

## 4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, zur Risikoabschätzung für die Einwirkung genotoxischer Agenzien auf Mensch und Tier eine stabile Zelllinie herzustellen, mit Hilfe derer UV-induzierte Genaktivierung in Säugerzellen anhand der grünen Fluoreszenz des Reporterproteins EGFP bzw. d2EGFP gemessen werden kann.

Dazu wurde der Vektor pNF- $\kappa$ B/Neo unter Verwendung des Reportermoleküls d2EGFP hergestellt, dessen Expression durch einen synthetischen Promotor, bestehend aus vier NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen und dem minimalen Thymidinkinase-Promotor, kontrolliert wird. HEK-Zellen wurden mit diesem Plasmid stabil transfiziert. Aus den entstandenen Klonen wurde eine geeignete Zelllinie für weitere Experimente ausgewählt. In der entstandenen Zelllinie HEK-pNF- $\kappa$ B/Neo wurde der induzierbare Promotor auf seine Regulierbarkeit in Abhängigkeit von Umwelttoxinen, insbesondere von UV-Strahlung unterschiedlicher biologischer Wirksamkeit, getestet. UVA-Strahlung löste in dieser Zelllinie NF- $\kappa$ B-induzierte Genexpression aus, gemessen anhand der d2EGFP-Fluoreszenz (Abb. 3-26B). Dieses Zell/Vektor-System kann somit als Reporter für NF- $\kappa$ B-abhängige Genaktivierung dienen.

Dabei wurden humane embryonale Nierenzellen (293/HEK) verwendet, da mit der zuerst verwendeten Zelllinie AA8 keine Genaktivierung durch UVC, MMC oder PMA gemessen werden konnte. Jedoch wurden mit AA8-Zellen nur transiente Transfektionen und Messungen im MTP-Fluorimeter durchgeführt.

Diese anfänglichen Schwierigkeiten, induzierte Genaktivierung zu messen, konnten durch den verwendeten Promotor, die Zelllinie, das induzierende Agens, die Induktionsbedingungen (Dosis, Inkubationszeit, Serum), die transiente Transfektion, die Messung im MTP-Fluorimeter oder das Reporteragen d2EGFP selbst bedingt sein. Diese Faktoren wurden genauer untersucht und variiert.

Zunächst wurden stabil transfizierte CHO-Zellen hergestellt, die EGFP bzw. d2EGFP konstitutiv exprimieren. Mit Hilfe dieser Zelllinien wurden verschiedene Möglichkeiten, die EGFP bzw. d2EGFP-Fluoreszenz zu visualisieren und zu quantifizieren, auf ihre Vor- und Nachteile untersucht. Dabei zeigte sich, daß konstitutiv exprimiertes EGFP durch FACS-Analyse (Abb. 3-8, Abb. 3-9), im MTP-Fluorimeter (s. 3.2.4) und im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 3-6) mit einem sehr günstigen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis nachgewiesen werden konnte. Konstitutiv oder induziert exprimiertes d2EGFP konnte dagegen nur durch FACS-Analyse (Abb. 3-9) und im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubte eine schnelle qualitative visuelle Kontrolle der induzierten d2EGFP-Expression, während die FACS-Analyse zur Quantifizierung der induzierten d2EGFP-Expression in HEK-pNF- $\kappa$ B/Neo-Zellen eingesetzt wurde.

Die HEK-Zelllinie wurde verwendet, da für diese Zellen die Induzierbarkeit NF- $\kappa$ B-abhängiger Genexpression durch TNF- $\alpha$  beschrieben ist [Li *et al.*, 1998] und TNF- $\alpha$  als Positivkontrolle

der NF- $\kappa$ B-Aktivierung etabliert werden konnte (Abb. 3-18, Abb. 3-20, Abb. 3-21). Außerdem wurde diese Zelllinie transient und stabil transfiziert. Bei der transienten Transfektion war eine Verdopplung der Anzahl d2EGFP-exprimierender Zellen nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  zu verzeichnen, während die Zugabe von TNF- $\alpha$  zu den stabil transfizierten Klonen einen Anstieg der d2EGFP-exprimierenden Zellen von ~ 3-5 % auf bis zu 90 % der Population verursachte.

Unter Verwendung stabil transfizierter, konstitutiv EGFP-exprimierender CHO-Zellen wurde das *in-vitro*-Modell zur Bestimmung der Zytotoxizität entwickelt. Die Proliferation nach Behandlung mit zytotoxischen Agenzien kann durch wiederholte Messung der EGFP-Fluoreszenz im MTP-Fluorimeter quantifiziert werden.

Untersuchungen zur Eignung von EGFP/d2EGFP als Reportergen in Säugerzellen ergaben, daß die stabile Transfektion und die EGFP-Expression Eigenschaften der transfizierten Zellen wie die UVC- und Röntgenstrahlensensitivität und die Wachstumsgeschwindigkeit nicht verändern. Die Messung der Halbwertszeit (HWZ) von EGFP und d2EGFP in CHO-Zellen zeigte, daß d2EGFP aufgrund seiner kürzeren HWZ und geringeren Akkumulation in der Zelle für Untersuchungen der Auf- und Abregulation der Genexpression besser geeignet ist als EGFP.

#### **4.1 VISUALISIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON EGFP UND D2EGFP**

Um EGFP/d2EGFP als Reporterkomponente in einem Bioassay einsetzen zu können, wurden verschiedene Methoden zur Quantifizierung der Fluoreszenz auf ihre Vor- und Nachteile untersucht.

Da die EGFP-Fluoreszenz stabil ist und nicht-invasiv in lebenden Zellen beobachtet werden kann, konnte bei Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops die EGFP-Fluoreszenz derselben Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten qualitativ beurteilt werden. Dies ist besonders wichtig bei der Untersuchung induzierbarer d2EGFP-Expression (s. 4.3). Es wurde ein FITC-Filtersatz verwendet (s. 2.4.2). Der Emissionsfilter ist ein Langpaßfilter, der nur Licht oberhalb von 520 nm passieren läßt, so daß nur ein geringer Teil der EGFP-Emission das Auge bzw. den Film erreicht, da das EGFP-Emissionsmaximum bei 508 nm liegt (Abb. 3-7). Auf den Fotos EGFP-exprimierender Zellen ist demnach nur ein Bruchteil der tatsächlichen Fluoreszenzintensität zu sehen (Abb. 3-6). EGFP-spezifische Filterpaare sind zwar kommerziell verfügbar, stellen jedoch einen hohen Kostenfaktor dar.

Das EGFP-Fluoreszenzspektrum wurde mit Hilfe des Fluoreszenzspektrophotometers gemessen (Abb. 3-7). Neben den spektralen Daten konnte die Fluoreszenzintensität einer Zellsuspension definierter Zelldichte bestimmt werden. Da die Probenvorbereitung für die Spektroskopie der für die FACS-Analyse entspricht, war es nicht sinnvoll, das Spektrofluorimeter für quantitative Analysen einzusetzen, denn mit nur geringem Mehraufwand konnten bei der FACS-Analyse sehr viel aussagekräftigere Daten über die EGFP-Fluoreszenz einer Zellpopulation gewonnen werden (s.u.).

Fluoreszenzintensitäten einheitlicher und gemischter Populationen EGFP- oder d2EGFP-exprimierender Zellen konnten pro Zelle mit Hilfe eines Fluorescence Activated Cell Scanner (FACS) gemessen werden (Abb. 3-8, Abb. 3-9, Abb. 3-17, Abb. 3-22 u.a.). Die Permeabilisierung der EGFP-exprimierenden Zellen mit 70 % Ethanol führte jedoch zu einem Verlust der EGFP-Fluoreszenz, vermutlich durch ein Auslaufen der kleinen, löslichen EGFP-Moleküle aus der membrangeschädigten Zelle. Bei Fixierung mit Formaldehyd konnte die EGFP-Fluoreszenz vollständig erhalten werden (Abb. 3-8).

Um solche arbeits- und zeitintensiven Meßtechniken bei den geplanten Genexpressionsstudien mit EGFP als Reporter zu umgehen, wurde die Messung der Fluoreszenzlichtabgabe im MTP-Fluorimeter erprobt und optimiert. Es wurden die stabil transfizierten AA8-Zelllinien mit konstitutiver Expression von EGFP oder d2EGFP verwendet (s. 4.2). Bei der Optimierung wurde die Filterkombination dem EGFP-Fluoreszenzspektrum angepaßt und Faktoren, die zur Hintergrundfluoreszenz beitragen, identifiziert und nach Möglichkeit minimiert.

Die Fluoreszenzerträge für zwei verschiedene Filtersätze (FITC-Filterkombination 485/20+530/20; EGFP-Kombination 460/40+508/20) erlaubten eine Schätzung der EGFP-Fluoreszenzausbeute, d.h. der vom Photomultiplier des MTP-Fluorimeters aufgenommenen Fluoreszenzmenge (s. 3.2.4). Der FITC-Filtersatz trifft nicht das Optimum für die EGFP-Messung. Der Fluoreszenzertrag ist bei dem EGFP-spezifischen Filtersatz ~ 3 mal höher. Jedoch kann der Ausschluß des Anregungslichtes wegen der eng beieinander liegenden Anregungs- und Emissionsmaxima (besonders bei EGFP, einer sogenannten „red-shifted“-Variante, bei der die Maxima nur 24 nm auseinanderliegen) problematisch werden. Um ein solches Überlappen des Anregungs- und Emissionslichtes zu vermeiden, sollte der Anregungsfilter 460/40 verwendet werden, der die Anregungsspitze von EGFP bei 468 nm statt bei 484 nm trifft [HELLWEG *et al.*, 2001].

Um Kinetiken mit identischem Zellmaterial zu produzieren, ist es wünschenswert, die EGFP/d2EGFP-Fluoreszenz in Anwesenheit von Medium zu messen, welches jedoch, neben der Fluoreszenz der Platten und der Autofluoreszenz der Zellen, zum Hintergrund beiträgt. Hintergrundfluoreszenzintensitäten von Medium und MTP werden leicht durch stark konstitutiv EGFP-exprimierende Zellen um das Zweifache überschritten. Bei schwacher EGFP-Expression von einem induzierbaren Promotor [AMSTERDAM *et al.*, 1996] oder bei geringen Transfektionseffizienzen kann möglicherweise die Hintergrundfluoreszenz der Zellen, Platten und Mediumkomponenten (z.B. Serum, Vitamine, Aminosäuren, Phenolrot) die Meßbarkeit einschränken. Da das Emissionsspektrum des  $\alpha$ -Mediums sein Maximum bei 520 nm erreicht, sollten EGFP-spezifische Emissionsfilter eine geringe Bandbreite aufweisen [HELLWEG *et al.*, 2001].

Fluoreszenzmessungen im MTP-Fluorimeter können durch die Autofluoreszenz der MTP beeinflusst werden. Für ein optimales Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (*signal-to-noise ratio*) ist es wichtig, die Fluoreszenz der MTP bei der Anregungswellenlänge zu minimieren. Bei den

gewählten Meßbedingungen (mit PBS oder  $\alpha$ -Medium, Messung von unten) zeigte die Costar-Platte mit klarem Boden und schwarzen Wänden die geringste Autofluoreszenz, vermutlich dadurch bedingt, daß die schwarzen Wände den „*cross-talk*“ zwischen den Vertiefungen (*wells*) bei der Messung reduzieren. Diese Platte wurde deshalb für alle Experimente mit Fluoreszenzmessung im 96-*well*-Format verwendet.

Vergleichende Messungen EGFP-exprimierender Zellen mit den beiden Filterkombinationen zeigten, daß der EGFP-Filtersatz (460+508) höhere Fluoreszenzwerte liefert als der FITC-Filtersatz (485+530), wie es durch die vorhergehenden Berechnungen erwartet wurde (s. 3.2.4.1, 3.2.4.3). Messungen von unten resultierten in bis zu 3 mal höheren Fluoreszenzwerten der adhärennten Zellen im Vergleich zur Messung von oben, vermutlich da der Meßkopf näher an dem zu messenden Material ist. Die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten von der Zellzahl bei suspendierten Zellen geht bei adhärennten Zellen in eine Sättigung der Fluoreszenzintensität bei hohen Zellzahlen über, da die Fläche keine ausgebreiteten und angehefteten Zellen mehr aufnehmen kann. Das Absinken und Anheften der suspendierten Zellen führt fast zu einer Verdopplung der Fluoreszenzintensität (Messung von unten), bedingt durch die Tatsache, daß adhärennte Zellen dem Meßkopf näher sind als suspendierte Zellen.

Die Messung von d2EGFP im MTP-Fluorimeter wurde dadurch erschwert, daß d2EGFP-exprimierende Zellen absolut weniger Fluoreszenz emittieren (Abb. 3-9). Erst bei 50-100 % Konfluenz der stabil transfizierten und konstitutiv d2EGFP-exprimierenden AA8-Zellen (AA8-pCMV-d2EGFP) war die Fluoreszenz von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden, nachdem der Hintergrund des  $\alpha$ -Mediums durch Messung in PBS und die MTP-Autofluoreszenz durch Subtrahieren der Plattenfluoreszenz eliminiert worden war. Aufgrund dieser hohen Detektionsschwelle sollte d2EGFP durch FACS-Analyse oder durch digitale Fluoreszenzmikroskopie und Bildanalyse quantifiziert werden.

Die Eignung des MTP-Fluorimeters für die EGFP-Fluoreszenzmessung wurde anhand der zellzahlabhängigen Fluoreszenz (s. 3.2.4.3, s.o.), der Bestimmung von Transfektionseffizienzen (Abb. 2-5, Tabelle 3-6) und der Bestimmung normalen (Abb. 3-10B) und gestörten Wachstums (Abb. 3-16, s. 4.2) gezeigt.

## **4.2 KONSTITUTIVE EXPRESSION VON EGFP UND D2EGFP ALS MARKER FÜR ZYTOTOXIZITÄT**

Als konstitutiv wirksamer Promotor wurde der Hybridpromotor aus dem  $\beta$ -Aktin-Gen des Huhnes und CMV-*Enhancer* (pCX-GFP, Abb. 2-1) und der CMV-*immediate-early-Enhancer* allein (pEGFP-N1, Tabelle 2-6) verwendet (Tabelle 2-1). Die Zellen wurden mit diesen Plasmiden transient und stabil transfiziert.

Bei der transienten Transfektion zeigte nur ein Teil der Zellen grüne Fluoreszenz (Tabelle 3-6, Abb. 3-6), da die Expression abhängig ist von der Zellzahl, die DNS aufgenommen hat, von der Kopienzahl und dem Expressionslevel pro Gen. Zudem wird eine dauerhafte Kultivierung der transfizierten Zellen durch die Abnahme der EGFP-Expression erschwert, da transient

transfizierte Zellen sich langsamer vermehren als solche, die keine DNS aufgenommen haben. Die transiente Transfektion hat gegenüber der stabilen jedoch den Vorteil, daß die transient transfizierten Zellen bereits nach 24 h für Experimente, insbesondere zum Austesten eines induzierbaren Promotors, einsetzbar sind (s. 4.3). Damit möglichst viele Zellen die Plasmid-DNS aufnehmen, wurden die Transfektionsbedingungen in Vorversuchen optimiert (Abb. 2-5, Abb. 2-6). Die wichtigsten Parameter sind hierbei die Art des Lipids, die DNS-Menge, das Ladungsverhältnis des positiv geladenen Lipids zum negativ geladenen DNS-Rückgrat, die Transfektionszeit und die Anwesenheit von Serum [KINGSTON *et al.*, 1996]. Aus den Vorversuchen ermittelte Transfektionsbedingungen (TransFast, 1.000 ng DNS pro Vertiefung, Ladungsverhältnis TransFast zu DNS von 2:1, 1 h Inkubation) wurden für die weiteren Experimente beibehalten.

Bei der Herstellung stabil transfizierter, EGFP- oder d2EGFP-exprimierender Zelllinien wurden die Zellen, die die/das Plasmid(e) aufgenommen hatten, durch die Resistenz der Zellen gegen das Aminoglycosid-Antibiotikum G418 selektiert. Diese Resistenz erhielten die Zellen durch das bakterielle Gen für die APT [SOUTHERN und BERG, 1982], das auf dem gleichen Plasmid oder auf dem Helferplasmid pSV2neo (Abb. 2-1) in die Zellen transferiert wurde. Dieses Enzym überträgt eine Phosphatgruppe auf Aminoglycoside (Neomycin, Gentamycin, Kanamycin, G418), wodurch diese die Proteinsynthese in Säugerzellen (durch Störung der Ribosomenfunktion) nicht mehr blockieren können. Die Zellen ohne APT können sich in Gegenwart toxischer G418-Dosen noch 1-2 mal teilen. Ungefähr eine von  $10^4$  Zellen einer Transfektion integriert die Plasmid-DNS stabil in ihre chromosomale DNS [MORTENSEN *et al.*, 1997]. Diese Zellen überlebten die Selektion durch G418. EGFP- oder d2EGFP-exprimierende Klone wurden nach Identifikation im Fluoreszenzmikroskop expandiert.

Die Verwendung stabil transfizierter Zellen hat den Vorteil, daß hohe intra- und inter-Experiment-Variabilitäten [HOLLON und YOSHIMURA, 1989; FARR und ROMAN, 1992] und die zeit- und kostenintensive Prozedur transienter Transfektionen vermieden werden können. Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind integrierende Vektoren, so daß die EGFP-Expression auch ohne Selektionsdruck aufrechterhalten werden kann. Dabei muss bedacht werden, dass Niveau und Stabilität der Expression durch chromosomale Positionseffekte und die Zahl der Integrationsereignisse beeinflusst wird [LACY *et al.*, 1983]. Die EGFP-Expression kann gering oder abwesend sein, falls der Vektor in einen inaktiven Teil des Genoms integriert wird. Außerdem kann die Linearisierung des Vektors durch zelluläre Enzyme wichtige Vektorbereiche zerstören, z.B. den CMV-Promotor, das EGFP-Gen oder das Neomycinresistenzgen. Im letzteren Fall überleben die Zellen die Behandlung mit G418 nicht, aber in den beiden ersteren Fällen können nicht-EGFP-exprimierende Klone isoliert werden. Diese Tatsache erforderte die Untersuchung mehrerer resistenter Klone auf ihre EGFP- (Abb. 3-12, Abb. 3-13) bzw. induzierbare d2EGFP-Expression (Abb. 3-21, Abb. 3-22, s. 4.3).

Falls EGFP für die Zellen einen Wachstumsnachteil verursachen sollte, könnte bei Entfernen des Selektionsdrucks der Anteil EGFP(+)-Zellen und die mittlere Fluoreszenz abnehmen. Es war jedoch über drei Wochen keine Abnahme der mittleren Fluoreszenz der Population in der FACS-Analyse bei Kultivierung ohne Selektionsdruck festzustellen (Abb. 2-7). Das entspricht den Beobachtungen von GUBIN *et al.* [1997], die ebenfalls stabil transfizierte, GFP-exprimierende CHO-Zellen herstellten und bei Kultivierung in G418-freiem Medium 12 Wochen lang GFP-Expression eines Klons auf hohem Niveau beobachteten. Die mittlere Fluoreszenz zeigt bei AA8-pCX-GFP und EM9-pCX-GFP einen zyklischen Verlauf; direkt nach der Aussaat sinkt die Fluoreszenz und erreicht nach drei Tagen ein Minimum. Nach acht Tagen ist der Ausgangswert wieder erreicht. Während der ersten Phase des exponentiellen Wachstums nimmt der EGFP-Gehalt pro Zelle somit ab, vermutlich da die Zellteilungen schneller erfolgen als die Proteinsynthese. GUBIN *et al.* [1997] schließen aus der stabilen Langzeitexpression von GFP in CHO-Zellen, daß GFP als alleiniger Marker für dauerhafte Transfektionsereignisse anderer, nicht so leicht nachweisbarer Genprodukte dienen kann.

Die Integration des Vektors kann jedoch auch Bereiche des zellulären Genoms stören, die wichtige zelluläre Funktionen steuern, wie z.B. das Wachstum oder die DNS-Reparatur. Verminderte oder vermehrte Verfügbarkeit von DNS-Reparaturenzymen kann einen Einfluß auf die Strahlenempfindlichkeit der Zellen haben [BUSCH *et al.*, 1989; JEGGO *et al.*, 1994]. Bei der Transfektion von EM9 mit DNS aus einer Cosmid-Bibliothek traten Revertanten mit Resistenz gegenüber Ethylmethansulfat auf, die nicht durch Transfektion des humanen XRCC1-Gens, das den Reparaturdefekt korrigiert, sondern vermutlich durch Veränderung des endogenen Hamster-XRCC1-Gens im Laufe der Transfektion und Selektion bedingt waren [BARROWS *et al.*, 1991]. Außerdem könnte auch das im Zyto- und Nukleoplasma vorhandene EGFP (Abb. 3-6) die Strahlenempfindlichkeit der Zellen verändern. Zumindest führte die Expression von GFP in den Mitochondrien von Affennieren-Zellen (COS-7) zu einer Photosensitivierung dieser Zellen für Licht der Wellenlängen 390 bis 570 nm [ZHANG *et al.*, 1998]. Das Wachstum der stabil transfizierten Zelllinien (Abb. 3-10A) verlief ungestört (s.u.), und die CHO-Linien mit und ohne EGFP-Expression zeigten nach statistischer Auswertung mittels Student's t-Test keinen signifikanten Unterschied im zellulären Überleben nach UVC- und Röntgenbestrahlung bzw. die Strahlenempfindlichkeit liegt im Rahmen der Variabilität der normalen Strahlensensibilität individueller Zelllinien (Abb. 3-15A und B).

Die ermittelten Dosiseffektkurven (DEK) zeigen einen gebogenen Verlauf mit  $D_0$ -Werten im Bereich von 1,0, 0,8 und 1,9 Gy bei Röntgenbestrahlung von EM9, EM9-pCX-GFP bzw. AA8 (Tabelle 3-10). Die Linien EM9 und EM9-pCX-GFP sind bei Betrachtung dieser  $D_0$ -Werte (fast) doppelt so röntgenstrahlenempfindlich wie AA8. Die hier gefundene erhöhte Röntgenstrahlensensitivität von EM9 ist mit der von THOMPSON *et al.* [1990] gemessenen 1,8 mal erhöhten Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung vergleichbar. Die erhöhte Sensitivität von EM9 gegenüber Röntgenstrahlung wird durch den Defekt im XRCC1-Gen und die darausfolgende reduzierte Einzelstrangbruchreparatur erklärt, wobei XRCC1 einen

Komplex mit der DNS-Ligase III bilden soll, der in EM9 vermindert ist [CALDECOTT *et al.*, 1995]. Einzelstrangbrüche sind eine wesentliche DNS-Läsion nach Röntgenbestrahlung und vermutlich auch nach UVA-Exposition. EM9 soll im Vergleich zu AA8 keine erhöhte UVC-Sensitivität aufweisen [THOMPSON *et al.*, 1980B]. Die UVC-DEK von UV5 hat einen rein exponentiellen Verlauf, somit zeigt UV5 im Vergleich zu AA8 und EM9 eine erhöhte UVC-Sensitivität, die durch einen Defekt im Inzisionsschritt der NER erklärt wird, der durch das humane ERCC2-Gen korrigiert werden kann [THOMPSON *et al.*, 1982; WEBER *et al.*, 1988]. Diese Unterschiede zwischen AA8, EM9 und UV5 haben hohe strahlenbiologische Relevanz.

UVC-Bestrahlung von EM9-pCX-GFP führte dosisabhängig nach 24 h erstmals und nach 72 h deutlich zu einer Aufspaltung der ursprünglich uniform EGFP-exprimierenden Population in eine EGFP(-)-Population und eine EGFP(+)-Population mit zunehmender Fluoreszenzintensität (Abb. 3-17). Die EGFP(-)-Population entsteht vermutlich, wie bei der Ethanolfixierung, durch ein Auslaufen der löslichen EGFP-Moleküle durch die geschädigte Membran. Die zweite Population läßt sich vielleicht durch einen strahleninduzierten Wachstumsstop erklären, währenddessen die Protein- und damit auch EGFP-Synthese zu einer verstärkten Ansammlung von Zellmasse und damit von EGFP führt.

Um mögliche Unterschiede im Wachstum zwischen der Ausgangszelllinie und der stabil transfizierten Zelllinie aufzudecken und um das Wachstum durch Fluoreszenzmessung bestimmen zu können, wurden Wachstumskurven erstellt (Abb. 3-10). Die Wachstumskurve (Zellzählung) zeigt die drei typischen Phasen des Zellwachstums, (i) die lag-Phase, (ii) die exponentielle Wachstumsphase und (iii) die stationäre Phase. Der Anstieg der Fluoreszenz ist, verglichen mit dem Anstieg der Zellanzahl, zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase verzögert. Ebenso ist die Steigung des Fluoreszenzanstiegs geringer verglichen mit dem Anstieg der Zellzahl in der exponentiellen Wachstumsphase. Das kann dadurch bedingt sein, daß die Fluoreszenzintensität durch den EGFP-Gehalt pro Zelle **und** die Zellzahl pro *well* bestimmt wird, wogegen die Zellzählung unabhängig von zellulärem Volumen und Proteingehalt, in diesem Fall speziell EGFP, ist. Durch FACS-Analyse konnte gezeigt werden, daß die mittlere Fluoreszenz pro Zelle während des exponentiellen Wachstums abnimmt (s.o. und Abb. 2-7B). Wenn die Zellzahl nach 120 h die stationäre Phase erreicht, steigt die Fluoreszenz weitere 30 h an, das heißt der EGFP-Gehalt pro Zelle steigt durch fortwährende Proteinsynthese, wie die FACS-Analyse verdeutlicht (Abb. 2-7B). Es liegt also eine Asynchronität von Zellteilung und Proteinsynthese vor, während der exponentiellen Wachstumsphase erfolgen die Teilungen schneller als die Proteinbiosynthese, die Zellen sind evtl. kleiner und enthalten weniger Protein. Im Gegensatz zur Zellmasse oder zum Proteingehalt der Zellen sollte der DNS-Gehalt der Zellen im gleichen Maße wie die Zellzahl ansteigen. Unter Berücksichtigung dieser Unterschiede erlaubt die EGFP-Fluoreszenz nur eine schnelle Schätzung des Zellmasse-Wachstums ohne Trypsinieren und Zählen der Zellen. HUNT *et al.* [1999] konnten das Fluoreszenzsignal stabiler GFP-exprimierender CHO-Zellen mit der Zellzahl korrelieren und sehen es als sensitive, gut reproduzierbare Methode zur Untersuchung der Dynamik von

Zellpopulationen an. Durch Verwendung definierter Zellzahlen konnte für suspendierte Zellen ein linearer Zusammenhang mit der Fluoreszenzintensität gefunden werden, der auch bei adhärennten Zellen in der lag-Phase in Zellrasen unter 100 % Konfluenz zutrifft (bis ca. 45.000 Zellen pro Vertiefung, s. 3.2.4, s. 4.1 MTP-Fluorimeter), für wachsende Zellen in dieser Form jedoch nicht zutrifft.

Deshalb wurde die Zellproliferation von AA8-pEGFP-N1 1 nach UVC-Bestrahlung mit Hilfe der EGFP-Fluoreszenz im MTP-Fluorimeter quantifiziert (s. 4.1). Die Frage war, ob das UVC-bedingte verminderte Wachstum anhand einer langsameren Fluoreszenzzunahme detektiert werden konnte. AA8-pEGFP-N1 1 zeigten nach UVC-Bestrahlung eine verlängerte lag-Phase und eine geringere maximale Fluoreszenz, beides dosisabhängig (Abb. 3-16A). 72 h nach Bestrahlung ist die DEK steiler als bei 192 h postirradiativem Wachstum (Abb. 3-16B). 72 h nach UVC-Exposition sind die unbestrahlten Zellen bereits in der exponentiellen Wachstumsphase, während die bestrahlten Zellen sich (noch) nicht von dem Strahlungs-induzierten Wachstumsstopp erholt haben. Diese Wachstumsverzögerung ist zum späteren Analysezeitpunkt nicht mehr vorhanden, und die Dosis-Wirkungs-Beziehung beschreibt die relative Wachstumskapazität der Zellen.

Die beschriebene Methode kann als Zytotoxizitätstest eingesetzt werden und gehört zu den Proliferationstests, die das Wachstum einer Zellpopulation messen und meist auf dem zellulären Proteingehalt basieren [SKEHAN *et al.*, 1990]. Der Gesamtproteingehalt der Zellen wurde als Endpunkt für Zytotoxizität evaluiert, z.B. in einem Test für Wasserverunreinigungen basierend auf einer Hepatom-Zelllinie [GELARDI *et al.*, 1996] oder in einem *in vitro* Zytotoxizitätstest in einer Testbatterie für humane Risikoermittlung, der zur Zeit genutzte Tierversuche ergänzen und ersetzen soll [BARILE *et al.*, 1994].

Bei dem hier beschriebenen Zytotoxizitätstest wird EGFP konstitutiv exprimiert, d.h. kontinuierlich auf hohem Niveau in allen Zelltypen [LATCHMAN, 1998B], und es sammelt sich in lebenden Zellen an. EGFP-Fluoreszenz ist damit ein Parameter, der den zellulären Gesamtproteingehalt reflektiert. Aber EGFP hat den Vorteil, daß es, einmal stabil in den Zellen exprimiert, in der lebenden Zelle durch einfache Fluoreszenzmessung direkt detektiert werden kann. Eine sterbende EGFP-exprimierende Zelle trägt nicht mehr zum Fluoreszenzanstieg während des Wachstums bei. Außerdem verlieren membrangeschädigte EGFP-exprimierende Zellen ihre Fluoreszenz (s.o.), so daß ausgetretene EGFP-Moleküle mit dem nächsten Mediumwechsel entfernt werden. Eine schnelle Bestimmung zytotoxischer Effekte kann also durch tägliche Messung des Zellrasens im MTP-Fluorimeter erfolgen.

GFP-Fluoreszenz erscheint zeitverzögert, da sich nach der korrekten Faltung des Proteins zur  $\beta$ -*can*-Struktur im Zentrum das Fluorophor aus der Sequenz Serin-Tyrosin-Glycin (Aminosäuren 65-67) durch Autooxidation bilden muß (Abb. 1-5). Reduzierende Bedingungen können die Fluorophorbildung verhindern. Ein GFP-Cyclin-Fusionsprotein, exprimiert in COS-7-Zellen, zeigte eine dreistündige Zeitverzögerung zwischen dem Zeitpunkt der Nachweisbarkeit durch

Immunfluoreszenz und dem Zeitpunkt, an dem es durch eigene Fluoreszenz detektiert werden konnte [PINES, 1995]. Bei Verwendung von S65T-Mutanten (S = Serin, T = Threonin), zu denen auch EGFP gehört, ist die Halb-Bildungszeit um ~ 66 % reduziert; für den Oxidationsschritt bei der Fluorophorbildung wurden für wt-GFP eine Zeitkonstante von 2 h und für S65T-GFP von 0,45 h gefunden [HEIM *et al.*, 1995]. Abb. 3-11 zeigt den im Mikrotiterplattenfluorimeter gemessenen zeitlichen Verlauf der EGFP-Expression in CHO-Zellen. Nach 24 h ist die Fluoreszenz deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden und steigt in den folgenden 24 h weiter an. Hierbei ist jedoch zu beachten, daß bei Messung im MTP-Fluorimeter eine Unterscheidung vom Hintergrund erst möglich ist, wenn mindestens 7 % der Zellen in einem fast konfluenten Zellrasen eine deutliche EGFP-Expression aufweisen (Tabelle 3-6). SUBRAMANIAN und SCRIENC [1996] beobachteten die EGFP-Expression von CHO-Zellen bis zu 6 d nach der transienten Transfektion und stellten das Maximum der intrazellulären EGFP-Ansammlung nach 24 h fest, die dann mit einer Kinetik erster Ordnung abnahm, vergleichbar der Wachstumsrate der Zellen. Zudem zeigte eine Immunfärbung des EGFP eine lineare Korrelation zwischen grüner Fluoreszenz und Immunfluoreszenz. Die Forscher schließen daraus, daß die grüne Fluoreszenz trotz der notwendigen posttranslationalen Modifikationen des EGFP zur fluoreszierenden Form als quantitatives Maß des intrazellulären EGFP in einzelnen Zellen dienen kann.

Ist EGFP einmal von den Zellen synthetisiert, ist es ein sehr stabiles Protein. In AA8-Zellen wurde hier eine EGFP-HWZ von 17,3 h gemessen (Abb. 3-14). EGFP ist somit weniger stabil als das Reporterenzym CAT, das eine HWZ von 50 h in Säugerzellen hat [THOMPSON *et al.*, 1991]. Diese Stabilität ist sehr nützlich, um langanhaltende Effekte auf die Genexpression zu messen. In stabil transfizierten Zellen wird somit eine hohe Fluoreszenzintensität erreicht, wenn EGFP unter Kontrolle des starken konstitutiven CMV- bzw. Hybrid-Promotors steht (Abb. 3-8, Abb. 3-9). Bei Verwendung eines induzierbaren Promotors in einer stabilen Zelllinie könnte sich von der Transfektion über die Isolation der resistenten Klone bis zur Expansion dieser Klone und Verwendung der Zellen für verschiedene Experimente mehr und mehr EGFP ansammeln [KINGSTON, 1997], da eine geringe basale Promotoraktivität nicht auszuschließen ist. Diese Zellen würden bereits vor Induktion (schwache) grüne Fluoreszenz aufweisen, und die Induktionspanne wäre vermindert. Zudem kann nach Induktion der Abfall der Genexpression, verursacht durch Stop der Interaktionen am Promotor und der Transkription, infolge der hohen Stabilität von EGFP nicht gemessen werden. Durch diese kontinuierliche Ansammlung von Reporterprotein sind EGFP und CAT als Reporter induzierbarer Promotoren nur für Endpunktmessungen und transiente Transfektionen geeignet. Für kinetische Messungen der Modulation der Genexpression (Auf/Ab-Regulation), wird deshalb das destabilisierte EGFP (d2EGFP, Clontech) empfohlen [LI *et al.*, 1998]. Eine von Teilen des murinen Ornithin-Decarboxylase-Gens kodierte PEST-Sequenz wurde mit dem EGFP-Gen fusioniert [LI *et al.*, 1998], die das Protein für schnelleren Abbau markiert [RECHSTEINER, 1990]. Die HWZ von d2EGFP lag bei den drei untersuchten stabil transfizierten AA8-Klonen zwischen 2,5 und 3,9 h

(Abb. 3-14). Die hier durchgeführte Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid hemmt jedoch nicht nur die Neusynthese von d2EGFP, sondern auch von Proteasen, die d2EGFP abbauen, sodaß die mit dieser Methode bestimmte HWZ die tatsächliche Abbaurate möglicherweise unterschätzt. Die HWZ von d2EGFP ähnelt der der Leuchtkäfer-Luciferase, die ~ 3 h in transfizierten Säugerzellen beträgt [THOMPSON *et al.*, 1991]. Luciferase und auch d2EGFP eignen sich damit auch für die Herstellung stabiler Zelllinien zur Untersuchung induzierbarer Systeme. Infolge der geringeren d2EGFP-Ansammlung kann die Induktionsspanne größer als bei EGFP sein. Die absolute Fluoreszenz jedoch ist geringer als bei EGFP (Abb. 3-9), bei Verwendung des konstitutiven CMV-*Enhancers*.

### 4.3 INDUZIERBARE GENEXPRESSION

Die Untersuchungen zur Lebensdauer von EGFP und d2EGFP hatten ergeben, daß d2EGFP der geeignetere Kandidat zur Untersuchung der Aktivität zellulärer induzierbarer Promotor- und *Enhancer*-Elemente ist (s. 4.2). Um d2EGFP als ein solches Reporter-gen zu testen, wurde ein induzierbarer Promotor verwendet.

In der engeren Auswahl für einen UV-induzierbaren Promotor waren solche, die NF- $\kappa$ B-, p53- oder AP1-Bindungsstellen enthalten (s. 1.1.5), oder synthetische Promotoren mit diesen Bindungsstellen. Da NF- $\kappa$ B-vermittelte Signaltransduktion und Genexpression ein bedeutendes Abwehrsystem gegenüber Umweltherausforderungen darstellt [SIEBENLIST *et al.*, 1994], wurde ein synthetischer Promotor ausgewählt, der aus vier NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen und dem minimalen Thymidinkinase-Promotor zur Bindung der Transkriptionenzyme bestand (Abb. 3-4).

Zunächst wurde das Plasmid pNF- $\kappa$ B-d2EGFP in transienten Transfektionen von AA8-Zellen auf Induzierbarkeit getestet. Als mögliche Induktoren wurden PMA, UVC-Strahlung und MMC ausgewählt.

PMA ist als potenter Tumorpromotor in der Mäusehaut bekannt [HECKER und SCHMIDT, 1974; BLUMBERG *et al.*, 1989]. Es aktiviert die Proteinkinase C *in vivo* [BEH *et al.*, 1989] und *in vitro* und aktiviert NF- $\kappa$ B in verschiedenen Zelltypen wie Prä-B-, T- und HeLa-Zellen (aus Cervix-Adenocarcinom) [SEN und BALTIMORE, 1986; BAEUERLE und BALTIMORE, 1988].

MMC aus *Streptomyces caespitosus* wirkt antibiotisch und karzinostatisch. Es reagiert kovalent mit der DNS, so daß „*crosslinks*“ zwischen komplementären DNS-Strängen entstehen, welche die Replikation behindern [UEDA und KOMANO, 1984]. MMC soll über einen anderen Signaltransduktionsweg als PMA NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression in humanen T-Zelllinien induzieren können [ANDERSON *et al.*, 1994].

UVC-Strahlung wird ebenso wie PMA und MMC von einigen Autoren als Aktivator von NF- $\kappa$ B beschrieben (s.u.).

Bei diesen transienten Transfektionen von AA8-Zellen mit pNF- $\kappa$ B-d2EGFP war nach Behandlung mit PMA, UVC oder MMC durch Messung im MTP-Fluorimeter keine Zunahme der Fluoreszenz nachweisbar (s. 3.4.1.1, 3.4.1.2). Parallel zu dem Plasmid mit induzierbarem

Promotor wurde das promotorlose Plasmid pd2EGFP-1 transfiziert, um eine eventuelle Autofluoreszenzzunahme der Zellen durch die Transfektion und die d2EGFP-Expression durch zufällige Kontrolle des d2EGFP-Gens durch einen zellulären Promotor abzuschätzen. Bei pd2EGFP-1 zeigten tatsächlich einige Zellen im Fluoreszenzmikroskop d2EGFP-Fluoreszenz, die dadurch bedingt sein konnte, daß das d2EGFP-Gen unter Kontrolle zellulärer Promotoren gelangt ist. Ebenso fluoreszierten einige der mit pNF- $\kappa$ B-d2EGFP transfizierten Zellen bereits vor Induktion, was z.B. durch Serumbestandteile oder Endotoxin in der Plasmidpräparation verursacht sein konnte.

Das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) kann in DNS-Präparationen enthalten sein und ist in Zelltypen, die CD14 auf der Zellmembran exprimieren, in der Lage, NF- $\kappa$ B zu aktivieren [VIRIYAKOSOL und KIRKLAND, 1995]. Die durchschnittliche Endotoxinmenge bei den verwendeten Qiagen-Maxiprep-Kits mit *E. coli* DH5 $\alpha$  als Gaststamm soll 5,2 ng pro  $\mu$ g DNS betragen [QIAGEN PLASMID PURIFICATION HANDBOOK, 1997]. Bei Verwendung dieses Stammes in dieser Arbeit wurden demnach bei den hier herrschenden Bedingungen die Zellen mit Endotoxinkonzentrationen im ng/ml-Bereich konfrontiert. Zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Hepatozyten wurden jedoch LPS-Konzentrationen von 1  $\mu$ g/ml benötigt [DIAZ-GUERRA *et al.*, 1996]. Die verwendeten AA8-Zellen exprimieren kein CD14 [GOLENBOCK *et al.*, 1993; DELUDE *et al.*, 1994], und HEK-Zellen erfordern zur LPS-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung die Transfektion von LPS-Rezeptoren [KIRSCHNING *et al.*, 1998]. Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch die geringen in der Plasmidpräparation enthaltenen Mengen an Endotoxin bei transienten Transfektionen ist somit unwahrscheinlich.

Um den Einfluß des Serums genauer zu untersuchen, wurde getestet, wie stark die Serumkonzentration im Medium ohne größere Beeinträchtigung der Zellen reduziert werden konnte, und ob eine verminderte Serumkonzentration vor und während der Induktion die Zahl der spontan d2EGFP-exprimierenden Zellen vermindert. Kultivieren der Zellen in serumfreiem Medium ohne Serumersatzstoffe ist nicht möglich, da sich unter solchen Bedingungen alle Zellen von der Unterlage ablösen (Abb. 2-3). Sowohl HEK- als auch CHO-Zellen sind somit von einer externen Wachstumsstimulation abhängig. Eine vorübergehende Kultivierung in serumarmen Medium (unter 1 %) ist möglich, dabei ist das Wachstum jedoch gehemmt. Es ist zu beachten, daß Serummangel ebenfalls ein Stressor ist, der in HEK-Zellen NF- $\kappa$ B aktivieren kann [GRIMM *et al.*, 1996; CUERVO *et al.*, 1998]. Außerdem sind im Serum verschiedene Wachstumsfaktoren enthalten, die NF- $\kappa$ B aktivieren können [FRETER *et al.*, 1996; TROPMAIR *et al.*, 1998]. Die Versuche mit den stabilen Klonen zeigen jedoch (Abb. 3-20, Abb. 3-22, s.u.), daß diese Aktivierung durch Wachstumsfaktoren quantitativ nicht ins Gewicht fällt, da über 90 % der Zellen vor Induktion keine detektierbare d2EGFP-Expression zeigen (Medium mit 10 % Serum). Zudem kann *in vivo* im Gewebeverband eine Beeinflussung durch Wachstumsfaktoren angenommen werden, so daß eine Durchführung der Versuche in serumhaltigem Medium vorzuziehen ist. Ein Nachteil der Verwendung von Serum ist die nicht vollständig bekannte

Zusammensetzung des FCS. Um Einflüsse verschiedener Chargen zu vermeiden, wurden alle Versuche mit der gleichen FCS-Charge durchgeführt.

In CHO-Zellen war somit mit Agenzien, die von anderen Forschergruppen als NF- $\kappa$ B-aktivierend beschrieben wurden, bei transienter Transfektion mit pNF- $\kappa$ B-d2EGFP keine erhöhte d2EGFP-Expression im MTP-Fluorimeter nachweisbar. Verschiedene Gründe, allein oder in Kombination, konnten dafür verantwortlich sein:

- Die Zelllinie und das induzierendes Agens: Vielleicht läßt sich in CHO-Zellen durch UVC, MMC und PMA in den eingesetzten Dosisbereichen NF- $\kappa$ B nicht aktivieren oder es folgt keine erhöhte Transkription auf die Aktivierung (s.u.). Zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Wegs durch Thrombozyten-aktivierenden Faktor (PAF) oder LPS mußten der PAF-Rezeptor bzw. CD14 stabil in CHO-K1-Zellen transfiziert werden [KRAVCHENKO *et al.*, 1995; DELUDE *et al.*, 1994]. In welchen nicht-phagozytierenden Zelllinien eine Aktivierung durch PMA oder TNF- $\alpha$  möglich ist, ist noch unklar. Deshalb wurden HEK-Zellen als eine adhärente Zelllinie eingesetzt, bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TNF- $\alpha$  (s.u.) beschrieben ist, so daß eine Positivkontrolle etabliert werden konnte.
- Die Inkubationszeit bis zur Messung der d2EGFP-Expression: Durch Beobachten im Fluoreszenzmikroskop und Messung im MTP-Fluorimeter konnten die Zellen mehrfach untersucht werden.
- Die transiente Transfektion, das Reportergen d2EGFP und der Nachweis im MTP-Fluorimeter konnten Ursache dafür sein, daß eine evtl. stattgefundene NF- $\kappa$ B-Aktivierung und erhöhte d2EGFP-Expression aufgrund zu schwacher Fluoreszenzzunahme nicht nachgewiesen werden konnte.

Tatsächlich war bei transienter Transfektion von HEK-Zellen mit pNF- $\kappa$ B-d2EGFP schon 4 h nach Zugabe von TNF- $\alpha$  eine geringe Zunahme der d2EGFP-Expression durch FACS-Analyse meßbar (Abb. 3-18A und B), die im MTP-Fluorimeter jedoch nicht gemessen werden konnte (Abb. 3-19A und B).

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß NF- $\kappa$ B-Aktivierung in HEK-Zellen durch TNF- $\alpha$  zu einer im FACS detektierbaren Erhöhung der fluoreszierenden d2EGFP-Menge pro Zelle führt, die die Autofluoreszenz der Zellen im grünen Bereich deutlich übersteigt. Um die Nachteile transienter Transfektionen zu umgehen (s. 4.2), wurden HEK-Zellen stabil mit dem Plasmid pNF- $\kappa$ B/Neo transfiziert, das das Neomycinresistenzgen trägt (s. 3.1.2.2, Abb. 3-4, Tabelle 2-8). Da die zufällige Integration einer unbekanntenen Anzahl von Plasmidkopien nach Linearisierung des Vektors durch zelluläre Nucleasen zahlreiche Effekte auf die Genexpression haben kann (s. 4.2), wurden 40 stabil transfizierte Klone vermehrt und auf ihre d2EGFP-Expression durch TNF- $\alpha$  untersucht.

TNF- $\alpha$  wirkt als endogener Mediator des septischen Schocks, der Entzündung, antiviraler Antworten und der Apoptose, wobei die Aktivität von TNF- $\alpha$  nicht speziesspezifisch ist. TNF-

$\alpha$  verursacht Zytolyse und Zytostase bestimmter transformierter Zellen [HELSON *et al.*, 1975; GRANGER *et al.*, 1985], Tumornekrose *in vivo*, wenn es tumortragenden Mäusen injiziert wird [CARSWELL *et al.*, 1975] und Apoptose in menschlichen Neutrophilen und Endothelzellen [TSUCHIDA *et al.*, 1995; POLUNOVSKY *et al.*, 1994]. TNF- $\alpha$  aktiviert NF- $\kappa$ B in solchen Zellen, die den Oberflächen-TNF-Rezeptor 1 (TNF-R-1) exprimieren [WHITESIDE und ISRAEL, 1997] und induziert z.B. in Zellen des Immunsystems die Expression von Genen mit NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen im Promotor [HOHMANN *et al.*, 1990; LACOSTE *et al.*, 1990; ZHANG *et al.*, 1990; OSBORN *et al.*, 1989]. TNF- $\alpha$  bindet an TNF-R-1, dadurch wird die TNF-R-1-assoziierte Todesdomäne (TRADD) rekrutiert. Die Interaktion von TRADD mit der Todesdomäne des Fas-assoziierten Proteins (FADD) löst über ICE-ähnliche Proteasen Zelltod-verursachende Signale aus, was aber nur in wenigen Zelllinien der Fall zu sein scheint. TRADD-Interaktion mit TRAF2 führt direkt oder über Bcl-2 oder NIK zur NF- $\kappa$ B-Aktivierung, die das Zellüberleben fördert [SONENSHEIN, 1997; MALININ *et al.*, 1997; DE MOISSAC *et al.*, 1998; POURZAND und TYRELL, 1999]. UV-Einwirkung auf Keratinozyten führt zur Freisetzung von TNF- $\alpha$  [BAZZONI *et al.*, 1994], das an der UV-induzierten Apoptose beteiligt sein soll [SHEIKH *et al.*, 1998]. Exposition von Keratinozyten mit UVB-Strahlung soll durch Assoziation des TNF-R-1 mit TRAF-2 zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen [TOBIN *et al.*, 1998].

TNF- $\alpha$  wurde als Positivkontrolle der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in HEK-Zellen etabliert (Abb. 3-20 bis Abb. 3-26). Bei Betrachtung der HEK-pNF- $\kappa$ B/Neo-Klone, bei denen TNF- $\alpha$  d2EGFP-Expression auslöst, fällt auf, daß sie im Vergleich zu Klonen, die nicht reagieren, schon eine erhöhte basale grüne Fluoreszenz aufweisen, so daß bis zu 7 % der Zellen in den Bereich EGFP(+)-Zellen fallen (Abb. 3-22). Ein kleiner Prozentsatz einer Population weist also bereits eine geringgradige Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionswegs auf. Bei den nicht reagierenden Klonen wurde vermutlich der Promotor und/oder das d2EGFP-Gen beim Einbau in ein Chromosom zerstört. Bei Klon 2 zeigten über 90 % der Zellen nach TNF- $\alpha$ -Zugabe deutliche Fluoreszenz (Abb. 3-22B) und dieser Klon wurde deshalb für alle weiteren Experimente verwendet.

In Klon 2 konnte eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B-abhängiger Genexpression durch 16 nmol/l PMA nachgewiesen werden (Abb. 3-24). Da das Überleben der Zellen nach PMA-Behandlung nicht bestimmt wurde, sei als Vergleichswert erwähnt, daß humane Colonkarzinomzellen HCT116 ein Überleben von 50 % bei Behandlung mit 648,4 nmol/l zeigten [HAN *et al.*, 1999].

Die Kinetik der TNF- $\alpha$  induzierten d2EGFP-Expression in HEK-Zellen zeigt einen schnellen Anstieg schon 6 h nach Zugabe von TNF- $\alpha$ , und einen langsamen Abfall über mehrere Tage, während PMA einen verzögerten Anstieg der d2EGFP-Expression mit einem Maximum nach 48 h verursacht (Abb. 3-24). Bei TNF- $\alpha$  ist zu beachten, daß es sich um eine Dauerstimulation handelt, während PMA nach 2 h Einwirkungszeit entfernt wurde. Der Abfall der d2EGFP-Ex-

pression findet also unter weiterem Einwirken von TNF- $\alpha$  statt, der vermutlich abgebaut wird oder nach einer bestimmten Bindungsdauer an seinen Rezeptor keinen Stimulus mehr ausüben kann.

Ab einer Dosis ionisierender Strahlung ( $^{137}\text{Cs}$ - $\gamma$ -Quelle) von 2 Gy wurde die Bindung von NF- $\kappa\text{B}$  an die DNS in humanen myeloiden Leukämie-Zellen (KG-1) aktiviert und sie erreichte ein Maximum bei 5 bis 20 Gy [BRACH *et al.*, 1991]. Die hier untersuchte Maximaldosis von 5 Gy Röntgenstrahlung, bei der ~ 15 % AA8- und 1 % EM9-Zellen überleben würden (Abb. 3-15B), führte in HEK-pNF- $\kappa\text{B}$ /Neo Klon 2 zu einer Verdopplung der d2EGFP-Expression nach 6 h, die nach 22 h auf den 1,3 bis 1,4fachen Wert der unbehandelten Kontrolle abfiel und bis 48 h nach Bestrahlung auf diesem Niveau blieb (Abb. 3-25A). Diese Werte sind jedoch zu niedrig, um eine sichere Aussage machen zu können. VALERIE *et al.* [1995] konnten in stabil transfizierten HeLa-Zellen nach Exposition mit ionisierender Strahlung eine erhöhte Bindung nukleärer Proteine an die HIV-*Enhancer*-Region, die NF- $\kappa\text{B}$ -Bindungsstellen enthält, nachweisen, jedoch keine erhöhte Expression des nachgeschalteten Reportergens CAT. In humanen embryonalen Lungenfibroblasten (FH109) lösten 5 Gy ionisierender Strahlung eine ~ sechsfach erhöhte Aktivität des sezernierten Reporters hGH aus, wobei hGH durch den IL-6-Promotor kontrolliert wurde, dessen NF- $\kappa\text{B}$ -Bindungsstelle für die Induktion verantwortlich war [BRACH *et al.*, 1993]. Geringere Dosen wurden nicht untersucht. BRACH *et al.* [1993] zeigten eine Bindung nukleärer Proteine an die NF- $\kappa\text{B}$ -Bindungsstelle bereits 15 min nach Einwirken ionisierender Strahlung (5 Gy), die 8 h nach Bestrahlung verschwunden war. FAURE *et al.* [1996] konnten in humanen Colonkarzinom-Zellen (HT28) zeigen, daß nukleäres NF- $\kappa\text{B}$  durch Röntgenstrahlung (ab 0,5 Gy, gemessen im  $\beta$ -Galactosidase-Reporterassay) aktiviert wird.

Durch UVC in Dosisbereichen von 0 bis  $15 \text{ J/m}^2$ , bei denen mindestens 5-10 % der EM9- und AA8-Zellen überleben (Abb. 3-15A), konnte keine NF- $\kappa\text{B}$ -Aktivierung in HEK-pNF- $\kappa\text{B}$ /Neo Klon 2 gemessen werden (Abb. 3-25B, Abb. 3-27). Das deckt sich mit den Befunden von VILE *et al.* [1995], die zeigen, daß erst sehr hohe Dosen UVC ( $40 \text{ J/m}^2$ ) NF- $\kappa\text{B}$  aktivieren, die auch Membranschäden verursachen. Dabei war die Aktivierung nicht mit dem Ausmaß der DNS-Schädigung korreliert. Auch frühere Studien zeigten, daß stark zytotoxische UVC-Dosen erforderlich sind, um NF- $\kappa\text{B}$  zu aktivieren; Bestrahlung mit  $40 \text{ J/m}^2$  UVC führte zu NF- $\kappa\text{B}$ -Aktivierung in HeLa-S3-Zellen [STEIN *et al.*, 1989B; DEVARY *et al.*, 1993]. In murinen Fibroblasten (L929) wurde durch  $30 \text{ J/m}^2$  UVC eine starke Induktion HIV-LTR (*Long Terminal Repeat*) gesteuerter CAT-Aktivität verursacht, dagegen lösten TNF- $\alpha$  (5,8 nmol/l) und PMA (162,1 nmol/l) keine Induktion aus [MILLER *et al.*, 1997]. Da bei  $30 \text{ J/m}^2$  UVC nur 0,2 bis 0,3 % der bestrahlten AA8- und EM9-Zellen überleben (Abb. 3-15A), wurden hier keine Experimente mit so hohen Dosen durchgeführt.

Die Wahrscheinlichkeit, daß der künstliche Promotor (200 bp) oder das d2EGFP-Gen (1042 bp) durch UV-induzierte Schäden zerstört wurde und daß deshalb keine d2EGFP-Expression

erfolgen konnte, obwohl NF- $\kappa$ B aktiviert wurde, ist relativ gering. Bei einer Dosis von 1 J/m<sup>2</sup> ist mit ungefähr einem Thymindimer pro 100.000 bp DNS zu rechnen [GIBBS *et al.*, 1990].

Exposition mit maximal 4.100 J/m<sup>2</sup> UVB- und UVA-Strahlung (Tabelle 2-14) führte nicht zu einer erhöhten d2EGFP-Expression (Abb. 3-26A, Abb. 3-27). Bei einer Dosis von 4.000 J/m<sup>2</sup> UVB- und UVA-Strahlung überleben 50-70 % AA8- und 40-60 % EM9-Zellen [SZYSLO, in Vorbereitung]. SIMON *et al.* [1994] konnten dagegen eine dosisabhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch subletale UVB-Dosen (290-320 nm) in der humanen epidermoiden Karzinom-Zelllinie A431 nachweisen, die zumindest teilweise über die Zellmembran ausgelöst wurde. In humanen Lungenfibroblasten (WI-38 und IMR-90) führten 1.530 J/m<sup>2</sup> UVB (Maximum bei 308 nm) zu einem deutlichen Anstieg der DNS-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B im *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) und der NF- $\kappa$ B-abhängigen Expression (NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen aus TNF- $\alpha$ -Promotor) des Reporters CAT [HELENIUS *et al.*, 1999].

In HEK-pNF- $\kappa$ B/Neo Klon 2 konnte eine Aktivierung NF- $\kappa$ B-abhängiger Genexpression durch UVA (Tabelle 2-15) ab 31 kJ/m<sup>2</sup> nachgewiesen werden, die 22 bis 28 h nach Bestrahlung ihr Maximum erreicht (Abb. 3-26B, Abb. 3-27). Bei einer Dosis von 53 kJ/m<sup>2</sup> UVA-Strahlung überleben 10-30 % AA8- und 30 % EM9-Zellen [SZYSLO, in Vorbereitung]. VILE *et al.* [1995] konnten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in humanen Hautfibroblasten (FEK4) durch 250 kJ/m<sup>2</sup> UVA mit dem EMSA messen. In einer humanen Keratinozyten-Zelllinie (NCTC) dagegen fanden DJAVAHERI-MERGNY *et al.* [1999] eine Abnahme der DNS-bindenden Aktivität von NF- $\kappa$ B und der NF- $\kappa$ B-gesteuerten Expression des Reporters Luciferase durch UVA-Bestrahlung (Maximum bei 365 nm, 60 bis 240 kJ/m<sup>2</sup>), die mit einer Reduktion der verfügbaren NF- $\kappa$ B-Untereinheiten p50 und p65 einherging. Das Überleben der NCTC-Zellen in dem untersuchten Dosisbereich wurde nicht angegeben, außerdem ist die verwendete Dosimetrie unbekannt, so daß nicht entschieden werden kann, ob es sich um einen physiologisch relevanten Dosisbereich handelt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Höchstdosis von 62 kJ/m<sup>2</sup> führte bei HEK-pNF- $\kappa$ B/Neo zu einer Zunahme der d2EGFP-exprimierenden Zellen von 4 % auf fast 30 %, wobei im Vergleich zu 46 kJ/m<sup>2</sup> jedoch keine starke Steigerung des Effekts mehr zu beobachten ist (Abb. 3-26B). Diese Unterschiede können demnach durch den unterschiedlichen UVA-Dosisbereich, die UVA-Quelle (TF-20L versus Sol-2 mit WG335-3+UG11) und die Zelllinien – Keratinozyten und embryonale Nierenzellen – bedingt sein (und s.u.).

Als gemeinsamer Schritt der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch verschiedene Agenzien wird die intrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vorgeschlagen, da das Antioxidans N-Acetylcystein bzw. Überexpression der Mangan-Superoxiddismutase die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TNF- $\alpha$  und PMA blockieren [STAAL *et al.*, 1990; SCHRECK *et al.*, 1991; MANNA *et al.*, 1998]. Redoxstreß allein in Form von 500  $\mu$ mol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war in murinen Prä-B-Zellen jedoch nicht in der Lage, NF- $\kappa$ B zu aktivieren [COURTOIS *et al.*, 1997]. Bei der Untersuchung von oxidativem Streß können in Serum oder Medium enthaltene Antioxidantien die Effekte abschwächen und den Einsatz höherer Dosen erfordern, als bei Behandlung mit dem Oxidans in

PBS oder serumfreiem Medium notwendig wäre [GUYTON *et al.*, 1996]. TNF- $\alpha$  wurde hier in Medium mit 10 % Serum angewandt, falls die ROS-Produktion für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TNF- $\alpha$  eine Rolle spielt, könnte sie durch Antioxidantien im Serum abgeschwächt sein.

Auf Ebene der DNS werden DNS-Einzel- und Doppelstrangbrüche als Auslöser der NF- $\kappa$ B-Aktivierung vorgeschlagen, da DNS-Strangbruch-produzierende UVA-Strahlung und Topoisomerasehemmstoffe NF- $\kappa$ B aktivieren [PIRET und PIETTE, 1996].

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, welches die Zelle gegen Apoptose schützt, ist möglicherweise bei bestrahlten Zellen nicht wünschenswert, da die Apoptose Zellen entfernen soll, die irreparable Schäden ihres Genoms erlitten haben [TOBIN *et al.*, 1998]. Dies trifft auch für DNS-schädigende, NF- $\kappa$ B-aktivierende Chemikalien bzw. Chemikaliengemische und Umweltproben zu, da die Gefahr besteht, daß geschädigte Zellen überleben und Mutationen entstehen.

Die oben dargestellten Unterschiede in den Ergebnissen verschiedener Forschergruppen deuten daraufhin, daß eine starke Zelltypspezifität in der Reaktion auf verschiedene Stimuli besteht. Um die Bedeutung der UV-Strahlung für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung mit dem hier getesteten System weiter aufklären zu können, sollten HEK-Zellen durch Keratinozyten und Fibroblasten oder auch Melanozyten ersetzt werden. Außerdem zeigen die Methoden zur Detektion der NF- $\kappa$ B-Aktivierung unterschiedliche Stadien des mehrstufigen Prozesses an, die für die z.T. widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich sein können. Ein EMSA zeigt die Bindung von NF- $\kappa$ B an seine Bindungssequenzen, ein *Northern blot* quantifiziert die mRNS-Transkription von einem Gen, das NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen in seinem Promotor oder *Enhancer* enthält. Reporterassays dagegen hängen von der NF- $\kappa$ B-Bindung an die DNS und korrekter Transkription und Translation des Reporterproteins ab. Die Bindung des dimeren Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B an seine Bindungssequenz muß nicht immer zu einer Initiation der Transkription führen, da einige Dimere, zusammengesetzt aus Proteinen der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie auch als Transrepressor der Genexpression wirken können, z.B. die Homodimere p50/p50 und p55/p55 [MAY und GOSH, 1997; PAUNESKU *et al.*, 2000]. Somit kann, auch wenn NF- $\kappa$ B-Bindung auf einen bestimmten Stimulus hin gezeigt wurde, die Transkription eines Gens/Reportergens ausbleiben. Hierbei wird jedoch vermutet, daß die transrepressiven Dimere eine andere Variante der Consensussequenz bevorzugen als die transaktivierenden. Die hier verwendeten NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen sollen transaktivierende Dimere bevorzugen (Tabelle 4-1).

Ein Thymin in Position 8 (fett markiert in Tabelle 4-1) soll dazu führen, daß keine p55/p55-Homodimere binden können. Ein Cytosin in dieser Position soll die Bindung dieser Homodimere begünstigen [PAUNESKU *et al.*, 2000].

**Tabelle 4-1 Vergleich der NF-κB-Bindungsmotiv–Consensussequenz mit Sequenzen in den Promotorregionen verschiedener Gene**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Referenz	
5'	G	G	G	R	N	N	T	Y	C	C	MÜLLER <i>et al.</i> , 1993
5'	G	G	G	R	N	Y	Y	Y	C	C	CHEN <i>et al.</i> , 1998
c	G	G	G	A	A	T	T	T	C	C	pNF-κB-d2EGFP Clontech, Palo Alto
g	G	G	G	A	C	T	C	T	C	C	iNOS-Gen, Promotorregion, 407-417 (aus <i>Rattus norvegicus</i> ) GenBank #Z69839
t	G	G	G	A	C	T	C	C	T	C	murines Connexin-32-Gen, putativ, 336-345 GenBank #M81446
g	G	G	G	A	C	T	T	T	C	C	Murines Ig κ-Gen, lymphozyten- spezifisches <i>Enhancer</i> -Fragment, 253-263 GenBank #X00268
g	G	G	G	A	A	T	C	T	C	C	Mensch (aus <i>Enhancer</i> -Region des IL-2 Rezeptor-α-Ketten-Gens, 8685- 8696, bindet p50/p50-Homodimere) GenBank #Z70243
	G	G	G	A	C	T	T	T	C	C	HIV (in 5'-LTR, 349-359 + 363-373, in 3'-LTR 9435-9444) GenBank #K03455

A, Adenin; C, Cytosin; G, Guanin; N, jedes Nukleotid; R, Purin; T, Thymin; Y, Pyrimidin  
GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Weiterhin können der Gesamtaufbau des Promotors und weitere darin enthaltene Transkriptionsfaktorbindungsstellen die Aktivierbarkeit durch NF-κB beeinflussen. Z.B. ist eine der im HIV-LTR enthaltenen NF-κB-Bindungsstellen in ihrer transaktivierenden Wirkung abhängig von der Anwesenheit von Sp-1-Bindungsstellen [MALLARDO *et al.*, 1996].

Außerdem ist die angenommene geringere Sensitivität von d2EGFP als Reporter im Vergleich zu enzymatischen Reportern zu beachten (s. 1.2.2), da bei Verwendung von d2EGFP nur soviel Protein für die Quantifizierung mittels verschiedener fluorimetrischer Methoden zur Verfügung steht, wie von der neu synthetisierten mRNA abgelesen wird [TSIEN, 1998]. In einer Zelle (Volumen ~ 5 fl) müssen mindestens  $5 \times 10^4$  Moleküle GFP vorhanden sein (weniger bei EGFP bzw. d2EGFP durch die ~ 6-35fach höhere Fluoreszenzintensität [ZHANG *et al.*, 1996; CHENG *et al.*, 1996; PATTERSON *et al.*, 1997]), um die Autofluoreszenz der Zelle zu übersteigen [AMSTERDAM *et al.*, 1996; AUBIN, 1979], so daß erst ab einer bestimmten Transkriptionsrate die d2EGFP-Fluoreszenz vom Hintergrund unterschieden werden kann. Wird durch die Behandlung mit einem Agens die zelluläre Autofluoreszenz erhöht oder zeigt die Substanz selbst Fluoreszenz im Bereich des EGFP-Spektrums, kann dadurch die Detektion von d2EGFP erschwert oder unmöglich gemacht werden. Auch wenn in der FACS-Analyse über 70 % der HEK-pNF-κB/Neo-Population nach Behandlung mit TNF-α deutliche Fluoreszenzzunahme zeigen (Abb. 3-23A), ist im MTP-Fluorimeter nur eine minimale Erhöhung der Fluoreszenz

meßbar (Abb. 3-23B). Dies erschwert die Erstellung von Kinetiken der induzierten Genexpression, da für die FACS-Analyse die Zellen trypsiniert werden müssen. Um dennoch mit den gleichen Zellen die d2EGFP-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten messen zu können, bietet sich die digitale Fluoreszenzmikroskopie mit Bildanalyse an. Ein Vergleich verschiedener Reporter kann Aufschluß über die tatsächliche Sensitivität von d2EGFP als Reporter geben.

d2EGFP bietet jedoch den entscheidenden Vorteil, daß Untersuchungen auf Einzelzellebene durchgeführt werden können, d.h. für jede einzelne Zelle kann eine Aussage gemacht werden, ob die Aktivierung des zu untersuchenden Promotors eine bestimmte Schwelle überschreitet.

#### **4.4 AUSBLICK**

Die hier diskutierten Ergebnisse zeigen, daß, mit einigen Einschränkungen, Genaktivierung mit Hilfe einfacher Fluoreszenzdetektion von d2EGFP, ohne weitere Behandlung der Zellen, in lebenden Zellen detektiert werden kann. Außerdem kann das Zellwachstum anhand der (additiven) Proteinsyntheseaktivität nach Behandlung mit zytotoxischen Agenzien bei Einsatz des konstitutiven EGFP-Expressionssystems bestimmt werden. Damit bildet diese Arbeit die Grundlage für ein auf der Internationalen Raumstation (ISS) durchzuführendes Weltraumexperiment zur Untersuchung genotoxischer und Schwerkraft-abhängiger Vorgänge in Säugerkzellen (*Cellular Responses to Radiation in Space* = CERASP).

Eine Kombination der beiden Systeme (Genaktivierung und Zytotoxizität) in einer Zelle kann durch Austausch von EGFP durch ein anderes fluoreszierendes Protein mit vergleichbaren Eigenschaften, wie z.B. das *Red Fluorescent Protein* (DsRed) aus der Pilzanemone *Discosoma species*, zur Quantifizierung des Wachstums erreicht werden. d2EGFP kann weiterhin für die Visualisierung der schadensinduzierten Genexpression verwendet werden, wobei andere Promotoren auf ihre spezifische Aktivierung nach DNS-Schäden getestet werden sollen. Die verwendete Zelllinie soll dabei aus dem bevorzugten Zielorgan eines (DNS-)schädigenden Agens stammen, z.B. zur Untersuchung der UV-Wirkungen sollen Keratinozyten und Fibroblasten verwendet werden.