

Marcus Tonak

Dr. med.

**Etablierung stabil transfizierter H1299-Zelllinien mit regulierbarer p53 Expression und Untersuchung des Einflusses posttranslationaler Modifikationen des p53-Tumorsuppressorproteins auf die Apoptoserate**

Geboren am 03.11.1973 in Leipzig

Reifeprüfung am 18.5.2003 in Mannheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1997/98 bis SS 2003

Physikum am 22.3.1999 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Luzern, Heidelberg und Aarau

Staatsexamen am 07.05.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h. c. mult. Klaus Kayser

In mehr als 50% aller Tumoren sind Veränderungen des p53-Proteins zu finden. Dieses Tumorsuppressorprotein verhindert normalerweise die Entartung von Zellen sowie ihre Ausbreitung, durch Vermittlung von Apoptose oder Zyklusarrest zur Wiederherstellung der Integrität der Zelle. Dabei wird es durch alle bekannten, das Genom schädigenden Einflüsse, wie die Behandlung von Zellen mit alkylierenden Substanzen, ionisierender Strahlung, DNA-querverbindende Agenzien oder Sauerstoffradikalen, über verschiedene Signalkaskaden aktiviert.

Unter anderem regulieren zahlreiche posttranslationale Modifikationen die Stabilität und Funktion des p53-Proteins. Die Phosphorylierung der Aminosäure Serin an der Position 20 spielt dabei eine bisher nicht endgültig geklärte Rolle. Die Auswirkungen der Serin 20-Phosphorylierung können näherungsweise mit der artifiziellen Mutante p53S20A, welche an der Position 20 von p53 die Aminosäure Alanin statt Serin besitzt, simuliert werden. Eine Phosphorylierung des mutierten Proteins an dieser Stelle ist nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden p53 defiziente H1299-Zellen mit Wildtyp-p53 oder

mutiertem p53S20A stabil transfiziert. Anhand dieser genetisch veränderten Zelllinien wurden Unterschiede von Stabilität und Aktivität zwischen Wildtyp und mutiertem p53 untersucht. Die alleinige Expression von Wildtyp- oder mutiertem p53 in den sonst p53-defizienten H1299-Zellen bewirkte keine Veränderung des Zellwachstums und der Apoptoserate. Zellen die das mutierte p53S20A-Protein exprimierten, wiesen bei ähnlichen mRNA-Konzentrationen wie in Wildtyp-p53 exprimierenden Zellen deutlich geringere Proteinkonzentrationen auf. Dies spricht für einen das p53-Protein destabilisierenden Effekt der Mutation S20A.

Weiterhin wurde während der hier beschriebenen Studien überprüft, ob der HDAC-Inhibitor SAHA einen Einfluss auf die Stabilität und Aktivität von p53 hat. Dabei konnte gezeigt werden, dass SAHA sowohl das p53-Protein stabilisiert als auch aktiviert. Die ermittelten Daten weisen auf eine Vermittlung des SAHA-Einflusses über die Erhöhung der C-terminalen Acetylierung des Tumorsuppressors hin.

Eine Aktivierung durch SAHA konnte auch bei dem mutierten p53S20A-Protein beobachtet werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die C-terminale Acetylierung in der Aktivierungssequenz des p53-Protein der Phosphorylierung von Serin 20 nachfolgt.

Die durchgeführten Experimente deuten weiterhin auf ein besseres Ansprechen einer Therapie mit SAHA bei p53-exprimierenden Tumorzellen als bei p53-defizienten Zellen hin.

Daraus ergibt sich für p53-negative Tumorzellen die Therapieoption des p53-Gentransfers in diese Zellen. Dadurch würde die Therapieeffizienz gesteigert werden können. Allerdings sind vorher noch erhebliche Fortschritte bei der Etablierung der Gentherapie notwendig.