

2.2.3.7 Restriktionsanalyse der rekombinanten Plasmide

Die nach der Transformation der Ligationsprodukte gewachsenen Kolonien wurden vermehrt und die enthaltene Plasmid-DNS mit Hilfe von Minipreps (s. 2.2.1.2) isoliert. Die Plasmid-DNS wurde durch eine Restriktionsanalyse charakterisiert. Die geeigneten RE wurden anhand der Restriktionsanalysen der Ausgangsplasmide ausgewählt (zu erwartende Fragmentgrößen s. Tabelle 3-2 und Tabelle 3-4). Nach dem Restriktionsverdau (s. 2.2.3.2) wurden die Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.2.2) aufgetrennt.

2.2.3.8 Vervielfältigung der rekombinanten Plasmide

Für die Transfektion der beiden rekombinanten Plasmide wurden mehrere Minipräparationen (s. 2.2.1.2) hergestellt und die DNS-Konzentration photometrisch bestimmt (s. 2.2.1.3).

2.3 ZELLKULTUR

2.3.1 Verwendete Zelllinien

Für diese Arbeit wurden verschiedene permanente Zelllinien verwendet, deren Herkunft in Tabelle 2-9 wiedergegeben ist. Die CHO-Zellen stammen aus dem Ovar eines Chinesischen Hamsterweibchens (*Cricetulus griseus*). Diese Zellen wurden ausgewählt, da sie schnell wachsen, bei Transfektionen Plasmid-DNS mit hoher Effizienz aufnehmen können und außerdem gut charakterisierte Mutanten erhältlich sind, die in definierten Reparaturschritten nach Bestrahlung Defekte aufweisen (s. 1.3.2).

Tabelle 2-9 Verwendetes Zellmaterial			
Laborbezeichnung	Gewebe/ Biopsie	Zelllinie Subtyp von Chromosomenzahl	Quelle Bestellnr.
AA8	Ovar Fibroblast	CHO-wildtyp (<i>Chinese Hamster Ovary</i>) Zelllinie CHO-K1 21	ATCC* CRL-1859
EM9	Ovar	CHO-Mutante CHO-AA8 21	ATCC* CRL-1861
UV5	Ovar	CHO-Mutante CHO-AA8 21	ATCC* CRL-1865
HEK/293	Niere Epithel	<i>Human Embryonic Kidney</i> Transformiert mit Adenovirus 5 DNS	ATCC* CRL-1573
*ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA		

Diese vier Zelllinien wurden mit den in Tabelle 2-1 aufgeführten Plasmiden stabil transfiziert und Klone jeder Zelllinie isoliert (Tabelle 3-8).

2.3.2 Herstellung der Zellkulturmedien

Die Zelllinien wurden in Instamed[®] α -Medium (Biochrom GmbH, Berlin) mit fetalem Kälberserum (FCS) und Antibiotika-Zusatz kultiviert.

Das Pulvermedium für 10 Liter wurde in 4 l *Aqua bidest.* gelöst. 32 g Glucose und 20 g Natriumhydrogencarbonat, gelöst in 1 l *Aqua bidest.*, wurden zugegeben. Diese zweifach konzentrierte Stammlösung wurde sterilfiltriert (Millipore Peristaltik-Pumpe, Millipore Corp., Bedford, MA, USA; Sterilfilter Sterivex GP, Porengröße 0,22 μ m), in Glasflaschen portioniert und bei 4°C bis zum Verbrauch gelagert (bis zu einem Monat).

Kurz vor Gebrauch wurden FCS und Antibiotika, aufgelöst in je 5 ml *Aqua bidest.*, dem Medium zugegeben (Tabelle 2-10). Das fötale Kälberserum (FCS) wurde bei RT angetaut, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, steril portioniert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 2-10 Herstellung der Kulturmedium-Gebrauchslösung

250 ml	Medien-Stammlösung (2x konzentriert)
5 ml	Amphotericin B (250 μ g/ml)*
5 ml	Penicillin/Streptomycin (10.000 IE / 10.000 μ g/ml)*
5 ml	Neomycin/Bacitracin (1 mg / 50 U/ml)*
ad 500 ml	<i>Aqua bidest.</i>
25 ml bzw. 50 ml	FCS* (für Medium mit 5 bzw. 10 % FCS).

*Antibiotika, FCS (Biochrom GmbH, Berlin)

2.3.3 Kulturbedingungen

Das Arbeiten mit den Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Arbeitsbank (Hera safe, Kendro Laboratory Products, Berlin), welche vor und nach Benutzung mit 70 %igem Ethanol gereinigt wurde.

Medien und Lösungen wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem CO₂-begasteten Brutschrank (BB16, Kendro Laboratory Products, Berlin) unter standardisierten Bedingungen von 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit, 95 % Luft und 5 % CO₂. Der Brutschrank wurde regelmäßig mit 70 %igem Ethanol gereinigt.

2.3.4 Poly-L-Lysin-Beschichtung

Für Experimente mit HEK-Zellen (s. 2.3.14) war eine Beschichtung der Kulturgefäße mit Poly-L-Lysin-Hydrobromid (zellkulturgetestet) erforderlich, welches als Polykation in einer monomolekularen Schicht eine stärkere Bindung der Zellen an das Substrat erlaubt.

Dazu wurden die Kulturgefäße mit 0,2 ml Polylysin-Lösung (0,1 mg/ml, in *Aqua bidest.*) durch Schwenken benetzt. Nach 5 min Einwirken bei RT und Waschen mit PBS (Tabelle 2-11) wurden die Zellen in die feuchte Platte eingesät.

2.3.5 Kultivieren und Subkultivieren der Zellen

Die Zelllinien wurden routinemäßig in Gewebekulturflaschen T80 oder T25 (Nunc, Wiesbaden) kultiviert. CHO- und HEK-Zellen wachsen als adhärente Zellen. Nach Erreichen der Konfluenz und Ausbildung eines dichten Zellrasens wurden sie mit Hilfe von Trypsin passagiert. Bei diesen Passagen wurde das α -Medium mit Antibiotika und 5 % Serum für CHO-Zellen und 10 % Serum für HEK-Zellen verwendet. Nach Waschen des Zellrasens mit 5 ml PBS (Tabelle 2-11) wurde er mit 5 ml Trypsinlösung (Tabelle 2-11) überschichtet und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 5 ml Medium zugegeben. Die Zellzahl in einer 1:10 Verdünnung in PBS wurde visuell in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Bei der Aussaat der Zellen in Gewebekulturflaschen bzw. in andere Kulturgefäße für die entsprechenden Experimente wurde bei CHO-Zellen die Zelldichte auf 5×10^3 Zellen/cm², für HEK-Zellen auf $1-3 \times 10^4$ Zellen/cm² eingestellt, wenn nicht anders beschrieben.

Ein Mediumwechsel erfolgte nach 4 Tagen, passagiert wurde nach 5-7 Tagen.

Tabelle 2-11 Lösungen für das Subkultivieren der Zellen

PBS (Phosphate Buffered Saline)-Lösung (fünffach konzentriert)

80 g NaCl
2 g KCl
14,4 g Na₂HPO₄·2H₂O
2 g KH₂PO₄
2 l *Aqua dest.*

Die Lösung wurde portioniert, autoklaviert und bei -20°C gelagert. Zum Gebrauch wurde sie aufgetaut und mit *Aqua bidest.* 1:5 verdünnt.

Trypsin/ EDTA-Lösung (zehnfach konzentriert, Biochrom GmbH, Berlin)

0,5/0,2 %ig in PBS (10x) ohne Ca²⁺, Mg²⁺

Die Lösung wurde portioniert und bei -20°C aufbewahrt. Zum Gebrauch wurde sie mit *Aqua bidest.* im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Gebrauchslösung blieb etwa 2 Wochen aktiv, wenn sie bei 4°C gelagert wurde.

Abb. 2-2 zeigt Zellen der Linie AA8 zu verschiedenen Zeiten nach Passagierung.

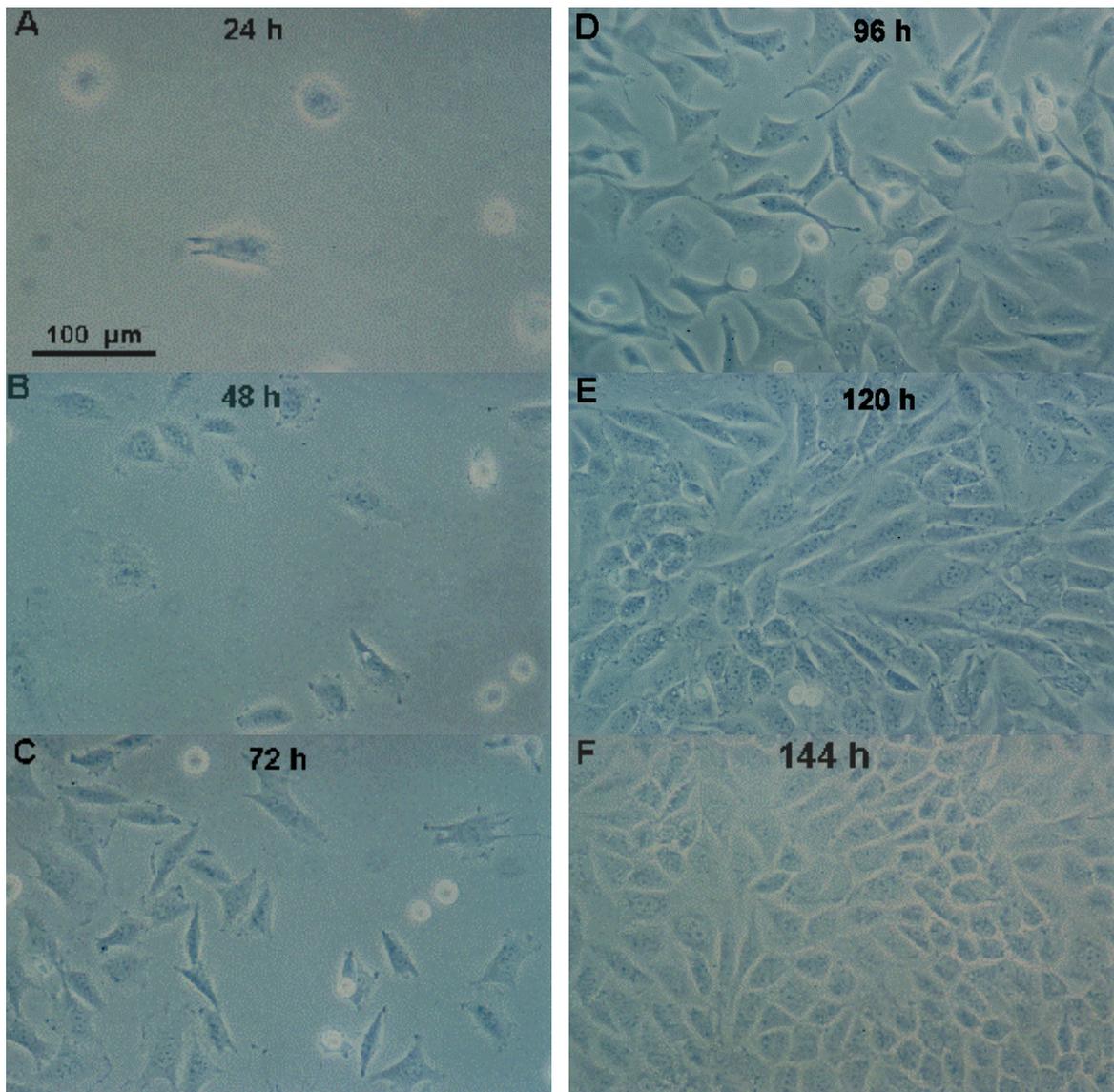


Abb. 2-2 Kultivierung der Zelllinie AA8

Nach der Aussaat, während der lag-Phase des Wachstums, setzen sich die durch die Trypsinierung abgerundeten Zellen am Boden des Kulturgefäßes ab und heften sich unter Ausbreitung ihrer Zelleiber an. Dabei nehmen sie die typische Spindelform mit unregelmäßigen zytoplasmatischen Ausläufern an. Nach Anpassung an die Wachstumsbedingungen folgt die exponentielle Wachstumsphase, in der die Zellen bei optimalen Bedingungen eine maximale Teilungsrates zeigen. 5 bis 7 Tage nach Aussaat hat sich ein konfluenter Zellrasen gebildet und die Zellen treten in die stationäre Wachstumsphase ein.

2.3.6 Wachstumskinetik während einer Passage (CHO-Zellen)

Abb. 2-3 zeigt die Abhängigkeit der verwendeten Zelllinien von der Serumzugabe. Exponentiell wachsende HEK- oder AA8-Zellen lösen sich bei Zugabe von serumfreiem Medium innerhalb von 48 h vollständig von der Unterlage ab. Erst bei Serumkonzentrationen von 5 % zeigen CHO-Zellen optimales Wachstum, während HEK-Zellen 10 % Serum benötigen (Abb. 2-3).

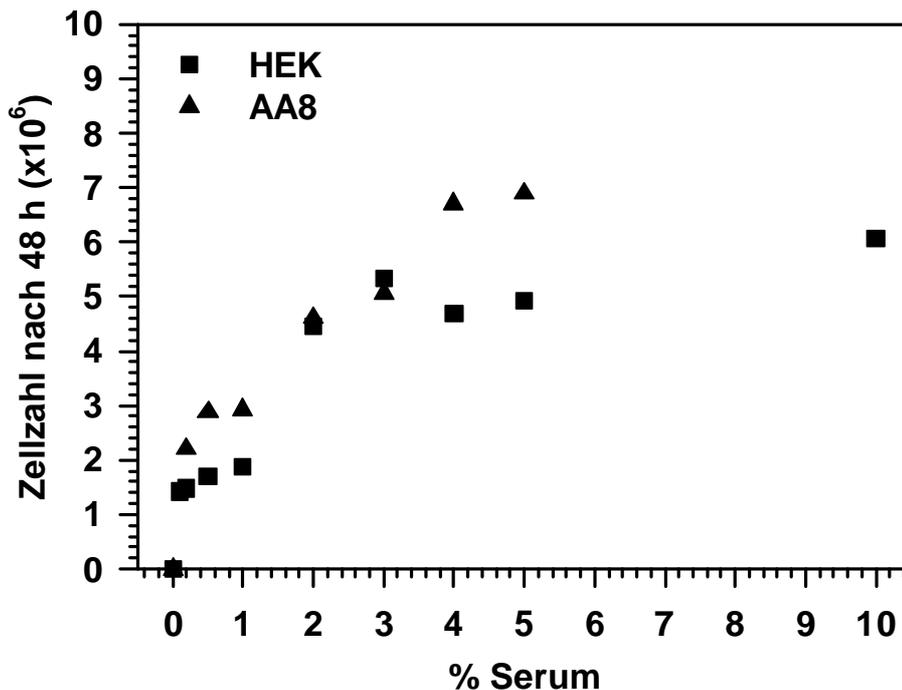


Abb. 2-3 Wachstum von HEK- und AA8-Zellen bei unterschiedlichen Serumkonzentrationen.

Die Zellen wurden in Petrischalen ausgesät und 4 Tage in Medium mit 10 % (HEK) bzw. 5 % (AA8) Serum kultiviert. 48 h nach Zugabe von Medium mit verschiedenen Serumkonzentrationen wurden die Zellen abtrypsinisiert und in der Zählkammer gezählt.

Abb. 2-4 zeigt exemplarisch die Vermehrungskurve der Zelllinie EM9. Die Zellen wurden in 5 ml Medium in Petrischalen (Ø 6 cm, Nunc, Wiesbaden) ausgesät und in regelmäßigen Abständen wurde die Zellzahl in den Petrischalen bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und 1 ml Trypsin zugegeben. Nach Inkubation wurde die Trypsinwirkung mit 1 ml Medium abgestoppt und die Zellen wurden gezählt (s. 2.3.5). Die exponentielle Wachstumsphase beginnt nach einer 24-stündigen lag-Phase und dauert bis 110 h nach der Aussaat an.

Die Verdopplungszeit (VZ) der Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase beträgt 18,6 h und wurde anhand der Steigung der Regressionsgerade (m) wie folgt berechnet:

$$VZ = \frac{\log 2}{m}$$

Nach 110 h tritt die Kultur in die stationäre Wachstumsphase ein. In dieser Phase werden Zelldichten von $1-2 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 erreicht. Eine Kultivierung über 190 h zeigte keine weitere Erhöhung der maximal erreichten Zellzahl, sondern es war eine Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen. Unter vergleichbaren Bedingungen wuchsen Zellen der Linien AA8 und UV5 mit einer VZ von 13 h.

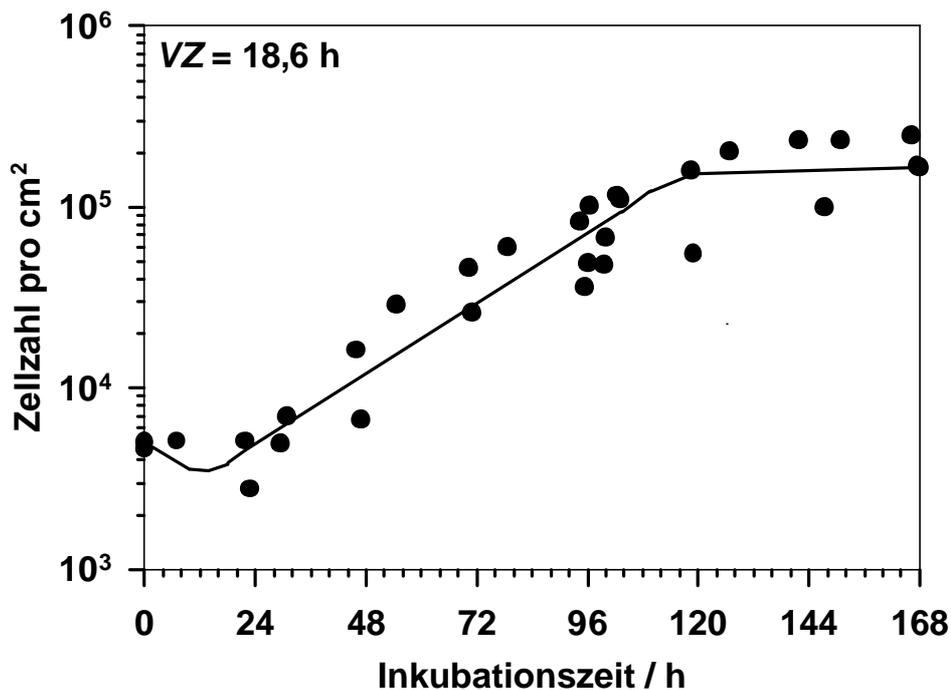


Abb. 2-4 Wachstumskurve der Zelllinie EM9

Kultivierung in Medium mit 5 % FCS. VZ = Verdopplungszeit.

2.3.7 Test auf Mycoplasmenbefall

Ein Befall der Zellkulturen mit Mycoplasmen führt in der Regel nicht zum Absterben der Zellen, behindert jedoch das normale Wachstum der Zellen und führt durch Veränderung der Zellmembran zu verfälschten Ergebnissen bei Transfektionen. Zum Ausschluß bzw. Nachweis eines Mycoplasmenbefalls wurden die Zelllinien routinemäßig in Petrischalen ausgesät und mit DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid) gefärbt [LINDL UND BAUER, 1994]. DAPI (Boehringer Mannheim, Mannheim) bindet an doppelsträngige DNS und erfährt dadurch eine ~ 20fache Verstärkung seiner Fluoreszenzintensität. Vorhandene Mycoplasmen können so als membranständige fluoreszierende Partikel nachgewiesen werden.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS (Tabelle 2-11) und einmal mit Methanol gewaschen und anschließend mit 2 ml DAPI in Methanol (0,1 µg/ml) inkubiert (15 min bei 37°C). Nach dem Waschen mit Methanol wurde das Präparat in PBS aufgenommen und im Fluoreszenzmikroskop (s. 2.4.2) betrachtet. Bei Nachweis von Mycoplasmen in einer Kultur wurde die kontaminierte Kultur entsorgt und durch eine eingefrorene mycoplasmenfreie Charge ersetzt.

2.3.8 Gefrierkonservierung von Zellen

Um Zellschäden durch langsame Veränderung der Eiskristalle zu minimieren, wurde den Zellen im Konservierungsmedium 10 % kryoprotektives Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. Konfluent gewachsene Zellen wurden trypsinisiert, gezählt und 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Konservierungsmedium resuspendiert (1 x 10⁶ Zellen/ml) in Kryoröhrchen

(Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Die Proben wurden zunächst 24 h im Isopropanol-gefüllten Einfrierbehälter (Nunc) in einer -80°C -Gefriertruhe eingefroren, danach in flüssigem Stickstoff (-196°C) bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 3 ml Medium aufgenommen, 5 min bei $250 \times g$ zentrifugiert, abgesaugt und in 2 ml Medium resuspendiert und in eine T80 Flasche mit 15 ml α -Medium pipettiert. Nach 24 h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel.

2.3.9 Transfektion

Für die Transfektion von Säugerzellen, d.h. den Transfer fremder DNS und die Expression der eingeschleusten genetischen Information, stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Die Elektroporation erfordert einen hohen apparativen Aufwand und ist wie die Calciumphosphat-Copräzipitation und die Transfektion mittels DEAE-Dextran relativ toxisch für die Zellen [KINGSTON, 1997]. Die Liposomen-vermittelte Transfektion dagegen erfordert minimalen apparativen Aufwand, je nach Zelllinie sind bei geringer Toxizität hohe Transfektionsraten zu erreichen, zudem ist die Durchführung in kurzer Zeit (1,5-2 h) möglich.

2.3.9.1 Durchführung der Transfektion

Liposomen

- TfxTM-10, -20, -50 Reagent (Promega, E1811)
- Tfx Reagents Transfection Trio (Promega, E2400)
- TransFast (Promega, E2432)

Plasmide Tabelle 2-1

Exponentiell wachsende Zellen wurden passagiert und in einer Dichte von $4,5 \times 10^4$ Zellen in 1,5 ml Medium pro Vertiefung in 6-well-Platten (Falcon, Becton Dickinson Labware, Heidelberg) oder, für die Optimierung der Transfektionsbedingungen und für Induktionsversuche (s. 2.3.14), in 1 ml Medium in 24-well-Platten (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Nach 3 Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. 24 h später bildeten die Zellen einen 70-80 % konfluenten Rasen. Die Transfektionen erfolgten in α -Medium mit 5 % (CHO) bzw. 10 % FCS (HEK-Zellen). Das Liposomenreagenz wurde nach Anleitung des Herstellers vorbereitet und bei -20°C aufbewahrt (1 mmol/l Endkonzentration). Dieses wurde dazu verwendet, ein Medium-DNS-Liposomen-Gemisch (Tabelle 2-12) herzustellen.

Tabelle 2-12 Menge an Lipid in Transfektionen

Lipid	Ladungsverhältnis Liposomen (+) : DNS (-)	Liposomen pro μg DNS
TransFast	1:1	3 μl
	2:1	6 μl
Tfx	3:1	4,5 μl

Dazu wurde Medium ad 200 μ l (24-*well*-plate) bzw. 1400 μ l (6-*well*-Platte) pro Vertiefung in einem sterilen Reaktionsgefäß vorgelegt, 1 μ g bzw. 1,75 μ g Plasmid-DNS zugefügt und gemischt (Wirbelmischer). Das Lipid wurde zugegeben und sofort gemischt (Wirbelmischer). Die Liposomengemische wurden 15 min bei RT inkubiert und nach Absaugen des Mediums in die Vertiefungen pipettiert. Die Zellen wurden 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Gemisch mit 800 μ l bzw. 1,5 ml Medium pro *well* verdünnt und anschließend die Zellen im Mikroskop beurteilt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. 48 h nach der Transfektion wurde die EGFP- bzw. d2EGFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop beurteilt, die Zellen wurden dann entweder für eine stabile Transfektion weiterverwendet (s. 2.3.9.3) oder im Mikrotiterplatten (MTP)-Fluorimeter (s. 2.4.5) gemessen oder für die FACS-Analyse (s. 2.4.4) fixiert.

2.3.9.2 *Optimierung der Transfektionen*

Bei der Optimierung der Transfektionen wurden die Art des Lipids (Tfx und TransFast), das Ladungsverhältnis Tfx / TransFast (+) : DNS-Rückgrat (-), die Menge transfizierter DNS, die Transfektionszeit und der Effekt von Serum berücksichtigt. Tfx wurde in drei verschiedenen molaren Verhältnissen der fusogenen Komponente DOPE (L-Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin) zur kationischen Komponente verwendet (Tfx10, 20, 50). Dieses kationische Lipid (N,N,N',N'-Tetramethyl-N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2,3,-di(oleoyloxy)-1,4-Butandiammonium-Jodid) ist in allen Tfx-Zubereitungen in gleicher Menge enthalten. Die Fluoreszenzausbeute wurde im MTP-Fluorimeter (Messung von unten an 13 überlappenden Positionen) und bei einigen Versuchen zusätzlich durch FACS-Analyse (Tabelle 3-6) gemessen.

Der Vergleich der verschiedenen Transfektionsreagenzien in AA8-Zellen zeigt, daß TransFast ab 500 ng DNS pro Vertiefung die höchsten Fluoreszenzwerte liefert. Bei steigenden DNS-Mengen pro Vertiefung nimmt die Fluoreszenz bei Verwendung von TransFast am stärksten zu. Die besten Transfektionsbedingungen sind TransFast und 1.000 ng DNS pro Gefäß (Abb. 2-5A). Der Vergleich verschiedener Ladungsverhältnisse Lipid zu DNS ergab, daß ein Überwiegen der positiven Ladung (2:1) die Ausbeute mehr als verdoppeln kann (Abb. 2-5B).

Auch HEK-Zellen zeigen mit TransFast die höchste Transfektionseffizienz (Abb. 2-6). Ein Vergleich von 24-*well*-Platten verschiedener Hersteller (Falcon und Nunc) ergab, daß mit der Nunc-Platte eine bessere Effizienz erzielt wurde, unabhängig davon, ob die Vergleichsplatte von Falcon mit Polylysin beschichtet (s. 2.3.4) oder unbehandelt war.

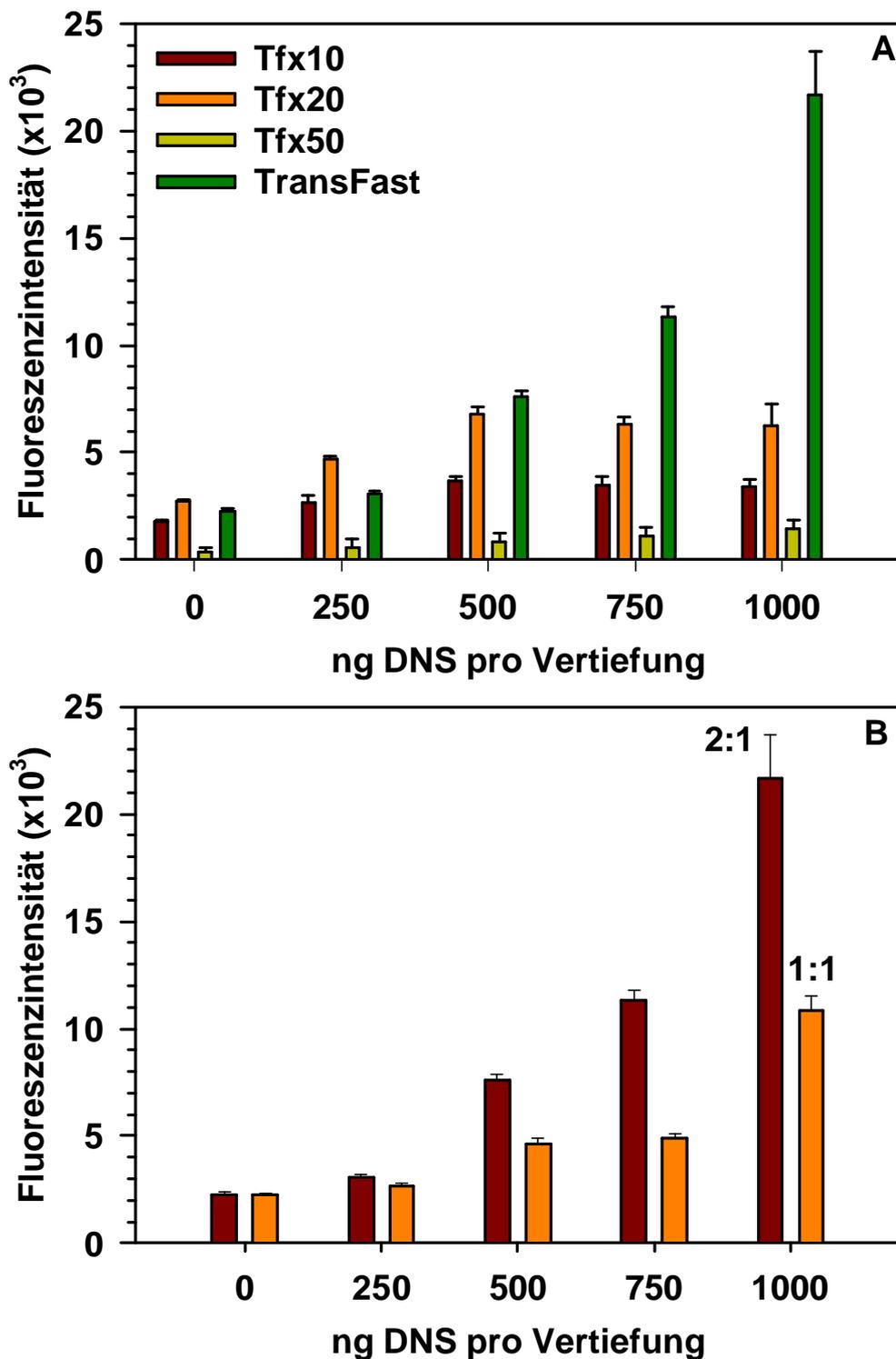


Abb. 2-5 Transfektionseffizienz in AA8-Zellen

Transfektion von AA8-Zellen mit pEGFP-N1 in Medium mit 5 % Serum. Im MTP-Fluorimeter gemessene mittlere Fluoreszenzintensität mit Standardabweichung (SD) nach 48 h (n = 5), die Autofluoreszenz der 24-well-Platte wurde well für well subtrahiert. **A** Transfektion mit verschiedenen Lipidreagenzien (Tfx10, 20, 50 / Ladungsverhältnis 3:1 und TransFast / 2:1) und Plasmid-DNS-Mengen. **B** Abhängigkeit der Transfektionseffizienz vom Ladungsverhältnis TransFast : DNS. Die Inkubationszeit wurde bei allen Versuchen auf 1 h festgelegt. Vergleich dieser MTP-Fluorimeterdaten mit Einzelzelldaten aus der FACS-Analyse in Tabelle 3-6.

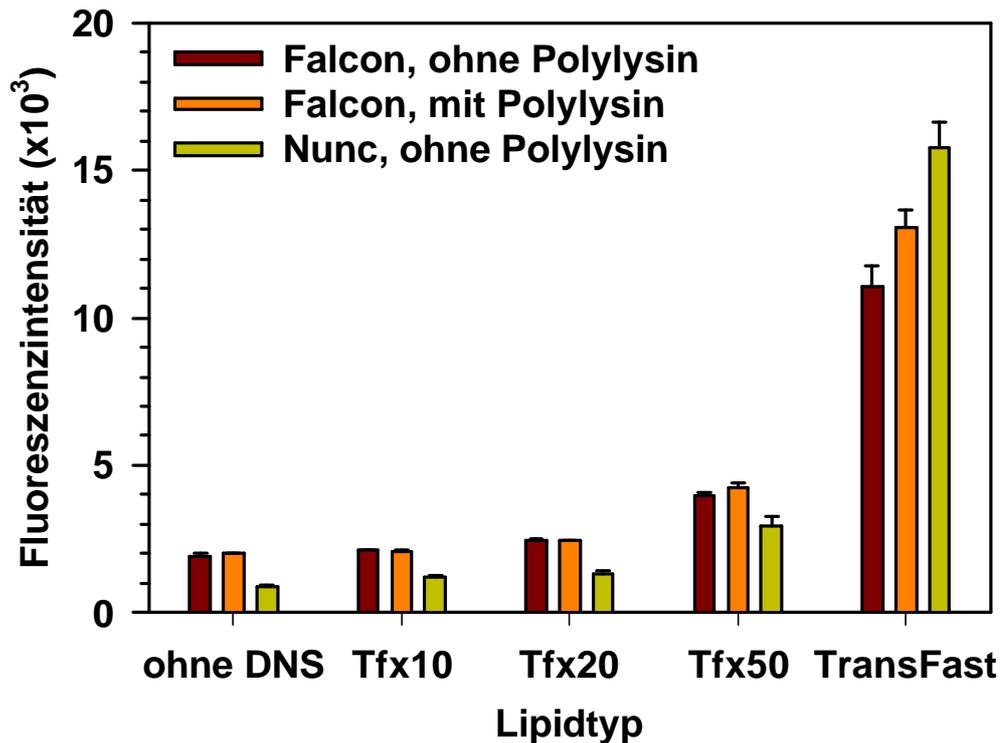


Abb. 2-6 Transfektionseffizienz in HEK-Zellen

Transfektion von HEK-Zellen mit pEGFP-N1 in Medium mit 10 % Serum. Im MTP-Fluorimeter gemessene mittlere Fluoreszenzintensität mit SD nach 48 h (n = 5), die Autofluoreszenz der 24-well-Platten wurde *well* für *well* subtrahiert. Vergleich der Lipide bei gleicher DNS-Menge (1 µg) in zwei verschiedenen 24-well-Platten, Falcon-Platte auch Polylysin-beschichtet.

2.3.9.3 Stabile Transfektion

Zur Isolierung der stabil transfizierten Zellen wurde ein dominanter selektierbarer Marker verwendet. Das Markergen Aminoglycosid-Phosphotransferase (APT) wurde cotransfiziert (pCX-GFP ohne APT-Gen) oder befand sich auf dem gleichen Plasmid wie das EGFP-Gen (s. 2.2.1, Tabelle 2-1). Für die Cotransfektion mit dem Helferplasmid pSV2*neo* wurden die Plasmide pCX-GFP und pSV2*neo* im Verhältnis 1:5 gemischt [BAUMSTARK-KHAN *et al.*, 1999].

Selektionsmedium mit G 418 Sulfat (1,5 mg/ml, Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach) für die stabile Transfektion:

Nach Literaturangaben sollte die Endkonzentration in Medium 100-800 µg/ml G418 (in stark gepufferter Lösung) betragen. Die im Antibiotikaresistenztest ermittelte Konzentration für AA8 und UV5 lag höher und betrug 1,5 mg/ml G418 [PALM, in Vorbereitung].

Für 500 ml Medium wurden 750 mg G418 in 50 ml *Aqua bidest.* gelöst und zusätzlich zu den anderen Komponenten (s. 2.3.2) zu 250 ml zweifach konzentriertem Medium sterilfiltriert (Sterilfilter, Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell, Dassel).

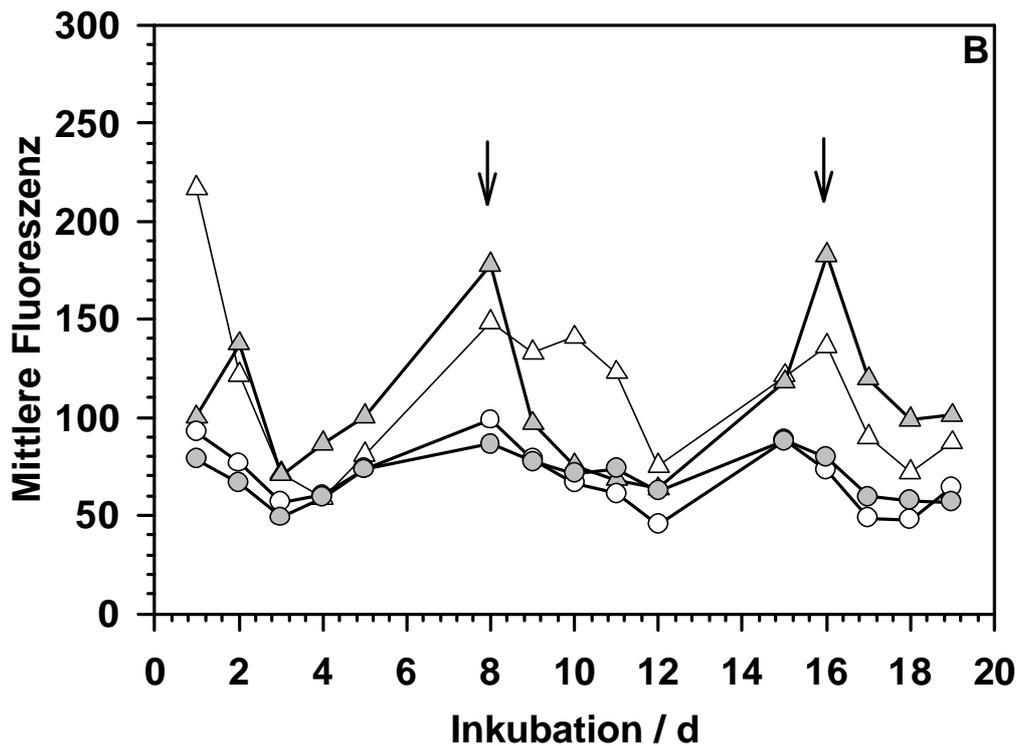
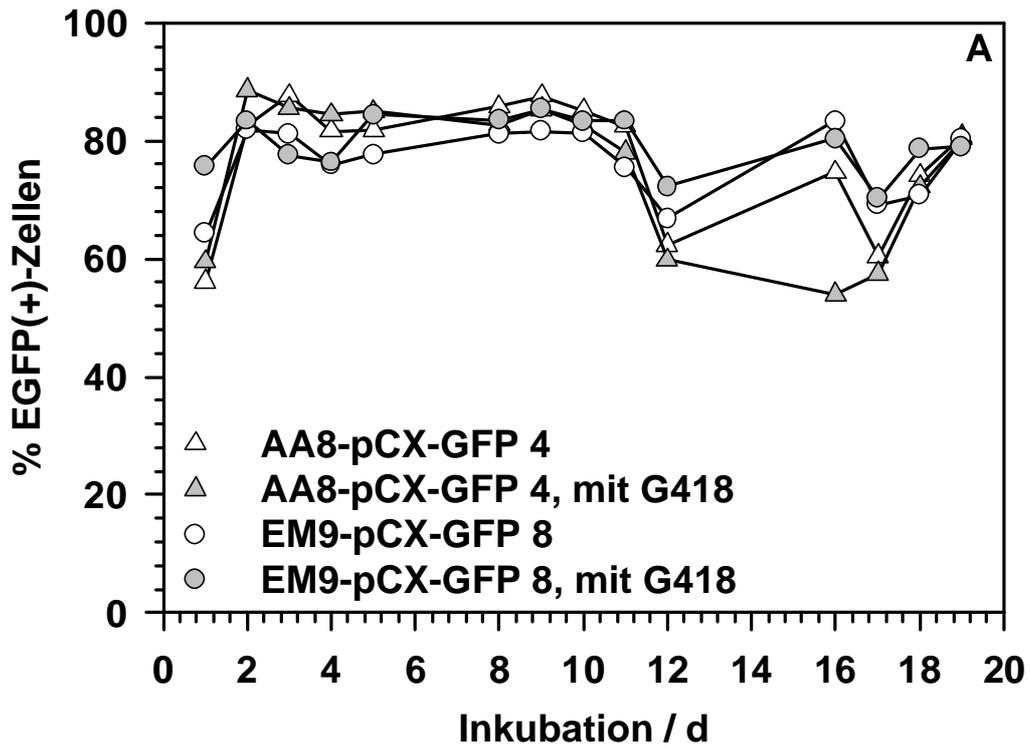


Abb. 2-7 EGFP-Expression über 3 Passagen

AA8-pCX-GFP und EM9-pCX-GFP wurden in Medium mit bzw. ohne G418 in Petrischalen kultiviert und täglich für die FACS-Analyse fixiert. **A** Prozentsatz EGFP(+)-Zellen. **B** Mittlere Fluoreszenz (geometrisches Mittel) der EGFP(+)-Zellen. Die Pfeile weisen auf den Zeitpunkt der Passage hin.

Für stabile Transfektionen wurden die Zellen 2 Tage nach der Transfektion trypsiniert und in Petrischalen (\emptyset 10 cm) mit je 10 ml Selektionsmedium überführt. Alle 4 Tage wurde ein Mediumwechsel mit Selektionsmedium durchgeführt. Nach 10-15 Tagen waren sichtbare Kolonien vorhanden, die mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops auf EGFP- bzw. d2EGFP-Expression untersucht wurden. EGFP(+)-Kolonien wurden mit einem Stift am Boden der Petrischale markiert. Um die Kolonien zu isolieren, wurde das Medium abgesaugt, die Petrischale einmal mit 5 ml PBS gewaschen, und die gewünschten Kolonien wurden mit Plastikringen umschlossen, in die 20 μ l Trypsin pipettiert wurde. Nach einer 2-4 minütigen Inkubation bei RT wurden die abgelösten Zellen in neue Petrischalen (\emptyset 10 cm) mit je 10 ml Selektionsmedium überführt. Nach 10-15 Tagen wurden die Kolonien im Fluoreszenzmikroskop (s. 2.4.2) auf eine einheitliche EGFP/d2EGFP-Expression geprüft. Falls dies der Fall war, wurden die Zellen in Selektionsmedium für 10 Generationszeiten inkubiert, um individuelle Kolonien zu Zelllinien vermehren. Bei sehr hohen Transfektionseffizienzen wurden die Zellen in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) ausgesät, in einer Konzentration von 50 Zellen pro Platte, so daß je nach Anheftungseffizienz bis zu 50 Kolonien pro Platte wuchsen.

Die stabil transfizierten Klone (Tabelle 3-8) wurden dauerhaft in Selektionsmedium kultiviert.

Zur Untersuchung der EGFP-Expression bei Kultivierung mit oder ohne G418 wurden AA8 und EM9, stabil transfiziert mit pCX-GFP und pSV2neo (s. 3.2.5), in Petrischalen kultiviert und täglich für die FACS-Analyse fixiert. Nach der Aussaat nimmt die mittlere Fluoreszenz der EGFP(+)-Zellen 72 h lang ab, um dann bis zur nächsten Passage nach 7 Tagen auf den Ausgangswert anzusteigen (Abb. 2-7B). Diese Abnahme fällt in den Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, während derer die Zellmasse und die Proteinsynthese hinter der Zellteilung zurückbleiben (s. 3.2.4.5). Bei Verlangsamung der Teilungsgeschwindigkeit kann mehr Protein, d.h. auch EGFP, pro Zelle gebildet werden und die mittlere Fluoreszenz steigt an. Dieser Verlauf der Fluoreszenzintensität kann sowohl bei Kultivierung in G418-haltigem als auch in G418-freiem Medium beobachtet werden.

2.3.10 Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid

Die Halbwertszeiten (HWZ) von EGFP und d2EGFP in CHO-Zellen wurden bei Hemmung der Proteinsynthese gemessen. Dazu wurden AA8-pCX-GFP 4, AA8-pEGFP-N1 1, AA8-pCMV-d2EGFP 1, 2 und 4 für 24 h in Cycloheximid-haltigem Medium inkubiert.

Tabelle 2-13 Cycloheximidlösung

Cycloheximid-Stammlösung (10 mg/ml)

100 mg Cycloheximid (Boehringer Mannheim, Mannheim)

10 ml *Aqua bidest.*

wurden im Wasserbad bei 37°C gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C bis zu 1 Woche aufbewahrt. Zum Gebrauch wurden 50 μ l Cycloheximid-Stammlösung zu 50 ml Selektionsmedium gegeben (Endkonzentration 10 μ g/ml).

Die Zelllinien wurden in 24-*well*-Platten in einer Dichte von 10^4 Zellen pro cm^2 in 1 ml Selektionsmedium ausgesät. Nach drei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Vier Tage nach Aussaat wurde 1 ml Cycloheximid-haltiges Medium (Tabelle 2-13) pro Vertiefung zugegeben. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Zellen trypsinisiert und mit 3,5 % Formaldehyd fixiert. Mit Hilfe des FACS wurde für je 20.000 Zellen die grüne Fluoreszenz pro Zelle gemessen (s. 2.4.4).

Die Daten aus drei unabhängigen Versuchen wurden normiert, d.h. der prozentuale Anteil der mittleren Fluoreszenz der EGFP(+)-Zellen vom Ausgangswert bei 0 h (= 100 %) berechnet. Für jeden Meßpunkt wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung der normierten Daten ermittelt. Zur Bestimmung der HWZ für EGFP und d2EGFP wurde in der halblogarithmischen Darstellung der mittleren normierten Fluoreszenz mit Hilfe von Sigma Plot 3.02 (Jandel, Deutschland) eine lineare Regression für die Meßpunkte berechnet. Die Steigung der Regressionsgerade ($b(1)$) ging in folgende Formel zur Berechnung der HWZ ein:

$$HWZ = \frac{\ln 2}{b(1)}$$

2.3.11 Exposition mit UV-Licht

Für die UVC-Exposition wurde die Bestrahlungsstärke der Quecksilber-Niederdrucklampe (Typ NN8/15, Hauptemissionslinie 253,7 nm, Kendro Laboratory Products, Berlin) mit dem UVX-Radiometer (Ultraviolet Products, San Gabriel, USA) auf $0,5 \text{ J/m}^2\text{s}$ eingestellt.

Für den Koloniebildungstest (s. 2.3.13) wurden die anhefteten Zellen (16 bis 20 h nach Inokulation) mit PBS gewaschen, abgesaugt und mit einer Fluenz von $0\text{-}35 \text{ J/m}^2$ exponiert. Nach der Bestrahlung wurde Medium zugegeben und die Zellen wurden im Brutschrank über 12-20 Tage inkubiert.

Für die Messung des Wachstums von AA8-pEGFP-N1-Zellen nach UVC-Bestrahlung (s. 2.4.5.3) wurden die Zellen in der MTP bestrahlt ($0\text{-}40 \text{ J/m}^2$). Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und, um ein Austrocknen während der Bestrahlung zu verhindern, mit $50 \mu\text{l}$ PBS überschichtet. Die MTP wurde mit einem Metalldeckel, der einen Schlitz für 8 Vertiefungen aufwies, abgedeckt und für die vorgegebene Zeit zentral im Strahlungsfeld der UVC-Lampe exponiert.

Für die Untersuchung UVC-induzierter Genexpression (s. 2.3.14) wurden die Zellen in 24-*well*-Platten oder Petrischalen ($\varnothing 3,5 \text{ cm}$, Nunc, Wiesbaden) bestrahlt. Die Zellen wurden mit $500 \mu\text{l}$ PBS pro Vertiefung gewaschen und mit 150 bzw. $500 \mu\text{l}$ PBS überschichtet. Die Vertiefungen wurden mit einer Metallplatte abgedeckt und die offenen Vertiefungen mit der gewünschten Dosis ($0\text{-}15 \text{ J/m}^2$) bestrahlt.

Für die Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängenbereichen simulierten Sonnenlichts wurde der Sonnensimulator SOL2 (Dr. Hönle, Martinsried) in Kombination mit verschiedenen optischen Glasfiltern (Schott Glas, Mainz) verwendet. Der SOL2 enthält einen Metallhalogenid-Hochdruckstrahler in einem lichtdichten Gehäuse mit Schubvorrichtung und

Tür. Durch Reflexion an der gehämmerten Metallbeschichtung der Innenwände des Gehäuses wird eine der Globalstrahlung ähnliche Strahlung erreicht. Auf der Bestrahlungsfläche von 35 x 25 cm² schwankt die Bestrahlungsintensität um weniger als 10 % (DIN 53387, Angaben des Herstellers). Additive Bestrahlungen ohne Ausschalten der Lampe wurden durch einen lichtdichten Schieber ermöglicht.

Tabelle 2-14 Wellenlängenbereiche der Filterkombinationen

Filterkombinationen (Schott): + UG 11, 1 mm	Kantenlage der WG-Filter $\lambda_c(\tau_{i\ max}/2)$	λ mit gemessener Transmission T von 0,0002	Wellenlängenbereich	Bestrahlungsstärke I
WG 305, 2 mm	305 nm	277 nm	277-408 nm	68,3 J/m ² s
WG 335, 3 mm	338 nm	314 nm	315-408 nm	51,3 J/m ² s

Während der Bestrahlung wurden die Zellen auf einem eisgefüllten Metallcontainer gekühlt. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte wie für die UVC-Bestrahlung. Um definierte Wellenlängenbereiche auf die Zellen einwirken zu lassen, wurde zusätzlich zum UG11 Bandpaßfilter (Schwarzglas mit Durchlässigkeit im UV) ein Langpaßfilter auf die Kulturgefäße gelegt. Ein Langpaßfilter hat im kurzwelligen Bereich niedrige Transmission (Sperrbereich) und im langwelligen Bereich hohe Transmission (Paßbereich). Die gewählten Filterkombinationen und die passierenden Wellenlängenbereiche sind in Tabelle 2-14 dargestellt. Der spektrale Reintransmissionsgrad $\tau_i(\lambda)$ ist das Verhältnis des ausdringenden spektralen Strahlungsflusses $(\Phi_{e\lambda})_{ex}$ zum eingedrungenen Strahlungsfluß $(\Phi_{e\lambda})_{in}$ und damit ein Maß für die spektrale Durchlässigkeit der Filter. Die Bezeichnung der WG-Filter von Schott (z.B. 305) gibt in 5 nm Schritten die Wellenlänge an, bei der der spektrale Reintransmissionsgrad zwischen Sperr- und Paßbereich auf die Hälfte seines Maximalwertes abgefallen ist (Halbwertswellenlänge). Die exakte Kantenlage λ_c bzw. Halbwertswellenlänge $\lambda(\tau_{i\ max}/2)$ der Filter ist in Tabelle 2-14 angegeben, die mm-Angaben entsprechen der Dicke der Filter.

Durch Multiplikation der Filtertransmissionsspektren mit dem Spektrum der SOL2 wurden die tatsächlichen Bestrahlungsspektren berechnet. Für die gewählten Filterkombinationen wurden die Bestrahlungsstärken I (in J/m²s bzw. W/m²) durch Integration über die Wellenlängen berechnet. Multipliziert mit den jeweiligen Bestrahlungszeiten in Sekunden ergab dies die Fluenz in J/m² (Abb. 2-8).

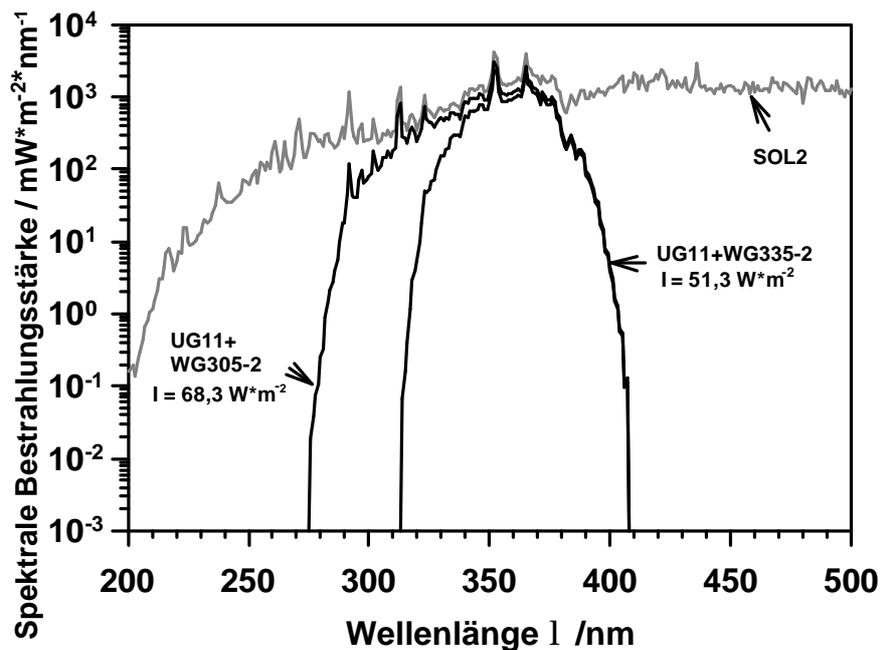


Abb. 2-8 Polychromatische Spektren simulierten Sonnenlichts

Durch Filterung der von einem Metallhalogenid-Hochdruckstrahler (SOL2) emittierten Strahlung mit WG-Filtern wurden polychromatische Spektren erzeugt. Das sichtbare Licht wurde durch den UG11-Filter ausgeschlossen. Messung des SOL2-Spektrums im Bentham DM 300 Spektroradiometer (zur Verfügung gestellt von Dr. Rainer Facius). I, Bestrahlungsstärke bei Verwendung der Filterkombinationen UG11 + WG305-2 bzw. UG11 + WG335-3.

2.3.12 Exposition mit Röntgenstrahlung

Für den Koloniebildungstest (s. 2.3.13) und den Nachweis induzierbarer Genaktivierung (s. 2.3.14) wurden die Zellen in Medium der Röntgenstrahlung ausgesetzt (Dosis 0-10 Gy). Die Röntgenröhre (Müller MG 150, Philipps, Hamburg) wurde mit 150 kV und 19 mA betrieben. Dosis und Dosisleistung wurden mit dem Strahlungsdosimeter WK92G (Wellhöfer Dosimetrie, Schwarzenbruck) gemessen. Die Dosisleistung wurde durch Variation des Abstands der Zellen zum Strahlungsfenster der Röntgenröhre auf 1,8 Gy/min eingestellt. Dieser Focus-Objekt-Abstand (34 cm) wurde bei allen weiteren Bestrahlungen konstant gehalten. Die Petrischalen wurden im zentralen Strahlungsfeld der Röntgenröhre angeordnet.

2.3.13 Koloniebildungstest (*Colony Forming Ability-Test*, CFA-Test)

Der Koloniebildungstest [PUCK UND MARCUS, 1956] ist eine Methode, die es erlaubt, das Überleben von Zellen nach Behandlungen wie beispielsweise Bestrahlung zu ermitteln.

Diese Methode findet ihre Anwendung bei solchen Zellen, die in der Lage sind, Kolonien zu bilden, und somit sowohl bei Mikroorganismen wie Bakterien, Algen und Hefen als auch bei Säugerzellen. Der Vorteil der Methode besteht in der Quantifizierung derjenigen Zellen, die die Behandlung unbeschadet überstehen, also ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit nicht verloren haben und dadurch zu auswertbaren Makrokolonien heranwachsen.

Tabelle 2-15 Formaldehyd-Kristallviolettlösung

0,5 g Kristallviolett	Merck, Darmstadt
50 ml Formaldehyd 33 %	
ad 500 ml <i>Aqua dest.</i>	

Eine konfluent bewachsene Zellkulturflasche T80 wurde trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in Petrischalen (PS, \varnothing 6, 10 und 25 cm, Nunc, Wiesbaden) mit definierter Zellzahl (75 bis 1×10^6) ausgesät. Die Zellzahl wurde so festgelegt, daß die *Plating Efficiency* (= Anheftungseffizienz) und der antizipierte letale Effekt der Bestrahlung kompensiert wurden und 20 bis 100 Kolonien pro PS wuchsen.

Nach Bestrahlung (s. 2.3.11, 2.3.12) wuchsen die überlebenden Zellen in 12-20 Tagen zu auswertbaren Makrokolonien heran. Diese wurden nach Dekantieren des Mediums und Waschen mit PBS mit Formaldehyd-Kristallviolettlösung (Tabelle 2-15) fixiert und gefärbt. Die Zählung der Kolonien erfolgte unter der Stereolupe (Vergrößerung 32fach). Gezählt wurden nur solche Kolonien, die 50 und mehr Zellen enthielten.

2.3.13.1 Auswertung

Die Auswertung der Überlebensdaten mit Berechnung der Dosiseffekturven (DEK) erfolgte mit dem Statistikprogramm DOSE (Dr. Christa Baumstark-Khan, DLR, Köln).

Das Programm berechnet für jede Koloniezahl das relative Überleben (S) und den natürlichen Logarithmus des relativen Überlebens ($\ln S$) aus der *Plating Efficiency* der bestrahlten (PE_B) im Verhältnis zu derjenigen der unbestrahlten Zellen (PE_0). Dabei ist die *Plating Efficiency* als das Verhältnis zwischen der Anzahl ausgezählter Kolonien nach 12-20tägiger Inkubation (K) und der Zellzahl bei Aussaat (Z) definiert. Sie ist ein Maß für die Vitalität der verwendeten Zellen:

$$PE_0 = \frac{K}{Z}$$

Die *Plating Efficiency* bei Dosen > 0 wurde auf die gleiche Weise ermittelt:

$$PE_B = \frac{K}{Z}$$

Das relative Überleben S wurde wie folgt berechnet:

$$S = \frac{PE_B}{PE_0}$$

Das Überleben bei Dosis 0 beträgt damit definitionsgemäß 1.

Der Verlust der Koloniebildungsfähigkeit wird anhand von Überlebens- oder Dosiseffekturven dargestellt, in denen im halblogarithmischen Maßstab das relative Überleben S der Zellen gegen Dosis aufgetragen wird (Abb. 2-9). Die Abnahme der Koloniebildungsfähigkeit wird

durch eine Exponentialfunktion der Dosis beschrieben, welche sich aus der Multitarget-Treffertheorie [KELLERER und HUG, 1968; RONTO *et al.*, 1967] ableitet:

$$S = 1 - (1 - e^{\frac{-D}{D_0}})^n$$

Für den Bereich hoher Dosen läßt sich diese Formel vereinfachen nach

$$\ln S = v \cdot D + \ln n \quad \text{wobei } v = -\frac{1}{D_0}$$

v = Proportionalitätskonstante

D = Dosis

n = Anzahl Targets

$\ln S$ ist damit durch eine Regressionsgerade mit der Steigung v und dem Achsenabschnitt $\ln n$ definiert.

Kenngrößen der Überlebenskurven

Zur Charakterisierung einer Dosiseffektcurve und um einen Vergleich zwischen verschiedenen Überlebenskurven zu ermöglichen, wird jede Dosiseffektcurve durch drei Kenngrößen D_0 , D_q und n charakterisiert, die nach logarithmischer Transformation der Überlebenswerte über eine lineare Regression für den linearen Teil der Kurve berechnet werden (Abb. 2-9).

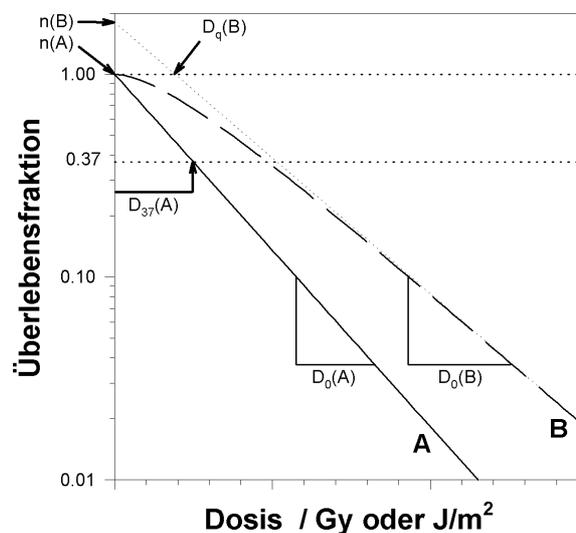


Abb. 2-9 Kenngrößen exponentieller Dosiseffektkurven [KIEFER, 1989]

Der **D_0 -Wert** entspricht dem Kehrwert der Steigung im linearen Bereich der Kurve. Je flacher die Überlebenskurve abfällt, desto größer ist D_0 . Der **D_{37} -Wert** gibt die Dosis an, welche benötigt wird, um das Überleben auf $1/e$ (= 37 %) zu reduzieren. Die **Extrapolationszahl n** entspricht dem Schnittpunkt des extrapolierten linearen Teils der Überlebenskurve (Regressionsgerade) mit der Ordinate. Der **Quasischwelldosiswert D_q** wird aus dem Schnittpunkt der extrapolierten Gerade mit der 100 %-Überlebenslinie ermittelt.

D_q und n sind Maße für die Schulterbreite der DEK. Die drei Kenngrößen stehen miteinander in

Beziehung: $D_q = D_0 \cdot \ln n$

Experimente mit reparaturdefizienten Zellen weisen DEK des A-Typs auf (Abb. 2-9A). B-Typ DEK (Abb. 2-9B) werden mit reparaturprofizienten Zellen erhalten.

2.3.13.2 *Statistische Behandlung der Daten*

Für jede Zelllinie wurden mindestens 3 unabhängige Versuchsreihen durchgeführt, innerhalb derer jeweils 4-6 Petrischalen pro Dosis verwendet wurden. Die relativen Überlebenswerte jeweils einer Dosis wurden zusammengefaßt und Mittelwert und Standardabweichung berechnet, die halblogarithmisch gegen die Dosis aufgetragen wurden.

Aus den Ergebnissen verschiedener Versuchsreihen wurden mit statistischen Standardverfahren (Varianzanalyse, F-Verteilung, Regressionsanalyse, Vergleich der Regressionskoeffizienten mittels Student's-t-Test-Verfahren) die Parameter der DEK (Tabelle 3-10) ermittelt und auf Signifikanzen überprüft [WOODS *et al.* 1982; WEICHELBAUM *et al.* 1980]. Für die statistische Behandlung der Daten wurde das Signifikanzniveau auf $2p \leq 0,05$ festgelegt.

2.3.14 Genaktivierung

Für den Nachweis UV-induzierbarer d2EGFP-Expression wurde eine vierfache NF- κ B-Bindungsstelle als Promotorelement ausgewählt (Tabelle 2-1). Das Plasmid pNF- κ B-d2EGFP wurde zunächst transient und nach Umbau (s. 2.2.3.1) auch stabil in verschiedene Zelllinien transfiziert (s. 2.3.9).

24 h nach ihrer transienten Transfektion mit pNF- κ B-d2EGFP (s. 2.3.9.1, TransFast unter Optimalbedingungen) wurden die AA8- oder HEK-Zellen mit UVC bestrahlt (s. 2.3.11) bzw. PMA, MMC oder TNF- α zugegeben (Tabelle 2-16). Nach der UVC-Bestrahlung wurde das PBS abgesaugt und α -Medium zugegeben. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden pCMV-d2EGFP und pEGFP-N1 sowie als Promotor-Negativkontrolle das Plasmid pd2EGFP-1 verwendet, das keinen Promotor enthält. Bei einigen Versuchen wurde 4 oder 6 h nach Transfektion Medium mit 0,2 % Serum zugegeben. Die Zellen wurden zu bestimmten Zeitpunkten im Fluoreszenzmikroskop (s. 2.4.2) betrachtet, im MTP-Fluorimeter (s. 2.4.5) gemessen und/oder für die FACS-Analyse (s. 2.4.4) trypsinisiert.

Als Nullkontrolle wurde das Lösungsmittel der induzierenden Substanz eingesetzt (Tabelle 2-16).

Tabelle 2-16 Lösungen

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)*

MW 616,8 g/mol

Stammlösung 1 (1 mg/ml) in DMSO*Stammlösung 2* (10 µg/ml) in DMSO

Die Stammlösungen wurden bei –20°C gelagert und innerhalb von 6 Wochen verbraucht.

Mitomycin C (MMC)*

MW 334,3 g/mol

Stammlösung (0,5 mg/ml) in *Aqua. bidest.*, pH 8,0

Die Stammlösung wurde bei –20°C gelagert und innerhalb von 6 Wochen verbraucht.

Tumornekrosefaktor α (TNF- α), human, rekombinant*

MW 17,35 kg/mol

PBS-BSA 1 %

0,1 g Bovines Serumalbumin (BSA), Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt)

10 ml PBS

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

TNF- α -Stammlösung (10 µg/ml) in PBS-BSA 1 %. Die Stammlösung wurde bei –20°C gelagert und innerhalb von 6 Wochen verbraucht.*(Sigma-Aldrich, Steinheim)

Die Auswertung der FACS-Daten aus transienten Transfektionen mit TNF- α -Zugabe erfolgte durch Berechnung des Induktionsfaktors IF_t :

$$IF_t = \frac{F(TNF) - F(pd2EGFP)}{F(BSA) - F(pd2EGFP)}$$

F(TNF) Prozentsatz EGFP(+)-Zellen nach Zugabe von TNF- α zu Zellen, die mit pNF- κ B-d2EGFP transfiziert wurden

F(BSA) Prozentsatz EGFP(+)-Zellen nach Zugabe von PBS-BSA zu Zellen, die mit pNF- κ B-d2EGFP transfiziert wurden

F(pd2EGFP) Prozentsatz EGFP(+)-Zellen bei Transfektion mit pd2EGFP-1

Stabil transfizierte Klone HEK-pNF- κ B/Neo wurden wie unter 2.3.9.1 beschrieben hergestellt und in 24-well-Platten ausgesät. Nach drei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, nach vier Tagen wurde Selektionsmedium mit TNF- α (0,6 nmol/l) zugegeben. Nach 18 h Inkubation wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Klone mit induzierbarer d2EGFP-Expression wurden vermehrt und bis zur weiteren Verwendung eingefroren (s. 2.3.8).

Für Versuche mit verschiedenen potentiell NF- κ B-aktivierenden Agenzien wurde ein stabil transfizierter Klon HEK-pNF- κ B/Neo-Zellen ausgewählt und in 24-well-Platten oder Petri-

schalen (\varnothing 3,5 cm) in einer Dichte von $4,2 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 in Selektionsmedium ausgesät. 3 Tage später erfolgte ein Medienwechsel, bei ~ 50 % Konfluenz. Bei 70-80 % Konfluenz wurden die Zellen Röntgen- (0-5 Gy), UVC- (0-15 J/m^2) oder simulierter Sonnenstrahlung (UVB+UVA 0-4098 J/m^2 , UVA 0-61560 J/m^2) ausgesetzt (s. 2.3.11, 2.3.12) oder PMA wurde zugegeben. PMA wurde nach 2 h Inkubation entfernt. Bei jedem Versuch wurden einige Vertiefungen bzw. Petrischalen als Positivkontrolle mit 0,6 nmol/l TNF- α behandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion im Fluoreszenzmikroskop (s. 2.4.2) betrachtet und für die FACS-Analyse trypsiniert und Formaldehyd-fixiert (2.4.4).

Daten aus mehreren unabhängigen Versuchen wurden kombiniert, das arithmetische Mittel und die Standardfehler berechnet.

Zur Erstellung einer Dosiseffektkurve für den Zeitpunkt 22 h nach Bestrahlung wurde ein Induktionsfaktor berechnet, der den Prozentsatz EGFP(+)-Zellen nach Behandlung mit dem entsprechenden Agens auf den Prozentsatz EGFP(+)-Zellen nach Zugabe von TNF- α bei dem jeweiligen Versuch bezieht:

$$IF_{22h} = \frac{F_b - F_u}{F_{TNF} - F_{BSA}}$$

IF_{22h}	Induktionsfaktor (nach 22 h Inkubation mit dem Agens)
F_b	Prozentsatz EGFP(+)-Zellen nach Behandlung von HEK-pNF- κ B/Neo mit verschiedenen Agenzien
F_u	Prozentsatz EGFP(+)-Zellen nach Scheinbestrahlung von HEK-pNF- κ B/Neo
F_{TNF}	Prozentsatz EGFP(+)-Zellen nach Behandlung von HEK-pNF- κ B/Neo mit TNF- α
F_{BSA}	Prozentsatz EGFP(+)-Zellen nach Behandlung von HEK-pNF- κ B/Neo mit PBS-BSA 1 % (Tabelle 2-16)

Die Induktionsfaktoren aus verschiedenen Versuchen wurden auf symmetrische Verteilung geprüft und für jeden Zeitpunkt der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.4 ANALYTIK

2.4.1 Lichtmikroskopische Dokumentation

Die Lebendbeobachtung der kultivierten Zellen erfolgte an einem umgekehrten Stereomikroskop mit Phasenkontrastoptik (Olympus CK2, Olympus Europe, Hamburg). Die fotografischen Aufnahmen wurden mit einer an das Mikroskop adaptierten Spiegelreflexkamera (Contax 137 MD Quartz, Yashica Europe, Hamburg) vorgenommen (automatische Belichtung, x 0,4). Dabei wurden die Farbdiafilme Kodak Ectachrome 100 ASA verwendet.

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie und Mikrofotografie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde für verschiedene Versuche eingesetzt:

- Bei stabilen Transfektionen mit konstitutiver EGFP-Expression wurden die G418-resistenten Klone auf ihre EGFP-Expression untersucht (s. 2.3.9).
- Bei transienten Transfektionen und / oder Induktionsversuchen wurde vor der Messung im MTP-Fluorimeter bzw. der Fixierung für die FACS-Analyse im Fluoreszenzmikroskop die EGFP- bzw. d2EGFP-Expression und Autofluoreszenz der Zellen überprüft (s. 2.3.9 und 2.3.14).
- Für die Mikrofotografie auf Objektträgern (OT) kultivierter Säugerzellen, dazu wurden die OT wie folgt vorbehandelt:

Mit Ethanol entfettete und sterilisierte OT in einem Quadriperm-Gefäß (In vitro Systems & Services, Osterode) wurden mit $1,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 in 5 ml Selektionsmedium beimpft. Nach 3-7 Tagen wurden die Zellen lebend im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss, Oberkochen) mit dem Standard-FITC(Fluoresceinisothiocyanat)-Filterblock 48 80 09 betrachtet (Anregungsfilter BP 450-490 nm, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 520) und fotografiert (Film: Kodak Ektachrome 400 ASA).

2.4.3 Spektroskopie/ Fluoreszenz- und Transmissionsmessungen

2.4.3.1 Fluoreszenzspektroskopie

EGFP-exprimierende Zellen wurden durch Trypsinieren geerntet, mit 3,5 % Formaldehyd in PBS fixiert, bei 250 x g zentrifugiert und in PBS in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Fluoreszenz-Anregungs- und Emissionsspektren dieser Zellsuspension wurden im Fluoreszenzspektrophotometer F-2000 (Hitachi, Tokio, Japan) aufgenommen. Für die Anregungsspektren wurde die Emission auf 540 nm eingestellt, und für die Aufnahme der Emissionsspektren wurde die Anregung auf 450 nm festgesetzt, um eine Überstrahlung des Anregungslichtes zu vermeiden.

2.4.3.2 Transmissionsmessungen

Die Transmission der Anregungs- und Emissionsfilter des MTP-Fluorimeters (für die Filterkombinationen 485+530 und 460+508, s. 2.4.5) wurde im Spektrophotometer U3310 (Hitachi, USA) gemessen.

2.4.3.3 Berechnung des Fluoreszenzertrages

Die Fluoreszenzspektren wurden normalisiert. Fluoreszenzanregungs- und Emissionsdaten wurden mit Hilfe von Sigma Plot 3.02 pro Wellenlänge mit den Filtertransmissionsdaten multipliziert und die Flächen unter diesen gefalteten Kurven berechnet, um die theoretischen Fluoreszenzerträge von EGFP im MTP-Fluorimeter bei zwei verschiedenen Filtersätzen zu ermitteln.

2.4.4 FACS-Analyse

Für die FACS-Analyse der EGFP-Expression wurden die Zellen abtrypsiniert und mit 3 ml kaltem Formaldehyd, 3,5 % in PBS, auf 0,5 ml Zellen, 30 min im Kühlschrank fixiert. Dann wurden 6,5 ml PBS zugegeben. Bis zur Messung wurden die Zellen im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Messung wurden die Zellen bei 250 x g 5 min bei RT pelletiert. Die Fixierlösung wurde abgesaugt und die Zellen wurden in 4 ml PBS resuspendiert und in Falcon-Rundbodenröhrchen für die FACS-Analyse (Becton Dickinson, Heidelberg) umgefüllt.

Das FACS-Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg) wurde mit fixierten entsprechenden Zelllinien (AA8, UV5, EM9, HEK und stabil transfizierte Linien, Tabelle 3-8) kalibriert. Für jede Messung wurden mit Hilfe der Auswertesoftware CellQuest™ (Becton Dickinson, Heidelberg) Vorwärtsstreuung (*Forward Scatter*) und Seitwärtsstreuung (*Sideward Scatter*) in einem Punktediagramm dargestellt, und in einem Histogramm die Häufigkeit der Ereignisse einer bestimmten Fluoreszenzintensität in Kanal FL-1. Mit Hilfe der EGFP-exprimierenden Zellen und der Ausgangszelllinien wurden Marker für EGFP(-) und EGFP(+)-Zellen in diesen Histogrammen eingestellt. Es wurden 20.000 Zellen pro Probe gemessen. Für die Auswertung wurde der Prozentsatz der EGFP(+)-Zellen und die mittlere Fluoreszenz der EGFP(+)-Zellen (arithmetisches oder geometrisches Mittel) verwendet.

2.4.5 Messung der Fluoreszenz im Mikrotiterplattenfluorimeter

Die EGFP-Fluoreszenz wurde im MTP-Fluorimeter Lamda Fluoro 320 (MWG Biotech, Ebersberg) mit einem Meßkopf (\varnothing 5 mm) von unten (und von oben) gemessen, ohne Temperaturkontrolle und ohne Schütteln. Das Gerät ist mit Interferenzfiltern hoher Qualität ausgerüstet:

- Filtersatz für FITC-Messungen (485/20 + 530/20)
- Zu testende EGFP-Filterkombination (460/40 + 508/20)

Mittlere Fluoreszenzintensitäten und Standardabweichungen wurden mit der KC4 Software Version 2.0, Revision 17 (MWG Biotech, Ebersberg) berechnet.

2.4.5.1 *Eigenfluoreszenz der verwendeten Platten*

Bei Verwendung der Filterkombinationen 485+530 und 460+508 wurde die Autofluoreszenz drei verschiedener MTP-Typen bestimmt. Dazu wurden die MTP (Corning Costar 3603, Cambridge, USA; Cellstar Microplate 655180, Greiner, Frickenhausen; Gewebekulturplatte 96-well 83.1835, Sarstedt, Newton, USA) sowohl leer als auch gefüllt mit 100 μ l PBS oder 100 μ l Medium pro Vertiefung, gemessen.

2.4.5.2 *EGFP-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellzahl und ihre Detektionsschwelle*

Die verwendeten Zelllinien wurden in verschiedenen Zellkonzentrationen in Costar-96-well-Platten ausgesät. Die Messung erfolgte direkt nach der Aussaat (Zellen noch in Suspension) und 24 h später. Es wurden die Filterkombinationen 485+530 und 460+508 mit den Meßkopffpositionen ober- und unterhalb der Platte verwendet.

Die Detektionsschwelle wurde mit Hilfe der Zellzahl-abhängigen Fluoreszenzintensität für adhärente, stabil transfizierte AA8-Zellen berechnet. Als Detektionsschwelle wurde die Anzahl Zellen definiert, bei der die Fluoreszenzintensität der EGFP-exprimierenden Zellen doppelt so hoch ist wie die Autofluoreszenz der untransfizierten Zellen, des Mediums und der MTP. Für den anfänglichen Teil der Kurve wurde für jeden Zellklon eine lineare Regression durchgeführt:

$$f(x) = b(1) \cdot x + b(0)$$

Dabei ist x die Zellzahl, $f(x)$ die Fluoreszenzintensität bei der jeweiligen Zellzahl, $b(1)$ die Steigung und $b(0)$ der Achsenabschnitt der linearen Regression. Die Zellzahl wurde mit Hilfe dieser Formel berechnet, unter der Voraussetzung $f(x) = 2 \cdot \text{Hintergrund}$.

2.4.5.3 UVC-Bestrahlung in 96-well-Platten

AA8-pEGFP-N1 1-Zellen wurden in Costar-96-well-Platten in 100 μ l Medium pro Vertiefung ausgesät. 24 h nach der Aussaat wurden die Zellen bestrahlt (s. 2.3.11). Die Platte wurde vor Bestrahlung und danach einmal täglich über zehn Tage ohne Deckel im MTP-Fluorimeter gemessen. Alle 4 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Der 0 h-Wert wurde mit Hilfe der KC4 Software *well* für *well* von den gemessenen Fluoreszenzwerten ($t > 0$ h) abgezogen, um die Hintergrundfluoreszenz von Platte und Medium vor der Berechnung der relativen Fluoreszenz zu eliminieren. Die Daten aus je drei Versuchen wurden wie unter 2.3.13.1 beschrieben bearbeitet und zusammengeführt, wobei statt der Überlebensfraktion die relative Fluoreszenz der bestrahlten Vertiefungen im Vergleich zu den unbestrahlten berechnet wurde.

2.4.5.4 Transfektionseffizienz

Transfektionseffizienzen in CHO-Zellen wurden für das Plasmid pEGFP-N1 in 24-well-Platten optimiert (s. 2.3.9.2). Die Messung der Fluoreszenzintensität an 13 überlappenden Positionen der Vertiefung erfolgte mit dem Filterpaar 485+530 mit unterer Meßkopfposition.