

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung der Intermediärvektoren und der Transkriptions-repressorkonstrukte

4.1.1 Generierung des pCMB 1 hygro Expressionsvektors

Um einen eukaryotischen Expressionsvektor zur Verfügung zu haben, welcher sowohl für die Expression von rekombinanten Proteinen in der Zellkultur als auch in transgenen Mäusen geeignet ist, wurde pCMB 1 hygro kloniert.

Das Plasmid pCAGGS (Niwa *et al.*, 1991) wurde zunächst mit HincII geschnitten, gefällt und später mit XbaI verdaut. Auf diese Weise konnte ein Fragment gewonnen werden, das die komplett kodierende Sequenz des Cytomegalovirus Immediate Early (CMV IE) Enhancer/Chicken β -Aktin Promoters enthielt (Transkriptionskassette). Der kommerzielle Expressionsvektor pcDNA 3.1 hygro (Invitrogen) wurde mit NheI verdaut, gefällt und dann mit NruI geschnitten. Das hierbei herausgeschnittene Fragment wurde bei der Ligation durch die oben erhaltene Enhancer/Promoter DNA-Kassette ersetzt. Auf diese Weise entstand pCMB1 hygro. Dieser Vektor enthält die CMV IE Enhancer/Chicken β -Aktin Promoter-Kassette, die für die Expression von rekombinanten Proteinen in der Zellkultur und in transgenen Mäusen geeignet ist, eine entkoppelte Hygromycinresistenzkassette zur Selektion stabiler Klone in der Zellkultur und einen Polylinker zum späteren Einklonieren von Repressordomänen.

4.1.2 Einbringen der TetR (B/E)-DNA-Bindedomäne und Homodimerisationsoberfläche in pCMB 1 hygro

Um die im Folgenden beschriebenen transkriptionellen Repressormoleküle mit Hilfe von Tetracyclin (oder dem Tetracyclinanalogon Doxycyclin, DOX) exogen induzierbar entweder an die DNA zu binden (Repression) oder wieder von ihr loszulösen (De-Repression), wurde die von Forster und Mitarbeitern beschriebene TetR (B/E) Domäne benutzt. Das TetR (B/E) Molekül besteht aus zwei Untereinheiten: Der B-Domäne, welche für die DOX-abhängige DNA-Bindung an die Ankersequenz des Tetracyclinoperons (tetO bzw. Tetracyclin Responsives Element, TRE) gebraucht wird, und die E-Untereinheit, die für die Dimerisierung von zwei TetR (B/E) Molekülen verantwortlich ist (Forster *et al.* 1999). Die Generierung des intermediären pCMB 1 hygro TetR (B/E) Expressionsvektors erfolgte in zwei Schritten:

Der unter 3.1.1 beschriebene pCMB1 hygro wurde zunächst mit HindIII verdaut und das geschnittene Plasmid zur Generierung von *blunt ends* mit Klenow inkubiert. Nach Fällung wurde pCMB1 hygro mit BamHI geschnitten. Ferner wurde pCMV TetR (B/E)-KRAB (Forster *et al.*, 1999) mit EcoRI geschnitten und die entstandenen 5'-Überhänge mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt. Nach Fällung und Restriktion mit BamHI konnte die herausgeschnittene Tet-abhängige Silencer-cDNA in den Polylinker des pCMB1 hygro-Plasmids ligiert werden, wodurch das pCMB1 hygro TetR (B/E)-KRAB-Plasmid entstand. Dieses Plasmid diente als Ausgangsvektor für die Herstellung des im Folgenden beschriebenen pCMB 1 hygro TetR (B/E).

4.1.3 Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Plasmids

Um letztlich ein Plasmid herzustellen, in das hinter die TetR (B/E) codierende Sequenz andere, ausgewählte Silencerdomänen kloniert werden konnten, musste die KRAB-Silencer-cDNA aus dem pCMB1 hygro TetR (B/E)-KRAB-Plasmid entfernt werden.

Zu diesem Zweck wurde pCMV-TetR (B/E)-KRAB mit AccI geschnitten, die 5'-Überhänge mit Klenow aufgefüllt und nach einer Fällung mit PpuMI verdaut. Das hierbei entstandene Fragment der TetR (B/E) codierenden Sequenz wurde in pCMB1 hygro TetR (B/E)-KRAB ligiert, nachdem dieses mit BamHI verdaut, das geschnittene Plasmid zur Generierung von *blunt ends* mit Klenow inkubiert, gefällt und mit PpuMI geschnitten worden war, wobei ein Teil der TetR (B/E)-cDNA und die gesamte KRAB kodierenden Sequenz herausgeschnitten wurden. Auf diese Weise entstand das Plasmid pCMB1 hygro TetR (B/E). Dieses Plasmid wurde als Ausgangsvektor für die im Folgenden beschriebenen Tet-induzierbaren Silencer verwendet. Zum besseren Verständnis zeigt Abb.5 die schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des pCMB 1 hygro TetR (B/E)-Vektors.

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung des pCMB 1 hygro TetR (B/E) Expressionsvektors waren in der Literatur bereits mehrere Gene beschrieben, deren Genprodukte aktive Transkriptionsrepression direkt induzieren konnten oder welche wesentlich am „*shutdown*“ von Genen beteiligt zu sein schienen. Um einen repräsentativen Querschnitt zu erhalten, wurden Moleküle verschiedener Repressorfamilien ausgewählt. Zu den ausgesuchten Repressoren gehörten die *de novo* DNA-Methyltransferase Dnmt3a, das Polycomb-group-Protein (embryonic ectoderm development, EED), die Histondeacetylasen HDAC 1, 3 und 4, der Silencer Sin3A und das Methyl-CpG-bindende Protein MeCP2. Die für die Transkriptionsrepressor codierenden Sequenzen wurden, wie im Folgenden beschrieben, unter

Aufrechterhaltung der jeweiligen codierenden Leserahmen carboxyterminal zur TetR (B/E)-Proteindomäne in pCMB 1 hygro TetR (B/E) einkloniert.

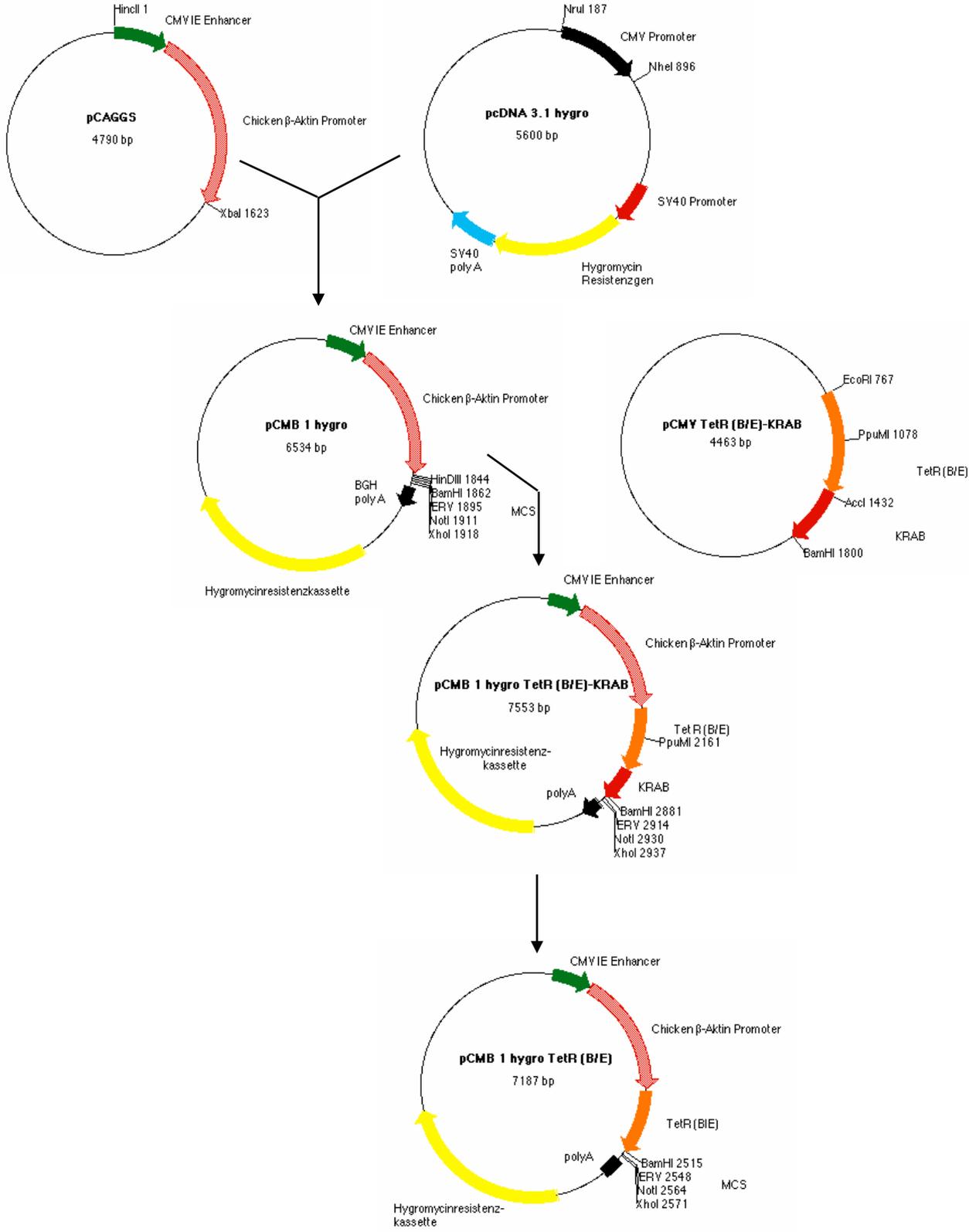


Abb.5 Schematische Darstellung des pCMB 1 hygro TetR (B/E)-Vektors
 Die einzelnen Klonierungsschritte sind unter 3.1 ausführlich beschrieben. Dieser Vektor fungiert später als Akzeptor für alle unter 3.2 vorgestellten Silencer-cDNAs.

4.2 Herstellung von Tet-induzierbaren putativen

Transkriptionsrepressoren

4.2.1 Klonierung der MeCP2-Transkriptionsrepressionsdomäne (TRD) in pCMB 1 hygro TetR (B/E)

Das Methyl-CpG-Bindungsprotein MeCP2 ist ein ubiquitäres Säugerprotein, welches eine Methyl-CpG-Bindungsdomäne sowie eine transkriptionale Repressionsdomäne besitzt. MeCP2 bindet mit seiner Bindungsdomäne an methyliertes CpG (sowohl bei nackter als auch bei in Chromatin verpackter DNA) und die TRD vermittelt dann die transkriptionale Repression, indem sie Sin3A und akzessorische HDACs rekrutiert (Nan et al., 1996; Nan et al., 1997; Bird 1999). Es kommt also zu einer Repression durch Histondeacetylierung. In dieser Arbeit wurde lediglich die TRD in den Expressionsvektor pCMB 1 hygro TetR (B/E) kloniert, da die MeCP2 eigene Methyl-CpG-Bindungsdomäne ja durch die TetR (B/E)-Domäne ersetzt wurde.

pCMB1 hygro TetR (B/E) wurde mit BamHI verdaut und nach der Auffüllung von 5'-Überhängen mit Hilfe der Klenow-Polymerase gefällt und mit NotI geschnitten. Das Plasmid pcDNA 3.1 hygro tTA MeCP2 wurde zunächst mit BssHI verdaut und zur Generierung von *blunt ends* mit Klenow inkubiert. Nach Fällung und Restriktion mit NotI konnte die herausgeschnittene TRD-cDNA des MeCP2 in den Polylinker des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Plasmids ligiert werden.

4.2.2 Klonierung der Histondeacetylasen 1, 3 und 4 in pCMB 1 hygro Tet-(B/E)

Histondeacetylasen sind in der Lage, durch die Deacetylierung der ϵ -Acetamidogruppe des Lysins an den Histonschwänzen des Chromatins die Chromatinstruktur zu verändern (Grunstein 1997; Hassig und Schreiber 1997; Pazin und Kadonaga 1997; Wade und Wolffe 1997). Durch die Deacetylierung kommt es zu einer engeren Verpackung des Chromatins, wodurch das Ansetzen der Transkriptionsmaschinerie der Zelle an der DNA in diesem Abschnitt behindert wird (Roth und Allis, 1996; Wolffe und Pruss, 1996). Weiterhin ist bekannt, dass z.B. die HDAC 4 nicht nur Histone deacetylieren, sondern auch andere Faktoren, die direkt mit Genregulation in Verbindung stehen, von dieser deacetyliert und so in ihrer Wirkung verändert werden (Miska et al. 1999; Wang et al. 1999). Auf Grund ihrer Homologie zur Hefe-Histondeacetylase Rpd3 werden HDAC 1 und HDAC 3 zu der Klasse 1 Histondeacetylasen gerechnet (Vidal und Gaber, 1991), während HDAC 4 Homologie zu der Hefe Histondeacetylase Hda1 besitzt und in die Klasse 2 Histondeacetylasen

eingeteilt wird (Rundlett et al., 1996). Um ihre Aufgaben zu erfüllen assoziieren HDACs auch mit anderen Co-Repressoren wie zum Beispiel Sin3 (Knoepfler und Eisenmann, 1999) und EED (van der Vlag und Otte, 1999).

4.2.2.1 Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 1-Plasmids

pCMB1 hygro TetR (B/E) wurde parallel mit BamHI und EcoRV verdaut. Das Plasmid pING 14A HDAC 1 wurde zunächst mit EcoRI geschnitten und nach der Generierung von *blunt ends* unter Zuhilfenahme der Klenow-Polymerase gefüllt und mit BamHI verdaut. Die so erhaltene HDAC 1- cDNA wurde nun in den Polylinker des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Plasmids ligiert.

4.2.2.2 Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 3-Plasmids

Um die HDAC 3-cDNA aus dem pcDNA 3.1 zero plus-Vektor herausschneiden zu können, musste dieser lediglich mit NaeI verdaut, die DNA gefüllt und dann mit NotI geschnitten werden. pCMB1 hygro TetR (B/E) wurde an seinem Polylinker parallel mit EcoRV und NotI aufgeschnitten und die HDAC 3-Silencer-cDNA einkloniert.

4.2.2.3 Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4-Plasmids

Um die HDAC 4-Silencer-cDNA in das pCMB1 hygro TetR (B/E)-Plasmid klonieren zu können, musste diese zunächst in ein intermediäres Konstrukt (pBlueskript SK(+)) verbracht werden. Zu diesem Zweck wurde pBlueskript SK (+) mit SmaI verdaut und anschließend mit Alkaliner Phosphatase behandelt. pING 14A HDAC 4 wurde mit SacI geschnitten und die 3'-Überhänge mit Hilfe der T4 Polymerase entfernt. Das herausgeschnittene HDAC 4-cDNA-Fragment konnte nun in pBlueskript SK(+) ligiert werden. Das so entstandene Plasmid pbs HDAC 4 wurde dann mit EcoRV verdaut, gefüllt und mit NotI geschnitten. Der Polylinker des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Plasmids wurde mit BamHI und, nach Auffüllen der Schnittstellen mit Klenow und dem Füllen, mit NotI aufgeschnitten. Nun konnte die HDAC 4-Silencer-cDNA in das pCMB1 hygro TetR (B/E) einkloniert werden.

4.2.2.4 Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Dnmt 3a-Plasmids

Die *de novo* Methyltransferase Dnmt3a ist in der Lage, Cytosinbasen, die benachbart zu Guaninbasen liegen und zuvor noch nicht methyliert waren, zu methylieren. Diese Methylierung wird auf die Tochterzellen vererbt (Okano et al., 1998; Fuks et al., 2001).

pCMB1 hygro TetR (B/E) wurde zunächst mit EcoRV und dann nach einer Fällung mit NotI verdaut. Die Dnmt3a-Silencer-cDNA wurde aus ihrem pBacPAK-Vektor mit BamHI und NotI herausgeschnitten, wobei nach dem BamHI Verdau, zur Auffüllung der 5'-Überhänge, eine Inkubation mit Klenow-Polymerase und eine anschließende Fällung folgte. Die Dnmt3a-cDNA konnte nun in den Polylinker des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Plasmids einkloniert werden.

4.2.2.5 Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-EED-Plasmids

Das Polycomb-group-Protein EED formt multimerische Proteinkomplexe, die an der Beibehaltung des transkriptionell-repressiven Status von Genen über Generationen hinweg beteiligt sind. Es interagiert *in vivo* und *in vitro* mit verschiedenen Histondeacetylasen (HDAC 1, 2 und 3), wodurch es zur Repression der Genaktivität kommt (van der Flag und Otte, 1999).

pCMB1 hygro TetR (B/E) wurde mit BamHI aufgeschnitten und die 5'-Überhänge mit Hilfe der Klenow-Polymerase aufgefüllt. Daraufhin wurde der Restriktionsansatz mit Alkaliner Phosphatase behandelt. Das Plasmid pAS2-EED wurde mit BamHI verdaut und nach der Generierung von *blunt ends* mittels der Klenow-Polymerase konnte die EED-Silencer-cDNA in den Polylinker des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Plasmids ligiert werden.

4.2.2.6 Klonierung des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Sin3A –Plasmids

Das ubiquitär exprimierte Multidomänenprotein Sin3A bildet zusammen mit HDAC 1 und HDAC 2 sowie anderen Untereinheiten den HDAC-Komplex. Sin3A besitzt viele Interaktionsdomänen, welche die Bindung an Transkriptionsfaktoren und an der Transkription beteiligter Proteine vermitteln (Nan et al., 1998; Jones et al., 1998). Auch Sin3A alleine ist in der Lage, dazu die Genexpression herunterzuregulieren (Knopfler und Eisenmann, 1999).

Um Sin3A mit Tet (B/E) zu fusionieren wurde im ersten Schritt mit Hilfe einer PCR ein etwa

300 Basenpaar großes Fragment der Sin3A-cDNA amplifiziert und in das pCMB1 hygro TetR (B/E)-Plasmid kloniert. Hierzu wurden zwei Oligonukleotide (Kapitel 2.1.8: CC 048 und CC 051) synthetisiert, die als Duplex an ihrem 5'-Ende einen BamHI-kompatibelen und am 3'-Ende einen EcoRV-kompatibelen Überhang bildeten und so in den durch BamHI/EcoRV-Verdau geöffneten Polylinker des pCMB1 hygro TetR (B/E)-Plasmids kloniert werden konnten. Das auf diese Weise entstandene Intermediärplasmid pCMB1 hygro TetR (B/E)-mSin3A (aa255-545) wurde nun mit EcoNI und XhoI geschnitten. pVZmSin3A wurde mit SspI und EcoNI verdaut und nach dem Fällen mit SalI geschnitten. Das hierbei herausgeschnittene restliche Sin3A-cDNA-Fragment konnte nun an die bereits im pCMB1 hygro TetR (B/E)-Sin3A (aa255-545) Sin3A-cDNA kloniert werden.

4.3 Sequenzierung der hergestellten Repressionskonstrukte am Übergang der TetR (B/E)-cDNA zur jeweiligen Silencermolekül

Um sicher zu gehen, dass bei den generierten Repressorexpressionskonstrukten der Übergang von der TetR (B/E)-cDNA zu der jeweils hieran klonierten Silencermolekül-cDNA auch wirklich im Leserahmen kloniert wurde, wurden die einzelnen Konstrukte sowohl aus der 5' Richtung (immer mit CC 030) wie auch aus der 3' Richtung (siehe Sequenzierprimer für die jeweiligen Silencermoleküle Kapitel 2.1.8) über die Klonierungsstelle hinweg sequenziert. Dies war nötig, da nur eine Klonierung im korrekten Leserahmen die Expression des TetR (B/E)-Silencer-Fusionsproteins gewährleistete. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit Hilfe der Sequencer 3.0.1 Software auf dem Macintosh G3 Computer ausgewertet.

Die Sequenzierung bestätigte die Richtigkeit der erwarteten Nukleotidsequenz in allen generierten Repressorexpressionskonstrukten. Diese konnten nun in den später beschriebenen Repressionsessays getestet werden.

4.4 Generierung des HPRT-Transkriptionsresponders

Um ein brauchbares Testsystem für die in Kapitel 3.2 beschriebenen verschiedenen potentiellen Repressormoleküle zu etablieren, war es notwendig, einen Responder zu generieren. Dieser Responder sollte folgende Eigenschaften haben: Erstens war es wichtig, für die verschiedenen Designerrepressoren spezifische Ankersequenzen zu schaffen. Aus diesem Grund wurde der Responder mit sechs in Tandem angeordneten tet-O Bindungsstellen

versehen. Diese tet-O Sequenzen (auch als TRE bezeichnet) binden die verschiedenen Repressorproteine nur in Abwesenheit von DOX, können aber keine Interaktion mit TetR (B/E)-Repressorproteinen im Beisein von DOX eingehen. Diese wichtige Eigenschaft (Tet *on/off*) ermöglicht das exogen reversible, durch DOX regulierbare Andocken der Repressoren an der Responder-DNA-Kassette. Als zweite essentielle Komponente war es wichtig, einen eukaryotischen Promoter in den Responder zu integrieren, dessen konstitutive, transkriptionelle Aktivität durch den Repressor herunterreguliert werden konnte.

Da bisherige Versuche, bei denen die Transkription von Genen gezielt durch den Einsatz von negativen und positiven Transkriptionsfaktoren reguliert wurde, lediglich mit synthetischen, viralen Promotoren durchgeführt wurden (CMV- und Thymidin Kinase (TK)-Promotoren) (Deuschle et al., 1995; Forster et al., 1999; Freundlieb et al., 1999; Imhof et al., 2000; Ryu et al., 2001; Jiang et al., 2001), wurde hier gezielt ein nicht viraler, eukaryotischer Promoter für den Responder ausgewählt. Der ausgesuchte murine Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Promoter wurde gewählt, da er in allen Geweben konstitutiv exprimiert und seine Transkriptionsregulation in der Literatur im Detail beschrieben wurde (Melton et al., 1996). Der HPRT-Promoter lenkt die Expression der über eine *intra-ribosomal-entry-site* (IRES) gekoppelten Reportergene (d2EGFP= *enhanced green fluorescence protein* und Luciferase). In unmittelbarer Nachbarschaft wurde 5' vom HPRT-Promoter die spezifische Ankersequenz (TRE) der Transkriptionsrepressoren und -aktivatoren kloniert. Desweiteren trägt der Responder eine entkoppelte Neomycinkassette, um eine Selektion von Zellklonen mittels G-418 nach einer stabilen Transfektion zu ermöglichen.

Bis zur endgültigen Fertigstellung des HPRT-Responders bedurfte es vieler einzelner Klonierungsschritte. Zum besseren Verständnis wird daher zunächst auf die Klonierung des Plasmids pTRE HPRT d2EGFP NEO eingegangen und später auf die Klonierung des pbs IVS IRES LUC-Plasmids. Die Ligation dieser beiden Plasmiden führte letztlich zum fertigen HPRT-Responderkonstrukt. Zum besseren Verständnis zeigen die Abbildungen Abb.6 und Abb.7 die schematischen Darstellungen der Klonierungsstrategien des pTRE HPRT d2EGFP NEO-Vektors und des HPRT-Responderkonstruktes aus pTRE HPRT d2EGFP NEO und pbs IVS IHRES LUC, respektive.

4.4.1 Klonierung des pTRE HPRT d2EGFP NEO-Intermediärkonstruktes

4.4.1.1 Klonierung des pIRESneo(-BamHI)-Plasmids

Das Plasmid pIRESneo wurde mit BamHI geschnitten, gefällt, mit EcoRI verdaut und nach dem Auffüllen der 5'-Überhänge mit Hilfe der Klenow-Polymerase religiert. Auf diese Weise entstand das pIRESneo(-BamHI)-Plasmid. Dieser erste Schritt war nötig, um die BamHI Schnittstelle zu zerstören, da es sonst später, nach einklonieren der d2EGFP-cDNA und einem Teil ihres Polylinkers (besitzt BamHI Schnittstelle) in das pIRESneo-Plasmid zwei BamHI Schnittstellen gegeben hätte. Dies jedoch hätte die später notwendige Klonierung des HPRT-Promoters in die BamHI-Seite vor der d2EGFP-cDNA unmöglich gemacht.

4.4.1.2 Klonierung des pTRE IRESneo(-BamHI)-Plasmids

Das Plasmid pIRESneo(-BamHI) wurde mit NruI verdaut und anschließend, um die 5'-Phosphatgruppe zu entfernen, mit alkaliner Phosphatase inkubiert. Das Plasmid pBiEGFP (Invitrogen) wurde mit SacI geschnitten und die 3'-Überhänge mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase beseitigt. Das hierbei herausgeschnittene Tetracyclin Responsive Element (TRE) konnte nun vor die Promoterregion des pIRESneo(-BamHI)-Plasmids kloniert werden.

4.4.1.3 Klonierung des pTRE d2EGFP IRESneo-Plasmids

Nach der Restriktion von pTRE IRESneo(-BamHI) mit MluI und der Generierung von *blunt ends* mittels der Klenow-Polymerase wurde die DNA gefällt und später mit NotI verdaut. So wurde der pCMV IE Promoter/Enhancer aus dem Plasmid herausgeschnitten. An seine Stelle wurde die cDNA des d2EGFP und ein Teil des Polylinkers aus dem pd2EGFP-Plasmid kloniert. Das Plasmid pd2EGFP wurde zu diesem Zweck zuerst mit Eco47III geschnitten und nach dem Fällen mit NotI verdaut.

4.4.1.4 Klonierung des HPRT-Promoters in das pTRE d2EGFP IRESneo-Plasmid

Für die Klonierung des HPRT-Promoters musste dieser zunächst einmal mit Hilfe einer PCR auf der aus der genomischen Mauscosmid Bank (RZPD Nummer: 121) ermittelten Cosmid-DNA amplifiziert werden. Hierzu wurden zwei Oligonukleotide (Kapitel 2.1.8: CC 049 und CC 050) synthetisiert, die als Duplex an ihren 5'- und 3' Enden einen BamHI-kompatibelen

Überhang bildeten und später (nach BamHI Verdau) in den ebenfalls durch BamHI Verdau geöffneten und mit Alkaliner Phosphatase behandelten Polylinker des pBluescript SK(+)-Plasmids kloniert werden konnten. Durch einen BamHI Verdau wurde nun der HPRT-Promoter wieder aus pbsHPRT herausgeschnitten und in das ebenfalls mit BamHI geschnittene und mit alkaliner Phosphatase behandelte pTRE d2EGFP IRESneo-Plasmid einkloniert. So entstand das Plasmid pTRE HPRT d2EGFP IRESneo.

4.4.1.5 Klonierung des pTRE HPRT d2EGFP NEO

Durch einen Verdau von pTRE HPRT d2EGFP IRESneo mit SspI und nach dem Fällen mit NotI, konnte das TRE HPRT d2EGFP DNA-Fragment aus dem Plasmid isoliert werden und daraufhin in das ebenso restringierte pcDNA 3-Plasmid (Invitrogen) einkloniert werden. Auf diese Weise wurde der CMV-Promoter des pcDNA 3-Konstruktes durch den HPRT-Promoter ersetzt. Außerdem enthielt das nun entstandene pTRE HPRT d2EGFP NEO-Konstrukt eine entkoppelte Neomycinkassette mit eigenem SV40 Promoter- und polyA. Dieses intermediäre Plasmid diente nun als Akzeptor für die IVS IRES LUC-Sequenz.

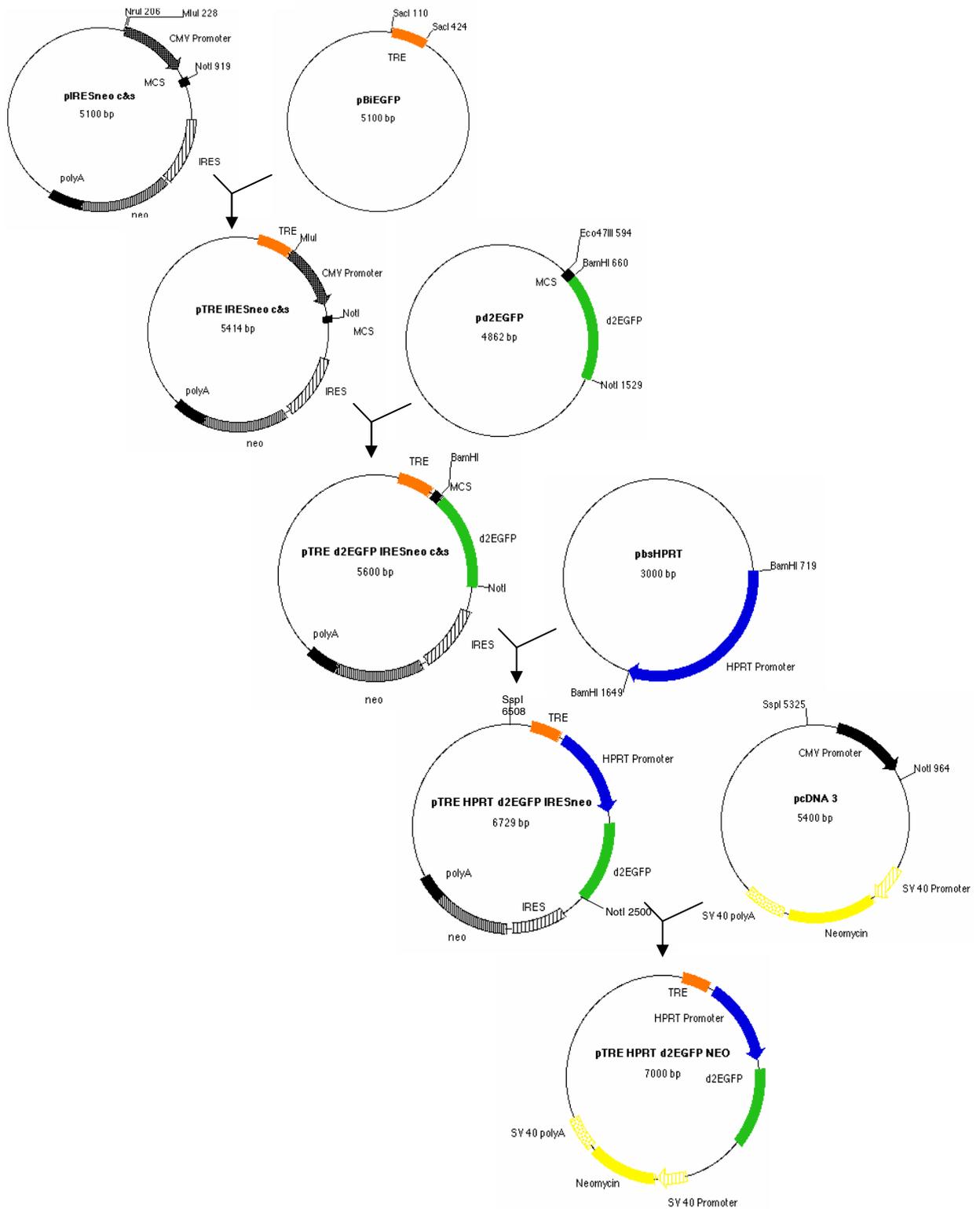


Abb.6 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des pTRE HPRT d2EGFP NEO-Vektors

Dieser Vektor ist einer der beiden Intermediärkonstrukte, die zur Klonierung des HPRT-Responderkonstruktes benötigt werden.

4.4.2 Klonierung des pbs IVS IRES LUC pA-Plasmids

4.4.2.1 Klonierung der IVS-DNA in pBlueskript SK(+)

Für diesen Klonierungsschritt musste zunächst die IVS-DNA (*intervening sequence*; Intron) mit Hilfe einer PCR auf dem pIRESneo-Plasmid amplifiziert werden. Hierzu wurden zwei Oligonukleotide (Kapitel 2.1.8: CC 046 und CC 047) synthetisiert, die als Duplex an ihren 5`- bzw. 3` Enden einen NotI-kompatiblen Überhang bildeten. Das amplifizierte IVS-PCR-Produkt wurde mit NotI verdaut und die 5`-Überhänge durch die Klenow-Polymerase aufgefüllt. Dieses DNA-Fragment wurde nun in ein mit XbaI geschnittenes, zur Generierung von *blunt ends* mit Klenow behandeltes und dann mit Alkaliner Phosphatase inkubiertes pBlueskript SK(+) kloniert. Es entstand das Plasmid pbsIVS.

4.4.2.2 Klonierung der IRES Luciferase polyA Sequenz in das pbsIVS-Plasmid

pbsIVS wurde mit SpeI aufgeschnitten und nach dem Auffüllen der 5` Überhänge durch Klenow mit Alkaliner Phosphatase behandelt. Das Plasmid pBSK-polioIRES-luciferase wurde mit ScaI geschnitten und gefällt. Dann folgte der Doppelverdau mit PmeI und HpaI. Das herausgeschnittene IRES Luciferase polyA-DNA-Fragment wurde nun hinter die IVS-DNA des pbsIVS-Konstruktes kloniert, wodurch das Plasmid pbsIVS IRES LUC pA entstand.

4.4.3 Klonierung des HPRT-Responderplasmids aus pTRE HPRT d2EGFP NEO und pbsIVS IRES LUC pA

Nach dem Verdau von pTRE HPRT d2EGFP NEO mit NotI und der anschließenden Inkubation mit Alkaliner Phosphatase konnte das mit NotI aus dem pbsIVS IRES LUC pA herausgeschnittene IVS IRES LUC pA-DANN-Fragment in pTRE HPRT d2EGFP NEO einkloniert werden.

Damit war das für die weiteren Versuche benötigte Responderkonstrukt fertig, welches die Respondergene d2EGFP (Fluoreszenzgen) und LUC (Firefly Luciferase) durch einem TRE-abhängigen HPRT-Promoter exprimieren sollte.

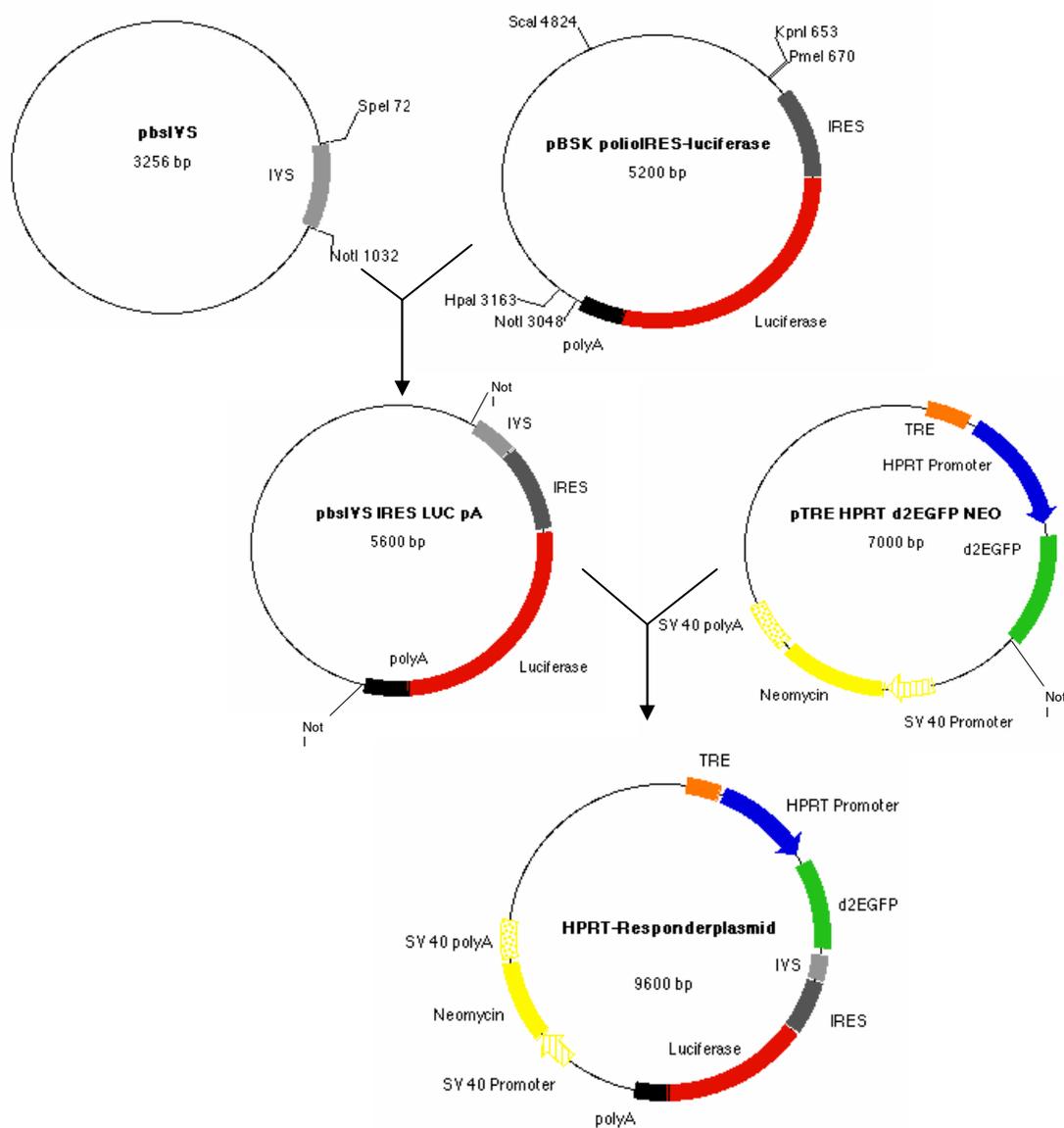


Abb.7 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des HPRT-Responderkonstruktes

Nach der Klonierung des pbs IYS IHRES LUC pA-Vektors, einem der zwei Intermediärkonstrukte zur Klonierung des HPRT-Responders und der darauffolgenden Ligation dieses Plasmids mit dem in Abb.6 dargestellten Intermediärkonstrukt pTRE HPRT d2EGFP NEO entsteht das fertige HPRT-Responderkonstrukt

4.5 Evaluierung des Repressionspotentials der Designerrepressoren mit Hilfe des HPRT-Responders

Um das Transkriptionsrepressionspotential der einzelnen Repressorexpressionskonstrukte testen zu können, wurden zunächst transiente Cotransfektionen des HPRT-Responders zusammen mit je einem der verschiedenen Silencerkonstrukte in NIH 3T3 Zellen

durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde darüber hinaus der pEF-Boss-renilla luciferase-Expressionsvektor mittransfiziert, was eine Normalisierung der einzelnen Transfektionseffizienzen untereinander ermöglichte. Eine Herunterregulierung der Transkription des HPRT-Promoters sollte in einer geringeren Expression der Luciferase ohne DOX resultieren und konnte deshalb durch luminometrische Messungen detektiert werden. Im Gegensatz dazu sollte im Beisein von DOX (1µg/ml Medium) die in Kapitel 3.2 beschriebenen Repressorfusionsproteine nicht an der TRE Ankersequenz binden können und deshalb die transkriptionelle Aktivität des HPRT-Promoters unbeeinflusst bleiben.

Sinn dieser Versuche war es, die verschiedenen, klonierten Silencerkonstrukte in einem schnellen Essay auf ihr Repressionspotential hin zu untersuchen und gleichzeitig die Funktionalität des HPRT-Responderkonstrukts zu testen.

Als Kontrolle diente die Cotransfektion des HPRT-Responders und des Renilla Referenzreporterplasmids gemeinsam mit dem leeren Klonierungsvektor pBlueskript SK(+) und mit pCMB1 hygro TetR (B/E), dessen Genprodukt genauso DOX-abhängig an die TRE binden kann, aber keine Silencerdomäne enthält. Dies diente dazu, auszuschließen, dass allein das Anbinden des Tetrepressors am TRE des Responders auch ohne ein daran fusioniertes Silencerprotein zu einer eventuellen Herunterregulation der Promoteraktivität führen könnte (sterische Behinderung).

Nach der Transfektion wurde jeweils die Hälfte aller Ansätze 24h in DOX-freiem Medium, die andere Hälfte 24h in 1µg DOX/ml Medium inkubiert.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Abb.8 dargestellt und die Auswertung der durchgeführten Messungen ergab, dass von allen getesteten Repressorexpressionskonstrukten lediglich pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4 in der Lage war, die Aktivität des HPRT-Promoters des HPRT-Responder in Abwesenheit von DOX herunterzuregulieren und somit die Expression von Luciferase signifikant zu verringern. Alle anderen im Cotransfektionsassay getesteten Silencer zeigten keine signifikante Transkriptionsrepression.

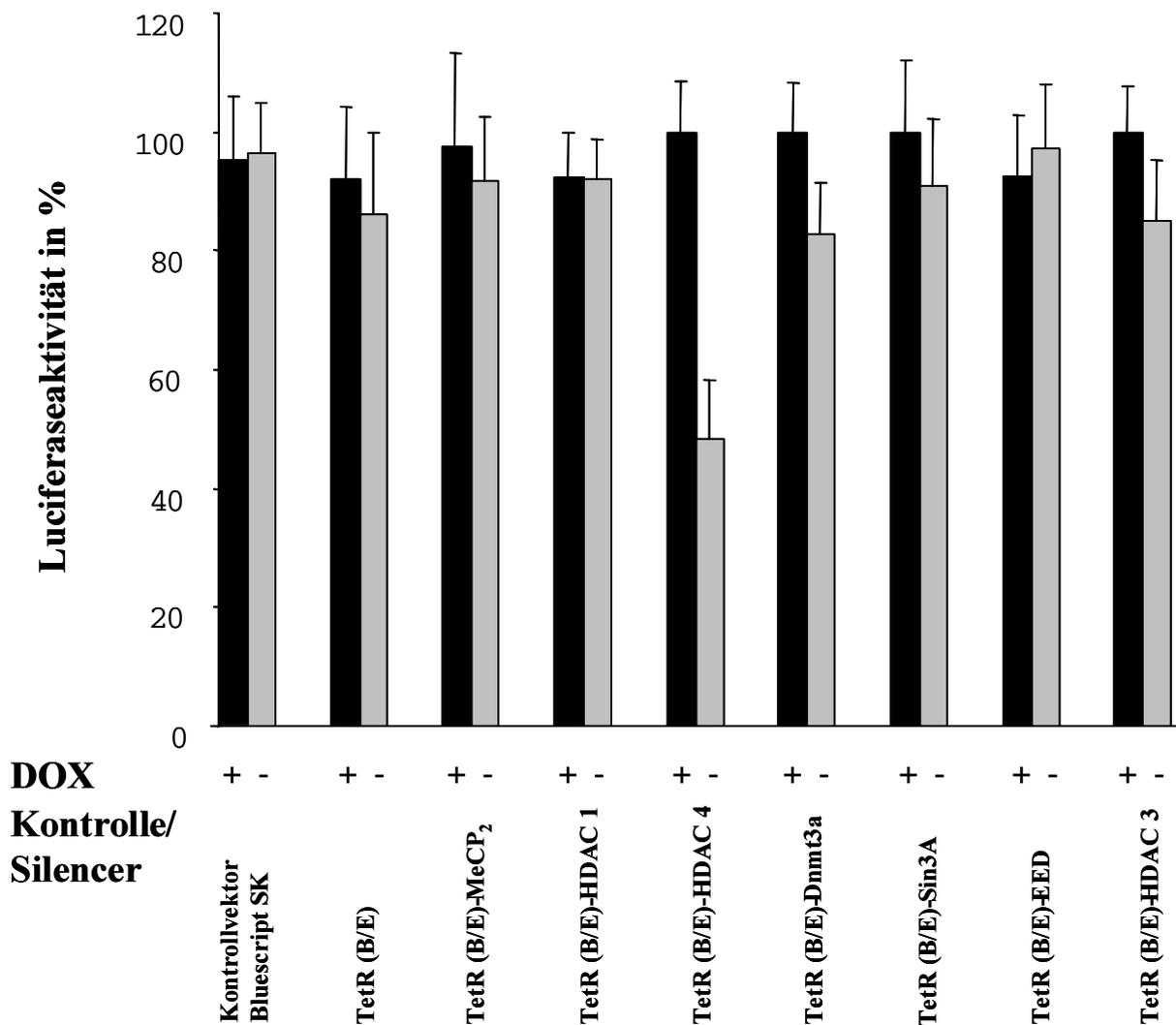


Abb.8 HDAC 4 silenced die HPRT-Promoteraktivität in transienten Cotransfektionssays

Nur die transiente Expression des TetR (B/E)-HDAC 4-Fusionsproteins zusammen mit dem HPRT-Responder in NIH 3T3-Zellen reduzierte signifikant die Luciferaseaktivität in Abwesenheit des Tetracyclinanalogs Doxycyclin (DOX) um über 50%.

4.6 Exogene Regulierbarkeit des stabil in NIH 3T3 transfizierten HPRT-Responders durch pCMV-TetR (B/E)-KRAB

Um zu ermitteln, in welcher Weise sich das Silencerpotential der Repressorexpressionskonstrukte auf den in das Genom der NIH 3T3 Zellen integrierten HPRT-Responder auswirken würde, wurden Einzelklone generiert, die stabil mit dem HPRT-Responderkonstrukt transfiziert worden waren. Dieser Versuch sollte zeigen, ob mit der Integration des Responders in den chromosomalen Kontext der Zelle eine Repression des

HPRT-Promoters durch Transkriptionssilencer, wie bei der transienten Cotransfektion induziert werden konnte. Stabile Responderklone sollten transient mit den bereits in den transienten Cotransfektionen getesteten Silencermolekülen transfiziert werden und eventuelle Veränderungen in der Luciferaseexpression ermittelt werden. Zunächst war es jedoch in einem Vorversuch nötig, diejenigen unter den generierten Responderklonen herauszusuchen, welche sich überhaupt regulieren ließen. Dies war sinnvoll, da die Tatsache einer überstandenen Selektion durch das Selektionsantibiotikum Neomycin (der HPRT-Responder besitzt eine entkoppelte Neomycinresistenzkassette) allein, noch nicht zwangsläufig bedeuteten musste, dass das HPRT-Responderkonstrukt vollständig, funktionierend und regulierbar in das Genom des Einzelklons eingebaut worden war.

Die einzelnen Zellklone wurden zu diesem Zweck in mehreren Ansätzen mit dem pCMV-TetR (B/E)-KRAB Silencerplasmid (in Forster et al. beschrieben) transient transfiziert. Dieses Plasmid exprimiert eine Fusion aus TetR (B/E) mit der KRAB-Silencerdomäne und bindet ebenfalls in Abwesenheit von DOX an die TRE des HPRT-Responders. Die Ergebnisse aus transienten Cotransfektionssays, in welchen pCMV-TetR (B/E)-KRAB der HPRT-Responder sowie ein Referenzreporterplasmid in NIH 3T3-Zellen getestet worden waren, sind in Abb.9 dargestellt. Da der pCMV TetR (B/E)-KRAB-Repressor eine etwas bessere Herunterregulation des HPRT-Promoters in diesen transienten Versuchen gezeigt hatte, wurde er nun zunächst an Stelle des pCMB 1 hygro TetR (B/E).HDAC 4-Repressors eingesetzt, um Einzelklonkandidaten zu ermitteln.

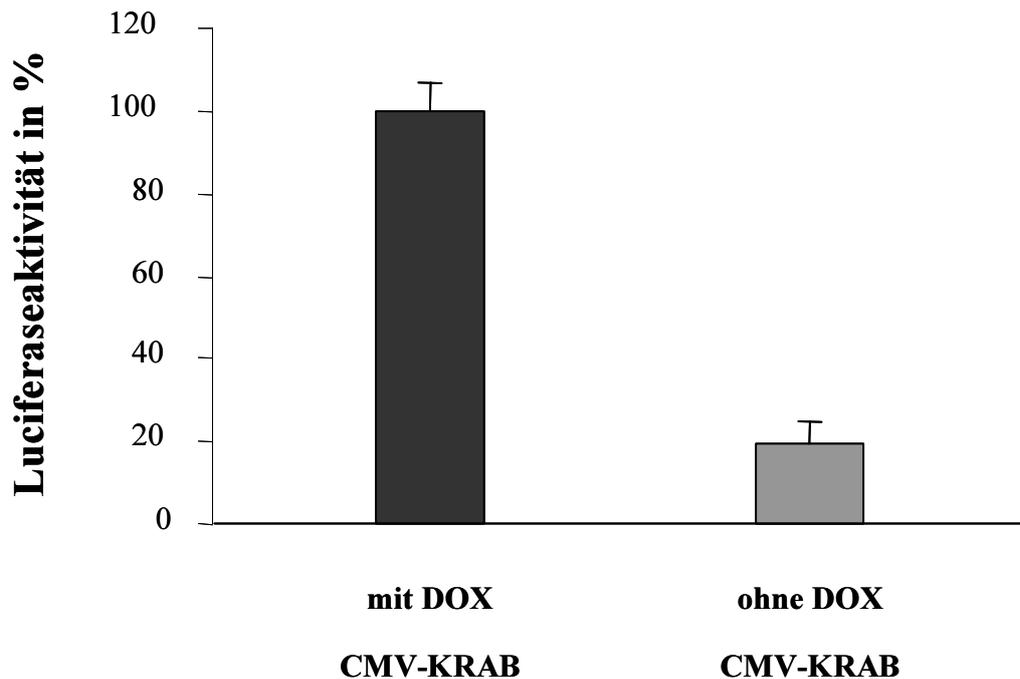


Abb.9 KRAB silenced den HPRT-Promoter in transienten Cotransfektionssays

Die transiente Expression des pCMV-TetR (B/E)-KRAB-Fusionsproteins zusammen mit dem HPRT-Responder in NIH 3T3-Zellen reduzierte signifikant die Luciferaseaktivität in Abwesenheit des Tetracyclinanalogons Doxycyclin (DOX) um 80%.

Die Hälfte aller Ansätze wurde 24h in DOX-freiem Medium, die andere Hälfte 24h in Medium mit 1µg DOX/ml inkubiert, dann geerntet und die ermittelten Luciferasewerte ausgewertet.

Trotz der hohen Anzahl von 129 generierten und analysierten Klonen wurde letztlich kein Kandidat ermittelt, der sich durch das Repressorexpressionskonstrukt pCMV-TetR (B/E)-KRAB in der Expression der Luciferase signifikant negativ beeinflussen ließ und für die geplanten Versuche hätte eingesetzt werden können.

Es erschien daher ratsam, auf eine bereits veröffentlichte Zelllinie zurückzugreifen, in welcher ein Responder bereits stabil in das Genom der Zelle integriert war, und von der bekannt war, dass die Aktivität eines konstitutiv exprimierten Reportergens sowohl negativ als auch positiv durch Aktivatoren/Repressoren regulierbar war (Freundlieb et al., 1999).

4.7 Die Luciferaseaktivität der HRL9-Zelllinie wurde durch transiente Transfektion des pCMB 1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4 reprimiert

Um ermitteln zu können, ob das Silencerkonstrukt pCMB 1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4 in der Lage war nach transienter Transfektion auch den stabil in das Genom der Zelle integrierten humanen CMV-Promoter herunterzuregulieren, wurde sich der Zelllinie HRL9 (Freundlieb et al., 1999) bedient, die freundlicherweise von Herrn Professor Bujard (ZMBH, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde.

Diese Zelllinie trägt folgende stabil integrierten Konstrukte:

1. Den rtTA reversen Transkriptionsaktivator (TetR-VP16 Fusion) als durch DOX induzierbaren Effektor, und als Responder das Luciferase Reportergen unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven hCMV-Minimalpromoters (humaner Cytomegalovirus) mit einer 5' integrierten TRE, an welcher sowohl der rtTA-Effektor (+DOX) als auch der TetR (B/E) Silencer (-DOX) binden können.

Entscheidend an diesem System war vor allem die konstitutive Expression von Luciferase durch den hCMV-Minimalpromoter und die Tatsache, dass sich dieser Promoter exogen über unterschiedliche Doxycyclinkonzentrationen im Medium regulieren ließ.

Das Verhalten der HRL9-Zelllinie mit und ohne DOX ist in Abb.10 dargestellt.

Dieser Vortest war notwendig, um die HRL-Zelllinie nochmals im Labor zu bestätigen. Die gemessenen Luciferasewerte bestätigten die von Freundlieb et al., 1999 publizierten Ergebnisse und zeigten, dass diese Zelllinie für die geplanten Experimente geeignet ist.

Deutlich zu erkennen ist die basale Expression von Luciferase in Abwesenheit von DOX sowie der enorme Anstieg der Luciferaseaktivität nach Zugabe von 1µg DOX/ml Medium nach 24h, welcher hervorgerufen durch transkriptionelle Aktivierung des Promoters mittels des rtTA Transaktivators erfolgt.

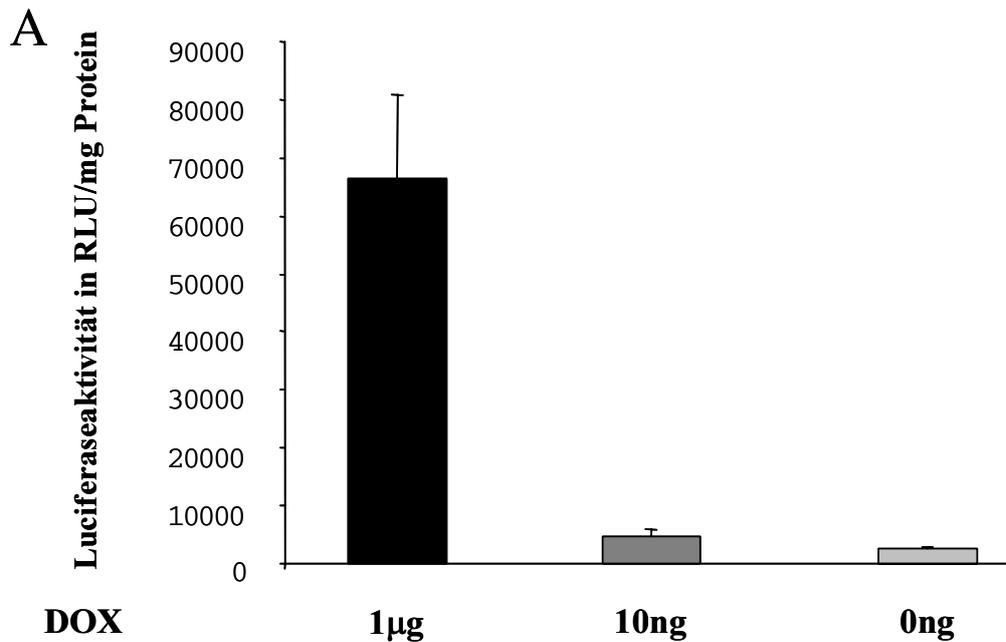
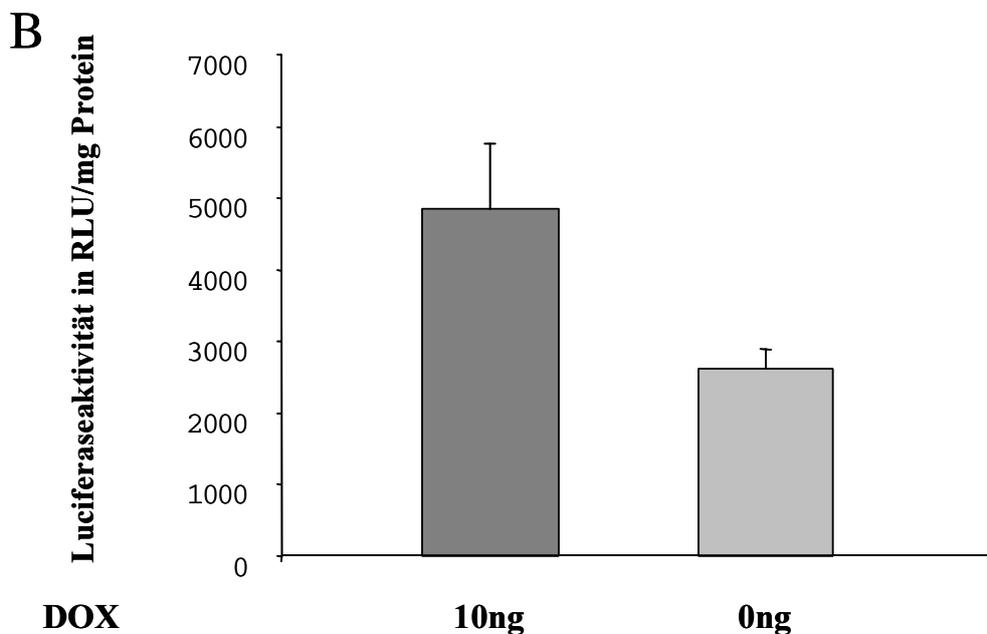


Abb.10 Verhalten der HRL9-Zelllinie bei verschiedenen DOX-Konzentrationen im Medium

Wie in Abb.10 A dargestellt, führen hohe DOX-Konzentrationen zu einer Induktion der Luciferaseaktivität durch den rtTA-Transaktivator (1µg DOX/ml Medium). Bei einer Dosis von 10ng DOX/ml liegt die CMV-Minimalpromoteraktivität immer noch um ca. 55% höher, als dies bei Abwesenheit von DOX der Fall ist. Die Luciferaseaktivität in Abwesenheit von DOX zeigt die basale Grundaktivität des hCMV-Minimalpromoters in der HRL9-Zelllinie ohne Anbindung von rtTA.

Zum besseren Erkennen zeigt Abb.10 B die unter A vorgestellte Luciferaseaktivität der HRL9-Zelllinie bei 10- und 0ng DOX/ml Medium nochmals in einer anders gewählten Skalierung.



Um das Potential des HDAC 4 Silencers testen zu können, wurde das HDAC 4-Expressionsplasmid transient gemeinsam mit einem Renilla-Reporterreferenzplasmid in die

HRL9-Zelllinie transfiziert, die Zellen 24h in DOX-freiem Medium inkubiert und die ermittelten Luciferasewerte am Computer ausgewertet. Als Kontrolle dienten hier Ansätze, die außer mit dem Reporterplasmid auch mit dem leeren Klonierungsvektor pBlueskript SK(+) transfiziert wurden und ebenfalls 24h in DOX-freiem Medium gehalten wurden. Außer den Luciferasewerten wurde auch der Proteingehalt der einzelnen Ansätze bestimmt, um sicher zu gehen, dass Unterschiede in der Luciferaseaktivität nicht von einer unterschiedlichen Anzahl an Zellen herrührten (doppelte Normalisierung).

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb.11 dargestellt.

Die Auswertung der ermittelten Messwerte ergab, dass der pCMB1 hygro TetR(B/E)-HDAC 4 Repressor die basale Aktivität des stabil in das Genom der HRL9 Zellen integrierten hCMV-Minimalpromoters in Abwesenheit von DOX um mehr als 60% herunterregulierte.

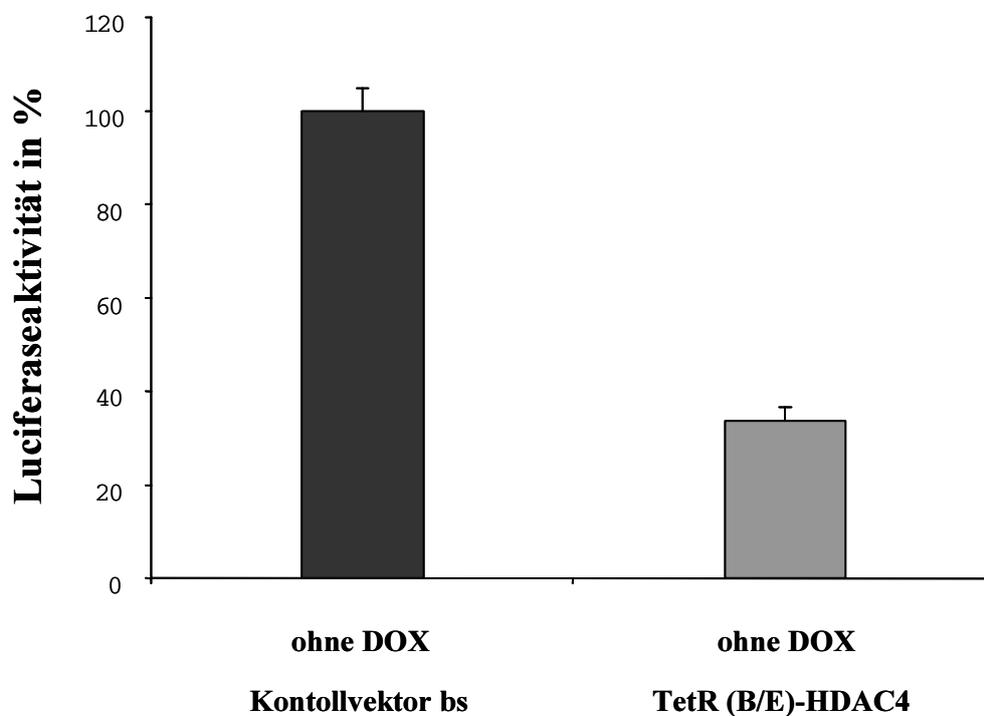


Abb.11 Repression des stabil integrierten hCMV-Minimalpromoters durch induzierbare HDAC 4-Expression

In Abwesenheit von DOX resultiert die transiente Transfektion des TetR (B/E)-HDAC 4-Fusionsproteins in die HRL9-Zelllinie in einer Herunterregulation der Luciferaseaktivität auf unter 40% (rechts) im Vergleich zu der Transfektion mit dem Kontrollplasmid Blueskript SK (bs) (links).

4.8 Tet-Regulierbarkeit von stabil mit dem

Repressorexpressionskonstrukt pCMB1 hygro TetR(B/E)-HDAC 4 transfizierten HRL9-Einzelklonen

Nachdem das Potential des HDAC 4-Silencerkonstruktes in transienten Versuchen mit der HRL9- Zelllinie positiv bestätigt worden war, war es von großem Interesse, HRL9-Zellklone zu generieren, welche den HDAC 4-Repressor konstitutiv exprimieren würden. Diese uniformen Klone sollten keine Varianz des rekombinanten HDAC 4-Repressors zeigen und so einen direkten Vergleich zwischen verschiedenen zu testenden Regulationszuständen (*on/off*) im gleichen Klon ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurden HRL9-Zellen stabil mit pCMB1 hygro TetR(B/E)-HDAC 4 und dem Puromycinresistenz vermittelnden Plasmid pPUR transfiziert und Einzelklone generiert, die permanent in DOX-freiem Medium gehalten wurden.

Die hochgewachsenen Zellklone wurden dann bezüglich ihres Repressionspotentials mit verschiedenen Doxycyclinkonzentrationen (10ng/ml; 0ng/ml) im Medium getestet. Da das Verhalten der HRL9-Zelllinie im Bezug auf diese Doxycyclinkonzentrationen bekannt war (Abb.11), sollten Klone identifiziert werden, deren Luciferaseaktivität in Abwesenheit von DOX signifikant herunterreguliert werden konnte. Hierzu wurden in einem Vorversuch zunächst Zellen eines Klons mit zwei DOX Konzentrationen im Medium (10ng = *leaky*; 0ng = *silenced*) für 24h inkubiert, geerntet und sowohl die Luciferaseaktivität als auch der Proteingehalt der einzelnen Ansätze ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden mit Hilfe des Computers ausgewertet. Bei der Analyse der Daten wurde auf folgendes geachtet:

Ist der analysierte Einzelklon in der Lage Luciferase zu exprimieren und sind die gemessenen Unterschiede im Abfallen der Luciferaseaktivität zwischen 10ng/ml und 0ng/ml Doxycyclin im Vergleich zur parentalen HRL9-Zelllinie signifikant? Der letzte Punkt war von besonderer Bedeutung, da eine eventuelle Herunterregulation nur durch den Vergleich dieser beiden Werte deutlich wurde. Da die HRL9 Zellen per se (Abb.10B) auf die Entfernung von DOX aus dem Medium im Vergleich zu der Expression bei 10ng mit einem Absinken ihrer Luciferaseaktivität um etwa 55% reagierten, wurden nur Klone selektioniert, die deutlich größere Reportergenrepression aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abb.12 dargestellt.

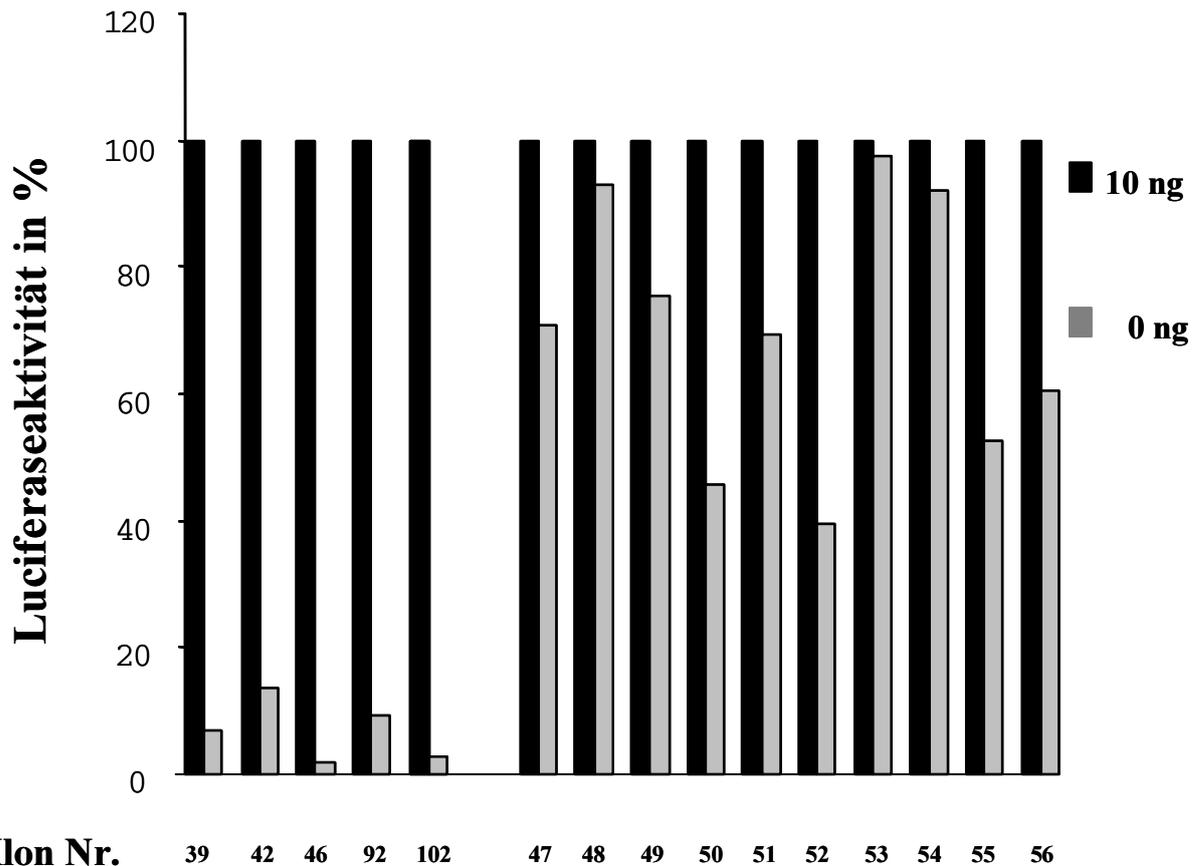


Abb.12 Repräsentation der exogenen, durch TetR (B/E)-HDAC 4 induzierbaren Genrepression verschiedener tripeltransgener HRL9-HDAC 4-Einzelklone

Die Klone 39,42,46,92 und 102 zeigen in Abwesenheit von DOX (hellgraue Balken) eine deutlich reduzierte Luciferaseaktivität im Vergleich zu den rechts dargestellten nicht oder nur eingeschränkt regulierbaren tripeltransgenen Klonen (KlonNr. 47-56). Da der hCMV-Minimalpromoter in diesen Klonen durch den HDAC 4-Repressor signifikant negativ regulierbar erschien, wurden die Klone 39,42,46,92 und 102 weiter analysiert. Wegen der hohen Anzahl an getesteten Einzelklonen kann hier lediglich eine Auswahl dargestellt werden.

Nach diesen ersten Vorversuchen konnten schließlich fünf putativ herunterregulierbare Kandidaten in die engere Wahl gezogen werden. Diese wurden dann in weiteren Versuchsansätzen auf ihr Verhalten gegenüber den drei verschiedenen Doxycyclinkonzentrationen genauer charakterisiert. Hierbei wurden nun auch zusätzlich Ansätze mit 1µgDOX/ml Medium getestet (Abb13 A), um sich von dem Vorhandensein des rtTA-Effektors in den Klonen zu überzeugen. Durch diesen zusätzlichen Test war es möglich, zwei Einzelklone (Klon 46 und Klon 102) zu bestätigen, welche sich eindeutig sowohl positiv (+DOX: Effektor aktiv) als auch negativ (-DOX: Silencer aktiv) regulieren ließen (Abb. 13). Da Klon 102 reproduzierbar eine stärkere Repression durch pCMB 1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4 zeigte wurde er für die weiteren Versuchsreihen herangezogen.

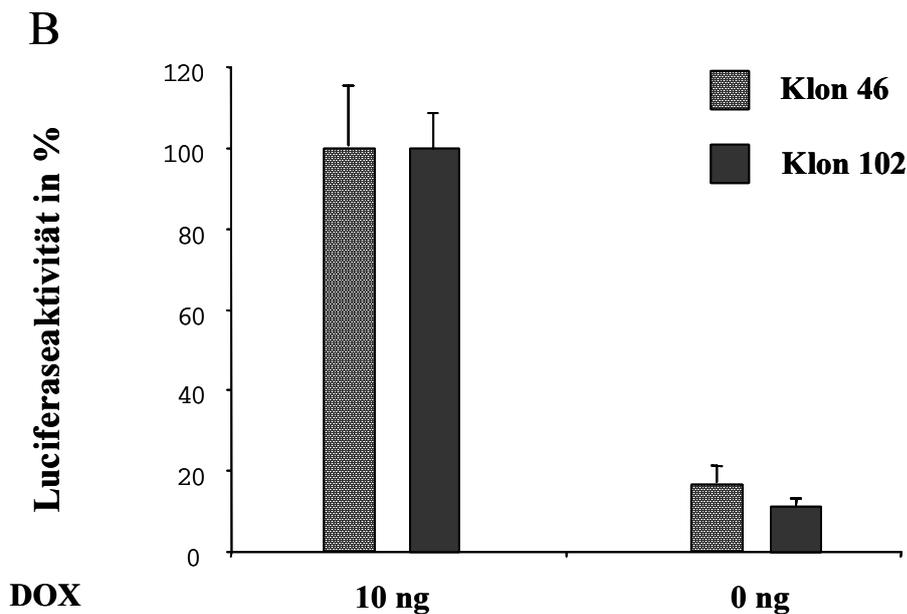
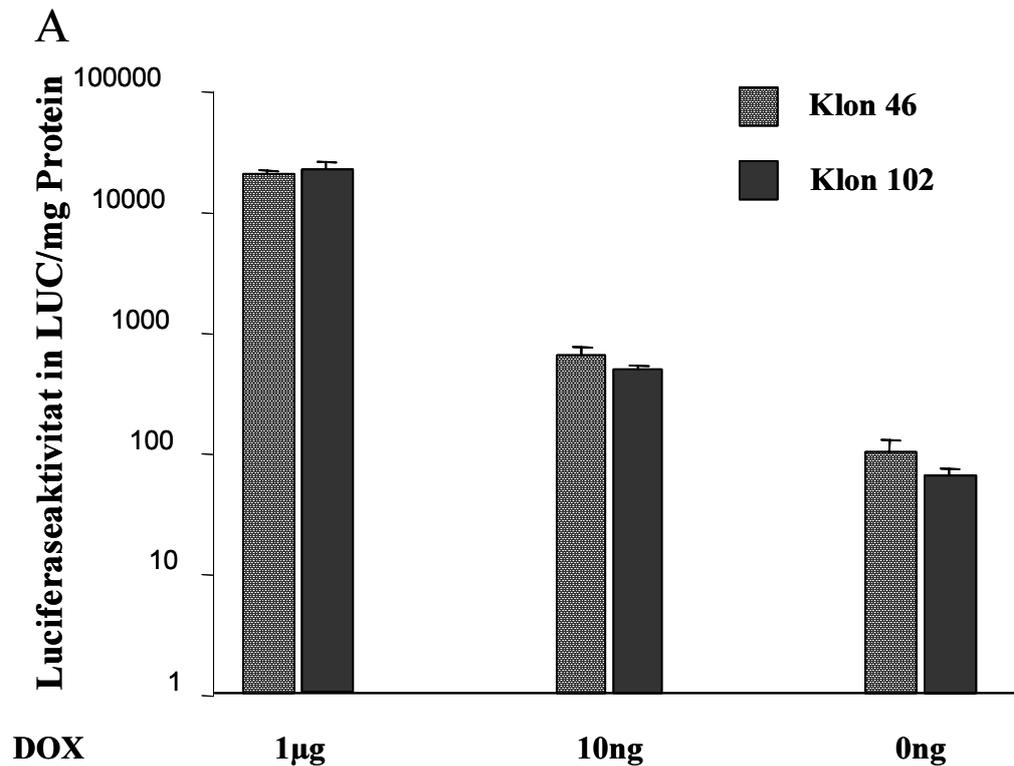


Abb.13 In den tritransgenen HRL9-HDAC 4-Einzelklonen 46 und 102 ist sowohl eine Aktivierung durch den reversen Transaktivator rtTA als auch eine Repression des hCMV-Minimalpromoters durch den TetR (B/E)-HDAC 4-Silencer über DOX zu induzieren

Abb.13 A zeigt die unterschiedliche Luciferaseaktivität in LUC/mg Protein der Klone 46 und 102 bei den DOX-Konzentrationen 1 µg/ml (Aktivierung durch rtTA), 10ng/ml (basale Aktivität des hCMV-Minimalpromoters) und ohne DOX (Repression durch TetR (B/E)-HDAC 4).

Abb.13 B zeigt nochmals die gemessene Luciferaseaktivität der Klone 46 und 102 bei 10ng und 0ng DOX/ml Medium in einer nicht logarithmischen, prozentualen Darstellung.

4.9 Aufhebung der Silencingaktivität im HRL9-pCMB1 hygro TetR (B/E)- HDAC 4 Einzelklon 102 durch Behandlung mit dem Histondeacetylasehemmer Trichostatin A (TSA)

Um zu ermitteln, ob die beobachtete Herunterregulierung der Luciferaseaktivität im Einzelklon 102 in Abwesenheit von Doxycyclin im Medium auf der Wirkung der Histondeacetylaseaktivität der HDAC 4 beruhte, wurden Versuche mit dem Histondeacetylasehemmer TSA durchgeführt. TSA ist äußerst spezifisch für die Hemmung der enzymatischen Histondeacetylaseaktivität und wird normalerweise als HDAC-Hemmer eingesetzt (Miska et al., 1999; Wang et al., 1999). Die Zugabe von TSA sollte gezielt die HDAC-Aktivität hemmen und so den HDAC 4 Repressionseffekt aufheben. Zur Klärung dieser Fragen wurden die Zellen in DOX-freiem Medium gehalten und 24h mit TSA behandelt, dann geerntet, die Luciferase- und Proteinwerte ermittelt und die erhaltenen Meßwerte auf dem Computer ausgewertet. Als Kontrolle diente die gleiche Anzahl von Ansätzen in DOX-freiem Medium. An Stelle des TSA wurde hier lediglich die gleiche Konzentration des für TSA verwendeten Lösungsmittels (Ethanol) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.

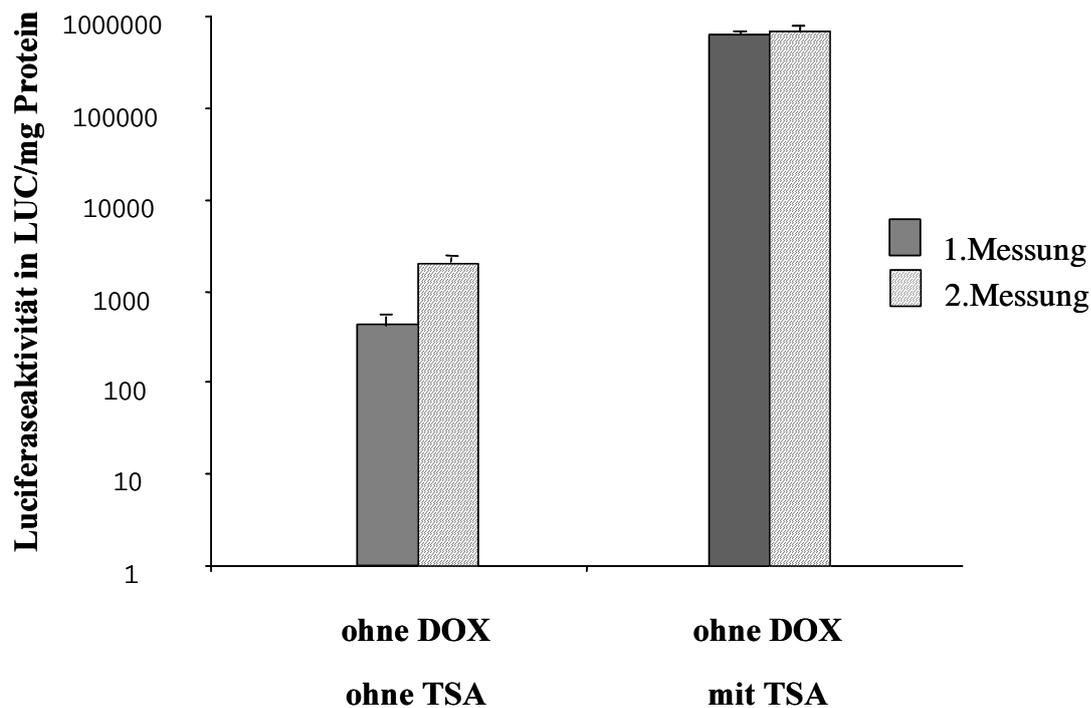


Abb.14 TSA hemmt die HDAC 4-Repressoraktivität im tripeltransgenen Einzelklon 102
 Die Behandlung des Einzelklon 102 mit TSA deblockiert das durch HDAC 4 hervorgerufene Gensilencing (Medium ohne DOX), was den Schluss zulässt, dass die beobachtete Repression durch die Histondeacetylaseaktivität der HDAC 4 hervorgerufen wird.

Die Behandlung der Zellen des tripeltransfizierten Einzelklons 102 mit dem Histondeacetylasehemmer TSA führte zu einer Deblockierung des durch HDAC 4 hervorgerufenen Gensilencings. Dies ließ den Schluß zu, dass die beobachtete Repression des hCMV-Minimalpromoters durch die Histondeacetylaseaktivität der Histondeacetylase 4 hervorgerufen wurde.

4.10 Überprüfung der HDAC 4 induzierten Genrepression im

Langzeitversuch

Wie unter Kapitel 3.8 gezeigt, war es möglich, die Luciferaseexpression des Einzelklons 102 sowohl positiv als auch negativ nur durch die verschiedenen DOX-Konzentrationen im Medium zu regulieren und somit die rtTA induzierte Aktivierung sowie die HDAC 4 induzierte Genrepression zu steuern. Die Frage war nun, ob eventuell eine längere Phase der Repression (veranlasst durch ein wochenlanges Halten des Einzelklons in DOX-freiem Medium und damit einhergehender ständiger Repression des hCMV-Minimalpromoters durch das TetR (B/E)-HDAC 4 Silencerfusionsprotein) letztlich zu einem permanenten „*shutdown*“ der

Genexpression führen würde, oder ob diese dennoch flexibel und reversibel bleiben würde. Diese Frage war wichtig, da Histondeacetylierungen im Sinne des Histoncodes eine permanente kovalente Veränderung darstellen könnten, welche möglicherweise auch auf Tochterzellen vererbt werden könnte. Um zu ermitteln, ob Einzelklon 102 auch noch nach mehreren Wochen dazu in der Lage sein würde, sich über DOX im Medium positiv regulieren zu lassen (+DOX: Effektor aktiv) wurden Zellen des Klons nach einer ersten Messung bei den Konzentrationen 0ng, 10ng und 1µg (Woche 0) über sechs Wochen hinweg permanent in DOX-freiem Medium belassen und dann erneut auf deren Reaktion gegenüber diesen drei DOX-Konzentrationen getestet.

Das Ergebnis ist in Abb. 15 dargestellt.

Die Abbildung zeigt deutlich, dass auch ein dauerhaftes Silencing des hCMV-Minimalpromoters durch das Repressorexpressionsplasmid pCMB1hygro TetR (B/E)-HDAC 4 über 6 Wochen hinweg nichts an der Reversibilität und Flexibilität des Tet *on/off*-Systems änderte und es nicht zu einer vererbten, permanenten Genrepression kam.

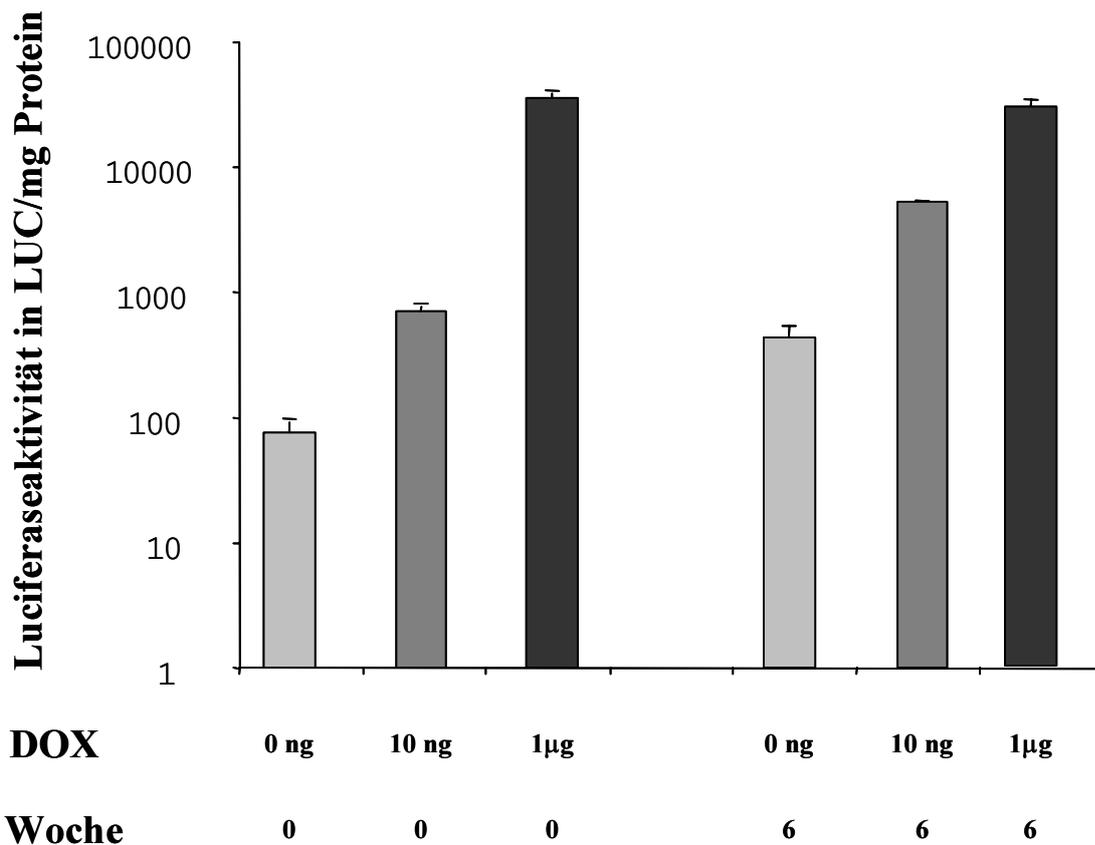


Abb.15 Die HDAC 4-induzierte Genrepression im Einzelklon 102 bleibt auch im Langzeitversuch reversibel

Dauerhafte Repression des hCMV-Minimalpromoters durch das TetR (B/E)-Silencerfusionsprotein über einen Zeitraum von 6 Wochen führt zu keiner permanenten, vererbten Genrepression im HRL9-HDAC 4 Einzelklon 102.

Linke Balken, Luciferaseaktivität vor Beginn des Langzeitversuchs, bei 0ng DOX/ml (TetR (B/E)-HDAC 4-Repressor bindet, 10ng DOX/ml (Intermediäre basale Aktivität) und 1µg DOX/ml (Aktivator bindet). Rechte Balken zeigen den reprimierten Zustand (0ng DOX/ml), intermediären Transkriptionsstimulus (10ng DOX/ml) und Transkriptionsaktivierung (1µg DOX/ml) nach der Langzeitkultur von 6 Wochen.

4.11 Untersuchung auf eine eventuelle Abhängigkeit zwischen Zellzyklus und der repressiven Wirkung der Histondeacetylaseaktivität auf den hCMV-Minimalpromoter

Die Tatsache, dass die Histondeacetylaseaktivität der HDAC 4 eine wichtige Rolle bei dieser Repression spielte (Kapitel 3.9) machte es wichtig zu klären, in welcher Weise die Histondeacetylase benötigt wurde, um den Repressionsstatus des Promoters während des

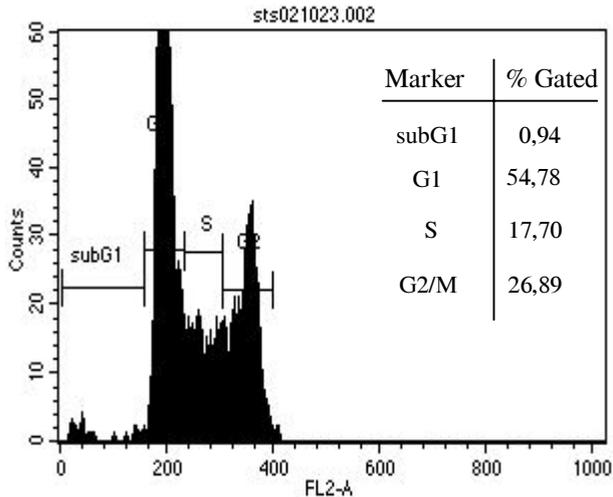
Zellzyklus aufrechtzuerhalten. Da der repressive Status des Promoters auch während der Mitose beibehalten werden muss, wäre eine Antwort auf diese Frage für das Verstehen der Genregulation von großer Bedeutung. Durch die Blockierung der Histondeacetylaseaktivität zu bestimmten Phasen des Zellzyklus sollte eine genauere Eingrenzung möglich gemacht werden, während welches Zellzyklusstatus die Histondeacetylaseaktivität zur Repression der Promoteraktivität benötigt wird.

Um zu untersuchen, ob die Histondeacetylaseaktivität benötigt wurde, um die transkriptionelle Repression der Zellen des Einzelklons 102 beizubehalten, wenn diese nicht durch die S-Phase des Zellzyklus liefern wurde folgender Versuch durchgeführt.

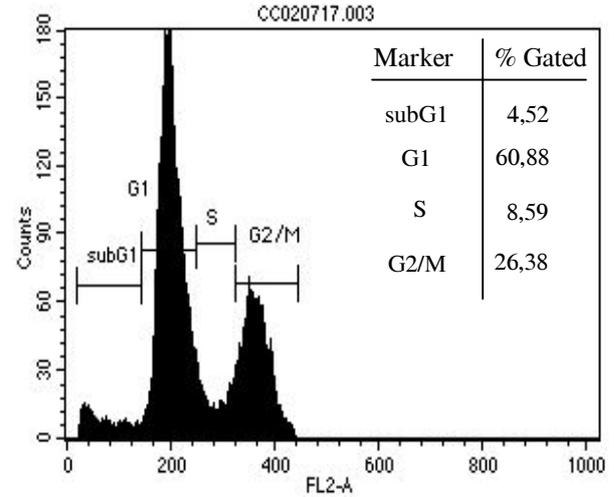
Zellen wurden über 48h hinweg in 0,5 mM Mimosin gehalten und somit in einen späten G1-Block festgehalten (Krude, 1999). Nach 24 von 48 Stunden wurde den Ansätzen 330nM TSA zugegeben, um die Wirkung der Histondeacetylase aufzuheben. Das Fortbestehen des G1-Blocks auch nach Zugabe von TSA wurde an Hand der Durchflußzytometrie bestätigt, die zeigte, dass nach 48h 75% der Zellen in der G1-Phase verharrten, im Vergleich zu 55% bei den asynchron durch den Zellzyklus laufenden Zellen. Um den Effekt des TSA bei mit Mimosin behandelten Zellen mit dem auf sich asynchron vermehrende Zellen vergleichen zu können, wurde parallel die gleiche Anzahl Ansätze mit Zellen kultiviert, die lediglich 24h mit TSA behandelt wurden.

Zu erkennen ist ein deutlicher Unterschied zwischen den sich im normalen Zellzyklus befindlichen und den in G1 blockierten Zellen. Diese Resultate zeigen, dass bei Zellen, die sich im G1-Block befinden, der herunterregulierte hCMV-Minimalpromoter keine Histondeacetylaseaktivität benötigt, um in seinem repressiven Status zu verbleiben. Da bei sich frei im Zellzyklus befindlichen Zellen die Histondeacetylase in ihrer Wirkung von TSA drastisch behindert wird, ist davon auszugehen, dass die Histondeacetylaseaktivität dazu benötigt wird, den repressiven Status des Promoters beim Durchwandern der Zellen durch den Zellzyklus aufrechtzuerhalten.

A: Klon 102, 10% FCS



B: Klon 102, 24h TSA



C: Klon 102, 48h Mimosin/24h TSA

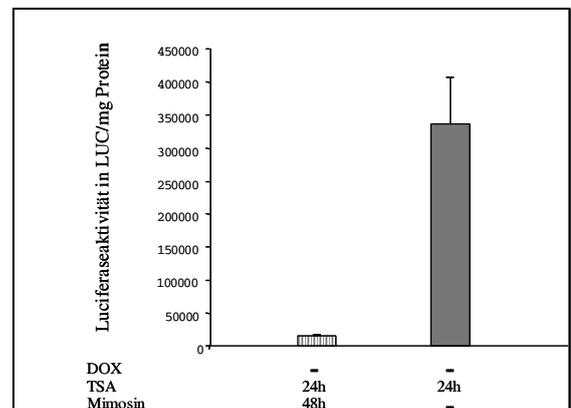
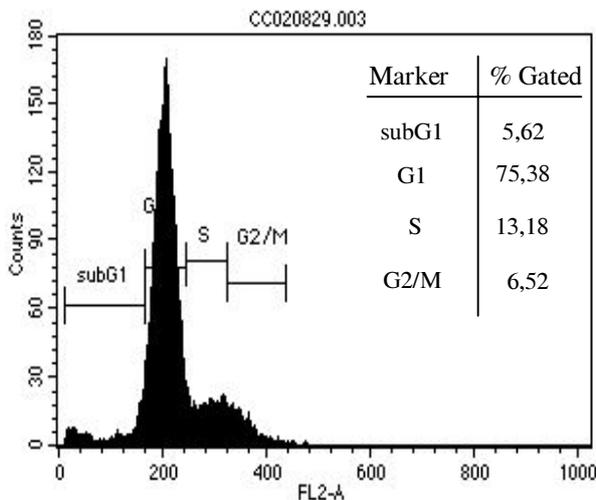


Abb.16 Die Histondeacetylaseaktivität wird während der G1-Phase nicht zur Aufrechterhaltung der Genrepression benötigt

Zellen des Einzelklons 102, die sich in einem asynchronen Zellzyklus befinden (A) werden durch die 48-stündige Behandlung mit Mimosin und gleichzeitige 24-stündige Behandlung mit TSA vor dem Ernten in einen G1-Block versetzt (C). Bild (B) zeigt zum Vergleich das Verhalten der Zellen bei 24-stündiger Behandlung allein mit TSA. Bild (D) zeigt den enormen Unterschied in der Luciferaseaktivität bei Zellen, die mit Mimosin und TSA behandelt wurden (linker Balken) zu denen, die allein mit TSA behandelt wurden (rechter Balken).

4.12 Untersuchung auf eine eventuelle Abhängigkeit zwischen Zellzyklus und Transkriptionsaktivierung im tripeltransfizierten Einzelklon 102

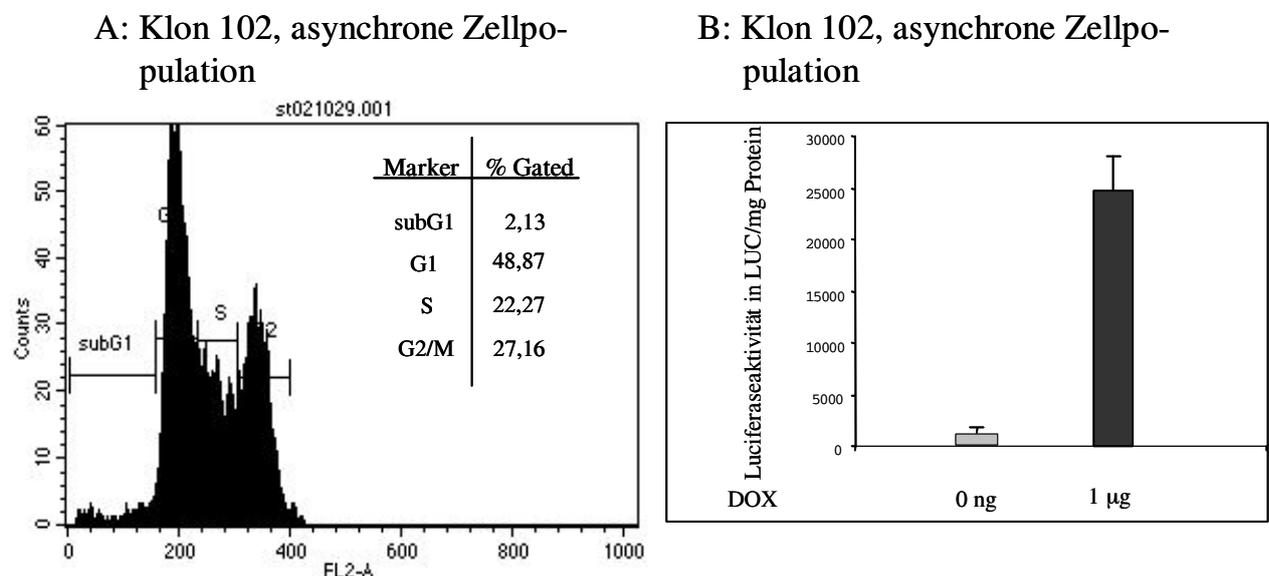
Bei der Betrachtung der Funktionalität des Tet *on/off*-Systems im Einzelklon 102 kam bald

die Idee auf, dass hier auch Fragen nach der Abhängigkeit zwischen Zellzyklus und Transkriptionsaktivierung der Zelle beantwortet werden konnten. Die pflanzliche Aminosäure Mimosin ist in der Lage HeLa Zellen in der späten G1 Phase zu synchronisieren (Krude, 1999) und somit deren Eintritt in die S-Phase zu verhindern (später G1-Block im Zellzyklus). War es also möglich, den durch den Repressor pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4 gesilenceten hCMV-Minimalpromoter (-DOX) durch die Zugabe von 1µg DOX/ml Medium wieder ebenso zu aktivieren, wie es die vorausgegangenen Versuche gezeigt hatten (Kapitel 3.8), obwohl die Zellen des Einzelklons 102 durch Mimosin in einen späten G1-Block verbracht worden waren? Wenn dies der Fall war, so konnte davon ausgegangen werden, dass eine Aktivierung des hCMV-Minimalpromoters durch rtTA nicht während der Zellreplikation oder der Mitosephase stattfand, da sonst eine geringere Aktivierung zu beobachten gewesen wäre. Die Zellen wurden 24h ohne DOX und mit Mimosin behandelt, dann weitere 24h in Mimosin belassen, nun jedoch zusätzlich auch mit einer DOX-Konzentration von 1µg/ml Medium behandelt.

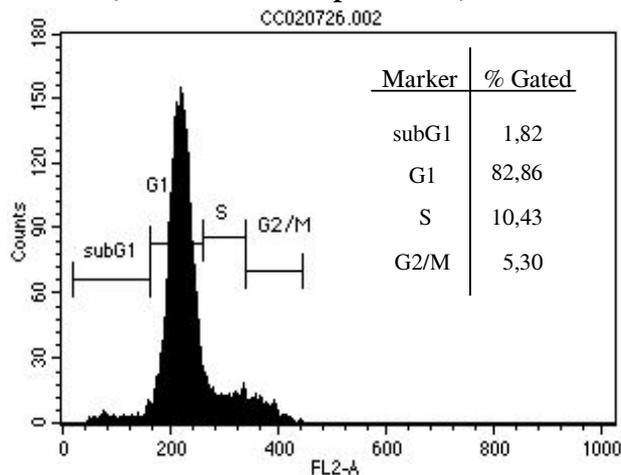
Der Effekt sowohl eines 24-stündigen wie auch eines 48-stündigen Mimosinblocks auf Zellen im Gegensatz zu den den Zellzyklus asynchron durchlaufenden Zellen ist in Abb.17 zu erkennen.

In der G1-Phase akkumulieren über 29% mehr, in der S- und G2/M-Phase über 9% bzw. 20% weniger Zellen, respektive, als in den asynchron durch den Zellzyklus laufenden Kontrollzellen. Trotz dieser Unterschiede lassen sich die durch Mimosin in ihrem Zellzyklus behinderten Zellen des Einzelklons 102 durch rtTA (1µgDOX/ml Medium) noch besser aktivieren, als Zellen, welche ohne mit Mimosin behandelt zu werden, aus DOX-freiem Medium kommend für 24h in DOX-haltiges Medium (1µg/ml) gegeben werden.

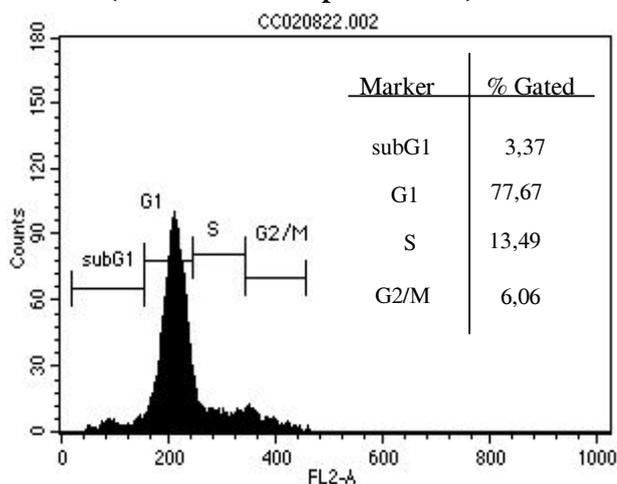
Die Ergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt.



C: Klon 102, 24h Mimosin
(G1-Block, Zeitpunkt 0h)

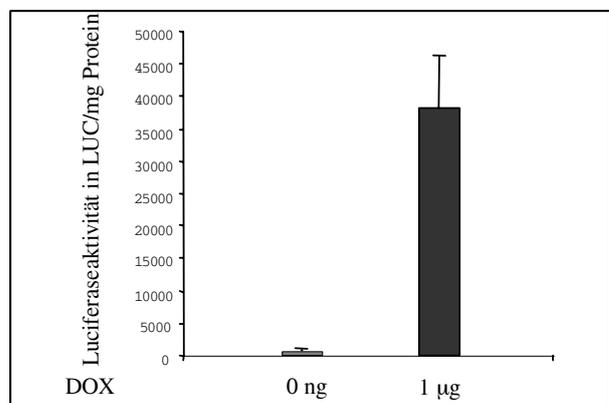


D: Klon 102, 48h Mimosin
(G1-Block, Zeitpunkt 24h)



**Durchflusszytometrie
Zellzyklusbestimmung im FACS**

E: Klon 102, 48h Mimosin
(G1-Block, Zeitpunkt 24h)



**Transkriptionsaktivierung des hCMV-
Promoters durch rtTA**

Abb.17 Transkriptionsaktivierung des hCMV-Minimalpromoters im HRL9-HDAC 4-Einzelklon 102 durch rtTA in G1-blockierten Zellen ist möglich

Zellen, die den Zellzyklus asynchron durchlaufen (A) ließen sich nach Zugabe von 1µg DOX/ml Medium und der damit einhergehenden Anbindung des rtTA an die TRE-Seite des hCMV-Minimalpromoters in ihrer Luciferaseexpression hochregulieren (B).

Das Gleiche gilt auch für Zellen des Klons 102, die zuvor durch eine 48-stündige Mimosinbehandlung in einen G1-Block versetzt wurden (D). Auch bei ihnen kommt es durch die Zugabe von 1µg DOX/ml Medium zu einem sogar noch höheren Anstieg der Luciferaseaktivität durch rtTA (E). Bild (C) zeigt die Zellen nach 24-stündiger Mimosinbehandlung.