

**Untersuchungen mit dem Ecdyson - induzierbaren Promotorsystem
an humanen Tumorzelllinien**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität
Bonn

Ute Becker
aus Krefeld

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Franz
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Penka Pesheva

Tag der Mündlichen Prüfung: 06. Dezember 2006

Aus dem Anatomischen Institut der Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität Bonn
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Karl Schilling

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	8
Einheiten	10
1 Einleitung	11
1.1 Typen der Genexpressionssysteme	11
1.2 Ecdysteroide	12
1.3 Ecdysonrezeptor	13
1.4 Genexpressionssystem in Säugetierzellen	14
1.5 GFP	15
2 Zielsetzung	16
3 Material	17
3.1 Geräte	17
3.2 Lösungen für die Zellkultur	18
3.3 Zusammensetzung der gebrauchsfertigen Nährlösungen	19
3.4 Chemikalien	19
3.5 Verbrauchsmaterialien	21
3.6 Kits	22
3.7 Plasmide	23
3.8 Verwendete Zelllinien	26
3.9 Verwendete Selektionsagenzien	27
3.10 Lösungen für Northern Blot	28
3.11 Lösungen für RNA-Gelelektrophorese	29
3.12 Lösungen für die Detektion von DIG-markierten Sonden: (für Northern Blot)	30
3.13 Lösungen zur Proteinextraktion	31
3.14 Lösungen für Western Blot (Protein Immunblot)	31
3.15 Lösungen für Immunhistochemie	34

4	Methoden	35
4.1	Zellkultur	35
4.1.1	Kulturbedingungen	35
4.1.2	Trypsinisierung der Zellen	35
4.1.3	Transfektion	36
4.1.4	Selektion transfizierter Zellen	37
4.1.5	Klonieren von Zellen	37
4.1.6	Einfrieren von Zellen	38
4.1.7	Auftauen der Zellen	38
4.2	Molekularbiologische Methoden	39
4.2.1	Analyse von RNA	39
4.2.2	Restriktionsverdau	40
4.2.3	Agarose Gel - Elektrophorese	40
4.2.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	41
4.2.5	Northern Blot Hybridisierung	42
4.2.5.1	RNA Elektrophorese in einem denaturierten Formaldehyd-Agarosegel	42
4.2.5.2	Vakuum-Transfer der RNA	43
4.2.5.3	Hybridisierung des Northern Blots mit einer DNA-Sonde	44
4.2.5.4	Detektion der hybridisierten Sonde	45
4.3	Fluoreszenzmikroskopie	45
4.4	Immunhistochemie	46
4.5	Western Blot Analyse	47
4.5.1	Extraktion von Protein aus Zellen	47
4.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	47
4.5.3	Coomassie-Blue Färbung der SDS-Polyacrylamid-Gele	48
4.5.4	Western Blot der transferierten Proteine	48
4.5.5	Ponceau-Färbung der transferierten Proteine	49
4.5.6	Immunmarkierung von Western Blots	49

5	Ergebnisse	50
5.1	Bestimmung der Resistenz von HaCat, Hela und HCT116 Zellen gegen Selektionsagenzien, Neomycin(G418), Zeocin, Hygromycin, Puromycin	50
5.2	Transfektion der Zellen mit dem Rezeptorplasmid pVgRxR, Isolation von Klonen	52
5.3	Transfektion der Zellen mit dem Rezeptorplasmid pEF-EIR, Isolation von Klonen	52
5.4	Selektion induzierbarer Klone durch Transfektion mit induzierbaren Resistenzgenen, Puromycin und Hygromycin B	53
5.5	Selektion induzierbarer pVgRxR Klone durch transiente Transfektion mit dem zuvor linearisierten induzierbaren Reportergen EGFP	54
5.6	Selektion induzierbarer pEF-EIR Klone durch transiente Transfektion mit dem induzierbaren Reportergen EGFP	56
5.7	Untersuchung der Expression der Rezeptorgene im Northern Blot	57
5.8	Immunhistochemie von HCT116 Klonen	58
5.9	Charakterisierung stabiler induzierbarer Klone von HCT116 auf Induktion von EGFP im Western Blot	59
6	Diskussion	61
7	Zusammenfassung	63
8	Literaturverzeichnis	64

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
CHO	Chinese Hamster Ovary
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Diethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EcR	Ecdysonrezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
E/GRE	Ecdyson / Glucocorticoid responsive Element
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GFP	Green Fluorescent Protein
HaCat	humane Keratinozyten Zelllinie
HCT 116	humane Colonkarzinom Zelllinie
Hela	humane Zervix Karzinom Zelllinie
Hygro	Hygromycin Resistenzgen
Ig	Immunglobulin
IRES	interne ribosomale Bindungsstelle
kb	Kilobasenpaare
MOPS	3-(N-Morpholio)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Neo	Neomycin Resistenzgen
p	Plasmid
P	Promoter
pA	Polyadenylierungssignal

PBS	Phosphat Buffered Saline
P _{CMV}	Promoter des Zytomegalievirus
PFA	Paraformaldehyd
P _{RSV}	Promoter des Rous Sarkoma Virus
Puro	Puromycin Resistenzgen
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RxR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
SSC	Standard Saline Citrate
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tet-System	Tetrazyklin induzierbares Genexpressionssystem
TBS	Tris buffered Saline
USP	Ultra Spiracle Protein
UV	Ultraviolett
VgEcR	modifizierter Ecdysonrezeptor
Zeo	Zeocin Resistenzgen

Einheiten

Da	Dalton
F	Faraday
g	Gramm
h	Stunde
k	Kilo
l	Liter
m	Meter
min.	Minuten
μ	Mikro-
n	Nano
N	Normal
rpm	Rotationen pro Minute
sec.	Sekunden
U	Unit (Enzymeinheit)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit induzierbaren Promotorsystemen, die ein wichtiges Instrument in der medizinischen und biologischen Forschung darstellen (Shockett und Schatz, 1996). Induzierbare Genexpressionssysteme finden in der Untersuchung von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen Anwendung (Jaenisch, 1988). Mit ihnen kann sowohl die allgemeine Funktion von Zellen, die Wirkung toxischer und teratogener Proteine (Pastorino et al., 1998; Wyborski et al., 2001, Subba et al., 2003) als auch die Expression von antisense Sequenzen oder siRNA Sequenzen zur Regulation endogener Genexpression untersucht werden (Lu et al., 2005; Rosok et al., 2005; Aigner, 2006). Induzierbare Genexpressionssysteme haben gegenüber konstitutiven Genexpressionssystemen den Vorteil, dass eine gute zeitliche und quantitative Regulation der Genexpression möglich ist. Vor allem kann die Expression auf einen Zeitpunkt nach dem Gentransfer gelegt werden, so dass eventuell toxische oder teratogene Faktoren während des Gentransfers nicht selektiv wirken. Mit diesem Ansatz werden transgene Zellen bzw. Organismen hergestellt, in denen bestimmte Proteine überexprimiert werden. Durch die präzise Kontrolle der Fremdgenexpression kann die Steuerung biochemischer und physiologischer Prozesse durch das Transgenprodukt analysiert werden (Shockett und Schatz, 1996). Es ist durchaus möglich, dass die sichere und kontrollierte Genexpression in Zukunft auch in der Gentherapie eingesetzt werden wird (Harvey und Caskey, 1998).

1.1 Typen der Genexpressionssysteme

Für die Forschung stehen zwei Genexpressionssysteme zur Verfügung:

1. endogen induzierbare Genexpressionssysteme
2. exogen induzierbare Genexpressionssysteme

Bei dem Erstgenannten finden zelleigene Regulationsmechanismen Anwendung. Hierbei können die verwendeten Promotorsequenzen durch natürlich vorkommende Induktoren gesteuert werden (Kerr und Stark, 1991), wobei neben dem zu induzierenden Gen auch weitere endogene Gene beeinflusst werden (Gossen et al., 1993; Porter, 1998). Solche Promotorsequenzen stammen zum Beispiel von Dexamethason- (Lee et al., 1984), Schwermetallionen- (McNeall et al., 1989) oder aus Interferon-induzierten Genen (Kerr und Stark, 1991).

Im zweiten Fall werden Regulationsmechanismen aus artfremden Organismen verwendet. Das gewünschte Gen wird gezielt reguliert, da die Induktoren gewöhnlich keinen bekannten Effekt auf die natürliche Genexpression der Empfängerspezies besitzen (Porter, 1998; Meyer-Ficca et al. 2004). Nach Porter müssen allerdings kodierende Gene für die notwendigen regulatorischen Proteine, d.h. Rezeptoren für die Induktormoleküle, zusätzlich in die Zelle transfiziert werden (Porter, 1998).

Als Vertreter der Gruppe exogener Genexpressionssysteme für Säugerzellen sind erstens das Lac-System zu nennen, das durch Isopropylthiogalaktosid (IPTG) reguliert wird (Hu und Davidson, 1987), zweitens das Tet-System, bei dem die Genexpression durch Tetrazyklin reguliert wird (Shockett et al., 1995) und drittens das in dieser Arbeit verwendete Ecdyson-induzierbare Genexpressionssystem (No et al., 1996; Lüers et al., 2000), welches vielfach erfolgreich in tierischen Zellen genutzt worden ist, um Gene reguliert zu exprimieren (Johns et al., 1999, No et al., 1996, Pastorino et al, 1998, Sawicki et al. 1998).

1.2 Ecdysteroide

Ecdysteroide regulieren diverse biologische Effekte während des Lebenszyklus von Insekten (Baehrecke, 1996). Eines dieser Hormone ist das Ecdyson [n. gr. ekdysis >das Herauskriechen<, Häuten], das den Häutungsprozess bei Crustaceen und Insekten steuert (Spindler, 1997). Das mit dem Cholesterin verwandte Steroidhormon Ecdyson wird in der Prothoraxdrüse gebildet und in die Hämolymphe abgegeben. Durch Umwelteinflüsse und endogene Faktoren werden neurosekretorische Zellen stimuliert, woraufhin das Gehirn PTTH (prothorakotropes Hormon) produziert, das die Freisetzung von Ecdyson steuert. Nach diesem Prozess wird im peripheren Gewebe Ecdyson durch hämhaltige Oxidasen in das aktivere 20-Hydroxyecdyson umgewandelt. Dieses wirkt im larvalen Stadium zusammen mit dem in den Corpora Allata gebildeten Juvenilhormon (Spindler, 1997).

1.3 Ecdysonrezeptor

Der Ecdysonrezeptor gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren, die an der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse, z.B. der Entwicklung, Differenzierung und Metamorphose beteiligt sind. Diese Transkriptionsfaktoren lassen sich in der Evolution weit zurückverfolgen, denn sie sind bei Vertebraten, Insekten, Schistosoma (Parasiten) und anderen Spezies zu finden (Thormeyer et al., 1998).

Alle Mitglieder dieser Rezeptorfamilie haben eine hoch kompakte DNA-Bindungsdomäne (C-Region), die aus einem variablen Amino-Terminus (A/B-Region), zwei Zinkfingern und einem konservierten Carboxy-(C) terminalen Ende (Regionen D bis F) besteht (Thormeyer et al., 1998). Für die Modulation der Transkriptionsrate ist die aminoterminal Region zuständig.

Die DNA-bindende Domäne ist eine kompakte Struktur, die aus zwei rechtwinklig angeordneten Alpha-Helices mit Zinkfingermotiven besteht (Yao et al., 1993; Perlmann et al., 1993). Als nächstes folgen so genannte Konsensussequenzen. Das sind gegenläufig palindrome Sequenzen, die bis zu drei Basenpaaren auseinander liegen können (Umesono und Evans, 1989). Der carboxyterminale Abschnitt schließlich ist für die Bindung des Induktors verantwortlich.

Bei klassischen Steroidhormonrezeptoren wie z.B. den Östrogen-, Androgen- und Progesteronrezeptoren ist eine Homodimerisierung der Rezeptoren möglich. Demgegenüber heterodimerisiert der Ecdysonrezeptor bei Insekten mit dem Ultraspiracle Protein (USP), bzw. bei Vertebraten dem homologen Retinoid-X-Rezeptor (Yao et al., 1993; Perera et al., 1999; Meyer-Ficca et al., 2004). Zusätzlich dazu hat die carboxyterminale Domäne ohne Hormon eine Repressorfunktion auf die Genexpression (Thormeyer et al., 1999).

Talbot u.a. erwähnen die drei isoformen Ecdysonrezeptoren EcR-A, -B1, -B2 bei *Drosophila melanogaster*, die gewebsspezifisch exprimiert werden. Diese drei Isoformen entstehen durch unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte aus einem Gen, und somit unterscheiden sie sich lediglich in der transaktivierenden, aminoterminalen Region (Talbot et al., 1993).

1.4 Genexpressionssystem in Säugetierzellen

Das von *Drosophila melanogaster* stammende endogene Ecdyson-induzierbare Genexpressionssystem kann nach einer Abwandlung für eine gezielte Genregulation in Säugerzellen verwendet werden (Christopherson et al., 1992). Zur Induktion dieses Systems werden statt Ecdyson die um ein Vielfaches aktiveren, synthetischen Analoga Muristeron A oder Ponasteron A verwendet (Nakanishi 1992). Diese Steroidhormone sind wegen ihrer guten Penetration durch Gewebe, das Fehlen einer Inaktivierung durch Serumproteine, sowie das Fehlen toxischer und teratogener Wirkungen auf Säugetierzellen für exogene Genexpressionssysteme sehr gut geeignet (No et al., 1996).

Da der Ecdysonrezeptor nicht in Säugetierzellen gebildet wird, muss ein Ecdyson-induzierbarer Expressionsvektor zusammen mit dem Ecdysonrezeptorgen in die Zelle transfiziert werden.

An Stelle des natürlichen heterodimeren Partners des Ecdysonrezeptors, dem Ultraspiracle Proteine (USP), wird der homologe Retinoid-X-Rezeptor (RXR) aus Säugerzellen verwendet (Yao et al., 1993). Dieser Rezeptor wird in den Säugerzellen von drei Genen kodiert, die eine Vielzahl von Isoformen bilden und mit mehreren Transkriptionsfaktoren interagieren können (Spindler, 1997; Li et al., 1997).

Bei der Anwendung des Ecdyson-induzierbaren Promotorsystems wird zunächst das Rezeptorplasmid VgRxR, das den modifizierten Ecdysonrezeptor und einen Retinoid-X-Rezeptor exprimiert, in die Zielzellen transfiziert. Die resultierenden Rezeptorzelllinien sollen beide Rezeptoren unter der Kontrolle viraler Promotoren konstitutiv und stark exprimieren (No et al., 1996). Somit können sie zusammen in Anwesenheit von Ponasteron A als Transkriptionsfaktorkomplex fungieren (Masuoka et al, 1970, No et al., 1996, Yao et al., 1993). (Vektorkarte Abb.1) Das zu induzierende Gen, das unter der Kontrolle eines Ecdyson-induzierbaren Promotors steht, wird nachfolgend auf einem weiteren Plasmid in die Rezeptorzelllinie transfiziert.

Dabei wird die Genexpression von dem induzierbaren Promotor durch Anlagerung eines Komplexes aus Ecdysonrezeptor, Retinoid-X-Rezeptor sowie Ecdysteroid an modifizierte Ecdyson/Glucocorticoid-Response-Elemente reguliert (Umesono und Evans, 1989; No et al., 1996).

Thormeyer u.a. beschreiben eine sehr niedrige basale Transkription des Ecdyson-induzierbaren Promotors ohne Ponasteron A oder Muristeron A. Die Autoren vermuten als Ursache, dass die

carboxyterminale Domäne des Ecdysonrezeptors auch in Vertebratenzellen eine Repressorfunktion entfalten kann, zumindest solange der Induktor nicht gebunden hat (Thormeyer et al., 1999). Durch Hinzufügen eines der beiden Steroidhormone wird die induzierbare Genexpression innerhalb kurzer Zeit und selektiv um mehrere Größenordnungen gesteigert (No et al., 1996, Lüers et al., 2000).

1.5 GFP

Das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein häufig verwendetes Reporterprotein bei der Darstellung der Genexpression und Proteinlokalisierung in lebenden Zellen (Chalfie et al., 1994). Es lässt sich laut Gubin u.a. in Säugetierzellen über lange Zeit stabil exprimieren (Gubin et al., 1997). Das GFP absorbiert die blaue Biolumineszenz von 395 nm und emittiert grünes Licht von 509 nm mit einer Schulter bei 540 nm (Chalfie et al., 1994).

GFP ist als Reporter besonders gut geeignet, da die Fluoreszenz allein auf der Peptidstruktur beruht und damit sein Nachweis keine Co-Faktoren oder beigefügte Substrate benötigt, und sich in vielen Zellversuchen sowie transgenen Tieren kein toxischer Einfluss gezeigt hat (Chalfie et al., 1994).

Eine Variante des Wildtyp GFP ist das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), das eine hellere Fluoreszenz zeigt und in Säugerzellen stabiler ist (Yang et al., 1996). Um eine höhere Expressionsrate in Vertebratenzellen zu erreichen, ist das EGFP für das humane Kodon optimiert worden (Haas et al., 1996). In dieser Arbeit wurde das EGFP verwendet.

2 Zielsetzung

Diese Arbeit verfolgt das Ziel, das Ecdyson-induzierbare Genexpressionssystem, dessen grundsätzliche Nutzbarkeit von Lüers et al. (2000) in CHO-Zellen gezeigt worden war, auf humane Tumorzellen anzuwenden, um nachfolgend Untersuchungen mit antisense oder siRNA Vektoren zum Studium der Genfunktion zu ermöglichen.

Dazu werden Untersuchungen an den Zelllinien HCT116 (humanen Colon Carzinom Zellen), HaCat (humanen Keratinozyten Zellen) und Hela (humane Cervix Carzinom Zellen) durchgeführt. Zur Identifizierung geeigneter Klone dieser Zelllinien, in denen das Ecdyson-induzierbare Promotorsystem funktioniert, soll die induzierbare Expression des Reporterproteins GFP (grün fluoreszierendes Protein) dienen.

3 Material

3.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	Function Line, Heraeus Instruments GmbH (Hanau, BRD)
Blotkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, BRD)
Digitale Geldokumentation	INTAS (Göttingen, BRD)
Gelkammer	BioRad (Californien, USA)
Gene Pulser®	BioRad (Californien, USA)
Heizplatte	Unitek HB 130
Hybridisierungsinkubator	GFL
Ionenaustauscheranlage	SC, Labomedic (Bonn, BRD)
Klonierungszyylinder (C ₄ -Stahl)	Universität Bonn
Lichtmikroskop & Fluoreszenz	LeicaDM IRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH (Wetzlar, BRD)
Magnetrührer	CAT M15, m. Zipperer GmbH (Staufen, BRD)
Magnetrührer	RCT basic, Kika® Werke (Ankara, TK)
Mikrozentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus Instruments (Hanau, BRD)
Neubauer – Zählkammer	Neubauer Improved, Hecht Assistent (Sondheim, BRD)
Orbitalschüttler	Polymax 1040 Heidolph
Photodokumentation	P90 Mitsubishi (INTAS)
Pipettierhilfe	pipetus®akku, Hirschmann® Laborgeräte (Eberstadt, BRD)
Pipettierhilfe	Eppendorf Reference (Wesseling-Berzdorf, BRD)
Pumpe	BioRad (Californien, USA)
Reinraumwerkbank	Hera safe, Heraeus Instruments (Hanau, BRD)
Saugapparatur	BioRad (Californien, USA)
Spektralphotometer(UV/Visible)	Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech (Cambridge, GB)
Stickstofftank	C´AIP Liquide (F)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg, BRD)

UV-Bestrahler (Crosslinker)	BioRad (Californien, USA)
UVT-28S	Herolab GmbH (Wiesloch, BRD)
Vakuumpumpe	KNF Neuberger INC. Laboport (New Jersey, USA)
Vortex	Genie 2, Scientify Industries (Bohemia, USA)
Zentrifuge	Laborfuge 400R, Heraeus Instruments GmbH (Osterode, BRD)

3.2 Lösungen für die Zellkultur

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (10x konzentriert)	Biochrom KG (Berlin, BRD)/Gibco BRL
DMEM ohne Calcium	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG (Berlin, BRD)/Seromed
G418 disulfate salt	Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)
Gene Jammer®, Transfection Reagent	Stratagene (Carlsbad, CA)
Glycerin	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
H ₂ O (steril) (deionisiertes Wasser)	Biochrom AG (Berlin, BRD)
Hygromycin B	Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG (Berlin, BRD)
McCoy's 5A Medium (Modified) 12 g/l	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, BRD)
Na ⁺ -Bicarbonat (7,5 w/v)	Biochrom AG (Berlin, BRD)
Na ⁺ -Pyruvate (100 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, BRD)
Penicillin/Streptomycin (10000 U)	Biochrom AG (Berlin, BRD) (100x Lösung)
Ponasteron A	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Puromycin	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%)	Biochrom AG (Berlin, BRD) (10x Lösung)
Trypsin/EDTA (0,25% / 0,02%)	Biochrom AG (Berlin, BRD)
Zeocin™	Bleomycin, Invitrogen (San Diego, USA)

3.3 Zusammensetzung der gebrauchsfertigen Nährlösungen

McCoy's + 10% FCS:	McCoy's (Pulverform)	12 g/l
	NaHCO ₃	30 ml
	Penicillin/Streptomycin	10 ml
	H ₂ O (steril)	ad 1000 ml
	Fötale Kälberserum (FCS)	100 ml
DMEM + 10% FCS:	DMEM (10x)	40 ml
	L-Glutamine	11 ml
	Na ⁺ -Pyruvate	4 ml
	Penicillin/Streptomycin	4 ml
	H ₂ O (steril)	ad 400 ml
	Fötale Kälberserum	40 ml
DMEM ohne Ca ⁺⁺ + 10% FCS	DMEM ohne Ca ⁺⁺	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	Fötale Kälberserum	50 ml

3.4 Chemikalien

Agar	Fluka Chemie GmbH (Buchs, CH)
Agarose	BMA (Rockland, USA)
Ammoniumpersulfat	Biotech (Uppsala, S)
Blocking Reagenz	Roche (Mannheim, BRD)
Bromphenol Blau	Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)
Bisacrylamid / Acrylamid 30% 19:1	BioRad (Californien, USA)
Calciumchlorid (CaCl ₂ H ₂ O)	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
CDP-Star TM	Roche (Mannheim, BRD)
Cellophanpapier	ALDI
Chlorsäure	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)

complete mini Tablette	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, BRD)
Coomasie-Blue	Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)
Diethylpyrocarbonat	Fluka Chemie GmbH (Bruch, CH)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
DMSO(Dimethylsulfoxide)	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
ECL-Reagenz	Amersham (Little Chalfont, GB)
EDTA	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Eisessig (=100% Essigsäure)	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Enzyme	Fermentas Life Science (St. Leon-Rot , BRD)
Ethanol	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Essigsäure	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Ethidiumbromid	Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)
Faltenfilter	Schleicher und Schuell (Dassel, BRD)
Formaldehyd	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Formaldehyd 37%	AppliChem GmbH (Darmstadt, BRD)
Formamid	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Igepal CA-630	Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Lachssperma	Roche (Mannheim, BRD)
Magermilchpulver	frema (DE-VAU-GE, Lüneburg)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Maleinsäure	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)
Methanol	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Molekulargewichtsmarker	BioRad (Californien, USA)
Molekulargewichtsstandard-Marker	Boehringer Mannheim (Mannheim, BRD)
MOPS	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Natriumacetat	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Natriumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Natriumcitrat	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Natriumphosphat	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
N-Laurosyl-Sarcosine	Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, BRD)
PMSF (Phenylsulfonylfluorid)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, BRD)
Ponceau S	Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)
Protein-Standards	BioRad (Californien, USA)
SDS	Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)
Temed (Tetramethylethylendiamin)	Amersham Bioscience (Uppsala, Sweden)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)
Tween 20	MP Biomedicals Inc. (Eschwege, BRD)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck KGaA (Darmstadt, BRD)

3.5 Verbrauchsmaterialien

Cryo Tube™ Vials 1,8ml SI	Nunc (Roskilde, DK)
Einmalpipetten 10ml (gestopft)	Greiner Labortechnik (Solingen, BRD)
Eppendorf-Spitzen (gestopft)	Biozym (Oldendorf, BRD)
Eppendorf-Spitzen	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, BRD)
Gene Pulser® Cuvette	0,4 cm electrode gap, pkg. of 50 Bio Rad (Californien, USA)
Gewebekulturschalen 3,5cm (Nunclon™)	Nunc (Roskilde, DK)
Gewebekulturschalen (steril) 60/15mm	Greiner bio-one (Solingen, BRD)
Gewebekulturschalen (steril) 100/20mm	Greiner bio-one (Solingen, BRD)
Einmalspritzen 50ml Omnifix	B/Braun (Melsungen, BRD)
Einmalspritzen 20 ml	Amefa GmbH (Limburg, BRD)
Kanülen (steril)	Microlane3, Becton, Dickinson & Company (Dublin, IRL)
Nitrozellulosemembran	Pall Corporation (Ann Arbor, USA)
Nylonmembran (pos. geladen)	Roche (Mannheim, BRD)
Parafilm	American CAN Company (Greewich, USA)
PVDF-Membran (Hybond P)	Amersham Biosciences (Amersham, GB)

Reaktionsgefäße	Microtubes 1, 5ml, Sarstedt (Nümbrecht, BRD)
Röhrchen (Tube) 15ml (steril)	Sarstedt (Nümbrecht, BRD)
Röhrchen (Tube) (steril) 30ml	Greiner bio-one (Solingen, BRD)
Röhrchen (Tube) (steril) 50ml	Greiner bio-one (Solingen, BRD)
Röntgenfilm	Kodak (Cedex, F)
Sterilfilter	ETO steril, Schleicher und Schuell (Dassel, BRD)
24 Lochplatten (Nunclon™)	Nunc (Roskilde, DK)
Whatman Papier	Whatman (Maidstone, GB)
Zellkulturflaschen (T ₂₅) (Nunclon™)	Nunc (Roskilde, DK)
Zellkulturflaschen (T ₇₅) (Nunclon™)	Nunc (Roskilde, DK)
Zellschaber	Biochrom AG (Berlin, BRD)

3.6 Kits

RNeasy Mini Kit®	Qiagen GmbH (Hilden, BRD)
RNeasy Midi Kit®	Qiagen GmbH (Hilden, BRD)
BCA-Protein-Assay Kit	Pierce (Rockford, USA)

3.7 Plasmide

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

pVgRxR:

Dieses von der Firma Invitrogen bezogene 8803 bp große Plasmid erlaubt die konstitutive Expression der für die Ecdyson-induzierbare Genexpression notwendigen Rezeptoren.

Der ursprünglich aus *Drosophila melanogaster* stammende, modifizierte Ecdysonrezeptor wird durch den Zytomegalievirus (CMV) enhancer Promotor, der humane Retinoid-X-Rezeptor durch den Rous Sarkoma Virus (RSV) Promotor expremiert.

Daneben enthält das Rezeptorplasmid eine Selektionskassette für Zeocin.

Zur besseren Integration ins Wirtsgenom wurde das Plasmid mit BstE II linearisiert.

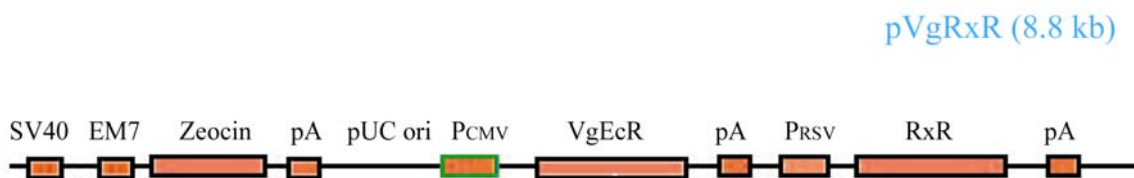


Abb.1 Vektorkarte pVgRxR

pEF-EIR:

Dieses Plasmid wurde entwickelt, um zum einen die viralen Promotoren P_{CMV} und P_{RSV} durch einen starken endogenen Promotor, nämlich den für das Gen des humanen Elongationsfaktor 1 α (huEF) zu ersetzen; zum anderen um die kodierenden Sequenzen von VgEcR und RXR über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) gekoppelt zu exprimieren.

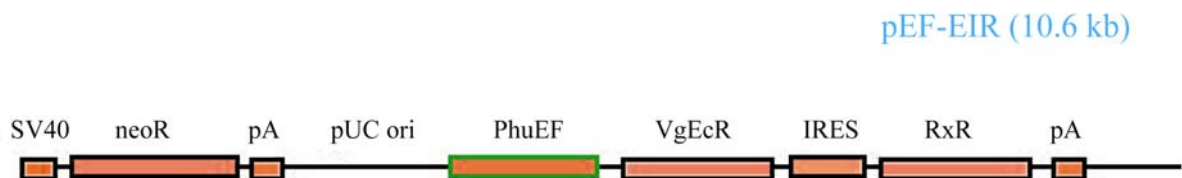
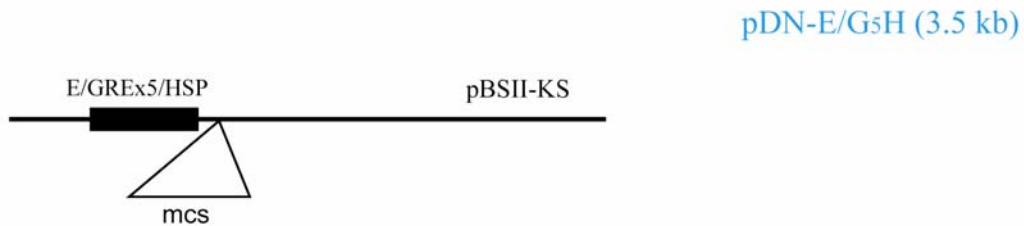


Abb.2 Vektordarstellung pEF-EIR

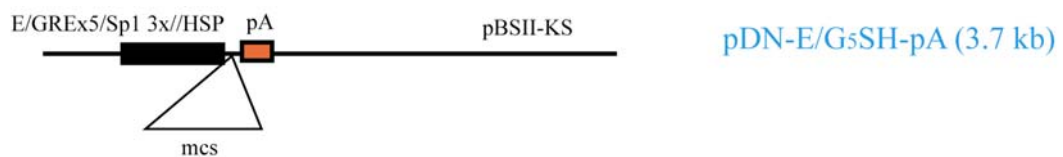
pDN-E/G₅H:

Dieser von Enrique Saez (Salk Institut, San Diego) bezogene 3,5 kb große Vektor enthält einen Ecdyson-induzierbaren Promotorkomplex mit fünf Ecdyson/Glucocorticoid-Response-Elementen (E/GREx5) und einen minimalen Hitzeschockpromotor. Dieser Promotorkomplex wurde in das pEGFP-N1 (4,7 kb) Plasmid (Clontech) kloniert und ersetzt dort den CMV Promotor.

Abb.3 Vektordarstellung pDN-E/G₅HpDN-E/G₅SH:

Das 3,5 kb große, von David No (Salk Institut, San Diego) bezogene Plasmid ist mit dem pDN E/G₅H-Vektor bis auf die Tatsache identisch, dass zusätzlich drei Sp1 Bindungsstellen vorhanden sind. Durch die zusätzliche Bindung des Sp1 Transkriptionsfaktors wird eine fünffach gesteigerte induzierbare Genexpression ermöglicht (No et al., 1996).

In dieses Plasmid wurden die Selektionskassetten für Hygromycin bzw. Puromycin Resistenz kloniert.

Abb.4 Vektordarstellung pDN-E/G₅SHpEGFP-N1:

Das 4,7 kb große Plasmid enthält neben einer Neomycin Resistenzgenkassette das Gen für das EGFP (enhanced green fluorescent protein).

In das von der Firma Clontech bezogene Plasmid pEGFP-N1 wurde das den CMV Promotor enthaltene Fragment herausgeschnitten und dafür das 0,6 kb große E/GREx5/HSP-Fragment des

pDN E/G₅H-Vektors eingebaut. Dabei entstand das hier verwendete pDN-E/G₅H-EGFP-SVneo (6,7 kb) Plasmid, das vor der Transfektion mit SacI oder SpeI linearisiert werden konnte.

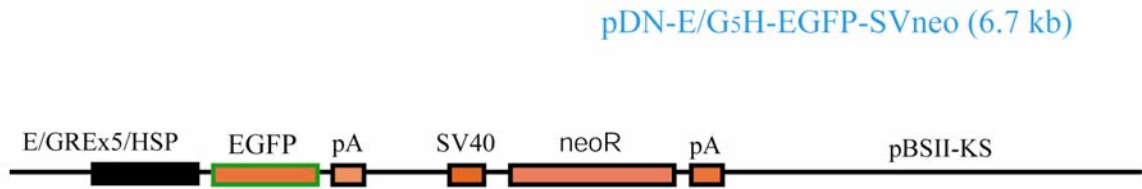


Abb.5 Vektordarstellung pEGFP-N1

pDN-E/G₅SH-hygro:

Aus dem 7,04 kb großen Vektor p5N-M-hyg-SV-X wurde die Selektionkassette Hygromycin B mit Hilfe von SmaI herausgeschnitten und in das oben beschriebene Plasmid pDN-E/G₅SH eingefügt.

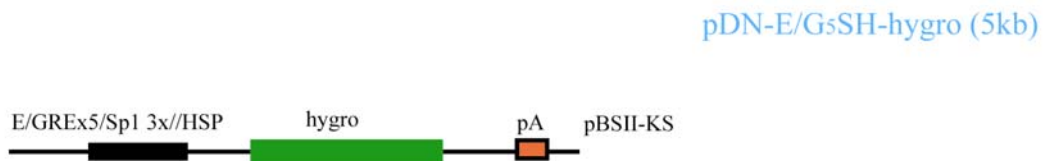


Abb.6 Vektorkarte pDN-E/G₅SH-hygro

pDN-E/G₅SH-puro:

Diesem 4,5 kb großen Plasmid liegt das pDN-E/G₅SH-Plasmid zugrunde, in das nach vorherigem Herausschneiden aus pPur (4,3 kb) die Selektionkassette Puromycin ligiert wurde.

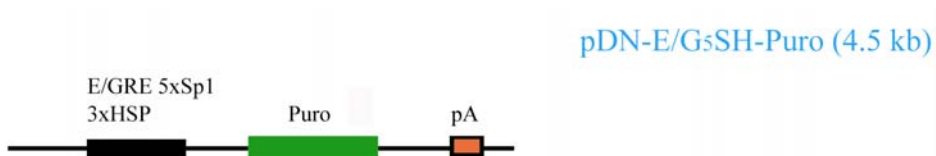


Abb.7 Vektordarstellung pDN-E/G₅SH-puro

3.8 Verwendete Zelllinien

HCT 116:

Die HCT 116 Zellen entstammen einem humanen Adenokarzinom des Colons. Die Zellen sind aus dem Colon eines männlichen Patienten isoliert worden und enthalten eine Mutation im Kodon 13 des ras-Protoonkogens (Brattain et al., 1981). Die Zelllinie wird in der American Type Culture Collection (ATCC) unter der Nummer CCL-247 geführt.

HaCat Zellen:

Die HaCat Zellen entstammen spontan immortalisierten Keratinozyten (Boukamp et al., 1988).

HeLa Zellen:

Die Zellen dieser epithelartigen Zelllinie sind aus dem Zervix Karzinom der Namen gebenden Patientin Henrietta Lacks isoliert worden. Die Zelllinie wird in der American Type Culture Collection (ATCC) unter der Nummer CRL-4010 geführt.

3.9 Verwendete Selektionsagenzien

G418:

G418 ist ein Aminoglykosid, das die Proteinsynthese inhibiert. Das dazugehörige Resistenzgen ist jenes für Neomycin. Neomycin ist ein topisches Aminoglykosid aus der Gruppe der Lokalantibiotika, das eine hohe Toxizität und hohe Allergierate in der lokalen Anwendung beim Menschen aufweist.

ZeocinTM:

Zeocin ist ein glykopeptidisches Antibiotikum aus der Bleomycin-Familie. Dieses Antibiotikum wirkt durch die Interkalierung in die DNA, deren Fragmentierung und der Hemmung der DNA-abhängigen Polymerase.

Hygromycin B:

Hygromycin B ist ein aminoglykosidisches Antibiotikum und wird von *Streptomyces hygroscopicus* produziert. Seine Wirkung entfaltet es durch die Inhibition der Proteinsynthese.

Puromycin:

Puromycin ist ein Aminonucleosid, das von *Streptomyces alboniger* produziert wird. Es inhibiert den Peptidyl-Transfer an Ribosomen.

3.10 Lösungen für Northern Blot

Denaturierungslösung:	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
Neutralisierungslösung:	Tris-Cl, pH 7	0,5 M
	NaCl	1,5 M
10x SSC-Puffer, pH 7:	NaCl	1,5 M
	Natriumcitrat	0,15 M
High-SDS-Hybridisierungspuffer (für Northernblot mit DNA-Sonden):		
	SSC-Puffer	5x
	Formamid, deionisiert	50%(v/v)
	N-Laurosyl-Sarcosine	0,1% (w/v)
	SDS	7% (w/v)
	Blocking-Reagenz	2% (v/v)
	N-Lauroyl-Sarcosine	0,1% (w/v)
	Natriumphosphat, pH 7,0	50 mM
Waschlösung 1:	SDS	1% (w/v)
	SSC	2x
Waschlösung 2:	SDS	1% (w/v)
	SSC	0,2x

3.11 Lösungen für RNA-Gelelektrophorese

10x Formaldehyd (FA)-Puffer:	MOPS	200 mM
	Na-Acetat	50 mM
	EDTA	10 mM
	In DEPC-Wasser; mit NaOH pH 7,0 einstellen	
1x Formaldehyd (FA)-Gellaufpuffer:	10x FA-Puffer	30 ml
	Formaldehyd, 37%	6 ml
	DEPC-Wasser	ad 300 ml
5x RNA-Probenpuffer:	Bromphenol-Blau (gesättigt)	16 µl
	EDTA, 500 mM, pH8	80 µl
	Formaldehyd, 37%	720 µl
	Glycerol, 100%	2 ml
	Formamid	3 ml
	10x FA-Puffer	4 ml
	DEPC-Wasser	100 µl

3.12 Lösungen für die Detektion von DIG-markierten Sonden: (für Northern Blot)

Maleinsäurepuffer, pH 7:	Maleinsäure	100 mM
	NaCl	150 mM
	In deionisiertem Wasser, mit NaOH den pH-Wert auf 7,5 einstellen.	
Blocking-Solution:	10x Stammlösung: 10g Reagenz in 100 ml Maleinsäure lösen, autoklavieren, bei 4°C lagern. Die Stammlösung wird vor der Anwendung durch einen Faltenfilter filtriert und 1:10 in Maleinsäurepuffer verdünnt.	
Waschpuffer:	0,3% Tween 20 in Maleinsäurepuffer	
Detektionspuffer, pH 9,5:	Tris-Cl	100 mM
	NaCl	100 mM
	Mit NaOH pH 9,5 einstellen	
	MgCl ₂	50 mM
	In deionisiertem Wasser	

3.13 Lösungen zur Proteinextraktion

Ripa (Extraktionslösung)	Tris 2M pH 7,0	5 ml
	Natriumdesoxycholat 10%	5 ml
	Natriumchlorid 5M	6 ml
	EDTA 0,5M pH 8,0	0,4 ml
	Igepal CA-630 10%	20 ml
	ad. 200 ml mit A. dest bei 4°C aufbewahren	
Vor Gebrauch dazugeben:	1 Tablette complete mini Proteaseinhibitoren	
	PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	1000µl

3.14 Lösungen für Western Blot (Protein Immunblot)

Alle Lösungen wurden in Aqua dest. angesetzt:

Ammonium-Persulfat (10%): 0,1 g in 1 ml Aqua dest. gelöst, frisch angesetzt

Proben Puffer (2x)	1M TRis-HCl, pH 6,8	1,25ml
	Glycerol	1,0 ml
	10% SDS (w/v)	3,0 ml
	2-Mercaptoethanol 5% (v/v)	565 µl
	Bromophenolblau 1% (w/v)	100 µl
12,5%-iges Trenngel	A.dest	3,1 ml
	Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml
	Bisacrylamid / Acrylamid (30%)	4,2 ml
	SDS, 10%	100 µl
	Ammoniumpersulfat, 10%	100 µl
	Temed	10 µl

4%-iges Sammelgel	A. dest	5 ml
	Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
	Bisacrylamid / Acrylamid (30%)	650 µl
	SDS, 10%	50 µl
	Ammoniumpersulfat, 10%	50 µl
	Temed	10 µl
Gel-Laufpuffer (10x) bei 4°C	Tris-HCl	15,15 g
	Glycine	72,0 g
	SDS, 10%	50 ml
	A. dest	ad 500 ml
Coomassie Blue-Färbelösung	Coomassie Blue	1% (w/v)
	Methanol	45,5% (v/v)
	Eisessig	9% (v/v)
Entfärbelösung	Methanol	20% (v/v)
	Eisessig	7% (v/v)
Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycine	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
	pH 8,3	
Ponceau-Lösung	Ponceau S	0,5% (w/v)
	Essigsäure	5% (v/v)
	Methanol	10% (v/v)
	in A. dest	
Blockierungslösung	5% Magermilchpulver in TTBS	

Tris-buffered saline (TBS)	Tris	20 mM
	NaCl	500 mM
	pH 7,5	

Tween-Tris-buffered saline (TTBS) 0,3% Tween in TBS

primäre Antikörper

Das polyklonale anti-GFP Antiserum aus der Ziege (Fa. Abcam Limited, Cambridge, GB, Cat. No. ab6658) wurde in einer Verdünnung von 1: 10.000 eingesetzt.

Das polyklonale anti-Aktin-C11 Antiserum aus der Ziege (Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc., Californien, USA, Cat. No. SC-1615) wurde in einer Verdünnung von 1: 7000 eingesetzt.

sekundärer Antikörper

Das Peroxidase konjugierte anti-Ziege Immunglobulin Antiserum aus dem Kaninchen (Dianova, Hamburg, BRD, Cat. No. 305-035-003) wurde in einer Verdünnung von 1: 30.000 eingesetzt.

3.15 Lösungen für Immunhistochemie

Waschlösung:	PBS (10x)	50ml
	BSA (Albumin Faktor V aus Rinderserum)	1 g
	A. dest.	ad 500 ml
DPBS:	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g
	KH ₂ PO ₄	0,24 g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,137 g
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,10 g
	A. dest.	ad 1000 ml
PBS:	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g
	KH ₂ PO ₄	0,24 g
	A. dest.	ad 1000 ml
PFA:	8g PFA in ca. 150 ml bei ca. 80°C 1 Std. rühren, anschließend 2 Tropfen 10 N NaOH hinzugeben bis die Lösung klar ist, 20 ml PBS 10x hinzufügen und mit 1N HCl (ca. 20 Tropfen) einen pH-Wert von 7,4 einstellen. Mit A. dest. auf 200 ml auffüllen und anschließend filtrieren.	
primärer Antikörper	polyklonales anti-GFP Antiserum aus der Ziege (Fa. Abcam Limited, Cambridge, GB, Cat. No. ab6658)	
sekundärer Anrikörper	Cy3 TM konjugierte Kaninchen Antiserum gegen Ig der Ziege (Fa. Dianova, Hamburg, BRD, Cat. No. 305-165-006)	

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kulturbedingungen

Die verwendeten adhärent wachsenden Zelllinien wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C in Luft-Atmosphäre mit 5% CO₂ und hoher Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Züchtung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen und Gewebekulturschalen.

Dem für die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT116 verwendeten Nährmedium McCoy's mit 10% FCS (fetales Rinderserum), wurden die Antibiotika Penicillin und Streptomycin in jeweils 1%iger Konzentration zugesetzt, um Bakterienwachstum in der Kultur zu verhindern.

Für die humane Keratinozytenzelllinie HaCat wurde als Nährmedium DMEM ohne Ca⁺⁺, für Hela DMEM mit Ca⁺⁺ verwendet und auf gleiche Weise mit den beiden Antibiotika behandelt. Die Nährmedien wurden alle drei bis vier Tage erneuert.

4.1.2 Trypsinisierung der Zellen

Die verwendeten Zellen sind an der Oberfläche der Zellkulturschalen durch bindende Proteine verankert; man bezeichnet sie als adhärent wachsende Zellen. Zum Passagieren der Zellen müssen diese Adhäsionen gelöst werden, was durch den Entzug von Kalzium- und Magnesium-Ionen und durch das proteolytische Enzym Trypsin geleistet wird (Spector et al. 1998). Hierfür wurde die 10x Trypsin/EDTA Stammlösung (mit PBS und Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺) in Ultrapur H₂O 1:10 verdünnt.

Nach Absaugen des in der Kulturschale befindlichen Nährmediums mit abgestorbenen Zellen wurde die Schale mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen, um die aus dem Nährmedium zurück gebliebenen Trypsininhibitoren zu entfernen. Nachfolgend wurden die Zellen für ca. 5 min. mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis sich alle Zellen von dem Boden der Kulturschalen gelöst hatten.

Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 3 ml Nährmedium mit FCS gestoppt. Nun konnten die Zellen entweder direkt in neue Kulturschalen ausgesät, oder bei 4°C und 1000 rpm 4 min. abzentrifugiert werden. Nach Absaugen des Überstandes und Resuspendierung des Pellets in

frischem Nährmedium standen die Zellen zu weiteren Analysen zur Verfügung. Für die neue Aussaat wurde die Zellsuspension zwischen 1:3 und 1:10 mit Nährlösung verdünnt.

4.1.3 Transfektion

Durch die Transfektion wird fremde DNA in Zellen eingebracht. Dies kann mittels unterschiedlicher Methoden durchgeführt werden. Im vorliegenden Fall kommen die Lipofektion mit Gene Jammer® von Stratagene sowie die Elektroporation zur Anwendung.

Bei der Lipofektion wird die zu transfizierende DNA in künstliche Lipidvesikel, den so genannten Liposomen, eingeschlossen. Die Liposomen verschmelzen bei Zugabe zu den Zellen mit der Zellmembran und geben dabei ihren Inhalt direkt in das Cytoplasma ab (Watson et al., 1993).

Zur Transfektion wurden je nach Ansatz unterschiedlich große Gewebekulturschalen verwendet, in denen die Zellen am Tag der Transfektion zu 80% konfluent waren.

Das Lipofektionsmedium wurde entsprechend dem Schema der Firma Stratagene angesetzt:

Format der Zellkulturschalen	Durchmesser der Schalen (mm)	Empfohlene Anzahl adherenter Zellen	Volumen des Transfektionsreagenz (µl / Schale)	Endvolumen der Transfektionsmixture (µl / Schale)	DNA-Menge (µg)	Mediumvolumen in jeder Schale	Volumen der Transfektionsmixture plus Medium
96 well	6,4	0,04-0,1	0,6	10	0,1	60µl	70 µl
48 well	10	0,1-0,3	1,2	50	0,2	75µl	125 µl
24 well	15	0,27-0,67	2,4	100	0,4	150 µl	250 µl
12 well	22	0,6-1,5	4,2	100	0,7	400 µl	500 µl
6 well	35	1,5-3,7	6,0	100	1,0	900 µl	1 ml
60 mm	60	4,0-11,0	12,0	250	2,0	2,25 ml	2,5 ml
100 mm	100	12,0-31,0	24,0	750	4,0	5,75 ml	6,5 ml
150 mm	150	27,0-69,0	48,0	1000	8,0	10 ml	11 ml

Tab.1 Lipofektionsansatz laut Stratagene

Dem reinen Nährmedium ohne fetales Kälberserum (FCS) wurde Gene Jammer® zugesetzt. Nach 5 min. wurde dieser Lösung DNA beigefügt. Dieser Ansatz wurde nach weiteren 5 Minuten auf die Zellen gegeben, die zuvor mit frischem Nährmedium versorgt wurden.

Diesem Lipofektionsansatz wurde nach 3 Stunden das gleiche Volumen an Nährmedium mit FCS hinzugefügt und nach 24 Stunden durch frisches, FCS haltiges Medium ersetzt.

Bei der Elektroporation werden die Zellen in DNA-haltiges Medium gegeben und dort einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt. Dadurch werden Poren in der Zellmembran kurzzeitig geöffnet, so dass die DNA direkt ins Cytoplasma gelangen kann (Watson et al., 1993).

Das durch Trypsinisierung und Zentrifugation hergestellte Zellpellet wurde in 0,8 ml Nährmedium resuspendiert und mit 5 µl DNA (1 µg/µl in H₂O) gemischt. Diese Lösung wurde in eine BioRad Gene Pulser® Cuvette zur Elektroporation bei 0,2kV und 950 µF transferiert.

4.1.4 Selektion transfizierter Zellen

Bei der Selektion ist das auf der transfizierten DNA befindliche Resistenzgen von entscheidender Bedeutung. Hierbei wird das Nährmedium so lange mit dem entsprechenden Selektionsagenz versetzt, bis nur noch diejenigen Zellen überleben können, die das Resistenzgen aufgenommen haben und dieses exprimieren. Als Kontrolle werden nicht transfizierte Zellen verwendet, deren vollständiges Absterben nach Zugabe des Selektionsagenz das Ende der Selektionsphase markiert.

Für die Selektion ist eine minimale Antibiotikumkonzentration notwendig, die durch eine Versuchsreihe für die bei dieser Arbeit verwendeten Zellen bestimmt wurde.

4.1.5 Klonieren von Zellen

Zum Erhalt einer Zellpopulation mit homogenen genetischen Merkmalen, so genannten Zellklonen, stehen Techniken der Ablösung einzelner verschiedener Zellhaufen in einer Gewebekulturschale zur Verfügung.

Hierbei wurden die von einer Zelle abstammenden Zellhaufen lichtmikroskopisch identifiziert und auf der Platte die entsprechende Stelle markiert. Anschließend wurden diese mit autoklavierten Klonierungszyklindern abgegrenzt. Die Klonierungszyklinder aus Stahl hatten einen Innendurchmesser von 4mm und eine Höhe von 3-4mm. Mit Hilfe von autoklaviertem Silikon-Fett wurden diese Zylinder an der Zellkulturschale befestigt und abgedichtet. Die somit isolierten Zellen wurden durch Gabe von Trypsinlösung in die Klonierungszyklinder abgelöst und in eine frische Zellkulturschale transferiert.

4.1.6 Einfrieren von Zellen

Bei der Kryopreservation werden die Zellen in eine Medium-Lösung, die 12,5% DMSO enthält, gegeben, die eine Eiskristallbildung beim Einfrieren mindern soll.

Die Zellen wurden durch Trypsinisierung von der Zellkulturschale gelöst und in einem sterilen, 30 ml Röhrchen 4 min. bei 4°C und 1000rpm abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes (Medium) und Resuspendierung des entstandenen Pellets in frischem Medium wurde gekühltes 25% DMSO/Medium im Verhältnis 1:1 tropfenweise hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 12,5% DMSO erreicht wurde.

Jeweils 1 ml dieses Ansatzes wurde in Cryotubes pipetiert und sofort auf Eis gestellt. Für 1-2 Tage wurden die Zellen in einem Styroporbehälter bei -80°C eingefroren, bevor sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff umgesetzt wurden.

4.1.7 Auftauen der Zellen

Die aus einem Stickstofftank entnommenen Zellen wurden bei 37°C aufgetaut. Die Suspension aus den Cryotubes wurde in sterile 30 ml Röhrchen transferiert und das DMSO/Medium mit 9 ml Nährmedium verdünnt. Bei 4°C und 1000 rpm wurde 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Analyse von RNA

Bei Arbeiten mit RNA muss die Kontamination mit RNasen unbedingt vermieden werden. Hierfür wurde die Arbeitsfläche sorgfältig mit 70% Ethanol gereinigt und für RNA-Arbeiten reservierte Mikropipetten mit sterilen, gestopften Spitzen sowie hitzesterilisierte Glaswaren (6h, 180°C) verwendet.

Zur Isolierung der RNA aus Säugetierzellen müssen die Zellen lysiert und homogenisiert werden. Anschließend kann die RNA nach Zugabe von 70% Ethanol an Kieselgel-Membranen gebunden werden. Vor der Elution der RNA in Wasser werden Verunreinigungen von der Matrix abgespült. In dieser Versuchsreihe sind sowohl das RNeasy Mini Kit® als auch das RNeasy Midi Kit® von Qiagen zur Anwendung gekommen, je nach Anreicherungsmenge.

Mit dem RNeasy Mini Kit® können bis zu 100 µg RNA mit einer Länge von über 200 Basen angereichert werden. Beim RNeasy Midi Kit® beläuft sich die Anreicherungsmenge auf maximal 1 mg RNA bei gleicher Länge.

Zur Verwendung des RNeasy Kits® wurden etwa $6 \cdot 10^6$ Zellen durch Trypsinieren und Zentrifugieren vorbereitet. Das so entstandene Zellpellet wurde mit 2 ml RLT-Puffer, welcher zuvor mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol versetzt worden war, resuspendiert. Dies geschah zur Inhibition der RNasen sowie zur Lysierung der Zellen. Durch mehrmaliges Aufziehen auf Einmalspritzen mit einer Ø 0,9 mm Spitze wurden die Zellen homogenisiert, bevor 70% Ethanol in gleichem Volumen hinzugegeben wurde.

Die Suspension wurde nach gründlichem Mixen mit Hilfe von Einmalpipetten auf eine RNeasy Midi Säule gegeben. Nun wurde zur Bindung der RNA an die Kieselgel-Membran 5 Minuten bei 22°C und 4500 rpm zentrifugiert.

Die nicht adhärennten Verunreinigungen auf der Säule wurden durch Zentrifugieren mit 4 ml RW1-Puffer und anschließend 2,5ml RPE-Puffer abgewaschen, bevor nochmals 2,5 ml RPE-Puffer durch die Säule zentrifugiert wurden. Dieses längere Zentrifugieren diente zur Trocknung der Säule mit RNA und zur Sicherstellung, dass kein Ethanol übertragen wurde.

Nach diesen Vorgängen konnten die RNeasy Säulen vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt werden. Durch zweimaliges Zentrifugieren mit je 200 µl RNase freiem Wasser wurde die RNA von der Kieselgel-Membran eluiert.

Die Quantität der aufgereinigten RNA konnte nun mit Hilfe photometrischer Messungen bestimmt werden.

Im Gegensatz zum RNeasy Mini Kit[®], variierte das Vorgehen beim RNeasy Midi Kit[®] in drei Punkten. Hauptunterschied war die Vorbereitung von lediglich $2 \cdot 10^6$ Zellen. Daneben wurden 700 μ l statt 4 ml RW1-Puffer, 500 μ l statt 2,5 ml RPE-Puffer und 50 μ l statt 200 μ l RNase freies Wasser verwendet. Ein weiterer Unterschied lag im Zentrifugieren. Bei der Mini-Präparation wurde bei 10.000 rpm zwischen 15 sec. und 2 min. zentrifugiert.

Genauer Vorgang s. Qiagen-Handbuch (2001).

4.2.2 Restriktionsverdau

Plasmid-DNA wird zur Synthese klonierbarer Fragmente durch Inkubation mit Restriktionsendonukleasen an spezifischen Stellen geschnitten. Die Fragmente können nach Elektrophorese in einem Agarosegel durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

Standardisiert wurden etwa 0,5-1 μ g Plasmid-DNA verdaut. Der Gesamtansatz hatte ein Volumen von 20 μ l und enthielt neben der DNA 2 μ l eines entsprechenden Puffers (10x konzentriert), 1 U Enzym und dest. H₂O. Die Inkubationszeit für die verwendeten Enzyme betrug eine Stunde bei 37°C. Danach wurden 3,5 μ l Lade-Puffer (5x konzentriert) zupipettiert und die Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. In dieser Arbeit werden Plasmide vor der Transfektion durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen linearisiert.

4.2.3 Agarose Gel - Elektrophorese

RNA-Fragmente unterschiedlicher Größe wandern aufgrund der durch ihre Phosphatgruppen verursachten negativen Ladungen im elektrischen Feld in Richtung Anode. Deshalb können RNA-Fragmente auf einem Agarosegel in einem elektrischen Feld aufgetrennt und mittels Zugabe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

Dazu wurde ein 0,7 %iges Agarose-Gel hergestellt, wobei 0,7 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle bei 600 W zum Kochen gebracht wurde. Der verdampfte Puffer wurde durch Wasser aufgefüllt. Nach Abkühlen auf 60°C wurde Ethidium Bromid in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml hinzugegeben.

Die Elektrophorese erstreckte sich über den Zeitraum von einer Stunde in 1x TAE-Puffer bei 80Volt.

Zum Vergleich wurde jeweils 1 µg eines Molekulargewichtsmarkers, der RNA-Fragmente bekannter Länge enthält, aufgetragen (1 kb Ladder, BioRad).

Anschließend erfolgte die Photodokumentation. Intakte Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben zeigte überwiegend zwei Banden, die der ribosomalen RNA entsprachen.

4.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht aufgrund der π -Elektronensysteme der konjugierten Doppelbindungen in den aromatischen Ringen der Basen. DNA und RNA zeigen ein Absorptionsmaximum bei 257 nm. Daher kann die Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung mit der UV-Spektroskopie ermittelt werden. Bereits bei der Wellenlänge von 260 nm absorbieren auch Verunreinigungen wie Proteine oder andere aromatische Substanzen UV-Licht. Das Absorptionsmaximum der Protein-Verunreinigungen liegt jedoch nicht bei 260 nm, sondern durch die aromatischen Reste der Proteine bei 280 nm. Deshalb kann mit einer Referenzmessung und einer Verhältnisbildung der Absorptionswerte von 260 nm und 280 nm die Reinheit der Lösung bestimmt werden. Reine DNA ergibt einen Quotienten von 1,8, während die Verunreinigung durch Proteine und aromatische Verbindungen dieses Verhältnis nach unten verschiebt. Reine RNA ergibt einen Quotienten größer oder gleich 2 (Jurk, 1998).

Grundlage für die Konzentrationsbestimmung bei 260 nm ist das Gesetz nach Lambert-Beer ($A=c \cdot l \cdot \epsilon$). Dieses Gesetz besagt, dass die Konzentration (c) einer Substanz mit Hilfe der gemessenen Absorption (A), der Küvettenbreite (l) und dem Extinktionskoeffizienten (ϵ) zu errechnen ist.

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl der Nukleinsäure-Probe in 49 µl Wasser verdünnt und gegen Wasser als Leerwert bei 260 nm und 280 nm im Spektrometer gemessen. Anschließend wurde die Konzentration in ng/µl errechnet.

4.2.5 Northern Blot Hybridisierung

Die Northern Blot Hybridisierung ist ein Verfahren zur quantitativen Erfassung spezifischer RNA-Transkripte. Die Bezeichnung erfolgte in Analogie zu dem von E.M. Southern 1971 entwickelten Southern Blot, das der quantitativen Erfassung von DNA-Fragmenten dient.

Die isolierte RNA wurde im Experiment durch die Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und auf Nitrocellulose- bzw. Nylon-Membranen übertragen. Bei der Elektrophorese wurde Formaldehyd zugesetzt, das zur Auflösung intramolekularer Doppelstrangbereiche diente.

Eine geeignet markierte komplementäre RNA – eine so genannte Sonde - wurde zum Nachweis einer speziellen mRNA durch Hybridisierung verwendet. Die Intensität der Autoradiographie-Bande kann als Maß für die Menge der betreffenden mRNA genommen werden (Knippers, 1971, 2001).

4.2.5.1 RNA Elektrophorese in einem denaturierten Formaldehyd-Agarosegel

In einem elektrischen Feld wandert die RNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode und wird dabei ihrer Größe entsprechend in der Gelmatrix aufgetrennt. Ein gleichmäßiges Laufverhalten wird durch formaldehydhaltige Agarosegele gewährleistet (Lehrach et al., 1977).

Bei dieser Versuchsreihe wurden als erstes Gelkammer, Gelträger und Kamm mit 0,5% SDS vorgereinigt, in deionisiertem Wasser gespült und mit 100%-igem Ethanol getrocknet. Anschließend wurden die Gegenstände zur Beseitigung verbliebener RNasen in 3%-iger H_2O_2 -Lösung für 10 min. inkubiert und gründlich mit DEPC-Wasser ausgewaschen.

Zur Herstellung eines 1,2%igen Agarosegels wurden 0,6 g RNase freie Agarose in 45 ml DEPC Wasser und 5 ml 10x Formaldehyd-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Diese Agaroselösung wurde anschließend unter Rühren auf einer Heizrührplatte langsam auf 60°C abgekühlt. Es wurden 900 µl 37%iges Formaldehyd sowie 1 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) zugesetzt. Anschließend wurde das Gel in den vorgereinigten Gelträger gegossen. Nach Aushärten des Gels wurde es in eine Gelkammer gelegt und mit 1x Formaldehyd-Gel-Laufpuffer überschichtet.

Es wurden sowohl 6-15 µl der isolierten RNA, als auch 5 µl des DIG-markierten RNA-Molekulargewichtsstandard-Markers I (Boehringer Mannheim, 10 ng/µl) mit 4 µl 5x RNA-Probenpuffer gemischt und der Ansatz mit DEPC-Wasser auf 20 µl ergänzt. Diese Proben wurden für 3 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend bis zum Einfüllen in die Geltaschen auf

Eis gekühlt. Nach erfolgter Elektrophorese, die über 2 Stunden bei einer konstanten Spannung von 4 V/cm stattgefunden hat, konnte die relative Menge, die Auftrennung sowie die Erhaltungsqualität der RNA unter UV-Licht anhand der ribosomalen RNA-Banden beurteilt werden.

Anschließend wurde das Gel dreimal für 10 min. in DEPC-Wasser gewaschen, um das Formaldehyd, das den Transfer der RNA vom Gel auf eine Membran behindert, zu entfernen. Um die Effizienz des Transfers längerer RNA zu steigern, wurde das Gel in 0,05N NaOH über 30 min. inkubiert. Hierbei wurde die RNA teilweise hydrolysiert. Anschließend wurde das Gel für 30 min. im 10x SSC-Puffer inkubiert.

4.2.5.2 Vakuum-Transfer der RNA

RNA-Fragmente können mittels Vakuum-Transfer aus dem Gel auf eine Nylon-Membran übertragen werden.

Hierfür wurden eine Nylon-Membran und ein Whatman Papier so zurecht geschnitten, dass sie an allen Seiten das Gel um 0,5 cm überragten. Sowohl die Membran als auch das Whatman Papier wurden mit Wasser angefeuchtet und kurz in 10x SSC-Puffer inkubiert. Auf den Boden der Blotting-Einheit wurden das Whatman Papier, die Membran und eine rahmende Plastikmaske luftblasenfrei geschichtet und das Gel vorsichtig auf die Membran platziert. Anschließend wurde mit einer Pumpe ein Unterdruck von 60 mbar erzeugt. Das Gel wurde mit 1l 10x SSC-Puffer überschichtet und der Vakuum-Blot über 2 bis 4 Stunden durchgeführt.

Nach dem Blotten wurde die Lage der Geltaschen sowie die rechte untere Ecke auf der Membran markiert. Durch kurzfristige UV-Bestrahlung (50 mJ, UV-Crosslinker) wurde die RNA kovalent an die Nylon-Membran gebunden.

4.2.5.3 Hybridisierung des Northern Blots mit einer DNA-Sonde

Die mRNA des Ecdysonrezeptors auf der Membran konnte durch die Hybridisierung mit einer entsprechenden DIG-markierten DNA-Sonde nachgewiesen werden.

Hierfür wurde die Membran in ein Hybridisierungsgefäß (50 ml Röhrchen) gegeben und 5 ml High-SDS-Hybridisierungslösung hinzugegeben. Außerdem wurden 50 µl von der zuvor durch Erhitzen auf 100°C über 5 Minuten denaturierten und anschließend bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagerten Lachssperma-DNA (geschert und denaturiert, 10 mg/ml) hinzu pipettiert. Die Prähybridisierung fand im Hybridisierungsinkubator eine Stunde lang bei 50°C statt. Von der DIG-markierten DNA-Sonde (60 ng/µl) wurden 2 µl mit 50 µl Lachssperma-DNA gemischt, für 5 Minuten bei 100°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Nach erfolgter Prähybridisierung wurde die denaturierte Sonde in den vorbereiteten High-SDS-Hybridisierungspuffer gegeben und die Membran mit diesem Gemisch über 16 Stunden bei 50°C hybridisiert.

Um die von der Membran unspezifisch gebundene Sonde und Hybridisierungslösung zu entfernen, wurde zweimal mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur und anschließend mit Waschlösung 2 über 3x10 Minuten bei 68°C stringent gewaschen.

4.2.5.4 Detektion der hybridisierten Sonde

Bei der Detektion werden jene Fragmente, die mit der DIG-markierten Sonde ein Hybrid gebildet haben, durch eine immuno-chemilumineszente Reaktion nachgewiesen.

Für diesen Versuch wurde die Membran für kurze Zeit in Waschpuffer gewaschen und in 20 ml Blockierungslösung für 40 Minuten abgesättigt. Dadurch sollten unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Membran verhindert werden. Zu der Blockierungslösung wurde nach dieser Zeit 1 μ l des an alkalische Phosphatase gebundenen Anti-Dioxigenin Fab-Fragments gegeben. Die Membran verblieb 40 Minuten in dieser Antikörperkonjugat-Lösung. Durch dreimaliges Waschen über zehn Minuten in Waschpuffer wurden nicht spezifisch gebundene Antikörper entfernt. Daran anschließend wurde zur Herstellung eines alkalischen Milieus, das für die Chemilumineszenz-Reaktion benötigt wurde, die Membran kurz in 15 ml Detektionspuffer inkubiert. Als Substrat für die Chemilumineszenz-Reaktion wurden 2 ml des Detektionspuffers mit 20 μ l CDP-StarTM 25mM [Dinatrium-4-Chloro-3-(4-Methoxyspiro(1,2-Dioxetane-3,2'-(5'-Chloro) Trizyklo(3.3.1.1^{3,7})Decan)4-yl)Phenyl] gemischt. Durch ständiges Pipettieren wurde die Membran mit der Substratlösung benetzt. Nach 5 Minuten konnte die Substratlösung abtropfen und die Membran in eine durchsichtige Folie gelegt werden. Zusammen mit einem Röntgenfilm wurde nun die Membran in eine Filmkassette gelegt. Nach einer einstündigen Expositionsdauer wurde der Film entwickelt. Jene Stellen, an denen die alkalische Phosphatase das Substrat umgesetzt hatte, fand eine Lichtentwicklung statt, die auf dem Röntgenfilm als Schwärzung zu erkennen war. Die Länge der markierten Fragmente konnte anhand des DIG-markierten RNA-Gewichtsstandards bestimmt werden.

4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Tatsache, dass gewisse Moleküle einen Teil des von ihnen absorbierten Lichts in Form einer langwelligeren Strahlung wieder abgeben, ist die Grundlage für die Fluoreszenzmikroskopie (Caly et al., 1978).

Für Fluoreszenzanalysen werden verschiedene Filtersysteme verwendet. Bei der Untersuchung des EGFP wurde das Filtersystem für Blauanregung ($\lambda = 450-490$ nm) und ein Detektionsfiltersystem für grünes Licht ($\lambda = 515-560$ nm) genutzt.

4.4 Immunhistochemie

Immunhistochemie (Syn: Antikörperfärbung; Immunfärbung) bezeichnet in der Medizin und Biologie eine Methode zur Darstellung von Antigenen mit Hilfe von Antikörpern. Hierbei bindet sich ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) an das Antigen. Gegen diesen Primärantikörper gerichtete Antikörper (Sekundärantikörper) binden sich mit angekoppelten Signalmolekülen wiederum an den Primärantikörper. Dadurch wird eine Verstärkung des Signals erreicht (Beesley, 1993, Linke, 1998).

In dieser Versuchsanordnung wurde als primärer Antikörper Anti-GFP der Firma Abcam (ab6658) und als sekundärer Antikörper Cy3TM konjugiertes Kaninchen Antiserum gegen Immunglobulin der Ziege der Firma Dianova (Cat. No. 305-165-006) verwendet.

4.5 Western Blot Analyse

Die Bezeichnung „Western Blot“ geht ebenso wie „Northern Blot“ auf den Namen des Erfinders der Blotting Technik, Edwin Southern, zurück.

Beim Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran aus Nitrocellulose transferiert. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die am Filter immobilisierten Proteine können von Antikörpern erkannt werden. Gebundener primärer Antikörper wurde durch Bindung eines Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpers und Chemoluminescens-Reaktion autoradiographisch dargestellt (Linke, 1998).

4.5.1 Extraktion von Protein aus Zellen

Die in 10 cm Gewebekulturschalen adhärend wachsenden Zellen wurden mit eiskaltem unsterilen PBS zwei Mal gewaschen. Anschließend wurde 10 ml eiskalter RIPA-Puffer mit 1000 µl Proteaseinhibitoren auf die Zellen gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber von der Gewebekulturschale abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Diese Suspension wurde auf Eis gestellt, bevor sie in einem Horizontalschüttler 15 min. bei 4°C bewegt wurde. Nach dieser Zeit wurde 15 min bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand, der dem Zelllysate entspricht, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Zellpellet verworfen. Aus 10µl dieses Zelllysates konnte mit Hilfe eines Kits von Pierce eine Proteinbestimmung durchgeführt werden.

Dem Proteingehalt der Proben entsprechend, konnten Proben, mit Probenpuffer und Mercaptoethanol versetzt, für den Western Blot verwendet werden.

4.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht es, Proteine in einem Acrylamidgel elektrophoretisch nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen. Die hydrophoben Wechselwirkungen werden durch Natrium Dodecyl Sulfat (SDS) aufgehoben wodurch die Tertiär- und Quartärstruktur zerstört wird, so dass sich die Proteine entfalten. Zusätzlich wird durch die Anlagerung der negativ geladenen SDS-Moleküle die

Proteineigenladung maskiert. Dies führt dazu, dass die Laufgeschwindigkeit allein von der Masse der Proteine abhängt und die Eigenladung und Molekülstruktur keinerlei Einfluss darauf haben.

Bei der diskontinuierlichen SDS-Page nach Laemmli (1970) werden zwei unterschiedliche Gele (großporiges Sammelgel und engporiges Trenngel) sowie Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet (Probenpuffer und Sammelgel sind saurer als Trenngel und Reservoirpuffer). Dies führt dazu, dass wesentlich schärfere Banden als bei der normalen SDS-PAGE erzeugt werden.

Für die Gelelektrophorese wurden 12,5% Trenngele verwendet, die nach dem Gießen mit 100% Isopropanol überschichtet und zur Polymerisation eine Stunde bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden. Das 4%-ige Sammelgel wurde anschließend gegossen und die Polymerisation erfolgte bei Raumtemperatur innerhalb einer halben Stunde. Zur Denaturierung der Proteine in den mit 2x Probenpuffer versetzten Proben wurden diese bei 95°C 5 min gekocht. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 60 min bei 200 V und 15 W.

4.5.3 Coomassie-Blue Färbung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Die Coomassie Blue Färbung ermöglicht eine dauerhafte Anfärbung der Proteinbanden in der Gelmatrix.

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele 30 min. in einer Coomassie Blue Lösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung gewaschen bis kein Hintergrund mehr sichtbar war. Da die Gele beim Trocknen leicht zerreißen, wurden sie 10 min. in einer Lösung aus 20% Glycerol und 10% Ethanol inkubiert. Nach Einspannen der Gele zwischen zwei Cellophanpapieren wurden sie 24 Stunden lang bei Raumtemperatur getrocknet.

Diese Färbemethode hat eine Sensitivität im µg-Bereich.

4.5.4 Western Blot der transferierten Proteine

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine werden von der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierzu wird das Wanderungsverhalten von Proteinen im elektrischen Feld genutzt.

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden im Tank-Blot Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das zu blottende Gel, zwei 3MM Whatmanpapiere, zwei Faserpolster sowie eine Poly-Screen-PVDF Transfermembran in der Größe des Gels wurden für

einige Minuten in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurden nach „Sandwich-Methode“ Faserpolster - 3MM Whatmanpapier - Gel - Membran - 3MM Whatmanpapier - Faserpolster aufeinander gelegt, in einer Blotkassette fixiert und zusammen mit einem Kühlelement im Blotmodul platziert. Das Blotmodul wurde mit Transferpuffer ausgefüllt. Die Transferdauer betrug zwei Stunden bei 100 V und 350 mA.

4.5.5 Ponceau-Färbung der transferierten Proteine

Die reversible Ponceau-Färbung dient dazu, die Effizienz des Transfers der Proteine zu ermitteln. Die Nitrocellulosemembran wurde 5 min. in der Ponceau-Färbung inkubiert und durch mehrmaliges Spülen mit A. dest differenziert. Durch den anschließenden Waschschrift mit TTBS wurde eine vollständige Entfärbung der Membran erreicht. Diese Membran wurde dann zur Immunmarkierung eingesetzt.

4.5.6 Immunmarkierung von Western Blots

Die Immunmarkierung des Western Blots wird durch die Fähigkeit von primären Antikörpern, sich an ein spezifisches Antigen zu binden, ermöglicht. Ein sekundärer, an Peroxidase gekoppelter Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper. Durch Zugabe eines chemilumineszenz-Substrates der Peroxidase kann die Emission des Lichtes als Reaktionsprodukt auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

Folgende Versuchsschritte wurden durchgeführt:

10 min waschen mit TTBS, 60 min blockieren mit Blockierungslösung, primärer Antikörper in die Blockierungslösung pipettieren und über Nacht bei 4°C inkubieren, 5 x 10 min. waschen mit TTBS, 60 min. Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper in 1% Milch / TTBS verdünnt bei Raumtemperatur, 5 x 10 min. waschen mit TTBS, 5 min. Inkubation des ECL-Reagenz.

5 Ergebnisse

Da es nicht vorhersagbar war, ob das Ecdyson-induzierbare Promotorsystem in anderen Zelllinien ebenso gut wie bei den CHO Zellen (Chinese hamster ovary) (Lüers et al., 2000) funktionierte und unser Interesse den humanen Zelllinien galt, wurden zu Anfang drei häufig verwendete Zelllinien parallel getestet. Wie Tabelle 3 auf Seite 51 zeigt, sind die Experimente bei den drei Zelllinien unterschiedlich weit geführt worden. Nur bei der Zelllinie HCT116 ist das Untersuchungsziel erreicht worden.

5.1 Bestimmung der Resistenz von HaCat, Hela und HCT116 Zellen gegen Selektionsagenzien, Neomycin(G418), Zeocin, Hygromycin, Puromycin

Um im Verlauf dieser Arbeit jene mit verschiedenen Vektoren transfizierte Zellen selektionieren zu können, wurden ohne vorherige Transfektion jeweils 10^3 Zellen der Linien Hct116, HaCat und Hela in 24 Lochplatten in ihrem entsprechenden Nährmedium ausgesät. Diese Nährmedien waren zuvor mit den Selektionsagenzien G418, ZeocinTM, Puromycin bzw. Hygromycin B - in jeweils sechs verschiedene Konzentrationen (von 0,001 mg/ml bis 1,0 mg/ml) - versetzt worden.

Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurden die Zellen regelmäßig mit neuem agenzienhaltigen Nährmedium versorgt.

Bei dieser Testreihe konnte ermittelt werden, dass folgende minimale Konzentrationen überschritten werden müssen, um die Zellen, die das Resistenzgen exprimieren, selektionieren zu können (Tabelle 2.).

	HCT 116	HaCat	Hela
Zeocin TM	0,001 mg/ml	0,2 mg/ml	0,008 mg/ml
G 418	0,04 mg/ml	0,04 mg/ml	0,04 mg/ml
Puromycin	<0,001 mg/ml	<0,001 mg/ml	<0,001 mg/ml
Hygromycin B	0,2 mg/ml	0,008 mg/ml	0,04 mg/ml

Tab. 2 Selektionsagenzienkonzentrationen

HCT 116		HaCat		Hela	
Resistenzbestimmung		Resistenzbestimmung		Resistenzbestimmung	
pVgRxR	pEF-EIR	pVgRxR	pEF-EIR	pVgRxR	- Isolation von Klonen, die die
					Rezeptoren EcR und RxR exprimieren
GRE-hygro	GRE-hygro	GRE-hygro	GRE-hygro	GRE-puro	- funktionelle Testung der Klone durch
					induzierte Expression eines Resistenzgens
GRE-GFP	GRE-GFP	GRE-GFP	GRE-GFP		- Anwendung induzierbarer Klone mit
					Vektoren die GFP induzierbar exprimieren
Northern Blot					- Nachweis der Induzierbarkeit des
					Transkripts
Western Blot					- Nachweis der Induzierbarkeit des Proteins
Immunhistochemie					- Nachweis der Lokalisation des Proteins in
					den Zellen und der Verteilung der
					Expression in der Zellpopulation

Tab. 3 Übersicht / Versuchsablauf

5.2 Transfektion der Zellen mit dem Rezeptorplasmid pVgRxR, Isolation von Klonen

Die humanen Colon Carzinom Zellen HCT 116, die humanen Cervix Carzinom Zellen Hela sowie die humane Keratinozytenzelllinie HaCat wurden mit dem Rezeptorplasmid pVgRxR, das zuvor mit der Restriktionsendonuklease BstEII linearisiert worden war, transfiziert.

Die Transfection der HCT 116 und HaCat Zellen geschah durch Lipofektion (mit Gene Jammer® der Firma Stratagene). Bei Hela hingegen wurde die Elektroporation eingesetzt.

Anschließend wurden alle drei Zelllinien mit dem Antibiotikum ZeocinTM (0,2 mg/ml) über zwei Wochen selektioniert. Die Selektion wurde als beendet angesehen, wenn in parallelen Kulturen, die nicht transfiziert worden waren, keine lebenden Zellen mehr zu finden waren. Dieses Antibiotikum aus der Bleomycin Familie kam zur Anwendung, weil auf dem Rezeptorplasmid die Selektionskassette für ZeocinTM liegt.

Nach abgeschlossener Selektion wurden 35 Klone von HCT 116 mit Hilfe von Klonierungszyklindern isoliert. Bei Hela- und HaCat-Zellen waren es jeweils 10 Klone, die auf diese Weise gewonnen wurden. Die Klone wurden mit dem Namen der Zelllinien und dem Zusatz „-pVgRxR“ bezeichnet.

5.3 Transfektion der Zellen mit dem Rezeptorplasmid pEF-EIR, Isolation von Klonen

Bei diesem Versuch wurden mittels Lipofektion Zellen der Zelllinien HCT 116 und HaCat mit dem linearisierten Rezeptorplasmid pEF-EIR transfiziert.

Anschließend wurde mit dem Aminoglykosid G418 zwei Wochen lang selektioniert, da das Plasmid das Resistenzgen für Neomycin/G418 exprimiert. Die Selektion wurde als beendet angesehen, wenn in parallelen Kulturen, die nicht transfiziert worden waren, keine lebenden Zellen mehr zu finden waren.

Von den so entstandenen Klonen wurden von beiden Zelllinien jeweils 10 durch Klonierungszyklindern isoliert. Diese Klone wurden mit dem Namen der Zelllinie und dem Zusatz „-pEF-EIR“ bezeichnet.

5.4 Selektion induzierbarer Klone durch Transfektion mit induzierbaren Resistenzgenen, Puromycin und Hygromycin B

Die zuvor isolierten 35 Klone von HCT 116-pVgRxR wurden mit dem Plasmid pDN-E/G₅SH-hygro transfiziert. Das auf diesem Plasmid befindliche Resistenzgen für das Aminoglykosid Hygromycin B ist einem Glucocorticoid Response Element (GRE) nachgeschaltet. Dieses sorgt dafür, dass das Resistenzgen lediglich dann „angeschaltet“ wird, wenn beide Rezeptoren des Rezeptorplasmids pVgRxR als Heterodimere in Anwesenheit von Ponasteron A an den Promotorbereich binden. Somit bildet das pDN-E/G₅SH-hygro Plasmid eine Art Kontrollinstanz hinsichtlich der Funktionstüchtigkeit des zuvor in HCT 116 Zellen transfizierten und selektierten Rezeptorplasmids pVgRxR. Durch die Selektionskassette für Hygromycin B kommt es, in Abhängigkeit von Ponasteron A, zu einer Doppelresistenz der Zellen.

Dadurch konnten bei dem Experiment jene induzierbaren Zellen mit Hygromycin B innerhalb von 14 Tagen selektiert und anschließend isoliert werden, die sowohl das Rezeptorplasmid pVgRxR, als auch das Plasmid pDN-E/G₅SH-hygro in Anwesenheit von Ponasteron A exprimieren. Diese Klone wurden mit dem Zusatz „-pGRE-hygro“ bezeichnet.

Bei den HeLa-pVgRxR Klonen Nummer 1, 2 und 5 kam statt des pDN-E/G₅SH-hygro Plasmids jenes mit der Selektionskassette Puromycin zum Einsatz. Der zugrunde liegende Mechanismus war derselbe. Nach Transfektion mit pDN-E/G₅SH-puro wurde über zwei Wochen mit Puromycin selektiert. Nach abgeschlossener Selektion wurden auch hier Klone isoliert. Diese wurden mit dem Zusatz „-pGRE-puro“ versehen.

5.5 Selektion induzierbarer pVgRxR Klone durch transiente Transfektion mit dem zuvor linearisierten induzierbaren Reporter gen EGFP

Das Rezeptorplasmid pDN-EG5H-GFP mit dem induzierbaren Reporter gen EGFP wurde durch einen Restriktionsverdau mit Spe I linearisiert. Nach der Linearisierung sollte das Plasmid eine Länge von 6,7 kb haben. Die Elektrophorese belegte die erfolgreiche Linearisierung (Abb. Nr. 8).

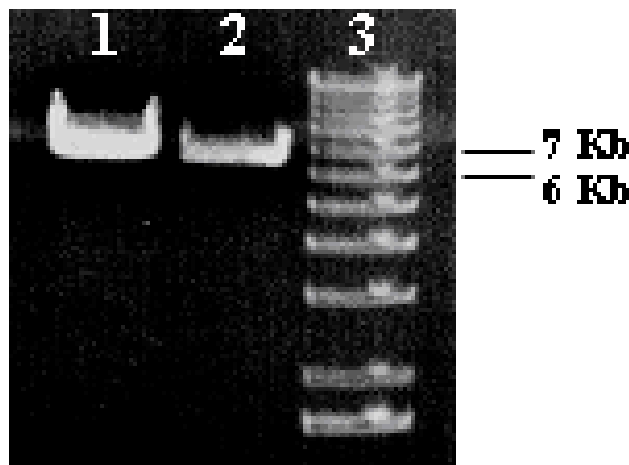


Abb.8 Elektrophorese des linearisierten Rezeptorplasmids pDN-EG5H-GFP. Bahn 1: Rezeptorplasmid, Bahn 2: Rezeptorplasmid, Bahn 3: Molekulargewichtsstandard (Vielfache von 1 Kb)

Auf dem Gel ist eine Leiter zu erkennen, mit der zwei Präparationen des linearisierten Rezeptorplasmide pDN-EG5H-GFP verglichen werden können. Hierbei kann man sehen, dass die Bande bei beiden Plasmiden zwischen den Banden 6 kb und 7 kb liegt.

Der zuvor linearisierte induzierbare Reportervektor pDN-EG5H-GFP wurde durch Lipofektion in die Klone von HCT 116-pVgRxR-pGRE-hygro, sowie in Hela-pVgRxR-pGRE-puro transfiziert. Anschließend wurde über 14 Tage mit dem Aminoglykosid G 418 selektioniert, da das Neomycin-Resistenzgen auf dem Reportervektor liegt. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist in diesem Reportervektor genau wie das in V.5 beschriebene pGRE-hygro bzw. pGRE-puro an ein Glucocorticoid Response Element gekoppelt. Nach Abschluss der Selektion wurden Subpopulationen mit dem synthetischen Ecdyson Analogon Ponasteron A bei einer Konzentration von 5µM induziert. Innerhalb von drei Tagen war eine grüne Fluoreszenz in einigen Zellklonen zu erkennen, welche sich im weiteren Verlauf steigern ließ. Das

Steroidhormon Ponasteron A wurde während der ganzen Zeit hinzugegeben. Sobald den Zellen das Ponasteron A entzogen wurde, ließ die Intensität der Fluoreszenz deutlich nach. Es wurden allerdings nur Klone beobachtet, die lediglich bis zu 10-60% grün fluoreszierende Zellen enthielten. Im Gegensatz dazu war bei den Kontrollpopulationen, denen kein Ponasteron A zugegeben worden war, keinerlei Fluoreszenz zu erkennen. Die Heterogenität der induzierten GFP-Expression könnte auf einer instabilen Funktion des Promotorsystems oder darauf beruhen, dass die Zellpopulationen nicht klonal waren.

Um die heterogenen, fluoreszierenden Zellpopulationen reklonieren zu können, wurden die induzierbaren Zellklone auf den Zellkulturschalen unter dem Fluoreszenzmikroskop markiert und anschließend mit Hilfe von Klonierungszyklindern isoliert.

Die isolierten Zellklone wurden in neue Kulturschalen ausgesät und unter weiterer Ponasteron A-Gabe rekloniert, mit dem Ziel, Zellklone zu isolieren, in denen alle Zellen GFP induziert exprimieren. Diese Klone wurden mit dem Zusatz „-GRE-GFP“ bezeichnet.

5.6 Selektion induzierbarer pEF-EIR Klone durch transiente Transfektion mit dem induzierbaren Reporter gen EGFP

In den bisherigen Versuchen mit dem induzierbaren GFP als Reporter gen konnte keine homogene induzierte Expression in den Zellpopulationen erreicht werden. Daher wurde ein Rezeptorplasmid getestet, das beide Rezeptorgene unter der Kontrolle eines einzigen, zudem endogenen Promotors (Elongations Faktor Promotor) exprimiert. Beide Rezeptorgene waren über ein IRES auf der mRNA verbunden.

Bei diesem Versuch wurde das zuvor durch SpeI linearisierte Rezeptorplasmid pDN-EG5H-GFP durch Lipofektion in HCT 116 pEF-EIR und HaCat pEF-EIR Zellen transfiziert.

Eine Selektion für diese Transfektanten mit dem Aminoglykosid G 418 war nicht möglich, da die Zellen schon aufgrund des pEF-EIR Rezeptorplasmids gegen G 418 resistent waren. Somit war eine Selektion nur mittels der induzierbaren Expression des grün fluoreszierenden Proteins GFP möglich. Hierfür wurden Ponasteron A in einer 5 μ M Konzentration dem Nährmedium zugesetzt. Durch die Induktion über mehrere Tage konnten mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Analysen GFP-positive Klone erkannt und isoliert werden. Auch in diesem Versuch waren die Zellklone heterogen in Bezug auf GFP Fluoreszenz (Abb. 9). Da der pEF-EIR Vektor nach diesen Experimenten dem pVgRxR Vektor nicht überlegen schien und zudem weitere Transfektionen mit neoR tragenden Vektoren nicht zuließ, wurde der Vektor in der Folge nicht mehr verwendet.

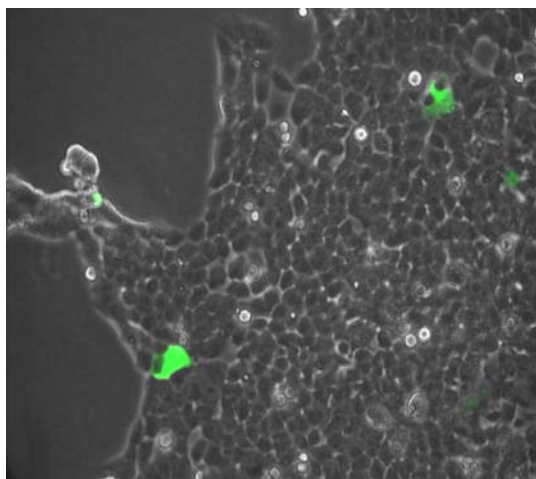


Abb.9 HCT116 Zellen unter Ponasteron A-Gabe, vereinzelte fluoreszierende Zellen in einer Zellpopulation

5.7 Untersuchung der Expression der Rezeptorgene im Northern Blot

Mittels der Fluoreszenzmikroskopie wurden jene Klone von den Zelllinien HCT 116 und HaCat gewählt, die nach Transfektion mit den Plasmiden pVgRxR, GRE-hygro und pDN-E/G₅H-GFP die deutlichste Fluoreszenz zeigten. Von den HCT116-pVgRxR-pGRE-hygro-pGRE-GFP Zellen wurden fünf Klone ausgewählt (Klon 12, 21, 26, 27, 31). Bei den HaCat Zellen war nur bei einem Klon (Nr.4) eine grüne Fluoreszenz detektierbar. Von diesen sechs Klonen wurde Gesamt-RNA hergestellt. Die RNA wurde durch Elektrophorese aufgetrennt und anschließend in einem Northern Blot mit genspezifischer Sonde für EcR und RxR untersucht.

Aufgrund eines Molekulargewichtsmarkers konnte festgestellt werden, dass sowohl die Rezeptoren EcR, als auch RxR in den Klone 31 und 26 exprimiert wurden. Bei den Zellklonen 4 und 21 wurde nur der Rezeptor EcR vollständig exprimiert, der Rezeptor RxR hingegen gar nicht. Bei den Klonen 13 und 27 waren beide Rezeptoren nicht nachweisbar.

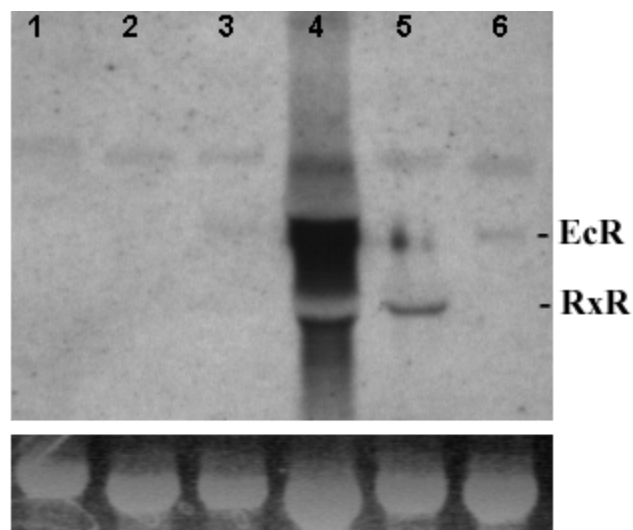


Abb. 10 Northern Blot Analyse der Expression des Ecdyson und Retinoid-X-Rezeptors

Nur in Bahn 4 sind beide Rezeptoren des Rezeptorplasmids pVgRxR nachweisbar.

Bahn 1: HCT116-pVgRxR Klon 27; Bahn 2: HCT116-pVgRxR Klon 13,

Bahn 3: HCT116-pVgRxR Klon 21, Bahn 4: HCT116-pVgRxR Klon 31,

Bahn 5: HCT116-pVgRxR Klon 26, Bahn 6: HaCat-pVgRxR Klon 4,

Diese Untersuchung zeigte, dass die Induzierbarkeit von HCT 116 Zellklonen nicht mit der quantitativen Expression der Rezeptorgene EcR und RXR korreliert.

5.8 Immunhistochemie von HCT116 Klonen

Die mit den Vektoren pVgRxR, pDN-E/G₅SH-hygro und pDN-E/G₅H-GFP transfizierten und ausselektionierten HCT116 Klone wurden im Hinblick auf das grüne Fluoreszenz Protein (GFP) unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dabei war der Klon 31 bzgl. der grünen Fluoreszenz des GFP sowie der Expression der Rezeptorgene im Northern Blot am vielversprechendsten. Dieser Klon 31 wurde im Folgenden unter kontinuierlicher Behandlung mit Ponasteron A subkloniert. Die so entstandenen Subklone 10.4 und 12.1 wurden für weitere Versuche wegen ihrer starken, wenn auch heterogenen Fluoreszenz ausgewählt.

Von diesen beiden Klonen wurde eine immunhistologische Untersuchung durchgeführt, wobei jeweils Zellen mit und ohne Ponasteron A - Zusatz in der Nährlösung verglichen wurden. Hierbei ergab sich, dass sich das Protein GFP immunhistochemisch in sehr viel mehr Zellen nachweisen ließ, als dies allein aufgrund ihrer eigenen Emission der Fall war. In den Zellen, denen das Ponasteron A entzogen worden war, nahm die Fluoreszenz erst nach 14 Tagen deutlich ab.

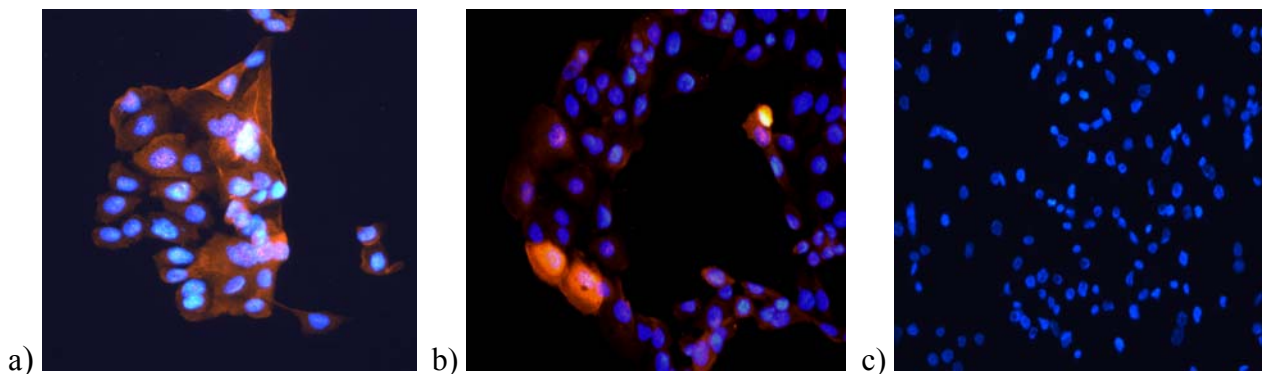


Abb.11 Immunhistochemischer Nachweis des GFP Proteins mit Cy3-gekoppeltem Antiserum. Positive Immunmarlierung wird durch die orangegelbe Farbe angezeigt.

- a), b) Zellkolonien von HCT 116-pVgRXR-pGRE-hygro-pGRE-GFP Klonen unter Ponasteron A-Gabe
 c) Kolonien derselben Zellklone wie in a und b nach Ponasterone A Entzug.

5.9 Charakterisierung stabiler induzierbarer Klone von HCT116 auf Induktion von EGFP im Western Blot

Von den zuvor mit den Plasmiden pVgRxR, GRE hygro und GRE EGFP transfizierten und selektionierten HCT116 Zellen wurde das grün fluoreszierende Protein im Western Blot analysiert. Hierbei erfolgte ein Vergleich zwischen jenen Zellen von Klonen, die mit Ponasteron A behandelt wurden und jenen der gleichen Klone, denen Ponasteron A nach Induktion entzogen worden war. Diese letztgenannten Zellen wurden nach Induktion ca. 6 Wochen ohne Ponasteron A gefüttert, da die Fluoreszenz von EGFP zunächst weiterhin in geringerem Maße vorhanden war. Zusätzlich zum EGFP wurde im gleichen Blot Aktin untersucht, um zu zeigen, dass eine gleichmäßige Beladung der Taschen erfolgt war.

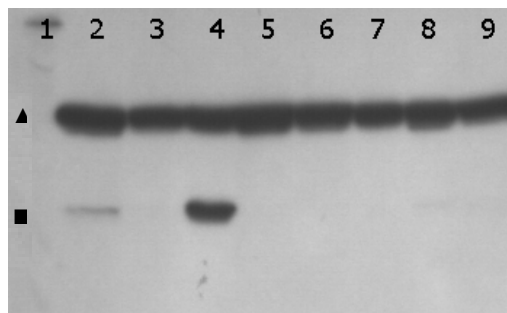


Abb.12 Western Blot Analyse von HCT116-pVgRxR-pGRE-hygro-pGRE-GFP Klonen mit Antikörpern gegen GFP und Aktin mit und ohne Induktion durch Ponasteron A-Gabe.

Die Aktinbande (▲) zeigt eine gleichmäßige Beladung der Taschen. Bahnen 2 und 4 zeigen eine weitere Bande (■) für das grün fluoreszierende Protein.

Bahn 1: Molekulargewichtsstandard, Bahn 2: Klon 31/10/4 +Pon; Bahn 3: Klon 31/10/4 – Pon;

Bahn 4: Klon 31/12/1 +Pon; Bahn 5: Klon 31/12/1 –Pon; Bahn 6: Klon 31/10/2 +Pon;

Bahn 7: Klon 31/10/2 –Pon, Bahn 8: Klon 31/10/3 +Pon; Bahn 9: Klon 31/10/3 –Pon

Der Western Blot zeigte für die Klone 10.4 und 12.1, dass die Induktion von EGFP mit Ponasteron A erfolgreich war.

Bei den Klonen 10.2 und 10.3 war keine Bande für EGFP auf dem Western Blot zu sehen, obwohl diese Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ebenfalls eine grüne Fluoreszenz erkennen ließen. Vermutlich lag die Proteinkonzentration des EGFP hier unter der Nachweisgrenze der Methodik.

Neben dem Protein der induzierten Zellen wurde auch jenes auf dem Western Blot abgebildet, bei dem das Ponasteron A den Zellen für längere Zeit entzogen worden war. Hierbei war keine Bande in dem Bereich für EGFP zu erkennen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass der Klon HCT 116-pVgRxR-pGRE-hygro-pGRE-GFP Nummer 13/12/1 zumindest für das GFP Gen eine Ecdyson-induzierbare Expression zeigte.

6 Diskussion

Diese Untersuchung wurde durchgeführt, nachdem zuvor in Chinese hamster ovary (CHO) Zellen die grundsätzliche Nutzbarkeit des Ecdyson-induzierbaren Promotorsystems gezeigt worden war (Lüers et al., 2000). Das Ziel der Arbeit war, dieses System auf humane Tumorzelllinien anzuwenden, um nachfolgend Untersuchungen u.a. mit induzierbaren antisense, oder siRNA Vektoren zum Studium der Genfunktion durchführen zu können, wie es zwischenzeitlich von anderen berichtet worden ist (Coumoul et al., 2004; Hoffmann et al., 2005).

Allerdings macht diese Untersuchungsreihe deutlich, wie schwierig es ist, eine stabile Ecdyson-induzierbare Zelllinie herzustellen, deren Expression anschließend detektiert werden kann.

Aufgrund mehrerer Parallelversuche ist es gelungen, einen Klon der humanen Kolonkarzinomzelllinie HCT116 herzustellen, in dem das Reporter Protein GFP (grün fluoreszierendes Protein) nach Induktion mit dem Steroidanalogon Ponasteron A sowohl in der Fluoreszenzmikroskopie als auch im Western Blot induzierbar reguliert werden konnte.

Die Schwierigkeit des Ecdyson-induzierbaren Promotorsystems liegt u.a. darin, dass für die Induktion zwei Proteine als Rezeptorheterodimer exprimiert werden müssen (Wakita et al., 2001), wobei zumindest RxR auch als endogenes Protein in humanen Zellen vorkommt und damit unerwünschte Effekte hervorrufen kann. Die Northern Blot Analyse verschiedener Klone, die funktionell als induzierbar charakterisiert worden waren, ergab, dass teilweise eines der beiden Rezeptorgene gar nicht oder nur schwach exprimiert wurde. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass in dem Plasmid pVgRxR in nächster Nähe gleich drei Promotoren liegen, die sich möglicherweise gegenseitig behindern.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde der Vektor pEF-EIR eingesetzt, der beide Rezeptorgene unter der Kontrolle eines einzigen und endogenen Promotors (elongation factor) exprimiert. Beide Rezeptorgene sind über eine IRES verbunden und werden von einer mRNA translatiert. In diesem Konstrukt ist der spezifische Rezeptor für Ponasteron A (EcR) am 5' Ende der IRES und ist somit möglicherweise sogar in der Translation bevorzugt. Allerdings hat dieses Plasmid nach den Erfahrungen dieser Untersuchung zu keiner höheren oder innerhalb der Zellpopulation homogenen Expression geführt.

Die auf dem Rezeptorplasmid pVgRxR liegenden Rezeptorgene für den Retinoid-X-Rezeptor und den Ecdysonrezeptor können bei der Integration in das Wirtsgenom Veränderungen erfahren

haben, die durch die Selektion mit Zeocin nicht ausgeschlossen werden können. Dazu beschreibt Trastoy im Jahre 2005, dass durch Zeocin ausgelöste DNA-Strangbrüche durch das Reparatursystem der Zelle nicht ausgeglichen werden können. Er zieht daraus den Schluß, dass Zeocin nicht komplett entgiftet ist und daher bei der Interpretation von Daten mit dem Selektionsagenz Zeocin sehr zurückhaltend vorgegangen werden sollte (Trastoy et al., 2005).

Das Ecdyson-induzierbare Genexpressionssystem ist bereits mehrfach erfolgreich angewendet worden, u.a. von Lüers 2000 in Chinese hamster ovary (CHO) Zellen (Lüers et al, 2000). Aber Van Craenenbroeck beschreibt im Jahre 2001, dass sie selbst und andere mehrfach beobachten konnten, dass nur in bestimmten Zelllinien eine induzierbare Genexpression mit dem pVgRxR Rezeptorplasmid erfolgreich ist. Daher ist es durchaus denkbar, dass die Schwierigkeit mit dem pVgRxR Rezeptorsystem in den ausgewählten Zelllinien begründet ist.

Die vorliegende Arbeit hat aufgezeigt, wie wichtig eine Ko-induktion mit einem Reporteragen bei der induzierten Expression eines Fremdgens ist. Während die Western Blot Analyse der Expression in dem Klon HCT 116-pVgRxR-pGRE-hygro-pGRE-GFP Nummer 31/12/1 eine starke Zunahme des GFP Proteins in Abhängigkeit von Ponasteron A zeigte, veranschaulichte die Fluoreszenzmikroskopie und der immunhistochemische Nachweis des GFP Proteins eine starke Heterogenität in der Zellpopulation. Die Induktion eines zellletalen Proteins hätte in diesem Versuchsaufbau möglicherweise nur zu einer geringen Reduktion der Zellzahl, aber nicht zur Elimination der gesamten Zellpopulation und somit zu falschen Folgerungen geführt.

In dieser Versuchsreihe konnte anhand der humanen Kolonkarzinomzelllinie HCT116 bewiesen werden, dass es möglich ist, das Ecdyson-induzierbare Genexpressionssystem in humanen Tumorzelllinien zu nutzen. Allerdings kann der Anspruch an das System, durch ein Reporterprotein, hier das GFP, schnell und sicher induzierbare Zellklone zu isolieren, nicht aufrechterhalten werden. Das Ecdyson-induzierbare Promotorsystem hat daher nach der vorliegenden Untersuchung keine Vorzüge gegenüber z.B. dem Tet-induzierbaren Promotorsystem, das in zahlreichen Publikationen der letzten Jahren erfolgreich verwendet wurde (Lee et al., 2005; Weiler et al., 2005). Weitere Vorteile des Tet-induzierbaren Promotorsystems bestehen in der Wasserlöslichkeit des Induktors, der bereits erfolgreich in vivo angewendet worden ist (Yang et al., 2005; Mikhailik et al., 2006). Nicht zu vernachlässigen ist der Preisvorteil von Doxixyclin gegenüber Ponasteron A. Vermutlich sind dies einige der Gründe dafür, dass das Ecdyson-induzierbare Promotorsystem kaum noch Verwendung findet und vom Markt genommen wird.

7 Zusammenfassung

Induzierbare Genexpressionssysteme ermöglichen die Untersuchung von Genfunktionen in Zellen, besonders der dortigen Wirkung toxischer und teratogener Proteine, sowie der regulierten Expression von antisense Sequenzen oder siRNA Sequenzen zur Regulation endogener Genexpression. Durch die präzise Kontrolle der Genexpression können biochemische und physiologische Prozesse reversibel analysiert werden.

Das von *Drosophila melanogaster* stammende endogene Ecdyson-induzierbare Genexpressionssystem, dessen Effizienz bereits in CHO-Zellen (Chinese hamster ovary) gezeigt worden war, sollte auf humane Tumorzelllinien [HCT116 (humanen Colon Carzinom Zellen), Hela (humane Cervix Carzinom Zellen) und HaCat (humanen Keratinozyten Zellen)] Anwendung finden, um nachfolgend Untersuchungen mit antisense oder siRNA Vektoren zum Studium der Genfunktion zu ermöglichen.

Mittels Lipofektion bzw. Elektroporation wurde das Ecdyson-induzierbare Rezeptorsystem (pVgRxR) in die Zellen integriert und mit Hilfe der Northern Blot Analyse seine Expression nachgewiesen. Ebenso wurde ein alternativer Reportervektor (pEF-EIR) lipofiziert, bei dem beide Reportergene von einer bizistronischen mRNA exprimiert werden. Zur Identifizierung induzierbarer Zelllinien sollte das Reporterprotein GFP (grün fluoreszierendes Protein) dienen, das mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie, der Western Blot Analyse wie auch der Immunhistochemie nachgewiesen wurde.

Von den drei verwendeten Zelllinien war lediglich bei der HCT116 Zelllinie ein funktionierendes Rezeptorsystem nachweisbar. Allerdings funktionierte das induzierbare Promotorsystem nur in einem Teil der Zellen eines Klons. Als Ergebnis der Arbeit wurde ein Klon von HCT 116 Zellen isoliert, bei dem das Ecdyson-induzierbare Genexpressionssystem mit den genannten Einschränkungen angewendet werden kann.

8 Literaturverzeichnis

Aigner A, Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol.* 2006 doi:10.1016 / j.jbiotec.2005.12.003

Baehrecke E.H., Ecdysone signaling cascade and regulation of *Drosophila* metamorphosis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1996; 33: 231-244

Beesley J.E., Immunocytochemical avenues. In: Beesley J.E., Hrsg. *Immunohistochemistry.* Oxford, Oxford University Press, 1993: 7,8

Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreuz D., Hornung J., Markham A. und Fusenig N.E., Normal keratinization in a spontaneously aneuploid human keratinocyte cell line. *J.Cell Biol.*, 1988; 106: 761-771

Brattain M.G., Fine W., Khaled F., Thompson J., Brattain D.E., Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.*, 1981; 41: 1751-1756

Caly R., Das Mikroskop und seine Anwendung: Fluoreszenzmikroskopie. In: Soost H.J., Hrsg. *Lehrbuch der klinischen Zytodiagnostik.* Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1978: 10-11

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., and Prasher D.C., Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994; 263: 802-805

Christopherson K. S., Mark M. R., Bajaj V., and Godowski P. J., Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; 89: 6314-6318

Coumoul X., Li W., Wang R.-H., and Deng C., Inducible suppression of *Fgfr2* and *Survivin* in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32 (10): E85, doi: 10.1093 / nar / gnh083

Van Craenenbroeck K., Vanhoenacker P., Leysen J.E., and Haegeman G., Evaluation of the tetracycline- and ecdysone-inducible systems for expression of neurotransmitter receptors in mammalian cells. *Eur. J. Neuroscience*, 2001; 14: 968-976

Gossen M., Bonin A.L. and Bujard H., Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokariotic regulatory elements. *TIBS*, 1993; 18: 471-475

Gubin A.N., Reddy B., Njoroge J.M., and Miller J.L., Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 236: 347-350

Haas J., Park E.-C. and Seed B., Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.*, 1996; 6: 315-324

Harvey D.M., Caskey C.T., Inducible control of gene expression: prospects for gene therapy. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998; 2: 512-518

Hoffmann S., Sommer A., Steroidhormone receptors as targets of the therapy of breast and prostate cancer – recent advances, mechanisms of resistance, and new approaches. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2005; 93: 191-200

Hu M.C. and Davidson N., The inducible lac operator-repressor system is functional in mammalian cells. *Cell*, 1987; 48: 555-566

Jaenisch R., Transgenic Animals. *Science*, 1988; 240: 1468-1473

Jurk M., Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren. In: Lottspeich F. und Zorbas H., Hrsg. *Bioanalytik*, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1998: 574, 575

Kerr I.M. and Stark G.R., The control of interferon-inducible gene expression, *FEBS Lett.*, 1991; 285: 194-198

Knippers R. , Genomik: Forschungen über die Struktur und Expression komplexer Genome. In Knippers R., Hrsg. Molekulare Genetik, 8. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1971, 2001: 504

Lee F., Hall C.V., Ringold G.M., Dobson D.E., Luh J., and Jacob P.E., Functional analysis of the steroid hormone control region of mouse mammary tumor virus, *Nucleic Acids Res.*, 1984; 12: 4191-4206

Lee Y.J., Mazzatti D.J., Yun Z., Keng P.C., Inhibition of invasiveness of human lung cancer cell line H1299 by over-expression of cofilin, *Cell Biol. Int.*, 2005; 29 (11): 877-883

Li C., Schwabe J.W.R., Banayo E., and Evans R.M., Coexpression of nuclear receptor partners invreases their solubility and biological activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 2278-2283

Linke R., Immunologische Techniken. In: Lottspeich F. / Zorbas H., Hrsg. Bioanalytik, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 1998; 94-97

Lu P.Y., Xie F., Woodle M.C., In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics, *Adv. Genet.*, 2005; 54: 117-142

Lüers G. H., Jess N. und Franz T., Reporter-linked monitoring of transgene expression in living cells using the ecdysone-inducible promotor system, *Eur. J. Cell Biol.*, 2000; 79: 1-5

Masuoka M., Orita S., Shino A., Matsuzawa T., Nakayama R., Pharmacological studies of insect metamorphosing hormone: ponasterone A, ecdysterone, and inokosterone, in the rat. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1970; 20: 142-156

McNeall J., Sanchez A., Gray P.P., Chesterman C.N., and Sleigh M.J., Hyperinducible gene expression from a metallothionein promoter containing additional metal-responsive elements. *Gene*, 1989; 76: 81-88

Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Kaiser H., Brack A.r., Kondolf R., Küpper J.-H., Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies. *Anal. Biochem.*, 2004; 334: 9-19

Mikhailik A., Tang M., Hearing P., Ravishankar V., Tabibzadeh S., *Front Biosci.*, 2006; 11: 883-888

Nakanishi K., Past and present studies with ponasterone, the first insect molting hormones from plants. *Steroids*, 1992; 57: 649-656

No D., Yao T.-P., and Evans R.M., Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 3346-3351

Pastorino J.G., Chen S.T., Tafani M., Snyder J.W., and Farber J.L., The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 7770-7775

Perera S.C., Ladd T.R., Dhadialla T.S., Krell P.J., Sohi S.S., Retnakaran A., Palli S.R., Studies on two ecdysone receptor isoforms of the spruce budworm *Choristoneura fumiferana*. *Mol. and Cell. Endocrinol.*, 1999; 152: 73-84

Perlmann T., Rangarajan P.N., Umesono K., and Evans R.M., Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes and Development*, 1993; 7: 1411-1422

Porter A., Controlling your losses: Conditional gene silencing in mammals. *Trends Genet.*, 1998; 14: 73-79

Rosok O., Sioud M., Systemic search for natural antisense transcripts in eukaryotes, *Int. J. Mol. Med.*, 2005; 15 (2): 197-203

Shockett P.E., Difilippantonio M., Hellman N., Schatz D.G., A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 6522-6526

Shockett P.E. and Schatz D.G., Diverse strategies for tetracycline-regulated inducible gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 5173-5176

Spector D.L., Goldman R.D. and Leinwand L.A., Growth and Manipulation of Cells in culture. In: *CELLS a Laboratory Manual, Volume 1*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998: 2.5-2.7

Spindler K.D., Ausgewählte Beispiele von Hormonsystemen bei wirbellosen Tieren. In: Spindler K.D., Hrsg. *Vergleichende Endokrinologie, Volume 1*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1997: 97-107

Spindler K.D., Phylogenetische Betrachtungen. In: Spindler K.D., Hrsg. *Vergleichende Endokrinologie, Volume 1*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1997: 203

Talbot W.S., Swyryd E.A., and Hogness D.S., *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*, 1993; 73: 1323-1337

Thormeyer, D., Tenbaum, S. P., Renkawitz, R., Baniahmad, A., EcR interacts with corepressors and harbours an autonomous silencing domain functional in both *Drosophila* and vertebrate cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1999; 68: 163-169

Trastoy M.O., Defais M., Larminat F., Resistance to the antibiotic Zeocin by stable expression of the *Sh ble* gene does not fully suppress Zeocin-induced DNA cleavage in human cells. *Mutagenesis*, 2005; 20:111-114

Umesono K., and Evans R.M., Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, 1989; 57: 1139-1146

Wakita K., McCormick F. and Tetsu O., Method for Screening Ecdysone-Inducible Stable Cell Lines. *BioTechniques*, 2001; 31:414-418

Watson J.D., Gilman M., Witkowski J, und Zoller M., Übertragung von Genen in Säugerzellen. „Hrgs.“ *Rekombinierte DNA*, 2. Auflage., Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1991: 202-205

Weiler M., Bahr O., Hohlweg U., Naumann U., Rieger J., Huang H., Tabatabai G., Krell H.W., Ohgaki H., Weller M., Wick W., BCL-x(L): time-dependent dissociation between modulation of apoptosis and invasiveness in human malignant glioma cells, *Cell Death Differ.*, 2005, doi:10.1038 / sj.cdd.4401786

Wyborski D.L., Bauer J.C. und Vaillancourt P., Bicistronic Expression of Ecdysone-Inducible Receptors in Mammalian Cells. *BioTechniques*, 2001; 31:618-624

Yang T.T., Cheng L., and Kain S.R., Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein, *Nucleic Acids Res.*, 1996; 24: 4592-4593

Yang Y., Kim M., Carrasco D., Kung A.L., Chin L., Weissleder R., In vivo assessment of RAS-dependent maintenance of tumor angiogenesis by real-time magnetic resonance imaging, *Cancer Res.*, 2005; 65 (18): 8324-8330

Yao T.-P., Forman B.M., Jiang Z., Cherbas L., Chen J.-D., McKeown M., Cherbas P., and Evans R.M., Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 1993; 366: 476-479

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Thomas Franz, der mich auf das Thema dieser Arbeit aufmerksam gemacht und mich ausgezeichnet angeleitet, betreut und unterstützt hat.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Fabian Runkel sehr herzlich bedanken, der mir immer wieder mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand.

Frau Marion Michels gilt mein besonderer Dank für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und wertvolle Unterstützung im Labor.

Frau G. Eversloh danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Immunhistochemie.

Frau Birgit Blanck und Frau Ulrike Schwaab danke ich für die freundliche Unterstützung bei Arbeiten im Labor.

Dem gesamten Team von Prof. Dr. med. Thomas Franz danke ich für die nicht selbstverständliche Integration in die Gruppe und die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre.