

Tabelle 3-7 FACS-Analyse EM9-pCX-GFP

Klon	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% EGFP(+)-Zellen	72,4	98,7	95,3	52,3	98,1	60,1	72,7	99,3	98,5
Mittlere Fluoreszenz der EGFP(+)-Zellen (arithmetisch)	189,9	178,9	157,2	707,5	913,6	36,1	78,6	133,6	183,2
Anheftungseffizienz in % \pm SD (n = 6)	28,3 \pm 3,9	16,8 \pm 5,6	22,2 \pm 4,9	72,0 \pm 4,8	55,3 \pm 13,0	38,5 \pm 5,8	91,0 \pm 7,0	42,2 \pm 4,4	47,8 \pm 7,2

Klon 7 zeigte eine fast 100 %ige Anheftungseffizienz (Tabelle 3-7) und ein verändertes, pilzartiges Wachstum und wurde deshalb für weitere Versuche nicht verwendet. Eine nicht transformierten EM9-Zellen ähnliche *Plating Efficiency* von 40-60 % weisen die Klone 5, 8 und 9 auf. Klon 4 zeigt bei der FACS-Analyse eine EGFP(+) und eine EGFP(-) Population, Klon 6 zeigt eine zu geringe Fluoreszenzintensität, Klon 5, 8 und 9 zeigen eine einheitliche, stark grün fluoreszierende Population und waren damit für weitere Experimente geeignet (Abb. 3-12). Die folgenden Experimente wurden mit Klon 8 durchgeführt.

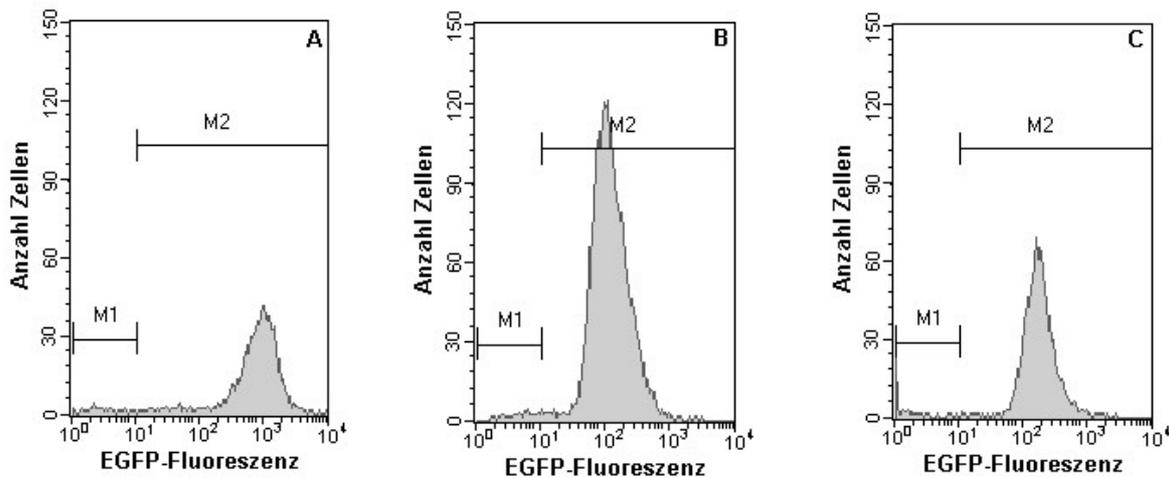


Abb. 3-12 FACS-Analyse von EM9-pCX-GFP

Klone EM9-pCX-GFP 5 (A), 8 (B) und 9 (C), stabile Transfektion von EM9 mit pCX-GFP und pSV2neo. M1, EGFP(-); M2, EGFP(+).

Alle im Laufe dieser Arbeit stabil transfizierten Zelllinien sind in Tabelle 3-8 dargestellt.

Tabelle 3-8 Stabil transfizierte Zelllinien

Laborbezeichnung	Zelllinie	Stabil transfiziert mit	Anzahl isolierter Klone	Hersteller (falls nicht selbst transfiziert)
AA8-pCX-GFP	CHO-AA8	pCX-GFP + pSV2neo	4	BAUMSTARK-KHAN <i>et al.</i> , 1999
AA8-pEGFP-N1	CHO-AA8	pEGFP-N1	5	
AA8-pCMV-d2EGFP	CHO-AA8	pCMV-d2EGFP	5	
AA8-pd2EGFP-1	CHO-AA8	pd2EGFP-1	2	
EM9-pCX-GFP	CHO-EM9	pCX-GFP + pSV2neo	9	
EM9-pEGFP-N1	CHO-EM9	pEGFP-N1	7	
UV5-pCX-GFP	CHO-UV5	pCX-GFP + pSV2neo	4	BAUMSTARK-KHAN <i>et al.</i> , 1999
HEK-pEGFP-N1	HEK	pEGFP-N1	5	
HEK-pd2EGFP-1	HEK	pd2EGFP-1	2	
HEK-pNF- κ B/Neo	HEK	pNF- κ B/Neo	40	

3.2.6 Herstellung EGFP-/d2EGFP-exprimierender Zelllinien ohne Cotransfektion

Um pEGFP-N1 (Tabelle 2-5) als Konstrukt für den Austausch des konstitutiven gegen einen induzierbaren Promotor zu testen, wurden AA8 und EM9 mit diesem Vektor stabil transfiziert.

Bei der Cotransfektion wird das EGFP-Gen durch den Promotor des β -Actin/ β -Globin-Gens des Huhnes gesteuert. Das Neomycinresistenzgen befindet sich auf dem Helferplasmid und ist promotorlos. Es wird nur exprimiert, wenn es unter die Kontrolle des β -Actin/ β -Globin-Gen-Promotors (oder eines starken zellulären Promotors) gelangt. Dieser soll jedoch gegen einen induzierbaren Promotor ausgetauscht werden, d.h. auch das Resistenzgen würde erst nach Induktion exprimiert. Die Klone sollen vor der Induktion bereits mit G418 selektiert werden, deshalb muß das Resistenzgen unter Kontrolle eines eigenen Promotors stehen. Damit beide Gene mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Zelle aufgenommen und eingebaut werden, sollten sie auf einem Plasmid liegen. Diese Voraussetzungen erfüllt pEGFP-N1.

Bei Transfektion von pEGFP-N1 und pCMV-d2EGFP (Abb. 3-3) in AA8-Zellen wuchsen pro Petrischale über 100 Kolonien. Mindestens 20 % dieser Kolonien waren EGFP/d2EGFP(+).

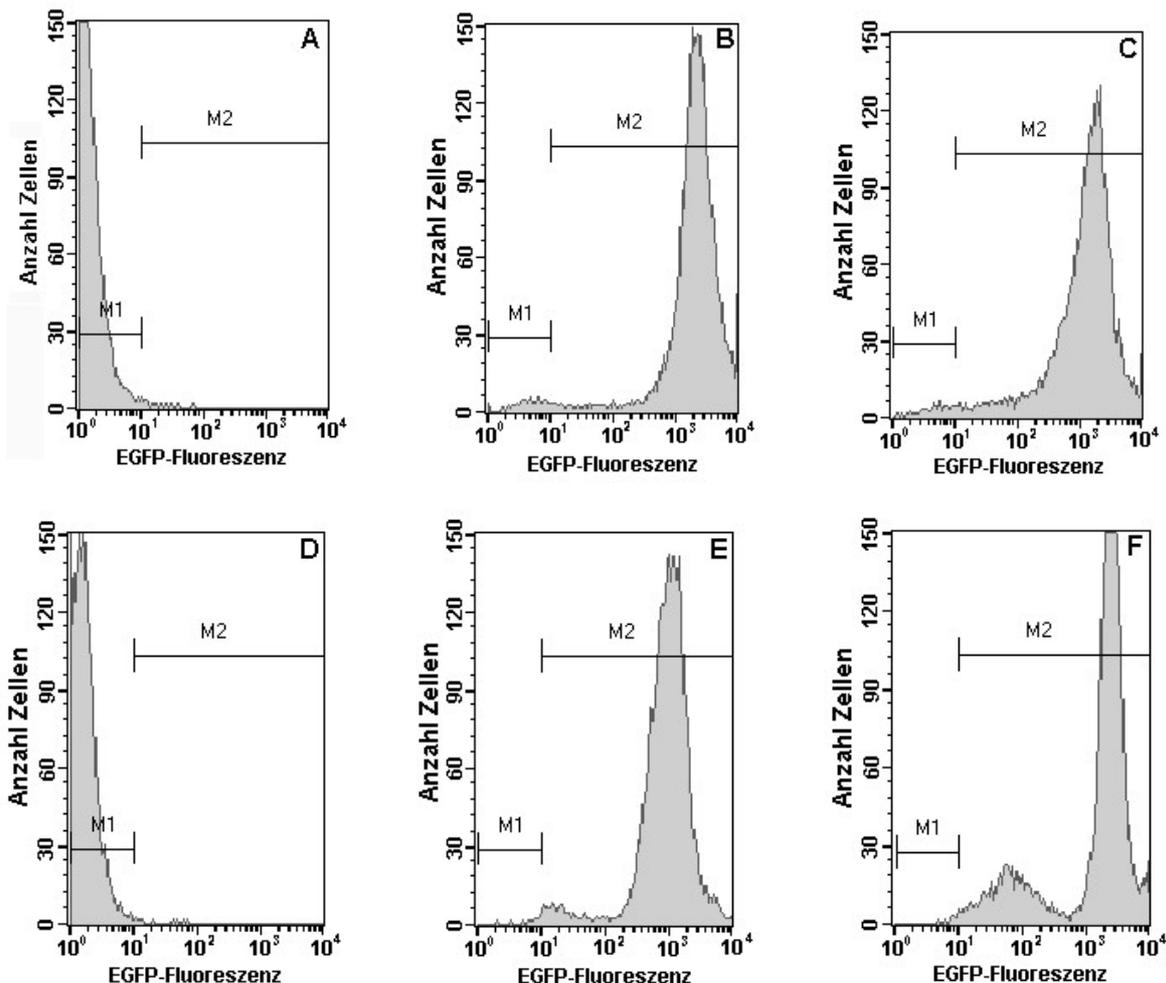


Abb. 3-13 FACS-Analyse stabil mit pEGFP-N1 transfizierter AA8 und EM9

A AA8, untransfiziert, **B** und **C** AA8-pEGFP-N1 1 und 5, **D** EM9 untransfiziert, **E** und **F** EM9-pEGFP-N1 5 und 9. M1, EGFP(-); M2, EGFP(+).

EGFP/d2EGFP-exprimierende Kolonien wurden nach Identifikation im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 3-6B) expandiert und ihre EGFP/d2EGFP-Expression durch FACS-Analyse quantifiziert. Die zwei dargestellten Zelllinien AA8-pEGFP-N1 1 und 5 zeigen gegenüber der Autofluoreszenz unveränderter AA8-Zellen eine 100 bis 1.000fach erhöhte Fluoreszenz, die zudem für eine sehr einheitliche EGFP-Expression spricht (Abb. 3-13B,C und A). Die Linien EM9-pEGFP-N1 5 und 9 weisen zusätzlich eine kleinere Population mit einer Fluoreszenzintensität von 10 bis 100 auf, wobei diese jedoch nur bei EM9-pEGFP-N1 9 ins Gewicht fällt. Für weitere Experimente wurden AA8-pEGFP-N1 Klon 1 und EM9-pEGFP-N1 Klon 5 verwendet.

Es wurden fünf AA8-pCMV-d2EGFP-Klone isoliert (Tabelle 3-9). Die Klone 1, 2 und 4 wurden für die Bestimmung der Halbwertszeit von d2EGFP (s. 3.2.7) verwendet.

Die entstandenen stabil transfizierten Zelllinien wurden für die Evaluierung von EGFP und d2EGFP als Reporter der Genexpression, beide zunächst unter Kontrolle des CMV-Promotors,

verwendet. Mit Hilfe dieser Zelllinien wurden verschiedene Fluoreszenz-Darstellungs- und Meßverfahren erprobt und optimiert (s. 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4).

Außerdem wurden die konstitutiv EGFP-exprimierenden Zelllinien für die Messung zytotoxischer Effekte in Säugerzellen getestet (s. 3.3.2).

Tabelle 3-9

FACS-Analyse AA8-pCMV-d2EGFP

Klon	1	2	3	4	5
% EGFP(+)-Zellen	87,8	81,6	92,6	96,4	70,8
Mittlere Fluoreszenz der EGFP(+)-Zellen (arithmetisch)	36,5	45,4	223,7	142,6	491,9

3.2.7 Halbwertszeit von EGFP und d2EGFP in stabil transfizierten AA8-Zellen

Um d2EGFP und EGFP als Reporter für induzierbare Genexpression zu evaluieren, wurde nach Erprobung verschiedener fluorimetrischer Verfahren ihre Halbwertszeit (HWZ) in den stabil transfizierten AA8-Zelllinien (s. 3.2.6) durch FACS-Analyse der EGFP-Fluoreszenz nach Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid bestimmt (Abb. 3-14).

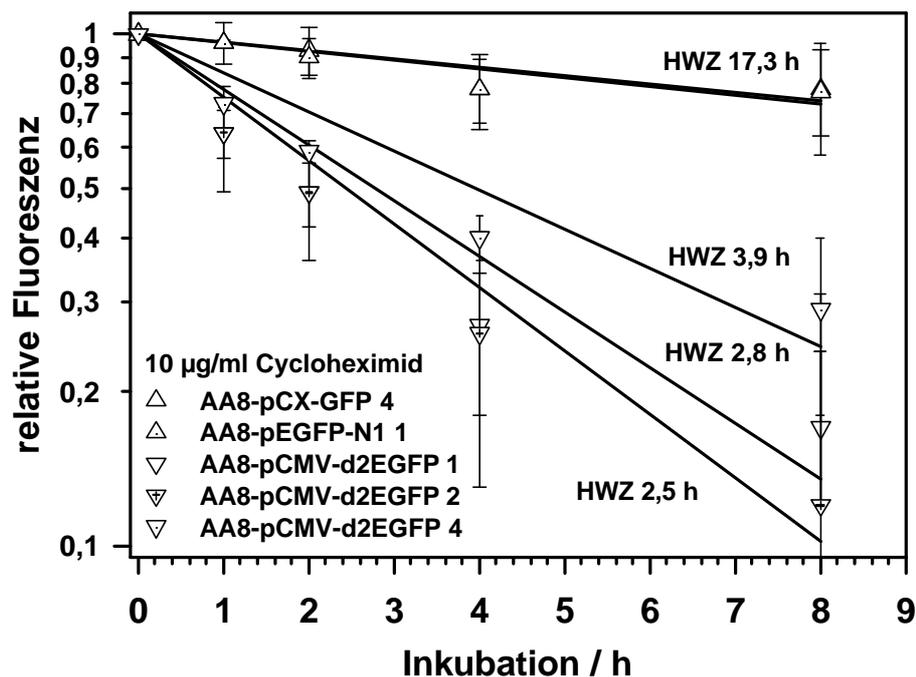


Abb. 3-14 Abfall der Fluoreszenz bei Inkubation verschiedener EGFP- oder d2EGFP-exprimierender Klone mit Cycloheximid.

Fluoreszenzintensitäten wurden im FACS gemessen. Die mittlere Fluoreszenz der Population zu verschiedenen Zeitpunkten wurde auf die Fluoreszenz bei 0 h Inkubation bezogen (relative Fluoreszenz). Mittelwert und Standardfehler dreier unabhängiger Experimente. HWZ = Halbwertszeit von EGFP und d2EGFP in den verschiedenen Zelllinien (s. 2.3.10).

Die Fluoreszenz fällt mit einer durchschnittlichen HWZ von 17,3 h bei EGFP und 3 h bei d2EGFP ab. Nach 24 h Inkubation mit Cycloheximid zeigte AA8-pCMV-d2EGFP keine meßbare Fluoreszenz mehr, die Population war von AA8 nicht mehr zu unterscheiden. EGFP-exprimierende Zellen zeigen eine geringe Reduktion der mittleren Fluoreszenz, aber fast die gesamte Population bleibt in dem als EGFP(+) definierten Bereich.

3.3 KONSTITUTIVE EGFP-EXPRESSION ALS MARKER FÜR ZYTOTOXIZITÄT IN CHO-ZELLEN

3.3.1 Strahlenempfindlichkeit der CHO-Zellen

Die stabile Transfektion beinhaltet einen Einbau fremder DNS in das Genom der transfizierten Zelle und die Expression zweier wirtsfremder Proteine, nämlich EGFP und die Aminoglycosid-Phosphotransferase (APT). Dadurch könnte das Verhalten der Zelle gegenüber verschiedenen Stimuli oder Noxen verändert werden oder die Physiologie der Zelle gestört werden. Insbesondere könnten beim Einbau der fremden DNS in ein Chromosom Gene zerstört werden oder unter die Kontrolle des exogenen Promotors gelangen, auch DNS-Reparaturgene könnten davon betroffen sein. Um solche Effekte zu erkennen und auszuschließen und um den Anteil überlebender Zellen in bestimmten Dosisbereichen für Experimente zur induzierbaren Genexpression (s. 3.4) zu kennen, wurden AA8, AA8-pCX-GFP 4, EM9, EM9-pCX-GFP 8, UV5 und UV5-pCX-GFP 1 hinsichtlich ihrer UVC- und Röntgenstrahlenempfindlichkeit getestet. Dazu wurden Überlebenskurven nach UVC- bzw. Röntgenbestrahlung für diese Zelllinien erstellt. Zum Vergleich der Zelllinien untereinander wurden die Kenngrößen der Dosiseffektkurven (DEK) ermittelt (Tabelle 3-10).

DEK nach UVC-Bestrahlung der Wildtyp-Linien AA8 und AA8-pCX-GFP 4 und der röntgensensitiven Linien EM9 und EM9-pCX-GFP 8 zeigen eine gebogene Form. Ihre D_0 -Werte liegen im Bereich von 3 bis 5.

Die DEK der UV-sensitiven Linien UV5 und UV5-pCX-GFP 1 haben einen rein exponentiellen Verlauf und ihr D_0 -Wert liegt unter 1 (Abb. 3-15A, Tabelle 3-10).

EM9 und die stabil transfizierte Zelllinie EM9-pCX-GFP 8 unterscheiden sich nicht signifikant in ihrem Überleben nach UVC-Bestrahlung (Abb. 3-15A). Der t-Test, mit dem die Regressionskoeffizienten der DEK von EM9 und EM9-pCX-GFP 8 verglichen wurden, ergab eine Wahrscheinlichkeit (P-Wert) von 83 %, daß die Werte einer gemeinsamen Grundgesamtheit angehören. Der T-Wert von 0,21 liegt zwischen dem oberen und unteren kritischen T-Wert von - 1,73 bzw. 1,73 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 und 20 Freiheitsgraden. Das Ergebnis ist also mit der Nullhypothese, daß sich beide Kurven nicht unterscheiden (H_0), verträglich.

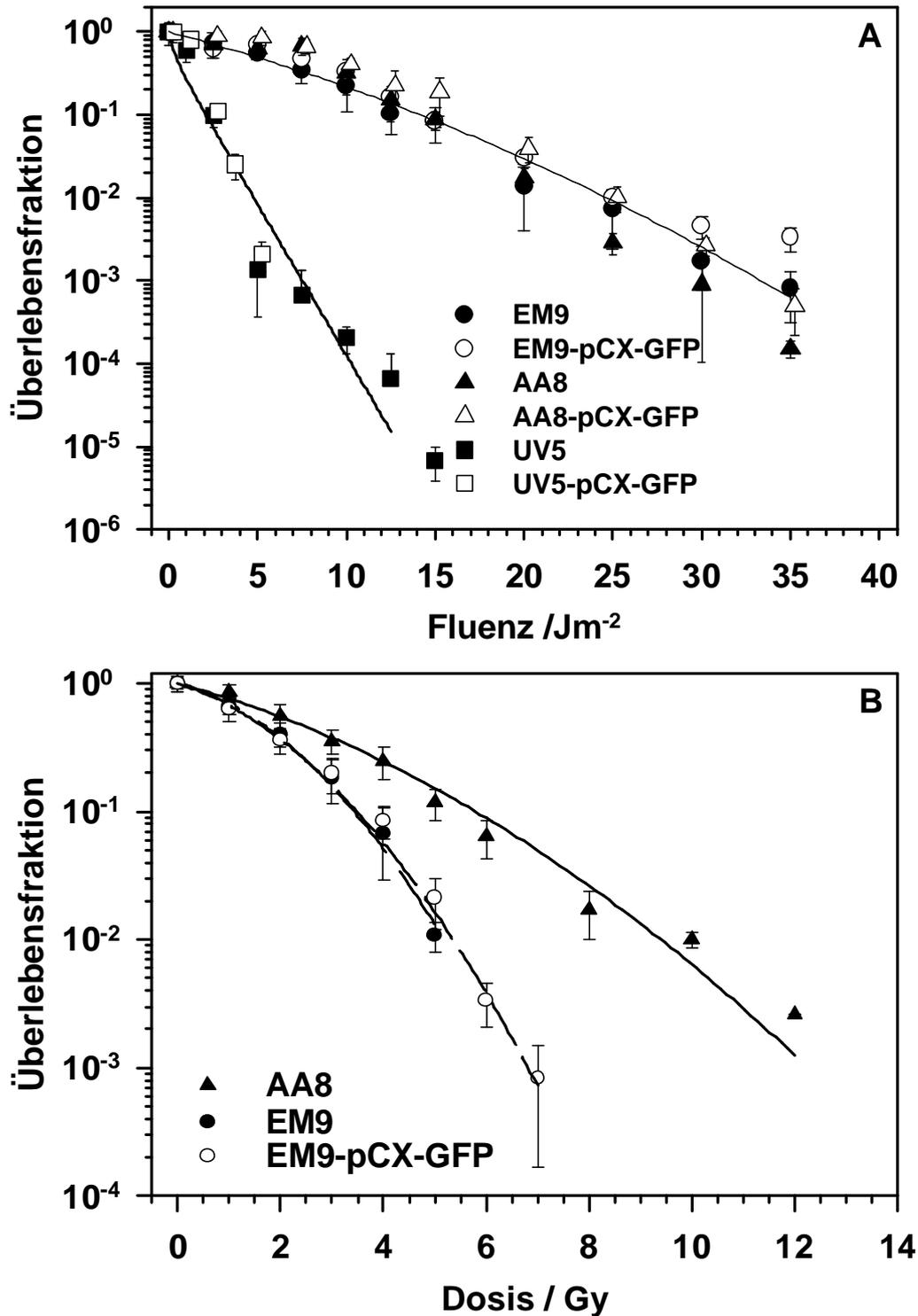


Abb. 3-15 Klonogenes Überleben von AA8, AA8-pCX-GFP, EM9, EM9-pCX-GFP, UV5 und UV5-pCX-GFP nach UVC-Bestrahlung (A) und nach Röntgenbestrahlung (B).

Die Kurven sind Computer-generierte Anpassungen an die Gleichung $S = 1 - (1 - e^{-\frac{D}{D_0}})^n$, wobei S das relative Überleben, D die Dosis und D_0 und n Konstanten sind.

Tabelle 3-10 Strahlenempfindlichkeit von *in vitro* kultivierten CHO-Zellklonen mit und ohne EGFP-Expression (Vektor pCX-GFP)

Strahlenqualität	Zelllinie	D_0	n	D_q	r^2
UVC	AA8	$3,50 \pm 0,10$	$7,32 \pm 1,15$	$6,98 \pm 0,72$	0,87
UVC	AA8-pCX-GFP 4	$3,79 \pm 0,09$	$5,95 \pm 0,68$	$6,77 \pm 0,57$	0,95
UVC	UV5	$0,96 \pm 0,02$	$1,10 \pm 0,18$	$0,09 \pm 0,16$	0,95
UVC	UV5-pCX-GFP 1	$0,87 \pm 0,02$	$1,53 \pm 0,13$	$0,34 \pm 0,08$	0,97
UVC	EM9	$4,42 \pm 0,12$	$1,60 \pm 0,17$	$2,21 \pm 0,50$	0,99
UVC	EM9-pCX-GFP 8	$4,74 \pm 0,23$	$1,60 \pm 0,28$	$2,21 \pm 0,90$	0,98
Röntgen	EM9	$0,98 \pm 0,15$	$2,61 \pm 1,26$	$0,94 \pm 0,58$	0,95
Röntgen	EM9-pCX-GFP 8	$0,75 \pm 0,08$	$9,20 \pm 7,38$	$1,67 \pm 0,68$	0,96
Röntgen	AA8	$1,88 \pm 0,07$	$1,6 \pm 0,18$	$0,88 \pm 0,23$	0,99

D_0	Kehrwert der Steigung der Regressionsgeraden
n	Extrapolationszahl der Regressionsgeraden, entspricht dem Schnittpunkt der extrapolierten Regressionsgerade mit der Ordinate
D_q	Quasisdosisschwellenwert, Schnittpunkt der extrapolierten Gerade mit der 100 % Überlebenslinie
r^2	Bestimmtheitsmaß

EM9 ist die röntgensensitive Mutante von AA8. Sie weist einen Defekt des XRCC1-Gens auf, das an der Einzelstrangbruchreparatur beteiligt ist. EM9 und EM9-pCX-GFP unterscheiden sich nicht in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Röntgenstrahlung (Abb. 3-15B). Die zweifach erhöhte Röntgensensitivität von EM9 im Vergleich zu AA8 wird an den D_0 -Werten deutlich (Tabelle 3-10).

3.3.2 Wachstum UVC-bestrahlter, EGFP-exprimierender Zellen

Da das Zellwachstum durch Messung der Fluoreszenz im MTP-Fluorimeter quantifiziert werden konnte (s. 3.2.4.5), wurde als nächstes untersucht, ob Unterschiede im Zellwachstum, die durch zytotoxische Agenzien ausgelöst werden, erfasst werden können. Als zytotoxisches Agens wurde exemplarisch UVC-Strahlung eingesetzt, da für AA8-Zellen Überlebensdaten nach UVC-Bestrahlung aus dem Koloniebildungstest vorlagen (s. 3.3.1).

24 h nach Aussaat der konstitutiv EGFP-exprimierenden Zellen (AA8-pEGFP-N1 1) wurden die Zellen in einer MTP mit verschiedenen UVC-Dosen bestrahlt. Anhand der alle 24 h im MTP-Fluorimeter (Filter 460+508) gemessenen Fluoreszenz konnte das Wachstum der EGFP-exprimierender Zellen abgeschätzt werden. Nach UVC-Bestrahlung zeigt die AA8-pEGFP-N1 1-Population eine verlängerte lag-Phase und eine geringere maximale Fluoreszenz (Abb. 3-16A), beides dosisabhängig. Abb. 3-16B zeigt die Dosis-Wirkungsbeziehung der Wachstumshemmung zu zwei Meßzeitpunkten aus Abb. 3-16A. Die Dosis-Wirkungsbeziehung zeigt 72 h nach Bestrahlung einen steileren Verlauf als bei 192 h.

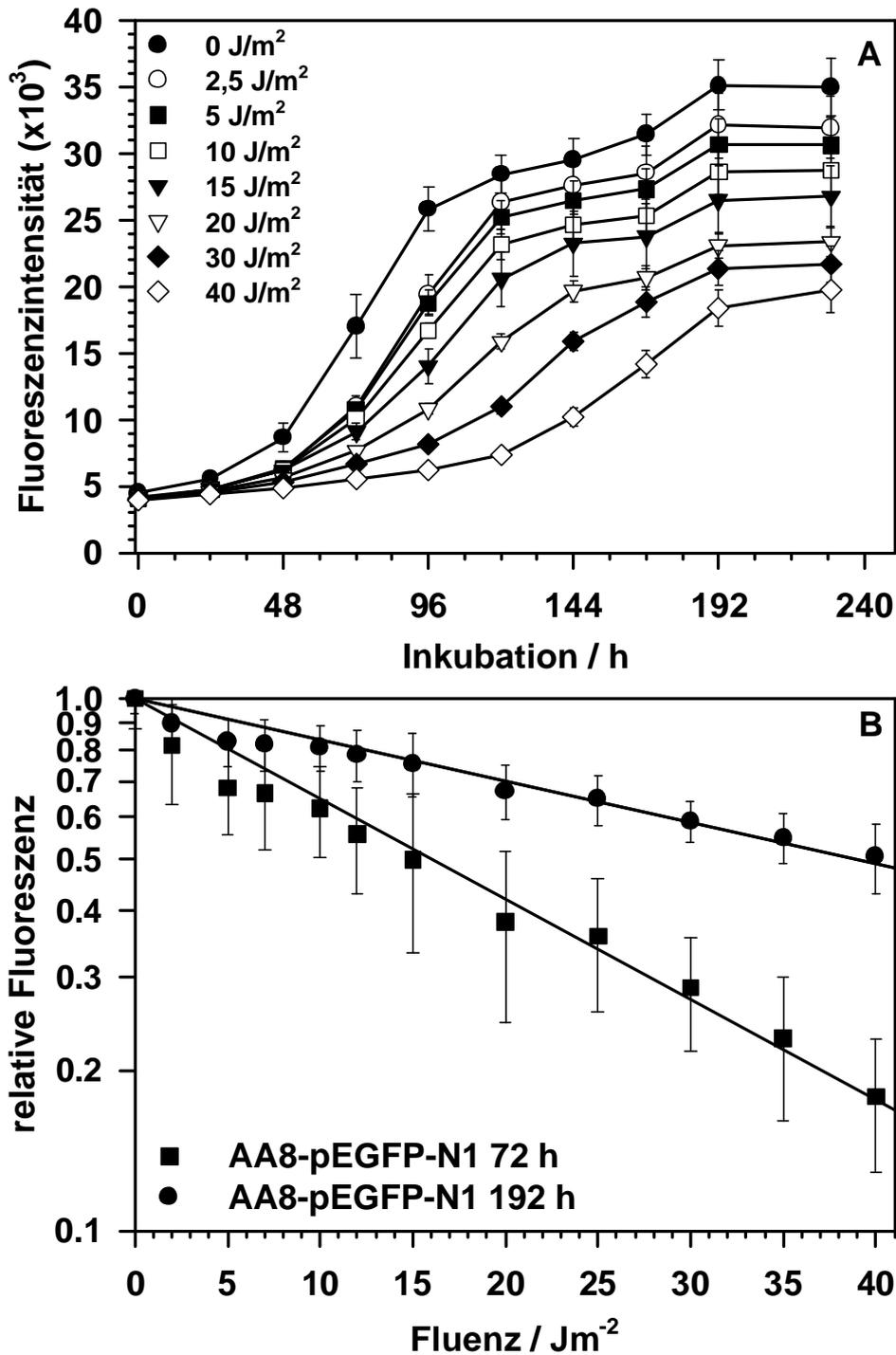


Abb. 3-16 Wachstum von AA8-pEGFP-N1-Zellen nach Bestrahlung mit verschiedenen UVC-Dosen, gemessen im MTP-Fluorimeter (Filter 460+508).

A Repräsentatives Beispiel aus drei Experimenten (Mittelwert und SD, n = 8). **B** Zu den Fluoreszenzdaten nach 72 h und 192 h wurde nach Subtraktion des 0 h-Wertes die Wachstumshemmung als relative Fluoreszenz berechnet (s. 2.4.5.3), die Daten aus drei Experimenten wurden kombiniert und eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt (n = 24, 8 wells pro unabhängigem Experiment).

3.3.3 EGFP-Expression UVC-bestrahlter EM9-pCX-GFP-Zellen

Um den Einfluß von UVC-Bestrahlung auf die EGFP-Expression in konstitutiv EGFP-exprimierenden Zelllinien zu untersuchen, wurde eine FACS-Analyse Formaldehyd-fixierter, UVC-bestrahlter EM9-pCX-GFP 8-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung durchgeführt (Abb. 3-17).

Die UVC-Bestrahlung der EGFP-exprimierenden Zellen führte zu zwei verschiedenen, im FACS meßbaren Effekten. Ein Teil der zuvor EGFP-exprimierenden Zellen verliert die EGFP-Fluoreszenz und unterscheidet sich im Fluoreszenzkanal 1 nicht mehr von untransfizierten AA8, deren Fluoreszenzintensität im Bereich des Markers M1 liegt. Der andere Teil der EGFP-exprimierenden Zellen zeigt eine Zunahme der EGFP-Fluoreszenz pro Zelle. Die UVC-Bestrahlung führte somit zu einer Aufspaltung der ursprünglich einheitlichen Population in eine EGFP(-) und eine stärker EGFP(+) Population. Diese Aufspaltung ist zum ersten Mal nach 24 h postirradiativem Wachstum angedeutet und nach 72 h deutlich zu sehen.

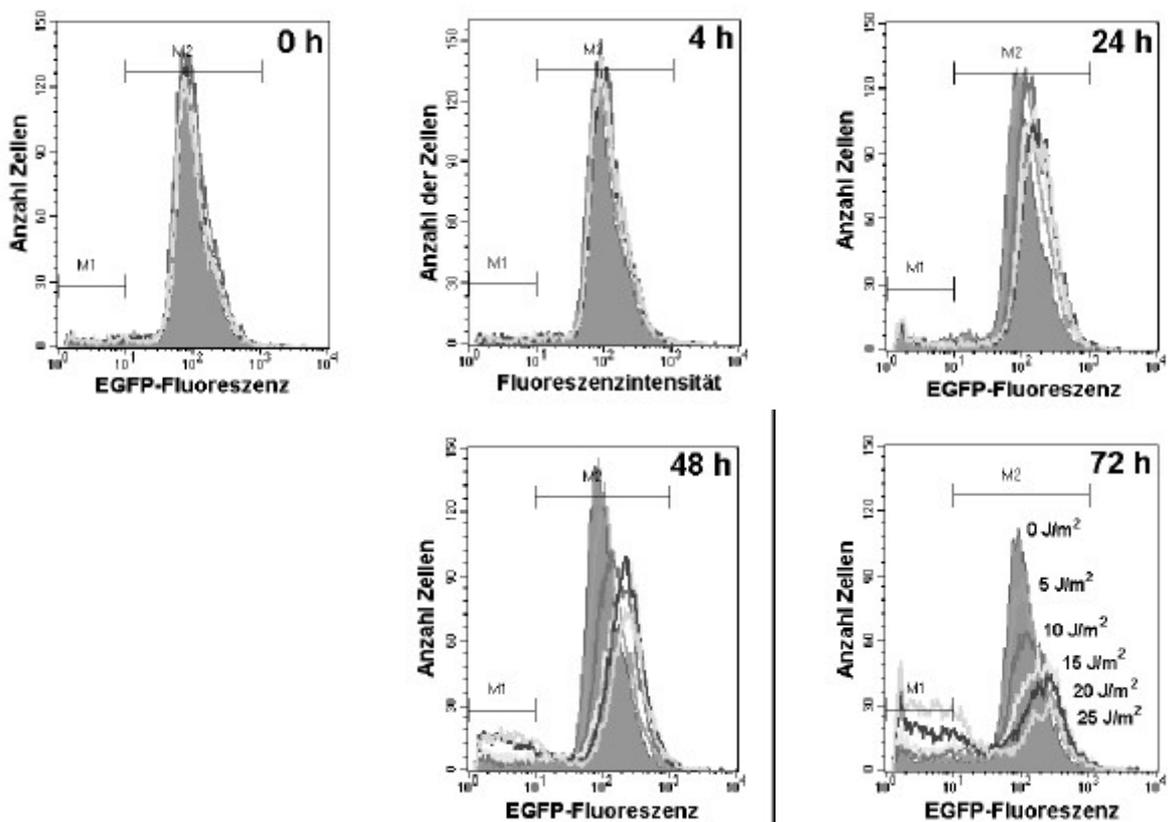


Abb. 3-17 FACS-Analyse von EM9-pCX-GFP 8 nach UVC-Bestrahlung.

EM9-pCX-GFP 8 wurden in Petrischalen ausgesät, drei Tage später mit UVC bestrahlt und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten für die FACS-Analyse trypsinisiert und mit Formaldehyd fixiert. M1, EGFP(-); M2, EGFP(+).

3.4 INDUZIERBARE d2EGFP-EXPRESSION ALS MÖGLICHER MARKER FÜR GENOTOXIZITÄT IN HEK-ZELLEN

Zum Nachweis induzierbarer Genexpression wurden die Vektoren pNF- κ B-d2EGFP (Tabelle 2-1) und pNF- κ B/Neo (s. 3.1.2.2) verwendet, die beide d2EGFP als Reporter gen und 4 NF- κ B-Bindungsstellen als induzierbares Promotorelement enthalten (Tabelle 2-8, Abb. 3-4). Es wurden transiente Transfektionen von AA8- und HEK-Zellen mit pNF- κ B-d2EGFP, und stabile Transfektionen von HEK-Zellen mit pNF- κ B/Neo durchgeführt. Die Aktivierung NF- κ B-abhängiger Genexpression wurde in Abhängigkeit von der Behandlung der Zellen mit PMA, TNF- α , MMC und UVC-, UVB- und UVA-Strahlung anhand der d2EGFP-Expression gemessen. Zur Quantifizierung dieser induzierbaren d2EGFP-Expression wurden die Messung im MTP-Fluorimeter und die FACS-Analyse evaluiert.

3.4.1 Transiente Transfektion mit pNF- κ B-d2EGFP

3.4.1.1 AA8-Zellen, Messung im MTP-Fluorimeter

Um schnelle Ergebnisse über die Induzierbarkeit von NF- κ B-abhängiger Genexpression in AA8-Zellen zu erhalten, wurden sie transient mit pNF- κ B-d2EGFP mit Hilfe von TransFast unter optimierten Bedingungen (s. 2.3.9.2) transfiziert. 24 h später wurde das induzierende Agens (PMA, UVC, MMC) in physiologisch relevanten Dosen appliziert.

Bei allen Versuchen mit AA8 und pNF- κ B-d2EGFP war im MTP-Fluorimeter zu verschiedenen Zeitpunkten keine Zunahme der Fluoreszenz nach Behandlung mit UVC, MMC oder PMA meßbar. Bei dem als Negativkontrolle verwendeten promotorlosen Plasmid pd2EGFP-1 zeigten einige Zellen im Fluoreszenzmikroskop EGFP-Fluoreszenz, ebenso einige der mit pNF- κ B-d2EGFP transfizierten Zellen vor Induktion. Wegen eines möglichen Einflusses von Serumkomponenten auf die Aktivierung und Bindung von NF- κ B an seine Bindungsstellen wurde getestet, wie stark die Serumkonzentration im Medium reduziert werden kann, ohne die Zellen zu beeinträchtigen (Abb. 2-3), und ob eine verminderte Serumkonzentration vor und während der Induktion die Zahl der spontan d2EGFP-exprimierenden Zellen vermindert (s.u.).

3.4.1.2 HEK-Zellen, Messung im MTP-Fluorimeter

Da bei den transienten Transfektionen von AA8-Zellen mit nachfolgender Induktion durch verschiedene Agenzien keine erhöhte Fluoreszenz gemessen werden konnte, wurde die Zelllinie HEK/293 getestet, in der NF- κ B durch TNF- α aktivierbar ist (s. 4.3). HEK-Zellen wurden transient mit Hilfe von TransFast mit pNF- κ B-d2EGFP transfiziert und 24 h später wurde das induzierende Agens appliziert.

HEK-Zellen zeigen ein schnelles Wachstum und eine hohe Transfektionseffizienz (s. 2.3.9.2). Eine stabile Transfektion der HEK-Zellen mit pEGFP-N1 war möglich (Abb. 3-6D).

Da verschiedene schädigende Behandlungen der Zellen zu einer Zunahme der Autofluoreszenz der Zellen im gelbgrünen Bereich führen können, die im MTP-Fluorimeter meßbar sein kann, wurde bei der Induktion mit PMA eine Platte mit untransfizierten HEK-Zellen mit PMA behandelt und parallel zu der transfizierten Platte gemessen. Eine Zunahme der Fluoreszenz konnte weder bei den transfizierten noch bei den untransfizierten Zellen nach PMA-Behandlung oder UVC-Bestrahlung gemessen werden. Bei Behandlung mit MMC dagegen konnte mit steigender Dosis eine geringgradige Abnahme der Fluoreszenz festgestellt werden.

3.4.1.3 HEK-Zellen, Behandlung mit TNF- α

Da weder UVC, MMC noch PMA in transfizierten AA8- bzw. HEK-Zellen eine meßbare d2EGFP-Expression auslösten, wurde Tumornekrosefaktor α (TNF- α) zur Aktivierung von NF- κ B eingesetzt. TNF- α soll durch Interaktion mit dem TNF-Rezeptor in der Membran der HEK-Zellen über eine Kaskade von Kinasen NF- κ B im Zytoplasma aus seiner Bindung an I κ B freisetzen, so daß NF- κ B im Zellkern seine Transkriptions-beeinflußende Wirkung ausüben kann (s. 4.3). TNF- α wurde in PBS-BSA 1 % gelöst, als Negativkontrolle wurden die Zellen deshalb mit dieser BSA-Lösung behandelt.

Das Medium wurde 4 h nach der Transfektion gewechselt und durch Medium mit 0,2 bzw. 10 % Serum ersetzt, um mögliche Auswirkungen optimaler und minimaler Serumgehalte des Mediums auf die basale und induzierbare d2EGFP-Expression der mit pNF- κ B-d2EGFP transfizierten HEK-Zellen zu untersuchen. Zur Detektion der d2EGFP-Expression wurde die FACS-Analyse (Abb. 3-18) und die Messung im MTP-Fluorimeter (Abb. 3-19) eingesetzt.

Bei transienter Transfektion ist in der FACS-Analyse eine Erhöhung des Anteils EGFP(+)-Zellen nach Behandlung mit TNF- α um den Faktor 2 zu beobachten, im Vergleich zu PBS-BSA 1 % behandelten Zellen (Abb. 3-18). Maxima der Induktion liegen nach 8 h und 20 h, dabei waren bis zu 10 % der TNF- α -behandelten Zellen EGFP(+). Auch nach 24 h ist kein deutlicher Abfall des Anteils EGFP(+)-Zellen festzustellen. Eine Dosisabhängigkeit der Induktion wurde im Bereich 0,6-6,0 nmol/l TNF- α nicht gemessen.

Bei Verwendung von 0,2 % Serum sind eine stärkere Streuung der Induktionsfaktoren und wenige absolut höhere Induktionsfaktoren als bei 10 % Serum zu beobachten.

Vor Fixierung der Proben für die FACS-Analyse (Abb. 3-18) wurde die 24-well-Platte im MTP-Fluorimeter gemessen (Abb. 3-19). Eine Transfektion der HEK-Zellen mit den Vektoren pCMV-d2EGFP und pEGFP-N1 wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz durchgeführt. Die mit pNF- κ B-d2EGFP transfizierten und mit TNF- α behandelten Zellen unterscheiden sich in der im MTP-Fluorimeter gemessenen Fluoreszenzintensität nicht von den mit PBS-BSA 1 % behandelten Zellen oder mit pd2EGFP-1 transfizierten Zellen, sowohl bei Inkubation in Medium mit 10 % als auch mit 0,2 % Serum.

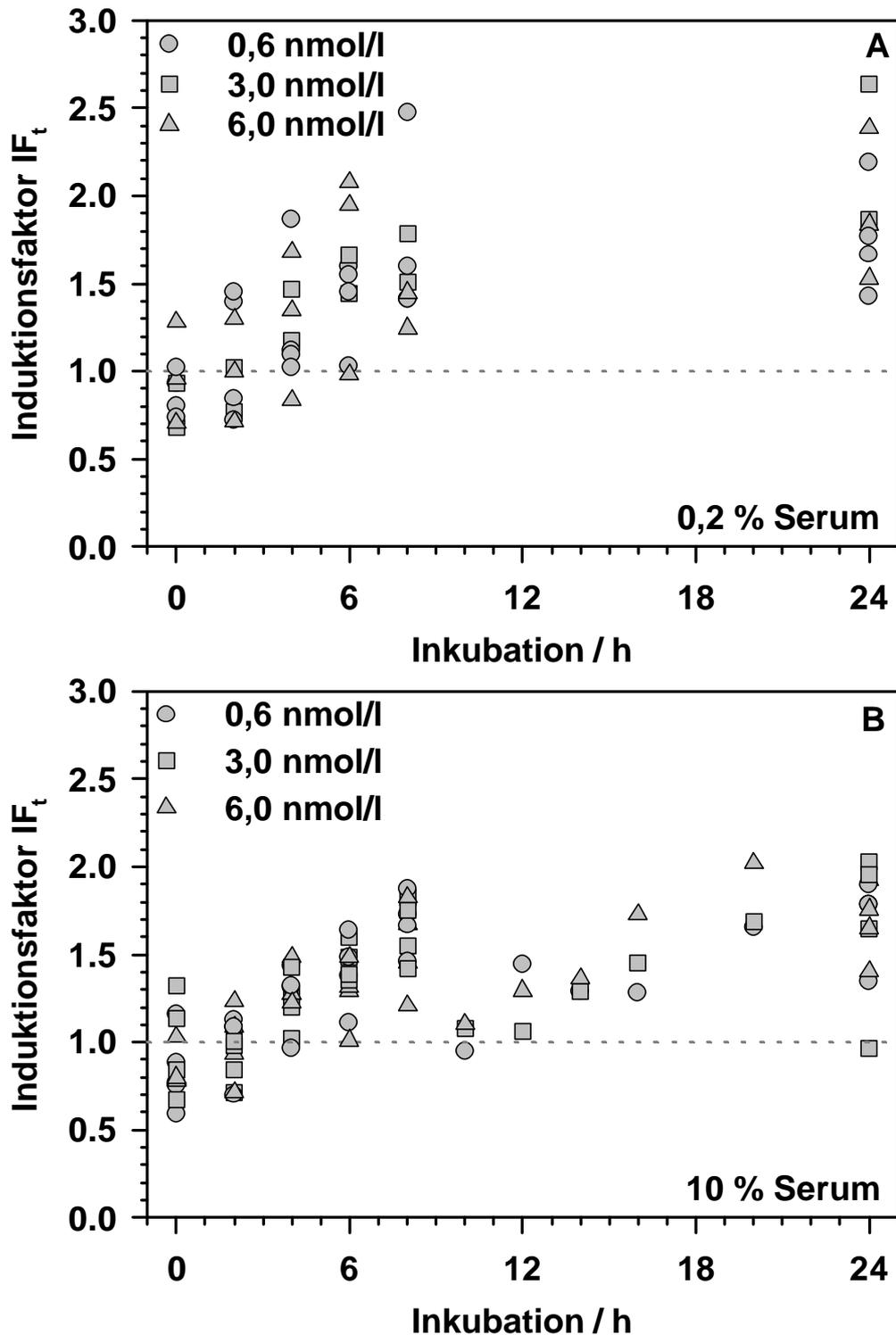


Abb. 3-18 Messung der NF- κ B-abhängigen d2EGFP-Expression nach TNF- α -Behandlung in transienten Transfektionen (FACS-Analyse)

Transiente Transfektion von HEK-Zellen mit pNF- κ B-d2EGFP, Behandlung mit TNF- α 24 h nach der Transfektion (entspricht 0 h in dieser Grafik). Induktionsfaktor für transiente Transfektionen (s. 2.3.14). Werte aus vier unabhängigen Versuchen. Inkubation in 0,2 % Serum (A) oder 10 % Serum (B).

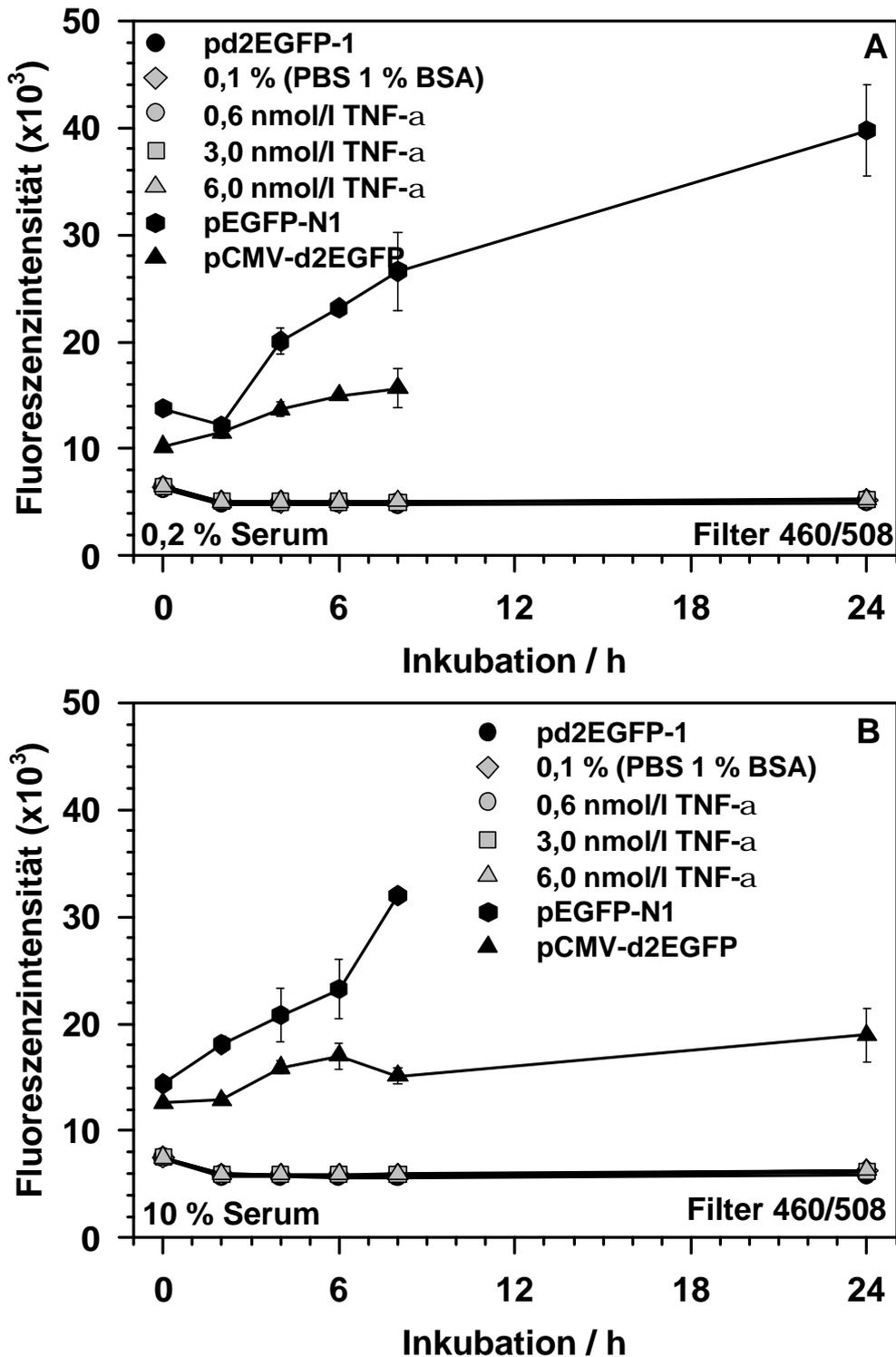


Abb. 3-19 Messung der NF- κ B-abhängigen d2EGFP-Expression nach TNF- α -Behandlung in transienten Transfektionen (MTP-Fluorimeter)

Transiente Transfektion von HEK-Zellen mit pNF- κ B-d2EGFP (graue Symbole), Behandlung mit TNF- α 24 h nach der Transfektion (entspricht 0 h in dieser Grafik). Positivkontrolle der Transfektion mit den Vektoren pEGFP-N1 und pCMV-d2EGFP (24 h nach Transfektion ist bereits EGFP- bzw. d2EGFP-Expression vorhanden). Negativkontrolle mit pd2EGFP-1. Mittelwert und Standardfehler (n=3). Inkubation in 0,2 % Serum (A) oder 10 % Serum (B).

3.4.2 Stabile Transfektion von HEK-Zellen mit pNF- κ B/Neo

Da bei der transienten Transfektion nicht alle Zellen die Plasmid-DNS aufnehmen und maximal eine Verdopplung des Anteils EGFP(+)-Zellen nach Behandlung transient transfizierter HEK-Zellen mit TNF- α meßbar war, wurden stabile Klone hergestellt, bei deren Verwendung die Plasmidaufnahme kein limitierender Faktor mehr ist. Durch Aussaat der G418-resistenten Zellen in einer Konzentration von 50 Zellen pro MTP und anschließender 10-20tägiger Kultivierung wurden 40 G418-resistente Klone isoliert. Jeder Klon wurde in Vertiefungen von 24-well-Platten ausgesät und bei 80 % Konfluenz mit 0,6 nmol/l TNF- α behandelt. Eventuelle grüne Fluoreszenz wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von TNF- α (0, 6, 18, 24, 48 h) im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Von 40 Klonen zeigten 27 Klone (67,5 %) keine, sieben Klone (17,5 %) schwache und sechs Klone (15 %) deutliche EGFP-Fluoreszenz. Aus diesen sechs Klonen sollte ein Klon ausgewählt werden, bei dem ein hoher Anteil der Population nach TNF- α -Behandlung eine starke d2EGFP-Expression zeigt. Dazu wurde zunächst der zeitliche Verlauf der EGFP-Fluoreszenz bei einem der sechs Klone untersucht, um den optimalen Zeitpunkt zur Messung der Fluoreszenz nach Induktion bei den sechs Klonen zu bestimmen.

3.4.2.1 Kinetik der d2EGFP-Expression nach Behandlung mit TNF- α

Ein stabil transfizierter Klon HEK-pNF- κ B/Neo wurde zu verschiedenen Zeiten nach Zugabe von TNF- α auf seine d2EGFP-Expression durch FACS-Analyse untersucht (Abb. 3-20). Bei den mit PBS-BSA 1 % behandelten Proben bleibt die Anzahl EGFP(+)-Zellen zwischen 4 und 6 % der Gesamtpopulation, während bei den TNF- α -behandelten Zellen nach 6 h ein geringer und nach 18 h ein starker Anstieg der EGFP(+)-Zellen zu verzeichnen ist. Auch nach 24 h ist die grüne Fluoreszenz der Zellen weiterhin nachweisbar. Zwischen 20 und 24 h ist der Anteil wieder geringer, diese verminderte d2EGFP-Expression kann jedoch dadurch bedingt sein, daß die nach 2, 4, 6, 8 und 24 h sowie nach 16, 18, 20 und 22 h gemessenen Expressionswerte aus unterschiedlichen Ansätzen stammen.

Da nach 18 h ein deutlicher Anstieg der d2EGFP-Expression zu verzeichnen war, wurde die d2EGFP-Fluoreszenz bei den sechs induzierbaren und zwei nicht-induzierbaren Klonen nach 18 h Inkubation mit TNF- α gemessen, um einen geeigneten Klon für weitere Experimente zu identifizieren (Abb. 3-21).

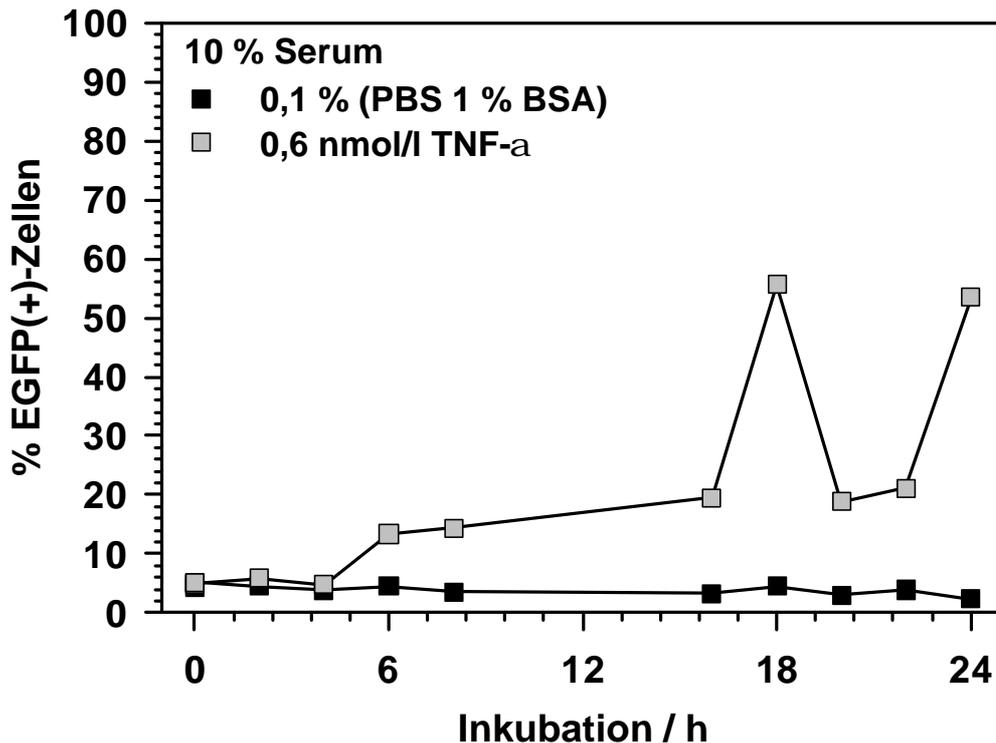


Abb. 3-20 Kinetik der induzierten d2EGFP-Expression

Behandlung eines HEK-pNF- κ B/Neo-Klons mit TNF- α 72 h nach Aussaat, FACS-Analyse

Klon 2 zeigt 18 h nach Behandlung mit TNF- α den höchsten Prozentsatz EGFP(+)-Zellen (Abb. 3-21). Wie bei Klon 1 führt die Inkubation mit 0,1 % (PBS-BSA 1 %) zu einem Anteil EGFP(+)-Zellen von ~ 5 %. Bei Klon 4 führt PBS-BSA zu einer starken Erhöhung des Anteils EGFP(+)-Zellen, die aber deutlich geringer ist als nach Induktion mit TNF- α . Klon 2 zeigte bei allen weiteren Versuchen, bei denen PBS-BSA als Kontrolle mitgeführt wurde, keine Induktion der d2EGFP-Expression durch PBS-BSA.

Behandlung von Klon 3 und 5 mit PBS-BSA verursacht weniger als 1 % EGFP(+)-Zellen, wobei aber durch TNF- α maximal 45 % positive Zellen entstehen. Klon 7 und 8 zeigen keinerlei Erhöhung des Anteils EGFP(+)-Zellen in der gemessenen Population 18 h nach Zugabe von TNF- α .

Zur Verdeutlichung der in Abb. 3-21 dargestellten prozentualen Anteile EGFP(+)-Zellen sind in Abb. 3-22 die Ergebnisse der FACS-Analyse für drei Klone als Histogramm der Fluoreszenzintensität vor Zugabe und 18 h nach Zugabe von TNF- α bzw. PBS-BSA dargestellt.

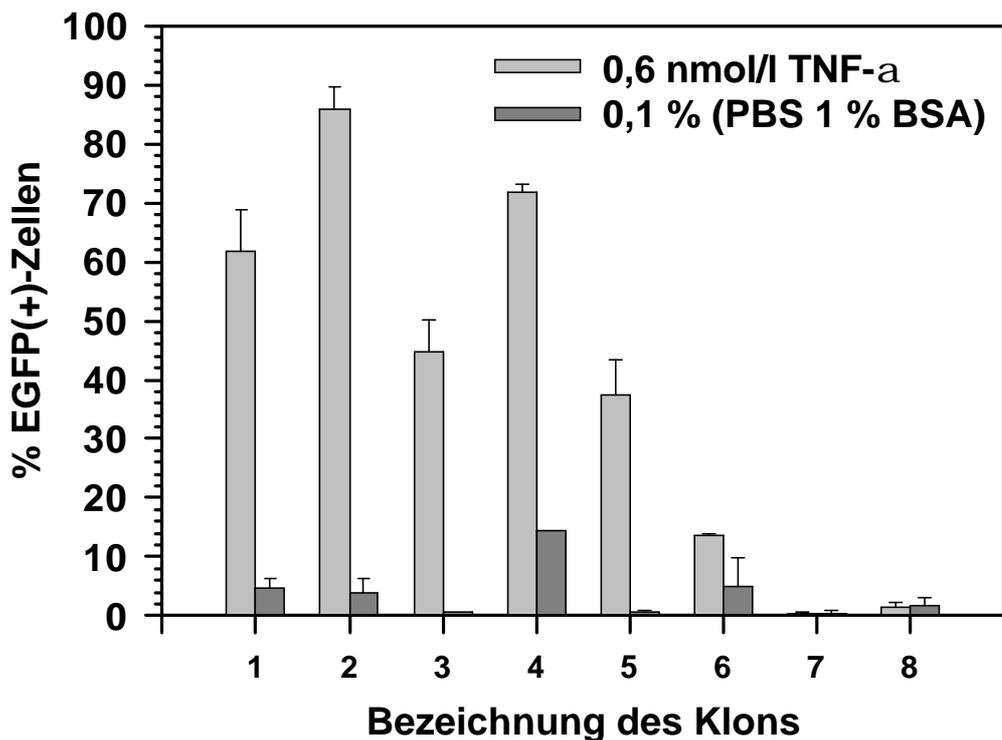


Abb. 3-21 Vergleich der TNF- α -induzierbaren d2EGFP-Expression verschiedener HEK-pNF- κ B/Neo-Klone

d2EGFP-Expression 18 h nach Behandlung von HEK-pNF- κ B/Neo-Klonen mit TNF- α 72 h nach Aussaat. Inkubation in Medium mit 10 % Serum. FACS-Analyse, Mittelwerte und Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die Klone 1 und 2 zeigen nach 18-stündiger Inkubation mit TNF- α eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität, so daß über 60 % der Zellen in den als EGFP(+) definierten Bereich (Marker M2) fallen (Abb. 3-22A und B).

PBS-BSA 1 % führt bei keinem der beiden Klone zu einer Induktion der d2EGFP-Expression. Klon 7 zeigt keine TNF- α -induzierbare d2EGFP-Expression nach 18 h, außerdem ist die Ausgangsfluoreszenz bei diesem Klon geringer verglichen mit Klon 1 und 2, und nur sehr wenige Zellen zeigen eine Fluoreszenzintensität, die in den Bereich des Markers M2 fällt, im Gegensatz zu fast 5 % EGFP(+)-Zellen bei den unbehandelten Klonen 1 und 2 (Abb. 3-22C, Abb. 3-21A).

Um bei weiteren Experimenten ein hohes Fluoreszenzsignal für die gesamte Population zu erreichen, wurde Klon 2, der den höchsten Anteil TNF- α -induzierbarer Zellen aufweist, ausgewählt.

Mit Klon 2 wurden die Fluoreszenzmikroskopie und die Messung im MTP-Fluorimeter bzw. im FACS auf ihre Eignung zum Nachweis der NF- κ B-abhängigen d2EGFP-Expression überprüft. Mit der geeigneten Meßmethode wurde dann in Klon 2 die Induktion des NF- κ B-Pathways durch den Phorbolster PMA und unterschiedliche Strahlenarten untersucht.

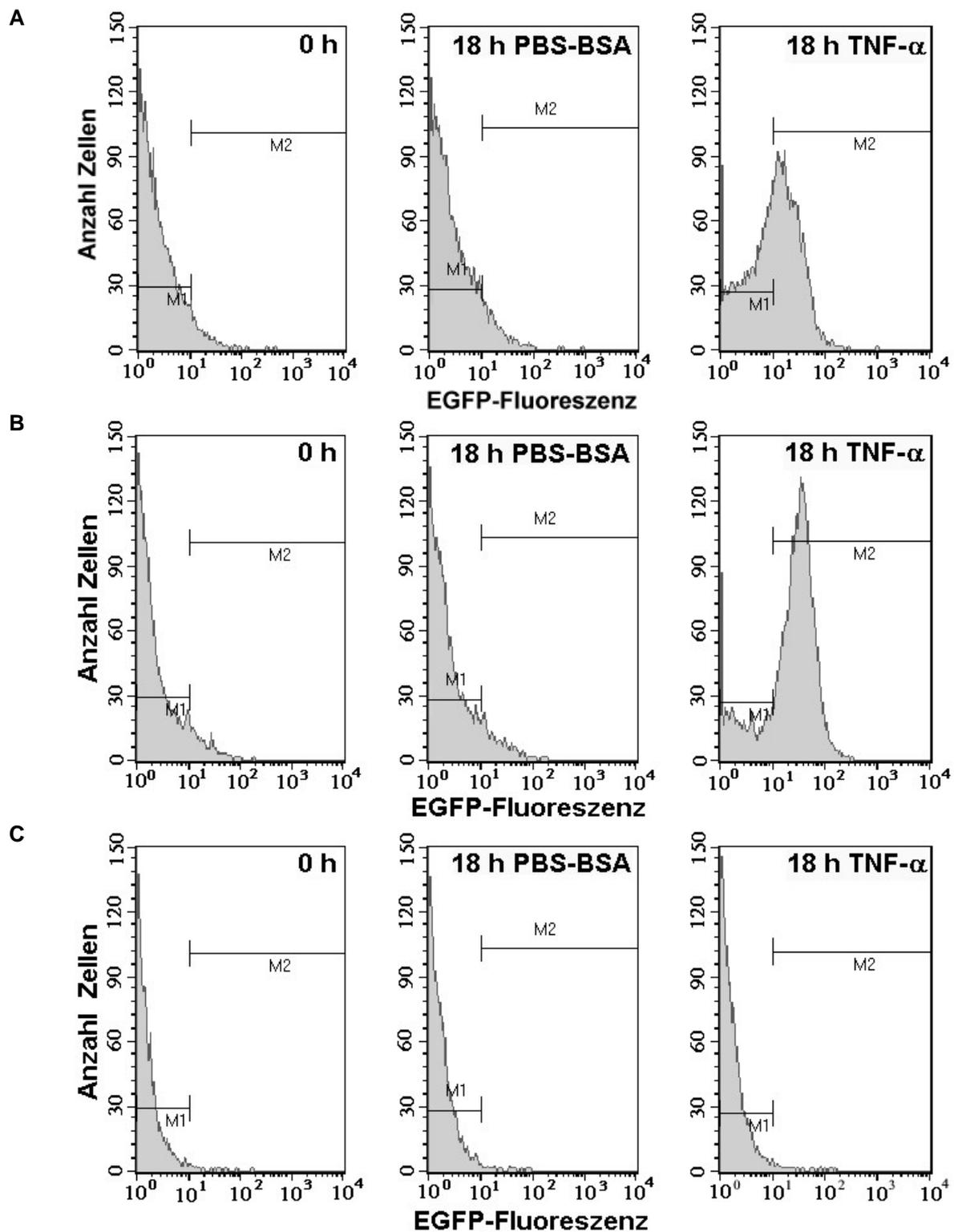


Abb. 3-22 Beispiele für Klone mit TNF- α -induzierbarer d2EGFP-Expression

FACS-Analyse von HEK-pNF κ B/Neo-Klonen vor und 18 h nach Behandlung mit 0,6 nmol/l TNF- α 72 h nach Aussaat. Inkubation in Medium mit 10 % Serum. Repräsentatives Beispiel aus 3 unabhängigen Experimenten (Abb. 3-21): Klon 1 (A), Klon 2 (B) und Klon 7 (C). M1, EGFP(-); M2, EGFP(+).

3.4.2.2 *Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop*

Eine Beobachtung der induzierten d2EGFP-Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop war möglich und erlaubte eine Vorauswahl der induzierbaren Klone (3.4.2.1) und die Unterscheidung der grünen d2EGFP-Fluoreszenz von der gelbgrünen bis gelb-orangefarbenen Autofluoreszenz der Zellen.

3.4.2.3 *Messung im MTP-Fluorimeter*

Bei transienter Transfektion und Induktion mit TNF- α war die im FACS meßbare Erhöhung des Anteils EGFP(+)-Zellen um den Faktor zwei im MTP-Fluorimeter nicht nachvollziehbar, wobei die absoluten Werte nicht mehr als 10 % EGFP(+)-Zellen betragen (Abb. 3-18, Abb. 3-19). Die Detektionsschwelle bei transienten Transfektionen liegt bei mindestens 7 % konstitutiv EGFP-exprimierenden AA8-Zellen (CMV-Promotor) in einem konfluenten Zellrasen (s. 3.2.4.6), die jedoch eine wesentlich höhere Fluoreszenzintensität aufweisen als TNF- α -behandelte HEK-pNF κ B/Neo-Zellen.

Auch bei stabiler Transfektion ist nur eine minimale Fluoreszenzzunahme bei TNF- α -Behandlung meßbar (Abb. 3-23B), die über 70 % EGFP(+)-Zellen in der FACS-Analyse entspricht. Die mittlere Fluoreszenzintensität bei FACS-Analyse dieser Zellen beträgt jedoch maximal 80, bei konstitutiver EGFP-Expression dagegen ~ 1.200 (AA8-pEGFP-N1 1, Abb. 3-9).

3.4.2.4 *Messung im FACS*

Sowohl bei transienten als auch bei stabilen Transfektionen und Induktion der NF- κ B-abhängigen d2EGFP-Expression mit verschiedenen Agenzien erlaubte das FACS die Quantifizierung der Fluoreszenz in Formaldehyd-fixierten Zellen (Abb. 3-18, Abb. 3-20 bis Abb. 3-26). Die Marker M1 (EGFP(-)) und M2 (EGFP(+)) wurden mit Hilfe der unbehandelten und der TNF- α -behandelten HEK-pNF- κ B/Neo Klon 2-Zellen gesetzt. Als Maß für die Induktion wurde der Anteil der Population gewählt, der in den Bereich des Markers M2 fällt (EGFP(+)-Zellen). Eine Berücksichtigung der mittleren Fluoreszenz der Zellen brachte keine Verbesserung der Aussagekraft.

3.4.2.5 *Behandlung mit PMA*

Ein Behandlung des Klons 2 mit dem Phorbolster PMA führt zu einer erhöhten d2EGFP-Expression, die im Vergleich zu TNF- α jedoch insgesamt einen geringeren Anteil der Population erfasst und langsamer beginnt (Abb. 3-24). Während bei Zugabe von TNF- α schon 6 h später über 50 % der Zellen d2EGFP-Expression zeigen und das Maximum zwischen 20 und 28 h erreicht wird, ist bei zweistündiger Behandlung mit PMA nach 6 h fast keine erhöhte Fluoreszenz nachweisbar. Das Maximum der d2EGFP-Expression wird 48 h nach PMA-Zugabe erreicht (Abb. 3-24). Eine Dosisabhängigkeit der d2EGFP-Induktion ist im Bereich von 16-160 nmol/l PMA nicht zu erkennen (Abb. 3-23A).

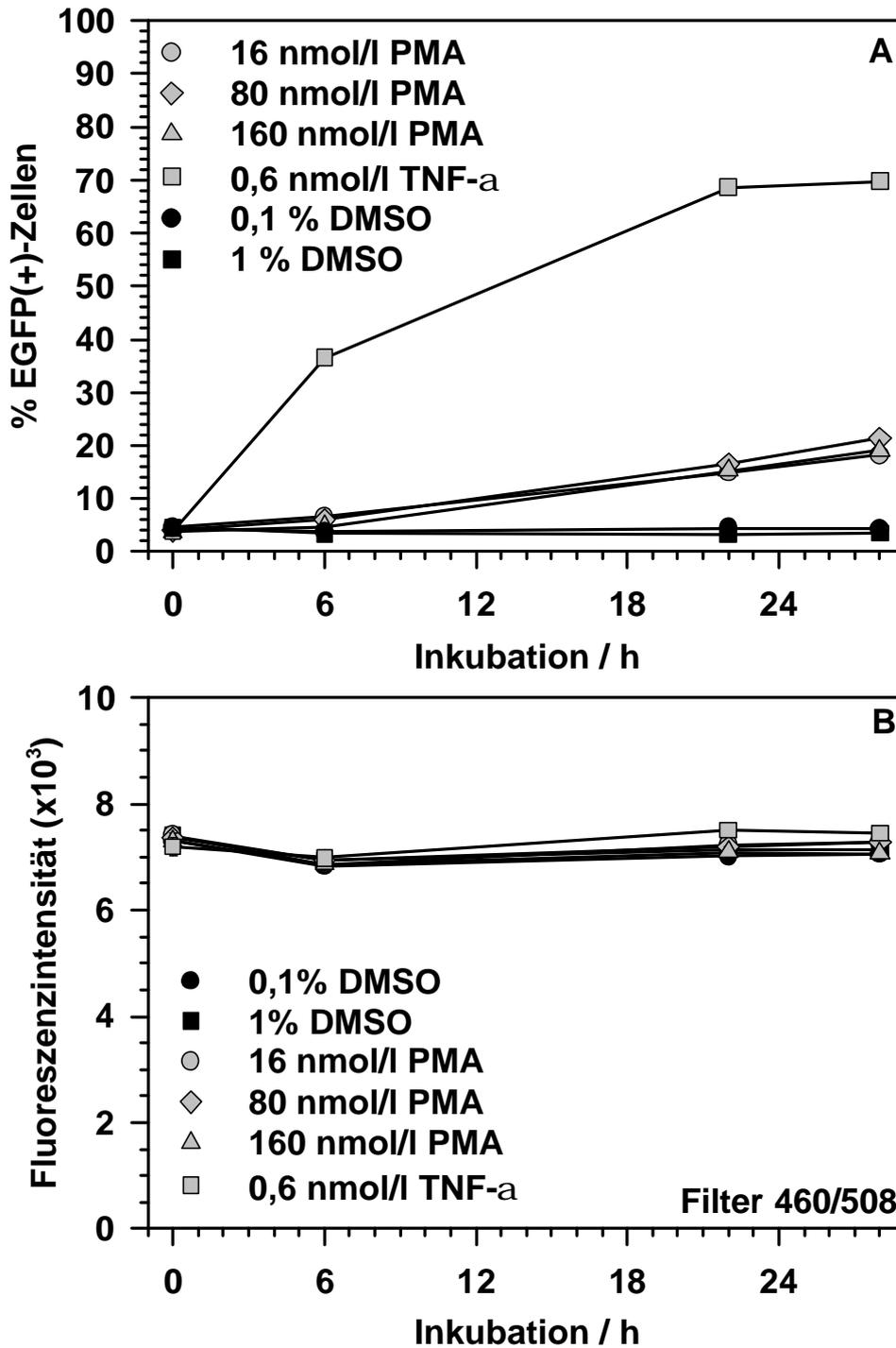


Abb. 3-23 Induktion von d2EGFP-Expression durch PMA

FACS-Analyse (A) und MTP-Fluorimeter-Messung (B) der d2EGFP-Expression von HEK-pNF-κB/Neo Klon 2 nach Behandlung mit PMA 72 h nach Aussaat, Medium mit 10 % Serum, 2 h Inkubation mit unterschiedlichen PMA-Konzentrationen.

Um eine Messung im MTP-Fluorimeter zu erproben, wurden die mit PMA behandelten Zellen vor Fixierung für die FACS-Analyse im MTP-Fuorimeter gemessen. Bei TNF- α -Behandlung ist eine äußerst geringe Fluoreszenzzunahme meßbar (Abb. 3-23B), die 70 % EGFP(+)-Zellen in der FACS-Analyse entspricht (Abb. 3-23A).

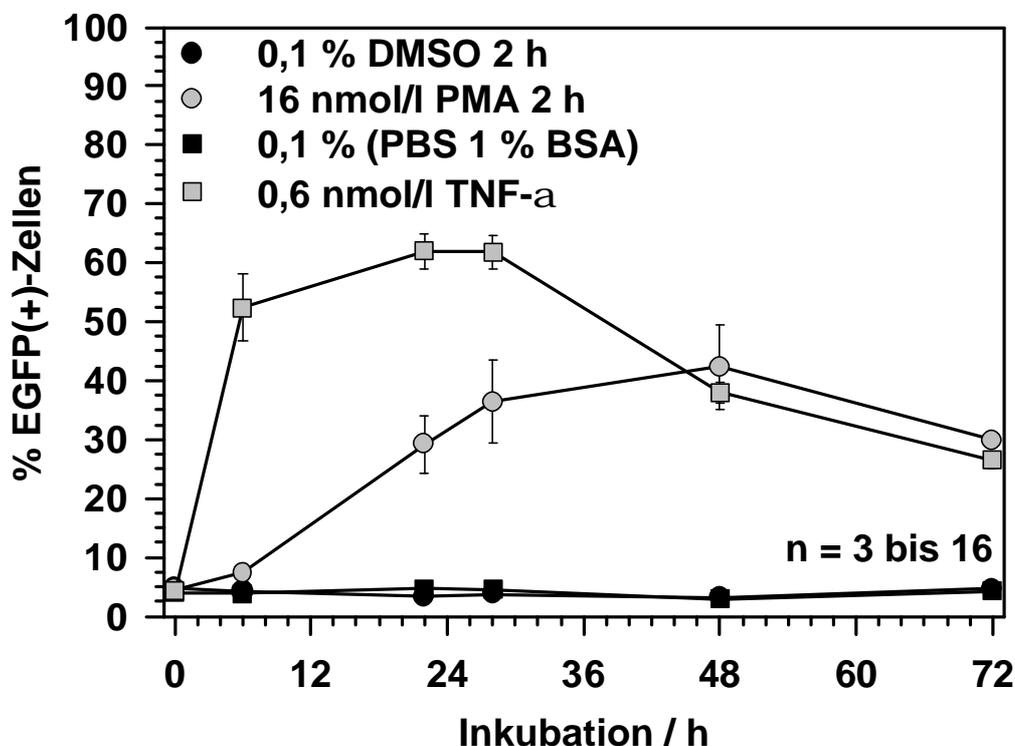


Abb. 3-24 Kinetik der PMA- bzw. TNF- α induzierten d2EGFP-Expression

FACS-Analyse der d2EGFP-Expression von HEK-pNF- κ B/Neo Klon 2 nach Behandlung mit PMA 72 h nach Aussaat, Medium mit 10 % Serum, mit PMA (2 h Inkubation) bzw. TNF- α , Mittelwerte und Standardfehler aus 3 bis 16 Versuchen (**B**).

3.4.2.6 Exposition mit Röntgen-, UVC-, UVB- und UVA-Strahlung

96 h nach Aussaat wurden HEK-pNF- κ B/Neo Klon 2-Zellen mit Röntgen-, UVC-, UVB- bzw. UVA-Strahlung exponiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung für die FACS-Analyse fixiert.

Nach Bestrahlung mit 0 bis 2 Gy war keine erhöhte Fluoreszenz nachweisbar. Bei 5 Gy ist nach 6 h eine Verdopplung des Anteils EGFP(+)-Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen zu verzeichnen (Abb. 3-25A).

Nach Bestrahlung mit 2,5 bis 15 J/m² UVC war keine erhöhte Fluoreszenz nachweisbar (Abb. 3-25B). Bei Bestrahlung mit UVB+UVA (Tabelle 2-14, Abb. 2-8) zeigt sich keine erhöhte d2EGFP-Fluoreszenz zu den untersuchten postirradiativen Zeitpunkten (Abb. 3-26A).

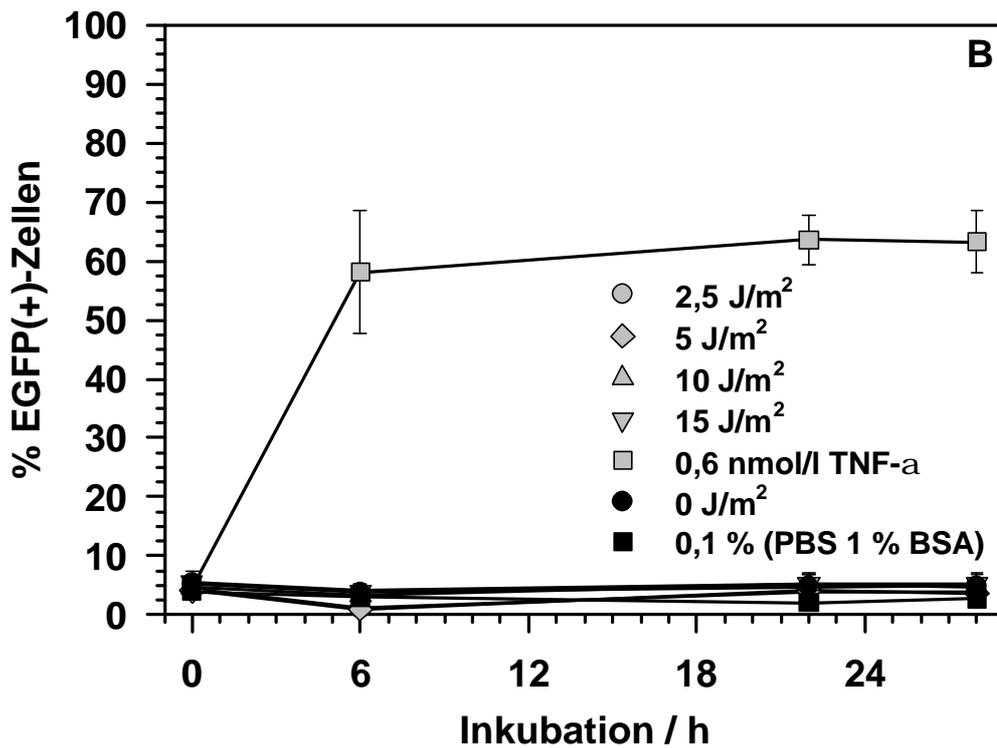
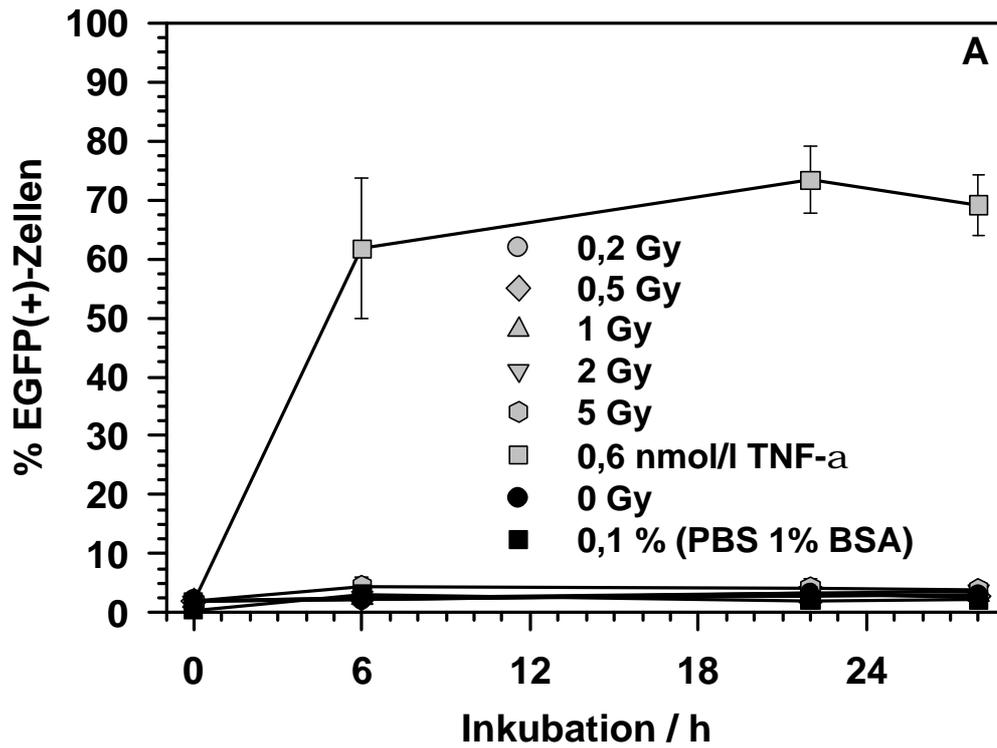


Abb. 3-25 d2EGFP-Expression nach Röntgenbestrahlung (A) bzw. nach UVC-Bestrahlung (B)

Inkubation in Medium mit 10 % Serum. FACS-Analyse von HEK-pNF-κB/Neo Klon 2, Mittelwert und Standardfehler aus 3 Experimenten.

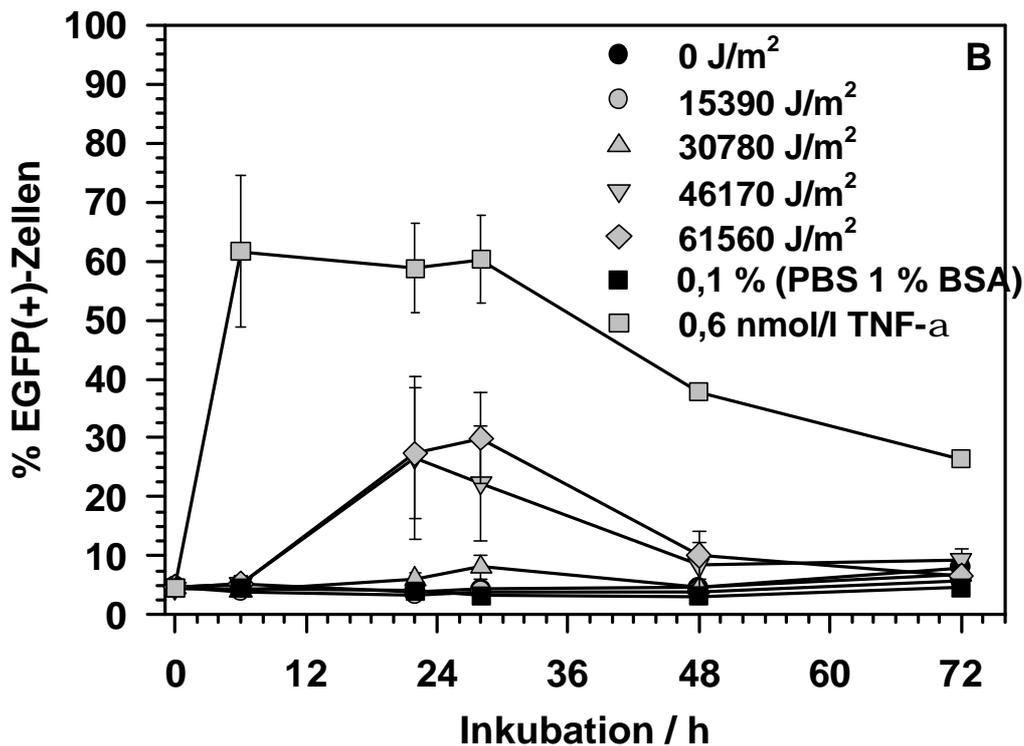
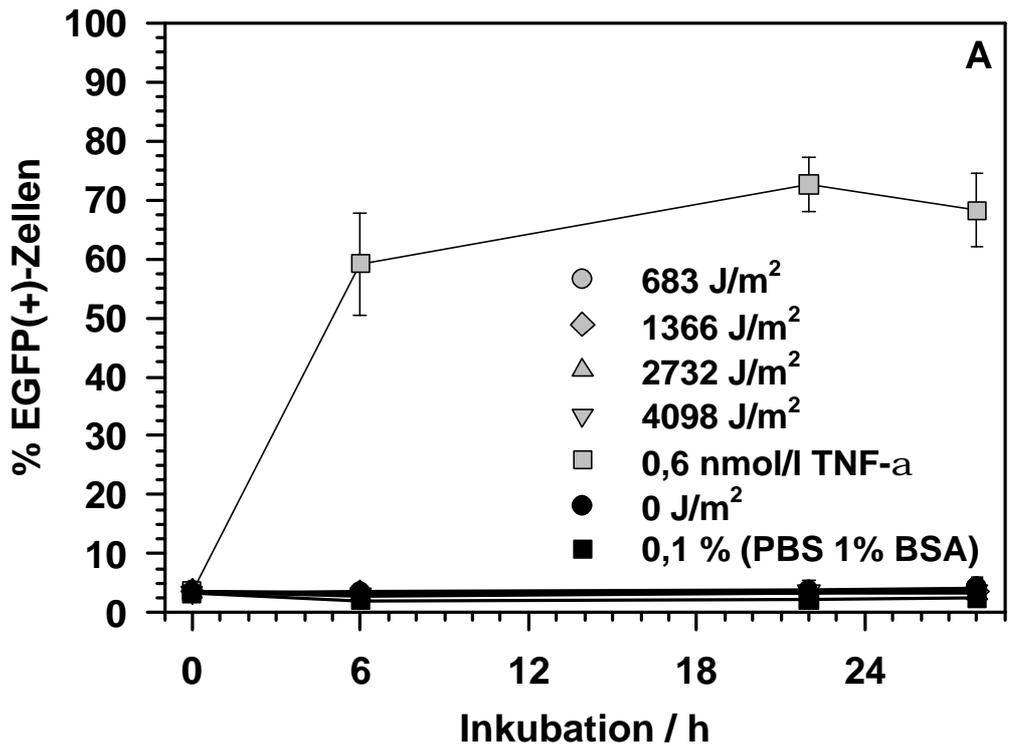


Abb. 3-26 d2EGFP-Expression nach UVB+UVA- und UVA-Bestrahlung

FACS-Analyse der d2EGFP-Expression von HEK-pNF- κ B/Neo Klon 2 nach UVB- und UVA-Bestrahlung (SOL2 + WG305-2+UG11) (A) bzw. nach UVA-Bestrahlung (SOL2 + WG335-3+UG11) (B). Bestrahlung 72 h nach Aussaat, Inkubation in Medium mit 10 % Serum, Mittelwert und Standardfehler für je 3 Experimente.

UVA-Bestrahlung (46,2 und 61,6 kJ/m², Tabelle 2-14, Abb. 2-8) dagegen führte in durchschnittlich 30 % der Zellen der bestrahlten Population nach 22 h zu d2EGFP-Expression (Abb. 3-26B). Eine Dosis von 30,8 kJ/m² führte zu einem geringen Anstieg der EGFP(+)-Population 22 bis 28 h nach UVA-Exposition. Bei allen Dosen ist nach 48 h der Anteil EGFP(+)-Zellen stark abgefallen und nach 72 h sind fast wieder die Ausgangswerte erreicht, was auch im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten war.

In Abb. 3-27 ist der gemittelte Induktionsfaktor (IF_{22h}) des EGFP(+) Populationsanteils in Abhängigkeit von der Dosis für die untersuchten Strahlenqualitäten dargestellt. 22 h nach UVA-Bestrahlung ist eine deutliche d2EGFP-Fluoreszenz meßbar, die über 60 % der Werte bei Induktion durch TNF- α erreicht.

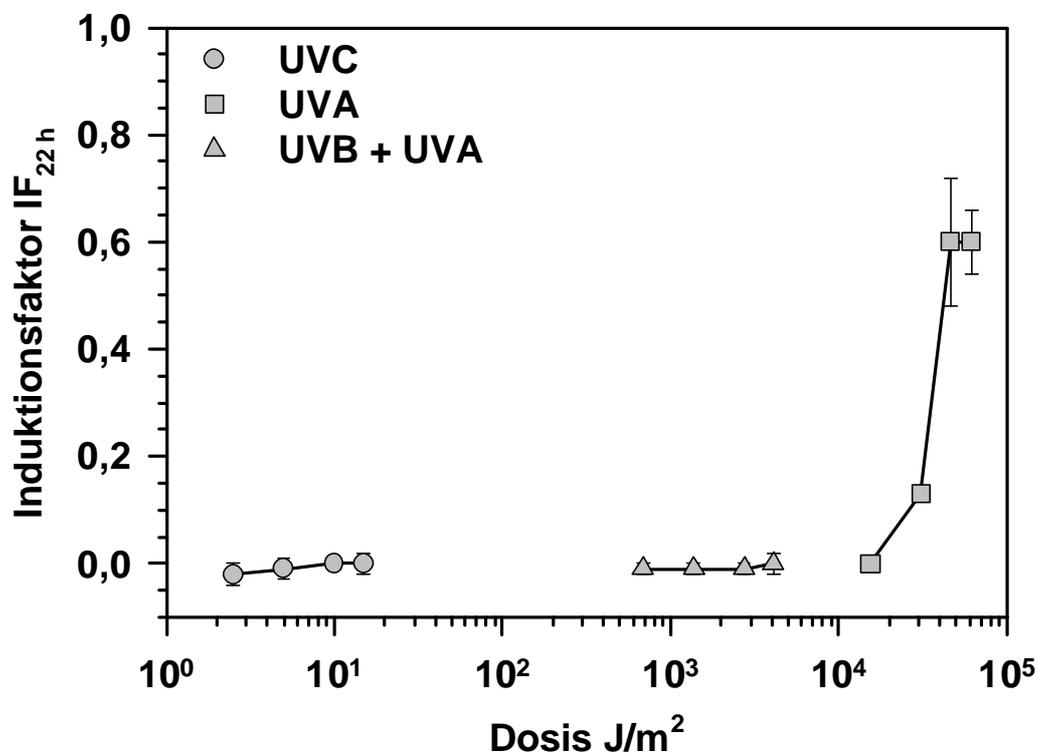


Abb. 3-27 Induktion NF- κ B-abhängiger Genexpression durch UV-Strahlung

FACS-Analyse der d2EGFP-Expression von HEK-pNF- κ B/Neo Klon 2, 22 h nach UVC, UVB und/oder UVA-Bestrahlung. Der Induktionsfaktor bezieht den EGFP(+)-Populationsanteil nach UV-Bestrahlung auf denjenigen nach TNF- α -Behandlung (Mittelwert und Standardfehler aus 3 Experimenten).