

5 ZUSAMMENFASSUNG

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

Um die Vorteile der Cofaktor-unabhängigen Expression von “*Green Fluorescent Protein*” (GFP) in heterologen Systemen und der Nachweisbarkeit von GFP in lebenden Zellen in der Untersuchung der Wirkungen ultravioletter (UV-) Strahlung auf Säugerzellen zu nutzen, sollte eine stabile Zelllinie hergestellt werden, mit deren Hilfe UV-induzierte Genaktivierung in Säugerzellen anhand der grünen Fluoreszenz des Reporterproteins *Enhanced GFP* (EGFP) gemessen werden kann.

Dazu wurden das an Säugerzellen adaptierte EGFP und seine destabilisierte Variante, d2EGFP, auf ihre Einsatzfähigkeit als Reporter für die Promotoraktivität in Säugerzellen untersucht. Im Vergleich zu den Ausgangszelllinien zeigten stabil transfizierte, konstitutiv EGFP- oder d2EGFP-exprimierende CHO-Zelllinien keine Veränderung des Wachstumsverhaltens und der Empfindlichkeit gegenüber Röntgen- und UVC-Strahlung. EGFP konnte in lebenden und Formaldehyd-fixierten Zellen durch FACS-Analyse und im Fluoreszenzmikroskop in jeder einzelnen Zelle, und zeitsparend im MTP-Fluorimeter nachgewiesen werden. Dabei besteht eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Anzahl der Zellen. Nach stabiler Transfektion kann das Wachstum dieser Zellen nach Behandlung mit einem zytotoxischen Agens anhand der EGFP-Fluoreszenz im MTP-Fluorimeter gemessen werden. Konstitutiv exprimiertes d2EGFP, das eine Halbwertszeit von 3 h in CHO-Zellen hat, konnte dagegen nur durch FACS-Analyse und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Zur Untersuchung der UV-induzierbaren Genexpression wurde die stabil transfizierte Zelllinie HEK-pNF- κ B/Neo hergestellt, bei der das Reporter-gen d2EGFP unter Kontrolle eines synthetischen Promotors steht, der vier NF- κ B-Bindungsstellen und den minimalen Thymidinkinase-Promotor enthält. In dieser humanen embryonalen Nierenzelllinie kann UVA-induzierte Genaktivierung anhand der d2EGFP-Fluoreszenz gemessen werden. TNF- α löste in bis zu 90 % der Zellen dieser Zelllinie d2EGFP-Expression aus und wurde deshalb als Positivkontrolle der Induktion NF- κ B-abhängiger Genexpression verwendet. UVC- und UVB-Strahlung lösten keine erhöhte d2EGFP-Expression aus, Röntgenstrahlung nur in hohen Dosen. Behandlung mit dem Tumorpromotor PMA verursachte d2EGFP-Expression in bis 40 % der Zellen einer Population. Der Nachweis dieser induzierten d2EGFP-Expression erforderte die FACS-Analyse oder das Betrachten im Fluoreszenzmikroskop, eine Messung im MTP-Fluorimeter war aufgrund der geringen Fluoreszenzintensität nicht möglich.