

**Aus dem Institut für Toxikologie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
eingereicht
über das Institut für Tierverhalten und Tierschutz
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**„Entwicklung einer innovativen Strategie zur Generierung
von knock-out-Mausmodellen“**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Cerstin Manuela Christel
Tierärztin aus Darmstadt**

Berlin 2003

Journal-Nr.: 2783

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Norbert-Christian Juhr
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Franz Oesch
Dritter Prüfer: Prof. Dr. Michael Schmidt

Deskriptoren: transcription; cell cycle; tetracycline; silencers;
transgenic animals; genes

Tag der Promotion: 06.02.2004

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

D 188

Dissertation, Freie Universität Berlin, 2003

ISBN 3-89820-689-0

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

This document is protected by **copyright**.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of Mensch & Buch Verlag.

© **MENSCH & BUCH VERLAG**, Berlin 2004
Nordendstr. 75, 13156 Berlin • ☎ 030 - 45 49 48 66
<http://www.menschundbuch.de> • info@menschundbuch.de

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	codierende DNA
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
G	Guanin
h	Stunde
ID	Identifikation
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
µl	Mikroliter
M	Molar
mM	Millimol
nM	Nanomol
mg	Milligramm
min	Minute/n
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
pmol	Picomol
polyA	poly adenylation signal
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	rounds per minute

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
T	Thymin
ü.N.	über Nacht
U/ml	Units pro Milliliter
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ μ l	Units pro Mikroliter
UV	Ultraviolett

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
2	Literaturübersicht	9
2.1	Die Labormaus in der biomedizinischen Forschung	9
2.2	Das Tet-System	11
2.3	Das modifizierte Tet-Repressorsystem	14
2.4	Transkriptionsrepression	16
2.5	Repressormoleküle	17
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Chemikalien	23
3.1.2	Verbrauchsmaterial	25
3.1.3	Lösungen, Puffer und Kulturmedien	26
3.1.3.1	Lösungen und Puffer	26
3.1.3.2	Kulturmedien	28
3.1.4	Kits	29
3.1.5	Geräte	30
3.1.6	Software	32
3.1.7	Enzyme	33
3.1.7.1	Restriktionsendonukleasen	33
3.1.7.2	DNA modifizierende Enzyme	33
3.1.8	Synthetische Oligonukleotide	33
3.1.9	Vektoren	35
3.1.9.1	Klonierungsvektoren	35
3.1.9.2	Säuger-Expressionsvektoren	35
3.1.10	Molekulargewichtsmarker	37
3.1.11	Bakterienstämme	37
3.1.12	Zelllinien	37
3.2	Methoden	38
3.2.1	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	38
3.2.1.1	Präparation aus 3 ml Kulturen („Mini-Präp“)	38
3.2.1.2	Präparation aus 30 ml/400 ml Kulturen („Midi-Prep“/„Maxi-Prep“)	38
3.2.2	Screening einer genomischen Mauscosmid-Bank	39
3.2.3	Reinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion	39
3.2.4	Fällen von DNA	40
3.2.5	Bestimmung der DNA-Konzentration	40
3.2.6	PCR	40
3.2.7	DNA-Sequenzierung	40
3.2.8	Agarosegelelektrophorese	41
3.2.9	Präparative Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	41
3.2.10	Restriktionsverdau von DNA	42
3.2.10.1	Analytischer Verdau	42
3.2.10.2	Präparativer Verdau	42
3.2.11	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	42
3.2.12	Auffüllen von DNA 5'-Überhängen	42
3.2.13	Entfernen von DNA 3'-Überhängen	43
3.2.14	Ligation von DNA	43
3.2.15	Herstellung kompetenter Bakterien	43

3.2.16	Transformation	44
3.2.17	Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford	44
3.2.18	Zellkultur	45
3.2.18.1	Kultivieren von NIH 3T3 und HRL9 Zellen	45
3.2.19	Konservierung lebender Zellen	45
3.2.20	Auftauen von Zellen	46
3.2.21	Vorkultur von HRL9 Zellen bzw. HRL9/TetR (B/E)-HDAC 4 Einzelklonen für ihre spätere Behandlung mit Doxycyclin, Trichostatin A und Mimosin	46
3.2.22	Transfektion von Plasmid-DNA in NIH 3T3 und HRL9 Zellen	47
3.2.22.1	Stabile Transfektion mittels Calcium Phosphat Präzipitation	47
3.2.22.2	Transiente Transfektion von NIH 3T3 und HRL 9 Zellen mittels Poly Fect	47
3.2.23	Präparation von Zellysaten für die luminometrische Messung und die Proteinbestimmung	47
3.2.24	Messung der Luciferaseaktivität im Luminometer	48
3.2.25	Präparation von Zellen für die Zellzyklusanalyse im FACS-Gerät	49
3.2.26	Durchführung der FACS-Messung und Auswertung der Daten	49
4	Ergebnisse	52
4.1	Klonierung der Intermediärvektoren und der Transkriptions-repressorkonstrukte	52
4.1.1	Generierung des pCMB 1 hygro Expressionsvektors	52
4.1.2	Einbringen der TetR (B/E)-DNA-Bindedomäne und Homodimerisationsoberfläche in pCMB 1 hygro	52
4.1.3	Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Plasmids	53
4.2	Herstellung von Tet-induzierbaren putativen Transkriptionsrepressoren	55
4.2.1	Klonierung der MeCP2-Transkriptionsrepressionsdomäne (TRD) in pCBM 1 hygro TetR (B/E)	55
4.2.2	Klonierung der Histondeacetylasen 1, 3 und 4 in pCMB 1 hygro Tet-(B/E)	55
4.2.2.1	Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 1-Plasmids	56
4.2.2.2	Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 3-Plasmids	56
4.2.2.3	Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4-Plasmids	56
4.2.2.4	Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Dnmt 3a-Plasmids	57
4.2.2.5	Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-EED-Plasmids	57
4.2.2.6	Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Sin3A –Plasmids	57
4.3	Sequenzierung der hergestellten Repressionskonstrukte am Übergang der TetR (B/E)-cDNA zur jeweiligen Silencermolekül	58
4.4	Generierung des HPRT-Transkriptionsresponders	58
4.4.1	Klonierung des pTRE HPRT d2EGFP NEO-Intermediärkonstruktes	60
4.4.1.1	Klonierung des pIRESneo(-BamHI)-Plasmids	60
4.4.1.2	Klonierung des pTRE IRESneo(-BamHI)-Plasmids	60
4.4.1.3	Klonierung des pTRE d2EGFP IRESneo-Plasmids	60
4.4.1.4	Klonierung des HPRT-Promoters in das pTRE d2EGFP IRESneo-Plasmid	60
4.4.1.5	Klonierung des pTRE HPRT d2EGFP NEO	61
4.4.2	Klonierung des pbs IVS IRES LUC pA-Plasmids	63
4.4.2.1	Klonierung der IVS-DNA in pBlueskript SK(+)	63
4.4.2.2	Klonierung der IRES Luciferase polyA Sequenz in das pbsIVS-Plasmid	63
4.4.3	Klonierung des HPRT-Responderplasmids aus pTRE HPRT d2EGFP NEO und pbsIVS IRES LUC pA	63
4.5	Evaluierung des Repressionspotentials der Designerrepressoren mit Hilfe des HPRT-Responders	64
4.6	Exogene Regulierbarkeit des stabil in NIH 3T3 transfizierten HPRT-Responders durch pCMV-TetR (B/E)-KRAB	66

4.7	Die Luciferaseaktivität der HRL9-Zelllinie wurde durch transiente Transfektion des pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4 reprimiert	69
4.8	Tet-Regulierbarkeit von stabil mit dem Repressorexpressionskonstrukt pCMB1 hygro TetR(B/E)-HDAC 4 transfizierten HRL9-Einzelklonen	72
4.9	Aufhebung der Silencingaktivität im HRL9-pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4 Einzelklon 102 durch Behandlung mit dem Histondeacetylasehemmer Trichostatin A (TSA)	75
4.10	Überprüfung der HDAC 4 induzierten Genrepression im Langzeitversuch	76
4.11	Untersuchung auf eine eventuelle Abhängigkeit zwischen Zellzyklus und der repressiven Wirkung der Histondeacetylaseaktivität auf den hCMV-Minimalpromoter	78
4.12	Untersuchung auf eine eventuelle Abhängigkeit zwischen Zellzyklus und Transkriptionsaktivierung im tripeltransfizierten Einzelklon 102	80
5	Diskussion	83
5.1	Klonierung der Tet-Repressormoleküle und des TRE-Responders	83
5.2	Analyse der Repressoren im transienten Transfektionssassay	84
5.3	Stabile Integration des HPRT-Responders	88
5.4	Transkriptionsregulierung in HRL9-Zellen und deren modifizierten Derivaten	90
5.5	Analyse der Repression mit Hilfe des HDAC-spezifischen Inhibitors TSA	94
5.6	Langzeitstudie zur epigenetischen Modifikation durch HDAC 4	95
5.7	Expressionsalterierung im Zusammenhang mit dem Zellzyklus	96
6	Zusammenfassung	100
7	Summary: „Development of an innovative strategy for generation of knock-out mouse models“	102
8	Literaturverzeichnis	104
9	Danksagung	110
10	Lebenslauf	111

9 Danksagung

Herrn Prof. Jühr gebührt mein Dank für seine Bereitschaft, diese externe Arbeit von Berlin aus zu betreuen. Herrn Prof. Oesch danke ich für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und die Möglichkeit, in der Mainzer Toxikologie zu forschen.

Ernesto Bockamp hatte den Mut, eine ahnungslose Tierärztin als Doktorandin einzustellen und ihr die ersten Schritte ins Reich der Molekularbiologie zu zeigen. Bei ihm konnte ich unzählige Fragen loswerden und in vielen fachlichen Diskussionen von seiner wissenschaftlichen Erfahrung profitieren. Er hat mir aber nicht nur den Start dieser Arbeit ermöglicht, sondern schließlich auch dafür gesorgt, dass sie den hier vorliegenden Abschluss gefunden hat. Danke für Dein Vertrauen und Deinen Zuspruch.

Mein besonderer Dank gilt Rosario Heck und Marko Maringer; ohne Euch hätte ich es nicht geschafft. Eure Hilfe, und was Ihr alles für mich getan habt, war überwältigend. Von Herzen danke ich Euch dafür.

Angélique Renzaho, Stuart Fraser, Leonid Eshkind, Svetlana Ohngemach und Bernd Lecher danke ich für ihre Hilfe und eine Menge Spaß im Labor. Steffen Schmidt hat mir durch die FACS-Messungen wertvolle Ergebnisse geliefert und viele Fragen beantwortet. Danke für Deine Geduld.

Vielen Dank auch an Markus Jülich - Du hast Dir so viel Zeit für mich genommen - auch wenn es nicht funktioniert hat.

Prof. Boujard in Heidelberg danke ich für die Überlassung der HRL 9-Zelllinie.

Die Mitglieder der Arbeitsgruppen Zabel, Decker und Reske-Kunz waren immer für uns da, wenn wir Hilfe brauchten. Danke.

Danke an so viele andere, die ich während meiner Zeit am Institut kennengelernt habe und von denen jeder Einzelne auf die eine oder andere Weise ein Stückchen zu dieser Arbeit beigetragen hat - ein Puzzle besteht aus vielen kleinen Teilen.