Diplomarbeit

Herstellung von gentechnisch manipulierten Krebszelllinien, welche GIRK1 Splicevarianten stabil und genomintegriert exprimieren

eingereicht von

Franz Niederl

Geb.Dat.: 02.03.1984

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Biophysik

unter der Anleitung von

Ao. Univ. Prof. Dr. Wolfgang Schreibmayer

Dr. Bibiane Steinecker

Graz, im Juni 2013

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 Juni 2013

Franz Niederl

Zusammenfassung

Ziel dieser Diplomarbeit war es, Zelllinien anzufertigen, die einzelne alternative Splicevarianten von GIRK1 (GIRK1c, GIRK1d, GIRK1e) stabil und genomintegriert exprimieren. An diesen Zelllinien sollen dann vitale Parameter wie Proliferation, Wundheilung, Motilität und Invasion bzw. Ionenkanalausstattung untersucht werden (nicht Gegenstand dieser Diplomarbeit).

Beim GIRK1 Protein handelt es sich um eine Untereinheit von G-Protein aktivierten einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen (GIRKs). GIRKs sind verantwortlich dafür, dass die Zelle auf das Vorhandensein von extrazellulären Botenstoffen reagieren kann.

Bisher etabliert war die Bedeutung von GIRKs bei der Regulation der Herztätigkeit durch das autonome Nervensystem (Vagusnerv) aber auch bei zentralnervösen Prozessen, wie bei der Schmerzbehandlung durch Opiate. Die Untersuchungen, die an der Medizinischen Universität Graz durchgeführt wurden zeigten, dass die Anzahl der Kopien von der mRNA des KCNJ3 Gens, welches für das GIRK1-Protein kodiert, im Brustkrebsgewebe extrem erhöht ist (Wagner, et al., 2010). Diese Erhöhung korreliert im Einzelnen positiv mit der Agressivität des Tumors, Vorkommen und Anzahl der Metastasen in den Lymphknoten und negativ mit der Lebenserwartung.

Auf zellulärer Ebene führt alternatives “RNA editing“ letztlich zur Translation von 4 verschiedenen GIRK1 Proteinen in den Krebszellen (GIRK1a, c, d und e). Es existieren Konstrukte, welche für fluoreszenzmarkierte Versionen von GIRK1c, d und e kodieren und zur Transfektion von Krebszellen geeignet sind. Diese Konstrukte wurden zunächst transient in die MCF7 Zelllinie eingebracht, durch entsprechenden Selektionsdruck wurde ein stabiler Einbau in das Genom der Krebszellen erreicht. Die erfolgreiche Integration wurde im Konfokalmikroskop kontrolliert. Anschliessend erfolgte eine Klonierung der positiven Zellen mittels FACS (fluorescense activated cell sorting).

Abstract

The aim of this thesis was, to produce cell lines, that express individual alternative splice variants of GIRK1 (GIRK1c, GIRK1d, GIRK1e) stable and genome-integrated. Then, vital parameters such as proliferation, "wound healing", motility and invasion or ion channel equipment should be examined in these cell lines (not subject of this thesis).

The GIRK1 protein is a subunit of G-protein-activated inwardly rectifying potassium channels (GIRKs). GIRKs are responsible for ensuring that the cell can respond to the presence of extracellular messengers.

Previously established was the importance of GIRKs in the regulation of cardiac activity by the autonomic nervous system (vagus nerve) but also in central nervous processes, such as in the treatment of pain by opiates. The investigations, carried out at the medical university of Graz have shown, that the number of copies of the mRNA of the KCNJ3 gene, encoding the protein GIRK1, is extremely increased in breast cancer tissue (Wagner, et al., 2010). This increase correlates positively with the aggressiveness of the individual tumor incidence and number of metastases in the lymph nodes and correlates negatively with life expectancy.

At the cellular level, alternate "RNA editing" ultimately leads to translation of 4 different GIRK1 proteins in cancer cells (GIRK1a, c, d and e). There are constructs existing, which encode fluorescently labeled versions of GIRK1c, d and e and are suitable for the transfection of cancer cells. These constructs were first transiently introduced into the cell line MCF7, by selection pressure a stable mounting is achieved in the genome of cancer cells. The successful integration was monitored by confocal microscopy. After that, a cloning of positive cells was possible by FACS (fluorescense activated cell sorting).

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 3

Abstract 4

Inhaltsverzeichnis 5

Abbildungsverzeichnis 7

Tabellenverzeichnis 10

Verwendete Abkürzungen 11

1. Einleitung 12

1.1 Brustkrebs 12

1.2 G-Proteine und GIRK 15

2. Material und Methoden 18

2.1 Material 18

2.1.1 MCF-7 Zelllinie *18*

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Notwendige Chemikalien *19*

2.1.3 Zellkulturmedium *21*

2.1.4 Laborgeräte *21*

2.1.5 Plasmid-DNA *22*

2.2 Methoden 24

2.2.1 Zellkulturführung *24*

2.2.2 Stabile Transfektion *24*

2.2.3 Konfokalmikroskopie *26*

2.2.4 FACS *28*

2.2.5 Einfrieren der stabil transfektierten Zellklone *29*

3. Ergebnisse 30

3.1 Stabil transfektierte Klone 30

3.1.1 Nährmedium zur Selektion stabil transfektierter Klone *30*

3.1.2 Stabile Transfektion von MCF-7 Zellen *30*

3.1.3 Selektion stabil transfektierter Zellen mittels FACS *33*

3.1.4 FACS Selektions-Einstellungen *35*

3.1.5 Charakterisierung der stabil transfektierten Zellklone *41*

3.2 Regelmäßige Kontrollen im Konfokalmikroskop 42

4. Diskussion 60

5. Literaturverzeichnis 62

Abbildungsverzeichnis

1.1 Häufigkeitsverteilung der Brustkrebsentstehung 14

1.2 Darstellung der Funktionsweise eines G-Proteins 16

2.1 Vektorenkarte pEYFP-C1 23

3.1 FACS Dot-Plot Darstellung
MCF7 Zellen 35

3.2 FACS Dot-Plot Darstellung
MCF7 + pEYFP-C1 Zellen 36

3.3 FACS Dot-Plot Darstellung
MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1c Zellen 37

3.4 FACS Dot-Plot Darstellung
MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1d Zellen 38

3.5 FACS Dot-Plot Darstellung
MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1e Zellen 39

3.6 Konfokalmikroskopische Aufnahme
MCF7 + pEYFP-C1 Zellen 43

3.7 Konfokalmikroskopische Aufnahme
MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1c Zellen 44

3.8 Konfokalmikroskopische Aufnahme
MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1d Zellen 44

3.9 Konfokalmikroskopische Aufnahme
MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1e Zellen 45

3.10 Konfokalmikroskopische Aufnahme
stabil transfektierter Klon FNV#02 46

3.11 Konfokalmikroskopische Aufnahme
stabil transfektierter Klon FNV#03 46

3.12 Konfokalmikroskopische Aufnahme
stabil transfektierter Klon FNV#04 47

3.13 Konfokalmikroskopische Aufnahme
stabil transfektierter Klon FNV#07 47

3.14 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNV#08 48
3.15 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNV#09 48
3.16 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1C#01 49
3.17 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1C#02 49
3.18 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1C#04 50
3.19 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1C#05 50
3.20 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1C#06 51
3.21 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1C#07 51
3.22 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1C#09 52
3.23 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1D#01 52
3.24 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1D#02 53
3.25 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1D#05 53
3.26 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1D#06 54
3.27 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1D#07 54
3.28 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1D#09 55
3.29 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1D#10 55

3.30 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1E#02 56
3.31 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1E#04 56
3.32 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1E#05 57
3.33 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1E#06 57
3.34 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1E#07 58
3.35 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1E#08 58
3.36 Konfokalmikroskopische Aufnahme stabil transfektierter Klon FNG1E#09 59
4.1 cell-motility 61

Tabellenverzeichnis

2.1 Verbrauchsmaterialien und notwendige Chemikalien Tab.1 19
2.2 Verbrauchsmaterialien und notwendige Chemikalien Tab.2 20
2.3 Verwendete Laborgeräte 21
3.1 Charakterisierung der stabil transfektierten Zellklone Tab.1 41
3.2 Charakterisierung der stabil transfektierten Zellklone Tab.2 42

Verwendete Abkürzungen

BRCA1	breast cancer 1 gene
BRCA2	breast cancer 2 gene
CLIS	carcinoma lobulare in situ
DCIS	duktales carcinoma in situ
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	ethylenediamineteraacetic acid
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSC	forward scatter
G-418	Geneticin
GIRK	G-protein activated inwardly rectifying potassium channels
GPCR	G-protein coupled receptor
HBSS	hank's buffered salt solution
MCF	michigan cancer foundation
MEM	mammary epithelial basal medium
mRNA	messenger ribonucleic acid
RNA	ribonucleic acid
SSC	sideward scatter
ZMF	Zentrum für medizinische Forschung

1. EINLEITUNG

1.1 BRUSTKREBS

Die folgenden Sachverhaltsdarstellungen sind dem Buch „Duale Reihe Manfred Stauber, Thomas Weyerstahl Gynäkologie und Geburtshilfe 2. Aktualisierte Auflage“ entnommen.

Etwa ein Viertel aller Malignome der Frau entfallen auf den Brustkrebs, wobei im Laufe ihres Lebens etwa jede 8. bis 10. Frau ein Mammakarzinom entwickelt, und das Risiko daran zu erkranken mit zunehmenden Lebensalter ansteigt. Es handelt sich hierbei um einen, vom Epithel der Drüsenlobuli oder der Milchgänge ausgehenden, bösartigen Tumor. In den vergangenen Jahren hat die absolute Mortalität um ca. ein Viertel abgenommen, was zum Einen auf eine verbesserte Früherkennung (Mammographie, Biopsie) und zum Anderen auf die verbesserten Therapiemöglichkeiten zurückgeführt wird.

Eine gesicherte Ätiologie des Brustkrebses ist derzeit nicht evident. Sowohl endogene Faktoren, als auch exogene Einflüsse scheinen eine Rolle bei der Entstehung zu spielen. Bis dato sind zwei genetische Mutationen bekannt, die mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einhergehen – es handelt sich hierbei um eine mutierte Variante der Tumorsupressorgene BRCA1 und BRCA2 wobei in 80% der Fälle von familiär vererbten Mammakarzinomen eine mutierte Variante des BRCA1 Gens vorgefunden wird.

Auch eine Hormonsubstitution, welche länger als fünf Jahre andauert, so zeigen einige prospektive und retrospektive Studien, geht mit einem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken einher, wobei Einnahmedauer und Dosis eine wichtige Rolle spielen. So nimmt das Risiko am Mammakarzinom zu erkranken nach dem Absetzen der Hormonsubstitution wieder ab.

Die Entwicklung des Mammakarzinoms präsentiert sich biphasisch über ein zunächst intraepitheliales in-situ Stadium welches nach mehrjähriger Latenz in ein, das umgebende Gewebe infiltrierende, Karzinom übergeht.

Die meisten aller Mammakarzinome, man geht hierbei von etwa 90% aus, entwickeln sich aus dem Epithel der Ductus oder terminalen Ductuli.
Man unterscheidet hierbei das DCIS „Ductales carcinoma in situ“ vom „invasiven duktalen Karzinom“. Ist die Basalmembran nicht durchbrochen, spricht man von einem DCIS, kommt es hingegen bereits zu einer Infiltration des umliegenden Gewebes, spricht man von einem invasiven duktalen Karzinom.

Der Rest, also etwa 10% der Mammakarzinome, geht vom Epithel der Lobuli aus. Hier unterscheidet man wiederum das CLIS „Carzinoma lobulare in situ“ vom „invasiven lobulären Karzinom“. Ist lediglich ein einzelner Lobulus und unter Umständen der dazugehörende Milchgang betroffen, definiert man diesen Befall als CLIS. Infiltriert der Tumor aber bereits das ihn umgebende Gewebe, spricht man vom invasiven lobulären Karzinom.

Beim DCIS unterscheidet man zwischen vier unterschiedlichen Wuchsformen:

- Solide (die häufigste Variante des DCIS)
- Komedoartig
- Kribriform
- Papillar

Degenerative Verkalkungen finden sich beim DCIS häufig als Folge der zahlreichen zentralen Nekrosen. Bis sich das DCIS zu einem invasiven Karzinom entwickelt, vergehen meist weniger als zehn Jahre.

Hingegen entwickelt sich ein CLIS erst relativ langsam in ein invasives lobuläres Karzinom (die Latenzzeit beträgt etwa 25 Jahre).
Die Tumorzellen des CLIS sind sehr klein, gut konturiert wobei Mitosen nur selten zu beobachten sind und auch Mikroverkalkungen sind, im Gegensatz zum DCIS, kaum zu beobachten.

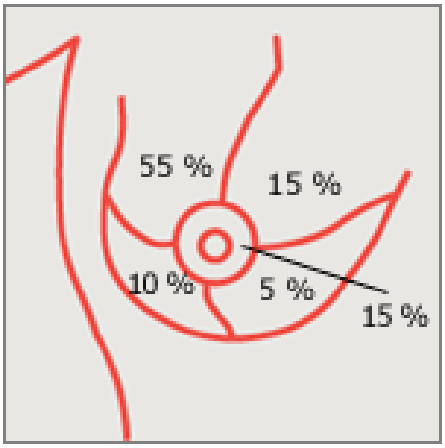


Abbildung 1.1. *Häufigkeitsverteilung der Brustkrebsentstehung*

In 55% der Fälle entsteht das Mammakarzinom im oberen äußeren Quadranten. Es folgt mit etwa 15% der obere innere Quadrant gefolgt vom unteren äußeren Quadranten mit etwa 10%. 15% können auch multizentrisch auftreten, und nur in sehr seltenen Fällen ist das Karzinom im unteren inneren Quadranten lokalisiert (etwa 5% der Fälle).

Der derbe, palpable Knoten ist das Leitsymptom des Mammakarzinoms. Dabei werden auch heute noch über 80% der Brustkrebsfälle von den betroffenen Frauen selbst entdeckt.

Abhängig von der histomorphologischen und biologischen Charakteristik des Karzinoms können Metastasierungen bereits frühzeitig erfolgen. So zeigt ein 20mm großer Tumor in ca. 50% der Fälle, und ein 5mm großer Tumor in lediglich 10% der Fälle eine Fernmetastasierung. Somit korreliert die Größe des Tumors mit der Geschwindigkeit seiner Metastasierung.

Die Metastasierung erfolgt zunächst lymphogen in die regionären Lymphknoten (Wächterlymphknoten Axilla). Im weiteren Verlauf kommt es zur hämatogenen Streuung der Krebszellen in Skelettsystem, Pleura, Lunge, Leber und Gehirn.

1.2 G-PROTEINE UND GIRK

Falls nicht durch Zitate gekennzeichnet sind die folgenden Sachverhaltsdarstellungen dem Lehrbuch: „Lehrbuch der molekularen Zellbiologie, Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter – 4. Auflage Verlag: WILEY-VCH“ entnommen.

„G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs Abk. f. engl. G-protein coupled receptor) bilden die größte Familie unter den Zelloberflächen-Rezeptoren. Diese Rezeptoren vermitteln Antworten auf eine enorme Vielfalt extrazellulärer Signalmoleküle, darunter Hormone, lokale Mediatoren und Neurotransmitter. Die Signalmoleküle sind in ihrer Struktur so vielfältig, wie sie es auch in ihrer Funktion sind: Sie können Proteine sein, kleine Peptide oder Abkömmlinge von Aminosäuren oder Fettsäuren, und für jedes einzelne von ihnen gibt es einen anderen Rezeptor oder sogar ein Sortiment von Rezeptoren. Da GPCRs an einer solch großen Vielfalt zellulärer Vorgänge beteiligt sind, sind sie interessante Ziele für die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen. Etwa die Hälfte aller bekannten Arzneistoffe wirken über GPCRs.“

„Wenn ein extrazelluläres Signalmolekül an einen GPCR bindet, erfährt das Rezeptorprotein eine Konformationsänderung, die es befähigt ein G-Protein auf der Innenseite der Plasmamembran zu aktivieren. Es gibt mehrere G-Protein-Varianten. Alle G-Proteine haben jedoch eine ähnliche Grundstruktur und arbeiten in ähnlicher Weise. Sie sind aus drei Proteinuntereinheiten zusammengesetzt: α, β und γ. Bindet ein extrazellulärer Ligand an den Rezeptor, Zerfällt das G-Protein in die aktivierte α Untereinheit und in den aktivierten βγ Komplex, diese können nun direkt mit Zielproteinen in der Plasmamembran in Wechselwirkung treten.“

Die Zielproteine für die Untereinheiten des G-Proteins sind entweder Enzyme oder Ionenkanäle in der Plasmamembran wie zB der Kaliumkanal.

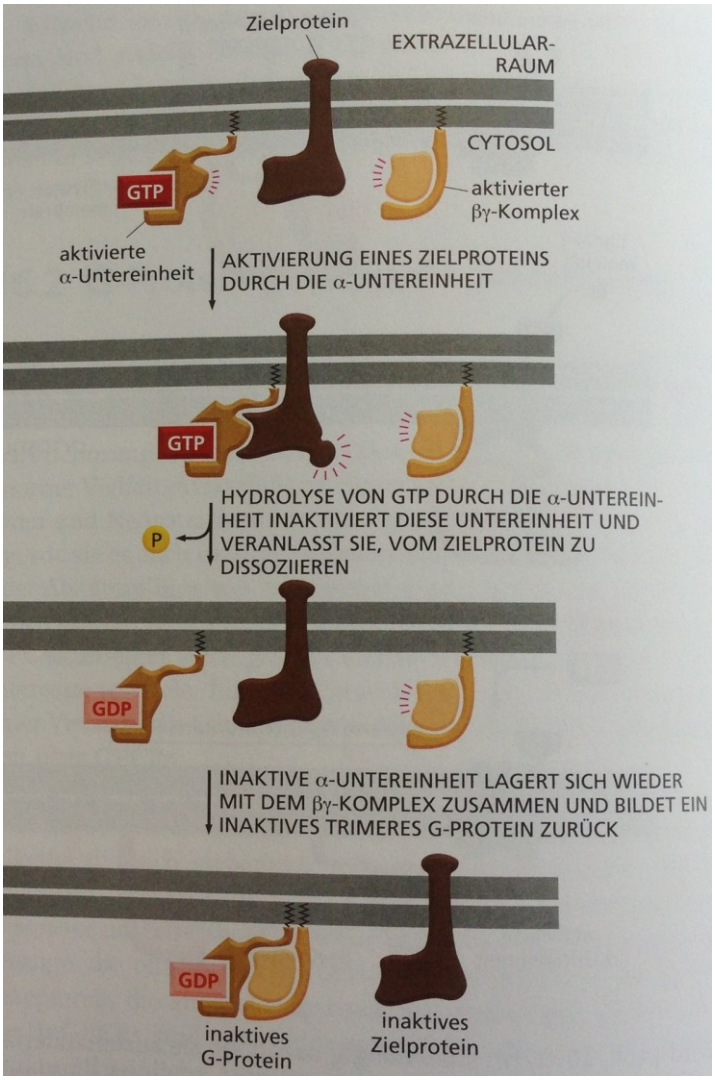


Abbildung 1.2 *Darstellung der Funktionsweise eines G-Proteins. Entnommen aus Lehrbuch der molekularen Zellbiologie, Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter – 4. Auflage Verlag: WILEY-VCH*

Man weiß heute, dass diese speziellen Kaliumkanäle „G-protein activated inwardly rectifying potassium channels“ (GIRK’s) eine wichtige Rolle in der Regulation von Nerven- und Herzmuskelzellen spielen. (Dascal N., 1997)(Dascal N., 2001)

GIRK’s sind allerdings auch an der Insulinsekretion der Bauchspeicheldrüse(Smith et al., 2001)(Iwanir & Reuveny, 2008), an der Blutplättchenaggregation (Shankar et al., 2006) und am Fettstoffwechsel in Fettzellen (Perry, et al., 2008) beteiligt. Wie inzwischen bekannt wurde, spielen GIRK’s auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese bösartiger Tumore.

So zeigten Untersuchungen, eine Erhöhung der GIRK1 RNA im invasiven Mamakarzinom im Vergleich zu gesundem Brustgewebe. Dabei korrelierte die Konzentration der GIRK1-RNA im Primärtumor mit der Anzahl vorhandener Lymphknotenmetastasen (Stringer, et. al., 2001). So wurde die stärkste Überexpression bei Befall von mehr als einem Lymphknoten beobachtet.

Darüber hinaus wurden auch Untersuchungen zum erhöhten mRNA-Level der GIRK1 Splice-Varianten (GIRK1a, b, c, d und e) in Brustkrebszellen durchgeführt, die zum Ergebnis hatten, das die Expression von GIRK1a, 1c, 1d, und 1e mRNA in diesen Zellen stark erhöht war (Wagner, et al., 2010). Diese Splice-Varianten betreffen allesamt die cytosolische C-terminale Region des Rezeptors, welche für die Aktivierung der G-Proteine und deren Regulation durch Phosphorylierung bedeutend ist.

Für die Erforschung von Brustkrebs, leisten die MCF-7 Zelllinien (siehe Punkt 2.1.1) einen wichtigen Beitrag.
Ziel dieser Arbeit war es dabei, die GIRK1 Splice Varianten (GIRK1c, d, und e) stabil und genomintegriert in die MCF7 Zellen zu transfektieren. Um den Transfektionserfolg auch Konfokalmikroskopisch darstellen zu können, wurden Konstrukte verwendet welche aus den GIRK1c, d, und e Splice-Varianten und dem Vektor pEYFP-C1 bestanden. Durch Anregung mit einem 513 nm Laser erschienen die transfektierten Zellen rötlich/gelb.

Am Ende dieser Diplomarbeit gingen 27 stabil transfektierte MCF7-Zellklone hervor welche die Konstrukte

- pEYFP-C1
- pEYFP-C1+GIRK1c
- pEYFP-C1+GIRK1d
- pEYFP-C1+GIRK1e

stabil und genomintegriert exprimierten.

2.MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 MCF-7 ZELLLINIE

Bei der MCF-7 Zelllinie handelt es sich um eine östrogenrezeptorpositive Brustkrebszelllinie. Diese wurde von H.D. Soule, durch Punktion eines Pleuraergusses einer 69 Jahre alten Frau, mit metastasiertem duktalen adenomatösem Mammakarzinom, isoliert (Soule, et al., 1973).

Diese Zelllinie gilt als Standard 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).

Bei meiner Diplomarbeit bildeten die MCF7 Zellen, (Katalognummer HTB-22) der Firma ATCC, die Grundlage zur Herstellung stabil transfektierter Klone, welche die GIRK1 Splice-Varianten GIRK1c -d und -e stabil und genomintegriert exprimieren.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Notwendige Chemikalien

Name	Bezugsquelle	Katalognummer
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, Krems-münster, Austria	606180
Cellstar TC – Plate 6 Well	Greiner Bio-One, Krems-münster, Austria	657 160
Cellstar Tissue Culture Flasks	Greiner Bio-One, Fricken-hausen, Germany	690 175
Centrifuge Tubes, 15mL	Greiner Bio-One, Krems-münster, Austria	188271
Centrifuge Tubes, 50mL	Bartelt, Graz, Austria	Nunc 9.380 027
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Lactan, Graz, Austria	Merck 2931
Ethanol 70 % vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Germany	T913.3

Tabelle 2.1 *Verbrauchsmaterialien und notwendige Chemikalien*

Name	Bezugsquelle	Katalognummer
Fetal Bovine Serum (FBS)	JRH Biosciences Lenexa, Kansas, USA	12103-500M
Geneticin G-418 Sulfate	GIBCO Invitrogen Corporation, Lofer, Austria	11811-031
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 Pyruvate Solution	PAA Laboratories, Pasching, Austria	S11-003
Steritop Filter Unit	Millipore, Wien, Austria	SCGPT01RE

Tabelle 2.2 *Verbrauchsmaterialien und notwendige Chemikalien*

2.1.3 ZELLKULTURMEDIUM

Als Zellkulturmedium wurde eine Nährlösung aus folgender Zusammensetzung verwendet:

- 450ml MEM
- 50ml FBS
- 5ml Sodium Pyruvat
- 5,81ml Penicillin Streptomycin

Für das Kulturmedium, der im späteren Verlauf dieser Diplomarbeit stabil transfektierten Klone, wurden der Nährlösung (510,81ml) noch 1500µg Geneticin G-418 hinzugefügt.

2.1.4 LABORGERÄTE

Name	Bezugsquelle
CO2-Inkubator, BB 6060	Haraeus 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
Zentrifuge, Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau, Germany
FACS	ZMF, Medizinische Universität Graz, Austria

Tabelle 2.3 *Verwendete Laborgeräte*

2.1.5 PLASMID-DNA

Für diese Arbeit wurde der C-Terminale Proteintransfusionsvektor pEYFP-C1 der Firma Clontech mit der Katalognummer 6005-01 verwendet. pEYFP-C1 codiert eine verbesserte gelb-grün Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Das Fluoreszenz Maximum liegt bei 513nm, das Emissionsspektrum liegt mit der Spitze bei 527nm (im gelb-grünen Bereich).(BD Biosciences Clontech)

Beim FACS (fluorescence activated cell sorting) ist es möglich die EYFP Emission zu detektieren und in weiterer Folge zu sortieren, indem ein „525-nm dichroic short-pass Spiegel“ und ein „530/30-nm bandpass Filter“ verwendet wird. (BD Biosciences Clontech)

Der Vektor enthält außerdem das Neomycin Resistenz-Gen (Neo), welches eine Selektion unter eukaryontischen Zellen unter Zuhilfenahme von G-418 ermöglicht. Bei G-418 handelt es sich um ein Aminoglycosid Antibiotikum, welches die Polypeptit Synthese in Eukaryontischen Zellen blockiert.

Fremdgene werden über die multiple Klonierungsstelle (MCS) am C-Terminalen Ende der EYFP-Sequenz inseriert. Für diese Diplomarbeit wurden fertige Konstrukte verwendet welche die kodierenden Sequenzen für die GIRK1 Splice-Varianten: GIRK1c GIRK1d und GIRK1e enthalten. Um die Aufnahme in den Zellkern zu erleichtern, wurde das Plasmid vor der Transfektion linearisiert.

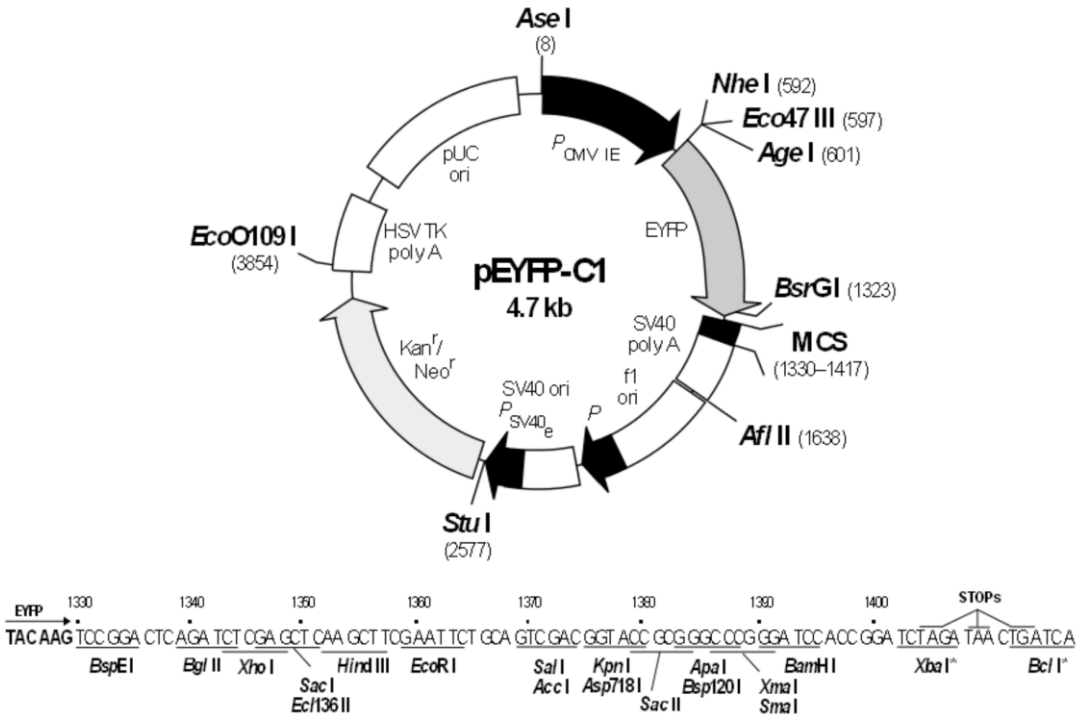


Abbildung 2.1 *Vektorenkarte des C-terminalen Proteintransfusionsvektors pEYFP-C1 Vektor Protokoll Nr.: PT3176-5 der Firma Clontech*

2.2 METHODEN

2.2.1 ZELLKULTURFÜHRUNG

Die in dieser Diplomarbeit verwendeten MCF-7 Zellen wurden in Punkt 2.1.3 beschriebener Nährlösung kultiviert. Von dieser Zubereitung wurden je 4ml in die Zellkulturflaschen mit Durchmesser 25cm² pipettiert. Aufbewahrt wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO2 und 95%iger Luftfeuchtigkeit.

Das Nährmedium wurde regelmäßig jeden 3. Tag gewechselt, und bei einem 80%igen Bewuchs der Zellflaschen-Böden kamen die Zellen zum Splitt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und verworfen, die Zellen anschließend mit 3ml HBSS Puffer gewaschen, dieser wurde anschließend wieder verworfen. Danach wurden den Kulturflaschen 1ml 0,25% Trypsin/EDTA hinzugefügt und diese umgehend in den Brutschrank retourniert. Nach 15 Minuten wurden diese wieder entnommen, und die nun lose im Zellkulturfläschchen schwimmenden Zellen wurden im Splitt 1+4 aufgeteilt.

2.2.2 STABILE TRANSFEKTION

Bei der stabilen Transfektion handelt es sich um eine Methode, genetische Informationen, über unterschiedliche Verfahrenswege, in den Zellkern der Zielzelle zu integrieren.

Dabei unterscheidet man grundlegend zwei Arten der Transfektion, nämlich die stabile und die transiente Transfektion.
Im Gegensatz zur transienten Transfektion, wird bei der stabilen Transfektion das neu implementierte Gen (im Fall meiner Diplomarbeit das GIRK1-c, d oder e Gen) vollständig in das Wirtszellengenom integriert. Das neue Gen bleibt erhalten und wird bei der nächsten Zellteilung mit dem Genom der Zelle weitervererbt.

Allerdings setzt eine stabile Transfektion einen Selektionsmarker voraus, zB ein Resistenzgen gegen ein bestimmtes Antibiotikum (im Falle meiner Diplomarbeit das Neomycin Resistenzgen Neo, des pEYFP-C1 Vektors). Wird dem Nährmedium G-418 beigesetzt, überleben nur die stabil transfektierten Zellen, welche das Plasmid erfolgreich in den Zellkern integriert haben, und so das Resistenz verleihende Protein exprimieren (Buddecke, 2002).

Derzeit ist es mit folgenden Methoden möglich, ein Plasmid in das Genom der Zielzelle zu integrieren (Mülhardt, 2002)

- Gewalt (Mikroinjektion)
- Diffusion (Elektroporation)
- Virale Aufnahmemechanismen
- Fusion des Plasmids mit der Zelle (zB Liposomenfusion, Lipofektion)
- Endo- bzw. Phagozytose (DEAE-Dextran, Transferin)

Bei meiner Diplomarbeit kam das TransFast Transfektionsragenz „Promega E24/31“ zur Anwendung, bei dem eine polykationische Gruppe an einer Lipid-Gerüststrukur gebunden ist.
Bei Kontakt mit Wasser bildet dieses Reagenz multilamelläre Vesikel, durch die eine Aufnahme in die Zelle ermöglicht wird. Dabei reagieren die negativ geladenen Phosphate der Nukleinsäure mit der kationischen Gruppe der Lipidverbindung (Felgner, et al., 1987). Von der Zelle werden die Vesikel schließlich durch Endozytose über die Zellmembran aufgenommen.

2.2.3 KONFOKALMIKROSKOPIE

Die folgenden Sachverhaltsdarstellungen sind dem Buch „Romeis, Mikroskopische Technik“ Maria Mulisch, Ulrich Welsch 18. Auflage 2010 entnommen.

Eine Schwäche der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass dicke und stark streuende Präparate nur sehr schlecht dargestellt werden können. Dies liegt daran, das die Fluoreszenz in den Präparaten nicht ausschließlich in der Fokusebene des Mikroskops angeregt wird, sondern auch unter- und oberhalb dieser Ebene. Ganze Strukturen des Präparates können dem Betrachter dadurch entgehen. Um diese Überlagerungen zu vermeiden, war es lange Zeit nur möglich sehr dünne Präparatschnitte für die Fluoreszenzmikroskopie zu verwenden, was zur Folge hatte, das lebende Zellen auf diese Art nicht dargestellt werden konnten.

Die konfokale Mikroskopie dagegen ermöglicht eine deutliche Reduktion der störenden Hintergrundinformationen. Durch diese Technik wird der Benutzer in die Lage versetzt, auch dicke und stark streuende Präparate, in einer hohen optischen Auflösung und mit starkem Bildkontrast, darzustellen.

„Das konfokale Prinzip wurde bereits in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts von Marvin Minsky an der Harvard Universität entwickelt. Es basiert auf die Einführung einer Lochblende in die Feldblendenebene eines Mikroskops. Diese Ebene ist „konjugiert“ zu der Fokusebene des Objektivs, dH nur diese Ebene wird scharf abgebildet. In einer weiteren konjugierten Ebene im Mikroskop, nämlich vor dem Detektor, wird eine zweite Lochblende eingeführt. Diese sorgt dafür, dass Signale außerhalb der Fokusebene ausgeblendet werden und nicht auf den Detektor gelangen. Die Informationen von Außerfokusberiechen werden also zweifach ausgeblendet. Mit der ersten Blende wird die Intensität des Anregungslichts stark abgeschwächt, sobald es sich außerhalb der Fokusebene befindet und mit der zweiten Blende werden Fluoreszenzsignale aus diesen Bereichen geblockt und vom Detektor gar nicht mehr detektiert.“

„In modernen konfokalen Systemen werden Laser verschiedener Wellenlängen zur Fluoreszenzanregung eingesetzt. Das Laserlicht wird in das Präparat fokussiert und mittels Scannerspiegel darüber geführt.
Die emittierte Fluoreszenz wird dann hinter der konfokalen Lochblende durch einen lichtempfindlichen Sensor (typischerweise Fotomultiplier) detektiert. Das Präparat wird also punktförmig abgetastet, und das konfokale Fluoreszenzbild entsprechend Punkt für Punkt zusammengesetzt".

Auflösungswerde, welche mit der konfokalen Mikroskopie erreicht werden, sind

- in x-y-Richtung etwa 200nm
- in z-Richtung etwa 500nm

Dabei ist die Auflösungsgrenze von 2 Faktoren abhängig, nämlich von

- der numerischen Apertur des Objektivs
- und der Wellenlänge der erzeugten Fluoreszenz

Durch die schnelle Entwicklung im Bereich der Computer- und Lasertechnologie hat auch die konfokale Mikroskopie viel an Bedeutung gewonnen. Konfokalmikroskope der Gegenwart ermöglichen

- Feinjustierungen örtlicher und zeitlicher Laserintensitäten
- spektrale Emissionsanalysen
- Lasermanipulationen an Zellen mit unterschiedlichen Lasern
- synchrone Bildaufnahmen

Auch in analytischen Bildverarbeitungssystemen finden Konfokalmikroskope inzwischen Anwendung. Somit werden Verfahren wie

- FRET (Förster-Resonanzenergietransfer)
- FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) und
- FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching)

ermöglicht.

2.2.4 FACS

Beim FACS (fluorescence activated cell sorting), handelt es sich um eine Methode die es ermöglicht, Zellen zu zählen und zu sortieren. Dabei werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt, wobei jede einzelne einen Laserlichtstrahl passieren muss. Dieser wiederum wird an den morphologisch unterschiedlichen Zellen individuell gestreut, eine Streuung die mit Detektoren nachgewiesen werden kann.

Unterschieden werden beim FACS zwei Arten des Streulichtes, zum einen das

- Vorwärtsstreulicht (FSC Forward Scatter) welches eine Aussage über das Volumen der Zellen gibt, und zum anderen das
- Seitwärtsstreulicht (SSC Sideward Scatter) welches die Granularität der Zellen beschreibt.

Die Sortierung der Zellen kann beim FACS über zwei Arten erfolgen, entweder

- über die Detektion des Streulichtes, welches eine Aussage über die Größe und Oberflächenbeschaffenheit der Zelle liefert
- oder durch die Detektion von Fluoreszenzfarben

Im Falle meiner Diplomarbeit erfolgte die Sortierung der Zellen über ihre Fluoreszenz. Hierzu wurde vom FACS die EYFP Emission des C-terminalen Proteintransfusionsvektors pEYFP-C1detektiert, was eine Selektion der stabil transfektierten Klone ermöglichte.

Detektiert werden die Fluoreszenzsignale im rechten Winkel zum Laserlichtstrahl, wobei die unterschiedlichen Farbstoffe, durch Bandpassfilter und Farbteilerspiegel in ihre Emissionsspektren aufgeteilt werden. Letztendlich detektieren Photomultiplier die Lichtsignale und ermöglichen eine Umwandlung in elektrische Signale, welche in den meisten Fällen als Dot-Plots graphisch dargestellt werden.

2.2.5 EINFRIEREN DER STABIL TRANSFEKTIERTEN ZELLKLONE

Um die spätere einwandfreie Verfügbarkeit der stabil transfektierten Klone zu gewährleisten, wurden diese, nach entsprechender Aufzucht, in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dabei wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

- Zuerst absaugen der Nährlösung aus den Zellkulturflaschen
- Danach waschen mit 3ml HBSS Puffer
- Anschließend absaugen des Puffers
- Im Folgenden Hinzugabe von 1ml 0,25% Trypsin/EDTA
- Die mit Trypsin/EDTA versetzten Zellen kamen für 15 Minuten in den Brutschrank
- Im Anschluss wurden den Zellen 4ml MCF7 Nährmedium (ohne G-418) hinzugegeben
- Die Zellsuspension wurde bei 500rpm für 5 min. zentrifugiert, und danach das MCF7 Medium verworfen.
- Die so abzentrifugierten Zellen konnten nun mit dem zum einfrieren bestimmten Nährmedium (9ml MCF7 Kulturmedium und 1ml DMSO) versetzt werden (je 1ml pro Kryo-Röhrchen)
- Danach stufenweises Einfrieren:
- Über Nacht bei -20°C
- Am nächsten Tag bei -70°C
- Am darauffolgenden Tag Endlagerung in flüssigem Stickstoff.

3. ERGEBNISSE

3.1 STABIL TRANSFEKTIERTE KLONE

3.1.1 NÄHRMEDIUM ZUR SELEKTION STABIL TRANSFEKTIERTER KLONE

Hierzu wurden dem Standard MCF-7 Kulturmedium bei einem Volumen von 510,81ml (siehe Punkt 2.1.3) 1500µg G-418 beigemengt. Dies ermöglichte eine erste Selektion der erfolgreich transfektierten Zellen, da diese durch den Vektor pEYFP-C1 das Neomycin Resistenz-Gen (Neo) in ihr Genom integrierten und so, im Gegensatz zu den nicht transfektierten MCF-7 Zellen, eine Resistenz gegenüber G-418 entwickelten.

3.1.2 STABILE TRANSFEKTION VON MCF-7 ZELLEN

Diese wurde nach dem Standard der Firma Promega - „Promega E24/31“ durchgeführt.

Die ausgewählten MCF 7 Zellen wurden vorbereitet indem sie aus dem Zellverband in den Zellkulturflaschen mit 0,25% Trypsin/EDTA versetzt und für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert wurden.

Anschließend wurden die MCF7-Zellen in der Zählkammer gezählt um einerseits sicherzustellen, dass eine ausreichende Anzahl von MCF7 Zellen für die Transfektion zur Verfügung steht und andererseits um eine passende Verdünnung der Zellen herstellen zu können.

Die Zählung ergab eine Konzentration von 60*10^4 Zellen/ml.

Erstellt wurden in weiterer Folge 2 Verdünnungen:

- 1+2 Verdünnung (2ml Zellen + 4ml MCF-7 Medium) WP1
- 1+1 Verdünnung (3ml Zellen + 3ml MCF-7 Medium) WP2

Diese wurden in zwei 6-Wellplatten aufgeteilt (in je 4 Abteilungen der ersten 6-Wellplatte WP1 kamen 1ml von der 1+2 Verdünnung und 1ml MCF-7 Medium, sowie in je 4 Abteilungen der zweiten 6-Wellplatte WP2 1ml von der 1+1 Verdünnung und 1ml MCF-7 Medium).

Die zur Erstellung der stabil transfektierten Klone verwendeten Konstrukte

- Vektor pEYFP-C1
- pEYFP-C1 + GIRK1c
- pEYFP-C1 + GIRK1d
- pEYFP-C1 + GIRK1e

wurden, um die Aufnahme in den Zellkern zu erleichtern, vor der stabilen Transfektion linearisiert.

Um die passende Konzentration der Plasmid-DNA für das Transfektions Procedere zu errechnen kam eine OD-Messung zur Anwendung. Diese Ergab bei den Konstrukten folgende Konzentrationen:

- Vektor: pEYFP-C1 5µg/µl
- pEYFP-C1 + GIRK1c 4,6µg/µl
- pEYFP-C1 + GIRK1d 4,5µg/µl
- pEYFP-C1 + GIRK1e 6,6µg/µl

Benötigt wurde eine Konzentration von 3µg/µl Plasmid-DNA. Somit wurden der Vektor pEYFP-C1, Vektor+GIRK1c und Vektor+GIRK1d, im Verhältnis 1+1, und Vektor+GIRK1e im Verhältnis 1+2 verdünnt.

1) Vorbereiten der Eppendorf Gefäße (im Fall dieser Arbeit 8 Stück)
    a. 2x Eppendorf für: pEYFP-C1
    b. 2x Eppendorf für: pEYFP-C1 GIRK1c
    c. 2x Eppendorf für: pEYFP-C1 GIRK1d
    d. 2x Eppendorf für: pEYFP-C1 GIRK1e
2) Jedem Eppendorf Gefäß wurden 800µl MCF7 Medium ohne FBS (Fetal Bovine Serum) hinzugegeben.
3) Danach wurde die 3µg/µl konzentrierte Plasmid-DNA in folgender Menge in die Eppendorf Gefäße pipettiert:
    a. 1,2 µl pEYFP-C1
    b. 1,3 µl pEYFP-C1 GIRK1c
    c. 1,3 µl pEYFP-C1 GIRK1d
    d. 1,3 µl pEYFP-C1 GIRK1e
4) Anschließend wurden den Eppendorf-Gefäßen je 9 µl „Transfast“ der Firma Promega beigemengt
5) Vortexen der Eppendorf-Gefäße mit dem Gemisch
6) 10 Minuten bei Raumtemperatur abwarten
7) Danach wurde das Medium von den MCF-7 Zellen aus den 2 Wellplatten entfernt um so
8) Den jeweiligen Eppendorf Inhalt (Transfast, Plasmid-DNA, MCF7-Nährmedium Gemisch) den beiden Wellplatten hinzuzufügen
9) Bei 37°C 1 Stunde abwarten
10) Danach wurden jedem Abschnitt der 6-Wellplatten noch 800µl MCF 7 Medium hinzugegeben.
11) Die Zellen in den Wellplatten die nun mit dem Transfektionsgemisch versehen waren, wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.
12) Am nächsten Tag Mediumwechsel - MCF 7 Standartmedium 2ml in jeden Abschnitt der Wellplatten
13) Nach weiteren 24 Stunden erneuter Mediumwechsel. Ab sofort wurden die stabil transfektierten MCF7-Zellen mit dem Stabilen Transfektions Medium kultiviert. Je 2 ml Pro Abschnitt der 6 Wellplatten.

Nach der durchgeführten stabilen Transfektion, wurde das Nährmedium täglich gewechselt, und die Zellen unter dem Lichtmikroskop auf Verunreinigungen und auf das zu erwartende einsetzende Zellsterben hin überprüft. Dieses Absterben setzte am 4. Tag nach Umstellung auf das stabile Transfektionsmedium ein. 30% der Zellen waren abgestorben, alle Abschnitte der Wellplatten waren im selben Ausmaß betroffen. Am 6. Tag nach Umstellung waren schließlich 80% der Zellen abgestorben und im Lichtmikroskop zeigten sich nur noch wenige resistente Zellen. Diese bildeten kleine Kolonien im Ausmaß von ca. 4-5 Zellen. Beide Wellplatten waren im selben Ausmaß von dem Absterben betroffen.

Im weiteren Verlauf wuchsen die Zellen sehr gut an, was eine Kultivierung in Zellkulturflaschen ermöglichte. Regelmäßige konfokalmikroskopische Kontrollen (siehe Punkt 3.2) zeigten, das sich sowohl die stabil transfektierten Zellen, als auch vereinzelt nicht stabil Transfektierte MCF-7 Zellen, als resistent gegenüber G-418 erwiesen.

Diese „Mischzellen“, bestehend aus stabil transfektierten MCF-7 Zellen und Standard MCF-7 Zellen, wurden anschließend dem FACS (fluorescence activated cell sorting) unterzogen, um die stabil-transfektierten Klone für die weitere Kultivierung zu gewinnen.

3.1.3 Selektion stabil transfektierter Zellen mittels FACS

Für das Aussortieren der stabil transfektierten Zellklone kam das FACSAria (BD Biosciences) des ZMF (Zentrum für Medizinische Forschung) Abteilung: core facility flow zytometrie der Medizinischen Universität Graz zur Anwendung.
Die Messgeschwindigkeit liegt bei bis zu 25.000 Zellen pro Sekunde und die Datenauswertung erfolgt mittels FACSDiva. (www.meduni-graz.at/zmf/971).

Für das FACS wurden die Mischzellen ausgewählt welche aus der WP1 kultiviert wurden. Diese zeigten in den Konfokalmikroskop-Kontrollen (siehe Punkt 3.2) eine durchwegs bessere Fluoreszenz als die Mischzellen aus WP2.

Um diese Zellen dem FACS zugänglich zu machen, wurden sie trypsiniert, zentrifugiert und in 4 Falcon Röhrchen (Vektor, GIRK1c, GIRK1d, GIRK1e) mit HBSS Puffer transportfähig gemacht. Zusätzlich waren Standard MCF-7 Zellen als Negativ für die Durchflusszytometrie notwendig.

Ergebnis: Vier 96-Wellplatten mit einem Zellklon/Wellplattenabteil

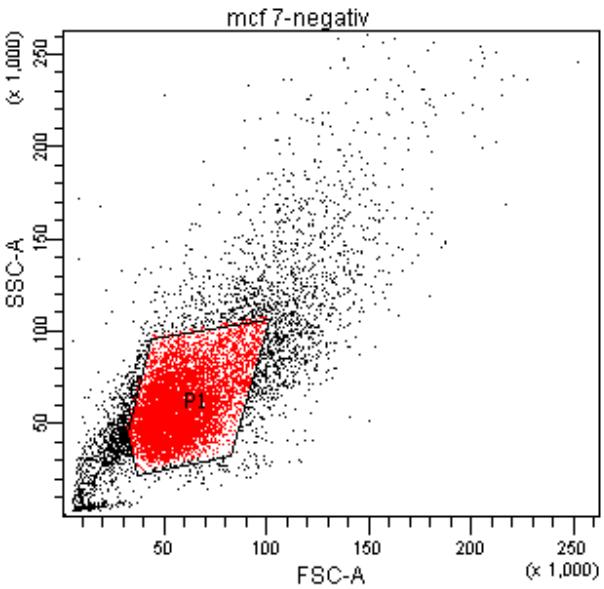
- MCF7 + pEYFP-C1
- MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1c
- MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1d
- MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1e

Die Lichtmikroskopische Kontrolle der vier 96-Wellplatten ergab jedoch, das in einigen Wellplattenabteilungen vom FACS bis zu 2 Zellen einsortiert wurden. So wurden alle Bereiche kontrolliert, und jene markiert die nur einen einzigen Zellklon enthielten, und somit für die weitere Kultivierung geeignet waren. Der Rest wurde verworfen.

Die so entstandenen neuen Zellklone erhielten, um eine einfache Beschriftung und Nummerierung zu ermöglichen, folgende Bezeichnung:

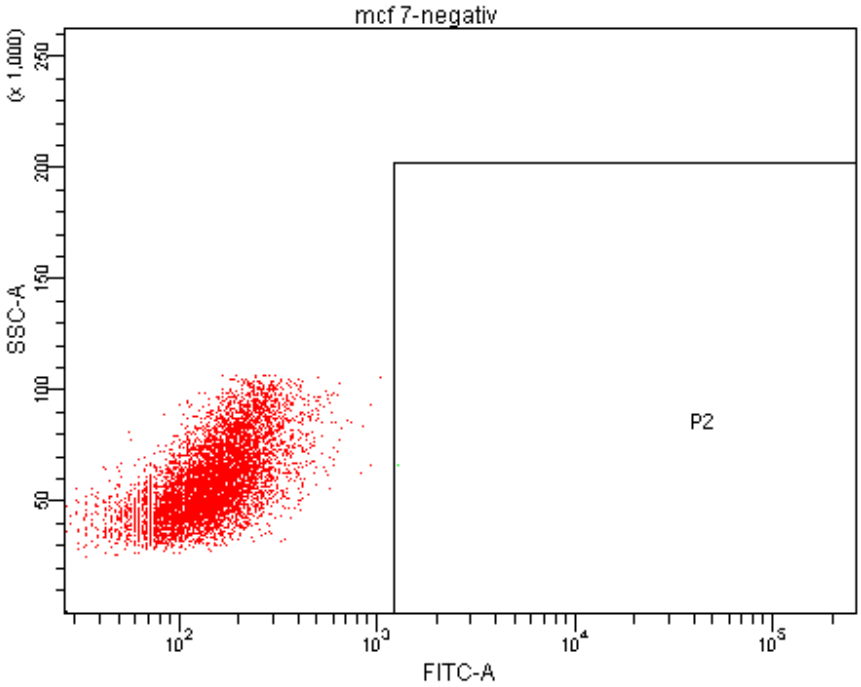
- FNV MCF7-Zelle stabil transfektiert mit Vektor pEYFP-C1
- FNG1C MCF7-Zelle stabil transfektiert mit pEYFP-C1 + GIRK1c
- FNG1D MCF7-Zelle stabil transfektiert mit pEYFP-C1 + GIRK1d
- FNG1E MCF7-Zelle stabil transfektiert mit pEYFP-C1 + GIRK1e

3.1.4 FACS SELEKTIONS-EINSTELLUNGEN



Experiment Name: 31052010
Specimen Name: mcf 7
Tube Name: negativ
Record Date: May 31, 2010 1:23:34 PM

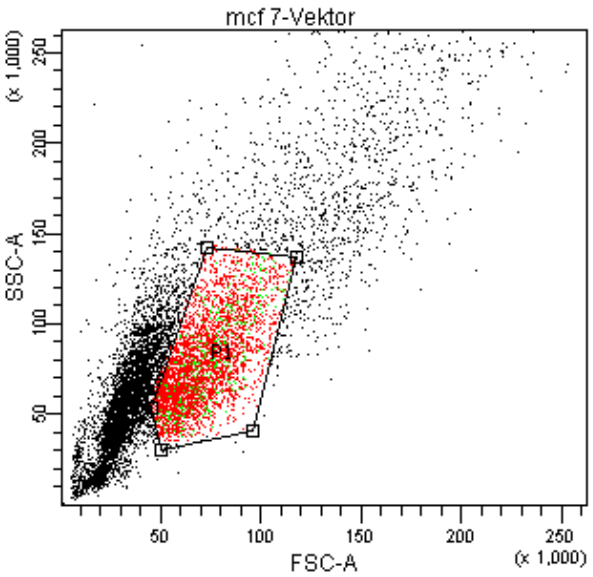
Population



Tube: negativ

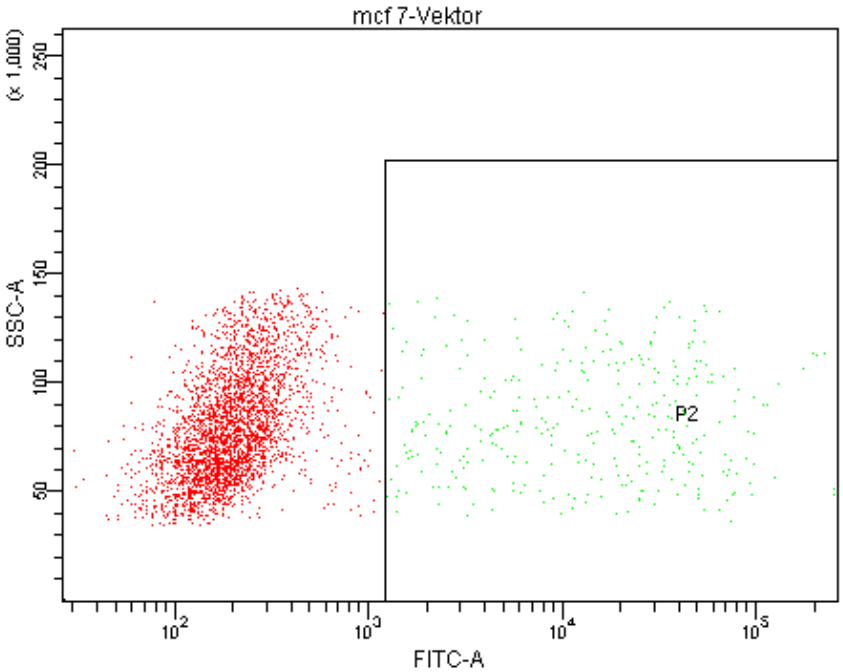
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	6,999	70.0	70.0
P2	1	0.0	0.0

Abbildung 3.1*Dot-Plot Darstellung der MCF7 Zellen, zur Erstellung der FACS Selektionsgrundlage. P2 = Anzahl der fluoreszierenden Zellen*



Experiment Name: 31052010
Specimen Name: mcf 7
Tube Name: Vektor
Record Date: May 31, 2010 2:46:30 PM

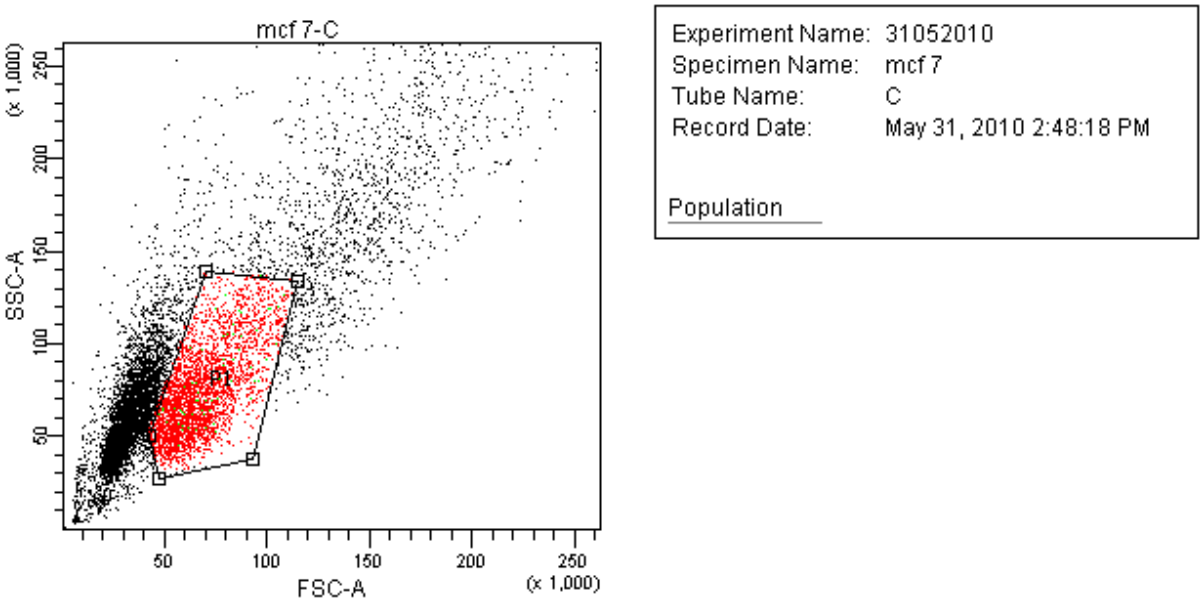
Population

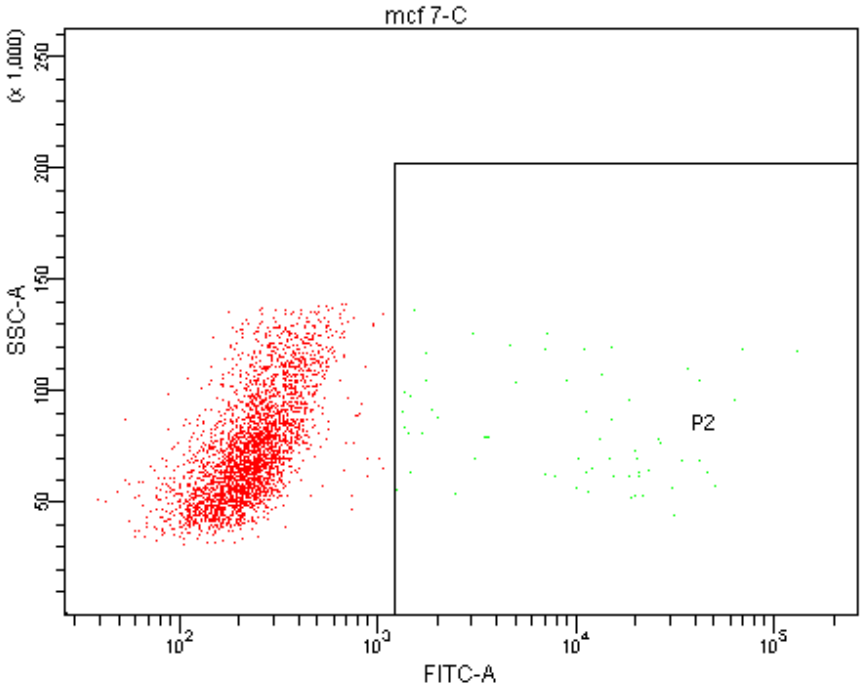


Tube: Vektor

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	3,401	34.0	34.0
P2	326	9.6	3.3

Abbildung 3.2 *Dot-Plot Darstellung der MCF7 Zellen + pEYFP-C1. P2 Anzahl der fluoreszierenden Zellen welche von den nicht fluoreszierenden getrennt werden.*

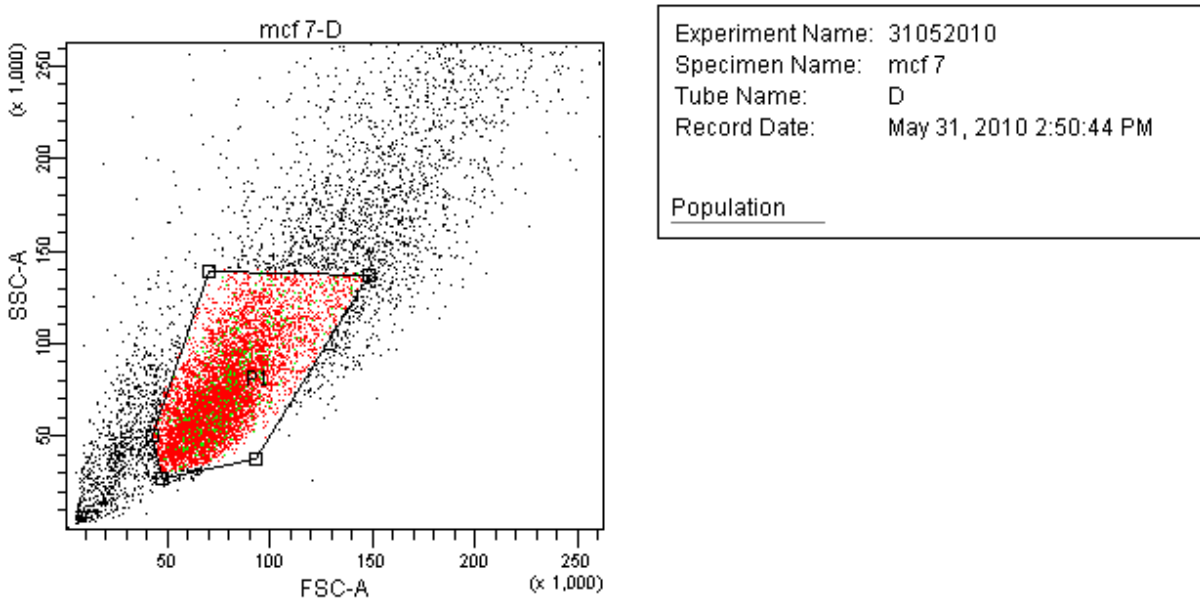


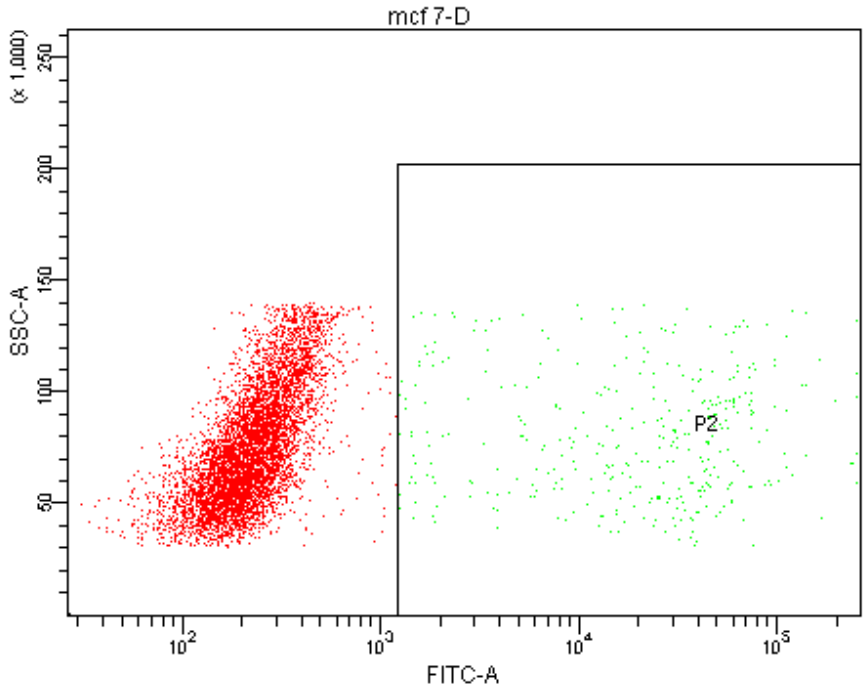


Tube: C

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	3,093	30.9	30.9
P2	62	2.0	0.6

Abbildung 3.3 *Dot-Plot Darstellung der MCF7 Zellen + pEYFP-C1 + GIRK1c. P2 Anzahl der fluoreszierenden Zellen welche von den nicht fluoreszierenden getrennt werden.*

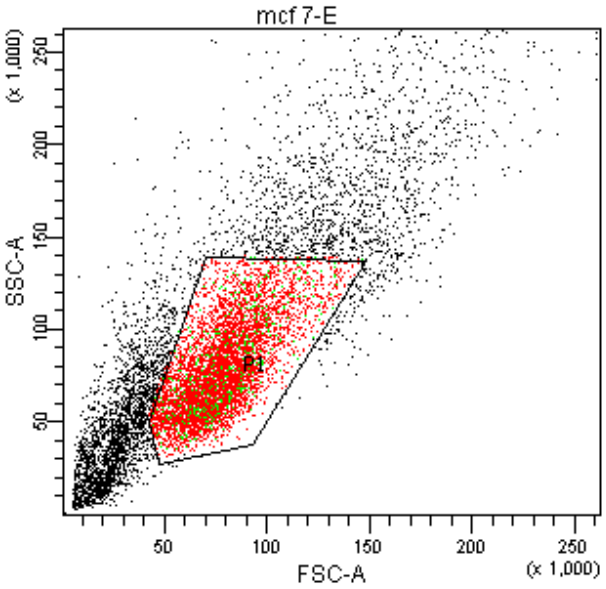




Tube: D

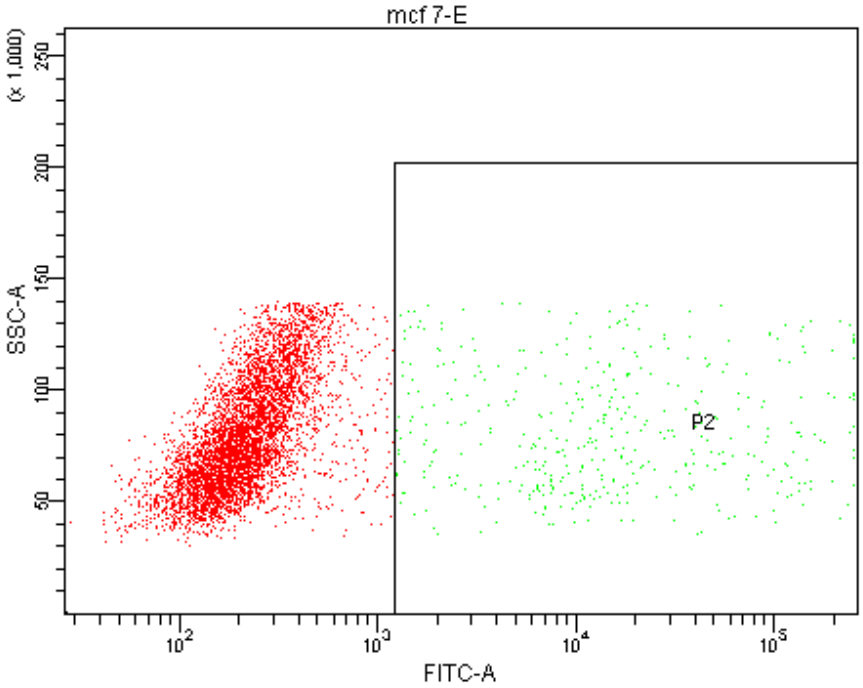
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	6,525	65.2	65.2
P2	366	5.6	3.7

Abbildung 3.4 *Dot-Plot Darstellung der MCF7 Zellen + pEYFP-C1 + GIRK1d. P2 Anzahl der fluoreszierenden Zellen welche von den nicht fluoreszierenden getrennt werden.*



Experiment Name: 31052010
Specimen Name: mcf 7
Tube Name: E
Record Date: May 31, 2010 2:55:00 PM

Population



Tube: E

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	5,848	58.5	58.5
P2	427	7.3	4.3

Abbildung 3.5 *Dot-Plot Darstellung der MCF7 Zellen + pEYFP-C1 + GIRK1e. P2 Anzahl der fluoreszierenden Zellen welche von den nicht fluoreszierenden getrennt werden.*

Die beste Fluoreszenz und höchste Zellteilungsrate erzielten im Verlauf der weiteren Kultivierung folgende Zellklone:

FNV#02	FNG1C#01	FNG1D#01	FNG1E#02
FNV#03	FNG1C#02	FNG1D#02	FNG1E#04
FNV#04	FNG1C#04	FNG1D#05	FNG1E#05
FNV#07	FNG1C#05	FNG1D#06	FNG1E#06
FNV#08	FNG1C#06	FNG1D#07	FNG1E#07
FNV#09	FNG1C#07	FNG1D#09	FNG1E#08
	FNG1C#09	FNG1D#10	FNG1E#09

3.1.5 Charakterisierung der stabil transfektierten Zellklone

Im Rahmen der Kultivierung und der konfokalmikroskopischen Kontrollen zeigte sich, dass sich die unterschiedlichen Klone, vor allem die Klone der unterschiedlichen Splice-Varianten des GIRK1 Rezeptors, sowohl in ihrer Zellteilungsrate, als auch in der Fluoreszenzintensität, deutlich voneinander unterschieden.

Die folgenden Tabellen sollen diese Unterschiede übersichtlich verdeutlichen.

Zellklon	Fluoreszenzintensität	Zellteilungsrate
FNV#02	++++	++++
FNV#03	+++	++
FNV#04	++++	++++
FNV#07	++++	++++
FNV#08	+++	++++
FNV#09	+++	++++
FNG1C#01	+++	+
FNG1C#02	+++	+++
FNG1C#04	+	+++
FNG1C#05	+++	+++
FNG1C#06	+++	+
FNG1C#07	+++	+
FNG1C#09	++++	++++

Tabelle 3.1 *Charakterisierung der stabil transfektierten Zellklone*

Zellklon	Fluoreszenzintensität	Zellteilungsrate
FNG1D#01	++++	+++
FNG1D#02	++++	++++
FNG1D#05	++++	+++
FNG1D#06	+++	+
FNG1D#07	++++	+++
FNG1D#09	++++	+++
FNG1D#10	++++	+++
FNG1E#02	+++	++++
FNG1E#04	+++	++++
FNG1E#05	++++	++++
FNG1E#06	+++	+++
FNG1E#07	++++	++++
FNG1E#08	+++	+
FNG1E#09	+++	+++

Tabelle 3.2 *Charakterisierung der stabil transfektierten Zellklone*

3.2 Regelmäßige Kontrollen im Konfokalmikroskop

Zur Darstellung der fluoreszierenden, stabil transfektierten Zellen, kam ein Konfokalmikroskop der Firma Leica vom Typ SL2 basierend auf dem Mikroskopstativ DM IRE2 zur Anwendung.

Für meine Versuche verwendete ich ein 20x (NA 0,5) Wasserimmersions-Objektiv. Die horizontale und vertikale Auflösung betrug 512x512 Pixel. Die Anregung der Proteinfluoreszenz erfolgte durch einen Argon-Laser bei 513nm, auch der Beam Splitter war bei 513nm eingestellt. Die Wellenlängen des Detektionsfensters lagen bei 520nm bis 550nm.

Die ersten Konfokalmikroskopischen Aufnahmen tätigte ich 8 Tage nach dem erfolgten Transfektions-Procedere. Hier zeigte sich bereits eine leichte Fluoreszenz der MCF7+pEYFP-C1 Zellen.

Die MCF7-Zellen mit den Konstrukten

- MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1c
- MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1d
- MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1e

hingegen zeigten zu diesem Zeitpunkt noch keine Fluoreszenz.

Eine weitere konfokalmikroskopische Kontrolle, 30 Tage nach erfolgter Transfektion, brachte schließlich die ersten guten Ergebnisse zum Vorschein:

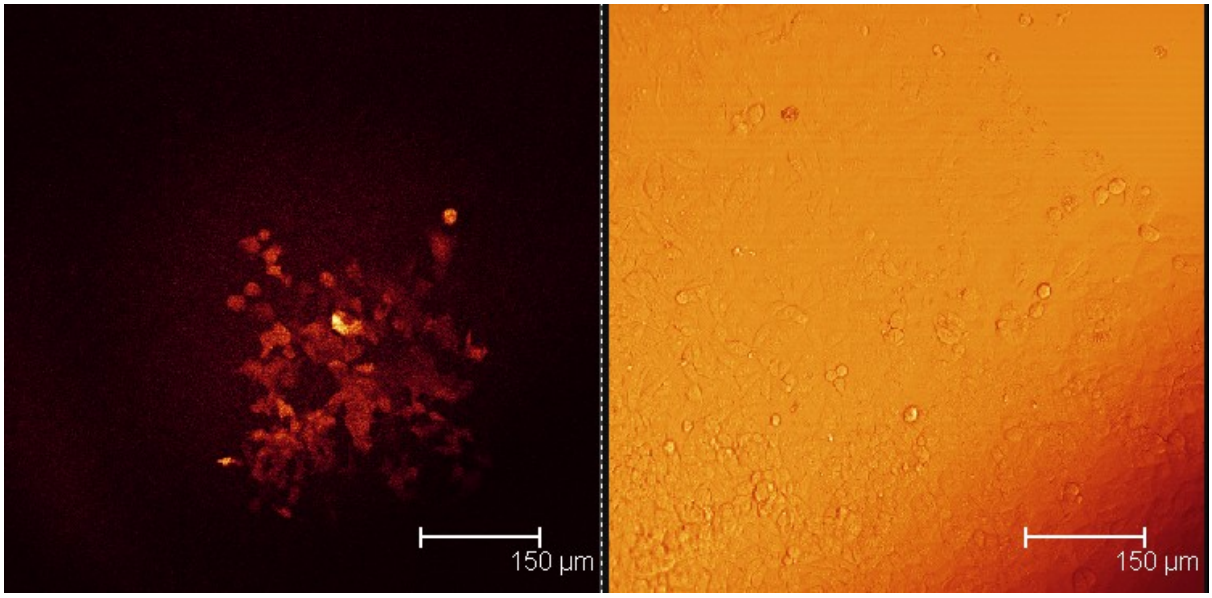


Abbildung 3.6 *Mischzellen MCF7+pEYFP-C1 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv (30 Tage nach erfolgter Transfektion)*

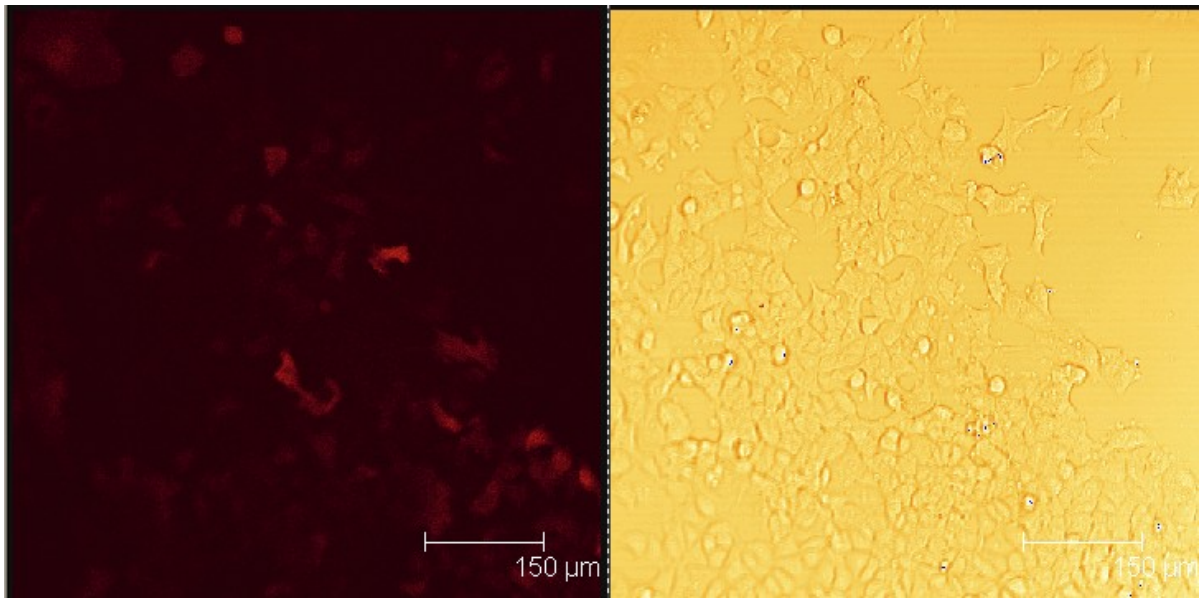


Abbildung 3.7 *Mischzellen MCF7+pEYFP-C1+GIRK1c konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv (30 Tage nach erfolgter Transfektion)*

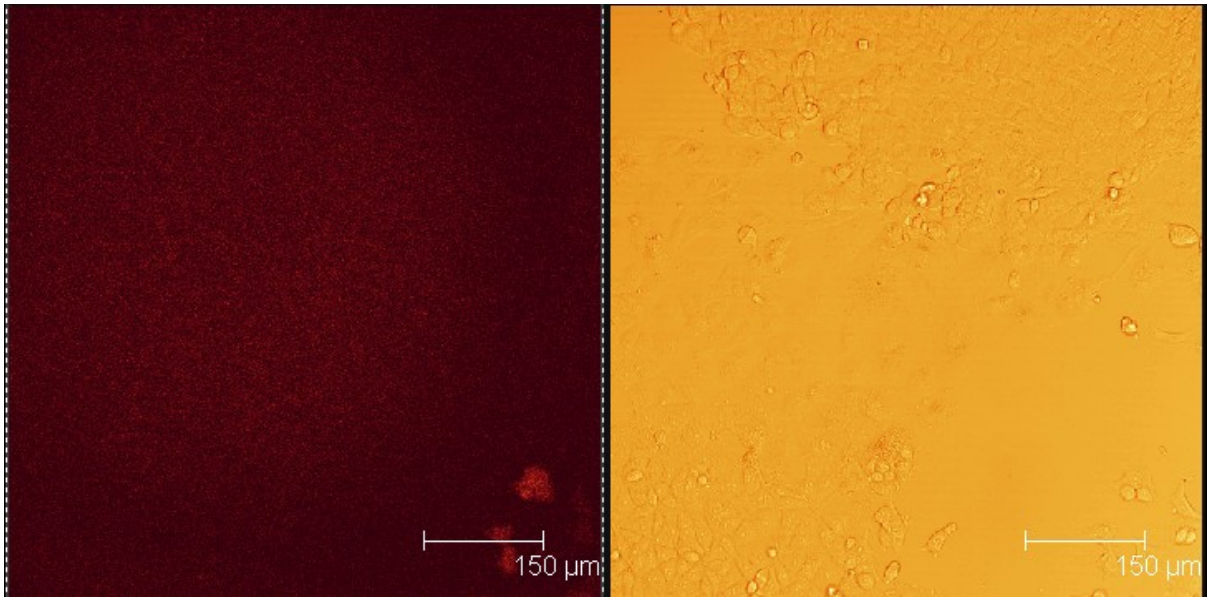


Abbildung 3.8 *Mischzellen MCF7+pEYFP-C1+GIRK1d konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv (30 Tage nach erfolgter Transfektion)*

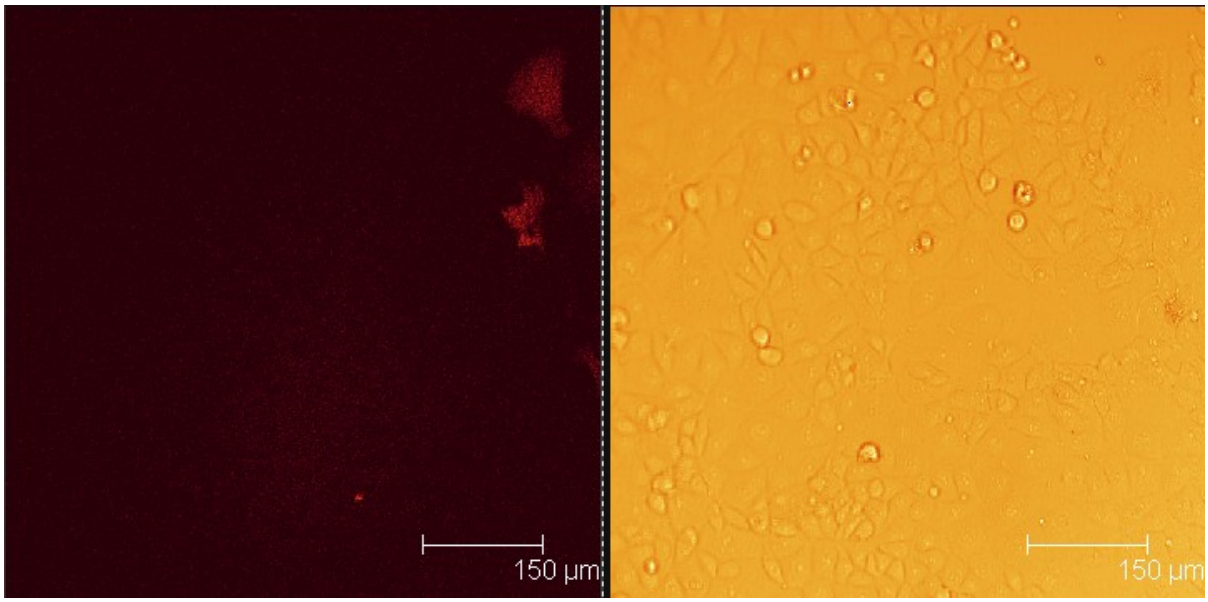


Abbildung 3.9 *Mischzellen MCF7+pEYFP-C1+GIRK1e konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv (30 Tage nach Transfektion)*

Auffällig in diesem Stadium der Zellkultivierung, war die unterschiedliche Intensität der Fluoreszenz.

So zeigten die

- MCF7+pEYFP-C1 und die
- MCF7+pEYFP-C1+GIRK1c Zellen eine weitaus intensivere Fluoreszenz als die

- MCF7+pEYFP-C1+GIRK1d und
- MCF7+pEYFP-C1+GIRK1e Zellen.

40 Tage nach erfolgtem FACS und nach weiterer Kultivierung der ausgewählten Zellklone,entstanden die folgenden konfokalmikroskopischen Aufnahmen:

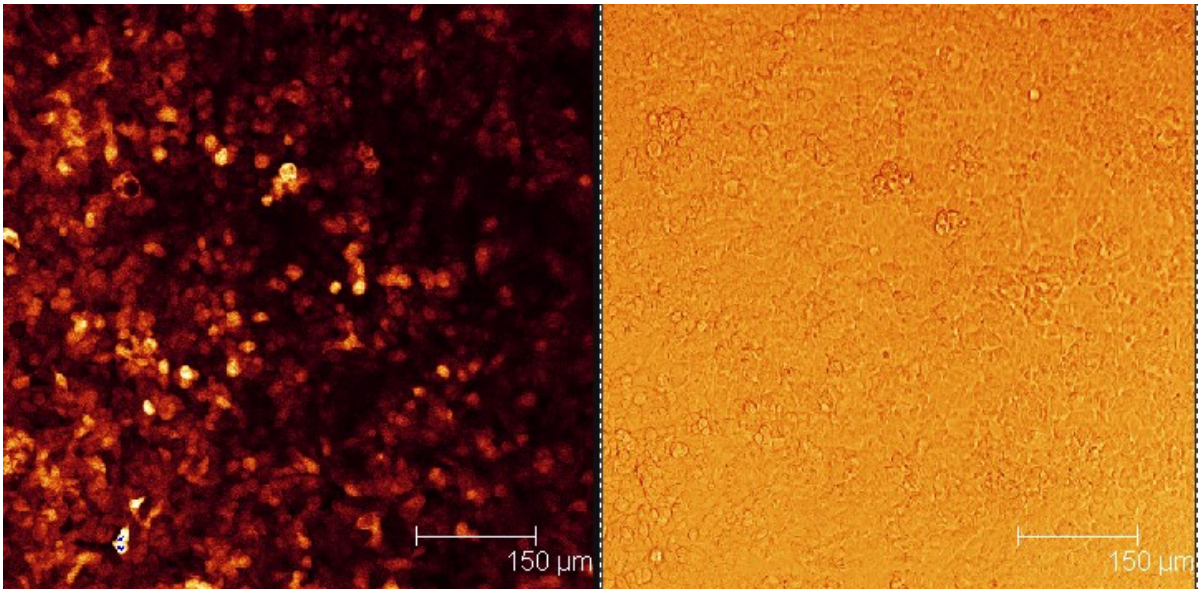


Abbildung 3.10 *Stabil transfektierter Klon FNV#02 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

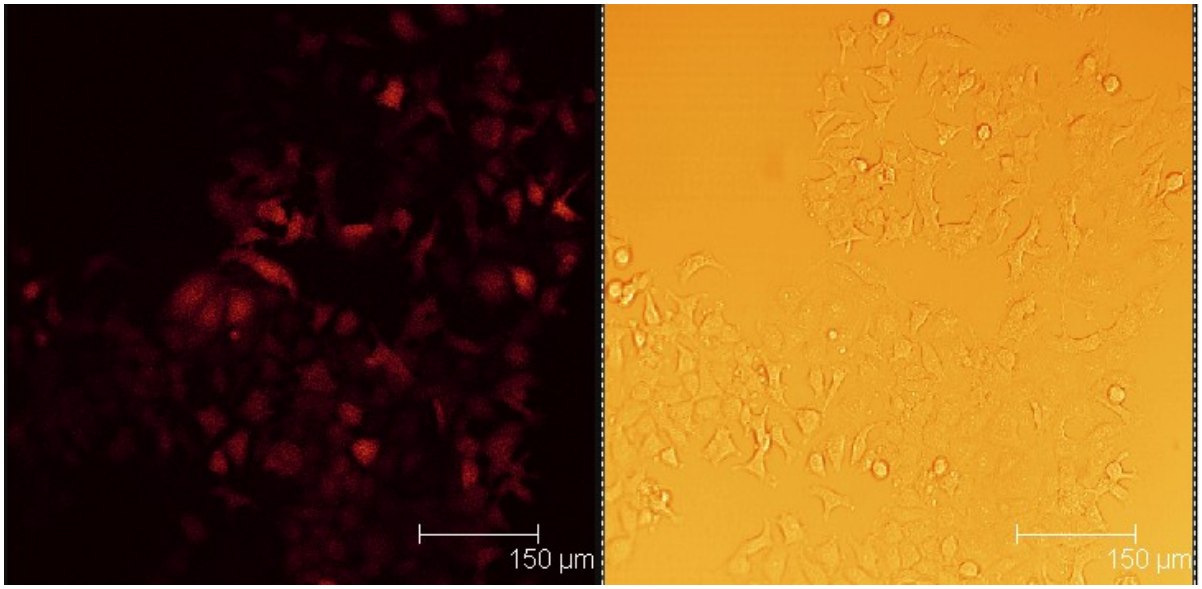


Abbildung 3.11 *Stabil transfektierter Klon FNV#03 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

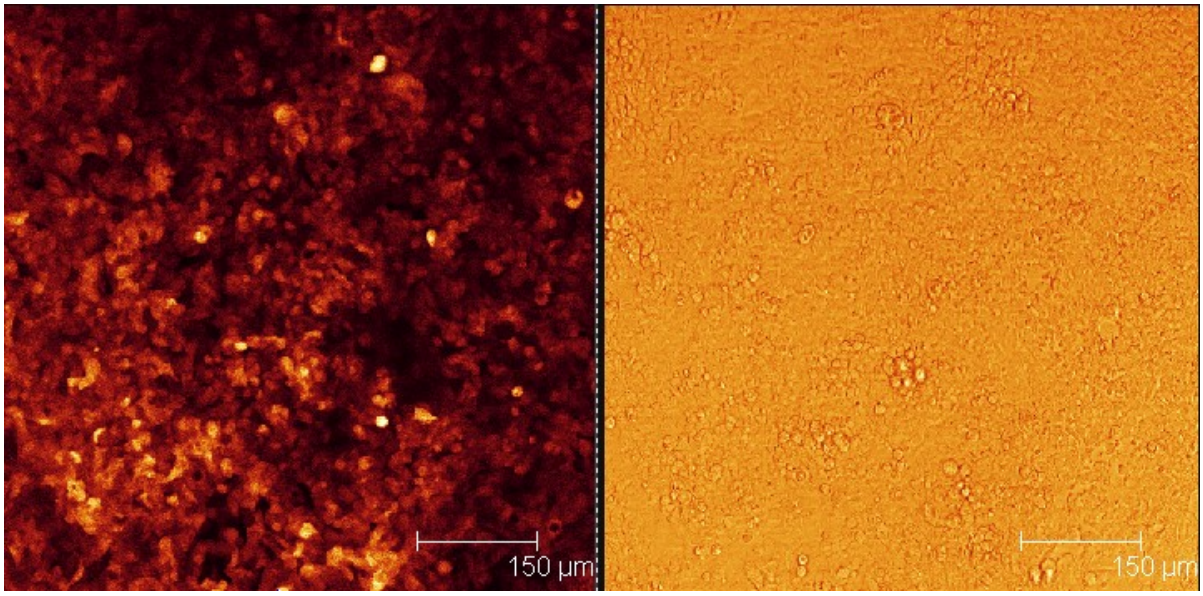


Abbildung 3.12 *Stabil transfektierter Klon FNV#04 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

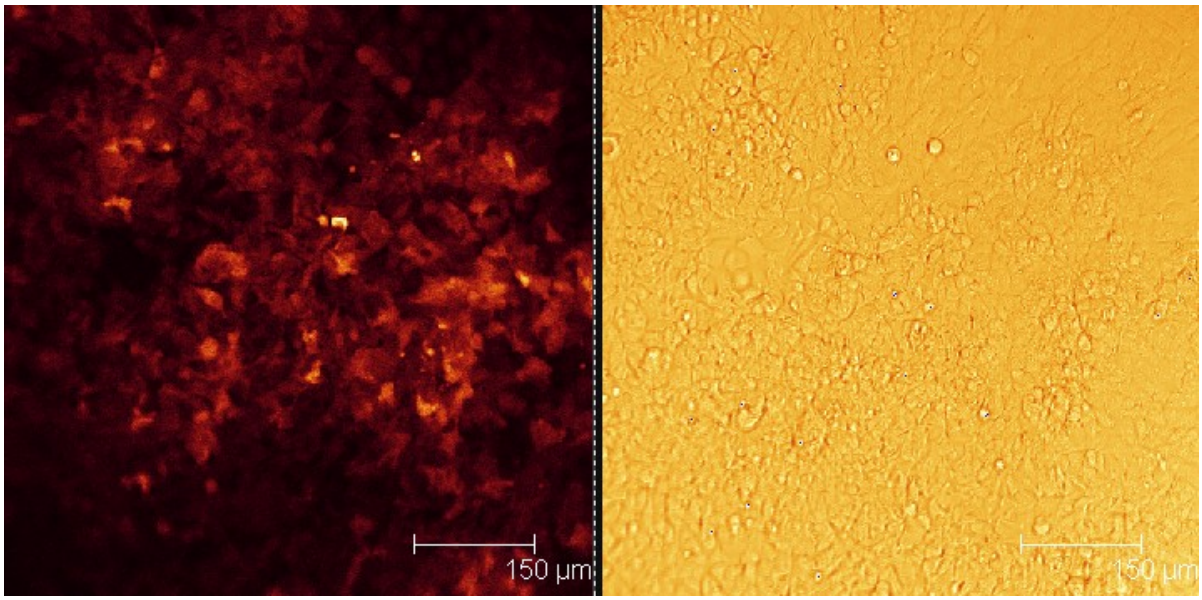


Abbildung 3.13 *Stabil transfektierter Klon FNV#07 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

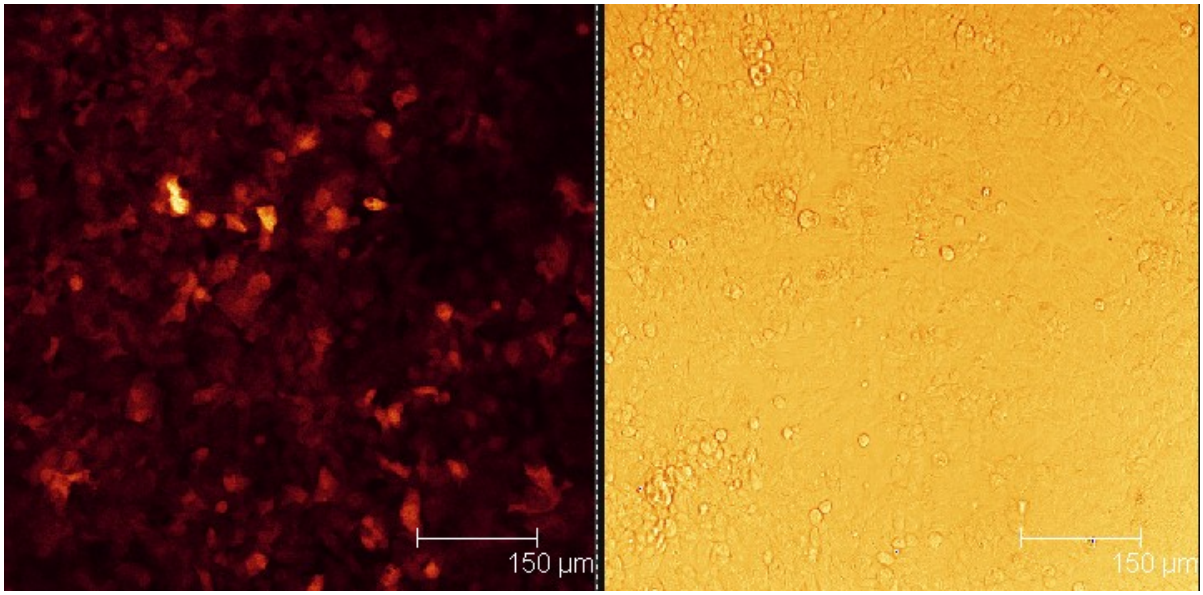


Abbildung 3.14 *Stabil transfektierter Klon FNV#08 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

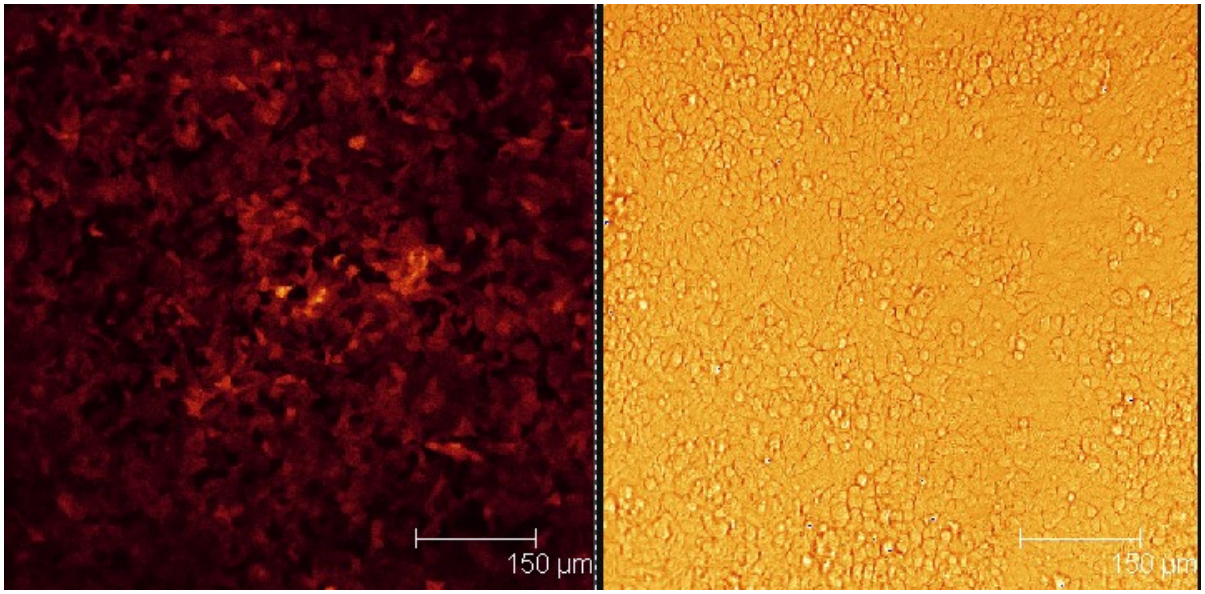


Abbildung 3.15 *Stabil transfektierter Klon FNV#09 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

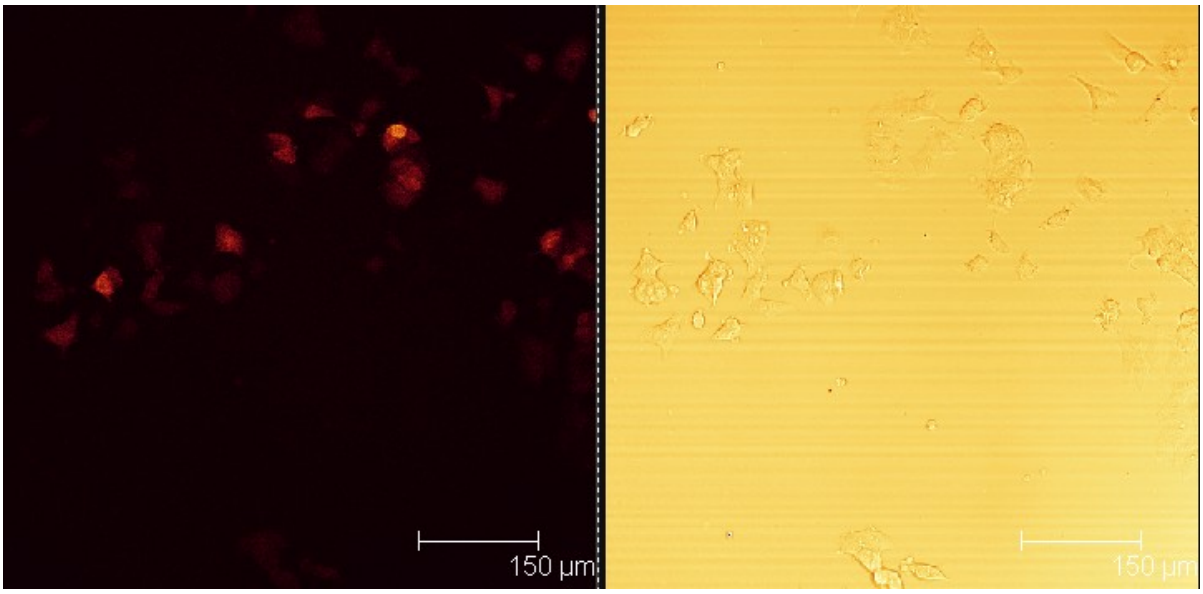


Abbildung 3.16 *Stabil transfektierter Klon FNG1C#01 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

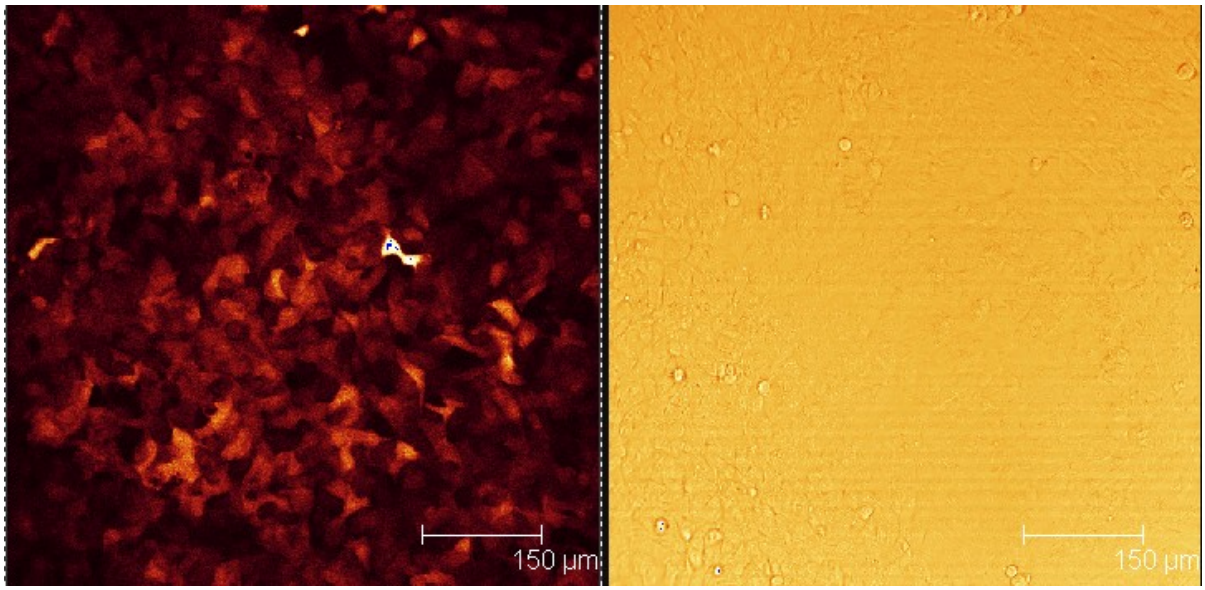


Abbildung 3.17 *Stabil transfektierter Klon FNG1C#02 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

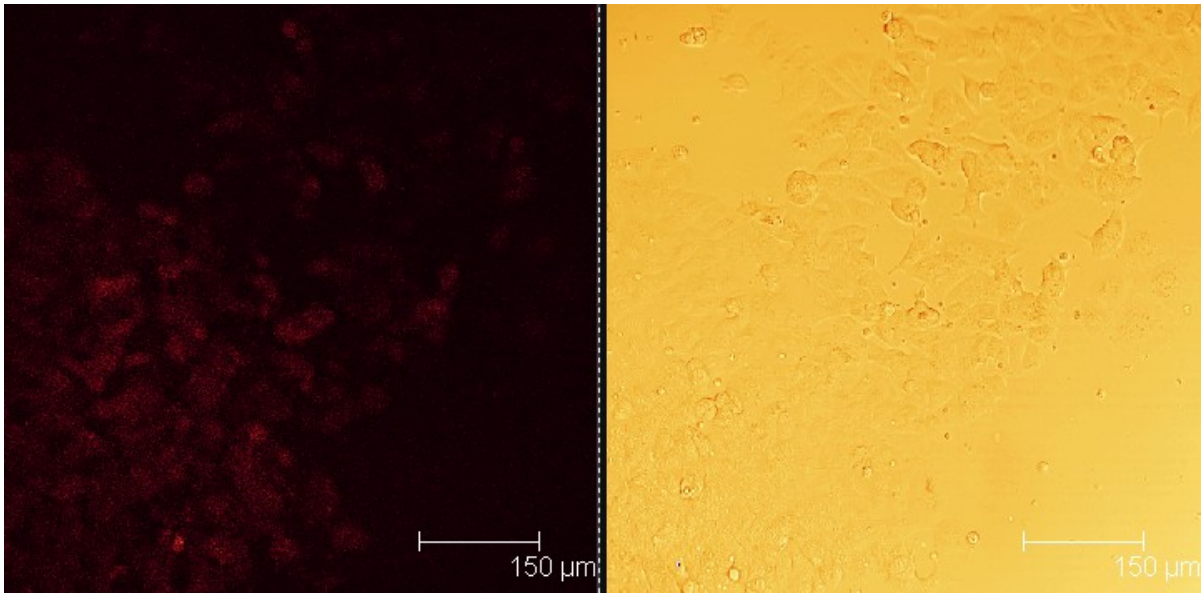


Abbildung 3.18 *Stabil transfektierter Klon FNG1C#04 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

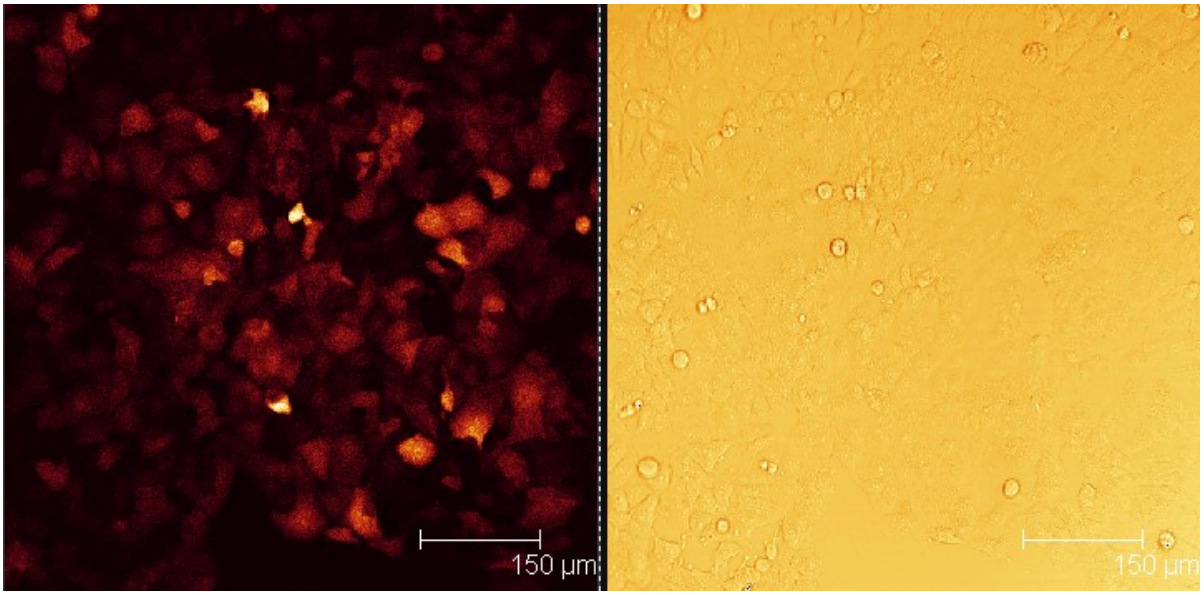


Abbildung 3.19 *Stabil transfektierter Klon FNG1C#05 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

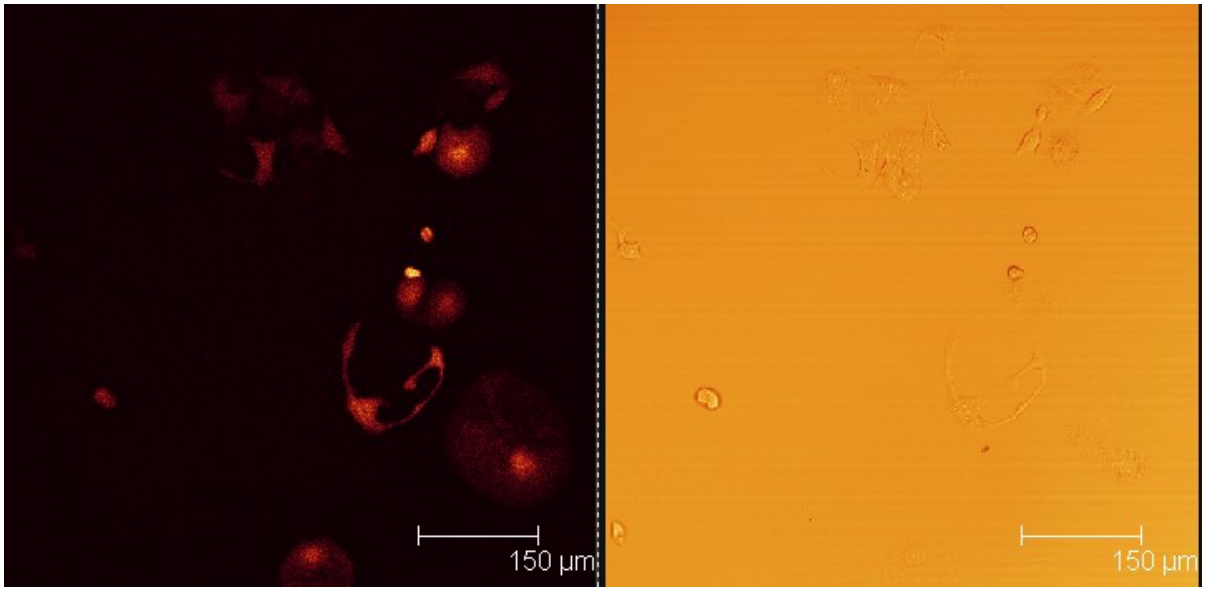


Abbildung 3.20 *Stabil transfektierter Klon FNG1C#06 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

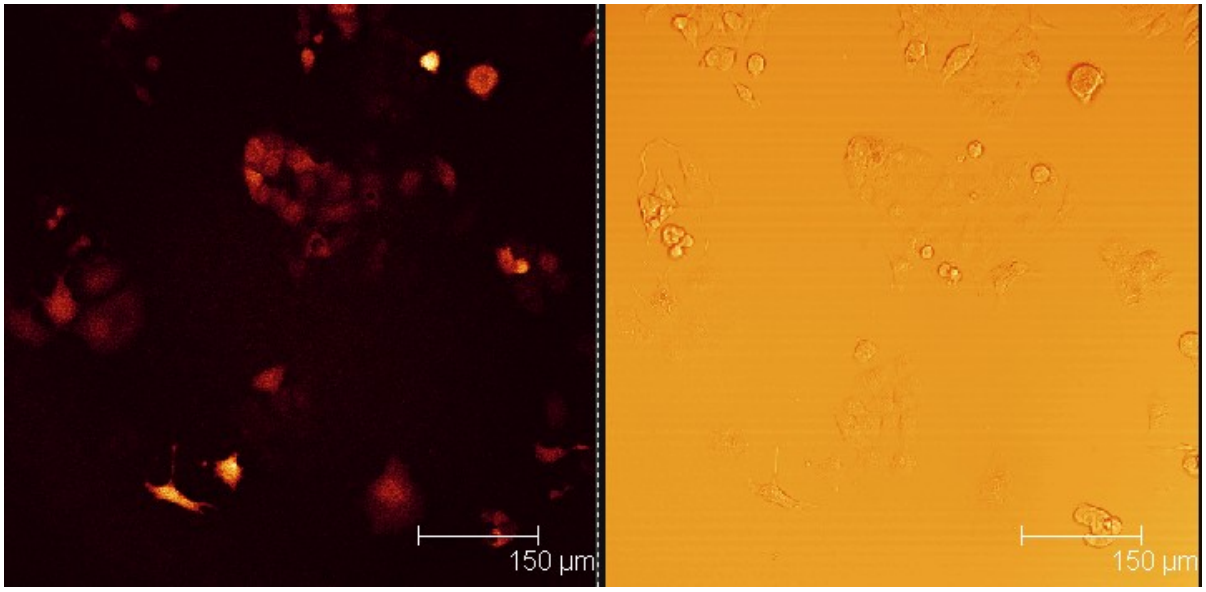


Abbildung 3.21 *Stabil transfektierter Klon FNG1C#07 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

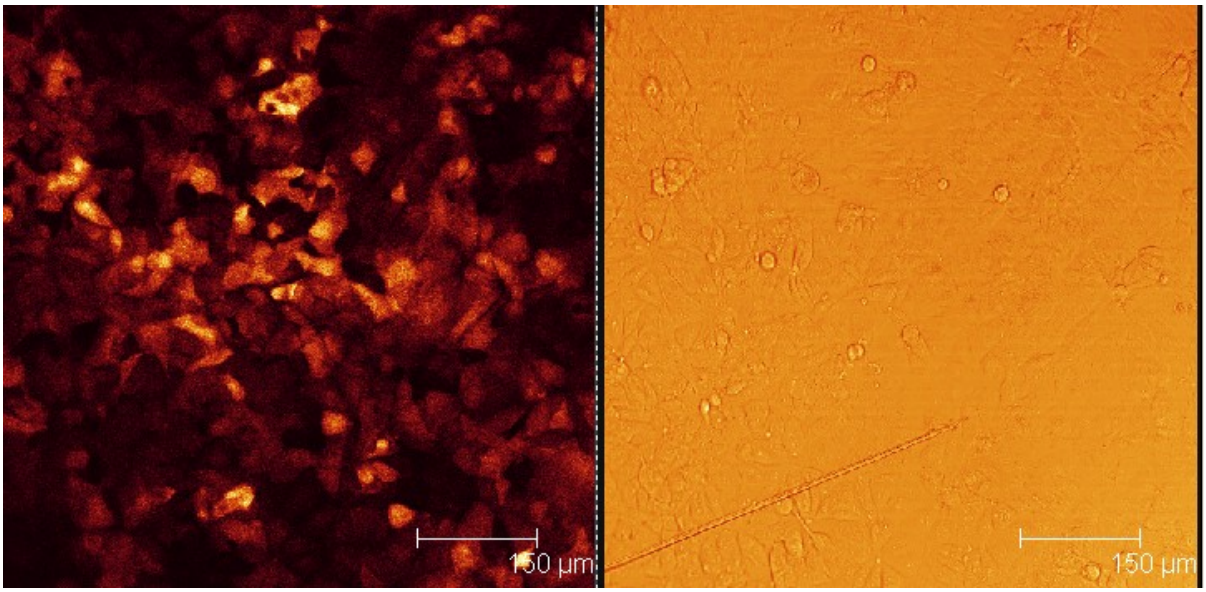


Abbildung 3.22 *Stabil transfektierter Klon FNG1C#09 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

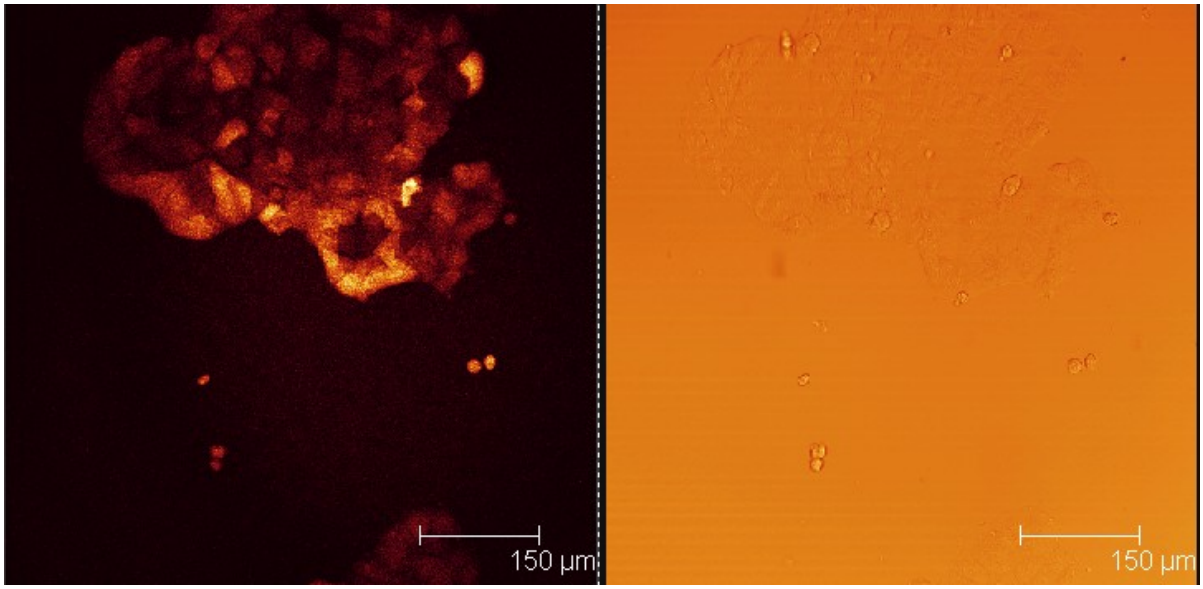


Abbildung 3.23 *Stabil transfektierter Klon FNG1D#01 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

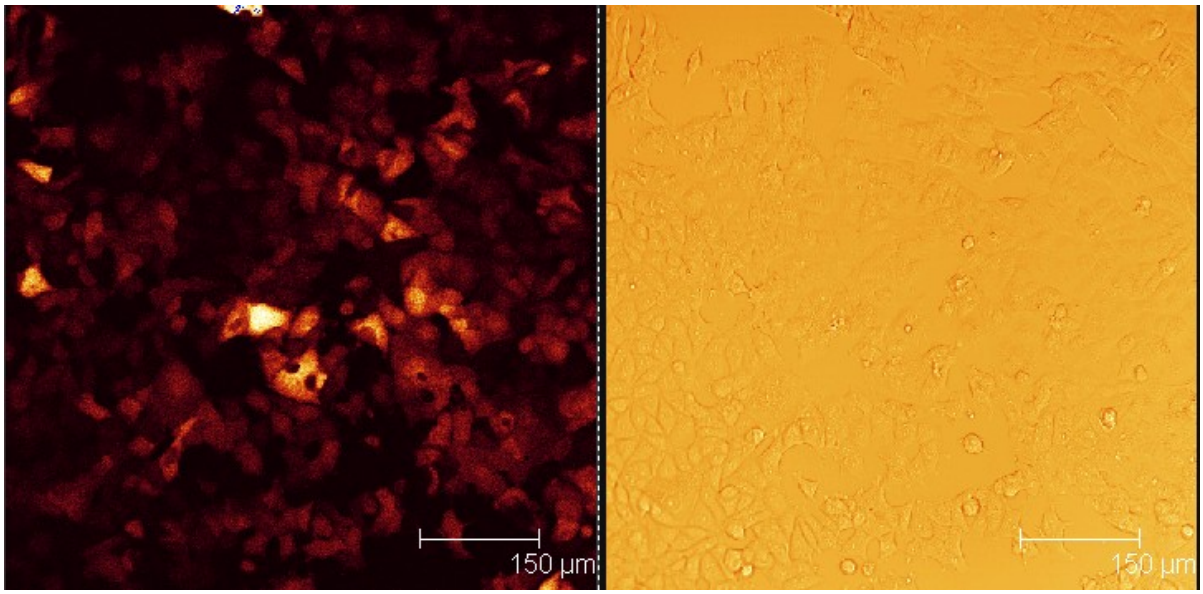


Abbildung 3.24 *Stabil transfektierter Klon FNG1D#02 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

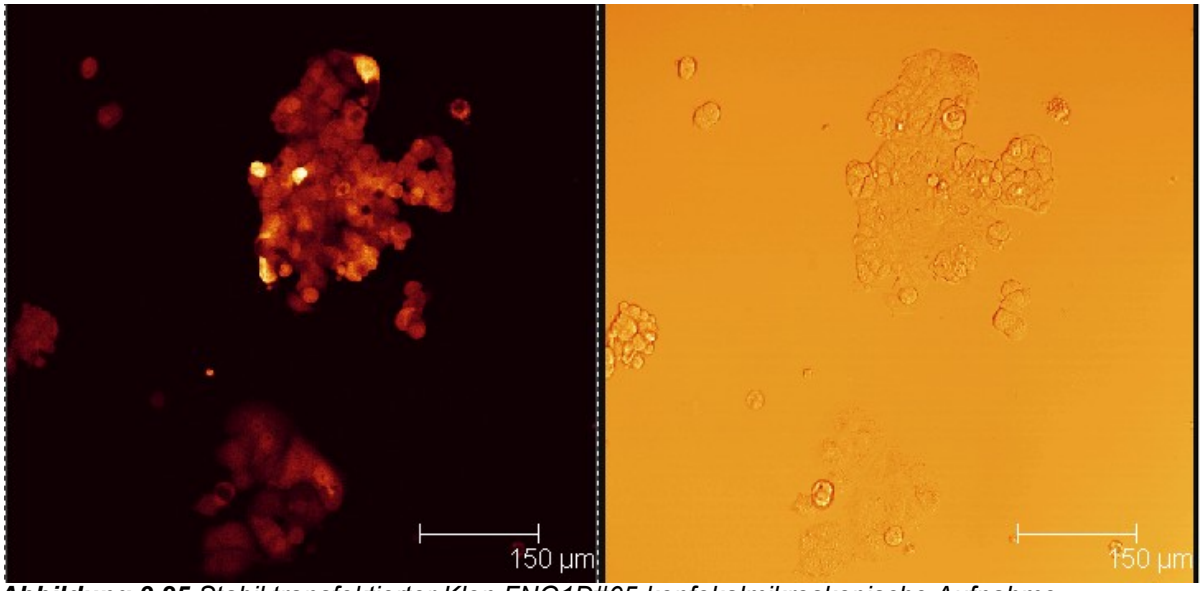


Abbildung 3.25 *Stabil transfektierter Klon FNG1D#05 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

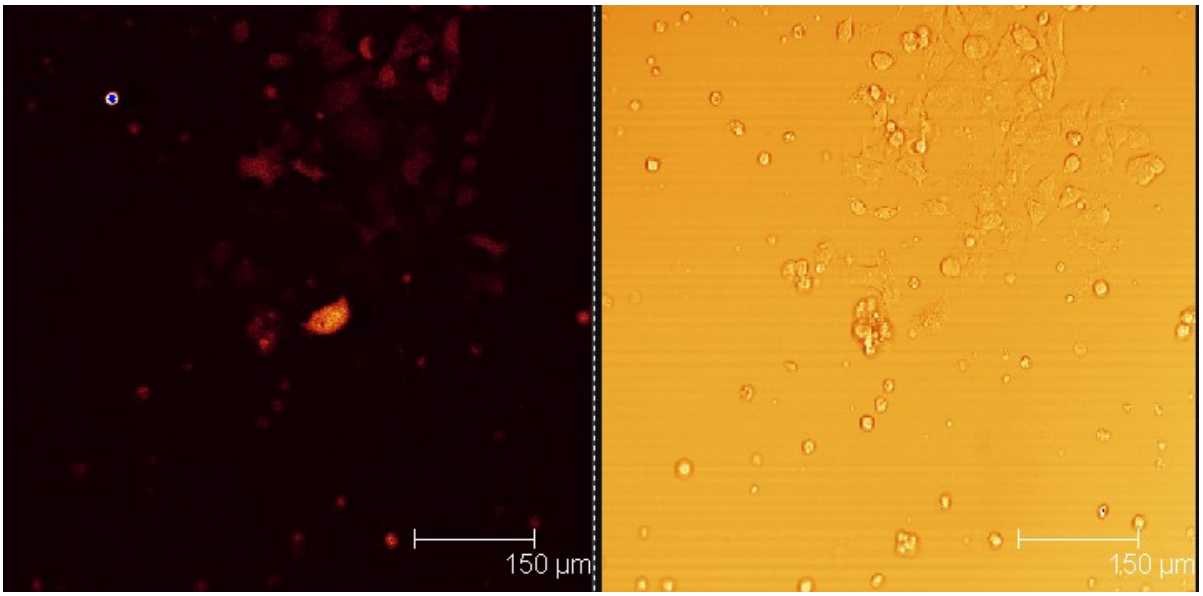


Abbildung 3.26 *Stabil transfektierter Klon FNG1D#06 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

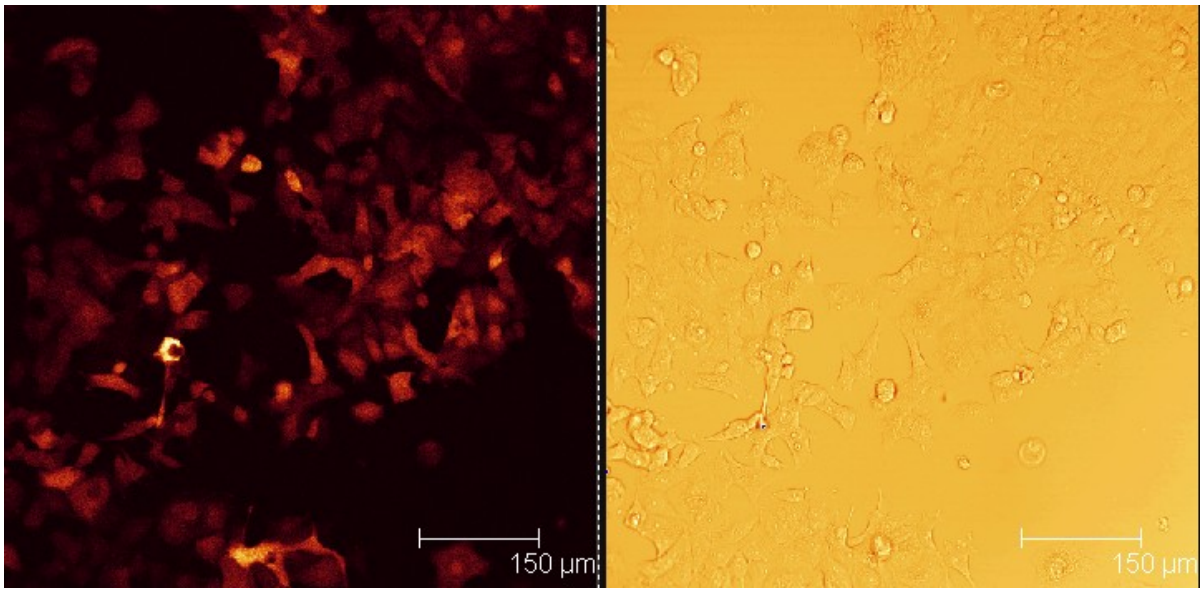


Abbildung 3.27 *Stabil transfektierter Klon FNG1D#07 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

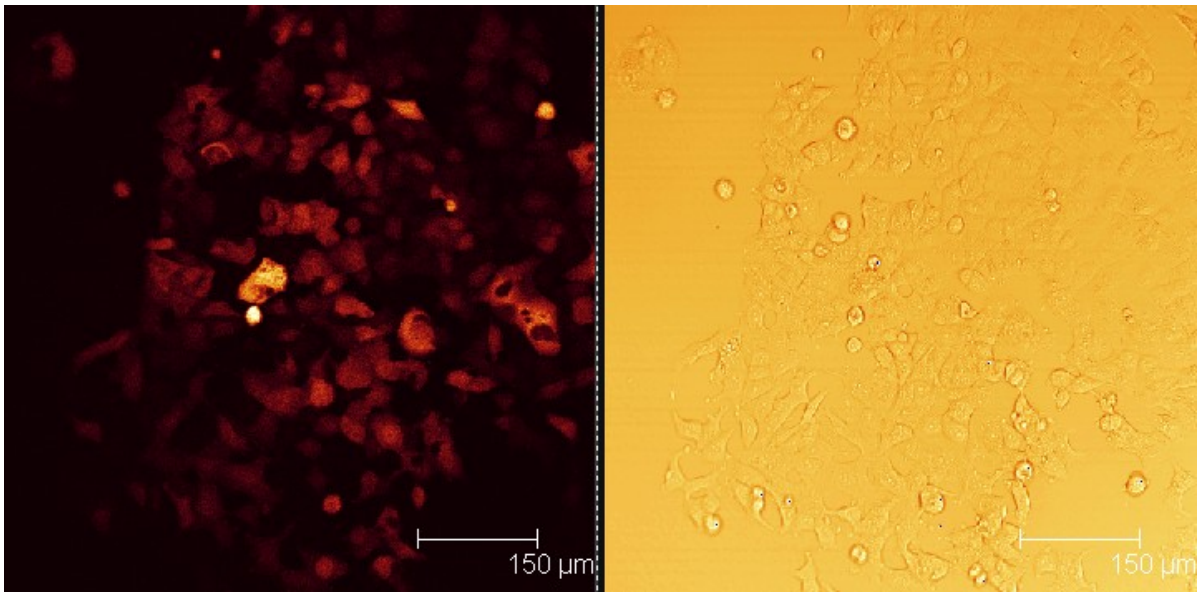


Abbildung 3.28 *Stabil transfektierter Klon FNG1D#09 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

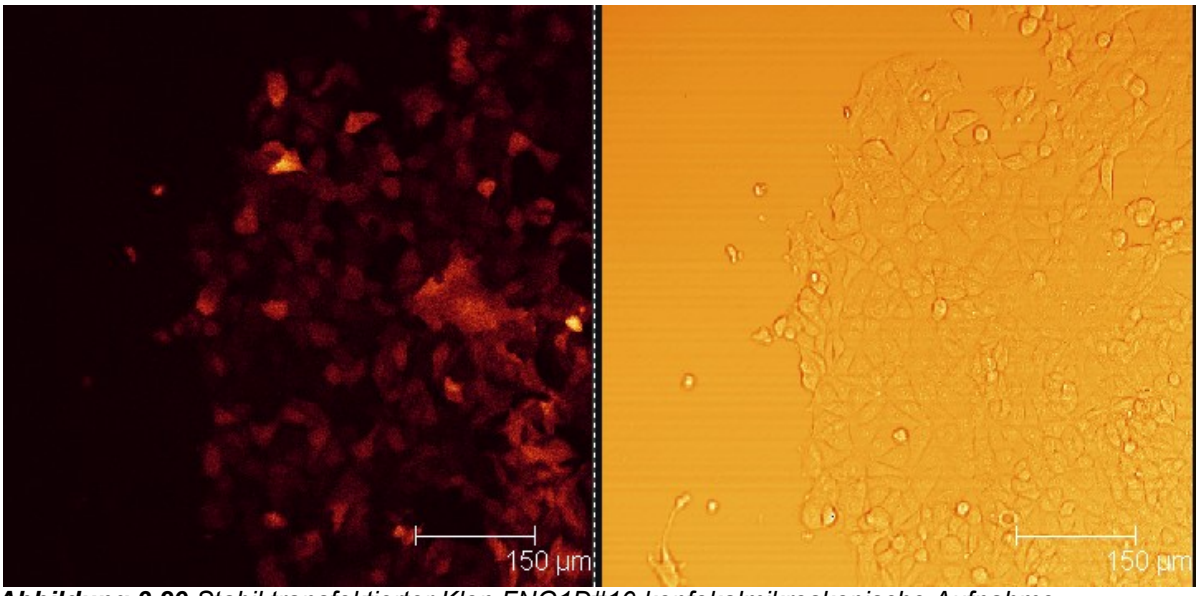


Abbildung 3.29 *Stabil transfektierter Klon FNG1D#10 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

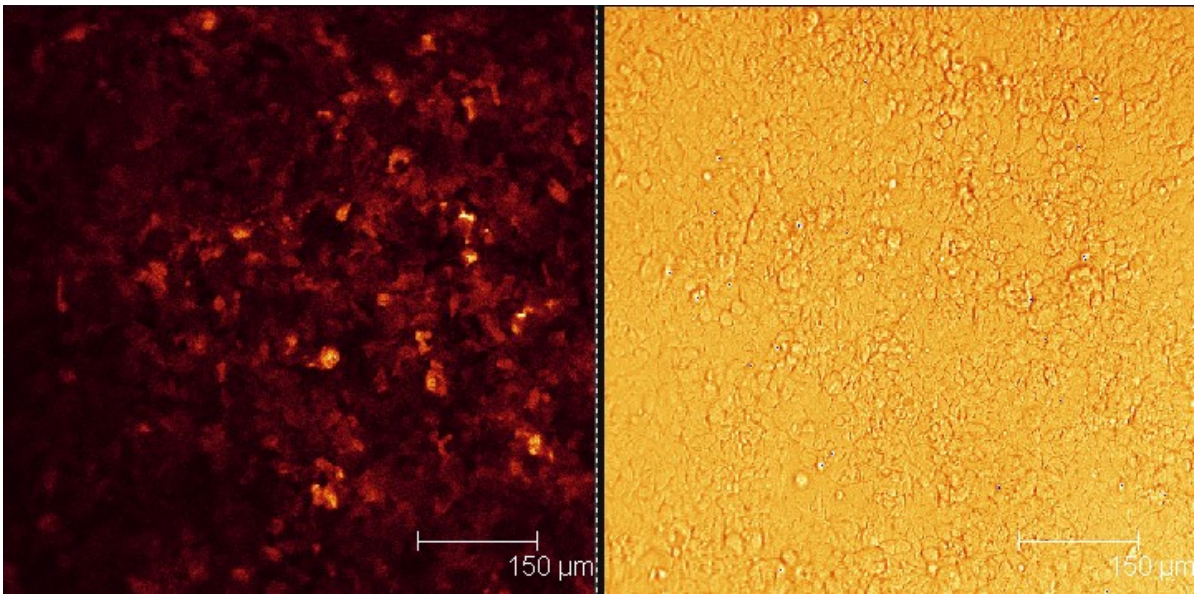


Abbildung 3.30 *Stabil transfektierter Klon FNG1E#02 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

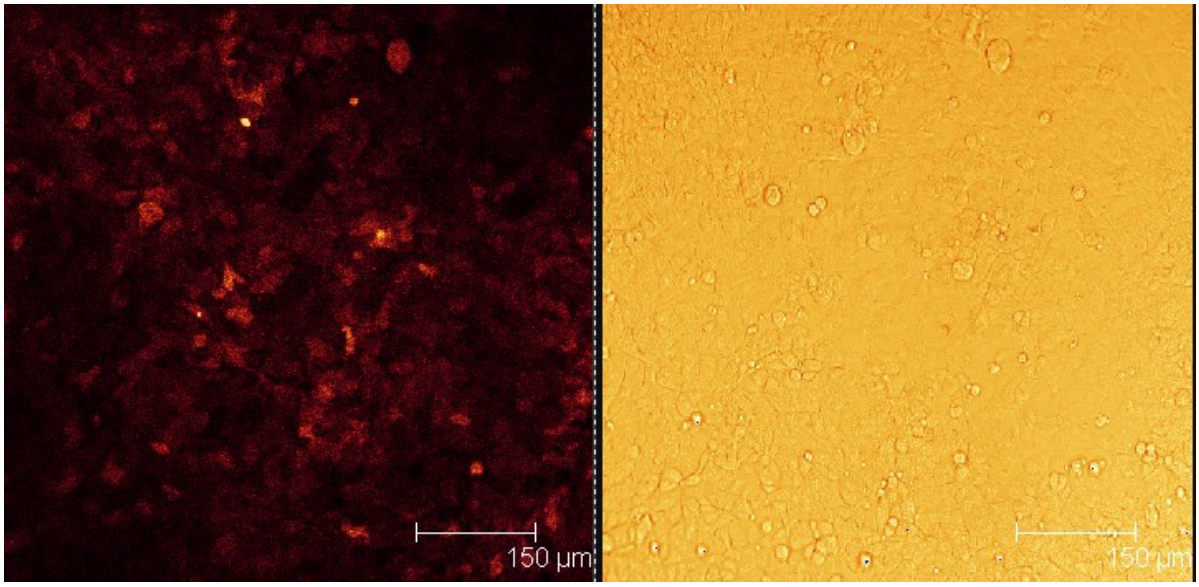


Abbildung 3.31 *Stabil transfektierter Klon FNG1E#04 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

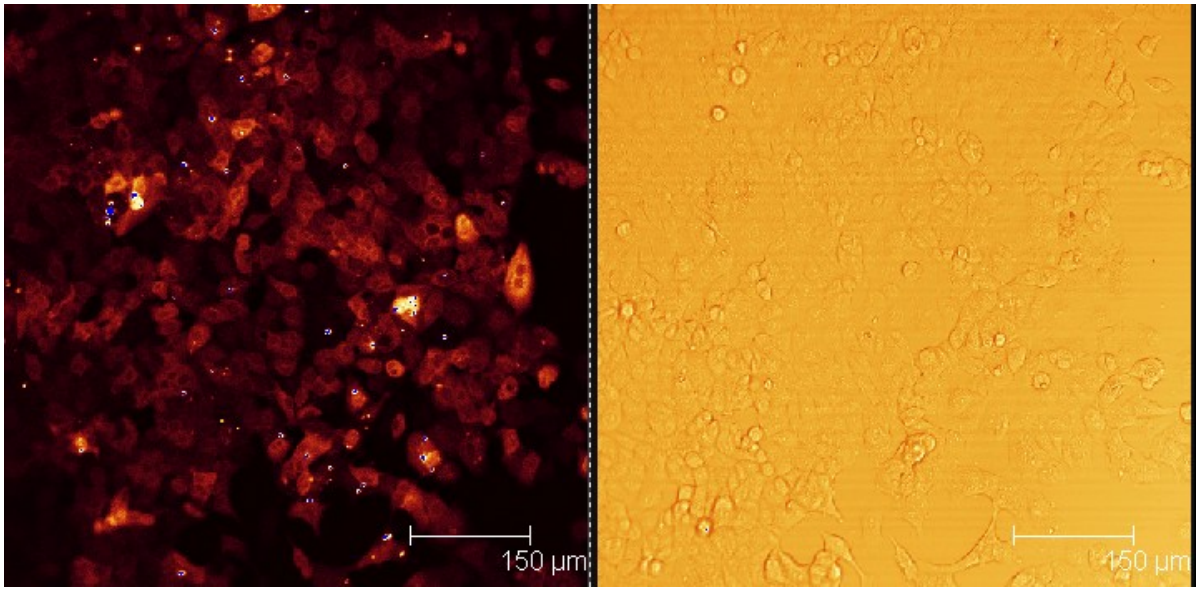


Abbildung 3.32 *Stabil transfektierter Klon FNG1E#05 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

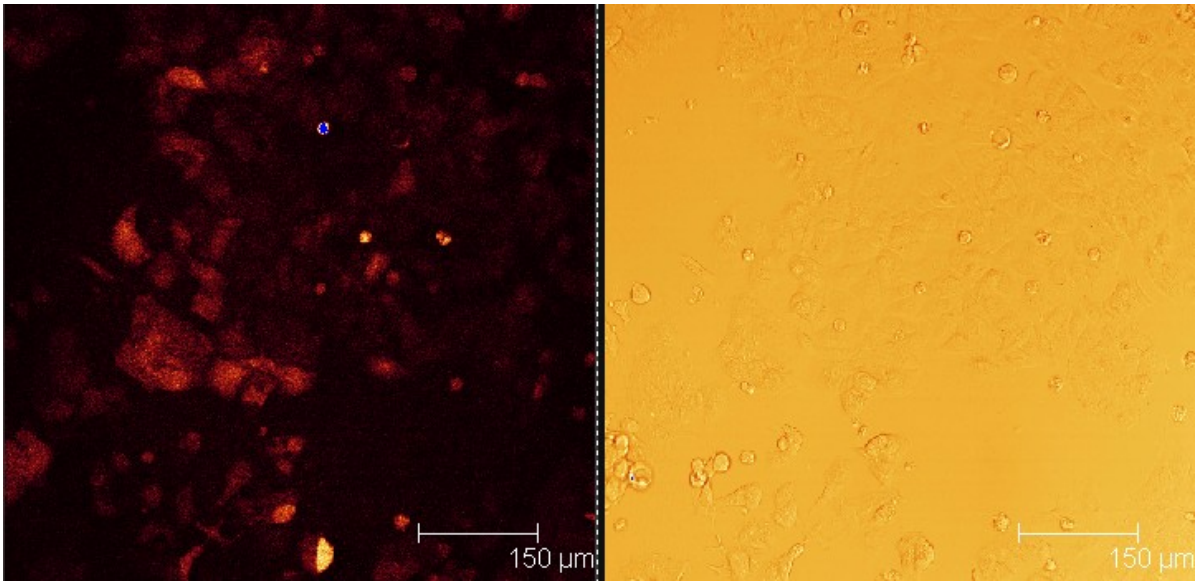


Abbildung 3.33 *Stabil transfektierter Klon FNG1E#06 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

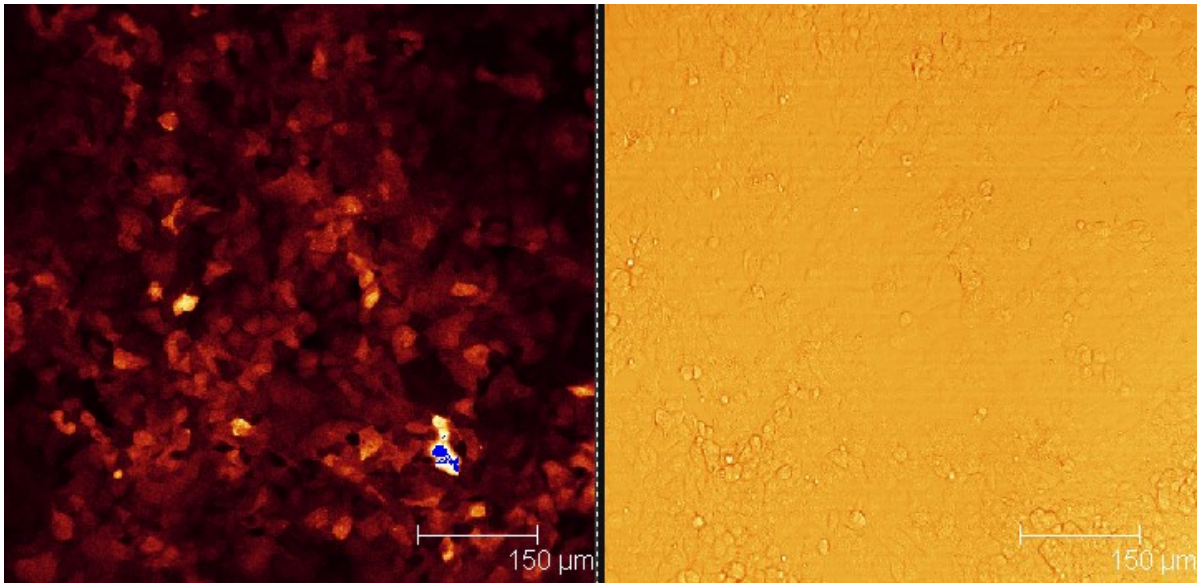


Abbildung 3.34 *Stabil transfektierter Klon FNG1E#07 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

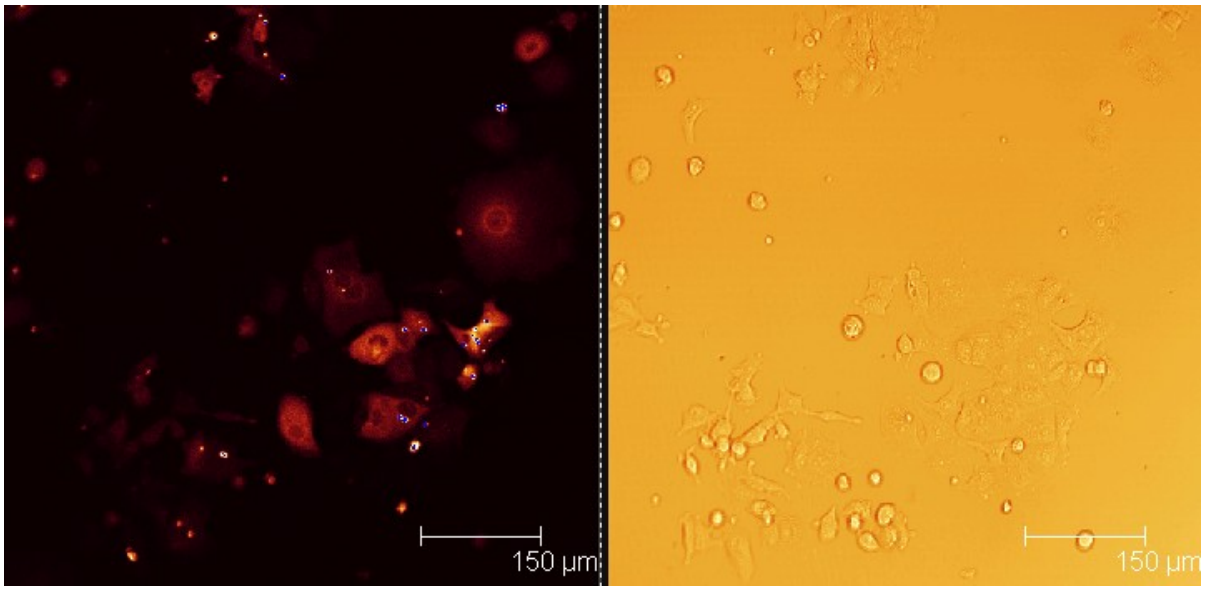


Abbildung 3.35 *Stabil transfektierter Klon FNG1E#08 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

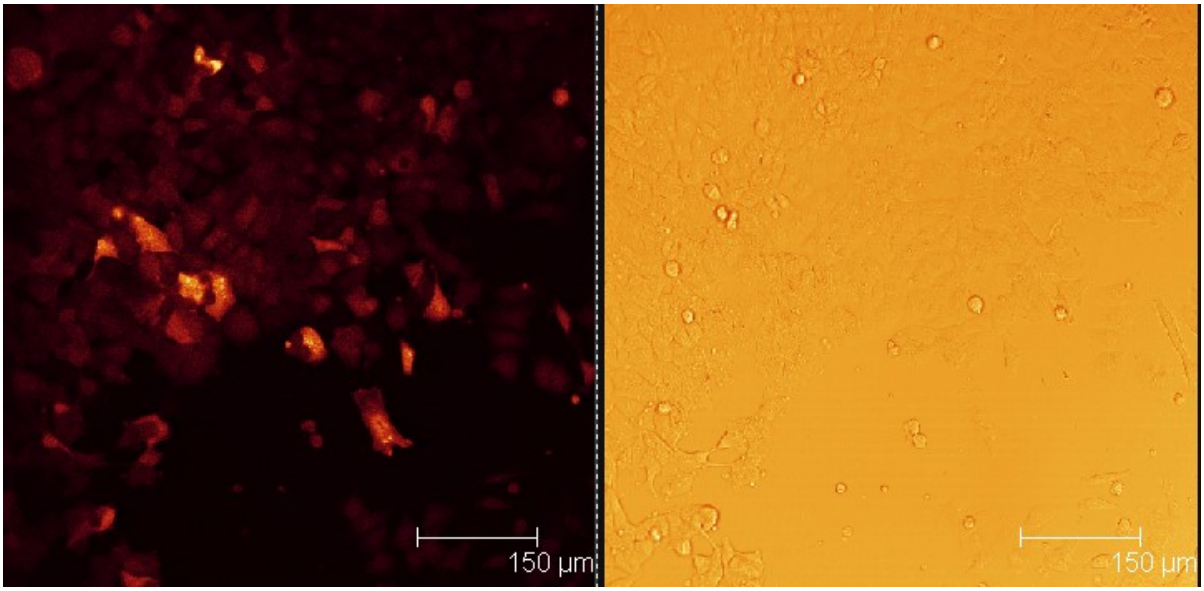


Abbildung 3.36 *Stabil transfektierter Klon FNG1E#09 konfokalmikroskopische Aufnahme 20x Wasserimmersions-Objektiv*

4. DISKUSSION

Das Ziel dieser Diplomarbeit, neue Zelllinien anzufertigen, welche einzelne alternative Splice-Varianten des GIRK1 Rezeptors (GIRK1c GIRK1d GIRK1e) stabil und genomintegriert exprimieren, konnte erreicht werden.
Zahlreiche konfokalmikroskopische Aufnahmen beweisen, durch die positive Fluoreszenz der kultivierten Zellklone, eine erfolgreiche Aufnahme der Konstrukte in den Zellkern und deren Expression.

Eine genaue Aussage über die Verteilung der Rezeptoren, und deren Lokalisation (Membranverteilt, oder Intrazellulär) kann im Rahmen dieser Arbeit nicht getätigt werden, da die konfokalmikroskopischen Aufnahmen für eine Überexpression der fluoreszierenden GIRK1 Proteine sprechen, und eine genaue Lokalisierung somit kaum möglich ist.

Wie in Punkt 3.1.5 beschrieben, zeigten sich bei den stabil transfektierten Zellen einige Unterschiede im Bereich der Fluoreszenzintensität und der Zellteilungsrate. So präsentierten sich die FNV Klone (MCF7 + pEYFP-C1) mit einer besonders ausgeprägten Fluoreszenz und einer sehr hohen Zellteilungsrate. Ebenso die meisten FNG1D (MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1d) und FNG1E (MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1e) Klone.

Dem Gegenüber zeigten sich einige FNG1C Klone (MCF7 + pEYFP-C1 + GIRK1c) mit einer weitaus geringeren Zellteilungsrate aber mit Großteils ebenso hoher Fluoreszenzintensität. Ein positiver Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Zellteilungsrate kann somit nicht hergestellt werden.

Aufgrund der Untersuchungen die an der Medizinischen Universität Graz durchgeführt werden und zeigen, dass die mRNA des KCNJ3 Gens, welches für das GIRK1 Protein kodiert, im Brustkrebsgewebe stark erhöht ist, sollen die neuen Zelllinien nun einen Beitrag zur weiteren Erforschung des Mammakarzinoms leisten.

Derzeit werden bereits einige dieser Zellklone am Institut für Biophysik der Medizinischen Universität Graz von PHD Student M.Sc. Simin Rezania genauer erforscht, und ihre bisherigen Ergebnisse zeigen eine signifikant erhöhte Motilität der FNG1C FNG1D und FNG1E Zellen im Vergleich zu Standard MCF7 und FNV Zellen.

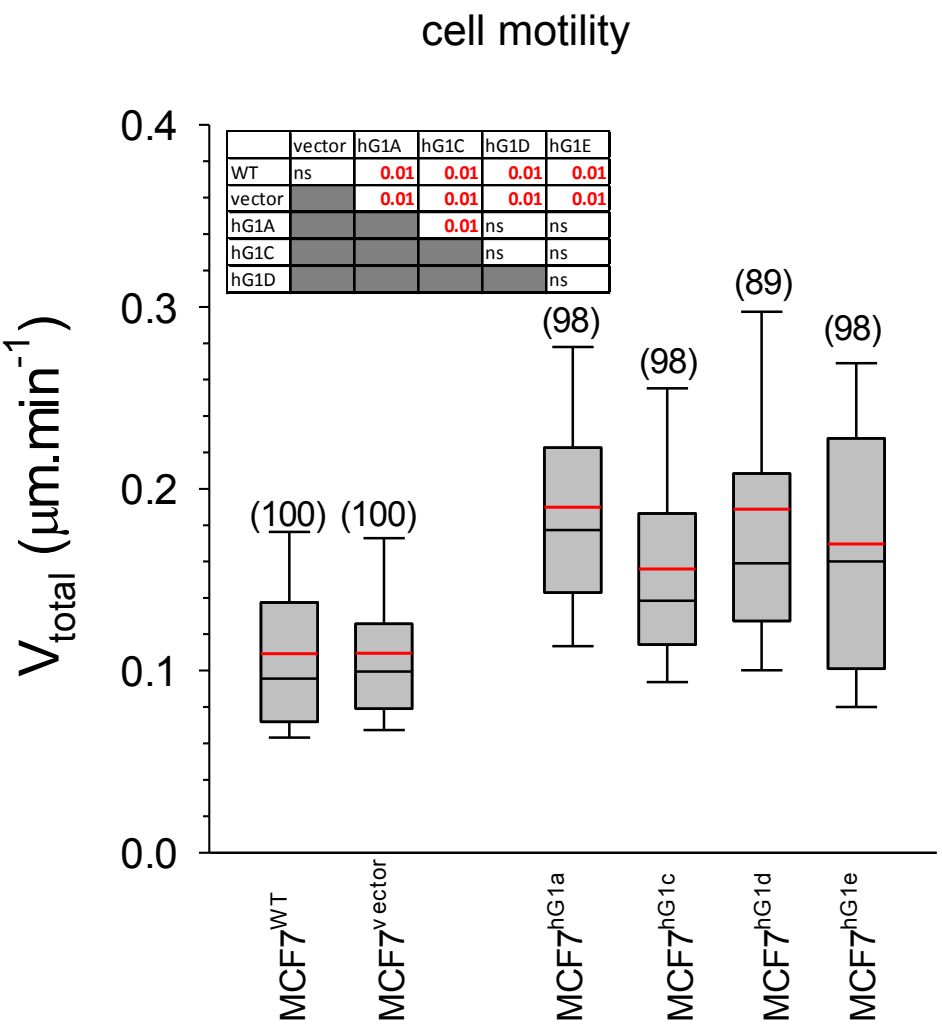


Abbildung 4.1 *Mit freundlicher Unterstützung und Freigabe durch PHD Student M.Sc. Simin Rezania, Institut für Biophysik der Medizinischen Universität Graz. Die Grafik zeigt eine signifikant erhöhte Motilität der MCF7 Zellen welche stabil mit GIRK1 a c d und e transfektiert wurden im Vergleich zu Standard MCF7 (MCF7WT) und FNV (MCF7vector) Zellen.*

Nun bleibt es Gegenstand der Forschung, weitere wichtige Parameter wie Proliferation, Wundheilung, Invasion und Ionenkanalausstattung an den neuen Zelllinien zu untersuchen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, et al. (4. Auflage). *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie.* WILEY-VCH.

BD Biosciences Clontech (2002). Vector Protocol #PT3176-5 Version #PR29944.

Buddecke, E. (2002). *Molekulare Medizin, eine systematische Einführung.* ecomed Verlagsgesellschaft AG & Co KG Landsberg.

Dascal N. (2001). Ion-channel regulation by G proteins. *Trends Endocrinol Metab 12:391-398* .

Dascal N. (1997). Signalling via the G protein-activated K+ channels. *Cell Signal 9:551-573* .

Felgner, P., Gadek, T., Holm, M., Roman, R., Chan, H., Wenz, M., et al. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipidmediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 84, no 21, 7413-7417* .

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 Arch 456:1097-1108* .

Mülhardt, C. (2002). *Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. Berlin.

Mulisch, M., & Welsch, U. (2010). *Romeis, Mikroskopische Technik.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

Perry, C., Pravetoni, M., Teske, J., Aguado, C., Erickson, D., Medrano, J., et al. (2008). Predisposition to late-onset obesity in GIRK4 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA 105:8148-8153* .

Shankar, H., Kahner, B., Prabhakar, J., Lakhani, P., Kim, S., & Kunapuli, S. (2006). G-protein-gated inwardly rectifying potassium channels regulate ADP-induced cPLA(2) activity in platelets through Src family kinases. *Blood 108:3027-3034* .

Smith, P., Sellers, L., & Humphrey, P. (2001). Somatostatin activates two types of inwardly rectifying K+ channels in MIN-6 cells. *J Physiol (London) 532:127-142* .

Soule, H., 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, 1409-1416* .

Stauber, M., & Weyerstahl, T. (2. Aktualisierte Auflage). *Gynäkologie und Geburtshilfe.* Thieme Verlag Duale Reihe.

Stringer, B., Cooper, A., & Shepard, S. (2001). Overexpression of the G-protein inwardly rectifying potassium channel 1 (GIRK1) in primary breast carcinomas correlates with axillary lymph node metastasis. *Cancer Res 61:582-588* .

Wagner, V., Stadelmeyer, E., Riederer, M., Regitnig, P., Gorischek, A., Devaney, T., et al. (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, 598-608* .