

Diplomarbeit

**Die Etablierung von MCF-7 Zelllinien  
mit Genom-integrierter Expression  
von GIRK1 und GIRK4**

eingereicht von

**Stefanie Fürtinger und Birgit Niesner**

0433041

0311241

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

(Dr. med. univ.)

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

Institut für Biophysik/ Klinische Abteilung für Onkologie

unter der Anleitung von

**Ao. Univ. Prof. Dr. Thomas Bauernhofer**

**Ao. Univ. Prof. Dr. Wolfgang Schreibmayer**

Graz, im Dezember 2010

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, im Dezember 2010

*Stefanie Fürtinger*

*Birgit Niesner*

# Danksagung

Wir möchten uns herzlich bei Herrn Prof. Wolfgang Schreibmayer für seine fortwährende Unterstützung und Geduld während der Entstehung dieser Arbeit bedanken. Sein stets offenes Ohr und seine hilfreichen Ratschläge machten deren Umsetzung erst möglich. In organisatorischen wie inhaltlichen Angelegenheiten stets unterstützend zur Seite stand uns Prof. Thomas Bauernhofer, bei dem wir uns an dieser Stelle für seinen unermüdlichen Einsatz und seine stets aufmunternden Gespräche ganz besonders bedanken möchten.

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, welche immer zu mir gestanden haben und mir im Laufe der Jahre stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Vor allem aber möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meiner Mutter bedanken. Ihre jahrelange liebevolle Begleitung und Unterstützung während allen Höhen und Tiefen meines Lebens machten mir es erst möglich durch dieses Studium zu gehen. Die Widmung dieser Arbeit gilt ihr, in liebevollem Gedenken an meinen Vater.

*Stefanie Fürtinger*

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich ganz besonders für ihre wertvolle Begleitung und jahrelange Unterstützung bedanken. Sie haben mich durch gute Zeiten des Studiums begleitet und in schlechten, stets bekräftigt.

*Birgit Niesner*

# Zusammenfassung

G-Protein aktivierte einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (GIRKs) stellen eine Verbindung zwischen Membranpotentialen und der Präsenz von extrazellulären Signalmolekülen dar. Sie spielen eine bedeutende Rolle in der humoralen Regulation der Herzaktivität, der Insulinausschüttung des Pankreas oder auch der Neurotransmitter regulierten neuronalen Aktivität. Wie in den letzten Jahren bekannt wurde, haben GIRKs auch einen wesentlichen Einfluss auf die Pathophysiologie von Brustkrebs, bezüglich Proliferation und Metastasierung. Einige GIRK-Subtypen konnten bereits identifiziert und in kultivierten Brustkrebszelllinien, im Gegensatz zu benignen Brustepithelzellen, nachgewiesen werden.

Der Einfluss von GIRK1 und GIRK4 auf Morphologie und Vitalparameter von Brustkrebszellen wurde in der Brustkrebszelllinie MCF-7 untersucht. Da die Transfektion der GIRKs den grundlegendsten Schritt für solche Versuche darstellt, war es das Ziel dieser Arbeit, neue Zelllinien zu etablieren, welche das GIRK1-, bzw. GIRK4-Protein stabil exprimieren. Die Selektion der stabilen Transfektanten erfolgte mit dem Antibiotikum G-418 (Geneticin). Da die GIRK-Proteine mit der gelben Form des grünen Fluoreszenz-Proteins (eYFP) gekoppelt waren, konnte der Transfektionserfolg mittels Konfokalmikroskopie überprüft werden. Die Sortierung der stabil transfektierten Zellen wurde mittels FACS-Analyse (engl. fluorescence activated cell sorting) durchgeführt, wodurch sieben GIRK1-Klone (A-G) und fünf GIRK4-Klone (2-6) hervorgebracht wurden. Diese wurden anschließend morphologisch charakterisiert.

Die im Rahmen der transienten Transfektion ersichtliche subzelluläre Verteilung der Fluoreszenz, welche bei GIRK1 im Intrazellulärraum, und bei GIRK4 in der Zellmembran lokalisiert war, schien für das jeweilige Protein charakteristisch zu sein. Bei der konfokalmikroskopischen Untersuchung der gewonnen Klone zeigte sich allerdings, dass das Expressionsverhalten und das Wachstumsmuster der Zellen, vor allem bei stark exprimierenden Klonen verändert war. Weitere Experimente bezüglich Vitalparameter dieser Zelllinien sind geplant.

# Abstract

G protein activated inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) represent a connection between membrane potentials and the presence of extra cellular signal molecules. They play an important role in the humoral regulation of cardiac activity, pancreatic insulin distribution and the neurotransmitter regulated neural activity. As noted in recent years, GIRKs have a significant influence on the pathophysiology of breast cancer, particularly proliferation and metastasis. A number of GIRK subtypes have already been detected and identified in cultured breast cancer cells, versus benign breast epithelial cells.

The influence of GIRK1 and GIRK4 on morphology and vital signs of breast cancer cells was examined in the breast cancer cell line MCF-7. Transfection of GIRKs is the most basic step for such attempts, the aim of this work was to establish new cell lines which express the GIRK1, or GIRK4 protein stably. The selection of stable transfectants was carried out using the antibiotic G-418 (Geneticin). GIRK proteins with the yellow form of green fluorescence protein (eYFP) were coupled, transfection success was verified using confocal microscopy. Sorting of stable transfected cells was carried out using FACS analysis (fluorescence activated cell sorting), which spawned seven GIRK1 clones (A-G) and five GIRK4 clones (2-6). These were then morphologically characterized.

In the context of transient transfection subcellular distribution of fluorescence, which was located in GIRK1 in the intracellular area and on GIRK4 in the cell membrane, seemed to be characteristic for each protein. Confocal microscopic investigation of the clones achieved however, that the expression behavior and the growth pattern of cells with strong expression has changed. Further experiments on vital signs of this cell lines are planned.

# Inhaltsverzeichnis

<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>III</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. BRUSTKREBS .....	1
1.2. G-PROTEINE UND GIRK.....	5
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>10</b>
2.1. MATERIAL .....	10
2.1.1. Zelllinien.....	10
2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.3. Laborgeräte .....	13
2.1.4. Plasmid.....	14
2.2. METHODEN.....	16
2.2.1. Zellkulturführung.....	16
2.2.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	17
2.2.3. Die Transfektion .....	18
2.2.3.1. Transiente Transfektion.....	20
2.2.3.2. Stabile Transfektion.....	21
2.2.4. Konfokalmikroskopie.....	23
2.2.5. Isolierung stabil transfektierter Klone mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) .....	25
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>28</b>
3.1. BESTIMMUNG DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ.....	28
3.2. SUBZELLULÄRE VERTEILUNG.....	32
3.3. STABILE TRANSFEKTION UND ETABLIERUNG VON KLONEN .....	34
3.3.1. Ermittlung der G-418 Konzentration zur Selektion stabil transfektierter Zellen .....	34
3.3.2. Stabile Transfektion von MCF-7 Zellen .....	37
3.3.3. Selektion stabil transfektierter Einzelzellen mittels FACS-Analyse .....	39
3.3.4. Charakterisierung der einzelnen Klone.....	42

<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>48</b>

# Verwendete Abkürzungen

AOTF	Acousto optic tunable filter
BRCA	Breast Cancer
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DEAE	Diethylaminoethyl-dextran
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMEM	Eagle's minimum essential medium
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FSC	Forward scatter
G-418	Geneticin
GFP	Green fluorescent protein
GIRK	G-protein activated inwardly rectifying K <sup>+</sup> channel
GPCR	G-Protein-coupled receptor
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
hG4	Human GIRK4
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
MCF	Michigan Cancer Foundation
MEBM	Mammary Epithelial Basal Medium
MEGM	Mammary Epithelial Cell Growth Medium
MEM	Mammary Epithelial Medium
mRNA	messenger-RNA
PMT	Photomultiplier tube
rG1	RatGIRK1
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Real time-polymerase chain reaction
SSC	Side scatter
YFPN1	Yellow fluorescent protein N1
ZMF	Zentrum für medizinische Forschung

# Abbildungsverzeichnis

1.1. Mammakarzinom-Frühformen	2
1.2. Häufigkeitsverteilung des Mammakarzinoms	3
1.3. G-Protein	6
1.4. Detektion des GIRK1-Proteins	8
2.1. Vektorkarte pEYFP-N1	15
2.2. Transient transfektierte MCF-7 Zellen	20
2.3. Prinzip der konfokalen Mikroskopie	24
2.4. Prinzip der Durchflusszytometrie	26
2.5. Lichtstreuung bei der Durchflusszytometrie	26
3.1. Transfektionsreihe	29-31
3.2. Subzelluläre Verteilung	32-33
3.3. „kill curve“	36
3.4. Stabile Transfektanten in der Mischkultur	38
3.5. FACS-Analyse GIRK1	40
3.6. FACS-Analyse GIRK4	41
3.7. GIRK1- und GIRK4-Klone	43-45

# Tabellenverzeichnis

3.1. Auswertung zur Bestimmung der Transfektionseffizienz	29
3.2. Merkmale der stabil transfektierten Klone	42

# 1. Einleitung

## 1.1. Brustkrebs

*Falls nicht durch ein eigenes Zitat gekennzeichnet sind nachfolgend geschilderte Sachverhalte aus dem Lehrbuch Duale Reihe: Gynäkologie und Geburtshilfe (Stauber & Weyerstahl 2007) entnommen.*

Das Mammakarzinom zählt zu den häufigsten malignen Tumoren der Frau. Jede achte Frau in der westlichen Welt erkrankt in ihrem Leben an einem Mammakarzinom und die Wahrscheinlichkeit zu erkranken, nimmt mit dem Alter zu. In der Altersgruppe der 35- bis 55-Jährigen ist Brustkrebs die häufigste Todesursache. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 75%, die 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei 60%. Eine endgültige Heilung lässt sich allerdings erst nach 20 bis 40 Jahren feststellen.

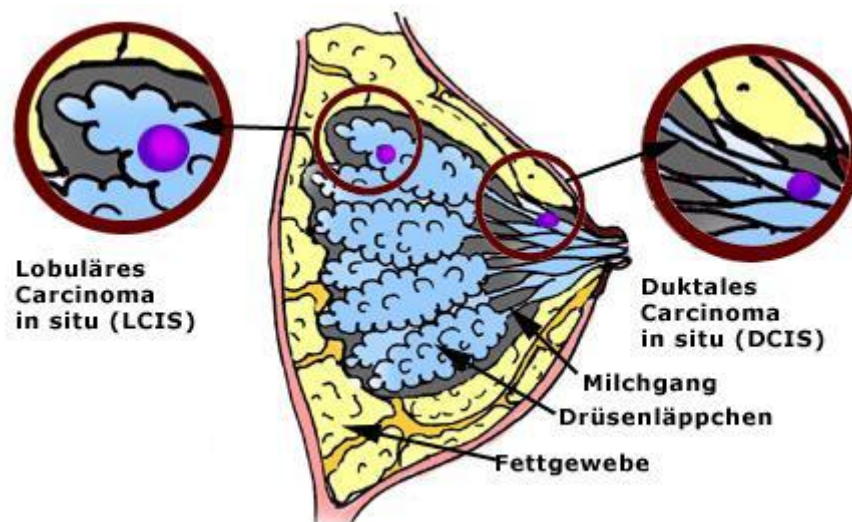
Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist unbekannt, wobei endogene Faktoren wie familiäre Häufungen ebenso eine Rolle zu spielen scheinen, wie exogene Einflüsse. Zwei Tumorsuppressorgene, bei welchen eine Mutation nachweislich zu einem erhöhtem Mammakarzinom-Risiko führt, sind das BRCA1- und BRCA2-Gen. In 80% der familiär vererbten Mammakarzinome finden sich Mutationen des BRCA1-Gens. Auch geographische Unterschiede in der Inzidenz des Mammakarzinoms lassen sich vermutlich auf genetische Faktoren und unterschiedliche Lebensgewohnheiten, wie zum Beispiel die Ernährung zurückführen. So erkranken Japanerinnen wesentlich seltener an einem Mammakarzinom, als Europäerinnen (Verhältnis 6:1).

Pathogenetisch entwickelt sich das Mammakarzinom biphasisch über intraepitheliale In-situ-Stadien, bis es nach mehrjähriger Latenz in ein infiltrierendes Karzinom übergeht. Unklar ist, ob sich ein Karzinom aus normalen Epithelzellen oder aus primär atypischen Hyperplasien entwickelt. Die Verdoppelungszeit der Tumorzellen beträgt, abhängig vom histologischen Typ, ungefähr 100 bis 300 Tage.

85-90% der Mammakarzinome sind histologisch von duktaler Genese. Durchbricht der Tumor die Basalmembran der Milchgänge nicht, bezeichnet man ihn als duktales Carcinoma in situ (DCIS). Bei Infiltration des umliegenden Gewebes

handelt es sich um ein invasives duktales Karzinom. 10-15% entwickeln sich aus dem Epithel der Läppchen, wobei hier der Befall eines einzelnen Lobulus oder auch des zugehörigen Milchgangs ein lobuläres Carcinoma in situ (LCIS) darstellt. Wird hier das umliegende Gewebe infiltriert, spricht man von einem invasiven lobulären Karzinom (siehe Abb. 1.1.).

Zum invasiven duktalem Karzinom, der häufigsten Form des Mammakarzinoms, zählen auch einige spezielle Formen. Das inflammatorische, muzinöse, papillare, medulläre, tubuläre, adenoid-zystische und apokrine duktales Karzinom zeichnet sich durch eine besondere Wuchsform, einen speziellen klinischen Verlauf und eine bestimmte Prognose aus.

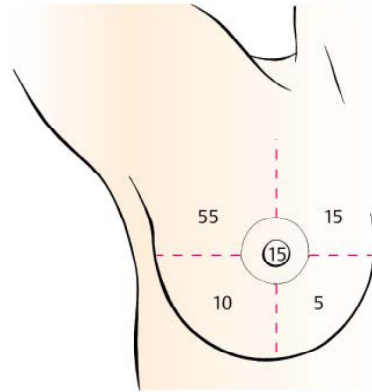


**Abbildung 1.1.** Spezifische Lokalisationen der beiden häufigsten Karzinomfrühformen.  
(<http://mammadiagnostik-marburg.de/typo3temp/pics/6ca779bf6b.jpg>)

Lokalisiert ist das Mammakarzinom am häufigsten im oberen äußeren Quadranten der Brust mit 55%, mit Bevorzugung der linken Brustdrüse (47% rechte Brust, 53% linke Brust). Der obere innere Quadrant und die retroareoläre Region zeigen eine Karzinom-Häufigkeit von je 15%. Der untere äußere Quadrant ist in ungefähr 10%, und der untere innere Quadrant in ca. 5% der Fälle betroffen (siehe Abb. 1.2.).

Die Metastasierung des Mammakarzinoms kann schon bereits sehr früh erfolgen, wobei eine direkte Beziehung zwischen Größe des Primärtumors und Geschwindigkeit der Metastasierung besteht. Die Metastasierung erfolgt lymphogen in die regionären (axillären) Lymphknoten und in weiterer Folge auch hämatogen. Die Organe der

hämato-genen Metastasierung sind das Skelettsystem, die Lungen, die Pleura, die Leber und das Gehirn. Mikro-Metastasen können allerdings über viele Jahre klinisch stumm bleiben.



**Abbildung 1.2.** Prozentuale Häufigkeitsverteilung des Mammakarzinoms.  
(aus Stauber & Weyerstahl 2007, p.375)

Das Leitsymptom des Mammakarzinoms ist der palpable Knoten. Mehr als 80% der malignen Tumoren werden von den Frauen selbst entdeckt. Neben der Vorwölbung verursachen Tumoren auch oft eine Hauteinziehung (Plateuphänomen). Im fortgeschrittenen Stadium zeigt sich meist das Orangenhaut-Phänomen, welches durch ein intradermales Lymphödem verursacht wird, sowie die blutige Sekretion aus der Mamille oder eine Mamillenretraktion.

Diagnostisch steht die gezielte Anamnese bezüglich der oben genannten Symptome, sowie die Inspektion und Palpation am Anfang der Untersuchung. Mit der Sonographie lassen sich Tumoren schon relativ sicher als suspekt oder unverdächtig erkennen und vor allem kann zwischen soliden Tumoren und Zysten differenziert werden. Die Sensitivität der Sonographie liegt bei palpablen Tumoren bei 90-98%, bei nicht palpablen ist allerdings die Sensitivität der Mammographie höher. Diese gilt in der Früherkennung des Mammakarzinoms als Goldstandard, da sie auch bei der Detektion von Mikrokalk als bestes bildgebendes Verfahren gilt. Gruppiertes, polymorphes Mikrokalk gilt als führendes röntgendiagnostisches Kriterium des In-situ-Karzinoms.

Zu den zahlreichen zusätzlichen diagnostischen Maßnahmen zählt auch die Galaktographie, welche bei pathologischer Sekretion aus der Mamille zum Einsatz kommt, um intraduktale tumoröse Veränderungen festzustellen. Die Magnetresonanztomographie stellt ein additives Untersuchungsverfahren dar, bei welcher allerdings die Spezifität, genauso wie bei der mittlerweile obsoleten Thermographie sehr gering ist. Mithilfe der Exfoliativzytologie lässt sich die Ursache von Epithelveränderungen der Brustwarze klären. In der Diagnostik des Morbus Paget, bei welchem das DCIS auch die Epidermis der Mamille befällt, hat diese einen sehr hohen Stellenwert.

Die heutige Standardmethode der Abklärung von suspekten Herdbefunden ist die präoperative histologische Klärung mit minimal invasiven Methoden wie der Stanzbiopsie und der stereotaktisch geführten Vakuum- und Exzisionsbiopsie.

Bei bereits nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen, welche auch als Indikator für eine stattgefundene hämatogene Metastasierung gelten, erfolgt eine Staging-Untersuchung mit einem Röntgen des Thorax, einer Leber-Scintigraphie, einer Knochenszintigraphie und einer gynäkologischen Untersuchung. Die Prognose und weitere Therapie sind von diesem Untersuchungsergebnis abhängig.

Da die Prognose der Patientin von der Metastasierung des Mammakarzinoms und nicht von der Radikalität des operativen Vorgehens abhängt, hat man in den letzten Jahren immer mehr Abstand von radikalen operativen Eingriffen genommen. Bei operablen Tumoren, welche den M. pectorialis major infiltriert haben, kommt allerdings auch heute noch die radikale (klassische) Mastektomie zum Einsatz, welche die Entfernung des Brustdrüsenkörpers, des Pektoralmuskels, der axillaren Lymphknoten und des axillaren Fettgewebes beinhaltet. Ein besseres kosmetisches Ergebnis kann mit der modifizierten radikalen Mastektomie erzielt werden. Hierbei werden die Brust, die Pektoralisfaszie und die axillaren Lymphknoten reseziert. Für eine brusterhaltende Therapie darf die zu operierende Brust nicht zu klein sein, es darf keine Infiltration in umliegendes Gewebe vorliegen und es muss sowohl die Lokalisation des Tumors, als auch das Verhältnis der Tumorgröße zum Brustvolumen günstig sein. Bei der Kombination mit Entfernung der axillaren Lymphknoten und nachfolgender Strahlentherapie sind die Heilungschancen vergleichbar mit der Mastektomie.

Da der Lymphknotenstatus ein essentielles prognostisches Kriterium des Mammakarzinoms ist, gehört die axillare Lymphadenektomie zum diagnostischen und therapeutischen Konzept. Zunehmend gewinnt hierbei die Sentinellymphknoten-

Technik an Bedeutung, da der Sentinellymphknoten (Wächterlymphknoten) der erste Lymphknoten im Lymphabflussgebiet des Tumors ist. Er kann präoperativ farblich oder radioaktiv markiert werden. Ist dieser tumorfrei, kann auf eine komplette Lymphadenektomie verzichtet werden.

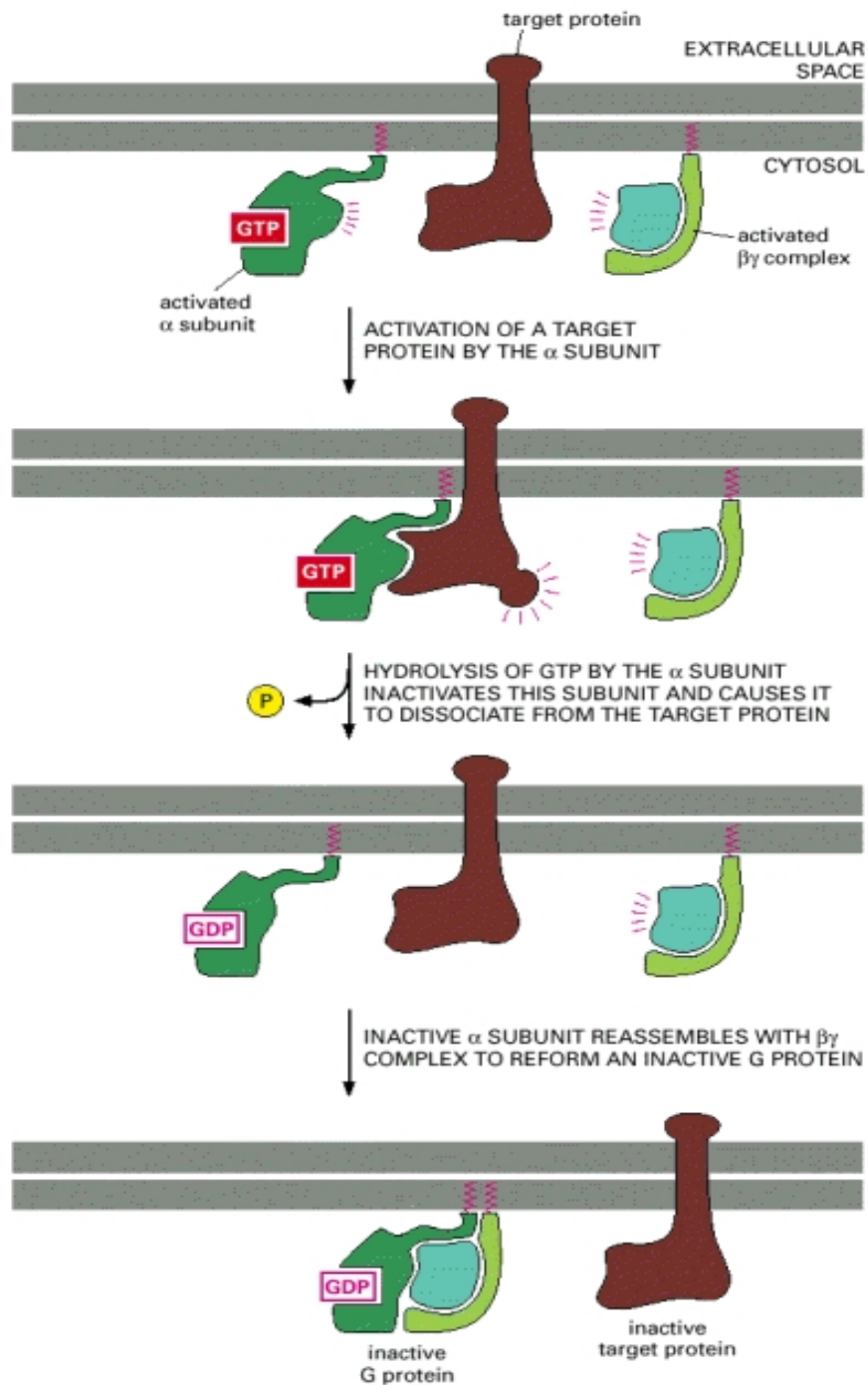
Eine adjuvante Therapie, mit dem Ziel vermutete, diagnostisch nicht erfasste Metastasen zu eliminieren, schließt sich der Resektion des Tumors an. Bei Patientinnen mit größeren Tumoren wird zur Verkleinerung des Tumors präoperativ eine neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt. Eine primäre Bestrahlung ist heutzutage nur noch bei inoperablen Patientinnen mit fortgeschrittener Erkrankung indiziert.

Die Tumorbiologie nimmt eine immer bedeutendere Rolle in der Entscheidung für eine spezielle adjuvante systemische Therapie ein. So sind zum Beispiel der Hormonrezeptor- und der HER-2/neu-Status an die erste Stelle der prädiktiven Faktoren gerückt (Stauber & Weyerstahl, 2007).

## 1.2. G-Proteine und GIRK

G-protein activated inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) stellen eine Klasse von  $K^+$ -Kanälen dar, welche eine Verbindung zwischen Membranpotentialen und der Präsenz von extrazellulären Signalmolekülen bilden. Die Signalübertragung erfolgt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und Pertussis-Toxin sensitive, heterotrimere G-Proteine. G-Proteine bestehen aus der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Der Aktivierung des Rezeptors folgt die Assoziation des G-Proteins zum Rezeptor, wodurch das G-Protein in seine aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit und den aktivierten  $\beta\gamma$ -Komplex zerfällt. Beide können so direkt mit Zielstrukturen in der Plasmamembran wechselwirken (siehe Abb. 1.3.(Alberts et al 2001, p. 531f)).

GIRKs spielen eine bedeutende Rolle in der humoralen Regulation der Herzaktivität, der Insulinausschüttung des Pankreas oder auch der Neurotransmitter regulierten neuronalen Aktivität (Dascal et al, 1993; Iwanir & Reuveny, 2008).



**Abbildung 1.3.** Die Aktivierung des G-Proteins mit der Spaltung in seine zwei Signalproteine.  
(aus Alberts et al 2001, p. 531)

Wie in den letzten Jahren bekannt wurde, spielen GIRKs auch eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie von Brustkrebs. Stringer et al. (2001) zeigte, dass die RNA von GIRK1 in invasiven Primärtumoren der Brust im Vergleich zu gesundem Brustgewebe überexprimiert war. Die Überexpression der GIRK1-RNA im Primärtumor korrelierte mit dem Vorhandensein und der Anzahl von Lymphknotenmetastasen. Die stärkste Überexpression wurde bei Befall von mehr als einem Lymphknoten beobachtet.

Plummer et al. (2004) konnte bei der Untersuchung von sechs Brustkrebs-Zelllinien die mRNA von GIRK1, GIRK2 und GIRK4 durch RT-PCR feststellen. Von den analysierten Brustkrebs-Zelllinien, konnte bei drei Östrogenrezeptor-positiven Zelllinien und einer Östrogenrezeptor-negativen Zelllinie eine Expression der GIRK1-mRNA festgestellt werden. Zwei Östrogenrezeptor-negative Zelllinien und die Zelllinie von normalem Brustepithel zeigten keine Expression. Nachfolgend konnte auch das Vorkommen der mRNA von GIRK1, GIRK2, GIRK3 und GIRK4 in mehreren kleinzelligen Lungenkarzinomen ermittelt werden (Plummer et al., 2005).

Brevet et al. (2008) belegten durch immunhistochemische Färbung die epitheliale Expression von vier  $K^+$ -Kanälen in humanem Brustkrebs-Gewebe. GIRK1 war in kanzerösem Gewebe, verglichen mit gesundem Gewebe, überexprimiert.

Auch verschiedene Splice-Varianten des GIRK1-Proteins (GIRK1a-e) wurden bezüglich ihrer erhöhten mRNA-Levels in Brustkrebszellen untersucht (Wagner et al., 2010). GIRK1b konnte in der Brustkrebszelllinie MCF-7 nicht nachgewiesen werden, GIRK1a, 1c, 1d und 1e waren allerdings reichlich vorhanden (siehe Abb. 1.4.). Interessanterweise betreffen die Splice-Varianten die cytosolische C-terminale Region, welche für die Aktivierung durch G-Proteine und die Regulation durch Phosphorylierung bedeutend ist.

Cell line	GIRK1		N
	Small size	Full length	
MCF7	+	(+)	12
MDA-MB-453	(+)	(+)	8
SKBR3	+	(+)	10
MCF10A	-	+	13
MCF12A	-	+	7
T47D	+	(+)	4

**Abbildung 1.4.** Detektion des GIRK1-Proteins durch Western Blot-Analyse.

+: Band klar detektierbar, (+): Band schwach detektierbar, -: Band nicht detektierbar, N: Anzahl der Experimente.

(aus Wagner et al., 2010)

Die Signalübertragung zwischen Tumorzellen und deren Umgebung ist einerseits essentiell für deren Überleben und andererseits für die Absiedelung von Tumorzellen in andere Organe mit anschließender Metastasierung. Tumorzellen bemächtigen sich oft der physiologischen Signalmechanismen, um neue, fatale Signalkaskaden zu entwickeln (vgl. Chambers, Groom & MacDonald, 2002).

Ein Beispiel für die bedeutende Rolle der G-Protein vermittelten Signalübertragung und von GPCRs im Rahmen der Tumor-Progression ist die Arbeit von Müller et al. (2001). Er beschreibt den entscheidenden Einfluss von Chemokinen und ihren Rezeptoren auf die metastatische Zielortbestimmung von Tumorzellen. Chemokine selbst wiederum können diese zielgerichtete Migration von Tumorzellen allerdings nur durch die Interaktion mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren induzieren. Der Beweis für die Existenz von GIRKs in Brustkrebszellen wurde, wie oben geschildert, erbracht. Ebenso wurde die Korrelation von Tumor-Progression mit Protein und RNA-Levels dokumentiert. Inwieweit jedoch GIRK-Kanäle in die Pathophysiologie von Krebszellen involviert sind und welchen Einfluss sie haben, ist zum derzeitigen Stand der Forschung noch weitgehend unbekannt.

Für die morphologische und pathophysiologische Erforschung von Brustkrebs ist die Zellkultur ein gängiges Setting. Die Transfektion, das heißt die Einbringung von Genen in die Zellen dient als unabdingbare Grundlage für die Untersuchung von deren Einfluss auf die Charakteristik und das Verhalten von Brustkrebszellen. Um den Transfektionserfolg zu überprüfen und die transfektierten Zellen von den Untransfektierten differenzieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Fusion zwischen dem GIRK1-, oder GIRK4-Protein mit der gelben Form des grünen Fluoreszenz-Proteins (eYFP) genutzt. Nach erfolgreicher Transfektion erschienen so die Zellen unter dem Konfokalmikroskop, bei Anregung durch einen 514nm Laser, gelb.

Die meist durchgeführte transiente Transfektion führt allerdings dazu, dass die Zellen nach einer gewissen Zeit das eingeschleuste Gen wieder verlieren. Basierend auf dieser Tatsache war das Ziel dieser Arbeit, neue Zelllinien zu etablieren, welche entweder das YFPN1-rG1- oder das YFPN1-hG4-Konstrukt in ihr Genom integrieren und stabil exprimieren. Die Art der Durchführung ist je nach Zelllinie und Kultivierungsart sehr unterschiedlich und muss individuell ausgetestet und angepasst werden.

Aus der stabilen Transfektion gingen im Rahmen dieser Arbeit sieben Klone (Klon A-G) hervor, welche das YFPN1-rG1 Konstrukt stabil in ihr Genom integrierten, und fünf Klone (Klon 2-6), welche das YFPN1-hG4 Konstrukt enthielten. Die gewonnenen stabilen Transfektanten wurden anschließend konfokalmikroskopisch bezüglich der Fluoreszenz, des Expressionsverhaltens und des Wachstumsmusters analysiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien MCF-7 (Katalognummer HTB-22<sup>TM</sup>) und MCF-10A (Katalognummer CRL-10317<sup>TM</sup>) der Firma ATCC verwendet.

Die Bezeichnung MCF-7 stammt von der Michigan Cancer Foundation-7, einem Institut in Detroit, in welchem die genannte Zelllinie 1970 etabliert wurde. Die primäre Zellkultur, 734B, stammte aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Mammakarzinompatientin mit metastasiertem duktalem Adenokarzinom, welche zuvor drei Jahre lang mit Radio- und Hormontherapie behandelt wurde.

Die langfristige Kultivierung von epithelialen Zellkulturen, welche von humanen Brust-Tumoren abstammten, zeigte in der Vergangenheit einen immer nur sehr begrenzten Erfolg, da die gewonnenen Zellen meist nicht fähig waren länger als einige Monate in Kultur zu überleben. Die ursprünglich gewonnenen 734B Zellen produzierten allerdings in regelmäßigen Abständen auch frei schwimmende Zellen, mit welchen es möglich war, eine gesonderte Kultur anzusetzen und in weiterer Folge die stabile MCF-7 Zelllinie zu etablieren.

Seitdem gilt diese als gängige Zelllinie für in vitro Brustkrebs-Studien, da diese noch einige epitheliale Zellfunktionen der Brustdrüse aufweist und auch über spezifische Östrogen-Rezeptoren verfügt. (Soule et al. 1973). Die MCF-7 Zellen boten bei unserer Arbeit die Grundlage für die Etablierung neuer Zelllinien, welche das GIRK4, bzw. das GIRK1-Konstrukt stabil exprimieren.

Der Name der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten MCF-10A Zellen stammt ebenfalls von der Michigan Cancer Foundation. Die Ursprungszellen wurden aus einem mastektomierten Brustgewebe einer 36-jährigen prämenopausalen Patientin gewonnen,

welche an einer fibrozystischen Mastopathie litt. Eine familiäre Vorbelastung hinsichtlich Brustkrebs war nicht vorhanden.

Von den ursprünglichen diploiden sterblichen Zellen (MCF-10M) wurden die zwei unsterblichen Zelllinien MCF-10A (anhaftend wachsende Zellen) und MCF-10F (freischwimmende Zellen) etabliert und für über 4 Jahre kultiviert (Soule et al, 1990; Tait, Soule & Russo, 1990). Die MCF-10A Zellen weisen Charakteristika von normalem Brust-Epithel auf und wurden als Vergleichszelllinie zu den MCF-7 Zellen mitgeführt.

### 2.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Katalognummer</b>
0.25% Trypsin-EDTA Solution	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany	T4049
24-Well-Platte	Bartelt, Graz, Austria	Nunc 9.700 543
96-Well-Platte	Bartelt, Graz, Austria	Nunc 9.700 541
BioWhittaker HBSS	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium	BE10-547F
Cellstar Serological Pipette, 10mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria	607180
Cellstar Serological Pipette, 25mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria	760180
Cellstar Serological Pipette, 5mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria	606180
Cellstar TC – Plate 6 Well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria	657 160
Cellstar Tissue Culture Flasks	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany	690 175
Centrifuge Tubes, 15mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria	188271
Centrifuge Tubes, 50mL	Bartelt, Graz, Austria	Nunc 9.380 027
Choleratoxin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany	C8052
Costar 12 Well Cell Culture Cluster	Corning, New York, USA	3513
Cryovial Cryogenic Vials	Simport Plastics, Beloeil, Canada	PK-100
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Lactan, Graz, Austria	Merck 2931
Ethanol 70 % vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG,	T913.3

## 2. Material und Methoden

Fetal Bovine Serum (FBS)	Karlsruhe, Germany JRH Biosciences Lenexa, Kansas, USA	12103-500M
Geneticin G-418 Sulfate	GIBCO Invitrogen Corporation, Lofer, Austria	11811-031
MEBM Basal Medium	Lonza, Walkersville, USA	Clonetics CC-3151
MEGM SingleQuots	Lonza, Walkersville, USA	Clonetics CC-4136
MEM with Earle's Salts	PAA Laboratories, Pasching, Austria	E15-825
Micro-Centrifuge Tube, clear	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria	667201
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories	P11-010
Petrischale 15 ml	Bartelt, Graz, Austria	153066
Pipette Tips 1000, blue	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria	740290
Pipette Tips 20, clear	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria	765290
Pipette Tips 200, yellow	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria	739290
Sodium Pyrovate Solution	PAA Laboratories, Pasching, Austria	S11-003
Steritop Filter Unit	Millipore, Wien, Austria	SCGPT01RE

### 2.1.3. Laborgeräte

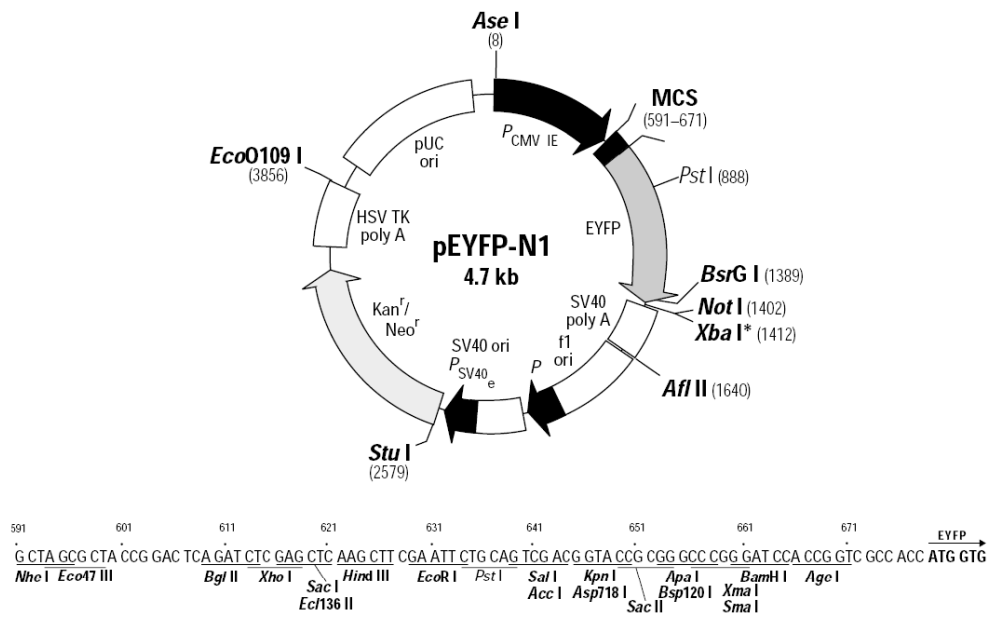
<b>Name</b>	<b>Bezugsquelle</b>
CO <sub>2</sub> -Inkubator, BB 6060	Heraeus Instruments, Hanau, Germany
Fluoreszenzmikroskop, DM IRE2	Leica Microsystems, Heidelberg, Germany
Mikroskop, ID03	Zeiss, Wien, Austria
Pipetten	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria
Pipettierhelfer, Accu-jet	Brand, Wertheim, Germany
Sterilbank, Clean Air	Bartelt, Graz, Austria
Vortexer	Janke und Kunkel, Staufen, Germany
Waage	Sartorius, Göttingen, Germany
Zählkammer, Bürker	Assistent, Sondheim/Rhön, Germany
Zentrifuge, Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau, Germany
FACS	ZMF , Medizinische Universität Graz, Austria
Cell observer	ZMF , Medizinische Universität Graz, Austria

### 2.1.4. Plasmid

In dieser Arbeit wurde der N-terminale Protein-Fusions-Vektor pEYFP-N1 der Firma BD Clontech (Katalognummer 6006-1) verwendet. Dieser Vektor kodiert für die gelbgrüne Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Die Sequenz des EYFP-Gens enthält mehr als 190 stille Basensubstitutionen zur Angleichung an die menschliche Codon-Präferenz. Zur Verbesserung der Translationseffizienz in eukaryotischen Zellen befindet sich vor der kodierenden EYFP-Sequenz eine Kozak Consensus-Sequenz. pEYFP-N1 enthält außerdem das Resistenzgen für Kanamycin, welches das Wachstum transformierter Wirtszellen auf Selektivagar zulässt und ein Resistenzgen für Neomycin, welches eine Selektion von Säugetierzellen mit Hilfe von G-418 möglich macht (vgl. Kapitel 3.3.1. Ermittlung der G-418 Konzentration zur Selektion stabil transfektierter Zellen).

Ein SV40-Polyadenylierungssignal nach der EYFP-Sequenz sorgt für eine Prozessierung des 3'-Endes der EYFP-mRNA. Zur prokaryotischen Expression ist eine pUcorni Stelle vorhanden. Eine multiple Klonierungsstelle befindet sich zwischen dem CMV-Promotor (PCMV IE), der die transiente Expression in Säugetierzellen kontrolliert, und der EYFP kodierenden Sequenz (BD Bioscience, product sheet, Nr. PT3192-5, 2002).

Fremdgene können über die multiple Klonierungsstelle (MCS) am N-Terminus der EYFP-Sequenz inseriert werden und müssen ein Startcodon zur Expression als EYFP-Fusionsprotein enthalten. In Abbildung 2.1. sind relevante Restriktionsenzymchnittstellen, sowie Abschnitte für Antibiotika-Resistenzen (Kanr / Neor) dargestellt. Der für die eukaryotische Expression wichtige Viruspromotor wird durch PCMV IE angezeigt.



**Abbildung 2.1.** Vektorkarte des N-terminalen Proteininfusionsvektors pEYFP-N1.  
(pEYFP-N1 Vector Information; Protocol # PT3192-5; Version # PR29945 3)

Für diese Arbeit wurde in das Plasmid entweder die GIRK1 bzw. die GIRK 4 kodierende Sequenz eingefügt. Um die stabile Integration in den Zellkern zu erleichtern wurde das Plasmid vor der jeder Transfektion linearisiert.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellkulturführung

Die MCF-7 Zellen wurden in EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium), ergänzt mit 10% Fetal Bovine Serum, sowie 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Natrium Pyruvat kultiviert. Bei den stabilen Transfektanten wurde dem Medium zusätzlich Geneticin (3µg/mL Medium) hinzugefügt.

Die Zelllinie MCF-10A wurde in MEBM (Mammary Epithelial Basal Medium) kultiviert. Diesem Medium wurde, bezogen auf eine Menge von 500ml, SingleQuots, 20µl Choleratoxin sowie 5,81mg/ml Penicillin/Streptomycin hinzugefügt.

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen mit einem Durchmesser von 25cm<sup>2</sup> kultiviert.

Bei konfluentem Zellrasen wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen mit 3mL HBSS gewaschen und mit 1mL 0,25%igem Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden ablösten.

Bei der Zelllinie MCF-7 wurde 4ml frisches Kulturmedium hinzugegeben, und die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 in neue Kulturgefäße aufgeteilt.

Zu den MCF 10A Zellen wurden zunächst 4mL MCF-10A Stopp, bestehend aus Kulturmedium und FBS Gold im Verhältnis 1:10, hinzupipettiert. Danach wurden die Zellen bei 1400 rpm 5 Minuten lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dem Zellpellet wurde daraufhin 5 ml HBSS hinzugegeben und erneut 5 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Kulturmedium gelöst und im Verhältnis 1:5 in neue Kulturgefäße aufgeteilt.

### 2.2.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um die Zellen einzufrieren wurden diese, wie im Abschnitt „Zellkulturführung“ beschrieben, mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit Kulturmedium versetzt und danach bei 1400 rpm 4 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in Einfriermedium (Kulturmedium + 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Kryoröhrchen wurden zunächst in Styroporbehältern bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und anschließend bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren, bevor diese bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

In früheren Versuchen zeigte sich, dass es nicht möglich ist, die stabilen Transfektanten mit Geneticin einzufrieren, da die Zellen durch das Antibiotikum so stark geschädigt werden, dass eine weitere Kultivierung nach dem Auftauen nicht mehr durchführbar ist. Darum wurde beim Einfrieren der stabilen Transfektanten sowohl dem Kulturmedium, als auch dem Einfriermedium kein G-418 mehr zugesetzt.

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen, wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Anschließend wurden diese in Kulturgefäße mit vorgewärmten Medium überführt. Die permanent exprimierenden Zelllinien wurden beim ersten Mediumwechsel wieder mit dem Antibiotikum G-418 versetzt. Die aufgetauten Zellen wurden erst nach drei Passagen wieder für Versuche verwendet.

### 2.2.3. Die Transfektion

Das Einbringen von Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Diese Gen-Transfer-Technologie ist ein maßgebliches Instrument zur Erforschung von wichtigen intrazellulären Prozessen, wie die Expression von Proteinen oder die Funktion von Genen. Die meistverwendeten Transfektionsmethoden erfolgen entweder mit Hilfe von Chemikalien, physikalischen Prozessen, viralen Methoden oder durch kationische Lipide.

Zu den chemischen Transfektions-Chemikalien zählen etwa das DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-dextran), ein kationisches Polymer, welches durch seine positive Ladung in enger Assoziation zur negativ geladenen Zellmembran steht und so durch Endozytose aufgenommen werden kann. Diese Methode eignet sich allerdings nur für die transiente Transfektion (Pillai et al., 2008).

Eine weitere Technik, die in den frühen 1970igern an Popularität gewann, ist die Transfektion durch eine Calcium-Phosphat-Co-Präzipitation. Hier wird durch die kontrollierte Vermengung von DNA mit Calcium Chlorid und einer gepufferten Phosphat-Lösung ein Präzipitat erzeugt, welches durch Endozytose oder Phagozytose von den zu transfektierenden Zellen aufgenommen wird. Diese Methode kann sowohl für die transiente, als auch für die stabile Transfektion angewendet werden (Jordan & Wurm, 2003).

Physikalische Methoden für den Gen-Transfer wurden in den frühen 1980igern entdeckt. Hier ist zunächst die direkte Mikroinjektion zu erwähnen, bei welcher die Nukleinsäuren mit Hilfe feiner Nadeln in die jeweiligen Zellen eingebracht werden. Diese Technik wurde vor allem für Versuche verwendet, welche mit einem DNA-Transfer in embryonale Stammzellen einhergingen. Eine weitere physikalische Technik zur Transfektion, die Elektroporation, wurde vor allem bei Zelllinien verwendet, welche durch andere Methoden sehr schwer zu transfektieren waren. Das Durchdringen der Zellmembran wird bei diesem Verfahren durch einen elektrischen Impuls ermöglicht, welcher Poren in der Membran bildet, durch welche die Nukleinsäuren in die Zellen gelangen können (Kim & Eberwine, 2010; Bockamp et al, 2002).

Die virale Form der Transfektion bietet eine alternative Methode zur Einbringung von fremden Genen in Zellen und eine mögliche Option für die in vivo-Transfektion. Die hierfür benötigten Vektoren enthalten entweder Adenoviren, Herpes-

Simplex-Viren, Retroviren oder auch Lentiviren. Die Vorteile dieser Technik zeigen sich in einer hohen Transfektions-Effizienz, da es beispielsweise bei der Transfektion mittels adenoviraler Vektoren möglich ist in kurzer Zeit eine große Anzahl an humanen Zellen zu infizieren. Auch können diese Vektoren große DNA-Segmente aufnehmen und sind durch rekombinante DNA-Techniken relativ leicht zu manipulieren. Die Nachteile dieses Verfahrens zeigen sich einerseits in seiner Labor-Intensität bezüglich der adenoviralen Vektoren und andererseits in der Gefahr einer Aktivierung latenter Krankheiten, betreffend der Verwendung von Retroviren (Vorburger and Hunt, 2002; Anson, 2004).

Für unsere Versuche kamen synthetische kationische Lipide zur Anwendung. Hierbei assoziiert die kationische Gruppe der Lipid-Verbindung mit den negativ geladenen Phosphaten der Nukleinsäure (Felgner et al., 1987). Die Aufnahme in die Zelle erfolgt wahrscheinlich über Endozytose oder über die liposomale Fusion mit der Zellmembran. Einige Vorteile dieser Methode zeigen sich in einer hohen Transfektionseffizienz, in der Möglichkeit auch RNA oder Proteine zu übertragen oder aber auch in der Fähigkeit Zelllinien zu transfektieren, welche gegenüber Calcium-Phosphat oder DEAE-Dextran resistent sind.

Wir verwendeten das TransFast<sup>TM</sup> Transfektionsreagenz, bei welchem eine polykationische Gruppe an eine Lipid-Gerüststruktur gebunden ist. Dieses, ursprünglich als trockener Lipid-Film gelieferte Reagenz, bildet bei Kontakt mit Wasser multilamelläre Vesikel, mithilfe derer es in die Zelle aufgenommen werden kann.

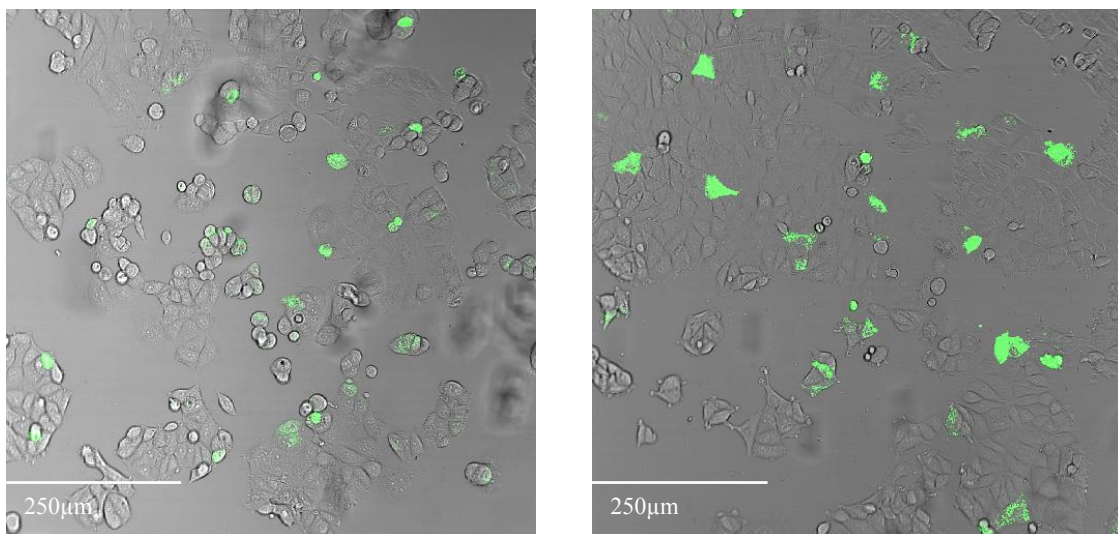
Das TransFast<sup>TM</sup> Transfektionsreagenz kann für in vitro und in vivo-Versuche, für die transiente und stabile Transfektion verwendet werden (Bennett et al., 1997; Tanner et al., 1997).

### 2.2.3.1. Transiente Transfektion

Bei dieser Art der Transfektion wird die DNA mithilfe eines Plasmids in die Zielzellen eingebracht, von diesen jedoch nur für eine begrenzte Zeit aufgenommen. In unseren Versuchen handelte es sich um eine Fusion zwischen dem GIRK1-, oder GIRK4-Protein mit der gelben Form des grünen Fluoreszenz-Proteins (eYFP). Nach erfolgreicher Transfektion erschienen so die Zellen unter dem Konfokalmikroskop bei Anregung durch einen 514nm Laser gelb.

Die zu transfektierenden Zellen wurden mit 0,25%igem Trypsin/EDTA abgelöst, und durch Auszählen mittels Neubauer-Zählkammer mit einer Zelldichte von  $20 \times 10^4$  Zellen in einer 6-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht inkubiert, sodass diese am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ungefähr 80% erreichten.

In einem Eppendorf-Gefäß wurde  $1 \mu\text{L}$  der Plasmid-DNA mit  $3 \mu\text{L}$  Transfast<sup>TM</sup> und  $0,8 \text{ mL}$  des MEM-Mediums gemischt. Das DNA-Transfast-Gemisch wurde für 10 – 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium aus der Mikrotiterplatte entfernt, und die Transfektionsmischung auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei  $37^\circ\text{C}$ , wurden  $800 \mu\text{L}$  Zellkulturmedium hinzugegeben. Bereits 30 Minuten später, wurde ein vollständiger Mediumwechsel durchgeführt, um so das Risiko von Zelltod während des Transfektions-Intervalls zu verringern. Nach 24 Stunden standen die transfektierten Zellen zur Weiterverwendung zur Verfügung (vgl. Abb. 2.2.).



**A)** transfektierte MCF-7 Zellen mit dem **B)** transfektierte MCF-7 Zellen mit dem YFPN1-rG1 Konstrukt. YFPN1-hG4 Konstrukt.

**Abbildung 2.2.** Konfokalmikroskopische Aufnahmen (20x Objektiv) von transient transfektierten MCF-7 Zellen.

### 2.2.3.2. Stabile Transfektion

Das Ziel bei dieser Art der Transfektion ist es, einzelne Klone, welche die transfektierte DNA ins zelluläre Genom integriert haben, zu isolieren und weiter zu vermehren und zu kultivieren. Um die untransfektierten Zellen von denen zu trennen, welche die DNA dauerhaft aufgenommen haben, ist es wichtig einen permanenten Selektionsdruck aufrechtzuerhalten. Dies kann, wie in unserem Fall, antibiotikumsinduziert erfolgen, wenn die transfektierte DNA antibiotika-resistente Marker enthält. Vor Beginn der Selektion sollte allerdings die erforderliche Menge des Antibiotikums bestimmt werden, welche je nach Zelltyp stark variieren kann (Felgner et al, 1987).

Am Anfang der stabilen Transfektion werden die Zellen von Interesse wie gewohnt und im Kapitel 2.2.3.1. „Die transiente Transfektion“ beschrieben, transfektiert und vorerst noch in einem nicht-selektiven Medium behalten. Erst zwei Tage später wird dem Zellkultur-Medium das Antibiotikum zugegeben und somit die Selektion begonnen. Die Verwendung des selektiven Mediums wird sodann für zwei bis drei Wochen beibehalten, einschließlich regelmäßiger Medium-Wechsel, um die bereits abgestorbenen Zellen zu entfernen.

Sobald einzelne Kolonien erkennbar sind, erfolgt die Isolierung dieser. Die Methoden hierfür sind zahlreich und gehen vom Picken mittels Cloning cylinders oder Pipetten, bis hin zum Ausplattieren einzelner Zellen durch sehr starke Verdünnung der Zellsuspension. Wir entschieden uns zur Zellsortierung mithilfe der FACS-Analyse, welche im weiteren Verlauf noch genauer beschrieben wird. Den dadurch gewonnenen einzelnen Zellen ist es somit möglich sich in klonalen Gruppen zu vermehren und sich somit zu einer neuen Zelllinie zu etablieren.

Als Mittel zur Selektion kam das Antibiotikum Geneticin® (G-418) zur Anwendung. Die Struktur dieser Substanz ist dem Gentamicin, Neomycin und Kanamycin ähnlich und stammt aus der Gruppe der Aminoglycoside. Dementsprechend bewirkt G-418 über die Bindung an die 80S Untereinheit der Ribosomen die Verhinderung der Elongation und somit eine Hemmung der Proteinbiosynthese. Da dieser Wirkungsmechanismus allerdings nicht nur in prokaryotischen, sondern auch in

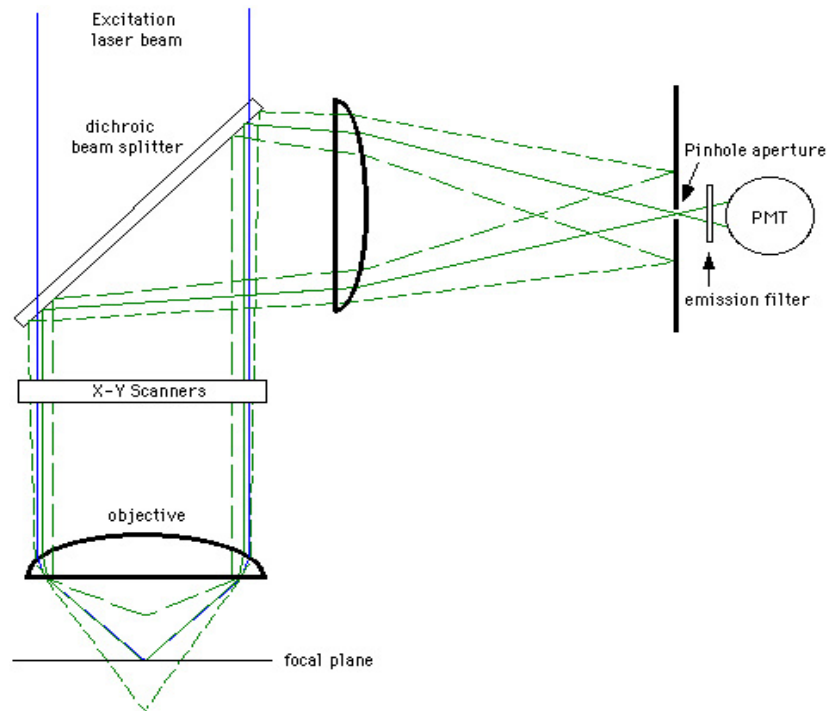
eukaryotischen Zellen wirkt, ist Geneticin® nicht therapeutisch einsetzbar und kommt somit nur in der Zellbiologie zur Anwendung.

Die Selektion stabil transfektierter Zellen erfolgt einerseits über die Zelltoxizität des Antibiotikums, welche zu einer Elimination nicht-transfektierter Zellen führt und andererseits durch das Einschleusen eines Neomycin-Resistenzgens (Neo<sup>r</sup>). Dieses Gen kodiert für eine Aminoglycosid-Phosphotransferase, welche über die Modifizierung der Amino- oder Hydroxylgruppe des Geneticins® zu einer Inaktivierung desselbigen führt. Somit ist es nur den stabil transfektierten Zellen möglich sich in einem Medium, welches mit G-418 versetzt ist, anzusiedeln. (Davis & Jimenez, 1980; Argyle, Tumbula & Leigh, 1996).

### 2.2.4. Konfokalmikroskopie

Zur mikroskopischen Darstellung der Fluoreszenzeigenschaften der Zellen kam ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop vom Typ SL2, basierend auf dem Mikroskopstativ DM IRE2 der Firma Leica zur Anwendung. Hierbei handelt es sich um ein Lichtmikroskop, bei welchem eine Lichtquelle (in unserem Fall ein Laser) durch ein Objektiv, nicht wie bei herkömmlichen Mikroskopen ein gesamtes Präparat, sondern nur einen kleinen, beugungsbegrenzten Ausschnitt dessen fokussiert. In diesem Bereich rastert der Laser das Objekt punktweise ab. Das reflektierte Licht, bzw. die dadurch emittierte Fluoreszenz gelangt durch dasselbe Objektiv zu einer Photoelektronenvervielfacherröhre (engl. photomultiplier tube, PMT), welche als Detektor dient. Mithilfe einer Lochblende (engl. pinhole) trifft nur das fokussierte Licht auf den Detektor, und Lichtstrahlen, welche sich außerhalb dessen befinden, werden geblockt (siehe Abb. 2.3.).

Das Fluoreszenzprotein wird durch eine bestimmte Laser-Wellenlänge angeregt. Diese wird durch den AOTF (acousto optic tunable filter) bestimmt. Der dichroitische Strahlteiler (engl. beam splitter), bei welchem es sich um ein Glasplättchen mit teilreflektierender Beschichtung handelt, reflektiert zudem das polarisierte Licht des Lasers, um lediglich die Transmission des Fluoreszenz-Lichtes zu ermöglichen. (Cox, 2002).



**Abbildung 2.3.** Prinzip der konfokalen Mikroskopie  
([www.gonda.ucla.edu/bri\\_core/confocal.htm](http://www.gonda.ucla.edu/bri_core/confocal.htm))

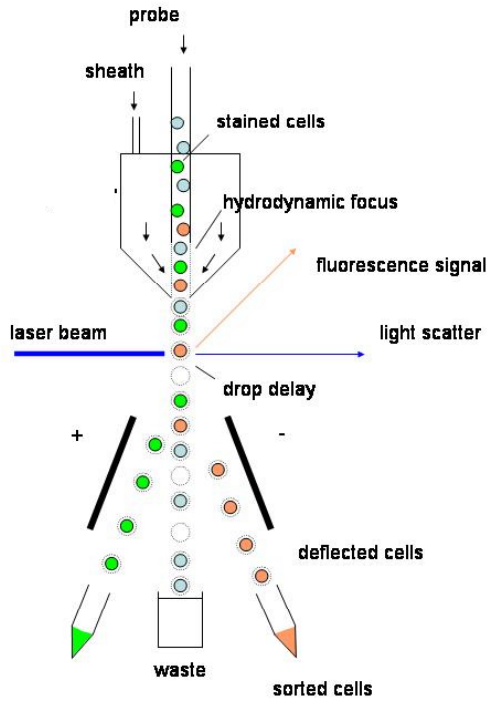
Für unsere Versuche verwendeten wir 20x (NA: 0,5) und 63x (NA: 1,20) Wasserimmersions-Objektive. Die Auflösung der Lichtintensität pro pixel betrug 8 bit (entspricht  $2^8 = 256$  verschiedenen Grauwerten). Die horizontale bzw. vertikale Auflösung betrug 512\*512 pixel (20x) bzw. 1024\*1024 pixel (63x). Die Anregung der Proteinfluoreszenz erfolgte durch einen Argon-Laser bei 514nm, der Beam splitter war ebenfalls auf 514nm eingestellt. Die Wellenlängen des Detektionsfensters lagen bei 540nm bis 570nm. Der Pinhole-Durchmesser lag bei einer Airy-Unit von 1.

### **2.2.5. Isolierung stabil transfektierter Klone mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

Mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS, engl. fluorescence activated cell sorting) gelingt eine quantitative und qualitative Vermessung intakter Zellen und darauf basierend, die Sortierung dieser.

Die Zellen von Interesse werden als Zellsuspension in einer Hüllflüssigkeit (engl. sheath fluid) transportiert. Diese dient dazu, den Probenstrom zu umhüllen und eine Zentrierung desselben zu bewirken, sodass dieser in einer Sequenz von Einzelzellen am Laser vorbeigeführt wird. Am Messpunkt, an dem der Probenstrom im rechten Winkel auf den Laser trifft, kommt es zur Streuung des Anregungslichts und zur Fluoreszenz-Anregung. Zugleich werden hier die Zellen auch bezüglich ihrer molekularen und physikalischen Eigenschaften analysiert.

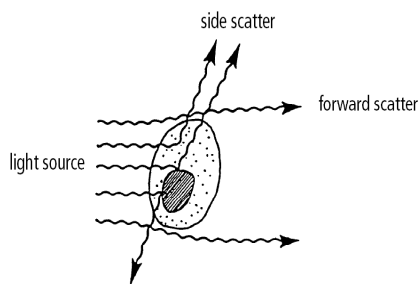
Das Licht, welches durch die Zelle in einem kleinen Winkel zum Laser-Strahl abgelenkt wird, wird als Vorwärtsstreulicht bezeichnet (engl. forward scatter; FSC) und ist ein Maß für die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter; SSC) stellt die Lichtstreuung in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl dar. Das SSC hängt von der Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Kompartimente ab und beschreibt somit die Granularität der Zelle (vgl. Abb. 2.4. und 2.5.).



**Abbildung 2.4.**

*Prinzip der Durchflusszytometrie*

*([www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/engl.Websites/zytometrie-engl.jsp](http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/engl.Websites/zytometrie-engl.jsp))*



**Abbildung 2.5.**

*Darstellung der Lichtstreuung durch die Zelle.*

*(BD FACSAria User's Guide; [ncxt.lbl.gov/files/lab/BD\\_Aria\\_manual.pdf](http://ncxt.lbl.gov/files/lab/BD_Aria_manual.pdf)).*

Die Fluoreszenz-Signale werden ebenfalls im rechten Winkel zum Laser-Strahl detektiert. Durch Bandpassfilter und Farbteilerspigel werden die verschiedenen Farbstoffe in ihre Emissionsspektren aufgetrennt. Photomultiplier (PMT) detektieren die Lichtsignale und wandeln diese in elektrische Signale um.

Für die graphische Darstellung der analysierten Daten dienen Histogramme oder Dot-Plots. Das Histogramm ist die einfachste, eindimensionale Darstellung der Intensitätsverteilung für einen Parameter. Hierbei wird die Intensität der gemessenen Signale (z.B. der Fluoreszenz) auf der x-Achse aufgetragen. Die Werte der y-Achse zeigen die Zahl der analysierten Zellen.

Dot-Plots (Punktwolkendarstellungen) sind zweidimensionale Darstellungen von Messwerten, bei welchen die Intensitätsverteilungen von zwei Parametern auf der x- und y-Achse gezeigt werden. Die Intensität jeder gemessenen Zelle wird hier als Punkt („dot“) an der x- und y-Position dargestellt und als „Event“ bezeichnet. Aufgrund dessen ist es möglich zu erkennen, ob die jeweiligen Parameter unabhängig voneinander verteilt sind oder in ihrer Expression miteinander korrelieren (Sack, Támok & Rothe 2007).

Für die Zellsortierung im Rahmen dieser Arbeit kam ein FACSAria (BD Biosciences) zur Anwendung. Dieses Zytometer erlaubt mit drei Lasern die Detektion von bis zu 10 Fluoreszenzfarben. Die Messgeschwindigkeit liegt bei bis zu 25 000 Zellen pro Sekunde. Die Datenauswertung erfolgt mittels FACSDiva acquisition/analysis software (siehe [www.meduni-graz.at/zmf/971](http://www.meduni-graz.at/zmf/971)).

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Bestimmung der Transfektionseffizienz

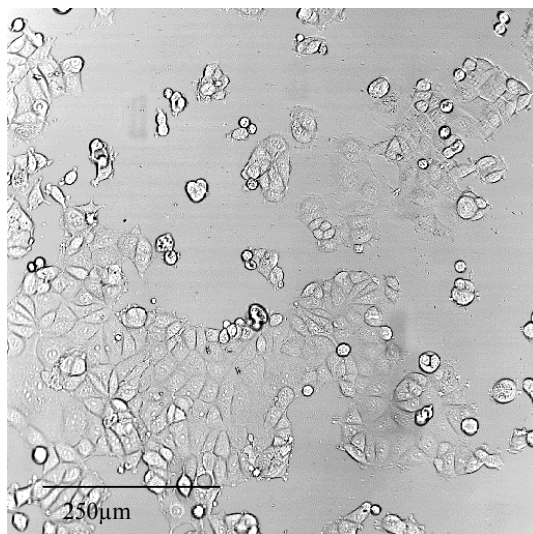
Zur Ermittlung der Effektivität der Transfektion wurden MCF-7-Zellen (Passage-Nr. 42) mit verschiedenen Mengen des Konstrukts YFPN1-rG1, bzw. YFPN1-hG4 und verschiedenen Mengen des Transfektionsreagens „TransFast<sup>TM</sup>“ transfektiert und anschließend die Anzahl der fluoreszierenden Zellen mittels eines Konfokalmikroskops bestimmt.

MCF-7-Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $30 \times 10^4$  Zellen in zehn Petrischalen ausgesät. Das Gesamtvolumen in der Zellkulturschale betrug 15ml. Am darauf folgenden Tag wurden sechs der Schalen mit YFPN1-rG1, eine mit YFPN1-hG4 und zwei mit dem Vektor transfektiert, eine Schale wurde als Kontrolle mitgeführt. Nach 24 Stunden wurden Bilder der Zellen zur Bestimmung der Fluoreszenz mittels Konfokal-Mikroskopie (20x Objektiv) erstellt (siehe Abb. 3.1.). Anschließend wurde anhand von zwei Bildern der Anteil der fluoreszierenden Zellen an der Gesamtanzahl der Zellen durch händische Auszählung ermittelt.

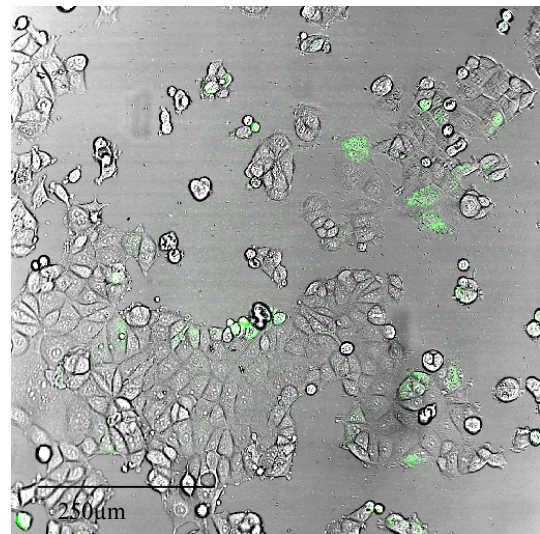
Die Auszählung hat ergeben, dass die Transfektion mit einer DNA-Menge von  $1 \mu\text{l}$  und einer TransFast-Menge von  $3 \mu\text{l}$  bei YFPN1-rG1 die höchste Effektivität erreicht hat (14,9 % transfektierte Zellen). Bei YFPN1-hG4 wurde mit demselben Verhältnis eine ausreichende Transfektionseffizienz von 8,4 % erzielt (siehe Tabelle 3.1.).

	Volumen d. DNA-Lösung	Volumen d. TransFast-Lösung	Gesamt-Anzahl der Zellen	Anzahl der fluoreszierenden Zellen	Effektivität
<b>YFPN1-rG1</b>	9 µl	3 µl	920	93	10,1 %
	1 µl	3 µl	544	81	14,9 %
	9 µl	1 µl	680	52	7,6 %
	1 µl	1 µl	925	21	2,3 %
	1 µl	0,3 µl	300	27	9,0 %
	0,3 µl	0,3 µl	495	4	0,8 %
<b>Vektor</b>	9 µl	3 µl	351	84	23,9 %
	1 µl	1 µl	501	90	18,0 %
<b>Kontrolle</b>	0 µl	0 µl	1091	0	0,0 %
<b>YFPN1-hG4</b>	1 µl	3 µl	789	66	8,4 %

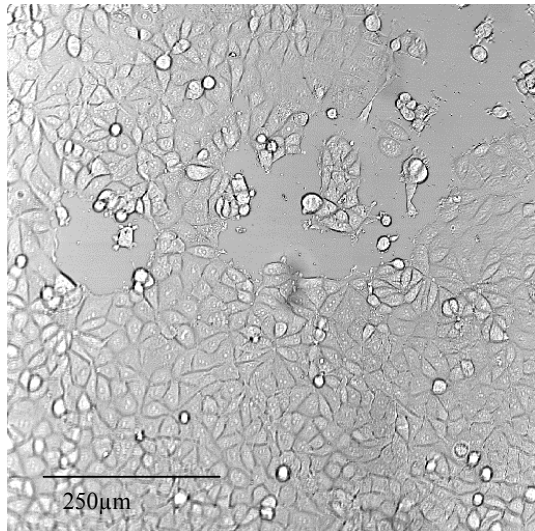
*Tabelle 3.1. Auswertung zur Bestimmung der Transfektionseffizienz.*



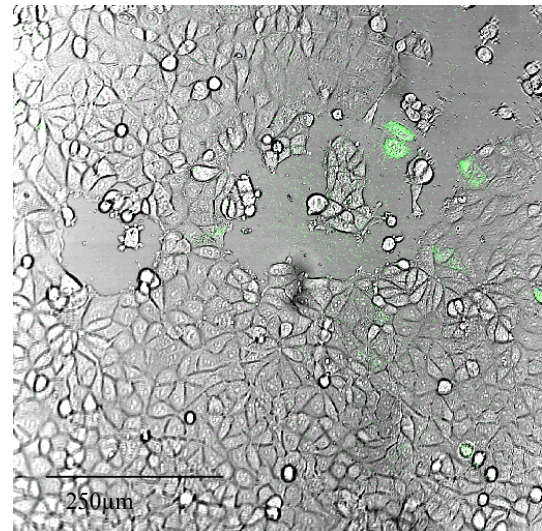
**A)** Transmissionsbild von transfektierten MCF-7 Zellen (YFPN1-rG1); Verhältnis DNA: Transfast™ beträgt 1:3.



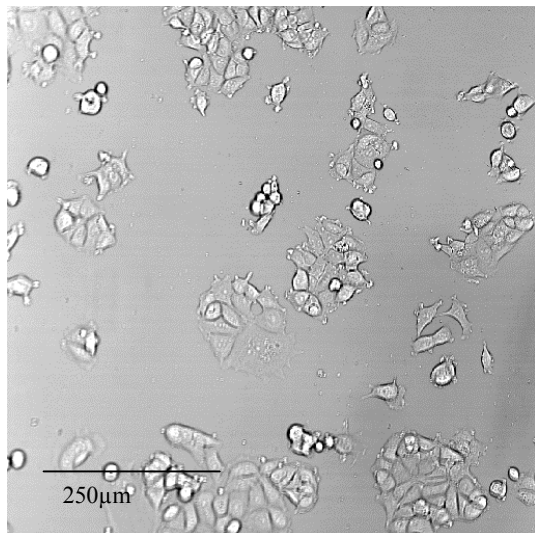
**B)** Transmissionsbild mit Fluoreszenzoverlay von transfektierten MCF-7 Zellen (YFPN1-rG1); Verhältnis DNA: Transfast™ beträgt 1:3.



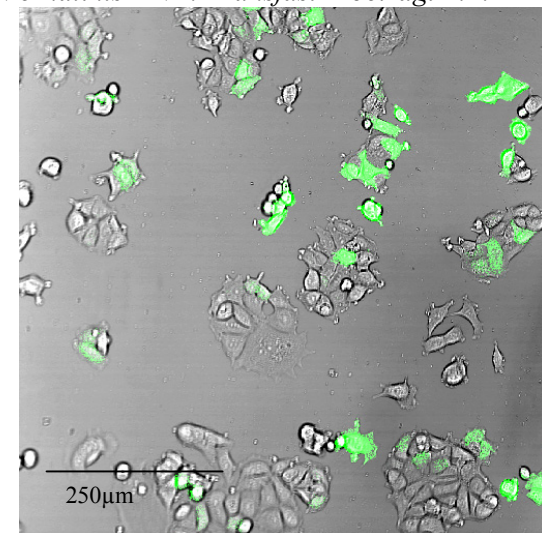
**C)** Transmissionsbild von transfektierten MCF-7 Zellen (YFPN1-rG1);  
Verhältnis DNA: Transfast™ beträgt 1:1.



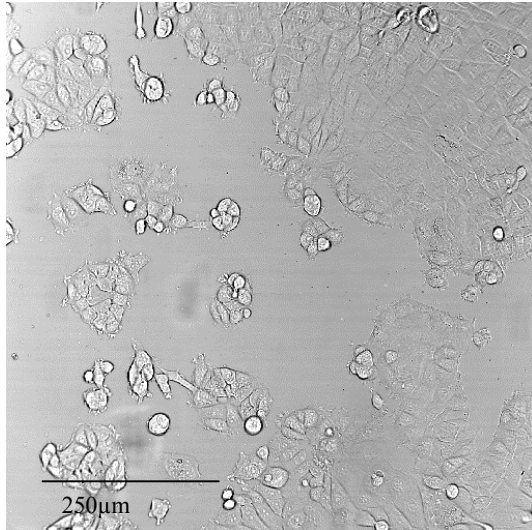
**D)** Transmissionsbild mit Fluoreszenzoverlay von transfektierten MCF-7 Zellen (YFPN1-rG1);  
Verhältnis DNA: Transfast™ beträgt 1:1.



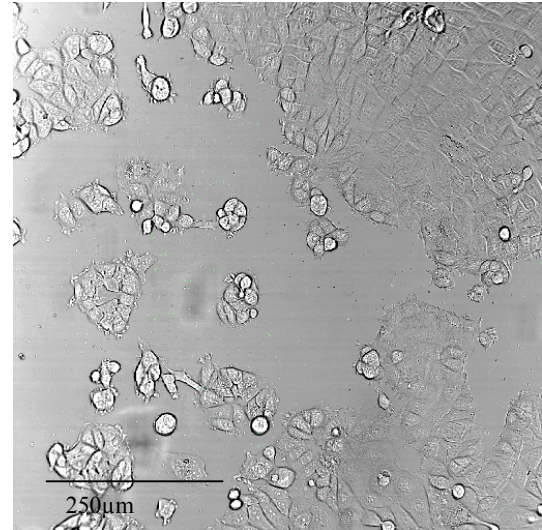
**E)** Transmissionsbild von transfektierten MCF-7 Zellen (YFPN1);  
Verhältnis DNA: Transfast™ beträgt 9:3.



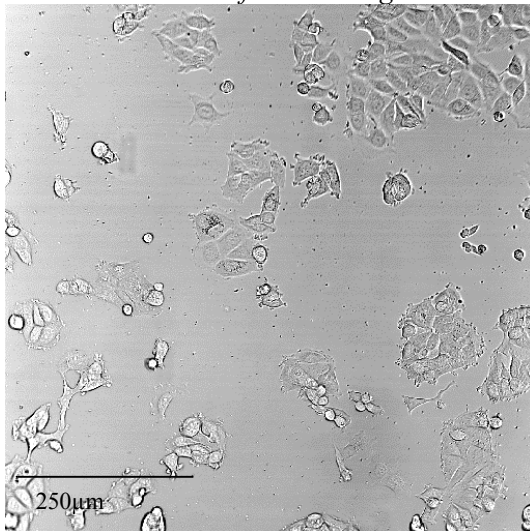
**F)** Transmissionsbild mit Fluoreszenzoverlay von transfektierten MCF-7 Zellen (YFPN1);  
Verhältnis DNA: Transfast™ beträgt 9:3.



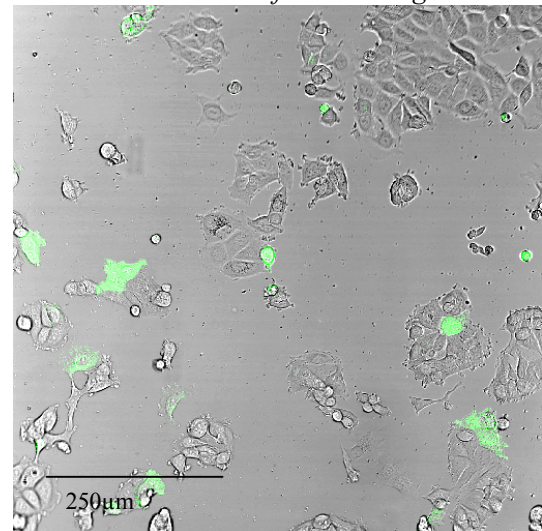
**G)** Transmissionsbild von untransfektierten MCF-7 Zellen;;  
Verhältnis DNA: Transfast™ beträgt 0:0..



**H)** Transmissionsbild mit Fluoreszenzoverlay von untransfektierten MCF-7 Zellen;  
Verhältnis DNA: Transfast™ beträgt 0:0.



**I)** Transmissionsbild von transfektierten MCF-7 Zellen (YFPNI-hG4);  
Verhältnis DNA: Transfast™ beträgt 1:3.



**J)** Transmissionsbild mit Fluoreszenzoverlay von transfektierten MCF-7 Zellen (YFPNI-hG4);  
Verhältnis DNA: Transfast™ beträgt 1:3.

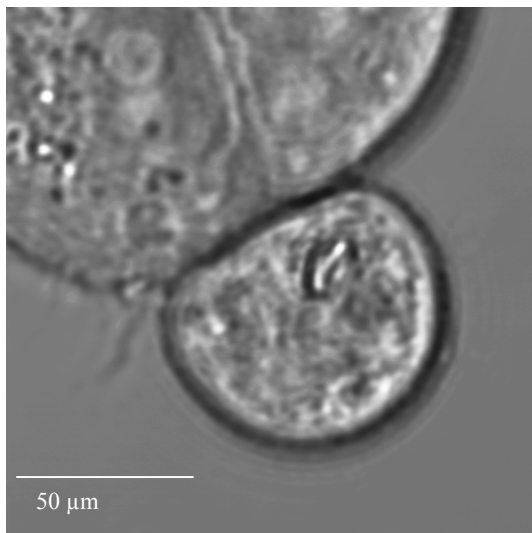
**Abbildung 3.1. (A-J):** Beispiele der konfokalmikroskopischen Aufnahmen (20x Objektiv) der Transfektionsreihe.

## 3.2. Subzelluläre Verteilung

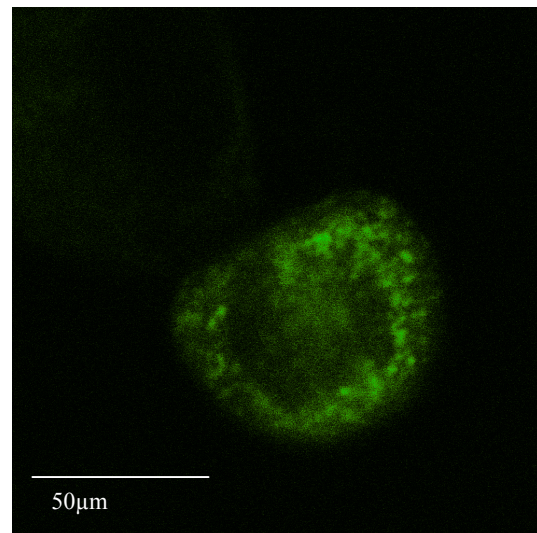
Um Rückschlüsse auf die intrazelluläre Verteilung von YFPN1-rG1, bzw. YFPN1-hG4 in transient transfektierten und stabil transfektierten MCF-7-Zellen ziehen zu können, wurde deren Fluoreszenz mittels Konfokal-Mikroskopie (63x Objektiv) beurteilt.

Bei transient transfektierten MCF-7-Zellen konnte eine charakteristische intrazelluläre Verteilung von YFPN1-rG1 in den intrazellulären Membranen, vermutlich im endoplasmatischen Retikulum, festgestellt werden. YFPN1-hG4 war teilweise auch in der Plasma-Membran lokalisiert (siehe Abb. 3.2.).

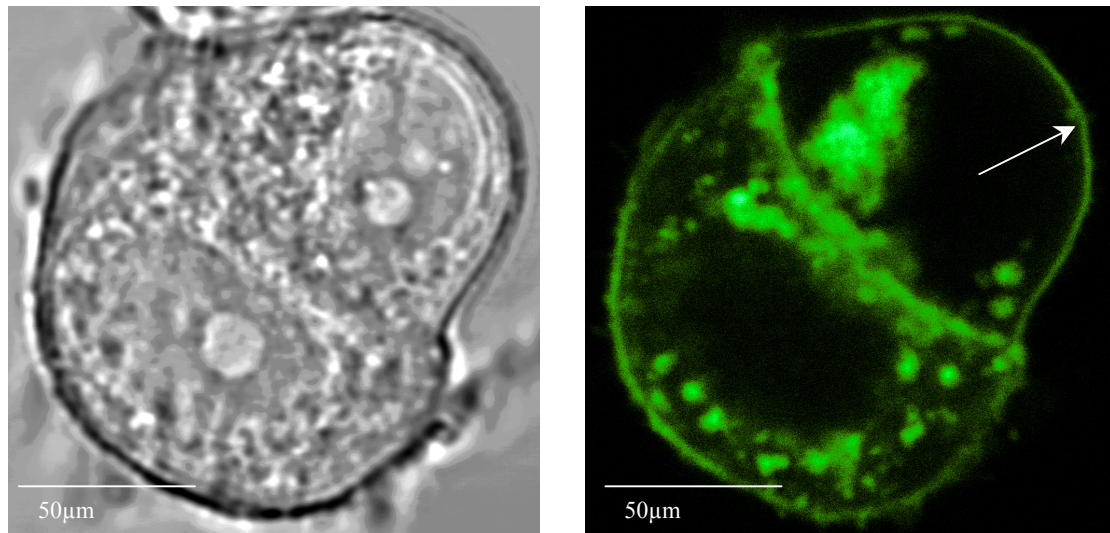
Bei den stabilen Transfektanten konnte man je nach Expressionsgrad unterschiedliche Verteilungen erkennen. Vor allem bei stark überexprimierenden Klonen war die typische Fluoreszenzverteilung, sowohl bei YFPN1-rG1 als auch bei YFPN1-hG4 nur eingeschränkt erkennbar (vgl. Kapitel 3.3.4. Charakterisierung der einzelnen Klone).



**A)** *Transmissionaufnahme einer transient transfektierten MCF-7 Zelle (YFPN1-rG1).*



**B)** *Intrazelluläre Verteilung der Fluoreszenz. Hier ist durch die nur partiell vorhandene Fluoreszenz der Effekt der transienten Transfektion gut erkennbar.*



**C)** Transmissionsaufnahme einer transient transfektierten MCF-7 Zelle (YFPN1-hG4) **D)** Membranverteilung der Fluoreszenz (siehe Pfeil)

**Abbildung 3.2. (A-D):** Konfokalmikroskopische Aufnahmen von MCF-7 Zellen (63x Objektiv)

### **3.3. Stabile Transfektion und Etablierung von Klonen**

Das Hauptziel der Arbeit war jenes, auf Grundlage der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 neue Zelllinien zu etablieren, welche entweder das GIRK1-eYFP- oder das GIRK4-eYFP-Konstrukt dauerhaft in ihr Genom integrieren und somit auch stabil exprimieren.

Nach der Ermittlung der passenden Antibiotikumsdosis zur Selektion der Klone, wurden die Zellen transfektiert und selektiert, um anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) Einzelzell-Kolonien zu kultivieren und in weiterer Folge als neue Zelllinie etablieren zu können.

#### **3.3.1. Ermittlung der G-418 Konzentration zur Selektion stabil transfektierter Zellen**

Als Vorbereitung zur stabilen Transfektion war es notwendig festzustellen, in welcher Menge das Antibiotikum dem Zellkulturmedium zugesetzt werden muss, um untransfektierte Zellen zu eliminieren. Die benötigte Konzentration ist allerdings spezifisch für jede Zelllinie. Ist die Dosis zu niedrig oder die Zelldichte zu gering, ist es den Zellen möglich der Selektion zu entgehen. Eine zu hohe Dosis führt zum Absterben aller Zellen. Somit ist eine individuelle Austestung essentiell. Idealerweise sollten die nicht-transfektierten Zellen innerhalb einer Woche nach Beigabe des Antibiotikums absterben (Southern and Berg, 1982).

Zur Ermittlung der passenden Antibiotikumsdosis für die Zelllinie MCF-7 wurden fünf verschiedene Konzentrationen des G-418 (0,2µg/ml, 0,5µg/ml, 1µg/ml, 2µg/ml und 3µg/ml) verwendet, jeweils in doppelter Ausführung. Darüber hinaus wurde dieser Versuch in der gleichen Art und Weise auch mit der Zelllinie MCF-10A durchgeführt.

Wie im Kapitel „Zellkulturführung“ beschrieben, wurden die jeweiligen Zellen zunächst gesplittet und mit einer Dichte von je  $15 \times 10^4$  Zellen pro Well in eine 12 Well-Mikrotiterplatte aufgeteilt. Nach zwei Tagen Inkubationszeit wurde mit der Austestung begonnen.

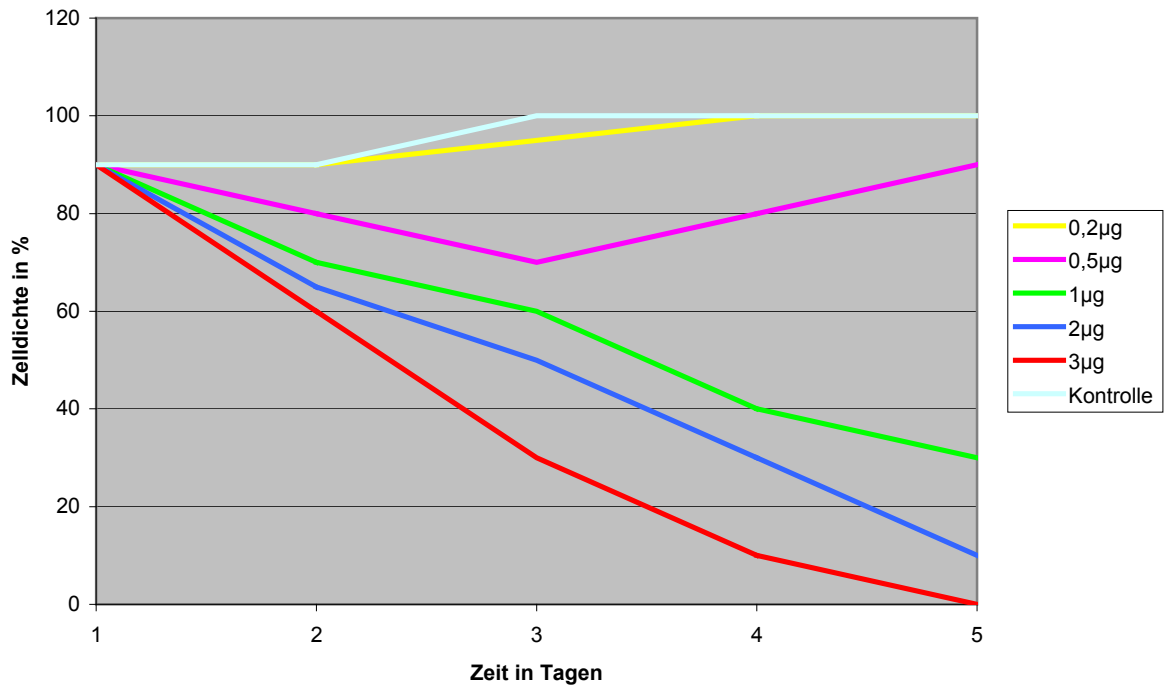
Zur Herstellung des selektiven Mediums, wurde das Antibiotikum Geneticin®, welches in Pulverform zu 5mg geliefert wurde, in 5ml Aqua dest. gelöst und die oben genannten Konzentrationen des Antibiotikums mit dem Medium vermischt. Um schließlich mit der Selektion zu beginnen, wurden die Zellen in den jeweiligen Wells mit dem entsprechenden Medium versorgt.

Ab diesem Zeitpunkt standen die Zellen unter regelmäßiger mikroskopischer Beobachtung. Der Verlauf dieser Austestung wurde anhand der Veränderungen der Zelldichte gemessen, welche als Prozentsatz der Zellkonfluenz bezogen auf die Größe der Wells angegeben wurde.

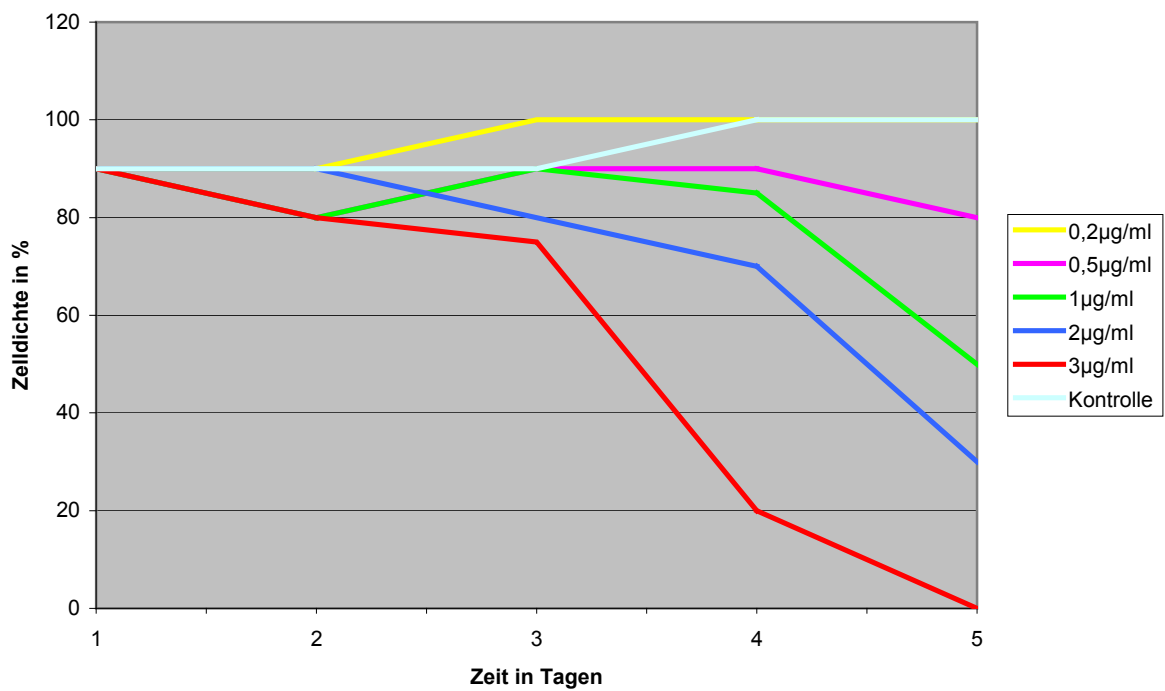
Beginnend bei 90% Konfluenz in allen Wells am ersten Tag der Austestung, wurden die Zellen fortan täglich um die gleiche Uhrzeit mikroskopisch beurteilt und die Elimination graphisch in Form von Diagrammen dargestellt (siehe Abb. 3.3.).

So konnte man beobachten, dass der Zellrasen bei den niedrigen Konzentrationen des Antibiotikums in seiner Größe bestehen blieb oder sogar noch weiterwuchs, während sich bei den beiden höchsten Konzentrationen ab dem 3. Tag eine deutliche Wirkung des G-418 zeigte.

Am 5. Tag der Austestung konnten schließlich bei einer Geneticin®-Konzentration von  $3 \mu\text{g/ml}$  bei beiden Zelllinien keine lebenden Zellen mehr festgestellt werden. Somit war die geeignete Antibiotikums-Dosis gefunden, mit welcher die darauffolgende stabile Transfektion durchgeführt werden konnte.



A) Verlauf der MCF-10A Zellelimination über die Zeit.



B) Verlauf der MCF-7 Zellelimination über die Zeit.

Abbildung 3.3. (A-B): „kill curve“ – graphische Darstellung der Mittelwerte aus den doppelt geführten Ansätzen der G-418 Austestung bei der Zelllinie MCF-7 und MCF-10A.

### 3.3.2. Stabile Transfektion von MCF-7 Zellen

Für die stabile Transfektion wurden zuerst die kultivierten MCF-7 Zellen, wie im Kapitel „Zellkulturführung“ beschrieben gesplittet und in eine 12 Well Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zelldichte betrug  $15 \times 10^4$  Zellen pro Well und es wurde vorerst noch das übliche Zellkulturmedium ohne Antibiotikum zugegeben.

Am darauffolgenden Tag, sobald sich die Zellen adhärent am Gefäßboden befanden, konnte mit der Transfektion begonnen werden. Der Ablauf ist identisch mit dem im Kapitel „Transiente Transfektion“ beschriebenen, allerdings variierten die Mengen der Plasmid-DNA und des Transfast<sup>TM</sup>. Benutzt wurden acht Slots und die Aufteilung war wie folgt:

- 1) 4µl YFPN<sub>1</sub> rGIRK1 + 1,5µl Transfast<sup>TM</sup>
- 2) 4µl YFPN<sub>1</sub> rGIRK1 + 1,5µl Transfast<sup>TM</sup>
- 3) 4µl YFPN<sub>1</sub> hGIRK4 + 1,5µl Transfast<sup>TM</sup>
- 4) 4µl YFPN<sub>1</sub> hGIRK4 + 1,5µl Transfast<sup>TM</sup>
- 5) 1µl YFPN<sub>1</sub> rGIRK1 + 1,2µl Transfast<sup>TM</sup>
- 6) 1µl YFPN<sub>1</sub> hGIRK4 + 1,2µl Transfast<sup>TM</sup>
- 7) Kontrolle
- 8) Kontrolle

Am nächsten Tag wurde das Medium jedes Wells gewechselt, allerdings nach wie vor mit dem nicht-selektiven Medium. Am zweiten Tag nach der Transfektion begann nun die Selektion durch Beimengung des Antibiotikums zum Zellkulturmedium. Die Konzentration des Geneticins® betrug, wie im Vorfeld ausgetestet 3µg/ml.

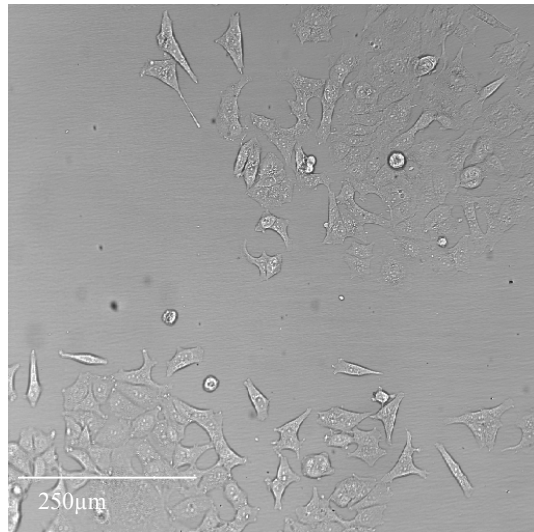
Ab diesem Zeitpunkt fand ein täglicher Mediumwechsel der gesamten Mikrotiterplatte mit dem selektiven Medium statt, um bereits abgestorbene Zellen zu verwerfen. Am 5. Tag nach Beginn der Selektion konnten bei den mitgeführten Kontroll-Wells, wie erwartet, keine lebenden Zellen mehr festgestellt werden. Am 10. Tag erfolgte eine erste Beurteilung der Zellen mittels Konfokalmikroskopie, um die stattgefundene Transfektion anhand der Fluoreszenz sicher nachzuweisen. Die Zellen wurden danach noch einige Tage weiter kultiviert und am 18. Tag nach Beginn der Selektion aufgrund der Beurteilungsergebnisse der Mikroskopie gesplittet. Der größte

Transfektionserfolg bezogen auf die Fluoreszenz war in Well 2), 4), 5) und 6) nachweisbar. Diese wurden in eine 6 Well Mikrotiterplatte transferiert.

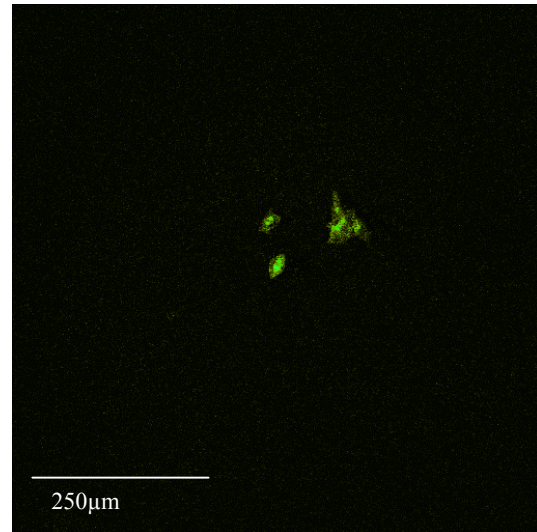
Beim Splitten wurden allerdings pro Well nur 250µl des 0,25%igen Trypsin/EDTA zum Ablösen der Zellen verwendet, und mit lediglich 1ml des G-418-Mediums abgestoppt. Anschließend wurde die gesamte Menge dieser Zellsuspension in das jeweilige Well pipettiert und mit weiteren 3ml des selektiven Mediums aufgefüllt.

Nach weiteren zwei Tagen Kultivierung, wurde schließlich am 20. selektiven Tag auch die 6 Well Mikrotiterplatte aufgrund des schnellen Zellwachstums gesplittet und die Zellen in Zellkulturfläschchen überführt. Für diesen Split wurden 0,5ml Trypsin/EDTA und 2ml G-418-Mediumstopp verwendet. Aus dieser Zellsuspension wurden danach 1,5ml entnommen, in das jeweilige Zellkulturfläschchen pipettiert und mit 3,5ml G-418-Medium aufgefüllt.

Aus diesem gewonnenen Zell-Stock wurden in weiterer Folge die Einzelzellen selektiert. vier Tage nach dem Split waren die transfektierten Zellen schlussendlich für die Zellsortierung mithilfe der FACS-Analyse bereit (siehe Abbildung 3.4.).



**A)** *Transmissionsaufnahme der Mischkultur.*



**B)** *Aufnahme von einzelnen fluoreszierenden Klonen in der Mischkultur.*

**Abbildung 3.4. (A-B):** *Konfokalmikroskopische Aufnahmen von stabil transfektierten MCF-7 Zellen (YFPN1-hG4) während der Selektionsphase als Mischkultur (20x Objektiv).*

### 3.3.3. Selektion stabil transfektierter Einzelzellen mittels FACS-Analyse

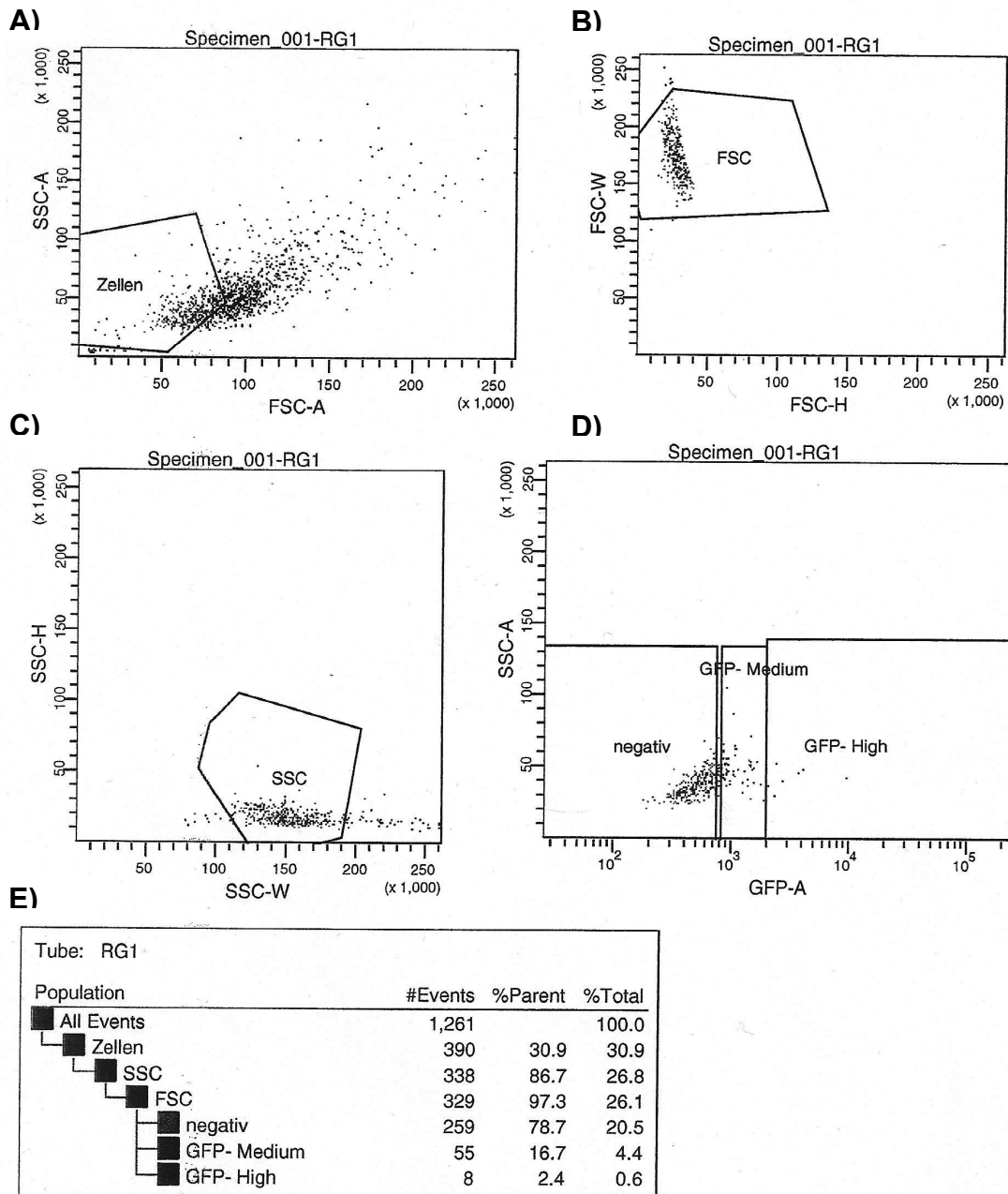
Die Isolierung der fluoreszierenden Einzelzellen aus den Mischkulturen und das damit verbundene Anzichten der gewonnenen Klone erfolgte am Zentrum für medizinische Forschung (ZMF) der medizinischen Universität Graz.

Gemessen wurden je ein Zellkulturfläschen der mit GIRK1 transfektierten Zellen (RG1) und eines der mit GIRK4 transfektierten Zellen (hG4). Wie in Kapitel 2.2.5. (Isolierung stabil transfektierter Klone mittels Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)) beschrieben, wurden folgende Parameter vermessen: FSC (forward scatter), SSC (side scatter) und GFP (green fluorescence protein). Die Darstellung der Messwerte erfolgte über Dot-Plots (Punktwolkendarstellungen) mit folgenden Parameter-Kombinationen:

- Zellgröße (FSC-A (area)) versus Zellgranularität (SSC-A)
- Zellgröße (FSC-H (height) versus FSC-W (width))
- Zellgranularität (SSC-H versus SSC-W)
- Fluoreszenz (GFP = green fluorescence protein) versus Zellgranularität

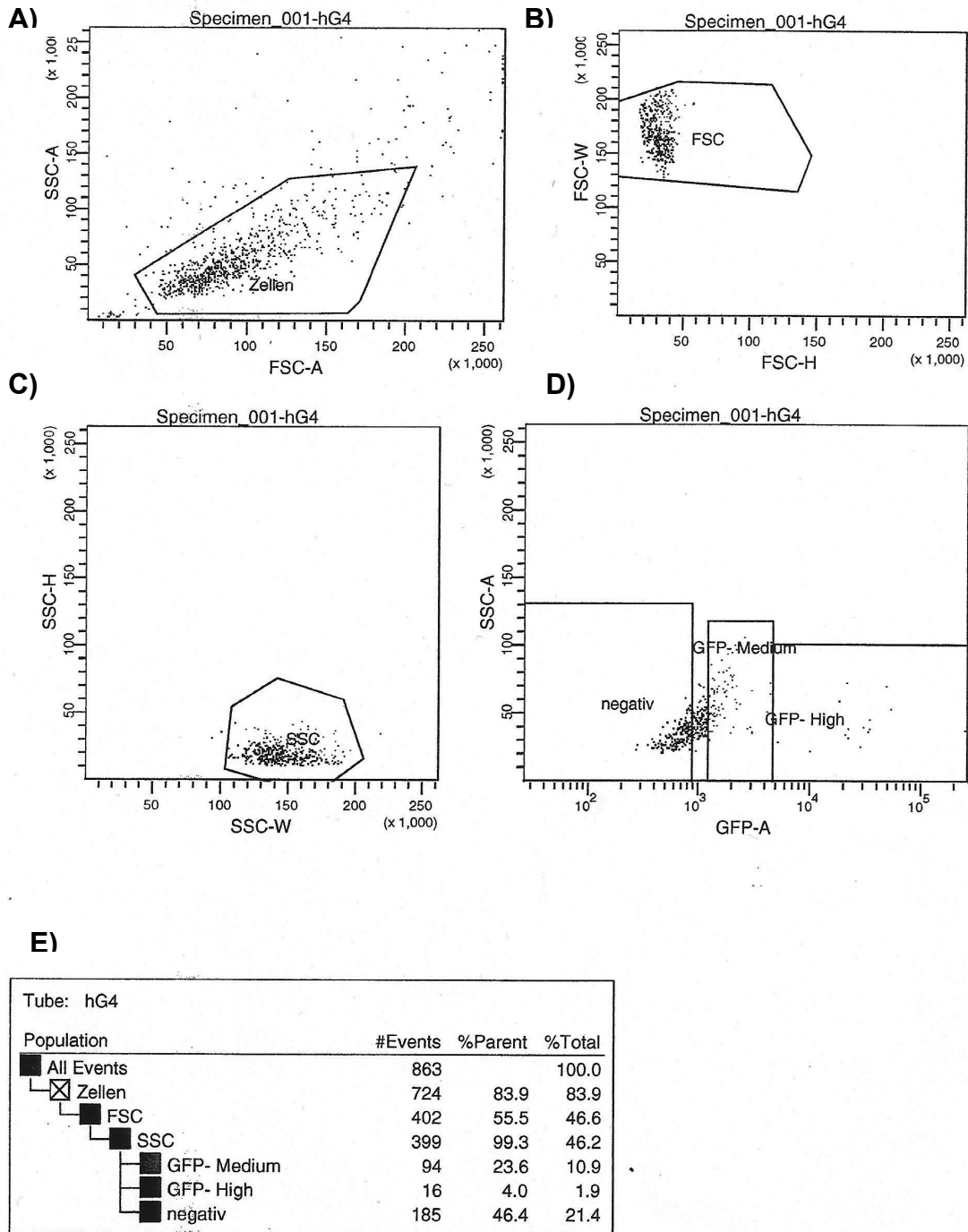
Innerhalb der Dot-Plots wurden bestimmte Regionen definiert und zur Identifizierung der gesuchten Zellpopulation (=fluoreszierend) verwendet. Die Zellen wurden, je nach Stärke der GFP Fluoreszenz, in die Gruppen „negativ“, „GFP-Medium“ und „GFP-High“ aufgeteilt. Die anhängenden Tabellen zeigen die gesamt gemessenen Events und die Anteile der gesuchten Events (vgl. Abb. 3.5. und 3.6.).

Die erhaltenen Klone wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten aufgeteilt. Von den ursprünglich 35 erhaltenen GIRK1-Klonen und den 16 erhaltenen GIRK4-Klonen, konnten sieben GIRK1-Klone (A-G) und fünf GIRK4-Klone (2-6) dauerhaft kultiviert und weiter charakterisiert werden (siehe Kapitel 3.3.4. Charakterisierung der einzelnen Klone).



**Abbildung 3.5. (A-E):** Dot-Plot Darstellungen der mit YFPNI-rG1 stabil transfektierten MCF-7 Zellen, in denen durch verschiedene Parameter-Kombinationen die fluoreszierenden Zellen von der übrigen Zellpopulation differenziert werden.

**A)** Selektion der als „Zellen“ erkannten Events. **B)** genauere Definition der Zellgröße (FSC). **C)** genauere Definition der Zellgranularität (SSC). **D)** Differenzierung der Zellen anhand der detektierten Fluoreszenz (GFP). **E)** Tabelle mit den relativen Anteilen der gemessenen Events.



**Abbildung 3.6. (A-E):** Dot-Plot Darstellungen der mit YFPN1-hG4 stabil transfektierten MCF-7 Zellen, in denen durch verschiedene Parameter-Kombinationen die fluoreszierenden Zellen von der übrigen Zellpopulation differenziert werden. **A)** Selektion der als „Zellen“ erkannten Events. **B)** genauere Definition der Zellgröße (FSC). **C)** genauere Definition der Zellgranularität (SSC). **D)** Differenzierung der Zellen anhand der detektierten Fluoreszenz (GFP). **E)** Tabelle mit den relativen Anteilen der gemessenen Events.

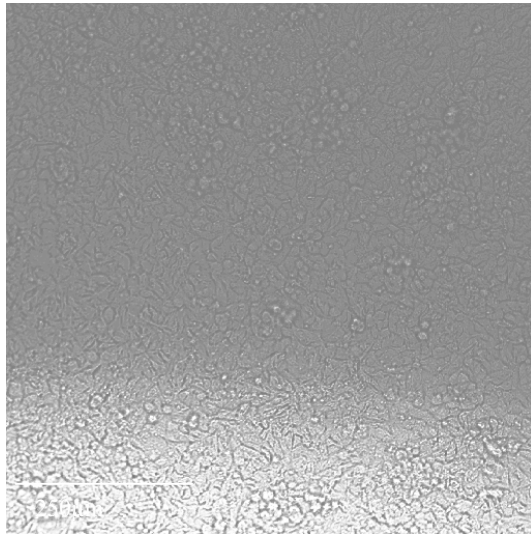
### 3.3.4. Charakterisierung der einzelnen Klone

Da die erhaltenen Klone unterschiedliche Merkmale bezüglich der Fluoreszenz, des Wachstums und der Expression aufweisen, erfolgt hier eine Charakterisierung hinsichtlich ihrer jeweiligen Eigenschaften basierend auf mikroskopischer Beobachtung (siehe Tab. 3.2. und Abb. 3.7.).

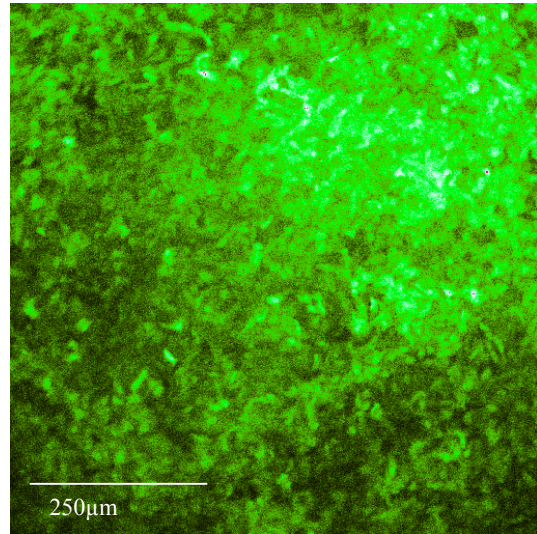
Die charakteristische Verteilung des Fluoreszenz-Proteins im Intrazellulärraum bei GIRK1 und in der Zellmembran bei GIRK4 ist bei den stabilen Transfektanten, im Gegensatz zu den transient transfektierten Zellen, nicht mehr in dieser Deutlichkeit erkennbar. So hat es den Anschein, dass vor allem bei den sehr stark fluoreszierenden GIRK4-Klonen das Fluoreszenz-Protein durch die Überexpression nicht nur in der Membran, sondern großteils auch in den intrazellulären Strukturen lokalisiert ist. Überdies weisen einige Klone eine regelmäßige Fluoreszenz-Verteilung über die gesamte Zelle auf (in der Tabelle als homogen beschrieben).

	Bezeichnung	Expressionsstärke	Wachstum	Expressionsmuster
GIRK1	Klon A	++++	+	Überexpression
	Klon B	+++	++	Homogen
	Klon C	++	+	membranverteilt
	Klon D	+	+++	homogen
	Klon E	++	++	intrazellulär
	Klon F	+	++	intrazellulär
	Klon G	++++	++	Überexpression
GIRK4	Klon 2	+++	+++	Überexpression,
	Klon 3	++	++	intrazellulär
	Klon 4	+	+	homogen
	Klon 5	+	+	membranverteilt
	Klon 6	+	++	membranverteilt

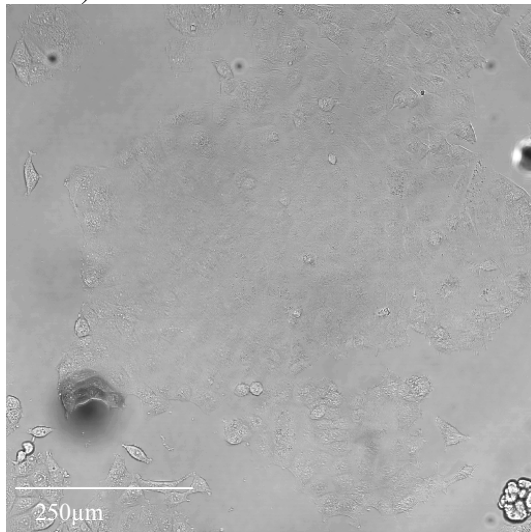
*Tabelle 3.2. Merkmale der stabil transfektierten Klone.*



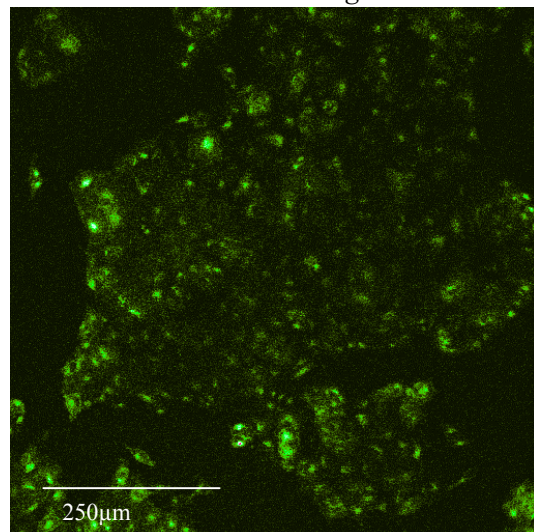
**A)** *Transmissionsaufnahme von Klon A (GIRK1)*



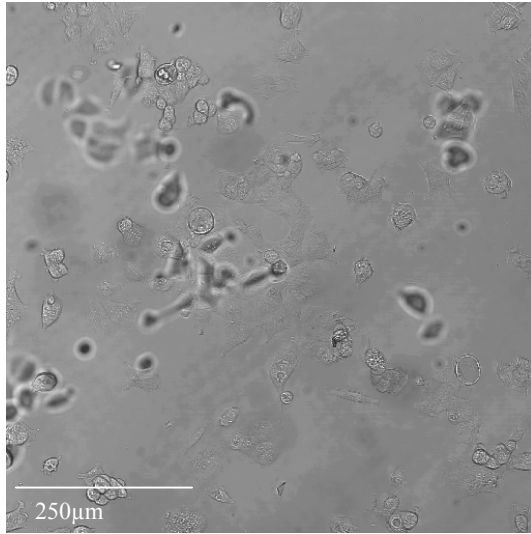
**B)** *Aufnahme von Klon A (GIRK1) mit der Fluoreszenzcharakterisierung ++++*



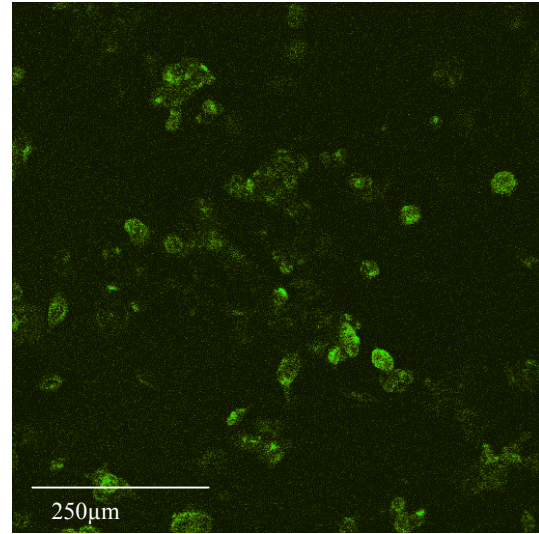
**C)** *Transmissionsaufnahme von Klon 2 (GIRK4)*



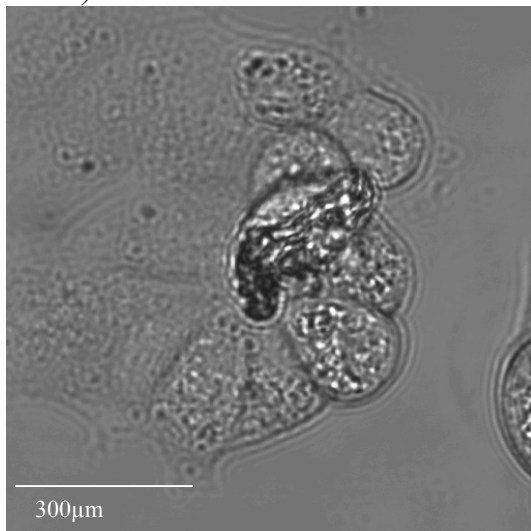
**D)** *Aufnahme von Klon 2 (GIRK4) mit der Fluoreszenzcharakterisierung +++*



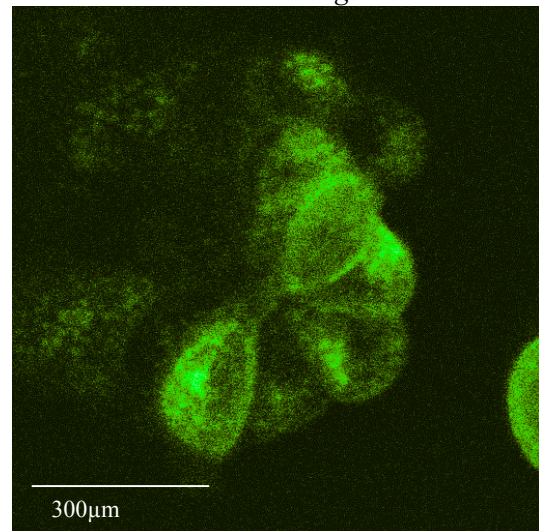
**E)** *Transmissionsaufnahme von Klon 4 (GIRK4)*



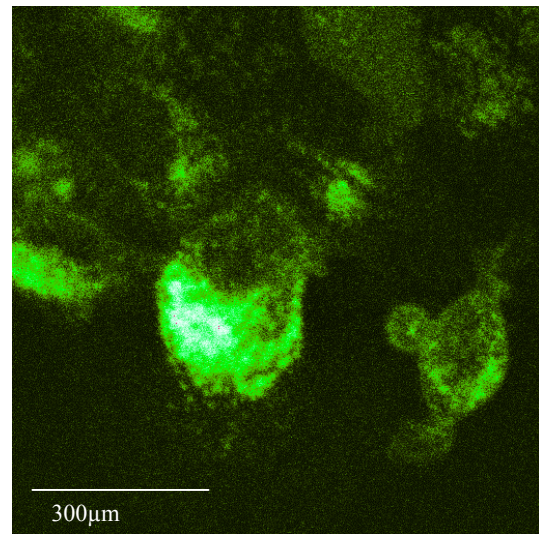
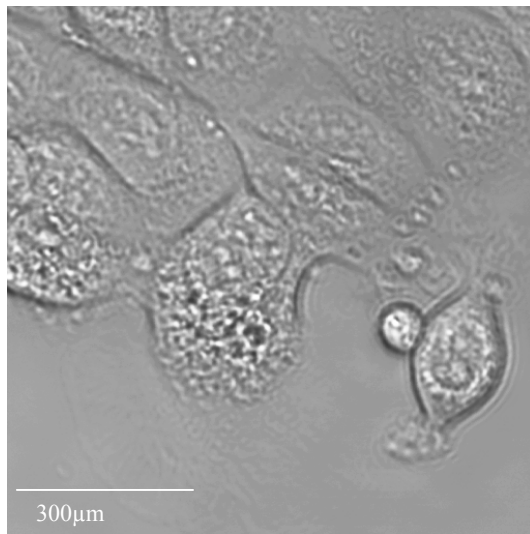
**F)** *Aufnahme von Klon 4 (GIRK4) mit der Fluoreszenzcharakterisierung +*



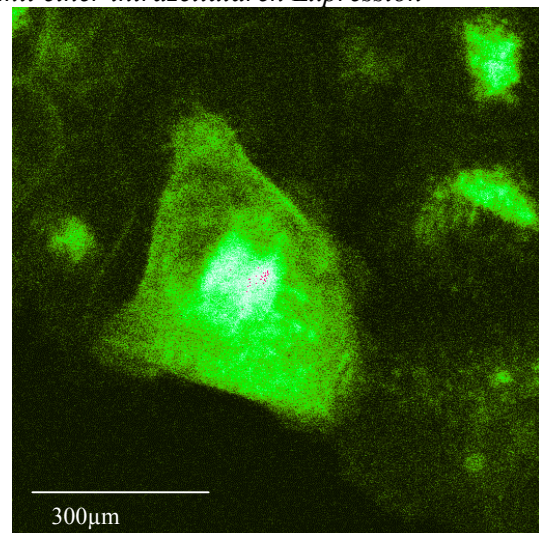
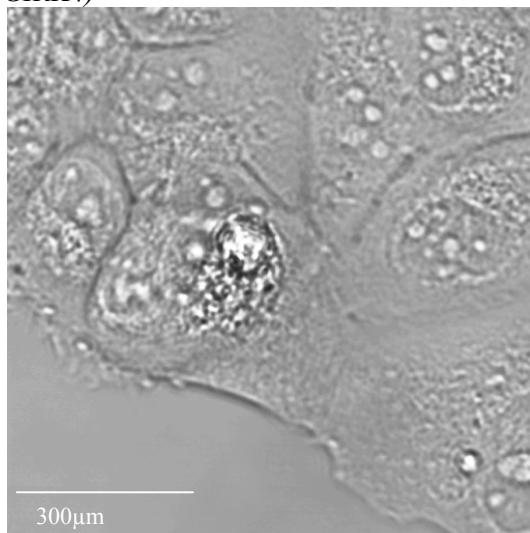
**G)** *Transmissionsaufnahme von Klon 4 (GIRK4)*



**H)** *Fluoreszenzaufnahme von Klon 4 (GIRK4) mit einer homogenen Expression*



**I)** *Transmissionsaufnahme von Klon 3 (GIRK4)*      **J)** *Fluoreszenzaufnahme von Klon 3 (GIRK4) mit einer intrazellulären Expression*



**K)** *Transmissionsaufnahme von Klon 2 (GIRK4)*      **L)** *Fluoreszenzaufnahme von Klon 2 (GIRK4) – durch Überexpression Verteilung in der Membran und im Zellinneren*

**Abbildung 3.7. (A-L):** *Konfokalmikroskopische Aufnahmen (20x und 63x Objektiv) der GIRK1 und GIRK4 Klone - Beispielbilder*

## 4. Diskussion

Die Erforschung der Bedeutung von GIRKs (G-protein activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels) in der Pathophysiologie des Brustkrebses, erfolgt meist auf Zellkultur-basierten Experimenten. In der Brustkrebs-Forschung stellt die Zelllinie MCF-7 ein standardisiertes und oft verwendetes zelluläres Brustkrebs-Modell dar.

Um im Rahmen dieser Arbeit spezifisch den Einfluss von GIRK1, bzw. GIRK4 auf das Verhalten von Brustkrebszellen untersuchen zu können, war die Transfektion der jeweiligen DNA in die Zellen ein essentieller Arbeitsschritt.

Basierend auf dieser Anforderung war das Ziel dieser Arbeit, das YFPN1-rG1, bzw. das YFPN1-hG4-Konstrukt nicht nur transient, sondern stabil in das Genom der MCF-7 Zellen zu integrieren und somit Klone als neue Versuchszelllinien zu etablieren. Die Arbeitstechnik hierfür befand sich in den 80iger Jahren noch in ihren Anfängen (vgl. Martin, Lohr & Dean, 1981) und variiert bis heute in ihren Details. Abhängig von der verwendeten Zelllinie und der Art der Kultivierung, macht dies eine sehr individuelle Anpassung erforderlich.

Vorbereitend zur stabilen Transfektion wurden die MCF-7 Zellen zunächst transient transfektiert und das Expressions-Verhalten der Proteinfuoreszenz konfokalmikroskopisch ermittelt. Die subzelluläre Fluoreszenz-Verteilung schien durch die vorwiegend intrazelluläre Anreicherung (vermutlich im endoplasmatischen Retikulum) von GIRK1 und die Membranverteilung von GIRK4 für das jeweilige Konstrukt charakteristisch zu sein.

Aus der stabilen Transfektion der MCF-7 Zellen und anschließenden Selektion von Einzelzell-Kolonien gingen sieben Klone (Klon A-G) hervor, welche das YFPN1-rG1 Konstrukt stabil in ihr Genom integrierten, und fünf Klone (Klon 2-6), welche das YFPN1-hG4 Konstrukt enthielten. Die stabilen Transfektanten zeigten ein interessantes Expressionsverhalten mit sehr unterschiedlichen Expressions-Intensitäten, allerdings war die erwartete charakteristische subzelluläre Fluoreszenz-Verteilung nicht mehr so eindeutig erkennbar wie bei den transienten Transfektanten.

So war vor allem bei den schwach fluoreszierenden Klonen noch die erwartete Verteilung der Fluoreszenz erkennbar, bei Klonen die stark fluoreszierten, war die Lokalisation der Fluoreszenz allerdings nicht mehr ausschließlich auf die erwarteten Zellregionen beschränkt, die Überexpression lässt eine genaue Zuordnung der Fluoreszenz zu einzelnen subzellulären Strukturen nicht zu.

Es ist auch durchaus anzunehmen, dass die Expressionsstärke einen Einfluss auf das Wachstum der jeweiligen Zelllinie hat. Es zeigte sich, dass Klone, welche das Fluoreszenz-Protein sehr stark exprimierten ein eher langsames Wachstum aufwiesen. Schwach exprimierende Klone zeigten allerdings sehr unterschiedliche Wachstumsmuster, weswegen hier der umgekehrte Zusammenhang nicht bestätigt werden konnte (vgl. Kapitel 3.3.4. Charakterisierung der einzelnen Klone).

Eine genaue Analyse, ob durch die Überexpression morphologische Charakteristika und verschiedene Vitalparameter von MCF-7 Zellen beeinflusst werden, ist Gegenstand derzeitiger und zukünftiger Studien. Auch andere GIRK Subtypen und Varianten werden so in ihren Funktionen untersucht werden.

Die „kill curve“, in welcher die Austestung der korrekten Antibiotikumsdosis graphisch dargestellt wurde (vgl. Kapitel 3.3.1. Ermittlung der G-418 Konzentration zur Selektion stabil transfektierter Zellen), dient zukünftigen Studien im Rahmen stabiler Transfektionen als Basis und kommt in diesen auch schon zum Einsatz.

Die Rolle der GIRKs in der Pathophysiologie von Brustkrebs ist eine sehr Bedeutsame, welche es in all ihren Wirkungsbereichen zu ergründen gilt, um in der Forschung wichtige Erkenntnisse zu sammeln, welche in weiterer Folge im therapeutischen Bereich zum tragen kommen.

## 5. Literaturverzeichnis

Alberts, B, Bray, D, Johnson, A, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K & Walter, P 2001, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.

Anson, DS 2004 `The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery`, *Genetic vaccines and therapy*, vol. 2, no. 1, p. 9.

Argyle, JL, Tumbula, DL & Leigh, JA 1996, `Neomycin Resistance as a Selectable Marker in *Methanococcus maripaludis*`, *Applied an Enviromental Microbiology*, vol. 62, no. 11, pp. 4233-4237.

Bennett, MJ, Aberle, AM, Balasubramaniam, RP, Malone, JG, Malone, RW & Nantz, MH 1997, `Cationic Lipid-Mediated Gene Delivery to Murine Lung: Correlation of Lipid Hydration with in Vivo Transfection Activity`, *Journal of medicinal chemistry*, vol. 40, no. 25, pp. 4069-4078.

Bockamp, E, Maringer, M, Spangenberg, C, Fees, S, Fraser, S, Eshkind, L, Oesch, F & Zabel, B 2002, `Of mice and models: improved animal models for biomedical research`, *Physiol Genomics*, vol. 11, no. 3, pp. 115-132.

Chambers, AF, Groom, AC & MacDonald, IC 2002, `Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites`, *Nature reviews cancer*, vol. 2, no. 8, pp. 563-572.

Dascal, N, Lim, NF, Schreibmayer, W, Wang, W, Davidson, N & Lester, HA 1993, `Expression of an atrial G-protein-activated potassium channel in *Xenopus oocytes*`, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 14, pp.6596-6600.

Davis, J & Jimenez, A 1980, `A new selective agent for eukaryotic cloning vectors`, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 29, 5 Suppl., pp. 1089-1092.

Felgner, PL, Gadek, TR, Holm, M, Roman, R, Chan, HW, Wenz, M, Northrop, JP, Ringold, GM & Danielsen, M 1987, `Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure`, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 21, pp. 7413-7417.

Guy, C. 2002, `Biological confocal microscopy`, *Materials Today*, vol. 5, pp. 34-41.

Iwanir, S & Reuveny, E 2008, ` Adrenaline-induced hyperpolarization of mouse pancreatic islet cells is mediated by G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels`, *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, vol. 456, no. 6, pp. 1097-1108.

Jordan, M & Wurm, F 2003, `Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate`, *Methods*, vol. 33, no. 2, pp. 136-143.

Kim, TK & Eberwine, JH 2010, `Mammalian cell transfection: the present and the future`, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 397, no. 8, pp. 3173-3178.

Martin, PA, Lohr, JR & Dean, DH 1981, `Transformation of *Bacillus thuringiensis* Protoplasts by Plasmid Deoxyribonucleic Acid`, *Journal of Bacteriology*, vol. 145, no. 2, pp. 980-983.

Müller, A, Homey, B, Soto, H, Ge, N, Catron, D, Buchanan, ME, McClanahan, T, Murphy, E, Yuan, W, Wagner, SN, Barrera, JL, Mohar, A, Verástegui, E & Zlotnik, A 2001, `Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis`, *Nature*, vol. 410, no. 6824, pp. 50-56.

Pillai, VB, Hellerstein, M, Yu, T, Amara, RR & Robinson, HL 2008, `Comparative studies on in vitro expression and in vivo immunogenicity of supercoiled and open circular forms of plasmid DNA vaccines`, *Vaccine*, vol. 26, no. 8, pp. 1136-1141.

Plummer, HK, Dhar, MS, Cekanova, M & Schuller, HM 2005, `Expression of G-protein inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) in lung cancer cell lines`, *BMC Cancer*, vol. 5, p. 104.

Plummer, HK, Yu, Q, Cakir, Y & Schuller, HM 2004, `Expression of inwardly rectifying potassium channels (GIRKs) and beta-adrenergic regulation of breast cancer cell lines`, *BMC Cancer*, vol. 4, p. 93.

Sack, U, Tárnok, A & Rothe, G 2007, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Karger, Basel, pp. 27-70.

Stringer, BK, Cooper, AG & Shepard SB 2001, `Overexpression of the G-Protein Inwardly Rectifying Potassium Channel 1 (GIRK1) in Primary Breast Carcinomas Correlates with Axillary Lymph Node Metastasis`, *Cancer Research*, vol. 61, no. 2, pp. 582-588.

Soule, HD, Maloney, TM, Wolman, SR, Peterson, WD, Brenz, R, McGrath, CM, Russo, J, Pauley, RJ, Jones, RF & Brooks, SC 1990, `Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10`, *Cancer Research*, vol. 50, no. 18, pp. 6075-6086.

Soule, HD, Vazquez, J, Long, A, Albert, S & Brennan, M 1973, `A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma`, *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 51, no. 5, pp. 1409-1416.

Stauber, M & Weyerstahl, T 2007, *Duale Reihe: Gynäkologie und Geburtshilfe*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Tait, L, Soule, HD & Russo, J 1990, `Ultrastructural and Immunocytochemical Characterization of an Immortalized Human Breast Epithelial Cell line, MCF-10`, *Cancer Research*, vol. 50, no. 18, pp. 6087-6094.

Tanner, FC, Carr, DP, Nabel, GJ & Nabel, EG 1997, `Transfection of human endothelial cells`, *Cardiovascular Research*, vol. 35, no. 3, pp. 522-528.

Vorburger, SA & Hunt, KK 2002, `Adenoviral Gene Therapy`, *The Oncologist*, vol. 7, no. 1, pp. 46-59.

Wagner, V, Stadelmeyer, E, Riederer, M, Regitnig, P, Gorischek, A, Devaney, T, Schmidt, K, Tritthart, HA, Hirschberg, K, Bauernhofer, T & Schreibmayer, W 2010, `Cloning and Characterisation of GIRK1 Variants Resulting From Alternative RNA Editing of the KCNJ3 Gene Transcript in a Human Breast Cancer Cell Line`, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 110, no. 3, pp. 598-608.