

2. Ergebnisse

2.1. Versuche zur Etablierung eines Zellsystems mit induzierbarer *APM-1*-Genexpression

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Überexpression des *APM-1*-Gens eine inhibierende Wirkung auf das klonale Wachstum von Zervixkarzinom-Zellen ausübt (Vogt, 1997; Reuter *et al.*, 1998). Aufgrund dieses Effekts war die Herstellung von Zelllinien mit dauerhafter *APM-1*-Expression nicht möglich. Um mehr über die funktionelle Rolle des Gens zu erfahren, ist jedoch die Etablierung zellulärer Klone mit einem stabil integrierten und regulierbar transkribierten *APM-1*-Gen erforderlich. Dies wurde mit Hilfe des „Tet-On Gene Expression System“ der Firma Clontech versucht.

2.1.1. Einführung in das Tet-On-System

Das Prinzip des Tet-On-Genexpressions-Systems (Gossen *et al.*, 1995) beruht auf der Regulation des Tetrazyklin-Resistenz-Operons, das auf dem *Tn10*-Transposon in *E. coli* liegt. Dieses Operon wird durch den Tet-Repressor (TetR) negativ reguliert, da er die Transkription der nachgeschalteten Gene durch Bindung an die Tet-Operator-Sequenzen (*tetO*) in Abwesenheit von Tetrazyklin (Tc) blockiert (Hillen und Wissman, 1989). Um dieses prokaryontische System für die kontrollierte Expression von Genen in Säugerzellen nutzbar zu machen, wurden zunächst die N-terminalen 207 Aminosäuren von TetR an die C-terminalen 127 Aminosäuren des VP16-Proteins von Herpes-Simplex-Virus fusioniert. Die negativ geladene VP16-Domäne fungiert als transkriptionelle Aktivierungsdomäne (AD) in Säugerzellen (Triezenberg *et al.*, 1988). Das resultierende Hybrid-Protein, der Tetrazyklin-kontrollierte Transaktivator (tTA), bindet an das Tet-responsive Element (TRE) und aktiviert dadurch die Transkription in Abwesenheit von Tc. Beim Tet-On-System wurde durch Austausch von vier Aminosäuren ein „reverser“ Tet Repressor (rTetR) erzeugt (Hillen und Berens, 1994; Gossen *et al.*, 1995), der bei Anwesenheit von Tc an TRE bindet. Anstatt Tc kann bei der Arbeit mit dem Tet-On-System allerdings das effektiver wirksame Tc-Derivat Doxyzyklin (Dox) eingesetzt werden. Durch die Fusion an VP16-AD wirkt rTetR als „reverser“ tTA (rtTA), der die Transkription nach Zusatz von Dox aktiviert. Codiert wird rtTA durch das pTet-On-Regulatorplasmid. Es enthält zusätzlich ein Neomycin-Resistenzgen, wodurch die Selektion stabil transfizierter Zellen ermöglicht wird.

Die zweite entscheidende Komponente ist die in das zelluläre Genom integrierte Kopie eines Plasmids, das das Gen von Interesse (hier: *APM-1*) unter Kontrolle des TRE exprimiert. Das TRE im pTRE-Plasmid von Clontech besteht aus sieben direkten Wiederholungen der 42 bp *tetO*-Sequenz und befindet sich direkt stromaufwärts eines minimalen CMV-Promotors (P_{minCMV}), dem die normalerweise mit dem „immediate early“ CMV-Promotor assoziierten starken Enhancer-Elemente fehlen. Ohne die Bindung von rtTA an die *tetO*-Sequenzen sollte daher keine Expression eines inserierten Gens erfolgen.

2.1.2. Etablierung und Analyse von HeLa Tet-On Zellklonen mit stabil integriertem *APM-1*-Gen

Zur Herstellung des rekombinanten pTRE-APM-1-Plasmids wurde zunächst die komplette *APM-1*-cDNA (3789 bp) aus pMefust-4 durch Restriktionsverdau mit *MfeI* und *EcoRI* isoliert und in den *EcoRI*-linearisierten pTRE-Vektor inseriert. Der Erfolg der Neukonstruktion wurde durch Ansequenzierung der beiden Vektor/Insert-Übergänge bestätigt. Ein Ausschnitt der physikalischen Karte des Konstrukts ist in B gezeigt.

Die pTRE-APM-1-Plasmide wurden mit dem Selektionsplasmid pTK-Hyg in HeLa Tet-On-Zellen co-transfiziert, um die Selektion stabiler Transfektanten mittels Hygromycin zu ermöglichen. Für die Experimente wurde die von der Firma Clontech bezogene Zelllinie „HeLa Tet-On“ verwendet, welche rtTA bereits stabil exprimiert. Die Untersuchung der Hygromycin-resistenten Zellklone auf Dox-induzierbare *APM-1*-Expression wurde mittels Northern-Analyse der behandelten und unbehandelten Zellen vorgenommen. Nach Überprüfung von 72 Zellklonen wurden insgesamt sechs Klone mit *APM-1*-Expression in Gegenwart von Dox gefunden. In Abbildung 1 sind die Analyse-Ergebnisse von fünf der sechs induzierbaren Klone dokumentiert. Klon I B1 weist sowohl absolut als auch im Vergleich zu den unbehandelten Zellen das stärkste Signal auf. Die detektierte Bande repräsentiert die *APM-1*-mRNA mit einer Länge von rund 3,8 kb. Ein Transkript gleicher Länge ist bei Klon II B3 zu sehen, allerdings mit wesentlich schwächerer Induzierbarkeit. Auch in Klon II B4 wird ein Transkript der erwarteten Länge in geringen Mengen produziert. Ein etwas stärkeres Signal ist bei Klon II A2 zu verzeichnen. Zusätzlich zu dem 3,8 kb-Transkript wird jedoch eine geringfügig längere mRNA hergestellt. Klon II A4 weist ein kaum nachweisbares Transkript von etwa 4,8 kb Länge auf. Klon II D5 zeigt keine Induzierbarkeit.

Für die weiteren Experimente wurden aufgrund der induzierbaren Expression von *APM-1*-mRNA erwarteter Länge die Klone I B1 und II B3 verwendet. Als Kontrolle wurde der nicht-induzierbare Klon II F1 mitgeführt.

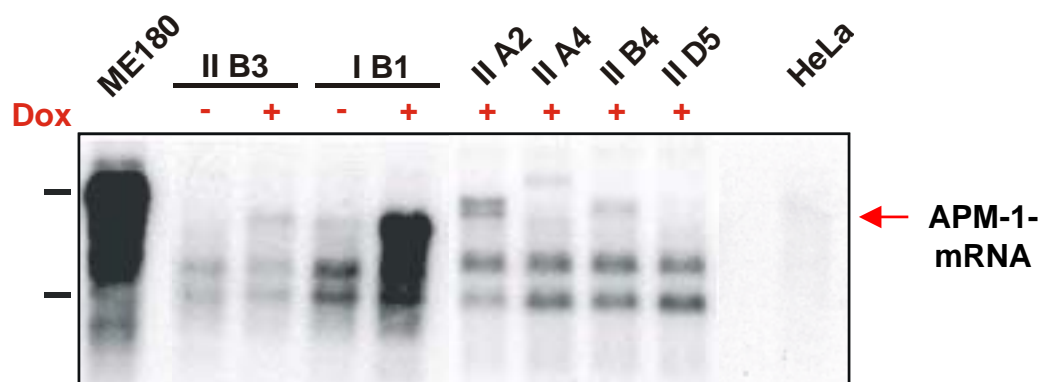


Abbildung 1: Northern-Analyse Hygromycin-resistenter HeLa Tet-On Klone

Die Zellen wurden in je zwei 175-cm²-Kulturflaschen ausgesät, und in Anwesenheit (+) bzw. Abwesenheit (-) von 1 µg/ml Dox für 48-72 Stunden kultiviert. Die Bezeichnungen der Klone sind angegeben. Gesamt-RNA wurde isoliert und die mRNA durch poly(A)⁺-Selektion angereichert. Als Positivkontrolle wurde ME180-, als Negativkontrolle HeLa-RNA verwendet. Je 2 µg poly(A)⁺-RNA wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nylonfilter transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit der Sonde „APM-1“, die dem 3,8 kb-*Mfa*-*Eco*RI-Fragment mit der kompletten APM-1-cDNA entspricht. Der rote Pfeil markiert das APM-1-Transkript von ca. 3,8 kb Länge. Die Querbalken deuten die Positionen der 28S- und der 18S-rRNA an. Die Autoradiographie erfolgte für 48 Stunden.

2.1.3. Auswirkungen der induzierbaren *APM-1* Expression auf das klonale Zellwachstum

Zur Untersuchung des Effekts der *APM-1*-Expression auf das klonale Wachstum von Tumorzellen unter Selektionsbedingungen wurden die ausgewählten Zellklone in einem „Colony Formation Assay“ (CFA) eingesetzt. Nach transienter Transfektion war ein wachstumshemmender Einfluss von *APM-1* auf die Zervixkarzinom-Zelllinien HeLa und CaSki im CFA nachgewiesen worden (Vogt, 1997; Reuter *et al.*, 1998). In den HeLa Tet-On Klonen ist das Gen dagegen stabil integriert und steht unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Dadurch kann die Transkription von *APM-1* durch Dox-Zugabe in den Zellen synchron aktiviert werden.

Verglichen wurde der Effekt des stark induzierbaren Zellklons I B1 mit dem des schwach induzierbaren Klons II B3 und dem des nicht-induzierbaren Klons II F1 bei Doxyzyklin-behandelten und unbehandelten Zellen. In Abbildung 2 ist eine repräsentative Auswahl von Kulturschalen nach Färbung der Kolonien zusammengestellt. Bei I B1 konnte auch nach mehrfacher Wiederholung des Experiments kein Unterschied in der Kolonienzahl zwischen behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet werden. Ein Vergleich der induzierbaren Klone mit dem nicht-induzierbaren Klon erbrachte ebenfalls keine erkennbar unterschiedlichen Ergebnisse. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass die Induktion der *APM-1*-Expression in den Zellklonen nicht ausreichend stark ist, um einen nachweisbaren Effekt auf das Zellwachstum zu erhalten.

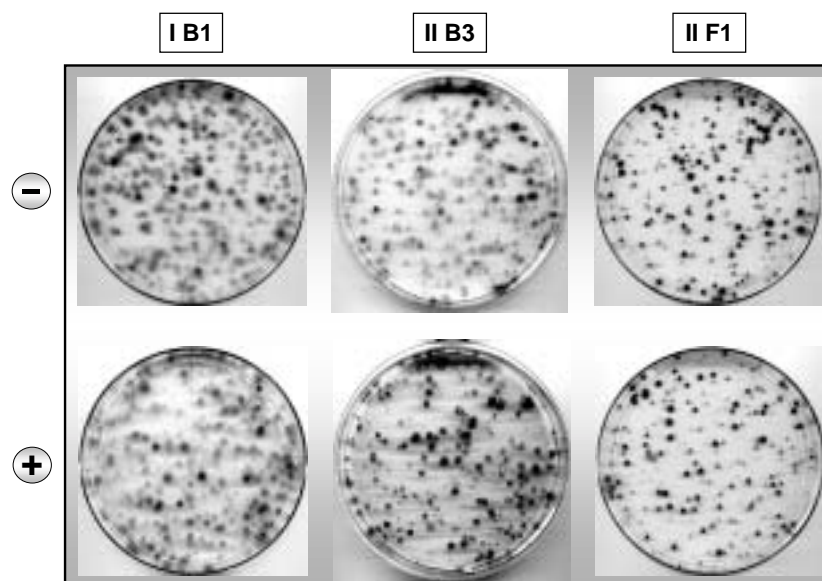


Abbildung 2: „Colony Formation Assay“ mit induzierten und nicht-induzierten HeLa Tet-On Zellklonen

Die Zellen wurden mit einer Ausgangsdichte von ca. 500 Zellen pro Schale ausgesät. Die Bezeichnungen der Klone sind angegeben. Nach 14-tägiger Kultivierung in Selektionsmedium ohne (-) und mit (+) Doxycyclin (1 µg/ml) wurden die entstandenen Kolonien fixiert und mit Kristallviolett angefärbt.

2.1.4. Überprüfung der induzierbaren *APM-1*-Expression durch RT-PCR-Analyse in doppelt-stabilen Zellklonen

Nach Angaben des Herstellers im Benutzer-Protokoll des Tet-On Systems (PT3001-1) existieren Berichte, dass es auch bei sorgfältig charakterisierten doppelt-stabilen Zelllinien gelegentlich zu einem Verlust der Dox-Induzierbarkeit kommt. Als Erklärung wird unter anderem eine Abschaltung oder Methylierung des viralen Promotors angeführt. Bei den vorliegenden Untersuchungen zur Wirkung der induzierbaren *APM-1*-Expression auf das klonale Wachstum von Tumorzellen waren weder Unterschiede zwischen Dox-behandelten und unbehandelten Zellen noch zwischen induzierbaren und nicht-induzierbaren Zellklonen gefunden worden (siehe Abschnitt 2.1.3.). Deshalb wurden die verwendeten Klone nochmals durch RT-PCR-Analyse mit Gesamt-RNA aus den Zellen auf ihre Induzierbarkeit überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 3 gezeigt. Als PCR-Primer wurde der im Vektor gelegene MV40 und der in der *APM-1*-cDNA gelegene MV06 benutzt. Die Position des PCR-Produkts von 470 bp Länge ist in Abbildung 4 B schematisch dargestellt. Nur bei Klon I B1 ist eine *APM-1*-Expression nachzuweisen. Allerdings wird bei diesem Klon auch in den unbehandelten Zellen ein Transkript produziert. Der Promotor wurde also offenbar nicht abgeschaltet, ist jedoch auch in Abwesenheit von Dox aktiv.

Waren nach Northern-Analyse Hygromycin-resistenter Zelllinien die Klone I B1 und II B3 noch als induzierbar charakterisiert worden (Abschnitt 2.1.2., Abbildung 1), steht diesem Resultat zufolge kein HeLa Tet-On Zellklon mit induzierbarer *APM-1*-Expression mehr zur Verfügung.



Abbildung 3: RT-PCR-Analyse Hygromycin-resistenter HeLa Tet-On Klone

Die Zellen wurden in je zwei 75-cm²-Kulturflaschen ausgesät, und in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) von 1 µg/ml Dox für 48-72 Stunden kultiviert. Die Bezeichnungen der Klone sind angegeben. Die reverse Transkription (RT) wurde mit je 1 µg Gesamt-RNA durchgeführt. Je 1/20 der RT-Reaktion wurde für die PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde eine PCR mit 10 ng pTRE-APM-1-cDNA hinzugefügt. Nach Auftrennung von 1/5 der PCR-Reaktionen in einem 1,5 %-igen Agarosegel und Southern Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde MV40-06, die mit dem PCR-Produkt von 470 bp Länge identisch ist. Der Pfeil markiert das PCR-Produkt mit der in Klammern angegebenen erwarteten Länge. Die Autoradiographie erfolgte für eine Stunde. Ausgesuchte Banden der als Größenstandard benutzten 100 bp-Leiter und deren Fragmentlängen (in bp) sind eingezeichnet.

2.1.5. Nachweis integrierter TRE-APM-1-DNA

Um zu ermitteln, ob bei Klon I B1 die *APM-1*-cDNA zusammen mit der Promotor-Einheit des pTRE-Plasmids intakt in das Genom der HeLa Tet-On Zellen integriert vorliegt, wurde eine Southern-Analyse der genomischen DNA durchgeführt. Verglichen wurde I B1-DNA mit DNA aus II B3, bei dem in der RT-PCR-Analyse keine *APM-1*-Expression mehr festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 3). Als Kontrollen wurden DNA aus dem *APM-1*-negativen Zellklon II F1 und aus HeLa-Zellen eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit zwei PCR-Produkten, die sich jeweils über die beiden Vektor/Insert-Übergänge erstrecken.

Falls die komplette TRE-APM-1-Kassette intakt ins Genom integriert wurde, sollte bei einer Doppelspaltung mit *XhoI* und *XbaI* ein Fragment von etwa 4,3 kb herauspaltbar sein. Das Fragment konnte ausschließlich bei Klon I B1 nachgewiesen werden (Abbildung 4 A). Das Fehlen des 4,3 kb-Fragments bei II B3 erlaubt die Schlussfolgerung, dass bei diesem Klon keine Stilllegung der Transkription, sondern ein Verlust der TRE-APM-1-Einheit vorliegt. Vermutlich gilt das auch für die restlichen nicht-induzierbaren Klone, die sich in der ersten Northern-Analyse noch als *APM-1*-positiv herausgestellt hatten.

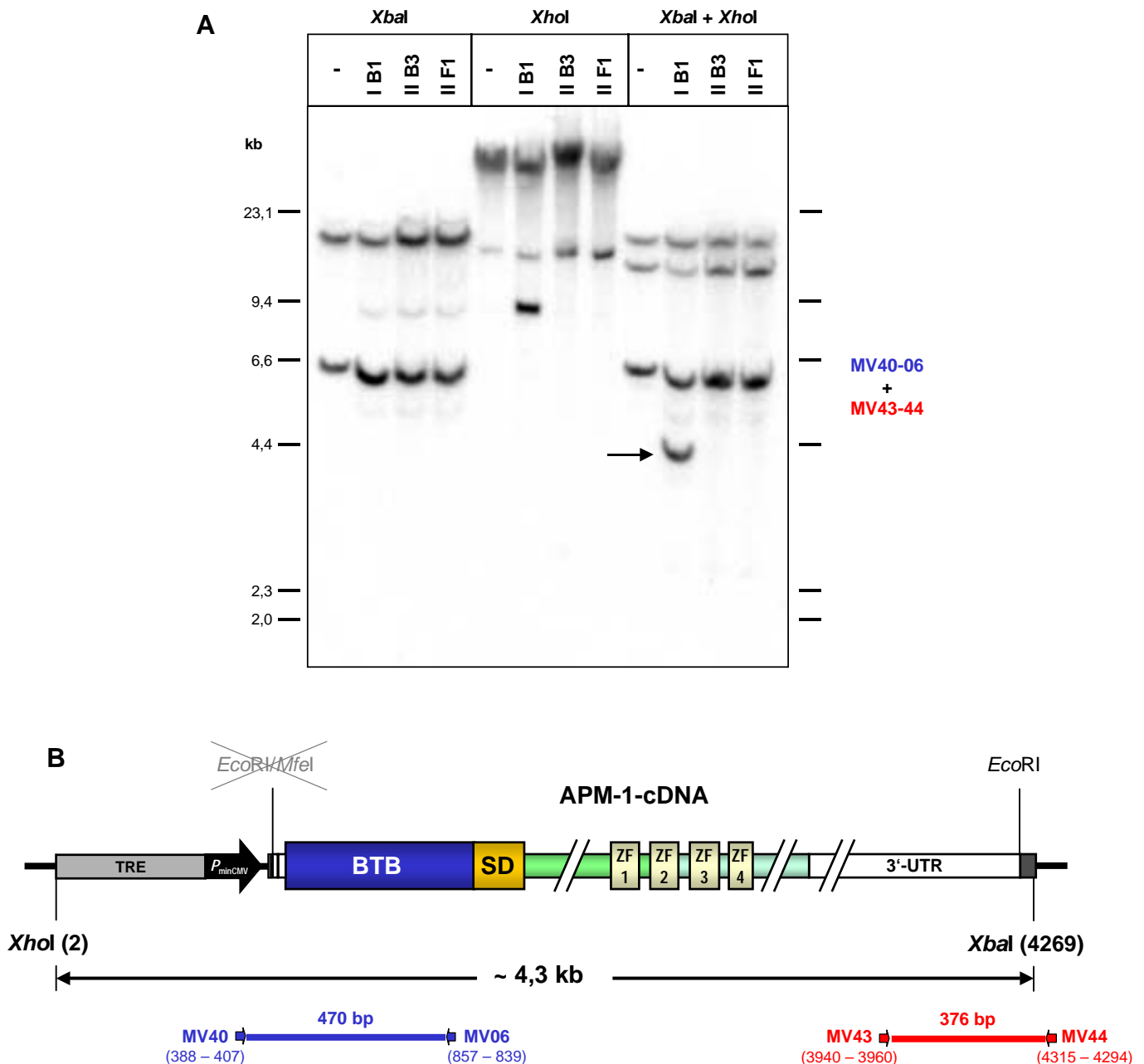


Abbildung 4: Southern-Blot-Hybridisierung mit vergleichender Analyse von HeLa-DNA mit DNA Hygromycin-resistenter HeLa Tet-On Klone

A zeigt die Southern-Hybridisierung von je 10 µg genomischer DNA nach Einfach- und Doppelspaltung mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Xba*I. Die Bezeichnungen der Klone sind angegeben. Auf die mit „-“ gekennzeichneten Spuren wurde DNA aus HeLa-Zellen aufgetragen. Als Sonden wurden die radioaktiv markierten PCR-Produkte der Primer MV40+MV06 bzw. MV43+MV44 verwendet. Der Pfeil kennzeichnet ein 4,3 kb-*Xho*I-*Xba*I-Fragment. Banden des λ-DNA/*Hind*III-Größenstandards mit den entsprechenden Fragmentlängen (in kb) sind eingezeichnet. Die Autoradiographie erfolgte für 16 Stunden.

In **B** ist ein Ausschnitt der physikalischen Karte des pTRE-APM-1-Konstrukts schematisch dargestellt. Das Fragment, das aus der Spaltung mit *Xho*I und *Xba*I resultieren sollte, ist angegeben. Die als Hybridisierungssonden verwendeten PCR-Produkte sind positionsgenau eingezeichnet. Die Bezeichnungen und Positionen der Primer sowie die Längen der PCR-Produkte sind angegeben.

(TRE, Tet-responsives Element; P_{minCMV} , minimaler CMV-Promotor; BTB, BTB-Domäne; SD, saure Domäne; ZF, Zinkfinger; UTR, untranslatierte Region)