

Untersuchungen zur Funktion des p53-Proteins bei der Regulation des Zellzyklus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der Universität-Gesamthochschule Essen

vorgelegt von

Frank Werner

aus Essen

Juni 1999

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Medizinische Strahlenbiologie der Universität-Gesamthochschule Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. C. Streffer

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Ryffel

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. R. Hensel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.9.1999

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
1.1	IONISIERENDE STRALUNG UND DAS TUMORSUPPRESSORPROTEIN P53	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DE
1.2	GESCHICHTE, STRUKTUR UND LOKALISATION DES P53-PROTEINS	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIE
1.3	DIE NORMALE FUNKTION DES P53-PROTEINS	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
1.3.1	SCHÄDIGUNG DER ZELLE	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
1.3.2	STIMULATION DER P53-INDUKTION	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
1.3.2.1	Interaktion des p53-Proteins mit der DNA und zellulären Proteinen	Fehler! Textmarke nicht def
1.3.2.2	Interaktion des p53-Proteins mit viralen Proteinen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
1.3.3	ZELLYKLUSKONTROLLE DURCH ZELLYKLUSBLOCKIERUNG	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINI
1.3.3.1	Der strahleninduzierte G ₁ -Block	Fehler! Textmarke nicht definiert.
1.3.3.1.1	p53, der G₁-Block und die Strahlenempfindlichkei	Fehler! Textmarke nicht definiert.
1.3.3.2	Der strahleninduzierte G ₂ -Block	Fehler! Textmarke nicht definiert.
1.3.3.2.1	p53, der G₂-Block und die Strahlenempfindlichkei	Fehler! Textmarke nicht definiert.
1.3.4	P53 UND DIE REPARATUR VON DNA-SCHÄDEN	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
1.3.5	P53 UND DIE APOPTOSE	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
1.4	MUTATION IM P53-GEN	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
1.5	GENETISCHE INSTABILITÄT	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
1.6	ZIELSETZUNG	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.1	MATERIAL	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.1.1	ZELLINIEN UND LYMPHOZYTEN	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.1.2	LÖSUNGEN, PUFFER UND REAGENZIEN	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.1.2.1	Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.1.2.2	Lösungen und Reagenzien für den Koloniebildungstest	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.1.2.3	Lösungen und Reagenzien für die Durchflußzytometrie	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.1.2.3.1	Lösungen und Reagenzien für die p53PJ-Doppelmarkierung	Fehler! Textmarke nicht de
2.1.2.3.2	Lösungen und Reagenzien für die BrdUPJ-Doppelmarkierung	Fehler! Textmarke nicht
2.1.2.3.3	Lösungen und Reagenzien für die Annexin5-PJ-Doppelmarkierung	Fehler! Textmarke n
2.1.2.4	Lösungen und Reagenzien für die SDS-Gele und den „Western blot“	Fehler! Textmarke nicht d
2.1.3	GERÄTE	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.1.4	PAPIERWAREN	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.1.5	GLASWAREN	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.1.6	PLASTIKWAREN	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.2	METHODEN	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.2.1	ZELLKULTUR	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.2.1.1	Zellkultur in Kulturflaschen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.1.2	Isolierung und Kultur von humanen Lymphozyten	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.1.3	Zellkultur auf Objektträger	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.1.4	Trypsinisierung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.1.5	Zellzahlbestimmung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.1.6	Behandlung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.1.7	Fixierung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.2	KOLONIEBILDUNGSTEST	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
2.2.3	IMMUNOCHEMISCHE MARKIERUNG VON ZELLEN FÜR DIE DURCHFLUßZYTOMETRIE	FEHLER! TEXTM
2.2.3.1	Durchflußzytometrie	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.3.2	P53-Propidiumiodid-Doppelmarkierung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.3.3	BrdU-Propidiumjodid-Doppelmarkierung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.3.4	Annexin-5-Propidiumjodid-Doppelmarkierung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2.2.4	FLUORESZENZMIKROSKOPIE	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

- 2.2.5 p53-NACHWEIS MITTELS EINES „WESTERN BLOTS“ **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
- 2.2.5.1 Denaturierende Natrium-Dodecyl-Sulphat - Polyacrylamid-Gelelektrophorese () **Fehler! Textma**
- 2.2.5.2 „Western blot“ **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
- 2.2.5.3 „Immunodetektion“ des p53-Proteins **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
- 2.2.6 STATISTIK **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

- 3.1 NORMALE P53-MENGE** **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.1.1 FRAGESTELLUNG **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.1.2 ERGEBNISSE **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.1.2.1 DURCHFLUßZYTOMETRIE **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.1.2.2 „WESTERN BLOTTING“ **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.1.2.3 FLUORESZENZMIKROSKOPIE **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.1.3 DISKUSSION **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
- 3.2 STRAHLENINDUZIERTER P53-MENGE** **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.2.1 FRAGESTELLUNG **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.2.2 ERGEBNISSE **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.2.2.1 Durchflußzytometrie **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.2.2.2 „Western blotting“ **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.2.3 DISKUSSION **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
- 3.3 p53-INDUKTION UND DIE ZELLZYKLUSBLOCKIERUNG** **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.3.1 FRAGESTELLUNG **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.3.2 ERGEBNISSE **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.3.2.1 Durchflußzytometrie **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.3.3 DISKUSSION **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
- 3.4 APOPTOSE-NACHWEIS BEI LYMPHOZYTEN UND BEI TUMORZELLINIEN** **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DE**
 - 3.4.1 FRAGESTELLUNG **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.4.2 ERGEBNISSE **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.4.2.1 Apoptose bei Lymphozyten bestimmt mit der Annexin-5 Methode **Fehler! Textmarke nicht defi**
 - 3.4.2.2 Apoptose bei Tumorzelllinien bestimmt mit der Annexin-5-Methode **Fehler! Textmarke nicht de**
 - 3.4.3 DISKUSSION **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
- 3.5 ZELLSTÄMME WI38 VA13E UND F** **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.5.1 FRAGESTELLUNG **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.5.2 ERGEBNISSE DER WI38 VA13 ZELLSTÄMME **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
 - 3.5.2.1 Mikroskopisches Erscheinungsbild **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.5.2.2 Zytometrie **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.5.2.3 Zellkinetik **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.5.2.4 Normale p53-Menge **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.5.2.4.1 Durchflußzytometrie **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.5.2.4.2 „Western blot“ **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.5.2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.5.2.5 Nachweis des großen T-Antigens **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.5.2.6 Strahlensensitivität der Wi38 VA13 Zellstämme **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.5.2.7 Zellzyklusverteilung **Fehler! Textmarke nicht definiert.**
 - 3.5.3 DISKUSSION **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
- 3.6 ABSCHLUß-DISKUSSION** **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

4 ZUSAMMENFASSUNG **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

5 LITERATURVERZEICHNIS **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

Abkürzungen

α	anti, gegen
Ak	Antikörper
BrdU	Bromdesoxyuridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCM	Fluoreszenzcytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
h	Stunde
ICP	Impulscytophometrie
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PJ	Propidiumjodid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulphat
wt	Wildtyp