

Etablierung und Charakterisierung einer humanen Zelllinie mit stabil integriertem E2_{Ad12}/Reporterkonstrukt zum Studium der Regulation des E2-Promotors durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg

Christiane Nolte

Abstract

Die zu Beginn meiner Dissertation vorliegenden Ergebnisse über die Modulation des zyklischen Adenosin-5'-Monophosphat (cAMP)/Proteinkinase A (PKA)-abhängigen Signal-transduktionsweges durch das E1A_{12S}-Onkoprotein des Adenovirus Typ12 (Ad12) wurden ausschließlich durch transiente Expressionsassays mit dem Ad12-spezifischen early region 2 (E2)-Promotor durchgeführt, der aufgrund eines cAMP response element (CRE) über die Transkriptionsfaktoren CRE-binding protein (CREB)/CREB-binding protein (CBP) und den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg reguliert wird. Transfizierte Vektor-Desoxyribonuklein-säure (DNA) wird nur in eine Chromatin-ähnliche Strukturen verpackt, gerade die Chromatin-Struktur und die Chromatin-regulierenden Faktoren sind jedoch entscheidend für die Tumor-genese und damit auch für die Krebstherapie. Viele Einzelheiten der Regulationsmechanismen sind noch unerforscht, deshalb sollte ich eine humane Zelllinie etablieren, deren kovalent integriertes Expressionsvektor den Ad12-spezifischen E2-Promotor und ein Reportergen enthalten sollte. Hierzu wurden von mir in zwei verschiedene Typen von Expressionsvektoren (pBlue-TOPO, pBL-CAT) mit unterschiedlichen Reportergen (β-Galactosidase-Gen=lacZ-Gen, Chloramphenicolacetyl-Transferase-Gen=CAT-Gen) der E2_{Ad12}-Wildtyp (WT)-Promotor und verschiedene Promotormutanten kloniert. Da der Nachweis des Reportergen-produkts β-Galactosidase nach Aktivierung des Promotors durch E1A-Proteine und die PKA-Cα-Untereinheit in den Zellen schwierig war, wurde zur Etablierung der Zelllinien mit integriertem Expressionsvektor das pBL-CAT-Vektorsystem benutzt. Nach Kotransfektion von KB-Zellen mit dem Expressionsplasmid pBL-E2_{Ad12}-WT/CAT und pBabe-Puro, einem Expressionsplasmid, das den Selektionsmarker Puromycin exprimiert, wurden von mir mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR) 15 Puromycin-resistente Zellklone mit kovalent integriertem Expressionsplasmid identifiziert. Bei zwei dieser KB-Zellklone (Klon 16 und 17) ließ sich der in das Wirtsgenom integrierte E2_{Ad12}-WT/Promotor durch das E1A_{12S}-Protein und die PKA-Cα-Untereinheit gut aktivieren. Parallele Versuche zeigten, dass es aufgrund eines hohen Basalspiegels von Phospho-CREB in den Zellen günstig war, den E2_{Ad12}-Promotor durch Forskolin über den cAMP/PKA-Signalweg erst nach Haltung im Hungermedium zu stimulieren. Unter diesen Bedingungen erhöhte sich die CAT-Expression der Zellklone 16 und 17 um mehr als das Doppelte, was diese Klone für weitere Untersuchungen der Regulation des in das Wirtsgenom integrierten E2_{Ad12}-WT-Promotors durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg und durch Chromatin-remodellierende und -modifizierenden Faktoren als geeignet erscheinen lässt.