

Katrin Seibel, geb. Lehlbach

Dr.med.

## **In vitro Systeme zur Charakterisierung der Induzierbarkeit des CD95-Systems durch wt p53 in humanen Hepatomzellen**

Geboren am 16.03.1970 in Heidelberg

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/92 bis SS 1999

Physikum am 24.09.1993 an der Universität Frankfurt a.M.

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg und New York

Staatsexamen am 10.05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof.Dr.med.P.R.Galle

Mutationen des p53-Gens sind die häufigsten genetischen Veränderungen, die in menschlichen Tumoren gefunden werden konnten. Inaktivierung des wt p53 Gens durch Deletion oder Punktmutation spielt eine große Rolle bei der Entwicklung maligner Tumoren. Um die Auswirkungen von p53 Mutationen in Hepatomzellen besser verstehen zu können, wurden in dieser Arbeit transiente Transfektionsversuche mit wt p53 und verschiedenen p53 Mutanten durchgeführt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer stabilen Zelllinie, um unterschiedliche p53 Konformationen in ein und demselben System untersuchen zu können. Von besonderem Interesse war dabei der Zusammenhang zwischen p53 Status und CD95-System.

Für die stabile Transfektion wurden die temperatursensitive Mutante p53ala143 und die p53 negativen Hep3 Zellen verwendet. Bei 32.5°C nimmt p53ala143 wt Konformation an, während bei 37°C die mutante Konformation vorliegt. Im Anschluß an die stabile Transfektion wurde die erfolgreiche p53 Expression im Immunoblot untersucht. Mittels SSCP-Analyse von Exon 5 des p53 Gens wurde die Integration von p53ala143 in den Hep3B Zellen nachgewiesen.

Die verstärkte Expression von wt p53 führt in der Regel zu einem Wachstums-Arrest in der G1 Phase des Zellzyklus. Um Aufschluß über das Wachstumsverhalten der stabilen Transfektante Hep3B p53ala143 zu erhalten, wurde die <sup>3</sup>H-Thymidin-Aufnahme der Zellen bei permissiver

(32,5°C) und restriktiver (37°C) Temperatur untersucht. Der beobachtete Wachstumarrest bei permissiver Temperatur zeigte die wt Funktion von p53ala143.

Bei der durch Chemotherapeutika vermittelten Apoptose spielt das CD95-System eine bedeutende Rolle. Um zu testen, ob die stabil mit der temperatursensitiven Mutante p53ala143 transfizierten Hep3B Zellen auf Bleomycinbehandlung mit der Induktion der CD95-Liganden mRNA reagieren, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß es durch die Behandlung der stabilen Transfektante mit Bleomycin sowohl bei restriktiver (mut p53) als auch bei permissiver (wt p53) Temperatur zur Induktion der CD95-Liganden Expression kommt. Dies ließ den Schluß auf einen wt p53 unabhängigen Induktionsweg für den CD95-Liganden zu.

Auch nach transientser Calcium-Phosphat Transfektion konnte ein Anstieg des CD95-Liganden nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich auf eine akute DNA Schädigung durch die Calcium-Phosphat-Transfektion zurückzuführen.

Das CD95-System hat auch beim Morbus Wilson große Bedeutung. Die toxische Schädigung durch Kupferionen führt zur Expression des CD95-Rezeptors und zu einer erhöhten Apoptoserate. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die in vitro Kupferbehandlung von wt exprimierenden Kulturzellen (HepG2) zu einer deutlichen Akkumulation von p53 führte, die wahrscheinlich Mittlerfunktion für die Apoptosewirkung besaß.

Um den Zusammenhang zwischen wt p53 und dem CD95-Rezeptor weiter zu untersuchen, wurde ein wt p53 exprimierendes Plasmid transient in die p53 defiziente Zelllinie Hep3B transfiziert. Untersucht wurde die CD95-Rezeptor Expression mittels FACS-Analyse vor und nach Bleomycinbehandlung. Durch Wiederherstellung des wt p53 Status gewannen die p53 defizienten Hep3B Zellen die Fähigkeit zurück, die CD95 Expression zu induzieren.

Dieses Ergebnis konnte auch mit der stabil in Hep3B transfizierten temperatur-sensitiven p53 Mutante 143Ala bestätigt werden. Bei FACS-Analysen nach Bleomycinbehandlung zeigt sich bei der permissiven Temperatur von 32,5°C (wt p53) ein Anstieg der Expression von CD95. Im Gegensatz dazu konnte bei der restriktiven Temperatur von 37°C (mut p53) kein CD95-Rezeptor nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit entwickelten in vitro Systeme lassen insgesamt den Schluß zu, daß die zellschädigende Wirkung bei Chemotherapie, aber auch beim M. Wilson eng mit einer durch wt p53 vermittelten Induktion des APO1/Fas System verbunden ist. Hierbei scheint jedoch insbesondere der CD95-Rezeptor direkt wt p53 abhängig reguliert zu werden.

Die wildtypische Konformation von p53 spielt demnach eine wichtige Rolle in der Signalübertragung der Apoptoseinduktion. Ihr Ausfall hat dagegen Bedeutung für die Tumorprogression und in der Resistenz von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika.