

II. Material und Methoden

1. Chemikalien, Puffer und Enzyme

Die eingesetzten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Neuulm), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (München) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

Falls nicht anders angegeben wurden die verwendeten Puffer und Lösungen nach den Angaben in Sambrook et. al. (1989) hergestellt.

Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme stammten aus der Herstellung von Roche (Mannheim), Gibco BRL (Karlsruhe) und Pharmacia (Freiburg).

2. Molekularbiologische Standardmethoden und Vektoren

Molekularbiologische Standardmethoden wie Anzucht von Bakterien, Plasmid-DNA-Präparationen, Modifikation von DNA und Gelelektrophoresen wurden wenn nicht anders beschrieben nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Aufreinigung großer Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion erfolgte mit dem „Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen.

Expressionsvektoren:

pOPmycHNF4 α 2

Um den pOP-mycHNF4 α 2-Vektor zu konstruieren wurde zunächst der myc-tag aus dem pCS2+MT Vektor (Rupp et al., 1994) mit der PCR (polymerase chain reaktion) amplifiziert. Dazu wurden ein 5'-Primer mit der Sequenz (5'-ATAAGAATGCGGCCGC GCTATGGAGCAAAGCTC-3') und ein 3'-Primer mit der Sequenz (5'-ATAAGAATG GCGGCCGCTCTAGAGGGTACCAGGCCTTG-3') eingesetzt. Die Primer führten *NotI*-Schnittstellen (unterstrichen) ein, ausserdem wurde eine *KpnI*-Schnittstelle (fett) in den 3'-Primer eingeführt. Die *NotI*-Schnittstellen wurden genutzt, um das PCR-Fragment anstelle des *cat*-Genes in den pOP13-Expressionsvektor (Stratagene) zu klonieren. Die Sequenz des HNF4 α 2 des Menschen wurde aus dem RcHNF4 α 2 Expressionsvektor (Drewes et al., 1996) amplifiziert. Dabei wurden der 5' Primer (5'-GGGGTACCATGCGACTCTCCAAAACC-3')

mit einer *KpnI*-Schnittstelle (fett) und 3' ein SP6-Primer (5'-CTATTTAGGT GACTACTATAG-3') eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde anschliessend als *KpnI-NotI*-Fragment im Leserahmen hinter den myc-tag kloniert. Die PCR Reaktionen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt.

Die in dieser Arbeit verwendeten HNF4 α 2-Mutationen wurden mit Hilfe des „QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene in den pOPmycHNF4 α 2 Expressionsvektor eingeführt. Dabei wurden die vom Hersteller beschriebenen Bedingungen eingehalten, die für die Mutagenesereaktionen verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die entsprechenden Konstrukte wurden nach der Mutante benannt, die sie exprimieren zum Beispiel, pOPmycD69A.

Um mögliche Mutationen durch die Mutagenese in den Konstrukten zu vermeiden, wurden die Leserahmen sequenziert und in den leeren pOP13-Vektor zurück kloniert.

Tabelle 1: Zusammenstellung der Primerpaare für die Mutagenese.

Mutante	Mutageneseprimer
D69A	A: 5`-GAGCTGTGCCGGCTGCAAG-3` B: 5`-CTTGCAGCCGGCACAGCTC-3`
R154X	A: 5`-GTCCTGTCCTGACAGATCACC-3` B: 5`-GGTGATCTGTCAGGACAGGAC-5`
R127W	A: 5`-CGGGACTGGATCAGCACTCG-3` B: 5`-CGAGTGCTGATCCAGTCCCG-5`
V255M	A: 5`-GATGAGCCGGATGTCCATACG-3` B: 5`-CGTATGGACATCCGGCTCATC-3`
Q268X	A: 5`-CGATCTGCAGCTCCTAGAAGGG-3` B: 5`-CCCTTCTAGGAGCTGCAGATCG-3`
E276Q	A: 5`-GATGACAATCAGTATGCCTACC-3` B: 5`-GGTAGGCATACTGATTGTCATC-3`
hHNF1(-325/+138)mut	A: 5`-GCTGAAGTCCCAAGTTCAGTCCC-3` B: 5`-GGGACTGAACTTGGGACTTCAGC-3`

Rc/CMVmycHNF4 α 2

Die Leserahmen der oben aufgeführten pOP13-Konstrukte wurden für einen Teil der Versuche über *NotI*-Schnittstellen in den Rc/CMV-Vektor (Invitrogen) eingeführt. Dies gilt sowohl für den Wildtyp HNF4 α als auch die Mutanten.

Rc/CMV- β -gal

Der offene Leserahmen des LacZ-Gens wurde mittels *NotI*-Schnittstellen aus pCS- β (Clontech) in den Rc/CMV-Vektor kloniert.

Rc/CMVmycE360X

Die E360X-Mutation wurde durch PCR mit dem Rc/CMVmycHNF4 α 2 als Template hergestellt. Als 5'-Primer wurde ein T7-Primer und 3' ein Primer (E360X: 5'-TCTGCGGCCGCTAGTTGTCAATCTTGGCC-3') verwendet, der ein Stopcodon und eine *NotI*-Restriktionsstelle (unterstrichen) einführt. Mit Hilfe von *NotI*-Schnittstellen wurde das amplifizierte Fragment in einen leeren Rc/CMV-Vektor kloniert und anschliessend sequenziert.

p22LFE1

Der p22LFE1-Vektor ist von Angrand et al. 1998 beschrieben worden. Mit seiner Hilfe ist es möglich stabile induzierbare Klone herzustellen. Eine Beschreibung dieses Systems erfolgt auf Seite 38. Der p22LFE1-Vektor wurde genutzt um stabile Klone von INS-1- und HEK293-Zellen herzustellen, diese Klone exprimieren das LacZ-Gen induzierbar. Für die Herstellung stabiler HNF4 α -Klone wurde anstelle des LacZ-Gens der Leserahmen für HNF4 α beziehungsweise seine Mutanten inkloniert. Für diese Klonierung wurde ein modifizierter p22LFE1-Vektor eingesetzt bei dem das LacZ-Gen durch *NotI*-Schnittstellen ersetzt worden war (Heike Thomas, Institut für Zellbiologie, Essen). Mit Hilfe dieser *NotI*-Schnittstelle wurden die entsprechenden Leserahmen inkloniert.

Reportergene:

H4-tk-lucI

Der H4-tk-lucI Reporter besitzt vier HNF4-Bindestellen vor dem Thymidinkinase-Promotor und dem Luciferasegen (Drewes et al., 1994).

hHNF1(-325/+138)lucII

Der HNF1 α -Promotor wurde aus einem 6 kb grossen genomischen Fragment, das im Blueskript-SK+ kloniert war (Ira Lemm, Institut für Zellbiologie, Essen) (Lausen et al., 2000), mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde ein T3-Primer und ein Primer benutzt der am 5'-Ende eine *HindIII*-Schnittstelle einführt. Das Promotorfragment wurde als *SacI-HindIII*-Fragment in einen auf dem pGL3-BasicII (Promega) basierenden Luciferase-Reportergenvektor (Ludger Klein-Hitpass, Institut für Zellbiologie, Essen) kloniert.

hHNF1(-325/+138)mut

Dieser Vektor entspricht dem hHNF1(-325/+138)lucII bei dem die putative HNF4-Bindestelle an Position (-58) mittels Mutagenese mutiert wurde. Das verwendete Primerpaar ist in Tabelle 1 angegeben.

xHNF1(-594/-207)lucI

Promotorsequenz aus dem *Xenopus*-HNF1 α (Weber et al., 1996).

rApo-AI(-1000/+14)lucI

Promotorsequenz aus dem Apolipoprotein-AI-Gen der Ratte (Hassan Nakhei, Institut für Zellbiologie, Essen) (Lausen et al., 2000).

3. Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 zusammengefasst

Tabelle 2: Zusammenfassung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HeLa	Cervixkarzinomzelllinie des Menschen
HEK293	Immortalisierte embryonale Nierenzelllinie des Menschen
INS-1	Insulinoma- β -Zelllinie der Ratte

4. Zellkultur von HeLa-, HEK293- und INS-1-Zellen

HeLa- und HEK293-Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre (95%) bei 37°C und 7,5% CO₂, in DMEM (Biochrom), mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin sowie je 100 U/ml Penicillin und Streptomycin gehalten. INS-1-Zellen (Asfari et al., 1992) wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, allerdings in RPMI 1640 mit einem Zusatz von 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM HEPES und 50 μ M Mercaptoethanol (Gibco). Die Zellen wurden unter konfluenten Bedingungen gehalten, für die Versuche zur Wachstumshemmung wurden die Zellen bis zur Passage 25 verwendet.

Zur Erhaltung der Zelllinien und stabilen Klone wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden 10⁷ Zellen in 3 ml kaltem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO in DMEM beziehungsweise RPMI 1640) aufgenommen, in 1 ml Aliquots langsam auf -70°C

abgekühlt und dann über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Aliquots auf 37°C erwärmt und in 10 ml vorgewärmtes Medium in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

5. Transfektion

HeLa- und HEK293-Zellen wurden wenn nicht anders beschrieben in 6-wells mit 2,3 µg Plasmid-DNA und 6 µl Lipofektamin (Gibco, BRL) nach Angaben des Herstellers transfiziert, die Transfektion von INS-1-Zellen erfolgte mit 10 µl Lipofektamin um eine höhere Effizienz zu erreichen.

Transfektionen von HEK293-Zellen für die Herstellung von Kernextrakten wurden nach der Calciumphosphat-Kopräzipitationsmethode durchgeführt. Es wurden 3×10^6 Zellen pro 10 cm-Zellkulturschale ausgesät. 20 Stunden nach Aussaat wurde das Medium gewechselt und drei Stunden später das Präzipitat auf die Zellen gegeben.

Ein Präzipitationsansatz für eine Zellkulturschale enthielt 20 µg DNA in 75 µl 1 mM EDTA-Lösung und 262,5 µl H₂O, 375 µl 2xHBS-Puffer sowie 37,5 µl 2,5 M CaCl₂. Dieser Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann über die Zellen verteilt. Es wurde 20 µl 50 mM Chloroquin zugegeben und dann vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 2 min mit 15% Glycerol in PBS inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Glycerol wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen danach Medium zugegeben und die Zellen im Brutschrank inkubiert.

2xHBS Puffer:

274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,4 mM Na₂HPO₄, 1,1 mM Dextrose, 42 mM Hepes (pH 7,05)

6. Herstellung von Kernextrakten aus transfizierten Zellen

Die Kernextrakte aus Calciumphosphat-transfizierten HEK293-Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion hergestellt. Die Herstellung von Kernextrakten erfolgte auf Eis, mit vorgekühlten Medien und Zentrifugen (4°C), zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Gummischaber von der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden dann durch 5 Minuten zentrifugieren bei 750 x g sedimentiert, das Pellet wurde in 0,5 ml Puffer A aufgenommen und 10 min. inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 250 µl Puffer A aufgenommen und in einem Handhomogenisator aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert, in 50 µl Puffer C aufgenommen und bei häufigem Vortexen 30 min inkubiert. Durch Zentrifugieren bei 50,000 U/min. (Beckmann TL-100) wurden gelöste Kernproteine und unlösliche Bestandteile getrennt. Der die Kernproteine enthaltende Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Puffer A

10 mM Hepes (pH 7,6), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT

Puffer C

20 mM Hepes (pH 7,6), 25 % (v/v) Glycerol, 420 nM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT

7. Herstellung stabiler induzierbarer Klone

Die folgende Beschreibung bezieht sich sowohl auf die Herstellung stabiler INS-1- als auch auf die Herstellung stabiler HEK293-Klone. Zunächst wurden die Zellen mit Lipofektamin transfiziert, dazu wurden die beschriebenen LFE-Vektoren eingesetzt. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen trypsiniert, in verschiedenen Verdünnungen von 1:1 bis 1:10 auf 10 cm Schalen verteilt und mit Puromycin (0,5 µg/ml) haltigem Medium auf stabile Klone selektiert. Einzelkolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt, in eine 24-well-Schale überführt und später mittels Immunfluoreszenz und Immunoblotanalyse auf Induzierbarkeit überprüft.

8. Induzieren von stabilen Klonen und Bestimmen der Zellzahl

Die hergestellten stabilen induzierbaren INS-1- und HEK293-Klone wurden durch Zugabe von Tamoxifen (4-OH-Tamoxifen, 100 nM) ins Medium induziert.

Zur Bestimmung des Anteils der das Transgen exprimierender Zellen innerhalb eines Klones wurden 50,000 Zellen pro 6-well-Schale ausgesät und induziert. Jeden zweiten Tag wurde das Zellkulturmedium gewechselt, dieses Medium enthielt kein Tamoxifen mehr. Am sechsten Tag wurden die Zellen trypsinisiert und erneut 50,000 Zellen pro 6-well-Schale ausgesät. Am Tag 2, 6 und 12 wurde, mit Hilfe von Immunfluoreszenz und Zählen unter dem Fluoreszenzmikroskop, der Anteil der exprimierenden Zellen bestimmt.

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 50,000 Zellen in 6-well-Schalen ausgesät und mit 100 nM Tamoxifen induziert. Nicht-induzierte Klone, die als Kontrollen dienten, wurden mit dem gleichen Volumen Ethanol (95%) behandelt. Alle zwei Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Am sechsten Tag wurden die Zellen trypsinisiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

9. β -Galaktosidase-Färbung

Zum Nachweis der LacZ-Expression von Zellen wurden die Zellen zunächst in PBS mit 1% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd fixiert. Dann wurden die Zellen 4-8 Stunden in PBS mit 5 mM Kaliumferricyanide, 5 mM Kaliumferrocyanid, 2 mM $MgCl_2$ und 1mg/ml X-Gal. (5-bromo-4-chloro-3- β -D-galactopyranosid) inkubiert.

10. Indirekte Immunfluoreszenz von Zellen

Die Immunfluoreszenzanalyse erfolgte in 3 cm Zellkulturschalen oder auf Glasplättchen. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, mit Methanol oder Paraformaldehyd (4%) fixiert und einmal mit PBS/0,01% Tween-20 und danach zweimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation mit PBS/10% Ziegen Serum für 1 Stunde bei 4°C abgesättigt. Als Erstantikörper diente der monoklonale gegen den myc-tag gerichtete Antikörper 9E10 (Evan et al., 1985), er wurde in einer Verdünnung von 1:5 in DMEM auf die

Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei RT wurde die Antikörperverdünnung durch mehrmaliges waschen mit PBS entfernt und danach der Cy3-gekoppelte Zweitantikörper (Dianova) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS/10% Ziegerserum auf die Zellen gegeben. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für eine Stunde, bei 4°C und im Dunkeln. Nach erneutem Waschen mit PBS und Trocknen der fixierten Zellen mit einem Zellfasertuch, wurden die Zellen mit „Mounting-Medium“ (Vectashield, Vector-Laboratories) eingedeckelt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) ausgewertet.

11. Luciferaseassay

Für den Luciferaseassay wurden die Zellen 24 Stunden nach Transfektion in 50 µl Lysepuffer aufgenommen (25 mM Trisphosphat (ph 7,8), 2 mM DTT, 2 mM CDTA, 1% Triton-X-100), dazu wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummispatels von der Zellkulturschale gelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert, von dem Überstand wurden 20 µl mit Hilfe des „Luciferase Assay Systems“ (Promega) in einem Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) analysiert.

12. Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen

Zellextrakte wurden in derselben Weise hergestellt wie für den Luciferaseassay beschrieben, der dort verwendete Lysepuffer wurde jedoch zusätzlich mit SDS versetzt (0,1%). Die Zellen wurden durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen und Vortexen aufgebrochen. Nachdem das unlösliche Pellet abzentrifugiert worden war, wurde der Überstand bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes erfolgte mit dem „BioRAD Protein Assay System“ (Biorad).

13. Immunoblotanalyse

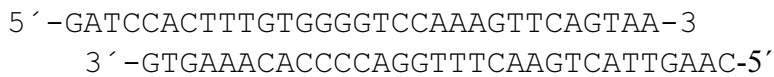
Die Immunoblotanalysen wurden mit dem myc-spezifischen monoklonalen Antikörper 9E10 durchgeführt, dieser erkennt spezifisch den myc-tag, den alle verwendeten Konstrukte als Fusion am N-Terminus tragen. Zum Nachweis der Proteine wurden die entsprechenden Extrakte einer denaturierenden Gelelektrophorese unterzogen (Sambrock et al., 1989). Danach wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schuell) geblottet. Die Membran wurde mit Blockingreagenz (Amersham, Braunschweig) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran mit einer 1:5 Verdünnung des 9E10 Antikörpers in PBS/0,05% Tween-20 inkubiert. Die Membran wurde eine halbe Stunde in PBS/0,05% Tween gewaschen dabei wurde die Waschlösung dreimal erneuert. Der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper (Amersham) wurde in einer 1:5000 Verdünnung in PBS/0,05% Tween auf die Membran gegeben, nach einer Stunde Inkubation und erneutem waschen konnte der Zweitantikörper mittels des ECL-Systems (enhanced chemoluminescence system, Amersham) detektiert werden.

14. Gelretardationsanalyse

Für die Gelretardationsanalysen wurden Kernextrakte aus Zellkultur-Zellen und Kernextrakt aus Rattenleber (Fabian Esser, Institut für Zellbiologie, Essen) eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben enthielt jeder Reaktionsmix für die Gelretardationen 2 µg Gesamtprotein, 150 ng Lachssperma-DNA als unspezifischer Kompetitor, 10^4 c.p.m. ^{32}P markiertes Oligonukleotid und gegebenenfalls Antikörper. Der Reaktionsmix von 15 µl Volumen wurde zunächst ohne Oligonukleotid in GRBB⁻ (10 mM Hepes (pH 7,6), 1 mM EDTA, 1 mM DDT, 4% Ficoll) angesetzt und 15 min bei Raumtemperatur (RT) vorinkubiert, dann wurde das Oligonukleotid in 5 µl GRBB⁻ zugegeben und erneut 15 min bei RT inkubiert. Der Reaktionsmix wurde in einem Polyacrylamidgel (4%) in 0,25 x TBE für 1,5 Stunden bei 100 Volt aufgetrennt. Um die retardierten DNA/Protein-Komplexe sichtbar zu machen wurde das Gel getrocknet und für 12-48 Stunden mit einem Film belegt.

Oligonukleotide:H4-Oligonukleotid:

Das H4-Oligonukleotid beinhaltet die HNF4-Bindestelle aus dem *Xenopus*-HNF1 α -Promotor (Zapp et al., 1993).

hHNF1Prom-Oligonukleotid:

Das hHNF1Prom-Oligonukleotid beinhaltet die HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 α -Promotor des Menschen.

hHNF1Prom.mut-Oligonukleotid:

Das hHNF1Prom.mut-Oligonukleotid beinhaltet die HNF4-Bindestelle aus dem HNF1 α -Promotor des Menschen. Es trägt jedoch eine Mutation in der Bindestelle wie sie bei MODY3 vorkommt. Die veränderte Base ist unterstrichen.



Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der Klenow-Polymerase und α -³²P-dCTP radioaktiv markiert.

Antikörper:H4/55

Der H4/55 ist ein monoklonaler Antikörper der ein Epitop aus dem ABCD-Fragment des Ratten-HNF4 α erkennt (Holewa et al., 1996).

9E10

Der 9E10 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen den myc-tag gerichtet ist (Evan et al., 1985).