

# 1 EINLEITUNG

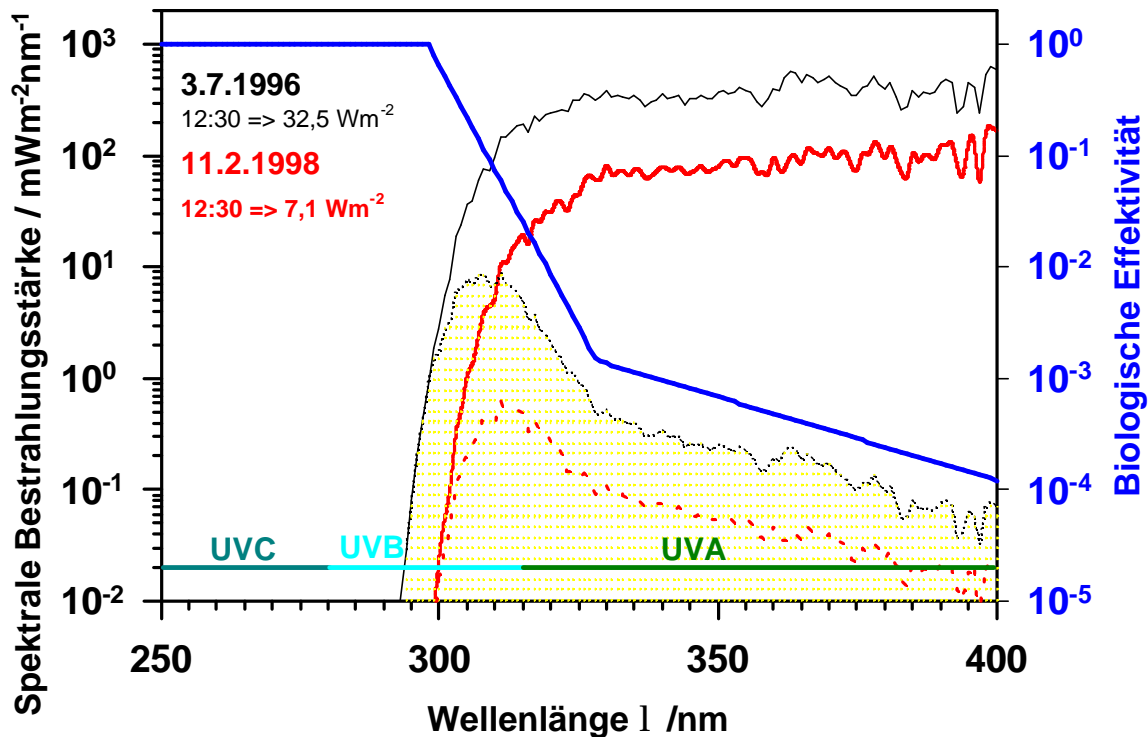
Durch zunehmende Umweltbelastungen, zu denen auch erhöhte ultraviolette (UV-)Strahlung gezählt werden muß, gewinnt der Umweltschutz eine immer wichtigere Bedeutung für die Gesundheit von Mensch und Tier. Erhöhte Hautkrebsraten sind auf eine vermehrte Exposition größerer Bevölkerungsgruppen und Tierpopulationen mit potentiell gefährdender UV-Strahlung zurückzuführen. Bei Lebewesen, die dem Sonnenlicht ausgesetzt sind, spielt vor allem die durch Ausdünnen der Ozonschicht bedingte Zunahme der auf der Erde auftreffenden UVB-Strahlung eine Rolle. Dadurch wird nicht nur die Gesundheit von Mensch und Tier gefährdet, sondern auch das Gleichgewicht in empfindlichen Ökosystemen, wie z.B. dem Phytoplankton [HÄDER und WORREST, 1991] oder dem antarktischen Zooplankton [JANKOWSKI und CADER, 1997; MALLOY *et al.*, 1997]. Beim Menschen kommen ein besonderes Schönheitsideal und ein geändertes Freizeitverhalten hinzu, die zu hohen UV-Expositionen besonders von hellhäutigen Menschen durch Reisen in tropische Länder, intensives Sonnenbaden und Besuche im Solarium führen. Zudem wird UV-Strahlung beim Menschen als Heilmittel gegen Krebs oder gegen Psoriasis eingesetzt. Deshalb sind epidemiologische Forschungen zum Hautkrebs und das Verständnis der Reaktionen von Säugerzellen auf UV-Strahlung und der induzierten photochemischen Veränderungen an der DNS von großer Bedeutung.

## 1.1 ULTRAVIOLETTE STRAHLUNG

UV-Strahlung gehört zum elektromagnetischen Spektrum der Sonnenstrahlung und umfaßt den Bereich von 10 bis 400 nm. Sie schließt sich, zu kürzeren Wellenlängen hin, an das sichtbare Licht an. Als Bestandteil des Sonnenlichts erreicht nur der langwellige Anteil (290-400 nm) die Erdoberfläche, kurzwelligere UV-Strahlung wird durch die Atmosphäre, insbesondere die stratosphärische Ozonschicht, absorbiert.

Die Einteilung der UV-Strahlung (Tabelle 1-1) wurde anhand der Erythem-Wirkungskurve (Abb. 1-1, blau) und der besonders bakteriziden Wirkung der UV-Strahlen unterhalb 280 nm getroffen.

<b>Tabelle 1-1</b>	<b>Einteilung der UV-Strahlung</b>		
Vakuum-UV	100 - 200 nm	$20 \times 10^{-19} - 9,9 \times 10^{-19}$ Ws	12,4 - 6,2 eV
UVC	200 - 280 nm	$9,9 \times 10^{-19} - 7,1 \times 10^{-19}$ Ws	6,2 - 4,4 eV
UVB	280 - 315 nm	$7,1 \times 10^{-19} - 6,3 \times 10^{-19}$ Ws	4,4 - 3,9 eV
UVA	315 - 400 nm	$6,3 \times 10^{-19} - 4,9 \times 10^{-19}$ Ws	3,9 - 3,1 eV



**Abb. 1-1 Sonnenspektrum für Köln, 50° 51'N, 7° 7'O, 72 m NN, 3.7.1996 12.30 h und 11.2.1998 12.30 h**

Das Sonnenspektrum (schwarze bzw. rote durchgezogene Linie) wurde mit einem Bentham DM 300 Spektroradiometer auf dem Dach des Instituts für Luft- und Raumfahrtmedizin im DLR, Köln-Porz gemessen (zur Verfügung gestellt von Dr. Facius). Das Erythem-Wirkungsspektrum der CIE ist blau dargestellt [MCKINLAY und DIFFEY, 1987] und die Erythem-gewichtete Bestrahlungsstärke der Sonne schwarz bzw. rot gepunktet.

Der Einschnitt bei 315 nm wird von der *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE) empfohlen und bezieht sich auf das Absinken der Erythemkurve vom Maximum der Erythem-erzeugenden Wirkung bei 290 nm auf 1 % der Wirkung bei 315 nm.

Abb. 1-1 zeigt die an einem klaren Sommer- und Wintertag (schwarze bzw. rote durchgezogene Linie) auf der Erdoberfläche gemessene spektrale Bestrahlungsstärke, das Erythem-Wirkungsspektrum der CIE (blaue Linie) [MCKINLAY und DIFFEY, 1987] und die mit diesem Wirkungsspektrum gewichtete Bestrahlungsstärke (schwarz bzw. rot gepunktete Kurve). Zwischen 315 nm und 290 nm nimmt die Bestrahlungsstärke am Sommertag um 4 Dekaden ab. An dem Wintertag erreicht nur Strahlung oberhalb von 298 nm die Erdoberfläche. Dies ist durch den unterschiedlichen Einfallswinkel der Sonnenstrahlung in Sommer und Winter bedingt. Das Erythem-Wirkungsspektrum beruht auf Daten zur Hautrötung verschiedener menschlicher Hauttypen, die nach UV-Bestrahlung unterschiedlicher Qualität erhoben wurden, und es soll die durchschnittliche Reaktion der Haut im UVA- und UVB-Bereich repräsentieren. Das Erythem-Wirkungsspektrum zeigt, daß die relative biologische Wirksamkeit der UV-Strahlung zum Kurzwelligen hin zunimmt, so daß auch eine geringe Zunahme der UVB-Bestrahlungsstärke

durch Ausdünnen der Ozonschicht eine große biologische Wirkung haben wird. Dies wird durch die erythemgewichtete Bestrahlungsstärke verdeutlicht. Sie ist das Produkt des Erythem-Wirkungsspektrums und des Sonnenspektrums (Abb. 1-1, schwarz bzw. rot gepunktet). Die Integration der Fläche unter dieser Kurve (gelbe Fläche) über den Wellenlängenbereich von 290 bis 400 nm ergibt die Erythemdosisrate ( $\text{Wm}^{-2}$ ) und ist ein Maß für die Menge der hautschädigenden UV-Strahlung. Die Verdünnung der Ozonschicht führt nicht nur zu einer erhöhten UVB-Menge, die die Erdoberfläche erreicht, sondern auch zu einer Verschiebung der Kante des Sonnenspektrums zum Kurzwelligen hin. Durch die hohe biologische Wirksamkeit der Strahlung in diesem Bereich sind deshalb von einer weiteren Ausdünnung der Ozonschicht alle Lebewesen auf der Erdoberfläche betroffen. URBACH [1997] geht, je nach Jahreszeit und geographischer Lage, von einer Erhöhung der biologisch effektiven UV-Strahlung von 4-9 % aus, was einen Anstieg des nicht-Melanom-Hautkrebses (Basal- und Squamosazellkarzinome) des Menschen von 2 % und des Malignen Melanoms von 0,6 % je 1 % Abnahme der Ozonschicht bedingt (s. 1.1.3.).

### 1.1.1 DNS-Schäden und ihre Reparatur

Alle auf der Erde lebenden Organismen sind ständig unterschiedlichen Formen von Strahlung ausgesetzt. Dazu gehören die kosmische Strahlung aus dem Weltall, die UV-Strahlung der Sonne und die Strahlung radioaktiver Elemente im Erdboden oder im Gestein.

Für die schädlichen Wirkungen dieser Strahlung auf Zellen ist die selektive Absorption der UV-Strahlung durch Chromophore verantwortlich. Das wichtigste Chromophor für kurze Wellenlängen ist hierbei die DNS. Deren Basen bestimmen ihr Absorptionsverhalten von 200 bis 260 nm. Unter 200 nm absorbieren in erster Linie die Desoxyribosephosphate des DNS-Rückgrats. Strahlenschäden an der DNS sind z.B. Brüche der Nukleotidketten, Veränderungen der Basen und intra- und intermolekulare Vernetzungen (Tabelle 1-2). Die UV-induzierten Einzelstrangbrüche können sowohl auf direkte Schädigung der DNS, als auch auf indirekte Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zurückgeführt werden. Neben diesen Strangbrüchen und Proteinquervernetzungen entstehen typische Basenschäden durch UV-Strahlung. Bei Verwendung von 254-nm-UV und UVB-Strahlung entstehen (5-6)Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs) und nicht-zyklische Pyrimidin(6-4)Pyrimidonaddukte ((6-4)-Photoprodukte). Bei den beteiligten Pyrimidinen handelt es sich meist um Thymin.

---

**Tabelle 1-2 UV-induzierte DNS-Schäden**

---

Basenschäden, z.B.	(5-6)Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs) nicht zyklische Pyrimidin(6-4)-Pyrimidonaddukte ((6-4)-Photoprodukte) 8-Hydroxyguanin und Thyminglycol
Einzelstrangbrüche (Doppelstrangbrüche bei UVC)	
DNS-Proteinquervernetzung	

---

Säugerzellen sind, wie auch Bakterienzellen, in der Lage, induzierte DNS-Schäden aus ihrem Genom zu entfernen, bevor diese durch eine DNS-Replikation als Mutation manifest werden. Die immense Bedeutung, die den Reparaturmechanismen dabei zur Erhaltung der Stabilität der Erbinformation zukommt, wird durch einen hohen Homologiegrad der einzelnen Enzyme der unterschiedlichen Reparaturwege von Bakterien und Hefen bis zum Menschen unterstrichen [BATTY and WOOD, 2000]. Nur einige wenige Enzyme erkennen einen spezifischen Schaden, wie z.B. die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNS-Methyltransferase das Vorliegen von O<sup>6</sup>-Methylguanin, und eliminieren ihn. Die Mehrzahl der DNS-Veränderungen werden nicht von einzelnen Enzymen, sondern über komplexe enzymatisch gesteuerte Reparaturwege beseitigt.

Im Zuge der Basenexzisionsreparatur (BER) wird die N-glycosidische Bindung zwischen einer fehlerhaften Base und der Desoxyribose durch eine Glycosylase, z.B. eine Uracilglycosylase, hydrolysiert. Die dadurch entstandene Fehlstelle wird von einer AP-Endonuclease erkannt, daraufhin wird das DNS-Rückgrat eingeschnitten, worauf die Polymerase  $\beta$  das fehlende Nukleotid in die entstandene Lücke einpaßt, eine Desoxyribosephosphodiesterase den überzähligen Zuckerphosphatrest entfernt und eine DNS-Ligase die Lücke endgültig schließt. Alternativ können auch längere Reparatursequenzen von den Polymerasen  $\delta$  oder  $\epsilon$  und *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) als deren Cofaktor generiert werden.

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist ein komplexer Reparaturvorgang, bei dem ein Multienzymkomplex den DNS-Schaden, z.B. ein CPD oder (6-4)-Photoprodukt, erkennt, die DNS zu beiden Seiten des Schadens einschneidet und zwischen diesen beiden Schnitten ein Oligonukleotid entfernt. Die entstandene Lücke wird auch hier durch eine Polymerase gefüllt und durch eine Ligase verschlossen. Ein Bestandteil des Multienzymkomplexes ist u.a. der aus neun Untereinheiten bestehende basale Transkriptionsfaktor TFIIH, der in ungeschädigter DNS seine Funktion in der DNS-Transkription erfüllt. Bei Vorliegen von DNS-Veränderungen wird TFIIH modifiziert und erlangt seine Reparaturaktivität.

Neben den genannten Reparaturwegen existieren weitere Mechanismen, welche die Beseitigung von DNS-Schäden nach einer DNS-Replikation ermöglichen. Allerdings sind diese Mechanismen nicht unbedingt fehlerfrei, konsequenterweise können Mutationen im Genom verbleiben.

Einige seltene humane Erbkrankheiten gehen mit Mutationen in Genen der NER einher. Die Erkrankung *Xeroderma pigmentosum* (XP), die mit einer Sonnenlichtempfindlichkeit und erhöhten Rate an Hauttumoren korreliert, wird durch Mutation in einem von 7 Genen (XPA-XPG) bestimmt. Von den XP-Genprodukten stellen XPA, XPC, XPF, und XPG einzelne Proteine des NER-Multienzymkomplexes dar; dabei sind XPB und XPD Untereinheiten des Transkriptionsfaktors TFIIH.

### 1.1.2 Biologische Konsequenz der DNS-Schäden

Die geschädigte Zelle kann je nach Grad der Schädigung, ihrer Reparaturkapazität und Position im mitotischen Zellzyklus unterschiedlich reagieren:

- Die Zelle kann die geschädigte DNS reparieren und sich erholen.
- Die Schäden werden nicht rechtzeitig repariert und während der folgenden Zellteilungen als Mutation fixiert.
- Die Zelle überlebt die Bestrahlung, ist jedoch nicht mehr teilungsfähig („*reproductive cell death*“).
- Die Bestrahlung führt zum unmittelbaren Zelltod (Apoptose, s.u.).

Das Einwirken von Strahlung auf die Zelle löst eine Signalkaskade (s. 1.1.4) aus, deren Ablauf zu einem der oben beschriebenen Endpunkte führen kann. Von besonderer Bedeutung als Voraussetzung für die Tumorentstehung durch DNS-reaktive, genotoxische Karzinogene sind hierbei Mutationen. Mutationen in verschiedenen Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen werden für die Entstehung maligne entarteter Zellen verantwortlich gemacht [WEINBERG, 1995; WEINBERG, 1996].

Da parallel zu den Schäden an der DNS und/oder als Folge dieser Schäden in der betroffenen Zelle bestimmte Gene vermehrt oder vermindert transkribiert werden, kann diese frühe Antwort der Zelle als ein Indikator dafür dienen, daß eine DNS-Schädigung stattgefunden hat. Sowohl UVC-, UVB- als auch UVA-Strahlung modulieren die Expression verschiedener Streßantwort-Gene in relevanten Dosisbereichen [TYRRELL, 1991] (s. 1.1.5). Art und Ausmaß der Schädigung, die Letalität und die Veränderung des Genexpressionsmusters hängen dabei nicht nur von der Dosis der UV-Strahlung, sondern wesentlich von der Art der UV-Strahlung (Vakuum-UV, UVC, UVB, UVA) ab.

UVC- und Vakuum-UV-Strahlung haben eine stark letale Wirkung (Tabelle 1-3), die durch das Absorptionsmaximum der DNS bei 260 nm erklärt wird. Die DNS ist damit das wichtigste Zielmolekül für Inaktivierung und Auslösung von Mutationen [SETLOW, 1974]. Die UVC- und UVB-induzierten Basenschäden stören die normale Basenpaarung und werden als nicht informativ angesehen, so daß verbleibende Basenschäden bei der nächsten Replikation Ursache für Mutationen sein können. Dabei werden CPDs und (6-4)-Photoprodukte als Haupt-Prämutationsläsionen in Säugerzellen nach UV-Exposition betrachtet [DROBETSKY und GLICKMAN, 1990; TORNALETTI und PFEIFER, 1996]. Neben der Konsequenz der Mutationsauslösung haben diese Basenschäden auch sofortige Reaktionen zur Folge, wie eine temporäre Hemmung der DNS-Replikation (Initiation und Progression der DNS-Gabel) [GRIFFITHS *et al.*, 1990] und der RNS-Elongation während der Transkription (Tabelle 1-3). CPDs in Promotorsequenzen, die zudem langsamer als transkribierte Sequenzen aktiver Gene repariert werden [TU *et al.*, 1996], können die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern [TOMMASI *et al.*, 1996].

---

**Tabelle 1-3 Biologische Wirkungen der UV-Strahlung auf zellulärer Ebene**

---

Letalität von Zellen, Apoptose

Mutagenität

Zellzyklusstop

Beeinflussung der Replikation

Veränderungen der Genexpression (Transkription, RNS-Prozessierung, Translation)

Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

---

UVA ist der energieärmste Bereich des UV und in seiner Wirkung zum Teil auf die Gegenwart von Sensibilisatoren (*Sensitizern*) angewiesen. Die resultierenden indirekten DNS-Schäden entstehen entweder durch direkten Energietransfer zwischen Sensibilisatoren und DNS oder über ein reaktives Zwischenprodukt („photodynamische Reaktion“). Für die biologischen Effekte der UVA-Strahlung ist primär die Bildung von ROS wie Singulett-Sauerstoff, Peroxidradikalen ( $\cdot O_2$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikalen ( $\cdot OH$ ) in der bestrahlten Zelle verantwortlich [TYRRELL, 1991]. Diese ROS sind reaktives Zwischenprodukt bei der Bildung von 8-Hydroxyguanin und Thyminglycol in den Nukleinsäuren und im wesentlichen für die nach UVA-Bestrahlung entstehenden Membranschäden durch Lipidperoxidation verantwortlich.

Je nach Strahlenqualität (UVA, UVB und UVC) wird ein unterschiedlicher Apoptose-Typ in murinen Lymphom-Zellen induziert: Durch UVA-induzierte Membranschäden (im Wellenlängenbereich von 340-400 nm) kann die sofortige, präprogrammierte Apoptose ausgelöst werden, durch DNS-Schädigung dagegen die verzögerte Apoptose [GODAR und LUCAS, 1995], Prozesse, bei denen entweder ein konstitutiver biochemischer Weg ohne Proteinsynthese oder ein induzierbarer mit makromolekularer Synthese beschriftet werden [GODAR, 1996]. Inzwischen wird ein dritter Apoptose-Typ durch hohe Dosen von UVB und UVC beschrieben, die „*intermediate*“ Apoptose, ausgelöst durch Rezeptor-Vernetzung an der Zellmembran [GODAR, 1999].

Sehr viele experimentelle Daten zur biologischen Wirkung der UV-Strahlung wurden und werden mit germiziden UV-Lampen (254 nm) gewonnen, obwohl solare UVC-Strahlung natürlicherweise nicht auf der Erde ankommt. Für die Erstellung von Referenzwerten ist es deshalb auch weiterhin erforderlich, Untersuchungen mit dieser Wellenlänge durchzuführen, auch wenn andere Lampen, die die solare UV-Strahlung simulieren, zur Verfügung stehen.

### **1.1.3 Die Bedeutung der UV-Strahlung für die Gesundheit von Mensch und Tier**

Von den verschiedenen Gesundheitsstörungen, die durch UV-Strahlung ausgelöst werden können (Tabelle 1-4), ist die Tumorentstehung aufgrund des möglicherweise tödlichen Ausgangs von größter Bedeutung.

**Tabelle 1-4 Wirkung der UV-Strahlung auf die Gesundheit von Säugetieren**

akut bis subakut	chronisch
Sonnenbrand ( <i>Dermatitis solaris</i> ) mit Erythem, Ödem und Störungen des Allgemeinbefindens wie Unwohlsein, Somnolenz, Schüttelfrost, Fieber	Karzinogenität - Tumorinitiation und –promotion: Squamosa- und Basalzellkarzinome (SCC, BCC), Malignes Melanom?
Sonnenbrand-Keratinocyten (Kernpyknose, eosinophiles Zytoplasma = Apoptose)	„Lichtalterung“ der Haut (solare Elastose)
Phototoxische Reaktionen / Photosensibilität	Aktinische / Solare Keratose
Photoallergische Reaktionen	Katarakt
Photokeratitis und -konjunktivitis	
Hyperpigmentierung der Haut	
Vitamin-D-Synthese in der Haut	
Hyperplasie der Epidermis	
Immunsuppression lokal und systemisch	
Aktivierung von Viren	

UVB-Strahlung, die nur zum Teil die Erdoberfläche erreicht, ist beim Menschen und anderen Säugetieren Auslöser für das solare Erythem und die Entstehung von Hautkrebs, insbesondere die aus epidermalen Keratinocyten abgeleiteten Squamosa- und Basalzellkarzinome (SCC, BCC) [BRIDGES, 1990; ZIEGLER *et al.*, 1994; ELWOOD *et al.*, 1989].

Die Induktion von Hautkrebs wird als ein Mehrstufenprozeß angesehen, der genetische und epigenetische Veränderungen beinhaltet [SLAGA, 1989] und in dem UV-Strahlung sowohl als Tumorinitiator als auch als Tumorpromotor agiert [MATSUI und DELEO, 1991]. Sie ist also für die irreversible Transformation von Normalzellen in initiierte, prä-maligne Zellen und für die selektive klonale Expansion dieser Zellen während der Promotionsphase verantwortlich. Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen, die in der Kontrolle von Apoptose, Zellzyklus und Proliferation eine Rolle spielen, können zu abnormer Zellproliferation führen. Bei der Hautkrebsentstehung sind die Tumorsuppressorgene p53 (TP53, s. 1.1.4) und *patched (ptc)* und die ras-Onkogene von Bedeutung. Besonders häufig wurden in menschlichen und murinen Hauttumoren Mutationen im p53-Gen nachgewiesen. Die p53-mutierten Zellen haben in der Epidermis bei weiterer UV-Exposition durch die ausgeschaltete p53-abhängige Apoptose einen Überlebensvorteil gegenüber wildtyp-p53-Zellen und expandieren klonal in die Lücken, die sterbende Sonnenbrand-Keratinocyten (Tabelle 1-4) hinterlassen [SOEHNGE *et al.*, 1997]. Die Bedeutung der DNS-Reparatur, insbesondere der NER, für den Schutz vor den karzinogenen Effekten der UV-Strahlung wird durch die hohe Inzidenz von Hautkrebs bei XP-Patienten deutlich [BOULIKAS, 1996; COPELAND *et al.*, 1997]. In der Tumorpromotions-phase spielen epigenetische Veränderungen eine große Rolle, die durch Veränderungen der Genexpression zu neuen Transkriptionsmustern führen können [GIBBS *et al.*, 1990].

Eine Bedeutung der UV-Strahlung in der Progressionsphase bis zur klinischen Manifestation des malignen Tumors aufgrund der weiteren genetischen und epigenetischen Veränderungen der Tumorzellen und der UV-bedingten Immunsuppression läßt sich nicht ausschließen.

UVB-Strahlung kann systemisch und lokal eine Immunsuppression verursachen [KONDO und SAUDER, 1995; BOONSTRA und SAVELKOUL, 1997]. Die erstere resultiert aus der Induktion von T-Suppressorzellen durch geschädigte Langerhans-Zellen oder durch in die Haut infiltrierende Makrophagen [KRIPKE, 1981]. Lokal werden von UV-bestrahlten Keratinozyten immunsupprimierende Cytokine wie Interleukin (IL-) 10, Tumornekrosefaktor (TNF-)  $\alpha$  und IL-1 $\alpha$  freigesetzt [ULLRICH, 1995]. Ein weiterer wichtiger Faktor bei der UVB-induzierten Immunsuppression ist die in der Epidermis durch Photoisomerisierung gebildete *cis*-Urocaninsäure [NOONAN und DE FABO, 1992].

Neben den Veränderungen in der Haut ist durch eine erhöhte UV-Belastung die Aktivierung latent im Genom vorhandener Viren zu erwarten, z.B. HIV-1 über Bindungsstellen für den nukleären Faktor  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B, s. 1.1.5) [STEIN *et al.*, 1989A], SV40 und *Herpes simplex* Virus (HSV) 1 [HERRLICH *et al.*, 1992].

Am Auge kann UVB-Strahlung zur Entwicklung von Katarakten [ZIGMAN, 1993] und zu einem gehäuften Auftreten der infektiösen Keratokonjunktivitis bei Rindern führen [MAYER, 1992; KOPECKY *et al.*, 1980].

UVA-Strahlung, die die Ozonschicht fast unabgeschwächt passiert, ist für die frühzeitige Hautalterung verantwortlich, kann aber auch in geringerem Ausmaß als UVB zu Erythem- und Kataraktbildung führen. Die Veränderungen in der sonnengeschädigten Dermis, die als solare Elastose bezeichnet werden, entstehen durch Ablagerung abnormer elastischer Fasern. UVA kann tiefer als UVB in die Haut eindringen, bis in die Basalschicht der Epidermis und die oberen Schichten der Lederhaut [BRULS *et al.*, 1984]. Beim Menschen kann die Exposition mit UVA-Strahlung höher sein als mit UVB-Strahlung. Dies ist nicht nur durch den relativen Anteil des UVA am Spektrum bedingt, das die Erdoberfläche erreicht (Abb. 1-1), sondern auf Solarienbesuche und die Verwendung UVB-blockender Sonnencremes, die nur die hautbräunende UVA-Strahlung passieren lassen, zurückzuführen. Vieles deutet darauf hin, daß UVA-Strahlung als Tumorpromotor auf UVB-initiierte Keratinozyten wirken kann [MATSUI und DELEO, 1991]. Durch ein ausgedehntes Sonnenbad bei Verwendung hoher Lichtschutzfaktoren oder durch Solarienbesuche können so hohe UVA-Dosen akkumuliert werden, daß eine mutagene und kanzerogene Wirkung nicht mehr ausgeschlossen werden kann [MOAN, 1994; DROBETSKY *et al.*, 1995; STARY *et al.*, 1997]. Teilweise wird UVA-Strahlung bereits als vollständiges Karzinogen (Initiator und Promotor) bezeichnet [DE LAAT *et al.*, 1997].

Einen gewissen Schutz vor den schädlichen Wirkungen der UV-Strahlung bieten die Hyperplasie der Epidermis (Lichtschwiele) und die Melaninsynthese, welche, abhängig vom Hauttyp, nach UV-Exposition beim Mensch und bei manchen Tierarten auftreten. Auch bei Hammerhaien, die sich in der Nähe der Wasseroberfläche aufhalten, konnte eine



„Sonnenbräunung“ und ein zunehmender UVB-Schutz durch gesteigerten Melaningehalt der Haut bei längerer UV-Exposition beobachtet werden [LOWE und GOODMAN-LOWE, 1996].

Die potentielle UV-Belastung bei Tieren unterscheidet sich vom Menschen in mehreren Aspekten: Das Verhalten der Tiere wird nicht durch das Schönheitsideal sonnengebräunter Haut bestimmt, so daß viele Tierarten bei starker Insolation Schattenplätze aufsuchen. Die Geometrie der exponierten Hautoberfläche unterscheidet sich bei den Haussäugetieren von der des aufrecht gehenden Menschen, so daß andere Bereiche als beim Menschen für UV-induzierte Hautveränderungen prädisponiert sind. Hierfür ist auch der Schutz durch Fell und Pigmentierung entscheidend. Insbesondere treten gehäuft SCC in nichtpigmentierten und unbehaarten Hautbezirken von Katzen, Rindern, Schafen, Pferden und Hunden auf [MAYER, 1992; MARKS *et al.*, 1992]. Bei weißen Angoraziegen und Schafen in Südafrika und Australien kommt es gehäuft zu Plattenepithelkarzinomen der Haut im Bereich der Ohren, des Hornansatzes und des Perineums und bei weißen Katzen an den Ohrspitzen [WEISS und KARBE, 1990]. ANDERSON und BADZIOCH [1991] stellten in den USA einen signifikanten Zusammenhang zwischen steigendem Risiko zur Entwicklung des „*cancer eye*“ bei Rindern und steigender Intensität der Solarstrahlung fest. Diese Plattenepithelkarzinome nehmen ihren Ausgang vom konjunktivalen Lidrand oder vom *Limbus corneae* und treten bevorzugt bei Rinderrassen mit schwach- oder nichtpigmentierten Lidrändern (Hereford, Höhenfleckvieh, Simmentaler) auf [WEISS und KARBE, 1990]. Sowohl das „*cancer eye*“ als auch die bovine infektiöse Keratokonjunktivitis können wirtschaftliche Verluste durch verminderte Gewichtszunahmen und Tierverluste verursachen. Auch beim Pferd wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten okulärer SCC und der Sonnenexposition gefunden [DUGAN *et al.*, 1991]. Für das Auftreten von Hautkrebs ist auch das Lebensalter, das die Tiere unter normalen Umständen erreichen, entscheidend, da die Veränderungen erst nach einer langen, vermutlich Spezies-abhängigen Latenzzeit auftreten. Um diesen Unterschieden Rechnung zu tragen, wurden Untersuchungen zur Abschätzung biologischer UV-Wirkungen bei Tieren [KASPER, 1986] und zur Schätzung der Sonnenbrandgefährdung bei geschorenen Schafen in Australien durchgeführt [CHAPMAN *et al.*, 1984]. Häufiger als die *Dermatitis solaris* ist bei Tieren die Photodermatitis, die nach Aufnahme photosensibilisierender Medikamente (Phenothiazin, Sulfonamide), von Futterzusatzstoffen (Olaquinox) oder Pflanzen wie z.B. Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) und Buchweizen (*Fagopyrum esculentum*) oder in Zusammenhang mit einer Primärerkrankung (Störung des Porphyrinstoffwechsels, Hepatopathie) bei Sonnenexposition auftritt.

Bei Wildtieren ist nur wenig über die Risiken einer erhöhten UV-Exposition bekannt. Bei in Gebäuden gehaltenen Zootieren (Reptilien, Säugetiere, Vögel) wird die für die Vitamin-D-Produktion fehlende UV-Strahlung in 60 % der europäischen Zoos durch Einsatz künstlicher UV-Quellen kompensiert [SCHAUBERGER, 2000].

Bei Fischen ist die UV-Exposition u.a. von der Trübung des Wassers und der Aufenthaltstiefe im Wasser abhängig. UV-Strahlung kann zu einem gehäuften Auftreten von Schäden in Fischzuchten führen [MAYER, 1992; BULLOCK, 1985; BULLOCK und COUTTS, 1985].

#### 1.1.4 Signaltransduktion in Säugerzellen nach Exposition mit UV-Strahlung

Die zelluläre Signaltransduktion gibt der Zelle die Möglichkeit, sich an ihre Umgebung anzupassen und ihr Wachstum und ihre Differenzierung im Zellverband zu kontrollieren. Änderungen der zellulären Signaltransduktion und Aktivierung von Protoonkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erscheinen heute als der mögliche gemeinsame Mechanismus genotoxischer und epigenetischer Kanzerogene [MARQUARDT, 1997].

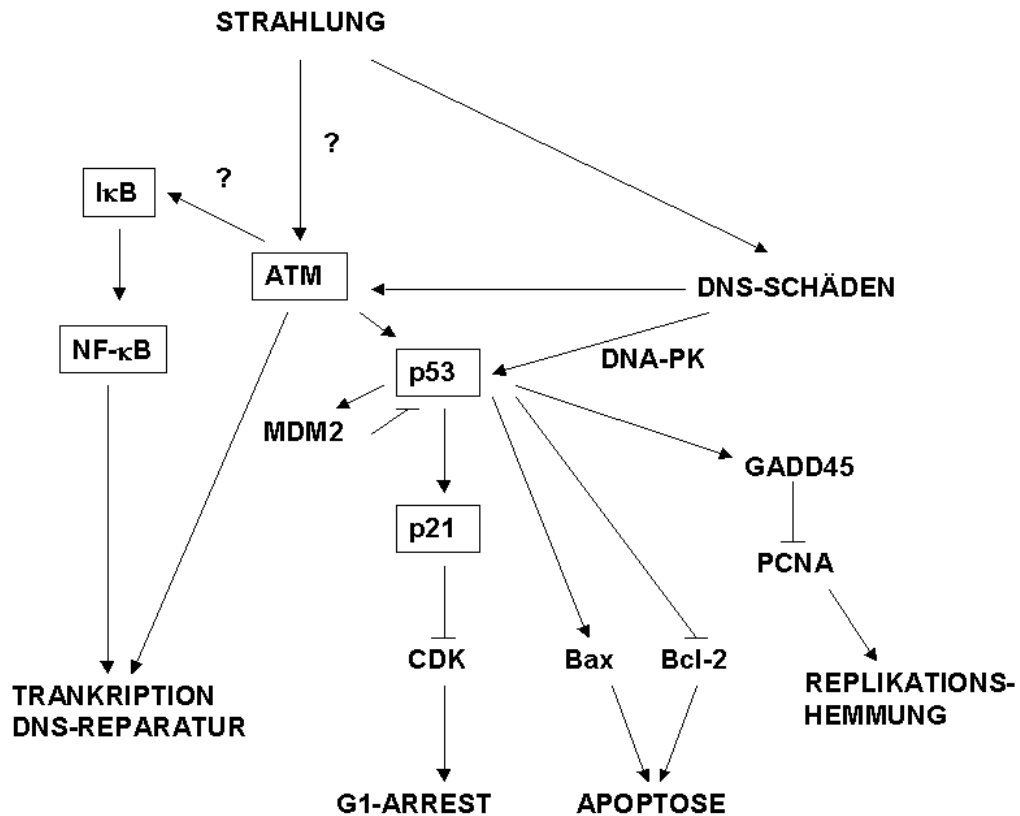
Zur Zeit ist es noch nicht möglich, ein einheitliches Bild der zellulären Vorgänge nach Bestrahlung mit UV-Licht zu zeichnen, da die Effekte nur teilweise aufgeklärt sind und stark vom Zelltyp und von der Strahlenart (UVC, UVB, UVA) geprägt sind. Dies wird durch die Dominanz der CPDs und (6-4)-Photoproducte bei UVC- und UVB- und der oxidativen Schäden bei UVA-Einwirkung deutlich. Es gibt zahlreiche Untersuchungen darüber, welche Proteine nach UV-Bestrahlung in bestimmten Zelltypen vermehrt nachweisbar sind [FORNACE JR., 1992]. Verschiedene Kinase-Kaskaden wurden identifiziert, die diese Reaktionen der Zellen vermitteln. Nur wenig ist dabei über die Bedeutung von UVA bei der Modulation der intrazellulären Signaltransduktion bekannt, und es bleibt noch offen, wie ein unterschiedlicher Schädigungsgrad und verschiedene Strahlenarten zu unterschiedlichen Antworten der Zelle (s. 1.1.1) führen können, die unter Umständen über Mutationen und Veränderungen der Genexpression zu Tumorinitiation und -promotion führen können. Besonders interessant ist dabei das Zusammenspiel der Aktivierung pro- und antiapoptotischer Faktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B (s. 1.1.5).

Die Reaktionen der Zelle nach UV-Bestrahlung werden als „UV-Antwort“ (*UV-response*) bezeichnet. Funktion der UV-Antwort soll der Schutz der Zelle vor den Auswirkungen von DNS-Schäden sein. Auf die durch UV-Strahlung gesetzten Schäden reagiert die Zelle aktiv, d.h. über bestimmte Signaltransduktionswege werden durch Aktivierung der Transkription bestimmter Gene Proteine *de novo* synthetisiert (s. 1.1.5). Ausnahme ist hierbei die konstitutive, sofortige Apoptose, die ohne Proteinsynthese abläuft (s. 1.1.1).

Die Signalwege und die aktivierten Faktoren bei Exposition mit UV- oder ionisierender Strahlung überschneiden sich teilweise. So müssen sowohl bei UV- als auch bei ionisierender Strahlung mindestens zwei Reaktionswege unterschieden werden, wobei einer im Zellkern und der zweite an der Plasmamembran startet. Die Aktivierung dieser Wege kann durch intrinsische zelluläre Radikalproduktion (ROS) ausgelöst oder verstärkt werden [LANDER *et al.*, 1995]. Wie auch die UV-Antwort kann die Reaktion auf ionisierende Strahlung zytoprotektiv oder zytotoxisch sein, abhängig vom aktivierten Signalweg. Diese Wege beinhalten die Aktivierung von Rezeptoren in der Plasmamembran, die Stimulation zytoplasmatischer Proteinkinasen, die Aktivierung der Transkription und eine geänderte Zellzyklusregulation. Dabei hat die DNS-Schadenserkenkung und -Reparatur einen Einfluß auf diese Signalkaskade und die daraus entstehenden zellulären Antworten [SCHMIDT-ULLRICH *et al.*, 2000].

Im Zellkern werden als Sensoren für strahleninduzierte DNS-Schäden p53, ATM (Protein, dessen Gen in *Ataxia-telangiectasia*-(AT)-Zellen mutiert ist), die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und die DNS-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) angesehen (Abb. 1-2) [MORGAN und KASTAN, 1997; GIACCIA und KASTAN, 1998; SZUMIEL, 1998]. AT ist eine Erbkrankheit, bei der die Strahlenempfindlichkeit der Zellen erhöht ist und die Betroffenen besonders anfällig für Krebserkrankungen sind. ATM stellt einen Faktor dar, der die DNS-Schäden mit den verschiedenen Reaktionen der Zelle, die durch p53 vermittelt werden, verknüpft. ATM beeinflusst auch den NF- $\kappa$ B-Inhibitor (I $\kappa$ B) und damit die NF- $\kappa$ B-gesteuerte Transkription [SCHMIDT-ULLRICH *et al.*, 2000]. Die UV-induzierten DNS-Schäden lösen eine Signalkaskade aus, die zur Akkumulation von p53 führt [ZHAN *et al.*, 1993]. p53 vermittelt, abhängig von der Dosis, durch Aktivierung verschiedener Gene entweder einen Zellzyklus-Arrest und die Aktivierung der DNS-Reparatur oder die Apoptose (Tabelle 1-3, Abb. 1-2) [SANCHEZ und ELLEDGE, 1995]. Gene, in deren Promotor bzw. *Enhancer* sich p53-Bindungsstellen befinden, sind z.B. das GADD45-Gen (induzierbar durch „*Growth Arrest and DNA Damage*“), das MDM2-Gen, das bax-Gen und das stromabwärts vom p53-Gen gelegene p21-Gen [ZHAN *et al.*, 1994; ZHAN *et al.*, 1996; LATCHMAN, 1998D; CHIN *et al.*, 1997]. GADD45 kann an PCNA binden und eine Rolle bei der DNS-Reparatur spielen [SANCHEZ und ELLEDGE, 1995]. Die Aktivierung der MDM2-Expression könnte durch eine negative *feedback*-Schleife die Wirkung von p53 beenden, Bax dagegen wird für die Einleitung der Apoptose in Zellen mit irreparablen DNS-Schäden verantwortlich gemacht [LATCHMAN, 1998D]. Der Zellzyklusstop nach DNS-Schädigung, der den Zellen Zeit für DNS-Reparaturleistungen verschafft, wird durch p21 ausgelöst, welches Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) hemmt [ELDEIRY *et al.*, 1994]. Diese Mechanismen vermindern das karzinogene Potential der solaren UV-Strahlung und haben zu der Bezeichnung von p53 als „Wächter des Genoms“ („*guardian of the genome*“) geführt [LANE, 1992]. Das p53-Gen wird als Tumorsuppressorgen bezeichnet, da in der Karzinogenese seine Mutation oder Deletion sowie eine Veränderung der Faktoren, die mit p53 zusammenwirken (z.B. das Onkogen MDM2), ein entscheidender Schritt sein kann [LATCHMAN, 1998D]. PARP bindet an DNS-Strangbrüche und rekrutiert nach Automodifikation durch gebundene Poly(ADP-Ribose)-Polymere andere Proteine, wie z.B. p53, p21 und DNA-PK, deren Funktion durch diese Polyanionen beeinflusst wird [ALTHAUS *et al.*, 1999]. DNA-PK ist an der DNS-Doppelstrangbruchreparatur beteiligt, sie bindet dabei an freie DNS-Enden und setzt eine Phosphorylierungskaskade in Gang.

Ein Signalweg, der von der Plasmamembran ausgeht, wird durch Phosphorylierung und/oder Multimerisation von Rezeptormolekülen angestoßen, wie z.B. der Rezeptoren für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-R), Interleukin-1 (IL-1R) und TNF- $\alpha$  (TNF-R) [WARMUTH *et al.*, 1994; SACHSENMEIER *et al.*, 1994; ROSETTE und KARIN, 1996; PEUS *et al.*, 2000]. Die SH-Gruppen verschiedener Kinasen und Phosphatasen (z.B. die Tyrosin-Phosphatase) werden durch UV-Strahlung oxidiert und dadurch inaktiviert, so daß vermehrt phosphorylierte Wachstumsfaktorrezeptoren vorliegen [BENDER *et al.*, 1997].



**Abb. 1-2 p53/ATM/NF-κB und die zelluläre Antwort auf Strahlung**

Die nukleären DNS-Schadens-Sensorproteine, p53, ATM und DNA-PK, spielen eine zentrale Rolle in der Modulation zellulärer Antworten, die direkt oder indirekt über die Regulation zellulärer Gene Apoptose (Bax, Bcl-2) oder Zellzyklusarrest (p21), DNS-Synthese und Reparatur (p21, GADD45, gebunden an PCNA) und Überleben beeinflussen. MDM2-Protein kann an p53 binden und seine Funktionen über eine negative *feedback*-Schleife hemmen. Strahlung kann p53 direkt oder indirekt über ATM aktivieren. Außerdem kann ATM direkt die DNS-Reparatur beeinflussen. Alternativ könnte ATM die Transkription über κB und NF-κB modulieren. Pfeile und Blocks bedeuten stimulierende bzw. hemmende Signale. Vorgänge an der Zellmembran, verschiedene Kinasen, AP1, PARP und der Einfluß von GADD45 auf die DNS-Reparatur wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen [modifiziert nach SCHMIDT-ULLRICH *et al.*, 2000; HARRIS, 1996 und SZUMIEL, 1998].

Die zytosolische Signaltransduktion nach UVC-Bestrahlung involviert Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) als distalen Beginn der Signalkaskade [KYRIAKIS und AVRUCH, 1996]. Die UV-aktivierte c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinase (JNK) z.B. kann den Transkriptionsfaktor AP1 (*Activator Protein 1*), ein Heterodimer aus den Protoonkogen-Produkten Fos, Jun und/oder Jun B, phosphorylieren und damit aktivieren. AP1 vermittelt die Induktion verzögert UV-aktivierbarer Gene mit AP1-Bindungsstellen [DEVARY *et al.*, 1991]. Dazu gehören der Plasminogenaktivator, die Kollagenase I, Stromelysin-1 und -2 und die Metallothioneine [SCHREIBER *et al.*, 1995]. Diese Metalloproteinasen verursachen den dermalen Kollagenabbau und können damit für die frühzeitige lichtbedingte Hautalterung verantwortlich sein [FISHER *et al.*, 1996].

### 1.1.5 Genaktivierung in Säugerzellen durch UV-Strahlung am Beispiel des NF- $\kappa$ B-Pathways

Alle Zellen von Bakterien bis zu Säugerzellen reagieren auf verschiedene Behandlungen mit Aktivierung oder Unterdrückung der Expression bestimmter Gene [LATCHMAN, 1998C]. Die Transkription spielt im Prozeß der Genexpression eine zentrale Rolle (ohne sie können alle nachfolgenden Schritte der Genexpression, wie RNS-Spleißen, Transport ins Zytoplasma, Translation in Protein, nicht stattfinden). Sie bietet damit einen attraktiven Kontrollpunkt der Regulation der Genexpression als Antwort auf verschiedene Stimuli [LATCHMAN, 1998A]. Die Transkription wird durch Interaktionen an Promotor- und *Enhancer*-Elementen des betreffenden Gens reguliert.

Der Promotor liegt direkt stromaufwärts der transkribierten Region und enthält Sequenzen wie TATA oder CCAAT und Sp1-Regionen (Consensussequenz GGGCGG) für die basale Transkription (T, Thymin; A, Adenin; G, Guanin; C, Cytosin). Diese sind an der konstitutiven Genexpression beteiligt (z.B. im humanen Metallothionein IIA-Gen). Die TATA-Box ist in sehr vielen, aber nicht allen Genen vertreten ist und liegt ~ 30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der richtigen Positionierung dieses Startpunktes [LATCHMAN, 1998A] und bindet vermutlich essentielle Transkriptionsproteine einschließlich der RNS-Polymerase II. Andere, weiter stromaufwärts gelegene Elemente („*upstream promoter elements*“) können die relativ geringe Aktivität der TATA-Box verstärken, z.B. die Sp1-Box oder die CCAAT-Box in einer oder mehreren Kopien.

*Enhancer*-Sequenzen sind weit entfernt vom Transkriptionsstartpunkt lokalisiert, stromauf- oder stromabwärts oder innerhalb der Transkriptionseinheit. Sie haben keine eigene Promotoraktivität, verstärken jedoch die Aktivität eines Promotors. Sie enthalten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wobei diese Elemente oft mit denen direkt stromaufwärts des Promotors liegenden identisch sind.

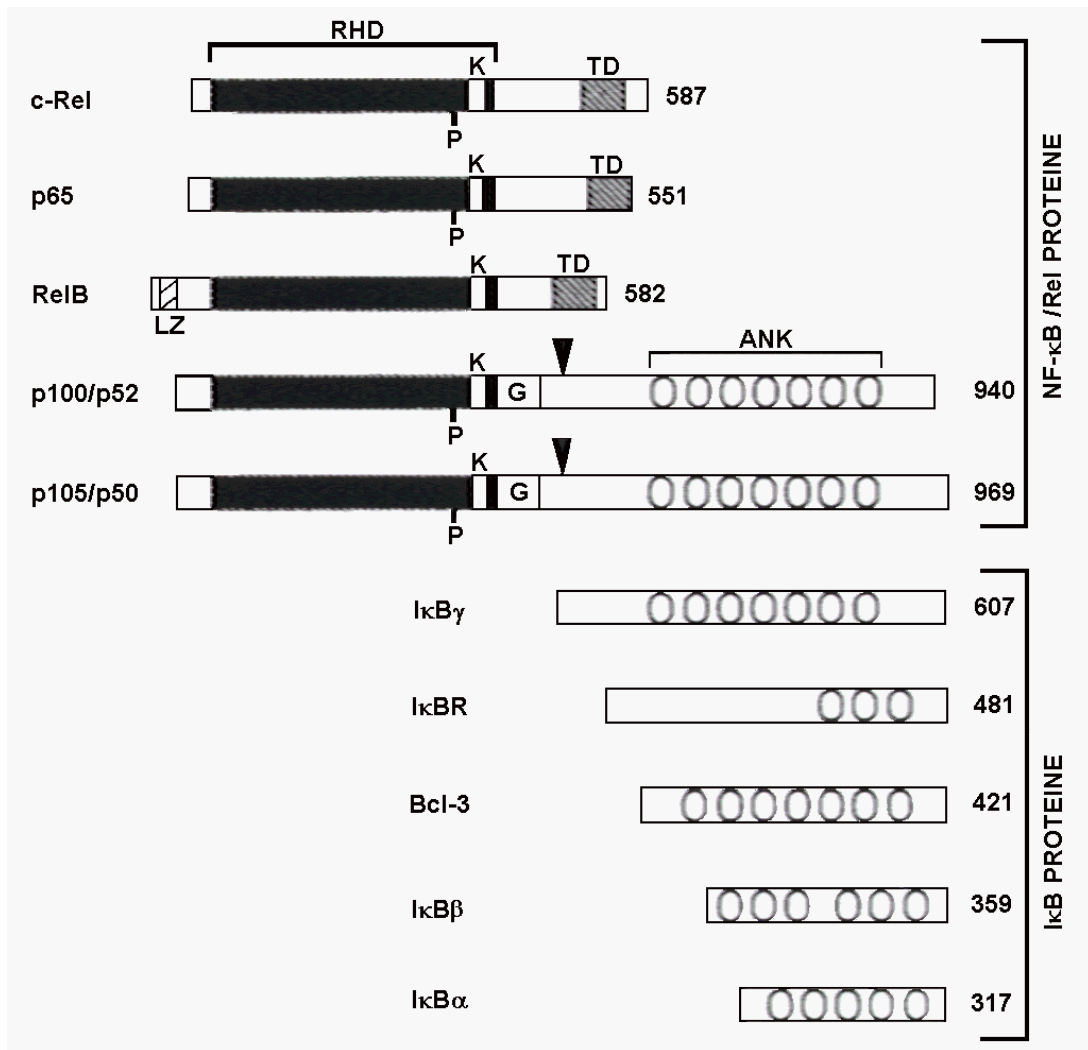
An der Antwort auf verschiedene Stimuli können verschiedene Sequenzelemente in der Promotor- und/oder *Enhancer*-Region beteiligt sein. Die verschiedenen regulierten Elemente sind nicht in allen Geweben von gleicher Wichtigkeit. Die induzierbaren Sequenzelemente interagieren mit Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren, was zu einer erhöhten Transkription des betreffenden Gens führt. Die Transkriptionsfaktoren selbst werden durch eine Reiz-spezifische Signalkaskade aktiviert, an deren Ende oft die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors steht (s. 1.1.4). In der Regel ist dabei keine *de-novo*-Proteinsynthese erforderlich, weil die Faktoren bereits in einer inaktiven Form in der Zelle existieren. Solche posttranslationalen Modifikationen eines prä-existierenden Faktors spielen bei folgenden UV-induzierbaren Promotorelementen eine Rolle [LATCHMAN, 1998C; STEIN *et al.*, 1989A]:

- dem Serum-Reaktionselement (SRE, *Serum Response Element*), z.B. im Promotor des *c-fos*-Gens, das den *Ternary Complex Factor* (TCF) und den *Serum Response Factor* (SRF) bindet

- dem Tetradecanoylphorbolacetat (TPA = PMA)-Reaktionselement (TRE, *TPA Response Element*) = AP1-Bindungsstelle (5'-TGAGTCAG-3'), das die Genaktivierung durch Phorbolester vermittelt, z.B. im Promotor des Kollagenase-Gens
- dem p53-Reaktionselement (*p53 Response Element*)
- der NF-κB-Bindungsstelle

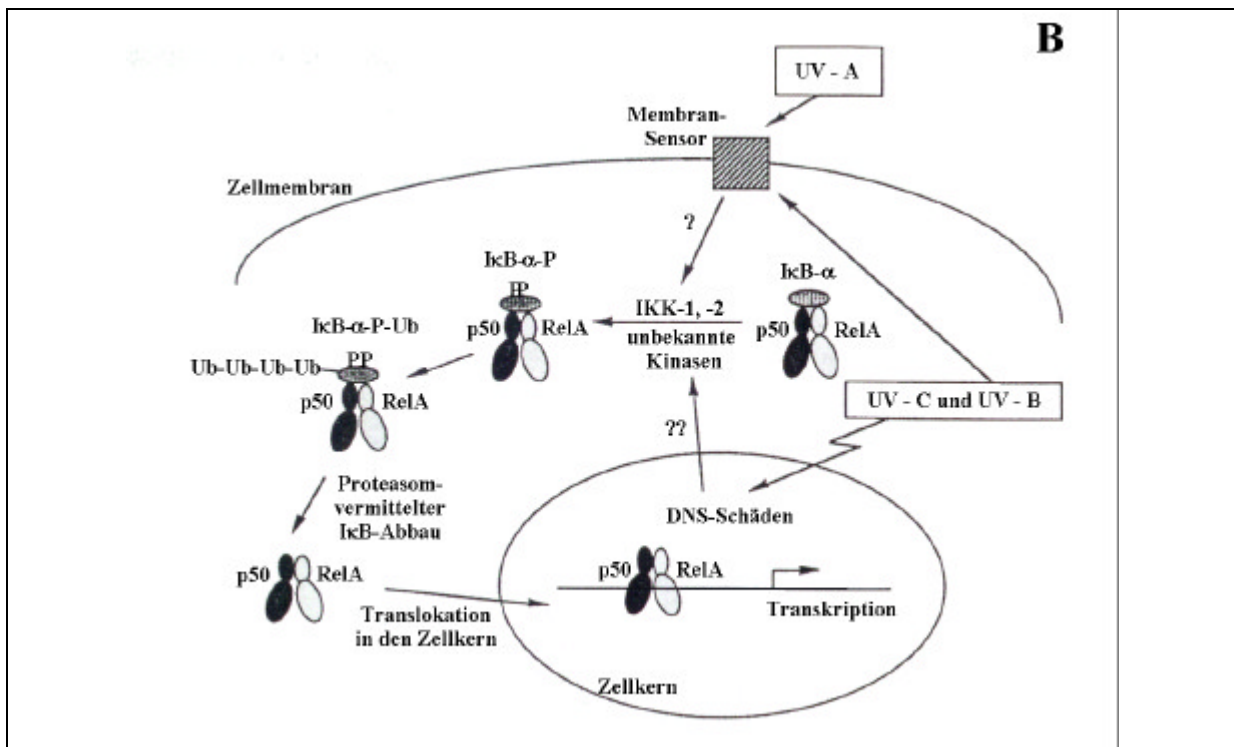
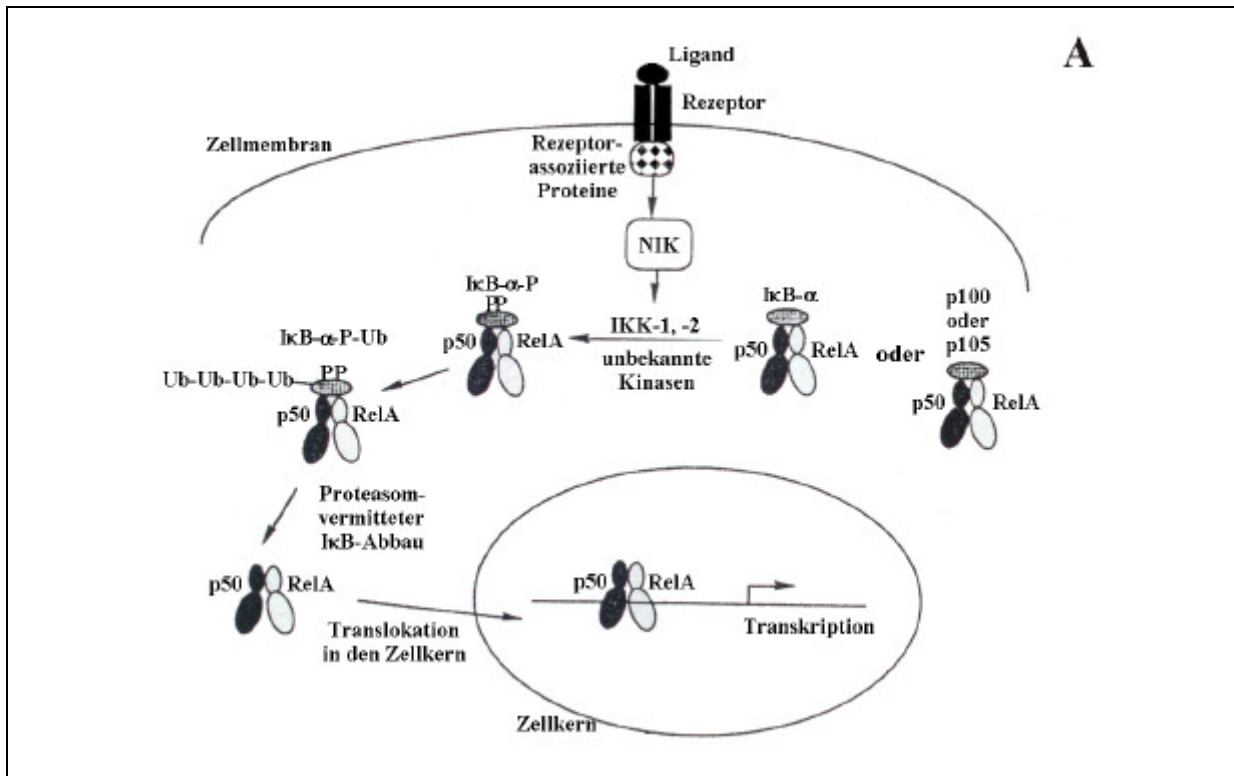
NF-κB gehört zu einer Familie strukturell verwandter Transkriptionsfaktoren (Abb. 1-3), die sequestriert im Zytoplasma liegen, gebunden an inhibitorische Proteine aus der κB-Familie [BAEUERLE und BALTIMORE, 1996]. NF-κB wurde zuerst als ein Protein identifiziert, das in reifen B- und Plasmazellen, aber nicht in Prä-B-Zellen, an eine spezifische dekamere DNS-Sequenz (5'-GGGACTTCC-3') innerhalb des *Enhancers* in einem Intron des *Immunoglobulin κ light chain* Gens bindet [SEN und BALTIMORE, 1986]. NF-κB existiert im Zytoplasma der meisten Zelltypen als Homo- oder Heterodimer. Eine Vielzahl zellulärer Stressoren löst Signalketten aus, an deren Ende IκB-α phosphoryliert und infolgedessen nach Ubiquitinierung durch das Proteasomsystem abgebaut wird (Abb. 1-4A und B). In NF-κB wird dadurch das Kernlokalisierungssignal freigelegt, der Faktor gelangt in den Zellkern, bindet an NF-κB-Bindungsstellen mit der Consensussequenz 5'-GGGRNNYYCC-3' (N, Nukleotid; R, Purin; Y, Pyrimidin) verschiedener Promotoren und startet die Transkription NF-κB-abhängiger Gene [WHITESIDE und ISRAEL, 1997]. TNF-α aktiviert NF-κB durch Bindung von TNF-α an den TNF-R, der daraufhin TRAF2 (*TNF-Receptor Associated Factor 2*) rekrutiert, der wiederum mit der Serin/Threoninkinase NIK (*NF-κB-inducing kinase*) assoziiert. NIK interagiert schließlich mit der IκB-Kinase (IKK, Abb. 1-4A) [MALININ *et al.*, 1997]. Inaktive NF-κB-Komplexe im Zytoplasma können auch durch proteolytische Spaltung der Vorläufer p105 und p100, die Dimere mit p65 oder c-Rel bilden (Abb. 1-4A), aktiviert werden [MERCURIO *et al.*, 1993].

NF-κB wurde zunächst auf seine Rolle bei der Regulation der Expression von Genen untersucht, die an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind. So ist NF-κB an der Regulation des Immunglobulin κ-Gens in B-Lymphozyten beteiligt und kann in Prä-B-Zellen durch Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert werden [MÜLLER *et al.*, 1993]. Neben den an der Immunantwort beteiligten Genen wie TNF-α, IL-1α, IL-2, IL-2α-Rezeptor, IL-3, IL-4, IL-6 und Interferon-γ [LENARDO und BALTIMORE, 1989] aktivieren NF-κB/Rel die Transkription von solchen Genen, die proliferative Prozesse kontrollieren und in vielen Zellen, z.B. B-Zellen, die Apoptose unterdrücken [BAICHWAL und BAEUERLE, 1997; SONENSHEIN, 1997]. Deshalb wird diesem Transkriptionsfaktor auch Bedeutung in der Onkogenese und der Chemotherapieresistenz verschiedener Neoplasien zugeschrieben [MAYO und BALDWIN, 2000].



**Abb. 1-3 Mitglieder der Säuger-Proteinfamilien NF-κB/Rel und IκB**

p65 (RelA), c-Rel und RelB enthalten starke Transaktivierungsdomänen (TD), während p50 und p52 im allgemeinen die Transkription nicht aktivieren. Die Pfeile deuten auf die endoproteolytische Schnittstelle von p100/p52 und p105/p50. Die NF-κB/Rel-Proteine werden durch IκB-Moleküle über Protein-Protein-Interaktionen zwischen den *ankyrin repeats* (ANK) in IκB und den Rel-Homologie-Domänen (RHD) der NF-κB/Rel-Dimere gehemmt, da dadurch die Kernlokalisationssequenz (K) der NF-κB/Rel-Dimere maskiert wird. Das kürzlich in B-Lymphozyten identifizierte p50-verwandte Protein, p55, ist nicht dargestellt. Die Anzahl der Aminosäuren jedes Proteins ist rechts vermerkt. P, PKA-Phosphorylierungsmotif; LZ, *Leucine Zipper*-Domäne in RelB; G, Glycin-reiche Region [aus: MAY und GOSH, 1997].



**Abb. 1-4 Schematische Darstellung des NF-κB-Signaltransduktionsweges**

Bindung eines Liganden an einen membranständigen Rezeptor verursacht den IκB-Abbau und die Translokation von NF-κB, das hier aus p50 und RelA (p65) besteht, in den Zellkern (A). UVA führt im wesentlichen via Membranschäden, UVB und UVC zusätzlich via DNS-Schäden zur NF-κB-Aktivierung (B). NIK, *NF-κB-inducing kinase*; IKK, IκB-Kinase [aus: LEGRAND-POELS *et al.*, 1998]



Der NF- $\kappa$ B-Signalweg kann neben LPS durch eine Reihe weiterer zellulärer Stressoren wie verschiedener Cytokine, Phorbol ester, Viren, UV-Strahlung, ROS, Wachstumsfaktormangel, Hypoxie und Hitzeschock induziert werden [MAY und GHOSH, 1997]. UVA und UVB/UVC-Strahlung lösen dabei vermutlich über unterschiedliche Wege, deren Zwischenschritte noch nicht bekannt sind, die Aktivierung von NF- $\kappa$ B aus (Abb. 1-4B).

NF- $\kappa$ B-DNS-Bindungsaktivität ist in vielen Zelltypen induzierbar. In wenigen Zelltypen wie reifen B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Neuronen, Cornea-Keratinocyten und glatten Muskelzellen ist NF- $\kappa$ B jedoch konstitutiv aktiv [MAY und GOSH, 1997].

Die Transkriptionsfaktorfamilie NF- $\kappa$ B/Rel wird auch mit verschiedenen virusbedingten Tumorerkrankungen in Verbindung gebracht, so z.B. mit der humanen adulten T-Zell-Leukämie, die mit einer Infektion durch das humane T-Zell-Leukämie Virus Typ I (HTLV-I) einhergeht, mit den Epstein-Barr-Virus-assoziierten malignen Erkrankungen und mit hepatozellulären Karzinomen im Laufe einer chronischen Hepatitis-B-Virusinfektion [MOSIALOS, 1997].

Die Bedeutung von NF- $\kappa$ B in der Reaktion der Haut auf UVB und UVA liegt vermutlich in einer Beeinflussung der Genexpression der Keratinozyten und Fibroblasten und in der anti-apoptotischen Wirkung und dadurch Einflüssen auf die Tumorerkrankung, -promotion und -progression. Es wird außerdem vermutet, daß NF- $\kappa$ B an der UV-induzierten Immunsuppression, die bei der Hautkrebsentstehung essentiell ist, beteiligt ist (s. 1.1.3), da das verantwortliche (murine) IL-10-Gen zwei NF- $\kappa$ B-Motive in seinem Promotor enthält [TEBO *et al.*, 1994]. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist in Keratinozyten bei der Produktion und Ausschüttung verschiedener Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  auf externe Stimuli wie LPS, Tumorpromotoren, UV und Zytokine beteiligt. Die UV-induzierte IL-6-Freisetzung aus Keratinozyten wird für die lokale und systemische Entzündung verantwortlich gemacht [URBANSKI *et al.*, 1990].

## 1.2 NACHWEIS DER GENAKTIVIERUNG

Ein Nachweis der verstärkten Transkription eines bestimmten Gens kann direkt durch Messen der Menge der zugehörigen mRNS im *Northern blot* erfolgen oder durch Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Erhöhte (Transkription und) Translation eines bestimmten Gens kann durch Quantifizierung des zugehörigen Genproduktes nachgewiesen werden. Die Messung des Genproduktes erfordert eine spezifische Methode zur Erkennung des Proteins, z.B. mit Hilfe eines Antikörpers im *Western blot*, und eine Möglichkeit der Quantifizierung. Eine Unterscheidung, ob tatsächlich eine Veränderung auf Ebene der Transkription und / oder der Translation stattgefunden hat, ist nicht möglich. Andere Methoden, um Interaktionen an Promoter- und *Enhancer*-Sequenzen zu ermitteln, sind Nuclease-Protektionsassays. Alle diese Verfahren sind sehr arbeits- und zeitaufwendig [KINGSTON, 1997].

### 1.2.1 Reporterassays

Zur Ermittlung transkriptionaler Aktivierung werden vermehrt sogenannte Reportergene eingesetzt, die ein gut zu detektierendes Protein kodieren. Solche Reportergene werden dem Promotor des zu untersuchenden Gens nachgeschaltet und bei dessen Aktivierung, d.h. bei Bindung des Transkriptionsinitiationskomplexes, verstärkt abgelesen.

An ein Reporter gen werden verschiedene Anforderungen gestellt. So soll sein Genprodukt in der zu untersuchenden Zelle nicht endogen vorhanden oder leicht zu identifizieren sein. Der Reporter gen assay soll schnell, leicht, sensitiv und kostensparend sein, und ein linearer Bereich der Genexpression soll die Detektion von kleinen und großen Veränderungen der Expression des Reporter gens ermöglichen. Zudem darf das Reporter gen die Physiologie der Zellen nicht beeinflussen [SAMBROOK *et al.*, 1989C].

Bei dem Protein handelt es sich meist um ein Enzym, z.B. die bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), die  $\beta$ -Galactosidase, verschiedene Luciferasen, die sezernierte Alkalische Phosphatase (SEAP) oder die  $\beta$ -Lactamase. Diese Enzyme katalysieren Reaktionen, deren Reaktionsprodukt mit Hilfe verschiedener Verfahren erfaßt werden kann (Tabelle 1-5).

Auch das humane Wachstumshormon (hGH) wird als Reporter gen verwendet. Es wird mit Hilfe von  $^{125}\text{I}$ -markierten Antikörpern im Szintillationszähler oder mit Hilfe eines Sandwich-ELISA quantifiziert. Die Durchführung dieser Methoden erfordert neben der Zugabe von Substraten oft eine aufwendige Probenbearbeitung.

Von den aufgeführten Reportern lassen sich nur die Leucht käfer luciferase (mit Membran-permeablem Luciferin ester), die  $\beta$ -Galactosidase (präzipitierendes Substrat X-Gal oder FDG) und die  $\beta$ -Lactamase in lebenden Zellen nachweisen und quantifizieren, wobei die Zugabe eines Substrates erforderlich ist.

SEAP und hGH erlauben eine wiederholte Messung der Reporteraktivität/-konzentration im Medium, eine Lokalisation der Reporter in der Zelle ist jedoch nicht möglich. Als Alternative zu diesen Enzymen wird das *Green Fluorescent Protein* (GFP) aus der pazifischen Leuchtmeduse *Aequorea victoria* angesehen.

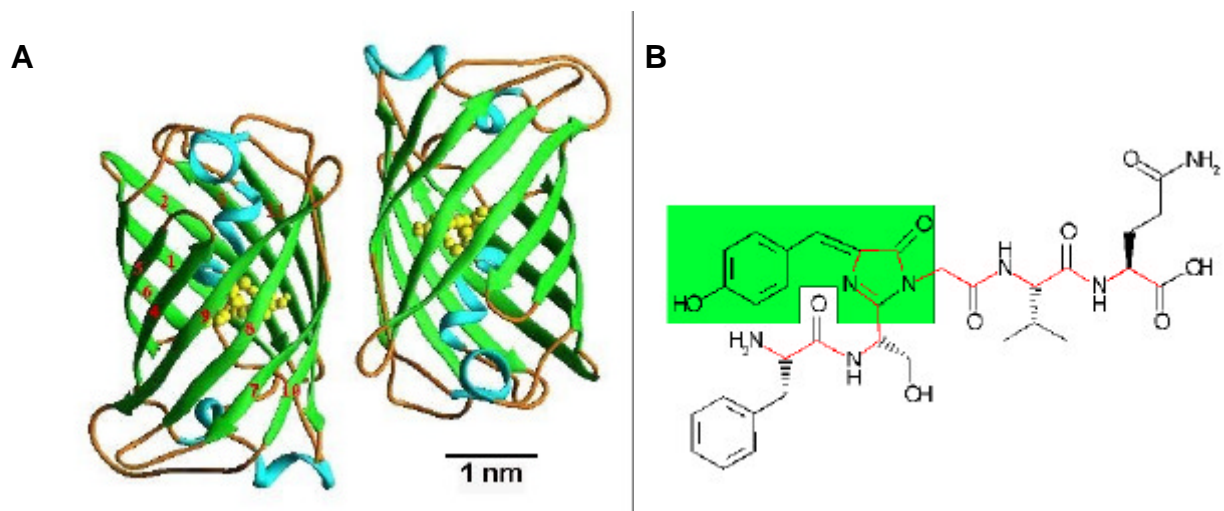
**Tabelle 1-5 Reportergene und Nachweis der zugehörigen Genprodukte**

Genprodukt	Vorbehandlung der Zellen	Substrat	Nachweis	Literatur
bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) (aus <i>E. coli</i> )	Ernte und Lyse der Zellen	<sup>14</sup> C- markiertes Chloramphenicol oder <sup>3</sup> H-markiertes Acetyl-CoA, fluoreszierendes Chloramphenicolderivat	radiometrisch nach Dünnschicht-chromatographie oder Phasen-extraktionsassay; fluorimetrisch CAT-ELISA	GORMAN <i>et al.</i> , 1982 KINGSTON, 1997
$\beta$ -Galactosidase ( <i>lacZ</i> -Gen aus <i>E. coli</i> )	Lyse der Zellen (Ausnahme: Substrate X-Gal und FDG)	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (ONPG), 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactosid (MUG), Fluorescein- $\beta$ -D-Galactopyranosid (FDG), X-Gal, 1,2-Dioxethansubstrat (Chemilumineszenz)	colorimetrisch fluorimetrisch luminometrisch	ALAM und COOK, 1990
bakterielle $\beta$ -Glucuronidase (GUS)	Lyse der Zellen überwiegend für Pflanzenzellen eingesetzt	X-Gluc, MUG, Admantyl-1,2-Dioxethan-Arylglucuronid	colorimetrisch fluorimetrisch luminometrisch	JEFFERSON <i>et al.</i> , 1987
Leuchtkäfer-Luciferase ( <i>Firefly, Photinus pyralis</i> )	Lyse der Zellen oder in lebenden Zellen mit Luciferinester als Substrat	Luciferin, ATP, Mg <sup>2+</sup> , O <sub>2</sub> (Lichtblitz < 1 s) besser: Luciferyl-CoA	luminometrisch oder Szintillationszähler	DE WET <i>et al.</i> , 1987
sezernierte humane Alkalische Phosphatase (SEAP)	SEAP wird in das Zellkulturmedium sezerniert	<i>p</i> -Nitrophenolphosphat, 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP), D-Luciferin- <i>O</i> -Phosphat + Leuchtkäfer-Luciferase, 1,2- Dioxethan-CSPD (Chemilumineszenz)	colorimetrisch fluorimetrisch luminometrisch	BERGER <i>et al.</i> , 1988 KAIN, 1997 YANG <i>et al.</i> , 1997
$\beta$ -Lactamase	nicht erforderlich	CCF2/AM	fluorimetrisch	ALAM und COOK, 1990 ZLOKARNIK <i>et al.</i> , 1998
humanes Wachstumshormon (hGH)	hGH wird in das Zellkulturmedium sezerniert	<sup>125</sup> I-markierter Antikörper	Szintillationszähler Sandwich-ELISA	KINGSTON, 1997
<i>Green Fluorescent Protein</i> (GFP)	nicht erforderlich	nicht erforderlich	fluorimetrisch	CHALFIE <i>et al.</i> , 1994

### 1.2.2 Green Fluorescent Protein

Die Klonierung des Gens für das *Green Fluorescent Protein* aus *A. victoria* [PRASHER *et al.*, 1992] ermöglichte die Expression von GFP in prokaryoten und eukaryoten Systemen. GFP wird in heterologen Systemen in Abwesenheit von exogenen Substraten synthetisiert und kann deshalb als einzigartiges Reporterprotein in vielen verschiedenen Organismen verwendet werden [CHALFIE *et al.*, 1994; KAIN *et al.*, 1995; PINES, 1995; CHENG *et al.*, 1996].

GFP fluoresziert *in vivo* nach Energietransfer von Aequorin, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiviertem Photoprotein [INOUE und TSUJI, 1994]. Ein solches fluoreszierendes Protein wurde in einigen biolumineszierenden Coelenterata nachgewiesen, neben *A. victoria* auch in *Renilla reniformis* [CHALFIE, 1995]. GFP absorbiert UV- und blaues Licht ( $\lambda_{\text{max}} = 395$  und  $470$  nm) und emittiert grünes Licht ( $\lambda_{\text{max}} = 509$  nm) [KAIN *et al.*, 1995], das mit Fluoreszenzmikroskopie, UV-Lichtbox oder FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Das minimale Fluorophor wird von einem Heptapeptid gebildet, das ein Trimer aus zyklischem Serin-dehydro-Tyrosin-Glycin enthält (Abb. 1-5B) [CODY *et al.*, 1993].



**Abb. 1-5 Struktur des GFP-Moleküls und seines Fluorophors**

**A** Struktur des GFP-Moleküls und seine Assoziation zu Dimeren im Kristall oder in Lösungen geringer Ionenstärke [YANG, F., *et al.*, 1996] und **B** Strukturformel des GFP-Fluorophors und seiner näheren Umgebung [CODY *et al.*, 1993]

Das wildtyp (wt) GFP kodierende Gen aus *A. victoria* wurde für die Expression in Säugerzellen optimiert. Bei diesem „*Enhanced Green Fluorescent Protein*“ (EGFP) wurde das Expressionsniveau in Säugerzellen durch Anpassung der Basensequenz des Gens an humane Codons (*human codon optimization*) erhöht [CORMACK *et al.*, 1996; YANG, T.T., *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1996]. Zudem trägt das EGFP-Gen Mutationen in seiner Fluorophorregion (F64L, S65T; F, Phenylalanin, L, Leucin, S, Serin, T, Threonin), die eine Verschiebung des zuvor zweigipfligen Anregungsmaximums des wtGFP zu 488 nm und eine Verstärkung der

Fluoreszenzintensität bedingen [HEIM *et al.*, 1995; CORMACK *et al.*, 1996]. EGFP emittiert bei Blaulicht-Anregung (488 nm) eine stabile Grünlicht-Fluoreszenz (507-509 nm).

Das isolierte GFP- und das daraus abgeleitete EGFP-Molekül weisen außerdem eine hohe Stabilität gegenüber äußeren Einwirkungen auf. GFP ist stabil über einen weiten pH-Bereich (pH 7 bis 12,2), in 6 mol/l Guanidiniumhydrochlorid, in 8 mol/l Harnstoff, in 1 % SDS und gegenüber Temperaturen über 65°C [WARD, 1981]. Diese Stabilität wird durch die besondere Tertiärstruktur des GFP-Moleküls, die sogenannte „ $\beta$ -can-Struktur“, erklärt (Abb. 1-5A). Sie besteht aus 11 antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern (grün), welche die Wand des dosenförmigen Moleküls bilden, in dessen Zentrum geschützt das Fluorophor (gelb) liegt, eingebettet in  $\alpha$ -Helices (blau) und Verbindungsstränge (orange).

GFP bzw. EGFP eignen sich als Marker der Genexpression in *Drosophila melanogaster*, Pflanzen- und Säugerzellen [CORMACK *et al.*, 1996; PINES, 1995], zur Proteinlokalisierung und Visualisierung des Proteintransports in der Zelle [KAIN *et al.*, 1995, KAETHER und GERDES, 1995] und zur Aufdeckung von Gentransfer in Säugerzellen [ZHANG *et al.*, 1996]. GFP erwies sich dabei als geeigneter Marker für FACS-Trennungen [ANDERSON *et al.*, 1996], wobei transiente und stabile GFP-Expression (wt und S65T-Mutante) in Säugerzellen flußzytometrisch quantifiziert werden konnten [SUBRAMANIAN und SCRIENC, 1996; LYBARGER *et al.*, 1996; ZOLOTUKHIN *et al.*, 1996]. Das EGFP-Gen konnte in stabil transfizierten Zellen des Chinesischen Hamsters konstitutiv unter Kontrolle des  $\beta$ -Actin-Promotors exprimiert werden [BAUMSTARK-KHAN *et al.*, 1999]. Stabil transfizierte, stark GFP-exprimierende Tumorzelllinien ermöglichten eine einfache Detektion der Mikrometastasierung in lebensfähigem Gewebe aus Nacktmäusen [CHISHIMA *et al.*, 1997]. Die Entwicklung von blauen, cyanfarbenen und gelben EGFP-Farbmутanten (EBFP, ECFP, EYFP) erweitert die Einsatzmöglichkeiten von EGFP auf die synchrone Untersuchung mehrerer Parameter in einer Zelle [HEIM und TSIEN, 1996; LYBARGER *et al.*, 1998], z.B. erlaubt die Expression von EGFP und seinen Farbvarianten in verschiedenen subzellulären Strukturen die Untersuchung der Interaktion verschiedener Organellen in lebenden Zellen [RIZZUTO *et al.*, 1996].

Anders als bei bisher bekannten Reportern, besteht die GFP- und EGFP-Fluoreszenz ohne Zugabe von Substraten oder Cofaktoren [CHALFIE *et al.*, 1994]. Während andere Reportergene, die Enzyme kodieren, wie  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Lactamase und Luciferase, eine höhere Sensitivität infolge der enzymatischen Signalverstärkung aufweisen, steht bei Verwendung von EGFP nur soviel Protein für die Quantifizierung mittels verschiedener fluorimetrischer Methoden zur Verfügung, wie von der neu synthetisierten mRNA abgelesen wird [CHENG *et al.*, 1996; TSIEN, 1998].

Trotzdem ist die Verwendung von EGFP sehr nützlich, da es durch Blaulichtanregung wiederholt in lebenden Zellen nachgewiesen werden kann. Für bestimmte Fragestellungen, bei denen sowohl die Auf- als auch die Ab-Regulation der Genexpression gemessen werden soll, kann die destabilisierte EGFP-Variante (d2EGFP) eingesetzt werden, die in Säugerzellen

schneller metabolisiert wird. d2EGFP wurde durch Fusionierung des EGFP-Gens mit der PEST-Sequenz des murinen Ornithin-Decarboxylase-Gens [LI *et al.*, 1998] zum schnelleren zellulärem Abbau markiert [RECHSTEINER, 1990].

Da Luciferase und  $\beta$ -Galactosidase-Assays die Lyse der Zellen erfordern, kann eine Zeitkinetik nur mit mehreren Zellansätzen durchgeführt werden [NISWENDER *et al.*, 1995], wogegen mit EGFP und d2EGFP dieselben Zellen mehrmals untersucht werden können.

### 1.3 BIOASSAYS

Mögliche durch Umweltverschmutzung bedingte Gesundheitsrisiken für Mensch und Tier erfordern die Entwicklung von Bioassays, die auf relevante toxische Eigenschaften der Schadstoffe sensitiv reagieren. Solche Bioassays zur Erfassung potenzieller Umweltschadstoffe sind besonders dann nützlich, wenn die toxischen Effekte von Schadstoffmischungen, z.B. in Boden und Grundwasser, quantifiziert werden sollen [GARDNER JR. *et al.*, 1998]. Wichtige Endpunkte beim Testen der Toxizität für Säuger sind Zytotoxizität und toxische Effekte auf das genetische Material, die mit der Krebsentstehung korreliert werden können.

Speziell Bioassays für das Umwelt-Monitoring erfordern eine schnelle und zuverlässige Datenerfassung. Die stabile EGFP-Fluoreszenz in lebenden Zellen kann dabei einen entscheidenden Beitrag zur Weiterentwicklung von Bioassays leisten.

Seit strengeren Kontrollen von Tierexperimenten in den 1980er Jahren und den frühen Bestrebungen, Tierversuche durch Alternativmethoden zu ersetzen, basierend auf den drei R's („*reduction, refinement, and replacement*“ = Reduktion, Verfeinerung, Ersatz) von Russel und Burch [RUSSEL und BURCH 1959], wurden verschiedene Konzepte für *in vitro* Tests zur Vorhersage der Toxizität bei Säugern entwickelt, die auf der Verwendung von Bakterien, Hefen, Insekten- oder Säugerzellen basieren [BALLS, 1994]. Solche alternativen Tests können die Verwendung von Tierversuchen verringern und zusätzliche Informationen zum Mechanismus der Toxizität liefern [ADOLPHE, 1995]. Die Schwäche solcher *in vitro* Tests im Vergleich zu Tierversuchen ist, daß systemische und metabolische Einflüsse toxischer Substanzen nicht gemessen werden können. *In vitro* Bioassays können jedoch in der Risikoerfassung von Umweltverschmutzungen und in der Arzneimittelentwicklung als „*Prescreening*-Toxizitätstest“ eingesetzt werden.

Die Verwendung von Säugerzellen bringt einige wichtige Vorteile gegenüber anderen eukaryoten Systemen wie Hefe-, Insekten- oder Fischzellen oder gegenüber prokaryoten Systemen basierend auf der Verwendung von *E. coli* oder *Salmonella* Spezies. Die Nutzung von Säugerzellen ist der von Hefen vorzuziehen, da deren starre, dicke Zellwand ein Hindernis darstellt und da die Erfassung von Arzneimittel-bedingten oder chemischen Interaktionen über Transkriptionsfaktoren direkt nur in Säugerzellen möglich ist, es sei denn, die betreffenden Transkriptionsfaktoren werden in Hefezellen transfiziert. Verglichen mit prokaryoten Systemen haben eukaryote den Vorteil einer geeigneten Membrenumgebung, posttranslationaler Prozessierung der Proteine und besserer Extrapolation zum menschlichen Organismus. Ein

prokaryoter Bioassay bietet Vorteile durch schnelleres Wachstum, d.h. schnelleren Zugriff auf die Ergebnisse. Die Kultivierung von Säugerzellen ist zwar kosten- und zeitintensiver als die Züchtung von Bakterien oder Hefen, jedoch sind die mit Säugerzellen erzielten Ergebnisse für die Messung bestimmter toxikologischer Endpunkte, wie Zytotoxizität, Mutagenität, Chromosomenaberrationen, Mikronukleusbildung und zelluläre Transformation von großer Relevanz für den Menschen und andere Säugetiere [WIEBEL *et al.*, 1997]. Außerdem können bei Toxizitätstests mit kultivierten klonalen Zelllinien die Risiken, die mit der Exposition von komplexen chemischen Mischungen in der Umwelt assoziiert sind, quantifiziert werden [HASSPIELER *et al.*, 1996].

Deshalb sollen in dieser Arbeit erste Schritte zur Entwicklung eines Bioassays unternommen werden, der auf der Verwendung von Säugerzellen zur Erfassung schadensinduzierter Genaktivierung basiert (s.u.).

### **1.3.1 Auswahl des Sensors**

Ziel der Arbeit ist die Konstruktion eines Reportervektorsystems, das auf DNS-schädigende Noxen hin zur Induktion des vektoreigenen EGFP-Gens führt. Der Sensor in diesem System soll ein Schadens-regulierter Promotor sein. Vergleichbare Reportervektorsysteme werden bereits in bakteriellen Testsystemen wie z.B. dem *umu*-Test [REIFFERSCHIED und HEIL, 1996] und dem SOS-Lux-Test [PTITSYN *et al.*, 1997] eingesetzt. Sie beruhen auf der Induktion des Reportergens  $\beta$ -Galaktosidase bzw. Luciferase, das durch einen DNS-Schadens-abhängigen Promotor reguliert wird. Auf Behandlung mit genotoxischen Substanzen reagieren diese Testsysteme mit einer erhöhten Expression des Reportergens.

Für den Nachweis UV-induzierbarer EGFP/d2EGFP-Expression in Säugerzellen muß zunächst ein geeigneter Promotor ausgewählt werden, unter dessen transkriptionaler Kontrolle das EGFP/d2EGFP-Gen stehen sollte. Dieser muß folgende Anforderungen erfüllen:

- Die bekannte Sequenz sollte UV-induzierbare Elemente enthalten.
- Der Promotor sollte neben der UV-Induzierbarkeit eine allgemeine Bedeutung für genotoxische Wirkungen in Säugerzellen, die Regulation des Zellzyklus, die Karzinogenese, die DNS-Reparatur oder die Apoptose besitzen.

Mögliche Kandidaten für einen solchen induzierbaren Promotor sind entweder solche UV-induzierbaren Promotoren, die p53-, AP1- oder NF- $\kappa$ B-Bindungssequenzen enthalten, oder ein synthetischer Promotor mit diesen Bindungselementen. Die NF- $\kappa$ B-Bindungssequenz ist aufgrund der kürzlich erkannten Bedeutung von NF- $\kappa$ B für die Apoptose und Proliferation und seiner möglichen Interaktionen mit p53 über ATM (s. 1.1.5) ein besonders interessanter Kandidat eines induzierbaren Promotorelements.

### **1.3.2 Auswahl der Zelllinien**

Für grundlegende Untersuchungen sollen etablierte Kulturen von Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) verwendet werden. Dieses Zellsystem ist leicht zu kultivieren und

besitzt den Vorteil, daß gut charakterisierte Mutanten erhältlich sind, die in definierten DNS-Reparaturschritten nach Bestrahlung Defekte aufweisen. Somit kann die Rolle der DNS-Reparatur bei der Entstehung der biologischen Effekte der DNS-Schäden untersucht werden [TRINIDAD *et al.*, 1991].

Folgende Zelllinien sollen untersucht werden:

- CHO-AA8 ist die reparaturprofiziente Linie. Sie ist ein Derivat der CHO-K1-Zelllinie und besitzt 21 Chromosomen [THOMPSON *et al.*, 1980A]. AA8 ist die parentale Linie der reparaturdefizienten Linien EM9 und UV5.
- CHO-EM9 zeigt Defekte in der Einzelstrangbruchreparatur, die durch Transfektion des menschlichen XRCC1-Gens korrigiert werden können [THOMPSON *et al.*, 1982; THOMPSON *et al.*, 1990]
- CHO-UV5 ist defekt im Inzisionsschritt der NER (Exzisionsreparatur-Komplementationsgruppe 2) [THOMPSON *et al.*, 1982], der durch das humane ERCC2-Gen korrigiert werden kann [WEBER *et al.*, 1988], und hypersensitiv gegenüber UV-Strahlung und „bulky-adduct“-Mutagenen. Sie kann weder CPDs noch (6-4)-Photoprodukte reparieren.

Für die Untersuchungen der induzierbaren Genexpression werden die adhärenen Zelllinien eingesetzt, in denen das ausgewählte Promotorelement durch endogene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden kann. Die verwendete Zelllinie sollte für den betreffenden Transkriptionsweg einen intakten Signaltransduktionsweg aufweisen. Bei Verwendung des NF- $\kappa$ B-Bindungselements kommt dazu die humane embryonale Nierenzelllinie (HEK/293) in Frage.

#### **1.4 FRAGESTELLUNG**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine Risikoabschätzung für die Einwirkung genotoxischer Agenzien auf Mensch und Tier mit Hilfe eines *in-vitro*-Modells zur Bestimmung der Zyto- und Genotoxizität zu ermöglichen. Dazu soll ein Vektor unter Verwendung des Reporter-moleküls EGFP bzw. d2EGFP konstruiert werden, dessen Expression in einer Säugerzelllinie durch einen geeigneten Promotor kontrolliert wird. Der induzierbare Promotor soll in Abhängigkeit von Umwelttoxinen, insbesondere von UV-Strahlung unterschiedlicher biologischer Wirksamkeit regulierbar sein, so daß das Zell/Vektor-System als ein Reporter für schadensabhängige Genaktivierung dienen kann (s. 1.1.5 und 1.3.1).

Um einen solchen Biosensor zur Erfassung von Zyto- und Genotoxizität zu entwickeln, sind im Rahmen dieser Arbeit folgende Aufgaben zu bewältigen:

- 1) Konstruktion von geeigneten Vektoren, bei denen die Reportergene EGFP und d2EGFP unter Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors sowie eines schadensabhängigen induzierbaren Promotors stehen.
- 2) Überprüfung verschiedener Nachweismethoden auf ihre Eignung auch schwache d2EGFP-Fluoreszenzen zu bestimmen. Dazu werden CHO-Zellen mit geeigneten EGFP- sowie d2EGFP-Reporterkonstrukten stabil transfiziert und die Expression des Reporter-moleküls



mittels Fluoreszenzmikroskopie, Durchflußzytometrie und Mikrotiterplattenfluorimetrie bestimmt.

- 3) Evaluierung der Halbwertszeit verschiedener EGFP-Varianten und Bestimmung der EGFP-Expressionscharakteristika in geeigneten Zelllinien.
- 4) Nutzung der konstitutiven EGFP-Expression als Marker für Zytotoxizität in CHO-Zellen. Als zytotoxisches Agens werden Röntgenstrahlen und UV-Licht verwendet.
- 5) Testung der induzierbaren d2EGFP-Expression als möglicher Marker für Genotoxizität in HEK-Zellen. Als responsives Element wird ein artifizieller Promotor verwendet, der durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B induziert wird. HEK-Zellen werden mit dem NF- $\kappa$ B-abhängigen d2EGFP-Reporterkonstrukt stabil transfiziert. Mittels dieses Systems wird die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Pathways durch TNF- $\alpha$ , PMA, Röntgen- sowie UVA-, UVB- und UVC-Strahlung untersucht.