

3 Material und Methoden

3.1 Material

Soweit nicht anders angegeben wurden die verwendeten Chemikalien von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH München bezogen.

Enzyme und Reagenzien für PCR

10x Probenpuffer	Promega, Mannheim
4x Probenpuffer	
Alkalische Phosphatase	Promega, Mannheim
dNTP's	Promega, Mannheim
MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
OligodT-Primer	Promega, Mannheim
Restriktions-Endonukleasen	Invitrogen, Karlsruhe
RNase-Inhibitor	Promega, Mannheim
T4-Ligase	Promega, Mannheim
Taq DNA Polymerase	PEQ-Lab, Erlangen
Taqman Universal Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt

Assay-Systeme

Cell Counting Kitt-8	Probior, München
Cell Proliferation Elisa	Roche, Penzberg
DANN Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
ECL Detection Kit	Ammersham, Bioscience
PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Isolations Kit	Qiagen, Hilden
RNA Isolations Kit	Qiagen, Hilden
siRNA Construction Kit	Ambion, Huntingdon UK
Taqman Ribosomal RNA Control	Applied Biosystems, Darmstadt
Prolong Antifade Eindeckmedium	Invitrogen, Karlsruhe

Zelllinien

293T	Freundliche Gabe von Dr. Lobitz, Klinik für Pädiatrie, Campus Virchow-Klinikum, Charité Universitätsmedizin Berlin
C2C12	Freundliche Gabe von Herrn Thurisch, Klinik für Neonatalogie, Campus Virchow-Klinikum, Charité Universitätsmedizin Berlin

Medien für die Zellkultur

0,025% Trypsin/0,01% EDTA in PBS	Promocell, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom AG, Berlin
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Optimem	Invitrogen, Karlsruhe
Skeletales Muskel-Medium	Promocell, Heidelberg

Transfektionsreagenzien

Effectene	Qiagen, Hilden
Fugene 6	Roche, Penzberg
Genesilencer	PEQ-Lab, Erlangen
Oligofectamine	Invitrogen, Karlsruhe
siPort	Ambion, Huntingdon, UK

Vektoren

LV-THM	Zur Verfügung gestellt von Prof. Trono, Genf
pMD2G	Zur Verfügung gestellt von Prof. Trono, Genf
pCMV-dR8.91	Zur Verfügung gestellt von Prof. Trono, Genf
pRSVRev	Zur Verfügung gestellt von Prof. Trono, Genf

Puffer und Lösungen

Annealing Puffer

100mM Kaliumacetat
30mM Hepes pH7,4
2mM Magnesiumacetat

Laufpuffer 10x

0,2mol/l Glycine
0,192mol/l Tris
0,1% SDS

TFB1-Puffer

100mM Rubidiumchlorid
50mM Magnesiumchlorid
30mM Kaliumacetat
10mM Kalziumchlorid
15% Glycerol, pH 5,8

TFB2-Puffer

10mM MOPS
10mM Rubidiumchlorid
75 mM Kalziumchlorid
15% Glycerol
pH 6,8 mit Kaliumhydroxid eingestellt

Trenngelpuffer 4x

1,5mol/l Tris,
0,4 % SDS

Sammelgelpuffer 4x

0,5mol/l Tris
0,4% SDS

Blotting Transferpuffer

48mM Tris
39mM Glycine
20% Methanol

TBS-T

10mM TrisHCl pH 7,5
150mM NaCl
0,1% Tween

Stripping Puffer

62,5mM Tris pH 6,7,
100mM β -Mercaptoethanol
2% SDS

RIPA-Puffer

25mM TrisHCl pH 7,5
150mM NaCl,
0,5% Natriumdeoxycholat
0,1% SDS, 2% Tween

10x TBS

100mM TrisHCL
1,5M NaCl
pH 7,5

10x TBE-Puffer

0,9M Tris-Borat
20 mM EDTA
pH 8,0

LB-Medium

10g/L Trypton
5g/L Hefe-Extrakt
5g/L NaCl
pH 7,5

TE-Puffer

10mM Tris/HCl
1mM EDTA
pH 7,5

Tabelle 1: Primer Oligonukleotide. Die humanen Primer wurden sowohl für die Taqman-PCR als auch für die semiquantitative PCR eingesetzt.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Abkürzung
Maus p21 Forward	agtgagcagttgcgccgtgatt	p21mur-For
Maus p21 Reverse	accagagtgaagacagcgacaag	p21-mur-Rev
Human p21 Forward	tgcatccaggaggcccgtgagc	p21-up-1
Human p21 Reverse	gccgccgttttcgacctgagagt	p21-low-1
Human β -Actin Forward	ccctaaggccaaccgtgaaaagatg	β -Actin-Up
Human β -Actin Reverse	gaaccgctcattgccgatagtgatg	β -Actin-Low
Human GAPDH Forward	gtcaacggatttggtcgtatt	GapDH-Up
Human GAPDH Reverse	agtcttctgggtggcagtgat	GapDH-Low

Tabelle 2: Oligonukleotid Sonden für Taqman PCR

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Abkürzung
p21-human-Sonde	FAM-CTTCGGCCAGTGGACAG-TAMRA	

Tabelle 3: Oligonukleotid Templates für die siRNA Herstellung mittels *siRNA Construction Kit*.

Bezeichnung siRNA Templates	Sequenz 5'-3'	Abkürzung
Luciferase Antisense	aatcgaagtattccgcgtacgcctgtctc	Luc-Anti
Luciferase Sense	aacgtacgcggaataacttcgacctgtctc	Luc-Sense
p21 Maus 1 Antisense	aaagtgtgccgtgtctctccctgtctc	p21-M-1Anti
p21 Maus 1 Sense	aagaagagacaacggcacactcctgtctc	p21-M-1Sense
p21 Maus 2 Antisense	aacggtggaactttgacttcgcctgtctc	p21-M-2Anti
p21 Maus 2 Sense	aacgaagtcaaagtccaccgcctgtctc	p21-M-2Sense
p21 Maus 3 Antisense	aagagaaaaccctgaagtgccctgtctc	p21-M-3Anti
p21 Maus 3 Sense	aaggcacttcagggttttccctgtctc	p21-M-3Sense
p21 Human 1 Antisense	aagaccatgtggacctgtcacctgtctc	p21-I Anti
p21 Human 1 Sense	aagtacaggtccacatggtccctgtctc	p21-I Sense
p21 Human 2 Antisense	aaaggcccgtctacatcttccctgtctc	p21-II Anti
p21 Human 2 Sense	aagaagatgtagagcgggccacctgtctc	p21-II Sense
p21 Human 3 Antisense	aacttcgactttgtcaccgagcctgtctc	p21-III Anti
p21 Human 3 Sense	aactcggtgacaagtcgaagcctgtctc	p21-III Sense

Tabelle 4: shRNA Sequenzen

	MLU1	19nt Sense	Loop	19nt Anti-Sense	Stop	CLA1	
	murine siRNA A p21						
5'	CGCGTCCCC	AGTGTGCCGTTGTCTCTTC	TTCAAGAGA	GAAGAGACAACGGCACACT	TTTTT	GGAAAT	3'
	humane siRNA I p21						
5'	CGCGTCCCC	GACCATGTGGACCTGTCAC	TTCAAGAGA	GTGACAGGTCCACATGGTC	TTTTT	GGAAAT	3'
	humane siRNA III p21						
5'	CGCGTCCCC	CTTCGACTTTGTCACCGAG	TTCAAGAGA	CTCGGTGACAAAGTCGAAG	TTTTT	GGAAAT	3'

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung

Alle Zelllinien und primäre Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Primäre humane skeletale Myoblasten wuchsen unter Verwendung von *Human-Skeletal Growth Medium* der Firma Promocell mit 5% fetalem Kälber Serum (FKS). Die Zelllinien 293T und C2C12 wurden mit *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) und einer Serumkonzentration von 10% kultiviert.

Das Medium wurde zwei- bis dreimal pro Woche gewechselt und die Zellen bei Erreichen von Konfluenz passagiert. Hierzu wurden das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit einem Volumen Phosphat-gepufferter Saline (PBS) gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde 0,05ml/cm² Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und für zwei bis fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Bei 293T Zellen konnte nach einer Minute bei Raumtemperatur trypsinisiert werden. Das Trypsin wurde durch Zugabe von zwei Volumen an serumhaltigem Medium inaktiviert und die Zellsuspension in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für fünf Minuten bei 560g wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 5ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit einer Trypanblau-Färbung bestimmt.

3.2.2 Kryokonservierung

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen erneut fünf Minuten bei 560g abzentrifugiert und in DMEM-Medium + 20% FKS aufgenommen, so dass eine Zellkonzentration von 2x10⁶/ml vorlag. Je 1ml der Suspension wurde in ein vorgekühltes Kryo-Röhrchen gegeben, anschließend wurden 0,8ml DMEM + 14% Dimethylsulfoxid zugegeben. Die Kryo-Röhrchen lagerten bei -20°C für zwei Stunden und anschließend bei -80°C. So können die Zellen über mehrere Monate gelagert werden oder nach zwei Tagen bei -80°C in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Bis zum Auftauen wurden die Röhrchen im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Der Inhalt wurde in ein 15ml Zentrifugenröhrchen überführt in dem 10ml DMEM vorgelegt war. Das Röhrchen wurde fünf Minuten bei 560g zentrifugiert, um Dimethylsulfoxid zu entfernen, bevor das Zellpellet erneut in 5ml Kulturmedium aufgenommen und suspendiert wurde. Die Zellzahl wurde mit einer Trypanblau-Färbung bestimmt.

3.2.3 Transfektion von siRNA

Die zu transfizierenden Zellen wurden 24 Stunden zuvor in Wellplatten ausgesät, so dass sie eine Konfluenz von 50%-70% zum Zeitpunkt der Transfektion erreichen. Wenn nicht anders angegeben wurden die in der Tabelle 5 genannten Zellzahlen in die Wellplatten gesät. In den folgenden Beschreibungen der Transfektionen wurden die benötigten Mengen für eine Transfektion im 6-Well-Format in Klammern hinter die Mengen einer Transfektion im 96-Wellformat geschrieben.

Tabelle 5: Eingesetzte Zellzahlen in verschiedenen Kulturschalen

Zellen	96-Well	24-Well	12-Well	6-Well
C2C12	5×10^3	1×10^4	$2,5 \times 10^4$	1×10^5
293T	1×10^3	1×10^4	$2,5 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$
primäre Myoblasten	5×10^3			$1,5 \times 10^5$

3.2.3.1 Genesilencer

1 l (5 l) Genesilencer Transfektions Reagent wurden mit 25 l serumfreien Medium verdünnt. 2,5 l (25 l) siRNA Diluent wurden mit 15 l serumfreien Medium verdünnt und darin die benötigte Menge an siRNA (7-70nM) aufgenommen, durch Pipettieren vermischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die siRNA-Lösung wurde danach mit der Genesilencer-Lösung vermischt und für mindestens fünf Minuten jedoch nicht länger als 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium in der Wellplatte abgenommen und nach dem Waschen mit PBS durch 56,5 l (930 l) serumfreies Medium ersetzt. Die Transfektionslösung wurde tropfenweise in das Well pipettiert und durch leichtes Kippen der Platte gemischt. Nach vier Stunden wurde ein Volumen an Medium mit doppelt konzentriertem Serum hinzu gegeben.

3.2.3.2 Oligofectamine

1 l (10 l) siRNA mit einer Konzentration von 20 M wurden auf 16 l (175 l) mit serumfreien Medium verdünnt. 0,8 l (4 l) Oligofectamine wurden mit 3 l (15 l) serumfreies Medium gemischt und für fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das verdünnte Oligofectamine wurde im Anschluss zu dem siRNA-Mix gegeben und 15-20 Minuten inkubiert, um die Komplexbildung zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden 80 l (800 l) serumfreies Medium

zu den Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz wurde in das Well pipettiert und für vier Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde ein Volumen an Medium mit doppelter Serumkonzentration zugegeben, um die normale Serumkonzentration von 10% im Medium wiederherzustellen.

3.2.3.3 siPort

0,6 μ l (4 μ l) siPort-Lipid Reagenz wurden mit serumfreien Medium auf 3 μ l (15 μ l) verdünnt, gemischt und 10-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 0,05-0,5 μ l (0,5-5 μ l) einer 20 μ M siRNA wurden in serumfreien Medium auf ein Volumen von 16,5 μ l (182 μ l) aufgefüllt und zu dem verdünnten Transfektionsreagenz gegeben. Es wurde für weitere 15-20 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Volumen PBS gewaschen. 80 μ l (800 μ l) frisches serumfreies Medium wurden in das Well pipettiert und der Transfektionsansatz hinzugegeben. Durch leichtes Schwenken wurde der Komplex verteilt und nach vierstündiger Inkubation bei 37°C wurde wiederum ein Volumen Medium mit doppelter Serumkonzentration zugegeben.

3.2.4 Zell-Vitalitäts Assay

Zur Bestimmung der Vitalität wurde ein Kit der Firma Probiol eingesetzt. Dieser beruht auf der Reduzierung von Tetrazoliumsalzen durch intrazelluläre Dehydrogenasen zu Formazan, welches bei 450nm detektiert werden kann. Hierzu wurden die Zellen in 96 Well Platten ausgesät und nach 24 Stunden das Medium gewechselt. Es wurden 10 μ l Lösung hinzugegeben und die Platte für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Messung im Elisa Reader.

3.2.5 Zell-Proliferations Assay

Die Proliferation wurde über die Menge des inkorporiertem Thymidinanalogon Bromodesoxyuridin (BrdU) ermittelt. Das Testprinzip beruht darauf, dass bei der DNA-Replikation während der S-Phase BrdU eingebaut wird, welches nach Denaturierung und Fixierung über einen spezifischen Antikörper und anschließender Bindung eines Peroxidase-gekoppelten, sekundären Antikörper detektiert werden kann. Die Durchführung des Assays erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Peroxidase-Reaktion wurde mit 1M Schwefelsäure gestoppt und bei 450nm gegen 650nm gemessen. Hierbei wurden Vitalitäts- und Proliferationsassay simultan im selben Well durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der Vitalität auf die Proliferation detektieren zu können.

3.2.6 Herstellung und Aufkonzentrierung von Viruspartikeln

6x10⁶ 293T Zellen wurden pro 15cm Zellkulturschale ausgesät und mit 17ml DMEM 10% FKS für acht Stunden bei 37°C inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt lag die Konfluenz der Zellen bei ca. 80%. Pro 15cm Platte wurden in einem 15ml Zentrifugenröhrchen 1,45ml Optimem Medium vorgelegt und 44,5 μ l Fugene-6 Transfektionsreagenz tropfenweise zugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Es wurden die Helferplasmide und der lentivirale Vektor, wie in Tabelle 6 angegeben, gemischt, tropfenweise zum Fugene Mix hinzugefügt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Komplexbildung des Reagenz mit der DNA zu ermöglichen. Der Fugene/DNA Mix wurde dann tropfenweise über die 15cm Platte verteilt, und die Zellen wurden über Nacht im Inkubator kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium durch frisches DMEM 10% FKS ersetzt und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert.

Tabelle 6: Mengen der eingesetzten Helferplasmide bei der Herstellung von Lentiviren

Plasmid	DNA per 15cm Schale
pLV-THM	10µg
pMD2G (envelope)	2,5µg
pCMV-dR8.91 (HIV gag/pol)	7,5µg
pRSVRev (rev)	2,5µg

Zur Gewinnung der im Überstand befindlichen Viruspartikel wurde das Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellkulturschale mit frischem Medium weiter inkubiert. Der Zellüberstand wurde für zehn Minuten bei 700g zentrifugiert, um Zellen und Debris zu entfernen. Im Anschluss wurde der Überstand durch einen Filter mit 0,45µm Porengröße gegeben und in ein 35ml Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Die Viruspartikel wurden in einer Sorvall 80 Ultrazentrifuge mit einem Schwingrotor AH629 bei 22.600rpm und 4°C für drei Stunden pelletiert und der Rotor auslaufen gelassen. Der Überstand wurde dekantiert und das Viruspellet in 50µl X-Vivo oder PBS gelöst. Das Ultrazentrifugenröhrchen wurde mit Parafilm verschlossen und eine Stunde auf Eis inkubiert, um das Lösen des Viruspellets zu unterstützen. Das aufkonzentrierte Virus wurde noch einmal bei 2000g für zehn Minuten zentrifugiert um ungelöste Bestandteile zu entfernen. Danach wurde die Lösung in Kryoröhrchen aliquotiert, da ein häufiges Auftauen und Einfrieren zum Verlust von infektiösem Virus führt, und bei -80°C gelagert. Diese Prozedur wurde nach weiteren 24 Stunden wiederholt um Virus erneut aufzukonzentrieren.

3.2.7 Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung der Konzentration infektiöser Partikel wurden 293T Zellen in eine 24 Well Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und dem frischen Medium 8µg/ml Polybrene zugefügt, welches die Infektion der Viruspartikel durch Anlagerung an die Zellmembran erleichtert. Zwei Wells wurden trypsiniert, um die durchschnittliche Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion zu ermitteln. Es wurden Verdünnungsstufen von 10⁻¹ bis 10⁻⁶ des Virus hergestellt und je 20µl zu 180µl Medium in ein Well gegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Vier Tage nach der Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und trypsiniert. Die Zellen wurden ein weiteres Mal in

PBS gewaschen und dann in 1ml PBS resuspendiert. Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl der GFP positiven Zellen bestimmt (3.5.2). Die Anzahl der infektiösen Partikel wurde aus Zellen mit einer Virusverdünnung bestimmt, bei der die Anzahl an GFP positiven Zellen zwischen 1% - 20% lag. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel :

$$\text{Titer (U/ml)} = [F \times C_0/V] \times D$$

F = Anteil der GFP positiven Zellen

C₀ = Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion

V = Volumen des Überstandes

D = Verdünnungsfaktor des Virus

3.2.8 Infektion von Zellen

24 Stunden vor der Infektion wurden die Zellen in eine 24-Wellplatte bzw. primäre Muskelzellen in eine 25cm² Zellkulturflasche gesät. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden die Zellen aus Well bzw. einer Flasche trypsinisiert und gezählt. Das Medium wurde bei den zu infizierenden Zellen gewechselt, dem neuen Medium wurden 8µg/ml Polybrene zugesetzt. Mit der aus der Titerbestimmung ermittelten Konzentration und der aktuellen Zellzahl konnte die Anzahl der infektiösen Partikel pro Zelle (MOI, *multiplicity of infection*) errechnet werden, bevor diese zu den Zellen zugegeben wurden. Nach zwölf Stunden wurde das virushaltige Medium durch frisches ersetzt und nach frühestens vier Tagen die Infektionsrate mittels FACS-Analyse bestimmt.

3.2.9 Isolierung von murinen Zellklonen

Um nach Virusinfektion eine Zelllinie mit identischem Integrationsort zu erhalten, wurden einzelne Zellklone durch Verdünnung isoliert. Die Zellen wurden hierzu trypsinisiert und mit Medium auf eine Zellzahl von 5, 10 und 15 Zellen/ml verdünnt. Aus den Verdünnungen wurden je 100µl in jedes Well einer 96-Wellplatte pipettiert. Nach einer Woche hatten die einzelnen Zellen einen kleinen Zellplaque gebildet und Wells, in denen nur ein Plaque zu sehen war, wurden markiert. Im nächsten Schritt konnten aus den Wells mit einer Population unter dem Fluoreszenzmikroskop die GFP-positiven identifiziert werden. Diese wurden weiter kultiviert, bis ausreichend Zellen für weitere Untersuchungen und Lagerung zur Verfügung standen.

3.2.10 Zellyse eukaryontischer Zellen

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit einem Volumen an PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1ml/10cm² TRI Reagent lysiert anschliessend bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert.

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Aus einem *E.coli* Glycerolstock wurden 10ml vorgewärmtes LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 150rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 1ml der Kultur in einen 250ml Kolben mit 100ml vorgewärmtem LB-Medium gegeben und bei 37°C im Schüttler inkubiert, bis eine optische Dichte (OD bei 600nm) von 0,5 erreicht war. Die Kultur wurde in 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 4000xg und 4°C wurden die Zellen stets auf Eis gehalten. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets wurden in je 15ml eiskaltem TFB-1 Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden für 90 Minuten auf Eis inkubiert und anschliessend bei 4000xg für fünf Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig in je 2ml eiskaltem TFB-2 Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 100µl Aliquots in 1,5ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und diese direkt in einem Trockeneis-Ethanolgemisch gefroren, bevor sie bei -80°C gelagert wurden.

3.3.2 Transformation von DNA in *E.coli*

Je 100µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 50-200ng Vektor zugegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt. Der Ansatz wurde für 15-20 Minuten auf Eis inkubiert und anschliessend für 45 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Es erfolgte die Zugabe von 500µl auf 37°C vorgewärmtes LB Medium und die Zellen wurden für zwei Stunden bei 37°C auf dem Schüttler bei 150rpm inkubiert. Die Zellen wurden für fünf Minuten bei 3000g abzentrifugiert und in 100µl LB Medium resuspendiert. Bei erwarteter hoher Koloniezahlen wurden, eine Verdünnungsreihe der Suspension auf LB Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C überkopf inkubiert.

3.3.3 Herstellung von Glycerolstocks

Um eine Retransformation von Plasmiden in *E.coli* zu vermeiden, wurde von positiven Klonen ein Glycerolstock angelegt, aus dem bei Bedarf eine Übernachtskultur angeimpft werden konnte. Hierzu wurde ein Volumen Übernachtskultur mit einem Volumen 40% Glycerol versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Nukleinsäure-Analytik

3.4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung wurde eine Übernachtskultur entweder von LB-Agarplatten oder aus Glycerolstocks angeimpft und bei 37°C und 150rpm inkubiert. Es wurden Qiagen Plasmid Minikits nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurden 2ml der Kultur durch Zentrifugation bei 6000xg für zehn Minuten bei 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von alkalischem Lysepuffer und anschließender Neutralisation wurde das Zellysate für zehn Minuten bei 17.900g zentrifugiert und der Überstand auf eine Anionenaustauschersäule gegeben. Nach einem Waschschrift der Säule erfolgte die Elution der Plasmid-DNA.

Zur Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA wurden der Qiagen Plasmid Midikit verwendet, dessen Kapazität bei 100µg liegt. Hierbei wurden 100ml LB-Medium in einem 250ml Schüttelkolben mit 100µl Übernachtskultur angeimpft und für 12-16 Stunden bei 37°C und 150rpm inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte analog zu dem des Qiagen Plasmid Minikits mit dem Unterschied, dass das Eluat einer zusätzlichen Isopropanol-Fällung unterzogen wurde, um die Plasmid-DNA aufzukonzentrieren und restliche Salze zu entfernen.

3.4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260nm im Spektralphotometer. Hierzu wurde die verdünnte DNA-Lösung in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1cm vermessen. Eine optische Dichte von eins entspricht dabei einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA (40µg RNA). Die Reinheit der DNA wurde durch den Quotienten der Messungen bei 260nm und 280nm ermittelt. Dabei liegt der Wert für reine Nukleinsäuren zwischen 1,8 und 2. Liegt der Wert darunter, enthält die Probe Verunreinigungen z.B. durch Proteine.

3.4.1.3 Restriktionsverdau von DNA

Zur Spaltung der Plasmid-DNA wurden 100-400ng DNA mit 2µl 10x Probenpuffer und fünf Units Enzym eingesetzt und mit PCR-Wasser auf 20µl aufgefüllt. Die Spaltung erfolgte nach den Spezifikationen der Enzyme. Anschliessend wurde die DNA mit einem Qiagen *PCR-Purification Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Hierbei bindet die DNA an eine Ionenaustauschersäule. So können kleine Nukleotide, Enzyme und Salze abgetrennt werden.

3.4.1.4 Fällung von DNA

Lag DNA in einem zu großen Volumen vor oder enthielt sie Verunreinigungen durch Salze oder Proteine, war eine Fällung der DNA notwendig. Hierzu wurden der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2 und 2,2 Volumen Ethanol oder Isopropanol zugefügt und die DNA für zwei Stunden bei -20°C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation bei 10.000g für 15 Minuten bei 4°C . Das Pellet wurde in einem Volumen (mindestens jedoch 200 μl) 70% Ethanol gewaschen. Es wurde für eine Minute bei 10.000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die DNA wurde nochmals mit einem Volumen 100% Ethanol gewaschen, um Wasserreste zu entfernen. Nach Zentrifugation wurde die DNA in PCR-Wasser oder TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.4.1.5 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zur Kontrolle von Restriktionsverdau und PCR-Reaktion wurden DNA-Proben auf einem Agarosegel aufgetrennt. Hierzu wurde 0,70-1,5% w/V Agarose in TBE-Puffer aufgeköcht. Es wurde dem Gel 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid zugefügt, welches in doppelsträngige DNA interkaliert und die DNA unter UV-Licht bei 300nm sichtbar macht. Die Laufkammer wurde mit TBE Puffer gefüllt. 9 μl DNA wurden mit 1 μl 10x DNA Probenpuffer versetzt und in eine Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 90-120V. Anschliessend wurde eine Foto-Dokumentation durchgeführt.

3.4.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die im Agarosegel identifizierten Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit Hilfe eines QiaQuick DNA Gel Extraktions Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.4.1.7 Auswahl von siRNA-Sequenzen

Die Wahl der siRNA Sequenzen wurde unter Zuhilfenahme der Internetseite des Whitehead Institute getroffen (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>). Das dort zur Verfügung gestellte Tool berücksichtigt bei der Auswahl die von der Arbeitsgruppe Tuschl publizierten Kriterien für wirksame siRNA⁹². Die Sequenzen wurden in einem *blast search* mit den bekannten humanen bzw. murinen Sequenzen abgeglichen, um eine Homologie zu anderen bekannten Genen auszuschliessen.

3.4.1.8 Herstellung von *in vitro* transkribierter siRNA

Die Herstellung der siRNA erfolgte mit einem *siRNA Construction Kit* der Firma Ambion nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden zwei komplementäre 29bp lange Oligonukleotide verwendet, die aus der 21bp siRNA Sequenz mit einer am 3'Ende angehängenen 8bp langen Sequenz für die T7 RNA-Polymerase bestanden. In separaten Reaktionen hybridisierte der T7 Promotor Primer mit den Oligonukleotiden. Die 3'Enden wurden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase aufgefüllt und

es entstanden so doppelsträngige Transkriptionstemplates. Aus diesen konnte die RNA-Polymerase RNA-Transkripte synthetisieren, die in einem zweiten Schritt miteinander hybridisiert wurden. Durch eine DNase Behandlung und die Verwendung einer speziellen Einzelstrang-Ribonuklease konnten die siRNA von DNA Templates und RNA-Einzelsträngen getrennt werden. Die weitere Aufreinigung erfolgte über eine Glasfibrsäule. Die siRNA wurde in nukleasefreiem Wasser aufgenommen und vermessen.

3.4.1.9 Herstellung von shRNA-Vektoren

3.4.1.9.1 Herstellung der shRNA-Oligonukleotide

Sense und Antisense Sequenz für die shRNA Oligonukleotide wurden nach den Kriterien von Trono¹¹¹⁴ mit der entsprechenden Sequenz für die siRNA versehen und kommerziell im 50µmol Maßstab synthetisiert. Je 2µl Sense und Antisense Strang wurden mit 46µl *Annealing*-Puffer für fünf Minuten bei 95°C und anschliessend für weitere zehn Minuten bei 70°C inkubiert um eine korrekte Anlagerung der beiden Stränge zu gewährleisten. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 5µl des Oligonukleotides zur Phosphorylierung eingesetzt und anschliessend bei -20°C gelagert.

3.4.1.9.2 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Ligation in einen Vektor zu ermöglichen, werden die 5'-Enden des Oligonukleotides phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5µl ATP-haltigem 5x Puffer und 1U T4-Polynukleotidkinase versetzt und mit Wasser auf 20µl aufgefüllt. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 37°C wurde die Kinase für 20 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert.

3.4.1.9.3 Ligation von zwei DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden

Durch die unterschiedlichen Restriktionsenzyme war die Orientierung des Inserts vorgegeben. 200ng geschnittene Vektor-DNA und die dreifache Menge an Insert wurden mit 5U Ligase und 4µl 5x ATP-haltigem Reaktionspuffer inkubiert und mit Wasser auf 20µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde bei 16°C über Nacht durchgeführt. Die Vektoren wurden anschliessend in *E.coli* transformiert.

3.4.1.10 RNA-Isolierung mit RNeasy Kit nach TRI Reagent Lyse

Die bei der Phenol-Chloroform-Extraktion erhaltene wässrige Phase wurde mit einem Volumen eiskaltem 70% Ethanol in Diethylpolycarbonat (DEPC)-haltigem Wasser versetzt und 700µl auf eine Qiagen *RNeasy MiniKit* Säule gegeben. War das Volumen der Probe größer, so wurde nach der Zentrifugation bei 10.000g für eine Minute das restliche Probenvolumen in die Säule pipettiert und erneut zentrifugiert. Die Isolierung erfolgte nach der Anweisung des Herstellers. Dabei wurde ein Dnase-Verdau direkt auf der Säule durchgeführt. Die Elution der RNA erfolgte in 30µl RNase freiem Wasser und die anschließende Lagerung bei -80°C.

3.4.1.11 RNA-Isolierung nach TRI Reagent Lyse

Die wässrige Phase wurde mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt und die RNA für mindestens zwei Stunden bei -20°C oder für 30 Minuten bei -80°C gefällt. Die ausgefallene RNA wurde für 20 Minuten bei 4°C und 12.000g zentrifugiert und das Isopropanol vollständig entfernt. Mit 75% Ethanol wurde die RNA einmal gewaschen und das Ethanol wiederum möglichst vollständig entfernt. Die RNA wurde in 30 μl DEPC Wasser gelöst und inkubiert noch einmal für zehn Minuten bei 60°C , bevor sie bei -80°C gelagert wurde.

3.4.1.12 CDNA-Synthese mit reverser Transkriptase

Zur Herstellung von cDNA aus der isolierten RNA wurde diese mittels des Enzyms Reverse-Transkriptase umgeschrieben. 100-500ng RNA wurden mit DEPC Wasser auf 10 μl verdünnt und mit 1 μl Oligo dT Primer gemischt. Der Ansatz inkubiert für zehn Minuten bei 72°C . Anschließend konnte der Mastermix mit den folgenden Komponenten zugegeben werden :

- 4 μl 5x Puffer
- 2 μl 0,1M DTT
- 2 μl dNTP's (5mM)
- 0,5 μl RNase-Inhibitor
- 1 μl MLV reverse Transkriptase

Die Umschreibung verlief bei 42°C für 60 Minuten und endete mit einem Denaturierungsschritt von zehn Minuten bei 94°C . Die Reaktion wurde auf 50 μl mit TE-Puffer aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

3.4.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Reaktion wurde die DNA in einem 0,2ml PCR-Reaktionsgefäß auf 10 μl verdünnt und je 10 μl Mastermix pro Reaktion zugefügt. Dieser bestand aus 2 μl 10x PCR Probenpuffer, 1 μl 10mM Primermix (*Forward* und *Reverse* Primer), 0,2 μl 10mM Nukleotid-Mix, 0,1 μl Taq-Polymerase 5U/ μl und ggf. 1,5 μl 25mM Magnesiumchlorid, sofern es nicht im Mastermix enthalten war. Der Mastermix wurde mit Wasser auf 10 μl aufgefüllt. Im Thermocycler erfolgte zunächst die Denaturierung der DNA in Einzelstränge für 60 Sekunden bei 94°C . Im zweiten Schritt erfolgte die Bindung der Primer an die DNA bei einer Temperatur, die 2-5 $^{\circ}\text{C}$ unter der Schmelztemperatur der Primer lag. Danach synthetisierte die Taq-Polymerase ausgehend vom Primer den komplementären Strang bei 72°C . Dem Elongationschritt schloss sich ein Denaturierungsschritt bei 94°C an. Die Zyklenzahl variierte je nach verwendeten Primern und Template zwischen 28-35 Zyklen. Zur Kontrolle der Amplifikation wurden 9 μl des PCR-Ansatzes mit 1 μl 10x Probenpuffer versetzt und auf ein 1% Agarosegel geladen (siehe 3.4.1.5).

3.4.1.14 Quantitative realtime PCR

Zur Messung der Produktmenge nach jedem Zyklus wurden Primer und Taqman-Probes sowie ein ABI Prism 7700 Cycler der Firma Applied Biosystems verwendet. Die PCR-Reaktion wurde in optischen 96-Wellplatten im 20µl Maßstab angesetzt. Es wurde ein kommerzieller Mastermix verwendet, zu dem lediglich die gewünschten Primer und Probes zugefügt wurden. Jede Reaktion wurde dreifach angesetzt. Für jedes Primer und Probe Set wurde ein Effizienztest nach den Angaben von Applied Biosystem¹²⁴ durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die Effizienz des Zielgens und des Referenzgens gleich sind. Die Auswertung erfolgte mit der Software des Cyclers nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode¹²⁴.

3.4.2 Protein-Analytik

3.4.2.1 Protein-Isolierung

Die Proben wurden aufgetaut und für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Dissoziation von DNA-Protein Komplexen zu ermöglichen. Es wurden im Anschluß 0,2ml Chloroform pro 1ml TRI Reagent hinzugefügt, 15 Sekunden kräftig geschüttelt und die Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Phasentrennung erfolgte eine Zentrifugation bei 12.000g für 40 Minuten bei 4°C. Die wässrige Phase wurde abgenommen und daraus RNA isoliert (siehe 3.4.1.11). Der organischen Phase wurden 0,2ml Ethanol pro 1ml TRI Reagent zugefügt und bei 4°C und 4.000g zentrifugiert, um die genomische DNA auszufällen. Der Überstand wurde abgenommen und der organischen Phase wurden 1,5 Volumen Isopropanol zugefügt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend zentrifugierte die Probe bei 10.000g für zehn Minuten bei 4°C. Das Proteinpellet wurde dreimal mit 2ml pro 1ml TRI Reagent 0,3M Guanidin-Hydrochlorid in 95% Ethanol gewaschen und danach ein weiteres Mal mit dem gleichen Volumen an 95% Ethanol. Das Pellet stand dabei jeweils 20 Minuten bei Raumtemperatur und wurde im Anschluss für fünf Minuten bei 7.500g abzentrifugiert. Das Proteinpellet trocknete für 15 Minuten, wurde in 1% SDS gelöst und nochmals bei 10.000g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

3.4.2.2 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung wurde in 96-Well Platten durchgeführt. Die hier angewendete *bicinchonic acid* Bestimmung (BCA) beruht auf der Reaktion nach Biuret. Als Standard diente eine *bovine Serum Albumin* (BSA) Verdünnungsreihe von 0-200µg/ml. Es wurde eine Doppelbestimmung der Proben und des Standards durchgeführt. Dazu wurden jeweils 200µl einer 50:1 Mischung BCA-Reagenz mit 1M Kupfersulfat zu 50µl Probe gegeben und bei 50°C für 30 Minuten inkubiert. Die Messung erfolgte im ELISA-Reader bei 550nm. Die Konzentration wurde mittels linearer Regression der Standardreihe ermittelt.

3.4.2.3 Westernblot

20µg bzw. 30µg der Proteinproben wurden mit Wasser auf 9µl bzw. 12µl verdünnt und mit 3µl bzw. 4µl 4x Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und anschliessend auf Eis gehalten. Die Substanzen für zwei Polyacrylamidgele wurden nach Tabelle 7 zusammengemischt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Acrylamidgele

	Trenngel	Sammelgel
Wasser	4,5µl	5µl
4xPuffer	2,25µl	1,85µl
Acrylamid	3,95µl	1,65µl
10% SDS	0,15µl	0,15µl
APS	100µl	50µl
Temed	15µl	30µl

Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Temed wurde das Trenngel zwischen die mit Ethanol gereinigten Glasplatten gegossen, so dass ein etwa 1,5cm breiter Streifen für das Sammelgel frei blieb. Die folgende Überschichtung mit Isopropanol garantierte eine exakte obere Kante bis das Gel nach 30 Minuten polymerisiert war. Das Isopropanol wurde abgegossen und das Sammelgel nach der Zugabe von APS und Temed auf das Trenngel gegossen. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Proben und ein Standard wurden in die Geltaschen pipettiert und die Proteine 30 Minuten bei 90mV und 60 Minuten bei 150mV aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 20 Minuten in Blotting Transferpuffer gelegt. Zum Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran kam ein Semidry-Blotting Verfahren zum Einsatz. Der Transfer erfolgte bei 40mA und maximal 25V über 30 Minuten. Die Membran wurde mit dest. Wasser gespült und für eine Minute mit Ponceau Rot reversibel gefärbt, um den Transfer zu überprüfen. Die Membran wurde für zehn Minuten in TBS-T entfärbt und im Anschluss für zwei Stunden in 4% Magermilch in TBS-T inkubiert. Die Membran wurde für fünf Minuten in TBS-T gewaschen und inkubierte über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4°C und leichtem Schütteln. Die Antikörper wurden mit 1% BSA in TBS-T und 0,1% Natriumazid verdünnt und in den in Tabelle 8 angegebenen Konzentration eingesetzt.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Firma	Konz. 1. Antikörper	Konz. 2. Antikörper	Quelle
Anti GapDH (Maus, Human) monoklonal	Chemicon	1:10.000	1:10.000	Maus
Anti Tubulin (Maus, Human) monoklonal	Sigma	1:1.000	1:5.000	Maus
Anti p21 human monoklonal	Oncogene	1:100	1:2.000	Maus
Anti p21 (Maus, Human) polyklonal	Santa Cruz	1:100	1:2.000	Hase

Die Membran wurde am nächsten Morgen viermal für zehn Minuten unter leichtem Schütteln mit TBS-T gewaschen und für 90 Minuten mit der entsprechenden Konzentration des sekundären Peroxidase gekoppelten Antikörper inkubiert. Nichtgebundener Antikörper wurde wieder mit viermaligem Waschen in TBS-T für zehn Minuten entfernt und die Membran anschliessend in der Dunkelkammer für eine Minute mit ECL-Reagenz inkubiert. Das Signal der ECL-Reaktion belichtete einen Röntgenfilm. Die Auswertung erfolgte durch Ermittlung der Bandenintensität im Vergleich zu einem internen GapDH- oder Tubulin-Standard. Hierzu wurde die Membran ein zweites Mal mit primären Antikörpern gegen den internen Standard, gefolgt von der Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper, hybridisiert. Die Bandenintensität wurde mit der Software Scion Image (<http://www.scioncorp.com/>) ausgewertet.

3.5 Physikalische Methoden

3.5.1 Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur Anzucht der Zellen wurden sterile Deckgläser in eine 6-Wellplatte gelegt und die Zellen in entsprechender Verdünnung in das Well gesät. Nach 24-48 Stunden wurden die Wells dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit 3,7% Formaldehyd in PBS 30 Minuten fixiert. Die Deckgläser wurden dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen, bevor sie mit *prolong Antifade* auf einem Objektträger eingedeckt wurden und direkt unter dem Fluoreszenz-Mikroskop mit einem Filter von 480nm auf GFP-Expression untersucht wurden.

3.5.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Zur FACS-Analyse wurden die Zellen trypsiniert, nach der Zentrifugation in PBS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe der Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie der Charité Campus Virchow-Klinikum. Die Zellen wurden mittels Vortex vorsichtig homogenisiert und in die Ladevorrichtung eines *FACSscan* der Firma

Becton und Dickinson gestellt. Die Zellen wurden durch eine Kapillare gesaugt und passierten dort einen Laserstrahl, wodurch das Licht des Lasers durch die Zellen abgelenkt wird. Ein Detektor auf der anderen Seite registriert das Vorwärtsstreuung (FSC), welches Auskunft über die Größe der Zellen gibt, während ein zweiter Detektor im 90° Winkel die Seitwärtsstreuung (SSC) misst. Die SSC ist ein Maß der Dichte und Granularität der Zellen. Beide Daten werden in einem Plot gegeneinander aufgetragen. Gleichzeitig wird der Fluoreszenzfarbstoff durch eine bestimmte Wellenlänge angeregt und das abgegebene Licht detektiert.

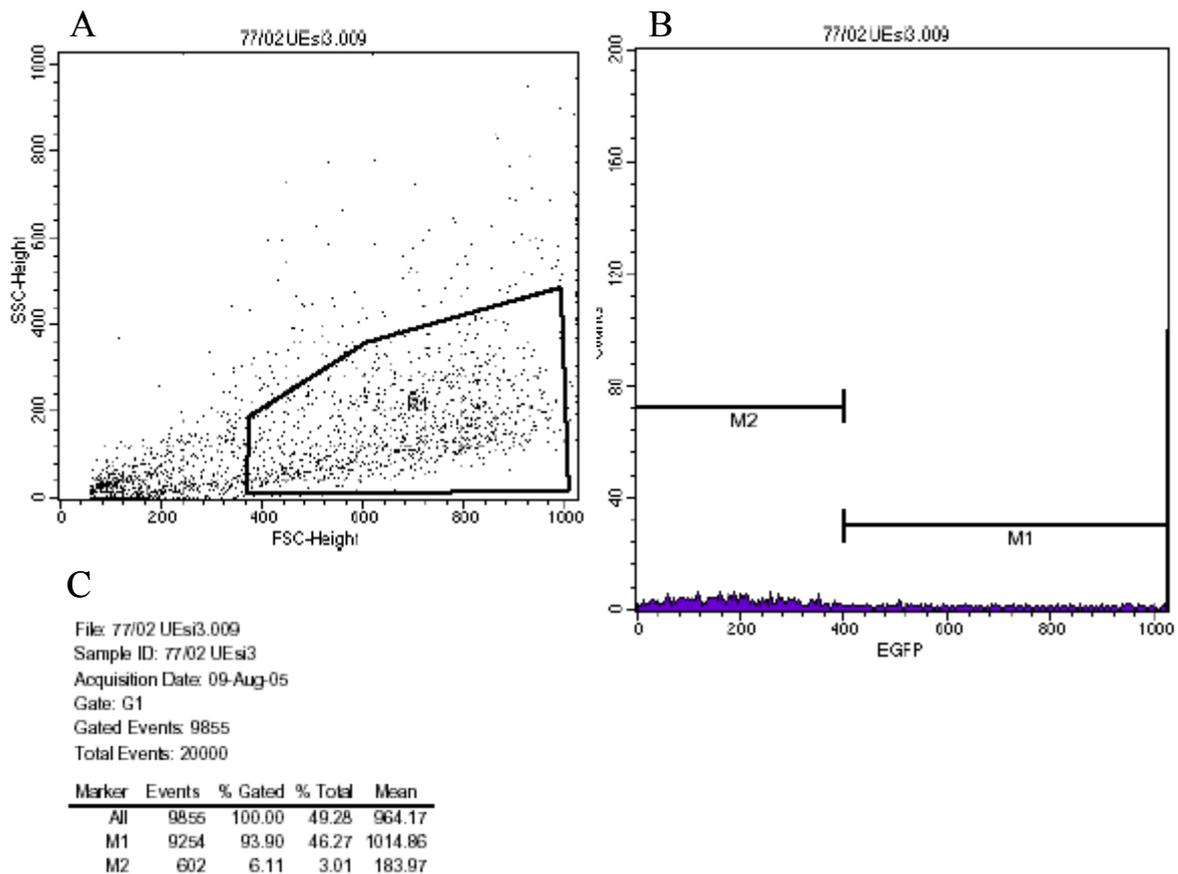


Abbildung 6: Ergebnis einer FACS-Messung. Im Plot A steht jeder Punkt für ein Objekt, welches die Kapillare passiert hat und vermessen wurde, es wird dabei auch von einem sogenannten „Event“ gesprochen. Es wird ein Bereich mit einem sogenannten „Gate“ markiert, in dem sich die Zellen befinden, nur diese werden bei der Analyse im zweiten Diagramm berücksichtigt (Abb. 6a). Alle Events, die kleinere Werte im FSC und SSC erreichen sind Zellrümpfer und kleinere Partikel. Im zweiten Diagramm ist die Intensität der Fluoreszenz auf der X-Achse und die Anzahl der Events im Gate auf der Y-Achse aufgetragen. Mit zwei Markern wird zwischen der Autofluoreszenz im Marker 2 und der Fluoreszenz durch GFP-Expression unterschieden (Abb.6b). Die Autofluoreszenz wird vorher an GFP negativen Zellen bestimmt. Die Auswertung gibt die benötigten Informationen (Abb.6c). Es wurden insgesamt 20.000 Events in der Kapillare registriert, von denen 9856 im Gate lagen. Von diesen zeigen 602 nur geringe Fluoreszenz im Marker 2 und 9254 eine hohe Fluoreszenz im Marker 1, welches zu einem Anteil an GFP positiven Zellen von 93,9% führt. Dabei lag die durchschnittliche Fluoreszenzintensität bei 1014,86.