



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Herstellung von stabilen Zelllinien zum Vergleich von
Fluoreszenzproteinen für in vivo imaging Versuche**

Autor: Anja Nürnberg
Institut / Klinik: Zentralinstitut für Seelische Gesundheit Mannheim (ZI)
Doktorvater: Prof. Dr. D. Bartsch

Ziel dieser Arbeit war die experimentelle Herstellung von stabilen Zelllinien, die verschiedene Fluoreszenzproteine konditional und quantitativ auf gleichem Niveau exprimieren. Diese Zelllinien sollen später in in vivo Imaging Versuchen eingesetzt werden, um festzustellen, welche Fluoreszenzproteine für bildgebende Methoden besonders geeignet sind.

Grundvoraussetzung für eine solche Fragestellung ist ein System, welches ein vergleichbares Expressionsniveau der zu untersuchenden Fluoreszenzproteine und gleichzeitig eine induzierbare Genexpression erlaubt. Diese Voraussetzungen können nicht durch herkömmliche Strategien zur Herstellung von stabilen Zelllinien erreicht werden, da hierbei sehr starke Schwankungen im Expressionsniveau der Klone auftreten und deshalb ein direkter Vergleich der Eigenschaften von Proteinen nicht möglich ist. Deshalb wurde für dieses Projekt eine Methode verwendet, die ein wiederholtes targeting der verschiedenen Fluoreszenzgene in den gleichen genomischen Lokus per recombinase mediated cassette exchange (RMCE) ermöglicht. Zusätzlich wurde ein konditionales Genexpressionssystem (Tet-System) eingesetzt, um so die Expression der Fluoreszenzproteine von außen durch Zugabe von Doxzyklin kontrollieren zu können.

Zunächst erfolgte die Klonierung von neun ausgewählten Fluoreszenzgenen in das Plasmid SF2-cLM2CG-FRT3, welches durch die flankierenden, heterologen FRT-Sites (FRT und F3) eine RMCE ermöglicht. Dieses Plasmid besitzt einen sog. bidirektionalen tet-gesteuerten Promotor, der die Expression des Fluoreszenzgens zusammen mit dem Reportergen Luziferase steuert. Ausgangspunkt für die Zellkulturexperimente war die stabile Masterzelllinie HeLa-EM2 (Klon 11 EGFP), die eine einzelne austauschbare Genkassette in einem für das Tet-System geeigneten genomischen Lokus (s/a-Lokus) aufweist.

Diese Kassette wurde einmalig mittels RMCE durch eine FRT-F3 flankierte HygTK-Kassette ersetzt. Das HygTK Fusionsprotein kann zur positiven- und negativen Selektion eingesetzt werden. Die positive Selektion ermöglicht den ersten RMCE-Schritt (Etablierung der Linie Hela-EM2 11-1-HygTK), die negative Selektion über Ganzyklovir ermöglicht weitere Rekombinationsschritte, ohne dass ein zellulärer Selektionsmarker im Genom zurückbleibt. Dazu wurden die in SF2-cLM2CG-FRT3 klonierten Fluoreszenzgene in Hela-EM2 11-1-HygTK Zellen transfiziert und durch RMCE mit der Flp-Rekombinase in den s/a-Lokus rekombiniert.

Unter optimierten Versuchsbedingungen konnte mit verschiedenen Fluoreszenzplasmiden eine RMCE Effizienz von ca. 60% erreicht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die so erhaltenen stabilen Zelllinien anhand ihrer Fluoreszenzemission und Normierung auf Luziferaseexpression charakterisiert. Durch die Luziferasemessungen konnte gezeigt werden, dass die RMCE-vermittelte Integration der verschiedenen Fluoreszenz-Expressionskassetten in einen definierten chromosomalen Lokus zu einer vergleichbar starken und über verschiedene Experimente reproduzierbaren Expressionsstärke führte, die zudem durch Doxzyklin-Zugabe über vier Größenordnungen regulierbar war.

Die Palette von neun stabilen Zelllinien mit induzierbaren und vergleichbar exprimierenden Fluoreszenz-Genen, die unterschiedliche Anregungs- und Emissionsspektren aufweisen, kann nun als Werkzeug eingesetzt werden, um Fragen im Bereich des in vivo Imaging zu untersuchen. Die ausgewählten Klone eines jeden Fluoreszenzproteins sollen anschließend in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe F.O.R.T.H. (Foundation for Research and Technology Hellas) in in-vivo Optical Imaging Versuchen eingesetzt werden. Die Doktorarbeit wurde im Rahmen des EU Projekts: "Integrated Technologies for In-Vivo Molecular Imaging" durchgeführt.