

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 CHEMIKALIEN

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen.

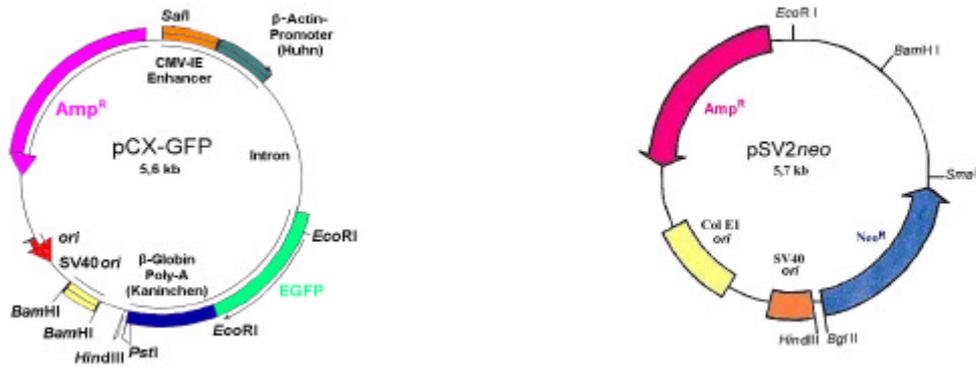
### 2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

#### 2.2.1 Vervielfältigung der Plasmide

Um das EGFP-Gen unter Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors in Säugerzellen einzuschleusen, wurden verschiedene Plasmide eingesetzt (Tabelle 2-1, Abb. 2-1). Für die eigenständige Vermehrung und Selektion in *Escherichia coli* besitzen die verwendeten Plasmide einen bakteriellen Replikationsursprung (*ori*) und einen selektierbaren Marker, der eine unter Kontrolle eines bakteriellen Promotors stehende Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin (Amp<sup>R</sup>) oder Kanamycin (Kan<sup>R</sup>) kodiert. Die Plasmide pEGFP-N1 und pd2EGFP-1 besitzen außerdem eine sogenannte „*Multiple Cloning Site*“ (MCS), die mehrere Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen (RE) enthält, so daß fremde DNS eingefügt werden kann, ohne daß *ori*, der Selektionsmarker oder das EGFP-Gen verändert werden.

**Tabelle 2-1 Verwendete Plasmide**

Bezeichnung	Plasmid-karte	Promotor	Reporter	Antibiotikaresistenz	Quelle
pCX-GFP	Abb. 2-1	$\beta$ -Actin/ $\beta$ -Globin-Gen-Promotor und CMV <i>Enhancer</i>	EGFP	Ampicillin (bakterieller Promotor)	M. Okabe, Osaka, Japan
pSV2neo	Abb. 2-1	promotorlos		G418-Resistenz, Helferplasmid Ampicillin (bakterieller Promotor)	Clontech, Heidelberg
pEGFP-N1	Tabelle 2-5	CMV <i>Enhancer</i>	EGFP	Kanamycin (bakterieller Promotor, P <sub>amp</sub> ), Neomycin (SV40 <i>early</i> Promotor)	Clontech, Heidelberg
pd2EGFP-1	Tabelle 2-5	promotorlos	d2EGFP	Kanamycin (bakterieller Promotor P <sub>amp</sub> ), Neomycin (SV40 <i>early</i> Promotor)	Clontech, Heidelberg
pNF- $\kappa$ B-d2EGFP	Tabelle 2-6	NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle vierfach	d2EGFP	Ampicillin (bakterieller Promotor)	Clontech, Heidelberg



**Abb. 2-1 Plasmide für Cotransfektionen**

Die Plasmide pCX-GFP (M. Okabe, Osaka, Japan) und pSV2neo (Clontech, Heidelberg) wurden bei der Cotransfektion von CHO-Zellen eingesetzt. Amp<sup>R</sup>, Ampicillinresistenzgen; CMV-IE *Enhancer*, *Cytomegalovirus Immediate Early enhancer*, ori, *origin* = Replikationsursprung; SV40 ori, Replikationsursprung aus *Simian Virus 40*; EGFP, EGFP-Gen; *b-Actin promoter (Huhn)*, Promotor des  $\beta$ -Actin-Gens des Huhnes; *b-Globin Poly-A (Kaninchen)*, Poly-Adeninschwanz des  $\beta$ -Globins-Gens des Kaninchens; Neo<sup>R</sup>, Neomycinresistenzgen

### 2.2.1.1 Transformation

Voraussetzung für die Transformation ist die Anzucht kompetenter Zellen, d.h. Zellen, die DNS aufnehmen können. *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen (ATCC Nr. 53868, Manassas, VA, USA) wurden nach der Methode von Hanahan kompetent vorbereitet [HANAHAN, 1983; SAMBROOK *et al.*, 1989A]. Zur Verwendung bei Ligationen wurden bereits kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen (*subcloning efficiency*, Gibco BRL Nr. 18265-017, Rockville, MD, USA) bezogen. Für die Herstellung unmethylierter Plasmid-DNS wurde der transformationskompetente *E. coli*-Stamm SCS110 (Stratagene Europe #200247, Amsterdam, Niederlande), der *dam* (DNS-Adenin-Methylase)- und *dcm* (DNS-Cytosin-Methylase)-negativ ist, verwendet.

Flüssigmedien und Agar (Tabelle 2-2) wurden autoklaviert und nach Abkühlen mit Antibiotika (50  $\mu$ g/ml Ampicillin oder 30  $\mu$ g/ml Kanamycin, Biochrom GmbH, Berlin) versetzt. Die Flüssigmedien wurden bei 4°C gelagert. Der Agar wurde in Petrischalen portioniert und nach dem Erstarren bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Eine Übernachtskultur in 3 ml LB-Medium wurde mit einer frisch angezogenen Kolonie angesetzt. 100 ml LB-Medium wurden mit der Übernachtskultur beimpft und 3 bis 4 h bei 37°C und 200 upm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellen wurden 10 min auf 0°C abgekühlt und 10 min bei 700 g und 4°C pelletiert. Nach Dekantieren des Mediums wurden die Zellen mit 10 ml eiskalter FSB-Lösung gewaschen, in 2 ml eiskalter FSB-Lösung resuspendiert, aliquotiert und bei -60°C gelagert.

Zur Vervielfältigung der Plasmide wurden diese kompetenten Zellen mit Plasmid-DNS transformiert und unter Selektionsdruck kultiviert. Als Positivkontrollen wurde parallel „supercoiled“ pUC18-DNS eingesetzt, als Negativkontrolle dienten kompetente Bakterien, die

keine Plasmid-DNS erhielten. 200 µl Zellen wurden mit 1-5 µl Plasmid-DNS (etwa 4 ng „*supercoiled*“ Plasmid-DNS) transformiert und die entstandenen Kolonien wurden gezählt. Die Transformationsrate wurde aus der Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) pro µg Plasmid-DNS berechnet.

---

**Tabelle 2-2    Lösungen und Medien für Transformation und Anzucht von Bakterien**

---

***FSB-Lösung (Transformationspuffer) nach SAMBROOK et al. [1989D]***

2 ml 1 mol/l Kaliumacetat pH 7,5  
1,78 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O  
0,29 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O  
1,49 g KCl  
0,16 g Kobalt(III)hexamminchlorid  
20 ml Glycerol  
160 ml H<sub>2</sub>O mischen  
pH 6,4 wurde mit 0,1 mol/l HCl eingestellt. Der Transformationspuffer wurde bei 4°C dunkel gelagert. Der pH stabilisierte sich bei pH 6,1-6,2.

***LB-Medium (Standard Luria Bertani)***

10 g Trypton (Tryptophan-reicher pankreatischer Verdau von Casein)  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
ad 1 l *Aqua dest.*

***LB-Agar***

1 l LB-Medium  
16 g Difco Bacto Agar

---

**2.2.1.2 Plasmidreinigung (Miniprep, Maxiprep)**

Für die Konstruktion rekombinanter Plasmide (s. 2.2.3) wurden Minipräparationen der Ausgangsplasmide hergestellt, für die Restriktionsanalyse solche der rekombinanten Plasmide (s. 0).

Dazu wurden aus einer 3 ml Übernachtskultur mit Hilfe des Wizard Plus Miniprep DNA Purification System (Promega, Madison, USA) nach Anleitung des Herstellers Minipräparationen durchgeführt, wobei sich ein Ertrag von 20-50 µg reiner DNS ergab. Zur Elution der DNS wurden 50 µl TE-Puffer (Tabelle 2-3) oder *Aqua bidest.* (pH ≥ 8,0, für präparative Restriktionsverdau, s. 2.2.3.2) verwendet. Die Plasmid-DNS wurde bei -20°C (in *Aqua bidest.*) oder 4°C (in TE-Puffer) aufbewahrt.

---

**Tabelle 2-3 Pufferlösung für die DNS-Elution**

---

**TE Puffer (Tris-EDTA) pH 7,6 oder 8,0**

Lösung 1            10 ml 1 mol/l TrisCl (pH 7,6/8,0)  
                      ad 500 ml *Aqua dest.*

Lösung 2            1 ml 1 mol/l EDTA (pH 8,0)  
                      ad 500 ml *Aqua dest.*

Lösung 1 und 2 wurden kombiniert, autoklaviert und bei RT gelagert.

---

Für die Transfektion der Säugerzellen wurden nach Transformation von DH5 $\alpha$  mit den verschiedenen Plasmiden Maxipräparationen hergestellt. Dazu wurden Qiagen Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) verwendet, deren Ertrag bei den hier verwendeten "high copy" Plasmiden (i.d.R. mit pUC *ori*, 500 Kopien pro Zelle) ~ 500  $\mu$ g Plasmid-DNS aus einer 100 ml Übernachtskultur beträgt. Die Präparation erfolgte nach Anleitung des Herstellers, wobei für die Übernachtskultur 3 ml LB-Medium mit Ampicillin bzw. Kanamycin verwendet wurde. Für die Zentrifugationsschritte wurde die gekühlte Ultrazentrifuge Sorvall RG5B (Du Pont Instruments, Bad Homburg) mit dem GSA- bzw. SS-34-Rotor verwendet. Die DNS wurde in TE (pH 8,0, Tabelle 2-3) gelöst.

Für ein analytisches Gel (s. 2.2.2) der Prozedur wurden die während der Präparation genommenen Proben mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol präzipitiert, die Pellets mit 70 % Ethanol gespült und in 10  $\mu$ l TE (pH 8,0) resuspendiert.

### 2.2.1.3 Photometrische Messung

Die Bestimmung des DNS-Gehaltes der Plasmidpräparationen erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) einer 1:100 Verdünnung in TE-Puffer (Tabelle 2-3) bei 260 nm im Spektrophotometer U-3310 (Hitachi, USA). Dabei wurde davon ausgegangen, daß 1 OD<sub>260</sub> 50  $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNS entsprechen. Der Verunreinigungsgrad durch Proteine wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Nur Proben mit einer OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> von über 1,8 wurden für Restriktionsverdaureaktionen eingesetzt.

## 2.2.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Plasmid-DNS und der Plasmidfragmente (s. 2.2.3.3) erfolgte mit Hilfe einer horizontalen Agarose-Gelelektrophorese, wobei der Grad der Auftrennung der Plasmide und Fragmente nach Größe von der Dauer der Elektrophorese und der Konzentration des Agarosegels abhängig ist [SAMBROOK *et al.*, 1989B].

Für Minigele (8 x 10,5 cm<sup>2</sup>) wurden 50 ml, für große analytische Gele (20 x 20 cm<sup>2</sup>) 200 ml, für präparative Gele 300-400 ml Agarosegel hergestellt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNS-Moleküle wurden Agarosekonzentrationen von 0,9, 1 oder 1,3 % eingesetzt.

---

**Tabelle 2-4 Puffer, Lösungen und Molekulargewichtsmarker für die Gelelektrophorese**

---

***10 x TBE (Tris-Borat-Elektrophorese)-Puffer***

107,8 g Trisbase  
55 g Borsäure  
7,44 g Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O  
ad 0,8 l *Aqua dest.*  
pH 8,0 (NaOH)  
ad 1 l *Aqua dest.*

Die Lösung wurde autoklaviert und bei RT aufbewahrt. Gebrauchslösung: 1 x TBE.

***Probenladepuffer***

50 mg Bromphenolblau-Natriumsalz (0,5 %, w/v) (Serva Electrophoresis, Heidelberg)  
4 g Saccharose (40 %, w/v)  
10 ml *Aqua dest.*

Aufbewahrung bei 4°C

***Ethidiumbromid-Stammlösung 10 mg/ml***

100 mg Ethidiumbromid reinst (Serva Electrophoresis, Heidelberg)  
10 ml *Aqua dest.*

Aufbewahrung bei 4°C. Gebrauchslösung: Endkonzentration 0,5 µg/ml in 1 x TBE

***Molekulargewichtsmarker***

KiloBase™ DNA Marker	Pharmacia Biotech, Freiburg
lambda DNA <i>Hind</i> III Digest	Pharmacia Biotech, Freiburg
100 bp Leiter und 1 kb Leiter	New England Biolabs, Beverly, MA, USA

---

1 x TBE-Puffer (Tabelle 2-4) wurde zur Agarose (Serva Electrophoresis, Heidelberg) gegeben, in der Mikrowelle gekocht bis die Agarose gelöst war, mit *Aqua dest.* aufgefüllt und in die Gelkammer gegossen.

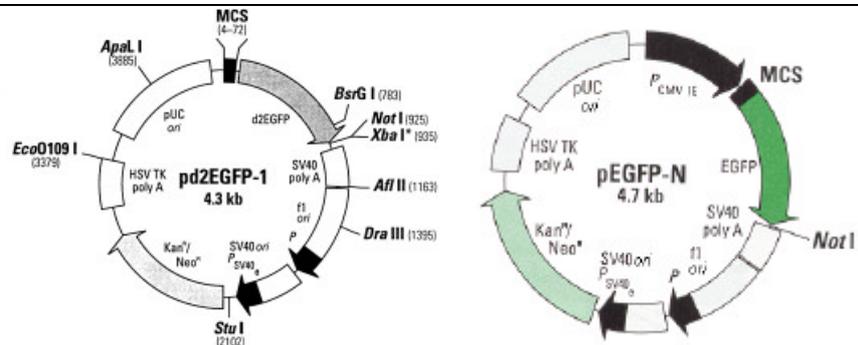
Die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x TBE-Puffer gefüllt. 1 µl Probe wurde mit 3 µl Probenladepuffer und *Aqua bidest.* ad 13 µl (Minigele) bzw. ad 20 µl (große Gele) gemischt. Nach seinem Erstarren wurde das in der Kammer plazierte Gel mit den Proben beladen. Die Elektrophorese wurde bei 400 mA und 70-100 V für 3-7 h (große Gele) bzw. 50-80 V für 50 min - 2 h (Minigele) in der GNA-200 Submarine Elektrophoresis Unit (Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese für 30 bis 45 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und vor dem Fotografieren mehrere Stunden in *Aqua dest.* entfärbt. Dazu wurden sie auf dem Transilluminator IL-350-M (302 nm, Bachhofer Laborgeräte, Reutlingen) beurteilt und mit der Fotovorrichtung MP-4 (Polaroid, Cambridge, MA, USA) auf Schwarz-Weiß-Instantfilmen (Polapan 54 Pro 100, Polaroid) abgelichtet. Bei Minigelen wurde 20 s belichtet, bei großen Gelen 25 s. Der Film wurde nach Entnahme des aus der Fotovorrichtung 45 s entwickelt.

## 2.2.3 Konstruktion der Plasmide

### 2.2.3.1 Übersicht Plasmidkonstruktionen: pCMV-d2EGFP und pNF-kB/Neo

**Tabelle 2-5** pCMV-d2EGFP

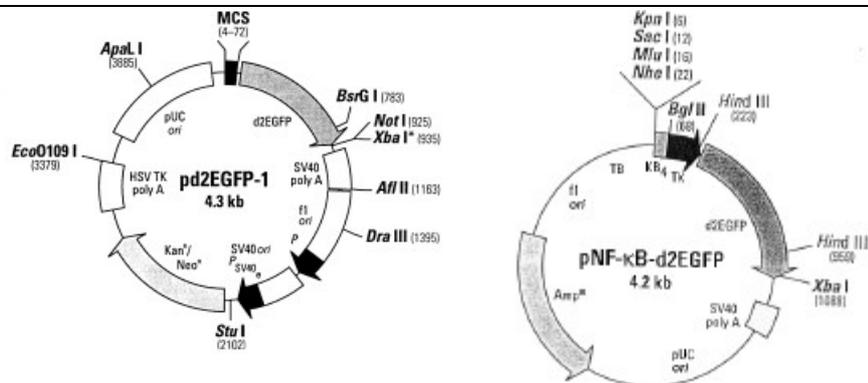
Plasmidkarten



Verwendete RE	<i>NotI</i> + <i>XhoI</i>	<i>NotI</i> + <i>XhoI</i>
Fragmente (aus Gel gewonnenes Fragment unterstrichen)	3362 bp (Vektor ohne d2EGFP-Gen) <u>903 bp</u> <i>XhoI-NotI</i> -Fragment (d2EGFP-Gen)	<u>3944 bp</u> <i>NotI-XhoI</i> -Fragment (Vektor-Rückgrat mit CMV-Promotor ohne EGFP-Gen) 789 bp (EGFP-Gen)
Ligationsbedingungen	Insert:Vektor 3:1, 1:1, 1:3, Inkubation 3 h bei RT	
Restriktionsanalyse	<i>XhoI</i> , <i>DrdI</i> , <i>EarI</i> , <i>HindIII</i> , <i>PstI</i>	

**Tabelle 2-6** pNF-kB/Neo

Plasmidkarten



Transformation der Ausgangsplasmide in	<i>E. coli</i> SCS110 ( <i>dam</i> ): unmethylierte <i>XbaI</i> -Schnittstelle	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$
Verwendete RE	<i>XbaI</i> + <i>SacI</i>	<i>XbaI</i> + <i>SacI</i>
Fragmente (aus Gel gewonnenes Fragment unterstrichen)	<u>3358 bp</u> <i>XbaI-SacI</i> -Fragment (Vektor ohne d2EGFP-Gen) 907 bp (d2EGFP-Gen)	3087 bp (Vektor ohne Promoter + d2EGFP-Gen) <u>1076 bp</u> <i>SacI-XbaI</i> -Fragment (Promotor + d2EGFP-Gen)
Ligationsbedingungen	Insert:Vektor 3:1, 1:1, 1:3; Inkubation 3 h bei RT, 16 h bei 15°C bzw. 4°C	
Restriktionsanalyse	<i>XbaI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>PstI</i> , <i>SacI</i>	

pCMV-d2EGFP wurde aus den Plasmiden pd2EGFP-1 und pEGFP-N1 hergestellt (Tabelle 2-5). pNF- $\kappa$ B/Neo wurde aus Fragmenten der Plasmide pd2EGFP-1 und pNF- $\kappa$ B-d2EGFP zusammengesetzt (Tabelle 2-6).

### 2.2.3.2 Restriktionsverdau

Die RE wurden von Promega (Mannheim), New England Biolabs (Beverly, MA, USA) oder Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen und nach Anleitung der Hersteller verwendet. Der mitgelieferte Puffer wurde unter Optimalbedingungen eingesetzt. Bei Verdau mit zwei RE wurde ein für beide Enzyme geeigneter Puffer ("Allround-Puffer"- Kaliumglutamat-Puffer) verwendet.

Die für die Verdaureaktionen verwendete DNS stammte aus Minipreps oder Maxipreps (s. 2.2.1.2), die DNS-Konzentration war durch photometrische Messung bestimmt worden (s. 2.2.1.3), oft war auch eine qualitative Analyse mittels Gelelektrophorese erfolgt (s. 2.2.2). Die DNS war in TE-Puffer pH 8,0 gelöst, oder, für präparative Restriktionsverdaus, in *Aqua bidest.* mit einem pH  $\geq$  8.

Für DNS-Verdaureaktionen wurden die in Tabelle 2-7 genannten Ansätze gemischt und bei 37°C im Thermoblock inkubiert (TRIO Thermoblock, Biometra, Göttingen).

Nach 3 h wurde ein 10  $\mu$ l Aliquot des präparativen Verdaus auf ein Minigel aufgetragen und 1 h bei 80 V aufgetrennt. Nach Färben mit Ethidiumbromid (s. 2.2.2) wurde die Qualität des Verdaus beurteilt. Bei komplettem Verdau wurde die gesamte Reaktion auf ein Gel aufgetragen (s. 2.2.2, 2.2.3.3), bei unvollständigem wurde die Inkubationszeit verlängert.

Tabelle 2-7	Berechnung des Restriktionsenzym (RE)-Ansatzes	
	analytischer Verdau	präparativer Verdau
<i>Aqua bidest.</i>	ad 20 $\mu$ l	ad 200-300 $\mu$ l
RE 10X Puffer	2 $\mu$ l	20-30 $\mu$ l
Acetyliertes BSA, 10 $\mu$ g/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l	2-3 $\mu$ l
DNS	1 $\mu$ g (0,2 - 1,5 $\mu$ g)    x $\mu$ l	10 $\mu$ g    x $\mu$ l
RE (10 U/ $\mu$ l) (2-10 facher Überschuß)	0,5 $\mu$ l	x $\mu$ l (je nach Konzentration des RE)
Inkubation	1 h bei 37°C	3 h bei 37°C

### 2.2.3.3 Reinigung der Fragmente und ihre Gewinnung aus dem Gel

Nach dem Verdau wurden die verschiedenen Fragmente mit Hilfe der Elektrophorese voneinander getrennt, um eine Ligationsreaktion allein mit den gewünschten Fragmenten zu ermöglichen und Religationen der Ausgangsplasmide zu unterbinden.

Dazu wurden Gele mit geeigneter Agarose-Konzentration hergestellt. Nach Zugabe von Probenladepuffer (Tabelle 2-4) zu den RE-Verdaureaktionen wurden diese in die Gelvertiefungen pipettiert und die Elektrophorese bei RT durchgeführt (s. 2.2.2).

Die interessierenden Banden wurden mit der langwelligen UV-Handlampe UVGL-58 (UV-254/366 nm, Ultra-Violet Products, San Gabriel, CA, USA) lokalisiert, mit einem nucleaserefreien Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt.

Um die DNS aus dem Agarosegel zu gewinnen, wurden die Agarosestücke unter Einwirkung des im Kit enthaltenen Puffers nach Anleitung des Herstellers (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) geschmolzen. Nachfolgend wurde die DNS in einer Silicagel-Membran-Säule gereinigt.

Die so gewonnene DNS war ausreichend rein für die weitere Behandlung mit RE und Ligasen. Der Elutionspuffer (20 mmol/l TrisCl) enthielt kein EDTA, um nachfolgende Reaktionsschritte nicht zu behindern.

#### 2.2.3.4 *Quantifizierung der Fragmente*

Die Schätzung der DNS-Fragment-Konzentrationen erfolgte anhand einer Gelelektrophorese eines Aliquots der isolierten Fragmente im Vergleich zu Markerbanden (100 bp/1kb-Leiter) und Restriktionsverdaureaktionen von 0,5 µg der verwendeten Ausgangsplasmide (s. 2.2.3.2).

Um eine optimale Auftrennung der Fragmente zu erzielen, wurden ein 0,9 %iges Agarosegel für das große Fragment (2 h bei 80 V) und ein 1,3 %iges für das kleine (50 min bei 80 V) hergestellt. Die Fragmente, Marker und Verdaureaktionen wurden nach Zugabe von 3 µl Probenladepuffer (Tabelle 2-4) auf das Gel aufgetragen.

Die anhand der Marker- und Fragmentbanden nach Ethidiumbromidfärbung des Minigels (s. 2.2.2) geschätzten DNS-Konzentrationen wurden im Ligationsansatz berücksichtigt.

#### 2.2.3.5 *Ligation*

Für alle Ligationsreaktionen wurde die Bacteriophage T4 DNS-Ligase (Promega, Nr. #M1801) in der Konzentration 3 U/µl verwendet. 0,01 Weiss Units (U) sind die Menge Enzym, die benötigt wird, um die Ligation von mehr als 95 % der *Hind*III-Fragmente von 1 µg Lambda-DNS bei 16°C in 20 min zu katalysieren. Der Ligase-Puffer (10 x) wurde aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt, um einen Abbau von ATP und Dithiothreitol zu vermeiden.

Die durchgeführten Ligationen erfolgten als sogenanntes “*directional cloning*”, d.h. die überstehenden Enden des Fragments und des Plasmidvektors wurden durch zwei verschiedene RE hergestellt, so daß das zu inserierende Fragment nur in der gewünschten Richtung eingebaut werden konnte. Die Rezirkularisierung des linearen Plasmidvektors wurde durch die nach Reinigung des verdauten Vektors nicht-komplementären überstehenden Termini unterbunden. Das einzufügende DNS-Stück hatte zum Vektor kompatible kohäsive Enden (5’ oder 3’ überstehend), bei denen eine sofortige Ligation möglich ist.

Die Ligation wurde nach modifizierter Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden pro Ligationsansatz 200 ng Vektor-DNS verwendet. Die Insert-DNS-Mengen wurden für verschiedene molare Verhältnisse von Insert zu Vektor (1:1, 1:3 und 3:1) nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{ng \text{ (Vektor)} \cdot kb \text{ (Insertgröße)}}{kb \text{ (Vektorgröße)}} \cdot \text{molaresVerhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = ng \text{ (Insert)}$$

Die benötigten Volumina der DNS-Fragmentlösungen wurden mit Hilfe der geschätzten DNS-Konzentrationen (s. 2.2.3.4) berechnet. Die Reaktionen wurden folgendermaßen angesetzt:

200 ng Vektor-DNS	y µl
x ng Insert-DNS	z µl
Ligase 10x Puffer	1 bzw. 2 µl
T4 DNS Ligase	0,3 µl
<i>Aqua bidest.</i>	ad 10 bzw. 20 µl

Neben den oben genannten Ligationsansätzen wurden zur Kontrolle eine Scheinligation ohne Ligase und eine Autoligation des linearisierten Plasmids durchgeführt. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und 3 h bei RT und/oder 16 h bei 15°C und 4°C inkubiert.

#### 2.2.3.6 Transformation von *E. coli* mit den rekombinanten Plasmiden

Da bei Ligationen nur mit einem geringen Anteil erfolgreich ligierter Plasmide zu rechnen ist, müssen die Transformationsbedingungen optimal sein, um diese geringen Mengen zirkulärer Plasmid-DNS in *E. coli* einzuschleusen. Dazu wurden hochkompetente *E. coli* DH5-α-Zellen (s. 2.2.1.1) und SOC-Medium (hergestellt nach SAMBROOK *et al.*, 1989D) verwendet.

Bei der Transformation der Ligationsprodukte (1:3, 3:1, 1:1) wurden als Kontrolle der Transformation und der Ligation die in Tabelle 2-8 genannten Reaktionsansätze berücksichtigt. Die Transformation erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Die transformierten Zellen wurden ausplattiert, und die Platten wurden 16-20 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

<b>Tabelle 2-8      Kontrolle der Transformation und Ligation</b>	
Transformation mit	erwartete Kolonienzahl
Schein-Transformation ohne DNS	keine
bekannter Menge einer Standardpräparation geschlossener zirkulärer DNS (pUC19, 0,1 µg/ml)	viele
religiertem linearisierten Vektor	wenige bis viele
unligiertem linearisierten Vektor	keine
ungeschnittenem Vektor (Miniprep)	viele

### 2.2.3.7 Restriktionsanalyse der rekombinanten Plasmide

Die nach der Transformation der Ligationsprodukte gewachsenen Kolonien wurden vermehrt und die enthaltene Plasmid-DNS mit Hilfe von Minipreps (s. 2.2.1.2) isoliert. Die Plasmid-DNS wurde durch eine Restriktionsanalyse charakterisiert. Die geeigneten RE wurden anhand der Restriktionsanalysen der Ausgangsplasmide ausgewählt (zu erwartende Fragmentgrößen s. Tabelle 3-2 und Tabelle 3-4). Nach dem Restriktionsverdau (s. 2.2.3.2) wurden die Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.2) aufgetrennt.

### 2.2.3.8 Vervielfältigung der rekombinanten Plasmide

Für die Transfektion der beiden rekombinanten Plasmide wurden mehrere Minipräparationen (s. 2.2.1.2) hergestellt und die DNS-Konzentration photometrisch bestimmt (s. 2.2.1.3).

## 2.3 ZELLKULTUR

### 2.3.1 Verwendete Zelllinien

Für diese Arbeit wurden verschiedene permanente Zelllinien verwendet, deren Herkunft in Tabelle 2-9 wiedergegeben ist. Die CHO-Zellen stammen aus dem Ovar eines Chinesischen Hamsterweibchens (*Cricetulus griseus*). Diese Zellen wurden ausgewählt, da sie schnell wachsen, bei Transfektionen Plasmid-DNS mit hoher Effizienz aufnehmen können und außerdem gut charakterisierte Mutanten erhältlich sind, die in definierten Reparaturschritten nach Bestrahlung Defekte aufweisen (s. 1.3.2).

<b>Tabelle 2-9 Verwendetes Zellmaterial</b>			
Laborbezeichnung	Gewebe/ Biopsie	Zelllinie Subtyp von Chromosomenzahl	Quelle Bestellnr.
AA8	Ovar Fibroblast	CHO-wildtyp ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> ) Zelllinie CHO-K1 21	ATCC* CRL-1859
EM9	Ovar	CHO-Mutante CHO-AA8 21	ATCC* CRL-1861
UV5	Ovar	CHO-Mutante CHO-AA8 21	ATCC* CRL-1865
HEK/293	Niere Epithel	<i>Human Embryonic Kidney</i> Transformiert mit Adenovirus 5 DNS	ATCC* CRL-1573
*ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA		