

Zusammenfassung

Nach genotoxischem Stress werden in der Zelle eine Reihe von Signaltransduktionskaskaden aktiviert (Review Agarwal *et al.*, 1998, Meek, 1999). Als integrierendes Protein dient u.a. der Tumorsuppressor P53, welcher dadurch post-translational modifiziert und in seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor „aktiviert“ wird. Das wtp53 Protein ist in der Lage, eine große Anzahl von Genen zu induzieren, die Funktionen in zellulären Prozessen, wie der Regulation der Proliferation, der Apoptose oder der DNA-Reparatur besitzen. Um biologische Konfliktsituationen in der geschädigten Zelle zu vermeiden, muss eine koordinierte Transaktivierung gewährleistet sein. Eine wichtige Frage ist, welche Parameter die Transaktivierungsaktivität von „aktiviertem“ wtp53 differentiell, d.h. promotor-selektiv, modulieren.

Für die Untersuchung dieser Parameter wurden zwei Subklone der EJ-Ras transformierten *tsp53val135*-exprimierenden REF Zellen (P160 und Cl6 Zellen) herangezogen, deren temperatursensitives P53 Protein differentielle Unterschiede in der Transaktivierung von P53 Zielgenen bei der permissiven Temperatur zeigte. Während das *p21* Gen in beiden Subklonen von dem *tsp53* Protein ähnlich induziert wurde, konnte in dem Cl6 Subklon eine deutlich erhöhte Induktion des *mdm2* Gens, sowie Genen mit Funktionen innerhalb des wtp53-abhängigen G2/M Wachstumsarrestes (*gadd45*, *b99*, *cyclin G*) und der Apoptose (*bax*) beobachtet werden. Während beide Subklone bei 30°C in einem G1/M Wachstumsarrest stoppten, entstand in Cl6 Zellen aufgrund der höheren Expression von G2/M Wachstumsarrest Genen ein zusätzlicher G2/M Arrest.

Neben dem regulären *tsp53* Protein (FL-*tsp53*) exprimieren beide Subklone ein C-terminal verkürztes *tsp53* Protein (DeltaC-*tsp53*). Dieses entsteht in dem P160/Cl6 Zellsystem vermutlich als Endprodukt eines alternativen proteasomalen Abbaus von (ubiquitiniertem) FL-*tsp53*.

DeltaC-*tsp53* zeigt *in vitro* und *in vivo* keine sequenz-spezifische DNA Bindungsaktivität, ist oligomerisierungsinaktiv und kann die Aktivität von FL-*tsp53* nicht durch direkte Protein/Protein Interaktion beeinflussen.

Cl6 und P160 Zellen zeigten klonale Unterschiede hinsichtlich der Aktivität dieses limitierten FL-*tsp53* Abbaus bei 30°C. Dies führt dazu, dass P160 Zellen, in denen

der limitierte FL-tsp53 Abbau aktiver ist, bei der permissiven Temperatur deutlich geringere FL-tsp53 Proteinlevel enthalten als Cl6 Zellen.

Diese klonalen FL-tsp53 Konzentrationsunterschiede waren ursächlich für die differentielle Transaktivierung der Gene *p21* und *mdm2* (sowie G2/M Wachstumsarrest- und Apoptosegenen) in dem P160/Cl6 Zellsystem bei der permissiven Temperatur verantwortlich. Die Blockierung des proteasomalen Abbaus in P160 Zellen bewirkte, dass funktionelles FL-tsp53 akkumulierte und dadurch eine selektive Erhöhung der Transkription des *mdm2* Gens induziert wurde, die mit der in Cl6 Zellen vergleichbar war. Diese erhöhte Transkription ging einher mit einer stärkeren *in vivo* Beladung des *mdm2* Promotors mit funktionellem FL-tsp53 Protein. Die Transkription des *p21* Gens und dessen Beladung mit FL-tsp53 wurde durch die erhöhten FL-tsp53 Proteinlevel nicht beeinflusst.

In dem Cl6/P160 Zellsystem konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der zellulären Konzentration von „aktiviertem“ wt-tsp53 Protein und der differentiellen Transaktivierung des G1/S Wachstumsarrestgens *p21* und der von G2/M – und proapoptischer Gene beobachtet werden. Modulator der wtp53 Konzentration ist der proteasomale Abbauweg, dem aufgrund dieses Zusammenhangs eine wichtige Funktion bei der zellulären, wtp53-abhängigen „Entscheidung“ G1/S vs. G2/M-Arrest bzw. Apoptose nach Aktivierung von wtp53 zukommen könnte.
