

## 3 ERGEBNISSE

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist es, ein *in-vitro*-Modell zur Bestimmung der Zyto- und Genotoxizität zu konstruieren. Zur Entwicklung des Genotoxizitätsmodells wurde der Vektor pNF- $\kappa$ B/Neo unter Verwendung des Reporter-moleküls d2EGFP hergestellt, dessen Expression in HEK-Zellen durch einen synthetischen Promotor, der vier NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen enthält, kontrolliert wird. Um das Zell/Vektor-System herzustellen, wurde der Vektor pNF- $\kappa$ B/Neo stabil in HEK-Zellen transfiziert. Außerdem wurden pEGFP-N1 und der neu konstruierte Vektor pCMV-d2EGFP, in denen die Reportergene EGFP und d2EGFP unter Kontrolle eines konstitutiv arbeitenden Promotors stehen, stabil in CHO- und HEK-Zellen transfiziert. Mit Hilfe der entstandenen Zelllinien wurden die Quantifizierung von EGFP bzw. d2EGFP durch Messung im Mikrotiterplatten-(MTP)-Fluorimeter und im Durchflußzytometer sowie die Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop erprobt. Unter Verwendung dieser stabil transfizierten CHO-Zellen, die EGFP konstitutiv exprimieren, wurde das *in-vitro*-Modell zur Bestimmung der Zytotoxizität entwickelt.

### 3.1 PLASMIDKONSTRUKTIONEN UND -PRÄPARATIONEN

#### 3.1.1 DNS-Präparationen

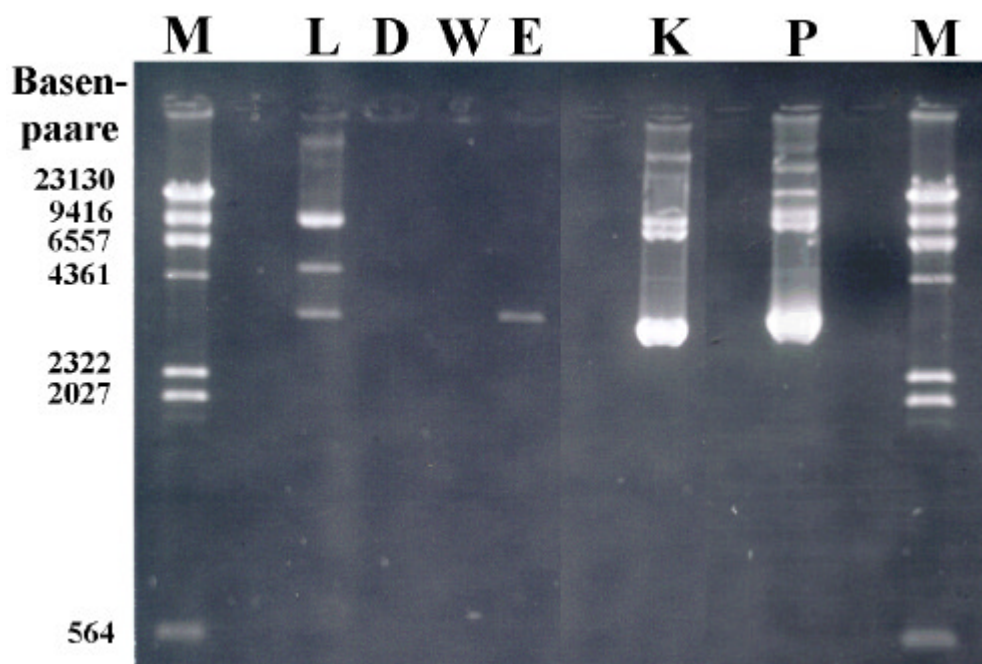
Für die Transfektionen der CHO- und HEK-Zellen wurden in den meisten Fällen Maxipräparationen der verwendeten Plasmide, und selten auch Minipräparationen eingesetzt. Die Minipräparationen dienen auch der Gewinnung von Ausgangsmaterial für die Klonierung neuer Plasmide (s. 3.1.2). Die Identität der präparierten DNS wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft, ihre Reinheit wurde durch photometrische Bestimmung des OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Verhältnisses abgeschätzt (Tabelle 3-1).

Im allgemeinen wurden nur DNS-Präparationen mit einer OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> > 1,5 für Transfektionen verwendet.

Das analytische Gel (Abb. 3-1) zeigt den Ablauf der Maxipräparation am Beispiel des Plasmids pEGFP-N1. Das geklärte Lysat (L) der Probe (P) enthält monomere Plasmid-DNS. Der Durchlauf D des Lysates sollte nur degradierte RNS enthalten, während die „*supercoiled*“ Plasmid-DNS an das Anionenaustauscherharz der Säule (Qiagen) bindet. Der Durchlauf und die gemischten Waschfraktionen aus beiden Waschschritten der Säule enthalten keine DNS. Das Eluat enthält monomere „*supercoiled*“ Plasmid-DNS. Die Spur der Probe zeigt wie die der Ausgangspräparation mehrere Banden, die am weitesten (zwischen 4361 und 2322 bp) gelaufene steht vermutlich für zirkuläres „*supercoiled*“ Plasmid, darüber befindet sich eine geringe Menge offener zirkulärer Form des Plasmids, und bei 9416 bp zwei weitere Banden, bei denen es sich um Plasmid-Multimere handeln kann.

**Tabelle 3-1 Optische Dichte bei 260 nm, DNS-Konzentration der Präparationen**

Plasmid	Probe	OD <sub>260</sub>	DNS-Konzentration (µg/µl)	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>
pCX-GFP	1	0,32	1,58	1,2
	2	0,26	1,29	1,1
	3	0,22	1,10	1,0
	4	0,27	1,35	1,0
pEGFP-N1	1	0,03	0,14	1,5
	2	0,20	1,00	1,9
pNF-κB-d2EGFP	1	0,12	0,62	1,8
	2	0,13	0,63	1,8
pCMV-d2EGFP	1	0,10	0,52	1,9
	2	0,11	0,57	1,9
	3	0,13	0,67	1,6
	4	0,11	0,54	1,8
pNF-κB/Neo	1	0,09	0,44	1,9
	2	0,09	0,47	1,9
	3	0,07	0,35	1,8
	4	0,10	0,51	1,6
pd2EGFP-1	1	0,05	0,23	1,4
	2	0,09	0,45	2,3
	3	0,07	0,34	1,9
	4	0,08	0,41	1,4



**Abb. 3-1 Maxipräparation von pEGFP-N1**

Agarose-Gelelektrophorese der pEGFP-N1-Präparation mit Proben aus verschiedenen Schritten der Präparation, 1 %iges Gel.

**M** Marker  $\lambda$ -DNS *Hind*III Digest

**L** Lysat, **D** Durchlauf, **W** Waschfraktion und **E** Eluat der Maxipräparation

**K** pEGFP-N1 Ausgangsprobe, **P** pEGFP-N1 Maxipräparation

### 3.1.2 Klonen der Plasmide

#### 3.1.2.1 Klonen des Plasmids pCMV-d2EGFP

pCMV-d2EGFP wurde aus dem d2EGFP-Gen des Vektors pd2EGFP-1 und dem EGFP-Gen-losen Grundgerüst des Vektors pEGFP-N1 zusammengesetzt (Tabelle 2-6). Dazu wurden die Ausgangsplasmide wie unter Material und Methoden beschrieben mit den Restriktionsenzymen (RE) *NotI* und *XhoI* vollständig verdaut. Aus einem präparativem Agarosegel wurden dann die entstandenen Fragmente einer Länge von 903 bp (d2EGFP-Gen) und 3944 bp (EGFP-loses Vektorgrundgerüst von pEGFP-N1) gewonnen und mittels Bacteriophage T4 Ligase religiert. Nach Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den Ligationsprodukten wuchsen bei einem Insert:Vektor-Verhältnis von 1:3 innerhalb von 16 h zwei Kanamycin-resistente Kolonien. Die Transformationseffizienz für das Kontrollplasmid pUC19 betrug bei dieser Transformation  $2,2 \times 10^7$  CFU/ $\mu$ g.

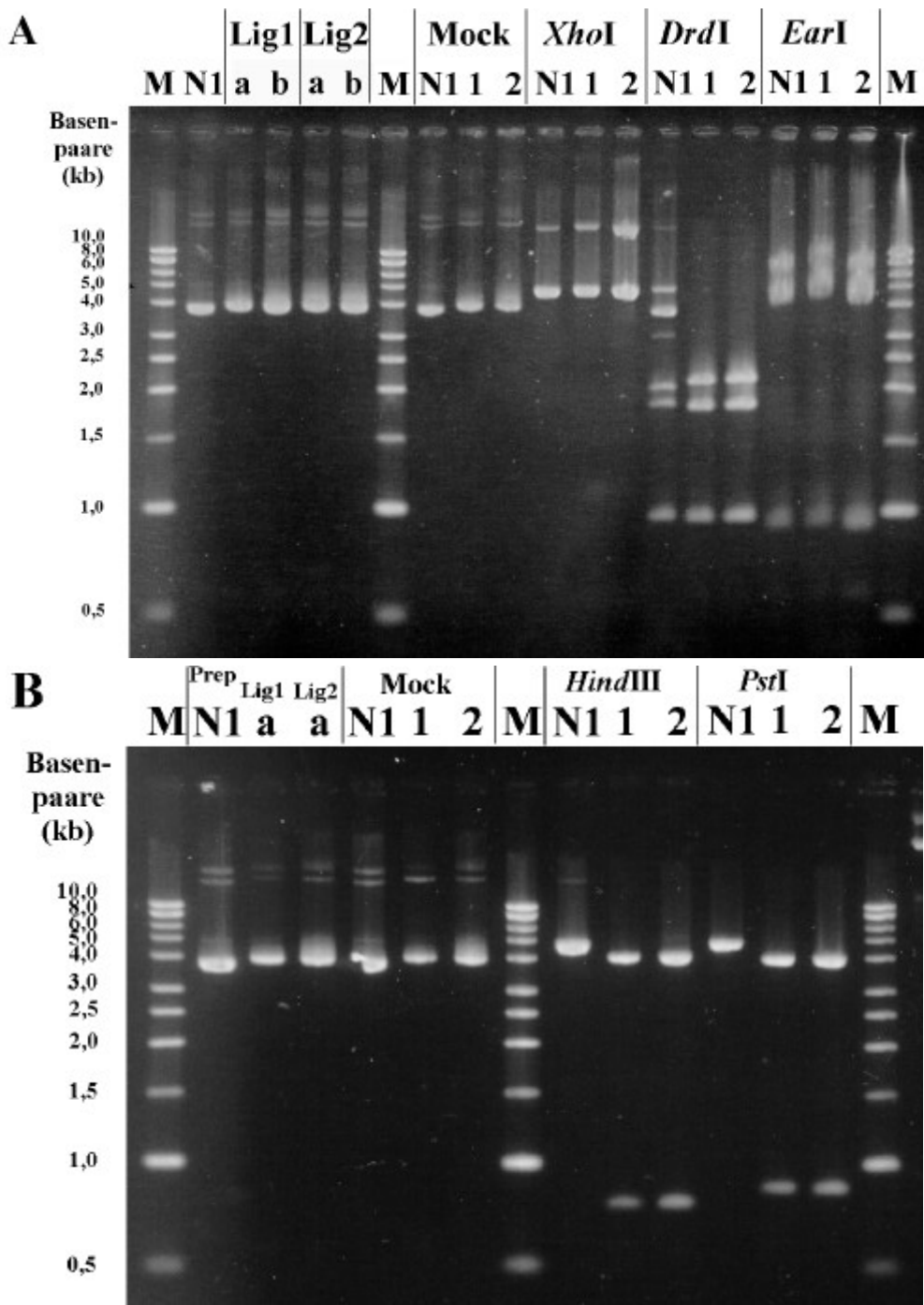
Zur Identifikation des rekombinanten Plasmids pCMV-d2EGFP (Abb. 3-3) wurden DNS-Präparationen aus diesen zwei Klonen mit den in Tabelle 3-2 genannten RE verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt.

**Tabelle 3-2 Restriktionsanalyse pCMV-d2EGFP - Fragmentlängen**

RE	pEGFP-N1	pCMV-d2EGFP
<i>XhoI</i>	4733 bp (linear)	4849 bp (linear)
<i>DrdI</i>	1988 bp	2104 bp
	1789 bp	1789 bp
	956 bp	956 bp
<i>EarI</i>	3646 bp	3762 bp
	877 bp	877 bp
	210 bp	210 bp
<i>HindIII</i>	4733 bp (linear)	4088 bp
		761 bp (Schnittstelle in MODC-Sequenz)
<i>PstI</i>	4733 bp (linear)	4006 bp
		843 bp (Schnittstelle in MODC-Sequenz)

Die Spuren der Minipräparationen und des Scheinverdaus (*Mock*) von pEGFP-N1 bzw. der Ligationsprodukte weisen neben einer starken Bande bei ~ 4 kb weitere Banden oberhalb von 10 kb auf, bei denen es sich um multimerer Plasmide handelt, da sie bei den Restriktionsverdaus (*DrdI*, *HindIII* und *PstI*) teilweise oder ganz verschwinden (Abb. 3-2).

Die entstandenen Fragmente beim Verdaus der Ligationsprodukte mit *DrdI*, *HindIII* und *PstI* entsprechen den Erwartungen für das rekombinante Plasmid pCMV-d2EGFP (Tabelle 3-3).



**Abb. 3-2 Restriktionsanalyse des rekombinanten Plasmids pCMV-d2EGFP**

Agarose-Gelelektrophorese des analytischen Verdau zweier Ligationsprodukte. Aus den zwei Kolonien wurden je zwei DNS-Minipräparationen angefertigt (**Lig1/Lig2**, Probe **a** und **b** in **A**, Probe **a** in **B**) und jeweils mit *XhoI*, *DrdI* bzw. *EaeI* (A) und *HindIII* bzw. *PstI* (B) im Vergleich zu pEGFP-N1 (**N1**, Vektorrückgrat des neuen Plasmids) verdaut (s. Tabelle 3-3).

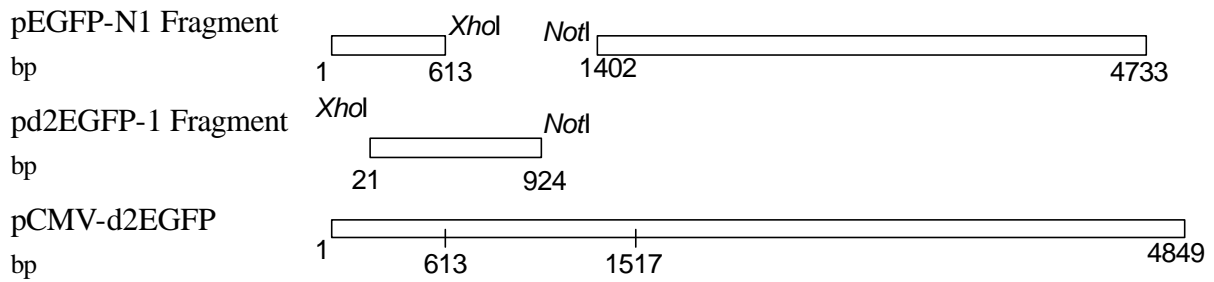
**M** Marker KiloBase™

**1** Verdau des Minipreps a des Ligationsprodukts 1

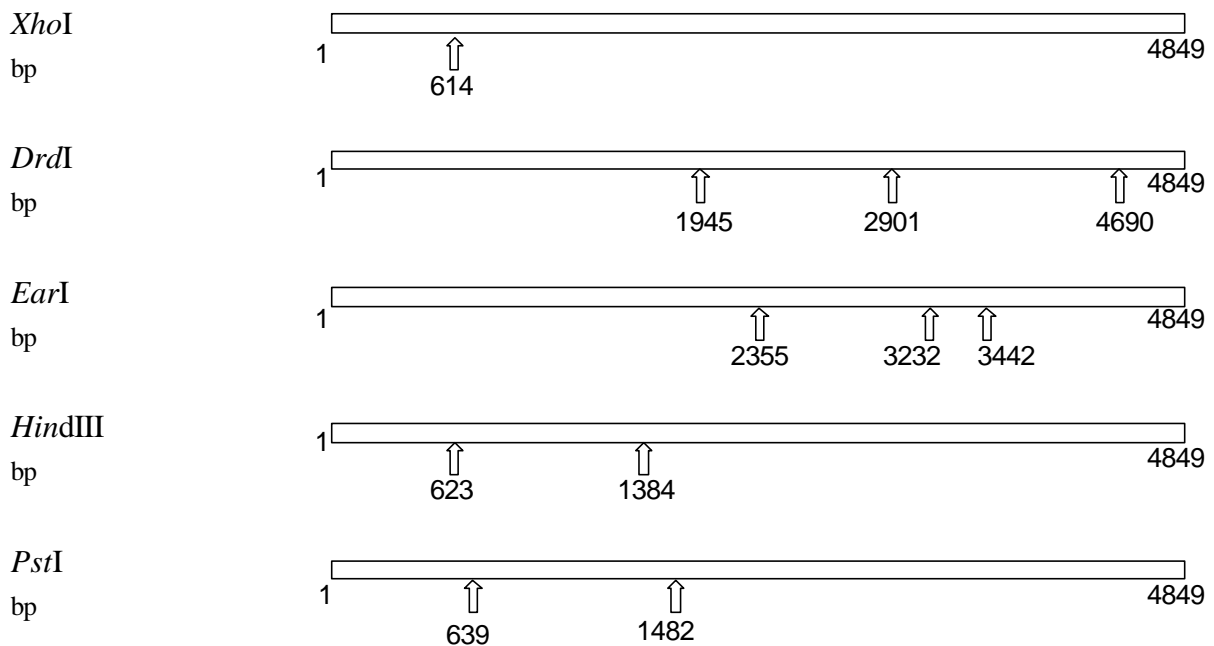
**2** Verdau des Minipreps a des Ligationsprodukts 2

**Mock** Scheinverdau ohne RE

**Tabelle 3-3 Restriktionsanalyse pCMV-d2EGFP - Schnittstellen**



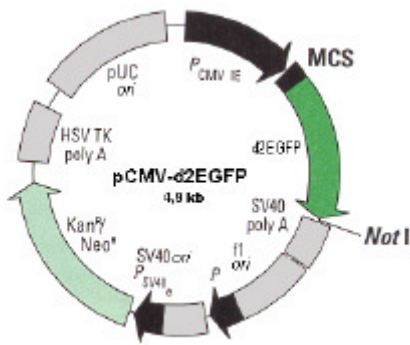
**Schnittstellen in pCMV-d2EGFP**



Der Verdau mit *XhoI* ist unvollständig, denn bei den Ligationsprodukten und pEGFP-N1 ist sowohl das erwartete linearisierte Plasmid auf Höhe von 4,0-5,0 kb als auch eine Bande multimeren Plasmids von über 10,0 kb vorhanden. Beim Verdau mit *EarI* sind die Banden zwischen 4 und 10 kb nicht auswertbar, das erwartete 877 bp lange Fragmente ist erkennbar.

Der vollständige Verdau von pEGFP-N1 mit *DrdI* sollte drei Fragmente ergeben (Tabelle 3-2), hier sind jedoch 4 zusätzliche Banden zu erkennen, die durch Multimere des Plasmids (oberhalb von 10 kb), durch linearisiertes Plasmid (~ 5 kb), durch unverdautes „supercoiled“ Plasmid (~ 4 kb) und durch das 1988bp+956bp-Fragment (3 kb) bedingt sind.

Die Verdaureaktionen zeigen, daß es sich bei beiden isolierten rekombinanten Plasmiden um das gewünschte Plasmid pCMV-d2EGFP (Abb. 3-3) handelt, insbesondere da *HindIII* und *PstI* das neue Plasmid zweimal schneiden, wobei die zweite Schnittstelle in der MODC-Sequenz des d2EGFP-Gens liegt, die pEGFP-N1 nicht enthält.



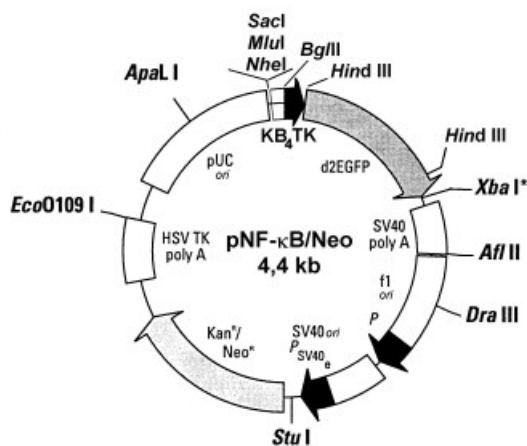
$P_{CMV IE}$  CMV *Immediate early* Enhancer  
 d2EGFP Gen für das destabilisierte EGFP  
 Kan<sup>R</sup> / Neo<sup>R</sup> Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen, verleiht Resistenz gegen Kanamycin (bakterieller Promotor P) und Neomycin (SV40 *early* Promotor)

**Abb. 3-3 Plasmidkarte pCMV-d2EGFP**

### 3.1.2.2 Klonen des Plasmids pNF- $\kappa$ B/Neo

pNF- $\kappa$ B/Neo wurde aus dem Grundgerüst des Vektors pd2EGFP-1 und dem NF- $\kappa$ B-Element-d2EGFP-Gen-Fragment aus pNF- $\kappa$ B-d2EGFP zusammengesetzt (Tabelle 2-8). Dazu wurden die Ausgangsplasmide wie unter Material und Methoden beschrieben mit den RE *Xba*I und *Sac*I vollständig verdaut. Aus einem präparativem Agarosegel wurden dann die entstandenen Fragmente mit einer Länge von 1076 bp (NF- $\kappa$ B-Element+d2EGFP-Gen) und 3358 bp (d2EGFP-loses Vektorgrundgerüst von pd2EGFP-1) isoliert und mittels Bacteriophage T4 Ligase religiert. Nach Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  mit den Ligationsprodukten wuchsen bei einem Insert:Vektor-Verhältnis von 1:1 und 1:3 innerhalb von 19 h je eine Kanamycin-resistente Kolonie. Die Transformationseffizienz für das Kontrollplasmid pUC19 betrug bei dieser Transformation  $2,0 \times 10^7$  CFU/ $\mu$ g.

Um das geklonte Plasmid pNF- $\kappa$ B/Neo (Abb. 3-4) zu identifizieren, wurden DNS-Präparationen aus diesen zwei Klonen mit den in Tabelle 3-4 aufgelisteten RE verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt.



KB<sub>4</sub> 4 Tandemkopien der NF- $\kappa$ B-Bindungsstelle  
 TK minimaler Thymidinkinase-Promotor (HSV Thymidinkinase)  
 d2EGFP Gen für das destabilisierte EGFP  
 Kan<sup>R</sup> / Neo<sup>R</sup> Aminoglycosid-Phosphotransferase-Gen, verleiht Resistenz gegen Kanamycin (bakterieller Promotor P) und Neomycin (SV40 *early* Promotor)  
 \* methyliert

**Abb. 3-4 Plasmidkarte pNF- $\kappa$ B/Neo**