

Innere Medizin
Olay Axel Gressner
Dr. med.

Das p53-Familienmitglied TAp63 α induziert Apoptose durch die Aktivierung todesrezeptor- und mitochondrienabhängiger Signalwege

Neue Ansätze zur Therapie des hepatozellulären Karzinoms

Geboren am 14.07.1978 in Aachen
Reifeprüfung am 18.06.1997 in Marburg/ Lahn
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1998 bis SS 2005
Physikum am 29.08.2000 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg, Edinburgh, New York
Praktisches Jahr in Heidelberg, New York
Staatsexamen am 10.06.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin (Gastroenterologie, Hepatologie)
Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. med. M. Müller-Schilling

TAp63, ein wichtiges Gen für epitheliale Entwicklung und Differenzierung, kodiert für zwei Proteine mit antagonistischen Funktionen das proapoptotische TAp63 und seinen dominant-negativen Gegenspieler Δ Np63, von denen beide eine ausgeprägte Sequenzhomologie mit p53 aufweisen. Zusätzlich unterzieht sich das TAp63-Transkript einem alternativen *Splicing* am COOH Terminus, woraus drei verschiedene Typen von TAp63 mit Namen α , β und δ (α = *full length*) resultieren.

Das große Ausmaß an struktureller Homologie von p63 zu evolutionär konservierten Regionen von p53 und p73 legt nahe, dass dieses Protein auch funktionelle Eigenschaften mit seinen Familienmitgliedern teilt.

Bisher wurde p63 lediglich in Hinsicht auf Entwicklung und Differenzierung intensiv untersucht. Knockout p63-Mäuse sind lebensfähig, haben jedoch starke epitheliale Missbildungen. In jüngerer Zeit konnte jedoch auch gezeigt werden, dass TAp63, ebenso wie p53, Apoptose induzieren kann. Die molekularen Mechanismen der durch TAp63 induzierten Apoptose sind ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit beschreiben und charakterisieren wir erstmals die TAp63-abhängigen Apoptosesignalwege.

Durch Klonierung des adenoviralen Vektors rAdTAp63 α aus der entsprechenden cDNA wurde ein System generiert, das es ermöglicht, dieses p53-Familienmitglied gezielt in verschiedenen Zelltypen zur Überexpression zu bringen. Weiterhin wurde ein Tet-On/Tet-Off-System in Saos 2-Osteosarkomzellen etabliert, durch das eine gezielte Tap63 α -Überexpression nach Doxizylin-Stimulation erreicht werden konnte.

Überexpression von TAp63 α führt zu einer deutlichen Apoptoseinduktion in Hep3B-Hepatomzellen und Saos 2-Zellen. Zum einen erfolgt dies über die Aktivierung Caspasen 3, 8 und 9, weiterhin über eine Sensitivierung von Hep3B-Zellen gegenüber TNF-R1-, TRAIL DR1/2-, CD95-R-medierter Apoptose; zum anderen als Folge eines TAp63 α -induzierten Abfalls des mitochondrialen Membranpotentials und einer transkriptionellen Hochregulation des BAX-Gens.

TAp63 α transaktiviert direkt das CD95- Gen über dessen p53-Bindungsstelle im ersten Intron, was zu einer Zunahme funktioneller CD95-Rezeptoren in Hepatomzellen führt. Diese Ergebnisse wurden durch Chromatin-Immunopräzipitation an Saos 2-Zellen bestätigt. Zusätzliche Stimulations- und Blockadeexperimente des CD95-, TNF-R- und des TRAIL-R-Todesrezeptorsystems zeigten, dass TAp63 α die Expression jedes dieser Todesrezeptoren aktivieren kann. Somit konnte aufgedeckt werden, dass TAp63 α den extrinsischen Apoptosesignalweg nicht nur über das CD95-System sondern über mindestens zwei weitere Todesrezeptortypen, nämlich TNF-R und TRAIL-R mediiert. Weiterhin konnten wir zeigen, dass TAp63 α das proapoptotische BAX-Gen transkriptionell aktiviert. Dies lässt eine molekulare Verbindung zwischen TAp63 α und dem mitochondrialen Apoptosesignalweg vermuten. Tatsächlich zeigten weiterführende Untersuchungen, dass TAp63 α die Expression zahlreicher proapoptotischer BCL 2 Familienmitglieder wie etwa BCL 2 L11/BIM sowie die Expression weiterer, in mitochondriale Apoptose involvierter, Gene, z. B. RAD 9, DAP 3 und APAF 1, aktiviert. Von besonderer klinischer Bedeutung ist bei diesen Ergebnissen die Tatsache, dass TAp63 α p53 $^{-/-}$ -Hepatomzellen gegenüber Chemotherapie sensibilisiert. TAp63 α und Chemotherapeutika wirken synergistisch auf die Apoptoseinduktion in Hepatomzellen. Dieser synergistische Effekt von TAp63 α und Zytostatika ist auf ein kooperatives Verhalten von todesrezeptorabhängigen sowie mitochondrialen Apoptosesignalwegen zurückzuführen. Jenseits seiner wichtigen Rollen in Entwicklung und Differenzierung von Geweben beschreiben wir hier folglich eine wesentliche Funktion von TAp63 α in der Induktion von Apoptose und in Chemosensitivität von malignen Zellen.

Wir konnten ferner zeigen, dass Δ Np73 die proapoptotische Funktion von TAp63 α inhibiert. Das bedeutet, dass ein einzelnes Familienmitglied zwar alleine Apoptose auslösen und somit antiproliferative Wirkung haben kann, in vivo jedoch Kreuzreaktionen mit den transaktivierenden bzw. dominant negativen Formen der anderen beiden Familienmitglieder p53 bzw. TAp73 und Δ Np73 bestehen. Somit sollte zur Steigerung der Effizienz zukünftiger Krebstherapien neben der gemeinsamen Applikation von TAp63 α und Chemotherapeutika auch eine kombinierte Gentherapie mit den beiden weiteren Familienmitgliedern evaluiert werden.