

Aus der Klinik für Gynäkologie,
gynäkologische Endokrinologie und Onkologie
der Philipps Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. U. Wagner

***Antisense-Expression des Gens für den Rezeptor des
humanen Lutein-Hormon-Releasing-Hormon (LHRH)
in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie EFO 21
mittels des Ecdysone-Systems***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps Universität Marburg
vorgelegt

von

Jan Hendrik Backhus

aus

Ruit auf den Fildern

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps Universität Marburg am: 18.11.2004

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Professor Dr. med. B. Maisch

Referent: Professor Dr. med. U. Wagner

Coreferent: Professor Dr. med. Y. Cetin

Meiner lieben Frau Jenni

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>EINLEITUNG</i>	1
1.1	Das Ovarialkarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Symptomatik und Diagnose	2
1.1.3	Histologie und Stadieneinteilung	3
1.1.4	Therapiemöglichkeiten	5
1.2	Das humane Lutein-Hormon-Releasing-Hormon (LHRH) und der LHRH-Rezeptor	7
1.3	Antisense	10
1.4	Das Ecdysone-System	11
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	14
2.	<i>METHODEN UND MATERIAL</i>	15
2.1	Konstruktion des antisense-exprimierenden Vektors	15
2.1.1	Plasmidrestriktionsverdau	15
2.1.2	Gelelektrophorese	16
2.1.3	Fragmentgelextraktion	17
2.1.4	Desphosphorilierung	18
2.1.5	Quantifizierung von Nucleinsäuren	18
2.1.6	Ligation	19
2.1.7	Transformation	20
2.1.8	Bakterienkultur	21
2.1.9	Analytische Plasmid-Präparation (Mini-Prep)	22
2.1.10	Plasmid-Präparation (Maxi-Prep)	22
2.1.11	Kryokonservierung von Bakterien	23

2.2	Allgemeine Zellkultur	24
2.2.1	Zelllinien	24
2.2.2	Kultivierung der Zellen	24
2.2.2.1	Kulturmedien	25
2.2.2.2	Passagieren adhärenter Zellen	25
2.2.2.3	Kryokonservierung	26
2.3	Etablierung der neuen Zelllinie	27
2.3.1	Bestimmung der Antibiotikasensitivität	27
2.3.2	Transfektion	27
2.3.3	Selektion	28
2.3.4	Isolierung von einzelnen Klonen	28
2.4	Überprüfung des Systems	29
2.4.1	Induktion des Ecdysone-Systems	29
2.4.2	DNA-Isolierung	30
2.4.3	RNA-Isolierung	30
2.4.4	c-DNA-Synthese	32
2.4.5	Oligonucleotidprimer	33
2.4.6	PCR	34
2.4.7	PCR-Kontrollverdau	35
2.4.8	Sequenzierung von PCR-Produkten	36
2.5	Untersuchung der LHRH-Rezeptorexpression	36
2.5.1	Radioligandenassay	36
2.6	Proliferationsexperimente	37
2.6.1	MTT-Assay	37
2.6.2	Trypan-blau-Färbung	38

2.7	Richtlinien zum Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen	39
2.8	Material	39
3.	<i>ERGEBNISSE</i>	42
3.1	Herstellung des Antisenseplasmides	42
3.1.1	LHRH-R-Fragmentisolierung	42
3.1.2	Subklonierung des LHRH-R-Genfragmentes in den pIND-Vektor	43
3.1.3	Transformation in kompetente Bakterien und anschliessende Überprüfung des Inserts durch Restriktionsanalyse	44
3.2	Einbau des Genexpressionssystems in EFO21 Zellen	45
3.2.1	Transfektion von pIND-R-HRHL und pVgRXR in EFO21	45
3.2.2	Nachweis des stabilen Einbaus von LHRH-R-Antisense in die genomische DNA von EFO21-Klonen	45
3.3	Nachweis der Expression von Antisense-RNA	46
3.3.1	RNA-Antisense Nachweis	46
3.3.2	Sequenzierung der cDNA	47
3.4	Nachweis der LHRH-Bindungsstellen durch einen Radiorezeptorassay	49
3.5	Proliferationsversuche mit der neuen Zelllinie	50
3.5.1	MTT-Assay	50
3.5.2	Trypan-blau-Färbung	52
4.	<i>DISKUSSION</i>	54
5.	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	61
6.	<i>LITERATUR</i>	63
7.	<i>ANHANG</i>	72

1. EINLEITUNG

1.1 Das Ovarialkarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Von den malignen Ovarialtumoren, welche 10-25% aller weiblichen Genitaltumoren ausmachen, sind ca. 90% epithelialer Herkunft. Diese Ovarialkarzinome manifestieren sich meist zwischen der 5. und 6. Lebensdekade und sind damit eher Tumoren der älteren Frau. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter. Obwohl die Tumoren des Ovars nur 5% der malignen Erkrankungen der Frau ausmachen, sind sie die vierthäufigste neoplasiebedingte Todesursache des weiblichen Geschlechts. Sehr häufig sind die Tumoren schon bei der Ersterkennung inkurabel und befinden sich zu etwa 65% bereits im Stadium der intraabdominellen Ausbreitung. So bewirken die Ovarialmalignome nach dem Mammakarzinom die höchste Sterberate durch bösartige Tumoren des weiblichen Genitaltraktes (Parazzini et al.1991, Orlandi et al. 1988). In den westlichen Industrieländern und den USA besteht eine Inzidenz von 14-16 pro 100.000 Frauen mit einer langsam aber kontinuierlich steigenden Tendenz. Etwa 80% der betroffenen Patientinnen sind zwischen 40 und 80 Jahre alt.

Als Risikofaktoren für das Ovarialkarzinom, dessen Ätiologie weiterhin unbekannt bleibt, gelten familiäre Veranlagung (Ovarialkarzinomfamilien, Mammakarzinomfamilien, Li-Fraumeni-Syndrom, Kolonkarzinomfamilien), Adipositas und vor allem hormonelle Einflüsse. Die Auswirkung von Schwangerschaft, Einnahme von Ovulationshemmern und Infertilität wurden untersucht und teils kontrovers diskutiert. Als signifikanter Risikofaktor wird die Kinderlosigkeit gedeutet. So wurde eine um 50% verringerte Inzidenz bei Frauen mit drei oder mehr Geburten gegenüber Nulliparae beobachtet (Rao und Slotman 1991). Auch die längerfristige Einnahme oraler Kontrazeptiva wird mit einer verringerten Erkrankungsrate in Verbindung gebracht (Lee et al. 1987, Walker et al. 2002). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass häufige Ovulationen verbunden mit Rupturen des Zölomepithels mit

anschließenden Regenerationsvorgängen, eine maligne Transformation wahrscheinlicher machen. Ebenso werden die erhöhten Östrogenspiegel in der Follikelflüssigkeit während der Ovulation als mitogener Stimulus angesehen, der zu einer Entartung der Zellen beitragen kann (Godwin et al. 1993).

Etwa 90 Prozent der Ovarialkarzinome treten sporadisch auf und nur 5 bis 10 Prozent scheinen genetisch bedingt zu sein. Bei diesen Frauen finden sich häufig Mutationen des BRCA1 und/oder BRCA2-Gens (Breast Cancer Gene 1: Chromosom 17, Breast Cancer Gene 2: Chromosom 13). Ein allgemeines Screening auf einen Defekt dieser Gene wird bisher nicht empfohlen und sollte ansonsten spezialisierten Zentren vorbehalten werden.

1.1.2 Symptomatik und Diagnose

Das Problem der späten Diagnosestellung und der daraus resultierenden schlechten Prognose ergibt sich aus der Symptomarmut des Tumors bis zur Stufe FIGO III. Zu den Symptomen des Ovarialkarzinoms gehören :

- Schmerzen und Druckgefühl im Abdomen
- Zunahme des Leibesumfangs
- Fremdkörpergefühl im Abdomen
- Blutungsanomalien
- Akutes Abdomen (Stieldrehung, Ruptur)
- Postmenopausenblutung
- Sekundäre Virilisierung durch androgene Hormonproduktion
- B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust)

Richtungsweisend bei der Diagnose ist der Palpationsbefund, wobei es sich mit zunehmendem Alter mit höherer Wahrscheinlichkeit um eine maligne Raumforderung handelt. Mit bildgebenden Verfahren kann die Diagnose gestützt werden und ein Staging begonnen werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) aller Ovarialkarzinome beträgt nur 30-35% (Schmidt-Matthiesen/ Bastert 1995), unter anderem deshalb, weil sich die therapeutisch relativ günstigen Stadien FIGO I und II (s.u.) den möglichen

Früherkennungsmaßnahmen meist entziehen und eher als Zufallsbefunde erhoben werden. Im Stadium FIGO I ist mit einer 5-JÜR von ca. 80-90 %, bei Vorliegen eines FIGO III nur noch von 25-40% und bei FIGO IV von ca. 11% auszugehen (Brun et al. 2000). Die Wertigkeit verschiedener Früherkennungsuntersuchungen, welche neben der klinischen Untersuchung die Bestimmung von Tumormarkern (Ca 125, Ca 72-4 und CEA) sowie die transvaginale Ultrasonografie, eventuell mit zusätzlicher Doppleruntersuchung, werden weiterhin diskutiert (Menon et al. 2000). Der Nachweis der Tumormarker Ca 125 und Ca 72.4 ist jedoch nicht in jedem Fall positiv. Bei positiver Markerkonstellation, sollten diese zur Therapieverlaufskontrolle herangezogen werden.

1.1.3 Histologie und Stadieneinteilung

Anhand der histologischen Differenzierungsform werden die Ovarialkarzinome in papillär-seröse (40-45%), muzinöse (10%), endometroide (10-20%), klarzellige (5-10%) und wenig differenzierte Karzinome (25%) unterteilt. Der histologische Typ kann, unabhängig vom Grad der Invasion, als prädiktiver Wert gelten. Dabei weisen Frauen mit muzinösen und endometroiden die längste und Frauen mit wenig differenzierten Karzinomen die kürzeste Überlebenszeit auf (Randrianjafisamindrakotroka et al.1995). Das histologische Grading erfolgt nach der Differenzierung der Zellen, wobei zwischen gut differenzierten (Grad 1), mäßig differenzierten (Grad 2) und schlecht differenzierten (Grad 3) Tumorzellen unterschieden wird. Grad 1-Tumoren zeigen generell noch papilläre Strukturen, bei Grad 2-Tumoren häufen sich atypische Zellformen mit gesteigerter mitotischer Aktivität und Grad 3-Tumoren bestehen weitgehend aus undifferenzierten Zellen (Ozols et al. 1992). Ein High-Grade Tumor geht, unabhängig von der Stadieneinteilung, mit einer schlechteren Prognose einher (Ozols et al. 1997). Für die Pathogenität sprechen des weiteren Verluste von Tumorsuppressorgenen oder Expression von Onkogenen. Die Beurteilung erfolgt bisher jedoch nur in Studien (Aunoble et al. 2000).

Für Therapiefestlegung und Prognose ist außer der histologischen Einteilung die klinische Stadieneinteilung des Befundes wichtig. Die Stadieneinteilung erfolgt zu einem nach der Internationalen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (FIGO), welche die Befunde bei Erst-OP inklusive der zytologischen Untersuchungen von Aszites, Zwerchfellkuppeln und Leberoberfläche berücksichtigt, und nach der TNM-Klassifikation (Tab. 1).

TNM	FIGO	Befundsituation
T1	I	Tumor begrenzt auf die Ovarien
T1a	IA	Tumor auf ein Ovar begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche des Ovars
T1b	IB	Tumor auf beide Ovarien begrenzt; Kapsel intakt; kein Tumor auf der Oberfläche beider Ovarien; keine malignen Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
T1c	IC	Tumor begrenzt auf ein oder beide Ovarien mit Kapselruptur und /oder Tumor an Ovaroberfläche und/oder maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien und breitet sich im Becken aus
T2a	IIA	Ausbreitung auf und/oder Implantate an Uterus und/oder Tube(n); ; keine malignen Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
T2b	IIB	Ausbreitung auf andere Beckengewebe; keine malignen Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
T2c	IIC	Ausbreitung im Becken (2a oder 2b) und maligne Zellen in Aszites oder Peritonealspülung
T3	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien mit histologisch nachgewiesenen Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
T3a	IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens
T3b	IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung < 2cm
T3c	IIIC	Makroskopische Peritonealmetastasen jenseits des Beckens, größte Ausdehnung > 2cm und/oder regionären Lymphknotenmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (ausgeschl. Peritonealmetastasen)
NX		regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0		keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1		regionäre Lymphknotenmetastasen

Tab. 1: TNM und FIGO-Klassifikation des Ovarialkarzinoms
(nach UICC 1997, TNM Classification of malignant Tumors)

1.1.4 Therapiemöglichkeiten

Das *chirurgische Vorgehen* ist gleichzeitig eine diagnostische Maßnahme, da nur durch eine Längslaparotomie und Gewinnung von histologischen Proben ein genaues Staging erfolgen kann. Das Ziel ist eine radikalchirurgische Entfernung des gesamten Tumorgewebes, da der Erfolg der nachfolgenden Chemotherapie mit zurückbleibendem Tumorgewebe negativ korreliert (Ozols et al. 1992). Vor der Manipulation am Tumor ist unbedingt Aszites oder Peritoneallavageflüssigkeit für die zytologische Untersuchung zu asservieren. Weiterhin sollten Abstriche von der Beckenwand erfolgen. Eine Komplett-OP umfasst die Hysterektomie mit beidseitiger Adnektomie, Omentektomie, pelvine - und paraaortale Lymphonodektomie und die Deperitonealisierung (Pfleiderer 1989, Burghardt et al. 1991). Es ist eine systematische Revision der Bauchhöhle durchzuführen, um das Tumorrestgewebe so gering wie möglich zu halten.

Sehr wichtig für die postoperative Behandlung ist die Einleitung einer kombinierten *Chemotherapie* (Tab 2). Bis auf das Stadium Ia(i) bzw. T1a1 (siehe oben), ist diese bei allen Ovarialkarzinomen indiziert. Als Standardchemotherapie (Ozols et al. 2001) gilt heute das folgende Schema:

<u>Paclitaxel/Carboplatin</u> :	Paclitaxel 175mg/m ² i.v. Carboplatin AUC5 i.v. (Calvert Formel)
(Wiederholung nach 3 Wochen)	

Tab 2: Derzeitige Standardchemotherapie beim Ovarialkarzinom

Je nach Allgemeinzustand der Patientin sollten sechs Zyklen angestrebt werden, mit dem Ziel, eine Komplettremission (CR) herbeizuführen, welche in ca. 30% der Fälle erreicht wird. Das Ansprechen auf die Therapie ist mit 90% im allgemeinen gut, die Remissionszeiten sind jedoch oft kurz und die Überlebenszeiten trotz anfänglichen Erfolgs gering. Bei einer zur

Tumorreduktion durchgeführten Chemotherapie erfolgt nach drei Zyklen ein Staging mit Sonographie, CT bzw. MRT von Becken und Abdomen und ggf. Zysto-/Rektoskopie. Zu erwähnen ist die hohe Nephro- und Neurotoxizität des Platins, so dass die Dosis eventuell der Kreatinin-Clearance anzupassen ist. Taxane führen häufig zu Polyneuropathien und sind kardiotoxisch. Als längerfristige Folgen der Zytostatikatherapie sind Leukämien und Knochenmarksaplasien bekannt (Colon-Otero et al. 1993).

Die *Strahlentherapie* des Ovarialkarzinoms ist heute zugunsten der Chemotherapie weitgehend verlassen worden.

Von besonderem Interesse und Gegenstand der Forschung und vieler klinischer Studien ist derzeit die *endokrine Therapie* des Ovarialkarzinoms. Der sensible Regelkreis des Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Regelkreises mit seinen Rückkopplungsmechanismen macht die Erforschung von Eingriffen in das System besonders bei malignem Zellwachstum interessant. Heute ist bekannt, dass Östrogen- und Progesteronrezeptoren in einem Großteil der Ovarialkarzinome zu finden sind. So finden sich bei etwa 62% der Ovarialkarzinome Östrogenrezeptoren, bei 49% Progesteronrezeptoren und bei 69% Androgenrezeptoren (Rao und Slotman 1991). Eine Kombination aus Östrogen- und Progesteronrezeptoren ließ sich bei ca. 36% der Tumoren nachweisen und etwa 25% sind rezeptornegativ. Trotz dieser ermutigenden Daten wurden durch die Gabe von Antiöstrogenen und Gestagenen Remissionserfolge von nur ca. 15% erreicht (Emons et al. 1993). Der Vorteil einer hochdosierten Gestagengabe besteht in einer Verbesserung des Allgemeinzustandes der Patientinnen, wobei jedoch die Dosierung von 200-400mg Medroxyprogesteronacetat (MPA) eingehalten werden sollte, um die Nebenwirkungen gering zu halten (Schmidt-Rhode 1991). Die derzeit hoffnungstragenden Untersuchungen zum Einsatz von Luteinisierenden Hormon-Releasing-Hormon (LHRH) -Agonisten und -Antagonisten beschäftigen sich mit dem Wirkmechanismus der Wachstumsinhibition mit geringen Nebenwirkungen (Emons und Schally 1994).

1.2 Das humane LHRH und der LHRH-Rezeptor

Mit der Entschlüsselung der Aminosäuresequenz und der Strukturaufklärung des hypothalamisch Dekapeptides Luteinisierendes Hormon- Releasing Hormon (LHRH, auch GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormon) von Schally (Schally et al, 1971), wurde ein großer Baustein zum Verständnis des menschlichen Reproduktionssystems gelegt. LHRH ist ein aus zehn Aminosäuren bestehendes Peptidhormon und wird von Neuronen des Nucleus präopticus und Nucleus arcuatus im Hypothalamus produziert und pulsatil an das hypophysäre Pfortadersystem abgegeben. In den gonadotropen Hypophysenzellen erfolgt über eine Bindung an den membranständigen LHRH-Rezeptor die Aktivierung einer Reaktionskaskade (Stojilkovic et al, 1994) mit konsekutiver Freisetzung der Gonadotropine LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon). Durch diese über verschiedene Rückkopplungsmechanismen gesteuerte Sekretion reifen in der reproduktiven Phase der Frau monatlich Follikel im Rahmen der Vorbereitung auf eine mögliche Schwangerschaft heran.

Die therapeutische Anwendung von LHRH-Analoga begann mit der synthetischen Herstellung. Mittlerweile sind mehr als 3000 solcher Analoga des Dekapeptides synthetisiert worden, von denen einige eine 50-100fach höhere Affinität zum LHRH-Rezeptor aufweisen als das natürliche LHRH (Schally et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Gabe (also nicht pulsatile) Gabe von LHRH zu einer Verminderung der Gonadotropinsekretion führt, was auf einer Abnahme der Rezeptordichte beruht. Diesen Effekt macht man sich heute klinisch etwa bei der Endometriose, aber auch zur sog. hormonablativen Therapie von hormonabhängigen Tumoren (Mammakarzinom, Prostatakarzinom) zu Nutzen. In pulsatiler Anwendungsweise kommen LHRH-Analoga u.a bei hypothalamischer Amennorrhoe und zur Infertilitätsbehandlung zur Anwendung.

Der humane LHRH-Rezeptor wurde 1992 von Kakar (Kakar et al.1992) geklont und sequenziert. Es handelt sich um einen 64kD großen Transmembranrezeptor, der zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren

gehört. Die Gensequenz besteht aus ca. 1550 Basenpaaren, die Open-Reading-Frame, welche zur Synthese des funktionsfähigen Proteins notwendig ist, befindet sich in zwischen bp56 und bp1024 und kodiert für ein 328-Aminosäureprotein (Abb 1) mit einem Molekulargewicht von etwa 37 kD.

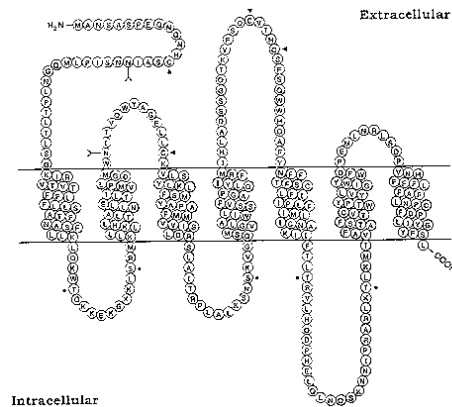


Abb 1: Der humane LHRH-Rezeptor

Als bekannt wurde, daß LHRH neben seinen physiologischen Bindungsstellen (LHRH-Rezeptor) in der Adenohypophyse auch extrahypophysäre Bindungsstellen hat, wurde die Bedeutung des Peptidhormons auch auf die Proliferationseigenschaften von Ovarialkarzinomzellen untersucht, da rund 80% der Ovarialkarzinome affine Bindungsstellen für LHRH aufweisen (Emons et al. 1989, Pahwa et al. 1989, Irmer et al. 1995). Die Sequenz des hypophysären Rezeptors ist identisch mit derjenigen des in humanen Mamma- und Ovarialkarzinomzellen gefundenen Rezeptors (Kakar et al. 1994). Ebenso wurde die Synthese von LHRH durch die Tumorzellen selbst beobachtet, so dass man hier von einem autokrinen Mechanismus ausgehen kann (Irmer et al., 1995 ; Emons et al, 2000). Die Wirkung von LHRH-Analoga auf Tumoren in vivo beruht auf zwei unterschiedlichen Mechanismen. Seit längerem bekannt ist eine Wachstumshemmung von hormonabhängigen Tumoren durch eine sog. selektive medikamentöse Hypophysektomie, bei der es durch die unphysiologische, nichtpulsatile Gabe von LHRH-Analoga zu

einer Downregulation der hypophysären LHRH-Rezeptoren mit konsekutivem Abfall der Serumgonadotropine kommt.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen in vitro durch nanomolare Mengen von LHRH-Analoga bis zu 40% gehemmt werden kann. Da in vitro jedoch der hypophysäre Regelkreis nicht vorhanden ist, muss hier von einem zusätzlichem Mechanismus der Proliferationshemmung mit *direkt* antiproliferativem Effekt auf die Tumorzellen ausgegangen werden.

Zur Zeit laufen klinische Studien, welche prüfen, ob die weiterhin schlechte Prognose der Ovarialkarzinome durch den Einsatz von LHRH-Analoga verbessert werden kann und in welcher Dosierung sie zum Einsatz kommen müssen. Aufgrund der in-vitro Versuche erscheint es möglich bei Tumoren, welche stärker entdifferenziert sind und über keine Steroidrezeptoren verfügen das Wachstum mit LHRH-Analoga zu verlangsamen. Die Dosierung hierbei muss jedoch wohl höher gewählt werden, als beim hormonablativen Therapiekonzept (Emons, 2000).

Zur Überprüfung und Vertiefung der Beobachtungen, dass LHRH einen direkten antiproliferativen Effekt auf bestimmte Ovarialkarzinomzelllinien hat, wäre ein Zellmodellsystem mit ausschaltbarem LHRH-Rezeptor, wie es mit Hilfe der im folgenden beschriebenen Antisense-Technik möglich ist, hilfreich, um die Reaktionswege weiter zu verfolgen. Mit Hilfe des etablierten Ecdysone-Expressionssystems stünden im Idealfall Zellen zur Verfügung, welche das gleiche Genom besitzen und deren Expressionseigenschaften des LHRH-Rezeptors gesteuert werden kann.

1.3 Antisense

Die zur Erforschung von Tumorbilologie genutzte Antisensetechnik beruht auf der Beobachtung, dass intrazellulär gebildete Doppelstrang-RNA durch spezifische Ribonukleasen (RNase H) abgebaut wird und so die Proteinbildung verhindert wird.

Bei der Transkription wird 5'-3'-RNA gebildet, mit deren Hilfe an den Ribosomenuntereinheiten das jeweilige Protein synthetisiert wird (Translation). Dieser Vorgang kann durch die Bindung (Abb 2) von komplementärer, also 3'-5', RNA verhindert werden, da es beim Vorliegen von intrazellulärer Doppelstrang-RNA zur Degradation dieser durch zelluläre Ribonukleasen kommt (Weintraub HM, 1990). Die spezifische Proteinsynthese kommt dadurch im Extremfall zum Erliegen.

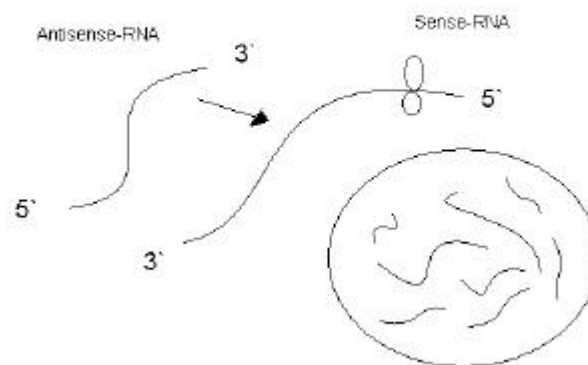


Abb 2: Die Bindung der komplementären Antisense-RNA führt zu einem Abbruch der Translation an den Ribosomen

Die meisten Untersuchungen dieser Art werden mit sog. Oligonukleotiden durchgeführt. Hierbei wird ein künstlich synthetisiertes Antisensemolekül in die zu untersuchende Zelle geschleust, und die Zellantwort als Einmalreaktion untersucht. Der Vorteil ist die einfachere Durchführung der Experimente und der variable Einsatz verschiedener Antisensesequenzen und Fragmentgrößen.

Eine andere Methode, welche auch in der vorliegenden Arbeit gewählt wurde, ist der stabile Einbau des Antisensegens in die genomische Information der Zelle, wobei durch die Integration eines Expressionsvektors die Menge an vorliegender Antisensemenge reguliert werden kann. So ist es theoretisch möglich, die Synthese eines Proteins durch die Störung in der Translation zu vermindern bzw. vollständig zu verhindern.

Für die Herstellung von Pharmazeutika ist die Antisense-Technologie interessant, um die ständig neuentdeckten Tumorwachstumsfaktoren mit dieser Methode spezifisch zu eliminieren.

1.4 Das Ecdysone System

Die genaue Regulierung die Genexpression ist ein wichtiger Mechanismus für das Verständnis der molekularen Steuerung des Zellwachstums. Das Ecdysone System ist eines der heute kommerziell erhältlichen Säugetierexpressionssysteme und ermöglicht die feinregulierbare Expression eines gewünschten Gens (No et al. 1996), welches zuvor in einen Expressionsvektor eingebaut wird. Das System basiert auf der Fähigkeit des Insektenhormons 20-OH Ecdysone bei der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* über den im Zellkern lokalisierten Ecdysone-Rezeptor eine Reihe von Entwicklungsstufen zur Ausbildung zu bringen. Das System arbeitet mit einem modifizierten Ecdysone-Rezeptor VgEcR, welcher zusammen mit dem aus Säugetieren stammenden Retinoid X-Rezeptor ein Heterodimer bildet und nach Zugabe des synthetischen Ecdysoneanalogon Muristerone A® an ein ebenfalls synthetisch modifiziertes nukleäres Ecdysone/Glucocorticoid-Responsive Element bindet (Abb 3). Dieses ruft über die Aktivierung eines vorgelagerten Promotors eine Transkriptionsaktivierung mit einer bis zu 200-fachen Genexpressionssteigerung hervor (No et al. 1996).

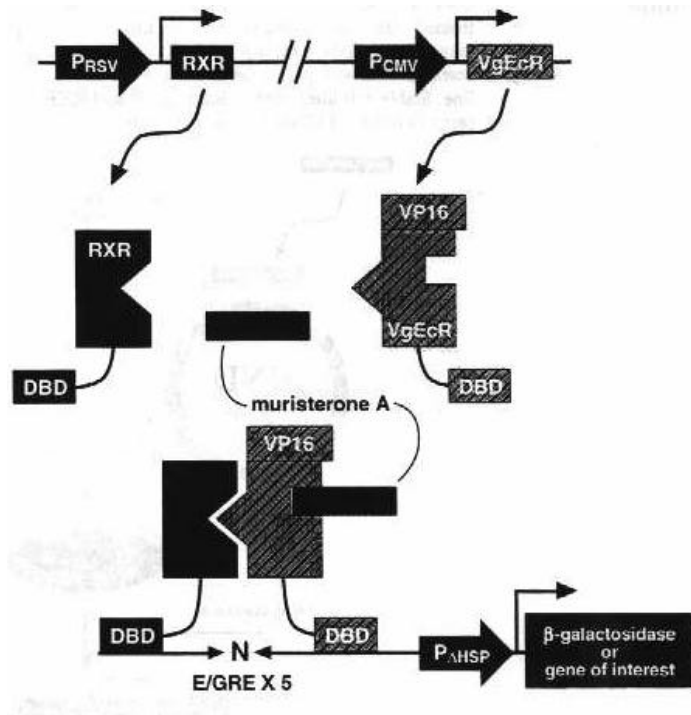


Abb 3 : Bildung und Bindung des Steroidrezeptorkomplex des Ecdysone-Systems

No et al. beschrieben eine fast nicht mehr detektierbare basale Expression, welche nach Zugabe des Ecdysteroidanalogons innerhalb von 24 Stunden auf ein Maximum der Genexpression ansteigt. Dabei wurden für MuristeroneA keine Wirkungen auf Säugerzellen nachgewiesen, was das System u.a. als ideales Versuchsmodell für die Antisense-Technik erscheinen lässt.

Das System besteht im einzelnen aus zwei Plasmiden, eines zur Kodierung der Rezeptoruntereinheiten (pVgRXR) und eines als induzierbarer Expressionsvektor (pIND), welcher zur Subklonierung des gewünschten Gens eine Multiple Cloning Site (MCS) enthält. Beide Plasmide enthalten je ein unterschiedliches Antibiotikaresistenzgen, um eine Selektionierung der Zellen zu ermöglichen, welche beide Plasmide in ihre genomische DNA einbauen.

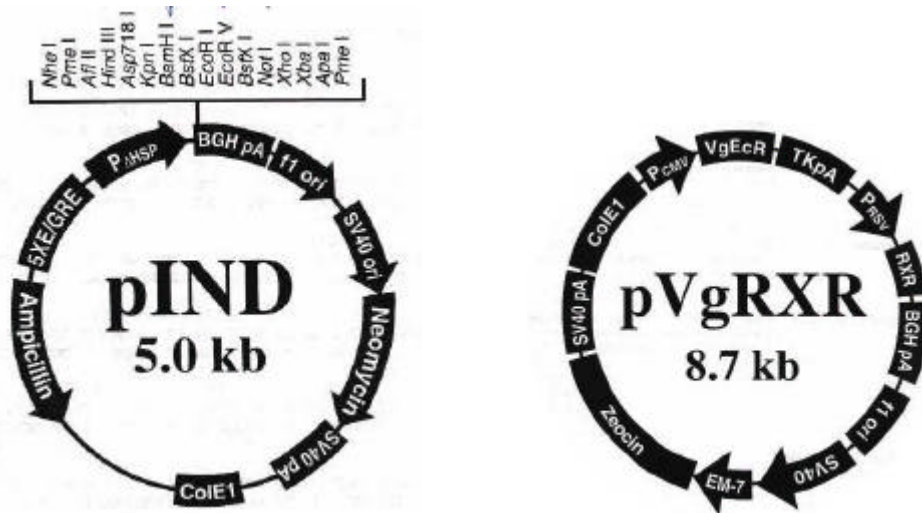


Abb 4: Die beiden Plasmide des Ecdysone-Systems

Im Plasmid pIND ist die MCS (Abb 4) erkennbar, welche Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen aufweist, die nur einmal im Plasmid vorkommen. Für die Subklonierung des LHRH-R-Antisensegenfragments wurde die Schnittstelle HindIII gewählt. Das Ampicillinresistenzgen war für die Selektion der Bakterien, welche das Plasmid inkorporiert haben, notwendig. Für die Selektion in den Tumorzellen wurde das Neomycinresistenzgen genutzt. In dem Vektor pVgRXR, welches für die Ecdysonerezeptoruntereinheiten kodiert, findet man das Zeocinresistenzgen, das ebenfalls zur Selektion der transfizierten Tumorzellen notwendig ist. Über virale Promotergene wird die Expression der Antibiotikaresistenzgene gesteigert, so dass hohe Dosen von Antibiotika, welche für nichttransfizierte Zellen sicher letal wirken, die Selektion der transfizierten Zellen hervorrufen.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Modellsystem durch eine neue Ovarialkarzinomzelllinie zu etablieren, um die Signaltransduktion des LHRH-Rezeptors in humanen Ovarialkarzinomzelllinien in vitro weiter zu untersuchen und das Verständnis für die antiproliferative Wirkung der LHRH-Analoga auf die Zellen zu vertiefen. Mittels eines induzierbaren Antisense-Systems sollte an der Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 eine Ausschaltung des LHRH-Rezeptors erfolgen. Anschließend sollte die Funktionalität des Genexpressionssystems und der Antisenseeffekt über die Auswirkungen auf die Proliferation unter LHRH-Analogazugabe in induziertem und nichtinduziertem Zustand untersucht werden. Dafür mussten folgende Teilschritte erreicht werden:

- Ein ausreichend großes Fragment aus der Open-Reading-Frame des humanen LHRH-Rezeptorgens musste isoliert und in Antisenseorientierung in den Expressionsvektor subkloniert werden.
- Die Antisenseorientierung war zu überprüfen, und anschließend bedurfte es einer Vervielfältigung des Vektors in kompetenten Bakterien.
- Nach Bestimmung der Antibiotikasensitivität der Ausgangstumorzelle sollte die stabile Transfektion der beiden Plasmide des Expressionssystems in die menschliche Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 erfolgen.
- Nach erfolgter Transfektion mussten einzelne Klone isoliert und vermehrt werden.
- Anschließend sollte überprüft werden, ob die Zellklone das in das Expressionssystem eingebaute Antisensegen stabil in die genomische DNA aufgenommen hatten.
- Folgend war der Nachweis der Expression von Antisense-RNA im induzierten Zustand im Vergleich zum nichtinduzierten Zustand nötig.
- Die Wirkung von Antisense-LHRH-R im induzierten und nichtinduzierten Zustand sollte nun durch die Bestimmung der Rezeptorendichte über einen Radiorezeptorassay erfolgen.
- Letztendlich sollten vergleichende Proliferationsversuche zeigen, inwiefern die antiproliferative Wirkung des LHRH-Analogen Triptorelin durch die Antisenseexpression gehemmt werden kann.

2. **METHODEN UND MATERIAL**

(Die molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders erwähnt nach den Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., 1991) durchgeführt.)

2.1 **Konstruktion des Antisense-exprimierenden Vektors**

2.1.1 Plasmidrestriktionsverdau

Das in 1.4 beschriebene Ecdysone–System enthält das 5024 bp große Plasmid pIND, welches eine Multiple Cloning Site (MCS) für das Einfügen des interessierenden Gens enthält. Die Zahl von 16 spezifischen Enzymschnittstellen, welche *unique* sind, das heißt, nur eine Schnittstelle aufweisen, ermöglicht es relativ gut, ein passendes Insert zu finden.

Das verwendete LHRH-Rezeptorfragment wurde aus dem Vector pSBC1-LHRH-R (Beckers et al. 1995) mit dem Restriktionsenzym HindIII herausgeschnitten und aufgereinigt (s.u.). Nun konnte das Plasmid pIND an der MCS ebenfalls mit dem Restriktionsenzym HindIII linearisiert werden.

Plasmidrestriktionsverdau:

5µl pIND (1µg/µl)	10 µl pSBC1-LHRH-R (1µg/ul)
5µl HindIII	10 µl HindIII
10µl Puffer	20 µl Puffer
1µl BSA	2 µl BSA
79µl H ₂ O	158 µl H ₂ O

Der Verdau wurde mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug je nach eingesetzter DNA-Menge zwischen 1h und 24h, wobei große Mengen, wie oben angegeben, über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Die Fragmente bzw. die linearisierten Plasmide wurden nach dem Verdau mittels Gelelektrophorese identifiziert. Hierbei konnte die Supercoiled Plasmid-DNA (ungeschnitten) von der linearisierten Plasmid-DNA unterschieden werden.

2.1.2 Gelelektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine effektive Methode zur Auftrennung von DNA Fragmenten mit einer Länge von 100bp bis 60 kbp (Ausubel et al. 1991). Je nach Größe der gesuchten Fragmente wird hierfür ein Gel mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,5 und 2% eingesetzt, wobei z.B. für zwei näher zusammenliegende kleine Fragmente sich eine höhere Konzentration anbietet.

Agarose-Gel (1.5%):

50 ml 0,5 x TBE-Puffer (89mmol/L Tris-Borsäure pH8 - 2 mmol/L EDTA - H₂O-Bidest)

0,75 g Agarose

2 µl Ethidiumbromid (Konz.:5mg/ml)

ca. 700 ng Leiter-DNA (1 kb)

ca. 500 ng DNA-Probe

Loading buffer (890 mmol/L Tris Borsäure pH8 - 20 mmol/L EDTA)

Die abgewogene Menge Agarose wurde in einen 200ml Erlenmeierkolben überführt und mit 50 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle bei 1000 Watt 1min. erhitzt. Die nun völlig gelöste Agarose wurde nach Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) in die Gelkammer gefüllt. Nach ca. 30 min war das Gel erhärtet, die Kammer wurde mit TBE-Puffer aufgefüllt und die Taschen konnten beladen werden. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden 1 zu 10 mit zehnfach konzentrierter Färbelösung (Loading buffer) aufgefüllt. Die erste und, wenn möglich, die letzte Tasche wurde mit der Leiter-DNA beladen. DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Polarität durch das elektrische Feld der angeschlossenen Gelkammer (ca. 30 min. bei 120 mv) und interkalieren mit dem EtBr. Dieses läßt sich mit Hilfe eines UV-Transluminators bei 312nm sichtbar machen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde mittels einer Polaroid-Kamera festgehalten.

2.1.3 Fragmentgelextraktion

Das HindIII-geschnittene Fragment aus pSBC1-LHRH-R musste nun aus dem Gel isoliert werden, um bei der geplanten Ligation in pIND eine Religierung mit dem linearisierten pSBC1 zu verhindern. Das Plasmid pIND bedurfte nicht dieses Verfahrens, da es nur an einer Stelle eröffnet wurde.

Hierzu wurde ein 2%iges Agarosegel mit EtBr gegossen. Die Geltasche für das DNA-Fragment-Gemisch aus der das gewünschte Fragment isoliert werden sollte, wurde so angelegt, daß ein Volumen von 100-200 µl aufgenommen werden konnte. Entsprechend kleinere Taschen für DNA-Marker waren links und rechts vorhanden. Die Gelkammern wurden mit 0,5 x TBE-Puffer bis zur oberen Kante des Gels aufgefüllt. Die mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA (5 – 20 µg) und die DNA-Marker wurden mit Loading-buffer 1 :10 gemischt und in die Taschen gegeben. Die Fragmente wurden nun bei 50 bis 100 mV unter UV-Licht Kontrolle getrennt, bis das gewünschte Fragment ca. 5 mm Abstand zu dem nächst größeren Fragment gewonnen hatte. Das Gel wurde nun aus der abgeschalteten Elektrophoreseeinheit herausgenommen und auf den UV-Transluminator gelegt. Mit einem sauberen Skalpell wurde direkt vor dem gewünschten Fragment eine ca.5 mm breite Tasche parallel und gleich lang zu der Ausgangstasche herausgeschnitten. Das Gel wurde wieder in die Elektrophorese-Einheit gebracht, die Tasche mit 1.5 x TBE - Puffer aufgefüllt und bei 25 - 50 mV unter UV-Licht Kontrolle (Handlampe) laufen gelassen, bis das Fragment vollständig in die Tasche gelangt war. Aufgrund der höheren Pufferkonzentration in der Tasche, verweilte das Fragment lange genug in der Tasche, um es absaugen zu können. Das auf diese Weise isolierte Fragment wurde phenolisiert (zur Proteinextraktion, um störende Proteine zu eliminieren), mit 2 Volumen Ethanol 100% und 1/10 Volumen Na-Acetat gefällt, bei 10000G pelletiert, mit Ethanol 70% gewaschen und in Bidest-H₂O hochkonzentriert aufgenommen. Die Nukleinsäurenkonzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt (siehe 2.1.5) und bei Bedarf mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge erhöht. Das isolierte Fragment wurde auf Agarosegel mit einer Probe (ca. 250 ng) aus dem DNA-Fragmenten-Gemisch, aus dem es isoliert wurde, verglichen.

2.1.4 Dephosphorilierung

Da das Plasmid pIND nur mit einem Restriktionsenzym eröffnet wurde, entstanden zwei kompatible Enden, welche in der folgenden Ligation wieder fusionieren konnten. Um dieses zu verhindern, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA mit Hilfe von Alkalischer Phosphatase (AP) dephosphoriliert. Das Insert besaß diese Phosphatgruppen an seinen 5'-Enden weiterhin, und konnte so bei der Ligation in die dephosphorilierte Plasmid-DNA subkloniert werden. 1 µg der linearisierten Plasmid-DNA wurde hierfür in 90 µl H₂O-Bidest aufgenommen und mit 10 µl Tris-HCL (pH 8) versetzt. Die Probe wurde anschließend mit 1 Unit Alkalischer Phosphatase zuerst bei 37° C und dann bei 56° C jeweils 15 Minuten inkubiert und der Vorgang anschließend noch einmal wiederholt. Anschließend mußte die Probe phenolisiert werden, um die Aktivität der AP zu beenden, da sie sonst bei der Ligation auch das Insert dephosphoriliert hätte. Hierfür wurde auf die Probe Phenol gegeben, geschüttelt, zentrifugiert, die obere Phase abpipettiert und die untere Phase verworfen. Die Phenolreste wurden anschließend mit Ether extrahiert. Nach dem hinzufügen des Ethers wurde wieder geschüttelt, zentrifugiert und die untere Phase, welche die DNA enthielt, vorsichtig herausgezogen. Anschließend wurde das Volumen dieser Probe gemessen, und die DNA wurde mit 1/20 Volumen Natriumacetat (NaAc) und 2 Volumen Ethanol (EtOH) 100% gefällt, dann gewaschen und in 15 µl H₂O-Bidest aufgenommen.

2.1.5 Quantifizierung von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren lassen sich durch ihre starke Absorption ultravioletten Lichtes der Wellenlänge 260 nm in einem Spektralphotometer mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes quantifizieren. Für die Berechnung bedient man sich der Formel

$$c (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = \text{OD } 260 \times V \times F$$

wobei V den Verdünnungsfaktor und F den Multiplikationsfaktor (50 für ds-DNA und 40 für RNA) darstellt. Die Absorption der Proben wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl in speziellen Quarzküvetten gegen das reine Lösungsmittel (DEPC-H₂O) als Leerwert im Gene-Quant-Photometer gemessen. Hiermit wurden sowohl die Konzentration der DNA- als auch der später gewonnenen RNA-Proben bestimmt.

2.1.6 Ligation

Unter Ligation versteht man die Verbindung zweier DNA-Moleküle mit sequenzkomplementären Enden, welche unter in vitro Bedingungen durch die T₄-Ligase katalysiert wird. Durch sie werden die Phosphatgruppen der 5'-Enden miteinander durch Esterbindungen miteinander verknüpft. Eine Rezirkularisierung der Plasmid-DNA kann durch die oben beschriebene Dephosphorylierung der 5'-Enden verhindert werden. Da die Enden des Plasmids pIND und die Enden des LHRH-R-Fragments mit ein und demselben Restriktionsenzym erzeugt worden sind, waren zwei Klonierungsmöglichkeiten für das Insert möglich, nämlich in Sense- oder in Antisense-Richtung.

Ligationsansatz :

- 1,5 µl Ligase-Puffer
- 1 µl pIND (linear. , dephosph.)
- 1 µl LHRH-R-Fragment
- 1 µl T₄-Ligase
- 10,5µl H₂O-Bidest

Der Reaktionsansatz wurde in einem Eppendorf-Cup nach kurzer Zentrifugation bei 16° C über Nacht inkubiert.

2.1.7 Transformation

Um eine genügend große Menge des neuen Plasmides zur Verfügung zu haben, bedient man sich der Amplifikation in Bakterien. Diese Bakterien müssen in der Lage sein, das Plasmid aufzunehmen (Transformation) und es mit einer möglichst hohen Effizienz zu replizieren. Es gibt eine Vielzahl solcher sogenannten kompetenten Bakterien, welche recht unterschiedliche Fähigkeiten haben (Liste in Ausubel et al.: Current Protocols in molecular biology). Um eine hohe Transformationsrate zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit der von der Firma Invitrogen® empfohlene E.coli-Stamm Top10F'Cells™ verwendet. Die Ligationsprobe wurde zentrifugiert und auf Eis gelegt. Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis langsam aufgetaut und es folgte die Zugabe von 2 µl 0,5M β-Mercaptoethanol. Da die kompetenten Bakterien sehr empfindlich auf Temperaturänderungen und mechanische Einflüsse sind, wurde für die Durchmischung nur mit dem Finger leicht gegen das Tube getippt und das Pipettieren der Probe streng vermieden. Anschließend wurden 5 µl des Ligationsansatzes direkt in die Zellmasse gegeben und die Probe wieder durch gegentippen gemischt. Nun wurde die Probe 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben genau 30 Sekunden im 42° C – Wasserbad inkubiert und hierbei nicht gemischt oder geschüttelt. Nun wurde die Probe wiederum 2 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend mit 250 µl vorgewärmten SOC-Medium (Invitrogen) versetzt. Im Schüttelinkubator wurden die Proben darauf bei 37° C mit 225 rpm 60 Minuten belassen.

Für die anschließende Selektionierung wurden Agar-Platten mit 50 mg/L Ampicillin hergestellt::

LB-Medium (Luria Bertani) :

10 g Casein-Hydrolysat
5 g Yeast-Extract
5 g NaCl
1 N NaOH

mit H₂O auf 1000 ml auffüllen, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

LB-Agar :

LB-Medium

1,5 % (w/v) Agar

autoklavieren und auf unter 50° C abkühlen lassen.

Erst dann wurde das Antibiotikum zugegeben und sterile 10 cm- Petrischalen etwa bis zur Hälfte befüllt. Nach der Inkubation im Schüttelinkubator wurde die Probe erneut auf Eis gestellt und je 100 µl wurden auf die Ampicillin-Agarplatten überführt und mit einem sterilen Glasspatel gleichmäßig auf der Platte verteilt. Als Kontrolle wurden 100 µl einer nichttransfizierten Probe beimpft. Die Agarplatten wurden bei 37° C über Nacht inkubiert.

2.1.8 Bakterienkultur

Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden nun zur weiteren Analyse in LB-Medium vermehrt. Dafür wurden einzelne, gut abgegrenzte Klone von der Agarplatte mittels einer sterilen Pipettenspitze „gepickt“, in 10 ml Tubes mit Ampicillin-LB-Medium überführt und im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{595nm} von 0,6 – 1,0 (sog. mid-log-Phase) inkubiert, da die Plasmidausbeute aus den Bakterien bei einer größeren Dichte nicht mehr optimal ist. Eine gute Durchschüttelung des Ansatzes im Inkubator mit leichter Schaumbildung trug zum besseren Wachstum bei. Zur Bestimmung der OD wurden steril Proben entnommen und im Photometer gemessen. Um eine Erhöhung der Plasmidausbeute bei reduzierter Proteinverunreinigung zu erzielen, wurde dem Medium 150 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt. Dieses hemmt durch Proteinbiosynthesehemmung die weitere Vermehrung der Bakterien bei fortlaufender Plasmidreplikation.

Aus den Tubes wurden 1,5 ml Suspension entnommen und in ein Eppendorf-Cup überführt. Der Rest der Suspension wurde im Kühlschrank gelagert und konnte nach erfolgter Testung zur Maxipräparation verwendet werden.

2.1.9 Analytische Plasmid-Präparation (Mini-Prep)

Die verschiedenen Klone wurden nun auf Beinhaltung des Plasmid pIND-R-HRHL (HindIII) getestet. Dafür musste in einem ersten Schritt die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert werden und diese anschließend mit spezifischen Restriktionsendonucleasen geschnitten werden, um das Insert und dessen Antisenseorientierung nachzuweisen.

Hierzu wurden die Eppendorf-Cups mit der Suspension der verschiedenen Klone zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren, anschließend wurde der Überstand verworfen und die Probe mit Hilfe eines Plasmidpräparationskits (Nucleobond - Macherey/Nagel) lysiert und gereinigt. Die Pellets wurden mit 300 µl RNase haltiger S1-Lösung (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A/ml, pH 8.0) 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Es folgte die Zugabe von 300 µl S2-Lösung (200 mM NaOH, 1% SDS) und weitere 5 Minuten Inkubationszeit. Danach wurden 300 µl S3-Lösung (2.8 M KAc, pH 5.1) hinzugefügt und die Probe 5 Minuten auf Eis inkubiert und ab und zu leicht gekippt, jedoch nicht geschüttelt. Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 13.000g. Der Überstand wurde abgenommen und 80 % (v/v) Isopropanol zur Fällung zugegeben. Anschließend wurde wieder bei 13.000g zentrifugiert und die Probe schließlich mehrmals mit 70 % EtOH gewaschen. Nun wurde das Plasmid-Pellet in einer Evaporationszentrifuge (Speed-Vac) getrocknet und in 40 µl H₂O-Bidest aufgenommen. Für die Analyse der gewonnenen Plasmidmenge aus den verschiedenen Klonen wurden Restriktionsanalysen mit den Enzymen HindIII und BamHI durchgeführt und anschließend die verschiedenen Proben der Klone auf Agarosegel elektrophoretisch dargestellt. Hierbei wurde bei drei von sechs Klonen eine Antisenseorientierung des LHRH-R-Fragments festgestellt.

2.1.10 Plasmid Präparation (Maxi-Prep)

Für die Transfektion des Plasmids pIND-R-HRHL-Antisense wurden größere Mengen benötigt, welche durch eine weitere Vermehrung eines der positiv getesteten Klone hergestellt wurde. Die anderen Klone wurden kryokonserviert

(s. unten). In einem großen Erlenmeierkolben wurden die transformierten Bakterien wiederum bis zur OD_{595nm} von 0,6–1,0 unter ständigem Schütteln inkubiert und mit Chloramphenicol versetzt (s. oben). Die Menge von 1000 ml LB-Medium wurde anschließend auf zwei 500 ml fassende Ultrazentrifugengefäße aufgeteilt und 20 Minuten bei 4° C und 4000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit den oben genannten Puffern (je 12 ml pro Ansatz) lysiert. Die lysierten Zellen wurden nun in ein Zentrifugenröhrchen (Polysterol , ca. 50 ml) überführt und bei 19.000g und 4° C 20 Minuten zentrifugiert. Während dieser Zeit wurde die zum Kit (Nucleobond - Macherey/Nagel) gehörende Isoliersäule mit 5 ml N2 Puffer (100 mM Tris/H₃ PO₄ , 15% Ethanol, 900 mM KCl, pH 6.3, 0.15% Triton X-100) equilibriert und anschließend mit dem Überstand aus der zentrifugierten Probe beladen. Nach dem Durchlauf wurde die Säule zweimal mit 12 ml N3 Puffer (100 mM Tris/H₃ PO₄ , 15% Ethanol, 1150 mM KCl, pH 6.3) gewaschen, die Säule auf ein frisches Zentrifugenröhrchen (50 ml Falcon Tube) gesetzt und das Plasmid mit 6 ml N5 Puffer (100 mM Tris/H₃ PO₄ , 15% Ethanol, 1000 mM KCl, pH 8.5) eluiert. Das Eluat wurde mit 4,2 ml Isopropanol aufgefüllt und 30 Minuten bei 5000g zentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 3 ml 70 % EtOH 10 Minuten bei 5000g gewaschen und anschließend in der Evaporationszentrifuge behandelt. Die Plasmid-DNA wurde in 1x TB aufgenommen, gut geschüttelt und zentrifugiert und die Konzentration im Gene-Quant-Photometer bestimmt, wobei sich eine Konzentration von 1,1 µg/µl (bei 900 µl Gesamtvolumen) ergab.

2.1.11 Kryokonservierung von Bakterien

Die getesteten Antisense-Klone wurden in Eppendorf-Cups bei –20° C unter Zugabe von Glycerin als Membranenschutz eingefroren. So können diese Stocks zu jeder Zeit für neue Plasmid-Gewinnung in LB-Medium heranwachsen:

Glycerin-Stocks:

-400 µl Bakteriensuspension

-600 µl Glycerin

vortexen und bei –20° C einfrieren.

2.2 Allgemeine Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

Für die Transfektion des LHRH-R-Antisense-Fragments im Ecdysone System wurde die adhärent wachsende Ovarialkarzinomzelllinie EFO 21 verwendet. Diese Zelllinie stammt aus der Anzucht der Eppendorfer Universitätsfrauenklinik Hamburg (Prof. Dr. Hölzel, [Simon et al. 1983](#)) und wurde aus Aszitesflüssigkeit einer 56-jährigen Patientin mit primärem Ovarialkarzinom entnommen. Histologisch handelte es sich hierbei um ein seröses, papilläres, wenig differenziertes Adenokarzinom. Die Zelllinie war hinsichtlich ihrer Expression des LHRH-Rezeptors positiv und zeigte hochaffine Bindungsstellen für LHRH ([Emons et al 1993](#), [Irmer et al. 1995](#), [Voelker et al. 1999](#)).

2.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Haltung der Zellen erfolgte in Kunststoffzellkulturflaschen verschiedener Größen, welche einen luftdurchlässigen Deckel besaßen, in Brutschränken bei einer Temperatur von 37° C und in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 95% Luft bei 100% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Begasung mit 5% CO₂ erfolgte zur Konstanthaltung des pH-Wertes der mit Hydrogencarbonat gepufferten Kulturmedien. Das sterile Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter Sterilwerkbänken mit vertikalem Luftstrom. Alle Gewebekulturmedien wurden bis zum Gebrauch bei 4° C gelagert und zur Anwendung im Wasserbad auf 37° C erhitzt. Das Wachstumsmedium wurde alle 3-4 Tage erneuert, und die verschiedenen Zellen wurden zur Kontaminationsvermeidung aus separaten Mediumflaschen versorgt.

2.2.2.1 Kulturmedien

Als Grundmedium für das Wachstum der Zellen wurde Minimal Essential Medium (MEM), ergänzt mit Earle's Salzen, verwendet. Die Pulverform des Mediums wurde in H₂O-Bidest gelöst und anschließend mit folgenden Substanzen versetzt:

Grundmedium:

2,5 mg/L Transferrin
67 mg Gentamycinsulfat
2,2 g/L NaHCO₃
40 IU/L Insulin

Der Ansatz wurde auf einen pH-Wert von 7,4-7,6 eingestellt und anschließend steril filtriert. Abschließend erfolgte die sterile Zugabe von 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und die Portionierung in 500 ml Flaschen, welche bei 4° C gelagert ca. 3 Monate haltbar waren. Für Transfektionen wurde ein phenolrot- und serumfreies Medium ohne Gentamycin mit ansonsten gleichen Zusätzen wie oben verwendet.

2.2.2.2 Passagieren adhärenter Zellen

Nachdem die Zellen in den Kulturflaschen zu ca.90% konfluent waren, war eine Reduktion der Zellmenge notwendig, da es sonst zu einem Absterben der Zellen kam. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe des Enzyms Trypsin vom Flaschenboden und voneinander getrennt und entweder zur RNA-Isolierung verwendet, auf neue Flaschen bzw. Versuchsplatten verteilt oder zur späteren Kultivierung eingefroren. Die Lösung hierfür setzte sich wie folgt zusammen:

Trypsinlösung:

140 mmol/L NaCl
3 mmol/L KCl
8 mmol/L Na₂HPO₄
1,5 mmol/L KH₂PO₄
2,5 mmol/L EDTA
2000 U/L Trypsin

Das Medium wurde hierfür abgegossen und Reste durch Vorspülen mit der Trypsin-Lösung entfernt. Anschließend wurden 3 ml der Lösung zugegeben und die Zellen im Brutschrank für ca. 5 Minuten inkubiert, wobei der Vorgang der Ablösung der Zellen unter dem Phasenmikroskop regelmäßig kontrolliert wurde. Die Trypsinwirkung wurde bei der Neuaussaat durch die Zugabe von Medium gestoppt.

2.2.2.3 Kryokonservierung

Um später noch möglichst frühe Passagen der Zellen verarbeiten zu können, wurden die gewonnenen Klone bei -80°C tiefgefroren. Hierfür wurden die Zellen in den Kulturflaschen abtrypsiniert, in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und 1:1 mit Kulturmedium versetzt. Dann wurden die Zellen für 5 Minuten bei 400g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Umdrehungszahl war zum Erhalt der Zellen unbedingt einzuhalten. Das Zellsediment wurde anschließend in 1,5 ml Medium, welches zu 10% mit sterilfiltriertem Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt worden war, resuspendiert und in spezielle Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Proben halb aufgetaut, in eine Zellkulturflasche mit 25 ml Medium überführt und im Brutschrank neu angezüchtet.

2.3 Etablierung der neuen Zelllinie

2.3.1 Bestimmung der Antibiotikasensitivität

Da die transformierten Zellen durch die Plasmidkodierung gegen die Antibiotika Zeocin® und G418 resistent waren, ließen sich die nichttransfizierten von den transfizierten durch eine Antibiotikaselektion unterscheiden. Zeocin® ist ein Antibiotikum der Bleomycin-Gruppe und wirkt über eine Interkalation und anschließende Restriktion der DNA (Berdy 1974). Es muß lichtgeschützt bei 4° C aufbewahrt werden. G418 ist ein Aminoglykosid Antibiotikum und interferiert mit den Ribosomenuntereinheiten von Eukaryonten, was zur Proteinsynthesehemmung führt. Die Aufbewahrung erfolgte ebenfalls bei 4° C. Die Handhabung der toxischen Antibiotika erfolgte unter Handschuhschutz. Zur Determination der letalen Dosis für untransfizierte Zellen wurde eine sogenannte „Killkurve“ für die Zelllinie EFO 21 erstellt. EFO 21-Zellen wurden dazu in 20 Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm ausgesät und mit Zeocin®- bzw. G418-haltigem Medium steigender Konzentrationen behandelt, wobei jeweils eine Petrischale ohne Antibiotikum als Kontrolle diente. Das Medium wurde dabei alle 5 Tage gewechselt. Nach ca. 4 Wochen konnte die letale Dosis von 650 µg/ml Zeocin® und 800 µg/ml G418 für EFO 21 notiert werden. Bei Verwendung von eingefrorenen Zellklonen erfolgte eine Selektion über etwa 10 Tage, wobei zur Kontrolle eine nichttransfizierte EFO 21- Zelle mit der selben Konzentration behandelt wurde.

2.3.2 Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von genetischem Material in eukaryontische Zellen, wobei zwischen einer transienten (einmaligen) und einer stabilen (festen) Transfektion unterschieden wird. Dabei können die Nukleinsäuren über verschiedene Mechanismen von der Zelle aufgenommen werden, z.B. durch Endozytose (u.a. Calcium-Phosphat-Methode), durch Diffusion (Elektroporation), durch mechanische Einwirkungen (Mikroinjektion,

Ultraschall), mit Hilfe von Viren, oder durch Fusion von kationischen Liposomen mit der Zellmembran (Felgner et al. 1989). Letztere wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die beiden Plasmide des Ecdysone-Systems in die Ovarialkarzinomzelle EFO 21 zu transfizieren und einen stabilen Einbau zu erreichen.

Hierfür wurden EFO 21-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 70% wachsen gelassen. Pro Schale wurden 5 µg pIND-R-HRHL und 5 µg pVgRXR in 150 µl des oben beschriebenen Transfektionsmediums in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 40 µl kationischer Liposomenlösung (Superfect) 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellen dreimal mit PBS (phosphate buffered saline) gespült. Nach der Inkubationszeit wurden die Zentrifugenröhrchen mit 1 ml Grundmedium versetzt, der Ansatz vorsichtig geschwenkt und 1ml hiervon auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden nun für 2-3 Stunden bei 37° C inkubiert, anschließend wurde die Transfektionslösung abgesaugt, die Platten dreimal mit PBS gewaschen und wieder mit Grundmedium gefüllt.

2.3.3 Selektion

Die Co-Transfizierten Zellen konnten nun anhand ihrer Fähigkeit die Antibiotikaresistenzgene für Zeocin und G418 zu exprimieren, selektioniert werden. Hierfür wurden sie unter besonderer Vorsicht vor Kontaminationen für drei Wochen unter stetiger Antibiotikazugabe in den Wachstumsschalen gehalten. Die Konzentration der Antibiotika entsprach den in der Killkurve ermittelten Konzentrationen (s. oben). Nach etwa 10 Tagen begannen sich Klone zu entwickeln.

2.3.4 Isolierung von einzelnen Klonen

Ein Klon ist definiert als eine Gruppe von genetisch identischen Zellen oder Organismen, die durch Teilung einer einzelnen Zelle entstanden sind. Für die

weiteren Untersuchungen war es wichtig, mehrere Klone heranzuzüchten, um sie auf ihre Funktionalität bezüglich des eingebauten Systems zu überprüfen. Daher wurden die Klone vor der Fusion voneinander getrennt. Die Klone wurden hierfür unter der Sterilbank unter mikroskopischer Kontrolle mit sterilen Pipetten gepickt und in eine neue Petrischale überführt. Nach genauer Kennzeichnung und ca. zwei Wochen weiterer Selektion, wurden die Klone auf große Kulturflaschen umgesetzt. Die lange Selektionszeit war wichtig um eine stabile Transfektion zu erreichen, deren Wahrscheinlichkeit bei einer maximalen Größenordnung von 10^{-4} liegt (Mühlhardt 1999). Aufgetaute Klone wurden für ca. zwei Wochen mit Zeocin® und G418 behandelt.

2.4 Überprüfung des Systems

2.4.1 Induktion des Ecdysone-Systems

Für die Induktion wurde das in 1.4 beschriebene Ecdysteroid MuristeroneA in den Konzentrationen von 1 und 10 μM verwendet. Während der Arbeiten kam es laut Hersteller zu einer Einstellung der Produktion von MuristeroneA, und es wurde das Ecdysteroid PonasteroneA verwendet, welches nach Angaben des Herstellers Invitrogen® ein vergleichbares Induktionsvermögen besitzt. Für die Induktion wurden 1 bzw. 10 μM (entsprechend 1 μl bzw. 10 μl pro 1ml Medium) MuristeroneA (bzw. PonasteroneA), welches zuvor in EtOH 100% gelöst wurde (250 μg Muristerone/PonasteroneA in 500 μl Ethanol 100%), zu den Zellen gegeben und diese für 24 bis 48 Stunden inkubiert. Der nicht induzierten Probe wurde die gleiche Menge (1 μl bzw. 10 μl pro 1ml Medium) an EtOH 100% zugegeben. Für den Radiorezeptorassay wurden die Zellen für 10 Tage auf 10 μM MuristeroneA® (bzw. PonasteroneA®) gehalten, wobei Medium und Hormon nach 5 Tagen erneuert wurden. Im Verlauf der Versuche wurde vom Hersteller ein weiterer Inducer (GS-E®) angeboten, welcher als nichtsteroidaler Agonist des Ecdysone-Rezeptors ebenfalls untersucht wurde.

2.4.2 DNA-Isolierung

Zur Überprüfung, ob das eingeschleuste LHRH-R-Antisense-Fragment im Genom der transfizierten EFO 21-Zellen nachzuweisen war, wurde die DNA aus den Zellen isoliert. Die nichtinduzierten Zellen wurden hierfür abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und bei 400g 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 3 ml Proteinase K-Puffer versetzt und im Schüttelinkubator bei 50° C über Nacht inkubiert.

Proteinase K-Puffer:

100 mmol/L NaCl
10 mmol/L Tris HCL pH 8,0
50 mmol/L EDTA pH 8,0
0,5% SDS
20 µg/ml Rnase A
0,1 mg/ml Proteinase K

Nun wurde gleiches Volumen Phenol zugegeben und wie in 2.1.4 beschrieben die DNA gereinigt und gefällt. Nach der anschließenden Konzentrationsbestimmung im Photometer wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (s.2.4.6). zum Nachweis des Inserts durchgeführt.

2.4.3 RNA-Isolierung

Die Isolierung von mRNA bedurfte spezieller Sauberkeit, da sonst ubiquitär vorkommende Ribonukleasen (RNasen) die gewonnene mRNA schnell zersetzten. Alle Schritte wurden daher mit Einmalhandschuhen und sterilen Einmalgefäßen und Pipettenspitzen durchgeführt. Glasbehälter wurden zur Inaktivierung der RNasen für zwei Stunden bei 200° C erhitzt. Das Lösungsmittel für die RNA war DEPC-H₂O. DEPC (Diethylpyrocarbonat) inaktiviert RNasen über eine Carboxylierung von Histidinresten und freien Aminogruppen (Fedorcsak und Ehrenberg 1966). H₂O-Bidest wurde hierfür mit

0,1% DEPC versetzt und unter Rühren über Nacht inkubiert. Die Wirkung des DEPC wurde am nächsten Tag durch Autoklavierung beendet.

Die Gewinnung der RNA erfolgte zum einen mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits, das alle Reagenzien außer Ethanol und DEPC-H₂O enthält. Das System basiert auf selektiven Bindungseigenschaften einer Silikagel-Membran mit der RNA. Über ein spezielles Puffersystem und Zentrifugation können mehr als 100 µg RNA an die Membran gebunden und anschließend mit DEPC-H₂O eluiert werden.

Die Zellen wurden nach der Pelletierung (s. oben) mit Hilfe eines Guanidinoisothiocyanat-Puffers (GIT-Puffer) lysiert. Das Zellysat wurde über eine 20g Kanüle durch dreimaliges vorsichtiges Aufziehen in einer 2 ml Spritze homogenisiert. Anschließend wurde die gleiche Menge DEPC-EtOH 70% zugegeben und die DNA (sichtbare visköse Masse) mit einer Pipettenspitze vorsichtig entfernt, um ein späteres Verstopfen der Säule zu verhindern. Es folgten die Waschschrirte mit verschiedenen Puffern und die Zentrifugation, um Verunreinigungen zu entfernen. Die an die Silikagel-Membran gebundene Gesamt-RNA wurde mit 30 µl DEPC-H₂O durch Zentrifugieren für zwei Minuten bei 13.000g eluiert und auf Eis gestellt. Eine Probe von 2 µl wurde mit 198 µl DEPC-H₂O versetzt und die Konzentration im Photometer bestimmt (s. 2.1.5)

Zum anderen wurde die RNA-Gewinnung um DNA-Verunreinigung auszuschließen über eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation (Ausubel et al. 1991) gewonnen. Hierfür wurde das Zellpellet mit 1,5 ml 1%β-Mercaptoethanol enthaltendem GIT-Puffer versetzt, gut geschüttelt und kurz zentrifugiert. In ein autoklaviertes Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen wurde 3,5 ml 5,7M CsCl-Lösung gegeben und hierzu sehr vorsichtig 1,5 ml des Zellysates pipettiert. Die Probe wurde in einer Ultrazentrifuge für 20 Stunden bei 18° C mit 35.000g zentrifugiert. Die als weißliche Bande in der Interphase sichtbare DNA wurde mitsamt dem Überstand mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt, und das Tube auf einem Zellstofftuch invertiert. Das (unsichtbare) RNA-Pellet wurde in 300 ul DEPC-H₂O aufgenommen und die RNA mit 1/10 Volumen NaAc und 2 Volumen EtOH 100% gefällt. Diese Lösung wurde 30 Minuten bei -80° C inkubiert und anschließend 30 Minuten bei 13.000g zentrifugiert. Danach wurde das Pellet einmal mit EtOH 70%

gewaschen und anschließend der restliche Alkohol mit dem Speed-Vac evaporiert. Die RNA wurde nun in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen und die Konzentration bestimmt. 10 µl dieser Probe wurden anschließend auf Gel aufgetragen, um die spezifischen RNA-Banden zu identifizieren.

2.4.4 c-DNA-Synthese

Um mRNA-Moleküle mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion zu vervielfältigen, muß eine sogenannte Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt werden. Hierbei wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus der Gesamt-RNA die mRNA in den komplementären Strang umgeschrieben, wobei die sogenannte first-strand-copy-DNA entsteht. Diese c-DNA wird anschließend mit Hilfe der PCR (s. 2.4.6) und sequenzspezifischen Primern in vitro vermehrt. Für die c-DNA-Synthese wird mit Hilfe von Oligo-(dT)₁₅-Primern die PolyA-haltige mRNA, welche nur ca. 2% der Gesamt-RNA ausmacht, spezifisch gebunden. Die zugesetzte Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase (M-MLV-RT) katalysiert nun mit Hilfe der zugesetzten Desoxynucleotide die Synthese des Matrizenstrangs.

c-DNA Reaktionsansatz:

1,25 µg Oligo-(dT)₁₅-Primer
je 1 mmol/L dNTP's
10 mmol/L Dithiothreitol
80 U RNasin
300 U M-MLV-RT
50 mmol/L Tris HCL pH 8,3
75 mmol/L KCl
3 mmol /L MgCl₂

Die Reagenzien wurden in einem Premix in 32,4 µl DEPC-H₂O gelöst , während die auf eine Konzentration von 4µg/7,6µl gebrachte RNA-Probe 10 Minuten bei 70° C denaturiert wurde. Nach dem Herunterkühlen der RNA-Probe auf 4° C wurden 32,4 µl Premix zugeführt, kurz zentrifugiert und die Probe bei 37° C 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität

der RT durch 10 minütiges Denaturieren bei 95° C beendet. Die so gewonnenen c-DNA-Proben wurden nun für die PCR verwendet und der Rest bei –20° C eingefroren.

2.4.5 Oligonucleotidprimer

Zum Nachweis des LHRH-R-Antisense-Fragments wurden die im Ecdysone-System enthaltenen Primer verwendet:

Sense - Antisense-Primer	Position [bp]	Annealing	Produkt	Referenz
5' CTC TGA ATA CTT TCA ACA AGT TAC 3'	429-452	52°C	836bp*	No et al 1996
5' CCT CGA CTG TGC CTT CTA 3'	603-620			

* Die 836 bp ergeben sich aus dem Abschnitt des 5'-Primers bis zum Insert (65 bp), dem Antisense Fragment (644 bp) und dem Abschnitt vom Insertende bis zum 3'-Primerende (127 bp)

Zur c-DNA –Kontrolle wurden GAP-DH-Primer verwendet:

Sense - Antisense-Primer	Annealing	Produkt	Referenz
5' CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA 3' 5' TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC 3'	60°C	356 bp	Stratagene Heidelberg

Die Ecdysone- und LHRH-R Primer wurden in der Mikrochemischen Einheit des Institutes für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg synthetisiert.

2.4.6 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR), in Abb. 5 dargestellt, ist eine effiziente Methode zur Darstellung kleinster Mengen DNA durch eine exponentielle Amplifizierung des gesuchten Gens (Mullis und Faloona 1987). Hierbei wird mit Hilfe von Oligonucleotidprimern, welche komplementär zu Regionen des gesuchten DNA-Abschnittes sind, in sich wiederholenden Zyklen von Denaturierung der DNA-Doppelstränge, Anlagerung der Primer (Annealing) und Anfügen der komplementären Desoxynucleotide durch die thermostabile Taq-Polymerase die DNA-Sequenz so häufig kopiert, dass sie sich anschließend auf einem Agarosegel deutlich darstellen lässt.

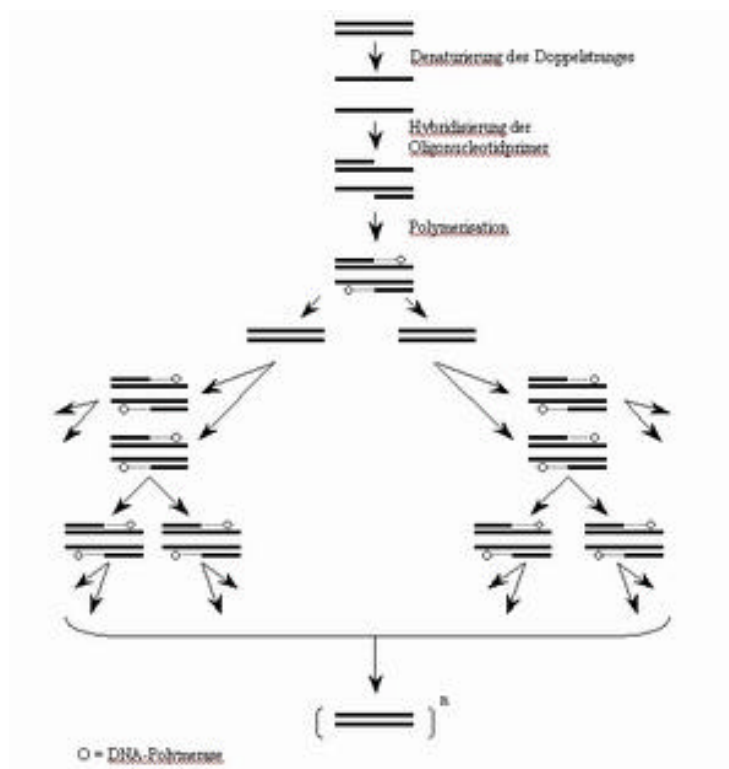


Abb 5 :Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion

PCR-Reaktionsansatz:

dNTP` s	je 200 µmol/L
5'-Primer	1 µmol/L
3'-Primer	1 µmol/L
Tris-HCl pH 8,3	10 mmol/L
KCl	50 mmol/L
MgCl ₂	1,5 mmol/L
Taq-Polymerase	1,25 U

Die Substanzen wurden mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 48 µl gebracht und mit 2 µl der gewünschten c-DNA versetzt. Die Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen bei den primerspezifischen Annealingtemperaturen. Im ersten Reaktionsschritt werden die DNA-Doppelstränge, welche durch die Amplifikation der Anfangs einzelsträngigen c-DNA entstehen, durch Erhitzen für zwei Minuten auf 94° C in Einzelstränge aufgeschmolzen. Im sogenannten Annealingschritt hybridisieren die Primer mit den komplementären Sequenzen des zu kopierenden Stranges bei der jeweiligen Annealingtemperatur für eine Minute. Die im dritten Schritt von den Primern ausgehende Polymerisation erfolgte bei 72° C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, für eine Minute.

2.4.7 PCR-Kontrollverdau

Das mit den Ecdysone-Primern erhaltene PCR-Produkt wurde mit Restriktionsendonucleasen verdaut und seine Antisense-Orientierung erneut überprüft. Hierfür wurden 10µl der PCR-Probe über Nacht bei 37°C mit den Enzymen HindIII und BamHI und den vom Hersteller empfohlenen Puffern inkubiert. Anschließend erfolgte die visuelle Darstellung mittels einer Gelelektrophorese und die Ermittlung der Fragmentgrößen anhand einer mitlaufenden DNA-Leiter.

2.4.8 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung des durch die PCR amplifizierten Genproduktes erfolgte durch ein externes Labor (SEQ-LAB, Sequence Laboratories Göttingen GmbH). Hierbei wurde das Produkt aus der c-DNA, welche aus der RNA der induzierten Zelllinie gewonnen wurde, sequenziert. Die Analyse ist im Ergebnisteil abgebildet (Abb 13 und 14).

2.5 Untersuchung der LHRH-Rezeptorexpression

2.5.1 Radioligandenassay

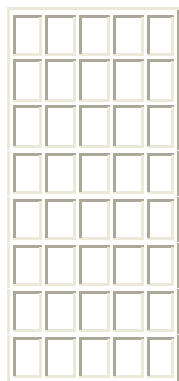
Der Nachweis des LHRH-Rezeptors in den Tumorzellen erfolgte über einen spezifischen Radioligandenassay. Als Radioligand wurde das mit ^{125}I markierte Triptorelin ($[\text{D-Trp}^6]\text{LHRH}$) eingesetzt. Die spezifische Aktivität des markierten Peptids wurde in einer Verdrängungsreaktion von markiertem und unmarkiertem Liganden an den spezifischen Rezeptoren der Zelllinie aT3-1 (Hypophysentumor einer transgenen Maus) bestimmt. Durch den Einsatz eines Überschusses an Plasmaprotein-Zellmembranen wurde die maximale Bindungsfähigkeit des Radioliganden an der hochaffinen Bindungsstelle bestimmt. Die mathematischen Auswertung der Messdaten erfolgte durch eine 2-Bindungsstellen-Scatchard-Analyse mit dem LIGAND-Computerprogramm. Für den Versuch wurden EFO 21 Zellen und zwei transfizierte Klone (OMiLe 1.2 und OMiLe 2.1) in jeweils 80 Petrischalen angezchtet, wobei die eine Hälfte der Zellen unter MuristeroneA® (bzw. PonasteroneA®)-Einfluss wuchsen, während die andere Hälfte nur unter dem Einfluss des Lösungsmittels des Inducers (100%EtOH) in der gleichen Konzentration stand. Nach 10 Tagen wurden die Zellen mehrfach gespült und vorsichtig aus den Schalen gewonnen. Die Membranengewinnung, die radioaktiven Messversuche und die statistische Auswertung wurden freundlicherweise von Dr. P. Völker durchgeführt.

2.6 Proliferationsexperimente

2.6.1 MTT-Assay

Die Proliferation der Tumorzellen in Kultur wurde mit Hilfe eines MTT-Assays untersucht. Das gelbe 3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) dringt in die Zellen ein, sein Tetrazoliumring wird durch die mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Tumorzellen aufgebrochen und in das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan umgewandelt. Die photometrische Intensität wurde gemessen und anschließend graphisch dargestellt.

Die Zellen wurden aus den Kulturflaschen abtrypsiniert, gezählt und in einer Konzentration von 500 Zellen pro 200µl Medium in 5 „96-well“-Mikrotiterplatten ausgesät. Hierbei erfolgte für jede Versuchsreihe eine 8-fach Bestimmung, aus welcher später der Mittelwert errechnet wurde. Für die Zelllinien EFO21, OMiLe 1.2 und OMiLe 2.1 entsprach der Versuchsaufbau der folgenden Graphik:



- 1: Leerwert (nur Medium)
- 2: Kontrolle (nur Zellen)
- 3: Triptorelin 10⁻⁵
- 4: PonasteroneA 10µM
- 5: Triptorelin/PonasteroneA

Nach der homogenen Aussaat erfolgte eine Anwachsphase für zwei Tage in RM-Medium. Am dritten Tag wurde das Medium mit einer sterilen Glaspipette unter leichtem Sog abgesaugt, wobei die Pipette jeweils am Rand der Wells bei sechs Uhr angesetzt wurde. Mit einer Platte wurde der erste MTT-Assay als Aussaatkontrolle durchgeführt. Hierbei wurden zu den 200 µl Medium 30 µl MTT zupipettiert und die Zellen für genau 3 Stunden bei 37°C weiter inkubiert. Die restlichen 4 Platten wurden mit dem jeweiligem Premix beschickt. Es wurde als Inducer des Ecdysone-Systems MuristeroneA, PonasteroneA und GS-E getestet. Der Einfluss von EtOH, als Lösungsmittel für die Hormone, auf

die Zellproliferation wurde ebenfalls untersucht. Das LHRH-Analogen Triptorelin wurde in PBS gelöst und in einer Stammlösung mit der Konzentration 10^{-3} Mol/L bei 4°C aufbewahrt. Für die Proliferation wurde durch Verdünnung mit RM-Medium eine Konzentration von 10^{-5} Mol/L eingesetzt. Die lyophilisierten Ecdysone-Analoga wurden EtOH 100% gelöst (Aufbewahrung bei -20°C) und in einer Konzentration von 10µM/L eingesetzt. Die an den 4 folgenden Tagen durchgeführten MTT-Assays wurden jeweils eingefroren und zusammen mit der Aussaatkontrolle ausgewertet. Hierzu wurde das in den lebenden Zellen gebildete blaue Formazan mit 100µl DMSO pro Well auf einem Rüttler für 5 Minuten gelöst und die Extinktion der Platten am Photometer bei 570nm, Referenzwellenlänge 630nm, bestimmt. Aus den 8-fach Bestimmungen wurden die Mittelwerte gebildet und vom Leerwert subtrahiert. Die Extinktionen wurden nun graphisch dargestellt.

2.6.2 Trypan-blau-Färbung

Mit Hilfe der Trypan-blau Färbung werden in vitro Zellen mit mit funktionsgestörter Zellmembran angefärbt, während dieses bei funktionsfähigen Zellen nicht nachzuweisen ist. Eine anschließende Quantifizierung des Anteils der angefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl macht so eine Aussage über die Wirkung von Stoffen auf Zellkulturen möglich. 20 µl abtrypsinierter Zellen wurden mit 80 µl einer 0,5%igen Trypan-blau-Lösung vermischt. Nach einigen Minuten wurde die Gesamtzahl der Zellen und die Zahl der kräftig blau gefärbten Zellen in einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt. Der Prozentsatz der funktionsgestörten Zellen wurde rechnerisch bestimmt.

2.7 Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen

Der Umgang mit gentechnisch veränderten Bakterien oder menschlichen Zellen setzt ein Labor voraus, welches durch die zuständige Behörde regelmäßig begangen wird und die Gesetzesbestimmungen erfüllt. Zusätzlich zu den allgemeingültigen Kautelen der Laborarbeit kommt die genaue Dokumentation von Arbeiten mit den Organismen, ihre Herkunft, Chargennummer, Datum des Versuches und der korrekten Vernichtung durch Autoklavierung des Materiales. Eine Übersicht zu den derzeit gültigen Richtlinien (26. Oktober 1998) hat der Rat der Europäischen Union im Internet veröffentlicht.

(http://europa.eu.int/eur-lex/de/lif/dat/1998/de_398L0081.html)

Als Sicherheitsbeauftragter für das gentechnische Labors der Sicherheitsstufe 1 war bis 1999 Dr. med. H. Hushmand-Nia und seit 1999 Dr. med. U.-S. Albert zuständig.

2.8 Material

Agarose – **Eurobio, Paris/Frankreich**

Alkalische Phosphatase – **Boehringer, Ingelheim**

Autoklav 2540 ELV – **Tuttnauer, Hempstead, NY/USA**

Bacteriological Agar – **Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1**

BamHI/Puffer – **Promega, Mannheim**

Biofuge - **Heraeus, Hanau**

Brutschrank - **Hereaus, Hanau**

Camera – **Polaroid, Waltham, MA/USA**

Casein Hydrolysate (Peptone) – **Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1**

Dimethylsulfoxid (DMSO) – **Serva, Heidelberg**

Ecdysone Inducible Expression Kit – **Invitrogen, Carlsbad, CA/USA**

EDTA-Na – **Merck, Darmstadt**

FalconKulturflaschen(250,750ml)-**Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ/USA**

Fetales Kälberserum (FCS) – **Sigma, München**

Feinwaage (μg)-Typ1872 – **Sartorius, Göttingen**

Gelkammer EC 370M - **Minicell**
Gene Power Supply – **Pharmacia Biotech, Buckinghamshire/England**
GeneQuant - **Pharmacia Biotech, Buckinghamshire/England**
Geneticin(G418) – **Sigma, München**
Gentamycin Sulfat – **Seromed, Berlin**
Glycerin – **Merck, Darmstadt**
GS-E – **Invitrogen, Carlsbad,CA/USA**
HindIII-Restriktionsenzym /Puffer – **Boehringer, Ingelheim**
Instamed w/o Phenolred – **Seromed, Berlin**
Instamed – **Seromed, Berlin**
Insulin – **Hoechst, Frankfurt am Main**
Kaliumchlorid (KCl) – **Roth, Karlsruhe**
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) – **Merck, Darmstadt**
Kombitips – **Eppendorf, Hamburg**
Mikroplate Reader MPR-A4 - **Tosoh, Tokio/Japan**
Mikroskop Diavert – **Leitz, Wetzlar**
Mikrotiterplatten surface(96well) – **Nunclon, Roskilde, Denmark**
Minifuge GL – **Heraeus, Hanau**
MTT (Tetrazolium Salz) – **Sigma, München**
Multipette – **Eppendorf, Hamburg**
MuristeroneA – **Invitrogen, Carlsbad,CA/USA**
Natriumchlorid (NaCl) – **Roth, Karlsruhe**
Neubauer Zählkammer Improved - **La Fontaine**
Nucleobond - **Macherey/Nagel, Düren**
One Shot Cells (kompetente E.coli) – **Invitrogen, Carlsbad,CA/USA**
PCR-Gene Amp 24000 - **Perkin Elmer, Wellesley, MA/USA**
Pipetten – **Gilson, Middleton, WI/USA**
Polapan – **Polaroid, Waltham, MA/USA**
PonasteroneA – **Invitrogen, Carlsbad,CA/USA**
Promax1020/Inkubator1000 – **Heidolph, Schwabach**
Speed Vac SC 110 – **Savant, Albertville, MN/USA**
β-Mercaptoethanol – **Serva, Heidelberg**
Sterilfilter & Pumpe – **Milipore, Bedford, MA/USA**
Superfect – **Qiagen, Hilden**

T4 Ligase – **Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1**
Transferrin - **Serva, Heidelberg**
Tris-Puffer - **Roth, Karlsruhe**
Trypsin - **Merck, Darmstadt**
Tubes – **Greiner, Frickenhausen**
Ultrazentrifuge L8-55 – **Beckmann, München**
UV-Gelbelichter – **Biometra, Göttingen**
Waage Portable (0,1-600g) – **Sartorius, Göttingen**
XbaI -Restriktionsenzym – **Promega, Mannheim**
Yeast-Extract – **Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen 1**
Zentrifuge Model J-6B – **Beckmann, München**
Zeocin - **Invitrogen, Carlsbad,CA/USA**

3. ERGEBNISSE

3.1 Herstellung des Antisense-Plasmides

3.1.1 LHRH-R-Fragmentisolierung

Das genutzte Fragment des humanen LHRH-Rezeptorgens wurde mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen aus dem Vektor pSBC1-LHRH-R gewonnen und aufgereinigt. Dieser Vektor (Abb 6) wurde in einer Arbeit zur Etablierung von Fibroblastenkulturzellen mit LHRH-Rezeptorüberexpression hergestellt und verwendet (Beckers et al. 1995).

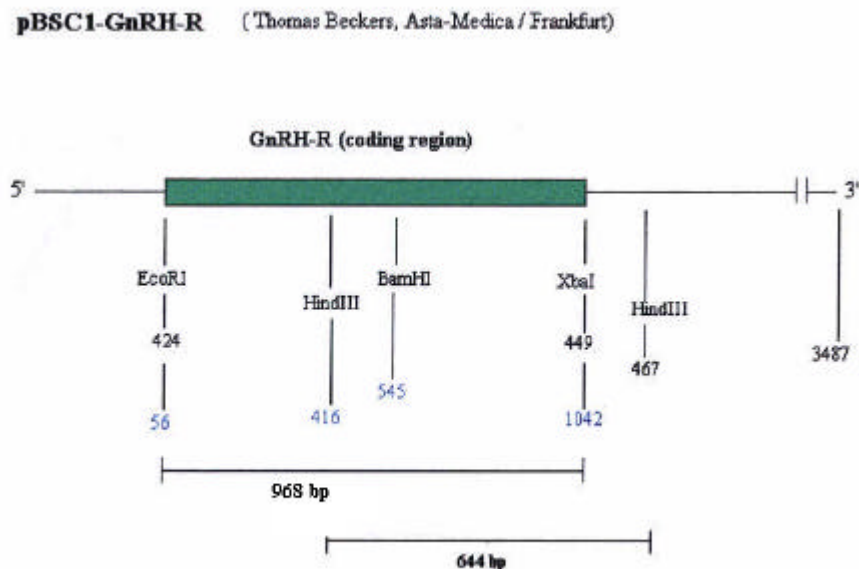


Abb. 6: Die codierende Region des LHRH-Rezeptors umfasst 986 Basenpaare

Die HindIII-Schnittstellen ergeben ein Fragment von 644 Basenpaaren (bp) (Abb. 7). Mit Hilfe der BamHI-Schnittstelle war es möglich, die Orientierung des Fragmentes nach der erfolgten Subklonierung zu untersuchen und so die entsprechenden Bakterienkulturen, welche das Plasmid mit Antisenseeinbau enthielten, zu selektionieren und als Klone zu gewinnen.

644bp =>



Abb. 7: Links stellt sich der mit HindIII geschnittenen Vektor pBSC1-GnRH-R mit einem ca. 650 bp großem Fragment und dem Rest des 3487 bp großen Vektors dar. Rechts ist die Leiter-DNA zur Fragmentgrößeneinschätzung aufgetragen.

3.1.2 Subklonierung des LHRH-Rezeptorgenfragmentes in den pIND-Vektor

Die Subklonierung des 644 bp Fragmentes aus der Open-Reading-Frame des humanen LHRH-Rezeptorgens erfolgte anschließend an die Linearisierung des Plasmides pIND aus dem Ecdysone-System wie im Abschnitt „Material und Methoden“ beschrieben. Das so neu synthetisierte Plasmid zeigt die Abb 8:

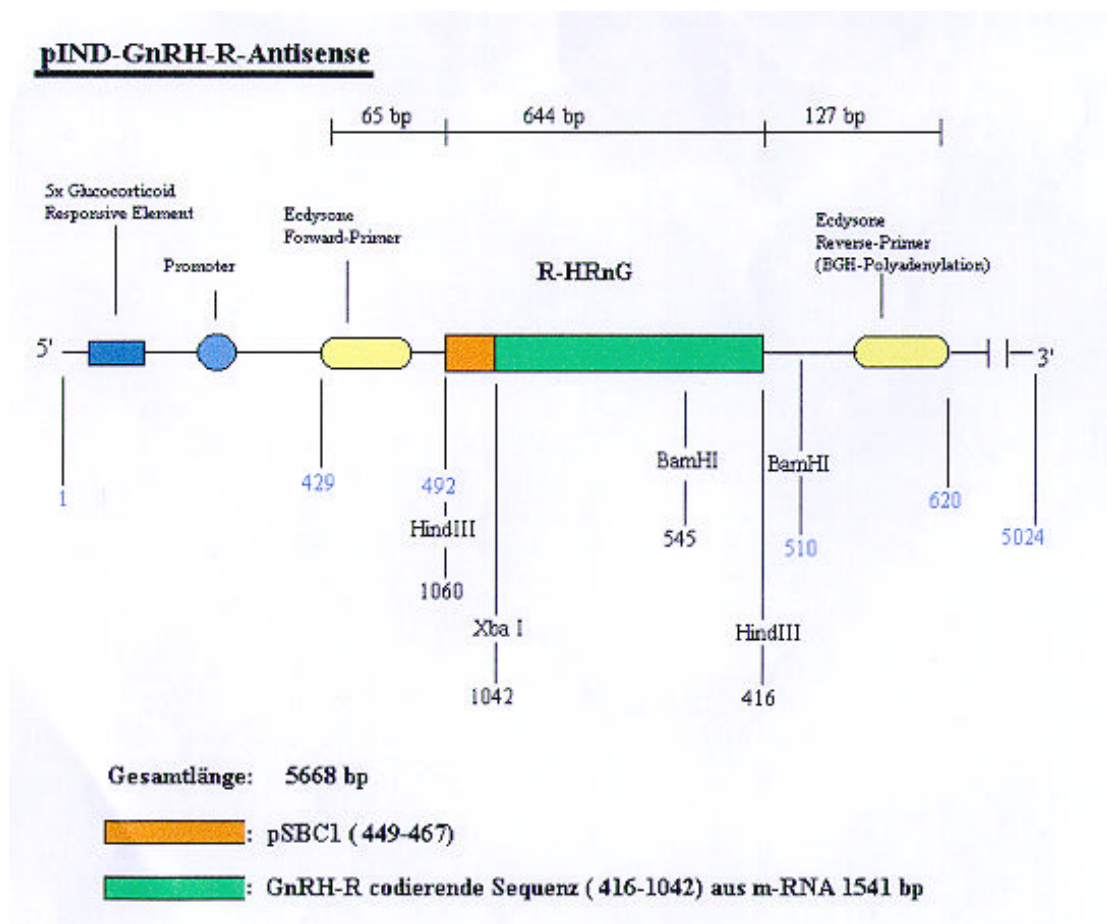


Abb. 8: Das neue Plasmid pIND-LHRH-R-Antisense

3.1.3 Transformation in kompetente Bakterien und anschließende Überprüfung des Inserts durch Restriktionsanalyse

Da aufgrund der gleichen Ligationsstellen (HindIII) sich nun die Möglichkeit einer Sense- oder Antisensesubklonierung ergab, musste nach der Transformation des Plasmids in die kompetenten Bakterien die Orientierung mit den Restriktionsendonucleasen BamHI und HindIII überprüft werden. Im Falle der Sense-Orientierung würde das mit BamHI geschnittene neue Plasmid ein 533 bp-Fragment ergeben, während die Antisenseorientierung ein 147 bp-Fragment ergäbe. In folgenden Abbildungen (9 und 10) zeigt sich links dargestellt neben der Leiter-DNA das neue Plasmid ungeschnitten, als sogenannte Supercoiled (s.c.) DNA, daneben eine HindIII Restriktion und im rechten Bild der Plasmidrestriktionsverdau mit BamHI :

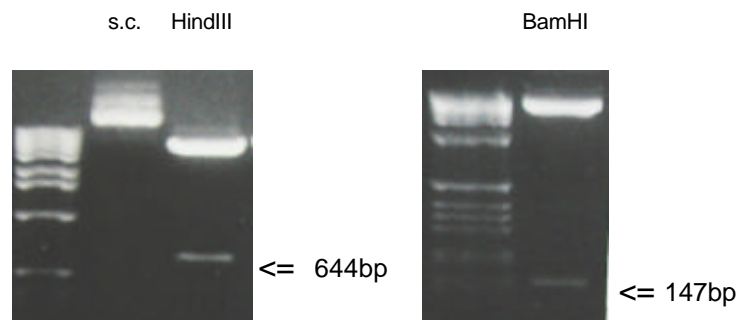


Abb. 9 und 10: Restriktionsanalyse des neuen Plasmides pIND-LHRH-R-Antisense

Die somit identifizierten E.Coli-Klone, welche das Plasmid mit Antisense-LHRH-R-Fragment reproduzierten, wurden nun zur Gewinnung von Plasmid-DNA in größeren Mengen benutzt, um anschließend für die Transfektion in die Tumorzelllinie bereitzustehen.

3.2 Einbau des Genexpressionssystems in EFO21 Zellen

3.2.1 Transfektion von pIND-R-HRHL und pVgRXR in EFO21

Zum stabilen Einbau der Plasmide pIND-R-HRHL und pvgRXR in die Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 wurde ein Liposomensystem (Superfect®) genutzt. Der Erfolg der Transfektion wurde zunächst anhand der plasmidvermittelten Antibiotikaresistenz der Zellen gesichert. Hierbei wurde zunächst an der Ausgangszelllinie nach ca. 4 Wochen die letale Dosis von 650 µg/ml Zeocin® und 800 µg/ml G418 für EFO 21 notiert. Die erfolgreiche Transfektion konnte an der Bildung von Klonen unter Inkubation im Wachstumsmedium mit zugegebenen Antibiotika in der zuvor ermittelten Konzentration beobachtet werden.

Nach dem Auftauen von Reserveklonen wurde jeweils eine erneute Selektion der Zellen durch Zugabe der Antibiotika in der Anwachsphase über etwa eine Woche durchgeführt. Anschließend folgte die Gewinnung von genomischer DNA und mRNA der Zellen im induzierten und nichtinduzierten Zustand.

3.2.2 Nachweis des stabilen Einbaus von LHRH-R-Antisense in die genomische DNA von EFO21-Klonen

Mittels PCR erfolgte aus den isolierten Nukleinsäuren nun der Nachweis einer stabilen Transfektion des Ecdysone-Systems in die genomische DNA der EFO21-Zellklone mit LHRH-R-Antisensegenamplifikation. Dieser Nachweis war bei Einbau des Fragmentes in die genomische DNA sowohl im induzierten wie auch im nichtinduzierten Zustand zu erwarten. Die folgende Abbildung zeigt die durchgeführte PCR mit Darstellung des Fragmentes sowie der Restriktionsprodukte beim Verdau mit HindIII sowie mit BamHI :

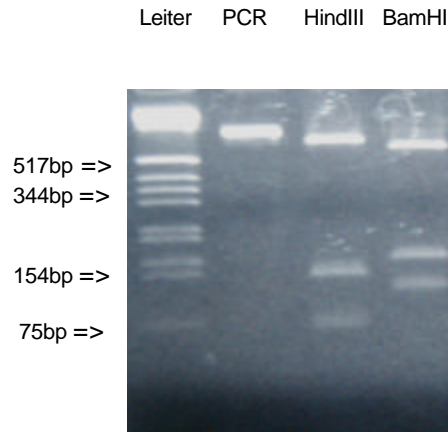


Abb. 11: PCR aus genomischer DNA aus OmiLe 2.1 mit Ecdysone-Primern

Die Restriktionsanalysen des in Abb. 11 gezeigten 836 bp großen Ecdysone-PCR Produktes mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und BamHI ergaben die bei einer vorhandenen Antisenseorientierung erwarteten Fragmentlängen (für HindIII: 65-644-127bp; für BamHI: 578-147-110bp).

3.3 Nachweis der Expression von Antisense-RNA

3.3.1 RNA-Antisense Nachweis

Nach Induktion der Zelllinien („Ovarialkarzinom-Marburg-inducible-Line-ecdysone“, kurz: OMiLe 1.2 und 2.1) mit den Inducerstoffen MuristeroneA und PonasteroneA wurde wie oben beschrieben RNA gewonnen um den Nachweis einer Induzierbarkeit der Zellen zu führen. Hierbei zeigte sich nach der c-DNA-Synthese regelmäßig der Nachweis des amplifizierten Antisensefragmentes sowohl im induzierten wie auch im nichtinduzierten Zustand der Zellen. Eine DNA-Verunreinigung wurde sowohl durch Ultrazentrifugation wie auch durch einen DNase-Verdau weitgehendst ausgeschlossen, so dass die Frage einer erhöhten basalen Transkriptionsrate des Systems oder eine Induktion des Ecdysone-Systems in der Zelllinie durch eigene steroidale Induktionsmechanismen hier diskutiert werden muss. Dieses war eine

Beobachtung, welche im Gegensatz zu der von No et al. Systembeschreibung stand.

Die folgende Abbildung zeigt die PCR Analyse aus c-DNA im nichtinduzierten und induzierten Zustand der Klone OMiLe 1.2 und 2.1 im Vergleich zur Negativkontrolle (H₂O-Probe):

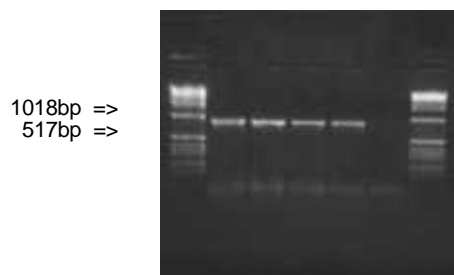


Abb. 12: c-DNA aus OMiLe 1.2 und 2.1 mit Ecdysone-Primern
(1:DNA-Leiter - 2:OMiLe 1.2 nichtinduziert - 3:OMiLe 1.2 induziert –
4:OMiLe 2.1 nichtinduziert - 5:OMiLe 2.1 induziert - 6:H₂O-Kontrolle - 7:DNA-Leiter)

3.3.2 Sequenzierung der cDNA

Dieser Antisensenachweis des LHRH-Rezeptorgenfragments wurde durch eine extern durchgeführte PCR-Produktsequenzierung bestätigt. Diese erbrachte eine 98,4%ige Genauigkeit. Das Ergebnis der Sequenzierung ist auf folgenden Abbildungen dargestellt und bestätigt die Antisense-Orientierung des LHRH-Rezeptorgeninserts, welches mit Hilfe der Ecdysoneprimer amplifiziert wurde.

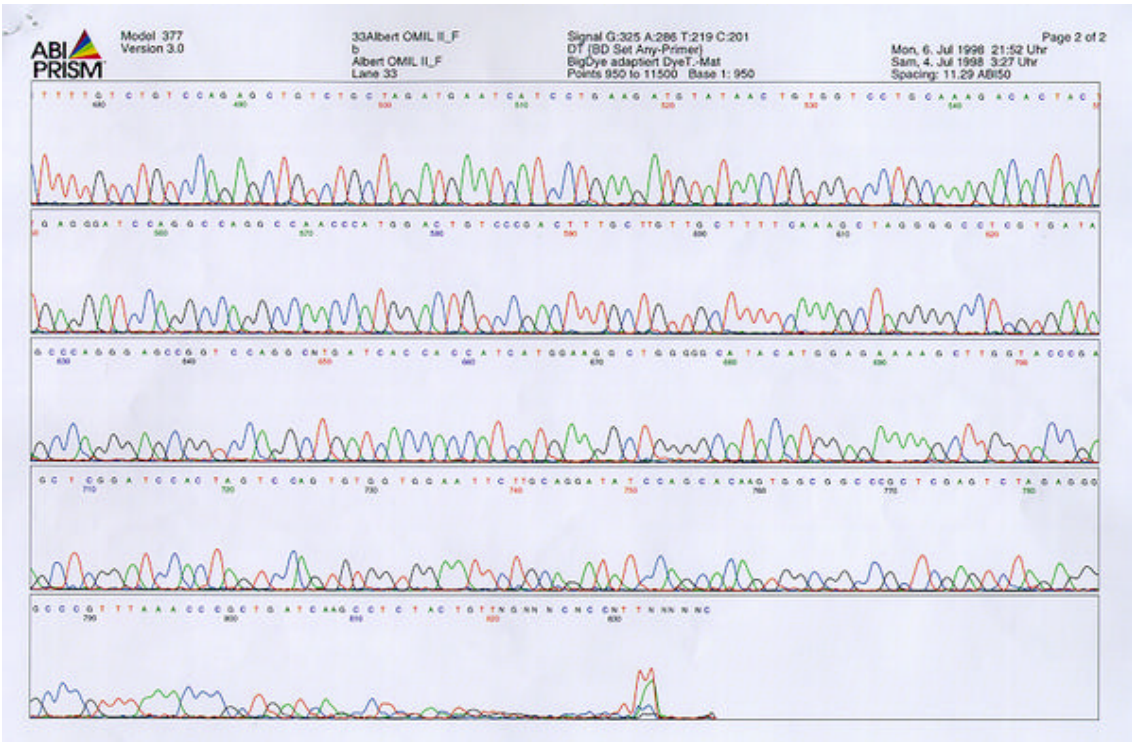
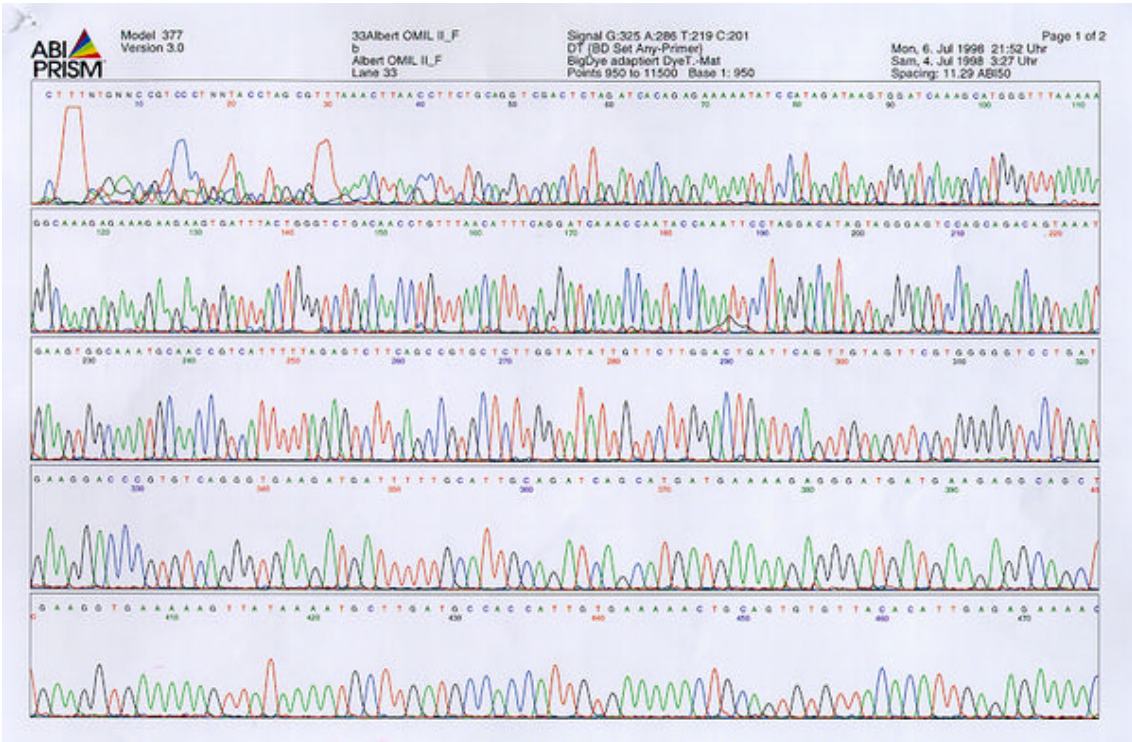


Abb. 13 und 14: Forward-Sequenzanalyse des 836bp großen c-DNA Produktes aus der Zelllinie OMiLe 2.1 mit Nachweis der LHRH-R- Antisenseexpression

3.4 Nachweis der LHRH-Bindungsstellen durch einen Radiorezeptorassay

Der Nachweis von LHRH-Rezeptoren an der Oberfläche von Zellen gelingt über eine etablierte Methode mittels eines Radioligandenassays (s. oben). Der Nachweis von hoch- und niedrigaffinen Bindungsstellen gestattet somit eine Aussage über die Rezeptordichte. Andere Arbeitsgruppen berichten von guten Ergebnissen mit einem Immunfluoreszenzantikörper für den humanen LHRH-Rezeptor (Karande et al., Wohlfart et al.), welcher die Oberflächenexpression des membranständigen Rezeptors nachweisen kann. Versuche mit diesem Antikörper in unserer Arbeitsgruppe erbrachten in dieser und in anderen Arbeiten nicht den gewünschten Erfolg.

In den durchgeführten Versuchen mit der neu etablierten Ovarialkarzinomzelllinie OMiLe 2.1 fand sich im Vergleich zu der Ausgangszelllinie EFO21 eine verminderte LHRH-Rezeptorexpression, sowohl im nichtinduzierten Zustand, wie auch nach Induktion des Systems.

Zelllinie	LHRH-Bindungsstellen	
	Kd [*10 ⁻⁹ mol/L]	B _{max} [fmol/10 ⁶ Zellen]
EFO-21 (EtOH)	8,2	25
EFO-21 (PS)	5,3	18
OMiLe 2.1 (EtOH)	6,0	12
OmiLe 2.1 (PS)	3,5	15

Tab. 3: Dissoziationskonstanten und die maximale Bindung für die vorhandenen hochaffinen Bindungsstellen

Die Ergebnisse sprechen wiederum für eine basale Induktionsrate des Ecdysone-Systems, welche eine genaue Aussage über die Auswirkung der Rezeptordownregulation kompliziert. Wie bereits in 3.3.1 gezeigt scheint ein Mechanismus der dauerhaften Induktion des Systems vorzuliegen, welcher zu diskutieren ist. Die gewünschte „Ein- und Ausschaltung“ des Rezeptors ist somit nicht zu erreichen.

3.5 Proliferationsversuche mit der neuen Zelllinie

3.5.1 MTT-Assay

Um den Effekt der LHRH-R-Antisenseexpression in der neuen Zelllinie zu untersuchen, wurden Proliferationsversuche durchgeführt, wobei die neue Zelllinie in ihrem Wachstumsverhalten unter Zugabe von LHRH-Analogen Triptorelin ([D-Trp⁶] LHRH (Decapeptyl®) 10^{-5} mol/L) mit der Zelllinie EFO21, aus der sie hervorgegangen war, verglichen wurde. Die Möglichkeit der Ermittlung der Proliferationsrate besteht in der Durchführung von Zählversuchen, wobei die Zellzahl an fortlaufenden Tagen mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ermittelt wird. Diese lässt sich jedoch auch durch die Ermittlung einer Farbextinktion mit Hilfe eines MTT-Assays rückschließen. Mit dieser Methode lassen sich in großem Maßstab Proliferationsanalysen durchführen, und sie wird von vielen Arbeitsgruppen in der Tumorforschung verwendet (Cole 1986, da Costa 1999).

Bei den Proliferationsversuchen konnte für EFO21 eine Proliferationshemmung durch Triptorelin (10^{-5} mol/L) von ca. 30% im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle mit einem Maximum nach etwa 4 Tagen nachgewiesen werden.

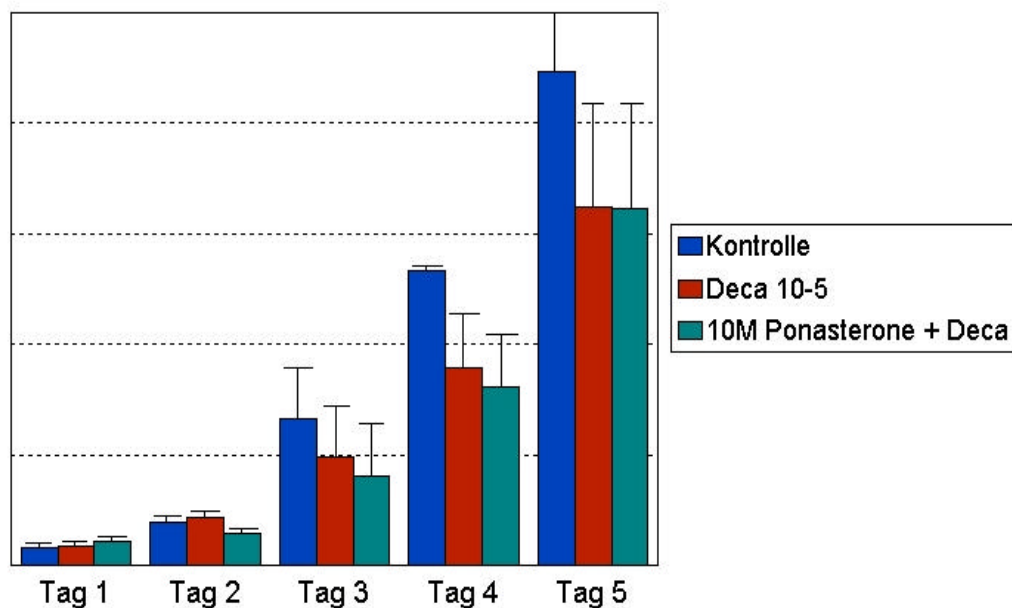


Abb. 15: EFO21 im MTT-Assay,
Nachweis der Hemmung durch Triptorelin (Decapeptyl® 10^{-5} mol/L)

Die hohen Standardabweichungen sind durch die kleinen Extinktionswerte bedingt. Es wurden jeweils 8-fach Messungen durchgeführt und alle Werte einbezogen. Die Ergebnisse der Hemmung von EFO21 durch das LHRH-Analogon Triptorelin sind ähnlich der Resultate durch Zählversuche innerhalb der Arbeitsgruppe.

Nach Aussaat der Zelllinie OMiLe 2.1 erfolgte zunächst eine Aussaatkontrolle, um eine Darstellung der Zellzahl vor der Induktion zu erhalten, welche möglichst in allen Gruppen gleich sein sollte. Nach erfolgter Induktion mit PonasteroneA 10µM zeigte sich in den Extinktionen eine Abnahme der Hemmung durch Triptorelin sowohl bei den induzierten Zellen, wie auch bei den nichtinduzierten Zellen. Bei vollständiger Funktionalität des Rezeptors im nichtinduzierten Zustand wären hier ohne Zugabe des Inducers ähnliche Ergebnisse wie bei der Zelllinie EFO21 (s. oben) zu erwarten gewesen. Eine Verringerung der Proliferationshemmung wäre in diesem Falle nur in der auf der folgenden Abbildung gezeigten letzten Spalte zu erwarten gewesen.

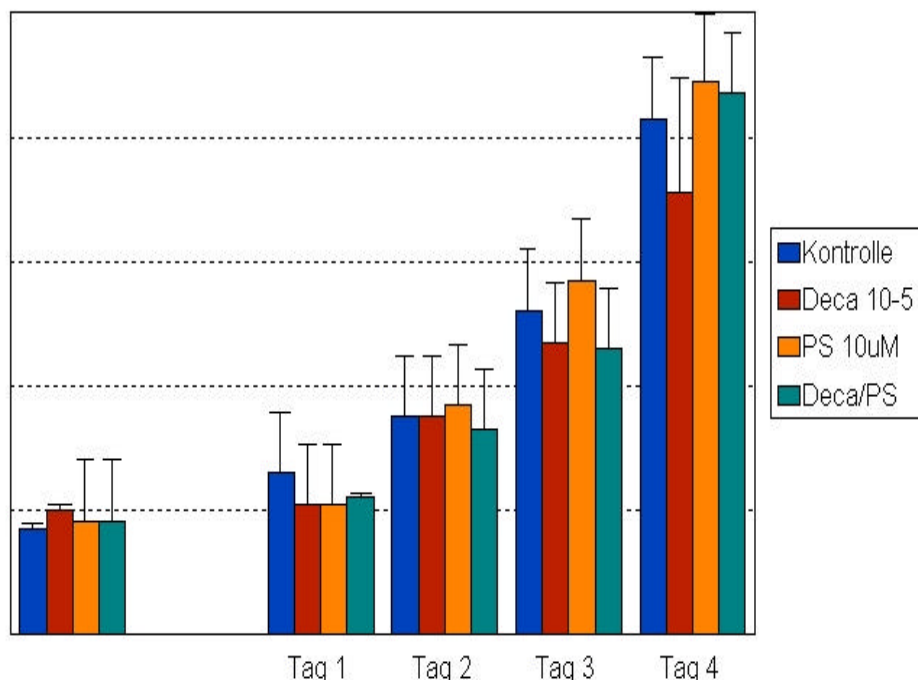


Abb. 16: OMiLe 2.1 im MTT-Assay,
Nachweis der geringeren Hemmung durch Triptorelin (10^{-5} mol/L)

Die Ergebnisse der Proliferationsversuche mittels MTT-Assay zeigen also einen Unterschied in der maximalen Wachstumshemmung der Antisensezelllinie, eine vollkommene Unterdrückung des antiproliferativen Effektes durch LHRH-Analoga, wie sie gewünscht war, ließ sich jedoch nicht nachweisen. Eine Ausschaltung des Rezeptors wurde somit nicht erreicht.

3.5.2 Trypan-blau-Färbung

Nach einer Wachstumszeit von 5 Tagen unter dem Zusatz von Triptorelin (Decapeptyl), PonasteroneA und Triptorelin + PonasteroneA wurden die Zellen abtrypsiniert und mit Trypan-blau angefärbt. Die Quantifizierung erfolgte nun in einer Neubauerzählkammer, wobei die funktionsgestörten, stark blau gefärbten Zellen von den funktionstüchtigen, nur schwach blau gefärbten Zellen unterschieden wurden. Die Zahl der funktionsgestörten Zellen wurde in Relation zu der Zellgesamtzahl gesetzt und dieses graphisch dargestellt.

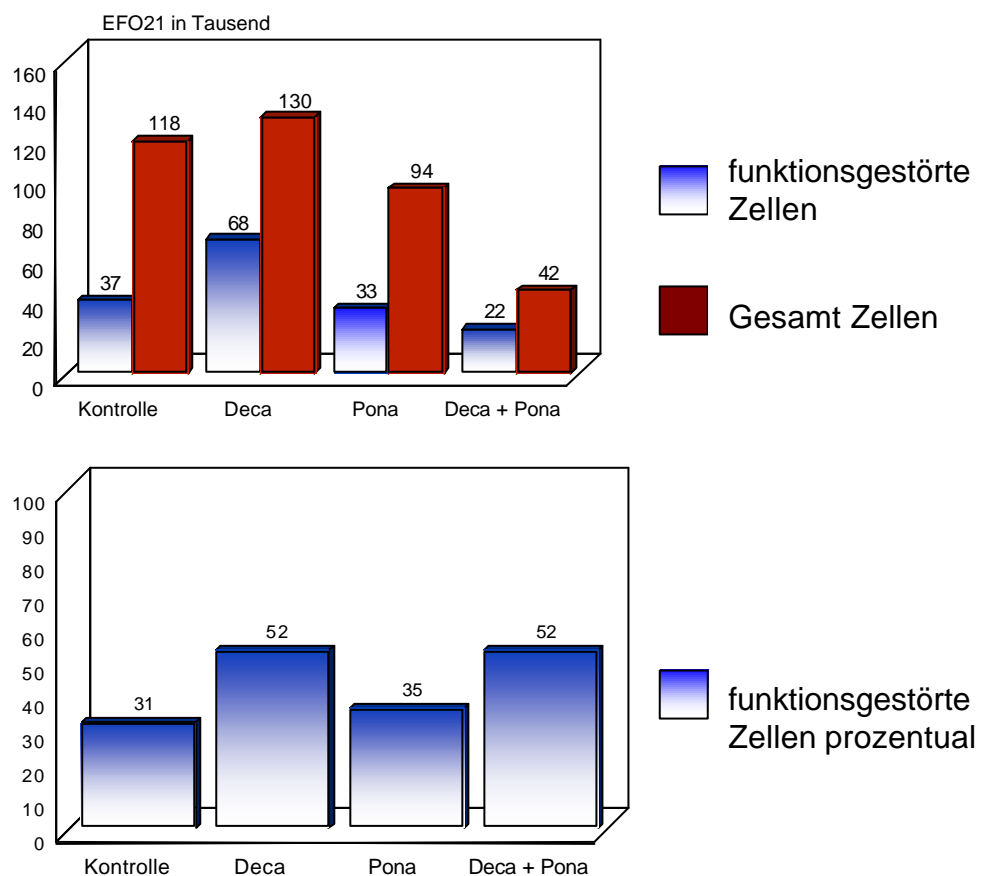


Abb. 17: EFO21 nach Trypan-blau-Färbung

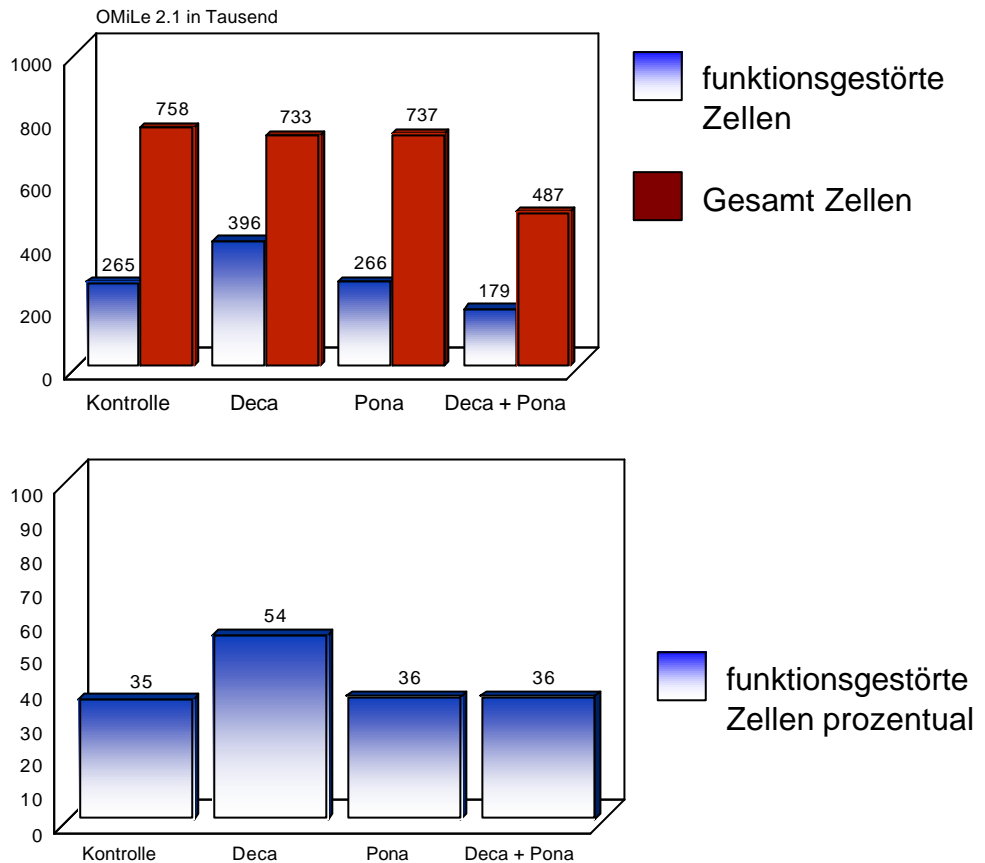


Abb. 18: OMiLe 2.1 nach Trypan-blau-Färbung

Die dargestellten Abbildungen zeigen einen Unterschied der Triptorelinwirkung auf die beiden Zelllinien. Während es bei EFO21 durch die proliferationshemmende Wirkung des LHRH-Analogons zu einem prozentualen Anstieg von funktionsgestörten Zellen kommt, war dieser Effekt bei der antisenseexprimierenden Zelllinie OMiLe 2.1 nicht zu beobachten. Somit zeigt sich auch in diesem Proliferationsversuch, ein unterschiedliches Wachstumsverhalten der neu etablierten Zelle im Vergleich zur Ausgangszelle. Inwiefern hier die vermutete leichte Rezeptordownregulation ursächlich ist, ist im folgenden Teil zu diskutieren.

4. DISKUSSION

Klinische Beobachtungen, epidemiologische Studien und vor allem zahlreiche experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Hormone die Proliferation und Funktion von malignen Ovarialtumoren beeinflussen können, und zwar sowohl im Sinne einer Wachstumsstimulation wie auch durch eine Proliferationshemmung.

Da auch bis heute therapeutische Maßnahmen beim Ovarialkarzinom oft nur kurze Remissionszeiten bewirken und die Mortalität weiterhin sehr hoch bleibt, wird der Manipulation hormonsensitiver Karzinome durch eine endokrine Therapie große Aufmerksamkeit geschenkt.

Durch den Nachweis der Expression von LHRH und seines Rezeptors in Ovarialkarzinomen ist die Existenz eines auf LHRH und seines korrespondierendem Rezeptor basierenden autokrinen bzw. parakrinen Systems wahrscheinlich geworden. Eindeutig ist die Tatsache, dass die Proliferation vieler Ovarialkarzinomzelllinien durch LHRH-Agonisten und Antagonisten negativ beeinflusst werden kann. Dieses autokrine System ist zumindest *in vitro* und im Nacktmausmodell ein Ziel für LHRH-Agonisten und Antagonisten (zur Übersicht [Emons et al. 1996a, 1996b](#), [Gründker et al. 2002a](#)), über welche die Proliferation dieser Tumoren effektiv gehemmt wird und deren genauer Wirkmechanismus aufgrund der vielfältigen Beobachtungen von verschiedenen Arbeitsgruppen Gegenstand experimenteller Forschung ist.

Es stellt sich die Frage, ob LHRH-Analoga in den Tumoren, ähnlich wie sie es in der Hypophyse tun, eine Down-Regulation der LHRH-Rezeptoren induzieren. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Frequenz und die Amplitude der pulsatilen LHRH-Sekretion in gonadotropen Zellen in direktem Zusammenhang mit der Freisetzung von LH und FSH stehen. Kontinuierliche Behandlungen mit hohen Dosen LHRH oder LHRH-Analoga führen zu einem Zustand, welchen man als medikamentöse Kastration bezeichnet. Der zugrunde liegende Mechanismus dieses Effektes ist eine Desensitivierung der gonadotropen Zellen, welche die Quantität der LHRH-

Rezeptoren drastisch verringert. Diesen Vorgang definiert man als Rezeptordownregulation (zur Übersicht [Schally et al. 1993](#), [Emons und Schally 1994](#)).

Dieses physiologische Prinzip allein scheint jedoch auf die LHRH-R-exprimierenden Ovarialtumoren nicht zuzutreffen. Der Nachweis von LHRH-Rezeptoren in diversen Geweben (Hypophyse, Ovar, Plazenta, Prostata, Lymphozyten) und in Tumorzellen mit gezeigten unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden bringt die Vermutung nahe, dass hier, wie auch bei den Östrogenrezeptoren, von der Natur unterschiedliche Funktionen vorgesehen sind bzw. durch die maligne Transformation von Zellen verursacht werden.

So wurde von [Gründker et al. \(2002a\)](#) für den LHRH-Rezeptor in Ovarialkarzinomzelllinien der intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismus beschrieben, welcher sich von dem des hypophysären Mechanismus grundlegend unterscheidet. Während, wie einleitend beschrieben, auf hypophysärer Ebene die Bindung des LHRH an seinen Rezeptor über das G-Protein G-alpha(q) die Kaskade anwirft, verursacht die Stimulation des LHRH-Rezeptors in Tumoren eine Aktivierung eines G-alpha(i) Proteines, welches mit der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren interagiert ([Gründker et al, 2001](#); [Limonta et al, 2001](#)). Bei den rezeptorexprimierenden Ovarialkarzinomzellen führen sowohl LHRH-Agonisten als auch LHRH-Antagonisten zu einer Proliferationshemmung ([Völker et al. 2000](#)).

Die Rezeptordownregulation durch die Zugabe von LHRH-Analoga zu rezeptorpositiven Zelllinien konnte zwar, wie sie in Hypophysenzellen beschrieben ist, ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch stand diese nicht im Verhältnis zu der beobachteten antiproliferativen Wirkung, welche deutlich ausgeprägter war, als dass sie allein durch die verminderte Rezeptorexpression zu erklären wäre ([Völker et al. 2000](#)). Die Zugabe von nur nanomolaren Mengen von LHRH-Analoga führt bei rezeptorpositiven Zelllinien, welche hochaffine Bindungsstellen aufweisen, zu einer signifikanten Proliferationshemmung. Durch die Zugabe von LHRH-Antiserum konnte dem entgegen eine Proliferationssteigerung nachgewiesen werden, so dass hier

von einem bestehenden autokrinen Regulationsmechanismus ausgegangen werden muss (Emons et al. 2000).

Nach Bindung der LHRH-Analoga an hochaffine Bindungsstellen konnte unter anderem die Interaktion mit mitogenen Transkriptionsfaktoren, welche zu einer verminderten Synthese von Wachstumsfaktoren führt, gezeigt werden (Gründker et al. 2002a).

Die intrazellulären Mechanismen der antiproliferativen Wirkung der LHRH-Agonisten sowie -Antagonisten und die teils unterschiedlichen Reaktionen verschiedener Zelllinien bedürfen weiterhin intensiver Forschungsarbeit.

Bekannt sind Ovarialkarzinomzelllinien (z.B. die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3), welche den LHRH-Rezeptor nicht exprimieren und auch nicht durch LHRH-Agonisten oder -Antagonisten gehemmt werden können. Für einen direkten Vergleich ist jedoch eine Zelllinie, welche die gleichen genetischen Informationen aufweist, als Modell für eine induzierbare Rezeptorausschaltung sinnvoller. Daraus entstand die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, nach der Möglichkeit, eine Ovarialkarzinomzelllinie zu etablieren, bei welcher der LHRH-Rezeptor „an- und ausschaltbar“ ist.

Das von No et al. entwickelte Ecdysone-Säugetierexpressionssystem scheint für die Etablierung einer LHRH-R-Antisensezelllinie ideal, da es durch eine weitere genetische Modifizierung ein Expressionssystem darstellt, welches durch humane Zellsysteme nicht in seiner Funktion beeinflusst werden sollte. Die Arbeitsgruppe um No beschrieb eine fast nicht detektierbare basale Expressionsrate und eine mögliche Steigerung der Expression des gewünschten Gens um das ca. 200-fache.

Die meisten Untersuchungen mit der Antisensemethodik werden noch immer mit Oligonukleotiden durchgeführt, so dass hier immer nur die passagere Wirkung beobachtet werden kann. Unklar bei der theoretisch eindeutigen Wirkung von Antisense-RNA ist weiterhin, in welchem Ausmaß nicht spezifisch antisensevermittelte Wirkungen durch diese Methodik zu berücksichtigen sind (Branch AD, 1998).

Ein bekanntes Beispiel für die erfolgreiche Anwendung der Antisensetechnologie ist die sogenannte Flavr-Savr®-Tomate, welche Antisense-RNA für ein Poly-Galacturonasegen exprimiert und so die Reifung der Tomate verzögert. Dieses gentechnisch veränderte Lebensmittel ist in den USA im Mai 1994 zugelassen worden (Schuch W, 1991). Bei diesem System handelt es sich somit um eine stabile Transfektion eines Antisensegens. Hierbei ist die Expression ständig aktiviert, es wird kein Inducer benötigt.

An humanen Ovarialkarzinomzellen wurde die induzierbare Antisensetechnik bereits erfolgreich zur Inhibition des Protoonkogen c-erbB-2 verwendet (Pegues JC et al., 1997). Hier zeigte sich bei der Induktion des Genexpressionssystems eine Veränderung der Wachstumseigenschaften der Tumorzellen.

Mit Antisense-Oligonukleotiden, also mit der externen Zugabe von synthetisch produzierten Antisensemolekülen, konnte Park an humanen Ovarialkarzinomzellen eine Proliferationshemmung durch den Rückgang der TGF-alpha-Expression mittels c-myc-Antisense zeigen (Park HY, 1997).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine neue Zelllinie, welche Antisense-RNA für den humanen LHRH-Rezeptor exprimiert, erfolgreich etabliert werden konnte. Die gewünschte Induzierbarkeit des Systems war nicht eindeutig zu erkennen. Es muss, zumindest in der neu etablierten Ovarialkarzinomzelllinie OMiLe 2.1, von einer erhöhten basalen Transkriptionsrate des Ecdysone-Systems ausgegangen werden.

Damit ist die Aussagefähigkeit über die Bedeutung des LHRH-Rezeptors für den intrazellulären Signaltransduktionsmechanismus, welche über die Bindung von LHRH-Agonisten oder -Antagonisten an LHRH-rezeptorexprimierenden Ovarialkarzinomzelllinien abläuft, eingeschränkt. Aufgrund der hochaffinen Bindungsstellen, über welche die Proliferationshemmung durch LHRH-Analoga vermittelt wird, müsste die gezielte Ausschaltung dieser Rezeptoren zu einer Inhibition der Wachstumshemmung durch die genannten LHRH-Analoga führen. Dieses wäre bei einer vollständigen Unterdrückung der Bindungsstellen am eindrucksvollsten zu beobachten. Fraglich ist jedoch, ob eine Downregulation des Rezeptors durch Antisensemoleküle konsekutiv zu einer

Erhöhung der Transkription des Rezeptorgens führt und somit den zu beobachtenden Effekt der erwarteten Verringerung der Hemmbarkeit der Zellen durch LHRH-Analoga aufhebt. Die direkte Analyse der LHRH-Rezeptorexpression mittels des etablierten Radiorezeptorassays zeigte in dieser Arbeit keine völlige Ausschaltung des Rezeptors. Auch konnte durch die Induktion des Genexpressionssystems kein Rezeptorexpressionsrückgang gezeigt werden. Eine qualitative und quantitative Analyse der Rezeptorexpression mittels immunhistochemischer Anfärbung über einen Antikörper wäre anzuschließen, um diese Ergebnisse zu überprüfen. Die derzeit vorliegenden immunhistochemischen Nachweisverfahren brachten mit den derzeit kommerziell erhältlichen LHRH-Rezeptorantikörpern jedoch bisher in unserer Arbeitsgruppe keine Erfolge.

Der gebrachte Nachweis der Antisenseexpression des LHRH-Rezeptorgenfragments in der neu etablierten Tumorzelllinie sowohl im nichtinduzierten als auch im induzierten Zustand führt bei der Interpretation der Ergebnisse zu Schwierigkeiten.

Eine Northern-blot Analyse, zur quantitativen Bestimmung der basal transkribierten Menge von Antisense-RNA im Vergleich zur Antisense-RNA-Menge nach Induktion, müsste zur Klärung der Sensitivität des Systems durchgeführt werden.

Die zu erwartende Beobachtung der fehlenden Hemmung durch LHRH-Analoga nach Induktion des Systems ist somit nicht eindeutig, da bereits im nichtinduzierten Zustand eine fehlende Hemmung zu beobachten sein kann, weil die Zelle LHRH-R-Antisense synthetisiert. Dadurch sind die verringerten Proliferationshemmungen der Zelllinie OMiLe 2.1 nur eingeschränkt zu beurteilen.

Die beschriebene selektive Induktion durch die verfügbaren Ecdysone-Analoga MuristeroneA, PonasteroneA und GS-E bezieht sich auf physiologische Säugetierzellen. Hier wurden keine Interferenzen im Stoffwechsel durch die Inducerstoffe beschrieben. Inwiefern bei Karzinomzellen jedoch eine Beeinflussung der zellulären Vorgänge stattfindet, ist nicht bekannt. Die spätere Verfügbarkeit eines nichtsteroidalen Inducers (GS-E) im Verlauf der

Untersuchungen, legt die Vermutung nahe, dass bei manchen Zelllinien eine Interaktion mit den steroidal Inducern stattfindet. Insbesondere bei speziell hormonsensitiven Tumorzellen ist daher zu diskutieren, ob das Ecdysonesystem der richtige Ansatz für die Etablierung eines Genexpressionssystems ist.

De Fazio et al. beschrieben 1997 die Wirkung von Antisense-Östrogenrezeptor-RNA in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF7, welche zu einer Steigerung der EGF-Rezeptorgen-Expression (epithelialer Wachstumsfaktor) führte. In dieser Arbeit wurde mit einem Genexpressionssystem gearbeitet, welches mit Zink als Inducerstoff benötigt (sog. Metal-inducible System). Somit wurde hier die mögliche steroidale Wirkung des Inducers auf die Zellen umgangen.

Kakar et al. beschrieben 1998 die Etablierung von humanen embryonalen Nierenzellen (EcRG293-Zellen), welche mit Hilfe des Ecdysonesystems zur Expression des humanen LHRH-Rezeptors fähig waren. Die primär rezeptornegativen Zellen konnten nach Subklonierung und Transfektion mit dem humanen LHRH-Rezeptorgen mittels MuristeroneA über eine Expression des LHRH-Rezeptors durch LHRH-Analoga um etwa 30% im Vergleich zu Kontrolle in ihrer Proliferation gehemmt werden. Bei der nichtinduzierten Zelllinie war dieses nicht zu beobachten gewesen. Eventuell liegt der Unterschied der Ergebnisse mit der humanen embryonalen Nierenzelle, für welche das Ecdysonesystem scheinbar geeignet ist, darin, dass die Ecdysteroidrezeptoren des Ecdysonesystems nicht durch zellulär gebildete Steroide zu besetzen sind.

In der in der vorliegenden Arbeit etablierten Zelllinie wäre jedoch aufgrund der hohen basalen Induktionsrate die Interferenz von gebildeten Steroiden der Tumorzelle EFO21 mit dem Ecdysteroidrezeptoren, welche auf dem Plasmid pVgRXR (s. Einleitung) codiert werden, zu hypothetisieren. Durchgeführte RNA-Versuche mit sogenanntem gestrippten Medium, welches frei von Steroiden ist, brachten ebenfalls keinen Unterschied.

Veränderungen im Wachstumsverhalten unter der Zugabe von LHRH-Analoga zu der neuen Zelllinie konnten gezeigt werden. Diese zeigen eine verringerte Proliferationshemmung der Zellen durch LHRH-Analoga im Vergleich zur Ausgangszelllinie EFO21. Die gewünschte gänzliche Aufhebung der Wachstumshemmung durch LHRH-Analoga, wie sie im Falle einer vollständigen Rezeptorausschaltung zu erwarten wäre, konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Die Beobachtungen der vermehrten Zahl von funktionsgestörten Zellen nach Triptorelinbehandlung in der Trypan-blau-Färbung zeigen eine Änderung des Proliferationsverhaltens der neu etablierten Zelllinie im Vergleich zur Ausgangszelllinie. Der genaue Mechanismus der Wachstumshemmung von LHRH-R positiven Zellen durch die Zugabe von LHRH-Analoga ist nicht endgültig geklärt. Die nachgewiesenen (s.oben) modifizierten Signaltransduktionskaskaden sind ein weiterer Schritt zur Erklärung der antiproliferativen Wirkung. Die Hypothese, dass Apoptosevorgänge in den behandelten Zellen die Proliferationshemmung verursachen, konnte in unserer Arbeitsgruppe widerlegt werden (Gründker et al. 2002b). Diese Beobachtung nämlich wurde von Imai 1998 und von Motomura 1998 beschrieben.

Die Trypan-blau-Methode lässt jedoch weiterführende Aussagen zu Apoptosevorgängen nicht zu. Es muss bei der Beobachtung, dass in der neu etablierten Zelle OmiLe2.1 Veränderungen im Proliferationsverhalten zu beobachten sind, bleiben. Inwiefern die Veränderungen des Wachstums mit der Rezeptorveränderung durch LHRH-R-Antisensesynthese oder mit der Zugabe des Ecdysteroids zusammenhängen bleibt unklar.

Zur Forschung an ausgeprägt hormonabhängigen Tumorzellen ist das Ecdysonesystem nach den vorliegenden Ergebnissen aufgrund möglicher Interferenzen mit dem System nicht geeignet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ovarialkarzinom hat aufgrund fehlender Früherkennung immer noch eine sehr schlechte Prognose, so dass in der Therapie weitere Fortschritte benötigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass in vitro eine Wachstumshemmung von humanen Ovarialkarzinomzelllinien durch die Zugabe von LHRH-Analoga erreicht werden kann. Der bekannte physiologische Mechanismus der sogenannten chemischen Kastration, welcher zu einem Abfall der Gonadotropine und somit auch des Östrogen und Progesteron führt, liegt hier jedoch nicht vor. Vielmehr scheinen direkte antiproliferative Effekte über die Aktivierung von zellulären Signaltransduktionskaskaden verantwortlich zu sein.

Um diese intrazellulären Mechanismen genauer zu untersuchen, sollte in der vorliegenden Arbeit ein Zellsystem etabliert werden, welche eine Ein- und Ausschaltung des LHRH-Rezeptors ermöglicht, um dann die Unterschiede der intrazellulären Vorgänge nach Zugabe von LHRH-Analoga weiter zu untersuchen.

Zur Rezeptorausschaltung sollte die Synthese von induzierbarer Antisense-RNA für den LHRH-Rezeptor mittels des Ecdysoneexpressionssystems erreicht werden. In das Ecdysone-Genexpressionssystem wurde zunächst ein 626 Basenpaar großes LHRH-Rezeptorgenfragment aus dem Open-Reading-Frame des humanen LHRH-Rezeptorgens in Antisenseorientierung eingebaut. Anschliessend konnte nach Transfektion ein stabiler Einbau des Systems in die humane Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 mit reproduzierbarem Nachweis des Antisensefragmentes in der genomischen DNA nachgewiesen werden. Eine Expression von Antisense-RNA konnte kontinuierlich nachgewiesen werden, die Antisenseorientierung wurde sowohl durch Restriktionsanalyse als auch durch eine Sequenzanalyse aus der cDNA bestätigt. Somit wurde eine neue Ovarialkarzinomzelllinie etabliert, welche, stabil transfiziert, LHRH-R-Antisense produziert. Es fand sich jedoch auch in der nichtinduzierten Zelllinie zumindest ein erhöhte basale Transkriptionsrate des Antisense-Fragmentes, so dass die Frage der Induktion des Systems durch zelleigene Substanzen oder

Substanzen der Nährlösung bei Nachweis von Antisense-RNA im nichtinduzierten Zustand offen bleibt. Die Verwendung von steroid- und phenolrotfreiem Medium in den Versuchen brachte hier keine Änderung. Unklar bleibt, warum der Inducerstoff MuristeroneA etwa 1 Jahr nicht zu beziehen war und hierfür der Ersatzstoff PonasteroneA verfügbar war. Im weiteren Verlauf kam der nichtsteroidale Inducer GS-E hinzu, so dass hier eine nicht ausreichend selektive Expressionsinduktion des Systems zu diskutieren ist. Veränderungen in der Wirkung des LHRH-Analogen Triptorelin auf die Proliferationshemmung der neu etablierten Ovarialkarzinomzelle OMiLe 2.1 in vitro wurden im Sinne einer reduzierten Hemmung im Vergleich zur Ausgangszelllinie nachgewiesen. Auch die Zahl der funktionsgestörten Zellen nach Triptorelinbehandlung war im Vergleich zur Ausgangszelllinie verändert.

Ein Effekt der Antisense-Synthese auf das Proliferationsverhalten unter LHRH-Zugabe konnte somit gezeigt werden, jedoch nicht in dem erwarteten Ausmaß. Die Komplexität der intrazellulären Signaltransduktionskaskade setzt ein stabiles System für die Erforschung voraus. Die nachgewiesene basale Transkriptionsrate scheint zur weiteren Analyse dieses komplexen intrazellulären Tumorsystems nicht ausreichend gering zu sein. Eine Bindung von zelleigenen Steroiden an den Ecdysonerezeptor mit Induktion des Systems in der vorliegenden Zelllinie wäre zu hypothetisieren.

Die beobachteten Veränderungen der Proliferationseigenschaften der Zelllinie OMiLe 2.1 sind somit nur eingeschränkt interpretierbar und bedürften weiterführenden Untersuchungen. Die Anwendung des Ecdysonesystems bei Untersuchungen an hormonabhängigen Zelllinien (z.B. Mamma-, Endometrium-, Ovarial und Prostatazelllinien) ist aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht zu empfehlen, und es sollte zur Etablierung eines Genexpressionssystems auf andere Methoden, wie z.B. ein MetaInducible-System als nicht steroidabhängiges System, zurückgegriffen werden.

6. LITERATUR

Aunoble B, Sanches R, Didier E, Bignon YJ (2000):

Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian carcinoma (review)

Int J Oncol 16(3): 567-576

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1991):

Current protocols in molecular biology.

Wiley Interscience, Boston

Beckers T, Marheinicke K, Reiländer H, Hilgard P (1995):

Selection and characterization of mammalian cell lines with stable over-expression of human pituitary receptors for gonadoliberein.

Eur J Biochem 231: 535-543

Berdy (1974):

Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure.

Adv Appl Microbiol. 1974;18(0):309-406. Review.

Branch AD (1996):

A hitchhikers guide to antisense and nonantisense biochemical pathways.

Hepatology 1996; 24: 1517-1529.

Branch AD (1998):

A good antisense molecule is hard to find.

Trends Biochem Sci 1998 Feb;23(2): 45-50

Brun JL, Feyler A, Chene G, Saurel J, Brun G, Hocke C (2000):

Long-term results and prognostic factors in patients with epithelial ovarian cancer

Gynecol Oncol 78 (1): 21-27

Burghardt E, Lahousen M, Stettner H (1990):
Die operative Behandlung des Ovarialkarzinoms.
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 50: 670-677

Cole et al (1986) :
Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay.
Cancer Chemother Pharmacol. 1986;17(3):259-63.

Colon-Otero G, Malkasian GP, Edmonson JH (1993):
Secondary myelodysplasia and acute leukemia following carboplatin-containing
combination chemotherapy for ovarian cancer.
J Natl Cancer Inst 85: 1858-1860

da Costa (1999):
Comparative analysis of three methods to assess viability of mammalian cells in
culture.
Biocell. 1999 Apr;23(1):65-72.

Emons G, Pahwa GS, Brack C, Sturm R, Oberheuser F, Knuppen R (1989):
Gonadotropin releasing hormone binding sites in human epithelial
ovariancarcinomata.
Eur J Cancer Clin Oncol 25: 215-221

Emons G, Ortmann O, Pahwa GS, Oberheuser F, Schulz KD.
LH-RH agonists in the treatment of ovarian cancer.
Recent Results Cancer Res. 1992;124:55-68.

Emons G, Ortmann O, Schulz KD (1993):
Rolle der endokrinen Therapie beim Ovarialkarzinom.
Gynäkologe 26: 123-130

Emons G, Schally AV (1994):

The use of luteinizing releasing hormone agonists and antagonists in gynecological cancers.

Hum Reprod 9: 1364-1379

Emons G, Ortmann O, Irmer G, Müller V, Schulz KD, Schally AV (1996a):

Treatment of ovarian cancer with LH-RH antagonists.

In: Filicori M, Flamigni C (eds.): Treatment with GnRH analogs: controversies and perspectives. Carnforth, UK: Parthenon, pp 165-72

Emons G, Ortmann O, Schulz KD (1996b):

GnRH analogues in ovarian, breast and endometrial cancers.

In: Lunenfeld B, Insler V (eds.): GnRH Analogues, The State of the Art 1996. Parthenon, Carnforth pp 95-120

Emons G, Schulz KD (2000):

Primary and salvage therapy with LHRH analogues in ovarian cancer.

Recent Results Cancer Res 2000;153:83-94

Emons G, Weiss S, Ortmann O, Grundker C, Schulz KD (2000):

LHRH might act as a negative autocrine regulator of proliferation of human ovarian cancer.

Eur J Endocrinol. 2000 Jun;142(6):665-70.

de Fazio A, Chiew YE, McEvoy M, Watts CK, Sutherland RL (1997) :

Antisense estrogen receptor RNA expression increases epidermal growth factor receptor gene expression in breast cancer cells.

Cell Growth Differ 1997 Aug;8(8):903-911

Felgner PL et al. (1989) :

Cationic liposome-mediated transfection.

Nature. 1989 Jan 26;337(6205):387-8.

Godwin AK, Testa JR, Hamilton TC (1993):

The biology of ovarian cancer development.

Cancer 71: 530-536

Gründker C, Volker P, Emons G. (2001):

Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha(I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase.

Endocrinology 2001 Jun;142(6):2369-80

Gründker C, Gunthert AR, Westphalen S, Emons G.(2002a):

Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers

European Journal of Endocrinology (2002) 146 1–14

Gründker C, Schulz K, Günthert AR, Emons G (2002b):

Luteinizing Hormone-Releasing Hormone induces nuclear factor κ B-Activation and inhibits apoptosis in Ovarian Cancer Cells

J Clin Endocrin Met , Vol.85, No.10 pp 3815-3820

Imai A, Takagi A, Horibe S, Takagi H, Tamaya T (1998):

Evidence for tight coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to stimulate Fas ligand expression in reproductive tumors: possible mechanism for hormonal control of apoptotic cell death.

J Clin Endocrinol Metab. 83:427–431.

Irmer G, Bürger C, Müller R, Ortmann O, Peter U, Kakar SS, Neill JD, Schulz KD, Emons G (1995):

Expression of the messenger RNAs for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and its receptors in human ovarian epithelial carcinoma.

Cancer Res 55: 817-822

Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD (1992):
Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor.
Biochem Biophys Res Commun 189: 289-295

Kakar SS, Grizzle WE, Neill JD (1994):
The nucleotide sequences of human GnRH receptors in breast and ovarian tumors are identical with that found in pituitary.
Mol Cell Endocrinol 106: 145-149

Kakar SS (1998):
Inhibition of Growth and Proliferation of EcGR293 Cell Line Expressing High-Affinity Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) Receptor Under the Control of an Inducible Promoter by GnRH Agonist (D-Lys⁶)GnRH and Antagonist (Antide).
Cancer Research 1998 Oct;58:4558-4560

Karande AA, Rajeshwari K, Padmanaban D, Ravichandra B, Joshi PG, Yadav P, Shobha P. (1998) :
Antiidiotypic antibody to gonadotropin releasing hormone as probe for cell surface receptors.
Biochem Mol Biol Int. 1998 Oct;46(3):449-59.

Lee NC, Wingo PA, Gwinn ML, Rubin GL, Kendrick JS, Webster LA, Ory HW (1987): For the Cancer and Steroid Hormone Study of the Centers for Disease Control and the National Institute of Child Health and Human Development. The reduction in risk of ovarian cancer associates with oral contraceptive use.
New Engl J Med 316: 650-655

Limonta P, Marelli MM, Moretti RM (2001):
LHRH analogues as anticancer agents: pituitary and extrapituitary sites of action.
Expert Opin Investig Drugs 2001 Apr;10(4):709-20

Menon U, Jacobs IJ (2000):

Recent developments in ovarian cancer screening.

Curr Opin Obstet Gynecol 12 (1): 39-42

Motomura (1998):

Induction of apoptosis in ovarian carcinoma cell line by gonadotropin-releasing hormone agonist.

Kurume Med J. 1998;45(1):27-32.

Mullis KB, Faloona FA (1987):

Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction.

Methods Enzymol 155: 335-350

Mühlhardt, C (1999):

Der Experimentator: Molekularbiologie / Cornel Mühlhardt. 1. Auflage -

Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm: G. Fischer, 1999

No D, Yao T-P, Evans RM (1996):

Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice.

Proc Natl Acad Sci USA, Vol.93: 3346-3351

Orlandi C, Marabini A, Mancini L, De Jaco PA, Costa A (1988):

Ovary cancer.

Adv Clin Oncol 3: 139-152

Ozols RF, Rubin SC, Dembo AJ, Robboy S (1992):

Epithelial ovarian cancer. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC (eds.).

Gynecologic Oncology. Philadelphia, Lippincott, pp. 731-781

Ozols RF, Rubin SC, Thomas G, Robboy S (1997):

Epithelial ovarian cancer. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC (eds.).

Gynecologic Oncology. Philadelphia, Lippincott, pp. 919-986

Ozols RF, Schwartz PE, Eifel PJ (2001):

Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma and peritoneal carcinoma. In: De Vita VT, Heliman S, Rosenberg SA (eds) Cancer- Principles and practice of oncology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkens, Philadelphia Baltimore New York, pp 1597-1632

Pahwa GS, Vollmer G, Knuppen R, Emons G (1989):

Photoaffinity labelling of gonadotropin releasing hormone binding sites in human epithelial ovarian carcinomata.

Biochem Biophys Res Commun 161: 1086-1092

Parazzini F, Franceschi S, La Vecchia C, Fascioli M (1991):

The epidemiology of ovarian cancer.

Gynecol Oncol 43: 9-23

Park HY (1997):

Inhibition of the proliferative effect of transforming growth factor-alpha by c-myc antisense DNA in human ovarian cancer cells

Biochem Mol Biol Int 1997 Dec; 43(5): 1015-1022

Pegues JC et al. (1997):

Inducible antisense inhibition of erbB-2 expression reduces anchorage independent growth of ovarian carcinoma cells

Cancer Lett. 1997 Jul 15; 117(1):73-79

Pfleiderer A (1989):

Malignome des Ovars.

In: Wulf KH, Schmidt-Matthiesen H (eds.): Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe. Spezielle gynäkologische Onkologie II. Urban & Schwarzenberg, pp. 37-129

Randrianjafisamindrakotroka et al.(1995):

Ovarian carcinomas. Retrospective study of 318 cases

J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris). 1995;24(7):711-6.

Rao BR, Slotman BJ (1991):

Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer.

Endocrine Rev 12: 14-26

Riede/Schäfer (1995):

Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage

Georg-Thieme Verlag Stuttgart

Schally AV, Arimura A, Baba J, Nair RM, Matsuo H, Reeding TW, Debeljuk L
(1971):

Isolation and properties of the FSH- and LH-releasing hormone.

Biochem Biophys Res Commun 43: 393-399

Schally AV, Comura-Schally AM, Hollander V (1993):

Hypothalamic and other peptide hormones.

In: Holland JF, Frei E, Bast RC, Kufe DW, Morton DL and Weichselbaum RR
(eds.)

Cancer Medicine, 3rd edition Lea & Febinger, Philadelphia PA, pp. 827-840

Schmidt-Matthiesen H, Bastert G (1995):

Gynäkologische Onkologie.

Schattauer-Verlag, Stuttgart

Schmidt-Rhode P (1991):

Kontrolluntersuchungen während und nach einer medikamentösen

Tumorthherapie - Erkennung und Behandlung von Nebenwirkungen.

In: Kaiser R, Schulz KD, Maass H (eds.): hormonale Behandlung von Genital-
und Mammatumoren bei der Frau, Thieme, Stuttgart New York, pp 137

Schuch W (1991):

Using antisense to study gene function

Symp Soc Exp Biol 1991; 45:117-27

Simon WE, Albrecht M, Hänsel M, Dietel M, Hölzel F (1983):

Cell lines derived from human ovarian carcinomas: growth stimulation by gonadotropic and steroid hormones.

J Natl Cancer Inst 70: 839-845

Stojilkovic SS, Reinhardt J, Catt KJ (1994)

Gonadotropin-releasing hormone receptors: Structure and signal transduction pathways.

Endocrine Rev 15: 462-499

UICC (1997):

TNM Classification of malignant Tumors.

Sobin LH, Wittekind Ch (eds). Wiley-Liss, New York

Walker GR, Schlesselman JJ, Ness RB (2002):

Family history of cancer, oral contraceptive use, and ovarian cancer risk.

Am J Obstet Gynecol 2002 Jan;186(1):8-14

Weintraub HM (1990):

Antisense RNA and DNA.

Sci Am. 1990 Jan;262(1):40-6. Review

Wohlfart S et al (2001):

Endogenous regulation of the GnRH receptor by GnRH in the human placenta

Mol Hum Reprod 2001 Jan;7(1): 89-95

7. ANHANG

Tabellarischer Lebenslauf :

Persönliche Daten

Name: Backhus
Vorname: Jan Hendrik
Geburtsdatum: 02.05.1972
Geburtsort: Ruit auf den Fildern (Baden-Württemberg)
Familienstatus: verheiratet mit Jennifer Backhus
Eltern: Wolfgang Backhus, Oberstudienrat
Antje Backhus, Med. Techn. Assistentin
Geschwister: eine Schwester

Schulische Ausbildung

1978-1982 Grundschole Hamdorf
1982-1988 Herdergymnasium Rendsburg
1988-1989 Mathomedi Highschool, Minnesota, USA
1989-1992 Herdergymnasium Rendsburg, Abitur 1992

Zivildienst

1992-1993 Integrative Kindertagesstätte Rendsburg

Freiwilliges Soziales Jahr

1993-1994 Stiftsklinik Augustinum, München

Hochschulausbildung

1994-2001 Studium der Humanmedizin an der
Philipps-Universität, Marburg
3.Staatsexamen: Juni 2001

Famulaturen

- Chirurgie: Städtische Kliniken Kiel
- Gynäkologie: UFK Marburg
- Dermatologie: Praxis Dr. Kammerau, Berlin
- Innere Medizin: Halton General Hospital, Liverpool, England

Praktisches Jahr

- Gynäkologie/Geburtshilfe, UFK Marburg
- Innere Medizin, ZIM Marburg
- Chirurgie, Hospital Universitario Oswaldo Cruz, Recife, Brasilien

Arzt im Praktikum

- August 2001- Januar 2003 in der Universitätsfrauenklinik Marburg

Assistenzarzt

- seit März 2003 Weiterbildung zum Facharzt für Gynäkologie und Geburtshilfe am Ev.Jung-Stilling Krankenhaus (Lehrkrankenhaus der Universität Bonn) in Siegen



Die vorliegende Dissertation entstand im Rahmen des Forschungsprojektes: Rekombinante Testsysteme zur Auffindung und Testung neuer Leitstrukturen sowie der Konzeptvalidierung für target-orientierte Krebstherapie, gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung FÖ-KZ-031697A.

Arbeitsgruppenleitung: Professor Dr. med. G. Emons

Mitglieder: Albert US, Gründker C, Hushmand-Nia H, Völker P

Ergebnisse wurden vorgestellt :

- I. Molekulare Mechanismen der Proliferationshemmung durch LHRH-Analoga in Ovarial-, Endometrium- und Mammakarzinomzelllinien
Molekulare Naturstoffforschung, Berichte aus Forschungsprojekten BEO, Jülich GmbH, 1998

- II. Molekulare Mechanismen der Proliferationshemmung durch LHRH-Analoga in Ovarialkarzinomzelllinien: Etablierung einer Zelllinie, welche mit Hilfe des Ecdysone-Systems LHRH-Rezeptorgen-antisense-mRNA exprimieren.
Albert US, Huschmand-Nia H, Backhus JH, Völker P, Gründker C, Emons G, Schulz KD
Arbeitskreis Molekularbiologie in der Frauenheilkunde, 1998 (Abstractband), (7):54

- III. Antisense GnRH-Rezeptorgenexpression in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie EFO21 mittels Ecdysone-System
Backhus J, Albert US, Huschmand-Nia H, Emons G, Schulz KD
174. Tagung der Mittelrheinischen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 2002 (Abstractband) P09



Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Austermann, Basler, Baum, Bertalanffy, Bien, Czybaiko, Daut, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Happle, Hoffmann, Joseph, Kern, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lange, Lennartz, Maisch, Moll, Moosdorf, Neubauer, Örtel, Remschmidt, Rothmund, Schmidt, Schüffel, Schulz, Seibert, Slenczka, Thomas, v. Wichert, Weihe, Werner



Danksagung:

Mein großer Dank für die Hilfe und die ständige Ansprechbarkeit gilt Frau Dr. med. Ute Susann Albert, welche mir letzten Endes das Rückgrat für die Dissertation gegeben hat. Herrn Dr. med. Hamid Huschmand-Nia danke ich für die Einweisung in molekularbiologische Arbeitsweisen und für die Idee des Themas. Herrn Professor Dr. med. Günter Emons danke ich für die Möglichkeit zur Mitwirkung in seiner Arbeitsgruppe. Dem Zellkulturlabor und ganz besonders Frau Martina Bauer danke ich für die nette Zeit im Labor und für die ständige Unterstützung und Hilfe. Auch ohne diese wäre die Arbeit nicht entstanden. Herrn em. Professor Dr. med. Klaus-Dieter Schulz und Herrn Professor Dr. med. Uwe Wagner danke ich für die Ermöglichung der Promotion und für die klinische und wissenschaftliche Ausbildung an der Klinik für Gynäkologie, Gynäkologische Endokrinologie und Onkologie der Philipps Universität Marburg. Danke an meine Eltern dafür, dass sie für mich da sind.



Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Antisense-Expression des Gens für den Rezeptor des humanen Lutein-Hormon-Releasing-Hormon (LHRH) in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie EFO 21 mittels des Ecdysone-Systems“ im Medizinischen Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn em. Professor Dr. med. K.-D. Schulz mit Unterstützung durch Herrn Professor Dr. med. G. Emons ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.