

Laila Christina König  
Dr. med.

## **Neue Protein-Protein-Interaktionen der p53-Familie und ihre Bedeutung für die Regulation der mitochondrialen Apoptose in Zellen des Hepatozellulären Karzinoms**

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktormutter: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling

Protein-Protein-Interaktionen (PPI) spielen eine zentrale Rolle in zahlreichen zellulären Regulationsmechanismen. Ihre Erforschung ist zum Gegenstand aktueller Forschung geworden, die die Entwicklung neuer hochspezifischer Angriffspunkte zum Ziel hat. Dabei rücken insbesondere Proteine in den Vordergrund, die sowohl auf transkriptioneller als auch auf transkriptions-unabhängiger Ebene interagieren. Bekannte Proteinfamilien sind die p53-Familie und die Bcl-2-Proteinfamilie, die wichtige Schnittstellen der mitochondrialen Apoptose beeinflussen.

Diese Arbeit diente der Detektion neuer Interaktionen zwischen beiden Familien sowie der Aufklärung ihrer exakten Lokalisationen auf subzellulärer Ebene, um damit ein weitreichenderes Verständnis in der mitochondrialen Apoptoseregulation zu erlangen.

Zum Screening neuer Interaktionen von p53 und p73 in der HCC-Zelllinie Hep3B wählten wir 33 Proteine, die in der Zellzykluskontrolle und Apoptoseregulation eine wichtige Rolle spielen. Hierfür wurde im Vorfeld eine Datenbankrecherche mittels BioGRID und Ingenuity durchgeführt.

Zur Detektion neuer Interaktionen von p53 und p73 etablierten wir zunächst den LUMIER-Assay in Hep3B-Zellen. Es handelt sich um einen Assay, der im Hochdurchsatzverfahren PPI mit einer hohen Sensitivität und Spezifität untersuchen kann und dabei zahlreiche Vorteile gegenüber anderen Verfahren bietet, wie z.B. die Durchführbarkeit mit menschlichen Zellen oder die Untersuchung aller Zellkompartimente. Als Ergebnis konnten für p53 drei neue Interaktionspartner identifiziert werden: BAG1, MCL1 und YAP. Für p73 wurden fünf neue Interaktionspartner identifiziert: BCL-xl, MCL-1, NFkB1, PML und YY1.

Zur Bestätigung der Ergebnisse des Screening-Verfahrens verifizierten wir diese mittels Co-Immunopräzipitation. Hier konnten wir alle oben beschriebenen Interaktionen ebenfalls nachweisen.

Bei drei der neuen Interaktionspartner (p53 mit BAG1 und MCL-1 sowie p73 mit BCL-xl und MCL-1) handelt es sich um Mitglieder der Bcl-2-Familie. Alle drei haben anti-apoptotische Funktionen und beeinflussen die Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalweges.

Für p53 und p73 konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es unter apoptotischer Stimulation mittels  $\alpha$ -Amanitin und Sorafenib zu einer vermehrten transkriptionellen Aktivierung von Genen kommt, die im mitochondrialen Apoptosesignalweg eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund interessierte uns insbesondere die exakte Lokalisation dieser Interaktionen.

Zur Untersuchung der Regulation auf subzellulärer Ebene führten wir zunächst Immunfluoreszenzversuche in Hep3B-Zellen und HepG2-Zellen durch. Diese deuteten darauf hin, dass eine apoptotische Stimulation durch  $\alpha$ -Amanitin und Sorafenib zu einer Verschiebung der Lokalisationen von p53 und p73 führt: p53 und

p73 translozierten vermehrt vom Zellkern in das Zytosol und an die Mitochondrien. Neben dieser qualitativen Untersuchung führten wir eine quantitative Messung mittels Fraktionierung durch. Hier bestätigte sich neben einer allgemein gesteigerten Induktion von p53 und p73 eine vermehrte Verschiebung dieser Proteine in das mitochondriale Kompartiment.

Da die Interaktion von p53 und BCL2 im Bereich der Mitochondrien vorbeschrieben ist, nehmen wir an, dass p53 und p73 durch ihre Lokalisation an die Mitochondrien und mittels Interaktion mit BCL-xl, MCL-1 und BAG1 zu einer vermehrten Apoptoseinduktion führten. Wir vermuten weiterhin, dass es durch die direkt inhibierende Wirkung von p53 und p73 auf BAG1, BCL-xl und MCL1 mittels direkter PPI zur Ausbildung einer Pore in der äußeren Mitochondrienmembran kommt, die zu einem Cytochrom c-Ausstrom führt. Damit wird die Endstrecke der Apoptose eingeleitet.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten neuen Protein-Protein-Interaktionen der p53-Familie und ihrem Zusammenspiel im mitochondrialen Kompartiment können wir einen Beitrag zum weiteren molekularen Verständnis der p53-Familie liefern und erwarten, durch weitergehende Untersuchungen in diesem Bereich neue therapeutische Optionen für das klinische Management des HCC entwickeln zu können.