

Aus dem Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin
des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt e.V.
in Köln-Porz

Eingereicht über das
Institut für Immunologie und Molekularbiologie
Fachbereich Veterinärmedizin
Freie Universität Berlin

**Nachweis UV-induzierter Genaktivierung
in Säugerzellen
mit Hilfe eines stabil in das Genom integrierten
GFP-Vektors**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christine E. Hellweg
Tierärztin aus Dortmund

Berlin 2001
Journal-Nr. 2478

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt
1. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt
2. Gutachter	Priv.-Doz. Dr. R. Hemmersbach

Tag der Promotion: 16.7.2001

Meiner Mutter (*in memoriam*)

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	8
1.1 ULTRAVIOLETTE STRAHLUNG	8
1.1.1 DNS-Schäden und ihre Reparatur	10
1.1.2 Biologische Konsequenz der DNS-Schäden	12
1.1.3 Die Bedeutung der UV-Strahlung für die Gesundheit von Mensch und Tier	13
1.1.4 Signaltransduktion in Säugerzellen nach Exposition mit UV-Strahlung	17
1.1.5 Genaktivierung in Säugerzellen durch UV-Strahlung am Beispiel des NF- κ B-Pathways	20
1.2 NACHWEIS DER GENAKTIVIERUNG	24
1.2.1 Reporterassays	25
1.2.2 Green Fluorescent Protein	27
1.3 BIOASSAYS	29
1.3.1 Auswahl des Sensors	30
1.3.2 Auswahl der Zelllinien	31
1.4 FRAGESTELLUNG	31
2 MATERIAL UND METHODEN	33
2.1 CHEMIKALIEN	33
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
2.2.1 Vervielfältigung der Plasmide	33
2.2.1.1 Transformation	34
2.2.1.2 Plasmidreinigung (Miniprep, Maxiprep)	35
2.2.1.3 Photometrische Messung	36
2.2.2 Gelelektrophorese	36
2.2.3 Konstruktion der Plasmide	38
2.2.3.1 Übersicht Plasmidkonstruktionen: pCMV-d2EGFP und pNF- κ B/Neo	38
2.2.3.2 Restriktionsverdau	39
2.2.3.3 Reinigung der Fragmente und ihre Gewinnung aus dem Gel	39
2.2.3.4 Quantifizierung der Fragmente	40
2.2.3.5 Ligation	40
2.2.3.6 Transformation von E. coli mit den rekombinanten Plasmiden	41
2.2.3.7 Restriktionsanalyse der rekombinanten Plasmide	42
2.2.3.8 Vervielfältigung der rekombinanten Plasmide	42
2.3 ZELLKULTUR	42
2.3.1 Verwendete Zelllinien	42
2.3.2 Herstellung der Zellkulturmedien	43
2.3.3 Kulturbedingungen	43
2.3.4 Poly-L-Lysin-Beschichtung	43
2.3.5 Kultivieren und Subkultivieren der Zellen	44
2.3.6 Wachstumskinetik während einer Passage (CHO-Zellen)	45
2.3.7 Test auf Mycoplasmenbefall	47
2.3.8 Gefrierkonservierung von Zellen	47
2.3.9 Transfektion	48
2.3.9.1 Durchführung der Transfektion	48
2.3.9.2 Optimierung der Transfektionen	49
2.3.9.3 Stabile Transfektion	51
2.3.10 Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid	53

2.3.11	Exposition mit UV-Licht.....	54
2.3.12	Exposition mit Röntgenstrahlung.....	56
2.3.13	Koloniebildungstest (Colony Forming Ability-Test, CFA-Test).....	56
2.3.13.1	Auswertung.....	57
2.3.13.2	Statistische Behandlung der Daten.....	59
2.3.14	Genaktivierung.....	59
2.4	ANALYTIK.....	61
2.4.1	Lichtmikroskopische Dokumentation.....	61
2.4.2	Fluoreszenzmikroskopie und Mikrofotografie.....	62
2.4.3	Spektroskopie/ Fluoreszenz- und Transmissionsmessungen.....	62
2.4.3.1	Fluoreszenzspektroskopie.....	62
2.4.3.2	Transmissionsmessungen.....	62
2.4.3.3	Berechnung des Fluoreszenzertrages.....	62
2.4.4	FACS-Analyse.....	63
2.4.5	Messung der Fluoreszenz im Mikrotiterplattenfluorimeter.....	63
2.4.5.1	Eigenfluoreszenz der verwendeten Platten.....	63
2.4.5.2	EGFP-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zellzahl und ihre Detektionsschwelle.....	63
2.4.5.3	UVC-Bestrahlung in 96-well-Platten.....	64
2.4.5.4	Transfektionseffizienz.....	64
3	ERGEBNISSE.....	65
3.1	PLASMIDKONSTRUKTIONEN UND -PRÄPARATIONEN.....	65
3.1.1	DNS-Präparationen.....	65
3.1.2	Klonen der Plasmide.....	67
3.1.2.1	Klonen des Plasmids pCMV-d2EGFP.....	67
3.1.2.2	Klonen des Plasmids pNF-κB/Neo.....	70
3.2	VISUALISIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON EGFP UND D2EGFP ALS REPORTERKOMPONENTE.....	73
3.2.1	Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop.....	73
3.2.2	EGFP-Fluoreszenzspektrum.....	74
3.2.3	Messung der EGFP- und d2EGFP-Fluoreszenz im FACS.....	75
3.2.4	Messung im MTP-Fluorimeter und Optimierung der Meßbedingungen.....	77
3.2.4.1	EGFP-Fluoreszenzerträge mit zwei verschiedenen Filterkombinationen.....	77
3.2.4.2	Autofluoreszenz verschiedener MTP.....	78
3.2.4.3	Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zellzahl.....	78
3.2.4.4	Detektionslimits EGFP- und d2EGFP-exprimierender Zellen in MTP.....	78
3.2.4.5	Messung des Vermehrungsverhaltens EGFP-exprimierender Zellen im MTP- Fluorimeter.....	79
3.2.4.6	Messung der Transfektionseffizienz im MTP-Fluorimeter.....	81
3.2.5	Stabile Transfektion durch Cotransfektion eines Helferplasmids.....	82
3.2.6	Herstellung EGFP-/d2EGFP-exprimierender Zelllinien ohne Cotransfektion.....	84
3.2.7	Halbwertszeit von EGFP und d2EGFP in stabil transfizierten AA8-Zellen.....	86
3.3	KONSTITUTIVE EGFP-EXPRESSION ALS MARKER FÜR ZYTOTOXIZITÄT IN CHO-ZELLEN	87
3.3.1	Strahlenempfindlichkeit der CHO-Zellen.....	87
3.3.2	Wachstum UVC-bestrahlter, EGFP-exprimierender Zellen.....	89
3.3.3	EGFP-Expression UVC-bestrahlter EM9-pCX-GFP-Zellen.....	91

3.4	INDUZIERBARE D2EGFP-EXPRESSION ALS MÖGLICHER MARKER FÜR GENOTOXIZITÄT IN HEK-ZELLEN.....	92
3.4.1	Transiente Transfektion mit pNF- κ B-d2EGFP	92
3.4.1.1	AA8-Zellen, Messung im MTP-Fluorimeter	92
3.4.1.2	HEK-Zellen, Messung im MTP-Fluorimeter.....	92
3.4.1.3	HEK-Zellen, Behandlung mit TNF- α	93
3.4.2	Stabile Transfektion von HEK-Zellen mit pNF- κ B/Neo	96
3.4.2.1	Kinetik der d2EGFP-Expression nach Behandlung mit TNF- α	96
3.4.2.2	Visualisierung im Fluoreszenzmikroskop.....	100
3.4.2.3	Messung im MTP-Fluorimeter.....	100
3.4.2.4	Messung im FACS	100
3.4.2.5	Behandlung mit PMA	100
3.4.2.6	Exposition mit Röntgen-, UVC-, UVB- und UVA-Strahlung.....	102
4	DISKUSSION	106
4.1	VISUALISIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON EGFP UND D2EGFP	107
4.2	KONSTITUTIVE EXPRESSION VON EGFP UND D2EGFP ALS MARKER FÜR ZYTOTOXIZITÄT	109
4.3	INDUZIERBARE GENEXPRESSION	115
4.4	AUSBLICK	123
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	124
6	SUMMARY.....	125
7	ABKÜRZUNGEN UND GLOSSAR.....	126
8	LITERATUR	130
9	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	143
10	LEBENS LAUF	144
11	DANKSAGUNG	146

9 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Christine E. Hellweg, die vorliegende Dissertation selbständig sowie nur mit den in dieser Arbeit aufgeführten Hilfsmitteln und Hilfen verfaßt zu haben. Diese Arbeit wurde noch in keinem früheren Promotionsvorhaben angenommen oder abgelehnt.

Köln, den 5. Januar 2001

- Christine E. Hellweg -

10 LEBENSLAUF

Christine E. Hellweg, * 28. Mai 1971 in Dortmund

Schulbildung:

1977 – 1981 Grundschule Spessartstraße in Mettmann
1981 – 1990 Heinrich-Heine-Gymnasium in Mettmann

Studium:

1990 – 1996 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
1. April 1996 Abschluß des Dritten Abschnitts der Tierärztlichen Prüfung

Auslandsaufenthalte:

Juli 1987 Université d'été de Besançon, Frankreich
Juli 1988 Université d'été de Perpignan, Frankreich
Juli 1989 Collège International de Cannes, Frankreich
März 1991 Praktikum
Docteur-Vétérinaire M. Beaulaton, Ophthalmologe
Cannes, Frankreich
Februar – März
1994 Praktikum
Docteur-Vétérinaire D. Carlotti, Dermatologe
Carbon Blanc, Frankreich
April – Mai 1995 Praktikum
Tierärztliche Klinik „Dundas Veterinary Services“
Winchester, Ontario, Kanada

Beruflicher Werdegang:

16. April 1996 Approbation als Tierärztin
April 1996 – Mai
1997 Stipendiatin (NaFöG)
Institut für Veterinärpathologie und Klinik für Kleine Haustiere
FU Berlin
Juni 1997 – Januar
2001 Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin
Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin des DLR, Strahlenbiologie
Köln-Porz
Ab 1. Februar 2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
Medizinische Einrichtungen der Universität zu Köln

Fortbildung:

Juli 1994 Osteosynthese-Workshop an der FU Berlin
November 1996 Pathohistologie der Niere, DVG Fachgruppe Pathologie, Fulda
September 2000 Fortbildung nach §15 Abs. 2 und 4 GenTSV an der Universität Bonn

Publikationen:

- BAUMSTARK-KHAN, C., C. E. HELLWEG, M. PALM and G. HORNECK (2001) Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) for Space Radiation Research using Mammalian Cells in the International Space Station. *Physica Medica*, XVII, Suppl. 1, 210-214
- HELLWEG, C. E., C. BAUMSTARK-KHAN and G. HORNECK (2001) Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) as reporter protein for biomonitoring of cytotoxic effects in mammalian cells. *Analytica Chimica Acta*, 427, 191-199
- HELLWEG, C. E., C. BAUMSTARK-KHAN, P. RETTBERG and G. HORNECK (2001) Suitability of Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) as reporter component for bioassays. *Analytica Chimica Acta*, 426, 175-184
- HELLWEG, C.E., C. BAUMSTARK-KHAN and G. HORNECK (2000) Mammalian Gene Expression Test. In: *TECHNOTOX, Proceedings of the BIOSET Technical Workshop on Genotoxicity Biosensing*, Mol, Belgien, 8.-12. Mai 2000, pp. 74-82, <http://www.vito.be/english/environment/environmentaltox5.htm>
- HELLWEG, C.E., M. PALM, C. BAUMSTARK-KHAN and G. HORNECK (2000) Detection of Green Fluorescent Protein expression in Chinese hamster ovary cells. In: *Biological UV Dosimetry, A Tool for Assessing the Impacts of UV Radiation on Health and Ecosystems* (Hrsg: Rettberg, P., C. Baumstark-Khan, G. Horneck and G. Amanatidis), European Communities, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 39-42
- BAUMSTARK-KHAN, C., J. AECKERLEIN, C. E. HELLWEG, K. SCHERER and G. HORNECK (2000) Biological UV-dosimetry using mammalian cells. In: *Biological UV Dosimetry, A Tool for Assessing the Impacts of UV Radiation on Health and Ecosystems* (Hrsg: Rettberg, P., C. Baumstark-Khan, G. Horneck and G. Amanatidis), European Communities, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp. 169-181
- BAUMSTARK-KHAN, C., C. E. HELLWEG, K. SCHERER and G. HORNECK (1999) Mammalian cells as biomonitors of UV-exposure. *Analytica Chimica Acta* 387, 281-287
- HELLWEG, C. E.; C. BAUMSTARK-KHAN, M. PALM and G. HORNECK (1999) Aus der Tiefe der Ozeane: Grün Fluoreszierendes Protein (GFP) der Qualle *A. victoria* in Biosensoren für UV-Strahlung. *Medizin und Mobilität*, Köln, 9.-12. September 1999, Flug- und Reisemedizin Sonderpublikation "Medizin und Mobilität" Abstract-Heft, S. 29 (**Posterpreis**)

11 DANKSAGUNG

Frau Dr. Christa Baumstark-Khan möchte ich herzlich danken für die ausgezeichnete fachliche Betreuung am Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt (DLR) und die stete Diskussionsbereitschaft, sowie Frau Dr. Gerda Horneck und Herrn Prof. Rupert Gerzer für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Michael F. G. Schmidt gilt mein besonderer Dank für die Übernahme des Themas am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin sowie die jederzeit gewährte wissenschaftliche Unterstützung.

Miriam Palm und Claudia Schmitz danke ich für die Einweisung in die Zellkulturarbeiten.

Katya Loupinina (Moskau), Priyanka Belawat (New Dehli) und Patrick Lau (Universität Bonn) möchte ich für die Unterstützung im Laboralltag während ihres Praktikums im Arbeitsschwerpunkt Strahlenbiologie danken.

Den Mitarbeitern der Werkstatt des Instituts für Luft- und Raumfahrtmedizin, insbesondere Simon Jokisch und Hartmuth Friedrich, danke ich für die Anfertigung von Expositionsboxen.

Ich danke allen Mitarbeitern des Arbeitsschwerpunkts Strahlenbiologie des Instituts für Luft- und Raumfahrtmedizin für die freundliche Atmosphäre sowie für ihre Hilfsbereitschaft.

Für ausdauerndes Verständnis, Unterstützung und Freude danke ich meiner Familie und meinen Freunden, vor allem Dietmar, meinem Vater, meiner Großmutter (*in memoriam*), Andreas, meinem Großvater, Uschi, Hedda, Irene, Angela und Rolf.