

Aus dem Universitätsklinikum Benjamin Franklin
der Freien Universität Berlin

Klinik für Innere Medizin I
Abteilung Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
(Leiter: Herr Prof. Dr. M. Zeitz)

**Untersuchung des Einflusses genetischer Läsionen in
Kolonkarzinomzellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber
chemotherapeutischen Agenzien**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Miriam Lenz
aus Berlin

Referent: Herr Prof. Dr. Ch. Hanski

Korreferent: Herr Prof. Dr. U. Keilholz

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 11.4.2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entstehung des kolorektalen Karzinoms	1
1.1.1	Mehrschrittkanzerogenese	1
1.1.2	Mikrosatelliteninstabilität und <i>mismatch repair</i> System.....	3
1.1.3	Erbliche Karzinome	4
1.1.3.1	Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)	4
1.1.3.2	Hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis (HNPCC)	4
1.1.4	Phänotypische und genotypische Unterschiede zwischen nicht-muzinösen und muzinösen Karzinomen	5
1.2	Mechanismus der zytotoxischen Wirkung ausgewählter Chemotherapeutika auf Epithelzellen.....	6
1.2.1	5-Fluorouracil (5-FU)	6
1.2.2	Irinotekan (CPT-11).....	7
1.2.3	7-Hydroxystaurosporin (UCN-01).....	9
1.3	Veränderungen des Zellzyklus in Kolonkarzinomzellen: potentielle Relevanz für Chemotherapie.....	10
1.3.1	Bedeutung von p21 ^{CIP1}	10
1.3.2	Bedeutung von p53	11
1.4	Verschiedene Formen der zellulären Reaktion auf Chemotherapeutika	12
1.4.1	Apoptose.....	12
1.4.2	Seneszenz.....	13
2	Fragestellung.....	15
3	Material	16
3.1	Zelllinien.....	16
3.2	Zellkulturmaterialien.....	17
3.3	Chemikalien.....	17
3.4	Geräte und sonstige Materialien.....	20
3.5	Puffer und Lösungen.....	21
4	Methoden.....	25
4.1	Zellkultur	25

4.1.1	Zellkulturmedien	25
4.1.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen	25
4.1.3	Kultivieren der Zellen	26
4.1.4	Zellzahlbestimmung mit Trypanblaufärbung.....	26
4.2	Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität	26
4.2.1	MTT-Test.....	26
4.2.2	Klonogener Test.....	28
4.3	Nachweis von Apoptose und Seneszenz	29
4.3.1	Western Blot.....	29
4.3.2	SA- β -Gal-Färbung	32
5	Ergebnisse	33
5.1	Vergleich des MTT- und des klonogenen Tests zur Untersuchung des Einflusses des p21-Proteins auf die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika	33
5.2	Untersuchung des Einflusses einer p53-Mutation auf die Chemosensitivität der Kolonkarzinomzellen	39
5.3	Untersuchung des Einflusses der Defekte im <i>mismatch repair</i> System.....	45
5.4	Untersuchung des Mechanismus der Zytotoxizität von 5-FU.....	52
5.4.1	Bestimmung der Apoptose nach Behandlung mit 5-FU.....	52
5.4.2	Bestimmung der Seneszenz nach Behandlung mit 5-FU	55
5.5	Untersuchung des Einflusses der Läsionen in p53 und im MMR-System auf die modulatorische Wirkung von 7-Hydroxystaurosporin (UCN-01).....	58
5.5.1	Kombination von 5-FU und UCN-01	58
5.5.2	Kombination von CPT-11 und UCN-01	63
6	Diskussion.....	72
6.1	Einfluss des p21 ^{CIP1} -Proteins auf die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika: Vergleich von zwei Testmethoden.....	72
6.2	Einfluss einer p53-Mutation auf die Chemosensitivität in Kolonkarzinomzellen	74
6.3	Einfluss eines Defektes im <i>mismatch repair</i> System.....	75
6.4	Mechanismus der Zytotoxizität von 5-FU in Abhängigkeit vom p53- und MMR-Status	76

6.5	Einfluss der Läsionen in p53 und im MMR-System auf die modulatorische Wirkung von UCN-01	77
7	Zusammenfassung.....	80
8	Abstract	81
9	Literaturverzeichnis	82
10	Danksagung.....	101