

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Im Einzelnen wurden folgende Chemikalien von den angegebenen Quellen bezogen:

Agar	Difco (Detroit, USA)
Agarose	Sigma (Deisenhofen, D)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen, D)
Bactopepton	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Borsäure	Roth (Karlsruhe, D)
Bradford Reagenz (Roti Quant)	Roth (Karlsruhe, D)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen, D)
Chloroform	Roth (Karlsruhe, D)
Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs, mol.biol.)	Sigma (Deisenhofen, D)
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma (Deisenhofen, D)
Doxycyclin	Sigma (Deisenhofen, D)
Dulbecco`s Mod Eagle Medium	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, D)

Ethidiumbromid Stammlösung (10mg/ml)	Roth (Karlsruhe, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma (Deisenhofen, D)
Fetales Kälberserum	Greiner (Frickenhausen, D)
Fetales Kälberserum Tetracyclin frei	BD Clontech (Heidelberg, D)
Formamid	Sigma (Deisenhofen, D)
G-418 (Neomycin)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
L-Glutamin (100x)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Glycerol	Sigma (Deisenhofen, D)
Hygromycin B (Stammlösung 10mg/ml)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Isoamylalkohol	Roth (Karlsruhe, D)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Kanamycin	Sigma (Deisenhofen, D)
Mimosin	Sigma (Deisenhofen, D)
Natriumacetat	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdihydrogenphosphat	Riedel de Haen (Seelze, D)

Natriumhydroxyd	Roth (Karlsruhe, D)
Penicillin-Streptomycin (10000 units/ml)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Phenol	Roth (Karlsruhe, D)
Puromycin	Sigma (Deisenhofen, D)
Propidiumjodid Stammlösung (1mg/ml)	Sigma (Deisenhofen, D)
Rinderserumalbumin (BSA)	Biolabs (Frankfurt a.M., D)
Ribonuklease A (Typ I-AS)	Sigma (Deisenhofen, D)
Saccharose	Roth (Karlsruhe, D)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe, D)
Tris base	Roth (Karlsruhe, D)
Trichostatin A	Sigma (Deisenhofen, D)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen, D)
Xylencyanol	Sigma (Deisenhofen, D)
Yeast Extract	Invitrogen (Karlsruhe, D)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden im Einzelnen von den angegebenen Quellen bezogen:

Corex II Röhrchen	DuPond (Bad Homburg, D)
Einmalküvetten für Bradfordassay	Braun (Melsungen, D)
Elektroporationsküvetten (2mm)	Peqlab (Erlangen , D)
Eppendorfreaktionsgefäße (1,5 und 2ml Safe-Lock)	Eppendorf (Hamburg, D)
Glaswolle	Merck (Darmstadt, D)
Neubauer Zählkammer	Braun (Melsungen, D)
Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe, D)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml Safe-Lock)	Eppendorf (Hamburg, D)
Petrischalen (steril, 82 mm)	Greiner (Frickenhausen, D)
Falconröhrchen (steril, 15ml und 50ml)	Greiner (Frickenhausen, D)
S&S-Rotrand-1x-Sterilfilter (0,22µm)	Schleicher&Schuell (Dassel, D)
Sterile Spritzen	Henke Sass Wolf (Tuttlingen, D)
Zellkulturbedarf (96- und 24-well Platten, 3,5, 6 und 9cm Kulturschalen, Einmalpipetten, Einfrierröhrchen, Spitzen etc.)	Greiner (Frickenhausen, D)

3.1.3 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

3.1.3.1 Lösungen und Puffer

Ampicillinlösung	500 mg Ampicillin (Natriumsalz) in 10 ml <i>Aqua destillata</i> gelöst, steril filtriert, aliquotiert, bei -20° C lagerstabil
------------------	---

Doxycyclinlösung (DOX)	2 mg DOX in 10 ml <i>Aqua destillata</i> gelöst, steril filtriert, aliquotiert, bei –20°C lagerstabil
EDTA 0,5 M	14,6 g EDTA, ad 100 ml <i>Aqua destillata</i> , pH 8,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren
G-418- Lösung	1g G-418 in 10 ml <i>Aqua destillata</i> gelöst, steril filtriert, aliquotiert, bei –20°C lagerstabil
Kanamycinlösung	500 mg Kanamycin in 10 ml <i>Aqua destillata</i> gelöst, steril filtriert, aliquotiert, bei 4°C lagerstabil
Mimosin	25 mg Mimosin in 2500 µl 1 M HCl gelöst, aliquotiert, bei Raumtemperatur lagerstabil
Natriumacetat 3M	24,61 g Natriumacetat, ad 100 ml <i>Aqua destillata</i> , pH 4,8 mit HCl einstellen
PBS 1x (Phosphate Buffered Saline)	8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1.44 g Natriumhydrogenphosphat, 0,24 g Kaliumhydrogenphosphat, ad 11 <i>Aqua destillata</i> , pH 7,4 mit HCl einstellen, autoklavieren
Puromycinlösung	25 mg Puromycin in 10 ml <i>Aqua destillata</i> gelöst, steril filtriert, aliquotiert, bei –20°C lagerstabil
Probenpuffer (Blaumarker)	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol , 15% Glycerol, ad 10 ml <i>Aqua destillata</i>
RNAse-Lösung	100 mg RNAse in 10 ml 0,01 M Natriumacetat pH 5,2 gelöst, 15 Minuten auf 100°C erhitzen, langsam abkühlen lassen, 1 ml 1 M Trischlorid pH 7.4 zugeben, aliquotiert, bei –20°C lagerstabil
10x TBE-Puffer	108 g Tris base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0,

ad 1l *Aqua destillata*, pH 8,0 mit HCl einstellen, autoklavieren

1M Tris base	121,1 g Tris base, ad 1l <i>Aqua destillata</i> , pH 7,4 mit HCl einstellen
Trichostatin A (TSA)	1 mg TSA in 10ml Ethanol 100% gelöst, aliquotiert, bei -20°C lagerstabil
Trypsin/EDTA	0,2 mM EDTA in PBS (autoklaviert), 0.025% Trypsin
STETL-Puffer	8% Saccharose, 5% Tween, 50 mM Tris pH 8,0, 50mM EDTA

3.1.3.2 Kulturmedien

Bakterienmedien

Die verwendeten Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und anschließend 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die angegebenen Mengen gelten jeweils für einen Liter Medium.

LB (Luria Bertani)-Medium	10 g Bactotrypton 5 g Yeast Extract 10 g Natriumchlorid pH 7,0 eingestellt mit HCl
2 x YT Medium	16 g Bactotrypton 10 g Yeast Extract 5 g Natriumchlorid pH 7,0 eingestellt mit HCl
Agar Platten	Zugabe von 15 g Agar zu einem Liter Medium, autoklavieren und auf ca. 50°C abkühlen lassen. Dann Zugabe der

entsprechenden Menge Antibiotikum (100 µg/ml)

Zellkulturmedien

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit Natriumpyrovat und 4500 mg/l Glucose wurde von Invitrogen (Karlsruhe, D) als Fertigprodukt bezogen und mit 5% / 10% FCS,

1000 U/ml Penicillin-Streptomycin und 5,8 mg/ml L-Glutamin angereichert. Für die Kultivierung stabiler Einzelklone der HRL9-Zelllinie nach deren Transfektion mit dem pCMB1 hygro TetR (B/E)-HDAC 4 Plasmid wurde dem Medium 1µg/ml Puromycin zugegeben. Die generierten Klone wurden während der ganzen Zeit ihres Gebrauchs in Puromycinselektionsmedium gehalten, außer sie wurden auf ihr Verhalten auf TSA und/oder Mimosin bzw. 24h in verschiedenen DOX-Konzentrationen getestet. Für die Kultivierung stabiler Einzelklone der NIH 3T3 Zellen nach deren Transfektion mit dem pTRE HPRT d2EGFP IRES LUC NEO Plasmid wurde dem Medium 1,5µg/ml Hygromycin zugegeben. Die generierten Einzelklone verblieben während der gesamten Zeit ihres Gebrauchs in diesem Selektionsmedium.

Wurden Versuche mit DOX durchgeführt, so wurde dieses in Konzentrationen von jeweils 1µg/ml –bzw. 10ng/ml Medium eingesetzt. Mimosin wurde dem Medium in einer Konzentration von 0,1 mg/ml, TSA von 0,1µg/ml zugegeben.

3.1.4 Kits

Es wurden folgende kommerziell erhältlichen Produkte verwendet:

Genetische Mauslibrary	RZPD (Library Number 121)
Dual Luciferase Reporter Assay System	Promega (Mannheim, D)
Polyfect Transfection Reagent	Qiagen (Hilden, D)
Pro Fection Mammalian Transfection System – Calcium Phosphate	Promega (Mannheim, D)

Plasmid Midi und Maxi Kit

Qiagen (Hilden, D)

Qiaex II Gel Extraction

KitQiagen (Hilden, D)

3.1.5 Geräte

Autoklav

KSG Sterilisatoren GmbH (Olching, D)

Bakterienbrutschrank

Heraeus (Hanau, D)

Bakterienschüttler

Certomat BS-T, B. Braun Biotech
(Melsungen, D)

Computer

Power Macintosh G3
Gericom Laptop IBM PC

Elektrophoresekammern

Werkstatt Institut für Toxikologie/Pharmakologie (Mainz, D)
Hybaid AGS (Heidelberg, D)

Elektroporator

Gene Pulser II
Bio Rad (München, D)

FACS Gerät

FACS Calibur
Becton Dickenson BD (Heidelberg, D)

Gefrierschrank (-20°C)

Liebherr Deutschland

Kühlschrank

Liebherr Deutschland

Laborschüttler

UNIMAX 2010
Heidolph (Kehlheim, D)

Luminometer

TD-20/20 Luminometer

	Turner Designs (Sunnyvale CA, USA)
Mikroskop	Lichtmikroskop Zeiss (Jena, D)
Millipore H ₂ O-Anlage	Milli-Q plus Millipore GmbH (Eschborn, D)
Netzgerät Power Supply	Consort E844 Braun (Melsungen, D)
pH-Meter	Multical Typ 538 Wiss. Tech. Werkstätten (Weilheim, D)
Photometer	Spectrophotometer Spectronic Genesys 5 (Spectronic Instruments Inc., USA)
Pipetman	Pipetus-akku Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Sequenzierer	ABI 377 (Weiterstadt, D)
Sicherheitswerkbank	Klasse 2 Modell 5 Nunc (Wiesbaden, D)
Stickstofftank	Air Liquide Kryotechnik GmbH (Düsseldorf, D)
Thermoblock	Dri-Block DB-3A Techne (Cambridge, GB)
Thermocycler	Typ Gradient Eppendorf (Hamburg, D) Typ UNO 96 Biometra (Göttingen, D)
Ultratiefgefrierer (-80°C)	Snijders (Tilburg, NL)

UV-Transluminator und Videosystem	LTF Labortechnik (Wasserburg, D)
Vortex	Heidolph (Kehlheim, D)
Wasserbad	Grant Science Services (München, D)
Zellkultur Inkubator	Nunc (Wiesbaden, D)
Zentrifugen	Laborzentrifuge 400 R Heraeus (Hanau, D)
Ultrazentrifuge	Sorvall Superspeed RC2-B DuPont (Bad Homburg, D)
Tischzentrifuge	Eppendorf 5417 C Eppendorf (Hamburg, D)

3.1.6 Software

Folgende Software wurde zumeist zur Editierung und Verwaltung von DNA-Sequenzen verwendet:

Cellquest Pro	BD Heidelberg
DNA-Strider 1.2	CEA (Gif-sur-Yvette, F)
Mac-Plasmap 2.1	CGC Scientific Ltd. (St. Louis, USA)
Sequencher Demo Version	Gene Codes Corporation (Ann Harbor, USA)

3.1.7 Enzyme

3.1.7.1 Restriktionsendonukleasen

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen stammen von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main, D).

Es wurden jeweils die vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer und Inkubationsbedingungen verwendet.

3.1.7.2 DNA modifizierende Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP) (1U/ μ l)	Roche (Mannheim, D)
DNA Polymerase Large Fragment (Klenow) (5U/ μ l)	Biolabs (Frankfurt a. M., D)
T4 DNA Ligase (400U/ μ l)	Biolabs (Frankfurt a. M., D)
T4 DNA Polymerase (3U/ μ l)	Biolabs (Frankfurt a. M., D)
Vent DNA Polymerase (2U/ μ l)	Biolabs (Frankfurt a. M., D)

3.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D), von der Firma Metabion (München, D) oder der Firma Roth (Karlsruhe, D) hergestellt.

ID Nr.	Sequenz	Verwendung
CC 030	5' CGTTGGGTGCAGTATTAGAGGAGC 3'	Sequenzierprimer für alle Silencerplasmide 5'
CC 031	5' CCATGGGCTGAGACTTGGTGG 3'	Sequenzierprimer für Dnmt3a Silencer 3'
CC 032	5' CGTCACTGCTCAGCTTCTGCTTC 3'	Sequenzierprimer für EED Silencer 3'
CC 033	5' CGGTAGAGACCATAGTTGAGCAGC 3'	Sequenzierprimer für HDAC 1 Silencer 3'
CC 034	5' GGAGTGAAGCGGCACATGTC 3'	Sequenzierprimer für HDAC 3 Silencer 3'
CC035	5' GCTTGCTGTCTGAAGAGCAGCTC 3'	Sequenzierprimer für HDAC 4 Silencer 3'
CC 036	5' GGGGTCAGCTTCAGCTTTTCGC 3'	Sequenzierprimer für MeCP2 Silencer 3'
CC 037	5' CCCATGACTGCCAGAACTTTGTGG 3'	Sequenzierprimer für sin3A Silencer 3'
CC 038	5' CTCCTACCTCTGTAGTGCTGGG 3'	Primer für HPRT Promoter PCR 5'
CC 039	5' CCCTCCTCATGAGTCTAAACAGC 3'	Primer für HPRT Promoter PCR 3'
CC 040	5' CACATATGTGTCGCCACACCTGA 3'	Nested Primer für HPRT Promoter PCR 5'
CC 041	5' TGATTCCTCAAGATTTAGGCCAG 3'	Nested Primer für HPRT Promoter PCR 3'
CC 042	5' TTGGTTTTTTCGCGCCGCTTAACCTCCAATTTTATCTATAATCGC 3'	Primer für PCR Fragment SssI Methylase 5'
CC 043	5' CGGGATCCCACAGGAAACAGACCATGAGCAAA 3'	Primer für PCR Fragment SssI Methylase 3'
CC 046	5' AAGGAAAAAAGCGGCCGCGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGG 3'	Primer für IVS cDNA PCR mit NotI Seite 5'
CC 047	5' AAGGAAAAAAGCGGCCGCGATGCATGCTCGACCTGCAGTTGG 3'	Primer für IVS cDNA PCR mit NotI Seite 3'
CC 048	5' AAAGATATCCCTCCATGAGGCTGGACAGC 3'	Primer für PCR Fragment sin3A mit ERV 3'
CC 049	5' CGGGATCCCTCCTACCTCTGTAGTGCTGGG 3'	Primer für HPRT Promoter mit BamHI Seite 5'
CC 050	5' CGGGATCCCTCCTACCTCTGTAGTGCTGGG 3'	Primer für HPRT Promoter mit BamHI Seite 3'
CC 051	5' CGCGGATCCGAGTGCAGAATGAAGCGACGG 3'	Primer für PCR Fragment sin3A mit BHI 5'

ID Nr.	Sequenz	Verwendung
CC 052	5' ACTCCTGGAGTATCAATGCTCTGAG 3'	Sequenzierprimer für Silencer sin3A 3'

3.1.9 Vektoren

3.1.9.1 Klonierungsvektoren

pBlueskript II SK (+)	Stratagene (Heidelberg, D)
pBi EGFP	BD Clontech (Heidelberg, D)
pcDNA 3.1 hygro	Invitrogen GmbH (Freiburg, D)
pd2EGFP 1	BD Clontech (Heidelberg, D)
pGL-2 basic	Promega (Mannheim, D)
pIRES 1 neo	BD Clontech (Heidelberg, D)
pPur	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, D)

3.1.9.2 Säuger-Expressionsvektoren

hHDAC 3 in pcDNA 3.1 zero plus	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. F. Lizcano, Harvard Medical School, Boston, USA (Dangond et al., <i>Biochem. Biophys. Res. Comm.</i> 1998; 648-652)
mDnmt3a in pBac PAK	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Li, Harvard Medical School, Boston, USA (Okano et al., <i>Nature genetics</i> 1998; 219,220)

pAIT 2 SssI- Methyltransferase	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von New England Biolabs, Beverly, USA
pAS 2 EED	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. A. Otte, E.C. Slater Institut, Amsterdam, NL (van der Vlag et al., <i>Nature genetics</i> 1999; 474,478)
pBSK-polioIRES-luciferase	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Bartenschlager, Institut für Virologie, Mainz, D
pCAGGS	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Miyazaki, Institute for Medical Genetics, Kumamoto, Japan (Hitochi et al., <i>Gene</i> 1991; 193-200)
pcDNA 3.1 hygro tTA MeCP2	Kloniert von Dr. E. Bockamp, ZMG, Institut für Toxikologie, Mainz, D
pCMV-tetR (B/E)-KRAB	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Hillen, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Friedrich Alexander Universität, Erlangen, D (Forster et al., <i>Nucleic Acids Research</i> 1999; 708-710)
pEF-Boss-renilla luciferase	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von AG Ross, Institut für Immunologie, Mainz, D
pING 14A HDAC 1	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. A. Cook, Wellcome/CRL Institute, Cambridge, GB
pING 14A HDAC 4	(Miska et al., <i>EMBO Journal</i> 1999 ; 5099-5107)

pVZ Sin3A

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von
Dr. D. Ayer, Fred Hutchinson Cancer Research
Center, Seattle, USA
(Laherty et al., *Cell* 1997; 349-356)

3.1.10 Molekulargewichtsmarker

Um die Größe elektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente bestimmen zu können wurden neben den zu untersuchenden Proben auch DNA Ladder als Vergleichsstandard aufgetragen. Hierzu wurden jeweils 0,5 µg des 1 kb DNA Ladder New England Biolabs (Frankfurt a. M., D) bzw. 0,5 µg des 1 kb DNA Ladder der Firma Gibco (Karlsruhe, D) verwendet.

3.1.11 Bakterienstämme

Für die Transformation von Plasmid DNA und Ligationsansätzen wurden ausschließlich *Escherichia coli* K 12 Derivatstämme verwendet:

DH5α: supE44 deltalacU169 (ϕ80lacZdeltaM15)hsdR17recA1 endA1
gyrA96 thi-1 relA1

TOP 10: deoR+, endA1-, recA1-, lacZdelta M15+, hsdRMS+,
delta (mrv-mcr BC)

3.1.12 Zelllinien

NIH 3T3: Maus Embryofibroblasten von ATCC (Nummer: CRL-1658)

HRL 9: HeLa Zellen (Freundlieb et al., *J Gene Med* 1999; 1: 4-12)
mit rtTA und dem pUHC 13-3 Vektor stabil transfiziert

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

3.2.1.1 Präparation aus 3 ml Kulturen („Mini-Präp“)

Zunächst wurden 3 ml LB/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (150 rpm). Am folgenden Tag wurden jeweils 1,5 ml der Kulturen bei 14000 rpm zwei Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterienpellets in 250 µl STETL-Puffer resuspendiert. Nach gründlichem vortexen des Pellets wurden die Proben 55 Sekunden im Wasserbad aufgekocht und dann 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert.

Der pelletierte Zelldebris wurde nun mittels eines autoklavierten Zahnstochers entfernt und die Plasmid DNA durch Zugabe von 220 µl Isopropanol zum wässrigen Überstand, starker Durchmischung und anschließender Zentrifugation (10 Minuten, 14000 rpm) gefällt.

Der Überstand wurde verworfen und das getrocknete DNA-Präzipitat in 30 µl *Aqua destillata* gelöst, welchem RNase in einer Konzentration von 100 ng/ml zugegeben wurde.

3.2.1.2 Präparation aus 30 ml/400 ml Kulturen („Midi-Prep“/„Maxi-Prep“)

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Purification Protokolls. Hierfür wurden zunächst 30/400 ml LB/ Amp-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (150 rpm). Die Bakterienkultur wurde am nächsten Tag bei 4500 rpm 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das Bakterienpellet wurde in 4/10 ml Puffer 1 (4°C) resuspendiert und mit 4/10 ml Puffer 2 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Danach folgte die Zugabe von 4/10 ml Puffer 3 (4°C) und vorsichtiges Invertieren des Lysats. Der „Midi-Prep“ wurde darauf hin 10 Minuten bei Raumtemperatur, der „Maxi-Prep“ 20 Minuten bei 4°C stehen gelassen. Das Lysat wurde dann durch eine mit Glaswolle präparierte Einwegspritze gedrückt und in die bereits mit 4/10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Quiagen-Tip-100/500-Säule einlaufen gelassen, wodurch sich die Zelltrümmer mit anheftender bakterieller DNA abtrennen. Anschließend wurde die Säule mit 2x 10/30 ml QC-Puffer gewaschen und mit 5/15 ml vorgewärmten (60°C) QF-Puffer eluiert. Das Eluat wurde in einem Correxröhrchen aufgefangen, 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben, gut gemischt und bei 10000 rpm (4°C) eine Stunde zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wurde die DNA in 2x 200µl *Aqua destillata* aufgenommen, in ein 1,5 ml

Eppendorfreaktionsgefäß überführt, gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde in einem entsprechenden Volumen *Aqua destillata* (50/500µl) über Nacht bei 4°C gelöst.

3.2.2 Screening einer genomischen Mauscosmid-Bank

Um den genomischen Locus des murinen HPRT-Promoter zu isolieren wurde zunächst beim Ressourcenzentrum des Deutschen Human Genom Projekts (RZPD, Berlin) ein Set von Primärpools der *ola mouse* 129 cosmid (Lib.No 121) library angefordert. Den 99 Primärpools (eine 96 well Platte und 3 einzelne 1,5ml Reaktionsgefäße), die die lyophilisierte DNA enthielten, wurde jeweils 50µl *Aqua destillata* zugegeben und die DNA über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden aus jedem Pool 5µl gelöste DNA entnommen und eine für den HPRT Promoter Locus spezifische PCR durchgeführt. Hierzu wurden die Primer CC 038 und CC 039 verwendet (60°C Annealingtemperatur; 30 Zyklen) Es wurde ein Primärpool, bei dem die PCR ein PCR Produkt in der erwarteten Größe lieferte, ermittelt. Die Richtigkeit dieses Pools wurde dann durch wiederholte PCR mit den nested primern CC 041 und CC 042 unter den unter 2.2.7 erwähnten PCR Bedingungen bestätigt. Das Ergebnis wurde dem RZPD mitgeteilt, welches daraufhin ein Set von Sekundärpools zusendete. Dieses wurde auf die gleiche Weise analysiert wie das Primärpoolset, und die in diesem Fall 3 positiven Sekundärpools wiederum dem RZPD gemeldet. Die nun vom RZPD zugesandte Stechagarkultur wurde mittels einer Impföse auf einer Agarplatte (Selektionsantibiotikum: Kanamycin 100µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkultur in 400 ml LB-Medium (Selektionsantibiotikum: Kanamycin 100µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm hochgewachsen. Die DNA-Gewinnung erfolgte wie unter Kapitel 2.2.1.2 beschrieben.

3.2.3 Reinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Reinigung von DNA erfolgte durch Extraktion mit Phenol-Chloroform. Es wurde dazu 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis: 25:24:1) zum Ansatz zugegeben, kurz gevortext und 5 Minuten bei RT und 14000 rpm zentrifugiert. Die DNA-haltige wäßrige Phase wurde abgenommen, nochmals mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gevortext und wie beschrieben abzentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde dann mit 1 Volumen Chloroform erneut extrahiert und die DNA mit Natriumacetat und Isopropanol gefällt (1/10 Volumen Natriumacetat, 2,5 Volumen Isopropanol).

3.2.4 Fällung von DNA

Die Fällung von DNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 Volumen Ethanol absolut. Nach mindestens 30 minütiger Lagerung bei -20°C wurde die DNA sedimentiert (30 Minuten, 14000 rpm), mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in *Aqua destillata* gelöst.

3.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung erfolgte nach dem von Sambrook et al. beschriebenen photometrischen Verfahren (Sambrook et al., 1989). Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung wurde der Gehalt mittels folgender Formel berechnet:

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

3.2.6 PCR

Die PCR (Polymerase chain reaction) erfolgte nach der Methode von Saiki und Kollegen und wurde in einem Volumen von $50\mu\text{l}$ durchgeführt (Saiki et al., 1988). Der Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 1/10 Vol. 10x DNA Polymerase Puffer (NEB) je 20 pmol der jeweiligen Primer, 100 μM aller vier dNTPs, sowie $1\mu\text{l}$ Vent DNA Polymerase (NEB). Als Template wurde entweder gereinigte Plasmid-DNA (50-100 ng) oder genomische Maus-DNA (0,5-1 μg) eingesetzt. Typischerweise wurde folgendes Standard PCR-Protokoll verwendet:

Einer Initialen Denaturierung bei 94°C von 4min folgten 30-35 Zyklen mit jeweils 1min Denaturierung bei 94°C , 1 min Primerannealing bei $55-60^{\circ}\text{C}$ (je nach eingesetzten Primern) und 1 min Elongation bei 72°C . Die finale Elongation bei 72°C dauerte 8 min.

Alle PCR Reaktion wurde auf einem Eppendorf Mastercycler oder Mastercycler Gradient (beide Eppendorf, Hamburg) ausgeführt.

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurde je $10\mu\text{l}$ jeder Reaktion auf einem 1% Agarosegel mittels Gelelektrophorese analysiert.

3.2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung beruht auf der 1977 von Sanger *et al.* beschriebenen Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977), die von Lee *et al.* 1992 durch

Verwendung fluoreszierender Didesoxynukleotide modifiziert wurde (Lee et al., 1992). Die Sequenzierung erfolgte mit dem *PRISM Ready Reaction Big Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt) in einer linearen PCR-Reaktion. Es wurden standardmäßig je 0,5 – 1µg zu sequenzierende Plasmid-DNA und 10 pmol Sequenzierprimer eingesetzt. Zum Ansatz wurden 4µl Premix zugegeben und dann das Volumen durch Zugabe von *Aqua destillata* auf 10µl aufgefüllt. Das Cycle-Sequencing Programm wurde auf einem Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) ausgeführt; einer einleitenden Denaturierung von 2 min bei 96°C folgten 35 Zyklen mit jeweils 18sec Denaturierung bei 96°C und 4min Kettenverlängerung bei 59°C. Die Fällung der Sequenzierprodukte erfolgte durch Erhöhung des Volumens auf 200µl mit *Aqua destillata*, Zugabe von 20µl 3 M NaAc (pH4,8) und 400 µl Ethanol absolut. Das getrocknete Pellet wurde in 2-3µl deionisiertem Formamid/50 mM EDTA gelöst und vor dem Auftragen 2min denaturiert. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und nachfolgende Auswertung erfolgte mit Hilfe einer automatischen Sequenzierapparatur (ABI 377, Weiterstadt) und der korrespondierenden Software Edit View 1.0.1 (Perkin Elmer, USA)

3.2.8 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Molekülen gemäß ihrer Molekülgröße (Fisher und Dingman 1971). Sowohl zur Analyse als auch zur Aufreinigung von DNA-/RNA-Fragmenten wurden horizontale, native Agarosegele verwendet, wobei sich die gewählte Agarosegelkonzentration aus der Größe der aufzutrennenden Fragmente ergibt. In der Regel wurden 1%ige Gele verwendet.

Der entsprechende Anteil an Agarose wurde in 1x TBE Puffer aufgekocht, mit 4µl/100ml Ethidiumbromidstammlösung versetzt und in die Gelkammer gegossen, wobei mittels eines Kunststoffkammes die Probenaschen ausgespart blieben. Nach Erstarren des Gels und der Herausnahme des Kammes wurden die Proben (mit 1/10 Volumen Probenpuffer gemischt) aufgetragen und das Gel in der Agarosegelelektrophoresekammer (gefüllt mit 1x TBE-Puffer) mit maximal 80 Volt Spannung getrennt. Anschließend wurden die Gele mittels UV-Transluminator dokumentiert und ausgewertet.

3.2.9 Präparative Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Aufzureinigende DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Verwendung des QIAEX II DNA Gel Extraction Kits gemäß den

Herstellervorschriften aus dem Gelblock extrahiert.

3.2.10 Restriktionsverdau von DNA

3.2.10.1 Analytischer Verdau

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden hierbei in einem Reaktionsvolumen von 20µl eingesetzt.

3.2.10.2 Präparativer Verdau

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden hierbei in einem Reaktionsvolumen von 50µl eingesetzt. Wurde mit zwei oder mehr Enzymen geschnitten, so wurde entweder ein Reaktionspuffer gewählt, in dem alle Enzyme effizient schneiden konnten, oder die Reaktion wurde sequenziell durchgeführt. Hierfür wurde die DNA nach dem ersten Verdau gefällt, im Reaktionspuffer für das zweite Enzym aufgenommen und erneut verdaut.

Sowohl beim analytischen wie auch beim präparativen Verdau von DNA wurden die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen unter Einsatz der jeweiligen Puffer eingehalten.

3.2.11 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um bei einer Ligation mit einer Insert-DNA einer Religation der beiden Vektorenden einer linearisierten Plasmid-DNA vorzubeugen, wurde mit Hilfe einer alkalinen Phosphatase die terminalen 5'-Phosphatgruppen der Vektor-DNA entfernt. Auf diese Weise konnte die Religation des Plasmids ohne Integration der Insert-DNA vermindert werden.

Die Dephosphorylierung erfolgte in unmittelbarem Anschluss an den Restriktionsverdau. Nach der gewünschten Inkubationsdauer des Restriktionsansatzes, wurde diesem lediglich 1 Einheit CIP Alkaline Phosphatase zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (20 Minuten bei 75°C) gestoppt.

3.2.12 Auffüllen von DNA 5'-Überhängen

Um auch die Ligation von zunächst nicht kompatiblen Überhängen zu ermöglichen wurde die 5'-3'-Polymeraseaktivität des großen Fragments der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) genutzt. Diese DNA-Polymerase I ist in der Lage einzelsträngige 5'-Überhänge von DNA-Fragmenten aufzufüllen und glatte Enden (*blunt ends*) zu generieren. Das Auffüllen erfolgte in unmittelbarem Anschluß an den Restriktionsverdau des Plasmids. Nach der gewünschten Inkubationsdauer des Restriktionsansatzes, wurde diesem lediglich 5 Einheiten DNA-Polymerase (Klenow) und 3µl dNTPs (jedes 10 mM) zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (20 Minuten bei 75°C) gestoppt.

3.2.13 Entfernen von DNA 3'-Überhängen

Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase ist in der Lage, einzelsträngige 3'-Überhänge von DNA-Fragmenten abzutrennen und glatte Enden (*blunt ends*) zu generieren. Auf diese Weise ist die Ligation von DNA-Fragmenten mit nicht kompatiblen Überhängen möglich. Das Abtrennen von 3'-Überhängen erfolgte in unmittelbarem Anschluß an den Restriktionsverdau des Plasmids. Nach der gewünschten Inkubationsdauer des Restriktionsansatzes wurden diesem lediglich 3 Einheiten T4 DNA-Polymerase und 3µl dNTPs (jedes 10mM) zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung (10 Minuten bei 75°C) gestoppt.

3.2.14 Ligation von DNA

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe von zwei miteinander kompatiblen DNA-Enden. In dieser Arbeit wurde die T4-DNA-Ligase verwendet, um DNA-Fragmente in entsprechend linearisierte Plasmid-DNA zu integrieren. Hierzu wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente in einem Gesamtvolumen von 10µl unter Verwendung des mitgelieferten Reaktionspuffers mit 400 Einheiten T4 DNA-Ligase inkubiert. Dabei wurde Insert- und Vektor-DNA meist in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt, wobei insgesamt 10-100ng DNA eingesetzt wurden. Der Reaktionsansatz wurde in der Regel über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.2.15 Herstellung kompetenter Bakterien

Um in der Lage zu sein Plasmid-DNA aufnehmen zu können (Transformation), müssen Bakterienzellen zuerst für die Aufnahme dieser DNA vorbereitet werden. Zu diesem Zweck

wurden wenige Mikroliter einer Bakterienglycerinkultur in 50ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm im Schüttelinkubator hochgewachsen. Die 50ml Bakterienkultur wurde dann zu 1 Liter LB-Medium gegeben und weitere 2 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt bis eine OD₅₅₀ von 0,5-0,6 erreicht war. Dann wurde die Kultur auf 4°C vorgekühlt, auf autoklavierte 250ml Zentrifugenflaschen verteilt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation der Bakteriensuspension (15min bei 3000 rpm) in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Pellets in jeweils 250ml eiskalten, sterilen *Aqua destillata* resuspendiert und dann wiederum 15min bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden dann jeweils nur noch 125ml eiskaltes, steriles *Aqua destillata* auf die Pellets gegeben, resuspendiert und dann jeweils der Inhalt zweier Flaschen zusammengegeben. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (15min bei 3000 rpm) und dem Verwerfen des Überstands wurden die zwei Bakterienpellets in je 20ml 10% Glycerol (ebenfalls eiskalt) resuspendiert, in 2 sterile, eisgekühlte Correxröhrchen überführt und 15min bei 5700 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 1ml 10% Glycerol gelöst. Die kompetenten Bakterien wurden nun á 50µl in autoklavierte, vorgekühlte 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.16 Transformation

Um Plasmid DNA zu amplifizieren und in kompetente Bakterien einzuschleusen, wurde im Labor die Methode der Elektroporation angewendet.

Hierzu wurden kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und dann in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2mm Elektrodenabstand) gegeben, in die kurz zuvor bereits 1,5µl eines Ligationsansatzes oder in Wasser gelöster Plasmid-DNA pipettiert wurde. Nach der gleich im Anschluß folgenden Elektroporation (200 Ohm, 25µF und 2.5 kV) wurden sofort 150µl 2xYT-Medium in die Küvette gegeben und diese dann 15-30 Minuten bei 150 rpm und 37°C im Bakterienschüttler zwecks Expression des β-Lactamase-Resistenzgens inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert, wobei je nach erwarteter Ligations- bzw. Transformationseffizienz 20-200µl Suspension verwendet wurde. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert und die gewachsenen Einzelkolonien am folgenden Tag in LB-Medium überimpft.

3.2.17 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford 1976). Der Farbstoff Coomassie-Blau bindet bei diesem Messverfahren an die Proteine, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465nm auf 595nm verschiebt und so eine indirekte photometrische Quantifizierung des Proteingehalts möglich wird.

Die Messungen erfolgten in Einmalküvetten. Es wurden jeweils 200µl Bradford-Reagenz, 790µl *Aqua destillata* und 10µl des entsprechenden Zelllysats zusammengegeben, gevortext und 15-30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Messung im Spectralphotometer bei OD₅₉₅. Zur Quantifizierung des Proteingehalts wurde vor jeder Meßreihe eine Eichgerade erstellt, wobei BSA in verschiedenen Konzentrationen (0µg, 2µg, 4µg, 8µg, 10µg und 20µg pro ml) verwendet wurde. Die Daten wurden mit der Software Microsoft Excel auf einem Macintosh G3 Computer ausgewertet.

3.2.18 Zellkultur

Um Kontaminationen zu verhindern, wurden alle Arbeitsschritte unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Zellinkubator bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre, 5% CO₂-Gehalt und 37°C propagiert.

3.2.18.1 Kultivieren von NIH 3T3 und HRL9 Zellen

NIH 3T3 und HRL9 Zellen wurden je nach Bedarf in 5% oder 10% FCS-Medium gehalten und im Zellinkubator kultiviert. Im Falle der stabil transfizierten HRL9 Zellen wurden dem Medium zusätzlich noch Selektionsantibiotika zugegeben.

Zum Trypsinisieren und Ernten der Zellen wurde zunächst das Medium von den Kulturschalen abgesaugt und diese dann 2x mit PBS gewaschen. Es folgte die Übersichtung mit Trypsin/EDTA und eine mehrminütige Inkubation der Zellen bei 37°C im Zellinkubator. Nach Ablösung der Zellen wurden diese in FCS-Medium aufgenommen und in dem jeweils gewünschten Verhältnis neu ausplattiert. Sollte die Zellzahl genau ermittelt werden, so wurden die Zellen in der Neubauerkammer ausgezählt und die Zellzahl mit folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/ml Medium}$$

3.2.19 Konservierung lebender Zellen

Nach Trypsinisieren der Zellen (meist eine konfluent gewachsenen P 100 Kulturschale) wurden diese in 5ml 5%FCS-Medium aufgenommen, in ein 15ml Falcon überführt und dann bei 800 rpm 8 Minuten bei 25°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 2-3ml FCS 10% DMSO gelöst und 1ml der Suspension in je ein Kryoröhrchen aliquotiert. Daraufhin wurden die Kryoröhrchen zunächst in Styroporbehälter verpackt im -80°C-Gefrierschrank eingefroren (3 Monate haltbar) und später in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.20 Auftauen von Zellen

Zunächst wurden die Zellen so schnell wie möglich (Wasserbad 37°C) aufgetaut. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Kryoröhrchen dem -80°C Gefrierschrank oder dem flüssigen Stickstoff entnommen wurden. Der Inhalt der Kryoröhrchen wurde dann in 3ml 5%FCS-Medium aufgenommen, in ein 15ml Falcon überführt und bei 800 rpm 8 Minuten bei 25°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 10ml 10%FCS-Medium resuspendiert und auf eine P 100 Kulturschale gegeben.

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

Je nach Menge der für die verschiedenen Versuchsreihen benötigten Zellen wurden eine oder mehrere konfluent gewachsene P 60 Kulturschalen mit 0,5ml Trypsin/EDTA trypsinisiert und nach Ablösung der Zellen mit 1,5ml 10% FCS-Medium versehen. Nach gründlicher Durchmischung mit Hilfe der Pipette wurden jeweils 100µl der Zellsuspension auf eine P 35 Kulturschale ausgesät und 2ml 10% FCS-Medium zugegeben. Am folgenden Tag wurde dann das Medium durch das mit der jeweiligen Substanz versehene neue 10% FCS-Medium ersetzt und die Zellen weitere 24h inkubiert. Im Falle einer 48-stündigen Inkubation wurden den trypsinisierten Zellen nicht wie oben beschrieben 1,5ml sondern 2,5ml Medium zugegeben und dann 100µl/P 35 Schale ausgesät. Daraufhin folgte die Lyse der Zellen und ihre Auswertung.

3.2.22 Transfektion von Plasmid-DNA in NIH 3T3 und HRL9 Zellen

3.2.22.1 Stabile Transfektion mittels Calcium Phosphat Präzipitation

Am Tag vor der Transfektion wurde eine in 5% FCS Medium gehaltene, konfluent gewachsene Kultur trypsinisiert und die Zellen in der Neubauerkammer ausgezählt.

Für jeden Transfektionsansatz wurden $5,6 \times 10^5$ Zellen auf jeweils eine P 60 Kulturschale in 10% FCS-Medium ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion unter Verwendung des Pro Fection Mammalian Transfection System Calcium Phosphate von Promega gemäß der Herstellervorschrift, wobei $10 \mu\text{g}$ des zu transfizierenden Plasmids, und im Falle der HRL9 Zellen auch zusätzlich $1 \mu\text{g}$ des Resistenzplasmids pPUR, eingesetzt wurden. Die Plasmide wurden zuvor linearisiert, mit sterilem Ethanol unter der Sicherheitswerkbank gewaschen und dann, ebenfalls unter der Sicherheitswerkbank, in sterilem *Aqua destillata* aufgenommen. Nach 24h wurden die Zellen wiederum trypsinisiert und in 50ml 10% FCS-Medium aufgenommen. Diese 50ml wurden daraufhin mittels einer Multipet Pipette auf fünf 96-well Platten verteilt (je $100 \mu\text{l/well}$). Nach weiteren 24h wurde das Medium erneut abgenommen und durch das Selektionsmedium mit dem Antibiotikum Puromycin (HRL9 $1 \mu\text{g/ml}$) bzw. Hygromycin (NIH 3T3 $1,5 \mu\text{g/ml}$) ersetzt. Der Vorteil dieser Art des Aussäens bestand in der parallel verlaufenden Selektion und Klonierung von Einzelzellen. In der folgenden Zeit wurde das Selektionsmedium je nach Bedarf alle 3-5 Tage gewechselt und das Wachstum von Einzelklonen mikroskopisch verfolgt.

3.2.22.2 Transiente Transfektion von NIH 3T3 und HRL 9 Zellen mittels Poly Fect

Zwei Tage vor der Transfektion wurde eine in 5% FCS-Medium gehaltene konfluent gewachsene P 100 Kulturschale trypsinisiert und im Verhältnis 1:5 auf P 100 Schalen mit 10% FCS-Medium ausgesät. Nach zwei Tagen wurden diese Schalen dann im Verhältnis 1:5 im Falle der NIH 3T3 Zellen und 1:15 im Falle der HRL9 Zellen auf P 60 Schalen mit 10% FCS-Medium ausplattiert. Nach 24h erfolgte die Transfektion unter der Verwendung des Qiagen Polyfect Transfection Reagent gemäß der Herstellervorschrift, wobei die HRL9-Zelllinie gemäß den Angaben für HeLa Zellen behandelt wurde. Bei den NIH 3T3 Zellen wurden jeweils $3,5 \mu\text{g}$ der Effektor-DNA, $0,5 \mu\text{g}$ der Responder-DNA und $0,025 \mu\text{g}$ des Renilla-Reporterplasmids pro Ansatz eingesetzt. Im Falle der HRL9 Zellen wurden $3,5 \mu\text{g}$ Effektor-DNA und $0,025 \mu\text{g}$ Renilla-Reporterplasmid eingesetzt.

3.2.23 Präparation von Zellysaten für die luminometrische Messung und die Proteinbestimmung

Zur Gewinnung von Zellysaten wurden die Kulturen zunächst einmal mit PBS gewaschen und daraufhin mit Passive Lysis Puffer des Dual Luciferase Reporter Assay System von Promega überschichtet. Sollten Kulturen auf P 60 Kulturschalen lyiert werden kamen 300µl Passive Lysis Puffer zum Einsatz, bei der Lyse von Kulturen auf P 35 Schalen 200µl. Nach einer 15-20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler wurden die Platten zunächst zu -20°C weggefroren, aufgetaut und das Lysat einer Kulturschale jeweils in ein 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Der bei der Behandlung mit Passive Lysis Puffer entstandene Zelldebris setzte sich schnell nach unten ab und das klare Lysat konnte nun für die Auswertung im Luminometer und die Proteinbestimmung nach Bradford herangezogen werden. Nach der Auswertung des Lysats wurde dieses entweder verworfen oder bei -20°C für die spätere Bestimmung der Proteinkonzentration gelagert.

3.2.24 Messung der Luciferaseaktivität im Luminometer

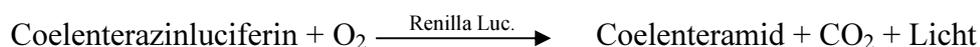
Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte unter Verwendung des Dual Luciferase Reporter Assay Systems von Promega. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass das Testgen, eben die Firefly Luciferase, und das Reporter gen bestehend aus einem konstitutiv, eukaryotischen Promoter gebunden an die Renilla Luciferase, gemeinsam in einer Probe Zellysats mit der gleichen biochemischen Methode (Lichtemission) gemessen werden können. Hierbei ist wichtig zu verstehen, dass die Firefly Luciferase und die Renilla Luciferase ein unterschiedliches Enzymsubstrat verwenden, die Lichtemission einer Probe also hintereinander im gleichen Ansatz gemessen werden kann.

Die stufenweise Reaktion stellt sich wie folgt dar:

1. Lichtmessung (Firefly Luciferase):



2. Lichtmessung (Renilla Luciferase):



Zunächst wurden zwischen 1 und 10µl des jeweiligen Zellysats in ein 2.0ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben, dieses dann in das Luminometer gestellt, 50µl Luciferase

Assay Substrat (gelöst in Luciferase Assay Puffer) zugegeben, mittels der Pipette gemischt und die Firefly Luciferaseaktivität gemessen. Es folgte die Zugabe von 50µl Stop&Glo Substrat (gelöst in Stop&Glo Puffer) und nach dem Mischen die Messung der Renilla Luciferase Aktivität. Die vom Luminometer ermittelten Werte wurden notiert und später mit der Software Microsoft Excel auf einem G3 Macintosh Computer ausgewertet, wobei die Luciferasereportergenaktivität der unterschiedlichen Ansätze mit Hilfe des coexprimierten Renillawertes untereinander normalisiert wurden.

3.2.25 Präparation von Zellen für die Zellzyklusanalyse im FACS-Gerät

Für die Auswertung von Zellen im FACS-Gerät im Rahmen der Zellzyklusanalyse wurden die Kulturen zunächst trypsinisiert. Die abgelösten Zellen wurden in FCS Medium aufgenommen und in ein 15ml Falconröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation bei 800 rpm 8 Minuten bei 25°C wurde der Überstand mittels einer Pipette abgesaugt und das Zellpellet zu Suspension durch vortexen überführt, wobei tropfenweise 1ml eiskaltes, zuvor mindestens ein Tag bei -20°C gelagertes 70%iges Ethanol zugegeben wurde. Die im Ethanol gelösten Zellen wurden daraufhin 30 Minuten bei 4°C gelagert und dann nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach absaugen des Ethanols wurde das Zellpellet in 0,5-1 ml PBS resuspendiert und in FACS Röhrchen überführt. Etwa 5 Minuten vor der Auswertung im FACS Gerät wurde das Zellysats mit Propidiumjodid (50 µg/ml) vermischt.

3.2.26 Durchführung der FACS-Messung und Auswertung der Daten

Die Zellzyklus-Analysen wurden mit einem FACSCalibur (Becton Dickenson BD, Heidelberg) nach allgemein geltendem Standard durchgeführt und die erhaltenen Daten mit der Software Cellquest Pro (BD) ausgewertet.

Bei der Zellzyklus-Analyse besteht ein linearer Zusammenhang zwischen DNA-Gehalt und Fluoreszenzintensität. Dieser Sachverhalt ist aber nur gegeben, wenn der rote Farbstoff Propidiumjodid (PI) im Überschuss (1µg/ml) zu den Zellen gegeben wird. Propidiumjodid interkaliert in die DNA und färbt auf diese Weise die Zellen an, die dann im zweiten Fluoreszenz-Kanal gemessen werden können.

Bei der Daten-Akquisition stellt man das FACS-Gerät so ein, dass die G₁-Phase des Zellzyklus (ein diploider Chromosomensatz) bei Kanal 200 liegt. Zellen in der G₂-Phase erscheinen dann im Kanal 400, da sie die doppelte DNA-Menge besitzen. Zellen der S-Phase haben einen unterschiedlichen DNA-Gehalt und liegen dazwischen (Abb. 3).

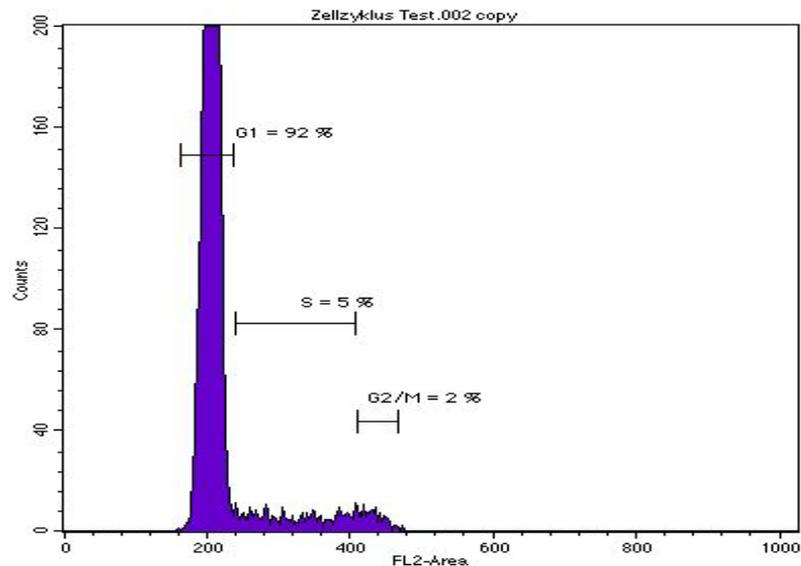


Abb.3 Typische Darstellung einer Zellzyklus-Messung

Die Empfindlichkeit des FACS-Gerätes wird so eingestellt, dass Zellen mit diploidem Chromosomensatz, die sich in der G1-Phase ihres Zellzyklus befinden, im Kanal 200 liegen. Dargestellt sind nur gegatete Daten aus R1 in Abb. 4.

Um Artefakte, die durch die Probenaufbereitung entstehen können zu vermeiden, werden Dupletten vor der Analyse ausgegated. Dupletten entstehen bei der Fixierung der Zellen mit Alkohol. Der Effekt dabei ist, dass eine G1-Duplette den gleichen DNA-Gehalt hat, wie ein einzelne Zelle in der G2-Phase. Das führt dazu, dass die G2-Phase ohne diese Duplettendiskriminierung überschätzt wird. Eine Duplette erzeugt aber ein breiteres Lasersignal, als eine einzelne Zelle und kann daher über die Darstellung der Peakbreite von einem Singlett unterschieden werden (Abb. 4). Es ist also darauf zu achten, vor der Auswertung der einzelnen Zellzyklusphasen eine Duplettendiskriminierung vorzunehmen.

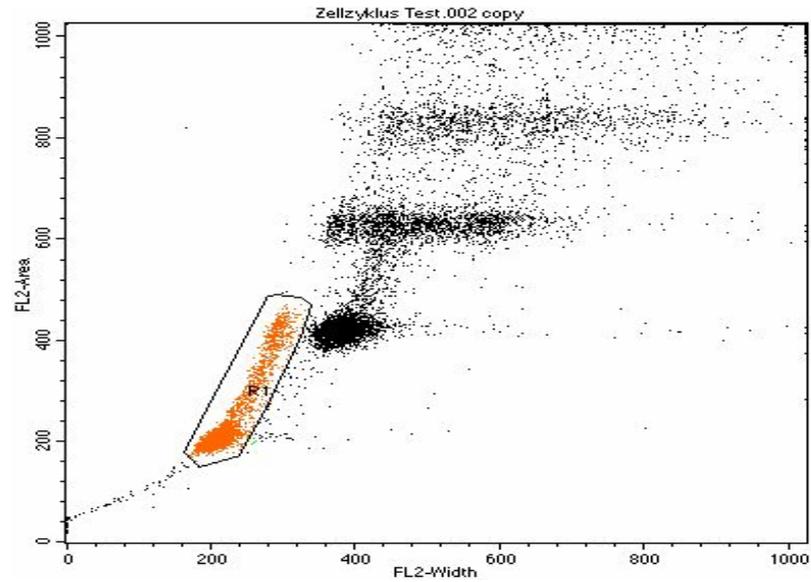


Abb.4 Duplettendiskriminierung

Dupletten erzeugen ein breiteres Lasersignal, als einzelne Zellen und liegen daher auf der x-Achse weiter rechts. Das Fluoreszenzsignal auf der y-Achse ist davon nicht betroffen. Durch eingrenzen der Singulettten in R1, lassen sich die Dupletten von der Analyse ausschliessen.