

Holger Hof
Dr. med.

Induktion des Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) durch Photonenbestrahlung in V79-Hamsterzellen

Geboren am 01.05.1973 in Würzburg
Reifeprüfung am 27.05.1992 in Mannheim
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992 bis SS 1999
Physikum am 31.08.1994 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 11.05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Radiologie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. K.-J. Weber

PCNA ist ein 36kD-Protein, das in DNA-Replikation und in mehreren Wegen der DNA-Reparatur involviert ist. So wirkt es zum einen als Teil einer Signalkette, welche die Zellzyklusprogression reguliert, zum anderen ist es als Co-Faktor der DNA-Polymerase δ an der DNA-Neusynthese beteiligt. Intrazellulär liegt es in zwei Formen vor: eine Form ist DNA-gebunden, und stellt die aktive Form dar, während die nukleoplasmatische Fraktion eine Art Reservepool darstellt. Für V79 Hamsterzellen wurde ein mutiertes, nichtfunktionales p53 sowie eine sogenannte "adaptive response", eine verbesserte Reparatur von DNA-Schäden nach Bestrahlung, beschrieben, wenn fünf Stunden vor der definitiven Dosis eine Vorbestrahlung mit geringer Dosis durchgeführt wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Assoziation von PCNA an die DNA nach Bestrahlung in V79-Zellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und in Abhängigkeit von einer etwaigen Vorbestrahlung mit geringer Dosis.

V79-Hamsterzellen in Monolayer-Kultur wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Erreichen von Konfluenz bezüglich Bromdesoxyuridin(BrdU)-Einbau, Gesamt- und DNA-gebundenem PCNA untersucht. Nach Erreichen des Stadiums minimaler DNA-

Assoziation von PCNA wurden die Zellen (Voll- oder Hungermedium [10% bzw. 0,5% fetales Kälberserum]) mit 1Gy (zusätzlich mit 8Gy für Zellen mit Vollmedium) Photonenstrahlung bestrahlt (6 MeV, 2Gy/min) und wiederum BrdU-Einbau, Gesamt- und DNA-gebundenes PCNA 0, 30, 60, und 120min nach Bestrahlung flußzytometrisch bestimmt (bis 240min nach Bestrahlung bei Zellen mit Vollmedium). Darüber hinaus wurden BrdU und PCNA nach Bestrahlung mit 1Gy für exponentiell wachsende und konfluente Zellen quantifiziert, jeweils mit und ohne Vorbestrahlung mit 0,01Gy, die fünf Stunden vor der definitiven Dosis appliziert wurde.

Sechs Tage nach Erreichen der Konfluenz war nur noch ein geringer BrdU-Einbau und kaum DNA- gebundenes PCNA (<15% positive Zellen) bei unverändertem Gesamt-PCNA nachweisbar. Bei zu diesem Zeitpunkt mit 1Gy bestrahlten konfluenten Zellen mit Vollmedium zeigte sich eine moderate DNA-Assoziation von PCNA mit einem Maximum 30 min nach der Bestrahlung ohne messbaren BrdU-Einbau. Nach Bestrahlung mit 8Gy zeigte sich kein deutlicher Anstieg des DNA-gebundenen PCNA im Vergleich zu den Kontrollen, jedoch war die Abnahme nach 60min stärker, sodaß möglicherweise das Maximum der PCNA-Assoziation bei höheren Dosen früher auftritt. Bei Zellen, die in Hungermedium gehalten wurden, zeigte sich keine erhöhte PCNA-Assoziation. Die Vorbehandlung mit 0,01Gy hatte bei exponentiell wachsenden und konfluenten Zellen keinen Einfluß auf die DNA-Assoziation von PCNA.

Die strahleninduzierte PCNA-Bindung an die DNA weist auf Reparaturvorgänge hin, scheint jedoch auf Serumstimulation angewiesen zu sein. Auch erfolgt die zeitliche Aktivierung von PCNA mit steigender Dosis zu einem früheren Zeitpunkt. Dieser p53-unabhängige Mechanismus erscheint jedoch von geringer Relevanz für das zelluläre Überleben in dieser Zelllinie zu sein, die eine ausgeprägte Toleranz für residuale Schäden zeigt. Des weiteren konnte bei V79-Zellen keine "adaptive response" bezüglich der DNA-Assoziation von PCNA detektiert werden. Auch bezüglich des zellulären Überlebens war keine "adaptive response" nachzuweisen.