGMENTE

Die Darstellung der niedermolekularen DNA erfolgte mittels konventioneller Agarose-Gelelektrophorese. Die aufgetrennten DNA-Fragmente erreichen eine Größe von bis zu 21 kb. Im System HL60-Zellen mit Topotecan als Apoptose-Induktor (Abbildung 26A) tritt die niedermolekulare DNA-Fragmentierung nach 3 h in Form der typischen DNA-Leiter auf, im System mit TNF- α /Cycloheximid als Induktor (Abbildung 26B) bereits nach 1,5 h. Damit findet die DNA-Spaltung in niedermolekulare Fragmente in beiden Systemen zeitversetzt um jeweils mindestens 30 min nach der initialen DNA-Spaltung in hochmolekulare Fragmente statt (vergleiche Abbildung 24A und B).

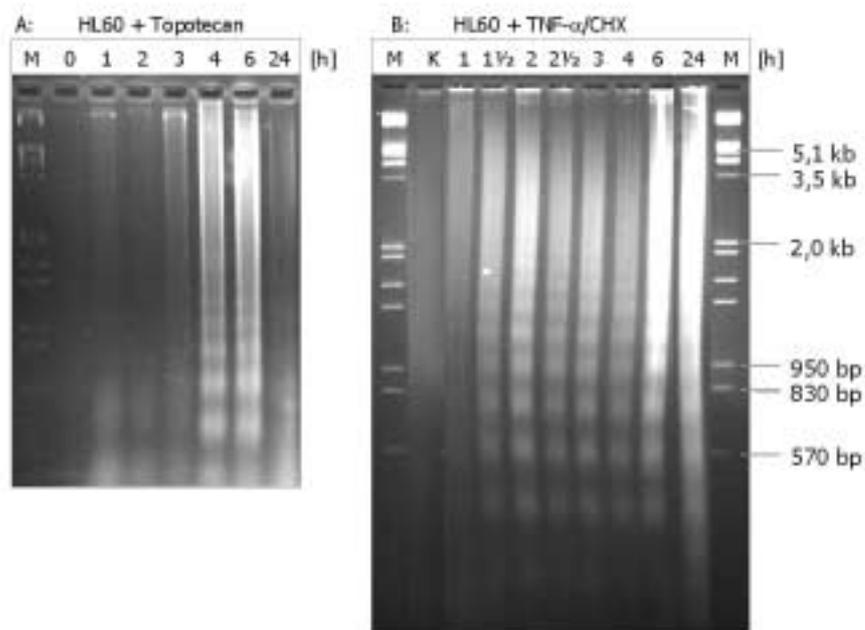


Abbildung 26: Kinetik der DNA-Spaltung in niedermolekulare Fragmente in unsynchronisierten HL60-Zellen mit verschiedenen Induktoren

A. DNA aus HL60-Zellen induziert mit Topotecan (150 ng/ml). (M) DNA-Größenstandard *Eco RI*/ λ -*HindIII*. Die Spaltung der DNA in niedermolekulare Fragmente in Form der typischen DNA-Leiter tritt nach 4 h Behandlung auf. B. DNA aus HL60-Zellen mit dem Induktor TNF- α /Cycloheximid (5 ng/ml bzw. 5 μ g/ml) behandelt. DNA-Größenstandard *Eco RI*/ λ -*HindIII*. Die DNA-Leiter ist bereits nach 1,5 h Induktion erkennbar.

Noch genauer kann der Abstand zwischen dem Einsetzen der Spaltung in hoch- und niedermolekulare Fragmente in synchronisierten Zellen verfolgt werden, da hier der Ablauf der Apoptose in den Zellen durch die gemeinsame Induktion in der S-Phase sehr gleichmäßig beginnt. In Abbildung 27 ist die Kinetik der Spaltung in niedermolekulare DNA-Fragmente in synchronisierten HL60-Zellen gezeigt. Die Zellen stammen aus demselben Versuchsansatz wie für die Auftrennung der hochmolekularen DNA (Abbildung 25) und lassen sich daher gut vergleichen. Tatsächlich ergibt sich hier eine noch klarere zeitliche Eingrenzung: Während die hochmolekularen DNA-Fragmente nach 1 h 45 min (Abbildung 25A) entstehen, setzt die DNA-Spaltung in niedermolekulare Fragmente erst nach 2 h (Abbildung 27A) ein.

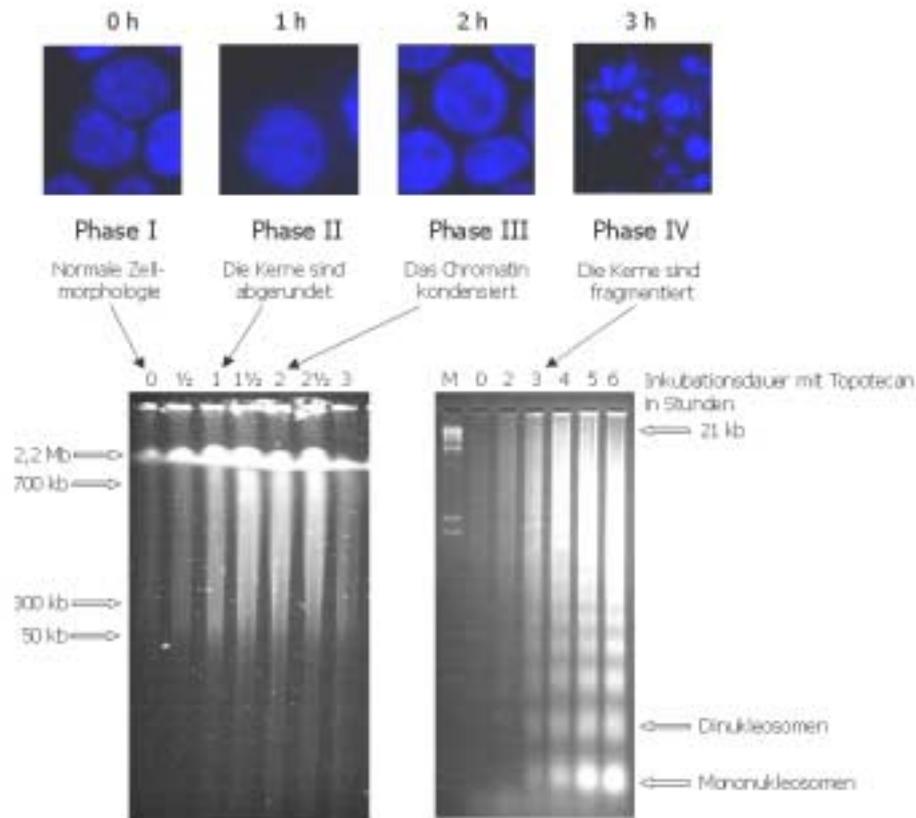


Abbildung 28: Vergleich der Zellmorphologie während der Apoptose mit dem Auftreten der verschiedenen DNA-Fragmentgrößen

Dargestellt sind im oberen Bereich der Abbildung mit DAPI gefärbte HL60-Zellen nach Inkubation mit Topotecan (150 ng/ml) für die angegebene Zeitdauer in Stunden; darunter sind die morphologischen Phasen der Apoptose nach GHIBELLI et al. (1995) zugeordnet. Die in den einzelnen Phasen auftretenden DNA-Fragmentgrößen sind anhand der pulsfeldgelelektrophoretischen Auftrennung (links) und der konventionellen Auftrennung (rechts, DNA-Leiter) dargestellt. In Phase II entstehen mit der Veränderung der Kerngestalt sehr hochmolekulare DNA-Fragmente, die in der Größenordnung bis $\geq 2,2$ Mb liegen. In der Phase III findet die Chromatinkondensation statt. Sie wird begleitet von der Entstehung hochmolekularer Fragmente im Bereich 700 bis 50 kb. Die Phase IV schließlich umfaßt die Desintegration des Kerns; sie fällt zusammen mit der DNA-Spaltung in niedermolekulare Fragmente, also der Entstehung der DNA-Leiter.

4.3.4 KINETIK DER DNA-FRAGMENTIERUNG IM „IN VITRO“-ANSATZ MIT CASPASE 3

Der systematische Ansatz der „in vitro“-Versuche wurde bereits unter 4.2.3 vorgestellt. Hier kam es zu einer unerwartet schnellen Fragmentierung der DNA nach Zugabe von Caspase 3. Caspase 3 als sogenannte Effektor-Caspase findet sich am Ende des Apoptose-Signalwegs und aktiviert direkt die „Caspase Activated DNase“ (CAD), die zumindest für einen Großteil der DNA-Fragmentierung bei Apoptose verantwortlich ist. Um eine weitere Bestätigung dafür zu erhalten, daß die DNA-Spaltung in hochmolekulare Fragmente vor der Spaltung in niedermolekulare Fragmente einsetzt, liegt der Gedanke nahe, die in den beiden vorigen Kapiteln nachgewiesene Reihenfolge der Entstehung der DNA-Fragmente auch in diesem System nachzuweisen, da es in dieser Art des Versuchs zu einer vollständigen Spaltung der DNA der eingesetzten isolierten Kerne kommt. Abbildung 29 zeigt, daß dies der Fall ist: Während die hochmolekularen DNA-Fragmente bereits nach 5 min Behandlung mit Caspase 3 deutlich werden, treten die niedermolekularen DNA-Fragmente im Vergleich zur Kontrolle ohne Caspase 3-Zusatz erst nach

2000; ROBERTSON et al., 2000). Ein DNA-Fragmentierungs-unabhängiger Apoptose-Nachweis ist die Spaltung der Poly-(ADP-Ribosyl)-Polymerase (PARP, 116 kDa) in ein 85 kDa und 27 kDa Fragment während der Apoptose (LAZEBNIK et al., 1994). Sowohl das Ausgangsprotein als auch das 85 kDa Fragment können im Western-Blot durch den Anti-PARP-Antikörper nachgewiesen werden (3.2.23.2.1). PARP katalysiert die Bildung von Poly-(ADP-Ribose), das als Teil eines Multiproteinkomplexes an der Reparatur und Replikation von DNA beteiligt ist (TRUCCO et al., 1998). Es wird vermutet, daß der Abbau von PARP durch Caspasen dazu dient, die DNA-Reparaturmechanismen zu unterbinden (KAUFMANN et al., 1993; LAZEBNIK et al., 1994).

In einer Zeitkinetik von HL60-Zellen induziert mit dem Apoptose-Induktor Topotecan (150 ng/ml) tritt das Spaltungsprodukt der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase nach 1 h 15 min Induktion auf (Abbildung 30). Damit ist die Spaltung von PARP ein Prozeß, der etwa 30 min vor der DNA-Fragmentierung beider Größenordnungen einsetzt. Dies unterstützt die Annahme, daß proteolytische Prozesse tatsächlich der Aktivierung der Endonuklease(n) vorausgehen (WEAVER et al., 1996 und Kap. 5.6).

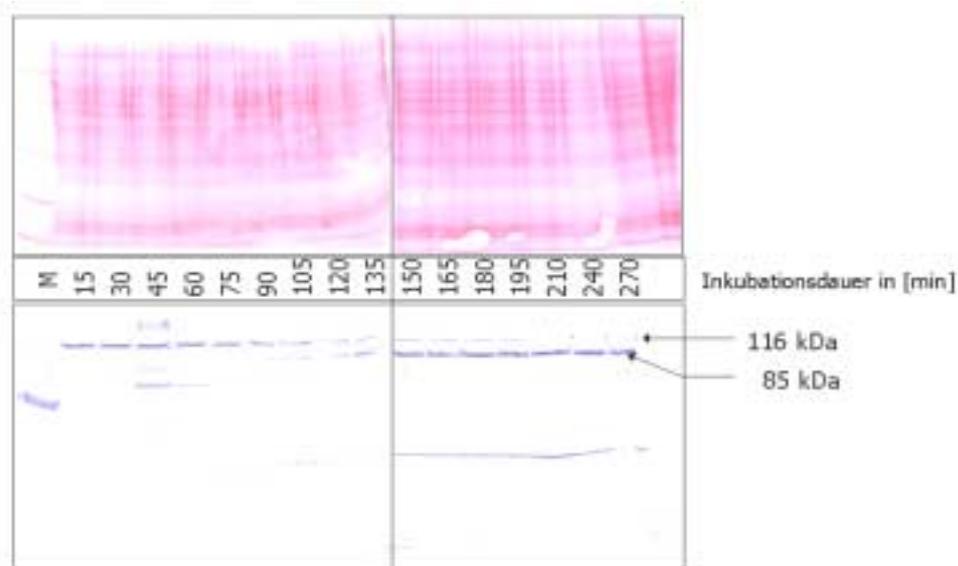


Abbildung 30: Nachweis der PARP-Spaltung während der Apoptose

In HL60-Zellen wurde durch Behandlung mit Topotecan (150 ng/ml) Apoptose induziert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen, daraus die Proteine präpariert (3.2.23.2.1), im denaturierenden 12% (v/v) SDS-Acrylamid-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. In (A) sind die transferierten Proteine mit Ponceau S angefärbt, in (B) ist die immunologische Identifizierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase auf dem Western-Blot dargestellt. Der polyklonale Primärantikörper gegen PARP wurde 1:1.000 in Blocklösung verdünnt, der Zweitantikörper Ziege Anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Alkalische Phosphatase 1:5.000 in Blocklösung. Der Nachweis erfolgte mit NBT/BCIP. Im Laufe der Apoptose verschwindet das 116 kDa Ausgangsprodukt und es erscheint ab 1 h 15 min Induktion das 85 kDa große Spaltprodukt. (M) Protein-Größenstandard.

4.3.6 ZUSAMMENFASSUNG DES ABSCHNITTES UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG (4.3)

Die Untersuchung der zeitlichen Abfolge der Apoptose ergab, daß die hochmolekularen DNA-Fragmente vor den niedermolekularen Fragmenten entstehen. Die Entstehung der DNA-Fragmente und ihr Abbau erfolgen sehr rasch. Es wurde gezeigt, daß zumindest „*in vitro*“ die niedermolekularen Fragmente aus

den hochmolekularen Fragmenten entstehen. Die Spaltung des Proteins PARP setzt vor der DNA-Fragmentierung ein und geschieht etwa gleichzeitig mit der morphologischen Veränderung des Kerns. Zudem können die morphologisch sichtbaren Phasen mit der Entstehung der DNA-Fragmente korreliert werden: Die hochmolekularen Fragmente entstehen in Phase II und III (Abrundung des Kerns und Kondensation des Chromatins) der Apoptose, die niedermolekularen Fragmente in der Phase IV (Zerfall in apoptotische Körperchen).

4.4 VERSUCHE ZUM NACHWEIS VON BEVORZUGTEN APOPTOTISCHEN SCHNITTSTELLEN IN EINER MODELLREGION

Um eine Aussage darüber zu erhalten, ob die DNA-Fragmentierung während der Apoptose zufällig erfolgt, oder an bevorzugten Schnittpunkten im Genom, wurde in den verschiedenen Versuchsanordnungen Apoptose induziert und in einer Modellregion nach bevorzugten Schnittpunkten mittels indirekter radioaktiver Endmarkierung gesucht. Als Genomabschnitt zur Analyse von bevorzugten Schnittpunkten wurde der Histongencuster gewählt, da durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe dieser Cluster über einen Bereich von 300 kb im Detail bekannt war (ALBIG et al., 1997). Der Histongencuster ist auf dem humanen Chromosom an der Position 6p21 lokalisiert.

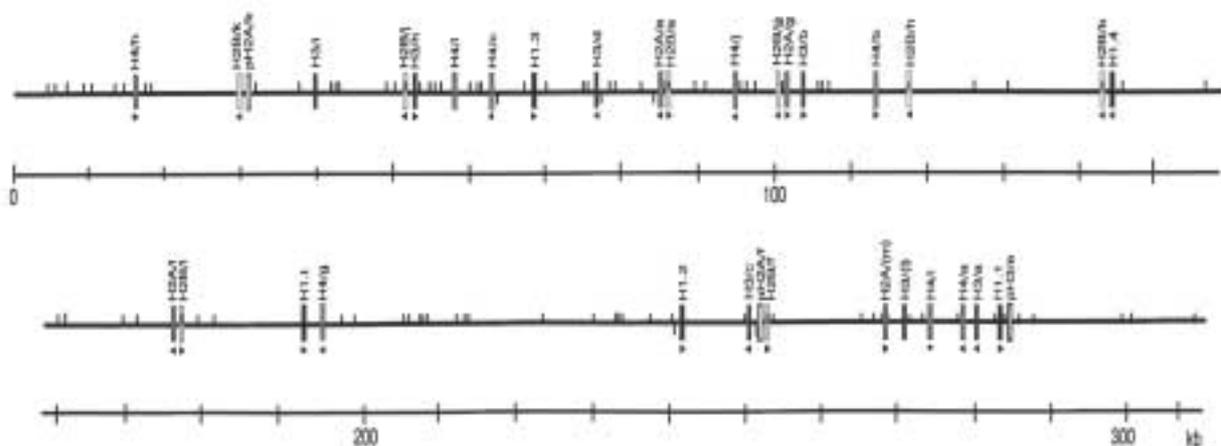


Abbildung 31: Der große Histongencuster auf Chromosom 6

Dargestellt ist ein Schema des 1997 von Albig et al. beschriebenen großen Histongencusters auf Chromosom 6. Die Gene der 35 in diesem Cluster enthaltenen Histone sind als Rechtecke eingezeichnet, wobei offene Markierungen Pseudogene kennzeichnen. Unter einigen der Gene ist die Transkriptionsrichtung durch einen Pfeil gekennzeichnet. Kurze senkrechte Markierungen auf der Führungslinie kennzeichnen *Eco* RI-Restriktionsschnittstellen. Der oben beginnende Genbereich wird im unteren Abschnitt der Abbildung fortgesetzt.

Das Prinzip der indirekten radioaktiven Endmarkierung (NEDOSPASOV und GEORGIEV, 1980) beruht darauf, daß durch Restriktionsverdauung genomischer DNA definierte Fragmente entstehen, die im Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen transferiert werden. Eines dieser Restriktionsfragmente wird an einem seiner Enden mit einer komplementären, radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Dadurch kann im Autoradiogramm der markierte Genomabschnitt erkannt und seine Größe ermittelt werden. Kommt es nun zu einem Schnitt in diesem Fragment z.B. durch Apoptose, so ist das resultierende Fragment kleiner und besitzt eine höhere elektrophoretische Mobilität. Aus der Laufstrecke läßt sich abschätzen, welche Größe das entstandene Fragment besitzt. Daraus läßt sich wiederum der genaue Schnittpunkt ermitteln (Abbildung 32).



Abbildung 32: Prinzip der indirekten Endmarkierung

Dargestellt ist ein schematisierter Ausschnitt der zellulären DNA mit den Restriktionsschnittstellen eines bestimmten Restriktionsenzym als Beispiel. Wird die zelluläre DNA mit diesem Enzym verdaut, so entstehen neben vielen anderen die hier eingezeichneten Restriktionsfragmente. Diese können ihrer Größe nach gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen übertragen werden. Um nun ein bestimmtes Fragment aus der Vielzahl der Fragmente herauszufinden, wird eine kurze, radioaktiv markierte Sonde in der folgenden Hybridisierung eingesetzt, die genau an einem Ende eines dieser Restriktionsfragmente hybridisiert. Damit entsteht durch die Southern-Hybridisierung eine radioaktive Bande bekannter Größe (resultierend aus der Laufstrecke des Fragments). Wird nun durch Apoptose eine Spaltung dieses Fragments erzielt, so wird eine kleinere radioaktive Bande resultieren, die nun ein kleineres Stück des Fragments markiert. Aus der genauen Lokalisation der Bande läßt sich die Größe des Fragments errechnen und damit der genaue Spaltungspunkt identifizieren.

Voraussetzung für diese Art der Southern-Hybridisierung ist, daß ein relativ großer Genombereich mit seinen Restriktionsschnittstellen kartiert sein muß. Insbesondere muß er groß genug sein, um aller Wahrscheinlichkeit nach auch einen apoptotischen Schnittpunkt zu enthalten. Diese Voraussetzungen sind für den großen Histongencluster auf Chromosom 6 gegeben (Abbildung 31).

4.4.1 VERSUCHE ZUM NACHWEIS EINER BEVORZUGTEN SCHNITTSTELLE IM HISTONGENCLUSTER

Aus dem Bereich des Histongenclusters wurden mehrere Sonden zur indirekten Endmarkierung präpariert, von denen insbesondere die Sonde 3 (s. Übersicht in Abbildung 33) standardmäßig benutzt wurde. Sie markiert ein 160 kb großes *MluI*-Fragment. Um einen Überblick über das Fragmentierungsverhalten des gesamten Histongenclusters zu erhalten, wurde eine H4-Sonde verwendet. Sie markiert sämtliche H4-Gene und erfaßt damit viele Einzelfragmente. Da es sich hier nicht um eine indirekte Endmarkierung handelt, ist die Sonde nicht geeignet, um genaue Schnittstellen zu bestimmen. Bei Apoptose-bedingten Spaltungen im Histongencluster könnte das Hybridisierungsmuster dieser Sonde die Freisetzung H4-tragender Fragmente anzeigen.

Sonde 3

Die Sonde 3 umfaßt 1,3 kb und wurde hergestellt aus dem Plasmid pWA 222 durch Restriktionsverdauung mit *MluI* und *Bst* EII. In der indirekten Endmarkierung eingesetzt markiert sie ein 160 kb großes *MluI*-Restriktionsfragment im Histongencluster.

Sonde 7

Die Sonde 7 markiert das gleiche Fragment wie Sonde 3, jedoch ausgehend vom entgegengesetzten Ende des Restriktionsfragments. Ihre Größe umfaßt 300 bp und wurde erstellt aus dem Plasmid pWA 171 durch *Eco* RI-Verdauung.

Sonde H4

Die Sonde H4 markiert die 13 verschiedenen H4-Gene des menschlichen Genoms und erlaubt damit keine indirekte Endmarkierung. Präpariert wurde sie aus dem Plasmid pBB 32 durch Verdauung mit *EcoRI*. Sie ist ca. 2 kb groß.

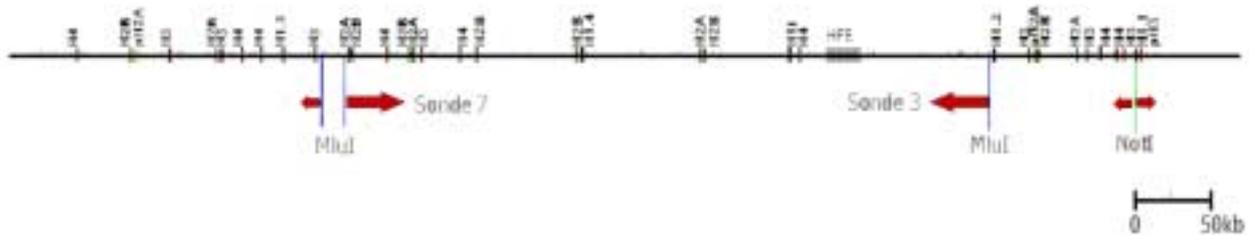


Abbildung 33: Bezugspunkte der Sonden zur indirekten Endmarkierung des Histongenclusters

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Histongencluster auf Chromosom 6. Die Restriktionsschnittstellen für das Enzym *MluI* sind blau markiert, für *NotI* grün markiert. Die hergestellten Sonden sind in rot eingezeichnet und zeigen jeweils den Startpunkt und die Richtung des markierten Restriktionsfragments (die Länge der Pfeile entspricht nicht der Größe der Sonden). In dieser Arbeit sind nur Hybridisierungen mit den Sonden 3 und 7 gezeigt.

4.4.1.1 IN DEN UNSYNCHRONISIERTEN SYSTEMEN IST KEINE BEVORZUGTE SCHNITTSTELLE IM HISTONGENCLUSTER NACHWEISBAR

Zur Untersuchung der bevorzugten Schnittstellen während der Apoptose wurden HL60-Zellen sowohl mit Topotecan, als auch mit Etoposid, Teniposid, Staurosporin und TNF- α /Cycloheximid in zeitlichen Kinetiken induziert und für die Auftrennung der hochmolekularen DNA vorbereitet. Die Verwendung der verschiedenen Induktoren gewährleistet, daß eventuell auftretende Schnittstellen nicht direkt durch den Einfluß der Induktoren auf die DNA entstehen, sondern tatsächlich durch die apoptotische DNA-Fragmentierung selbst. Daher wurden neben den verwendeten Topoisomerase I und II-Hemmern zur Apoptose-Auslösung auch das Cytokin TNF- α in Kombination mit Cycloheximid verwendet. Um die indirekte Endmarkierung der DNA zu ermöglichen, wurde die DNA mit dem Restriktionsenzym *MluI* in definierte Fragmente geschnitten. Die Auftrennung der DNA erfolgte mittels ROFAGE. Nach dem Transfer der DNA auf Nylonmembranen wurden diese mit der entsprechenden radioaktiv markierten Sonde hybridisiert.

In allen Systemen konnte mit der Sonde 3 und Sonde 7 nur die 160 kb Ausgangsbande (erzeugt durch die *MluI*-Restriktionsverdauung) nachgewiesen werden (Abbildung 34). Es traten keine distinkten kleineren Banden auf, die auf einen bevorzugten apoptotischen Schnittpunkt hinweisen würden. Es wurde jedoch Apoptose in bis zu 40% der Zellen ausgelöst (4.2.1.1). Im Gel (links) ist eine deutliche Verschiebung der Größe der Gesamtheit der Fragmente hin zu kleineren Fragmenten zu beobachten. Die Hybridisierungen mit den Sonden 3 und 7 zeigen zu Beginn auftretende Doppelbanden. Diese sind vermutlich auf die unvollständige Verdauung mit Restriktionsenzym durch dessen Methylierungsempfindlichkeit zurückzuführen, oder auf die Retardierung einzelner Fragmente durch die große DNA-Menge im Gel. Diese hohe Konzentration ist jedoch nötig, um einen deutlichen Nachweis in der indirekten

Endmarkierung zu erhalten. Im Verlauf der Kinetik zeigt sich, daß die Hybridisierungsintensität der 160 kb großen Ausgangsbande abnimmt, d.h. daß die DNA abgebaut wird. Es tritt jedoch keine definierte kleinere Bande auf, die einen Hinweis auf einen bevorzugten Angriffspunkt im Histongencluster gibt, so daß hier von gleichmäßig über die ganze Region verteilten Spaltungen ausgegangen werden muß. Auch die Hybridisierung mit der H4-Sonde zeigt in keinem der Ansätze neu auftretende, kleinere Fragmente. Damit gilt für den gesamten Histongencluster, daß in diesem System keine bevorzugte Schnittstelle auftritt.

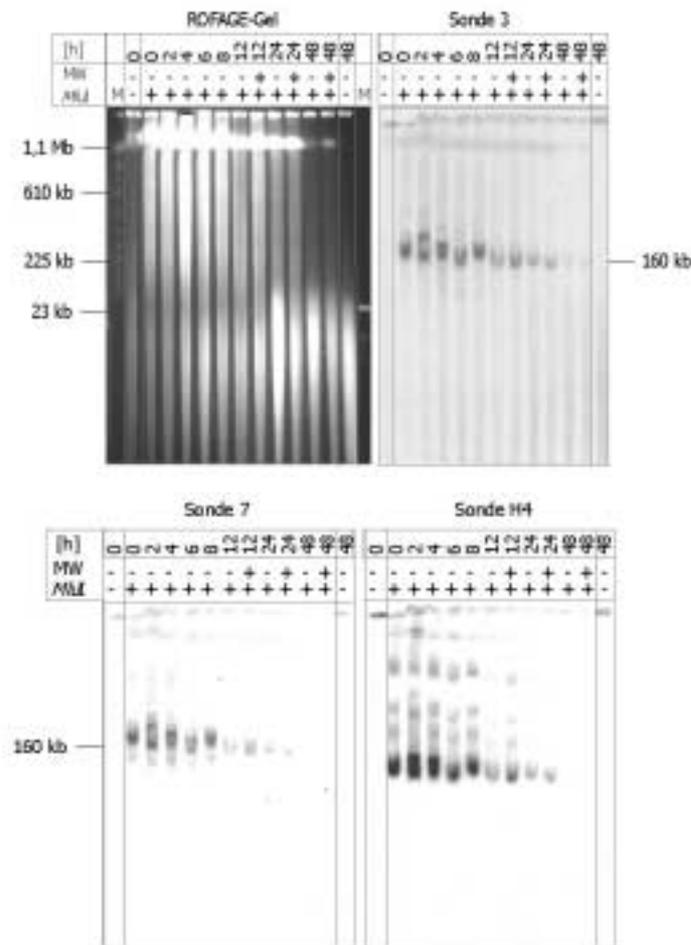


Abbildung 34: Suche nach bevorzugten Schnittpunkten im Histongencluster in unsynchronisierten HL60-Zellen mit Topotecan (150 ng/ml) als Apoptose-Induktor

Dargestellt ist die pulsfeldgelelektrophoretische Auftrennung nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid sowie die dazugehörigen Southern-Hybridisierungen mit den Sonden 3 und 7 (indirekte Endmarkierung) und H4 (keine indirekte Endmarkierung). Die Zeiten geben die steigende Inkubationsdauer mit Topotecan in Stunden wieder. Bei den 12 h, 24 h und 48 h-Werten wurden jeweils zum Vergleich nach je 8 h Medienwechsel mit erneuter Zugabe von Topotecan durchgeführt (angedeutet durch MW). Es ergibt sich dadurch jedoch keine Veränderung in der DNA-Fragmentierung im Vergleich zu den Werten ohne Mediumwechsel. Die DNA der Spure wurde z.T. mit *MluI* geschnitten, um die indirekte Endmarkierung zu ermöglichen. Die Auftrennung über ROFAGE erfolgte über 24 bis 36 h über die Parameter eines logarithmisch-abnehmenden Zeitintervalls von 100 bis 10 Sekunden bei einem linear-abnehmenden Winkel von 120 bis 110° und einer logarithmisch-abfallenden Spannung von 200 bis 150 V. (M) DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A, DNA-Größenstandard λ -*HindIII*. Die indirekten Endmarkierungen zeigen Banden in der Größe um 160 kb. Es entstehen jedoch keine distinkten kleineren Banden im Verlauf der Behandlung mit Topotecan. Die Southern-Hybridisierung mit Sonde H4 zeigt die verschiedenen H4-Gene, doch auch hier ist keine entstehende, definierte kleinere Bande zu beobachten, die auf eine bevorzugte Spaltung im Bereich des Histongenclusters hinweisen würde.

Um dieses Ergebnis auch in einem System zu reproduzieren, dessen Apoptose-Induktion nicht auf DNA-Schäden beruht, wie sie durch die Topoisomerase-Hemmstoffe entstehen, wurden HL60-Zellen mit

TNF- α /Cycloheximid behandelt. Wie unter 1.1.2 beschrieben, verläuft hier der apoptotische Signalweg über die Caspase 8 und nachfolgende Caspasen der Caspase-Kaskade. Auch in diesem System konnte kein bevorzugter Bruchpunkt im Histongencluster während Apoptose nachgewiesen werden. Obwohl die Auftrennung der hochmolekularen DNA-Fragmente im Zeitverlauf eine Zunahme der kleineren Fragmente zeigt, entstehen neben dem 160 kb großen Ausgangsfragment keine definierten kleineren Banden, die auf eine bevorzugten Spaltungsstelle im Histongencluster schließen lassen könnten.

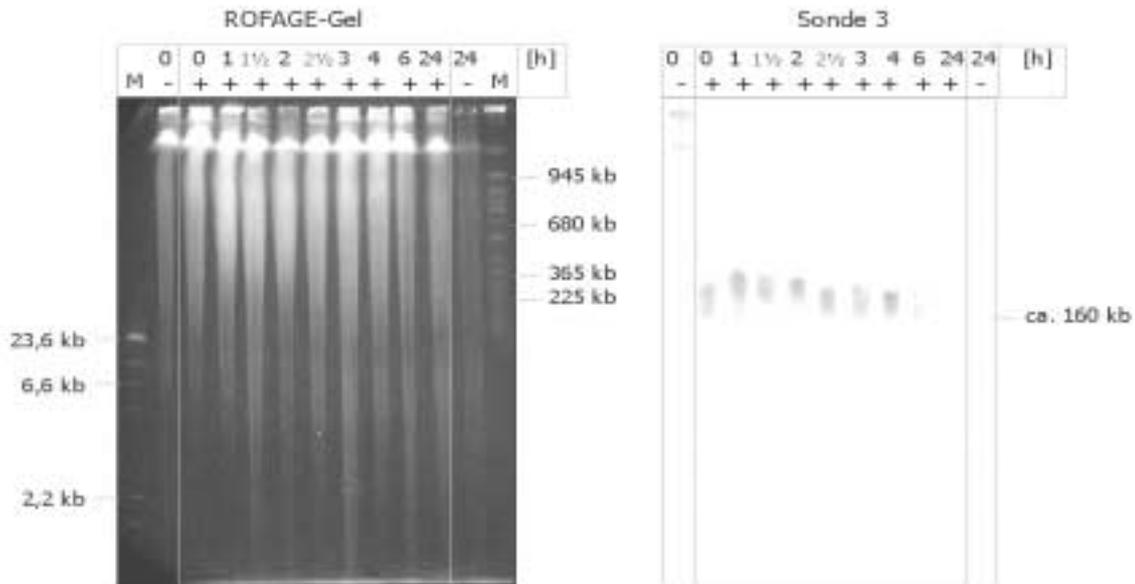


Abbildung 35: Suche nach bevorzugten Schnittpunkten in HL60-Zellen mit TNF- α /Cycloheximid als Apoptose-Induktoren

Links ist das ROFAGE-Gel nach Färbung der DNA mit Ethidiumbromid dargestellt, rechts die dazugehörige Southern-Hybridisierung mit der Sonde 3. Die Zeiten geben die steigende Behandlungsdauer der Zellen mit TNF- α /Cycloheximid wieder. Die DNA wurde z.T. mit *MluI* verdaut, um die indirekte Endmarkierung zu ermöglichen. (M) DNA-Größenstandard λ -*HindIII*, DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A. Auch hier ist nur die 160 kb große Bande des aus der Restriktionsverdauung resultierenden Ausgangsfragments zu beobachten.

Zusätzlich wurde in CEM-Zellen und U937-Zellen Apoptose induziert und dort nach bevorzugten Spaltstellen im Histongencluster gesucht, um auszuschließen, daß es sich bei dem Fehlen der stellenspezifischen DNA-Fragmentierung im Histongencluster um einen für HL60-Zellen spezifischen Effekt handelt. Sowohl in CEM-Zellen (Abbildung 36) als auch in U937-Zellen (nicht gezeigt) konnte wiederum das 160 kb große Ausgangsfragment nachgewiesen werden (die Intensität der Bande schwankt aufgrund unterschiedlichen DNA-Gehalts in den Blöckchen), jedoch keine kleineren Fragmente. Dies zeigt, daß auch unabhängig von der verwendeten Zelllinie kein bevorzugter Apoptose-Schnittpunkt im Histongencluster auftritt.

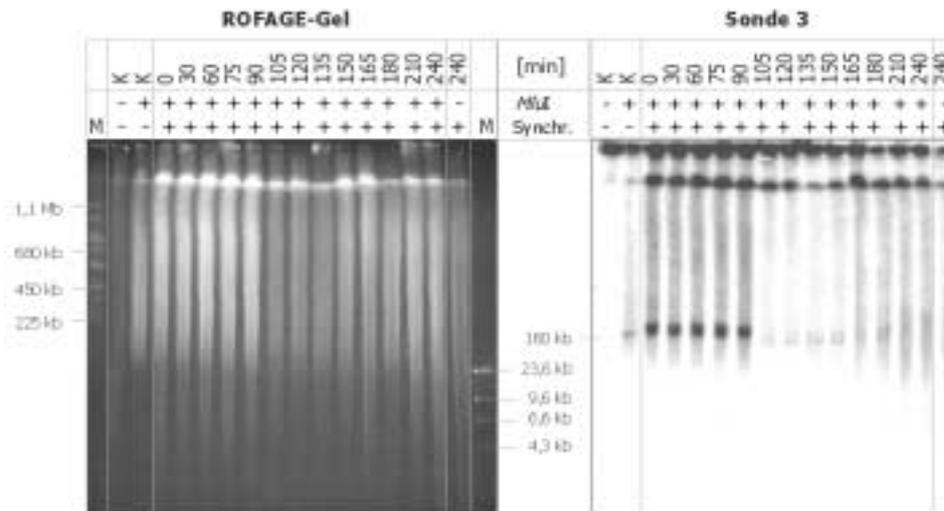


Abbildung 36: Suche nach bevorzugten, apoptotischen Schnittpunkten in CEM-Zellen

Links ist die Auftrennung der DNA über Pulsfeldgelelektrophorese dargestellt, rechts die Southern-Hybridisierung mit der Sonde 3 des Histongenclusters. Die Zeiten geben die Behandlungsdauer der Zellen mit Topotecan wieder. Die DNA wurde z.T. mit *MluI* verdaut. (M) DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A, DNA-Größenstandard λ -*HindIII*. Die indirekte Endmarkierung mit Sonde 3 zeigt die 160 kb große Ausgangsbande, doch auch hier treten keine distinkten Banden auf, die auf eine bevorzugte Spaltstelle im Histongencluster hinweisen würden. Die variable Stärke der Bande ist auf unterschiedlich große Mengen an aufgetragener DNA im Blöckchen zurückzuführen.

4.4.1.2 DIE ANREICHERUNG APOPTOTISCHER ZELLEN DURCH DAS MACS-SYSTEM ERGIBT

E BENFALLS KEINEN BEVORZUGTEN SCHNITTPUNKT IM HISTONGENCLUSTER

Eine weitere Möglichkeit im Bemühen um eine möglichst hohe Apoptoserate war die Anreicherung bzw. Abtrennung apoptotischer Zellen von normalen Zellen. Da kein Zellsortierer zur Verfügung stand, wurde auf ein System zurückgegriffen, das auf der Abtrennung von Zellen mittels Annexin V-gekoppelter Magnetkügelchen basiert. Die selektive Trennung der Zellen erfolgt aufgrund einer Verlagerung („Flip“) des Phosphatidylserins von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite, einem Phänomen, das während der Apoptose auftritt (KOOPMAN et al., 1994). An der Außenseite binden Annexin V-gekoppelte Magnetkügelchen an die Phosphatidylserinmoleküle und ermöglichen die Trennung apoptotischer Zellen von den nicht apoptotischen Zellen im magnetischen Feld des MACS-Separators.

Hierzu wurden HL60-Zellen verwendet, in denen Apoptose durch Topotecan induziert wurde (6 h-Wert), sowie Jurkat-Zellen, die zum einen mit dem Anti-APO/Fas-Antikörper und zum anderen mit TNF- α /Cycloheximid behandelt wurden. Aus Vorversuchen in der Arbeitsgruppe waren hier die einzusetzenden Konzentrationen sowie die benötigte Inkubationsdauer bekannt. Das Größenprofil der Gesamtpopulation induzierter Zellen sowie das Größenprofil der MACS-positiven Zellen wurde im Zellzählgerät ermittelt (Abbildung 37). Die Fraktion der apoptotischen Zellen mit einem Durchmesser von 7,5 bis 10,5 μm ist selektiert; es befinden sich nur wenige nicht apoptotische Zellen (Durchmesser größer als 10,5 μm) in der MACS-positiven Fraktion. Die Auftrennung der hochmolekularen DNA aus der Gesamtpopulation der behandelten Zellen im Vergleich zur MACS-positiven und MACS-negativen Fraktion bestätigt eine gute Auftrennung der Zellen (Abbildung 38); allerdings war die DNA der erhaltenen apoptotischen Fraktion

(MACS-positive Fraktion) nach Verdauung mit *MluI* bereits in der Größenordnung < 100 kb. Nach der jeweiligen Inkubation mit Apoptose-Induktor waren die Zellen zwar noch nicht in einem späten Stadium der Apoptose (morphologische Beobachtungen, nicht gezeigt), aber die DNA-Fragmentierung schritt auch während der etwa 1 h dauernden Auftrennung im MACS-System voran, so daß offensichtlich alleine diese Zeitspanne genügte, um die Zellen in eine späte Phase der Apoptose zu bringen. Damit war diese Art der Anreicherung apoptotischer Zellen keine Alternative im Rahmen der vorgesehenen Untersuchungen der initialen DNA-Fragmentierung.

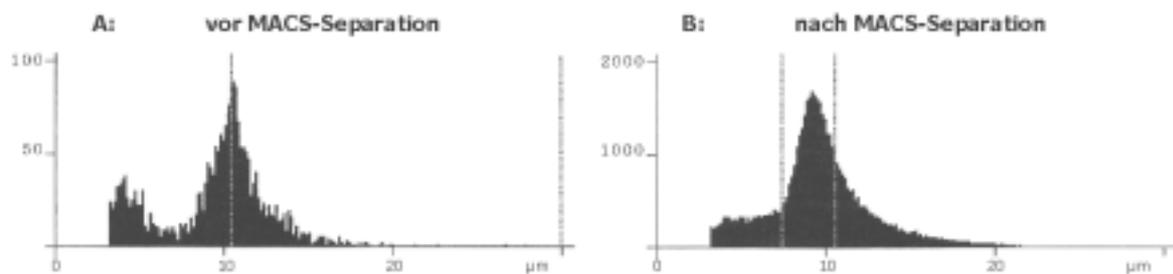


Abbildung 37: Messung der Zellgröße im Zellzählgerät vor und nach MACS-Separation apoptotischer Zellen

A. Gesamtpopulation 24 h mit Topotecan behandelte HL60-Zellen im Zellzählgerät (Dichte: 150.000 Zellen/ml).
B. MACS-positive Fraktion (apoptotische Zellen) nach Abtrennung im Zellzählgerät (Dichte: 4 Mio. Zellen/ml).

Dennoch wurde auch in dem späteren Stadium der apoptotischen DNA-Fragmentierung nach freigesetzten Fragmenten aus dem Histongencluster gesucht. In der MACS-positiven Fraktion tritt keine spezifische Hybridisierung der aus der Restriktionsverdauung resultierenden 160 kb Bande mit Sonde 3 aus dem Histongencluster auf, die DNA ist schon zu weit fragmentiert und befindet sich in einem Bereich kleiner als 100 bis 50 kb. Es treten jedoch auch keine kleineren distinkten Banden auf, die auf einen bevorzugten Abbau dieser Region hinweisen würden. Tatsächlich ist nur ein Schmier an DNA zu sehen, der auf einen mehr oder weniger zufälligen Abbau der DNA des Histongenclusters hinweist (Abbildung 38).

Fragmente aufgrund der großen DNA-Menge im Gel zurückzuführen. Die 160 kb Bande bleibt bis zum 24 h Wert sichtbar, obwohl insgesamt die DNA-Menge stark abgenommen hat (siehe Ethidiumbromidfärbung des Gels). Diese kann jedoch von den ca. 30% nicht apoptotischen Zellen des Gesamtansatzes stammen, so daß dieser Befund nicht aussagt, daß der Bereich des Histongenclusters vor apoptotischer Fragmentierung besonders geschützt wäre. Zum Vergleich durchgeführte Hybridisierungen mit anderen Sonden aus codierenden Bereichen des Genoms (Hochschwefel-Keratingen und Aktinen) zeigten, daß auch in diesen Bereichen des Genoms nicht bevorzugt geschnitten wird (Abbildung 56).



Abbildung 39: DNA-Fragmentierung im Bereich des Histongenclusters in synchronisierten HL60-Zellen mit Topotecan (150 ng/ml) als Apoptose-Induktor

Links ist das ROFAGE-Gel abgebildet, in der Mitte die indirekte Endmarkierung mit Sonde 3, rechts die Hybridisierung mit der Sonde H4. Mit zunehmender Inkubationsdauer mit Apoptose-induzierendem Agens ist eine Abnahme der 160 kb Ausgangsbande (resultierend aus der *MluI*-Verdauung) der Hybridisierung mit Sonde 3 zu erkennen, jedoch keine entstehenden, definierten kleineren Banden, die auf einen bevorzugten Schnittpunkt in diesem Bereich hinweisen würden. Ebenso verhält es sich bei der Sonde H4. (M) DNA-Größenstandard λ -*HindIII*.

Der Vergleich der Hybridisierungsintensität der 160 kb großen Ausgangsbande von unbehandelten Zellen mit Topotecan behandelten Zellen nach Synchronisierung zeigt, daß die Hybridisierungsintensität der Ausgangsbande abnimmt (Sonde 3, Abbildung 39 und Abbildung 40). Dies bedeutet, daß während der Apoptose nicht nur die DNA insgesamt zu kleineren Fragmenten abgebaut wird, sondern auch DNA aus dem Histongencluster in kleinere - jedoch nicht distinkte - Fragmente geschnitten wird. Damit ist der Histongencluster nicht per se vor Fragmentierung geschützt, sondern wird nur nicht an bevorzugten Stellen geschnitten.

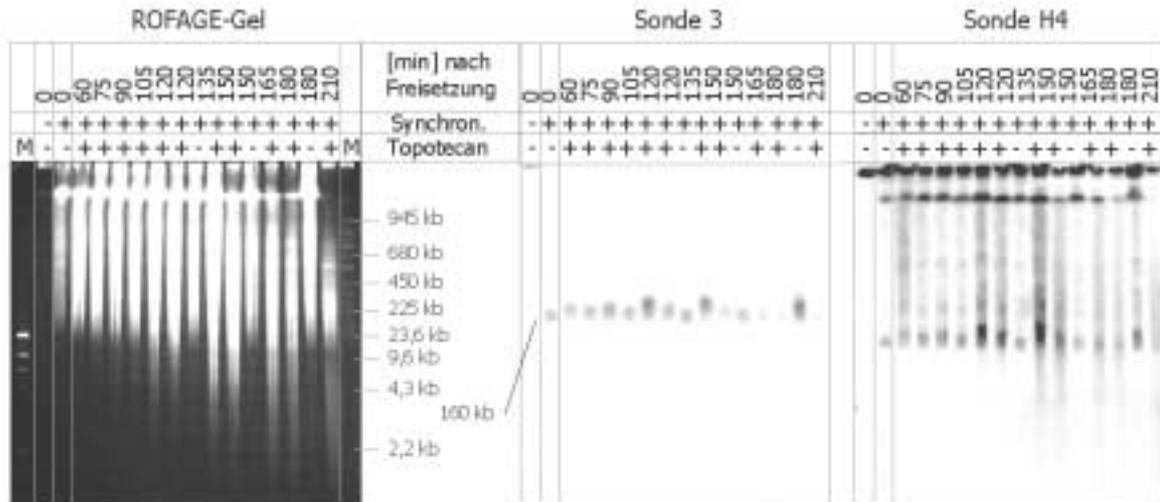


Abbildung 40: Suche nach bevorzugten apoptotischen Schnittpunkten im Histongencluster in synchronisierten HL60-Zellen mit dem Apoptose-Induktor Topotecan

Links ist das ROFAGE-Gel abgebildet, in der Mitte die indirekte Endmarkierung mit Sonde 3, rechts die Hybridisierung mit der Sonde H4. Mit zunehmender Inkubationsdauer mit Apoptose-induzierendem Agens ist über den Zeitverlauf eine Abnahme der 160 kb Ausgangsbande (resultierend aus der *MluI*-Verdauung) der Hybridisierung mit Sonde 3 zu erkennen, jedoch kein bevorzugter Schnittpunkt durch das Auftreten kleinerer, distinkter Banden. Bei der Auftrennung der *MluI*-verdauten DNA aus den synchronisierten Zellen wurden zusätzlich noch Vergleichswerte aus synchronisierten, aber unbehandelten Zellen (dargestellt mit Minuszeichen), die jeweils zum gleichen Zeitpunkt geerntet worden waren wie die Topotecan behandelten Zellen, mit aufgetragen. (M) DNA-Größenstandard λ -*HindIII*, DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A.

4.4.1.4 DIE „IN VITRO“-VERSUCHE MIT ISOLIERTEN KERNEN ZEIGEN EBENFALLS, DAB DIE DNA FRAGMENTIERT WIRD, JEDOCH KEIN BEVORZUGTER SCHNITTPUNKT IM HISTONGENCLUSTER AUFTRITT

Durch die „in vitro“-Versuche mit isolierten Kernen konnte ein hoher Grad an weitgehend synchroner DNA-Fragmentierung insbesondere in den Ansätzen mit rekombinant exprimierter Caspase 3 erreicht werden. In Abbildung 42 besonders deutlich zu erkennen, betrifft die DNA-Fragmentierung alle Kerne in gleichem Ausmaß (siehe Kapitel 4.2.3). Dies erleichtert den Nachweis von bevorzugten Schnittstellen in einer single-copy-Region wie dem 160 kb großen *MluI*-Fragment aus dem Histongencluster, da hier der Hintergrund an nicht apoptotischen und nekrotischen Zellen wegfällt. Sowohl im Ansatz mit apoptotischem Zytoplasma, als auch in den Ansätzen mit Caspase 3 inkubiertem Zytoplasma nicht apoptotischer Zellen ist eine deutliche DNA-Fragmentierung festzustellen. Es entstehen Fragmente definierter Größenordnung (Abbildung 40 und Abbildung 42). Trotz Abnahme der Ausgangs-Restriktionsbande von 160 kb kommt es nicht zum Auftreten definierter kleinerer Fragmente, so daß auch hier bestätigt wird, daß im Histongencluster kein bevorzugter initialer Schnittpunkt enthalten ist. Auch hier weist der in der Hybridisierung auftretende Schmier auf einen gleichmäßigen Abbau dieses Bereichs an verschiedenen, mehr oder weniger zufälligen Stellen hin.

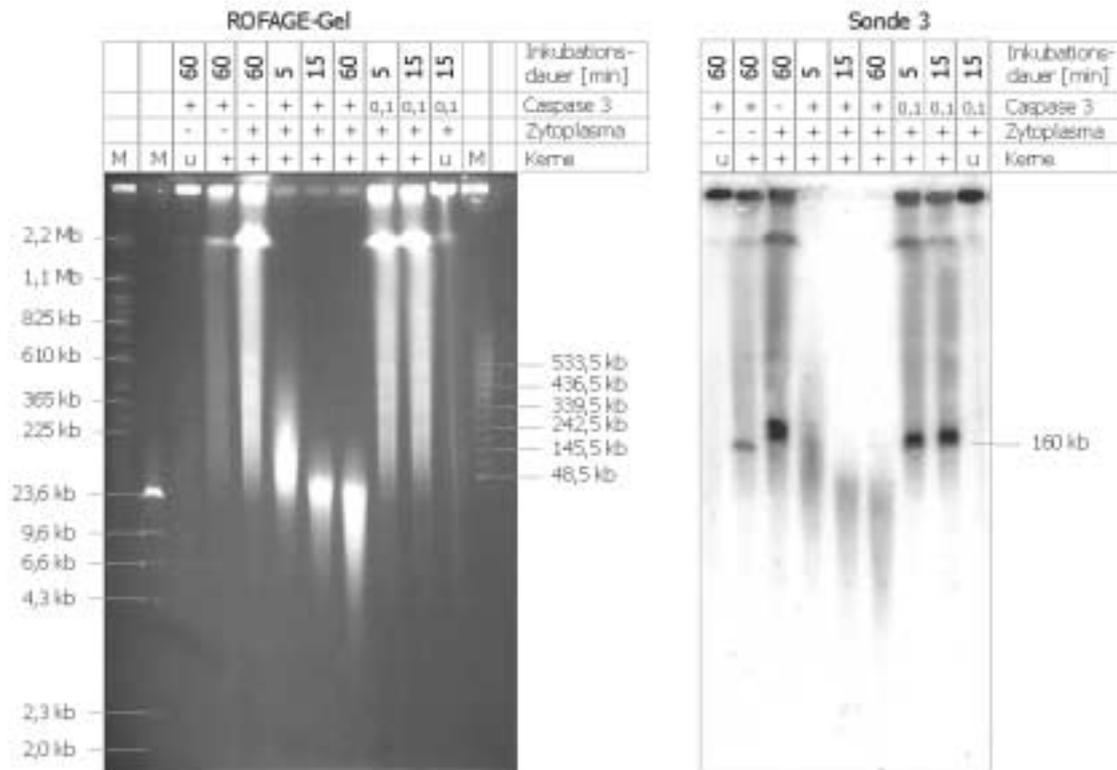


Abbildung 41: Suche nach bevorzugten, apoptotischen Schnittpunkten im „in vitro“-System mit isolierten Kernen

Links ist die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA der isolierten Kerne nach Anfärbung mit Ethidiumbromid gezeigt, rechts die indirekte Endmarkierung mit Sonde 3 aus dem Histongencluster. (M) DNA-Größenstandards YAC-WAY-4A, λ -HindIII, λ -Phagen-Konkatemere. (U) Kerne unverdaut, aber wie angegeben behandelt. Die Zusammensetzung des Ansatzes besteht aus je 200 μ l Kernsuspension (aus 6×10^8 Zellen), 200 μ l Zytoplasmaextrakt (aus 3×10^8 Zellen) sowie 100 μ l Caspase 3 (soweit nicht anders angegeben). Wie bereits in 4.2.3.2 gezeigt, kommt es durch die Inkubation mit ausreichend Caspase 3 (Spuren 6-8) zu einer gleichmäßigen Fragmentierung der zellulären DNA in eine Größenordnung von zunächst 300 bis 50 kb, später zu noch kleineren Größen. In der indirekten Endmarkierung mit Sonde 3 aus dem Histongencluster ist dies durch die Hybridisierung des durch Restriktionsverdauung generierten 160 kb großen Ausgangsfragment zu verfolgen. Durch die Behandlung mit Caspase 3 kommt es zum Verschwinden dieser Bande, d.h. auch dieses Fragment wird im Laufe der Apoptose abgebaut. Es tritt jedoch kein kleineres Fragment in Form einer definierten Bande auf, das auf eine bevorzugte Schnittstelle in diesem Bereich hinweisen würde.

Die DNA-Fragmentierung im „in vitro“-System erlaubt eine Fokussierung auf die initiale DNA-Fragmentierung während der Apoptose, da sie die DNA-Fragmentierung in allen Kernen zur gleichen Zeit erzeugt. Dies wurde in dieser Arbeit genutzt, um den Punkt der initialen Fragmentierung möglichst genau zu definieren. In Abbildung 42 ist gezeigt, daß die DNA-Fragmentierung - wenn sie erst in Gang gesetzt ist - sehr schnell fortschreitet, in diesem Ansatz innerhalb von 15 min auf 50 bis 300 kb. Auch in diesem engmaschigen Netz der Beobachtung der DNA-Fragmentierung konnte jedoch kein bevorzugter Schnittpunkt im Histongencluster festgestellt werden, obwohl auch hier das Ausgangsfragment von 160 kb offensichtlich fragmentiert wird (demonstriert am Verschwinden der Bande).

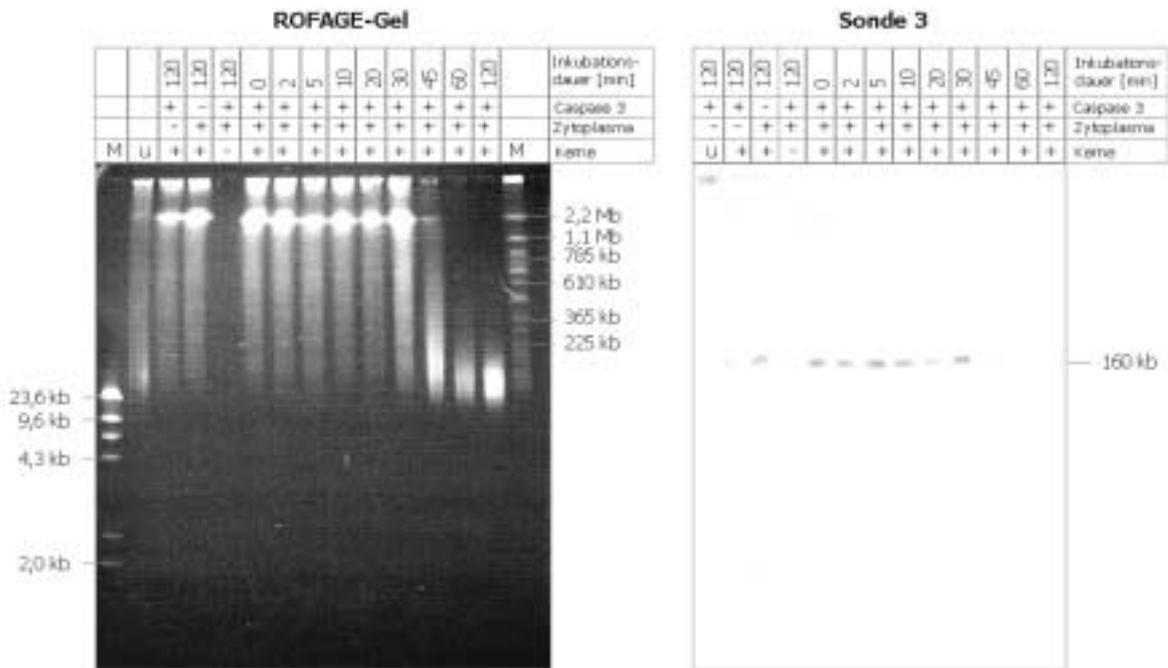


Abbildung 42: Trotz massiven Abbaus der DNA auch im Histongencluster ist keine bevorzugte Schnittstelle zu beobachten

Links ist die Auftrennung der DNA nach Pulsfeldgelelektrophorese gezeigt, rechts die indirekte Endmarkierung mit Sonde 3 aus dem Histongencluster. Die zelluläre DNA zeigt eine deutliche Fragmentierung ab 30 min Inkubationsdauer mit Caspase 3 und Zytoplasma und erreicht nach 1 h eine Art Gleichgewichtszustand. Die indirekte Endmarkierung zeigt, daß auch die DNA im Bereich des Histongenclusters fragmentiert wird; die 160 kb große Ausgangsbande, resultierend aus der Restriktionsverdauung mit *MluI*, verschwindet. Es tritt jedoch keine neue Bande auf. Dies weist darauf hin, daß die DNA hier nicht an einer bevorzugten Stelle abgebaut wird. (M) DNA-Größenstandard λ -*HindIII* bzw. YAC-WAY-4A, (u) unverdaute DNA des 2 min mit Caspase 3 behandelte Wertes. Der Ansatz enthält jeweils 110 μ l Kernsuspension (aus 6×10^8 Zellen), 110 μ l Zytoplasmaextrakt (aus 3×10^8 Zellen) und 10 μ l Caspase 3.

4.4.2 KONTROLLE DURCH DEN NACHWEIS DES MLL-BCR-SCHNITTPUNKTES

Nachdem trotz intensiver Untersuchung kein bevorzugter Schnittpunkt im Bereich von 160 kb des Histongenclusters zu finden war, stellte sich die Frage nach einer Positivkontrolle für die verwendete Methode. STANULLA et al. (1997) veröffentlichten eine Arbeit, in der sie in einer sogenannten Bruchpunktregion eine Spaltung im MLL-Gen nach Induktion von Apoptose durch Etoposid (neben anderen Induktoren) beschreiben. Diese Bruchpunktregion (MLL-bcr von breakpoint cluster region) wurde zuerst analysiert, da es unter Behandlung von Leukämien mit Topoisomerase II-Inhibitoren auffallend häufig zu einer sekundären akuten myeloischen Leukämie (t-AML) durch Bruch in Chromosom 11 an der Position 11q23 und Translokation auf über 30 verschiedene andere Chromosomen kam (STRISSEL et al., 1998). Zur Überprüfung der von uns verwendeten Methode versuchten wir, diese apoptotische Spaltstelle auch in unserem System durch indirekte Endmarkierung nachzuweisen.

4.4.2.1 HERSTELLUNG DER MLL-BCR-SONDE

Aus den Bereichen der Exons 10 und 11 des MLL-Gens wurde aus den Oligonukleotiden OTE1 (5'-GTC AGC TGC TGG AGT GTA ATA AGT GC-3') und OTE2 (5'-GTG GAT CCA CAG CTC TTA CAG GGA AC-3') per PCR ein 0,37 kb langes Fragment amplifiziert und in den pGEM-T Vektor ligiert.

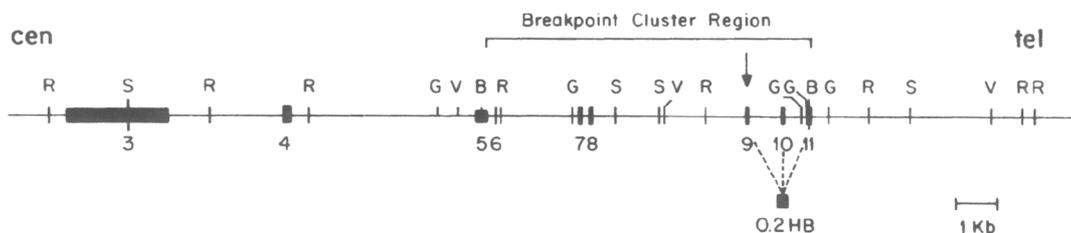


Abbildung 43: Restriktionskarte des MLL-Gens (entnommen aus STANULLA et al., 1997)

Die Exons des MLL-Gens sind als schwarze Kästen wiedergegeben und durch die darunter stehenden Zahlen numeriert. Die chromosomale Orientierung des Ausschnitts ist durch cen für Zentromer und tel für Telomer angedeutet. Der Pfeil zeigt den Punkt der spezifischen Spaltung für die darunter stehende 0,2HB cDNA-Sonde. Die Restriktionsschnittstellen sind mit den Buchstaben R für *Eco RI*, S für *Sst I*, G für *Bgl II*, V für *Eco RV* und B für *Bam HI* gekennzeichnet.

4.4.2.2 IN DEN ZELLINIEN JURKAT UND HL60 IST DER MLL-BCR-SCHNITTPUNKT NICHT NACHWEISBAR

Um den apoptotischen Schnittpunkt im MLL-Gen als Kontrolle für die angewendete Methode verwenden zu können, wurden zunächst Versuche mit HL60-Zellen durchgeführt (hier nicht gezeigt), sowie in Jurkat-Zellen mit dem Topoisomerase II-Hemmstoff Etoposid als Apoptose-Induktor (Abbildung 44). Trotz Durchführung mehrerer zeitlicher Kinetiken konnte der Schnittpunkt jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Hybridisierung zeigte jeweils nur die 9,4 kb große, aus der *Bam HI*-Restriktionsverdauung resultierende Bande, nicht jedoch das erwartete 1,6 kb große, aus der apoptotischen DNA-Spaltung resultierende Fragment. Die Färbung der DNA mit Ethidiumbromid nach Auftrennung der isolierten chromosomalen DNA durch konventionelle Agarose-Gelelektrophorese zeigt an der Entstehung der DNA-Leiter, daß die Zellen apoptotisch sind. Die im Kontrollwert bereits auftretende Leiter ist auf die recht hohe spontane Apoptoserate in Jurkat-Zellen zurückzuführen. Jurkat-Zellen wurden verwendet, da von (APLAN et al., 1996) beschrieben worden war, daß in ihnen der Bruch im MLL-Gen induzierbar sei.

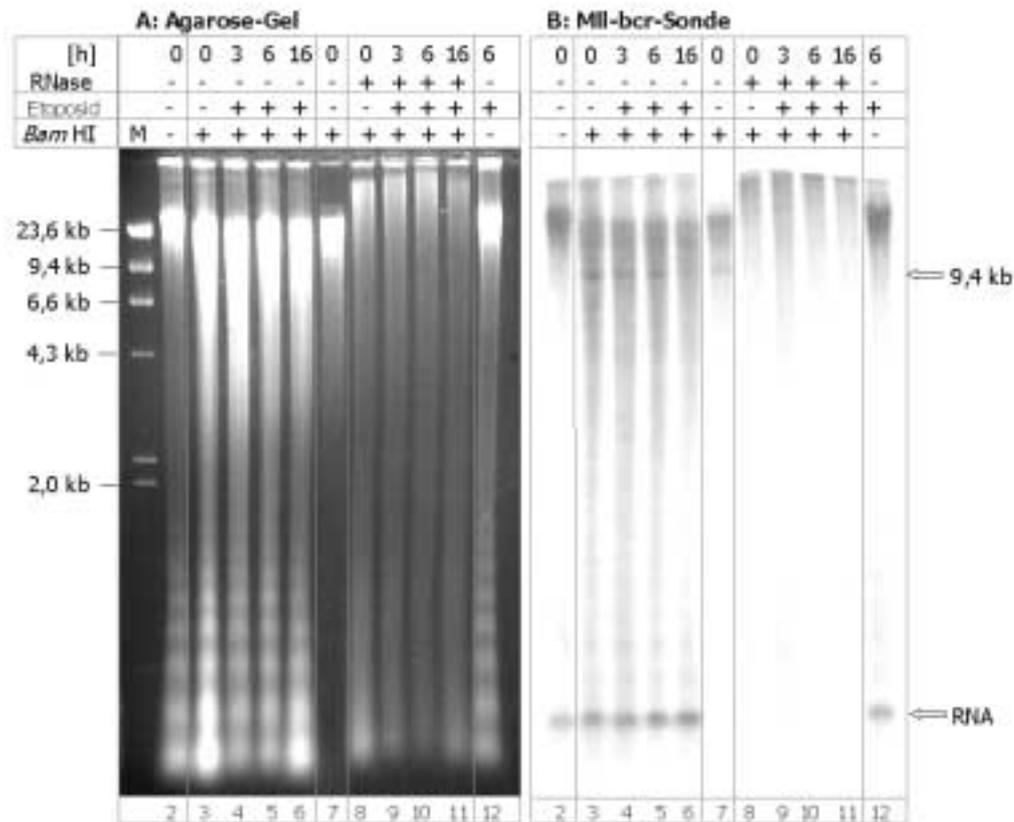


Abbildung 44: Der Bruchpunkt im MLL-Gen ist in Jurkat-Zellen nicht nachweisbar

A. Auftrennung der chromosomalen DNA im Agarosegel. B. Indirekte, radioaktive Endmarkierung mit der MLL-bcr-Sonde zum Nachweis des Bruchpunktes. Bereits in den Kontrollzellen ist eine apoptotische DNA-Fragmentierung in Form einer Leiter zu sehen; dennoch kann mit der Southern-Hybridisierung nur das 9,4 kb große, aus der Spaltung mit *Bam HI* resultierende Ausgangsfragment nachgewiesen werden, nicht jedoch der gesuchte Bruchpunkt im MLL-Gen. (M) DNA-Größenstandard λ -*HindIII*, (2) nicht mit Restriktionsenzymen verdaute DNA aus unbehandelten Zellen, (3) bis (11) *Bam HI*-verdaute, chromosomale DNA aus (3)/(8) unbehandelten Zellen, (4)/(9) 3 h, (5)/(10) 6 h, (6)/(11) 16 h mit Etoposid (10 μ M) behandelten Jurkat-Zellen, (7) DNA aus unbehandelten K562-Zellen, (12) nicht mit Restriktionsenzymen verdaute DNA aus 6 h mit Etoposid behandelten Zellen, (8) bis (11) die DNA wurde zusätzlich mit RNase verdaut (3.2.11.1.1).

4.4.2.3 DER GESUCHTE SCHNITTPUNKT IST NUR IN DER ZELLINIE CEM MIT ETOPOSID ALS APOPTOSE-INDUKTOR NACHWEISBAR

Nachdem der MLL-Schnittpunkt in HL60 und Jurkat-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte, wurde der Ansatz wie in der Veröffentlichung von STANULLA et al. (1997) beschrieben auf CEM-Zellen übertragen.

CEM-Zellen zeigen die Besonderheit auf, daß sie bei geringer Dichte adhären wachen, bei Konfluenz jedoch auch in Suspension weiter wachsen können. Wenn diese Zellen verdünnt werden, heften sie sich wieder am Boden des Kulturgefäßes an. Wurde in adhären, noch nicht konfluenten Zellkulturen Apoptose ausgelöst, so wurden die apoptotischen Zellen fast ausschließlich in Suspension gefunden, während die nicht apoptotischen Zellen am Boden der Kulturschale haften blieben. Durch die Messung des Größenprofils ließ sich dieses Phänomen auch im Zellzählgerät nachweisen (Abbildung 45). Die Zählung des Gesamtansatzes aus Suspensions- und adhären Zellen nach Ablösung mit Trypsin oder durch Abschaben zeigt eine Mischung nicht apoptotischer (mit einem Durchmesser größer als 10,5 μ m) und apoptotischer Zellen (7,5 bis 10,5 μ m Durchmesser), sowie apoptotischer Körperchen (kleiner als

7,5 µm im Durchmesser). Die Zählung getrennt nach adhärennten Zellen und Zellen aus Suspension bestätigt, daß die adhärennten Zellen nicht apoptotisch sind. Hier sind nur Zellen mit einem Durchmesser größer als 10,5 µm zu finden. Die Zellen in Suspension sind dagegen schon sehr weit fortgeschritten in der Apoptose: Es lassen sich hauptsächlich apoptotische Körperchen und tote Zellen nachweisen, die einen Durchmesser kleiner als 7,5 µm aufweisen. Daneben existiert auch eine kleine Zahl von Zellen noch vor dem Zerfall in apoptotische Körperchen (7,5 bis 10,5 µm im Durchmesser), also in dem Stadium, welches Ziel der durchgeführten Untersuchungen ist. Zusätzlich zeigt das Größenprofil, daß recht wenige Zellen überhaupt in Apoptose gehen, wobei zu bedenken ist, daß jede Zelle in mehrere apoptotische Körperchen zerfällt. Somit ist die Ausbeute apoptotischer Zellen aus diesem System sehr gering.

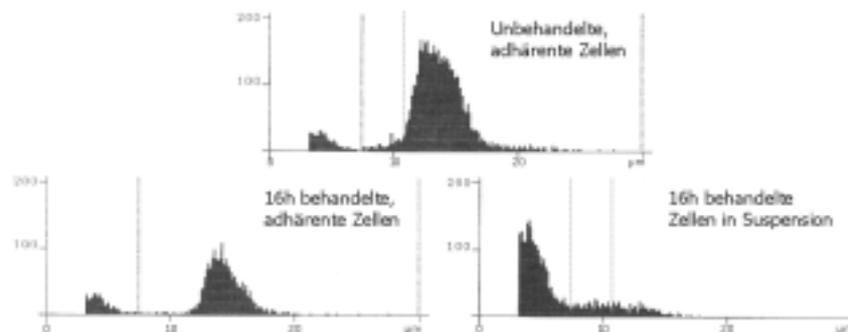


Abbildung 45: Messung des Größenprofils in CEM-Zellen mit Topotecan als Apoptose-Induktor

Adhärennte CEM-Zellen wurden für 16 h mit Topotecan (150 ng/ml) behandelt. Dargestellt ist das Größenprofil von unbehandelten Zellen (noch alle adhärennt) und das Profil 16 h behandelter Zellen getrennt nach Zellen, die noch am Boden des Kulturgefäßes haften blieben (adhärennte Zellen, links nach Abschabung vom Zellkulturflaschenboden) oder sich vom Boden abgelöst hatten (Zellen in Suspension, rechts). Die adhärennten Zellen nach 16 h Behandlung zeigen keine Apoptose, während die Zellen in Suspension schon weitgehend in apoptotische Körperchen zerfallen sind (< 7,5 µm). Zellen im Stadium der beginnenden Apoptose sind kaum zu entdecken (zwischen 7,5 und 10,5 µm).

Die Auftrennung der niedermolekularen DNA getrennt nach adhärennten Zellen und Zellen aus der Suspension bestätigt sowohl die morphologische Beobachtung als auch die Messung des Größenprofils. Die DNA-Leiter als Nachweis der Apoptose findet sich ausschließlich in den Zellen, die sich während der Behandlung mit Apoptose-Induktor vom Boden der Kulturschale abgelöst haben. Sie setzt nach 4 h Behandlung mit Topotecan (150 ng/ml) ein. Damit zeigen nur die Suspensionszellen apoptotische Eigenschaften. Die vermutliche Ursache für die Ablösung adhärennter Zellen bei Apoptose könnte darin zu suchen sein, daß während der Apoptose auch Teile des Zytoskeletts abgebaut werden (z.B. Aktin, Fodrin, Gelsolin, usw., zusammengestellt in MARTIN et al., 1995; STROH und SCHULZE-OSTHOFF, 1998).

In den kinetischen Untersuchungen zum zeitlichen Ablauf der apoptotischen DNA-Fragmentierung wurde festgestellt (vgl. Kapitel 4.3), daß die DNA-Spaltung in niedermolekulare Fragmente erst nach der initialen Spaltung in hochmolekulare Fragmente einsetzt. Deswegen wurde auch die hochmolekulare DNA aus den CEM-Zellen in Suspension getrennt von den nach Behandlung adhärennten Zellen gewonnen und aufgetrennt. Die Färbung der DNA mit Ethidiumbromid zeigt, daß im Vergleich zu den Suspensionszellen (links), in denen die DNA-Fragmentierung bereits nach 2,5 h eingesetzt hat, die adhärennten Zellen (rechts in Abbildung 46B) keine DNA-Fragmentierung zeigen. Sie entsprechen den unbehandelten

Kontrollzellen. Die DNA-Fragmentierung der Suspensionszellen ist an der kleiner werdenden DNA-Menge in den Taschen und den Spuren zu erkennen. Die aufgetragene DNA-Menge der in Blöckchen gegossenen Zellen variiert hier stark, da eine Abschätzung der Zellmenge aus der Messung im CASY nicht möglich war und somit jeweils die Gesamtzahl der Zellen in Suspension in eine gleiche Anzahl Blöckchen gegossen wurde.

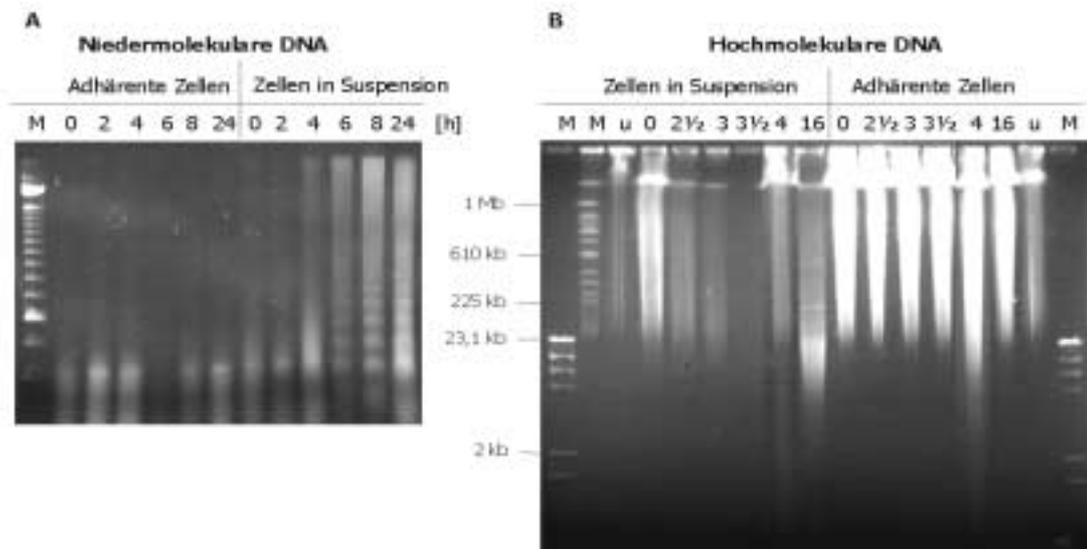


Abbildung 46: Kinetik der DNA-Fragmentierung in CEM-Zellen in Abhängigkeit von der Adhärenz

A. Dargestellt ist ein 1,2% Agarosegel nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid, die DNA wurde wie unter 3.2.11.3.1.1 beschrieben präpariert. CEM-Zellen, die bei genügend großer Zelldichte nicht nur adhären, sondern auch in Suspension wachsen, lösen sich bei Apoptose-Induktion vom Boden des Kulturgefäßes ab. Apoptotische Zellen sind ausschließlich im Überstand zu finden. Hier ist die niedermolekulare DNA-Fragmentierung in Form der DNA-Leiter nach 4 h Induktion mit Topotecan (150 ng/ml) nachweisbar. Die Ernte der adhären Zellen erfolgte durch Abschaben vom Boden des Zellkulturgefäßes. (M) DNA-Größenstandard. B. Links ist die DNA aus Zellen in Suspension aufgearbeitet und aufgetrennt worden, rechts die DNA aus adhären Zellen. Nach Isolierung wurde die DNA zusätzlich mit dem Restriktionsenzym *MluI* verdaut. Die Auftrennung der DNA erfolgte per Pulsfeldgelelektrophorese. Ein Abbau der DNA in hochmolekulare Fragmente ist ebenfalls nur in den Suspensionszellen zu finden, was bestätigt, daß sich die apoptotischen Zellen (ab 4 h Induktion) offenbar vom Untergrund ablösen. (M) DNA-Größenstandard λ -*HindIII*, DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A, (u) nicht mit *MluI* verdaute DNA aus unbehandelten Zellen bzw. 16 h mit Etoposid (10 μ M) behandelten Zellen, (M) DNA-Größenstandard λ -*HindIII*.

Nach erfolgter Etablierung der Apoptose-Induktion in der CEM-Zelllinie (4.4.2.3) wurde versucht, nun in diesem von (STANULLA et al., 1997) veröffentlichten System mit Etoposid (10 μ M) als Apoptose-Induktor, den beschriebenen MLL-Schnittpunkt nachzuweisen. Dies gelang: Neben dem 9,4 kb großen Ausgangsfragment resultierend aus der indirekten Endmarkierung nach Verdauung mit *Bam HI*, konnte das gesuchte 1,6 kb große Schnittpunktfragment nachgewiesen werden (Abbildung 47). Die DNA zeigt nach 16 h Behandlung mit Etoposid das Auftreten der DNA-Leiter und damit apoptotische Eigenschaften. Daraufhin wurde dieselbe Membran nach Entfernung der radioaktiven MLL-bcr-Sonde (vgl. 3.2.20) mit der Sonde 3 des Histongenclusters hybridisiert, um im direkten Vergleich nach Spaltungsregionen im Histongencluster zu suchen. Hier tritt jedoch nach der indirekten Endmarkierung nur das aus der Restriktionsverdauung resultierende 25 kb große Fragment auf. Ein bevorzugter Schnittpunkt in Form kleinerer, distinkter Banden zeigt sich auch hier nicht, obwohl im MLL-Gen der beschriebene Schnittpunkt auftritt. Daraus kann geschlossen werden, daß auch in diesem System im Histongencluster keine

bevorzugte apoptotische Schnittstelle enthalten ist. Die Tatsache, daß der MLL-Schnittpunkt nicht in allen Zelllinien induziert werden kann, zeigt, daß es sich bei der bevorzugten apoptotischen Fragmentierung in dieser Region nicht um einen generellen, sondern einen sehr spezifischen Effekt dieses Systems handelt.

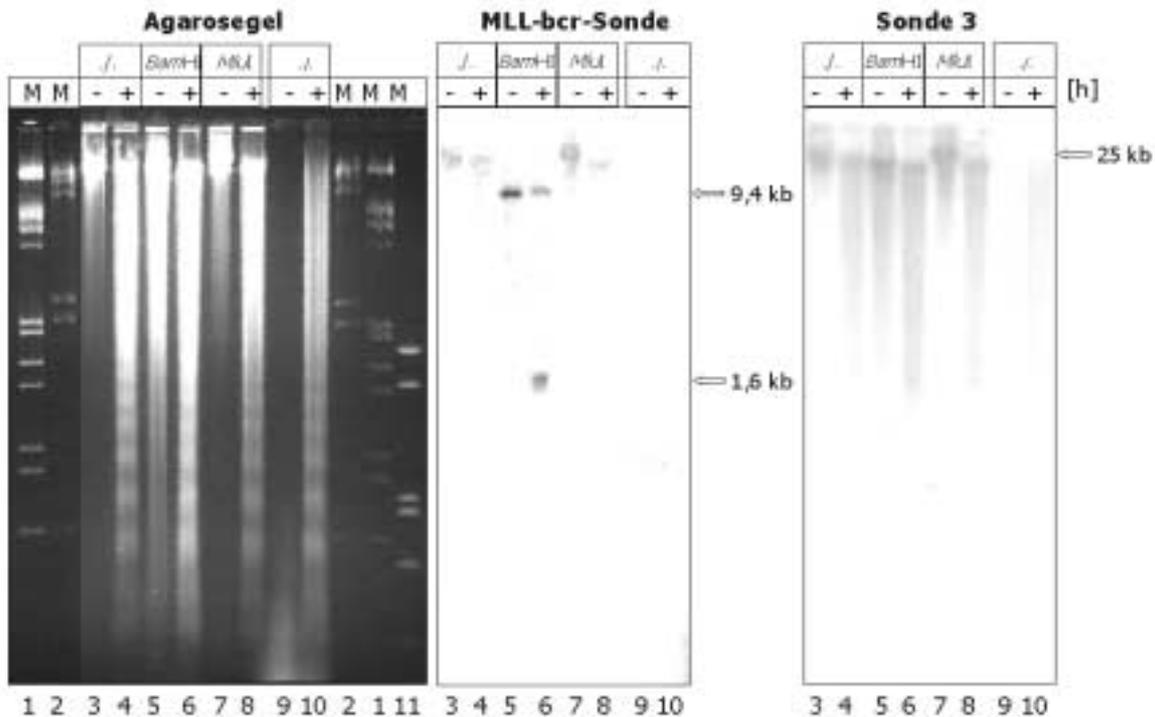


Abbildung 47: Nachweis des MLL-Schnittpunktes in CEM-Zellen mit Etoposid (10 µM) als Induktor

Links ist das 1,2% Agarosegel abgebildet, auf dem die aus den Zellen isolierte chromosomale DNA aufgetrennt wurde, in der Mitte dazu die indirekte, radioaktive Endmarkierung mit der MLL-bcr-Sonde, rechts die indirekte, radioaktive Endmarkierung mit der Sonde 3 für den Histongencluster. In der Mitte, Spur 5, ist das 9,4 kb große Ausgangsfragment zu erkennen, das aus der *Bam HI*-Verdauung resultiert; in Spur 6, in der DNA aus 16 h mit Etoposid behandelten Zellen aufgetragen wurde, ist neben dem Ausgangsfragment das 1,6 kb große Fragment zu finden, das durch Apoptose induziert wurde. (M) DNA-Größenstandard *Eco RI*/λ-*HindIII* (1), DNA-Größenstandard λ-*HindIII* (2), (3) und (4) unverdaute DNA, (5) und (6) *Bam HI*-verdaute DNA, (7) und (8) *MluI*-verdaute DNA, (9) und (10) Darstellung der niedermolekularen DNA, jeweils (3)/(5)/(7)/(9) nicht mit Etoposid behandelte Zellen, jeweils (4)/(6)/(8)/(10) 16 h mit Etoposid behandelte Zellen, (11) DNA-Größenstandard pUC19 Taq/Rsa.

4.4.3 ZUSAMMENFASSUNG DES ABSCHNITTES VERSUCHE ZUM NACHWEIS VON BEVORZUGTEN APOPTOTISCHEN SCHNITTSTELLEN IN EINER MODELLREGION (4.4.1 UND 4.4.2)

Im Histongencluster ist keine bevorzugte apoptotische Schnittstelle nachzuweisen. Da jedoch - wie gezeigt - auch der Histongencluster im Verlauf der Apoptose abgebaut wird, erfolgt dies offensichtlich über nicht bevorzugte Schnittstellen, sondern mehr oder weniger gleichmäßig über die untersuchte Region verteilt. Auch andere untersuchte codierende Bereiche des Genoms zeigen dieses Phänomen. Der im MLL-Gen auch bei Apoptose auftretende, von STANULLA et al. (1997) beschriebene Bruchpunkt kann nur in bestimmten Zelllinien (CEM-Zellen, jedoch nicht HL60- oder Jurkat-Zellen) nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, daß es sich bei der bevorzugten apoptotischen Schnittstelle im MLL-Gen um einen

Sonderfall handelt. Die codierenden Regionen werden im Normalfall jedoch nicht über bevorzugte Schnittstellen abgebaut.

4.4.4 VERSUCHE ZUM NACHWEIS VON MARS IM HISTONGENCLUSTER

Eine weitere Fragestellung der Arbeit umfaßt die Identifizierung sogenannter MARS (Matrix Attachment Regions) im Histongencluster. Grundlage für diese Fragestellung ist die Beobachtung, daß die DNA-Spaltung während der Apoptose zu hochmolekularen Fragmenten der Größenordnung 50 bis 300 kb führt (OBERHAMMER et al., 1993b). Diese entsprechen der postulierten Größe von DNA-Schleifen zwischen den Matrixanheftungsregionen (MARS) im Genom (FILIPSKI et al., 1990). Da die Länge des untersuchten Histongenclusters im *MluI*-Fragment 160 kb, insgesamt sogar 300 kb beträgt, mußte angenommen werden, daß dort eine oder mehrere MARS vorzufinden seien. Diese sollten dann der Theorie zufolge bevorzugte apoptotische Schnittstellen repräsentieren. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob im Histongencluster Matrixanheftungsregionen nachweisbar sind.

Die Organisation der DNA des Chromatins in DNA-Schleifen (Abbildung 4) geschieht durch Anheftung sogenannter MAR-Elemente der DNA an die Kernmatrix. Die Kernmatrix ist ein sehr komplexes und weitgehend unbekanntes Proteingeflecht (FEY und PENMAN, 1988; STUURMAN et al., 1990; BEREZNEY, 1991; NAKAYASU und BEREZNEY, 1991), dessen eine Hauptkomponente die Topoisomerase II ist (u.a. GASSER und LAEMMLI, 1986). Die bisher gefundenen Matrixanheftungsregionen sind dadurch geprägt, daß sie in der Regel ein oder mehrere der folgenden Charakteristika zeigen (zusammengestellt in DIJKWEL und HAMLIN, 1995): (1) ein hoher A-T-Gehalt (generell ca. 70%), (2) AATATTT-Motive bzw. zehn hintereinander angeordnete A's oder T's, (3) eine oder mehrere Topoisomerase II-Konsensus-Sequenzen und (4) eine kurze Sequenz, die sich bei superhelicalem Streß entpaaren kann. Aus der Tatsache, daß die Topoisomerase II Bestandteil der Kernmatrix ist, entstand neben anderen Methoden die Technik des MAR-Nachweises durch Inhibierung der Topoisomerase II (RAZIN et al., 1993, 1994). Dabei wird durch Behandlung mit Topoisomerase II-Hemmstoffen wie Etoposid (VP-16) oder Teniposid (VM-26) die Topoisomerase II durch Bildung eines kovalenten Komplexes inhibiert und ein Strangbruch erzeugt. Der Unterschied zur Suche nach apoptotischen Spaltstellen besteht darin, daß die Zellen in Agaroseblöckchen gegossen werden, vor Inkubation mit VM-26 oder VP-16 durch Detergenzien lysiert werden und lösliche Zellbestandteile ausgewaschen werden, so daß die Apoptose nicht mehr ablaufen kann. Damit kommt es zur Fokussierung auf die Aktion der Topoisomerase II. Durch Inkubation im Topoisomerase II-Spaltungspuffer in Gegenwart der Topoisomerase II-Inhibitoren kommt es zum Strangbruch und Bildung des unter Kapitel 1.1.2 beschriebenen kovalenten Komplexes, der die Religation der DNA-Stränge verhindert und so nach Denaturierung und Verdauung der Proteine die Strangbrüche manifestiert. Es werden hochmolekulare Fragmente gebildet, welche die DNA-Schleifen zwischen den MARS wiedergeben und je nach Größe pulsfeldgelelektrophoretisch aufgetrennt werden können (FILIPSKI et al., 1990; RAZIN et al., 1994; GROMOVA et al., 1995a). Diese können mit der Methode der indirekten Endmarkierung (siehe Kapitel 4.4) zugeordnet und in ihrer Größe bestimmt werden.

4.4.4.1 IM HISTONGENCLUSTER KONNTEN KEINE MARS NACHGEWIESEN WERDEN

Die Suche nach MARs wurde in verschiedenen Abwandlungen des Razin'schen Schemas (1993, 1994) in Form des „Topoisomerase II mediated loop excision protocols“ durchgeführt. Im einzelnen wurden die Ansätze nach Iarovaia et al. und Gromova et al. (GROMOVA et al., 1995a; GROMOVA et al., 1995b; IAROVAIA, O. V. et al., 1995; IAROVAIA, O. et al., 1996), sowie insbesondere nach FAJKUS et al. (1998) angewendet. Die Abweichungen sind kleinerer Art; sie betreffen jeweils nur die eingesetzte Hemmstoff-Konzentration, das Auswaschen der löslichen Topoisomerase II und die Konzentration des Detergens im Lysispuffer (siehe auch Kapitel 3.2.21). Unterschiede konnten in den einzelnen Ansätzen nicht festgestellt werden, daher sind hier nur einige der Ansätze wiedergegeben. In keinem der durchgeführten Versuche konnte im Histongencluster eine MAR festgestellt werden. Die indirekte Endmarkierung sowohl im Versuch mit Teniposid (Abbildung 48) als auch mit Etoposid (Abbildung 49) zeigt wiederum nur die aus der Restriktionsverdauung resultierende 160 kb große Ausgangsbande, aber keine entstehenden kleineren Banden, die auf eine MAR im untersuchten Bereich hinweisen würden. Auch weitere Variationen der Ansätze brachten dasselbe Ergebnis. Die Bandbreite im Design der verschiedenen durchgeführten Experimente zur Identifizierung der MARs gibt Tabelle D (Seite 133) wieder.

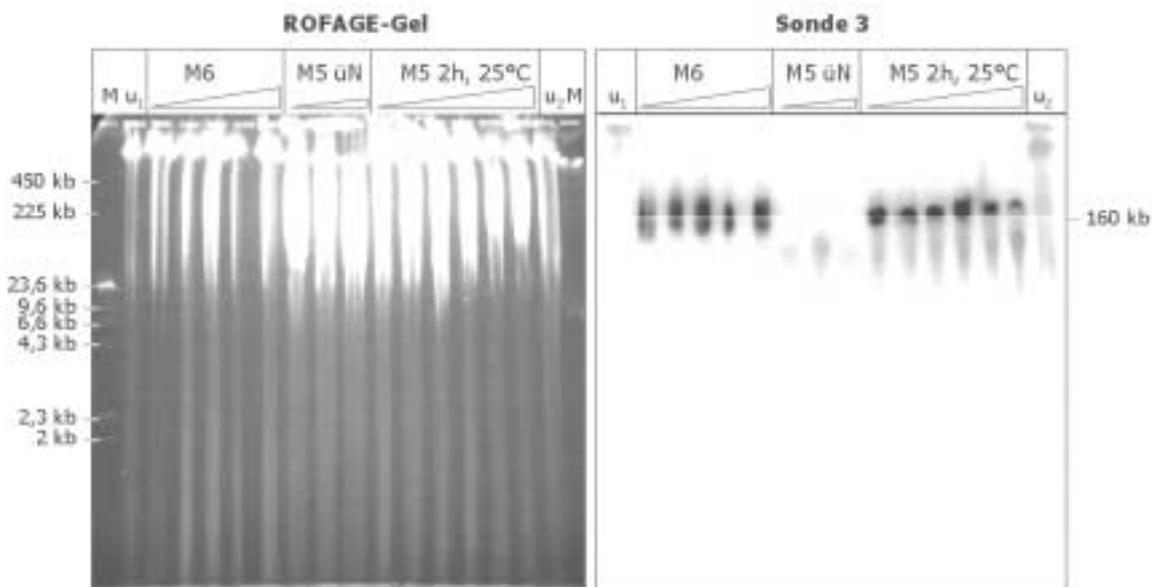


Abbildung 48: Versuch des Nachweises von MARs im Histongencluster durch das „Topoisomerase II mediated loop excision protocol“

Links dargestellt ist die Auftrennung der DNA der Versuche M 5 (HL60-Zellen) und M 6 (293-Zellen) nach Verdauung mit *MluI* durch Pulsfeldgelelektrophorese, rechts die dazugehörige indirekte Endmarkierung mit der Sonde 3 aus dem Histongencluster. (M) DNA-Größenstandard λ -*HindIII*, (u_1), (u_2) DNA aus nicht mit Inhibitor versetzten Zellen, unverdaut, das Inkubationsdreieck M 6 gibt die Konzentrationen 0, 45, 80, 200 und 500 μ M des Inhibitors wieder, das Inkubationsdreieck M 5 $\bar{u}N$ die Konzentrationen 0, 45, 200 μ M, jedoch inkubiert über Nacht, das Inkubationsdreieck M 5 2 h, 25°C die Konzentrationen 0, 20, 45, 80, 200, 500 μ M, inkubiert für 2 h bei 25°C (dem Temperaturoptimum der Topoisomerase II). Die indirekte Endmarkierung zeigt das erwartete Ausgangsfragment resultierend aus der Restriktionsverdauung mit *MluI*, jedoch keine distinkte kleinere Bande, die auf eine MAR im Histongencluster hinweisen würde.

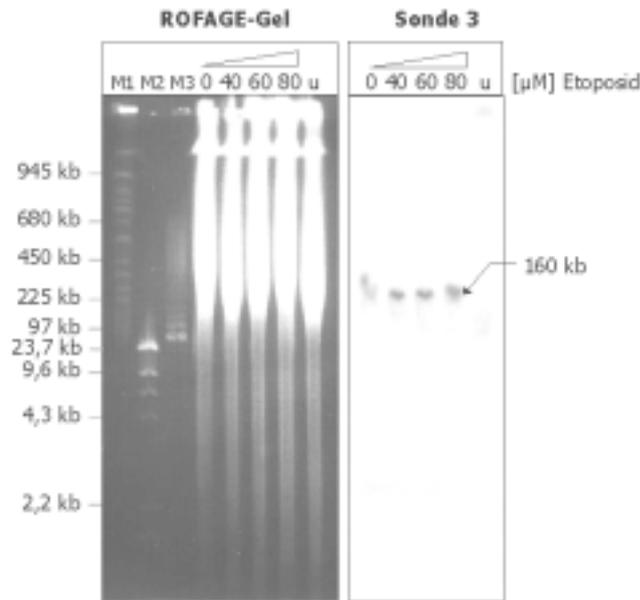


Abbildung 49: Auch bei Verwendung von Etoposid als Topoisomerase II-Inhibitor treten keine Anhaltspunkte für MARs im Histongencluster auf

Dargestellt ist links die pulsfieldgelelektrophoretische Auftrennung der DNA, rechts die dazugehörige indirekte Endmarkierung mit Sonde 3 aus dem Histongencluster. Die DNA wurde bis auf Spur u mit dem Restriktionsenzym *MluI* verdaut, um die indirekte Endmarkierung zu ermöglichen. Die Hybridisierung mit Sonde 3 zeigt das erwartete Ausgangsfragment von 160 kb, resultierend aus der Restriktionsverdauung, jedoch keine kleineren Banden, die Anhaltspunkte für vorhandene Topoisomerase II-Bindungsstellen und damit MARs sein könnten. (M1) DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A, (M2) DNA-Größenstandard λ -*HindIII*, (M3) DNA-Größenstandard λ -Phagen-Konkatemere, Inkubationsdreieck: jeweils mit 0, 40, 60, 80 μ M Etoposid für 1 h behandelte DNA, (u) mit 80 μ M Etoposid behandelte DNA, jedoch nicht mit *MluI* verdaut.

Aus den Resultaten ist zu schließen, daß im Histongencluster weder bevorzugte apoptotische Schnittstellen noch MARs enthalten sind. Das hier gefundene Ergebnis steht damit nicht im Gegensatz zu der Hypothese, daß apoptotische Spaltstellen bevorzugt an MARs zu finden sind, bzw. MARs bevorzugte apoptotische Spaltstellen darstellen (OBERHAMMER et al., 1993b).

4.4.4.2 DER NACHWEIS DER HPRT-GEN-MAR ALS POSITIVKONTROLLE

Der Befund, daß im Histongencluster kein MAR enthalten ist, steht in völligem Einklang mit dem Fehlen von bevorzugten apoptotischen Schnittstellen im Histongencluster, dennoch fehlte eine Positivkontrolle, in der eine bekannte MAR nachgewiesen wurde. Als Positivkontrolle wurde die von FAJKUS et al. (1998) beschriebene MAR im HPRT-Gen ausgewählt. Zum Nachweis der HPRT-Gen-MAR wurden zwei Sonden zur indirekten Endmarkierung aus dem HPRT-Gen präpariert, DXS10 und DXS86. Die Spezifität der Sonden wurde an genomischer DNA mit bzw. ohne Zugabe des Ausgangsplasmids getestet (Abbildung 51). Beide sind spezifisch, benötigen jedoch lange Expositionszeiten zum Nachweis der hybridisierenden Banden des single copy-HPRT-Genbereichs. In der indirekten Endmarkierung mit der Sonde DXS10 sind das aus der Restriktionsverdauung mit *SacI* resultierende Ausgangsfragment in einer Größe von etwa 250 kb und das 110 kb große Spaltungsprodukt zu erwarten. Bei der Verwendung der Sonde DXS86 ist das aus der Restriktionsverdauung mit *FspI* resultierende Ausgangsfragment in einer Größe von etwa

156 kb und das 76 kb große Spaltungsprodukt zu erwarten. Beide Spaltungsprodukte zeigen eine der MARs in diesem Bereich.

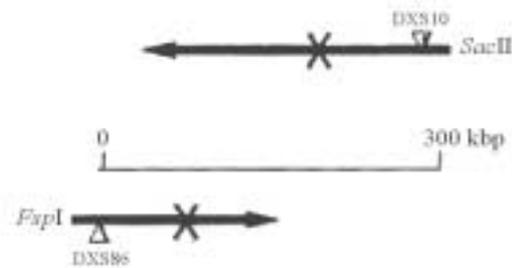


Abbildung 50: Restriktionskarte eines Ausschnitts des HPRT-Genbereichs (entnommen aus FAJKUS et al., 1998)

Sonde DXS10

Für die Amplifizierung dieses Sondenfragments wurden die Oligonukleotide 5'-CAC ATT CAG ACT TCC TCA GGG ACA-3' sowie 5'-ACC TTG ATC TTT CAC CTA TGG CTG-3' als Startsequenzen verwendet. Das erhaltene 438 bp große Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgereinigt und in den Vektor pGEM-T ligiert, mit den Restriktionsenzymen *Sac*II und *Spe*I wieder aus dem Plasmid herausgeschnitten, aufgereinigt und für die radioaktive Markierung nach der Random Prime-Methode verwendet.

Sonde DXS86

Hier waren die Oligonukleotide 5'-GTT GCA GAG GCA CGA TTG GAA CT-3' und 5'-TGA CAC CAT TTA CCT AAT GCA C-3' Ausgangspunkte für die Amplifizierung durch die Polymerasekettenreaktion. Erhalten wurde ein 634 bp großes Fragment, das analog der Sonde DXS10 - wie im vorigen Abschnitt beschrieben - weiter bearbeitet wurde.

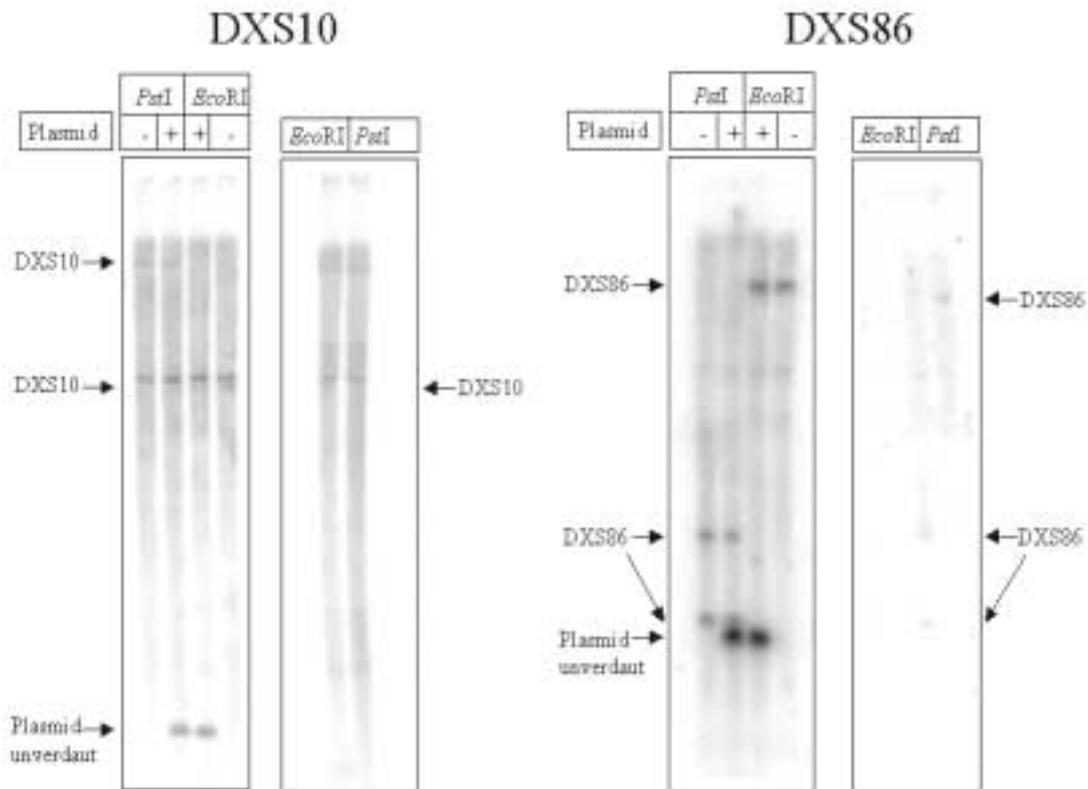


Abbildung 51: Überprüfung der Sonden für die HPRT-Genregion

Als Grundlage wurde jeweils im linken Teil der Abbildung chromosomale DNA aus CEM-Zellen verwendet, der das Plasmid (+) zugegeben wurde, aus dem die Sonde amplifiziert worden war. Die chromosomale DNA wurde verdaut mit *PstI* bzw. *EcoRI*. Im rechten Teil der jeweiligen Abbildung ist chromosomale DNA ohne das Kontrollplasmid aufgetragen. Die Hybridisierungen erfolgten nach Vorschrift (3.2.20) mit der entsprechenden radioaktiv markierten Sonde. Die Plasmidzugabe diente der Überprüfung der Hybridisierungseffizienz.

Da HL60-Zellen das HPRT-Gen aufgrund einer Deletion fehlt (MONNAT, 1989; FRENCH et al., 1990; MONNAT et al., 1992a; MONNAT et al., 1992b), konnte diese Zelllinie für den Nachweis der HPRT-Gen-MARs nicht verwendet werden. Daher wurde die Zelllinie K562 verwendet, in der FAJKUS et al. (1998) die HPRT-Gen-MAR nachgewiesen hatten.

Die indirekte Endmarkierung des HPRT-Gens in dieser Zelllinie zeigte Banden der Größe 365 kb und 285 kb (Abbildung 52) und weist damit auf das Vorhandensein der gesuchten MAR im HPRT-Genbereich hin. Die von FAJKUS et al. (1998) gefundenen Fragmentgrößen von 156 kb als Ausgangsfragment und 76 kb konnten jedoch nicht reproduziert werden. Der Abstand der beiden gefundenen Banden entspricht 80 kb und dies wiederum entspricht dem von FAJKUS et al. (1998) beobachteten Abstand zwischen Ausgangsfragment und Spaltungsprodukt. Dies deutet darauf hin, daß unter Umständen durch Methylierung die telomerwärts gelegene Restriktionsschnittstelle nicht benutzbar war und somit ein größeres Ausgangsfragment und ein größeres Spaltungsfragment entstanden ist. Auch FAJKUS et al. (1998) erwähnen die unvollständige Restriktionsverdauung durch die partielle Methylierung der Restriktionsschnittstellen. Variationen in der Konzentration des Restriktionsenzym führten ebenso wie die Variation anderer Parameter (aufgeführt in Tabelle D) nicht zu einer Reproduzierung der von FAJKUS et al. (1998) veröffentlichten Größen.

Ein weiterer Unterschied in den Ergebnissen bestand darin, daß nach Behandlung der Zellen mit Topoisomerase II-Inhibitoren im Gegensatz zu den erwähnten Untersuchungen keine Fragmente in der Größenordnung von 20 bis 600 kb in der pulsfeldgelelektrophoretischen Auftrennung nachgewiesen werden konnten (Abbildung 52). Die Fragmentgröße der DNA in der Kontrollspur entspricht der Fragmentgröße in den Spuren der mit VM-26 behandelten Proben. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß der Inhibitor Apoptose auslösen kann (siehe Abbildung 13). Somit sollte er auch in diesem Ansatz funktionsfähig sein, da es sich um denselben Mechanismus der Topoisomerase II-Inhibierung handelt. Die Konzentration und Inkubationsdauer mit Restriktionsendonukleasen wurde ebenso variiert wie die Konzentration und Inkubationsdauer mit Inhibitor im Ansatz selbst. Zudem wurde Etoposid als Inhibitor verwendet, so daß auch diese möglichen Fehlerquellen ausgeschlossen werden können. Die Variationen in der experimentellen Gestaltung der Ansätze gibt Tabelle D wieder. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der beobachteten Unterschiede liegt in der Zelllinie selbst; von K562-Zellen gibt es zahlreiche Unterlinien, die in ihren Eigenschaften z.T. erheblich voneinander abweichen (unveröffentlichte Beobachtungen von O. Witt und M. Kratzmeier). Daher wäre durch die Verwendung verschiedener Unterlinien bereits das abweichende Verhalten erklärbar. Festzuhalten bleibt, daß die verwendete Methode in der Lage war, MARs nachzuweisen.

Zelllinien	HL60, 293, K562, CEM
Induktoren	Etoposid, Teniposid
Lösungsmittel	DMSO, Ethanol abs.
Konzentrationen	20, 45, 60, 80, 100, 200, 500 μ M
Inkubationsdauer	1, 2, 4, 8 h
Auswaschen der löslichen Topoisomerase	0, 30, 60, 90 min
Restriktionsverdauung	<i>FspI</i> , <i>SacII</i> , <i>MluI</i>
Konzentration Restriktionsenzym	50, 100, 200, 300 U pro halbes Blöckchen
Sonden	DXS86, DXS10

Tabelle D: Versuchsvariationen zur Identifizierung von MARs nach dem „Topoisomerase II mediated loop excision protocol“

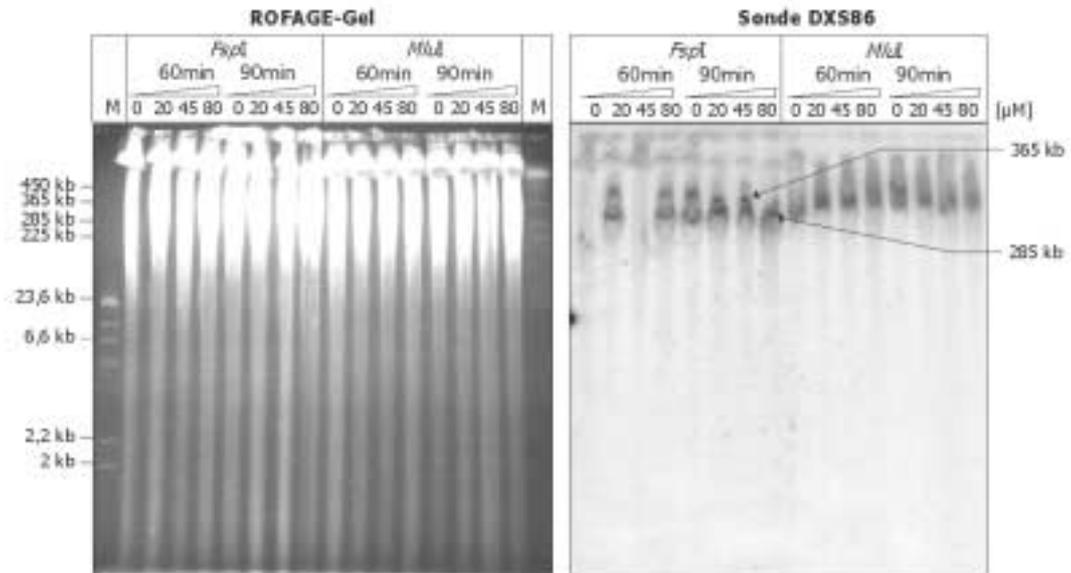


Abbildung 52: Suche nach der MAR im HPRT-Gen von K562-Zellen mit Teniposid als Inhibitor

Links ist die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA nach Anfarbung mit Ethidiumbromid gezeigt, rechts die dazugehörige indirekte Endmarkierung mit der Sonde DXS86 aus dem HPRT-Genbereich. Die DNA wurde zur indirekten Endmarkierung für die HPRT-Genregion mit *FspI*, für die indirekte Endmarkierung des Histongenclusters mit *MluI* verdaut. Die Parameter der Pulsfeldgelelektrophorese umfassen: 0,9% TBE-Agarose-Gel, Auftrennung über 29 h, bei einem Intervall von 30 bis 5 s (logarithmische Abnahme), einem Winkel von 120 bis 110° (lineare Abnahme) und einer Spannung von 180 bis 120 V (logarithmische Abnahme). Es sind jeweils Werte der Inkubation im Topoisomerase-Spaltungspuffer für 60 bzw. 90 min angegeben. Die Konzentration des Topoisomerase II-Inhibitors Teniposid beträgt 0, 20, 45, 80 μM . (M) DNA-Größenstandard λ -*HindIII*, DNA-Größenstandard YAC-WAY-4A. Die in der indirekten Endmarkierung mit DXS86 auftretenden Banden zeigen die Größe von ca. 365 kb bzw. 285 kb und sind damit um 209 kb größer als die erwarteten Banden, was unter Umständen auf eine Methylierung der oberhalb gelegenen *FspI*-Restriktionsschnittstelle zurückzuführen ist.

4.4.5 ZUSAMMENFASSUNG DES ABSCHNITTES VERSUCHE ZUM NACHWEIS VON MARS IM HISTONGENCLUSTER (4.4.4)

Im 160 kb großen *MluI*-Fragment des Histongenclusters konnte keine MAR identifiziert werden. In Anbetracht der Tatsache, daß allgemein von einer Durchschnittsgröße der DNA-Schleifen von 50 bis 150 kb ausgegangen wird, ist dies erstaunlich. Da jedoch in diesem Bereich auch keine bevorzugten apoptotischen Schnittstellen enthalten sind, erscheint dies im logischen Zusammenhang mit der These, daß bevorzugte apoptotische Schnittstellen an den Matrixanheftungsstellen auftreten. Die als Positivkontrolle für die verwendete Methode des „Topoisomerase II mediated loop excision protocols“ untersuchten HPRT-Gen-MARs konnten nachgewiesen werden, allerdings zeigten sowohl Spaltprodukt als auch Ausgangsbande eine größere Fragmentgröße als von FAJKUS et al. (1998) berichtet. Dies könnte auf eine partielle Methylierung der telomerwärts gelegenen Restriktionsschnittstelle, auf Verwendung unterschiedlicher K562-Unterlinien und auf unterschiedliche Fragmentauftrennungsmethoden zurückzuführen sein. Übereinstimmend wird in beiden Fällen eine Spaltung beobachtet.

4.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR ORTSSPEZIFITÄT DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG

Bisher ist nicht bekannt, ob die apoptotische DNA-Fragmentierung in den verschiedenen Regionen des Genoms zufällig erfolgt oder nach einem bestimmten Schema abläuft. Die Tatsache, daß die Spaltung der DNA in hochmolekulare Fragmente ein Zwischenstadium von 50 bis 300 kb Fragmentgröße erreicht, wird - wie im vorigen Kapitel beschrieben - als Hinweis darauf verstanden, daß die als sog. DNA-Schleifen von dieser Größe vorliegende DNA tatsächlich an ihren Anheftungspunkten an der Matrix, den sog. MARs, zuerst bzw. bevorzugt geschnitten werden könnte (u.a. OBERHAMMER et al., 1993b; LAGARKOVA et al., 1995; STANULLA et al., 1997). Andere Autoren (WINTER et al., 1998; NAGATA, 2000) gehen von einer rein zufälligen Fragmentierung der DNA während der Apoptose aus, während wiederum andere berichten, daß die DNA aus dem Bereich des Heterochromatins bevorzugt fragmentiert wird (HENDZEL et al., 1998; DULLEA et al., 1999 u.a.). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, treten zuerst die hochmolekularen, dann die niedermolekularen DNA-Fragmente auf (vgl. Kap. 4.3). Unbestritten ist ebenfalls, daß die DNA-Leiter als Zeichen für die niedermolekularen Fragmente während der Apoptose, durch die Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen auftritt (HEWISH und BURGOYNE, 1973). Hierfür wird die schon erwähnte DNase CAD verantwortlich gemacht (ENARI et al., 1998). Es ist jedoch nicht bekannt, ob unter Umständen noch weitere DNasen im apoptotischen Signalweg wichtig sind (u.a. HUGHES und CIDLOWSKI, 1998; HUGHES et al., 1998; LIU, Q. Y. et al., 1999a; ROBERTSON et al., 2000; YAKOVLEV et al., 2000). Insbesondere für die Entstehung der hochmolekularen Fragmente ist noch nicht geklärt, ob hierfür ebenfalls CAD eine Rolle spielt oder andere, noch unbekannt DNasen. Zur Klärung der Frage, ob die apoptotische DNA-Fragmentierung bevorzugt in bestimmten Regionen des Genoms oder sie zufällig abläuft, wurden die hoch- und niedermolekularen Fragmente getrennt voneinander auf den apoptotischen Abbau bestimmter Genombereiche hin untersucht. Hierzu wurde sowohl hoch- als auch niedermolekulare DNA aus Apoptose-induzierten Zellen gewonnen, auf Nylonmembranen transferiert und Fragmente aus bestimmten Bereichen des Genoms durch Southern-Hybridisierung nachgewiesen. Da durch die Bevorzugung bestimmter Genombereiche auch Rückschlüsse auf die Chromatinstruktur der jeweiligen Region möglich sein könnten, konzentrierte sich die Auswahl der untersuchten Bereiche neben der codierenden Region des Histongenclusters auch auf funktionell unterschiedliche Bereiche des Heterochromatins sowie des Euchromatins.

4.5.1 SONDENKLONIERUNG

Das menschliche Genom läßt sich aufgrund morphologischer bzw. struktureller Unterschiede in verschiedene Bereiche gliedern. Die unterschiedliche Anfärbbarkeit des Chromatins führte zu den Begriffen Eu- bzw. Heterochromatin, die in Abbildung 53 weiter klassifiziert werden.

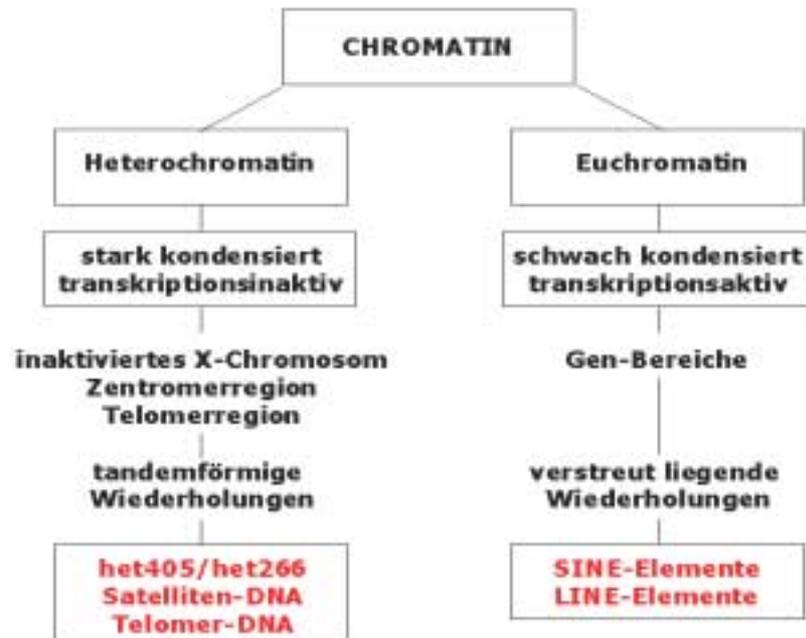


Abbildung 53: Zuordnung der Begriffe Heterochromatin und Euchromatin zu den Genombereichen

Blau dargestellt ist die Zuordnung der verwendeten Sonden zu den aufgeführten Bereichen des Genoms. Die Abbildung wurde entnommen aus STRACHAN UND READ: MOLEKULARE HUMANGENETIK, 1996.

Die einzelnen Genombereiche können auch nach ihrer relativen Häufigkeit unterschieden werden; dies ist verdeutlicht in Abbildung 54. Der Hauptteil des Genoms (ca. 70%) besteht aus DNA, die nicht den Genen sowie den damit verwandten Sequenzen, wie Promotoren, regulatorische Elemente etc., zugerechnet werden kann. Ihrer Häufigkeit nach werden sie der großen Gruppe der einmal oder selten vorkommenden DNA zugeordnet bzw. der kleinen Gruppe der mehr oder weniger häufig wiederholten DNA. Diese sich wiederholenden Sequenzen finden sich entweder verstreut über das gesamte Genom oder liegen als Cluster vor, wie z.B. die Satelliten-DNA im Zentromerbereich oder die Telomer-DNA im Telomerbereich der Chromosomen. Die Gene und damit verwandte Sequenzen machen nur 30% des Kerngenoms aus. Davon gehören wiederum nur ca. 10% in die Gruppe der codierenden DNA. 90% bestehen aus Pseudogenen, Genfragmenten, Introns sowie untranslatierten Sequenzen. In dieser Arbeit wurden Sonden zur Markierung der einzelnen Regionen des humanen Genoms verwendet. Sie sind in Abbildung 54 in blauer Schrift der Klassifizierung zugeordnet. Mit diesen Sonden wurde in dieser Arbeit das Verhalten von drei der vier Großgruppen des Genoms während der DNA-Fragmentierung untersucht.

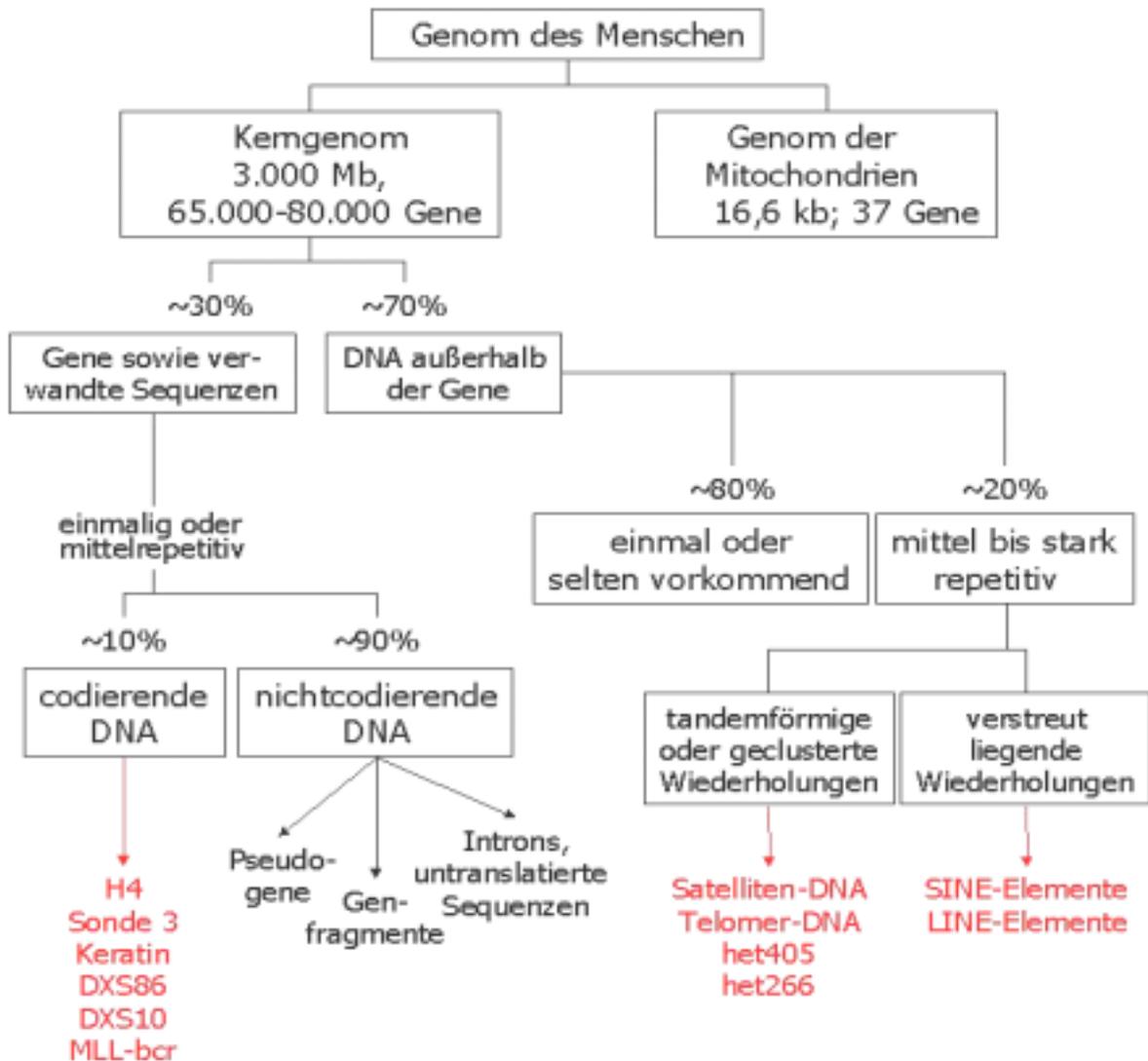


Abbildung 54: Einteilung des Genoms in verschiedene Bereiche nach Häufigkeit und Struktur

Die verwendeten Sonden zur Markierung in der Southern-Hybridisierung sind in blau dargestellt und den einzelnen Genombereichen zugeordnet (modifiziert nach STRACHAN UND READ: MOLEKULARE HUMANGENETIK, 1996).

Die in dieser Arbeit verwendeten Sonden stammen aus der Zentromerregion (Sau3A-Repeat-Sonde sowie die Oligonukleotidsonden het266 und het405), aus der Telomerregion (Telomer-Repeat-Sonde), aus der *KpnI*-Familie (LINE-Sonde), aus der Familie der *AluI*-Elemente (Alusonde), sowie aus dem Aktigen und einem Hochschwefel-Keratingen. Im folgenden wird die Herstellung der einzelnen Sonden beschrieben.

Sau3A-Repeat-Sonde

Sie gehört in die Familie der Alpha-Satelliten-DNA, die eine Primaten-spezifische Gruppe von tandemförmig wiederholten Sequenzen darstellt. Diese Familie kommt im Heterochromatin des Zentromers aller menschlichen Chromosomen vor. Ihr Basiselement umfaßt etwa 170 bp. Die hier verwendete Sonde wurde generiert durch PCR nach der Vorschrift von DUNHAM et al. (1992) aus den Oligonukleotiden $\alpha 27$: 5'-CAT CAC AAA GAA GTT TCT GAG AAT GCT TC-3' und $\alpha 30$: 5'-TGC ATT CAA CTC ACA GAG TTG AAC CTT CC-3'.

Oligonukleotidsonde het266

Sie ist eine Satelliten-III-Sequenz, die als einfache Wiederholungseinheit im menschlichen Genom vorkommt und ebenfalls im Heterochromatin der Zentromerregion lokalisiert ist (GOSDEN et al., 1991). Ihre Sequenz lautet 5'-(CCATT)₆-3'.

Oligonukleotidsonde het405

Das Oligonukleotid stellt eine einfach repetitive, alphanucleotidische Sequenz dar, die charakteristisch für das konstitutive Heterochromatin der Zentromerregion ist. Ihre Sequenz lautet 5'-GAA GAA GCT TTC TGA GAA ACT GCT TAG TG-3'.

Telomer-Repeat-Sonde

Basiselement dieser Sonde ist das Hexanukleotid (TTA GGG), das durch PCR ohne Template nach IJDO et al. (1991) aneinandergehängt wurde und so Fragmentgrößen des wiederholten Hexanukleotids von bis zu 25 kb enthält. Primer sind (TTA GGG)₅ und (CCC TAA)₅. Sie erkennt so humane Telomersequenzen der Form (TTA GGG)_x.

Alusonde

Sie gehört in die Familie der sog. SINEs (Short INterspersed repetitive Elements), also kurze, verstreut liegende Wiederholungseinheiten, die zu den mittelrepetitiven Sequenzen zu rechnen sind. Im Gegensatz zur Satelliten-DNA liegen diese in vielen einzelnen Kopien im menschlichen Genom verteilt. Hauptvertreter der SINEs ist die *Alu*-Familie. Sie werden vorwiegend im Euchromatin gefunden und sind dort oft mit Genen gekoppelt. Somit repräsentieren *Alu*-Sequenzen codierende Bereiche im menschlichen Genom. Gewonnen wurde diese Sonde aus dem Plasmid pWA 759 durch Verdauung mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Xba*I und anschließender gelelektrophoretischer Aufreinigung.

LINE-Sonde

LINE-Elemente (Long INterspersed repetitive Elements) sind neben den SINEs die am häufigsten vorkommenden mittelrepetitiven Sequenzen. Sie sind mit etwa 10⁵ Kopien im menschlichen Genom vertreten (HWU et al., 1986) und stellen damit einen Anteil von 2 bis 3% der gesamten DNA (SKOWRONSKI und SINGER, 1986; SINGER et al., 1993). Der Hauptvertreter dieser Gruppe ist die *Kpn*I-Familie, aus deren Sequenz die hier verwendete Oligonukleotidsonde besteht (5'-CAT GGC ACA TGT ATA CAT ATG TAA CWA ACC-3', W= A oder T). Sie sind wie die SINEs charakteristisch für die euchromatischen Bereiche, fehlen aber in den codierenden Bereichen. Sie kommen nur in den nicht codierenden Abschnitten transkriptionsaktiver Bereiche vor.

Aktinsonde

Die Aktinsonde umfaßt 240 bp des menschlichen β -Aktins und wurde aus dem Plasmid pTRI- β -Aktin generiert durch Verdauung mit *Kpn*I und *Eco*RI. Sie erkennt mehrere Formen des β -Aktins sowie seine Pseudogene.

Keratinsonde

Sie markiert ein Hochschwefel-Keratinogen und umfaßt 1.000 bp, hergestellt durch *Eco*RI-Verdauung des Plasmids IP3 (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Birgit Drabent). Es ist zu vermuten, daß dieses Gen in den verwendeten Tumorzellen inaktiv ist.

4.5.2 DNA-SPALTUNG IN HOCHMOLEKULARE FRAGMENTE

Die durch Apoptose ausgelöste DNA-Spaltung in hochmolekulare Fragmente läßt sich ohne weiteres durch die Auftrennung von DNA verfolgen, welche nicht zusätzlich durch Restriktionsenzyme verdaut worden ist (Abbildung 55 im Vergleich zu *MluI*-verdauter DNA, Abbildung 56). Zur Untersuchung des Fragmentierungsmusters einzelner Bereiche des Genoms wurden jedoch zwei verschiedene Ansätze verwendet: zum einen die Hybridisierung der Sonden an nicht zusätzlich mit Restriktionsenzymen verdauter DNA und zum anderen an DNA, die mit *MluI*, einem selten schneidenden Restriktionsenzym, verdaut worden war.

Im nicht zusätzlich mit Restriktionsenzymen verdauten Ansatz läßt sich insbesondere das Fragmentierungsmuster repetitiver Bereiche wie das Zentromer (Sau3A-Repeat-Sonde, het266, het405), das Telomer (Telomer-Repeat-Sonde) und die LINE- bzw. SINE-Elemente durch Hybridisierung nachweisen (Abbildung 55). Durch ihren Wiederholungscharakter entstehen während der Apoptose in jeder einzelnen Zelle viele gleiche oder ähnliche, kleinere Fragmente, die in der Hybridisierung leicht zu verfolgen sind. Der Nachweis von single copy-Bereichen erfordert hingegen eine andere Strategie: Da in jeder Zelle bei nicht bevorzugtem Abbau an bestimmten Schnittstellen nur Fragmente unterschiedlicher Größe auftreten, sind diese nicht in der Hybridisierung nachweisbar, sondern fallen unter die Nachweisgrenze. Daher kann die apoptotische Fragmentierung nur an der Abnahme der Ausgangsbande verfolgt werden, die durch vorherige Restriktionsverdauung auf eine definierte Größe geschnitten wird. Der Nachweis von repetitiven Bereichen in zusätzlich zur Apoptose mit *MluI*-verdauter DNA hat dagegen den Nachteil, daß durch die Restriktionsverdauung Fragmente erzeugt werden, die sich mit den aus der Apoptose resultierenden Fragmenten überlagern und daher keine eindeutige Aussage erlauben.

Die Hybridisierung an nicht zusätzlich mit Restriktionsenzymen verdauter DNA mit Sonden aus den repetitiven Bereichen zeigt einen raschen, weitgehend gleichmäßigen Abbau aller untersuchten Bereiche, die sich wie beschrieben durch die sukzessive Entstehung von kleineren Fragmenten verfolgen lassen (Abbildung 55). Auch die codierenden Regionen weisen auf apoptotische Spaltungen in den untersuchten Bereichen hin; dies läßt sich an der Abnahme der Intensität der durch die Restriktionsverdauung mit *MluI* generierten Ausgangsbande verfolgen. Da hier keine definierten kleineren Fragmente entstehen, ist davon auszugehen, daß auch diese Spaltungen nicht über bevorzugte Schnittstellen verlaufen, sondern an verschiedenen Stellen auftreten.

Bei der Spaltung in hochmolekulare DNA-Fragmente lassen sich zwischen den einzelnen Genombereichen nur wenige Unterschiede feststellen. Die Hybridisierungsmuster sind, abgesehen von der relativen Stärke der Hybridisierungen, einander sehr ähnlich. Die Unterschiede in der relativen Hybridisierungsstärke beruhen auf der spezifischen Aktivität der Sonde und auf der Kopienzahl der hybridisierenden Sequenz im Genom. Die Fragmentierung in den einzelnen Genombereichen verläuft auch zeitlich weitgehend synchron. Die DNA-Fragmentierung hat sowohl in der Zentromerregion (dargestellt durch die Sonden Sau3A-Repeat, het405 und het266) als auch in der Telomerregion und den LINE-Elementen ein relatives Maximum nach 2 h 15 min Inkubation mit dem Apoptose-Induktor Topotecan. Der Beginn liegt bei

1 h 45 min; dies ist besonders deutlich zu sehen in der Hybridisierung mit der Sau3A-Repeat-Sonde. Auch die entstehenden Fragmentgrößen in den einzelnen Hybridisierungsmustern sind vergleichbar. Da aus den Agaroseblöckchen während der Proteinase K-Verdauung und dem sich anschließenden, ausgiebigen Waschprozeß, sowie der mehrtägigen Aufbewahrung, Fragmente kleiner als 20 kb aus den Blöckchen heraus diffundieren, ist diese Methode nicht geeignet, um Fragmente dieser Größe zu untersuchen.

Die Ansätze wurden sowohl in synchronisierten als auch unsynchronisierten HL60-Zellen mit Topotecan als Apoptose-Induktor durchgeführt. Da die synchronisierten Zellen einen zeitlich koordinierten Eintritt in die apoptotische DNA-Fragmentierung aufweisen (vgl. 4.2.2) und sich damit deutlichere Hybridisierungsmuster der apoptotischen Fragmente ergeben, wird hier auf die Darstellung der unsynchronisierten Ansätze verzichtet. Die DNA-Spaltung in hochmolekulare Fragmente zeigt in keiner der untersuchten Regionen eine bevorzugte Spaltung; sowohl zeitlich als auch örtlich tritt eine homogene Fragmentierung aller untersuchten Bereiche auf. Dies läßt auf ein Schema der DNA-Fragmentierung schließen, das weitgehend unabhängig von einzelnen Sequenzen ist und unterschiedliche Genomregionen gleichmäßig fragmentiert.

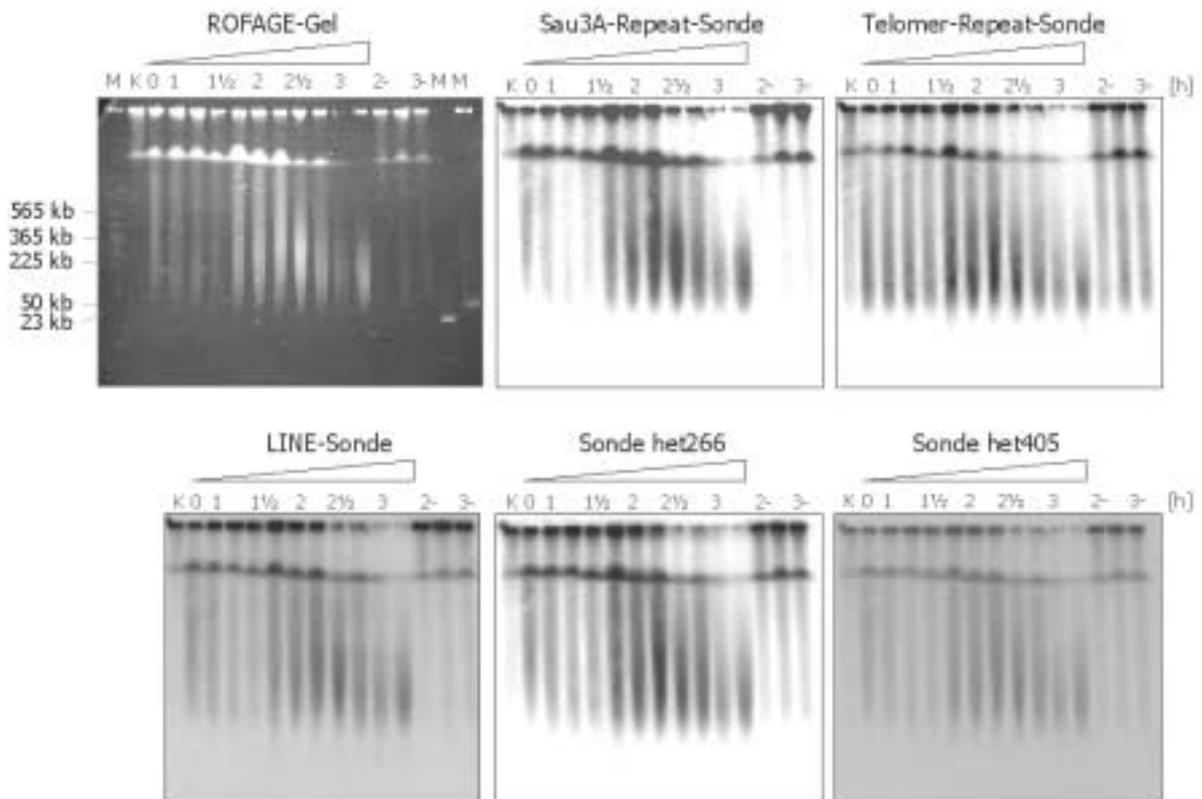


Abbildung 55: Vergleich der Hybridisierungsmuster nicht codierender Genomregionen bei der Spaltung in hochmolekulare, apoptotische DNA-Fragmente

DNA aus synchronisierten HL60-Zellen, behandelt mit Topotecan (150 ng/ml) für 0, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180 und 210 min wurde durch Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA wurde nach Färbung mit Ethidiumbromid (s. ROFAGE-Gel) auf Nylonmembranen transferiert und mit den aufgeführten, radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Sonden jeweils wieder abgewaschen (vgl. 3.2.20) und die Membranen neu hybridisiert. Die einzelnen Hybridisierungen zeigen abgesehen von ihrer relativen Stärke weitgehende Übereinstimmungen in Bezug auf den zeitlichen Verlauf und die Größenordnung der entstehenden Fragmente. Die relative Stärke der Hybridisierungen hängt ab von der Häufigkeit der komplementären Sequenz im Genom und der spezifischen Aktivität der Sonde.

Zum Vergleich der Fragmentierung in den einzelnen Bereichen des Genoms wurden auch Bereiche aus codierenden Regionen zur Hybridisierung verwendet, wie die Sonde für das Hochschwefel-Keratingen (Keratinsonde), die Sonde für das Aktingen (Aktinsonde), die Sonden für den Histongencluster (Sonde 3 und H4, bereits gezeigt in Abbildung 39 und Abbildung 40) sowie zum Vergleich zu Abbildung 55 die Sonde des Zentromerbereichs (Sau3A-Repeat-Sonde), des Telomerbereichs (Telomer-Repeat-Sonde), sowie der Alusonde als Beispiel für die Familie der SINE-Elemente. Um die Hybridisierung dieser Regionen sichtbar zu machen, wurde die DNA mit *MluI* verdaut, wie bereits oben erläutert.

Die Hybridisierungsmuster zeigen, daß im Keratingen und den Aktingen bzw. deren Pseudogenen ein Abbau in kleinere Fragmente erfolgt; auch hier treten – wie bereits im Histongencluster beobachtet – keine distinkten Banden auf, die auf bevorzugte Spaltstellen hinweisen würden. Die Fragmentierung setzt nach 1 h 45 min Inkubation mit Topotecan ein und erreicht ein relatives Maximum nach 2 h 15 min Behandlung.

Die Hybridisierung der *MluI*-verdauten DNA mit Sonden aus nicht codierenden Bereichen des Genoms (Abbildung 56) bestätigen die Hybridisierung an nicht mit Restriktionsenzymen verdauter DNA mit denselben Sonden (Abbildung 55). Während die Sau3A-Repeat-Region kaum *MluI*-Restriktionsschnittstellen besitzt und daher wie an unverdauter DNA zunächst mit der hochmolekularen DNA in der Region der Taschen des Gels hybridisiert, deren Abbau über die ganze Länge der Membran zu beobachten ist, enthält die Telomerregion viele *MluI*-Schnittstellen. Durch die *MluI*-Verdauung entsteht ein Bandenmuster, das Fragmente bis zu einer Größe von ca. 50 kb zeigt. Die unterschiedliche Größe der Banden ist auf die unterschiedliche Länge der Telomer-Repeats der Chromosomen zurückzuführen. Die apoptotische Fragmentierung wird daher erst aus dem Abbau dieser Banden sichtbar. Sie erreicht eine Größenordnung von ca. 6 bis 4 kb, während sowohl die Sau3A-hybridisierenden Bereiche als auch die Bereiche der Alusonde Fragmentgrößen von weniger als 500 bp erreichen. Die Hybridisierung der Membran mit der Alusonde zeigt einen sehr raschen Abbau der hochmolekularen DNA nach ebenfalls 1 h 45 min. Auch in dieser Sequenzfamilie sind *MluI*-Restriktionsschnittstellen enthalten, so daß es durch die Restriktionsverdauung zu einem Bandenmuster bis zu einer Größe von ca. 50 kb kommt. Die Alusonde repräsentiert die Familie der SINE-Elemente und wird mit zu der codierenden DNA gerechnet, da diese Sequenzen oft an Gene gekoppelt sind. Inwieweit der rasche Abbau dieses Bereichs auf eine Bevorzugung dieser Region bei der apoptotischen Spaltung schließen läßt, wird in Kapitel 5.5 diskutiert. Die in der Hybridisierung mit der Sau3A-Repeat-Sonde auftretenden Banden der Größenordnung 800 bp konnten nicht reproduziert werden.

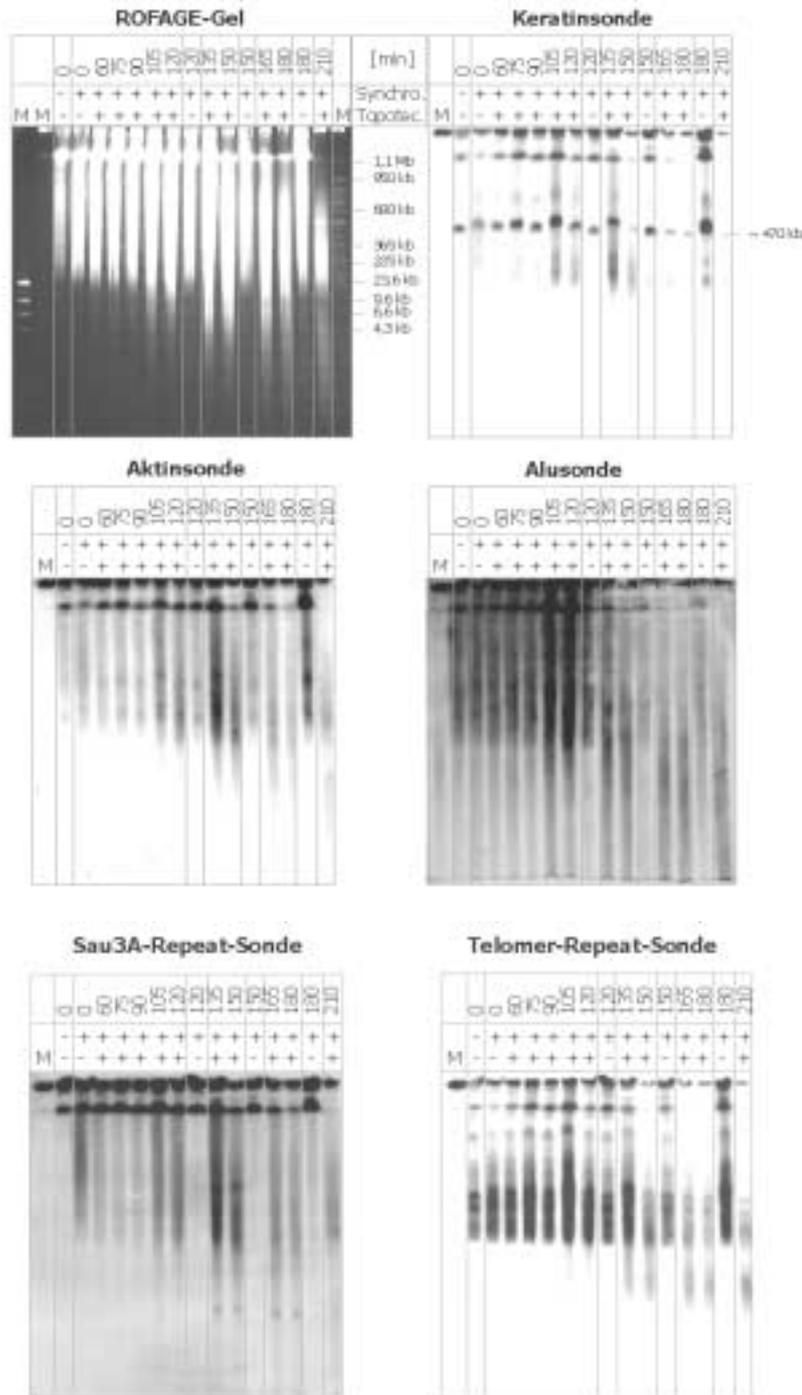


Abbildung 56: Vergleich der Hybridisierungsmuster codierender und nicht codierender Genomregionen bei der Spaltung in hochmolekulare DNA-Fragmente nach *MluI*-Verdauung

Die Hybridisierung mit Sonden aus dem Bereich codierender DNA zeigt, daß es hier im Laufe der Kinetik ebenfalls zu einem Abbau der hybridisierenden DNA-Fragmente kommt, es treten jedoch keine distinkten kleineren Banden auf, die auf einen bevorzugten Schnittpunkt in diesen codierenden Bereichen hinweisen würden. Die Familie der SINE-Elemente, hier dargestellt durch die Hybridisierung mit der Alusonde zeigt einen sehr raschen Abbau der DNA durch apoptotische DNA-Fragmentierung. Die Hybridisierungen aus dem Bereich nicht codierender DNA bestätigen die Ergebnisse unverdauter DNA. Durch den unterschiedlichen Gehalt an Restriktionsschnittstellen für *MluI* und die unterschiedliche Repeatlänge in den einzelnen Chromosomen kommt es zu einer Verschiebung des Bandenmusters und damit auch des Abbaumusters (siehe Text oberhalb der Abbildung).

Zur weiteren Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens wurden zudem Langzeitkinetiken bis 24 h mit synchronisierten HL60-Zellen durchgeführt. Auch hier wurde die Apoptose und damit die DNA-Fragmentierung mit Topotecan als Induktor ausgelöst.

In der Langzeitkinetik bis 24 h (Abbildung 57 und Abbildung 58) läßt sich zusätzlich zu den Ergebnissen aus der Kurzzeitkinetik (bis 3,5 h, Abbildung 55 und Abbildung 56) erkennen, daß die DNA-Fragmentierung in den nicht codierenden Bereichen des Genoms (Abbildung 57) ein zeitlich eng umgrenzter Vorgang ist. Nach einem Maximum des DNA-Abbaus zwischen 2 und 2,5 h ist der Abbau nach 3,5 h weitgehend komplett. Hochmolekulare Fragmente treten nicht mehr auf; in den Taschen ist nur noch die DNA der nicht apoptotischen Zellen zu sehen. Dieses Phänomen tritt in allen untersuchten nicht codierenden Regionen gleichmäßig auf. Eine zeitliche Bevorzugung der Spaltung eines bestimmten Bereichs kann damit für die untersuchten Regionen ausgeschlossen werden.

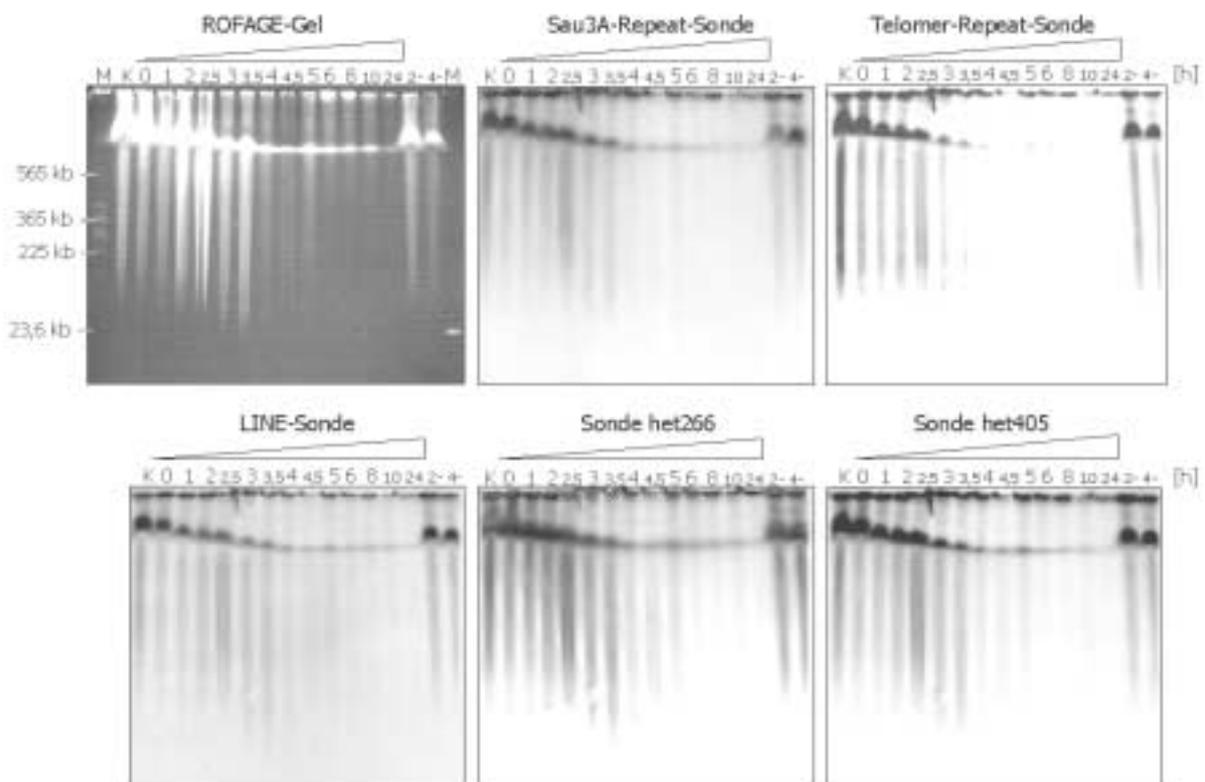


Abbildung 57: Langzeitkinetik zur Untersuchung der Ortsspezifität der apoptotischen DNA-Fragmentierung in den nicht codierenden Bereichen des Genoms

In synchronisierten HL60-Zellen wurde nach Induktion mit Topotecan (150 ng/ml) die hochmolekulare DNA isoliert und pulsfeldgelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der DNA wurden mit den aufgeführten Sonden radioaktive Hybridisierungen der einzelnen Genombereiche durchgeführt. Das Inkubationsdreieck gibt die Zeiten der Behandlung nach Freisetzung der Zellen aus dem Zellzyklus-Block mit Aphidicolin wieder. (K) DNA aus unbehandelten, unsynchronisierten Kontrollzellen, (2-), (4-) DNA aus synchronisierten, jedoch nicht mit Topotecan behandelten Zellen. Links oben ist das ROFAGE-Gel gezeigt, daneben und darunter die radioaktiven Hybridisierungen der einzelnen nicht codierenden Genombereiche. Auch hier zeigt sich ein weitgehend homogenes Bild der DNA-Spaltung in hochmolekulare Fragmente. Die DNA-Fragmentierung in den einzelnen Regionen des Genoms zeigt ein Maximum zwischen 2 und 2,5 h und ist nach 3,5 h weitgehend abgeschlossen. Die verbleibende DNA in der Region der Taschen des Gels stammt vermutlich aus den nicht apoptotischen Zellen im Ansatz.

Die untersuchten codierenden Bereiche des Genoms (Abbildung 58) zeigen deutlich den Abbau der DNA während der apoptotischen DNA-Fragmentierung. Allerdings scheint auch er in einer nicht bevorzugten

Art und Weise zu geschehen, was das Auftreten eines Schmiers bzw. das Nichtauftreten distinkter kleinerer Banden andeutet. Auch hier findet der Abbau der hochmolekularen DNA in einem Zeitraum bis zu 3,5 h statt, zeitgleich mit dem Abbau der DNA in nicht codierenden Genombereichen. Der Abbau des inaktiven Keratingens verläuft ebenso homogen wie der Abbau der aktiven Histon-Gene (Sonde 3 und Sonde H4). Somit besteht auch hier kein Unterschied zwischen den einzelnen Genombereichen. Dies weist wiederum auf einen gleichmäßigen Abbau der DNA in hochmolekulare Fragmente in den untersuchten Genombereichen hin.

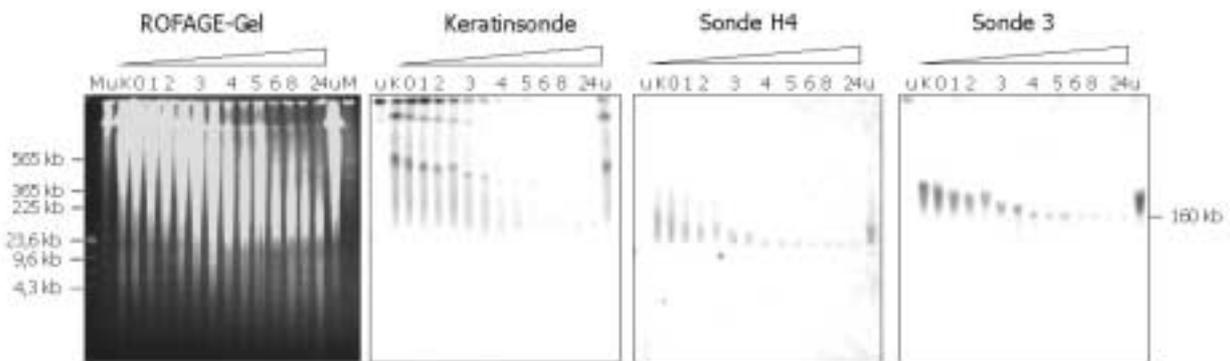


Abbildung 58: Langzeitkinetik zur Untersuchung der Ortsspezifität der apoptotischen DNA-Fragmentierung in codierenden Genbereichen

DNA desselben Versuchs wie in Abbildung 57 wurde mit dem Restriktionsenzym *MluI* verdaut, um eine Darstellung der hochmolekularen DNA aus codierenden Bereichen des Genoms zu ermöglichen. Links ist das ROFAGE-Gel nach Färbung mit Ethidiumbromid dargestellt, rechts die Hybridisierungen mit Sonden aus codierenden Genombereichen. Die Hybridisierung sowohl der Sonde für das vermutlich inaktive Keratingen als auch für die aktiven Histon-Gene (Sonde 3 und Sonde H4) zeigt, daß im Verlauf der Kinetik (dargestellt durch das Inkubationsdreieck, im einzelnen: DNA aus unsynchronisierten, unbehandelten und unverdauten Zellen, aus unsynchronisierten, unbehandelten aber *MluI* verdauten Zellen, 0 h, 1 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 3,5 h, 4 h, 4,5 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h mit Topotecan (150 ng/ml) behandelten synchronisierten Zellen, sowie 24 h nicht behandelte, aber synchronisierte Zellen) die hybridisierende Bande immer weiter an Stärke abnimmt, bis vermutlich nur noch die Hybridisierung der DNA aus dem Anteil der nicht apoptotischen Zellen zu sehen ist.

Ähnlich verhält es sich in den anderen getesteten Systemen (HL60-Zellen mit den Induktoren Teniposid, Etoposid, TNF- α /Cycloheximid und Staurosporin sowie den Zelllinien CEM und U937 mit dem Induktor Topotecan). Daher wird hier auf eine weitere Darstellung verzichtet.

4.5.3 DNA-SPALTUNG IN NIEDERMOLEKULARE FRAGMENTE

Bei der Untersuchung der Ortsspezifität der DNA-Spaltung in nukleosomale Fragmente konnten im Gegensatz zur Spaltung in hochmolekulare DNA-Fragmente deutliche Unterschiede in den verschiedenen Genbereichen festgestellt werden. Während die Bereiche des Zentromers sowie LINE- und SINE-Elemente nach Apoptose-Induktion in nukleosomale Fragmente gespalten werden, zeigt der Telomerbereich keine internukleosomale Spaltung. Wie Abbildung 59 zeigt, hybridisiert hier DNA sehr gemischter Länge im Bereich größer als 2,2 kb, es treten jedoch keine nukleosomalen Fragmente auf. Die Hybridisierung im oberen Bereich läßt sich auf Spaltungen im subtelomeren Bereich zurückführen, da die Telomerregion von HL60-Zellen nur 2 bis 7 kb groß ist (TOMMERUP et al., 1994, in anderen Zellen zusammengestellt unter GREIDER, 1991; DE LANGE, 1994). Im Histongencluster konnte keine Hybridisierung mit niedermolekularen

DNA-Fragmenten festgestellt werden, weder mit der Sonde H4, noch mit der Sonde 3 des Histongenclusters (nicht gezeigt), während die Aktinsonde eine nukleosomale Fragmentierung dieses Gens und vermutlich Kreuzhybridisierung seiner Isoformen aufzeigt. Dies liegt daran, daß die Nachweisgrenze für die einzelnen Sequenzabschnitte sehr niedrig ist, während die Aktinegene bzw. deren Pseudogene häufiger vorkommen und daher auch leichter nachgewiesen werden können.

Insgesamt kann kein zeitlicher Unterschied zwischen dem Einsetzen der internukleosomalen Spaltung - wie im Gel dokumentiert - und der Fragmentierung in den einzelnen Bereichen des Genoms festgestellt werden. Die ersten Leiterfragmente treten in allen untersuchten Bereichen nach 2 h 15 min auf. Damit gibt es auch bei der Spaltung in niedermolekulare DNA-Fragmente – abgesehen von der Aussparung der Telomerbereiche – keinen Genombereich, der bevorzugt vor allen anderen geschnitten wird. Auffällig ist nur der vergleichsweise starke Anteil der Leiterfragmente aus dem Bereich der AluI-Elemente, insbesondere nach 3,5 h Inkubation mit Topotecan. Dies könnte auf einen bevorzugten Abbau der verstreut repetitiven Sequenzen hinweisen.

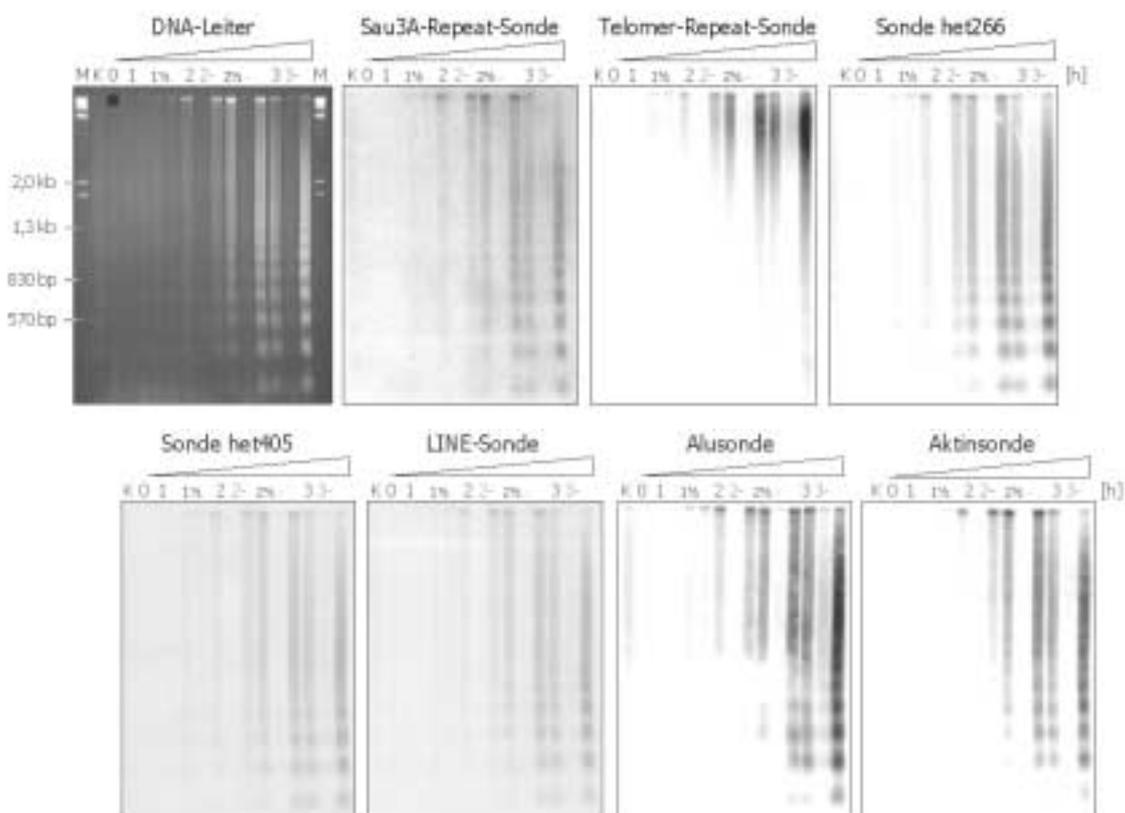


Abbildung 59: Untersuchungen zur Ortsspezifität der Spaltung in niedermolekulare DNA-Fragmente in den verschiedenen Regionen des Genoms

Wie bereits in 4.2.1.1 vorgestellt, ist auch eine Spaltung in niedermolekulare DNA-Fragmente nach Apoptose-Induktion zu beobachten, die sich – typisch für Apoptose – in einer DNA-Leiter darstellt. Nach Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wurden auch hier mit den radioaktiv markierten Sonden aus den verschiedenen Genombereichen Southern-Hybridisierungen durchgeführt. Während sowohl die Zentromerbereiche (repräsentiert durch die Sau3A-Repeat-Sonde, Sonde het266 und het405), als auch die LINE- und SINE-Elemente (repräsentiert durch die LINE-Sonde bzw. Alusonde) und sogar die Aktinegene/Pseudogene (Aktinsonde) eine internukleosomale Spaltung entsprechend den sichtbaren Fragmenten im Gel aufweisen, kommt es im Telomerbereich zu keiner internukleosomalen DNA-Spaltung. Hier ist nur ein Schmier im Bereich größer als 2,2 kb Fragmente zu beobachten, der sich auf Spaltungen in der subtelomeren Region zurückführen läßt.

Da in den niedermolekularen Fragmenten keine Hybridisierung mit Elementen des Histongenclusters möglich war, läßt sich die Spaltung in die niedermolekularen DNA-Fragmente zwischen den untersuchten codierenden Bereichen des Genoms nicht vergleichen.

Die Langzeitkinetik (bis 24 h Induktion mit Topotecan) der apoptotischen DNA-Spaltung in niedermolekulare Fragmente (Abbildung 60) bestätigt das Ergebnis der Kurzzeitkinetik (bis 3,5 h Induktion mit Topotecan). Während alle anderen untersuchten Genombereiche in nukleosomale Fragmente geschnitten werden, wird der Telomerbereich von dieser Art der Fragmentierung ausgespart. Obwohl die Spaltung der DNA in hochmolekulare Fragmente nach 3,5 h Inkubation mit Topotecan weitgehend abgeschlossen war (vgl. Ethidiumbromidfärbung der Gele in Abbildung 55 und Abbildung 56), entstehen die niedermolekularen Fragmente offensichtlich sukzessive (vgl. Gelbild in Abbildung 60). Zunächst geht die Anzahl der Fragmente im Bereich 4 bis 20 kb nach 4 h Inkubation mit Topotecan zurück, später auch die Menge der nukleosomalen Fragmente, die zudem – wie vor allem die gelelektrophoretische Auftrennung zeigt – nach 24 h Anzeichen von unspezifischem Schneiden durch DNasen aufweist, wie sie während der sog. „sekundären Nekrose“ (vgl. 1.1.1) freigesetzt werden. Dies ist ein nur in Zellkultur auftretendes Phänomen. Im Gewebe werden die apoptotischen Zellen bereits in einem frühen Stadium von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert. Sekundäre Nekrose wird daran deutlich, daß die nukleosomalen Fragmente unschärfer werden. Dies läßt auf einen unspezifischen Abbau durch lysosomale Enzyme schließen. Besonders deutlich zeigt dies die Hybridisierung mit der Sau3A-Repeat-Sonde, etwas schwächer die anderen Sonden aus dem Zentromerbereich (het405 und het266). Im Telomerbereich entstehende Fragmente treten gleichzeitig mit der internukleosomalen Spaltung in den anderen Bereichen des Genoms ab 2,5 h Inkubation mit Topotecan auf. Die Anzahl der Fragmente bleibt jedoch im weiteren Verlauf der Fragmentierung zwischen 3,5 h und 24 h Inkubation mit Topotecan unverändert. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, daß die DNA-Fragmentierung im Telomerbereich nicht nur von der internukleosomalen Spaltung ausgespart wird, sondern von jeglicher DNA-Spaltung.

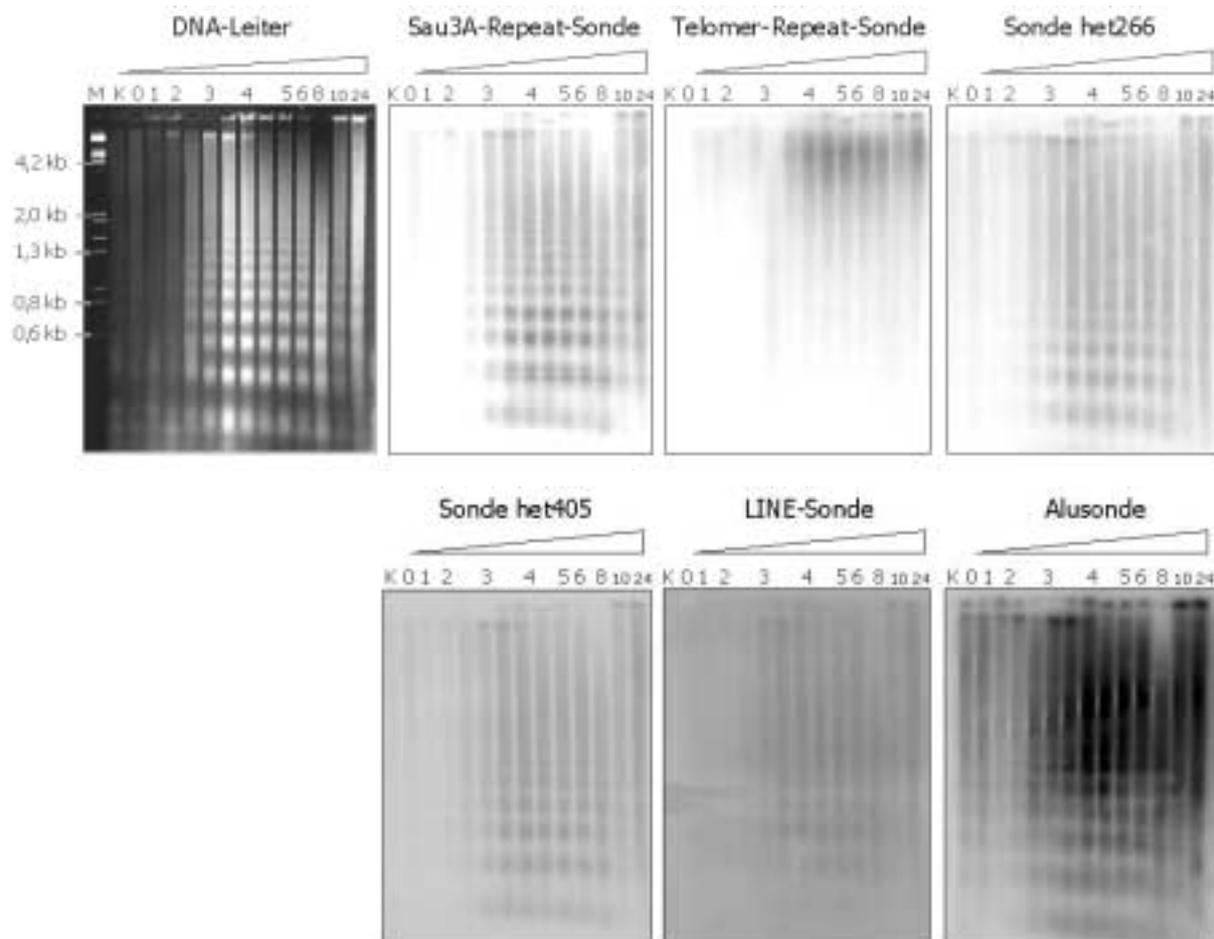


Abbildung 60: Langzeitkinetik zur Untersuchung der Spaltung der verschiedenen Genombereiche in niedermolekulare DNA-Fragmente

Links oben ist das Agarosegel nach konventioneller Elektrophorese und Färbung der DNA mit Ethidiumbromid gezeigt, daneben und darunter finden sich die nach Transfer der DNA auf eine Nylonmembran durchgeführten Hybridisierungen mit radioaktiven Sonden aus den verschiedenen Genombereichen. Die Langzeitkinetik bis 24 h (entsprechend der hochmolekularen DNA in Abbildung 57 und Abbildung 58) bestätigt den gefundenen Unterschied zwischen der Fragmentierung der verschiedenen untersuchten Genombereiche und der Telomerregion: Während in allen anderen Bereichen analog Abbildung 59 eine internukleosomale Spaltung zu beobachten ist, tritt diese im Telomerbereich nicht auf. Darüber hinaus wird der Telomerbereich offensichtlich nicht weiter fragmentiert. Die Anzahl der Fragmente, die aus den hochmolekularen DNA-Fragmenten stammen, nimmt nicht weiter ab.

Um zu prüfen, ob die Aussparung des Telomerbereichs bei der apoptotischen DNA-Fragmentierung eventuell nur ein Zelltyp-spezifischer bzw. Induktor-spezifischer Effekt ist, wurde auch in den anderen vorgestellten Systemen (HL60-Zellen in Verbindung mit anderen Apoptose-Induktoren als Topotecan bzw. Topotecan als Induktor in Verbindung mit anderen Zelllinien) Apoptose induziert. Daraus wurde sowohl die hoch- als auch die niedermolekulare DNA präpariert und diese entsprechend ihrer Größe gelelektrophoretisch aufgetrennt. Diese Gele wurden nach Färbung der DNA auf Nylonmembranen transferiert und ebenfalls mit den angegebenen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Tatsächlich läßt sich in allen untersuchten Systemen der beobachtete Effekt bestätigen: Der Telomerbereich bleibt ausgespart von der apoptotischen Fragmentierung in nukleosomale Einheiten, während alle anderen Bereiche ähnliche zeitliche und räumliche Fragmentierungsmuster aufweisen. Beispielhaft dargestellt ist die Untersuchung der DNA-Spaltung in niedermolekulare Fragmente in U937-Zellen nach Induktion mit Topotecan (150 ng/ml). Sie dient damit als Beispiel der Fragmentierung unter Verwendung des gleichen

Induktors, jedoch einer anderen Zelllinie. In Abbildung 62 sind die Hybridisierungsmuster der einzelnen Genombereiche der niedermolekularen DNA-Fragmente nach Induktion mit Teniposid in den linken Spuren des Gels bzw. der Membran und Staurosporin in den rechten Spuren des Gels bzw. der Membran in unsynchronisierten HL60-Zellen verglichen. Somit tritt auch bei Apoptose-Auslösung durch andere Induktoren die Ausparung des Telomerbereichs von der apoptotischen DNA-Fragmentierung auf und stellt damit einen Induktor- und Zelltyp-unabhängigen, generellen Apoptose-Effekt dar.

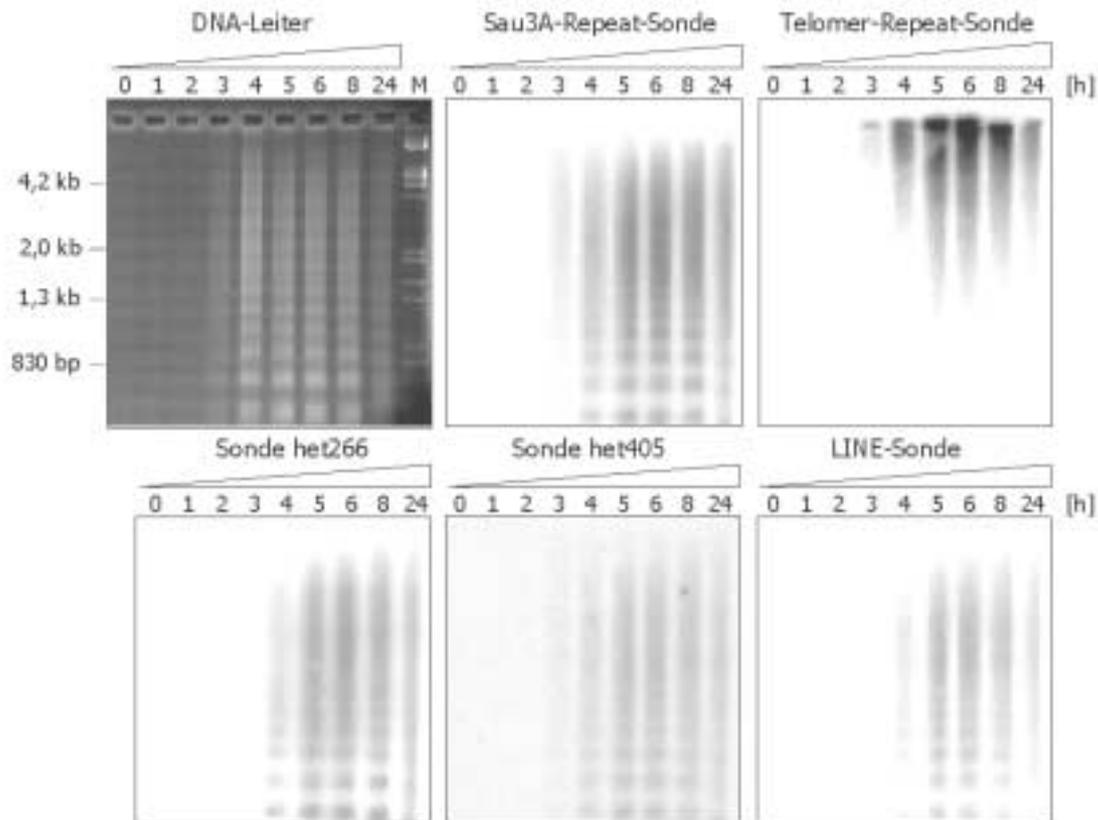


Abbildung 61: Das Fragmentierungsmuster der verschiedenen Genombereiche bei der Spaltung in niedermolekulare DNA-Fragmente in U937-Zellen mit Topotecan als Apoptose-Induktor

Nicht synchronisierte U937-Zellen wurden mit dem Apoptose-Induktor Topotecan (150 ng/ml) behandelt, ihre DNA extrahiert und aufgetrennt (vgl. Kapitel 3.2.11.3.1.1 und 3.2.13.1). Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurde diese mit den angegebenen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Hierbei bestätigt sich das zunächst in HL60-Zellen gefundene Phänomen: Der Telomerbereich wird im Gegensatz zu den anderen getesteten Regionen des Genoms nicht während der Apoptose in nukleosomale Einheiten gespalten.

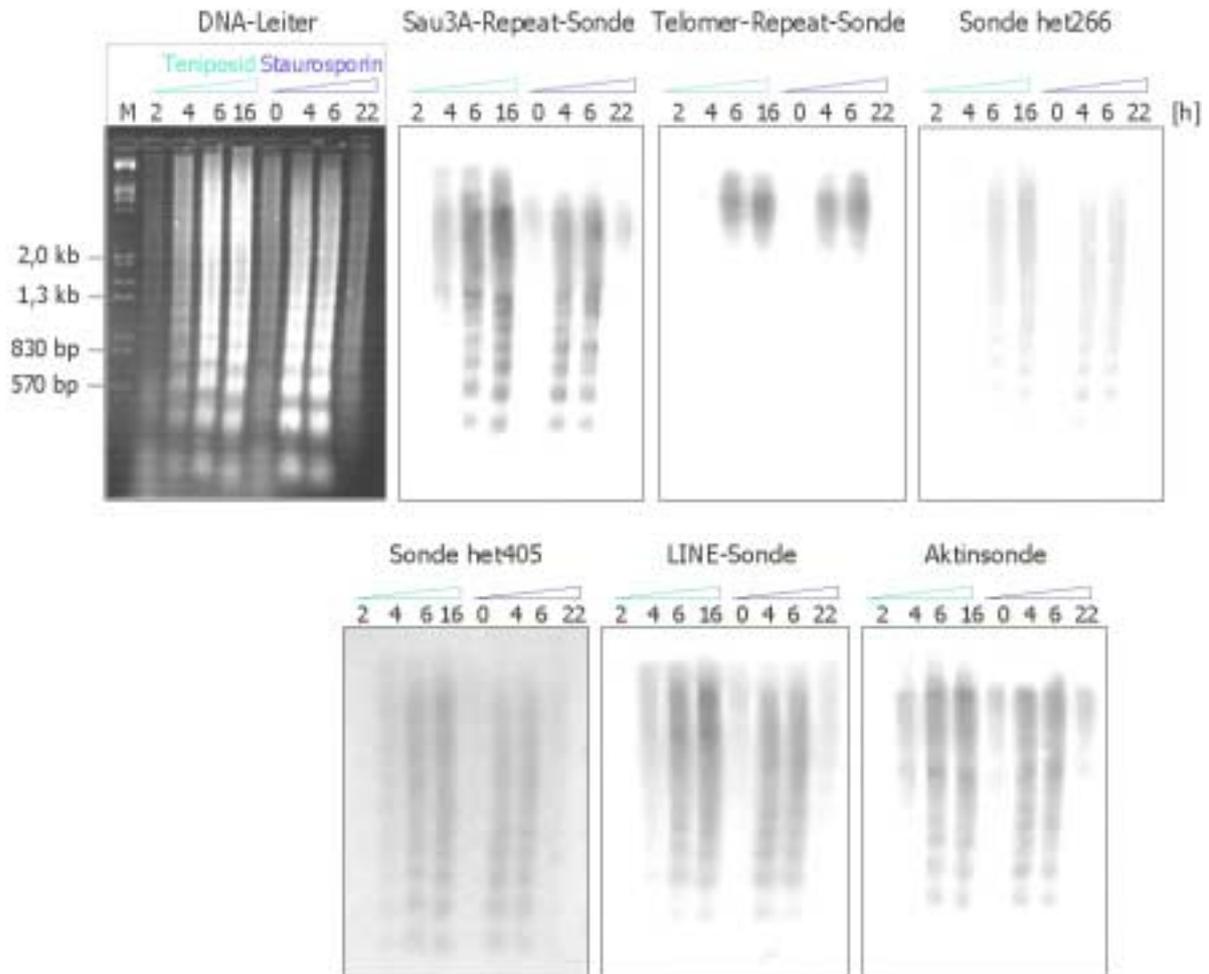


Abbildung 62: Überprüfung des Fragmentierungsmusters der verschiedenen Genombereiche nach Induktion der Apoptose durch andere Induktoren als Topotecan

In den durch das grüne Inkubationsdreieck markierten Spuren ist die Induktion von Apoptose in HL60-Zellen mit Teniposid (10 μ M in DMSO) durchgeführt worden, in den durch das rote Inkubationsdreieck gekennzeichneten Spuren erfolgte sie durch Gabe von Staurosporin (1 μ M). (M) DNA-Größenstandard *Eco RI*/ λ -*HindIII*. Mit beiden Arten von Induktoren bestätigt sich, daß bei der apoptotischen DNA-Fragmentierung der Telomerbereich des Genoms von der Spaltung in Nukleosomen ausgespart bleibt.

Um auszuschließen, daß nur aufgrund der Präparationsmethode der niedermolekularen DNA das beobachtete Phänomen der Aussparung des Telomerbereichs bei der apoptotischen Fragmentierung auftritt, wurde zusätzlich aus HL60-Zellen, die mit TNF- α /Cycloheximid behandelt waren, chromosomale DNA nach ENARI et al. (1998) gewonnen. Diese aufgrund ihrer Größe sehr hochvisköse DNA, die bei dieser Art der Isolierung auftritt, ist – da sie nicht wie sonst hochmolekulare DNA noch in der Zelle in Agarose gegossen wird – größeren Scherkräften ausgesetzt, was die Auftrennung erschwert. Daher wurde diese Art der Auftrennung nicht standardmäßig verwendet, sondern die hochmolekulare DNA bei der Präparation der DNA-Leiter vorher abgetrennt. Beide Methoden zeigen – von der schlechteren Handhabbarkeit und der größeren Scherung der DNA abgesehen - dieselben Ergebnisse. Auch in der auf diese Art isolierten Gesamt-DNA ist das beschriebene Phänomen zu beobachten: Während die Zentromer-DNA (hier gezeigt an der Sau3A-Repeat-Sonde) internukleosomal geschnitten wird, sind keine Nukleosomen zu finden, die aus dem Telomerbereich stammen (Abbildung 63). Zudem wurde hiermit

noch einmal die Unabhängigkeit der Aussparung des Telomerbereichs von der Art der Apoptose-Induktion gezeigt, da nun die drei Hauptklassen der Apoptose-Induktoren - wie in Tabelle B (Seite 83) aufgeschlüsselt - verwendet wurden, um dieses Phänomen zu bestätigen.

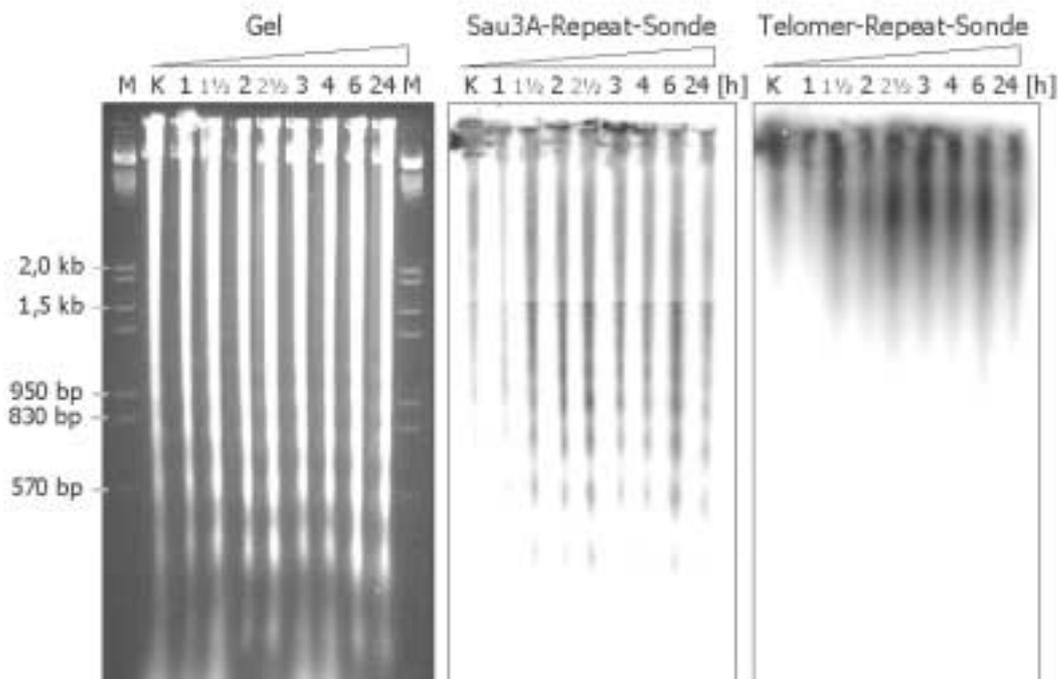


Abbildung 63: Überprüfung der Präparationsmethode der DNA-Leiter

Hier wurde aus HL60-Zellen, die für die angegebenen Zeitwerte in Stunden mit TNF- α /Cycloheximid behandelt wurden, chromosomale DNA nach ENARI et al. (1998) präpariert und auf einem konventionellen Agarosegel aufgetrennt. Die sehr hochvisköse DNA unterliegt bei dieser Art der Präparation Scherkräften, was die DNA-Spur in den unbehandelten Zellen erklären kann. Auch bei dieser Art der Auftrennung konnte mittels Southern-Hybridisierung nachgewiesen werden, daß der Telomerbereich von der apoptotischen DNA-Fragmentierung in nukleosomale Einheiten ausgespart bleibt.

4.5.4 UNTERSUCHUNG DER NUKLEOSOMALEN ORGANISATION DER TELOMERREGION IM GENOM HUMANER ZELLINIEN

Die Tatsache, daß der Telomerbereich von der internukleosomalen DNA-Fragmentierung ausgespart wird, wirft die Frage auf, ob die DNA im Telomerbereich des Genoms überhaupt nukleosomal organisiert ist. Dies wurde überprüft, indem aus unbehandelten Zellen Nukleosomen präpariert wurden. Dazu wurden zunächst Kerne nach HEWISH und BURGOYNE (1973) präpariert und diese dann einer limitierten Mikrokokkus-Nuklease-Verdauung unterzogen. Dabei wurde deutlich, daß die Präparation von Nukleosomen aus HL60-Zellen Modifikationen der bisher etablierten Methode aus Leberextrakten erfordert. Zunächst wurden HeLa-Zellen verwendet und die optimierte Methode (vgl. 3.2.10.3.1.2) dann auf HL60-Zellen übertragen.

4.5.4.1 NUKLEOSOMENPRÄPARATION AUS NICHT APOPTOTISCHEN ZELLEN

Die Nukleosomen aus HL60-Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Diese wurde zunächst mit der radioaktiv markierten Sonde aus der Telomerregion und anschließend nach Abwaschen der ersten Sonde mit der radioaktiv markierten Sonde aus der Zentromerregion (Sau3A-Repeat-Sonde) hybridisiert. Die Hybridisierungen zeigen, daß nicht nur der Zentromerbereich, sondern auch der Telomerbereich des humanen Genoms nukleosomal organisiert ist (Abbildung 64). Damit kann die gefundene Aussparung der Telomerregion bei der internukleosomalen Fragmentierung nur auf einen Effekt der apoptotischen DNase(n?) zurückgeführt werden. Auffällig ist jedoch, daß die Nukleosomen der Telomerregion in ihrer Größe von den Nukleosomen der Zentromerregion bzw. der im Gel als Leiter auftretenden Nukleosomen abweichen und weniger scharfe Banden ergeben. Daher wurde in Abbildung 65 ein direkter Vergleich der Größe der entstandenen Nukleosomen vorgenommen. Aus den Oligomeren ist der Rückschluß möglich, daß Mononukleosomen aus dem Telomerbereich ca. 150 bis 170 bp groß sind und damit kleiner als die ca. 190 bis 200 bp umfassenden Nukleosomen im Rest des Chromatins.

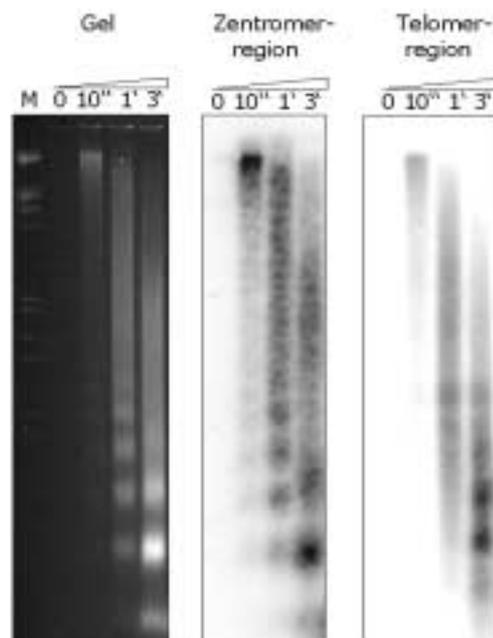


Abbildung 64: Überprüfung der nukleosomalen Organisation der Zentromerregion im Vergleich zur Telomerregion

Aus 1×10^8 HL60-Zellen wurden Kerne nach der modifizierten Methode präpariert (vgl. Kapitel 3.2.10.3.1.2), diese nicht (0-Wert) bzw. für 10 s, 1 min und 3 min mit 50 U Mikrokokus-Nuklease bei 37°C behandelt. Nach Stop der Verdauung mit EDTA wurden die Kerne in einem hypotonen Phosphat-EDTA-Puffer lysiert und so die entstandenen Nukleosomen freigesetzt. Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurden die Nukleosomen mit 1 M NaCl und zweifachem Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und anschließend gefällt. Die unterschiedlich lang mit Nuklease geschnittenen DNA-Fragmente wurden auf einem 1,2% Agarosegel bei 60 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert und mit den radioaktiv markierten Sonden für die Telomerregion (Telomer-Repeat-Sonde) und die Zentromerregion (hier dargestellt ist die Sau3A-Repeat-Sonde) des Genoms hybridisiert. Die Hybridisierungen zeigen, daß auch im Telomerbereich eine nukleosomale Organisation der DNA gegeben ist. Es fällt jedoch auf, daß die Größe der entstandenen Nukleosomen von der Größe der im Gel aufgetrennten Nukleosomen und den im Zentromerbereich hybridisierenden Nukleosomen abweicht. (M) DNA-Größenstandard *EcoRI*/ λ -*HindIII*.

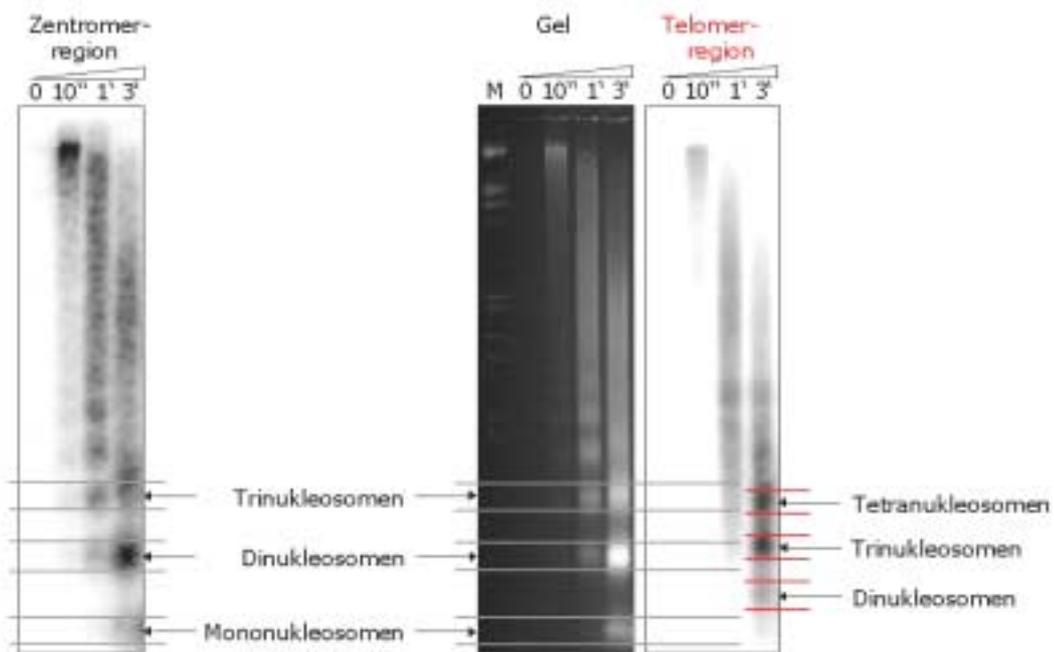


Abbildung 65: Vergleich der Größe der nukleosomalen Einheiten der Telomerregion mit der Zentromerregion

Die Abbildung entspricht der vorhergehenden; zum Größenvergleich sind jedoch die einzelnen „Leitersprossen“ aus dem Gel und den Hybridisierungen zugeordnet worden. Die Nukleosomen des Telomerbereichs sind mit etwa 150 bis 170 bp durchgehend kleiner als normale Nukleosomen, die eine Größe von ungefähr 190 bis 200 bp und Vielfache davon aufweisen.

4.5.4.2 NUKLEOSOMENPRÄPARATION AUS APOPTOTISCHEN ZELLEN

Um unterscheiden zu können, ob der Telomerbereich tatsächlich ganz von der DNA-Spaltung in niedermolekulare Fragmente ausgespart wird und daher in einer Größe bis zu 2 kb resultierend aus der apoptotischen DNA-Spaltung in hochmolekulare Fragmente erhalten bleibt, oder eventuell von einer anderen DNase gespalten wird, wurde ein weiterer Ansatz gewählt: HL60-Zellen wurden für 0 h, 3 h und 5 h mit dem Apoptose-Induktor Topotecan behandelt. Danach wurde aus einem Teil der Zellen die niedermolekulare DNA zur Darstellung der apoptotischen DNA-Leiter präpariert (vgl. 3.2.11.3.1.1); aus dem anderen Teil der Zellen wurden wie unter 3.2.10.3.1.2 beschrieben durch partielle Mikrokokus-Nuklease-Verdauung Nukleosomen isoliert. Die Inkubation der Kerne mit Mikrokokus-Nuklease wurde hier jeweils nach 1 min bzw. 3 min gestoppt. Zum Vergleich der Auswirkungen der unterschiedlichen Präparationsmethoden auf die DNA-Fragmentierung wurde auch jeweils ein nicht Mikrokokus-Nuklease behandeltes Wert (0 min) aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Leiter sowie der Nukleosomen aus der Mikrokokus-Verdauung nicht apoptotischer Zellen (Spuren 3 bis 6) zeigt die Vergleichbarkeit der Präparationsmethoden; es entstehen jeweils nukleosomale Fragmente. Wurden apoptotische Zellen zusätzlich noch der Mikrokokus-Nuklease-Verdauung unterzogen, so kam es zu einer Anreicherung der nukleosomalen Fragmente im Gel. Diese können sowohl aus bisher ausgesparten Genombereichen stammen, als auch aus dem Anteil der nicht apoptotischen Zellen im Ansatz. Auch im Telomerbereich entstehen durch die zusätzliche Mikrokokus-Nuklease-Verdauung nukleosomale Fragmente. Wäre die Telomerregion während der Apoptose schon durch eine andere Nuklease in sehr

kleine Fragmente abgebaut worden, könnten die entstehenden nukleosomalen Fragmente nur aus nicht apoptotischen Zellen stammen. Da der Vergleich der Zunahme der neu entstehenden nukleosomalen Fragmente im Zentromerbereich im Vergleich zu den entstehenden nukleosomalen Fragmenten im Telomerbereich schwierig ist, läßt sich diese Möglichkeit nicht ausschließen. Der Telomerbereich zeigt eine weniger scharf definierte Spaltung in die nukleosomalen Fragmente. Allerdings nimmt auch der aus der apoptotischen Spaltung in hochmolekulare Fragmente resultierende DNA-Schmier im oberen Bereich der Membran ab. Diese Beobachtung spricht für eine Aussparung der Telomerregion von der DNA-Spaltung. Der Schmier entsteht vermutlich durch Spaltungen im subtelomeren Bereich. Damit erscheint die Aussparung der Telomerregion von der apoptotischen Spaltung insgesamt wahrscheinlicher als ein spezifischer Abbau des Telomerbereichs durch eine andere DNase.

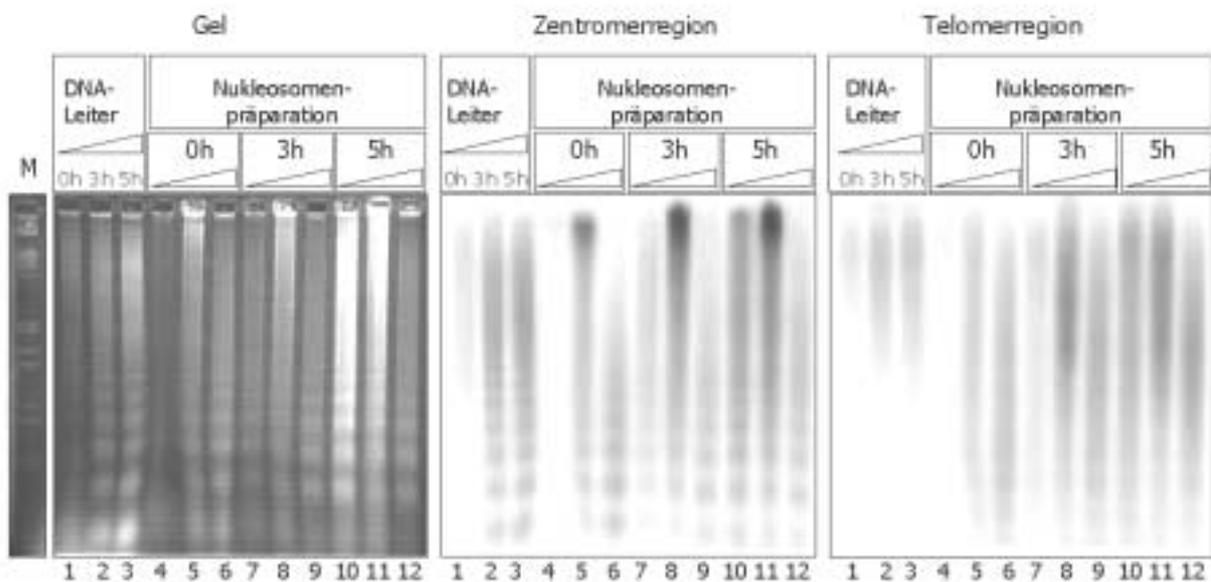


Abbildung 66: Nukleosomenpräparation aus apoptotischen HL60-Zellen im Vergleich zur apoptotischen DNA-Leiter

HL60-Zellen wurden für 0 h, 3 h und 5 h mit dem Apoptose-Induktor Topotecan behandelt. Aus einem Teil der Zellen wurde die niedermolekulare DNA zur Darstellung der apoptotischen DNA-Leiter präpariert (s. Kapitel 3.2.11.3.1.1) und im linken Teil des Gels aufgetrennt. Das Inkubationsdreieck steht für (1) unbehandelte Zellen, (2) DNA aus 3 h mit Topotecan behandelten Zellen, (3) DNA aus 5 h behandelten Zellen. Aus dem anderen Teil der Zellen wurden wie unter Kapitel 3.2.10.3 beschrieben durch partielle Mikrokoccus-Nuklease-Verdauung Nukleosomen isoliert. Die Inkubation mit Mikrokoccus-Nuklease wurde hier jeweils nach 1 min bzw. 3 min gestoppt. Es wurden also jeweils dem Inkubationsdreieck entsprechend nicht apoptotische (Spuren 4 bis 6), 3 h Apoptose-induzierte (Spuren 7 bis 9) und 5 h Apoptose-induzierte Zellen (Spuren 10 bis 12) der Nukleosomenpräparation unterzogen. Hierbei wurde entweder gar nicht mit Mikrokoccus-Nuklease behandelt (Spuren 4/7/10), 1 min (Spuren 5/8/11) oder 3 min (Spuren 6/9/12). Die DNA wurde auf einem 1,2% Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Zunächst wurde mit der radioaktiv markierten Telomer-Repeat-Sonde (Telomerregion), danach mit der Sau3A-Repeat-Sonde (Zentromerregion) hybridisiert. Die DNA-Leiter zeigt die Aussparung der Telomerregion von der apoptotischen Spaltung. Die Nukleosomenpräparation aus nicht apoptotischen Zellen (Spuren 4 bis 6) beweist die Vergleichbarkeit der beiden Methoden. Die apoptotischen Zellen zeigen nach limitierter Mikrokoccus-Nuklease-Verdauung eine Zunahme der nukleosomalen Fragmente, sowohl im Zentromerbereich als auch im Telomerbereich. Da ein Vergleich der Menge von neu entstehenden nukleosomalen Fragmenten im Telomerbereich mit denen im Zentromerbereich schwierig ist, ist die Frage ihrer Herkunft nicht klar. Die Abnahme des Schmiere im oberen Bereich des Gels spricht jedoch für eine Aussparung des Telomerbereichs von der apoptotischen DNA-Fragmentierung.

4.5.5 ZUSAMMENFASSUNG DES ABSCHNITTES UNTERSUCHUNGEN ZUR ORTSSPEZIFITÄT DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG (4.5)

Der Vergleich der Spaltung in hoch- und niedermolekulare DNA-Fragmente ergibt damit für die analysierten Bereiche, daß hochmolekulare DNA-Fragmente vor niedermolekularen DNA-Fragmenten entstehen. Dies geschieht in einem kurzen Abstand von wenigen Minuten. Alle untersuchten Genomregionen zeigen ein zeitlich koordiniertes Einsetzen der DNA-Spaltung in hoch- und niedermolekulare Fragmente. Die DNA-Fragmentierung erfolgt gleichmäßig. Die untersuchten codierenden Bereiche des Genoms zeigen einen homogenen Abbau ihrer DNA ohne Bevorzugung bestimmter Schnittpunkte. Ihre Spaltung scheint damit einem zufälligem Schema zu unterliegen. Ebenso zeigt die Spaltung der nicht codierenden Bereiche des Genoms in hochmolekulare DNA-Fragmente einen gleichmäßigen Verlauf. Im Bereich der niedermolekularen DNA-Fragmente zeigen alle untersuchten Bereiche eine internukleosomale Spaltung. Einzig der Telomerbereich zeigt keine nukleosomalen Fragmente, sondern scheint von dieser Art der Fragmentierung ausgespart zu sein - unabhängig davon, welches System oder welche Präparationsmethode verwendet wird. Da der Telomerbereich wie die anderen Genombereiche nukleosomal organisiert ist – allerdings in kleineren Einheiten – könnte dies eine spezifische Eigenschaft der apoptotischen Endonuklease(n?) sein oder auf der veränderten Chromatinstruktur des Telomerbereichs beruhen.

5 DISKUSSION

Die Apoptose ist in den letzten Jahren als ein entscheidender Regelmechanismus in der Zell- und Entwicklungsbiologie und der Onkologie erkannt worden. Nachdem zunächst den Beobachtungen Wyllies und seiner Mitarbeiter Ende der siebziger Jahre kaum Beachtung geschenkt wurde, ist die Apoptose-Forschung inzwischen zu einem sehr aktuellen und kompetitiven Feld geworden. Ein Aspekt des apoptotischen Signalwegs, nämlich die Umstrukturierung und Spaltung des Chromatins, ist nur anfänglich untersucht worden und inzwischen fast wieder aus dem Blickpunkt der Forschung verschwunden. Dabei ist nicht viel über die Regeln und die Zusammenhänge bekannt, die bei diesem Prozeß zum Tragen kommen. Tatsächlich bietet die apoptotische DNA-Fragmentierung eine Menge an Möglichkeiten und Perspektiven – nicht nur zur Erforschung der Apoptose selbst, sondern auch zur weiteren Erforschung des Chromatins, insbesondere seiner strukturellen und funktionellen Eigenschaften. Gerade dieser Aspekt wird – wenn das menschliche Genom vollständig sequenziert worden ist – verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses treten. Daß über die apoptotische DNA-Fragmentierung - genauso wie über die Domänenstruktur des Chromatins - noch wenig bekannt ist, deutet bereits ein Blick in die heterogene und widersprüchliche Literatur an. Daher war es Ansatzpunkt dieser Arbeit, Erkenntnisse über die Fragmentierung des Chromatins während der Apoptose zu gewinnen.

Die Analyse der Chromatinspaltung im Verlauf der Apoptose beruht in dieser Arbeit zum einen auf der Identifizierung bevorzugter Schnittstellen im Histongencluster auf Chromosom 6 als einer Modellregion. Mit 300 kb Größe ist er groß genug, um aller Wahrscheinlichkeit nach mindestens eine initiale apoptotische Schnittstelle und mindestens eine Matrixanheftungsregion zu enthalten. Beides konnte jedoch nicht im Histongencluster identifiziert werden. Welche Konsequenzen dieses unerwartete Ergebnis hat und welche Deutungen der Domänenstruktur damit möglich sind, wird im Anschluß diskutiert.

Zum anderen wurde das Fragmentierungsmuster verschiedener Regionen des Genoms während der Apoptose eingehend untersucht und die zeitliche Abfolge der DNA-Fragmentierung erkundet, um Details über die Kinetik und Ortsspezifität dieses Prozesses zu erfahren. Die dazu durchgeführten Etablierungen und Optimierungen des induzierenden Systems, sowie der Apoptose-Nachweise, werden direkt im Anschluß diskutiert, gefolgt von den Ergebnissen aus den Untersuchungen zu den bevorzugten Schnittpunkten im Histongencluster und der Suche nach MARs im Histongencluster. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Kinetik der apoptotischen DNA-Fragmentierung sowie ihrer Ortsspezifität bezogen auf die verschiedenen Regionen des Genoms schließen die Diskussion dieses Teils ab.

5.1 DIE INDUKTION VON APOPTOSE ZUR UNTERSUCHUNG DER DNA-FRAGMENTIERUNG

Zur Auslösung von Apoptose in Zelllinien existiert ein breites Spektrum an Möglichkeiten. Sie reichen von den physikalischen Schäden durch UV-Strahlung oder γ -Strahlung bis zu den chemischen Induktoren wie

chemotherapeutischen Medikamenten, Ethanol und β -Amyloid-Peptiden. Die physiologischen Auslöser umfassen zytotoxische Zytokine, Kalziumerhöhung, Glukokortikoide, TGF- β , Verarmung an Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und die Zellablösung. Auch über Schäden wie Hitzeschock, oxidativem Streß, viralen Infektionen, Bakterien-Toxinen, Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und freien Radikalen kann Apoptose ausgelöst werden (zusammengestellt in SCHWARTZMAN und CIDLOWSKI, 1993; THOMPSON, 1995). Jeder Induktor zeigt eine für sich eigene Kinetik sowohl in der Auslösung der Apoptose als auch in der Resistenz bzw. Sensitivität der einzelnen Zelltypen (z.B. im Vergleich der Lymphozyten mit Topoisomerase-Inhibitoren, DUBREZ et al., 1995; KURIBAYASHI et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich eine Klasse von Induktoren verwendet, die zu den Chemotherapeutika gehören und sich wie z.B. Topotecan (Handelsname Hycamtin®) bereits in der Stufe 2 der klinischen Erprobung befinden (HERBEN et al., 1996; ARDIZZONI et al., 1997) bzw. wie Etoposid (VP-16) oder Teniposid (VM-26, Handelsname Vumon®) schon in der klinischen Anwendung sind (MUGGIA und KELLEY, 1992; BELANI et al., 1994). Diese wurden eingesetzt, da sie zum einen gute Apoptose-Induktoren in den im Labor bereits etablierten Zelllinien sind und zum anderen der kinetische Ablauf der durch sie ausgelösten Apoptose gut reproduzierbar ist, wie mehrfach aus unseren Versuchen hervorging.

Ein Aspekt, der auch die klinische Anwendung von Chemotherapeutika schwierig macht, ist der Umstand, daß nicht jeder Zelltyp auf die verwendeten Induktoren anspricht, bzw. daß einzelne Zelltypen sehr unterschiedlich ansprechen (DEL BINO et al., 1990; LI, X. et al., 1994; KAUFMANN und EARNSHAW, 2000). Während solide Tumoren oft sehr resistent sind, sprechen z.B. Leukämien häufig auf Apoptose-Induktion an (MARTINS et al., 1997b; HOUGHTON, 1999). Eine Gruppe von Chemotherapeutika, die hier gute Ergebnisse erzielen, sind Substanzen, die über die Hemmung der zelleigenen Topoisomerasen DNA-Schäden verursachen und in Folge die Apoptose-Maschinerie in Gang setzen (BERTRAND et al., 1991a; BERTRAND et al., 1991b; FERGUSON und BAGULEY, 1996).

Für die Untersuchung der DNA-Fragmentierung während der Apoptose war es wichtig, möglichst viele Zellen gleichzeitig in den Prozeß der Apoptose zu bringen, um die Untersuchungen vor einem möglichst geringen Hintergrund an nicht apoptotischen Zellen durchführen zu können. Unabhängig davon, welche Induktionsform gewählt wird, kommt es nie zu einer Induktion der Apoptose in allen Zellen einer Population. Dies ist auf die Komplexität der Signalwege zurückzuführen, in denen pro- und antiapoptotische Mechanismen miteinander konkurrieren (diskutiert unter EARNSHAW, 1999). Andere Möglichkeiten des Schutzes der Zellen vor Apoptose beruhen auf Mechanismen, die verhindern, daß die induzierenden Substanzen ihr intrazelluläres Ziel erreichen. Ein Beispiel ist das *mdr-1*-Genprodukt, das bei Überexpression für die Ausbildung von Multidrug-Resistenzen verantwortlich gemacht wird. Diese stehen im Zusammenhang mit schlechten Prognosen bei akuten Leukämien (GOTTESMAN, 1993). Diese Schutzmechanismen haben in den durchgeführten Untersuchungen zur Folge, daß immer vor einem Hintergrund nicht apoptotischer oder sogar nekrotischer Zellen gearbeitet wird. Um jedoch mit der hier verwendeten Methode Schnittstellen in single copy-Bereichen des Genoms nachweisen zu können, ist neben der Verwendung eines empfindlichen Nachweises ein möglichst hoher Anteil an Zellen nötig, der sich in Apoptose befindet. Die Sichtung der Literatur ergab – zusätzlich zu Erfahrungen aus unserer

Arbeitsgruppe -, daß Leukämiezelllinien eine hohe Sensitivität gegenüber Topoisomerase-Inhibitoren bei gleichzeitig geringer Induktion der pathophysiologischen, d.h. nekrotischen Form des Zelltods aufweisen (DUBREZ et al., 1995). Als besonders sensitiv erwies sich – wie auch bereits von Dubrez et al. (1995) beschrieben – die Behandlung von promyelozytischen HL60-Zellen mit Topoisomerase-Hemmstoffen. Während dort als Vertreter der Topoisomerase I-Inhibitoren noch Camptothecin verwendet wurde, wurde in dieser Arbeit mit gutem Erfolg der Hemmstoff Topotecan eingesetzt, ein potentes Derivat des Camptothecins. Topoisomerase II-Hemmstoffe wurden in Form von Etoposid (VP-16) oder Teniposid (VM-26) verwendet. Ähnlich sensitiv wie die HL60-Zellen zeigten sich monozytäre U937-Zellen (siehe auch BICKNELL et al., 1994), während in K562-Zellen kein Anzeichen für Apoptose in K562-Zellen nach Induktion mit Topoisomerase-Hemmstoffen gefunden werden konnte (siehe auch KURIBAYASHI et al., 1996). Dies könnte neben den oben erwähnten Resistenzmechanismen (siehe auch ROWLEY et al., 1996) auch auf die Anzahl der Topoisomerase-Moleküle in den einzelnen Zelllinien (FERNANDES et al., 1990; HUSAIN et al., 1994) oder deren Mutation zurückzuführen sein, die eine Inhibierung der Topoisomerasen durch Hemmstoffe verhindert (BUGG et al., 1991; FRY et al., 1991).

Der Mechanismus, über den die Topoisomerase-Inhibitoren zur Induktion von Apoptose führen, ist vielfältig diskutiert: von der Wirkung über einen Zellzyklus-Block (SLEIMAN et al., 1998) bis zur Auslösung von Mutationen in Genen, die für die Zelle überlebenswichtig sind (HASHIMOTO et al., 1995a). Grundlage der Wirkung von Topoisomerase-Hemmstoffen ist die Bildung eines kovalenten Komplexes aus DNA-Topoisomerase und Inhibitor, welcher eine Religation der durch Topoisomerase gespaltenen DNA-Stränge (Topoisomerase II) bzw. des gespaltenen Strangs (Topoisomerase I) verhindert und so zu einem dauerhaften DNA-Strangbruch führt. Wie gezeigt werden konnte, sind diese Strangbrüche initial reversibel (HSIANG et al., 1989; UDVARDY und SCHEDL, 1991). Auswirkungen haben sie erst in der S-Phase, wenn es zu einer Kollision der fortschreitenden Replikationsgabel mit dem kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex kommt (HORWITZ und HORWITZ, 1973; LIU, L. F., 1983; POMMIER et al., 1991, zusammengefaßt in KAUFMANN, 1998). Danach kommt es zur Initiierung von DNA-Schäden-induzierten Signalweiterleitungen, Zellzyklus-Arrest und der Aktivierung von Reparaturmechanismen. Erst in deren Folge wird eine Einbindung der enzymatischen Maschinerie vermutet, die schließlich in die Apoptose mündet. Welche Prozesse hier eine Rolle spielen, ist noch nicht geklärt. Vermutet wird, daß sowohl Prozesse, die durch DNA-Schäden aktiviert wurden, als auch Antworten auf Streß die Apoptose-Maschinerie in Gang setzen. Beteiligt sind neben der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK, SMITH, G. C. und JACKSON, 1999) und dem verwandten Protein ATM (einem „Checkpoint-sensor“-Protein des Zellzyklus, das DNA-Schäden wahrnimmt und in Folge Zellzyklus-Arrest auslösen kann, ROTMAN und SHILOH, 1998), die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase PARP, die Cyclin-abhängigen Kinasen sowie der Transkriptionsfaktor NF κ B (BOLAND et al., 2000) oder der „Second Messenger“ Ceramid, der wiederum für die Aktivierung von JNK und p38 verantwortlich ist (zusammengefaßt und diskutiert in KAUFMANN, 1998; RICH et al., 2000). JNK und p38 sind terminale Kinasen der drei Stress-aktivierten Kinase-Signalwege, die zu einer Aktivierung der Transkription von Stress-responsiven Genen führen (CANMAN und KASTAN, 1996; KYRIAKIS und AVRUCH, 1996; OSBORN und CHAMBERS, 1996).

Nach einer morphologisch latenten Phase, die je nach Zelltyp unterschiedlich lang sein kann, kommt es innerhalb von 30 bis 60 Minuten zu stereotypen morphologischen Veränderungen. Sie äußern sich in einer Abnahme des Zellvolumens, der Hyperaktivität der Plasmamembran in Form der Bildung von Bläschen an der Zelloberfläche, der Kondensation des peripheren Heterochromatins und der Spaltung des Kerns und des Zytoplasmas in membranumschlossene Körperchen. Biochemisch zeigt sich die Expression von Genen, die für den Transkriptionsfaktor *jun* und den Tumornekrosefaktor- α homologen Fas-Liganden codieren. Weiterhin kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien in das Zytosol und zur Aktivierung der Caspase-Kaskade (MESNER und KAUFMANN, 1997 und dort aufgeführte Literaturverweise). Insbesondere die Freisetzung von Cytochrom c scheint den Hauptweg dieses Signalwegs darzustellen (KAUFMANN und EARNSHAW, 2000; ROBERTSON et al., 2000).

Nicht alle behandelten Zellen gehen wirklich in Apoptose. Wie auch in dieser Arbeit mehrfach bestätigt, liegt die Rate der apoptotischen Zellen zwischen 25 und 30% nach 3 h Behandlung (siehe auch BERTRAND et al., 1993). Zudem gehen die Zellen nicht synchron in Apoptose (MARTINS et al., 1997b). Dies scheint von der Phase des Zellzyklus beeinflusst zu werden, in der sie sich zur Zeit der Induktion befinden. Für die Topoisomerase II-Inhibitor-vermittelte Spaltung ist die Bevorzugung der G2/S-Phase als Induktionszeitpunkt nachgewiesen. Topoisomerase I-vermittelte Strangbrüche sind auch in den anderen Zellzyklusphasen zu finden, jedoch mit verminderter Häufigkeit (CHOW und ROSS, 1987; DAVIES et al., 1988; HSIANG et al., 1989). Der Rest der Zellen überlebt die Behandlung, allerdings mit einer erhöhten Häufigkeit von chromosomalen Aberrationen und Mutationen. Gut untersucht ist dies insbesondere in nicht essentiellen, aber anschaltbaren Genen wie dem Hypoxanthin/Guanin-Phospho-Ribosyl-Transferaselocus (HGPRT-Locus), in dem nach Behandlung mit Topotecan oder Etoposid große Deletionen und Insertionen beobachtet wurden. Die Häufigkeit solcher Mutationen beträgt $3 - 10 \times 10^{-6}$. Insbesondere nach Behandlung mit Epipodophylotoxinen wie Teniposid wurden Mutationen üblicherweise an bevorzugten Topoisomerase II-Spaltungsstellen beobachtet (BAE et al., 1991; BERGER et al., 1991; BODLEY et al., 1993; HAN, Y. H. et al., 1993; HASHIMOTO et al., 1995b). Die Strangbrüche selbst führen zu transienten Fragmenten größer als 600 kb (ROY et al., 1992; BEERE et al., 1995). Diese sind also größer als die bei der Apoptose beobachteten irreversiblen Fragmente, die zwischen 50 und 300 kb groß sind. Die Häufigkeit der Topoisomerase-vermittelten Strangbrüche nach Behandlung von HL60-Zellen mit Etoposid oder Teniposid liegt bei einem Bruch pro $10^6 - 10^7$ Basenpaaren und ist damit um Größenordnungen seltener als die apoptotische DNA-Fragmentierung (alle 200 bis 2.000 bp, LONG et al., 1984). Somit lassen sich die durch die Substanzen direkt hervorgerufenen, primären DNA-Fragmente von den durch Apoptose hervorgerufenen sekundären Fragmenten eindeutig abgrenzen, was eine entscheidende Vorbedingung zur Verwendung von Topoisomerase-Hemmstoffen in dieser Arbeit war.

Um zu prüfen, ob die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf die DNA-Fragmentierung auch tatsächlich auf Prozessen der Apoptose und nicht etwa nur auf spezifischen Wirkungen der Topoisomerase-Hemmstoffe beruhen, wurden die mit Topoisomerase-Hemmern durchgeführten Versuche auch mit anderen Induktoren wiederholt. Hier wurde hauptsächlich das System TNF- α /Cycloheximid zur Induktion verwendet, da es ebenfalls in guter Ausbeute und in synchroner Weise Apoptose induzierte (diese Arbeit

und BINDER et al., 1997). Zudem ist es eines der Standardsysteme der Apoptose-Forschung (WALLACH et al., 1997). TNF- α ist bekannt als Zytokin und als Ligand des TNF-Rezeptors an der Zelloberfläche (NAGATA und GOLSTEIN, 1995; VANDENABEELE et al., 1995). Über die Bindung von TNF- α kommt es zur Trimerisierung der Rezeptoren und dadurch zur Aktivierung der Caspase-Kaskade über die Caspase 8 und eventuell auch der Caspase 2 (KISCHKEL et al., 1995; MUZIO et al., 1996). Diese führt schließlich zur Auslösung der Apoptose-typischen zellulären Veränderungen, wie z.B. der DNA-Fragmentierung. TNF-induzierte Apoptose kann nach völligem Block der Proteinsynthese ablaufen, was als Zeichen dafür gewertet wird, daß jede Zelle eine bereits existierende Apoptose-Maschinerie besitzt (HAHN et al., 1985). Auch hier existieren im Signalweg Gegenmechanismen zur Protektion vor Apoptose; sie sind jedoch abhängig von erneuter Proteinsynthese. Diskutiert wird hier eine Induktion der Bildung von Schutzproteinen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (HOLTMANN und WALLACH, 1987). Daher führt die Inhibierung der Proteinsynthese zu einer Steigerung der Apoptoserate. In dieser Arbeit wurde zur Inhibierung der Proteinsynthese Cycloheximid verwendet (POLUNOVSKY et al., 1994). Cycloheximid selbst löst ebenfalls Apoptose aus. Hier wird diskutiert, daß die Zelle nur durch konstante Bildung von kurzlebigen Schutzproteinen mit hoher Syntheserate vor den konstitutiv exprimierten Todeseffektoren geschützt wird. Bei Übergewicht der proapoptotischen Effektormoleküle kommt es durch gehemmte Proteinsynthese zum Ablauf der apoptotischen Signalkaskade (GONG et al., 1993; WOODS und CHAPES, 1993). In der vorliegenden Arbeit kam es bereits nach 1 h Behandlung mit TNF- α /Cycloheximid zur Auslösung der Apoptose in HL60-Zellen, nach 6 h war ein Prozentsatz von 30% Zellen apoptotisch. Dies stimmt überein mit Berichten anderer Arbeitsgruppen (VOELKEL-JOHNSON et al., 1995 in C3hA-Zellen, BINDER et al., 1997 in MCF-7-Zellen). Der ebenfalls in dieser Arbeit verwendete Anti-APO/Fas-Antikörper zeigte eine weit geringere Ansprechbarkeit der Zellen. Hier kam es erst nach 12 h Inkubation zu einer zellulären Antwort, die als Apoptose nachweisbar war. Andere Autoren berichten von deutlicheren Ergebnissen (ENARI et al., 1995 zeigen eine deutliche Fragmentierung nach Inkubation von nur 60 min). Dies könnte zum einen an der Verwendung sensitiverer Zelllinien liegen, zum anderen an der geringeren biologischen Wirksamkeit des uns zur Verfügung stehenden Antikörpers.

Von den meisten Induktoren ist bekannt, daß sie ein Wirkungsmaximum in einer bestimmten Phase des Zellzyklus besitzen und daher nur dann synchron Apoptose induzieren, wenn sich alle Zellen der behandelten Kultur in gleichen Stadium des Zellzyklus befinden (EVAN et al., 1992). Von Topotecan ist eine Wirkungsspezifität in der S-Phase beschrieben (Produktmonographie). Diese könnte damit zusammenhängen, daß Topotecan seine Zytotoxizität nicht durch die eigentliche Interaktion mit der Topoisomerase I entfaltet, sondern durch das Aufeinandertreffen von kovalentem Komplex aus Enzym und Inhibitor und der sich fortbewegenden Replikationsgabel in der S-Phase (siehe auch Kapitel 1.1.2). Die dadurch entstehenden Protein-gebundenen Strangbrüche werden zwar nach Wegnahme des Inhibitors in der Regel wieder repariert (LOIKE und HORWITZ, 1976; LONG et al., 1984), dennoch resultiert daraus eine Apoptose-Induktion. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt.

Ausgehend von der S-Phase-abhängigen Zytotoxizität entstand im Rahmen der vorgelegten Arbeit die Idee, die Apoptoserate zu steigern, indem möglichst viele Zellen in die Phase des Zellzyklus gebracht

werden, in der sie auch für die Topotecan induzierte Apoptose empfindlich sind. Daher wurden Zellen durch Aphidicolin-Gabe am Übergang von der G1-Phase zur S-Phase geblockt und nach Entlassung aus dem Block sofort mit Topotecan behandelt, um dessen Wirkungsmaximum voll auszuschöpfen. Tatsächlich konnte auf diese Art und Weise eine um fast 50% erhöhte Apoptoserate induziert werden, die noch dazu den Vorteil hatte, die Zellen mehr oder weniger gleichzeitig zu induzieren. Dadurch befanden sich alle apoptotischen Zellen in etwa demselben Stadium des apoptotischen Prozesses. Dies ist für die Beobachtung der initialen Mechanismen der apoptotischen DNA-Fragmentierung von entscheidender Bedeutung und ein deutlicher Vorteil gegenüber dem nicht synchronisierten System, das neben einer per se geringeren Apoptoserate auch noch eine Mischung apoptotischer Zellen aller Stadien des apoptotischen Prozesses aufweist. Mit dem synchronisierten System war es hingegen möglich, die Kinetik der Spaltung in hochmolekulare DNA-Fragmente zeitlich von der Kinetik der Spaltung in niedermolekulare DNA-Fragmente zu trennen. Zu bedenken ist bei der Synchronisierung von HL60-Zellen allerdings, daß die Synchronisierung selbst ebenfalls Apoptose auslösen kann (GLYNN et al., 1992). Daher wurde die optimale Wirkungsbeziehung von Aphidicolin und HL60-Zellen überprüft. Bei möglichst hoher Synchronität des Zellzyklus sollte es zu einer möglichst geringen Auslösung an Apoptose kommen. Dies wurde mit einer Aphidicolin-Konzentration von 1,5 µM über 24 h erreicht. Vergleichbare Ergebnisse zeigt eine in der Zwischenzeit veröffentlichte Arbeit von MARTELLI et al. (1999).

Die wiederholte Gabe von Topotecan zu unsynchronisierten Zellen im Abstand von wenigen Stunden zeigte im Gegensatz zur Synchronisierung der Zellen keine Erhöhung der Apoptoserate, so daß davon auszugehen ist, daß zumindest in Zellkultur der Apoptose-limitierende Faktor nicht die Halbwertszeit des Topotecans ist (sie liegt bei 3 Stunden), sondern seine S-Phase-spezifische Wirkung.

Die Synchronisierung der Zellen brachte somit den entscheidenden Vorteil, neben der Erhöhung der Apoptoserate auch den gleichzeitigen Eintritt der Zellen in die Apoptose zu bewirken. Dadurch wurde eine wesentlich gezieltere und aussagekräftigere Untersuchung der apoptotischen DNA-Fragmentierung möglich.

Die Tatsache, daß in keinem der in der Literatur beschriebenen Systeme oder der in dieser Arbeit untersuchten Systeme Apoptose in allen Zellen induziert werden konnte, führte zu dem Versuch, die apoptotischen Zellen von den nicht apoptotischen Zellen abzutrennen. Ein Zellsortierer stand nicht zur Verfügung, so daß auf die Abtrennung der apoptotischen Zellen mittels Bindung an Annexin V-gekoppelte Magnetkügelchen und Separation durch eine Säule im magnetischen Feld zurückgegriffen werden mußte. Die Erkennung der apoptotischen Zellen basiert auf dem während der Apoptose zu beobachtenden Flip des Phosphatidylserins von der Innenseite der Plasmamembran auf deren Außenseite. Dort bindet es an die Annexin V-gekoppelten Magnetkügelchen. Nicht bekannt war allerdings die zeitliche Beziehung zwischen Phosphatidylserin-Flip und einsetzender DNA-Fragmentierung. In unserem System war die DNA in der als apoptotische Zellen isolierten Fraktion bereits kleiner als 50 kb, so daß die ersten Schritte der apoptotischen DNA-Fragmentierung schon abgelaufen waren. Da zudem die Auftrennung der Zellen selbst weitere Zeit in Anspruch nahm, in der die Zellen im apoptotischen Prozeß schnell voranschritten, war dieses System nicht für die vorgesehenen Untersuchungen geeignet. In der Zwischenzeit

veröffentlichten BACSO et al. (2000), daß die an Annexin-V bindenden apoptotischen Zellen bereits stark fragmentierte DNA aufweisen.

Eine weitere Möglichkeit, um die Vorgänge während der Apoptose im Einzelnen untersuchen zu können, ist die Untersuchung der DNA-Fragmentierung in „*in vitro*“-Systemen auf der Basis isolierter Kerne. Diese finden immer mehr Anwendung und zeigen gute Ergebnisse (LAZEBNIK et al., 1993; LAZEBNIK et al., 1994; LIU, X. et al., 1997; SAMEJIMA et al., 1998 u.a.). Durch die Identifizierung und Isolierung von Effektormolekülen ist es möglich, einzelne Aspekte der Signalkaskade genauer zu untersuchen. Einzelne Faktoren können inhibiert, mutiert oder im Überschuß zugegeben werden. Grundsätzlich basieren diese „*in vitro*“-Systeme auf der Isolierung von Kernen aus nicht apoptotischen Zellen und deren Inkubation mit Zytoplasma, das in irgendeiner Weise mit Apoptosefaktoren aktiviert oder verändert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden isolierte HL60-Zellkerne mit davon unabhängig isoliertem, unbehandeltem Zytoplasma inkubiert. Durch die Isolierung von Zytoplasma aus unbehandelten Zellen wurden sämtliche für die Apoptose wichtigen Faktoren wieder hinzugegeben – sowohl die antiapoptotischen, als auch die proapoptotischen. Es ist bekannt, daß auch entkernte Zellen die Merkmale der Apoptose zeigen (JACOBSON et al., 1994; SCHULZE-OSTHOFF et al., 1994). Dies bedeutet, daß die Apoptose unabhängig vom Zellkern ablaufen kann, da alle wichtigen Signalmoleküle im Zytoplasma vorzuliegen scheinen. Inwieweit das auch für die DNA-Fragmentierung zuständigen DNasen gilt, ist noch nicht geklärt. CAD/ICAD ist hauptsächlich im Kern zu finden (SAMEJIMA und EARNSHAW, 1998), während AIF (apoptosis inducing factor) eine zunächst mitochondriale Lokalisierung zeigt (SUSIN et al., 1999). Über die Translokation der für die DNA-Fragmentierung benötigten Faktoren in den Zellkern ist noch nicht viel bekannt. Auch hier werden in den Molekülen Kernlokalisationssequenzen vermutet (YASUHARA et al., 1997; NAGATA, 2000). Sowohl inaktive Vorläuferformen als auch aktive Caspasen sind im Kern zu finden (MARTINS et al., 1997a, 1997b), wobei Caspase 3 hauptsächlich im Zytoplasma vorzuliegen scheint (CHANDLER et al., 1998). Die apoptotische Signalkaskade wurde gestartet durch Zugabe der in Hefe rekombinant exprimierten Caspase 3 (vgl. Abbildung 20). Damit wird der Signalweg erst in einem recht späten Schritt aktiviert. Die Caspase-Kaskade ist umgangen, da Caspase 3 eines der Endprodukte der proteolytischen Kaskade darstellt (zusammengefaßt z.B. in FRASER und EVAN, 1996; NICHOLSON und THORNBERRY, 1997; SALVESEN und DIXIT, 1997; VILLA et al., 1997; CRYNS und YUAN, 1998). Inwieweit sie andere Caspasen retrograd aktivieren kann, ist nicht bekannt. Als Effektor-Caspase zeigt sie vielfältige Wirkungen. So wird sie für die Degradation der Lamine (KAUFMANN, S.H., 1989; UCKER et al., 1992; LAZEBNIK et al., 1993), PARP (KAUFMANN, S.H., 1989; KAUFMANN et al., 1993), PKC δ / θ (EMOTO et al., 1995; DATTA et al., 1997), Gelsolin (KOTHAKOTA et al., 1997), Fodrin (MARTIN et al., 1995), Aktin (MASHIMA et al., 1995; KAYALAR et al., 1996), DNA-PK_{cs} (CASCIOLA-ROSEN et al., 1995; HAN, Z. et al., 1996), Topoisomerase II (SUGIMOTO et al., 1998) u.v.a. verantwortlich gemacht (zusammengestellt in CRYNS und YUAN, 1998; NICHOLSON, 1999). Ihre für die vorliegende Arbeit wichtigste Wirkung ist jedoch die Spaltung des mit CAD im inaktiven Komplex vorliegenden ICAD (Inhibitor of CAD, SAKAHIRA et al., 1998; WOLF et al., 1999). Dadurch wird CAD aktiviert und kann im Zellkern die DNA spalten (SAKAHIRA et al., 1998; ENARI et al., 1995). Auch ICAD

zeigt vielfältige Wirkungen. Inwieweit durch seine Spaltung auch andere DNasen aktiviert werden, ist nicht bekannt. Ebenso wenig ist geklärt, ob Caspase 3 ebenfalls andere DNasen direkt oder indirekt aktiviert (SAMEJIMA et al., 1998). Allerdings zeigen Experimente mit ICAD-defizienten Mäusen nach ZHANG, J. et al. (1999) keinerlei nukleäre Fragmentierung. Auch konnte gezeigt werden, daß transformierte Jurkat-Zellen, die ein Caspase-resistentes ICAD exprimieren, weder eine Spaltung in hoch- noch in niedermolekulare DNA-Fragmente aufweisen (SAKAHIRA et al., 1999) und ohne Spaltung von ICAD keine DNA-Fragmentierung auftritt (SABOL et al., 1998; TANG und KIDD, 1998). Dies impliziert, daß die Aktivierung anderer potentieller DNasen im Zusammenhang mit der Spaltung des ICAD stehen muß. Nach Aktivierung von CAD kommt es im verwendeten „*in vitro*“-System innerhalb weniger Minuten zum Abbau der gesamten DNA des Kerns (diese Arbeit und NAGATA, 2000). Es entstehen sowohl hochmolekulare als auch niedermolekulare DNA-Fragmente. Dies könnte bedeuten, daß (1) CAD auch für die hochmolekularen DNA-Fragmente verantwortlich ist, (2) eine andere DNase ebenfalls durch ICAD bzw. aus deren Aktion resultierende Substanzen aktiviert wird (z.B. AIF im Mitochondrien-Intermembranspalt) oder (3) Caspase 3 eine andere DNase aktiviert. In sehr späten Phasen der Apoptose kann in Zelllinien wie Jurkat (WOHRL und HACKER, 1999) oder JILdm (MCILROY et al., 1999) auch eine durch ICAD nicht mehr beeinflussbare DNA-Fragmentierung festgestellt werden, die auf die Aktion einer unabhängigen DNase zurückzuführen sein könnte (z.B. einer lysosomalen DNase II aus unspezifischer Proteolyse).

Ein zweiter „*in vitro*“-Ansatz in dieser Arbeit umfaßt die Aktivierung des apoptotischen Signalwegs in den isolierten Kernen durch Zugabe von Zytoplasma, das aus apoptotischen Zellen nach Induktion mit Topotecan gewonnen wurde (Kapitel 4.2.3.1). Durch die Aktivierung des apoptotischen Signalwegs wurden bereits alle zytoplasmatischen Prozesse der apoptotischen Signalkaskade in Gang gesetzt; d.h. die Caspase-Kaskade ist aktiviert, es existieren alle Caspasen in aktivierter Form, ebenso sollte CAD aktiviert sein, genauso wie andere bisher noch unbekannte Moleküle (DNasen?). Inwieweit schon eine vollständige Translokation von Caspase 3 bzw. CAD in den Kern stattgefunden hat, ist nicht zu sagen. Allerdings zeigt die Zugabe des apoptotischen Zytoplasmas zu den isolierten Kernen aus nicht apoptotischen Zellen keine solch starke Wirkung wie die Zugabe von rekombinant exprimierter Caspase 3. Zu erwarten war, daß durch die Einbeziehung aller apoptotischen Prozesse eine viel deutlichere und schnellere Aktivierung des Signalwegs eintritt. Tatsächlich ist dieser jedoch verzögert gegenüber dem Einsatz aufgereinigter Caspase 3. Dies könnte neben der Präparationsmethode auch daran liegen, daß die Effektormoleküle schon in die abgetrennten und nicht weiter verwerteten Zellkerne transloziert wurden (eine Zusammenstellung der Protein-Translokationsprozesse während der Apoptose findet sich in PORTER, 1999). Die Sensitivität des „*in vitro*“-Systems mit Caspase 3 als Induktor ist erstaunlich. Nach einer kurzen Latenzzeit von ca. 30 Minuten kommt es innerhalb weniger Minuten zu einem vollständigen Abbau der zellulären DNA. Dies deutet auf einen autokatalytischen Verstärkungsmechanismus hin.

Die beschriebene zellfreie „*in vitro*“-Methodik birgt zwei entscheidende Vorteile gegenüber der Induktion von Apoptose in ganzen Zellen: Zum einen zeigen 100% der Kerne die Merkmale der Apoptose (EARNSHAW, 1995). Damit fällt der Hintergrund nicht apoptotischer Zellen und nekrotischer Zellen weg.

Die Methode ist somit grundsätzlich sensitiver für die Untersuchung von bevorzugten Schnittstellen. Zum anderen findet eine gleichmäßige und gleichzeitige Induktion der DNA-Fragmentierung in den Zellkernen statt, so daß sich alle Zellkerne in demselben Stadium des DNA-Fragmentierungsprozesses befinden. Dies erlaubt eine genaue Untersuchung des kinetischen Verlaufs der Apoptose und insbesondere der DNA-Fragmentierung. Von Nachteil ist, daß schon geringe Änderungen der Aktivität der Caspase 3 den zeitlichen Verlauf der Fragmentierung durch den autokatalytischen Verstärkungsmechanismus gravierend verändert. Da sich die Aktivität der Caspase mit der Lagerungszeit verändert, muß bei jedem Ansatz die ihre Aktivität neu ermittelt werden. Es ist anzunehmen, daß es erst einem gewissen Schwellenwert an aktivierter Caspase bedarf, um die DNA-Fragmentierung in Gang zu setzen. Grundsätzlich sollte mit wenigen Caspase-Molekülen der Signalweg ausgelöst werden können, es kommt dann jedoch zu einer enorm verlängerten Latenzzeit, in der die Caspase 3 offensichtlich weitere Procaspase 3-Moleküle aus dem zugegebenen Zytoplasma nicht apoptotischer Zellen aktiviert. Da die DNA-Fragmentierung - einmal ausgelöst - sehr schnell voranschreitet, muß das schmale Zeitfenster der DNA-Fragmentierung genau getroffen werden, was eine weitere Problematik darstellt. Samejima et al. (1998) diskutieren, daß zusätzlich die Caspasen von ihren Zielsubstanzen wie CAD räumlich getrennt sein könnten, so daß erst deren Translokation zum Übertritt in die „execution phase“ führt (siehe auch MARTINS et al., 1997b; ZHIVOTOVSKY et al., 1999). Noch schwieriger ist die Situation bei Verwendung von Zytoplasma aus apoptotischen Zellen, da dessen Caspase 3-Aktivität kaum zu bestimmen ist. Dies scheint auch an der Präparation des Zytoplasmas zu liegen und an der Haltbarkeit der Effektmoleküle während der Präparation, obwohl andere Autoren diese Problematik nicht beschreiben (s. obige Zitate).

Natürlich stellen die „*in vitro*-Versuche“ mit isolierten Kernen ein artifizielles System dar. Allerdings sind auch die Versuche in den Gesamtzellen in Kultur gewissermaßen artifiziiell, da der Gewebeverband und dessen Einflußnahme auf die Zellen fehlt. Mit dieser Einschränkung ist es durchaus sinnvoll, die Prozesse der Apoptose in den vereinfachten Systemen mit Zelllinien in Kultur und in „*in vitro*“-Ansätzen mit isolierten Zellkernen zu untersuchen. Von Vorteil ist insbesondere die mögliche Trennung von Vorgängen, die im Zytoplasma ablaufen und Vorgängen, die im Kern stattfinden (LAZEBNIK et al., 1993; LAZEBNIK et al., 1994). Außerdem ist die Möglichkeit gegeben, verschiedene Phasen der Apoptose zu untersuchen (SAMEJIMA et al., 1998), bzw. - wie bereits erwähnt - durch Zugabe oder Wegnahme bestimmter Faktoren deren Einfluß auf den Signalweg zu untersuchen (z.B. LIU, X. et al., 1998; SABOL et al., 1998). Wie der Vergleich zeigt, sind die Ergebnisse aus den Versuchen mit Zellen in Kultur und isolierten Zellkernen durchaus miteinander in Einklang zu bringen. So finden sich deutliche Parallelen sowohl in den morphologischen Veränderung der isolierten, Apoptose-induzierten Kerne als auch den biochemischen Veränderungen in den Kernen (ausführlich diskutiert in LAZEBNIK et al., 1993).

Ein Unterschied zwischen den Versuchen mit isolierten Zellkernen und Zellen in Kultur konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch festgestellt werden: Während in apoptotischen Zellen die DNA-Fragmentierung hochmolekulare Fragmente der Größe 2,2 Mb bis 50 kb zeigt, sind im „*in vitro*“-Ansatz mit isolierten Kernen und Caspase 3 als „Apoptose-Vermittler“ insbesondere 500 bis 50 kb große Fragmente angereichert. Dieses Phänomen läßt sich auch in anderen Publikationen verfolgen (FILIPSKI et

al., 1990; WALKER, P. R. und SIKORSKA, 1994), obwohl dieser Unterschied in keiner der Publikationen diskutiert wird. Eine denkbare Ursache hierfür könnte in der besseren Zugänglichkeit der Kerne für Faktoren aus dem Zytoplasma liegen, wie sie durch eine teilweise Schädigung der Kernmembran bei der Präparation entstehen könnte. Zum anderen könnte das fehlende Zytoskelett die Weitergabe apoptotischer Signale beeinflussen. Durch die Trennung von Kernen und Zytoplasma könnte jedoch auch die Veränderung der Kernmorphologie in Phase II der Apoptose (siehe 4.3.3) gestört sein, was durch die externe Zugabe von Zytoplasmaextrakt nicht reversibel wäre.

Insgesamt birgt der „*in vitro*“-Ansatz mit isolierten Kernen entscheidende Vorteile für die Bestätigung der Ergebnisse der „*in vivo*“- Versuche, da er neben der hohen Synchronität – wie sie für diese Arbeit wichtig war – auch die Analyse der Wirkung einzelner Apoptosefaktoren ermöglichen und deren Untersuchung in Bezug auf den Signalweg wesentlich vereinfachen kann.

5.2 DIE KINETIK DER SPALTUNG IN HOCH- UND NIEDERMOLEKULARE DNA-FRAGMENTE

Nachdem bereits 1980 die Entstehung der niedermolekularen DNA-Fragmente in Form der DNA-Leiter als das Erkennungszeichen der Apoptose gewertet wurde (WYLLIE et al., 1980), bedurfte es erst der Entwicklung neuer Elektrophoresetechniken (CARLE et al., 1986; SMITH, C. L. und CANTOR, 1987), um auch die hochmolekularen DNA-Fragmente zu entdecken (WALKER, P. R. et al., 1991; ROY et al., 1992; BROWN et al., 1993). Durch die Möglichkeit der Pulsfeldgelelektrophorese, Fragmente bis zu einer Größe von mehreren Megabasen aufzutrennen (HELLER und POHL, 1989), konnte gezeigt werden, daß zusätzlich zu den oligonukleosomalen Fragmenten auch Fragmente der Größenordnung 300 bis 50 kb entstehen (OBERHAMMER et al., 1993b; CAIN et al., 1994; COHEN et al., 1994; SUN, X. M. und COHEN, 1994; SUN, X. M. et al., 1994b; ZHIVOTOVSKY et al., 1994a; ZHIVOTOVSKY et al., 1994b). Damit wurde zudem klar, daß das Fehlen der DNA-Leiter nicht hinreichend ist, um eine Zelle als nicht-apoptotisch zu erkennen. Vielmehr ist die Tatsache, daß hochmolekulare DNA-Fragmente entstehen, zum Zeichen für die Apoptose geworden, da diese im Gegensatz zu den niedermolekularen DNA-Fragmenten in allen Zellen während der Apoptose auftritt (COHEN et al., 1992; OBERHAMMER et al., 1993b; BICKNELL et al., 1994; SUN, X. M. und COHEN, 1994). Die Entstehung von Fragmenten der Größe um 300 kb wurde zunächst als Resultat der Interaktion der Induktoren mit Topoisomerase II-Molekülen an spezifischen Stellen des Chromatins gewertet (FILIPSKI et al., 1990, u.a.), während Fragmente der Größe 50 kb und die DNA-Leiter als Folge der Aktivierung einer Endonuklease während der Apoptose diskutiert wurden (OBERHAMMER et al., 1993b). Beere et al. (1995) konnten zeigen, daß tatsächlich vorübergehend entstehende ≥ 600 kb große DNA-Fragmente durch die Interaktion der Induktoren mit Topoisomerase II entstehen; die Strangbrüche sind jedoch reversibel (FILIPSKI et al., 1990; WALKER, P. R. et al., 1991). Allerdings mehren sich die Berichte, nach denen auch in Zellen, in denen Apoptose über andere Mechanismen (wie UV-Strahlung oder H_2O_2 , COHEN et al., 1992; BROWN et al., 1993; OBERHAMMER et al., 1993b; SUN, X. M. und COHEN, 1994) ausgelöst wurde, schon nach 5 min Fragmente der Größe 600 bis 750 kb entstehen. Inwieweit sie unter Umständen

ebenfalls durch Topoisomerase II-abhängige Mechanismen verursacht sein könnten, ist nicht bekannt. RUSNAK et al. (1996) vermuten jedoch, daß auch diese Fragmente (≥ 1 Mb und 450 bis 600 kb) Produkte der Aktivität einer Endonuklease sind. Dagegen beruhen die 300 bis 50 kb großen Fragmente bereits eindeutig auf Apoptose-Induktion. Diese Fragmentierung ist nicht reversibel und die Fragmente sind nicht vorübergehend proteingebunden. Inwieweit sie Rückschlüsse auf die Organisation des Chromatins zulassen, wird in Kapitel 5.3 diskutiert. Mit der Entwicklung noch höher auflösender Pulsfeldgelelektrophoresetechniken wie CHEF (Contour Clamped Homogenous Electric Field Electrophoresis) konnte gezeigt werden, daß die DNA-Fragmentierung nicht nur auf die erwähnten Größenordnungen beschränkt ist, sondern DNA-Fragmente durchgängig von ≥ 2 Mb bis 100 kb entstehen, mit jeweils einem Maximum bei 2,2 Mb und 50 kb (GHIBELLI et al., 1995; SESTILI et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte dies auch für die Auftrennung durch ROFAGE (Rotating Field Agarose Gel Electrophoresis) dokumentiert werden. Dies weist darauf hin, daß die DNA-Fragmentierung möglicherweise einem sehr gleichmäßigen Schema folgen könnte. In der hier vorgelegten Untersuchung apoptotischer Zellen konnte keine bevorzugte Bildung von 300 kb großen Fragmenten beobachtet werden. Berichte, die eine bevorzugte Spaltung in 300 bis 50 kb große Fragmente beschreiben, beruhen im wesentlichen auf der Auftrennung durch FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis), ebenfalls einer Sonderform der Pulsfeldgelelektrophorese (HELLER und POHL, 1989; FILIPSKI et al., 1990). Berichten Sestilis zufolge könnte sie im Bereich von 300 kb eine artifizielle Akkumulation von Fragmenten bewirken (SESTILI et al., 1996).

Die Tatsache, daß während der Apoptose zwei verschiedene Klassen von Fragmentgrößen beobachtet werden, wirft die Frage auf, inwieweit diese voneinander abhängig oder unabhängig generiert werden. Der zeitliche Ablauf zeigt, daß die hochmolekularen DNA-Fragmente vor den niedermolekularen DNA-Fragmenten entstehen (OBERHAMMER et al., 1993b und diese Arbeit). Während OBERHAMMER et al. (1993b) u.a. aufgrund der verwendeten Auftrennungsmethode jedoch nur Fragmente der Größenordnung 300 bis 50 kb in die Auswertung einbeziehen konnten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Entstehung von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe bis 2,2 Mb in die kinetische Betrachtung aufgenommen. Darüber hinaus wurde die zeitliche Abfolge der DNA-Fragmentierung auch in den optimierten Ansätzen der Apoptose-Induktion durch die Verwendung von synchronisierten Zellen und die DNA-Fragmentierung im „*in vitro*“-Ansatz mit isolierten Kernen untersucht. Dies ermöglichte eine Eingrenzung des Zeitintervalls zwischen dem Einsetzen der Spaltung in hochmolekulare DNA-Fragmente und der Entstehung von niedermolekularen Fragmenten in den untersuchten Zelllinien auf 30 min.

Das Auftreten hochmolekularer DNA-Fragmente ist auch dann zu beobachten, wenn keine niedermolekulare DNA-Fragmentierung feststellbar ist (z.B. bei Fehlen von Caspase 3 in MCF7-Zellen oder in MOLT-4-Zellen, COHEN et al., 1992; OBERHAMMER et al., 1993a; BEERE et al., 1995). Dies legt nahe, daß unterschiedliche Prozesse für die Entstehung von hoch- und niedermolekularen Fragmenten verantwortlich sein könnten (PANDEY et al., 1994; WALKER, P. R. und SIKORSKA, 1994). Z.B. könnten verschiedene Endonukleasen für die Fragmentierung verantwortlich sein. Die bisher für die DNA-Fragmentierung vorgeschlagenen Endonukleasen wurden von ROBERTSON et al. (2000) aktuell

zusammengestellt und diskutiert. Insbesondere wurde eine Abhängigkeit der Endonukleasen von verschiedenen Ionen wie Kalzium oder Magnesium gefunden. Daneben konnte eine Abhängigkeit der internukleosomalen, nicht jedoch der DNA-Spaltung in hochmolekulare Fragmente von dem Efflux von Chlorid-Ionen aus der Zelle beobachtet werden (RASOLA et al., 1999). Die hier vorgelegten „*in vitro*“-Versuche mit isolierten Zellkernen, Zytoplasma und Caspase 3 zeigen jedoch, daß zumindest „*in vitro*“ die Aktivierung von Effektormolekülen wie CAD/ICAD durch Caspase 3 ausreicht, um die gesamte chromosomale DNA einer Zelle innerhalb weniger Minuten abzubauen. Dies spricht gegen eine völlige Unabhängigkeit der Spaltung in hoch- und niedermolekulare DNA-Fragmente und für die These, daß für die Entstehung der verschiedenen Fragmentgrößen allein die Zugänglichkeit der Chromatinbereiche verantwortlich ist (NAGATA, 2000). Es existiert auch die Hypothese, daß die Bildung der Fragmente, die größer oder gleich 2 Mb sind, mit der Veränderung der äußeren Kerngestalt in Zusammenhang stehen könnten (GHIBELLI et al., 1995; GHIBELLI et al., 1998) und damit nicht auf die direkte Aktivität einer DNase zurückzuführen sind. Dies wird in der vorliegenden Arbeit durch die Beobachtung angedeutet, daß in den „*in vitro*“-Ansätzen in isolierten Kernen im Gegensatz zur Induktion von Apoptose „*in vivo*“ in Zelllinien Fragmente erst ab einer Größe von 500 kb und kleiner zu beobachten sind. Diese könnten nach dem Modell von Ghibelli auf ein Fehlen der Interaktion zwischen Kern und Zytoplasma im „*in vitro*“-Versuch zurückzuführen sein, die für die Spaltung in Fragmente größer/gleich 2 Mb verantwortlich sein könnte. Auf welchem Mechanismus diese Veränderungen der Kerngestalt beruhen könnten, ist nicht bekannt. Eine veränderte Zugänglichkeit der isolierten Kerne für zytoplasmatische Faktoren könnte – zumindest hypothetisch – ebenso wie eine veränderte ionische Umgebung (der pH des Zytoplasmas sinkt) die weitere Fragmentbildung beeinflussen. Denkbar sind auch Störungen in der DNA-Reparatur oder Replikation, durch die Einzelstrangbrüche entstehen könnten, die durch die Kondensation des Kerns zur Fragmentierung der DNA beitragen könnten.

Durch die kinetische Untersuchung der Entstehung der einzelnen Fragmentgrößen und deren Koordination mit den morphologischen Veränderungen konnten in der vorgelegten Arbeit erstmals die einzelnen Phasen der Apoptose mit der DNA-Fragmentierung korreliert werden. So zeigt sich, daß „*in vivo*“ die Abrundung des Kerns (Phase II) mit dem Auftreten der 2,2 Mb großen Fragmente zusammenfällt. Die Chromatinkondensation (Phase III) tritt im zeitlichen Zusammenhang mit der Fragmentierung in hochmolekulare DNA-Fragmente auf und die Fragmentierung des Kerns (Phase IV) erscheint mit dem Auftreten der DNA-Leiter. Damit korrelieren die beobachteten Veränderungen des Kerns direkt mit dem Phasenmodell nach GHIBELLI et al. (1995).

Die Untersuchung der Kinetik der apoptotischen DNA-Fragmentierung in dieser Arbeit zeigt auch, daß die DNA-Fragmentierung unerwartet schnell abläuft. Innerhalb weniger Minuten wird die DNA zunächst in Fragmente einer Größe von 2,2 Mb bis 50 kb gespalten und geht nach einer kurzfristigen Akkumulation im Bereich 20 bis 50 kb in die Generierung der internukleosomalen DNA-Fragmente über. Die entstehenden Mononukleosomen akkumulieren jedoch nicht während der fortschreitenden Apoptose, sondern werden – anders als bei Mikrokoccus-Nuklease-Verdauung – vermutlich weiter abgebaut, so daß jeweils nur ein „steady state“ zu beobachten ist. Der schnelle Verlauf der DNA-Fragmentierung wird von

anderen Autoren beschrieben (SAMEJIMA et al., 1998). Über die Natur des Abbaus der entstandenen Mononukleosomen ist jedoch nichts bekannt. Hier könnte ein unspezifischer Abbau durch andere DNasen wie z.B. durch die lysosomale DNase II vorliegen, da bekannt ist, daß die Zellen sich selbst verdauen (Autophagie) und die Lysosomen zerstört werden, wenn keine im Gewebe normalerweise folgende Phagozytose durch Nachbarzellen stattfindet (OHSAWA et al., 1998; NEUZIL et al., 1999). Die Schnelligkeit des Abbaus der DNA führte zur Vermutung, daß die ausführende(n) DNase(n) bereits an den wichtigen Stellen des Chromatins – wie z.B. den MARs - in inaktiver Form vorliegen könnte(n) und dann aktiviert werden (FALCIERI et al., 1994a; FALCIERI et al., 1994b; WALKER, P. R. und SIKORSKA, 1997). Bisher gibt es dafür keine Anhaltspunkte. In Pflanzenzellen konnte jedoch eine Endonuklease identifiziert werden, die an die Kernmatrix gebunden ist, MARs erkennt und dort Einzelstrangbrüche in die DNA einführt (SZOPA und ADAMIEC, 1993; RZEPECKI, 1994). Die Untersuchungen der Proteolyse während der Apoptose weisen jedoch darauf hin, daß durch die Spaltung struktureller Proteine wie Lamine, NuMA, etc. erst den Endonukleasen der Zugang zur DNA ermöglicht werden könnte (WEAVER et al., 1996; MARTELLI et al., 1997). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte am Beispiel der PARP-Spaltung in HL60-Zellen gezeigt werden, daß die DNA-Fragmentierung ein im Vergleich zur Proteolyse später auftretender Prozeß ist. In diesem Zusammenhang konnten RAO et al. (1996) nachweisen, daß in Zellen, die ein nicht spaltbares Lamin exprimieren, die DNA-Fragmentierung nicht fortschreiten konnte.

Während insgesamt die Tatsache inzwischen allgemein akzeptiert wird, daß die hochmolekularen DNA-Fragmente vor den niedermolekularen entstehen, sind die Berichte über die beteiligten Endonukleasen - insbesondere die Frage, ob daran eine oder mehrere Endonukleasen beteiligt sind – weiterhin sehr heterogen. Klarheit werden hier sicherlich erst Experimente bringen, die auf weiteren knockout-Experimenten und Inhibitor-Studien beruhen und die dort gefundenen Ergebnisse nicht nur in Beziehung setzen zur niedermolekularen DNA-Fragmentierung, sondern auch zur bisher nicht ausreichend untersuchten hochmolekularen DNA-Fragmentierung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten an, daß in den untersuchten Systemen die Anwesenheit von Caspase 3 und dadurch aktiver CAD ausreichend ist, um die DNA einer Zelle in kleine Einheiten zu spalten. Durch das in der vorliegenden Arbeit verwendete „*in vitro*“-Versuchssystem ist nun auch eine Untersuchung einzelner Faktoren, wie z.B. die Aktion der aktiven CAD alleine oder von AIF in Bezug auf die hoch- und niedermolekulare DNA-Fragment-Entstehung möglich.

5.3 DIE SUCHE NACH BEVORZUGTEN APOPTOTISCHEN SCHNITTSTELLEN

Im MLL-Gen auf Chromosom 11q23 identifizierten STANULLA et al. (1997) eine bevorzugte Schnittstelle innerhalb einer chromosomalen Bruchpunktregion von 8,3 kb, die in den initialen Stadien der Apoptose auftritt. In derselben Region wurden schon zuvor Matrixanheftungsregionen identifiziert (BROEKER et al., 1996; STRISSEL et al., 1998). Daraus stellten die Autoren die Hypothese auf, daß die DNA-Fragmentierung während der Apoptose über bevorzugte Schnittstellen verläuft und daß diese über bevorzugte Spaltung an den Matrixanheftungsregionen in Zusammenhang mit der Domänenstruktur des Chromatins stehen

könnten. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit in einer Modellregion nach bevorzugten Schnittstellen und Matrixanheftungsregionen gesucht. Da während der apoptotischen DNA-Fragmentierung Abbaubanden im Bereich von ca. 50 kb entstehen, erscheint es sinnvoll, als Untersuchungsbereich einen Abschnitt im Genom zu wählen, der über mehrere 100 kb im Detail bekannt ist. Der Histongencluster wurde als Modellregion gewählt, da er durch Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits sehr genau untersucht ist (ALBIG et al., 1997). Zudem ist er groß genug, um aller Wahrscheinlichkeit nach mindestens eine apoptotische Schnittstelle zu enthalten. Im Histongencluster wurde jedoch keine bevorzugte Schnittstelle gefunden – weder in den einfachen, unsynchronisierten Systemen aus verschiedenen Zelllinien in Kombination mit verschiedenen Induktoren, noch in den optimierten Systemen mit synchronisierten Zellen und in den zellfreien Systemen. Um die Methode zur Suche nach bevorzugten Schnittstellen bei Apoptose zu überprüfen, wurden Kontrollversuche durchgeführt, die auf einer bereits identifizierten apoptotischen Schnittstelle in der Bruchpunktregion des MLL-Gens basierten (STANULLA et al., 1997). Dabei wurde festgestellt, daß der Nachweis dieser Spaltung von der verwendeten Zelllinie abhängig ist. In HL60-Zellen und Jurkat-Zellen fand keine Spaltung statt (siehe auch APLAN et al., 1996; STRISSEL et al., 1998), während in der Zelllinie CEM-CCRF, die auch von STANULLA et al. (1997) verwendet worden war, eine Spaltung zu beobachten war. Die Autoren führen Unterschiede in der Nachweisbarkeit der Schnittstellen auf die unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Zelllinien gegenüber den verschiedenen Apoptosestimuli zurück. Diese Erklärung kann jedoch für die hier untersuchten Systeme aus Zelllinie und Induktor nicht zutreffen, da die induzierte Rate an apoptotischen Zellen in HL60-Zellen jeweils deutlich höher war als in CEM-Zellen. Daher ist davon auszugehen, daß die bevorzugte Schnittstelle im MLL-Gen einen Sonderfall darstellt, der nur in bestimmten Kombinationen aus Zelllinie und Apoptose-Induktor induzierbar ist.

Wurde in dem Ansatz mit CEM-Zellen und Etoposid als Apoptose-Induktor nach bevorzugten Schnittstellen im Histongencluster gesucht, so zeigte sich keine Schnittstelle im Histongencluster, obwohl im Kontrollversuch der Bruchpunkt im MLL-Gen nachweisbar war. Dies könnte daran liegen, daß die Bruchpunktregion im MLL-Gen einen sehr fragilen Bereich im Genom darstellt, da dort Chromosomen-Translokationen nach Behandlung von Leukämien mit Epipodophylotoxinen beobachtet werden können (GILL-SUPER, 1993), während von der Region des Histongenclusters keine Chromosomen-Translokationen bekannt sind. Jedoch zeigen die weiteren bisher auf bevorzugte apoptotische Schnittstellen untersuchten Regionen, in denen Translokationen auftreten (SCL, ENL, AF-6, TCRB, TCRG, TCRD) keine bevorzugten Schnittstellen (APLAN et al., 1996). Auch die in dieser Arbeit untersuchten Bereiche des Keratingens und der Aktogene zeigten keine bevorzugten Schnittstellen während der apoptotischen DNA-Fragmentierung. Zudem sollte in Betracht gezogen werden, daß die wenigen bisher identifizierten bevorzugten Schnittstellen während der Apoptose bis auf sehr wenige Ausnahmen nur in Zelllinien gefunden wurden, in denen der gesuchte Bereich amplifiziert war (z.B. für *c-Myc*, POMMIER et al., 1992). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß der Nachweis einzelner Schnittstellen in einer single-copy-Region aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze nicht möglich ist und durch die Amplifikation der betreffenden Gene sich die Spaltstellen mit der Methode der indirekten Endmarkierung in der Southern-Hybridisierung leichter

nachweisen lassen. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß durch die Amplifikation der untersuchten Bereiche dort die Chromatinstruktur verändert ist und diese einen positiven Einfluß auf die Spaltung während der Apoptose ausübt.

Daß im Histongencluster keine bevorzugte Schnittstelle gefunden wurde, kann in unterschiedlicher Weise gedeutet werden. Zum einen ist nicht bekannt, wieviel Prozent des Genoms überhaupt in hochmolekulare DNA-Fragmente geschnitten werden. Es existieren Schätzungen, nach denen nur 10% der DNA in nukleosomale Fragmente geschnitten wird (VODENICHAROV et al., 1996). Was mit dem Rest der DNA geschieht, wurde allerdings weder untersucht noch diskutiert. In Anbetracht der Tatsache, daß die Zellen im Gewebe bereits in einem frühen Stadium der Apoptose phagozytiert werden und große DNA-Fragmente für die aufnehmende Zelle ein Gefährdungspotential in Form möglicher Rekombinationsereignisse darstellen, erscheint die These, daß der nicht nukleosomal geschnittene Teil der DNA keinen Abbau erfährt, unwahrscheinlich. In den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen war eine Abschätzung des Anteils der DNA, der in nukleosomale Fragmente geschnitten wird, nicht möglich. Im „*in vitro*“-Ansatz mit isolierten Kernen wird jedoch deutlich, daß die gesamte chromosomale DNA bis auf eine Größe kleiner als 50 kb fragmentiert wird. Für die in Geweben erfolgende Phagozytose gilt zudem, daß auch die aufnehmende Zelle unter Umständen am weiteren Abbau der DNA beteiligt sein kann (z.B. über lysosomale Enzyme, McILROY et al., 2000).

Der Histongencluster könnte auch ein bei der initialen DNA-Fragmentierung während der Apoptose ausgesparter Bereich sein und erst im weiteren Verlauf der DNA-Fragmentierung mehr oder weniger zufällig geschnitten werden. In den durchgeführten Versuchen konnte ein Abbau der 160 kb großen *MluI*-Fragments beobachtet werden. Die Aussparung von der initialen Fragmentierung könnte z.B. darauf zurückzuführen sein, daß die initiale DNA-Fragmentierung - wie bereits von anderen postuliert - bevorzugt an den Matrixanheftungsregionen einsetzt (BORTNER, OLDENBURG AND CIDLOWSKI, 1995; OBERHAMMER et al., 1993b) und im Histongencluster keine solche MAR enthalten ist. Aufgrund seiner Größe (300 kb) wäre dies zwar atypisch (JACKSON et al., 1990; RAZIN et al., 1995), jedoch nicht auszuschließen. Die Suche nach MARs im Histongencluster war daher ein weiterer Ansatz zur Aufklärung der apoptotischen DNA-Fragmentierung. Dieser sollte darüber hinaus Aufschluß über die chromosomale Organisation des Clusters geben.

5.4 DIE SUCHE NACH MATRIXANHEFTUNGSREGIONEN

Chromatin-Domänen sind dadurch definiert, daß die DNA in variablen Abständen von 50-300 kb an die Kernmatrix angeheftet ist (FILIPSKI et al., 1990). Diese Anheftungsstellen werden als Matrixanheftungsregionen, kurz MARs, bezeichnet (MIRKOVITCH et al., 1984; GASSER und LAEMMLI, 1986). Durch die Anheftung bilden sich sogenannte DNA-Schleifen aus, die als Domänen einer gemeinsamen Regulation unterliegen könnten (LAEMMLI et al., 1992; RAZIN et al., 1993). Würde die/eine der apoptotische(n) Endonuklease(n) gezielt die DNA an den Matrixanheftungsregionen spalten, so könnten

die Schnittstellen während der Apoptose indirekt Hinweise auf die Domänenstruktur des untersuchten Chromatinbereiches geben.

Mit Entwicklung der Pulsfeldgelelektrophorese, die eine Auftrennung von hochmolekularen DNA-Fragmenten ermöglicht, wurde das Modell der Chromatindomänenstruktur, wie es von Mirkovitch, Gasser und Laemmli postuliert und untersucht wurde, einer neuen Analyseverfahren zugänglich. Durch den Einsatz von Topoisomerase-Hemmstoffen und durch die Aktivierung von endogenen Nukleasen konnten FILIPSKI et al. (1990) zeigen, daß der Abbau der DNA über eine Zwischenstufe erfolgt, nämlich über die Freisetzung der DNA-Domänen durch Spaltung an ihren Matrixanheftungsregionen. Daraus entwickelte sich eine neue Technologie zur „*in vivo*“-Identifizierung von Matrixanheftungsstellen (RAZIN et al., 1993; GROMOVA et al., 1995a; IAROVAIA, O. et al., 1996; FAJKUS et al., 1998). Sie wird auch als „Topoisomerase II mediated DNA loop excision protocol“ (Methode zur Topoisomerase II-vermittelten Isolierung von DNA-Schleifen) bezeichnet. Die Topoisomerase II ist eine der Hauptkomponenten der sehr komplex zusammengesetzten und weitgehend nicht erforschten Kernmatrix (EARNSHAW und HECK, 1985; GASSER und LAEMMLI, 1986; KAUFMANN und SHAPER, 1991). Die Topoisomerase II kommt auch im Nukleoplasma in löslicher Form vor, allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß (BERRIOS et al., 1985; EARNSHAW et al., 1985.). Somit lag die Annahme nahe, daß die Topoisomerase II eine Rolle in der Vermittlung zwischen der Anheftung von MAR-Elementen in der DNA und der Kernmatrix spielen könnte (COCKERILL und GARRARD, 1986; GASSER und LAEMMLI, 1986; ADACHI et al., 1989). Die im Kernplasma vorliegende, lösliche Topoisomerase II wird bei dieser Art der Extraktion mit entfernt. Es bleibt nur die in der Kernmatrix gebundene Topoisomerase II zurück (IAROVAIA, O. et al., 1996).

Durch Inhibierung der gebundenen Topoisomerase II und Denaturierung des Enzyms kommt es zur Entstehung von DNA-Fragmenten in der Größe der DNA-Schleifen, die anschließend durch Pulsfeldgelelektrophorese und indirekte Endmarkierung analysiert werden können. Dadurch konnten Spaltstellen der Topoisomerase II sowohl in Versuchen auf Grundlage ganzer Zellen als auch in vorher isolierten Kernen identifiziert werden (CHEN, G. L. et al., 1984; UDVARDY et al., 1986). Durch ihre Bindung an bestimmte Sequenzen kann die in der Kernmatrix gebundene Topoisomerase II in ihrer *in vivo*-Umgebung spalten. Dies ist um so wichtiger, da gezeigt wurde, daß die Spaltstellen der Topoisomerase II *in vivo* von der Chromatinstruktur abhängig sind (SAITOH und LAEMMLI, 1994). Aus dieser Art von Versuchen ging zusätzlich hervor, daß die in der Kernmatrix lokalisierte Topoisomerase II offensichtlich die DNA nur an Stellen in unmittelbarer Nähe von MARs schneidet und nicht an jeder Topoisomerase II-Konsensus-Sequenz (RAZIN et al., 1993; MIASSOD et al., 1997).

Der prinzipielle Ansatz der Methode des beschriebenen „Topoisomerase II mediated loop excision protocols“ (RAZIN et al., 1993) wurde in dieser Arbeit in mehreren Variationen auf die Region des Histongenclusters übertragen. Im Histongencluster konnte jedoch keine MAR identifiziert werden. Wenn auch die Größe des Histongenclusters mit 300 kb impliziert, daß hier - von einer durchschnittlichen DNA-Schleifen-Größe von 50 bis 300 kb ausgehend - eine MAR enthalten sein müßte, steht dieses Ergebnis dennoch nicht im Widerspruch zu anderen Veröffentlichungen. So wurden bereits Domänengrößen von bis zu 660 kb gefunden (MULLENDERS et al., 1983). Zudem mehren sich die Berichte von sog. „supra loop

chromatin", das DNA-Schleifen in einer Größe von 0,5 bis 1,3 Mb aufweist (KHODAREV et al., 1997). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von BEERE et al. (1995), daß im Rahmen der Verwendung von Topoisomerase-Hemmern zur Auslösung von Apoptose in den Zellen transiente DNA-Fragmente von ≥ 600 kb entstehen, die auf die direkte Aktion der Topoisomerasen an der DNA zurückzuführen sind. Dies könnte einen Hinweis darauf darstellen, daß nur bestimmte Regionen und eventuell nur bestimmte MARs für die Interaktion der Topoisomerasen mit den Inhibitormolekülen zugänglich sind oder tatsächlich auch eine gewisse Anzahl von Domänen dieser Größenordnung existiert. Für den Bereich des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes MHC auf Chromosom 6 (in Nachbarschaft des Histongenclusters) wurde durch Chromosomen-Painting und *in situ*-Hybridisierung einzelner Genbereiche gezeigt, daß dort bis zu mehrere Megabasen große Chromatinschleifen existieren, die bis an die Oberfläche des Chromosoms reichen (VOLPI et al., 2000). Die Größe der Schleifen scheint in Beziehung zur Zahl der aktiven Gene der Region zu stehen (je mehr aktive Gene, desto größer und näher am Rand des Chromosoms in externalen Loops). Damit ist es durchaus möglich, daß auch der Histongencluster mit seinen vielen aktiven Genen als sehr große DNA-Schleife organisiert ist. Es ist zu erwähnen, daß MARs auch an Stellen existieren, in denen mit VM-26 keine Spaltungsstellen gefunden werden konnten. Daher ist die Topoisomerase II nicht direkt an der Anheftung der DNA an die nukleäre Matrix beteiligt (GEORGIEV et al., 1991). Wahrscheinlicher ist, daß es durch die Interaktion der Topoisomerase II mit der DNA zu einer Modifizierung der sekundären Struktur der DNA an den MARs kommt, welche die Zugänglichkeit für die Nukleasen erhöht (GROMOVA et al., 1995b). Es existiert jedoch auch die Hypothese, daß die Erkennung von Topoisomerase-Spaltungsstellen nicht nur von der Chromatinorganisation, sondern auch von dem verwendeten Topoisomerase II-Inhibitor abhängt und somit mit VM-26 (Teniposid) bzw. dem aus diesem Grund ebenfalls eingesetzten Etoposid (VP-16) nicht notwendigerweise alle Topoisomerase II-Spaltungsstellen kartiert werden (BORGNETTO et al., 1996).

Für den Histongencluster bedeuten die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente, daß er vermutlich in einer einzigen, großen DNA-Schleife lokalisiert ist und somit eine einzige große Domäne darstellt. Wenn davon ausgegangen wird, daß auch die Regulation der enthaltenen Gene hauptsächlich von der Domänenstruktur beeinflusst wird, so würde dies bedeuten, daß alle enthaltenen Gene gemeinsam in ihrer Replikation und Transkription reguliert werden, was Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe auch andeuten. Die Regulation der Genexpression ist jedoch viel komplizierter, so daß die Organisation in Domänen nur eine Ebene der effektiven Expressionsregulation ganzer Bereiche darstellt. Darüber hinaus werden einzelne Gene in der Domäne durch Bindung von Proteinen an die bisher bekannten *cis*-Regulationselemente wie Promotoren, Enhancer, Silencer etc. reguliert (PTASHNE, 1988).

Das Fehlen von MARs im Histongencluster könnte auch das Fehlen bevorzugter apoptotischer Schnittstellen im Histongencluster unter der Annahme erklären, daß während der Apoptose zunächst bevorzugt an den MARs geschnitten wird (OBERHAMMER et al., 1993b; STANULLA et al., 1997). Über den weiteren Abbau der DNA nach der postulierten Spaltung an den MARs ist weder die verantwortliche Nuklease, noch die Art der Fragmentierung bekannt. Zufällige Spaltungen innerhalb der DNA-Schleife sind also genauso möglich, wie Spaltungen an bevorzugten DNA-Sequenzen der MAR-Region.

In verschiedenen Regionen des Genoms wurden bisher MARs identifiziert und kartiert, so z.B. Lysozymgen im Huhn (PHI-VAN et al., 1998), das menschliche β -Globingen (JARMAN und HIGGS, 1988), das α -Globingen des Huhns (FARACHE et al., 1990), p53 (DEPERT, 1996) und der menschliche Protamingencluster (KRAMER und KRAWETZ, 1996; Zusammenstellung in BOULIKAS, 1995). Darunter wurden die MARs des c-Myc-Amplicons (GROMOVA et al., 1995a), der 28S rRNA (LAGARKOVA et al., 1995), des *Drosophila* X-Chromosoms (IAROVAIA, O. et al., 1996) und des α -Globin-Genclusters (RAZIN et al., 1991) mit dem „Topoisomerase II mediated loop excision protocol“ (RAZIN et al., 1993) entdeckt. Aus diesen wurde die HPRT-Genregion als Positivkontrolle für den Nachweis von MARs ausgewählt, da hier die benötigten Sonden leicht zugänglich waren und präpariert werden konnten. Außerdem stellt die HPRT-Genregion im Gegensatz zu vielen der anderen untersuchten Regionen eine single-copy-Region dar, so wie auch der Histongencluster in seiner Gesamtheit eine single-copy-Region ist. Dies erleichtert den Vergleich der Ergebnisse. Da in HL60-Zellen das HPRT-Gen deletiert ist (MONNAT, 1989; MONNAT et al., 1992a; MONNAT et al., 1992b), wurden die Versuche in K562-Zellen durchgeführt, die, wie schon bei FAJKUS et al. (1998) beschrieben, einen besonders klaren Nachweis der MARs in dieser Region ermöglichen sollten. Allerdings existieren von der K562-Zelllinie verschiedene Unterlinien, die z.T. deutliche Unterschiede aufweisen (Witt, O. und Kratzmeier M., unveröffentlichte Beobachtungen). Im HPRT-Gen konnte ein Spaltungsprodukt und damit eine MAR nachgewiesen werden, allerdings konnte die von Fajkus et al. (1998) veröffentlichte Größe nicht reproduziert werden. In den hier durchgeführten Experimenten traten um ca. 210 kb größere Fragmentgrößen von Ausgangs- und Spaltungsfragment auf. Dieses könnte darauf hinweisen, daß die für die indirekte Endmarkierung nötige Restriktionsverdauung die DNA aufgrund von Methylierung nur partiell verdaute und daher zu größeren Fragmenten führt. FAJKUS et al. (1998) weisen in ihrer Arbeit ebenfalls auf die Möglichkeit einer nur partiellen Restriktionsendonukleolyse durch teilweise Methylierung der DNA hin. Eine Erhöhung der verwendeten Enzymaktivität sowie der Inkubationsdauer brachten jedoch keine Unterschiede. Erwähnt werden sollte in diesem Zusammenhang auch, daß die Abschätzung der Größe aus der Auftrennung durch Pulsfeldgelelektrophorese eine Schwankungsbreite von bis zu 10% aufweist (CUTTING et al., 1988). Weitere Ungenauigkeiten bei der Ermittlung der Fragmentgrößen können durch unterschiedliche DNA-Mengen in den einzelnen Spuren des Gels verursacht werden, da die DNA-Menge die Laufeigenschaften beeinflusst (DOGGETT et al., 1992).

5.5 UNTERSUCHUNGEN ZUR ORTSSPEZIFITÄT DER APOPTOTISCHEN DNA-FRAGMENTIERUNG IN DEN VERSCHIEDENEN BEREICHEN DES GENOMS

Zur Untersuchung der DNA-Fragmentierung in Bezug auf einzelne Bereiche des Genoms wurde apoptotische DNA mit radioaktiven Sonden aus verschiedenen Regionen des Genoms hybridisiert, um einen Überblick über ihren Abbau oder ihr Persistieren während der Apoptose zu gewinnen. Als Sonden für codierende Regionen wurden Bereiche des Histongenclusters (Sonde 3 und Sonde H4), ein

Hochschwefel-Keratingen (POWELL et al., 1983) und eine Aktinsonde verwendet, die neben den aktiven humanen Aktinogenen auch deren über das Genom verteilte Pseudogene erkennt. Aus dem Bereich des Heterochromatins wurden Sonden aus dem Zentromer (Sau3A-Repeat-Sonde, het266 und het405) und dem Telomer (Telomer-Repeat-Sonde) eingesetzt sowie LINE-Elemente (LINE-Sonde) und SINE-Elemente (Alusonde) als Vertreter von verstreut-repetitiven Sequenzen des Euchromatins.

Die während der Apoptose entstehenden hochmolekularen DNA-Fragmente zeigen eine Größenordnung von mehreren Megabasen bis ca. 50 kb. Werden sie mit den beschriebenen radioaktiven Sonden hybridisiert, so zeigen alle repetitiven Genombereiche ein recht ähnliches Bild: Mit Einsetzen der hochmolekularen Fragmentierung beginnt auch die Spaltung dieser Genomregionen. Innerhalb der einzelnen Regionen sind keine Unterschiede im Abbau zu erkennen: Sowohl in Bezug auf das zeitliche Einsetzen, als auch in Bezug auf die Größe der entstehenden Fragmente zeigen sie ein einheitliches Verhalten. Einzig die Bereiche der LINE-Elemente und SINE-Elemente deuten einen geringfügig verstärkten Abbau an (auch gezeigt von Meinl, A. et al., unveröffentlichte Ergebnisse, KHODAREV et al., 2000). Dies wiederum geht konform mit Untersuchungen von VODENICHAROV et al. (1996), die einen bevorzugten Abbau von verstreut liegenden, repetitiven Fragmenten beobachteten.

Auch andere Autoren berichten vom gleichmäßigen Abbau der DNA sowohl transkriptionell aktiver als auch inaktiver Gene (WINTER et al., 1998) mit Ausnahme der mitochondrialen DNA, die während der Apoptose nicht abgebaut wird (MURGIA et al., 1992). Dies könnte darauf hindeuten, daß tatsächlich nur eine einzige DNase am Abbau der DNA beteiligt ist. Die einzig bisher klar identifizierte apoptotische DNase CAD schneidet die DNA nach Beobachtungen von Shimozaki und Nagata zufällig und zeigt nur eine leichte Bevorzugung AT-reicher Sequenzen (angedeutet in NAGATA, 2000, Ergebnisse noch unveröffentlicht). WIDLAK et al. (2000) gehen von einer Konsensus-Spaltsequenz der Form 5'-RRR Y↓R YYY-3' aus. Die Gleichmäßigkeit der Spaltung der DNA in hochmolekulare Fragmente steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Hendzel et al. (1998). Seine Untersuchungen lassen eine rasche Spaltung des Euchromatins vermuten, die zugleich mit der Proteolyse der Lamine erfolgt und damit der Umorganisation der intranukleären Proteinmatrix Raum gibt. Dadurch könnte eine passive Kondensation des Heterochromatins in Form von Aggregation ermöglicht werden. Allerdings basierte die Untersuchung in der zitierten Arbeit nicht auf der Auftrennung und Hybridisierung einzelner Genombereiche, sondern auf indirekter Immunfluoreszenz acetylierter Histone in apoptotischen Zellen. Acetylierte Histone werden in transkriptionell kompetenten Chromatinregionen gefunden. Während der Apoptose konnten HENDZEL et al. (1998) keine acetylierten Histone mehr nachweisen, was jedoch nicht unbedingt auf den Abbau dieser Bereiche zurückzuführen sein muß, sondern durchaus auch die Möglichkeit der Deacetylierung der Histone bei Apoptose offen läßt. Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß zunächst auftretende Spaltungen im Euchromatin erfolgen, da in der hier vorgelegten Arbeit nur eine punktuelle Untersuchung aus codierenden Regionen des Genoms durchgeführt wurde und nicht die für diese Aussage systematische Untersuchung vieler verschiedener codierender Regionen. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit weisen jedoch in Richtung eines gleichmäßigen Abbaus aller untersuchten Genombereiche.

Auch KRYSTOSEK (1999) beobachtete durch Verwendung eines Einbau-Assays markierter Nukleotide einen raschen Abbau aktiver Gene aufgrund des Abbaus exponierten Chromatins der perinukleolären und peripheren Anteile der Lamina (KRYSTOSEK und PUCK, 1990; HAAG, 1994). Es wurde jedoch kein Vergleich mit dem Abbau anderer Genomregionen wie dem Heterochromatin vorgenommen. Auch andere Autoren berichten von Hinweisen auf eine zunächst bevorzugte Spaltung des Euchromatins in Fragmente der Größe von 2,2 bis 0,68 Mb an den CpG-Inseln bereits wenige Minuten nach Induktion von Apoptose (QI und SIT, 1998). Dies schließen sie aus dem Größenvergleich der entstehenden apoptotischen Fragmente mit der Verdauung chromosomaler DNA durch die Restriktionsendonuklease *NotI*. Von diesem Enzym ist bekannt, daß es die DNA bevorzugt an den CpG-Inseln und selten außerhalb schneidet. Inwieweit diese Spaltungen von der Topoisomerase II verursacht werden, wird nicht erörtert, Untersuchungen von WALKER und SIKORSKA (1997) schließen diese Möglichkeit weitgehend aus.

Inwieweit die erwähnten Spaltungen an den CpG-Inseln in Einklang zu bringen sind mit der These, daß die apoptotische DNA-Fragmentierung bevorzugt an den Matrixanheftungsstellen stattfindet, wird in keiner der Arbeiten diskutiert. Während die vermutlich euchromatischen Spaltungen Fragmente im Megabasen-Bereich (2,2-, 1,6-, 1,1-, 0,68- Mb, CHEN, D.L. et al., 1998) generieren, führen die vermuteten Spaltungen an den Matrixanheftungsregionen zu Fragmenten der Größe zwischen 20 und 300 kb (OBERHAMMER et al., 1993b sowie andere bereits zitierte Autoren). Da jedoch in der vorgelegten Arbeit keine bevorzugte Entstehung von Fragmenten zwischen 300 und 50 kb beobachtet werden konnte und zudem neue Berichte die Existenz größerer DNA-Schleifen nahelegen (VOLPI et al., 2000), können beide Möglichkeiten zutreffen. Während die Megabasen-Spaltungen an CpG-Inseln stattfinden, wird bei der MAR-Hypothese von Spaltungen in AT-reichen Regionen (G-Banden) ausgegangen. CpG-Inseln befinden sich zu über 80% in den hellen, Gen-reichen R-Banden der Chromosomen (CRAIG und BICKMORE, 1994). Allerdings wird auch von MARs im Lysozym-Gen des Huhns und des Apolipoproteins B des Menschen (PHI-VAN et al., 1990) berichtet, die mit den Grenzen der DNase I-hypersensitiven (und damit acetylierten und transkribierten, HENDZEL und DAVIE, 1991) Domänen der R-Banden überlappen (DAVIE, 1995). Beide Ansätze bekämen einen gemeinsamen Nenner durch die Annahme, daß die DNase I-hypersensitiven Bereiche die DNA-Schleife als Einheit der Genregulation darstellen und die MARs diese begrenzen. Während der Apoptose müßte dann bevorzugt an den MARs, die mit den CpG-Inseln überlappen, geschnitten werden. Inwieweit diese Bereiche jedoch von der/einer der apoptotischen Nuklease(n) erkannt werden, ist nicht geklärt. Hier ist ein Einfluß durch die Zugänglichkeit des Chromatins zu vermuten. Es konnte von ALLERA et al. (1997) gezeigt werden, daß transkriptionell aktive Bereiche des Chromatins eine offenere Chromatinstruktur aufweisen, die darauf beruht, daß die Anordnung von Nukleosomen zu Strukturen höherer Ordnung durch die Hyperacetylierung der Histone inhibiert wird (siehe auch WU, 1997; HENDZEL et al., 1998).

Matrixanheftungsregionen kommen offensichtlich in allen Bereichen des Genoms vor (mit einer größeren Dichte im Heterochromatin, KÄS und LAEMMLI, 1992; STRISSEL et al., 1998). Dies würde erklären, weshalb bei der Beobachtung der DNA-Fragmentierung im Bereich kleiner als 700 kb der Abbau der unterschiedlichen, untersuchten Genomregionen gleichmäßig vonstatten geht. Eine Unterscheidung

zwischen Heterochromatin und Euchromatin wäre denkbar aufgrund von Veränderungen der Zugänglichkeit des Chromatins durch Modifikation z.B. der Histone (insbesondere Acetylierung und Methylierung), was einen Abbau zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Fragmentgrößen erlauben könnte. Dies würde darauf hinweisen, daß während der Apoptose verschiedene Nukleasen aktiviert werden, die eine unterschiedliche Spaltungsspezifität besitzen. Ebenso gibt es Hinweise dafür, daß die Existenz einer zweiten DNase gar nicht nötig ist (vgl. die „*in vitro*“-Fragmentierung in dieser Arbeit und NAGATA, 2000). Alleine die gezielte Proteolyse struktureller Kernproteine der Kernlamina sowie der Kernmatrix könnten dazu führen, daß durch den Abbau der Lamine, Aktine, Topoisomerasen, evtl. Acetylasen und Deacetylasen, die ebenfalls in der Kernmatrix enthalten sind, das Chromatin zugänglicher für den Abbau durch CAD als einzig bisher bekannte Nuklease wird. Dies wirft die Frage auf, wie es bei einem gleichmäßigen Abbau des Chromatins in hochmolekulare Fragmente zu spezifischen Spaltungen in bestimmten Genomregionen, wie dem MLL-Gen oder dem AML-1-Locus (STANULLA et al., 1997) kommt, die aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls durch die apoptotische Signalkaskade hervorgerufen werden. Hier mutmaßen die Autoren, daß dies unter Umständen nur eine Auswahl von Genbereichen betrifft, die besonders sensitiv für die Spaltung in MAR-Regionen sind und daher bereits als Chromosomen-Translokationsstellen bekannt sind (wie z.B. *c-myc*). Welche Einflüsse hierbei eine Rolle spielen, ist nicht bekannt. Als einer der Hauptfaktoren wird die Zugänglichkeit des Chromatins vermutet.

Die Analyse der niedermolekularen DNA-Fragmente durch Hybridisierung der isolierten nukleosomalen DNA-Fragmente mit Sonden aus den verschiedenen Genombereichen ergab im Vergleich zu der gleichmäßigen Spaltung der hochmolekularen DNA-Fragmente ein in zweifacher Hinsicht unterschiedliches Fragmentierungsmuster. Zum einen konnten die untersuchten codierenden Bereiche des Genoms – mit Ausnahme des Aktgens und seiner Pseudogene - in den nukleosomalen Fragmenten nicht nachgewiesen werden. Warum das Euchromatin und dadurch auch die codierenden Sequenzen – wie von VODENICHAROV et al. (1996) postuliert – nach der Spaltung in hochmolekulare Fragmente von der internukleosomalen Spaltung ausgespart sein sollten, ist nicht bekannt. Belegt ist hingegen, daß sich transkriptionell aktive und inaktive Genombereiche darin unterscheiden, daß sie eine veränderte Nukleosomenstruktur aufweisen und transient mit der Kernmatrix verbunden sind (zusammengestellt in DAVIE, 1995). Unter Umständen ist gerade die erwähnte veränderte Nukleosomenstruktur verantwortlich dafür, daß - wie von VODENICHAROV et al. (1996) postuliert - nur transkriptionell inaktive Genbereiche während der Apoptose zu Nukleosomen geschnitten werden. Damit könnten die codierenden Regionen nach der Spaltung in hochmolekulare Fragmente entweder gar nicht weiter abgebaut werden (dagegen spricht jedoch, daß keine akkumulierenden Banden in der indirekten Endmarkierung sichtbar sind, sondern die Banden scheinbar „verschwinden“) oder ein schneller Abbau durch unspezifische Spaltung der zunächst entstandenen hochmolekularen Fragmente erfolgt. Aufgrund des engmaschigen Zeitrasters der durchgeführten Versuche kann dies weitgehend ausgeschlossen werden. Allerdings ist hierbei die Nachweisgrenze von Einzelfragmenten in der Southern-Hybridisierung zu bedenken. Zudem ist gezeigt worden, daß der Abbau der DNA bevorzugt an der Linker-DNA zwischen den Nukleosomen erfolgt und

andere Stellen im Nukleosom nicht zugänglich sind (LIU, X. et al., 1999b), was eine „unspezifische“ Spaltung an dem Nukleosomen-Core-Partikel unwahrscheinlich werden läßt. Darüber hinaus wäre der Nachweis der MLL-bcr-Schnittstelle nicht möglich gewesen, wenn das Euchromatin nach anfänglicher Spaltung sehr rasch weiter fragmentiert würde. Hierbei wäre auch denkbar, daß die Bereiche dieser Chromosomen-Translokationsstellen vor Abbau jeglicher Art geschützt sein könnten. Ebenso wäre möglich, daß die DNA der codierenden Regionen zwar in nukleosomale Fragmente abgebaut wird, diese aber nicht nachweisbar sind, da sie aufgrund ihres single copy-Charakters unter die Nachweisgrenze fallen. Dies legt die Hybridisierung mit der Aktinsonde nahe, die eine internukleosomale Fragmentierung zeigt. Allerdings erfaßt diese Sonde sowohl die aktiv transkribierten Aktinegene als auch die inaktiven Pseudogene des Aktins. Somit ist nicht auszuschließen, daß die hybridisierenden Fragmente aus den Bereichen der transkriptionell inaktiven Pseudogene stammen.

Auch andere Autoren haben beobachtet, daß es bei der Apoptose insbesondere zu einer Spaltung stark methylierter, kaum transkribierter DNA in nukleosomale Einheiten kommt (VODENICHAROV et al., 1996). Dies deutet darauf hin, daß die Methylierung der CpG-Inseln im Heterochromatin dafür verantwortlich sein könnte, daß sie von der apoptotischen Nuklease zunächst nicht erkannt werden (DULLEA et al., 1999). Ferner beobachteten sie durch Sequenzierung der DNA von bei Apoptose entstehenden Mono- und Dinukleosomen, daß in ihrem System (MEL-Zellen mit Etoposid als Apoptose-Induktor) bevorzugt der heterochromatische Teil des Genoms (und hier insbesondere die verstreut liegenden repetitiven Sequenzen) in den nukleosomalen DNA-Fragmenten angereichert ist (VODENICHAROV et al., 1996). Nur zehn Prozent der DNA apoptotischer MEL-Zellen konnten sie in Form der DNA-Leiter nachweisen. Wenn diese tatsächlich hauptsächlich aus dem Heterochromatin stammen sollte, bleibt wiederum die Frage offen, was mit dem Rest der DNA geschieht, nämlich der DNA des Euchromatins. Zudem konnten in der vorliegenden Arbeit nukleosomale Fragmente auch aus den verstreut-repetitiven LINE- und SINE-Elementen nachgewiesen werden. Eine definitive Aussage darüber, was mit dem Euchromatin nach der Spaltung in hochmolekulare Fragmente geschieht, ist zum momentanen Zeitpunkt nicht möglich und bedarf weiterer Erforschung.

Ein zweiter Unterschied in der Spaltung in niedermolekulare Fragmente während der Apoptose konnte in der vorliegenden Arbeit durch die systematischen Untersuchung der Spaltung in nukleosomale Fragmente festgestellt werden: Während sich die untersuchten Bereiche des Zentromers ebenso wie die Elemente der LINE und SINE-Familie in den nukleosomalen Fragmenten wiederfinden, wird die Telomerregion von der internukleosomalen Spaltung ausgespart. Dies ist eine völlig neue Beobachtung. Bei der Spaltung von DNA in hochmolekulare Fragmente sind dagegen Fragmente bis zu 50 kb zu sehen. Diese werden wahrscheinlich aufgrund ihrer Größe sehr wahrscheinlich von Spaltungen außerhalb des Telomerbereichs generiert, nämlich in den subtelomeren Regionen und weiter zentromerwärts gelegenen Bereichen des Genoms, da die Telomerregion in den untersuchten Zelllinien sehr klein ist (2 bis 7 kb, TOMMERUP et al., 1994). Um zu analysieren, inwieweit die Aussparung des Telomers eine universelle Eigenschaft der apoptotischen DNA-Fragmentierung ist, wurde dieser Versuchsansatz auf andere Zelllinien und andere

Apoptose-Induktoren übertragen. Die Aussparung des Telomerbereichs von der internukleosomalen DNA-Spaltung und damit der gesamten apoptotischen DNA-Spaltung zeigte sich in jedem durchgeführten Ansatz. Um dieses Phänomen eingrenzen zu können, wurde die nukleosomale Organisation des Telomerbereichs untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch der Telomerbereich nukleosomal organisiert ist. Allerdings sind die durch limitierten Mikrokokus-Nuklease-Verdauung generierten nukleosomalen Wiederholungseinheiten kleiner als die des restlichen Chromatins. Die Länge der entstehenden DNA-Fragmente bewegt sich in einer Größenordnung von ungefähr 150 bis 170 bp und Vielfachen davon und ist damit ca. 40 bp kürzer als die 190 bis 200 bp langen „normalen“ Nukleosomen von HL60-Zellen. Dieser Größenunterschied konnte auch in anderen Zellkulturen und Tiergeweben (LEJNINE et al., 1995) und sogar in Pflanzen gefunden werden (FAJKUS et al., 1995a; FAJKUS et al., 1995b). TOMMERUP et al. (1994) gehen von einer ungewöhnlichen Struktur des Chromatins im Telomerbereich kurzer menschlicher Telomere aus. Dabei ziehen sie sowohl eine nicht nukleosomale Struktur, als auch eine irreguläre nukleosomale Struktur in Betracht. Zudem zeigen die Mononukleosomen der kurzen Telomer-Repeats (2 bis 7 kb) eine erhöhte Sensitivität zur Mikrokokus-Nuklease, die in den anderen nukleosomalen Fragmenten nicht zu finden ist. Eine Erklärung dieser Sensitivität könnte z.B. in der Modifizierung der Histone in diesem Bereich zu suchen sein; bisher ist darüber nichts bekannt. Ein mit Telomer-Proteinen interagierendes Molekül ist die Tankyrase, die unter anderem auch PARP-Aktivität besitzt, so daß unter Umständen eine posttranslationale Poly-ADP-Ribosylierung eine der möglichen Modifikationen der Histone im Telomerbereich sein könnte (SMITH, S. et al., 1998). In Ratten-Telomeren konnten nukleosomale Arrays ebenfalls mit kleinerer Repeatlänge und instabilen Mononukleosomen gefunden werden (157 ± 2 bp, MAKAROV et al., 1993). Mindestens 75% des Telomers in Ratten sind demnach nukleosomal organisiert. Sie zeigen eine kompaktere Struktur als die Nukleosomen des restlichen Chromatins und enthalten nicht das charakteristische 100 bzw. 200 bp DNase II-Spaltungsintervall (je nach Kondensationsstatus). BEDOYAN et al. (1996) konnten zeigen, daß jedoch in den Telomer-Nukleosomen die Core-Histone und das Histon H1 enthalten sind. Sie schließen daraus, daß durch die kürzere Linkerlänge (~ 8 bp) die Histon H1-Bindung an den DNA-Linker weniger fest erfolgt. Damit bleibt eine größere Menge basischer Reste des H1 ungebunden, die unter Umständen eine engere internukleosomale Bindung und dadurch die Ausbildung höherer nukleosomaler Organisationsstrukturen zwischen benachbarten Nukleosomen verursachen könnten. Die größere Ladungsdichte an den Telomeren könnte auch die Bindungskapazität der Nukleosomen zu anderen basischen Molekülen verringern bzw. zu sauren Molekülen erhöhen. Dann könnte z.B. auch die Interaktion mit der basischen DNase CAD (ENARI et al., 1998) oder evtl. vorkommenden anderen basischen DNasen inhibiert sein.

DE LANGE (1992) fand Anheftungsstellen an der Kernmatrix durch die Repeatsequenz TTAGGG selbst. Nach ihren Untersuchungen sind 80% bis 95% des Telomer-Repeats während der Interphase dauerhaft nicht kovalent an die Kernmatrix angeheftet – unabhängig vom untersuchten Zelltyp und dessen Telomerlänge. Diese beobachtete Anheftung an die Kernmatrix könnte in Zusammenhang mit der Ausbildung eines vor Abbau, Ligation und Rekombination schützenden Kernproteinkomplexes stehen, der

in der Evolution stark konserviert geblieben ist (zusammengestellt in BLACKBURN, 1991a, b; ZAKIAN, 1995). Erstaunlich ist, daß die Anheftung der Telomer-Repeats an die Kernmatrix von den bisherigen „Regeln“ für MARs abweicht. Während MARs in der Regel AT-reiche Regionen sind und Topoisomerase II-Bindungsstellen besitzen, erwiesen sich die Anheftungsstellen der Telomer-Repeats als G-reich und besitzen keine der angenommenen Topoisomerase II-Konsensus-Sequenzen. Untersuchungen der Topoisomerase II-Spaltung von Telomeren *in vitro* und *in vivo* zeigten, daß unabhängig davon Topoisomerase II-Spaltungen stattfinden können und zwar alle 6 bp an der Stelle 5'-TTAGG*G-3' (YOON et al., 1998). Dies ist allerdings stark von der Verwendung eines einzigen Topoisomerase II-Inhibitors abhängig, dem Etoposid. Kein anderer Inhibitor der Topoisomerase II konnte sonst Spaltungen erzeugen. Durch die Identifizierung von MARs und Topoisomerase II-Spaltungsstellen müßte nach der Hypothese, daß im Verlauf der Apoptose bevorzugt an MARs geschnitten wird, auch im Telomerbereich eine Spaltung in Fragmente gefunden werden. Da die Telomerregion in HL60-Zellen darüber hinaus – wenn auch in abgewandelter Weise - nukleosomal organisiert ist, wäre auch hier eine internukleosomale Spaltung zu erwarten. Daraus ergibt sich die Frage, was diesen Bereich vor dem apoptotischen Abbau in Oligonukleosomen schützt und welche Konsequenzen sich daraus ergeben. Als verantwortliche Nuklease für die internukleosomale Spaltung der DNA während der Apoptose wurde die DNase CAD identifiziert (ENARI et al., 1998). Ihre Aktivität erlangt sie nach Proteolyse ihres Inhibitors ICAD durch Caspase 3. Sie zeigt eine Präferenz für Konsensussequenzen der Form 5'-RRR Y↓R YYY-3' (WIDLAK et al., 2000). Dies könnte bedeuten, daß CAD die DNA im Bereich der aus den Repeats des Hexanukleotids TTAGGG bestehenden Telomersequenz nicht schneidet. Wie bereits angedeutet, könnte ebenso auch der Zugang der DNase zu den Schnittstellen an der Linker-DNA blockiert sein: z.B. durch die viele freie basische Valenzen des H1-Linkerhistons durch kurze Linker-DNA-Längen und die damit verbundene elektrostatische Abstoßung eines weiteren basischen Proteins wie CAD, sowie durch eine stärkere Interaktion zwischen benachbarten Nukleosomen, wodurch die Nukleosomen kompaktiert vorliegen könnten und ein Zugang erschwert wäre. Ferner könnten die sehr dicht aufeinander folgenden Anheftungen an die Kernmatrix (nach DE LANGE, 1992, alle 6 bp) eine wesentliche Rolle bei der Zugänglichkeit der Telomer-Repeats spielen, zudem gerade diese Interaktion mit dem Schutz der Chromosomenenden vor ungewolltem Abbau, Ligation und Rekombination in Zusammenhang gebracht wird. Allerdings ist die Kernmatrix selbst ebenfalls Ziel des apoptotischen Abbaus; zum Zeitpunkt des Eintritts der internukleosomalen DNA-Fragmentierung ist sie schon größtenteils abgebaut. Inwieweit der Abbau den Bereich der Telomeranheftung an die Kernmatrix betrifft, ist bislang nicht untersucht, so daß daraus noch keine Rückschlüsse auf eine Beziehung zwischen der Ausbildung des Schutzes der Chromosomenenden und der Aussparung der Telomerregion von der internukleosomalen Fragmentierung während der Apoptose gezogen werden können.

Zur Klärung der Frage, ob die Telomere während der Apoptose evtl. von einer anderen DNase in sehr kleine Fragmente geschnitten werden, oder ob der Telomerbereich vollständig ausgespart bleibt, wurde im Rahmen der Untersuchungen das Chromatin aus apoptotischen Zellen einer limitierten Mikrokokus-Nuklease-Spaltung unterzogen. Die Hybridisierung der isolierten DNA mit der Telomer-Repeat-Sonde

zeigt mit steigender Inkubationszeit ein Auftreten von hybridisierenden Fragmenten in der Größe von Nukleosomen. Diese könnten sowohl von den nicht apoptotischen Zellen des Ansatzes, als auch von den bei der Fragmentierung ausgesparten Bereichen stammen. Gleichzeitig vermindert sich bei zunehmender Mikrokokkus-Nuklease-Verdauung der bei der Hybridisierung mit der Telomer-Repeat-Sonde zu beobachtende Schmier im höhermolekularen Bereich. Dies wiederum deutet auf eine Aussparung der Telomer-DNA bei der Apoptose hin, da sie durch die Mikrokokkus-Nuklease weiter verdaut werden kann. Insgesamt ist ein Abbau durch eine andere DNase damit als nicht wahrscheinlich anzusehen.

5.6 ENTWICKLUNG EINES MODELLS ZUR DNA-FRAGMENTIERUNG WÄHREND DER APOPTOSE

Seit ihrer Entdeckung ist die Rolle der DNA-Fragmentierung während der Apoptose Gegenstand intensiver Diskussion. Für den Zelltod selbst ist die DNA-Fragmentierung entbehrlich (ELLIS et al., 1991b; UCKER et al., 1992; SAKAHIRA et al., 1998). Was also ist ihr Sinn und Zweck? Bereits HOWELL und MARTZ (1988) vertraten die These, daß die DNA-Fragmentierung die Möglichkeit zur Eliminierung mutierter oder viraler DNA-Sequenzen repräsentiert und damit der Eliminierung potentiell gefährlicher DNA dient (WYLLIE, A., 1998). Leicht vorstellbar ist auch, daß alleine die Größe der DNA in unverpackter Weise – nämlich ca. 2 m Länge der DNA einer einzelnen Zelle - eine für die phagozytierenden Nachbarzellen unmöglich zu bewältigende extrazelluläre Belastung darstellen könnte (WYLLIE, A., 1998). Da DNA auch als starkes Autoantigen bekannt ist, könnte sie ferner eine Autoimmunantwort hervorrufen (NAGATA, 2000). PEITSCH und TSCHOPP (1994) bezeichneten daher die Aktion der Endonukleasen als „Aufräumen von toten Zellen“ – vermutlich um Phagozytose durch Nachbarzellen zu erleichtern und/oder die Transformation von intakter DNA aus toten Zellen in die Nachbarzellen zu vermeiden. Dies läßt die „Zerkleinerung der DNA“ apoptotischer Zellen durchaus sinnvoll erscheinen. Die Spaltung sowohl des komplexen eukaryotischen Genoms, als auch der meist ebenfalls relativ komplexen viralen Genome, die ebenfalls von Makrophagen aufgenommen werden, in geeignete Fragmente ist durch sequenzspezifische Endonukleasen (wie bei den bakteriellen Restriktionsendonukleasen) kaum bewältigbar. Daher ist die Existenz eines für den Prozeß der Apoptose spezifischen Fragmentierungssystems sinnvoll. Genau dieses scheint das CAD/ICAD-System darzustellen. Wie die hier vorgelegten Untersuchungen zusammen mit den zitierten Untersuchungen zeigen, ist für den Abbau des Chromatins tatsächlich nicht die DNA-Sequenz, sondern die Chromatinstruktur und damit die Zugänglichkeit einzelner Bereiche entscheidend (siehe auch Untersuchungen von MOORE et al., 1993 zur Unterscheidung zwischen primärer DNA-Sequenz und sekundärer DNA-Struktur durch Endonukleasen).

Die Chromatinstruktur wird gebildet durch die Interaktion der DNA mit Proteinen: mit den Core-Histonen zur Bildung von Nukleosomen, mit dem Histon H1 zur Bildung höherer nukleosomaler Strukturen, mit den vielfältigen Proteinen der Kernmatrix über die Anheftung an MAR-Elemente zur Bildung von DNA-Schleifen und mit vielen anderen strukturellen und funktionellen Proteinen zur Bildung des funktionsfähigen Zellkerns. Da sowohl Protease-Aktivitäten als auch Nuklease-Aktivitäten für die DNA-

Fragmentierung in intakten Zellen erforderlich sind, ist daraus zu schließen, daß die Proteolyse Chromatin-assoziiierter Polypeptide Nuklease-hypersensitive Stellen analog zu den transkriptionell aktiven Chromatinregionen zugänglich machen könnte (ZHIVOTOVSKY et al., 1994b und dort zitierte Referenzen). Die vorliegende Arbeit kommt – bestätigt durch die Hypothese anderer Autoren (insbesondere NAGATA, 2000) – zu dem Schluß, daß keine Regionen des Genoms bevorzugt gespalten werden, sondern die einzelnen Bereiche des Chromatins unabhängig von der Wichtigkeit verschiedener Gene oder Genombereiche mehr oder weniger homogen abgebaut werden.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Ergebnisse lassen sich mit den bereits zitierten Untersuchungen zu folgendem Modellsystem zusammenfassen: Zunächst kommt es nach Induktion der Apoptose und Aktivierung der Caspase-Kaskade zum Abbau der Kernlamina, die vermutlich zur Kondensation des Chromatins führt bzw. neben anderen Caspase-abhängigen (z.B. Acinus) und unabhängigen Molekülen (z.B. AIF) zu der Kondensation des Chromatins beiträgt. Dies könnte die beobachteten Spaltungen im Abstand von Megabasen an den CpG-Inseln innerhalb weniger Minuten ermöglichen. Durch welche Mechanismen diese entstehen, ist nicht bekannt. Die Kondensation des Chromatins geht zudem mit einer deutlichen Dephosphorylierung der drei verschiedenen H1-Subtypen in HL60-Zellen einher (KRATZMEIER et al., 2000). Dadurch könnte es zu einer weiteren Auffaltung des Chromatins und der Freisetzung von spaltungsfördernden Ionen (wie Magnesiumionen) kommen, die für die spätere CAD-Aktivität erforderlich sind. Danach gehen bereits der Abbau der verschiedenen Proteine (PARP, DNA-PK, Fodrin, Aktin, Topoisomerasen etc.) und die weitere DNA-Fragmentierung Hand in Hand. Durch die Spaltung an den MARs und ähnlich zugänglichen Chromatinbereichen könnten Fragmente in Domänengröße entstehen. An ihnen verläuft der Abbau weitgehend homogen mit einer leichten Bevorzugung der LINE- und SINE-Elemente. Im Anschluß daran folgt der Abbau des Heterochromatins bis zu Oligonukleosomen. Für den Verbleib der DNA-Fragmente aus codierenden Regionen gibt es bisher keine Erklärung. Denkbar wäre, daß eine veränderte Nukleosomenstruktur der aktiv transkribierten Bereiche den Abbau zu Nukleosomen verhindert. Bei der apoptotischen Spaltung des Heterochromatins wird der Telomerbereich aufgrund von Unzugänglichkeit oder Unspaltbarkeit durch CAD ausgespart.

Für dieses Modell wäre die Existenz von CAD als der einzigen an der Entstehung der hoch- und niedermolekularen Fragmente (ab einer Größe von etwa 700 kb) beteiligten Nuklease den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ausreichend. Bei diesen Überlegungen sollte bedacht werden, daß die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit (sowie zahlreicher anderer hier zitierter) auf Versuchen in Zellkultur beruhen. Im Gewebe werden entstehende apoptotische Zellen schon in einem frühen Stadium – vor Sichtbarwerden der morphologischen Veränderungen und der DNA-Fragmentierung (DURRIEU et al., 1998) – phagozytiert. Das bedeutet, daß alle weiteren Schritte der Apoptose innerhalb der Phagozyten ablaufen und es damit denkbar ist, daß diese zumindest zu einem späteren Zeitpunkt der Apoptose-Kaskade am Abbau der Zellkörperchen und der DNA beteiligt sein könnten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung der Apoptose-bedingten Fragmentierung des Chromatins wurden verschiedene Zelllinien, Induktoren mit Wirkung auf die verschiedenen Apoptose-Signalwege, die Anreicherung von apoptotischen Zellen durch magnetische Separation, die Induktion der Apoptose auf verschiedenen Stufen des Signalwegs, „*in vitro*“-Assays mit isolierten Kernen sowie die vorherige Synchronisierung der Zellen in Kombination mit einem Zellzyklus-Phasen-spezifischen Apoptose-Induktor getestet, etabliert und optimiert. Besonders wirkungsvoll erwies sich die Verwendung synchronisierter HL60-Zellen in Verbindung mit dem S-Phase-spezifischen Topoisomerase I-Hemmer Topotecan und die Untersuchungen im „*in vitro*“-System mit isolierten Kernen und rekombinant exprimierter Caspase 3. Beide Ansätze induzieren Apoptose in hoher Rate und sehr synchron, so daß hier die Untersuchungen auf Basis der Kinetik der apoptotischen DNA-Fragmentierung fortgeführt werden konnten. Dadurch war eine Eingrenzung der initialen Phase der apoptotischen DNA-Spaltung in hochmolekulare Fragmente möglich. Dies war Vorbedingung für die Suche nach bevorzugten apoptotischen Schnittstellen.

Im Histongencluster als Modellregion ist keine bevorzugte apoptotische Schnittstelle enthalten. Im Kontrollexperiment am MLL-Gen konnte dagegen mit der gleichen Methodik eine bereits veröffentlichte bevorzugte Schnittstelle während der Apoptose nachgewiesen werden. Wie aus den vorgelegten Untersuchungen hervorging, ist dieser Nachweis nur in bestimmten Zelllinien (insbesondere CEM-Zellen, nicht jedoch HL60-Zellen) möglich. Im Verlauf der Apoptose konnte zwar keine spezifische Spaltstelle, jedoch ein homogener Abbau des Histongenclusters beobachtet werden. Der Vergleich mit zwei weiteren codierenden Regionen zeigte, daß auch hier der Abbau nicht über bevorzugte apoptotische Schnittpunkte, sondern homogen erfolgte. Daher ist davon auszugehen, daß die bevorzugte apoptotische Schnittstelle im MLL-Gen einen Sonderfall darstellt, während normalerweise der Abbau der DNA während der Apoptose zufällig erfolgt. Im Histongencluster konnten zudem keine Matrixanheftungsregionen gefunden werden, wie sie im MLL-Gen nachgewiesen wurden. Dies bedeutet, daß der gesamte 300 kb große Histongencluster innerhalb einer einzigen DNA-Schleife und damit einer einzigen Domäne lokalisiert ist. Dies würde eine gemeinsame Regulation des gesamten Bereichs nahelegen.

Die Kinetik und die Ortsspezifität der apoptotischen DNA-Fragmentierung in den verschiedenen Regionen des Genoms zeigt, daß das Genom sehr homogen fragmentiert wird. Die DNA-Spaltung in hochmolekulare Fragmente erzeugt nicht nur die in der Literatur beschriebenen 300 bis 50 kb großen Fragmente, sondern auch Fragmente in Megabasengröße. Im „*in vitro*“-Ansatz mit isolierten Kernen entstehen dagegen nur Fragmente der Größenordnung 500 bis 50 kb. Daher könnten die DNA-Fragmente in Megabasengröße in Zusammenhang mit der passiven Kondensation des Kerns bei Veränderungen der Kerngestalt stehen. Aus den kinetischen Untersuchungen ging hervor, daß die hochmolekularen DNA-Fragmente vor den niedermolekularen DNA-Fragmenten entstehen. Die „*in vitro*“- Fragmentierung in isolierten Kernen zeigt zudem, daß die beiden Größenordnungen an DNA-Fragmenten nicht unabhängig voneinander generiert werden, sondern die niedermolekularen Fragmente aus den hochmolekularen Fragmenten entstehen. Die Spaltungsmuster der einzelnen Genomregionen führten zu dem Schluß, daß

Bereiche nicht codierender DNA grundsätzlich nicht schneller abgebaut werden als die codierenden Regionen – eine leichte Bevorzugung zeigen die LINE- und SINE-Elemente. In den entstehenden Oligonukleosomen ist kein Nachweis codierender DNA möglich, was auf eine Aussparung dieser Bereiche von der internukleosomalen Spaltung hinweisen könnte. Völlig ausgespart von der DNA-Fragmentierung wird die Telomerregion, obwohl auch sie – wie in dieser Arbeit für HL60-Zellen gezeigt – nukleosomal organisiert ist. Allerdings weist die DNA ihrer Nukleosomen eine kleinere Größe als die normalerweise beobachteten knapp 200 bp auf. Die beobachtete Aussparung der Telomerregion könnte auf das Fehlen von Erkennungssequenzen der apoptotischen DNase CAD oder auf Wechselwirkungen zwischen den Telomer-Nukleosomen und der DNase zurückzuführen sein. Dies könnte darauf hinweisen, daß in dem untersuchten System die alleinige Aktivität von CAD als DNase ausreicht, um die Entstehung der apoptotischen DNA-Fragmente zu erklären. Die gleichmäßige Fragmentierung der DNA während der Apoptose weist daraufhin, daß einzig die Struktur und Zugänglichkeit des Chromatins, nicht jedoch die Sequenz der unterschiedlichen DNA-Bereiche eine Rolle bei der apoptotischen DNA-Fragmentierung spielt.

IV. LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, Y, Käs, E and Laemmli, UK. (1989). Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J.* 8, 3997-4006.
- Adams, JM and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-6.
- Albig, W, Kioschis, P, Poustka, A, Meergans, K and Doenecke, D. (1997). Human histone gene organization: nonregular arrangement within a large cluster. *Genomics* 40, 314-22.
- Allan, J, Staynov, DZ and Gould, H. (1980). Reversible dissociation of linker histone from chromatin with preservation of internucleosomal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 885-9.
- Allen, MJ, Dong, XF, O'Neill, TE, Yau, P, Kowalczykowski, SC, Gatewood, J, Balhorn, R and Bradbury, EM. (1993a). Atomic force microscope measurements of nucleosome cores assembled along defined DNA sequences. *Biochemistry* 32, 8390-6.
- Allen, MJ, Lee, C, Lee, JDt, Pogany, GC, Balooch, M, Siekhaus, WJ and Balhorn, R. (1993b). Atomic force microscopy of mammalian sperm chromatin. *Chromosoma* 102, 623-30.
- Allera, C, Lazzarini, G, Patrone, E, Alberti, I, Barboro, P, Sanna, P, Melchiori, A, Parodi, S and Balbi, C. (1997). The condensation of chromatin in apoptotic thymocytes shows a specific structural change. *J Biol Chem* 272, 10817-22.
- Alnemri, ES, Livingston, DJ, Nicholson, DW, Salvesen, G, Thornberry, NA, Wong, WW and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. *Cell* 87, 171.
- Antequera, F, Boyes, J and Bird, A. (1990). High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62, 503-14.
- Antequera, F, Macleod, D and Bird, AP. (1989). Specific protection of methylated CpGs in mammalian nuclei. *Cell* 58, 509-17.
- Antonsson, B and Martinou, JC. (2000). The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256, 50-7.
- Aplan, PD, Chervinsky, DS, Stanulla, M and Burhans, WC. (1996). Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors [see comments]. *Blood* 87, 2649-2658.
- Aravind, L and Koonin, EV. (2000). SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci* 25, 112-4.
- Ardizzoni, A, Hansen, H, Dombernowsky, P, Gamucci, T, Kaplan, S, Postmus, P, Giaccone, G, Schaefer, B, Wanders, J and Verweij, J. (1997). Topotecan, a new active drug in the second-line treatment of small-cell lung cancer: a phase II study in patients with refractory and sensitive disease. The European Organization for Research and Treatment of Cancer Early Clinical Studies Group and New Drug Development Office, and the Lung Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 15, 2090-6.
- Arents, G, Burlingame, RW, Wang, BC, Love, WE and Moudrianakis, EN. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10148-52.
- Arents, G and Moudrianakis, EN. (1993). Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10489-93.

- Ashkenazi, A and Dixit, VM. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-8.
- Asumendi, A, Andollo, N, Boyano, MD, Hilario, E, Perez-Yarza, G, Atencia, R, Arechaga, J and Garcia-Sanz, M. (2000). The role of cleavage of cell structures during apoptosis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46, 1-11.
- Bacso, Z, Everson, RB and Eliason, JF. (2000). The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res* 60, 4623-8.
- Bae, YS, Chiba, M, Ohira, M and Ikeda, H. (1991). A shuttle vector for analysis of illegitimate recombination in mammalian cells: effects of DNA topoisomerase inhibitors on deletion frequency. *Gene* 101, 285-9.
- Bednar, J, Horowitz, RA, Grigoryev, SA, Carruthers, LM, Hansen, JC, Koster, AJ and Woodcock, CL. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14173-8.
- Bedoyan, JK, Lejnine, S, Makarov, VL and Langmore, JP. (1996). Condensation of rat telomere-specific nucleosomal arrays containing unusually short DNA repeats and histone H1. *J Biol Chem* 271, 18485-93.
- Beere, HM, Chresta, CM, Alejo Herberg, A, Skladanowski, A, Dive, C, Larsen, AK and Hickman, JA. (1995). Investigation of the mechanism of higher order chromatin fragmentation observed in drug-induced apoptosis. *Mol.Pharmacol.* 47, 986-996.
- Belani, CP, Doyle, LA and Aisner, J. (1994). Etoposide: current status and future perspectives in the management of malignant neoplasms. *Cancer Chemother Pharmacol* 34, S118-26.
- Belmont, AS, Braunfeld, MB, Sedat, JW and Agard, DA. (1989). Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro. *Chromosoma* 98, 129-43.
- Belmont, AS and Bruce, K. (1994). Visualization of G1 chromosomes: a folded, twisted, supercoiled chromonema model of interphase chromatid structure. *J Cell Biol* 127, 287-302.
- Belmont, AS, Sedat, JW and Agard, DA. (1987). A three-dimensional approach to mitotic chromosome structure: evidence for a complex hierarchical organization. *J Cell Biol* 105, 77-92.
- Berezney, R. (1991). The nuclear matrix: a heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus. *J Cell Biochem* 47, 109-23.
- Berezney, R and Coffey, DS. (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 60, 1410-7.
- Berezney, R and Coffey, DS. (1975). Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA. *Science* 189, 291-3.
- Berger, NA, Chatterjee, S, Schmotzer, JA and Helms, SR. (1991). Etoposide (VP-16-213)-induced gene alterations: potential contribution to cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8740-3.
- Bernardi, G. (1993). The vertebrate genome: isochores and evolution. *Mol Biol Evol* 10, 186-204.
- Berrios, M, Osheroff, N and Fisher, PA. (1985). In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the Drosophila nuclear matrix fraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4142-6.
- Bertrand, R, Kerrigan, D, Sarang, M and Pommier, Y. (1991a). Cell death induced by topoisomerase inhibitors. Role of calcium in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 42, 77-85.

- Bertrand, R, Sarang, M, Jenkin, J, Kerrigan, D and Pommier, Y. (1991b). Differential induction of secondary DNA fragmentation by topoisomerase II inhibitors in human tumor cell lines with amplified c-myc expression. *Cancer Res* 51, 6280-5.
- Bertrand, R, Solary, E, Jenkins, J and Pommier, Y. (1993). Apoptosis and its modulation in human promyelocytic HL-60 cells treated with DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Exp. Cell Res.* 207, 388-397.
- Bicknell, GR, Snowden, RT and Cohen, GM. (1994). Formation of high molecular mass DNA fragments is a marker of apoptosis in the human leukaemic cell line, U937. *J Cell Sci* 107, 2483-9.
- Binder, C, Binder, L, Kroemker, M, Schulz, M and Hiddemann, W. (1997). Influence of cycloheximide-mediated downregulation of glucose transport on TNF alpha-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 236, 223-30.
- Blackburn, EH. (1991a). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-73.
- Blackburn, EH. (1991b). Telomeres. *Trends Biochem Sci* 16, 378-81.
- Bode, J, Kohwi, Y, Dickinson, L, Joh, T, Klehr, D, Mielke, C and Kohwi-Shigematsu, T. (1992). Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix- associating DNAs. *Science* 255, 195-7.
- Bode, J and Maass, K. (1988). Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* 27, 4706-11.
- Bodley, AL, Huang, HC, Yu, C and Liu, LF. (1993). Integration of simian virus 40 into cellular DNA occurs at or near topoisomerase II cleavage hot spots induced by VM-26 (teniposide). *Mol Cell Biol* 13, 6190-200.
- Boise, LH, Gonzalez-Garcia, M, Postema, CE, Ding, L, Lindsten, T, Turka, LA, Mao, X, Nunez, G and Thompson, CB. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
- Boland, MP, Fitzgerald, KA and O'Neill, LA. (2000). Topoisomerase II is required for mitoxantrone to signal nuclear factor kappa B activation in HL60 cells. *J Biol Chem* 275, 25231-8.
- Boldin, MP, Mett, IL, Varfolomeev, EE, Chumakov, I, Shemer-Avni, Y, Camonis, JH and Wallach, D. (1995). Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *J Biol Chem* 270, 387-91.
- Bordas, J, Perez-Grau, L, Koch, MH, Vega, MC and Nave, C. (1986a). The superstructure of chromatin and its condensation mechanism. I. Synchrotron radiation X-ray scattering results. *Eur Biophys J* 13, 157-73.
- Bordas, J, Perez-Grau, L, Koch, MH, Vega, MC and Nave, C. (1986b). The superstructure of chromatin and its condensation mechanism. II. Theoretical analysis of the X-ray scattering patterns and model calculations. *Eur Biophys J* 13, 175-85.
- Borgnetto, ME, Zunino, F, Tinelli, S, Käs, E and Capranico, G. (1996). Drug-specific sites of topoisomerase II DNA cleavage in Drosophila chromatin: heterogeneous localization and reversibility. *Cancer Res.* 56, 1855-1862.
- Bornfleth, H, Edelmann, P, Zink, D, Cremer, T and Cremer, C. (1999). Quantitative motion analysis of subchromosomal foci in living cells using four-dimensional microscopy. *Biophys J* 77, 2871-86.

- Bortner, CD and Cidlowski, JA. (1999). Caspase independent/dependent regulation of K(+), cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis. *J Biol Chem* 274, 21953-62.
- Bortner, CD and Cidlowski, JA. (2000). Volume regulation and ion transport during apoptosis. *Methods Enzymol* 322, 421-33.
- Bortner, CD, Hughes, FM, Jr. and Cidlowski, JA. (1997). A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 32436-42.
- Bortner, CD, Oldenburg, NBE and Cidlowski, JA. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 5, 21-26.
- Bossy-Wetzel, E, Newmeyer, DD and Green, DR. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD- specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* 17, 37-49.
- Boulikas, T. (1995). Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol*, 279-388.
- Bradbury, EM. (1998). Nucleosome and chromatin structures and functions. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 30-31, 177-184.
- Broeker, PL, Super, HG, Thirman, MJ, Pomykala, H, Yonebayashi, Y, Tanabe, S, Zeleznik Le, N and Rowley, JD. (1996). Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* 87, 1912-1922.
- Brown, DG, Sun, XM and Cohen, GM. (1993). Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J.Biol.Chem.* 268, 3037-3039.
- Brownell, JE and Allis, CD. (1996). Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6, 176-84.
- Brownell, JE, Zhou, J, Ranalli, T, Kobayashi, R, Edmondson, DG, Roth, SY and Allis, CD. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-51.
- Bugg, BY, Danks, MK, Beck, WT and Suttle, DP. (1991). Expression of a mutant DNA topoisomerase II in CCRF-CEM human leukemic cells selected for resistance to teniposide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7654-8.
- Burgoyne, LA, Hewish, DR and Mobbs, J. (1974). Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem J* 143, 67-72.
- Cain, K, Inayat-Hussain, SH, Wolfe, JT and Cohen, GM. (1994). DNA fragmentation into 200-250 and/or 30-50 kilobase pair fragments in rat liver nuclei is stimulated by Mg²⁺ alone and Ca²⁺/Mg²⁺ but not by Ca²⁺ alone. *FEBS Lett* 349, 385-91.
- Canman, CE and Kastan, MB. (1996). Signal transduction. Three paths to stress relief [news; comment]. *Nature* 384, 213-4.
- Canman, CE, Tang, HY, Normolle, DP, Lawrence, TS and Maybaum, J. (1992). Variations in patterns of DNA damage induced in human colorectal tumor cells by 5-fluorodeoxyuridine: implications for mechanisms of resistance and cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10474-8.

- Capranico, G, Zunino, F. (1992). DNA topoisomerase-trapping antitumor drugs. *Eur J Cancer* 28, 2055-60.
- Carle, GF, Frank, M and Olson, MV. (1986). Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 232, 65-8.
- Carruthers, LM, Bednar, J, Woodcock, CL and Hansen, JC. (1998). Linker histones stabilize the intrinsic salt-dependent folding of nucleosomal arrays: mechanistic ramifications for higher-order chromatin folding. *Biochemistry* 37, 14776-87.
- Casciola-Rosen, LA, Anhalt, GJ and Rosen, A. (1995). DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med* 182, 1625-34.
- Cha, RS and Thilly, WG. (1993). Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl* 3, S18-29.
- Chandler, JM, Cohen, GM and MacFarlane, M. (1998). Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem* 273, 10815-8.
- Chen, DL, Swe, M and Sit, KH. (1998). G-band expression and megabase fragmentations in apoptosis. *Exp. Cell Res.* 240, 293-304.
- Chen, GL, Yang, L, Rowe, TC, Halligan, BD, Tewey, KM and Liu, LF. (1984). Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* 259, 13560-6.
- Chinnaiyan, AM, O'Rourke, K, Tewari, M and Dixit, VM. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-12.
- Chipev, CC and Wolffe, AP. (1992). Chromosomal organization of *Xenopus laevis* oocyte and somatic 5S rRNA genes in vivo. *Mol Cell Biol* 12, 45-55.
- Chong, S, Taylor, KA and Piper, AA. (1995). Intragenic matrix attachment and DNA-protein interactions in the human X-linked Hprt gene. *Biochim Biophys Acta* 1264, 103-14.
- Chow, KC and Ross, WE. (1987). Topoisomerase-specific drug sensitivity in relation to cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 7, 3119-23.
- Clark, DJ and Kimura, T. (1990). Electrostatic mechanism of chromatin folding. *J Mol Biol* 211, 883-96.
- Cockerill, PN. (1990). Nuclear matrix attachment occurs in several regions of the IgH locus. *Nucleic Acids Res* 18, 2643-8.
- Cockerill, PN and Garrard, WT. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44, 273-82.
- Cockerill, PN, Yuen, MH and Garrard, WT. (1987). The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J Biol Chem* 262, 5394-7.
- Cohen, GM, Sun, XM, Fearnhead, H, MacFarlane, M, Brown, DG, Snowden, RT and Dinsdale, D. (1994). Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol* 153, 507-16.
- Cohen, GM, Sun, XM, Snowden, RT, Dinsdale, D and Skilleter, DN. (1992). Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 286, 331-4.

- Collins, SJ, Gallo, RC and Gallagher, RE. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270, 347-9.
- Craig, JM and Bickmore, WA. (1994). The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes [see comments] [published erratum appears in *Nat Genet* 1994 Aug;7(4): 551]. *Nat.Genet.* 7, 376-382.
- Crane-Robinson, C and Ptitsyn, OB. (1989). Binding of the globular domain of linker histones H5/H1 to the nucleosome: a hypothesis. *Protein Eng* 2, 577-82.
- Crute, JJ, Wahl, AF and Bambara, RA. (1986). Purification and characterization of two new high molecular weight forms of DNA polymerase delta. *Biochemistry* 25, 26-36.
- Cryns, V and Yuan, J. (1998). Proteases to die for [published erratum appears in *Genes Dev* 1999 Feb 1;13(3):371]. *Genes Dev* 12, 1551-70.
- Cutting, GR, Antonarakis, SE, Youssoufian, H and Kazazian, HH, Jr. (1988). Accuracy and limitations of pulsed field gel electrophoresis in sizing partial deletions of the factor VIII gene. *Mol Biol Med* 5, 173-84.
- Daneholt, B. (1999). Pre-mRNP particles: From gene to nuclear pore. *Curr Biol* 9, R412-5.
- Dasso, M, Dimitrov, S and Wolffe, AP. (1994). Nuclear assembly is independent of linker histones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12477-81.
- Datta, R, Kojima, H, Yoshida, K and Kufe, D. (1997). Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 20317-20.
- Davie, JR. (1995). The nuclear matrix and the regulation of chromatin organization and function. *Int Rev Cytol*, 191-250.
- Davies, SM, Robson, CN, Davies, SL and Hickson, ID. (1988). Nuclear topoisomerase II levels correlate with the sensitivity of mammalian cells to intercalating agents and epipodophyllotoxins. *J Biol Chem* 263, 17724-9.
- de Lange, T. (1992). Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *EMBO J.* 11, 717-724.
- de Lange, T. (1994). Activation of telomerase in a human tumor [comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2882-5.
- Del Bino, G, Skierski, JS and Darzynkiewicz, Z. (1990). Diverse effects of camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I, on the cell cycle of lymphocytic (L1210, MOLT-4) and myelogenous (HL-60, KG1) leukemic cells. *Cancer Res* 50, 5746-50.
- Deppert, W. (1996). Binding of MAR-DNA elements by mutant p53: possible implications for its oncogenic functions. *J Cell Biochem* 62, 172-80.
- Desagher, S and Martinou, JC. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10, 369-77.
- Dijkwel, PA and Hamlin, JL. (1988). Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites, genes, and an interamplicon junction in the amplified dihydrofolate reductase domain of Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol* 8, 5398-409.
- Dijkwel, PA and Hamlin, JL. (1995). Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm. *Int Rev Cytol*, 455-84.

- Doggett, NA, Smith, CL and Cantor, CR. (1992). The effect of DNA concentration on mobility in pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 20, 859-64.
- Don, MM, Ablett, G, Bishop, CJ, Bundesen, PG, Donald, KJ, Searle, J and Kerr, JF. (1977). Death of cells by apoptosis following attachment of specifically allergized lymphocytes in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 55, 407-17.
- Dretzen, G, Bellard, M, Sassone-Corsi, P and Chambon, P. (1981). A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal Biochem* 112, 295-8.
- Dubrez, L, Goldwasser, F, Genne, P, Pommier, Y and Solary, E. (1995). The role of cell cycle regulation and apoptosis triggering in determining the sensitivity of leukemic cells to topoisomerase I and II inhibitors. *Leukemia* 9, 1013-24.
- Dullea, RG, Robinson, JF and Bedford, JS. (1999). Nonrandom degradation of DNA in human leukemic cells during radiation- induced apoptosis. *Cancer Res* 59, 3712-8.
- Dunham, I, Lengauer, C, Cremer, T and Featherstone, T. (1992). Rapid generation of chromosome-specific aliphoid DNA probes using the polymerase chain reaction. *Hum Genet* 88, 457-62.
- Durrieu, F, Belloc, F, Lacoste, L, Dumain, P, Chabrol, J, Dachary-Prigent, J, Morjani, H, Boisseau, MR, Reiffers, J, Bernard, P et al. (1998). Caspase activation is an early event in anthracycline-induced apoptosis and allows detection of apoptotic cells before they are ingested by phagocytes. *Exp Cell Res* 240, 165-75.
- Durrieu, F, Samejima, K, Fortune, JM, Kandels-Lewis, S, Osheroff, N and Earnshaw, WC. (2000). DNA topoisomerase II α interacts with CAD nuclease and is involved in chromatin condensation during apoptotic execution. *Curr Biol* 10, 923-6.
- Earnshaw, WC. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 7, 337-43.
- Earnshaw, WC. (1999). Apoptosis. A cellular poison cupboard. *Nature* 397, 387, 389.
- Earnshaw, WC, Halligan, B, Cooke, CA, Heck, MM and Liu, LF. (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol* 100, 1706-15.
- Earnshaw, WC and Heck, MM. (1985). Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J Cell Biol* 100, 1716-25.
- Earnshaw, WC, Martins, LM and Kaufmann, SH. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- Edmondson, DG, Smith, MM and Roth, SY. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev* 10, 1247-59.
- Ellis, RE, Jacobson, DM and Horvitz, HR. (1991a). Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 129, 79-94.
- Ellis, RE, Yuan, JY and Horvitz, HR. (1991b). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7, 663-98.
- Emoto, Y, Manome, Y, Meinhardt, G, Kisaki, H, Kharbanda, S, Robertson, M, Ghayur, T, Wong, WW, Kamen, R, Weichselbaum, R et al. (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *Embo J* 14, 6148-56.
- Enari, M, Hase, A and Nagata, S. (1995). Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells. *Embo J* 14, 5201-8.

- Enari, M, Sakahira, H, Yokoyama, H, Okawa, K, Iwamatsu, A and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD [see comments] [published erratum appears in Nature 1998 May 28;393(6683):396]. *Nature* 391, 43-50.
- Eng, WK, Faucette, L, Johnson, RK and Sternglanz, R. (1988). Evidence that DNA topoisomerase I is necessary for the cytotoxic effects of camptothecin. *Mol Pharmacol* 34, 755-60.
- Evan, GI, Wyllie, AH, Gilbert, CS, Littlewood, TD, Land, H, Brooks, M, Waters, CM, Penn, LZ and Hancock, DC. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-28.
- Fajkus, J, Kovarik, A, Kralovics, R and Bezdek, M. (1995a). Organization of telomeric and subtelomeric chromatin in the higher plant *Nicotiana tabacum*. *Mol Gen Genet* 247, 633-8.
- Fajkus, J, Kralovics, R, Kovarik, A and Fajkusova, L. (1995b). The telomeric sequence is directly attached to the HRS60 subtelomeric tandem repeat in tobacco chromosomes. *FEBS Lett* 364, 33-5.
- Fajkus, J, Nicklas, JA and Hancock, R. (1998). DNA loop domains in a 1.4-Mb region around the human hprt gene mapped by cleavage mediated by nuclear matrix-associated topoisomerase II. *Mol Gen Genet* 260, 410-6.
- Falcieri, E, Gobbi, P, Cataldi, A, Zamai, L, Faenza, I and Vitale, M. (1994a). Nuclear pores in the apoptotic cell. *Histochem J* 26, 754-63.
- Falcieri, E, Gobbi, P, Zamai, L and Vitale, M. (1994b). Ultrastructural features of apoptosis. *Scanning Microsc* 8, 653-65.
- Fanning, TG and Singer, MF. (1987). LINE-1: a mammalian transposable element. *Biochim Biophys Acta* 910, 203-12.
- Farache, G, Razin, SV, Targa, FR and Scherrer, K. (1990). Organization of the 3'-boundary of the chicken alpha globin gene domain and characterization of a CR 1-specific protein binding site. *Nucleic Acids Res* 18, 401-9.
- Felsenfeld, G. (1992). Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* 355, 219-24.
- Ferguson, LR and Baguley, BC. (1996). Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes. *Mutat Res* 355, 91-101.
- Fernandes, DJ and Catapano, CV. (1995). The nuclear matrix as a site of anticancer drug action. *Int Rev Cytol*, 539-76.
- Fernandes, DJ, Danks, MK and Beck, WT. (1990). Decreased nuclear matrix DNA topoisomerase II in human leukemia cells resistant to VM-26 and m-AMSA. *Biochemistry* 29, 4235-41.
- Fesus, L. (1991). Apoptosis fashions T and B cell repertoire. *Immunol Lett* 30, 277-82.
- Fey, EG and Penman, S. (1988). Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 121-5.
- Filipski, J, Leblanc, J, Youdale, T, Sikorska, M and Walker, PR. (1990). Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures. *EMBO J.* 9, 1319-1327.
- Finch, JT and Klug, A. (1976). Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1897-901.

- Finch, JT, Lutter, LC, Rhodes, D, Brown, RS, Rushton, B, Levitt, M and Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* 269, 29-36.
- Fletcher, TM and Hansen, JC. (1996). The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 6, 149-88.
- Fraser, A and Evan, G. (1996). A license to kill. *Cell* 85, 781-4.
- French, BT, Patrick, DE, Grever, MR and Trewyn, RW. (1990). Differential effect of 6-ethylmercaptapurine on c-myc expression in wild-type and HGPRT-deficient HL-60 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 27, 171-7.
- Fry, AM, Chresta, CM, Davies, SM, Walker, MC, Harris, AL, Hartley, JA, Masters, JR and Hickson, ID. (1991). Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in human tumor cell lines. *Cancer Res* 51, 6592-5.
- Gasser, SM, Amati, BB, Cardenas, ME and Hofmann, JF. (1989). Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function. *Int Rev Cytol* 119, 57-96.
- Gasser, SM and Laemmli, UK. (1986). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* 46, 521-30.
- Georgiev, GP, Vassetzky, YS, Jr., Luchnik, AN, Chernokhvostov, VV and Razin, SV. (1991). A. E. Braunstein Plenary Lecture. Nuclear skeleton, DNA domains and control of replication and transcription. *Eur J Biochem* 200, 613-24.
- Gervais, FG, Xu, D, Robertson, GS, Vaillancourt, JP, Zhu, Y, Huang, J, LeBlanc, A, Smith, D, Rigby, M, Shearman, MS et al. (1999). Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid- beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97, 395-406.
- Ghibelli, L, Fanelli, C, Rotilio, G, Lafavia, E, Coppola, S, Colussi, C, Civitareale, P and Ciriolo, MR. (1998). Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *Faseb J* 12, 479-86.
- Ghibelli, L, Maresca, V, Coppola, S and Gualandi, G. (1995). Protease inhibitors block apoptosis at intermediate stages: a compared analysis of DNA fragmentation and apoptotic nuclear morphology. *FEBS Lett.* 377, 9-14.
- Gill-Super, HJ, McCabe, NR, Thirman, MJ, Larson, RA, LeBeau, MM, Pedersen-Bjergaard, J, Philip, P, Diaz, MO, Rowley, JD. (1993). Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA topoisomerase II. *Blood* 82, 3705.
- Glynn, JM, Cotter, TG and Green, DR. (1992). Apoptosis induced by Actinomycin D, Camptothecin or Aphidicolin can occur in all phases of the cell cycle. *Biochem Soc Trans* 20, 84S.
- Golstein, P. (1997). Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol* 7, R750-3.
- Gomez-Angelats, M, Bortner, CD and Cidlowski, JA. (2000). Cell volume regulation in immune cell apoptosis. *Cell Tissue Res* 301, 33-42.
- Gong, J, Li, X and Darzynkiewicz, Z. (1993). Different patterns of apoptosis of HL-60 cells induced by cycloheximide and camptothecin. *J Cell Physiol* 157, 263-70.

- Gorczyca, W, Gong, J and Darzynkiewicz, Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53, 1945-51.
- Gosden, J, Hanratty, D, Starling, J, Fantes, J, Mitchell, A and Porteous, D. (1991). Oligonucleotide-primed in situ DNA synthesis (PRINS): a method for chromosome mapping, banding, and investigation of sequence organization. *Cytogenet Cell Genet* 57, 100-4.
- Gottesman, MM. (1993). How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 53, 747-54.
- Gottlieb, GS and Fennewald, MA. (1996). UV photoaffinity labeling of Tn3 transposase--DNA complexes: identification of DNA binding domains. *Can J Microbiol* 42, 46-59.
- Graziano, V, Gerchman, SE, Schneider, DK and Ramakrishnan, V. (1994). Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament. *Nature* 368, 351-4.
- Greider, CW. (1991). Telomeres. *Curr Opin Cell Biol* 3, 444-51.
- Gromova, II, Nielsen, OF and Razin, SV. (1995a). Long-range fragmentation of the eukaryotic genome by exogenous and endogenous nucleases proceeds in a specific fashion via preferential DNA cleavage at matrix attachment sites. *J.Biol.Chem.* 270, 18685-18690.
- Gromova, II, Thomsen, B and Razin, SV. (1995b). Different topoisomerase II antitumor drugs direct similar specific long-range fragmentation of an amplified c-MYC gene locus in living cells and in high-salt-extracted nuclei. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 102-106.
- Gross, A, Yin, XM, Wang, K, Wei, MC, Jockel, J, Milliman, C, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P and Korsmeyer, SJ. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 274, 1156-63.
- Grossbach, U. (1995). Selective distribution of histone H1 variants and high mobility group proteins in chromosomes. *Semin Cell Biol* 6, 237-46.
- Grunstein, M, Hecht, A, Fisher-Adams, G, Wan, J, Mann, RK, Strahl-Bolsinger, S, Laroche, T and Gasser, S. (1995). The regulation of euchromatin and heterochromatin by histones in yeast. *J Cell Sci Suppl* 19, 29-36.
- Haag, MM, Krystosek, A, Arenson, E, Puck, TT. (1994). Reverse transformation and genome exposure in the C6 glial tumor cell line. *Cancer Invest* 12, 33-45.
- Hahn, T, Toker, L, Budilovsky, S, Aderka, D, Eshhar, Z and Wallach, D. (1985). Use of monoclonal antibodies to a human cytotoxin for its isolation and for examining the self-induction of resistance to this protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3814-8.
- Han, YH, Austin, MJ, Pommier, Y and Povirk, LF. (1993). Small deletion and insertion mutations induced by the topoisomerase II inhibitor teniposide in CHO cells and comparison with sites of drug-stimulated DNA cleavage in vitro. *J Mol Biol* 229, 52-66.
- Han, Z, Malik, N, Carter, T, Reeves, WH, Wyche, JH and Hendrickson, EA. (1996). DNA-dependent protein kinase is a target for a CPP32-like apoptotic protease. *J Biol Chem* 271, 25035-40.
- Hansen, JC, Tse, C and Wolffe, AP. (1998). Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 37, 17637-41.

- Hashimoto, H, Chatterjee, S and Berger, NA. (1995a). Inhibition of etoposide (VP-16)-induced DNA recombination and mutant frequency by Bcl-2 protein overexpression. *Cancer Res* 55, 4029-35.
- Hashimoto, H, Chatterjee, S and Berger, NA. (1995b). Mutagenic activity of topoisomerase I inhibitors. *Clin Cancer Res* 1, 369-76.
- Hayes, JJ and Wolffe, AP. (1992). The interaction of transcription factors with nucleosomal DNA. *Bioessays* 14, 597-603.
- Hebbes, TR, Thorne, AW and Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *Embo J* 7, 1395-402.
- Heller, C and Pohl, FM. (1989). A systematic study of field inversion gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 17, 5989-6003.
- Hellinger, RB, Goodman, HM, Boyer, HW. (1974). Analysis of the endonuclease EcoRI fragments of the DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose gel electrophoresis. *J. Virol.* 14, 1235-1244.
- Hendzel, MJ and Davie, JR. (1991). Dynamically acetylated histones of chicken erythrocytes are selectively methylated. *Biochem J* 273, 753-8.
- Hendzel, MJ, Nishioka, WK, Raymond, Y, Allis, CD, Bazett-Jones, DP and Th'ng, JP. (1998). Chromatin condensation is not associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273, 24470-8.
- Hengartner, MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-6.
- Hengartner, MO, Ellis, RE and Horvitz, HR. (1992). *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature* 356, 494-9.
- Hengartner, MO and Horvitz, HR. (1994a). The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345, 243-6.
- Hengartner, MO and Horvitz, HR. (1994b). Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4, 581-6.
- Henikoff, S. (1990). Position-effect variegation after 60 years. *Trends Genet* 6, 422-6.
- Henikoff, S. (1994). A reconsideration of the mechanism of position effect. *Genetics* 138, 1-5.
- Herben, VM, ten Bokkel Huinink, WW and Beijnen, JH. (1996). Clinical pharmacokinetics of topotecan. *Clin Pharmacokinet* 31, 85-102.
- Hewish, DR and Burgoyne, LA. (1973). Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun* 52, 504-10.
- Hinchliffe, JR. (1981). Cell death in embryogenesis. London: Chapman and Hall.
- Hockenbery, D, Nunez, G, Milliman, C, Schreiber, RD and Korsmeyer, SJ. (1990). Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348, 334-6.
- Hollowood, K and Macartney, JC. (1991). Reduced apoptotic cell death in follicular lymphoma. *J Pathol* 163, 337-42.
- Holmes, SE, Dombroski, BA, Krebs, CM, Boehm, CD and Kazazian, HH, Jr. (1994). A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. *Nat Genet* 7, 143-8.

- Holmgren, L, Szeles, A, Rajnavolgyi, E, Folkman, J, Klein, G, Ernberg, I and Falk, KI. (1999). Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies [see comments]. *Blood* 93, 3956-63.
- Holtmann, H and Wallach, D. (1987). Down regulation of the receptors for tumor necrosis factor by interleukin 1 and 4 beta-phorbol-12-myristate-13-acetate. *J Immunol* 139, 1161-7.
- Horowitz, RA, Agard, DA, Sedat, JW and Woodcock, CL. (1994). The three-dimensional architecture of chromatin in situ: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J Cell Biol* 125, 1-10.
- Horwitz, SB and Horwitz, MS. (1973). Effects of camptothecin on the breakage and repair of DNA during the cell cycle. *Cancer Res* 33, 2834-6.
- Houghton, JA. (1999). Apoptosis and drug response. *Curr Opin Oncol* 11, 475-81.
- Howe, L, Ranalli, TA, Allis, CD and Ausio, J. (1998). Transcriptionally active *Xenopus laevis* somatic 5 S ribosomal RNA genes are packaged with hyperacetylated histone H4, whereas transcriptionally silent oocyte genes are not. *J Biol Chem* 273, 20693-6.
- Howell, DM and Martz, E. (1988). Nuclear disintegration induced by cytotoxic T lymphocytes. Evidence against damage to the nuclear envelope of the target cell. *J Immunol* 140, 689-92.
- Hsiang, YH, Lihou, MG and Liu, LF. (1989). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res* 49, 5077-82.
- Huberman, JA. (1981). New views of the biochemistry of eucaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase alpha. *Cell* 23, 647-8.
- Hughes, FM, Jr. and Cidlowski, JA. (1998). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis: protease-dependent activation of cell shrinkage and DNA degradation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65, 207-17.
- Hughes, FM, Jr. and Cidlowski, JA. (1999). Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo. *Adv Enzyme Regul* 39, 157-71.
- Hughes, FM, Jr. and Cidlowski, JA. (2000). Apoptotic nuclease assays. *Methods Enzymol* 322, 47-62.
- Hughes, FM, Jr., Evans-Storms, RB and Cidlowski, JA. (1998). Evidence that non-caspase proteases are required for chromatin degradation during apoptosis. *Cell Death Differ* 5, 1017-27.
- Hurle, JM. (1988). Cell death in developing systems. *Methods Achiev Exp Pathol* 13, 55-86.
- Husain, I, Mohler, JL, Seigler, HF and Besterman, JM. (1994). Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res* 54, 539-46.
- Hwu, HR, Roberts, JW, Davidson, EH and Britten, RJ. (1986). Insertion and/or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3875-9.
- Iarovaia, O, Hancock, R, Lagarkova, M, Miassod, R and Razin, SV. (1996). Mapping of genomic DNA loop organization in a 500-kilobase region of the *Drosophila* X chromosome by the topoisomerase II-mediated DNA loop excision protocol. *Mol. Cell Biol.* 16, 302-308.
- Iarovaia, OV, Lagarkova, MA and Razin, SV. (1995). The specificity of human lymphocyte nucleolar DNA long-range fragmentation by endogenous topoisomerase II and exogenous Bal 31 nuclease depends on cell proliferation status. *Biochemistry* 34, 4133-8.

- Ijdo, JW, Wells, RA, Baldini, A and Reeders, ST. (1991). Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Res* 19, 4780.
- Irmeler, M, Thome, M, Hahne, M, Schneider, P, Hofmann, K, Steiner, V, Bodmer, JL, Schroter, M, Burns, K, Mattmann, C et al. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP [see comments]. *Nature* 388, 190-5.
- Jackson, DA and Cook, PR. (1985). Transcription occurs at a nucleoskeleton. *Embo J* 4, 919-25.
- Jackson, DA, Dickinson, P and Cook, PR. (1990). The size of chromatin loops in HeLa cells. *Embo J* 9, 567-71.
- Jacobson, MD, Burne, JF and Raff, MC. (1994). Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *Embo J* 13, 1899-910.
- Jarman, AP and Higgs, DR. (1988). Nuclear scaffold attachment sites in the human globin gene complexes. *Embo J* 7, 3337-44.
- Kanda, T, Sullivan, KF and Wahl, GM. (1998). Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr Biol* 8, 377-85.
- Karpen, GH. (1994). Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev* 4, 281-91.
- Käs, E and Chasin, LA. (1987). Anchorage of the Chinese hamster dihydrofolate reductase gene to the nuclear scaffold occurs in an intragenic region. *J Mol Biol* 198, 677-92.
- Käs, E and Laemmli, UK. (1992). In vivo topoisomerase II cleavage of the Drosophila histone nd satellite III repeats: DNA sequence and structural characteristics. *The EMBO Journal* 11, 705-716.
- Käs, E, Poljak, L, Adachi, Y and Laemmli, UK. (1993). A model for chromatin opening: stimulation of topoisomerase II and restriction enzyme cleavage of chromatin by distamycin. *Embo J* 12, 115-26.
- Kass, SU, Landsberger, N and Wolffe, AP. (1997a). DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* 7, 157-65.
- Kass, SU, Pruss, D and Wolffe, AP. (1997b). How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 13, 444-9.
- Kaufmann, SH. (1989). Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res.* 49, 5870-5878.
- Kaufmann, SH. (1998). Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Biophys Acta* 1400, 195-211.
- Kaufmann, SH, Desnoyers, S, Ottaviano, Y, Davidson, NE and Poirier, GG. (1993). Specific proteolytic cleavage of poly-(ADP-ribose)-polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53, 3976-85.
- Kaufmann, SH and Earnshaw, WC. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 256, 42-9.
- Kaufmann, SH, Mesner, PW, Jr., Samejima, K, Tone, S and Earnshaw, WC. (2000). Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. *Methods Enzymol* 322, 3-15.

- Kaufmann, SH and Shaper, JH. (1991). Association of topoisomerase II with the hepatoma cell nuclear matrix: the role of intermolecular disulfide bond formation. *Exp Cell Res* 192, 511-23.
- Kayalar, C, Ord, T, Testa, MP, Zhong, LT and Bredesen, DE. (1996). Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2234-8.
- Kellum, R and Schedl, P. (1991). A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell* 64, 941-50.
- Kerr, JF. (1971). Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 105, 13-20.
- Kerr, JF, Harmon, B and Searle, J. (1974). An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J Cell Sci* 14, 571-85.
- Kerr, JF, Wyllie, AH and Currie, AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.
- Keshet, I, Lieman-Hurwitz, J and Cedar, H. (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 44, 535-43.
- Khodarev, NN, Bennett, T, Shearing, N, Sokolova, I, Koudelik, J, Walter, S, Villalobos, M and Vaughan, AT. (2000). LINE L1 retrotransposable element is targeted during the initial stages of apoptotic DNA fragmentation. *J Cell Biochem* 79, 486-95.
- Khodarev, NN, Narayana, A, Constantinou, A and Vaughan, AT. (1997). Topologically constrained domains of supercoiled DNA in eukaryotic cells. *DNA Cell Biol* 16, 1051-8.
- Kingston, RE, Bunker, CA and Imbalzano, AN. (1996). Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev* 10, 905-20.
- Kischkel, FC, Hellbardt, S, Behrmann, I, Germer, M, Pawlita, M, Krammer, PH and Peter, ME. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-88.
- Klehr, D, Schlake, T, Maass, K and Bode, J. (1992). Scaffold-attached regions (SAR elements) mediate transcriptional effects due to butyrate. *Biochemistry* 31, 3222-9.
- Klug, A, Rhodes, D, Smith, J, Finch, JT and Thomas, JO. (1980). A low resolution structure for the histone core of the nucleosome. *Nature* 287, 509-16.
- Kokileva, L. (1994). Multi-step chromatin degradation in apoptosis. DNA breakdown in apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol* 105, 339-43.
- Kokileva, L. (1995). Comparative study of induction of endogenous DNA degradation in rat liver nuclei and intact thymocytes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 111, 35-43.
- Koopman, G, Reutelingsperger, CP, Kuijten, GA, Keehnen, RM, Pals, ST and van, OMH. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-20.
- Kornberg, RD. (1977). Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 46, 931-54.
- Kornberg, RD and Thomas, JO. (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184, 865-8.

- Korsmeyer, SJ. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80, 879-86.
- Korsmeyer, SJ, McDonnell, TJ, Nunez, G, Hockenbery, D and Young, R. (1990). Bcl-2: B cell life, death and neoplasia. *Curr Top Microbiol Immunol* 166, 203-7.
- Koseki, T, Inohara, N, Chen, S and Nunez, G. (1998). ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5156-60.
- Kothakota, S, Azuma, T, Reinhard, C, Klippel, A, Tang, J, Chu, K, McGarry, TJ, Kirschner, MW, Kohts, K, Kwiatkowski, DJ et al. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-8.
- Kramer, JA and Krawetz, SA. (1996). Nuclear matrix interactions within the sperm genome. *J Biol Chem* 271, 11619-22.
- Kratzmeier, M, Albig, W, Hanecke, K and Doenecke, D. (2000). Rapid dephosphorylation of H1 histones after apoptosis induction. *J Biol Chem* 275, 30478-86.
- Krystosek, A. (1999). Preferential sites of early DNA cleavage in apoptosis and the pathway of nuclear damage. *Histochem Cell Biol* 111, 265-76.
- Krystosek, A and Puck, TT. (1990). The spatial distribution of exposed nuclear DNA in normal, cancer, and reverse-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6560-4.
- Kubista, M, Hagmar, P, Nielsen, PE and Norden, B. (1990). Reinterpretation of linear dichroism of chromatin supports a perpendicular linker orientation in the folded state. *J Biomol Struct Dyn* 8, 37-54.
- Kuida, K, Haydar, TF, Kuan, CY, Gu, Y, Taya, C, Karasuyama, H, Su, MS, Rakic, P and Flavell, RA. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-337.
- Kuribayashi, N, Sakagami, H, Iida, M and Takeda, M. (1996). Chromatin structure and endonuclease sensitivity in human leukemic cell lines. *Anticancer Res* 16, 1225-30.
- Kyriakis, JM and Avruch, J. (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18, 567-77.
- LaCasse, EC, Baird, S, Korneluk, RG and MacKenzie, AE. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17, 3247-59.
- Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Laemmli, UK. (1978). Levels of organization of the DNA in eucaryotic chromosomes. *Pharmacol Rev* 30, 469-76.
- Laemmli, UK, Cheng, SM, Adolph, KW, Paulson, JR, Brown, JA and Baumbach, WR. (1978). Metaphase chromosome structure: the role of nonhistone proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42, 351-60.
- Laemmli, UK, Käs, E, Poljak, L and Adachi, Y. (1992). Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev* 2, 275-85.
- Lagarkova, MA, Iarovaia, OV and Razin, SV. (1995). Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers. *J.Biol.Chem.* 270, 20239-20241.

- Lazebnik, YA, Cole, S, Cooke, CA, Nelson, WG and Earnshaw, WC. (1993). Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol* 123, 7-22.
- Lazebnik, YA, Kaufmann, SH, Desnoyers, S, Poirier, GG and Earnshaw, WC. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-7.
- Lazebnik, YA, Takahashi, A, Moir, RD, Goldman, RD, Poirier, GG, Kaufmann, SH and Earnshaw, WC. (1995). Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9042-6.
- Lee, DY, Hayes, JJ, Pruss, D and Wolffe, AP. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72, 73-84.
- Lejnine, S, Makarov, VL and Langmore, JP. (1995). Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2393-7.
- Leuba, SH, Yang, G, Robert, C, Samori, B, van Holde, K, Zlatanova, J and Bustamante, C. (1994). Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11621-5.
- Levine, B, Huang, Q, Isaacs, JT, Reed, JC, Griffin, DE and Hardwick, JM. (1993). Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature* 361, 739-42.
- Levy-Wilson, B. (1990). DNaseI hypersensitive sites at the 3' end of the human apolipoprotein B gene. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 162-8.
- Li, E, Beard, C, Forster, AC, Bestor, TH and Jaenisch, R. (1993a). DNA methylation, genomic imprinting, and mammalian development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 297-305.
- Li, E, Beard, C and Jaenisch, R. (1993b). Role for DNA methylation in genomic imprinting [see comments]. *Nature* 366, 362-5.
- Li, H, Zhu, H, Xu, CJ and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, P, Nijhawan, D, Budihardjo, I, Srinivasula, SM, Ahmad, M, Alnemri, ES and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89.
- Li, X, Gong, J, Feldman, E, Seiter, K, Traganos, F and Darzynkiewicz, Z. (1994). Apoptotic cell death during treatment of leukemias. *Leuk Lymphoma* 13, 65-70.
- Liu, LF. (1983). DNA topoisomerases--enzymes that catalyse the breaking and rejoining of DNA. *CRC Crit Rev Biochem* 15, 1-24.
- Liu, LF. (1989). DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 58, 351-75.
- Liu, QY, Ribecco, M, Pandey, S, Walker, PR and Sikorska, M. (1999a). Apoptosis-related functional features of the DNaseI-like family of nucleases. *Ann N Y Acad Sci* 887, 60-76.
- Liu, X, Kim, CN, Pohl, J and Wang, X. (1996). Purification and characterization of an interleukin-1beta-converting enzyme family protease that activates cysteine protease P32 (CPP32). *J Biol Chem* 271, 13371-6.

- Liu, X, Li, P, Widlak, P, Zou, H, Luo, X, Garrard, WT and Wang, X. (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 8461-8466.
- Liu, X, Zou, H, Slaughter, C and Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-84.
- Liu, X, Zou, H, Widlak, P, Garrard, W and Wang, X. (1999b). Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem* 274, 13836-40.
- Loike, JD and Horwitz, SB. (1976). Effect of VP-16-213 on the intracellular degradation of DNA in HeLa cells. *Biochemistry* 15, 5443-8.
- Long, BH, Musial, ST and Brattain, MG. (1984). Comparison of cytotoxicity and DNA breakage activity of congeners of podophyllotoxin including VP16-213 and VM26: a quantitative structure- activity relationship. *Biochemistry* 23, 1183-8.
- Lonn, U, Lonn, S, Nysten, U and Winblad, G. (1989). Altered formation of DNA in human cells treated with inhibitors of DNA topoisomerase II (etoposide and teniposide). *Cancer Res* 49, 6202-7.
- Loo, DT, Copani, A, Pike, CJ, Whitemore, ER, Walencewicz, AJ and Cotman, CW. (1993). Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7951-5.
- Lorico, A, Boiocchi, M, Rappa, G, Sen, S, Erba, E and D'Incalci, M. (1990). Increase in topoisomerase-II-mediated DNA breaks and cytotoxicity of VP16 in human U937 lymphoma cells pretreated with low doses of methotrexate. *Int J Cancer* 45, 156-62.
- Lozzio, CB and Lozzio, BB. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-34.
- Luger, K, Mader, AW, Richmond, RK, Sargent, DF and Richmond, TJ. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution [see comments]. *Nature* 389, 251-60.
- Lydersen, BK and Pettijohn, DE. (1980). Human-specific nuclear protein that associates with the polar region of the mitotic apparatus: distribution in a human/hamster hybrid cell. *Cell* 22, 489-99.
- Makarov, VL, Lejnine, S, Bedoyan, J and Langmore, JP. (1993). Nucleosomal organization of telomere-specific chromatin in rat. *Cell* 73, 775-87.
- Mandel, M and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53, 159-62.
- Manders, EM, Kimura, H and Cook, PR. (1999). Direct imaging of DNA in living cells reveals the dynamics of chromosome formation. *J Cell Biol* 144, 813-21.
- Maniatis, T, Fritsch, F. Sambrook, J. (1985). Molecular cloning. New York: Cold Spring Harbor.
- Martelli, AM, Bareggi, R, Bortul, R, Grilli, V, Narducci, P and Zwyer, M. (1997). The nuclear matrix and apoptosis. *Histochem Cell Biol* 108, 1-10.
- Martelli, AM, Bortul, R, Fackelmayer, FO, Tazzari, PL, Bareggi, R, Narducci, P and Zwyer, M. (1999). Biochemical and morphological characterization of the nuclear matrix from apoptotic HL-60 cells. *J Cell Biochem* 72, 35-46.

- Martin, SJ, O'Brien, GA, Nishioka, WK, McGahon, AJ, Mahboubi, A, Saido, TC and Green, DR. (1995). Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 270, 6425-8.
- Martins, LM, Kottke, T, Mesner, PW, Basi, GS, Sinha, S, Frigon, N, Jr., Tatar, E, Tung, JS, Bryant, K, Takahashi, A et al. (1997a). Activation of multiple interleukin-1beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 7421-30.
- Martins, LM, Mesner, PW, Kottke, TJ, Basi, GS, Sinha, S, Tung, JS, Svingen, PA, Madden, BJ, Takahashi, A, McCormick, DJ et al. (1997b). Comparison of caspase activation and subcellular localization in HL-60 and K562 cells undergoing etoposide-induced apoptosis. *Blood* 90, 4283-96.
- Mashima, T, Naito, M, Fujita, N, Noguchi, K and Tsuruo, T. (1995). Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 1185-92.
- Maxam, AM and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 560-4.
- McCarthy, RE, Junius, V, Farber, S, Lazarus, H and Foley, GE. (1965). Cytogenetic analysis of human lymphoblasts in continuous culture. *Exp Cell Res* 40, 197-200.
- McDonnell, TJ and Korsmeyer, SJ. (1991). Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349, 254-6.
- McIlroy, D, Sakahira, H, Talanian, RV and Nagata, S. (1999). Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli. *Oncogene* 18, 4401-8.
- McIlroy, D, Tanaka, M, Sakahira, H, Fukuyama, H, Suzuki, M, Yamamura, K, Ohsawa, Y, Uchiyama, Y and Nagata, S. (2000). An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev* 14, 549-58.
- Mesner, PW, Jr. and Kaufmann, SH. (1997). Methods utilized in the study of apoptosis. *Adv Pharmacol* 41, 57-87.
- Miassod, R, Razin, SV and Hancock, R. (1997). Distribution of topoisomerase II-mediated cleavage sites and relation to structural and functional landmarks in 830 kb of Drosophila DNA. *Nucleic Acids Res* 25, 2041-2046.
- Mirkovitch, J, Mirault, ME and Laemmli, UK. (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell* 39, 223-232.
- Monnat, RJ, Jr. (1989). Molecular analysis of spontaneous hypoxanthine phosphoribosyltransferase mutations in thioguanine-resistant HL-60 human leukemia cells. *Cancer Res* 49, 81-7.
- Monnat, RJ, Jr., Chiaverotti, TA, Hackmann, AF and Maresh, GA. (1992a). Molecular structure and genetic stability of human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene duplications. *Genomics* 13, 788-96.
- Monnat, RJ, Jr., Hackmann, AF and Chiaverotti, TA. (1992b). Nucleotide sequence analysis of human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) gene deletions. *Genomics* 13, 777-87.
- Moore, J, Boswell, S, Hoffman, R, Burgess, G and Hromas, R. (1993). Mutant H-ras over-expression inhibits a random apoptotic nuclease in myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 17, 703-9.

- Morris, T, Masson, W, Singleton, B and Thacker, J. (1993). Analysis of Large Deletions in the HPRT Gene of Primary Human Fibroblasts Using the Polymerase Chain Reaction. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 19, 9-19.
- Muggia, FM and Kelley, SL. (1992). Teniposide in adult solid tumors: a historical perspective. *Semin Oncol* 19, 43-50.
- Mullenders, LH, van, ZAA and Natarajan, AT. (1983). Comparison of DNA loop size and supercoiled domain size in human cells. *Mutat Res* 112, 245-52.
- Murgia, M, Pizzo, P, Sandona, D, Zanovello, P, Rizzuto, R and Di, VF. (1992). Mitochondrial DNA is not fragmented during apoptosis. *J Biol Chem* 267, 10939-41.
- Murray, NE, Bruce, SA and Murray, K. (1979). Molecular cloning of the DNA ligase gene from bacteriophage T4. II. Amplification and preparation of the gene product. *J Mol Biol* 132, 493-505.
- Muzio, M, Chinnaiyan, AM, Kischkel, FC, O'Rourke, K, Shevchenko, A, Ni, J, Scaffidi, C, Bretz, JD, Zhang, M, Gentz, R et al. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-27.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-65.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12-8.
- Nagata, S and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-56.
- Nakamura, S, Takeshima, M, Nakamura, Y, Ohtake, S and Matsuda, T. (1997). Induction of apoptosis in HL60 leukemic cells by anticancer drugs in combination with anti-Fas monoclonal antibody. *Anticancer Res* 17, 173-9.
- Nakayasu, H and Berezney, R. (1991). Nuclear matrices: identification of the major nuclear matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10312-6.
- Nan, X, Campoy, FJ and Bird, A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88, 471-81.
- Nedospasov, SA and Georgiev, GP. (1980). Non-random cleavage of SV40 DNA in the compact minichromosome and free in solution by micrococcal nuclease. *Biochem Biophys Res Commun* 92, 532-9.
- Neuzil, J, Svensson, I, Weber, T, Weber, C and Brunk, UT. (1999). alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis in Jurkat T cells involves caspase-3 activation, and both lysosomal and mitochondrial destabilisation. *FEBS Lett* 445, 295-300.
- Nicholson, DW. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-42.
- Nicholson, DW and Thornberry, NA. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Noll, M. (1974a). Internal structure of the chromatin subunit. *Nucleic Acids Res* 1, 1573-8.
- Noll, M. (1974b). Subunit structure of chromatin. *Nature* 251, 249-51.
- Norton, VG, Imai, BS, Yau, P and Bradbury, EM. (1989). Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* 57, 449-57.

- Oberhammer, FA, Fritsch, G, Schmied, M, Pavelka, M, Printz, D, Purchio, T, Lassmann, H and Schulte-Hermann, R. (1993a). Condensation of the chromatin at the membrane of an apoptotic nucleus is not associated with activation of an endonuclease. *J Cell Sci* 104, 317-26.
- Oberhammer, FA, Wilson, JW, Dive, C, Morris, ID, Hickman, JA, Wakeling, AE, Walker, PR and Sikorska, M. (1993b). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 12, 3679-3684.
- Oberhammer, FA, Hochegger, K, Froschl, G, Tiefenbacher, R and Pavelka, M. (1994). Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J Cell Biol* 126, 827-37.
- Ohsawa, Y, Isahara, K, Kanamori, S, Shibata, M, Kametaka, S, Gotow, T, Watanabe, T, Kominami, E and Uchiyama, Y. (1998). An ultrastructural and immunohistochemical study of PC12 cells during apoptosis induced by serum deprivation with special reference to autophagy and lysosomal cathepsins. *Arch Histol Cytol* 61, 395-403.
- Olins, AL and Olins, DE. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183, 330-2.
- Oltvai, ZN, Milliman, CL and Korsmeyer, SJ. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-19.
- Oppenheim, RW. (1985). Cyclic GMP and neurone death [letter]. *Nature* 313, 248.
- Oppenheim, RW. (1991). Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 14, 453-501.
- Osborn, MT and Chambers, TC. (1996). Role of the stress-activated/c-Jun NH2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs. *J Biol Chem* 271, 30950-5.
- Pan, G, O'Rourke, K and Dixit, VM. (1998). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273, 5841-5.
- Pandey, S, Walker, PR and Sikorska, M. (1994). Separate pools of endonuclease activity are responsible for internucleosomal and high molecular mass DNA fragmentation during apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 72, 625-629.
- Paranjape, SM, Kamakaka, RT and Kadonaga, JT. (1994). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 63, 265-97.
- Pardue, ML and Hennig, W. (1990). Heterochromatin: junk or collectors item? *Chromosoma* 100, 3-7.
- Paulson, JR and Laemmli, UK. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817-28.
- Pazin, MJ, Bhargava, P, Geiduschek, EP and Kadonaga, JT. (1997). Nucleosome mobility and the maintenance of nucleosome positioning. *Science* 276, 809-12.
- Pederson, T. (2000). Half a century of "the nuclear matrix". *Mol Biol Cell* 11, 799-805.
- Peitsch, MC and Tschoop, J. (1994). Granzyme B. *Methods Enzymol* 244, 80-7.
- Pennings, S, Meersseman, G and Bradbury, EM. (1994). Linker histones H1 and H5 prevent the mobility of positioned nucleosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10275-9.

- Phi-van, L, Sellke, C, von, BA and Stratling, WH. (1998). An initiation zone of chromosomal DNA replication at the chicken lysozyme gene locus. *J Biol Chem* 273, 18300-7.
- Phi-Van, L, von, KJP, Ostertag, W and Stratling, WH. (1990). The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol Cell Biol* 10, 2302-7.
- Pienta, KJ, Getzenberg, RH and Coffey, DS. (1991). Cell structure and DNA organization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1, 355-85.
- Politz, JC, Tuft, RA, Pederson, T and Singer, RH. (1999). Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr Biol* 9, 285-91.
- Poljak, L, Seum, C, Mattioni, T and Laemmli, UK. (1994). SARs stimulate but do not confer position independent gene expression. *Nucleic Acids Res* 22, 4386-94.
- Polunovsky, VA, Wendt, CH, Ingbar, DH, Peterson, MS and Bitterman, PB. (1994). Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res* 214, 584-94.
- Pommier, Y, Capranico, G, Orr, A and Kohn, KW. (1991). Distribution of topoisomerase II cleavage sites in simian virus 40 DNA and the effects of drugs. *J Mol Biol* 222, 909-24.
- Pommier, Y, Orr, A, Kohn, KW and Riou, JF. (1992). Differential effects of amsacrine and epipodophyllotoxins on topoisomerase II cleavage in the human c-myc protooncogene. *Cancer Res* 52, 3125-30.
- Porter, AG. (1999). Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 9, 394-401.
- Powell, BC, Sleight, MJ, Ward, KA and Rogers, GE. (1983). Mammalian keratin gene families: organisation of genes coding for the B2 high-sulphur proteins of sheep wool. *Nucleic Acids Res* 11, 5327-46.
- Pruss, D, Bartholomew, B, Persinger, J, Hayes, J, Arents, G, Moudrianakis, EN and Wolffe, AP. (1996). An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres [see comments]. *Science* 274, 614-7.
- Ptashne, M. (1988). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 335, 683-9.
- Purves, D, Snider, WD and Voyvodic, JT. (1988). Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 336, 123-8.
- Qi, L and Sit, KH. (1998). Euchromatin megabase cleavages and conjoint apoptotic-autophagic death expression with nucleolar ball-and-socket joint dislocations in human Chang liver cells arrested in S-phase by etoposide. *Eur J Cell Biol* 77, 239-46.
- Raff, MC. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.
- Raff, MC, Barres, BA, Burne, JF, Coles, HS, Ishizaki, Y and Jacobson, MD. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262, 695-700.
- Rao, L, Perez, D and White, E. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135, 1441-55.
- Rasola, A, Farahi, FD, Hofman, P and Rossi, B. (1999). Lack of internucleosomal DNA fragmentation is related to Cl(-) efflux impairment in hematopoietic cell apoptosis. *Faseb J* 13, 1711-23.

- Razin, SV, De, MGCV and Scherrer, K. (1994). Characterization of the chromatin structure in the upstream region of the chicken alpha-globin gene domain. *Mol Gen Genet* 242, 649-52.
- Razin, SV, Gromova, II and Iarovaia, OV. (1995). Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. *Int Rev Cytol*, 405-48.
- Razin, SV, Hancock, R, Iarovaia, O, Westergaard, O, Gromova, I and Georgiev, GP. (1993). Structural-functional organization of chromosomal DNA domains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 25-35.
- Razin, SV, Kekelidze, MG, Lukanidin, EM, Scherrer, K and Georgiev, GP. (1986). Replication origins are attached to the nuclear skeleton. *Nucleic Acids Res* 14, 8189-207.
- Razin, SV, Petrov, P and Hancock, R. (1991). Precise localization of the alpha-globin gene cluster within one of the 20- to 300-kilobase DNA fragments released by cleavage of chicken chromosomal DNA at topoisomerase II sites in vivo: evidence that the fragments are DNA loops or domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88, 8515-8519.
- Reed, J. (2000). Apoptosis: Academic Press.
- Reed, JC, Miyashita, T, Krajewski, S, Takayama, S, Aime-Sempe, C, Kitada, S, Sato, T, Wang, HG, Harigai, M, Hanada, M et al. (1996). Bcl-2 family proteins and the regulation of programmed cell death in leukemia and lymphoma. *Cancer Treat Res* 84, 31-72.
- Renauld, H, Gasser, SM. (1997). Heterochromatin: a meiotic matchmaker? *Trends Cell Biol* 7, 201-205.
- Rich, T, Allen, RL and Wyllie, AH. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-83.
- Richmond, TJ, Rechsteiner, T and Luger, K. (1993). Studies of nucleosome structure. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 265-72.
- Robertson, JD, Orrenius, S and Zhivotovsky, B. (2000). Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* 129, 346-58.
- Robinett, CC, Straight, A, Li, G, Willhelm, C, Sudlow, G, Murray, A and Belmont, AS. (1996). In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition. *J Cell Biol* 135, 1685-700.
- Rollini, P, Namciu, SJ, Marsden, MD and Fournier, RE. (1999). Identification and characterization of nuclear matrix-attachment regions in the human serpin gene cluster at 14q32.1. *Nucleic Acids Res* 27, 3779-91.
- Romig, H, Ruff, J, Fackelmayer, FO, Patil, MS and Richter, A. (1994). Characterisation of two intronic nuclear-matrix-attachment regions in the human DNA topoisomerase I gene. *Eur.J.Biochem.* 221, 411-419.
- Rotman, G and Shiloh, Y. (1998). ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet* 7, 1555-63.
- Rowley, PT, Keng, PC and Kosciolk, BA. (1996). The effect of bcr-abl antisense oligonucleotide on DNA synthesis and apoptosis in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 20, 473-80.
- Roy, C, Brown, DL, Little, JE, Valentine, BK, Walker, PR, Sikorska, M, Leblanc, J and Chaly, N. (1992). The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp Cell Res* 200, 416-24.

- Rusnak, JM, Calmels, TP, Hoyt, DG, Kondo, Y, Yalowich, JC and Lazo, JS. (1996). Genesis of discrete higher order DNA fragments in apoptotic human prostatic carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 49, 244-52.
- Rzepecki, R. (1994). The Complex of the 32-Kd Endonuclease and 65-Kd Protein from Plant Nuclear Matrix Preferentially Recognizes the Plasmid Containing Sar DNA Element. *Journal of Plant Physiology* 144, 479-484.
- Sabol, SL, Li, RN, Lee, TY and Abdul Khalek, R. (1998). Inhibition of apoptosis-associated DNA fragmentation activity in nonapoptotic cells: The role of DNA fragmentation factor-45 (DFF45/ICAD). *BIOCHEMICAL.AND.BIOPHYSICAL.RESEARCH.COMMUNICATIONS*. 253, 151-158.
- Sadoni, N, Langer, S, Fauth, C, Bernardi, G, Cremer, T, Turner, BM and Zink, D. (1999). Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* 146, 1211-26.
- Sahara, S, Aoto, M, Eguchi, Y, Imamoto, N, Yoneda, Y and Tsujimoto, Y. (1999). Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation [see comments]. *Nature* 401, 168-73.
- Saiki, RK, Scharf, S, Faloona, F, Mullis, KB, Horn, GT, Erlich, HA and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4.
- Saitoh, Y and Laemmli, UK. (1993). From the chromosomal loops and the scaffold to the classic bands of metaphase chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 755-65.
- Saitoh, Y and Laemmli, UK. (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* 76, 609-22.
- Sakahira, H, Enari, M and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis [see comments]. *Nature* 391, 96-9.
- Sakahira, H, Enari, M, Ohsawa, Y, Uchiyama, Y and Nagata, S. (1999). Apoptotic nuclear morphological change without DNA fragmentation. *Curr Biol* 9, 543-6.
- Salvesen, GS and Dixit, VM. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91, 443-6.
- Samejima, K and Earnshaw, WC. (1998). ICAD/DFF regulator of apoptotic nuclease is nuclear. *Exp.Cell Res*. 243, 453-459.
- Samejima, K, Tone, S, Kottke, TJ, Enari, M, Sakahira, H, Cooke, CA, Durrieu, F, Martins, LM, Nagata, S, Kaufmann, SH et al. (1998). Transition from caspase-dependent to caspase-independent mechanisms at the onset of apoptotic execution. *J Cell Biol* 143, 225-39.
- Savill, J and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-8.
- Schild, C, Claret, FX, Wahli, W and Wolffe, AP. (1993). A nucleosome-dependent static loop potentiates estrogen-regulated transcription from the *Xenopus* vitellogenin B1 promoter in vitro. *Embo J* 12, 423-33.
- Schlegel, HG. (1985). Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Schneider, U, Schwenk, HU and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 521-6.

Schulze-Osthoff, K, Walczak, H, Droge, W and Krammer, PH. (1994). Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *J Cell Biol* 127, 15-20.

Schwartz, DC and Cantor, CR. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.

Schwartzman, RA and Cidlowski, JA. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 14, 133-51.

Searle, J, Lawson, TA, Abbott, PJ, Harmon, B and Kerr, JF. (1975). An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol* 116, 129-38.

Sedat, J and Manuelidis, L. (1978). A direct approach to the structure of eukaryotic chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42, 331-50.

Sellins, KS and Cohen, JJ. (1987). Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J Immunol* 139, 3199-206.

Sestili, P, Cattabeni, F and Cantoni, O. (1996). Direct excision of 50 kb pair DNA fragments from megabase-sized fragments produced during apoptotic cleavage of genomic DNA. *FEBS Lett.* 396, 337-342.

Shen, X, Yu, L, Weir, JW and Gorovsky, MA. (1995). Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell* 82, 47-56.

Sheridan, JW, Bishop, CJ and Simmons, RJ. (1981). Biophysical and morphological correlates of kinetic change and death in a starved human melanoma cell line. *J Cell Sci* 49, 119-37.

Shi, YF, Sahai, BM and Green, DR. (1989). Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 339, 625-6.

Shu, HB, Halpin, DR and Goeddel, DV. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6, 751-63.

Simpson, RT. (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17, 5524-31.

Singer, MF. (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol* 76, 67-112.

Singer, MF, Krek, V, McMillan, JP, Swergold, GD and Thayer, RE. (1993). LINE-1: a human transposable element. *Gene* 135, 183-8.

Skowronski, J and Singer, MF. (1986). The abundant LINE-1 family of repeated DNA sequences in mammals: genes and pseudogenes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 457-64.

Sleiman, RJ, Catchpoole, DR and Stewart, BW. (1998). Drug-induced death of leukaemic cells after G2/M arrest: higher order DNA fragmentation as an indicator of mechanism. *Br J Cancer* 77, 40-50.

Smith, CL and Cantor, CR. (1987). Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Methods Enzymol* 155, 449-67.

Smith, GC and Jackson, SP. (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 13, 916-34.

Smith, S, Giriat, I, Schmitt, A and de, LT. (1998). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres [see comments]. *Science* 282, 1484-7.

Southern, EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-17.

Stacey, NH, Bishop, CJ, Halliday, JW, Halliday, WJ, Cooksley, WG, Powell, LW and Kerr, JF. (1985). Apoptosis as the mode of cell death in antibody-dependent lymphocytotoxicity. *J Cell Sci* 74, 169-79.

Stanulla, M, Wang, J, Chervinsky, DS, Thandla, S and Aplan, PD. (1997). DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis. *Mol Cell Biol* 17, 4070-9.

Staynov, DZ, Dunn, S, Baldwin, JP and Crane-Robinson, C. (1983). Nuclease digestion patterns as a criterion for nucleosome orientation in the higher order structure of chromatin. *FEBS Lett* 157, 311-5.

Stein, GS, Stein, JL, van Wijnen, AJ and Lian, JB. (1994). Histone gene transcription: a model for responsiveness to an integrated series of regulatory signals mediating cell cycle control and proliferation/differentiation interrelationships. *J. Cell Biochem.* 54, 393-404.

Strachan, T und Read, AP. (1996). Molekulare Humangenetik: Spektrum.

Strasser, A, Harris, AW, Bath, ML and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331-3.

Strasser, A, Harris, AW, Corcoran, LM and Cory, S. (1994). Bcl-2 expression promotes B- but not T-lymphoid development in scid mice. *Nature* 368, 457-60.

Strasser, A, Whittingham, S, Vaux, DL, Bath, ML, Adams, JM, Cory, S and Harris, AW. (1991). Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8661-5.

Strissel, PL, Dann, HA, Pomykala, HM, Diaz, MO, Rowley, JD and Olopade, OI. (1998). Scaffold-associated regions in the human type I interferon gene cluster on the short arm of chromosome 9. *Genomics* 47, 217-29.

Stroh, C and Schulze-Osthoff, K. (1998). Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates [editorial]. *Cell Death Differ* 5, 997-1000.

Stuurman, N, Meijne, AM, van, dPAJ, de, JL, van, DR and van, RJ. (1990). The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *J Biol Chem* 265, 5460-5.

Sugimoto, K, Yamada, K, Egashira, M, Yazaki, Y, Hirai, H, Kikuchi, A and Oshimi, K. (1998). Temporal and spatial distribution of DNA topoisomerase II alters during proliferation, differentiation, and apoptosis in HL-60 cells. *Blood* 91, 1407-1417.

Sun, DY, Jiang, S, Zheng, LM, Ojcius, DM and Young, JD. (1994a). Separate metabolic pathways leading to DNA fragmentation and apoptotic chromatin condensation. *J Exp Med* 179, 559-68.

Sun, XM and Cohen, GM. (1994). Mg(2+)-dependent cleavage of DNA into kilobase pair fragments is responsible for the initial degradation of DNA in apoptosis. *J Biol Chem* 269, 14857-60.

Sun, XM, Snowden, RT, Dinsdale, D, Ormerod, MG and Cohen, GM. (1994b). Changes in nuclear chromatin precede internucleosomal DNA cleavage in the induction of apoptosis by etoposide. *Biochem Pharmacol* 47, 187-95.

Sundstrom, C and Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17, 565-77.

- Susin, SA, Lorenzo, HK, Zamzami, N, Marzo, I, Snow, BE, Brothers, GM, Mangion, J, Jacotot, E, Costantini, P, Loeffler, M et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [see comments]. *Nature* 397, 441-6.
- Svaren, J and Horz, W. (1993). Histones, nucleosomes and transcription. *Curr Opin Genet Dev* 3, 219-25.
- Sykes, RC, Lin, D, Hwang, SJ, Framson, PE and Chinault, AC. (1988). Yeast ARS function and nuclear matrix association coincide in a short sequence from the human HPRT locus. *Mol Gen Genet* 212, 301-9.
- Szopa, J and Adamiec, R. (1993). Is the 65 kDa protein a direct signal for the nuclease release from nuclear matrix, starting the apoptotic cascade? *Acta Biochim Pol* 40, 209-12.
- Szyf, M. (1996). The DNA methylation machinery as a target for anticancer therapy. *Pharmacol Ther* 70, 1-37.
- Takahashi, A, Alnemri, ES, Lazebnik, YA, Fernandes-Alnemri, T, Litwack, G, Moir, RD, Goldman, RD, Poirier, GG, Kaufmann, SH and Earnshaw, WC. (1996). Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8395-400.
- Takashima, A, Noguchi, K, Sato, K, Hoshino, T and Imahori, K. (1993). Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7789-93.
- Talanian, RV, Quinlan, C, Trautz, S, Hackett, MC, Mankovich, JA, Banach, D, Ghayur, T, Brady, KD and Wong, WW. (1997). Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* 272, 9677-82.
- Tang, D and Kidd, VJ. (1998). Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem* 273, 28549-28552.
- Tate, PH and Bird, AP. (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3, 226-31.
- Taunton, J, Hassig, CA and Schreiber, SL. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p [see comments]. *Science* 272, 408-11.
- Terai, C, Kornbluth, RS, Pauza, CD, Richman, DD and Carson, DA. (1991). Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J Clin Invest* 87, 1710-5.
- Thoma, F, Koller, T and Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol* 83, 403-27.
- Thompson, CB. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.
- Thornberry, NA. (1997). The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 53, 478-90.
- Thornberry, NA. (1998). Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 5, R97-103.
- Thornberry, NA and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-6.
- Tommerup, H, Dousmanis, A and de, LT. (1994). Unusual chromatin in human telomeres. *Mol Cell Biol* 14, 5777-85.

- Towbin, H, Staehelin, T and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4.
- Traganos, F, Kapuscinski, J, Gong, J, Ardelt, B, Darzynkiewicz, RJ and Darzynkiewicz, Z. (1993). Caffeine prevents apoptosis and cell cycle effects induced by camptothecin or topotecan in HL-60 cells. *Cancer Res* 53, 4613-8.
- Trauth, BC, Klas, C, Peters, AM, Matzku, S, Moller, P, Falk, W, Debatin, KM and Krammer, PH. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-5.
- Trucco, C, Oliver, FJ, de, MG and Menissier-de, MJ. (1998). DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res* 26, 2644-9.
- Tse, C, Sera, T, Wolffe, AP and Hansen, JC. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* 18, 4629-38.
- Tse, R, Vavougios, G, Hou, Y and Mahuran, DJ. (1996). Identification of an active acidic residue in the catalytic site of beta-hexosaminidase. *Biochemistry* 35, 7599-607.
- Tsujimoto, Y and Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 466, 6-10.
- Turner, BM. (1991). Histone acetylation and control of gene expression. *J Cell Sci* 99, 13-20.
- Turner, BM, Birley, AJ and Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in Drosophila polytene nuclei. *Cell* 69, 375-84.
- Uchiyama, Y. (1995). Apoptosis: The history and trends of its studies. *Arch Histol Cytol* 58, 127-37.
- Ucker, DS, Obermiller, PS, Eckhart, W, Apgar, JR, Berger, NA and Meyers, J. (1992). Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* 12, 3060-3069.
- Udvardy, A and Schedl, P. (1991). Chromatin structure, not DNA sequence specificity, is the primary determinant of topoisomerase II sites of action in vivo. *Mol. Cell Biol.* 11, 4973-4984.
- Udvardy, A, Schedl, P, Sander, M and Hsieh, TS. (1986). Topoisomerase II cleavage in chromatin. *J. Mol. Biol.* 191, 231-246.
- Ura, K, Hayes, JJ and Wolffe, AP. (1995). A positive role for nucleosome mobility in the transcriptional activity of chromatin templates: restriction by linker histones. *Embo J* 14, 3752-65.
- Uren, AG, Coulson, EJ and Vaux, DL. (1998). Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci* 23, 159-62.
- van Holde, K and Zlatanova, J. (1995). Chromatin higher order structure: chasing a mirage? *J Biol Chem* 270, 8373-6.
- Vandenabeele, P, Declercq, W, Vanhaesebroeck, B, Grooten, J and Fiers, W. (1995). Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J Immunol* 154, 2904-13.
- Vaux, DL, Haecker, G and Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76, 777-9.
- Vaux, DL and Korsmeyer, SJ. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-54.

- Vettese-Dadey, M, Grant, PA, Hebbes, TR, Crane- Robinson, C, Allis, CD and Workman, JL. (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *Embo J* 15, 2508-18.
- Villa, P, Kaufmann, SH and Earnshaw, WC. (1997). Caspases and caspase inhibitors. *Trends.Biochem.Sci.* 22, 388-393.
- Vodenicharov, MD, Markova, DZ and Djondjurov, LP. (1996). Spontaneous apoptosis in mouse F4N-S erythroleukemia cells induces a nonrandom fragmentation of DNA. *DNA Cell Biol* 15, 287-96.
- Voelkel-Johnson, C, Entingh, AJ, Wold, WS, Gooding, LR and Laster, SM. (1995). Activation of intracellular proteases is an early event in TNF-induced apoptosis. *J Immunol* 154, 1707-16.
- Vogt, C. (1842). Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (Alytes obstriicians). *Solothurn*.
- Volpi, EV, Chevret, E, Jones, T, Vatcheva, R, Williamson, J, Beck, S, Campbell, RD, Goldsworthy, M, Powis, SH, Ragoussis, J et al. (2000). Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei. *J Cell Sci* 113, 1565-76.
- Wahl, AF, Crute, JJ, Sabatino, RD, Bodner, JB, Marraccino, RL, Harwell, LW, Lord, EM and Bambara, RA. (1986). Properties of two forms of DNA polymerase delta from calf thymus. *Biochemistry* 25, 7821-7.
- Walker, NI, Harmon, BV, Gobe, GC and Kerr, JF. (1988). Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol* 13, 18-54.
- Walker, PR, Kokileva, L, Leblanc, J and Sikorska, M. (1993). Detection of the initial stages of DNA fragmentation in apoptosis. *Biotechniques* 15, 1032-1040.
- Walker, PR and Sikorska, M. (1994). Endonuclease activities, chromatin structure, and DNA degradation in apoptosis. *Biochem Cell Biol* 72, 615-23.
- Walker, PR and Sikorska, M. (1997). New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem Cell Biol* 75, 287-99.
- Walker, PR, Smith, C, Youdale, T, Leblanc, J, Whitfield, JF and Sikorska, M. (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 51, 1078-85.
- Walker, PR, Weaver, VM, Lach, B, LeBlanc, J and Sikorska, M. (1994). Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res* 213, 100-6.
- Wallach, D, Boldin, M, Varfolomeev, E, Beyaert, R, Vandenabeele, P and Fiers, W. (1997). Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding. *FEBS Lett* 410, 96-106.
- Wallach, D, Kovalenko, AV, Varfolomeev, EE and Boldin, MP. (1998). Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol* 10, 279-88.
- Wang, JC. (1987). Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* 909, 1-9.
- Wang, S, Zhou, Y, Lukinius, A, Oberg, K, Skogseid, B and Gobl, A. (1998). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding mouse phospholipase C-beta3. *Biochim Biophys Acta* 1393, 173-8.

- Weaver, VM, Carson, CE, Walker, PR, Chaly, N, Lach, B, Raymond, Y, Brown, DL and Sikorska, M. (1996). Degradation of nuclear matrix and DNA cleavage in apoptotic thymocytes. *J Cell Sci* 109, 45-56.
- Weber, K and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244, 4406-12.
- Weiler, KS and Wakimoto, BT. (1995). Heterochromatin and gene expression in Drosophila. *Annu Rev Genet* 29, 577-605.
- Widlak, P, Li, P, Wang, X and Garrard, WT. (2000). Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase- activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J Biol Chem* 275, 8226-32.
- Widom, J. (1986). Physicochemical studies of the folding of the 100 A nucleosome filament into the 300 A filament. Cation dependence. *J Mol Biol* 190, 411-24.
- Widom, J. (1989). Toward a unified model of chromatin folding. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 18, 365-95.
- Williams, GT. (1991). Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* 65, 1097-8.
- Williams, SP, Athey, BD, Muglia, LJ, Schappe, RS, Gough, AH and Langmore, JP. (1986). Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length. *Biophys J* 49, 233-48.
- Wilson, GG and Murray, NE. (1979). Molecular cloning of the DNA ligase gene from bacteriophage T4. I. Characterisation of the recombinants. *J Mol Biol* 132, 471-91.
- Winston, F and Allis, CD. (1999). The bromodomain: a chromatin-targeting module? [news]. *Nat Struct Biol* 6, 601-4.
- Winter, DB, Gearhart, PJ and Bohr, VA. (1998). Homogeneous rate of degradation of nuclear DNA during apoptosis. *Nucleic Acids Res* 26, 4422-5.
- Wohrl, W and Hacker, G. (1999). Extent and limitation of the control of nuclear apoptosis by DNA-fragmenting factor. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 552-8.
- Wolf, BB, Schuler, M, Echeverri, F and Green, DR. (1999). Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem* 274, 30651-6.
- Wolffe, AP. (1989). Dominant and specific repression of Xenopus oocyte 5S RNA genes and satellite I DNA by histone H1. *Embo J* 8, 527-37.
- Wolffe, AP. (1994). Transcription: in tune with the histones. *Cell* 77, 13-16.
- Wolffe, AP and Guschin, D. (2000). Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription. *J Struct Biol* 129, 102-22.
- Wolffe, AP, Khochbin, S and Dimitrov, S. (1997). What do linker histones do in chromatin? *Bioessays* 19, 249-255.
- Wolffe, AP and Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* 84, 817-9.

- Woodcock, CL, Grigoryev, SA, Horowitz, RA and Whitaker, N. (1993). A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9021-5.
- Woodcock, CL, Horowitz, RA. (1995). Chromatin organization re-viewed. *Trends Cell Biol* 5, 272-277.
- Woods, KM and Chapes, SK. (1993). Three distinct cell phenotypes of induced-TNF cytotoxicity and their relationship to apoptosis. *J Leukoc Biol* 53, 37-44.
- Workman, JL and Buchman, AR. (1993). Multiple functions of nucleosomes and regulatory factors in transcription. *Trends Biochem Sci* 18, 90-5.
- Wu, C. (1997). Chromatin remodeling and the control of gene expression. *J Biol Chem* 272, 28171-4.
- Wyllie, AH. (1998). Apoptosis. An endonuclease at last [news; comment]. *Nature* 391, 20-1.
- Wyllie, AH, Beattie, GJ and Hargreaves, AD. (1981). Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J* 13, 681-92.
- Wyllie, AH, Kerr, JF and Currie, AR. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Wyllie, AH, Morris, RG, Smith, AL and Dunlop, D. (1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142, 67-77.
- Yakovlev, AG, Wang, G, Stoica, BA, Boulares, HA, Spoonde, AY, Yoshihara, K and Smulson, ME. (2000). A role of the Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease in apoptosis and its inhibition by Poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 275, 21302-8.
- Yang, E, Zha, J, Jockel, J, Boise, LH, Thompson, CB and Korsmeyer, SJ. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80, 285-91.
- Yasuhara, N, Eguchi, Y, Tachibana, T, Imamoto, N, Yoneda, Y and Tsujimoto, Y. (1997). Essential role of active nuclear transport in apoptosis. *Genes Cells* 2, 55-64.
- Yin, XM, Wang, K, Gross, A, Zhao, Y, Zinkel, S, Klocke, B, Roth, KA and Korsmeyer, SJ. (1999). Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886-91.
- Yoon, HJ, Choi, IY, Kang, MR, Kim, SS, Muller, MT, Spitzner, JR and Chung, IK. (1998). DNA topoisomerase II cleavage of telomeres in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1395, 110-20.
- Yuan, J and Horvitz, HR. (1992). The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 116, 309-20.
- Zakian, VA. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 270, 1601-7.
- Zamzami, N and Kroemer, G. (1999). Condensed matter in cell death [news; comment]. *Nature* 401, 127-8.
- Zamzami, N, Susin, SA, Marchetti, P, Hirsch, T, Gomez-Monterrey, I, Castedo, M and Kroemer, G. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis [see comments]. *J Exp Med* 183, 1533-44.
- Zhang, H, D'Arpa, P and Liu, LF. (1990). A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons. *Cancer Cells* 2, 23-7.

- Zhang, J, Wang, X, Bove, KE and Xu, M. (1999). DNA fragmentation factor 45-deficient cells are more resistant to apoptosis and exhibit different dying morphology than wild-type control cells. *J Biol Chem* 274, 37450-4.
- Zhao, K, Käs, E, Gonzalez, E and Laemmli, UK. (1993). SAR-dependent mobilization of histone H1 by HMG-I/Y in vitro: HMG-I/Y is enriched in H1-depleted chromatin. *Embo J* 12, 3237-47.
- Zhivotovsky, B, Cedervall, B, Jiang, S, Nicotera, P and Orrenius, S. (1994a). Involvement of Ca²⁺ in the formation of high molecular weight DNA fragments in thymocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 202, 120-7.
- Zhivotovsky, B, Samali, A, Gahm, A and Orrenius, S. (1999). Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 644-51.
- Zhivotovsky, B, Wade, D, Gahm, A, Orrenius, S and Nicotera, P. (1994b). Formation of 50 kbp chromatin fragments in isolated liver nuclei is mediated by protease and endonuclease activation. *FEBS Lett* 351, 150-4.
- Zhou, Q, Snipas, S, Orth, K, Muzio, M, Dixit, VM and Salvesen, GS. (1997). Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* 272, 7797-800.
- Zhou, YB, Gerchman, SE, Ramakrishnan, V, Travers, A and Muyltermans, S. (1998). Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* 395, 402-5.
- Zink, D, Cremer, T, Saffrich, R, Fischer, R, Trendelenburg, MF, Ansorge, W and Stelzer, EH. (1998). Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum Genet* 102, 241-51.

LEBENS LAUF

Tessa Schliephacke, geb. Elbert

Persönliche Daten	Geburtsdatum: Geburtsort: Familienstand:	14.06.1971 Wasserlos Jetzt Alzenau/Ufr verheiratet
Ausbildung	1977 – 1982	Volks- und Teilhauptschule Michelbach
	1982 – 1991	Spessart-Gymnasium Alzenau ➤ Abitur im humanistischen Zweig
	WS1991/92 - SS1992	Technische Hochschule Darmstadt Studiengang Chemie/Diplom
	WS1992/93	Technische Hochschule Darmstadt Studiengang Chemie/Biologie für Lehramt an Gymnasien
	SS1993 - WS 1996/97	Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg Studiengang Biologie/Chemie für Lehramt an Gymnasien ➤ Zwischenprüfung und Erstes Staatsexamen ➤ Zulassungsarbeit: „Versuche zur Einführung von Modifikationen in ein <i>in vitro</i> synthetisiertes tRNA ^{Lys 3} - Konstrukt“ durchgeführt im Institut für Biochemie, Abt. von Herrn Prof. Dr. H.-J. Gross
	4/1997 - 11/1997	Universität Hohenheim Fachbereich Ernährungswissenschaften ➤ Mitarbeit in der Arbeitsgruppe 'Vitamin E und Arteriosklerose' (Prof. Dr. K. Biesalski)
	ab 12/1997	Georg-August-Universität Göttingen Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Abt. Molekularbiologie ➤ Beginn der Arbeit zur vorliegenden Dissertation mit dem Titel: „Beziehungen zwischen der Chromatinstruktur und Apoptose-bedingter DNA- Fragmentierung“. Die Arbeit wurde in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Doenecke unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Albig durchgeführt. Gefördert wurde diese Arbeit von 12/1997 bis 11/2000 von der DFG (Graduiertenkolleg: Molekularbiologische Analyse pathophysiologischer Prozesse).

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

- Allen voran *Herrn Prof. Dr. Doenecke* und *Herrn PD Dr. Albig* für die Überlassung der Arbeit und die wissenschaftliche Betreuung.
- *Herrn Prof. Dr. Jungermann* für seine sofortige Bereitschaft, die Vertretung dieser Arbeit an der Georg-August-Universität Göttingen im Fachbereich Biologie zu übernehmen.
- *Herrn Prof. Dr. Grossbach* für seine Bereitschaft, das Korreferat dieser Arbeit zu übernehmen.
- *Herrn Prof. Dr. Günther* für die Betreuung im Graduiertenkolleg „Molekularbiologische Analyse pathophysiologischer Prozesse“.
- *Herrn Dr. Kratzmeier* für die Betreuung zu Beginn der Arbeit und seine Unterstützung bei der Einarbeitung in das Gebiet der Apoptose.
- Allen Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Hier möchte ich insbesondere *Frau Nicole Döring* für die gute und geduldige Einweisung in die molekularbiologischen Methoden und *Frau Kristina Hänecke* für ihre Hilfe bei so manch aufwendigem Zellversuch danken. Vielen Dank auch für die mir entgegen gebrachte Freundschaft!
- *Frau Christa Bode* aus der Abteilung Molekularbiologie für so manch wertvollen Tip und die gute Organisation und Durchführung unseres Bestellwesens.
- Den *Mitgliedern der Werkstatt* für ihre durchweg unkomplizierte und schnelle Hilfe, dem *Servicelabor (Herrn Andreas Nolte)* und dem *Sekretariat der Biochemie* sowie des *Graduiertenkollegs (Frau Röder)* für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.
- *Herrn Dr. Dressel* für die Hilfe bei den durchflußzytometrischen Messungen.
- Natürlich den fleißigen *Korrekturlesern* der Arbeit!
- *Meinem Mann, meiner Familie, meinem Freundeskreis* und *Frau Dr. Braun* für die Unterstützung auf nicht-wissenschaftlicher Basis und das Verständnis, das sie mir während aller Phasen meiner Dissertation entgegengebracht haben.