

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Biochemische und strukturelle Untersuchungen
an Proteinen des p53 Tumorsuppressor-
Netzwerks: p53, p63 und MDM2**



Dissertation
Christian Klein
2002

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Biochemische und strukturelle Untersuchungen
an Proteinen des p53 Tumorsuppressor-Netzwerks:
p53, p63 und MDM2**

Christian Klein

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber
	2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
	3. apl. Prof. Dr. G.-B. Kresse
	Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 24.04.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 11.06.2002 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1998 bis Januar 2002 unter Anleitung von Frau Dr. S. Hansen in der Abteilung Molekularbiologie der Pharmaforschung der Roche Diagnostics GmbH in Penzberg und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried angefertigt.

für Delphine und meine Eltern

DANKSAGUNGEN

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Huber (MPI für Biochemie) für die Möglichkeit zur Durchführung der Promotion und für die große Freiheit bei ihrer Anfertigung. Herrn Prof. Dr. J. Buchner (TU München) und Herrn Prof. Dr. G.-B. Kresse danke ich herzlich für ihre Bereitschaft Gutachten für diese Arbeit zu erstellen.

Mein spezieller Dank gilt Frau Dr. S. Hansen, die diese Arbeit erst ermöglichte, für ihre Diskussionsbereitschaft, die Freiheit bei der Bearbeitung der Thematik und die große Unterstützung. Frau K. Bauer und R.-M. Busl-Schuller danke ich herzlichst für ihre stetige Unterstützung. Herrn Dr. M. Schwaiger danke ich für die gemeinsamen NMR-spektroskopischen Arbeiten. Für die Zusammenarbeit im Rahmen der NMR-Messungen sowie für die Erstellung des p53-DNA-Modells danke ich Herrn Dr. T. Diercks und E. Planker (Novaspin Biotech GmbH) sowie Herrn Prof. Dr. M. Kessler (TU München). Herrn Dr. G. Georges danke ich für die Erstellung des Homologiemodells der p63 DBD. Herrn Dr. K.-P. Künkele danke ich herzlichst für die gemeinsamen FCS-Messungen und ungezählte Diskussionen. Bei Frau C. Breitenlechner sowie Herrn Dr. R. Engh und Dr. S. Palme bedanke ich mich für die intensive Einführung und Hilfe bei der Röntgen-Kristallographie sowie unzählige Diskussionen. Herrn M. Kreuzler danke ich für seine Diplomarbeit: "Charakterisierung des p53 Homologen p73", den Praktikanten Frau K. Düvell, P. Jäckel und Herrn C. Charvet sowie J. Teixeira für die zellbiologischen Arbeiten im Feld der Tat-vermittelten Proteintransduktion. Frau Dr. F. Hesse und Herrn Dr. G. Achhammer, Dr. E. Kopetzki, Dr. K. Lang und Dr. K. Kaluza sei herzlichst für die dauernde Diskussionsbereitschaft und vielfältige Anregungen gedankt. Herrn Dr. H. Brandstetter, Dr. U. Jacob, J. Kluge (MPI für Biochemie), Dr. W. Schäfer und Dr. W. von der Saal sei für Hilfestellungen; Dr. P. Dunten (Roche Nutley) für die Zusammenarbeit gedankt. Herrn Prof. Dr. J. Buchner, Dr. S. Bell, L. Müller und K. Richter (TU München) sowie Dr. T. Holak, M. Brüggert und Dr. N. Budisa (MPI für Biochemie) sowie Frau A. Kühlewein, Herrn G. Gemmecker und A. Dehner (TU München) sei für die Kooperation gedankt. Frau Dr. A. Stern, Dr. B. Kaluza, Dr. D. Ambrosius und Herrn Prof. Dr. G.-B. Kresse danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit. Den Mitgliedern des p53 Projektteams, den Mitarbeitern der Abteilungen Molekularbiologie und Proteinchemie sowie den Mitgliedern der Abteilung Strukturforschung sei für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche und produktive Arbeitsatmosphäre gedankt. Herrn C. Schantz danke ich für die Durchführung von Fermentationen, Frau Dr. P. Rüger und U. Jucknischke für Biacore-Messungen. Herrn Dr. M. Lanzendörfer, Dr. A. Grossmann und Dr. A. Papadimitriou sei für die Bereitstellung von Geräten gedankt. Frau E. Liebig, Herrn H. Rabenseifner, D. Sonnenstuhl, L. Perras und G. Saalfrank danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, Herrn A. Gärtner für die Durchführung der Massenspektroskopie. Herrn Dr. O. Mundigl danke ich für Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie, Herrn Dr. C. Seidel und Herrn Dr. A. Escherich für die Peptidsynthese sowie Herrn Dr. S. Klostermann und allen Mitarbeitern von TR-I für Hilfe bei Fragen der Informatik. Herrn Dr. A. Brinker, Dr. H. Sondermann sowie Frau Dr. M. Hayer-Hartl (MPI für Biochemie) danke ich für ungezählte Diskussionen und die Möglichkeit, Geräte der Abt. Zelluläre Biochemie zu benutzen. Ein Dankeschön gilt auch meinen Mitdoktoranden: D. Demuth, K. Dettmar, N. Euer, V. Evtimova, B. Gansneder, Dr. T. Hövel, Dr. T. Gutjahr, Dr. A. Haussmann, Dr. T. Hildebrandt, M. Hirt, J. Kenklies, S. Krauss, R. de Lange, T. Ligensa, S. Lösch, R. Macek, J. Preiherr (†), T. Schneider, M. Schräml, Dr. K. Sichler, N. Tarbé, M. Weber und Dr. B. Zehenter.

VERÖFFENTLICHUNGEN UND PRÄSENTATIONEN

Im Verlauf dieser Arbeit entstanden die folgenden Publikationen und Präsentationen:

In Vorbereitung:

- N.N. Crystal structure of phage-derived and high affinity peptides in complex with the p53-binding domain of the MDM2 oncoprotein.
- Klein, C. & Hansen, S. Refolding, purification and comparative characterization of the p53 core domain.
- Brüggert, M., Klein, C., Hansen, S., Holak, T. & Schleicher, M. Binding of p53 to F-actin.

Publikationen aus der Dissertation:

- Bell, S.*, Klein, C.*, Müller, L., Hansen, S. & Buchner, J. p53 contains large unstructured regions in its native state, zur Publikation eingereicht. * beide Autoren trugen gleichberechtigt bei.
- Klein, C., Planker, E., Diercks, T., Kessler, H., Künkele, K.-P., Lang, K., Hansen, S. & Schwaiger, M. NMR spectroscopy reveals the solution dimerization interface of p53 core domains bound to their Consensus DNA. *J Biol Chem* 276, 49020-49027. (2001).
- Klein, C., Georges, G., Künkele, K.-P., Huber, R., Engh, R. A. & Hansen, S. High thermostability and lack of cooperative DNA binding distinguish the p63 core domain from the homologous tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 276, 37390-37401. (2001).
- Stoll, R., Renner, C., Hansen, S., Palme, S., Klein, C., Belling, A., Zeslawski, W., Kamionka, M., Rehm, T., Mühlhahn, P., Schumacher, R., Hesse, F., Kaluza, B., Voelter, W., Engh, R. A. & Holak, T. Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53. *Biochemistry* 40, 336-344. (2001).

Poster:

- Application of Tat-mediated peptide transduction to dissect the p53 pathway. Klein, C., Düvell, K., Charvet, C., Busl-Schuller, R.-M., Bauer, K., Seidel, C. & Hansen, S. Poster, 5. German Peptide Symposium, Bielefeld, Deutschland, 11.-14. März, 2001.

- Biochemical and structural studies on the basis of p53 regulation. Klein, C., Schwaiger, M., Künkele, K.-P., Hesse, F., Lang, K. & Hansen, S. Poster, 8th Roche International Biostructures Symposium, Tutzing, Deutschland, 10.-14. September, 2000.
- NMR spectroscopy reveals the solution dimerization interface of p53 core domains bound to their Consensus DNA. Klein, C., Planker, E., Diercks, T., Kessler, H., Künkele, K.-P., Lang, K., Hansen, S. & Schwaiger, M. Poster, 27th Annual Conference on Protein Structure and Function, Lorne, Australien, 10.-14. Februar, 2002.
- Folding and stability of p53, a protein associated with molecular chaperones. Müller, L., Bell, S., Klein, C., Buchner, J. Poster, Cold Spring Harbor Meeting on "Molecular Chaperones & The Heat Shock Response", Cold Spring Harbor, USA, 1.-5. Mai, 2002.
- High thermostability and lack of cooperative DNA binding distinguish the p63 DNA binding domain from the homologous p53 DNA binding domain. Klein, C., Georges, G., Künkele, K.-P., Huber, R., Engh, R. A. & Hansen, S. Poster, 11th International p53 Workshop, Barcelona, Spanien, 15.-18. Mai, 2002.
- NMR spectroscopy reveals the solution dimerization interface of p53 DNA binding domains bound to their consensus DNA. Klein, C., Planker, E., Diercks, T., Kessler, H., Künkele, K.-P., Lang, K., Hansen, S. & Schwaiger, M. Poster, 11th International p53 Workshop, Barcelona, Spanien, 15.-18. Mai, 2002.

Publikationen aus der Diplomarbeit:

- Lischke, A., Klein, C., Stierhof, Y.-D., Hempel, M., Mehlert, A., Almeida, I. C., Ferguson, M. A. J. & Overath, P. Isolation and characterization of glycosylphosphatidylinositol-anchored, mucin-like surface glycoproteins from bloodstream forms of the freshwater-fish parasite *Trypanosoma carassii*. *Biochem J* 345 Pt 3, 693-700. (2000).
- Klein, C., Göpfert, U., Goehring, N., Stierhof, Y. D. & Ilg, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Identification, purification, structural and ultrastructural characterization of the secreted promastigote proteophosphoglycan pPPG2, a stage-specific glycoisoform of amastigote aPPG. *Biochem J* 344 Pt 3, 775-786. (1999).
- Göpfert, U., Goehring, N., Klein, C. & Ilg, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania mexicana*. Molecular cloning and characterization of the *Leishmania mexicana* ppg2 gene encoding the proteophosphoglycans aPPG and pPPG2 that are secreted by amastigotes and promastigotes. *Biochem J* 344 Pt 3, 787-795. (1999).

INHALTSVERZEICHNIS

1	ABKÜRZUNGEN	1
2	ZUSAMMENFASSUNG	5
3	EINLEITUNG	7
3.1	<i>BIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON P53</i>	7
3.2	<i>P53 HOMOLOGE</i>	10
3.3	<i>DOMÄNENSTRUKTUR VON P53 UND P53 HOMOLOGEN</i>	11
3.4	<i>REGULATION VON P53 DURCH MDM2</i>	15
3.5	<i>REGULATION VON P53</i>	17
3.6	<i>REGULATION DER P53 DNA-BINDUNG</i>	18
3.7	<i>P53 IN DER TUMORTHERAPIE</i>	20
3.8	<i>RÖNTGENKRISTALLOGRAPHIE</i>	22
3.9	<i>ZIELE UND INHALTE</i>	26
4	MATERIAL UND METHODEN	28
4.1	MATERIAL	28
	Geräte	28
	Chemikalien und Reagenzien	29
	(Verbrauchs-) Materialien	31
	Enzyme, Proteine und Antikörper	32
	DNA-Oligonukleotide	33
	Plasmide	34
	Peptide	35
	Bakterienstämme	36
	Zelllinien	36
	Kulturmedien	36
	Puffer und Lösungen	37
4.2	METHODEN	38
	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	38
	Kultivierung und Konservierung von E. coli Stämmen	38
	Konzentrationsbestimmung von DNA	38
	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
	Restriktionsanalyse	39
	Agarose-Gelelektrophorese	39
	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	39
	Ligation	39
	Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen	39
	Transformation von E. coli	40
	Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli	40
	Sequenzierung	40
	Expressionsanalyse	41
	Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden	41
	Klonierung der p63 DBD	41
	<i>Zellbiologische Methoden</i>	42
	Kultivierung von Zellen	42
	Fluoreszenzmikroskopie - Tat-vermittelte Peptidtransduktion	42
	p53 Luziferase-Reporter-Gen-Test - Tat-vermittelte Peptidtransduktion	42
	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	43
	Reinigung von Inclusion Bodies	43
	Expression, In-Vitro-Faltung und Reinigung der p53 DBD	43
	Expression, In-Vitro-Faltung und Reinigung der p53 DBD für NMR-Spektroskopie	44
	Lösliche Expression und Reinigung der p53 DBD	44
	Expression und Reinigung der p63 DBD	45
	Expression und Reinigung der p63 DBD für NMR-Spektroskopie	45
	Expression und Reinigung der GST-p53 DBD und GST-p63 DBD Fusionsproteine	46
	Expression, In-Vitro-Faltung und Reinigung von p53C312	46
	Reinigung von f.l. p53 Konstrukten	47
	In-Vitro-Faltung und Reinigung von hXDM2 LHI (21-105)	47

<i>Analytische und biophysikalische Methoden</i>	49
Proteinbestimmung	49
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
Native Gelelektrophorese.....	49
Immunoblot.....	49
Analytische Gelfiltration.....	50
Massenspektroskopie	50
Dynamische Lichtstreuung (DLS)	50
UV- und Fluoreszenz-Spektroskopie	50
CD-Spektroskopie.....	51
Gleichgewichtsentfaltung.....	51
Differential Scanning Kalorimetrie (DSC).....	52
Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	52
DNA-Bindungstest (EMSA)	53
Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	53
<i>Strukturanalyse von Proteinen</i>	55
Kristallisation von Proteinen.....	55
Röntgenstrukturanalyse von Proteinen.....	55
NMR-Spektroskopie	56
Molecular Modelling	57
5 ERGEBNISSE	58
5.1 UNTERSUCHUNGEN AN DER P53 DNA-BINDUNGS- DOMÄNE	58
<i>Expression, In-Vitro-Faltung und Reinigung der p53 DBD</i>	58
<i>Expression, In-Vitro-Faltung und Reinigung der p53 DBD für NMR-Spektroskopie</i>	65
<i>Kristallisation der p53 DBD</i>	67
<i>Biochemische Charakterisierung der p53 DBD</i>	69
<i>Die p53 DBD im Kontext des tetrameren p53 Gesamtproteins</i>	72
5.2 DAS ALLOSTERISCHE MODELL DER P53 AKTIVIERUNG	81
<i>Aktivierung von p53 durch Tat-C-terminale Peptide</i>	81
<i>Aktivierung der latenten DNA-Bindung von p53</i>	85
<i>Die postulierte Interaktion zwischen der p53 DBD und CTRD</i>	89
5.3 EXPERIMENTELLE AUFKLÄRUNG DER P53 DIMERISIERUNGS-KONTAKTFLÄCHE	91
<i>NMR-spektroskopische Untersuchungen der p53 DBD-DNA-Bindung</i>	91
<i>Aufklärung der p53 Dimerisierungs-Kontaktfläche</i>	96
5.4 VERGLEICH DER P63 DBD MIT DER HOMOLOGEN P53 DBD	101
<i>Klonierung, Expression und Reinigung (einer neuen Isoform) der p63 DBD</i>	101
<i>DNA-Bindungsaktivität und Spezifität der p63 DBD</i>	105
<i>Spektroskopie der p63 DBD</i>	109
<i>Erhöhte thermodynamische Stabilität der p63 DBD - Thermostabilität</i>	111
<i>Sequenz-basierter Vergleich der p63 und p53 DBDs</i>	114
<i>NMR-spektroskopische Untersuchungen der p63 DBD</i>	115
5.5 RÖNTGENSTRUKTURANALYSE DER N-TERMINALEN DOMÄNE VON HXDM2 IM KOMPLEX MIT EINEM HOCHAFFINEN P53 PEPTIDANTAGONISTEN	118
<i>Biophysikalische Analyse der MDM2 Peptidbindung</i>	118
<i>Kristallisation</i>	122
<i>Datensammlung</i>	122
<i>Modellbau und Verfeinerung</i>	124
<i>Strukturbeschreibung</i>	125
6 DISKUSSION	133
6.1 UNTERSUCHUNGEN AN DER P53 DNA-BINDUNGS- DOMÄNE	133
6.2 DAS ALLOSTERISCHE MODELL DER P53 AKTIVIERUNG	141
6.3.1 DIE P53 DBD DIMERISIERUNGS-KONTAKTFLÄCHE	146
6.3.2 EIN SANDWICH-ARTIGES MODELL DES P53-DNA-KOMPLEXES?	154
6.4 VERGLEICH DER P63 DBD MIT DER HOMOLOGEN P53 DBD	159
6.5 STRUKTUR DES ONKOPROTEINS HXDM2 IM KOMPLEX MIT EINEM HOCHAFFINEN P53 PEPTIDANTAGONISTEN	167
6.6 AUSBLICK	176
7 LITERATUR	177

1 ABKÜRZUNGEN

53BP1	p53 Bindeprotein 1
53BP2	p53 Bindeprotein 2
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
Å	Angström (10^{-10} m)
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AIS	<i>engl.</i> : Amplified In Squamous Cell Carcinoma (Bezeichnung für p63)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	<i>engl.</i> : Alternative Reading Frame
AS	Aminosäure
ATCC	<i>engl.</i> : American Type Culture Collection
ATM	<i>engl.</i> : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	<i>engl.</i> : Ataxia Telangiectasia Related
AUC	<i>engl.</i> : Analytical Ultracentrifugation
bp	Basenpaare
BLAST	<i>engl.</i> : Basic Local Alignment Search Tool
Bq	Bequerel
BSA	<i>engl.</i> : Bovine Serum Albumine
CD	Circular Dichroismus
CDK	<i>engl.</i> : Cyclin-Dependent Kinase
CFTR	<i>engl.</i> : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
Cp	Absolute Polydispersität
cDNA	<i>engl.</i> : <i>complementary</i> DNA
CON1x5	Consensus-1x5 (pentameres p53 Consensus-DNA-Oligonukleotid)
CON2x5	Consensus-2x5 (dekameres p53 Consensus-DNA-Oligonukleotid)
CON4x5	Consensus-4x5 (duodekameres p53 Consensus-DNA-Oligonukleotid)
CSD	<i>engl.</i> : Cambridge Structural Database
CTD	C-terminale Domäne
C-terminal	Carboxyterminal
CTRD	C-terminale regulatorische Domäne
D ₂ O	Deuteriumoxid („schweres Wasser“)
Da	Dalton
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DLS	<i>engl.</i> : Dynamic Light Scattering
DMEM	<i>engl.</i> : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.</i> : Desoxyribonucleic Acid
dNTP	<i>engl.</i> : Didesoxynucleotidtriphosphate
DSC	<i>engl.</i> : Differential Scanning Calorimetry
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
ε	Molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	<i>engl.</i> : Electrospray Ionisation
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EEC	<i>engl.</i> : Ectodermal Dysplasia, Ectrodactaly and Cleft Palate
EG	Ethylenglycol
ELISA	<i>engl.</i> : Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
EMSA	<i>engl.</i> : Electrophoretic Mobility Shift Assay
f	Femto
FCS	<i>engl.</i> : Fluorescence Correlation Spectroscopy
FGF	<i>engl.</i> : Fibroblast Growth Factor
FKS	Fötales Kälberserum
f.l.	<i>engl.</i> : full-length
FPLC	<i>engl.</i> : Fast Protein Liquid Chromatography
FRET	<i>engl.</i> : Fluorescence Resonance Energy Transfer

g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ⁻²)
GdnCl	Guanidiniumhydrochlorid
GST	Glutathion-S-transferase
h	<i>engl.</i> : hour
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HDM2	Humanes MDM2 Onkoprotein
HEPES	Hydroxyethylpiperazinoethansulfonsäure
HPLC	<i>engl.</i> : High Performance Liquid Chromatography
HPV	Humaner Papillomavirus
HSQC	<i>engl.</i> : Homonuclear Single Quantum Correlation
HTRF	<i>engl.</i> : Homogeneous Time-Resolved Fluorescence
hXDM2	Humanisiertes <i>Xenopus laevis</i> MDM2 Onkoprotein
IB	<i>engl.</i> : Inclusion Bodies
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration bei 50% Inhibition
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ITC	<i>engl.</i> : Isothermal Titration Calorimetry
k	Kilo
K _D	(Apparente) Dissoziationskonstante
KET	<i>engl.</i> : Keratinocyte Transcription Factor (Bezeichnung für p63)
kb	Kilobasen
KP	Kaliumphosphat
L	Liter
LB	Luria Bertani
LFS	Li-Fraumeni Syndrom
m	Milli
M	Molar (mol/L)
M	Mega
μ	Mikro
MCS	<i>engl.</i> : Multiple Cloning Site
MDM2	<i>engl.</i> : Mouse Double Minute, murines Onkoprotein
min	Minute
MG	Molekulargewicht
mRNA	<i>engl.</i> : messenger RNA
MS	Massenspektroskopie
mt	mutant
MTS	<i>engl.</i> : Membrane Translocating Sequence
n	Nano
NLS	<i>engl.</i> : Nuclear Localization Signal
NMR	<i>engl.</i> : Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	<i>engl.</i> : Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
NTD	N-terminale Domäne
N-terminal	Aminoterminal
NVP	„Novartis Peptid“
OD ₅₉₅	Optische Dichte bei 595 nm
p40	Bezeichnung für p63
p51	Bezeichnung für p63
p53	(Humanes) Tumorsuppressorprotein p53
p63	(Humanes) p63 (p53 homologes Protein)
p73	(Humanes) p73 (p53 homologes Protein)
p73L	Bezeichnung für p63
p.A.	pro Analysis
PAb	<i>engl.</i> : p53 Antibody, monoklonal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pBS	<i>engl.</i> : pBluescript
PBS	<i>engl.</i> : Phosphate Buffered Saline
PCR	<i>engl.</i> : Polymerase Chain Reaction
PDB	<i>engl.</i> : Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol

PG	<i>engl.</i> : Polygrip (p53 spezifisches DNA-Oligonukleotid)
pH	pH-Wert
pI	Isoelektrischer Punkt
PP	Pyrophosphat
PTD	<i>engl.</i> : Protein Transduction Domain
Rb	<i>engl.</i> : Retinoblastoma Protein
Rh	Hydrodynamischer Radius
RNA	<i>engl.</i> : Ribonucleic Acid
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur (20°C-25°C)
s	Sekunde
RP	<i>engl.</i> : Reversed Phase
SAM	<i>engl.</i> : Sterile Alpha Motif
SAR	<i>engl.</i> : Structure-activity relationship
SH3	<i>engl.</i> : src Homology Domain 3
SDS	<i>engl.</i> : Sodiumdodecylsulfate
SPR	<i>engl.</i> : Surface Plasmon Resonance
src	<i>engl.</i> : Sarcoma
ssDNA	Einzelsträngige DNA
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	TRIS/Acetate/EDTA-Puffer
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TBE	TRIS/Borat/EDTA-Puffer
TD	Tetramerisierungsdomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TG	TRIS/Glycin-Puffer
TL	<i>engl.</i> : Toothless (unspezifisches DNA-Oligonukleotid)
T _m	Schmelzpunkt
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
TRF	<i>engl.</i> : Time-Resolved Fluorescence
TRIS	TRISHydroxymethylaminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
TROSY	<i>engl.</i> : Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
Θ _{MRW}	Molare Elliptizität (bezogen auf die Anzahl der Aminosäuren)
U	<i>engl.</i> : Units (Enzymaktivität)
UPM	Umdrehungen Pro Minute
UV	Ultraviolett
[U-]-	<i>engl.</i> : Uniformly
[U- ¹⁵ N]	Einheitlich ¹⁵ N-markiert
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vis	<i>engl.</i> : Visible
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
XDM2	<i>Xenopus laevis</i> MDM2 Onkoprotein

2 ZUSAMMENFASSUNG

Das p53 Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der als der wichtigste Tumorsuppressor in Säugern fungiert und die Expression einer Reihe von Genen reguliert, die eine wichtige Rolle im Zellzyklus, bei der Anti-Angiogenese, bei der Apoptose-Induktion und der Seneszenz spielen. Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Verhinderung der Tumorentstehung ist p53 in mehr als 50% aller humanen Tumoren mutiert. Die meisten dieser Mutationen sind in der zentralen p53 DNA-Bindungsdomäne zu finden. Die Kristallstruktur der p53 DNA-Bindungsdomäne im Komplex mit einer Consensus-DNA zeigte, wie die DNA-Bindungsdomäne spezifisch mit DNA interagiert und wie diese Interaktion durch Mutationen inaktiviert werden kann. Für den vollständigen Komplex aus tetramerem p53 und DNA sowie für seine Regulation existiert jedoch bisher trotz vielfältiger Bemühungen keine strukturelle Information.

Zu Beginn dieser Arbeit stellte das allosterische Modell, das eine Interaktion der C-terminalen Domäne mit der DNA-Bindungsdomäne postuliert, das akzeptierte Modell der Regulation der DNA-Bindung von p53 dar. Ursprünglich sollte daher der molekulare Mechanismus der p53 Regulation durch die C-terminale Domäne aufgeklärt werden. Zwar wurde in DNA-Bindungstests sowie im zellulären Kontext durch Tat-vermittelte Peptidtransduktion bestätigt, daß C-terminale p53 Peptide die spezifische DNA-Bindung von p53 aktivieren, allerdings wurde im Verlauf der Untersuchungen deutlich, daß das allosterische Modell der p53 Aktivierung nicht zutreffend ist. Vielmehr unterstützen die hier vorliegenden Ergebnisse alternative Modelle der p53 Regulation, die auf einer Interaktion der C-terminalen Domäne mit unspezifischer DNA beruhen und keine konformationellen Veränderungen bei DNA-Bindung voraussetzen.

Für biochemische und strukturelle Untersuchungen wurde ein effizientes System zur *In-Vitro*-Faltung und Reinigung der p53 DNA-Bindungsdomäne etabliert. Die biophysikalische Analyse der *in vitro* gefalteten p53 DNA-Bindungsdomäne zeigte, daß sie strukturell und konformationell mit der aus der löslichen Fraktion gereinigten DNA-Bindungsdomäne übereinstimmt. Eine weitergehende Untersuchung der Struktur und Funktion von verkürzten p53 Konstrukten im Vergleich zu tetramerem p53 zeigte, daß alle Fragmente funktionelle Einheiten bilden. Im Vergleich zur monomeren DNA-Bindungsdomäne (AS 94-312) und p53C312 (1-312) sind tetrameres p53 (1-393) und N93p53 (94-393) jedoch deutlich thermodynamisch und funktionell destabilisiert. Durch CD-Spektroskopie und Dekonvolution der Spektren konnte gezeigt werden, daß tetrameres p53 große unstrukturierte Bereiche enthält. p53 setzt sich vermutlich als modular aufgebautes Protein aus strukturierten und großen unstrukturierten Bereichen zusammen. p53 kann daher in die wachsende Klasse von intrinsisch ungefalteten nativen Proteinen eingeordnet werden. Das Fehlen einer definierten rigiden Struktur zusammen mit der geringen Stabilität stellt vermutlich eine Voraussetzung für die hohe funktionelle Flexibilität des p53 Proteins sowie die Interaktion mit einer Vielzahl von Proteinen dar.

Mithilfe der NMR-Spektroskopie wurden verschiedene Fragestellungen untersucht, die die Regulation und DNA-Bindung der p53 DNA-Bindungsdomäne betreffen. Unter Verwendung einer ¹⁵N-markierten p53 DNA-Bindungsdomäne im Komplex mit Consensus-DNA konnten durch NMR-spektroskopische Untersuchungen erstmals experimentelle Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie zwei p53 DNA-Bindungsdomänen bei der kooperativen Bindung an eine verkürzte Consensus-DNA-Bindungsstelle in Lösung dimerisieren. Die NMR-Daten zeigten

zum einen, daß die p53 DNA-Bindungsdomäne während der DNA-Bindung keinen größeren konformationellen Änderungen unterworfen ist, und ermöglichten zum anderen die Lokalisation der Dimerisierungs-Kontaktfläche zwischen den beiden p53 DNA-Bindungsdomänen in der H1 Helix. Basierend auf den NMR-Daten konnte ein schlüssiges Modell des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes erstellt werden. Dieses läßt die Schlußfolgerung zu, daß die identifizierte Dimerisierungs-Kontaktfläche auch die tatsächliche Kontaktfläche im tetrameren p53-DNA-Komplex darstellt. Die Bedeutung dieser Kontaktfläche wird ferner von der Beobachtung gestützt, daß zum einen die H1 Helix häufig von inaktivierenden Mutationen betroffen ist und daß zum anderen der mutmaßliche p53 Inhibitor 53BP2 über einen seiner *ankyrin repeats* diese für die DNA-Bindung essentielle Region blockiert. Auf der Grundlage von Symmetrie-Überlegungen wird schließlich diskutiert, daß tetrameres p53 potentiell räumlich getrennte und nicht aufeinander folgende Consensus-Bindungsstellen im Promoterbereich von p53-Zielgenen in einer "Sandwich"-artigen Weise verknüpfen und so DNA-Schleifen erzeugen könnte, wie sie durch Elektronenmikroskopie bei transkriptionell aktiven p53 Komplexen beobachtet wurden.

Durch die Entdeckung der p53 Homologen p63 und p73 und ihrer Isoformen wurde eine Familie von p53 Proteinen definiert, die unterschiedliche Funktionen in der Entwicklung, Differenzierung und Tumorsuppression haben. In dieser Arbeit wurde die p63 DNA-Bindungsdomäne, die ca. 60% Homologie zu p53 aufweist, zum ersten Mal biochemisch und biophysikalisch charakterisiert. Dabei wurde eine neue humane Isoform von p63 identifiziert, die vorläufig als p63- δ bezeichnet wurde. Der biochemische und biophysikalische Vergleich mit der p53 DNA-Bindungsdomäne ergab überraschende Unterschiede. Im Gegensatz zu p53, bindet die isolierte monomere p63 DNA-Bindungsdomäne nicht spezifisch an p53 Consensus-DNA-Bindungsstellen, wogegen beide DNA-Bindungsdomänen als GST-Fusionsprotein, und daher als artifizielle Dimere vorliegend, mit vergleichbarer Affinität und Spezifität an die p53 Consensus-DNA-Bindungsstellen in den Genen *p21*, *gadd45*, *cyclin G* und *bax* binden. Außerdem wurde durch Kalorimetrie ($T_m=61^\circ\text{C}$ für p53 versus 44°C für p63) und Gleichgewichts-Entfaltung ($[\text{Urea}]_{50\%}=5.2\text{ M}$ versus 3.1 M) gezeigt, daß die Faltung der p63 DNA-Bindungsdomäne im Vergleich zu p53 bemerkenswert stabil ist. Eine Analyse des Sequenz-Alignments der p53 und p63 DNA-Bindungsdomänen hebt vor allem Unterschiede um ein Segment nahe der H1 Helix hervor, welche die durch NMR-Spektroskopie identifizierte Dimerisierungs-Kontaktfläche in der p53 DNA-Bindungsdomäne ausbildet. Dieser Unterschied ist vermutlich die Ursache für die stark verminderte DNA-Bindungs Kooperativität der p63 DNA-Bindungsdomäne. Ein hier vorgestelltes Sequenz-basiertes Homologie-Modell der p63 DNA-Bindungsdomäne zeigt Ansatzpunkte zur Erklärung der fehlenden Kooperativität und möglicherweise auch der erhöhten Faltungsstabilität.

Eine Reihe von Publikationen hat gezeigt, daß die Inhibition der p53-HDM2-Interaktion eine Möglichkeit zur pharmakologischen Intervention bei einer Reihe von p53 wildtyp Tumoren darstellt. In dieser Arbeit wurde humanisiertes XDM2 Protein aus *Xenopus laevis*, das über eine humanisierte p53 Bindungsstelle verfügt, im Komplex mit einem hochaffinen, künstlichen Peptidantagonisten kristallisiert. Die bis 2.0 \AA aufgelöste Kristallstruktur des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes ermöglicht einen Einblick in den Bindungsmodus eines hochaffinen HDM2-Antagonisten und könnte zusammen mit der bekannten Struktur des HDM2-p53-Peptidkomplexes einen Ausgangspunkt für das strukturbasierte rationale Design von niedermolekularen Inhibitoren der p53-HDM2-Interaktion bilden.

3 EINLEITUNG

3.1 Biologische Funktionen von p53

Tumorerkrankungen im Menschen sind vereinfacht betrachtet auf ein gestörtes Gleichgewicht zwischen **Proliferation und Apoptose** zurückzuführen (Evan und Vousden, 2001; Green und Evan, 2002; Lowe und Lin, 2000; Malumbres und Barbacid, 2001). Die molekularen Mechanismen, die zu einer Tumorigenese führen, sind jedoch auf eine große Vielfalt von Ursachen zurückzuführen, deren Zusammenspiel erst jetzt nach mehr als 25 Jahren Forschung langsam molekular verstanden wird (Futreal *et al.*, 2001; Hanahan und Weinberg, 2000; Serrano und Massague, 2000; Wagener, 1999). Aufgrund der Häufigkeit von Tumorerkrankungen und ihrer Vielfalt sowie der Probleme in der Tumorthherapie stellt die Entwicklung neuartiger zielgerichteter Therapiekonzepte für die Onkologie ein wichtige medizinische Notwendigkeit dar (Abbott, 2002; Brooks und La Thangue, 1999; Gibbs, 2000; Workman und Kaye, 2002). Die kürzlich erfolgte Zulassung spezifischer Tumortherapeutika wie Herceptin und STI571 (Bange *et al.*, 2001; Druker, 2002; Sawyers, 2002) läßt hoffen, daß p53 als wichtigster Tumorsuppressor in der Zukunft ebenfalls einen bedeutenden Ansatzpunkt in der Krebstherapie darstellen wird (Fahraeus *et al.*, 1999; Hansen und Kaluza, 1999).

Mehr als 21500 Publikationen mit Bezug zu p53 (Stand März 2002) machen deutlich, daß das **p53** wohl das weltweit am intensivsten untersuchte Protein seit seiner Entdeckung im Jahr 1979 ist (Chang *et al.*, 1979; Kress *et al.*, 1979; Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979; Montano, 2001a). Trotz des Wissens über das p53 Netzwerk bestehen noch große Lücken im Verständnis der p53 Funktion. Daher kann in dieser Einleitung nur ein sehr grober Überblick über die Funktion, Regulation und Struktur von p53, seinen Homologen p63 und p73 sowie über seinen funktionellen Antagonisten MDM2 gegeben werden. Nachdem ursprünglich angenommen wurde, daß es sich bei *p53* um ein Onkogen handelt, wurde in den folgenden Jahren klar, daß die ursprünglich isolierte Form eine dominant-negative Mutation aufweist, und *p53* vielmehr ein **Tumorsuppressorgen** ist (Lane und Benchimol, 1990; May und May, 1999). Die zentrale Rolle bei der Verhinderung der Tumorigenese wird mit den Schlagworten von p53 als Hüter des Genoms (*guardian of the genome*) (Lane, 1992) bzw. als zellulärem Torwächter (*cellular gatekeeper*) (Levine, 1997) umschrieben. p53 ist das häufigste Ziel von genetischen Veränderungen, die in humanen Tumoren gefunden werden (Hainaut *et al.*, 1998). In mehr als 50% aller Tumoren ist p53 durch Mutationen inaktiviert (Hollstein *et al.*, 1999; Hollstein *et al.*, 1991; Soussi und Beroud, 2001). Keimbahn-Mutationen von p53 sind Ursache des Li-Fraumeni Syndroms (LFS), das durch eine stark erhöhte familiäre Tumorzinzidenz gekennzeichnet ist (Birch *et al.*, 2001; Chompret, 2002). In Tumoren, die keine p53 Mutation aufweisen, ist das p53 Netzwerk (Agarwal *et al.*, 1998) oft durch andere Mechanismen inaktiviert wie z.B. nukleärer Ausschluß (Neuroblastom), Interaktion mit viralen Proteinen wie E1B oder E6 (Cervixkarzinom), Überexpression von MDM2 (Sarkom) oder Inaktivierung von p14^{ARF}. p53 fungiert in erster Linie als Transkriptionsfaktor, der nach seiner Aktivierung durch zellulären Stress die Expression einer Vielzahl von Genen kontrolliert (El-Deiry, 1998) die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Induktion von Apoptose, sowie bei der Alterung von Zellen und bei der Anti-Angiogenese spielen und so vor einer Tumorigenese schützen (May und May, 1999; Vousden, 2000).

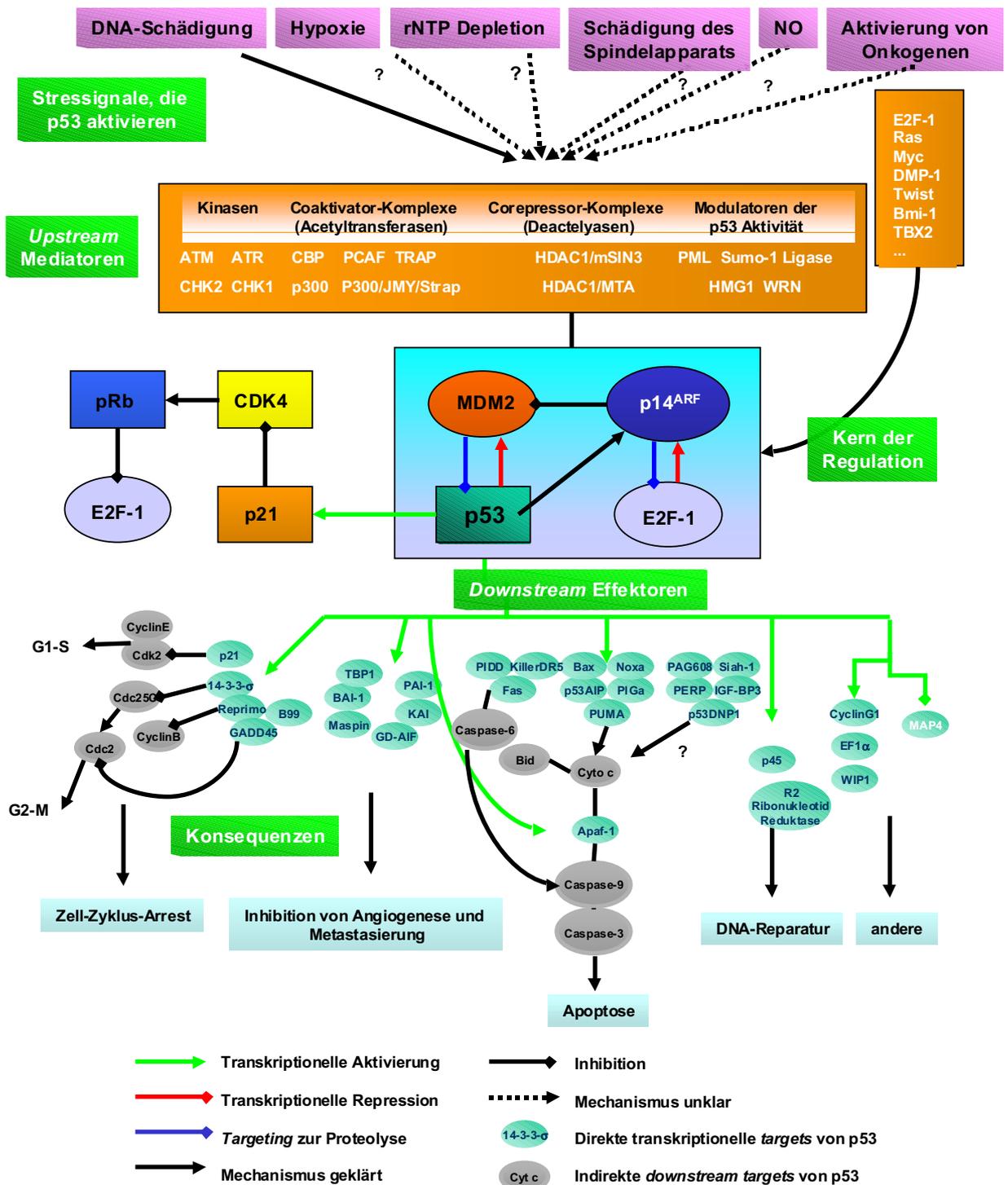


Abb. 3.1: Schematische und vereinfachte Übersicht über die Regulation und Funktion des p53 Tumorsuppressor-Netzwerks mit benachbarten Netzwerken und seinen wichtigsten Komponenten. Schema adaptiert aus (Jin und Levine, 2001).

Die Aktivierung von p53 erfolgt als Folge von zellulärem Stress, wie z.B. DNA-Schädigung oder Hypoxie, oder der Aktivierung von Onkogenen. Dabei können mindestens drei unabhängige Wege der p53 Aktivierung unterschieden werden: 1) DNA-Schädigung z.B. durch ionisierende Strahlung vermittelt durch die Kinasen ATM und Chk2, 2) Dysregulation von Wachstumssignalen als Folge der Expression

von Onkogenen wie Myc oder Ras vermittelt durch p14^{ARF} und 3) Zellulärer Stress durch Chemotherapeutika, UV-Bestrahlung und Proteinkinase-Inhibitoren vermittelt vermutlich durch die Kinasen Casein Kinase II und ATR (Vogelstein *et al.*, 2000). DNA-Schädigung ist einer der am besten untersuchten Wege bei der Induktion einer p53 Antwort (Lakin und Jackson, 1999; Wahl und Carr, 2001; Zhou und Elledge, 2000). Die Induktion erfolgt im allgemeinen über eine postrtranslationale **Phosphorylierungs- und Acetylierungskaskade** (Appella und Anderson, 2001; Banin *et al.*, 1998; Bartek *et al.*, 2001; Hirao *et al.*, 2000; Khanna *et al.*, 2001; Sakaguchi *et al.*, 1998). Als Folge der Aktivierung p53-regulierter Gene durch DNA-Schädigung geht eine Zelle nach einer DNA-Schädigung entweder in einen Zellzyklus-Arrest über, der die Reparatur der entstandenen Schäden ermöglicht, oder stirbt in einem regulierten Prozeß apoptotisch ab, wenn die Schäden irreparabel waren (Amundson *et al.*, 1998; Bates und Vousden, 1999; Yonish-Rouach, 1996). Die Anwendung der Microarray-Technologie ermöglichte es in den letzten Jahren, die dabei durch **p53-regulierten Gene** genomweit durch mRNA Profilierung parallel zu untersuchen (Kannan *et al.*, 2001a; Kannan *et al.*, 2001b; Song *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000). Diese und andere Ansätze führten zur Identifikation einer großen Anzahl von neuen, p53-kontrollierten Genen, die insbesondere eine Rolle bei der Induktion von Apoptose spielen und das bekannte Repertoire an p53-Zielgenen von *p21*, *gadd45*, *bax*, *cyclinG1*, *mdm2*, *KILLER/DR3*, *IGF-BP3*, *PIG3*, *14-3-3* (El-Deiry, 1998) entscheidend erweiterten: *NOXA* (Oda *et al.*, 2000a), *p53AIP* (Oda *et al.*, 2000b), *p53DINP1* (Okamura *et al.*, 2001), *PUMA* (Nakano und Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001) sowie eine p53 regulierte Ribonukleotid-Reduktase, die einer wichtige Rolle in der Antwort auf DNA-Schädigung hat (Tanaka *et al.*, 2000). Das p53 Tumorsuppressor-Netzwerk ist durch seine zentrale Rolle mit einer Reihe anderer Tumorsuppressoren wie dem p16-CyclinD₁-CDK4-Rb-E2F-Netzwerk (Bartek *et al.*, 1997; Hickman *et al.*, 2002; Serrano, 1997), β -Catenin (Damalas *et al.*, 1999; Damalas *et al.*, 2001), Pml (Salomoni und Pandolfi, 2002) oder PTEN (Stambolic *et al.*, 2001) verknüpft. Die genannten Funktionen übt p53 als Transkriptionsfaktor über seine an spezifische p53-Elemente bindende DNA-Bindungsdomäne aus. An dieser Stelle sollte jedoch auch erwähnt werden, daß p53 neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor eine Reihe von nicht-transkriptionellen Funktionen bei der Kontrolle der Apoptose und der Aufrechterhaltung der **Integrität des Genoms** ausübt (Albrechtsen *et al.*, 1999; Janus *et al.*, 1999; Liu und Kulesz-Martin, 2001). Für diese Funktionen ist neben der DNA-Bindungsdomäne die C-terminale Domäne von p53 verantwortlich, die eine unspezifische DNA-Bindungsaktivität aufweist (Foord *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1995) (Domänenstruktur siehe Kapitel 3.3) und in der Lage ist, unterschiedliche Topologien der DNA sowie DNA-Schäden und fehlgepaarte Basenpaare zu erkennen (Bakalkin *et al.*, 1995; Degtyareva *et al.*, 2001; Dudenhoffer *et al.*, 1999; Dudenhoffer *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999b; Lee *et al.*, 1997; Szak und Pietenpol, 1999). Trotz seiner wichtigen Funktionen ist p53 erstaunlicherweise nicht essentiell; so zeigen p53 defiziente Mäuse eine normale Embryonalentwicklung (Choi und Donehower, 1999), entwickeln allerdings sehr früh multiple Tumoren (Attardi und Jacks, 1999; Donehower *et al.*, 1992). Auch führt der Verlust von p53 zusammen mit einer Telomer-Dysregulation zur beschleunigten Entwicklung von Tumoren (Chin *et al.*, 1999). Eine neues Tiermodell mit Mäusen, die eine erhöhte p53 Aktivität aufweisen, macht aber gleichzeitig deutlich, daß der Preis für die Tumorsuppression durch p53 möglicherweise (verfrühte) **Seneszenz** ist (Ferbeyre und Lowe, 2002; Itahana *et al.*, 2001; Tyner *et al.*, 2002).

3.2 p53 Homologe

Neben humanem und murinem p53 stellt p53 aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* ein näher charakterisiertes Protein dar, das über ähnliche Mechanismen wie humanes p53 reguliert wird (Bessard *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 1994; Soussi *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1995a). Trotz seiner essentiellen Rolle in der Tumorsuppression bei höheren Organismen konnten aber erstaunlicherweise bis vor kurzem keine p53 Homologen in niederen multizellulären Organismen identifiziert werden. Mit der Entdeckung von p53 Homologen in *D. melanogaster* (Brodsky *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2000; Ollmann *et al.*, 2000) und *C. elegans* (CEP-1) (Derry *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 2001) wurde nun aber endgültig klargestellt, daß eine effiziente Tumorsuppression durch p53 schon für niedere Organismen absolut essentiell ist (Nordstrom und Abrams, 2000). In den vorangehenden Jahren wurden zudem zwei zu p53 homologe Gene identifiziert (Kaelin, 1999; Levrero *et al.*, 2000; Lohrum und Vousden, 2000; Oren, 1997; Strano *et al.*, 2001; Yang und McKeon, 2000): **p63** (auch als KET, p51, p40, AIS und p73L bezeichnet) (Hibi *et al.*, 2000; Osada *et al.*, 1998; Schmale und Bamberger, 1997; Senoo *et al.*, 1998; Trink *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998) und **p73** (Jost *et al.*, 1997; Kaghad *et al.*, 1997). Im Unterschied zu p53 existieren von p63 und p73 eine ganze Reihe verschiedener Isoformen und Splicevarianten. Mehrere Studien zeigten, daß bestimmte Isoformen von p63 und p73 an p53-abhängige Elemente binden, p53-abhängige Zielgene aktivieren und nach Überexpression oder DNA-Schädigung über Mechanismen, die sich von p53 unterscheiden, Apoptose einleiten können (Costanzo *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2002; Jost *et al.*, 1997; Kaghad *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998). Diese strukturelle und funktionelle Homologie erlaubte es, eine neue **Superfamilie von Transkriptionsfaktoren** zu definieren, in denen *p63* ein evolutionäres Vorläufergen der phylogenetisch jüngeren *p53* und *p73* Gene zu sein scheint (De Laurenzi und Melino, 2000; Yang *et al.*, 2002). Die Gene, die von den Mitgliedern der p53 Familie kontrolliert werden, unterscheiden sich allerdings (Yu *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1998); auch scheinen p63 und p73 nicht auf dieselben Stimuli nach genotoxischen DNA Schäden hin aktiviert zu werden (Kaghad *et al.*, 1997). Die p53 Homologen haben grundlegende Funktionen im Zusammenhang mit Entwicklung und Differenzierung (Irwin und Kaelin, 2001), wie in zellulären Modellsystemen (Almog und Rotter, 1998; Mills *et al.*, 1999; Schmale und Bamberger, 1997; Yang *et al.*, 1998) und mit den entsprechenden Gen-Knockout Mäusen gezeigt wurde (Celli *et al.*, 1999; Donehower *et al.*, 1992; Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999a; Yang *et al.*, 2000). Im Unterschied zu p53 ist p63 für die Embryonalentwicklung essentiell. Mäuse, denen das p63 Gen fehlt, weisen schwere Defekte während der ektodermalen Differenzierung auf (Mills *et al.*, 1999). Basierend auf diesem Phänotyp wurde eine Rolle von p63 in der Epithelentwicklung vorgeschlagen, die p63 für die Stammzellregeneration unerlässlich macht (Little und Jochemsen, 2002; Yang *et al.*, 1999a). Die Expression von p53 und p73 Homologen in der Muschel *Mya arenaria* kann als Modellsystem für humane Tumoren dienen (Kelley *et al.*, 2001). Mutationen in der p63 DBD sind außerdem die Ursache humaner erblicher Entwicklungsstörungen (van Bokhoven und McKeon, 2002), wie des autosomal dominanten EEC-Syndroms (von *ectodermal dysplasia, ectrodactaly and cleft palate*) und eines EEC-ähnlichen *limb mammary* Syndroms (Celli *et al.*, 1999). Die Mutationen, die für das EEC-Syndrom verantwortlich sind, werden in den zu p53 homologen Resten der p63 DBD gefunden, die häufig in humanen Tumoren mutiert sind (Celli *et al.*, 1999).

3.3 Domänenstruktur von p53 und p53 Homologen

Alle Mitglieder der p53 Familie sind modular organisiert und aus drei funktionellen Subdomänen aufgebaut: 1) einer N-terminalen Domäne (**NTD**) (1-93), die eine saure flexible N-terminale Transaktivierungsdomäne (**TAD**) (1-50) (Botuyan *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000) mit der regulatorisch wichtigen BOX1-Domäne zur Interaktion mit MDM2 (Liu *et al.*, 2001) und Proteinen der Transkriptionsmaschinerie sowie eine Prolin-reiche Region (63-97) umfaßt, die vermutlich mit SH3-Domänen von Partnerproteinen interagiert, 2) einer zu ca. 60% homologen evolutionär hochkonservierten zentralen DNA-Bindungsdomäne (**DBD**) (102-292), und 3) einer C-terminalen Domäne (**CTD**), die eine Tetramerisierungsdomäne (**TD**) (320-356) und eine basische C-terminale regulatorische Domäne (**CTRD**) (363-393) umfaßt (Arrowsmith, 1999; Arrowsmith und Morin, 1996; Bargonetti *et al.*, 1993; Fields und Jang, 1990; Jayaraman *et al.*, 1997; Montano, 2001b; Pavletich *et al.*, 1993; Soussi und May, 1996; Wang *et al.*, 1993; Yamane *et al.*, 2001). Abb. 3.2 zeigt einen Überblick über die Domänenstruktur von p53. Mehrere p63 und p73 Isoformen weisen zusätzlich eine konservierte C-terminale Erweiterung von ca. 100 Resten auf, die in p53 nicht vorhanden ist und vermutlich eine Protein-Interaktions-Domäne mit regulatorischer Funktion ist. Die Struktur dieser Region wurde kürzlich aufgeklärt (Chi *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001d) und weist strukturelle Homologie zu **SAM-Domänen** auf (Thanos und Bowie, 1999). Alternatives Splicing der C-terminalen Region von p63 und p73 führt zur Expression einer Vielzahl von Splicevarianten, die sich in ihren C-Termini und der Anwesenheit der SAM-Domäne unterscheiden (Levrero *et al.*, 1999). Außerdem wurden N-terminal deletierte Np63 und Np73 Isoformen identifiziert, die aufgrund des Fehlens der TAD nicht zur transkriptionellen Aktivierung fähig sind und eine anti-apoptotische Rolle ausüben; vermutlich indem sie als funktionelle Antagonisten der entsprechenden N-terminal nicht deletierten Isoformen fungieren (Grob *et al.*, 2001; Moll *et al.*, 2001; Pozniak *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1998).

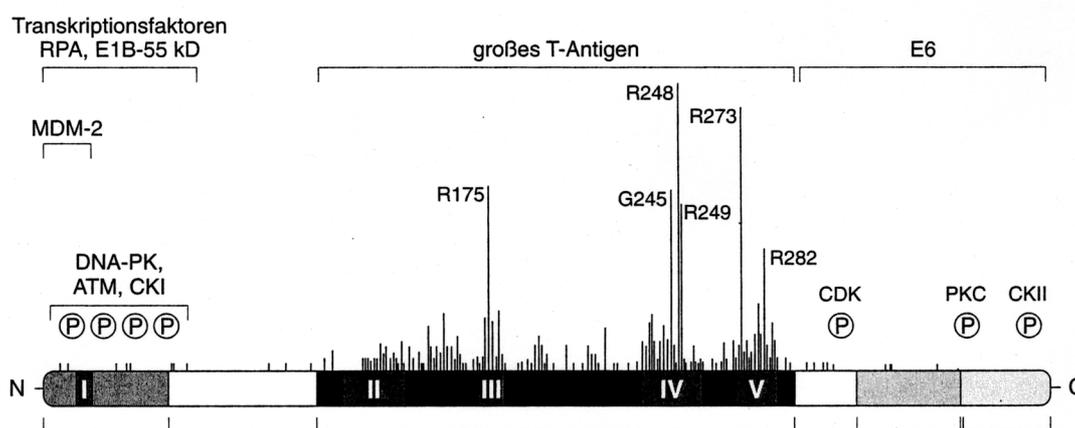


Abb. 3.2: Domänenstruktur von p53. Die funktionellen Domänen (TAD, DBD, TD und CTRD) sind durch Klammern bezeichnet. Einige ausgewählte Interaktions- und Phosphorylierungsstellen mit den zugehörigen Proteinen und Kinasen sind bezeichnet. Die Mutationshäufigkeit in humanen Tumoren ist als Histogramm eingezeichnet; die sechs häufigsten Mutationen (*hot spots*) sind hervorgehoben (Ko und Prives, 1996). Die Ziffern bezeichnen die evolutionär konservierten Bereiche. Abkürzungen: CDK: *Cyclin-Dependent Kinase*; CK: *Caseinkinase*; DNA-PK: *DNA-abhängige Proteinkinase*; ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*; MDM2: *Mouse Double Minute*; RPA: *Replication Protein A*. Abbildung aus (Wagener, 1999).

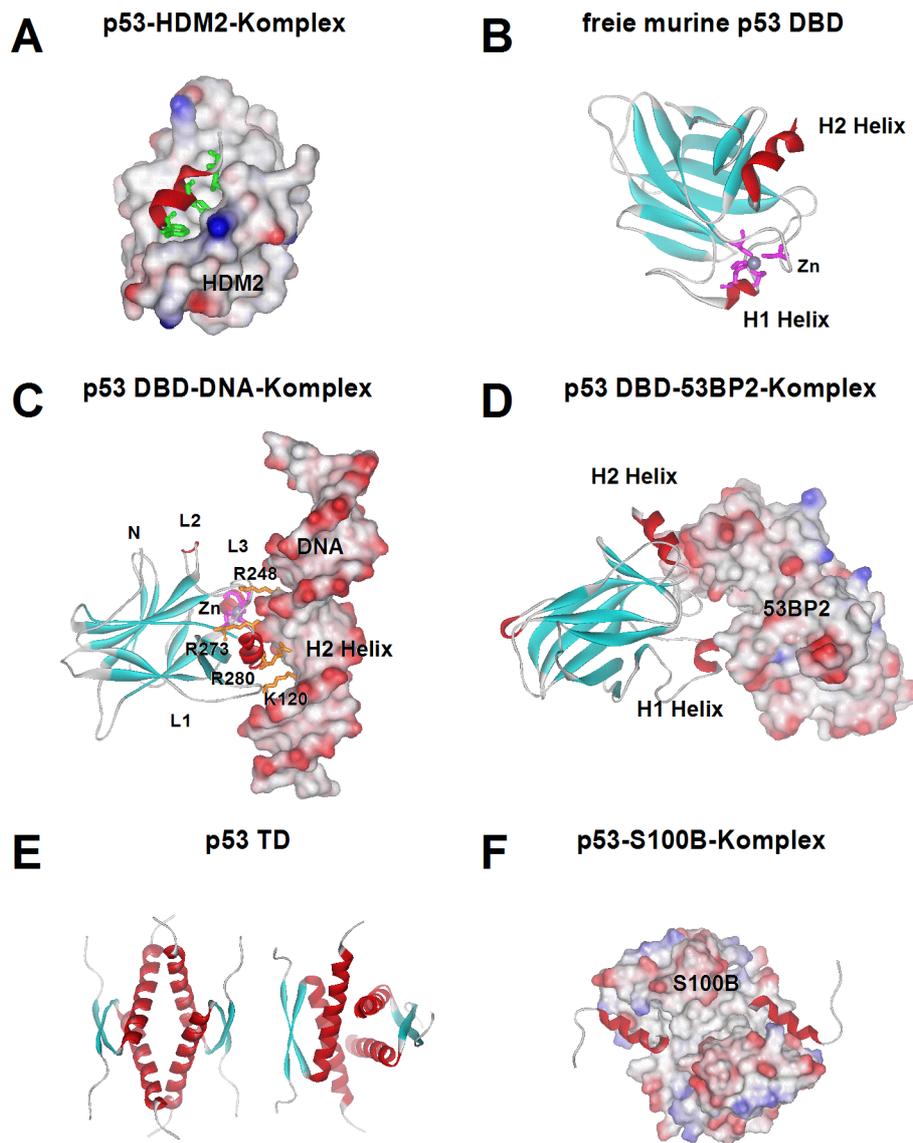


Abb. 3.3: Übersicht über kristallographisch und NMR-spektroskopisch strukturell aufgeklärten p53 Domänen. A) N-terminaler p53-Peptid-HDM2-Komplex (17-29) (Kussie *et al.*, 1996) (PDB-Code: 1YCR); B) Murine freie p53 DBD (99-284) (Zhao *et al.*, 2001) (PDB-Code: 1HU8, Kette B); C) humaner p53 DBD-DNA-Komplex (94-289) (Cho *et al.*, 1994) (PDB-Code: 1TSR, Kette B); D) p53 DBD-53BP2-Komplex (Gorina und Pavletich, 1996) (PDB-Code: 1YCS); E) p53 TD (319-360) (Clore *et al.*, 1995a; Jeffrey *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994) (PDB-Code: 1SAL); E) C-terminaler p53 Peptid-S100B($\beta\beta$)-Komplex (367-388) (Rustandi *et al.*, 2000) (PDB-Code: 1DT7). p53 Domänen sind in einer Sekundärstruktur-Darstellung, p53 Interaktionspartner in einer Connolly-Oberflächendarstellung abgebildet. Strukturell wichtige Reste und Strukturelemente sind bezeichnet.

Die **Struktur** der isolierten murinen p53 DBD (Zhao *et al.*, 2001) sowie der humanen p53 DBD im Komplex mit DNA (Cho *et al.*, 1994) und 53BP1 (Joo *et al.*, 2002) bzw. 53BP2 (Gorina und Pavletich, 1996) sowie die Struktur der TD (Clore *et al.*, 1995a; Jeffrey *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994) wurden kristallographisch bzw. durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Arrowsmith und Morin, 1996; Branden und Tooze, 1999; Burley, 1994; Pennisi, 1996; Prives, 1994). Zudem sind die Strukturen von N-

und C-terminalen Peptiden im Komplex mit MDM2 (Kussie *et al.*, 1996) und S100B (Rustandi *et al.*, 2000) bekannt. Die Struktur und Funktionen der N-terminalen TAD und der CTRD werden in Kapitel 3.4 und 3.6 näher erläutert; die Funktion der Prolinreichen Region bei der Induktion von Apoptose ist bisher molekular nicht verstanden (Baptiste *et al.*, 2002; Venot *et al.*, 1998; Walker und Levine, 1996). Für das vollständige tetramere p53 Protein ist allerdings bislang keine detaillierte strukturelle Information vorhanden, was vermutlich auf die Flexibilität der NTD und CTD des Proteins und auf Schwierigkeiten bei der Gewinnung ausreichender Mengen an geeigneten stabilen und homogenen p53 Präparationen zurückzuführen ist. Insbesondere ist bisher keine strukturelle Information vorhanden, wie intaktes tetrameres p53 spezifisch mit DNA interagiert.

Die **p53 DBD** weist mehrere Regionen auf, in denen sehr oft **Mutationen** gefunden werden (Hollstein *et al.*, 1999). Diese führen dazu, daß p53 in mehr als der Hälfte aller humanen Tumoren inaktiviert vorliegt (Sigal und Rotter, 2000). Mutationen in der p53 DBD sind zudem in den meisten Fällen Ursache des Li-Fraumeni Syndroms. Anhand der Kristallstruktur der p53 DBD im Komplex mit DNA können die Auswirkungen von Mutationen auf die DNA-Bindung rationalisiert werden (Cho *et al.*, 1994). Die p53 DBD besteht aus einem β -Sandwich aus der Immunoglobulin-Klasse von Proteinen (Bork *et al.*, 1994), das als Gerüst für zwei längere *loops* (L2 und L3) und ein *loop-sheet-helix* (LSH mit der H2 Helix) Motiv dient, die zusammen für die spezifische DNA-Bindung verantwortlich sind und daher evolutionär hochkonserviert sind. Die zwei 4- und 5-strängigen antiparallelen β -sheets des Sandwich bilden den hydrophoben Kern der Domäne; die L2 und L3 *loops* sind miteinander verbunden und koordinieren zusammen mit der kurzen H1 Helix das für die Faltung essentielle Zn^{2+} -Ion (Arrowsmith und Morin, 1996; Cho *et al.*, 1994; Pennisi, 1996; Prives, 1994). p53 war das erste Beispiel für einen Transkriptionsfaktor, der für die DNA-Erkennung eine Anordnung von *loops* nutzt. Zusammen mit der Struktur der p50 Untereinheit von NF- κ B (Ghosh *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 1995) etablierte die Struktur der p53 DBD die **Immunoglobulin-Faltung** in Kombination mit DNA-bindenden *loops* als neue strukturelle Klasse von DNA-Bindungsdomänen. Mutationen betreffen in den meisten Fällen entweder direkt die DNA-Bindung (Kontaktmutanten) oder die konformationelle Integrität der Domäne (Strukturmutanten) (Cho *et al.*, 1994; Ory *et al.*, 1994; Trulson and Millhauser, 1999) und führen zu einer thermodynamischen Destabilisierung der Mutanten (Bullock *et al.*, 2000). NMR-spektroskopische und *molecular dynamics* Simulationen zeigen, daß dies auf lokale strukturelle Veränderungen zurückzuführen ist (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 2002). Dabei lassen sich fünf unterschiedliche Klassen an Mutationen unterscheiden (Bullock und Fersht, 2001; Bullock *et al.*, 2000), die zum Teil eine Rest-DNA-Bindungsaktivität bzw. eine veränderte DNA-Spezifität haben (Campomenosi *et al.*, 2001; Deppert *et al.*, 2000; Di Como und Prives, 1998; Inga und Resnick, 2001; Kovvali *et al.*, 2001; Pan und Haines, 2000; Rolley *et al.*, 1995). Mithilfe spezieller Antikörper wie z.B. PAb 240 (Spezifität: mutante Konformation) und PAb 1620 (Spezifität: wildtyp Konformation) (Danks *et al.*, 1998; Gannon *et al.*, 1990; McLure und Lee, 1996; Vojtesek *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2001c; Yolcu *et al.*, 2001) sowie durch *phage display* (Ravera *et al.*, 1998; Stephen *et al.*, 1995; Stephen und Lane, 1992) lassen sich unterschiedliche konformationelle Zustände der p53 DBD unterscheiden (Cohen *et al.*, 1999; Milner, 1995). p53 verliert seine DNA-Bindungsaktivität bei physiologischen Bedingungen nach kurzer Zeit (Hainaut *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1996a) und bestimmte Mutanten zeigen abhängig von der

Temperatur eine bzw. keine DNA-Bindungsaktivität (Friedlander *et al.*, 1996; Milner und Medcalf, 1990). Da die Konformation der p53 DBD durch ein Zn^{2+} -Ion stabilisiert wird, ist p53 gegenüber der Behandlung mit Komplexbildnern und Schwermetallen empfindlich (Coffer und Knowles, 1994; Hainaut und Mann, 2001; Meplan *et al.*, 2000; Palecek *et al.*, 1999; Rainwater *et al.*, 1995; Verhaegh *et al.*, 1997). Molekulare **Chaperone** spielen bei der Faltung naszierender Polypeptidketten und der Erkennung mißgefalteter Proteine eine Rolle (Buchner und Walter, 2002). Mutantes p53 bildet reguliert von Cochaperonen wie Hop und Hsp40 (King *et al.*, 2001) unter anderem Komplexe mit den molekularen Chaperonen Hsp90 und Hsp70 (Blagosklonny *et al.*, 1996; Blagosklonny *et al.*, 1995; Fourie *et al.*, 1997; Hupp, 1999). Die Interaktion mit Chaperonen moduliert die Konformation von p53 und spielt eine Rolle bei der Stabilisierung und zellulären Lokalisation von p53 (Zylicz *et al.*, 2001). Die Konformation und Assoziation von mutantern p53 mit Hsp90 kann durch Geldanamycin, einen Inhibitor von Hsp90 (Stebbins *et al.*, 1997), reguliert werden (Whitesell *et al.*, 1998). Hsp90 hat daher und aufgrund p53-unabhängiger Funktionen in der Signaltransduktion (Richter und Buchner, 2001) großes Interesse in der Tumorthherapie gewonnen (Scheibel und Buchner, 1998; Workman und Maloney, 2002). Neben ihrer Funktion bei der transkriptionellen Aktivierung hat die p53 DBD eine **3'-5'-Exonuklease-Aktivität** (Mummenbrauer *et al.*, 1996; Skalski *et al.*, 2000). Möglicherweise spielt die p53 DBD zusammen mit der CTRD im transkriptionell inaktiven p53 auch bei der Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden eine Rolle (Albrechtsen *et al.*, 1999; Janus *et al.*, 1999). Die Bindung an geschädigte DNA kann außerdem zu einer autoproteolytischen Spaltung von p53 führen, bei der die p53 DBD freigesetzt wird (Molinari *et al.*, 1996; Okorokov und Milner, 1997; Okorokov *et al.*, 1997). Basierend auf einer Vielfalt an experimentellen Beobachtungen wird zudem diskutiert, daß mutantes p53 durch Änderung der DNA-Spezifität bzw. unabhängig von der Rolle als Transkriptionsfaktor Funktionen gewinnen kann, die eine Tumorigenese fördern (**gain-of-function**) (Blagosklonny, 2000; Cadwell und Zambetti, 2001; Deppert *et al.*, 2000; Roemer, 1999; Sigal und Rotter, 2000; van Oijen und Slootweg, 2000). Im Gegensatz zur p53 DBD ist die Inaktivierung der p63 bzw. p73 DBD durch Mutationen selten und nur in Einzelfällen nachgewiesen, so daß p63 und p73-Isoformen vermutlich keine so maßgebliche Rolle bei der Tumorigenese wie p53 zu spielen scheinen (Marin und Kaelin, 2000). Ihre Rolle in der Tumorsuppression ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt Gegenstand der Diskussion (Davis und Dowdy, 2001; Grob *et al.*, 2002; Stiewe und Putzer, 2002).

Sowohl das Tumorsuppressorprotein p53 als auch seine Homologen p63 und p73 enthalten eine **TD** und liegen in Lösung als Tetramer vor (Friedman *et al.*, 1993). Die p53 TD bildet ein Dimer aus Dimeren (Clore *et al.*, 1995a; Jeffrey *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994; McCoy *et al.*, 1997), dessen Faltung gegenüber thermischer Entfaltung bemerkenswert stabil ist (Johnson *et al.*, 1995; Mateu und Fersht, 1998; Mateu *et al.*, 1999). Mutationen in der p53 TD sind nicht so häufig wie in der DBD, können durch Verhinderung der Tetramerisierung von p53 aber ebenfalls für die spontane Entstehung von Tumoren verantwortlich sein (Chene, 2001b; Chene und Bechter, 1999); auch können sie die Ursache für erbliche Erkrankungen wie das Li-Fraumeni Syndrom sein (Davison *et al.*, 1998; DiGiammarino *et al.*, 2002). Die Oligomerisierung von mutantern p53 mit wildtyp p53 führt zur Bildung von Heterotetrameren, was mit der Inaktivierung von p53 einhergeht (**dominant-negativer Effekt**) (Milner und Medcalf, 1991). Durch künstliche Oligomerisierungsdomänen, die mit der p53 Tetramerisierung interferieren, kann p53 inaktiviert werden (Contegno *et al.*, 2002).

3.4 Regulation von p53 durch MDM2

Das murine *MDM2 (mouse double minute)* Gen sowie sein humanes Homologes HDM2¹ wurden als Onkogen in einer Sarkomzelllinie identifiziert (Momand *et al.*, 1992; Oliner *et al.*, 1992). Humane Sarkome weisen oft eine starke Überexpression von MDM2 auf (Momand und Zambetti, 1996; Picksley *et al.*, 1996). *MDM2* codiert für ein 90 kD Onkoprotein, von dem multiple Splicevarianten existieren und das als wichtigster Regulator des p53 Proteins fungiert (Juven-Gershon und Oren, 1999). MDM2 ist aus mehreren Domänen aufgebaut: 1) einer N-terminalen Domäne (AS 1-220), die mit p53, p73, E2F/DP1 interagiert, 2) einer sauren Domäne (AS 150-300), die eine Bindungsstelle für das ribosomale L5 Protein enthält, 3) einer Bindungsstelle für Rb (AS 270-320) und 4) einer RING Fingerdomäne (AS 400-491), die an RNA binden kann und als E3 Ligase für die Ubiquitylierung von p53 verantwortlich ist (Freedman und Levine, 1999; Freedman *et al.*, 1999; Momand *et al.*, 2000). Daneben enthält MDM2 nukleäre Import- und Exportsignale sowie eine nukleoläre Lokalisationssequenz (Lohrum *et al.*, 2000). Genetische und biochemische Studien mit Peptiden und inhibitorischen Antikörpern (*mapping*) zeigten, daß die N-terminale Domäne von MDM2 spezifisch mit der **BOX1-Domäne** in der TAD der N-terminalen Domäne von p53 interagiert (Chen *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1998; Freedman *et al.*, 1997; Le Bras *et al.*, 2002; Picksley *et al.*, 1994; Portefaix *et al.*, 2000). In diesen Studien konnten die für eine Bindung essentiellen Reste (Phe¹⁹, Trp²³ und Leu²⁶) identifiziert werden (Bottger *et al.*, 1997a). Durch *phage display* wurden außerdem neue, hochaffine MDM2-bindende Peptide identifiziert (Bottger *et al.*, 1996). NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten, daß ein p53-Peptid aus der TAD bei Bindung an MDM2 eine α -helikale Struktur einnimmt (Blommers *et al.*, 1997; Botuyan *et al.*, 1997). Die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von HDM2 und XDM2 aus *Xenopus laevis* im Komplex mit einem kurzen p53 Peptid (AS 17-27/29) bestätigte schließlich die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen. Das p53-Peptid bindet über eine amphiphile α -Helix mit den exponierten Resten Phe¹⁹, Trp²³ und Leu²⁶ in die hydrophobe Bindungstasche auf MDM2 (Kussie *et al.*, 1996; Shair, 1997). Neben der BOX1-Domäne wurde mindestens eine weitere Bindungsstellen für MDM2 in der p53 DBD beschrieben (Burch *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2002). Das Onkoprotein MDM2 reguliert die p53 Aktivität über **drei Mechanismen**. Zum einen führt die Interaktion mit der p53 TAD zur Blockade der transkriptionellen Aktivität von p53 (Hall und Milner, 1997; Leng *et al.*, 1995; Oliner *et al.*, 1993). Zum anderen fungiert MDM2 als E3 Ligase, die p53 ubiquityliert (Fang *et al.*, 2000). Schließlich exportiert MDM2 p53 aus dem Nukleus ins Cytoplasma (Vousden und Woude, 2000) und führt es dort dem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System zu (Ashcroft und Vousden, 1999; Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997; Lane und Hall, 1997). Auf der anderen Seite aktiviert p53 die Expression von MDM2 durch p53-responsive Elemente im Promoterbereich von MDM2 (Barak *et al.*, 1993; Juven *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993). Dies führt zu einer regulatorischen Rückkopplung (**feedback loop**) (Picksley und Lane, 1993), so daß die p53 und MDM2 Konzentrationen in den Zellen oszillatorischen Schwankungen unterworfen sind (Lev Bar-Or *et al.*, 2000). Möglicherweise reguliert p53 während der Apoptose MDM2 auch direkt auf Proteinebene, indem es eine spezifische Caspase induziert, die MDM2 proteolytisch spaltet (Pochampally *et al.*, 1999). Bei einer Amplifikation von *MDM2* kommt es dagegen zu einer dauerhaften Dysregulation, so

¹ Da MDM2 zuerst in der Maus identifiziert wurde, wird MDM2 als Bezeichnung von HDM2 verwendet. MDM2 und HDM2 werden auch in dieser Arbeit synonym verwendet.

daß MDM2 onkogen wirkt. Die Bedeutung der p53-MDM2-Interaktion für die p53 Regulation wird daran ersichtlich, daß die p53 TAD das Ziel einer ganzen Reihe von Kinasen ist, die p53 Ser-15, Thr-18 und Ser-20 als Folge diverser Stimuli wie DNA-Schädigung phosphorylieren (Shieh *et al.*, 1997; Unger *et al.*, 1999), dadurch die Affinität der Bindung an MDM2 verringern (Bean und Stark, 2002; Lai *et al.*, 2000; Sakaguchi *et al.*, 2000) und die Regulation durch MDM2 aufheben (Prives, 1998). Neben p53 interagiert MDM2 auch mit p73, nicht jedoch mit p63. Die Bindung an MDM2 inhibiert die transkriptionelle Funktion von p73; p73 wird im Unterschied zu p53 aber nicht dem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt (Balint *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001e). **MDMX** ist ein MDM2 Homologes (Shvarts *et al.*, 1997; Shvarts *et al.*, 1996), dessen genaue zelluläre Funktion noch unklar ist (Parant *et al.*, 2001). MDMX und MDM2 weisen die höchste Homologie in der N-terminalen Domäne auf, die in MDMX ebenfalls eine hydrophobe Bindungstasche für p53 und p73 ausbildet (Bottger *et al.*, 1999). Die Bindung von p53 an MDMX führt zur transkriptionellen Inaktivierung von p53; im Unterschied zu MDM2 kommt es aber weder zur Ubiquitylierung noch führt MDMX p53 dem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System zu. Erst kürzlich wurde zudem gezeigt, daß MDM2 neben p53 mit Tip60 ein anderes Protein ubiquityliert, das eine Rolle bei der DNA-Reparatur und Apoptose spielt (Legube *et al.*, 2002). Bei der Regulation der Ubiquitylierung von p53 spielen neben MDM2 zwei weitere Proteine eine wichtige Rolle: p14^{ARF} (Homologes in der Maus: p19^{ARF}) und das virale E6 Protein. Interessanterweise codiert der **INK4a/ARF Lokus**, der für p14^{ARF} codiert, in einem alternativen Leserahmen für den Tumorsuppressor p16^{INK4A}, der als CDK Inhibitor eine wichtige Rolle bei der Regulation des Retinoblastoma Proteins (Rb) im Zellzyklus spielt (Carnero *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 1998; Sherr, 2001; Zhang *et al.*, 1998). **p14^{ARF}** ist ein Tumorsuppressorprotein, das seine Funktion, die Stabilisierung von p53, über die Regulation von MDM2 ausübt und häufig in humanen Tumoren inaktiviert ist (Asker *et al.*, 1999; Serrano *et al.*, 1996; Sherr, 1998). p14^{ARF} aktiviert als Folge der Aktivierung durch Onkoproteine wie z.B. c-Myc oder Ras eine p53 Antwort, indem es an MDM2 bindet und dadurch die Ubiquitylierung und den Abbau von p53 verhindert (DiGiammarino *et al.*, 2001; Honda und Yasuda, 1999; Pomerantz *et al.*, 1998; Tao und Levine, 1999; Weber *et al.*, 1999; Xirodimas *et al.*, 2001). Die Infektion mit humanen Papillomaviren des Typs HPV-16/18 ist für 90% aller humanen Cervixkarzinome ursächlich (zur Hausen, 1998). Das virale **E6 Protein** (Rapp und Chen, 1998) bindet an p53 und rekrutiert die zelluläre Ubiquitin E3 Ligase E6AP (Nuber *et al.*, 1998). Diese ubiquityliert p53 und führt p53 dem proteasomalen Abbau zu (Huibregtse *et al.*, 1993; Scheffner *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1999). Die Expression von E6 ersetzt die genau regulierte Regulation von p53 durch MDM2 und führt dadurch zur Bildung von Cervixkarzinomen (Hengstermann *et al.*, 2001). Es wird diskutiert, daß das für Arginin codierende p53 Allel eines verbreiteten p53 Arg72Pro Polymorphismus in Codon 72, durch seine erhöhte Affinität für das E6 Protein einen hohen Risikofaktor für die Suszeptibilität gegenüber dem HPV-16/18 E6-induziertem Cervixkarzinom darstellt (Storey *et al.*, 1998; Zehbe *et al.*, 1999). Neben den beschriebenen Funktionen interagiert MDM2 mit anderen wichtigen regulatorischen Proteinen wie E2F (Loughran und La Thangue, 2000; Martin *et al.*, 1995) und Rb (Hsieh *et al.*, 1999; Yap *et al.*, 1999). MDM2 hat außerdem eine Reihe von p53-unabhängigen Funktionen, die ebenfalls zu einer Tumorigenese beitragen können (Blain und Massague, 2000; Jones *et al.*, 1998).

3.5 Regulation von p53

p53 kommt normalerweise in geringen Konzentrationen in der Zelle vor und hat eine kurze Halbwertszeit; als Folge seiner potentiellen „Toxizität“ für normale Zellen wird es unter physiologischen Bedingungen streng kontrolliert. Erst als Folge von zellulären Stress-Signalen wird p53 aktiviert und akkumuliert in der Zelle (Maltzman und Czyzyk, 1984; Reich *et al.*, 1983). Abgesehen von der Regulation durch Partnerproteine erfolgt die Regulation von p53 über eine Reihe von miteinander verknüpften postrationalen Mechanismen (Balint und Vousden, 2001; Jayaraman und Prives, 1999; Oren, 1999; Somasundaram, 2000; Vousden, 2002):

- **Phosphorylierung:** p53 enthält mehrere Phosphorylierungsstellen in der TAD und in der CTRD, die in einem komplexen Wechselspiel die Aktivität von p53 und Wechselwirkungen mit Partnerproteinen wie MDM2 regulieren (Steegenga *et al.*, 1996). Insbesondere die Mechanismen, die zur Phosphorylierung von p53 nach DNA-Schädigung führen, wurden intensiv untersucht (Appella und Anderson, 2001; Banin *et al.*, 1998; Bartek *et al.*, 2001; Hirao *et al.*, 2000).
- **Acetylierung:** Neben der Phosphorylierung wurde in den letzten Jahren die Acetylierung über **p300/CBP** (Grossman, 2001; Gu und Roeder, 1997; Gu *et al.*, 1997; Vaziri *et al.*, 2001) als wichtiger Mechanismus bei der Aktivierung von p53 identifiziert (Prives und Manley, 2001). DNA-Schädigung führt neben bzw. vermittelt durch Phosphorylierung zu einer Acetylierungskaskade, bei der Coaktivatoren/Histonacetyltransferasen rekrutiert werden, die für die transkriptionelle Funktion von p53 entscheidend sind (Barlev *et al.*, 2001). Gleichzeitig scheint die Deacetylierung von acetyliertem p53 durch Histon-Deacetylasen wie PID und **Sir2** eine wichtige regulatorische Rolle zu spielen (Luo *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2000; Vaziri *et al.*, 2001).
- **Ubiquitynylierung und Sumoylierung:** Die Proteininstabilität von p53 wird über die erwähnte Rückkopplungsschleife mit **MDM2** sowie über die Interaktion von MDM2 mit **p14^{ARF}** genau reguliert (Fang *et al.*, 2000; Honda und Yasuda, 1999; Kubbutat und Vousden, 1998; Piette *et al.*, 1997). Die MDM2 E3 Ligase ubiquitynyliert p53 und führt zum Export von p53 aus dem Zellkern in das Cytoplasma, wo es durch das Ubiquitin-Proteasom-System proteolytisch abgebaut wird (Groll *et al.*, 1997; Weissman, 2001; Jesenberger und Jentsch, 2002). Kürzlich wurde mit HAUSP ein Protein identifiziert, das p53 deubiquitynylieren kann und dadurch zu einer p53 Stabilisierung führt (Li *et al.*, 2002). Neben der Ubiquitynylierung wird p53 durch Ubc9 mit **SUMO-1** modifiziert (Bernier-Villamor *et al.*, 2002; Kahyo *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2001). Gleichzeitig wird die E3 Ligase Aktivität von MDM2 gegenüber p53 durch Sumoylierung gesteigert (Buschmann *et al.*, 2000).
- **Zelluläre Lokalisation/Kompartimentierung:** Die Lokalisation von p53 und MDM2 unterliegt ebenfalls einer strengen Regulation. Sowohl p53 als auch MDM2 enthalten nukleäre Import- und Exportsignale. Nach der Aktivierung übt p53 seine Funktion als Transkriptionsfaktor im Nukleus aus, wo es gebunden an Vimentin (Klotzsche *et al.*, 1998) oder F-Actin (Jiang *et al.*, 2001; Metcalfe *et al.*, 1999; Okorokov *et al.*, 2002) vorliegen kann. Durch Bindung an MDM2 wird p53 im Nukleus ubiquitynyliert und aus dem Nukleus ins Cytoplasma exportiert, wo es proteolytisch abgebaut wird (Liang and Clarke, 2001; Roth *et al.*, 1998; Stommel *et al.*, 1999; Zhang and Xiong, 2001).

3.6 Regulation der p53 DNA-Bindung

Eine Reihe von Beobachtungen führten zum **Modell der allosterischen Regulation** der p53 DNA-Bindung durch die CTRD (*p53 autoregulation*) (Ahn und Prives, 2001; Hupp und Lane, 1994a; Hupp und Lane, 1994b; Hupp und Lane, 1995). Die CTRD spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Aktivität (Almog *et al.*, 2000; Lassus *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 1999) und Ubiquitynylierung (Crook *et al.*, 1996; Kubbutat *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2000) von p53. Das allosterische Modell geht davon aus, daß *in vivo* die CTRD mit der DBD des p53 Proteins im inaktiven Zustand interagiert und die DBD in einer für die DNA-Bindung inaktiven Konformation hält. Als Folge von zellulärem Stress wie UV-Bestrahlung wird die CTRD posttranslational modifiziert (Meek, 1999). Dies hebt die inhibitorische Interaktion auf, so daß p53 durch eine Konformationsänderung aktiviert wird, an spezifische Zielgene bindet und diese aktivieren kann (Gu und Roeder, 1997; Hupp und Lane, 1994a; Hupp *et al.*, 1995; Kaku *et al.*, 2001a; Wolkowicz *et al.*, 1998; Wolkowicz und Rotter, 1997). Aus *E. coli* gereinigtes sowie latente Fraktionen von aus Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen isoliertem tetramerem p53 Protein sind für eine spezifische DNA-Bindung latent. Latentes wildtyp sowie mutantes p53 kann *in vivo* und *in vitro* durch eine Reihe an Mechanismen, die die CTRD betreffen, reguliert bzw. zur DNA-Bindung (re-) aktiviert werden (Mundt *et al.*, 1997): 1) Bindung von gegen den C-Terminus gerichteten Antikörpern (Abarzua *et al.*, 1995; Hupp *et al.*, 1992; Hupp *et al.*, 1993; Niewolik *et al.*, 1995; Pospisilova *et al.*, 2000) und Antikörperfragmenten (Caron de Fromentel *et al.*, 1999; Mary *et al.*, 1999), 2) Bindung von Chaperonen (Hupp *et al.*, 1992; Hupp *et al.*, 1993), 3) Phosphorylierung der CTRD durch CKII, cdc22, PKC etc. (Hupp und Lane, 1994b; Hupp und Lane, 1995), 4) Acetylierung der CTRD durch CBP/p300 (Gu und Roeder, 1997; Prives und Manley, 2001), 5) O-Glykosylierung (Shaw *et al.*, 1996) und ADP-Ribosylierung (Mendoza-Alvarez und Alvarez-Gonzalez, 2001); 6) Inkubation mit kurzen basischen Peptiden abgeleitet aus der CTRD (Abarzua *et al.*, 1996; Hupp *et al.*, 1995; Shibata *et al.*, 1998), 7) Interaktion mit kurzen ssDNA-Fragmenten (Jayaraman und Prives, 1995; Selivanova *et al.*, 1996; Zotchev *et al.*, 2000), 8) Mutationen bzw. Deletion essentieller Aminosäuren (Hao *et al.*, 1996; Ishioka *et al.*, 1995; Marston *et al.*, 1998) sowie 9) die Interaktion mit einer Reihe von Proteinen wie Cyclin A (Luciani *et al.*, 2000), c-Abl (Nie *et al.*, 2000) oder S100B (Rustandi *et al.*, 2000). Diese Experimente erlaubten es, in der CTRD eine für die Regulation verantwortliche basische Consensus-Sequenz festzulegen: **xKxKKxxxxRxKKx** (x steht für eine beliebige Aminosäure). Wie ein Sequenz-Alignment der CTRDs von p53 zeigt, ist diese Sequenz evolutionär konserviert (Bessard *et al.*, 1998; Gu und Roeder, 1997). Neben dem allosterischen existiert ein kompetitives **Interferenz-Modell**, das die Latenz von p53 auf eine sterische Interferenz der unspezifischen DNA-Bindung der CTRD mit der spezifischen DNA-Bindung durch die p53 DBD zurückführt (Anderson *et al.*, 1997; Bayle *et al.*, 1995). Nach diesem Modell wird statt der Interaktion der CTRD mit der DBD die interferierende unspezifische DNA-Bindung durch Antikörper-Bindung oder durch Phosphorylierung bzw. Acetylierung der CTRD (Hoffmann *et al.*, 1998) bzw. durch Konkurrenz mit kleinen basischen C-terminalen Peptiden aufgehoben (Anderson *et al.*, 1997), so daß die p53 DBD nun spezifisch an ihre Consensus-Bindungsstellen binden kann. Andere Publikationen betonten die Bedeutung der NTD für die Regulation der DNA-Bindung von p53 (Hansen *et al.*, 1998) und postulierten, daß die NTD von p53 mit der DBD und/oder CTRD

interagiert (Muller-Tiemann *et al.*, 1998). In einer *molecular modelling* Studie wurde außerdem vorgeschlagen, daß die Prolin-reiche Region der NTD eine amphipathische Helix mit der CTRD ausbilden könnte (Kim *et al.*, 1999a). Durch Inkubation mit zellgängigen C-terminalen Peptiden konnte schließlich gezeigt werden, daß sowohl wildtyp als auch mutantes p53 in Tumorzellen reaktiviert werden kann, so daß die Tumorzellen in Apoptose übergingen (Kim *et al.*, 1999a; Selivanova *et al.*, 1997). Basierend auf der Idee, p53 in humanen Tumoren zu reaktivieren, haben C-terminale Peptide großes Interesse für Ansätze zur Entwicklung neuartiger Krebstherapien erlangt (Hupp *et al.*, 2000; Selivanova *et al.*, 1998; Wiman, 1998).

Tetrameres p53 bindet sequenzspezifisch an **Consensus-DNA-Sequenzen**, die aus zwei aufeinander folgenden, palindromen 10 bp Consensus-Bindungsstellen aufgebaut sind: 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' (Pu: Purinbasen, Py Pyrimidinbasen), von denen jede wiederum aus zwei Kopf-an-Kopf 5 bp Consensus-Bindungsstellen besteht (Cho *et al.*, 1994; El-Deiry *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 1993; Funk *et al.*, 1992; Kern *et al.*, 1991; Stenger *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995b; Waterman *et al.*, 1995). Die isolierte TD bildet ein symmetrisches Dimer aus Dimeren (Clore *et al.*, 1995a; Jeffrey *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994), und es existieren zwei gegensätzliche Modelle, wie die DBDs der jeweiligen Dimere an die DNA binden können; entweder in aufeinander folgender oder in alternierender Anordnung. Experimentelle Evidenzen sprechen für eine Anordnung, in der die DBDs eines Dimers gemeinsam an eine halbe 10 bp Consensus-Bindungsstelle binden (McLure und Lee, 1998). Mehrere Studien haben gezeigt, daß vier p53 DBDs in Abwesenheit der TD kooperativ an die p53 Consensus-DNA-Sequenz binden (Balagurumoorthy *et al.*, 1995; Bargonetti *et al.*, 1993; Bullock *et al.*, 2000; Pavletich *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995b). Auch ist die Kristallstruktur des p53 DBD-DNA-Komplexes mit einem Modell in Einklang zu bringen, in dem die vier DBDs ohne sterische Behinderung an die Consensus-DNA-Bindungsstelle binden (Cho *et al.*, 1994) und diese dadurch leicht krümmen (Appella *et al.*, 1998; Balagurumoorthy *et al.*, 1995; Lebrun *et al.*, 2001; Nagaich *et al.*, 1999; Nagaich *et al.*, 1997b). Die Stabilität des p53-DNA-Komplexes wird möglicherweise durch ADP/ATP reguliert (Okorokov und Milner, 1999). Eine unspezifische Interaktion der isolierten p53 DBD mit *supercoiled* DNA-Plasmiden führt ebenfalls zu einer Oligomerisierung der p53 DBD (Jett *et al.*, 2000; Palecek *et al.*, 2001; Palecek *et al.*, 1997). Kürzlich wurde gezeigt, daß die Biogenese des p53 Tetramers zwei Schritte umfaßt, die cotranslationale Dimerisierung der Monomere, gefolgt von der posttranslationalen Dimerisierung zum Tetramer in Lösung (Nicholls *et al.*, 2002). Im Gegensatz zum bis vor kurzem akzeptierten posttranslationalen Dimerisierungs- und Tetramerisierungsmodell (Hara *et al.*, 2000; Stommel *et al.*, 1999) hat dies Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Heterotetramere und den dominant-negativen Effekt von p53 Mutationen. p53 kontrolliert als Transkriptionsfaktor schätzungsweise ca. **200-300 Zielgene** im Genom (Bourdon *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001b). Um die Selektivität der Aktivierung zu gewährleisten, wird eine Reihe von Mechanismen diskutiert. Zum einen kann p53 abhängig von seiner Konformation die Basensequenz von Consensus-Bindungsstellen unterscheiden (Martinez *et al.*, 1998). Daneben reguliert die Phosphorylierung bestimmter Phosphorylierungsstellen durch CDKs sowie die Bindung von Proteinen wie PAb 421 in der CTRD vermutlich über konformationelle Änderungen die Spezifität der Erkennung unterschiedlicher Consensus-Motive (Hecker *et al.*, 1996; Kaku *et al.*, 2001b; Resnick-Silverman *et al.*, 1998; Thornborrow und Manfredi, 1999; Wang und Prives, 1995).

3.7 p53 in der Tumorthherapie

In der (experimentellen) Tumorthherapie verwendete konventionelle **Chemotherapeutika** (z.B. DNA-schädigende Agenzien, Antimetabolite, Mikrotubuli-aktive Substanzen, Proteasom-Inhibitoren etc.) können in Tumoren mit wildtyp p53 eine Akkumulation von p53 auslösen, die dazu führt, daß die Tumorzellen in Apoptose übergehen (Blagosklonny, 2002; Pruschy *et al.*, 2001; Reed, 2002; Sellers und Fisher, 1999). Tumoren mit inaktiviertem p53 sind daher teilweise gegen Chemotherapeutika resistent (Brown und Wouters, 1999). Allerdings ist das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von wildtyp p53 kein genereller Indikator für die Antwort auf eine Chemotherapie (Johnstone *et al.*, 2002; Pirolo *et al.*, 2000). Neurodegeneration nach Hypoxie in Folge eines Schlaganfalls (Lakkaraju *et al.*, 2001) und die starken Nebenwirkungen einer Chemo- und Strahlentherapie sind unter anderem auf eine p53-vermittelte massive Induktion von Apoptose in Normalgewebe zurückzuführen. Cytoprotektive Agenzien sollen Zellen vor einer überschießenden Induktion von Apoptose und Zelltod schützen (Balla *et al.*, 2001) Die temporäre Hemmung der transkriptionellen Aktivität von p53 durch den in einem zellulären Screening identifizierten **p53 Inhibitor Pifithrin** kann die genannten Nebenwirkungen vermindern, ohne dadurch die Effektivität der Therapie von p53-negativen Tumoren zu vermindern oder neue Tumoren zu induzieren (Bassi *et al.*, 2002; Komarov *et al.*, 1999; Komarova und Gudkov, 1998; Komarova und Gudkov, 2000; Komarova und Gudkov, 2001; Wiesmuller, 2000). Tumoren mit defektem p53 sind gegenüber Hypoxie weniger empfindlich und sprechen daher weniger auf antiangiogenetische Therapien an (Yu *et al.*, 2002).

Seiner zentralen Rolle in der Tumorigenese entsprechend besteht eine Reihe von Möglichkeiten die p53 Tumorsuppressor-Funktion in Krebszellen zielgerichtet wiederherzustellen (Beaudry *et al.*, 1996; Chene, 2001a; Huang und Oliff, 2001; Hupp *et al.*, 2000; Lane und Lain, 2002; Papavassiliou, 2000; Tzatsos und Papavassiliou, 1999; Wiman, 1997). Ein Ansatz besteht in der (nicht-) viralen Wiedereinführung von wildtyp p53 in p53-negative Tumoren p53 durch eine **Gentherapie** (Chang *et al.*, 2000; Clayman, 2000; Sengupta *et al.*, 2000; Zeimet *et al.*, 2000). Zwei intelligente Ansätze nutzen dagegen gerade das Fehlen von p53 in Tumoren aus. Replikative Adenoviren wie **ONYX-015** (Bischoff *et al.*, 1996) töten selektiv p53-negative Tumorzellen ab, auch wenn der genaue Mechanismus der Replikation von ONYX-015 umstritten und möglicherweise nur zum Teil p53-abhängig ist (Alemany *et al.*, 2000; Khuri *et al.*, 2000). Adenovirale DNA mit einzelsträngigen *hairpin* Strukturen an beiden Enden löst eine Antwort auf DNA-Schädigung aus, die in der Abwesenheit von p53 zum Zelltod führt (Raj *et al.*, 2001; Vogelstein und Kinzler, 2001). Die **Reaktivierung** der wildtyp Aktivität von mutantern bzw. inaktivem p53 in Tumoren ist auf besonderes Interesse in der Krebstherapie gestoßen (Bullock und Fersht, 2001; Hupp *et al.*, 2000). Verschiedene Untersuchungen versuchten, basierend auf struktureller Information (Wieczorek *et al.*, 1996) oder durch die Generierung sekundärer Suppressormutationen (Brachmann *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001; Nikolova *et al.*, 2000) mutierte p53 DBDs zu reaktivieren bzw. die zur DNA-Bindung fähige, aktive wildtyp Konformation zu stabilisieren (Bullock und Fersht, 2001). Diese Versuche und Ansätze, die auf semirationalem Proteindesign (Nikolova *et al.*, 1998) oder *directed evolution* (Matsumura und Ellington, 1999; Xirodimas und Lane, 1999) beruhten, führten zu Proteinen mit erhöhter thermodynamischer Stabilität und unterstützten die Idee, die p53 DBD durch niedermolekulare Verbindungen zu stabilisieren. Auf dem allosterischen Modell der

p53 Regulation basierend (Gu und Roeder, 1997; Hupp und Lane, 1994a; Hupp *et al.*, 1995) wurden von der CTRD abgeleitete Peptide beschrieben, die die wildtyp Aktivität von mutantern p53 wiederherstellen sollen (siehe Kapitel 3.5) (Kim *et al.*, 1999a; Selivanova *et al.*, 1997; Selivanova *et al.*, 1998). Mittlerweile wurden pharmakologisch aktive, niedermolekulare Verbindungen beschrieben, die die wildtyp Konformation von humanem p53 allosterisch stabilisieren bzw. wiederherstellen und *in vivo* eine anti-Tumor-Aktivität aufweisen sollen (Bykov *et al.*, 2002; Coffey *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 1999; Takimoto *et al.*, 2002). Um Peptide zu identifizieren, die p53 stabilisieren können und als Ausgangspunkte für das Design niedermolekularer Verbindungen dienen könnten, wurden die drei mit p53 interagierenden Loops des p53 Interaktionspartner 53BP2 (Gorina und Pavletich, 1996) als kurze lineare Peptide synthetisiert. Ein von der SH3-Domäne von 53BP2 abgeleitetes Peptid interagiert mit der p53 DBD und stabilisiert die Domäne in einer Chaperon-artigen Art und Weise. Das Peptid kann zudem die Konformation von wildtyp p53 und der Mutante R249S stabilisieren und die Mutante I195T zur DNA-Bindung reaktivieren (Friedler *et al.*, 2002). Einer der am weitesten fortgeschrittenen Ansätze zur spezifischen Aktivierung von p53 in Tumorzellen wurde in Kapitel 3.6 diskutiert; die **Inhibition** der Interaktion zwischen p53 und seinem negativen Regulator HDM2 (Lane, 1999) entweder durch Antisense-Ansätze (Wang *et al.*, 1999) oder durch peptidische und niedermolekulare Antagonisten (Bottger *et al.*, 1996; Duncan *et al.*, 2001; Garcia-Echeverria *et al.*, 2000; Luke *et al.*, 2000; Stoll *et al.*, 2001). Eine Alternative zur Inhibition der p53-HDM2-Proteininteraktion könnten enzymatische Inhibitoren der HDM2 E3 Ubiquitin-Ligase darstellen (Lai *et al.*, 2001). In HPV infizierten Cervixkarzinoma Zellen kann die Ubiquitinylierung von p53 durch die E6AP E3 Ligase über die Inhibition des p53-E6 Komplexes verhindert werden (Butz *et al.*, 2000). Bei beiden Ansätzen beruht die Wirkung in der Tumorzelle auf der Inhibition des Abbaus von p53 durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Freedman und Levine, 1998; Maki *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2000). Auf transkriptioneller Ebene kann die Expression von HDM2 bzw. E6 durch unspezifische Inhibitoren der Transkription wie Roscovitin (Lu *et al.*, 2001) verringert und so eine p53 Antwort induziert werden. Daneben bieten die Interaktionen von p53 und HDM2 mit Proteinen des p53 Netzwerks wie **p14^{ARF}** weitere potentielle Ansatzpunkte für eine Tumorthherapie. Die Interaktionsfläche zwischen p14^{ARF} und HDM2 wurde kürzlich näher charakterisiert (Bothner *et al.*, 2001) und ermöglicht die Suche nach niedermolekularen Mimetika, die wie kurze p14^{ARF} Peptide die Ubiquitinylierung und den Abbau von p53 inhibieren (Midgley *et al.*, 2000). Weitere Ansätze zur Reaktivierung von p53 beruhen auf der **Modulation der Lokalisation** von p53 und HDM2, die durch nukleäre Import- und Export-Signalsequenzen (NLS/NES) reguliert wird (Vousden und Woude, 2000). Der Export von p53 aus dem Nukleus ist eine Voraussetzung für seinen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Freedman und Levine, 1998). In bestimmten Tumorzellen liegt wildtyp p53 cytoplasmatisch im Komplex mit Mortalin (mot-2) und damit inaktiviert vor (Moll *et al.*, 1996; Wadhwa *et al.*, 1998; Wadhwa *et al.*, 2002). MKT-077, ein Inhibitor der p53-mot-2-Interaktion, setzt p53 aus dem Komplex mit mot-2 frei und reaktiviert die nukleäre transkriptionelle Funktion von p53 (Wadhwa *et al.*, 2000). Leptomycin B (LMB) moduliert die zelluläre Lokalisation von p53 bzw. HDM2 durch Inhibition des nukleären Exportins CRM-1. Als Folge davon akkumuliert p53 im Nukleus und wird nicht dem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt, so daß Neuroblastoma und Cervixkarzinoma Zellen p53-vermittelt abgetötet werden (Hietanen *et al.*, 2000; Lain *et al.*, 1999; Smart *et al.*, 1999).

3.8 Röntgenkristallographie

Zur Bestimmung der hochaufgelösten Struktur von Makromolekülen ist die Röntgenkristallstrukturanalyse die Methode der Wahl. Das Prinzip der Strukturaufklärung durch Röntgenkristallographie beruht auf der **Interpretation von Elektronendichten durch Atommodelle**. Daneben findet für Proteine mit weniger als 30 kD die NMR-Spektroskopie Anwendung, die außerdem Informationen über Teilaspekte der Struktur und die Dynamik von Makromolekülen in Lösung liefern kann. Seit den Pionierarbeiten von Perutz und Kendrew an Hämoglobin und Myoglobin hat die Zahl der durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Proteinstrukturen beständig zugenommen, so daß mittlerweile in der Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000) mehr als 13000 Protein-Kristallstrukturen zugänglich sind (Stand März 2002). Insbesondere die Kombination von molekularbiologischen Techniken zusammen mit der Weiterentwicklung von Hard- und Software hat zur Auswertung der Daten diese Entwicklung in den letzten Jahren dramatisch beschleunigt. Auf eine eingehende Beschreibung der Theorie und Methoden der Röntgenstrukturanalyse wird an dieser Stelle verzichtet. Im folgenden wird das Prinzip der Röntgenstrukturanalyse kurz erläutert; für eine detaillierte Beschreibung sei auf entsprechende Lehrbücher verwiesen (Drenth, 1999; McRee, 1999).

Kristallisation von Proteinen

Der entscheidende Schritt der Röntgenstrukturanalyse von Proteinen besteht darin, durch geordnete Präzipitation Kristalle von ausreichender Größe und Qualität zu erhalten. Dazu wird die Proteinlösung z.B. durch Zugabe von Salz (Aussalzen) oder Polyethylenglycol langsam zur Übersättigung gebracht. Mittlerweile wird am häufigsten die **Dampfdiffusionsmethode** eingesetzt (McPherson, 1976), bei der das Protein mit einem Fällungsmittel versetzt und in eine Umgebung gebracht wird, in der sich über die Dampfphase ein Gleichgewicht mit einer höher konzentrierten Reservoirolösung einstellt, so daß die Proteinlösung langsam aufkonzentriert wird. Die Kristallisation eines Proteins hängt von vielen Parametern wie: Proteinkonzentration, Art und Konzentration des Fällungsmittels, pH-Wert, Temperatur und dem Zusatz von Additiven ab. Zur Suche nach Kristallisationsbedingungen werden statistische **faktorielle Screening-Ansätze** verwendet (Carter und Carter, 1979). Kristalle sind aus einer regelmäßig wiederholten Anordnung von Einheitszellen aufgebaut. Die Einheitszellen sind durch die Länge ihrer drei Achsen a , b und c und die eingeschlossenen Winkel α , β und γ charakterisiert. Weist der Kristall eine Symmetrie auf, so liegen die einzelnen Einheiten (asymmetrische Einheiten) gemäß den Symmetrioperationen mehrfach in der Einheitszelle vor. Die Anzahl der Moleküle in der Einheitszelle muß dabei jedoch nicht mit der Anzahl der asymmetrischen Einheiten übereinstimmen.

Beugung von Röntgenstrahlen

Bestrahlt man ein Atom mit Röntgenstrahlen, so führt das oszillierende elektromagnetische Feld der Röntgenstrahlen zu Schwingungen der Elektronen im Atom. Die oszillierenden Elektronen senden mit einer Phasenverschiebung von 180° Strahlung derselben Wellenlänge aus (kohärente Streuung). Die Streuung an Atomen

ist abhängig von der Zahl und Position der Elektronen im Atom und wird durch den atomaren Formfaktor $f(\mathbf{S})$ beschrieben.

$$f(\mathbf{S}) = \int_{\mathbf{r}} \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{r}$$

$\rho(\mathbf{r})$ beschreibt die Elektronenwolke am Ort \mathbf{r} , \mathbf{S} den Differenzvektor zwischen einfallendem und gestreutem Strahl. Die Streuung an einer Einheitszelle des Kristalls ergibt sich aus dem Streubeitrag aller Atome in der Einheitszelle und wird durch den **Strukturfaktor** $F(\mathbf{S})$ beschrieben, bei dem über alle Atome i summiert wird.

$$F(\mathbf{S}) = \sum_i f_i \exp(2\pi i \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{S})$$

Die Summe aller von den Einheitszellen in einem Kristall gestreuten Wellen ergibt die Welle, die vom gesamten Kristall gestreut wird. Eine Einheitszelle an der Kristallposition $\mathbf{r} = u\mathbf{a} + v\mathbf{b} + w\mathbf{c}$ (u, v, w ganze Zahlen, $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$ Kristallvektoren) hat den Streubeitrag

$$F(\mathbf{S}) \times \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S})$$

Der Kristall hat somit den Streubeitrag

$$K(\mathbf{S}) = F(\mathbf{S}) \times \sum_i \exp(2\pi i u \mathbf{a} \cdot \mathbf{S}) \times \sum_u \exp(2\pi i v \mathbf{b} \cdot \mathbf{S}) \times \sum_v \exp(2\pi i w \mathbf{c} \cdot \mathbf{S})$$

Die einzelnen Streubeiträge löschen sich aufgrund der großen Zahl der Einheitszellen fast immer aus (Addition der Vektoren im Argand Diagramm), es sei denn, a^*S , b^*S , c^*S sind ganze Zahlen, die Millerindizes h, k, l . Wenn diese Lauebedingungen erfüllt sind, streuen alle Einheitszellen in Phase, und die Amplitude der gestreuten Welle ist proportional zum Strukturfaktor $F(\mathbf{S})$ und der Anzahl der Einheitszellen im Kristall. Die Streuung an einem Kristall verhält sich so, als ob der Strahl an den Gitterebenen des Kristalls reflektiert würde. Diese Gitterebenen können mit den Millerindizes aus den Lauebedingungen beschrieben werden, der Strahl wird daher von der Ebene (hkl) reflektiert. Daraus ergibt sich das **Braggsche Gesetz**, wobei λ die Wellenlänge des einfallenden Strahls, θ der Reflexionswinkel an der Gitterebene und d der rechtwinklige Abstand der Gitterebenen voneinander sind.

$$2d \sin \theta = \lambda$$

Die Millerindizes hkl bilden das so genannte reziproke Gitter. Dabei entspricht ein Gitterpunkt hkl im reziproken Gitter einer Schar von Gitterebenen im realen Gitter mit Indizes hkl und umgekehrt. Der Vektor hkl im reziproken Gitter hat die Länge $1/d_{hkl}$, wobei d_{hkl} der Abstand der Gitterebene hkl im realen Gitter ist. Es kann gezeigt werden, daß das reziproke Gitter dieselbe Symmetrie wie das Kristallgitter hat. Statt über alle Atome in der Einheitszelle zu summieren, kann über die gesamte Elektronendichte in der Zelle integriert werden. Dies ergibt für den Strukturfaktor

$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \int_{cell} \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{r}$$

Fouriertransformation ergibt

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_{cell} \mathbf{F}(\mathbf{S}) \exp(-2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{S}$$

Mit den Lauebedingungen für $\mathbf{r} \cdot \mathbf{S}$ erhält man über die fraktionalen Koordinaten der Einheitszelle x, y, z ($\mathbf{r} = x\mathbf{a} + y\mathbf{b} + z\mathbf{c}$)

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} \mathbf{F}(hkl) \exp(-2\pi i(hx + ky + lz))$$

Mit $F = |\mathbf{F}| \exp(i\alpha)$ erhält man schließlich

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} |F(hkl)| \exp(-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl))$$

Die Berechnung der **Elektronendichte** in der Einheitszelle erfolgt somit aus den Beiträgen der Strukturaktoren, $|F(hkl)|$, und der Phasen $\alpha(hkl)$. Die Beiträge der Strukturaktoren erhält man aus den gemessenen Intensitäten $I = a|F|^2$. a ist eine Konstante, die verschiedene Einflüsse wie Absorption, Datensammlung, Wellenlängenabhängigkeit der Streuung, Polarisation etc. beinhaltet. Die Phasen α können jedoch nicht direkt aus dem Streubild erhalten werden, sondern müssen auf indirektem Weg erzeugt werden (**Phasenproblem in der Kristallographie**). Das Phasenproblem wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des molekularen Ersatz (**molecular replacement**) gelöst. Die Methode des molekularen Ersatzes verwendet Phasen eines bekannten Moleküls als Suchmodell beruhend auf der Überlagerung der Struktur des Suchmodells mit der zu lösenden Struktur. Das Suchmodell wird in der Elementarzelle durch zwei Operationen optimal positioniert: Eine Rotationssuche ermittelt die relative Orientierung der bekannten zur gesuchten Struktur, eine Translationssuche die notwendige Verschiebung, um beide Moleküle zu überlagern. Die Pattersonsuche faktorisiert das sechsdimensionale Suchproblem in zwei dreidimensionale Suchen. Sie verwendet als Grundlage die Pattersonfunktion (Autokorrelation der Elektronendichte):

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_h |F(h)|^2 \cos(2\pi \mathbf{u} \cdot \mathbf{h}) = \int_{\mathbf{r}_1} \rho(\mathbf{r}_1) \times \rho(\mathbf{r}_1 + \mathbf{u}) d\mathbf{v}$$

\mathbf{h} beschreibt einen Vektor im reziproken Raum, \mathbf{u} einen Vektor im Pattersonraum. Zur Berechnung der Pattersonfunktion sind im Gegensatz zur Berechnung der Elektronendichte nicht der Betrag des Strukturaktors, sondern sein Quadrat und somit nur die gemessenen Intensitäten, nicht jedoch die Phasenwinkel der Strukturaktoren notwendig. Als Autokorrelationsfunktion enthält die Pattersonfunktion nur Informationen über die relativen Abstände der Atome innerhalb einer Elementarzelle. Die intramolekularen Vektoren sind nur von der Orientierung des Moleküls abhängig, während die intermolekularen Vektoren sowohl von der Orientierung als auch von der Position des Moleküls in der Elementarzelle abhängen. Daher werden zunächst in

einer dreidimensionalen Rotationssuche die intramolekularen Vektoren beider Moleküle zur Deckung gebracht und anschließend die intermolekularen Vektoren beider Pattersonfunktionen in einer Translationssuche korreliert. Für die Pattersonsuche ist eine hohe Homologie der unbekanntes Struktur zum Modell notwendig. In der vorliegenden Arbeit war eine homologe Struktur des betrachteten Moleküls bereits verfügbar (Kussie *et al.*, 1996).

Modellbau und Verfeinerung

Bei der Verfeinerung des Modells zur Strukturlösung wird der **Energieterm** minimiert.

$$E = E_{geom} + W_a \sum_h \left| |F_{obs}(h)| - k |F_{calc}(h)| \right|^2$$

Der Energieterm besteht aus einem geometrischen Energieterm E_{geom} des Modells und einem kristallographischen Energieterm. Der Parameter W_a skaliert beide Terme auf eine vergleichbare Größenordnung. Die Anzahl der Messdaten reicht zumeist nicht aus, um alle Freiheitsgrade der Molekülgeometrie ausreichend festzulegen. Daher wurde der geometrische Term empirisch aus hochaufgelösten Strukturen kleiner Moleküle gewonnen und beinhaltet Terme für typische Bindungslängen, Bindungswinkel, van der Waals Wechselwirkungen etc., um eine realistische Geometrie des Proteins zu gewährleisten (Engh und Huber, 1991). Darüber hinaus sind gerade in der Anfangsphase der Verfeinerung bei typischen Auflösungen von 2-3 Å die Atompositionen nicht immer genau bestimmbar. Für eine Kontrolle des Verlaufs der Verfeinerung werden die Messdaten in einen Arbeitsdatensatz und einen Testdatensatz aufgeteilt. Die automatische Verfeinerung erfolgt nur mit dem Arbeitsdatensatz. Als Maß für die Verfeinerung wird bei jedem Verfeinerungsschritt der **R-Faktor** berechnet.

$$R = \frac{\sum_h \left| |F_{obs}| - |F_{calc}| \right|}{\sum_h |F_{obs}|}$$

Die Berechnung des freien R-Faktors, R_{free} , (Brünger, 1992a) mit dem Testdatensatz erlaubt eine Aussage über die Qualität der Verfeinerung: Fällt R_{free} parallel mit dem R-Faktor, so ist der kristallographische Term ausreichend berücksichtigt und es wird nicht lediglich die Geometrie des Moleküls optimiert. Zusätzlich zum Energieterm kann nach dem *maximum likelihood target* Algorithmus verfeinert werden. Hierbei wird bei der Verfeinerung jedes einzelnen Atoms berücksichtigt, daß die anderen Atome des Proteins keine starre Position einnehmen, sondern eine gewisse Beweglichkeit besitzen, so daß es nicht nur eine einzige minimierte Position für das jeweilige betrachtete Atom geben kann, sondern diese abhängig vom Verhalten der umliegenden Atome ist.

3.9 Ziele und Inhalte

Zu Beginn dieser Arbeit war das **allosterische Modell** das allgemein akzeptierte Modell der Regulation der p53 DNA-Bindung (Ahn und Prives, 2001). Gemäß dem Modell der allosterischen Regulation (*p53 autoregulation*) (Hupp und Lane, 1994a) interagiert die CTRD des p53 Proteins im latenten Zustand mit der p53 DBD und hält sie in einer für die DNA-Bindung inaktiven Konformation. Basierend auf dem allosterischen Modell und C-terminalen p53 Peptiden wurden verschiedene Ansätze zur Entwicklung neuartiger Krebstherapien verfolgt (Hupp *et al.*, 2000; Selivanova *et al.*, 1998; Wiman, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen **Mechanismen der Regulation** von p53 biochemisch und strukturell untersucht werden und die Interaktion der p53 DBD mit C-terminalen Peptiden auf molekularer Basis charakterisiert werden. Für Interaktionsstudien und strukturelle Untersuchungen wurde ein Verfahren zur *In-Vitro*-Faltung und Reinigung der p53 DBD etabliert (Kapitel 5.1). Biochemische und biophysikalische Untersuchungen mit diesem und weiteren p53 Konstrukten machten zusammen mit im Verlauf der Arbeit publizierten Experimenten (Ayed *et al.*, 2001; Espinosa und Emerson, 2001; Friedler *et al.*, 2002) aber deutlich, daß die Grundvoraussetzungen des allosterischen Modells höchstwahrscheinlich nicht zutreffen (Klein *et al.*, 2001b). Vielmehr scheint die Latenz von p53 auf eine Interferenz der unspezifischen DNA-Bindung des C-Terminus mit der spezifischen DNA-Bindung zurückzuführen sein (Anderson *et al.*, 1997) (Kapitel 5.2).

Für das vollständige tetramere p53 Protein sind bis heute nur beschränkte biophysikalische und strukturelle Daten bekannt. Um näheren Einblick in die **Stabilität und Struktur-Funktionsbeziehungen** von p53 zu gewinnen, wurden die in dieser Arbeit präparierten monomeren p53 Konstrukte, die die DBD beinhalten, biochemisch und biophysikalisch im Vergleich zu tetrameren p53 Konstrukten (Bell, 2001) analysiert. Die geringe strukturelle Stabilität von p53 zusammen mit der Existenz großer unstrukturierter Bereiche außerhalb der gefalteten Domänen legen die Schlußfolgerung nahe, daß p53 der Klasse von nativen, unstrukturierten Proteinen zugeordnet werden kann (Bell *et al.*, 2002b) (Kapitel 5.1).

Im Verlauf der Untersuchungen zur Regulation der DNA-Bindung wurden NMR-Experimente mit der p53 DBD durchgeführt, die die erste experimentelle Identifikation der **Dimerisierungs-Kontaktfläche** zwischen zwei p53 DBDs erlaubten, welche in Lösung kooperativ an ihre Consensus-DNA-Bindungsstelle gebunden sind (Klein *et al.*, 2001b). Die Dimerisierungs-Kontaktfläche wird von der kurzen H1 Helix gebildet, für die eine Rolle in der Interaktion der Domänen postuliert wurde (Cho *et al.*, 1994). Basierend auf den NMR-Daten konnte ein konsistentes Modell des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes erstellt werden. In einer kürzlich erschienen Publikation wurden diese Ergebnisse unabhängig reproduziert und bestätigt (Rippin *et al.*, 2002c). Die Beobachtung, daß inaktivierende p53 Mutationen häufig die H1 Helix betreffen (Walker *et al.*, 1999) und daß der mutmaßliche p53 Inhibitor 53BP2 über einen seiner *ankyrin repeats* an diese Region bindet (Gorina und Pavletich, 1996), unterstützen das Modell weiter. Es kann daher angenommen werden, daß die experimentell identifizierte Region die tatsächliche Kontaktfläche der DBDs auch im tetrameren p53-DNA-Komplex darstellt (Kapitel 5.3). Die biologischen Implikationen dieser Ergebnisse wurden mittlerweile in einem Review diskutiert (Chene und Jahnke, 2002). Basierend auf der Symmetrie des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes wird ein **“Sandwich”-artiges Modell** für den intakten tetrameren p53-DNA-Komplex diskutiert, das dadurch charakterisiert wird, daß

tetrameres p53 als Dimer aus Dimeren an zwei getrennte, gegenüberliegende Consensus-DNA-Bindungsstellen binden kann. p53 hat nach diesem Modell eine inhärente Fähigkeit zur Verknüpfung zweier DNA Stränge, wie es z.B. für transkriptionell aktive Komplexe in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet wurde (Stenger *et al.*, 1994). Das Sandwich-artige Modell vereint die Symmetrie der p53 TD mit den strukturellen Anforderungen der p53 Bindung an eine palindrome Consensus-DNA-Bindungsstelle ohne dafür eine konformationelle Änderung bei DNA-Bindung vorauszusetzen (Waterman *et al.*, 1995) (Kapitel 6.3.2).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte zudem erstmals eine **biochemische und biophysikalische Charakterisierung der p63 DBD** im Vergleich zur p53 DBD (Klein *et al.*, 2001a). Bis auf die Tatsache, daß die p63 DBD ca. 60% Identität mit der p53 DBD und eine besonders hohe Konservierung von Resten aufweist, die die DNA-bindende Konformation stabilisieren (Arrowsmith, 1999; Schmale und Bamberger, 1997; Yang *et al.*, 1998), war bisher nur wenig über die biochemischen Eigenschaften der p53 homologen Domäne bekannt. Im Gegensatz zu p53 ist die freie p63 DBD nicht in der Lage, kooperativ an spezifische p53 Consensus-Bindungsstellen zu binden. Im artifiziell dimerisierten Zustand allerdings binden GST-p63 DBD und GST-p53 DBD mit vergleichbarer Affinität und Spezifität an natürlich vorkommende p53 Consensus-Bindungsstellen, was dafür spricht, daß sich die beiden DBDs in bezug auf ihre Dimerisierungsfähigkeit und kooperative DNA-Bindungsaktivität, nicht aber in bezug auf die DNA-Spezifität unterscheiden. Kalorimetrische Untersuchungen und Harnstoff-Gleichgewichtsentfaltung zeigten, daß die p63 DBD im Vergleich zu p53 thermodynamisch bemerkenswert stabilisiert ist (Kapitel 5.4). Ein auf der Basis eines Sequenz-Alignments und der Kristallstruktur der p53 DBD für die p63 DBD erstelltes Homologie-Modell ermöglicht es, zusammen mit der beschriebenen Identifikation der Dimerisierungs-Kontaktfläche von p53, die fehlende Kooperativität der p63 DBD auf molekularer Basis zu verstehen (Kapitel 6.4).

Aufgrund der Bedeutung von p53 und HDM2 bei der Tumorsuppression bzw. Tumorentstehung sind Ansätze zur Inhibition der **p53-HDM2-Interaktion** von großem Interesse für die Entwicklung targetspezifischer Tumortheraeutika (Moll und Zaika, 2000; Stoll *et al.*, 2001; Zhang und Wang, 2000). Daher wurde zum Abschluß dieser Arbeit humanisiertes XDM2 aus *Xenopus laevis*, das über eine humane p53 Bindungsstelle verfügt, im Komplex mit einem hochaffinen NVP-Peptidantagonisten (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000) kristallisiert, der über unnatürliche Aminosäuren verfügt. Zusammen mit der bekannten Struktur des HDM2-p53-Peptidkomplexes (Kussie *et al.*, 1996) kann die bis 2.0 Å aufgelöste **Kristallstruktur des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes** einen Ausgangspunkt für das strukturbasierte rationale Design von niedermolekularen Inhibitoren der p53-HDM2-Interaktion bilden (Kapitel 5.5).

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

Geräte

ABI Prism System 310 + 373 Genetic Analyzers	Perkin Elmer, Weiterstadt
ÄKTA-Explorer, ÄKTA-FPLC, ÄKTA-Prime	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
BioMax TransScreen Röntgenfilmkassette	Kodak, Cambridge, UK
CO ₂ Brutschrank	Kendro Laboratory Products, Hanau
Confocor I Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer	Carl-Zeiss, Oberkochen, & Evotec, Hamburg
Curix HT-330U Röntgenfilmentwickler	AGFA, Köln
Digitaler Mikroskop-Kamera-Aufsatz DX30	Kappa opto-electronics, Gleichen
DynaPro Dynamic Light Scattering Instrument	Protein Solutions, Lakewood, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektronische Fein- + Analysenwaagen	Sartorius, Göttingen, Mettler Toledo, Gießen
Elektrophoresekammer für Agarosegele	H. Hölzel Laborgeräte, Dorfen
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Biometra, Göttingen
Elektrophorese-Spannungsversorgung	H. Hölzel Laborgeräte, Dorfen
Elektrophorese-Spannungsversorgung EPS3500	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ELISA Reader 400 ATC	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop DX60 mit Kameraaufsatz	Olympus, Hamburg
FluoroMax-2 Spex Fluorimeter + Software	Jobin Yvon, Horiba, Edison, USA
FPLC-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Fraktionssammler FRAC-100 + SuperFrac	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
French Pressure Cell Press + FA-031 Zelle (40K)	Thermo Spectronic, Cambridge, England
Gasbrenner Fireboy	Integra Biosciences, Fernwald
Gaulin Micron Lab 40 Lab Homogenisator	APV Homogeniser, Lübeck
Gel Print 2000 i Geldokumentationssystem	MWG Biotech, Ebersberg
Gelelektrophoresesystem Protean II xi	Biorad, München
Geltrockner Model 543 + 583 mit Kühlfalle	Biorad, München
GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler	Perkin Elmer, Weiterstadt
Gynkotec HPLC System	Dionex, Idstein
HiLoad Pumpe P-50 + Peristaltische Pumpe P1	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Imageplate Detektor	Marresearch, Hamburg
Imaging Densitometer GS-700	Biorad, München
Inverses MZ12 Stereo-Mikroskop mit KL1500 LCD	Leica, Solms
J715-CD-Spektropolarimeter, PTC-351S Peltier-Unit	Jasco, Tokyo, Japan
Kombischüttler KL2	E. Bühler, Hechingen
Kühlbrutschrank	Rubarth Apparate, Hannover
Laborzentrifuge Varifuge 3.0R + 15R	Kendro Laboratory Products, Hanau
Laminar Flow Werkbank	Prettl, Bempflingen
Leuchttisch	Neolab, Heidelberg
Lumi-Imager F1 Workstation + Lumianalyst Software	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lyophilisator mit Ölpumpe	Kendro Laboratory Products, Hanau
Magnetrührer REO	IKA, Staufen
Mikrotiterplattenschüttler MTS4	IKA, Staufen
Mikrowelle	Toshiba, München
Milli-Q Water Purification System	Millipore, Eschborn
Nano N-DSC II Differential Scanning Kalorimeter	CSC, American Fork, USA
Optima XL-A Analytical Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, München
pH Meter 535	WTW, Ft. Myers, USA
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Precitherm Wasserbad	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Präzisionsküvetten aus Suprasil Quarzglas 1-10 mm	Hellma, Müllheim
Provario Ultrafiltrationssystem	Pall Filtron, Dreieich
REC112 Schreiber	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Refraktometer	Leica, Solms
Röntngenerator mit Drehanode RU-300	Rigaku, Woodlands, USA
Rotoren SS34, GSA, GS-3 für Sorvall RC-5B	Kendro Laboratory Products, Hanau
Sonifier Cell Disruptor B15	Branson, Heusenstamm
Sorvall RC-5B Kühlzentrifuge	Kendro Laboratory Products, Hanau
Spectra Fluor Plus	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
SpeedVac Vakuumkonzentrator mit Ölpumpe	Thermo Savant, Holbrook, USA
Spektrophotometer Uvikon 933	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Storm 860 Phosphorimager + Software	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Taumler Rockomat	Integra Biosciences, Fernwald
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge OTD65B mit 75Ti + T865 Rotoren	Kendro Laboratory Products, Hanau
Ultraturrax T25 Basic	IKA, Staufen
Ultrazentrifuge TL 100 mit TLA 100.3 Rotor	Beckmann Coulter, München
Umkehrlichtmikroskop für Zellkultur	Leica, Solms
Uvicord SII + UV-1 UV-Monitor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
VP-ITC Isothermal Titrationskalorimeter	MicroCal, Northhampton, USA
Western Blot Elektrophorese Apparatur	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien waren, so weit nicht anders angegeben, von höchst möglichem Reinheitsgrad (p.A.) und wurden von Merck Eurolab (Darmstadt), Sigma Aldrich (Irvine, UK) und Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) bezogen. Biochemische Reagenzien wurden von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) bezogen.

Agarose MP	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ampicillin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ampuwa-Wasser	Fresenius, Bad Homburg
Antifoam SE-35	Sigma Aldrich, Irvine, UK
Bacto Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit, USA
Benzamidin	Sigma Aldrich, Irvine, UK
Bio-Express-1000 Medium (U- ¹³ C,-U- ¹⁵ N)	Cambdrige Isotope Laboratories, Andover, USA
Bio-Express-Min Medium (U- ¹³ C,-U- ¹⁵ N)	Cambdrige Isotope Laboratories, Andover, USA
Bradford Biorad Protein Assay Reagent	Biorad, München
Bromphenolblau S	Serva, Sigma Aldrich, Irvine, UK
¹³ C ₆ -D-Glucose (>98%)	Martek Biosciences, Columbia, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Sigma Aldrich, Irvine, UK
D ₂ O	Martek Biosciences, Columbia, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Irvine, UK
Dithiothreitol	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ethanol	Merck Eurolab, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Sigma Aldrich, Irvine, UK
Glutaraldehyd in Wasser (25% (v/v))	Sigma Aldrich, Irvine, USA
Glutathion	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Glycerol (99%)	Sigma Aldrich, Irvine, UK
Guanidiniumhydrochlorid (GdnCl)	Sigma Aldrich, Irvine, UK
Harnstoff	Riedel de Haen, Seelze
HPLC-Wasser	Merck Eurolab, Darmstadt
Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure (HEPES)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Kanamycin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
L-Arginin	Sigma Aldrich, Irvine, UK
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
MEM Vitaminlösung	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Irvine, UK
Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
15 N-Ammoniumchlorid (>98%)	Martek Biosciences, Columbia, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Irvine, USA
NuSieve GTG Low Melting Agarose	Biozym, Oldendorf
Phosphate-buffered Saline (PBS), Puffer, 10x	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Phosphate-buffered Saline (PBS), Puffer, 1x	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Phosphate-buffered Saline (PBS), Tabletten	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate-buffered Saline (PBS), PBS Tween	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
PCR dNTP Nucleotide-Mix	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Polyethylenglykol 2000-8000 (PEG 2000-8000)	Fluka, Sigma Aldrich, Irvine, UK
Polyethylenglykol 40000 (PEG 40000)	Serva, Sigma Aldrich, Irvine, UK
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich, Irvine, UK
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma Aldrich, Irvine, UK
Protein Gel Mix (Acrylamid, 2.6%Bisacrylamid)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Redivue [γ - 32 P]-Adenosintriphosphat 9.25 MBq	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Roti-Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30% Acryl-, 0.8% Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Sea Plaque GTG Low Melting Agarose	Biozym, Oldendorf
SuRE/Cut Buffer A, B, H, L, M	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
TAE Puffer, 10x	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
TBE Puffer, 10x	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Irvine, UK
TG Puffer, 10x	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
TG-SDS Puffer, 10x	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Trimeprazin	Sigma Aldrich, Irvine, UK
TRIS-(2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP)	Pierce, Rockford, USA
TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma Aldrich, Irvine, UK
Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)	Sigma Aldrich, Irvine, UK

Molekularbiologische und proteinchemische Kits

Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Biotin Protein Labeling Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Crystal Additive and Detergent Screen	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
Crystal Screen 1 & 2	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
DNA-Molekulargewichtsstandards III, V, VI, VII	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Fluorescein Protein Labeling Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
PCR Core Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

(Verbrauchs-) Materialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien stammten von Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen), Sarstedt (Nümbrecht) und Nalgene Nunc (Wiesbaden). Chromatographiematerialien wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Kristallisationszubehör von Hampton Research (Laguna Niguel, USA) bezogen.

Benzamidine Sepharose 6B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Biomax MR Röntgenfilm	Kodak, Cambridge, UK
Blue Sepharose 6 Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Butyl-Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Cellulose Phosphate	Whatman, Fairfield, USA
Chromatographie-Säulen Econo-Q	Biorad, München
Chamberslides (8 Well)	Nalgene, Rochester, USA
Chromatographie-Säulen XK	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Combitips	Eppendorf, Hamburg
DyeEx Spin Kit	Qiagen, Hilden
Filterpapier Mini Trans-Blot	Biorad, München
Filterpapier	Whatman, Fairfield, USA
Glutathione Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glutathione Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Greiner-Röhrchen aus Polypropylen (15 mL, 50 mL)	Greiner & Söhne, Nürtingen
Heparin Sepharose CL-6B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hi Trap Heparin 5 mL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hi Trap SP 5 mL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
High Load 26/60 Superdex 200 prep grade	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
High Load 26/60 Superdex 75 prep grade	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon P PVDF-Membran	Millipore, Bedford, USA
Kanülen und Spritzen	B. Braun, Melsungen
Kapillaren (0.2, 0.5, 0.75 mm)	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
Macrosep Centrifugal Concentrators 3, 10K	Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, USA
Microsep Centrifugal Concentrators 3, 10K	Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, USA
MicroAmp PCR-Tubes	Perkin Elmer, Weiterstadt
MicroSpin S-200 HR und S-400 HR Säulen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
NAP-10 Säulen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Parafilm	Americian National Can, Neenah, USA
pH Indikatorpapier	Merck Eurolab, Darmstadt
Plastik-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen	Beckmann, München
Poly-His Protein Purification Resin (Zn-NTA)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Q-Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Quickspin Columns Sephadex G50	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Slide-a-Lyzer Dialyserahmen	Pierce, Rockford, USA
SpectraPor Dialyseschläuche	Roth, Karlsruhe
SP-Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterilfilter Durapore für Medium	Millipore, Bedford, USA
Sterilfilter-Flaschenaufsatz	Nalgene, Rochester, USA
Sterilfilter für Spritzen (0.2 µM)	Schleicher & Schuell, Dassel
Superdex 75 HR 10/30	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
TSK G2000SW, TSK G3000SW	TosoH Biosep, Montgomeryville, USA
Ultrafree-0.5, -4, -15 Centrifugal Concentrators 5K	Millipore, Bedford, USA
Ultrafree-MC Centrifugal Filter	Millipore, Bedford, USA
Zellkultur-Einwegartikel	Becton Dickinson, Heidelberg

Enzyme, Proteine und Antikörper

Albumin aus Rinderserum, Fraktion V (BSA)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Benzonase (Endonuklease)	Merck Eurolab, Darmstadt
Casein Kinase II	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Combithek Eichproteine I für Chromatographie	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DnaK aus <i>E. coli</i>	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
f.l. p53 30 aktiv aus <i>E. coli</i>	Dr. S. Hansen, Roche Diagnostics GmbH
f.l. p53 latent aus <i>E. coli</i>	Dr. S. Hansen, Roche Diagnostics GmbH
f.l. p53 aktiv aus Sf9-Zellen	Dr. S. Hansen, Roche Diagnostics GmbH
Gel Filtration Calibration Kit (LMW, HMW)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lysozym	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Polynukleotid-Kinase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Protein Kinase C	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Protein-Molekulargewichtsstandard	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Pwo DNA-Polymerase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Rainbow Molekulargewichtsstandard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Restriktionsenzyme	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Thrombin	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Antikörper

PAb 1801 , aus Maus, monoklonal Spezifität: NTD von p53: AS 46-55	Novabiochem, Merck Eurolab, Darmstadt (Banks <i>et al.</i> , 1986)
CM-1 , aus Kaninchen, polyklonal Spezifität: multiple p53-Epitope	Oncogene, Merck Eurolab, Darmstadt (Vojtesek <i>et al.</i> , 1993)
DO-1 , aus Maus, monoklonal Spezifität: NTD von p53: AS 21-25	Novabiochem, Merck Eurolab, Darmstadt (Vojtesek <i>et al.</i> , 1992)
PAb 122 , aus Maus, monoklonal Spezifität: CTRD von p53: AS 372-378	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim (Rotter <i>et al.</i> , 1983)
PAb 421 , aus Maus, monoklonal Spezifität: CTRD von p53: AS 372-382	Novabiochem, Merck Eurolab, Darmstadt (Crawford und Harlow, 1982; Harlow <i>et al.</i> , 1981; Rotter <i>et al.</i> , 1983)
PAb 240 , aus Maus, monoklonal Spezifität: mutante p53 DBD Konformation AS 213-217 (RHSVV)	Novabiochem, Merck Eurolab, Darmstadt (Gannon <i>et al.</i> , 1990)
PAb 1620 , aus Maus, monoklonal Spezifität: wildtyp p53 DBD Konformation konformationelles Epitop	Novabiochem, Merck Eurolab, Darmstadt (Ball <i>et al.</i> , 1984; Cook und Milner, 1990; Milner <i>et al.</i> , 1987)
Penta-His Antikörper , aus Maus, monoklonal Spezifität: His ₅ -Epitop	Qiagen, Hilden
RGS-His Antikörper , aus Maus, monoklonal Spezifität: RGS(His) ₄ -Epitop	Qiagen, Hilden
Anti-GST Antikörper , aus Ziege, polyklonal Spezifität: multiple GST-Epitope	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Anti-Mouse-IgG-POD , aus Kaninchen, polyklonal Spezifität: Maus-IgG	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Anti-Rabbit-IgG-POD , aus Ziege, polyklonal Spezifität: Kaninchen-IgG	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Anti-Goat-IgG-POD , aus Kaninchen, polyklonal Spezifität: Ziegen-IgG	Novabiochem, Merck Eurolab, Darmstadt
Anti-Mouse IgG Cy-3 markiert , aus Ziege Spezifität: Maus-IgG	Dianova, Hamburg

DNA-Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) und TIB Molbiol (Berlin) bezogen. Am 5'-Ende TAMRA-markierte Oligonukleotide für FCS-Messungen wurden von MWG-Biotech bezogen.

Tab. 4.1: Übersicht über verwendete DNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Bemerkung
p63 max for	GCAGCGCCATATGGGATCCTCCACCTTCGATGCTCTCTCT	Klonierung p20020
p63 max rev	CGCGCTCGAGTTATCATGTCTATCTGGATACCATGTGTGTTCTG	Klonierung p20020
p63 min for	GCGCCATATGGGATCCTTCCAGCAGTCGAGCACCGCCAA	Klonierung p20019
p63 min rev	CGCGCTCGAGTTATCATGTCTATCTTTCATCCGCCTTC	Klonierung p20019
p53 30 for	GGGACAGCCAAGTCTGT	Klonierung p20014
p53 30 rev	CCGTCTCGAGTCACCTGCTCCCCCT	Klonierung p20014
p53 DD for	GGATCCCATATGAAGAAGAAACCCTGGATGG	Klonierung p20026
p53 DD rev	GCTGGAATGCATCTCGAGTTATCAGTCTGAGT	Klonierung p20026
TAT for	GATCTTATGGACGCAAGAAGCGCCGCCAGCGCCGCCGCGGAGGATCCC ATATGACTAGTGTCTGACTGAATGAC	Klonierung p20004
TAT rev	TCGAGTCATTTCAGTCGACACTAGTCATATGGGATCCTCCGCGGCGGCG CTGGCGGCGCTTCTTGCGTCCATAA	Klonierung p20004
Mia-1 for	ATTTATTTGCTTTGTGAGCGG	Sequenzierung pQE40
PQ40 rev	CATTACTGGATCTATCAACAGG	Sequenzierung pQE40
pGEX for	GTATATAGCATGGCCTTTGC	Sequenzierung pGEX
pGEX rev	CATGTGTCAGAGGTTTTCAC	Sequenzierung pGEX
PG for	AGCTTAGGCATGTCTAGGCATGTCTA	p53 Consensus Site (Hupp <i>et al.</i> , 1992)
PG rev	AGCTTAGACATGCCTAGACATGCCTA	p53 Consensus Site (Hupp <i>et al.</i> , 1992)
TL	AGCTTAGGCATGTCTAGGCATGTCTA	unspezifische DNA (Hupp <i>et al.</i> , 1992)
TL-CON	GGGACCTGCGAGGCAGTTGGCATTG	¼ p53 Consensus Site -
CON-Struktur	ATAAATGGGCAAGTCTAGGAA	½ p53 Consensus Site (Cho <i>et al.</i> , 1994)
CON 1x5A	GGAGGCACC	¼ p53 Consensus Site -
CON 1x5B	GGTGTCTCC	¼ p53 Consensus Site (Pavletich <i>et al.</i> , 1993)
CON 2x5	CCTAGACATGCCTAAT	½ p53 Consensus Site (El-Deiry <i>et al.</i> , 1992)
CON 4x5	CCTAGACATGCCTAGACATGCCTAAT	p53 Consensus Site (El-Deiry <i>et al.</i> , 1992)
bax for	TCGTCACAAGTTAGAGACAAGCCTCG	p53 Consensus Site (Miyashita und Reed, 1995)
cyclinG for	TCGGCACAAGCCCAGGCTAGTCCCG	p53 Consensus Site (Okamoto und Beach, 1994)
gadd45 for	TCGGAACATGTCTAAGCATGCTGCG	p53 Consensus Site (Kastan <i>et al.</i> , 1992)
mdm2 for	TCGGGTCAAGTTTCAGACACGTTCCG	p53 Consensus Site (Juven <i>et al.</i> , 1993)
p21 for	TCGGAACATGTCCCAACATGTTGCG	p53 Consensus Site (El-Deiry <i>et al.</i> , 1993)

* Experimentell generierte und natürliche p53 Consensus DNA-Oligonukleotide für EMSA, FCS, NMR und Kristallisationsexperimente (Bessard *et al.*, 1998; Wang und Prives, 1995). p53 Bindungsstelle: 5'-Pu Pu Pu C (A/T) (T/A) G Py Py Py-3'.

1	<u>MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDI</u>	DO1
51	<u>EQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSSVPSQ</u>	PAb1801
101	<u>KTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTQCPVQLWVDST</u>	
151	<u>PPPQTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGN</u>	
201	<u>LRVEYLLDRNTRFRHSVVVPYEPPEVGSDCSTTIHNYMCNSSCMGGMNRRP</u>	PAb240
251	<u>ILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPRDRRTEENLRKKGEPHHELP</u>	
301	<u>PGSTKRALPNNTSSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALEL</u>	
351	<u>KDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDS</u>	PAb122

Abb. 4.1: Sequenz von humanem p53. Die p53 DBD ist kursiv markiert. Ausgewählte Antikörperepitope sind unterstrichen und neben der Sequenz angegeben.

Plasmide

Zur Expression der p53 Konstrukte in *E. coli* wurden im Rahmen der Arbeit die folgenden Plasmide aus dem Plasmidstock von TR-BG5 (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) verwendet bzw. über PCR oder Umklonierung von DNA-Fragmenten aus den entsprechenden Vektoren kloniert. pQE40-Konstrukte beruhen auf einem modifizierten pQE40 Expressionsvektor (Qiagen) unter Kontrolle eines T5 Promoters (Bujard *et al.*, 1987; Stuber *et al.*, 1990); pGEX-Konstrukte beruhen auf einem pGEX-4T-1 Expressionsvektor (Pharmacia) unter Kontrolle eines *tac* Promoters (Smith und Johnson, 1988). Die Selektion erfolgte über 100 µg/mL Ampicillin. Alle pQE40 Plasmide wurden mit dem Repressorplasmid pUBS520 in die entsprechenden *E. coli* Stämme cotransfiziert. Die Selektion für pUBS520 erfolgte mit 50 µg/mL Kanamycin. pUBS520 umfaßt neben dem *lac I* Repressor das *dnaY* Gen, das für die in *E. coli* seltene Arginin-tRNA_{AGA/AGG} codiert (Brinkmann *et al.*, 1989). Proteine mit N-terminalen GST- bzw. His-Tags beeinhalteten einen zusätzlichen GSGH-Linker. Die Sequenz aller codierenden Regionen wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Das Plasmid pBluescript II SK⁺ (Stratagene) diente als unspezifische Kompetitor-DNA in DNA-Bindungstests.

Tab. 4.2: Übersicht über die verwendeten Expressionsplasmide. Die Position der entsprechenden Genprodukte bezogen auf p53 ist angegeben. Herkunft der Plasmide: SH: S. Hansen, RB: R. Busl-Schuller, CK: C. Klein.

Plasmid	Reste	Beschreibung	Tag	Vektor	MW	Herkunft
p17000	1-393	f.l. p53	-	pQE40	43.5	SH
p17007	94-312	p53 DBD	-	pQE40	24.6	SH
p17008	94-312	p53 DBD H175	-	pQE40	24.5	SH
p17009	94-312	p53 DBD W248	-	pQE40	24.6	SH
p17010	94-312	p53 DBD V138	-	pQE40	24.6	SH
p17011	94-312	p53 DBD A143	-	pQE40	24.6	SH
p11427	94-312	(His) ₆ -p53 DBD	RGS(His) ₆	pQE40	26.3	RB
p11433	94-312	p53 DBD-(His) ₆	RGS(His) ₆	pQE40	25.9	RB
p11432	94-312	p53 DBD-HA	HA	pQE40	26.0	RB
p20002	94-312	GST-p53 DBD	GST	pGEX-4T	51.2	CK
p11430	1-312	(His) ₆ -p53C312	RGS(His) ₆	pQE40	36.0	RB
p11420	40-312	1801-p53 DBD	-	pQE40	30.0	RB
p20015	94-393	N93p53	-	pQE40	33.8	CK
p11435	1-393	(His) ₆ -f.l. p53	RGS(His) ₆	pQE40	44.9	RB
p20011	1-363	(His) ₆ -f.l. p53 30	RGS(His) ₆	pQE40	41.9	CK
p20014	94-363	p53 DBD 30	-	pQE40	30.5	CK
p20016	1-393	GST-f.l. p53	GST	pGEX-4T	70.1	CK
p20020	114-349	p63 DBD max	-	pQE40	25.8	CK
p20019	141-322	p63 DBD min	-	pQE40	20.3	CK
p20021	114-349	GST-p63 max	GST	pGEX-4T	52.2	CK
p20022	141-322	GST-p63 min	GST	pGEX-4T	46.7	CK
p20004	-	TAT-Vektor	RGS(His) ₆	pQE40	-	CK
p20006	94-312	TAT-p53 DBD	RGS(His) ₆	pQE40	28.0	CK
p20018	94-312	TAT-p53 DBD W248	RGS(His) ₆	pQE40	28.0	CK
p20007	361-383	Tat-C-Peptid-2x	RGS(His) ₆	pQE40	9.1	CK
p20008	16-27	Tat-IP3-2x	RGS(His) ₆	pQE40	9.6	CK
p20009	1-393	Tat-f.l. p53	RGS(His) ₆	pQE40	46.9	CK
p20010	1-363	Tat-p53 30	RGS(His) ₆	pQE40	43.6	CK
p20012	94-363	Tat-p53 DBD 30	RGS(His) ₆	pQE40	33.8	CK
p20013	94-393	Tat-N93p53	RGS(His) ₆	pQE40	37.1	CK
p20026	318-393	Tat-p53DD	RGS(His) ₆	pQE40	12.0	CK

Peptide

Alle Polypeptide wurden von Dr. C. Seidel und Dr. A. Escherich (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) mit Standard Fmoc-Peptidchemie synthetisiert und durch präparative RP-HPLC gereinigt. Alle Peptide waren C-terminal amidiert. Die Identität und Reinheit wurde durch ESI-Massenspektroskopie bestätigt. Das p53 NVP-Peptid wurde von Dr. P. Dunten (Roche Nutley, USA) erhalten.

Tab. 4.3: Übersicht über die Peptide, die zur Untersuchung der Regulation der p53 DNA-Bindung in EMSA, FCS, ITC, NMR, Kristallisation, ELISA/HTRF und Biacore-Experimenten sowie zur Tat-vermittelten Peptidtransduktion verwendet wurden. *: N-terminale Biotinylierung; X: nor-Leucin statt Methionin; pS: Phosphoserin. O: Oregon Green. ^{a)} (Hupp *et al.*, 1995); ^{b)} (Muller-Tiemann *et al.*, 1998); ^{c)} (Wiman und Selivanova, 1999).

Name	Sequenz	Reste	MG [Da]	Bemerkungen
C1/V1	GSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKK -/*	361-382	2433/3043	C-terminales Peptid ^{a)}
C2/V0	LKSKKGQSTSRHKKL -/*	369-383	1725/2335	C-terminales Peptid
V2	GHSKTHSKRSKHRGQSAKSKLS *	-	3043	Peptidvariante
V3	KSCKKGQSTSRHKK *	-	2110	Peptidvariante
V4	LKSKKGQSTSRHKK *	-	2223	Peptidvariante
V5	KRCKKGQSTSRHKK *	-	2178	Peptidvariante
V6	RSRRGQSTSRHKK *	-	2194	Peptidvariante
V7	KSCKKGQSTSRHRR *	-	2166	Peptidvariante
V8	RSRRGQSTSRHRR *	-	2250	Peptidvariante
V9	KSCKGSRHKK *	-	1794	Peptidvariante
V10	KSCKGSGSGSGRHHK *	-	2139	Peptidvariante
V11	DSDDGQSTSEHDD *	-	2017	Peptidvariante
V12	HLKSKKRHHKLLX	-	1515	Peptidvariante
V13	HLKSKKGRHHKLLX	-	1572	Peptidvariante
V14	HLKSKKGSRRHHKLLX	-	1659	Peptidvariante
V15	HLKSKKGSRRHHKLLX	-	1716	Peptidvariante
V16	HLKSKKGSRRHHKLLX	-	1803	Peptidvariante
V17	KSCKRHKK	-	1038	Peptidvariante
T-C1	TAMRA-GSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKK	361-382	2862	TAMRA-Markierung
P2	LKSKKGQSTpSRHKKLXFKTEGPDpSD *	369-393	3585	Phosphorylierung
P3	LKSKKGQSTpSRHKKLXFKTEGPDpSD *	369-393	3665	Phosphorylierung
N1	APAAPTPAAPAPAPSWPLS	79-94	1769	N-terminales Peptid ^{b)}
N2	APAAPTPAAPAPAPSWPLS *	79-94	2180	N-terminales Peptid
P14	GSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTY	105-126	2777	Putativer Inhibitor ^{c)}
TAT1	OG ₄ YGRKKRRQRRRG ₄ HLKSKKGQSTSRHKKL	368-383	4255	Tat-wildtyp Peptid
TAT2	OG ₄ YGRKKRRQRRRG ₄ HLKSAKGQSTSAHKAL	368-383	4055	Tat-Kontroll-Peptid

Tab. 4.4: Übersicht über die Peptide, die zur Untersuchung der p53-MDM2-Interaktion durch ITC und für Cokristallisationsexperimente verwendet wurden. ^{a)} (Kussie *et al.*, 1996); ^{b)} (Wang *et al.*, 2001e); ^{c)} (Martin *et al.*, 1995); ^{d)} (Bottger *et al.*, 1996); ^{e)} (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000).

Name	Sequenz	Reste	MG [Da]	Bemerkung
p53	ETFSDLWKLLPEN	17-29	1591	N-terminales p53-Peptid ^{a)}
L22Y	ETFSDYWKLLPEN	17-29	1642	L22Y p53-Peptidvariante
p73	TTFEHLWSSLEPDS	13-26	1648	N-terminales p73-Peptid ^{b)}
E2F	EHVREDFSGLLPEE	385-398	1656	Putatives MDM2-bindendes E2F-Peptid ^{c)}
IP3	MPRFMDYWEGLN	16-27	1558	<i>phage display</i> optimiertes p53-Peptid ^{d)}
NVP	Ac-Phe-Met-Aib-Pmp-6-Cl-Trp-Glu-Ac ₃ C-Leu	19-26	1210	Struktur-basiert optimiertes IP3-Peptid mit unnatürlichen Aminosäuren ^{e)}

Bakterienstämme

Im Verlauf der Arbeit wurden die folgenden *E. coli* Bakterienstämme zur Klonierung und Proteinexpression eingesetzt. Der Genotyp der jeweiligen Stämme ist angegeben.

<i>E. coli</i>	Genotyp	Referenz
BL21	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>gal</i>	(Grodberg und Dunn, 1988; Sambrook und Russell, 2001)
HB101	<i>E. coli</i> K12 x <i>E. coli</i> B Hybrid F ⁻ <i>supE44 hsdS20</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>recA13 ara14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20</i> (Str ^r) <i>xyl-5 mtl-1 mcrB thi-1 leuB6 glnV44</i>	(Bolivar und Backman, 1979; Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)
UT5600	<i>E. coli</i> K12 F ⁻ <i>ara-14 proC14 leuB6 azi-6 lacY1 tsx-67 entA403 trpE38 secA6 rfbD1 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi-1 (ompT-fepC)266</i>	(Grodberg und Dunn, 1988)

Zelllinien

Für die beschriebenen Experimente zur Tat-vermittelten Peptidtransduktion wurden die folgenden adhärenenten human Tumorzelllinien verwendet.

Zelllinie	Herkunft	p53 Status	Referenz
MCF7	humanes Mammakarzinom	wildtyp	ATCC-Nr. HTB-22
HCT 116	humanes Colonkarzinom	wildtyp	ATCC-Nr. CCL-247
Saos-2	humanes Osteosarkom	negativ	ATCC-Nr. HTB-85
H1299	humanes Lungenkarzinom	negativ	(Takahashi <i>et al.</i> , 1992)

Kulturmedien

Alle Medien wurden nach Sambrook und Russell (2001) angesetzt und durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C und 2 bar sterilisiert bzw. sterilfiltriert. LB-Agar für LP-Platten wurde durch Zugabe von 15 g/L Bactoagar vor der Sterilisation hergestellt. Zur Selektion wurden den auf ca. 50°C abgekühlten Medien 100 µg/mL Ampicillin und 50 µg/mL Kanamycin zugesetzt. Zur Isotopenmarkierung wurden dem M9 Minimalmedium ¹⁵NH₄Cl und/oder ¹³C-Glucose zugesetzt.

LB-Medium:	10 g/L Bactotrypton 5 g/L Bactoyeast Extrakt 5 g/L NaCl
Fermentationsmedium:	3 g/L K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O 50 g/L Springer-Hefe, salzfrei 50 mg/L Synperonic Aminosäuren 3 g/L Glucose 740 mg/L MgSO ₄ x 7 H ₂ O
M9-Minimalmedium:	7.5 g/L Na ₂ HPO ₄ 2.5 g/L KH ₂ PO ₄ 0.24 g/L MgSO ₄ 2 g/L NH ₄ Cl 20 mL/L 50% (w/v) Glucose 4 mL/L Glycerin 100 µL/L Spurenelementlösung nach Maass 10 mL/L MEM Vitaminlösung

Puffer und Lösungen

Brij-Puffer	6% (v/v) Brij (pH 7.0), 1.5 M NaCl 60 mM EDTA
Solubilisierungspuffer	100 mM TRIS/HCl (pH 7.5), 6 M GdnCl/HCl 100 mM DTT
5x SDS-Probenpuffer	250 mM TRIS/HCl (pH 6.8), 5% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerin, 0.5% (w/v) Bromphenolblau 200 mM DTT
Trenngellösung für 12.5%-ige Gele	0.375 M TRIS/HCl (pH 8.8) 12.5% Acrylamid, 0.3% Bisacrylamid 0.1% (w/v) SDS + 0.015% (w/v) APS, 0.01% (v/v) TEMED
Sammelgellösung für 3%-ige Gele	0.125 M TRIS/HCl (pH 6.8) 3% Acrylamid, 0.1% Bisacrylamid 0.1% (w/v) SDS + 0.03% (w/v) APS, 0.02% (v/v) TEMED
10x TG-Laufpuffer	250 mM TRIS/HCl (pH 8.5), 1.92 M Glycin
10x TG-SDS-Laufpuffer	250 mM TRIS/HCl (pH 8.5), 1.92 M Glycin 1% (w/v) SDS
Coomassie -Färbelösung	30% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) konzentrierte Essigsäure 1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
Coomassie -Entfärbelösung	30% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) konzentrierte Essigsäure
2x DNA-Bindepuffer	40 mM HEPES (pH 8.0), 50 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ 20% (v/v) Glycerin, 5 mM DTT 0.1% (v/v) Triton X100, 1 mg/mL BSA
Gellösung für 4%-ige native Gele	30 mM TRIS (pH 8.4), 30 mM Borsäure, 4% Acrylamid, 0.15% Bisacrylamid 0.1% (v/v) Triton X100, 1 mM EDTA + 0.1% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED
10x DNA-Probenpuffer	4% (w/v) Bromphenolblau 50% (v/v) Glycerin
10xTAE-Laufpuffer	400 mM TRIS/Acetat (pH 8.0) 10 mM EDTA
TBS-Puffer	50 mM TRIS/HCl (pH 7.4) 150 mM NaCl
TE-Puffer (steril)	10 mM TRIS/HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA
10x PBS-Puffer	0.1 M Na ₂ HPO ₄ , 0.01 M KH ₂ PO ₄ (10x pH 7.0; 1x pH 7.4) 1.37 M NaCl, 27 mM KCl
10x TBE-Puffer	890 mM TRIS (pH 8.4), 890 mM Borsäure 20 mM EDTA

4.2 Methoden

Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Arbeiten wurden entsprechend Sambrook und Russell (2001) durchgeführt. DNA-Sequenzanalysen, Datenbankrecherchen und Vorhersagen von DNA- und Proteineigenschaften wurden mit dem GCG Wisconsin Programmpaket (Accelrys) innerhalb des Roche Sequence Analysis Web Interface durchgeführt. Für den statistischen Vergleich von Proteinsequenzen fand das Programm ProtParam (Appel *et al.*, 1994) Verwendung.

Kultivierung und Konservierung von E. coli Stämmen

E. coli Stämme wurden bei 37°C in LB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika auf LB-Agarplatten bzw. in Kulturröhrchen (Roller) oder Erlenmeyerkolben (Schüttler, 200 Upm) bis zur gewünschten Zelldichte kultiviert. Die Kulturen wurden jeweils mit einer Einzelkolonie von einer LB-Platte oder aus Glycerinkulturen inokuliert. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 595 nm. Dabei entspricht eine OD₅₉₅ von 1.0 einer Dichte von ca. 10⁹ Zellen/mL Kultur. Zur Langzeitkonservierung wurden 0.5 mL einer Übernachtskultur mit 0.5 mL Glycerin versetzt, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in 10 mM TRIS (pH 8.0) bestimmt. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1.0 einer Konzentration von 50 µg/mL dsDNA. Der Quotient OD_{260/280} als Maß für die Reinheit der DNA beträgt im Idealfall 2.0. Alternativ wurde die Konzentration im Agarose-Gel durch Vergleich mit der Intensität der Banden der Größenstandards abgeschätzt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die *polymerase chain reaction* (PCR) angewendet (Mullis und Faloona, 1987). Ein typischer 100 µL PCR-Amplifikationsansatz enthielt 1-10 ng cDNA bzw. Plasmid DNA als *template*, je 1 µM Oligonukleotid-Primer, 0.2 mM dNTP PCR Nucleotide Mix sowie 2.5-5 U Pwo DNA Polymerase in Pwo PCR-Puffer mit 2 mM MgSO₄. Beim Design der Oligonukleotid-Primer wurden die folgenden Punkte berücksichtigt: a) GC-Gehalt, Länge und Schmelzpunkt für beide Primer identisch; b) Schmelzpunkt ca. 65-75°C; c) Überlappung mit *template* 18-25 bp; d) Überhang mit singulärer Schnittstelle endet GC-reich; e) keine weiteren Primer-Bindungsstellen, keine Komplementarität, keine internen Sekundärstrukturen im Primer. Die PCR-Amplifikation erfolgte mit dem folgendem Programm in einem GeneAmp 2400 Thermocycler (Perkin Elmer):

Denaturierung	2 min 94°C	
Zugabe der Polymerase	<i>hot start</i>	
Denaturierung	30 sec 94°C	
Hybridisierung	30 sec 58-63°C	
Elongation	1 min 72°C	25-30 Zyklen
Elongation	5-10 min 72°C	

Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem Agarose-Gel analysiert. Zur präparativen Isolation der PCR-Produkte wurde der Reaktionsansatz nach Angaben des Herstellers mit MicroSpin S-400 HR und S-200 HR Säulchen (Pharmacia) aufgereinigt, einem Restriktionsverdau unterzogen und durch präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt.

Restriktionsanalyse

Zum Nachweis von Restriktionsschnittstellen und zur Gewinnung sequenzspezifisch geschnittener DNA-Fragmente zur Klonierung wurden ca. 200-500 ng Plasmid-DNA mit jeweils 5-10 U Restriktionsendonuklease unter den empfohlenen kompatiblen Pufferbedingungen für 1 h bei der empfohlenen Temperatur verdaut und anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten gemäß ihrer Größe erfolgte durch Elektrophorese mit 1%-igen (w/v) Agarose-Gelen (Trennbereich 0.5-10 kb). Dafür wurden 1 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer aufgekocht, bei ca. 60°C mit 50 µg Ethidiumbromid versetzt und in eine horizontale Gelapparatur (8 x 12.5 cm) gegossen. Nach dem Erstarren des Agarose-Gels wurden die Proben mit 10x DNA-Probenpuffer versetzt und durch Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 50-100 V aufgetrennt; als Elektrodenpuffer diente TAE-Puffer. Die aufgetrennten Banden wurden anhand ihrer Fluoreszenz durch das interkalierte Ethidiumbromid bei 254 nm identifiziert. Die Größe konnte durch Vergleich mit linearen DNA-Größenstandards abgeschätzt werden.

Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Einzelne DNA-Fragmente wurden nach einem Restriktionsverdau durch Gelelektrophorese mit *low melting* SeaPlaque Agarose-Gelen aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und anschließend mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurde das Agarose-Gel in Solubilisierungspuffer solubilisiert. Die DNA band anschließend unter Hochsalzbedingungen an ein Silicagel und wurde nach einem Waschschrift in 10 mM TRIS (pH 8.0) eluiert.

Ligation

Die Verknüpfung von isolierten DNA-Fragmenten aus Restriktionsansätzen durch die T4 DNA-Ligase erfolgte mithilfe des Rapid DNA Ligation Kits (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers. Typischerweise wurden ca. 200 ng verdaute Vektor-DNA mit einem fünffachen molaren Überschuß an verdauter Fragment-DNA (*insert*) für 15 min bei 20°C ligiert. Das Ligationsprodukt wurde anschließend wie unten beschrieben in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Zur Kontrolle erfolgte eine Ligation mit der jeweiligen Vektor-DNA ohne Insert.

Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Zellen

100 mL LB-Medium wurden mit 100 µL einer Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstamms mit pUBS520 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₅₉₅ von 0.5 kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien 15 min auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation bei 4°C geerntet (2500 g, 10 min). Die pelletierten Zellen wurden in 33 mL eiskaltem Puffer I (30 mM KAc (pH 5.8), 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin) resuspendiert und für 1 h auf Eis gehalten.

Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 8 mL Puffer II (10 mM MOPS (pH 6.8), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin) aufgenommen und auf Eis in Portionen zu 200 µL aliquotiert (Hanahan, 1983; Hanahan *et al.*, 1991). Die Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Transformation von E. coli

Zur Transformation mit rekombinanter DNA wurden 100 µL chemisch kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut, mit ca. 0.2-0.4 µg DNA aus Ligationsansätzen bzw. 0.01-0.1 µg Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert (Cohen *et al.*, 1972). Danach wurden die Zellen für 90 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µL LB-Medium wurden die Transformationsansätze 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und bis zur Entstehung gut sichtbarer Bakterienkolonien bei 37°C gehalten. Zur Analyse der Transformanden wurden 5-10 Einzelkolonien der Transformation vermehrt und die Plasmid-DNA isoliert. Ein analytischer Restriktionsverdau mit nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese gab Aufschluß über den Klonierungserfolg.

Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli

Plasmid-DNA für weiterführende Experimente wie PCR, Klonierung, Restriktions- und Sequenzanalyse wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden Bakterienzellen aus 1.5 mL einer Übernachtskultur unter alkalischen Bedingungen lysiert (Birnboim und Doly, 1979); zelluläre RNA wurde durch RNase A Zusatz abgebaut. Die Plasmid-DNA band anschließend unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamatrix und wurde zur Abtrennung von zellulären Bestandteilen stringent gewaschen. Die Elution erfolgte mit einer Konzentration von 100-200 ng/µL in 50 µL Nidrigsalzpuffer. Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde der QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

Sequenzierung

Die Sequenz aller verwendeten Plasmid-DNA-Konstrukte wurde durch Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) über den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide in einer zyklischen Sequenzierreaktion bestätigt. Hierzu wurde der Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Typischerweise wurden in 20 µL Reaktionsvolumen 500 ng Plasmid-DNA mit 5 pmol Sequenzierprimer und 4 µL Sequenziermix versetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem folgendem Programm in einem GeneAmp 2400 Thermocycler (Perkin Elmer):

Denaturierung	10 sec 94°C	
Hybridisierung	15 sec 55°C	
Elongation	4 min 60°C	25 Zyklen

Nicht eingebaute Nukleotide wurden über QIAquick DyeEx Säulchen nach Angaben des Herstellers entfernt. Die elektrophoretische Auftrennung und Fluoreszenzdetektion erfolgten mit einem Kapillarelektrophorese ABI Prism 310 System (Perkin Elmer).

Expressionsanalyse

Zur Analyse der Expression und zur Optimierung der Expressionsbedingungen (löslich vs. unlöslich) wurde der Einfluß verschiedener Parameter wie Zelldichte bei Induktion, IPTG-Konzentration, Temperatur sowie Induktionsdauer auf die Proteinexpression getestet. Dafür wurden jeweils 5 mL LB-Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C kultiviert. Bei der gewünschten OD₅₉₅ (0.3 bis 1.0) und der gewählten Temperaturen (20°C bis 37°C) erfolgte die Induktion mit IPTG (0.05-1.0). Zu Vergleichszwecken wurde eine Kultur nicht induziert. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden Aliquots, die einer Dichte von OD₅₉₅=2.5 entsprachen, abzentrifugiert (5000 Upm, 10 min). Die Bakterienpellets wurden anschließend in 250 µl 50 mM TRIS (pH 7.5), 50 mM EDTA resuspendiert und durch Ultraschall (3x 15 s auf Eis) mit einem Sonifier Cell Disruptor B15 (Branson) lysiert. Zellwandbestandteile und unlöslichen Proteine wurden durch Zentrifugation (12000 Upm, 10 min) abgetrennt und in 250 µl 50 mM TRIS (pH 7.5), 50 mM EDTA resuspendiert. Jeweils 10 µl des Lysats, des Überstands mit dem löslichen Protein und der resuspendierten unlöslichen Fraktion mit den *inclusion bodies* wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und durch SDS-PAGE analysiert.

Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden

Zur radioaktiven Markierung von Oligodesoxynukleotiden für DNA-Bindungstests (EMSA) mit [γ -³²P]-ATP wurden die entsprechenden p53-spezifischen komplementären DNA-Oligonukleotide mit Polynukleotidkinase an den 5'-Enden phosphoryliert (Sambrook und Russell, 2001). Ein 30 µl Markierungsansatz enthielt jeweils 2-4 µg der beiden komplementären DNA-Oligonukleotide sowie 20 U Polynukleotidkinase und 4 µl [γ -³²P]-ATP (0.4 mBq/µL) (Pharmacia) in Polynukleotidkinase-Puffer. Nach der Phosphorylierung bei 37°C für 1 h wurden die komplementären DNA-Oligonukleotide mit 20 µL A. bidest versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und durch langsames Abkühlen annealt. Die radioaktiv markierte dsDNA-Probe befand sich nach Extraktion mit 50 µL Phenol/Chloroform in der wässrigen Phase. Reste an nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden wurden mit G-50 Sephadex Zentrifugen-Säulchen (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Eine markierte Probe wurde für ca. 6 Wochen verwendet.

Klonierung der p63 DBD

Die 705 bp cDNA, die für die p63 DBD (AS 114-349) des humanen p63 Proteins codiert, wurde aus einer humanen Plazenta cDNA-Bibliothek (Clontech) durch PCR mit Gen-spezifischen Primern amplifiziert. Der C-terminale Teil der amplifizierten Sequenz wies eine Deletion von fünf Aminosäuren auf. Diese Sequenz konnte als humaner *expressed sequence tag* (EST) mit BLAST2 (Altschul *et al.*, 1997) in der *EMBL Nucleotide Sequence Database* (dbEST Datenbank) gefunden werden (*Accession-Nr.*: est_hum11:aw605859, est_hum10:aw382125) und wurde ursprünglich im FAPESP/LICR Human Cancer Genome Project (<http://www.ludwig.org.br>) identifiziert. Das PCR-Produkt wurde über NdeI und XhoI Restriktionsschnittstellen im richtigen Leserahmen in einen modifizierten pQE40 Expressionsvektor (Qiagen) unter Kontrolle eines T5 Promoters kloniert (Bujard *et al.*, 1987; Stuber *et al.*, 1990). Der resultierende Expressionsvektor codiert für die humane p63 DBD mit einem zusätzlichen N-terminalen Glycin. Zur Gewinnung eines GST-Fusionsproteins wurde das PCR-Produkt zudem über BamHI und XhoI Restriktionsschnittstellen in einen pGEX-4T-1 Expressionsvektor (Pharmacia) unter Kontrolle eines *tac* Promoters kloniert (Smith und Johnson, 1988).

Zellbiologische Methoden

Kultivierung von Zellen

Adhärenenten Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) mit 10% FKS, 2 mM Glutamin und nicht-essentielle Aminosäuren in einem CO₂-Inkubator mit 10% CO₂ bei 37°C kultiviert (Lindl, 2000). Zum Passagieren der Zellen wurden diese in 5 U/mL Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, in frischem Medium aufgenommen, abzentrifugiert (500 Upm, 5 min) und mit einer Zelldichte von ca. 3×10^4 Zellen/cm² in eine neue Kulturflasche überführt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zum Einfrieren der Zellen wurde die gewünschte Zellzahl abzentrifugiert (500 Upm, 5 min), in FKS aufgenommen und in Einfriereröhrchen mit 50% DMSO Endkonzentration in einem Nalgene Einfriercontainer eingefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Ampullen möglichst schnell erwärmt. Die Zellen wurden in DMEM/10% FKS resuspendiert, abzentrifugiert und in eine Kulturflasche überführt.

Fluoreszenzmikroskopie - Tat-vermittelte Peptidtransduktion

Zur Gewinnung von Tat-Proteinen in *E. coli* wurde ein Tat-Expressionsvektor (p200004) kloniert, der über einen RGS(His)₆-Tag, eine N-terminale Tat-Sequenz sowie eine MCS verfügt. Die Tat-vermittelte Peptid- und Proteintransduktion erfolgte wie beschrieben (Becker-Hapak *et al.*, 2001; Vocero-Akbani *et al.*, 2001; Vocero-Akbani *et al.*, 2000). 1.5×10^4 Zellen wurden in einem unbeschichteten 8 Well Chamberslide ausgesät und für 24-48 h kultiviert. Zur Transduktion wurden die Zellen für > 30 min mit 0.1-4 µM Tat-Fusionspeptiden in DMEM/10% FKS inkubiert. Die Zellen wurden dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd, 4% Saccharose für <20 min im Dunkeln fixiert und mit DABCO eingedeckelt. Der Nachweis der Peptidtransduktion erfolgte mit einem (konfokalen) Fluoreszenzmikroskop (Olympus). Der immunchemische Nachweis der Tat-Proteine und Peptide durch Immunfluoreszenz erfolgte nach einem Blockierungsschritt in 50% FKS durch Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper (z.B. 5 µg/mL RGS-His Antikörper bzw. PAb122) in PBS gefolgt von einer Inkubation mit einem für Maus-IgG spezifischen Cy-3 markierten Sekundärantikörper (4 µg/mL, Dianova). Die Kernfärbung erfolgte mit 100 ng/mL DAPI in PBS. Nach jeder Inkubation wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen.

p53 Luziferase-Reportergen-Test - Tat-vermittelte Peptidtransduktion

Zum Nachweis der Aktivierung der Transkriptionsaktivität von p53 durch Tat-vermittelte Peptidtransduktion in einem Luziferase-Reportergen-Test wurden jeweils 1.25×10^5 p53-negative Saos-2 Zellen pro 12-Well mit 50 ng p53-Plasmid (p11444, RB) und 100 ng p53-induzierbarem PG-Luziferase Reporter-Plasmid (Roche Nutley, USA) durch Lipofektion mit FuGene 6 Transfektionsreagenz (Roche Molecular Biochemicals) transfiziert und für 20 h bei 37°C in DMEM/10% FKS inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend für 20 h mit Oregon Green-markiertem Tat-C-terminalem Peptid und dem entsprechenden Kontrollpeptid versetzt. Nach der Ernte und Lyse der Zellen wurde die Luziferase-Aktivität der Zellysate in 96-well Platten mit dem Luciferase Reportergene Gene Assay (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers an einem LumiImager bestimmt und ausgewertet. Die gemessene Luziferase-Aktivität wurde zur Normalisierung auf die gleiche Proteinkonzentration bezogen.

Proteinbiochemische Methoden

Die *In-Vitro*-Faltung und chromatographische Reinigung von Proteinen erfolgte entsprechend den allgemein akzeptierten Vorgehensweisen (Harris und Angal, 1994; Scopes, 1999) mit ÄKTA-Systemen (Unikorn Software, Pharmacia).

Reinigung von Inclusion Bodies

Zur Präparation von hochreinen IBs zur *In-Vitro*-Faltung wurden 100 g *E. coli* (Naßgewicht) in 500 mL 100 mM TRIS/HCl (pH 7.0), 1 mM MgSO₄ bei 4°C mit einem Ultraturax T25 Basic (IKA) homogenisiert und mit 300 mg Lysozym und 500 U Benzonase versetzt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 20 min wurde die Zellsuspension in einer APV-Gaulin Lab 60-15 RPF Hochdruckpresse aufgeschlossen, mit 3000 U Benzonase versetzt und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lysat wurde 2:1 mit Brij-Puffer verdünnt und zum Lösen der Membranbestandteile 30 min bei Raumtemperatur inkubiert; die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert (GS-3 Rotor, 8000 Upm, 20 min). Zum Waschen der IBs wurden 30 mg Biomasse zweimal mit dem Ultraturax in 100 mL 100 mM TRIS/HCl (pH 6.5), 20 mM EDTA resuspendiert und abzentrifugiert. Die IB-Präparation wurde bis zur Solubilisierung bei -20°C gelagert.

Expression, In-Vitro-Faltung und Reinigung der p53 DBD

Die Sequenz, die für die p53 DBD (AS 94-312) (Bullock *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 1994) des humanen wildtyp p53 codiert, wurde durch PCR mit Gen-spezifischen Primern aus dem Plasmid pT7.7Hup53 (Midgley *et al.*, 1992) amplifiziert und im richtigen Leserahmen in einen modifizierten pQE40 Expressionsvektor (Qiagen) kloniert (S. Hansen, pers. Mitteilung). Zur Expression der p53 DBD in Form von *inclusion bodies* wurde das Plasmid p17007 (p53 DBD) in die *E. coli* Stämme BL21 bzw. HB101 transformiert, die mit dem Repressorplasmid pUBS520 (Brinkmann *et al.*, 1989) cotransfiziert waren. Ein transfizierter Klon wurde bei 37°C in 5x2 L LB-Medium in 5 L Schüttelkolben unter Zusatz der Antibiotika Ampicillin (100 µg/mL) und Kanamycin (50 µg/mL) bis zu einer OD₅₉₅ von 0.5 kultiviert; die Induktion der Expression erfolgte bei 37°C über Nacht mit 1 mM IPTG. Nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 g für 15 min) geerntet, in 50 mM TRIS (pH 6.8), 5 mM DTT, 1 mM Benzamidin, Complete Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei, Roche Molecular Biochemicals), 250 U Benzonase (Merck), 1 mg/mL Lysozym resuspendiert und durch Hochdruck-Dispersion mit einem APV-Gaulin Lab 40 Homogenisator aufgeschlossen. Die IBs wurden aus den Bakterien isoliert, mit Detergenzien gewaschen und anschließend in 6 M GdnCl, 100 mM TRIS (pH 7.5), 100 mM DTT solubilisiert (Lilie *et al.*, 1998). Zur Gewinnung größerer Mengen an IBs wurde eine Hochzelldichte-Fermentation bei 37°C durchgeführt. Die *In-Vitro*-Faltung erfolgte bei 4° bis 10°C nach einem optimierten Protokoll im 4 L Maßstab mit 3-4 Pulsen à 200 µg/mL über 24 h in folgendem Puffer: 0.1 M TRIS (pH 8.0), 0.5 M GdnCl, 0.5 M L-Arginin, 20 µM ZnCl₂, 5 mM DTT, 1 mM Benzamidin. Nach der *In-Vitro*-Faltung wurde die p53 DBD durch Ultrafiltration mit einem Provario Tangentialflußsystem (Pall Filtron) auf 1/20 konzentriert und in 50 mM KP (pH 6.6), 50 mM KCl, 5 mM DTT dialysiert. Dabei fiel nicht bzw. falsch gefaltetes Protein als Niederschlag aus. Der Zentrifugationsüberstand (GSA, 13000Upm, 20 min) nach Dialyse wurde auf eine SP-Sepharose Fast Flow Kationenaustauscher-Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit einem linearen KCl Gradienten eluiert. Die abschließende Reinigung erfolgte durch Gelfiltration mit einer High Load 26/60

Superdex 75-Säule (Pharmacia) in 50 mM KP (pH 6.8), 150 mM KCl, 5 mM DTT. Aufgrund der hohen Reinheit der IB Präparation (> 80%) konnte auf eine zusätzliche Heparin HiTrap-Säule während der Reinigung (Bullock *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 1999) verzichtet werden. Die vereinigten Fraktionen wurden mit 5 K Ultrafree 4 Zentrifugen-Konzentratoren (Millipore) durch Ultrafiltration auf eine Endkonzentration von 200-500 μ M konzentriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Ein Teil der Präparation wurde vor dem Aliquotieren für weitere Anwendungen wie NMR-Spektroskopie oder Kristallisation durch Dialyse in die entsprechenden Puffer wie z.B. 10 mM TRIS (pH 7.0), 40 mM KCl, 1 mM TCEP für Kristallisation überführt.

Expression, In-Vitro-Faltung und Reinigung der p53 DBD für NMR-Spektroskopie

Einheitlich [U - ^{15}N]- und doppelt [U - ^{13}C , ^{15}N]-markierte p53 DBDs wurden nach dem oben beschriebenen optimierten Protokoll zur Gewinnung der p53 DBD gewonnen. Als Expressionsstämme fanden *E. coli* BL21 und *E. coli* B (Wildtypisolat, Laborstamm) Verwendung, die mit dem Helferplasmid pUBS520 (Brinkmann *et al.*, 1989) cotransfiziert waren. *E. coli* B verbandt in Minimalmedium ein schnelleres Wachstum zu höheren Dichten mit höheren Expressionsausbeuten. Eine Expression in UT5600 ist wegen Wachstumsdefizienz in Minimalmedium nicht möglich. Zur Gewinnung von einheitlich [U - ^{15}N]- und [U - ^{13}C , ^{15}N]-markierten p53 DBDs wurden die Bakterien bei 37°C in M9-Minimalmedium angezüchtet, dem 100 μ M ZnCl₂, Antibiotika, Mineralsalze und MEM-Vitamine (Gibco, Invitrogen) sowie 2 g/L $^{15}NH_4Cl$ (Martek Biosciences) als einzige Stickstoff-Quelle und für die doppelt [U - ^{13}C , ^{15}N]-markierte p53 DBD 4 g/L [$^{13}C_6$]-Glucose als einzige Kohlenstoff-Quelle zugesetzt waren. Bei einer OD₅₉₅ von 0.8 wurde die Proteinexpression über Nacht durch Zugabe von 1 mM IPTG bei 37°C induziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und die IBs isoliert. Die *In-Vitro*-Faltung und Reinigung erfolgte wie für die p53 DBD oben beschrieben. Die vereinigten Fraktionen wurden mit 5 K Ultrafree 4 Zentrifugen-Konzentratoren (Millipore) durch Ultrafiltration auf eine Endkonzentration von 200-500 μ M konzentriert, in 50 mM KP (pH 6.8), 40-100 mM KCl, 5 mM DTT dialysiert, abschließend mit 5% (v/v) D₂O versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Ausbeuten lagen bei ca. 60 mg der [U - ^{15}N]- und ca. 45 mg der [U - ^{13}C , ^{15}N]-p53 DBD aus je 1 L Minimalmedium. SDS-PAGE und analytische Gelfiltration zeigten, daß die NMR-Proben >98% rein waren und als Monomer vorlagen. Die spezifische DNA-Bindungsaktivität der p53 DBD wurde durch EMSA bestätigt. Das ^{15}N , 1H -HSQC-Spektrum der *in vitro* gefalteten [U - ^{15}N]-markierten p53 DBD war mit dem kürzlich publizierten Spektrum einer aus der löslichen Fraktion aufgereinigten p53 DBD (Wong *et al.*, 1999) identisch.

Lösliche Expression und Reinigung der p53 DBD

Zum Vergleich mit der *in vitro* gefalteten p53 DBD und mit verschiedenen p53 Konstrukten sowie zum Vergleich mit p63 DBD wurde die p53 DBD durch Induktion der Kulturen bei 20°C mit 0.1 M IPTG für 6 h löslich exprimiert. Die Reinigung erfolgte mit Modifikationen der beschriebenen Methode für die *in vitro* gefaltete und die löslich exprimierte p63 DBD, und erforderte einen zusätzlichen Affinitätsreinigungsschritt an einer Heparin HiTrap Säule (Bullock *et al.*, 2000). Dafür wurden nach dem SP-Sepharose-Schritt die vereinigten Fraktionen in 50 mM TRIS (pH 6.8), 5 mM DTT auf eine 5 mL Heparin HiTrap-Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit einem linearen KCl Gradienten (0-0.5 M) eluiert. Nach der

Vereinigung der Fraktionen erfolgte die abschließende Reinigung mit einem präparativen Gelfiltrationsschritt an einer High Load 26/60 Superdex 75-Säule (Pharmacia).

Expression und Reinigung der p63 DBD

Zur Expression der p63 DBD wurde das Plasmid p20020 (p63 DBD) in den *E. coli* Stamm HB101 transformiert, der mit dem Repressorplasmid pUBS520 (Brinkmann *et al.*, 1989) cotransfiziert war. Ein transfizierter Klon wurde bei 37°C in 5x2 L LB-Medium unter Zusatz der Antibiotika Ampicillin (100 µg/mL) und Kanamycin (50 µg/mL) bis zu einer OD₅₉₅ von 0.5 kultiviert; die Induktion erfolgte bei 37°C über Nacht mit 1 mM IPTG. Nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 g für 15 min) geerntet, in 50 mM TRIS (pH 6.8), 5 mM DTT, 1 mM Benzamidin, Complete Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei, Roche Molecular Biochemicals), 250 U Benzonase (Merck), 1 mg/mL Lyszym resuspendiert und durch Hochdruck-Dispersion aufgeschlossen. Der lösliche Überstand des Lysats wurde auf eine SP-Sepharose Fast Flow Kationenaustausch-Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit einem linearen KCl-Gradienten (0–0.5 M) eluiert. Nach der Vereinigung der Fraktionen erfolgte die abschließende Reinigung mit einem präparativen Gelfiltrationsschritt mit einer High Load 26/60 Superdex 75-Säule (Pharmacia) in 50 mM KP (pH 7.0), 150 mM KCl, 5 mM DTT. Die vereinigten Fraktionen wurden mit 5 K Ultrafree 4 Zentrifugen-Konzentratoren (Millipore) auf 10 mg/mL konzentriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

Expression und Reinigung der p63 DBD für NMR-Spektroskopie

Einheitlich [¹⁵N]- und dreifach [²D, ¹³C, ¹⁵N]-markierte p63 DBDs wurden nach dem oben beschriebenen optimierten Protokoll zur Gewinnung der p63 DBD gewonnen. Als Expressionsstamm fand *E. coli* BL21 Verwendung, der mit dem Helferplasmid pUBS520 (Brinkmann *et al.*, 1989) cotransfiziert war. Zur Gewinnung von einheitlich [¹⁵N]-markierter p53 DBD wurden die Bakterien bei 37°C in 2 L M9-Minimalmedium angezchtet, dem 100 µM ZnCl₂, Antibiotika, Mineralsalze, 0.4% (v/v) Glycerin und MEM-Vitamine (Gibco, Invitrogen) sowie 2 g/L ¹⁵NH₄Cl (Martek Biosciences) als einzige Stickstoff-Quelle zugesetzt waren. Zur Gewinnung von einheitlich [²D, ¹³C, ¹⁵N]-markierter p63 DBD wurden die Bakterien bei 37°C in 1 L Bioexpress 1000 Medium (CIL) angezchtet, dem 80% (v/v) D₂O zugesetzt wurde. Zuvor wurde der Expressionsstamm BL21 in mehreren Vorkulturen mit steigenden D₂O Konzentrationen langsam an das Wachstum in D₂O adaptiert (Arrowsmith und Wu, 1998; Goto und Kay, 2000). Bei einer OD₅₉₅ von 0.8 wurde die Proteinexpression über Nacht durch Zugabe von 1 mM IPTG bei 37°C induziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Die Reinigung wie für die p63 DBD ohne weitere Modifikationen. Die vereinigten Fraktionen nach Gelfiltration wurden mit 5 K Ultrafree 4 Zentrifugen-Konzentratoren (Millipore) durch Ultrafiltration auf eine Endkonzentration von 400-1000 µM konzentriert, in 50 mM KP (pH 6.8), 40-100 mM KCl, 5 mM DTT dialysiert, abschließend mit 5% (v/v) (v/v) D₂O versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zwar war die relative Expression der p63 DBD in Minimalmedium verringert, jedoch betrug die Ausbeuten ca. 60 mg der [¹⁵N]-p63 DBD aus 2 L M9-Minimalmedium und ca. 30 mg der [²D, ¹³C, ¹⁵N]-p63 DBD aus 1 L Bioexpress 1000. SDS-PAGE und analytische Gelfiltration zeigten, daß die NMR-Proben >95% rein waren und als Monomer vorlagen. Der Markierungsgard der Proben wurde durch ESI-MS bestimmt.

Expression und Reinigung der GST-p53 DBD und GST-p63 DBD Fusionsproteine

Zur Expression der GST-p63 DBD wurden die Plasmide p20002 (GST-p53 DBD) bzw. p20021 (GST-p63 DBD) in den *E. coli* Stamm UT5600 transformiert. Beide Vektoren codieren für GST-DBD Fusionsproteins inklusive eines Gly-Ser-Gly-Linkers, der nach Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin am N-Terminus verbleibt. Zur Expression wurden die transfizierten Zellen bei 37°C in 5x2 L LB-Medium in 5 L Schüttelkolben unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/mL) bis zu einer OD₅₉₅ von 0.5 kultiviert; die Induktion der Expression erfolgte bei 20°C (GST-p53 DBD) bzw. 37°C (GST-p63 DBD) über Nacht mit 0.1 mM IPTG. Nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 g für 15 min) geerntet, in PBS, 5 mM DTT, 1 mM Benzamidine, Complete Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-frei, Roche Molecular Biochemicals), 250 U Benzonase (Merck), 1 mg/mL Lyszoym resuspendiert und durch Hochdruck-Dispersion mit einem APV-Gaulin Lab 40 Homogenisator aufgeschlossen. Das Lysat wurde mit 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma) versetzt und 30 min unter Rühren inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der lösliche Überstand auf eine GSH-Sepharose 4B-Säule (Pharmacia) aufgetragen. GST-Fusionsprotein wurde mit 10 mM Glutathion in 50 mM TRIS (pH 8.0), 150 mM KCl, 5 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin eluiert. Die abschließende Reinigung erfolgte durch Gelfiltration mit einer HiLoad 26/60 Superdex 200-Säule (Pharmacia) in 50 mM TRIS (pH 7.0), 150 mM KCl, 5 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin. Alle Proteine wurden mit 5 K Ultrafree 4 Zentrifugen-Konzentratoren (Millipore) konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Durch proteolytische Spaltung mit Thrombin (Verhältnis 1:200, Dauer 14 h bei 4°C) konnte die DBD quantitativ aus dem Fusionsprotein in 100 mM KP (pH 7.0) freigesetzt werden. Thrombin wurde durch Zugabe von 5 mM DTT inaktiviert und anschließend über Affinitätschromatographie an Benzamidin-Sepharose (Pharmacia) abgetrennt. Ungespaltenes Fusionsprotein wurde durch Batch-Inkubation mit GSH-Sepharose 4B-Säule (Pharmacia) entfernt. Die weitere Reinigung der gespaltenen DBDs erfolgte wie oben beschrieben.

Expression, In-Vitro-Faltung und Reinigung von p53C312

Zur Expression von p53C312 in *inclusion bodies* wurde das Plasmid p11430 in den *E. coli* Stamm BL21, pUBS520 transformiert. Ein transfizierter Klon wurde bei 37°C in 5x2 L LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/mL) und Kanamycin (50 µg/mL) bis zu einer OD₅₉₅ von 0.5 kultiviert; die Induktion erfolgte bei 37°C über Nacht mit 1 mM IPTG. Nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, in 8 M Harnstoff, 50 mM KP (pH 7.8), 500 mM NaCl, 10 mM DTT solubilisiert und unter denaturierenden Bedingungen auf eine Zn-NTA-Chromatographiesäule (Roche Molecular Biochemicals) aufgetragen und mit einem Imidazol-Gradienten eluiert. p53C312 wurde anschließend bei 10°C durch Verdünnung in 3 Pulsen à 300 µg/mL in 0.1 M TRIS (pH 8.0), 1 M L-Arginin, 100 µM ZnCl₂, 10% (v/v) Glycerin, 5 mM DTT, 1 mM Benzamidin *in vitro* gefaltet. Nach Konzentrierung durch Ultrafiltration mit einem Provario-System und Dialyse in 50 mM TRIS (pH 6.8), 50 mM KCl, 10% (v/v) Glycerin, 5 mM DTT wurde p53C312 durch Affinitätschromatographie an einer 5 mL Heparin HiTrap-Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit einem linearen KCl Gradienten (0–1.0 M) eluiert. Nach der Vereinigung der Fraktionen erfolgte die abschließende Reinigung mit einem präparativen Gelfiltrationsschritt mit einer High Load 26/60 Superdex 75-Säule (Pharmacia) in 50 mM KP (pH 6.8), 150 mM KCl, 5 mM DTT. Die Fraktionen wurden mit 5 K Ultrafree 4 Zentrifugen-Konzentratoren (Millipore) auf 4 mg/mL

konzentriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die *In-Vitro*-Faltung und Reinigung des N-terminal trunkierten Konstrukts 1801-p53 DBD (AS 40-312) erfolgte analog mit einer Q-Sepharose Fast Flow Anionenaustausch-Säule (Pharmacia).

Reinigung von f.l. p53 Konstrukten

Tetrameres f.l. p53 für DNA-Bindungstests wurde nach einem Protokoll von Dr. S. Hansen (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) aufgereinigt (Hansen *et al.*, 1996a; Hupp *et al.*, 1992). Zur Expression von f.l. p53 wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit dem Plasmid pT7.7Hup53 (Midgley *et al.*, 1992) unter Kontrolle eines T7 Promoters transformiert. Ein transfizierter Klon wurde bei 37°C in 2 L LB-Medium unter Zusatz von $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin bis zu einer OD_{595} von 0.3 kultiviert; die Induktion erfolgte mit $0.5\ \text{mM}$ IPTG für 3-4 h bei 20°C . Nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation ($5000\ \text{Upm}$, 10 min, 4°C) geerntet, in $50\ \text{mM}$ HEPES (pH 8.0), 10% Saccharose resuspendiert und in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden auf Eis aufgetaut und durch milde Lyse unter Zusatz von $250\ \text{mM}$ KCl, $0.5\ \text{mg}/\text{mL}$ Lysozym, $1\ \text{mM}$ Benzamidin lysiert. Der lösliche Überstand nach Zentrifugation wurde 1:5 in $25\ \text{mM}$ HEPES (pH 8.0), $0.1\ \text{mM}$ EDTA, 15% (v/v) Glycerin, 0.1% Triton X-100, $5\ \text{mM}$ DTT, $1\ \text{mM}$ Benzamidin verdünnt, auf eine $5\ \text{mL}$ Heparin HiTrap-Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit einem linearen KCl Gradienten ($0-1.0\ \text{M}$) eluiert. Fraktionen, die in einem DNA-Bindungstest (EMSA) latente DNA-Bindung zeigten, wurden vereinigt, 1:5 in $25\ \text{mM}$ HEPES (pH 8.0), $0.1\ \text{mM}$ EDTA, 15% (v/v) Glycerin, 0.1% Triton X-100, $5\ \text{mM}$ DTT, $1\ \text{mM}$ Benzamidin verdünnt und auf eine $3\ \text{mL}$ P-11 Phosphocellulose-Säule (Whatman) aufgetragen, die nach Vorschrift des Herstellers am Vortag aktiviert worden war. Die Elution erfolgte mit einem linearen KCl Gradienten ($0-1.0\ \text{M}$). Fraktionen, die im EMSA latente DNA-Bindung zeigten, wurden vereinigt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Ausbeute der Präparation betrug ca. $1\ \text{mg}$ f.l. p53 mit einer Reinheit von ca. 70%. Aktives f.l. p53 aus Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen für DNA-Bindungstests wurde von Dr. S. Hansen zur Verfügung gestellt (Hansen *et al.*, 1996a; Hupp *et al.*, 1992). Für vergleichende biochemische und biophysikalische Studien wurden zudem von Dr. S. Bell und L. Müller (Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München) tetramere f.l. p53 und N93p53 Konstrukte löslich in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt wie beschrieben (Bell, 2001; Bell *et al.*, 2002b).

In-Vitro-Faltung und Reinigung von hXDM2 LHI (21-105)

Humanisiertes hXDM2 LHI (21-105) wurde von Dr. S. Palme und C. Breitenlechner (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) kloniert und für Kristallisationsexperimente zur Verfügung gestellt. Die *In-Vitro*-Faltung und Reinigung erfolgte nach dem folgenden Protokoll. IBs aus der rekombinanten Expression von hXDM2 (21-105) in *E. coli* BL21 in einem 10 L Fermenter wurden isoliert, gewaschen und in $6\ \text{M}$ GdnCl, $100\ \text{mM}$ TRIS (pH 7.5), $5\ \text{mM}$ EDTA, $10\ \text{mM}$ DTT solubilisiert. Die *In-Vitro*-Faltung erfolgte bei 20°C im 10 L Maßstab mit 4 Pulsen à $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ über 12 h in $50\ \text{mM}$ MES (pH 7.0), $50\ \text{mM}$ NaCl, $1\ \text{mM}$ EDTA, $5\ \text{mM}$ DTT. Nach der Entfernung von unlöslichem Material durch Zentrifugation wurde langsam $1.5\ \text{M}$ Ammoniumsulfat eingerührt. Unter diesen Bedingungen adsorbierte hXDM2 im Batch an hydrophobe Butyl-Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia) und konnte durch Elution mit $25\ \text{mM}$ MES (pH 7.0), $1\ \text{mM}$ EDTA eluiert werden. Die weitere Reinigung erfolgte nach pH-Einstellung des Eluats auf pH

6.5 mit einer SP-Sepharose Fast Flow Kationenaustauscher-Säule (Pharmacia) mit einem Gradienten von 0-500 mM NaCl. Die abschließende Reinigung erfolgte durch Gelfiltration mit einer High Load 26/60 Superdex 75-Säule (Pharmacia) in 10 mM MES (pH 7.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT. Das vereinigte Protein wurde durch Ultrafiltration mit einer Amicon-Rührzelle auf ca. 2.5 mg/mL konzentriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Reinheit der Präparation betrug >95%. Zur Kristallisation mit niedermolekularen Verbindungen sowie p73- und NVP-Peptiden wurde gereinigtes hXDM2 mit einem 3-5-fachen Überschuß an Peptid inkubiert. Anschließend wurde der stabile Komplex in 10 mM MES (pH 7.0), 50 mM NaCl, 2 mM DTT über Gelfiltration an einer HiLoad 26/60 Superdex 75-Säule (Pharmacia) isoliert. Ungebundenes Peptid wurde in diesem Schritt abgetrennt. Die Fraktionen, die den hXDM2-Peptidkomplex enthielten, wurden anschließend durch Ultrafiltration mit 5 K Ultrafree 4 Zentrifugen-Konzentratoren (Millipore) auf eine Konzentrationen von 10 mg/mL konzentriert, in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Vor der Kristallisation wurden die aufgetauten Aliquots zur Entfernung von Aggregaten 10 min bei 13000 Upm und 4°C abzentrifugiert.

Analytische und biophysikalische Methoden

Für eine detaillierte Beschreibung der angewandten analytischen, spektroskopischen und biophysikalischen Methoden wird auf die Sekundärliteratur verwiesen (Creighton, 1997a; Creighton, 1997b; Lottspeich und Zorbas, 1997; Price, 2000)

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch entsprechend dem Beer-Lambertschen Gesetz: $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ bestimmt. Dabei steht ϵ für den Extinktionskoeffizienten, c für die Konzentration und d für die Schichtdicke der Küvette. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) sowie durch die Messung der Extinktion bei 280 nm. Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten bei 280 nm erfolgte nach der Methode von Edelhoich (Edelhoich, 1967) und Gill und Hippel (Gill und von Hippel, 1989). Für eine vollständig reduzierte 1 mg/mL Lösung ergibt sich in einer Küvette der Schichtdicke 1 cm die folgende Extinktion: 0.649 für p53 DBD, 0.567 für p63 DBD, 0.917 für p53C312, 0.763 für p53 und 0.509 für N93p53.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Fractionen von Proteinpräparationen wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit diskontinuierlichem Puffersystem entsprechend ihrer Größe aufgetrennt (Laemmli, 1970) und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Für die elektrophoretische Trennung wurden Polyacrylamidgele mit 3%-igen Sammel- und 10-15%-igen Trenngelen mit 0.1% (w/v) SDS verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben in SDS-Probenpuffer in Gegenwart von 100 mM DTT für 5 min bei 100°C aufgeköcht. Typischerweise wurden 5 µg (kleine Kämme) bzw. 10 µg (große Kämme) Gesamtprotein pro Tasche aufgetragen. Zur Größenbestimmung dienten Molekulargewichts-Größenstandards. Die Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Gelapparatur (Biometra) bei 200 V für 1 h mit TG-SDS als Laufpuffer. Nach Austritt der Lauffront wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend mit Coomassie-Entfärbelösung entfärbt.

Native Gelelektrophorese

Zur Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität (EMSA) wurden 4%-ige native Polyacrylamidgele verwendet (Sambrook und Russell, 2001). Die Proben wurden in DNA-Bindepuffer aufgetragen. Die Auftrennung der radioaktiven DNA-Oligonukleotid-Protein-Komplexe erfolgte bei 4°C in einer vertikalen Protean II xi Gelapparatur (Biorad) bei 200 V für 2 h bei mit 0.33x TBE, 0.1% (v/v) Triton X-100 als Laufpuffer. Das Gel wurde getrocknet und die markierte DNA durch Autoradiographie detektiert. Zur Quantifizierung der radioaktiven Signale wurde ein Storm 860 Phosphorimager verwendet (Molecular Dynamics, Pharmacia).

Immunoblot

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Immobilon P PVDF-Membranen (Whatman) erfolgte elektrophoretisch als *semi dry blot* in TG-Puffer mit 20% (v/v) Methanol (100 mA, 2 h). Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit Blockierungspuffer (5% (w/v) Milchpulver in TBS, 0.1% Tween) abgesättigt. Zur Detektion wurde die Membran anschließend mit

0.1-1 μg Primärantikörper in Blockierungspuffer für mindestens 1 h inkubiert. Die Membran wurde dreimal in TBS-Tween gewaschen, mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper im (1:10000) inkubiert und erneut gewaschen. Die Detektion und quantitative Auswertung erfolgte durch eine Chemolumineszenz-Reaktion schließlich mit Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers mithilfe eines LumiImagers (Roche Molecular Biochemicals).

Analytische Gelfiltration

Analytische Gelfiltration zur Analyse des Oligomerisierungszustands in Lösung erfolgte mit einer analytischen TSK G 3000SW (TosoHaas) Gelfiltrationssäule an einem analytischen HPLC-System (Gynkotek mit Chromeleon Software, Dionex) bei einem Fluß von 0.5 mL/min in 50 mM KP (pH 7.0), 150 mM KCl, 5 mM DTT. Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarray-UV-Detektor bei 280/220 nm. Zum Vergleich der p53 Konstrukte wurde außerdem eine Phenomenex BioSep SEC-3000 Säule bei einem Fluß von 0.75 mL/min in 40 mM KP (pH 8.0), 300 mM KCl, 2 mM DTT mit einem JASCO FP-920 Fluoreszenz-Detektor (Anregung 280 nm, Detektion 340 nm).

Massenspektroskopie

ESI-Massenspektroskopie wurde von A. Gärtner (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) durchgeführt. ESI-MS bestätigte die Reinheit und Identität aller verwendeten Proteinpräparationen und zeigte, daß das N-terminale Methionin nach der Translation abgespalten wurde. Zudem wurde durch ESI-MS der Markierungsgrad Isotopen-markierter Proteinpräparationen für die NMR-Spektroskopie bestimmt.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Zur Messung der hydrodynamischen Parameter und des Oligomerisierungszustands in Lösung fand die Methode der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) Anwendung. Die Bestimmung der hydrodynamische Parameter erlaubt eine Aussage über die Größenverteilung der in der Lösung enthaltenen Partikel (Modalität) und eine empirische Aussage über die zu erwartende Kristallisationswahrscheinlichkeit (Ferre-D'Amare *et al.*, 1997; Ferre-D'Amare und Burley, 1994; Zulauf und D'Arcy, 1992). Alle Proben wurden vor der Messung in 40 mM KP (pH 7.0), 5 mM DTT auf eine Konzentration von 1–2 mg/mL verdünnt und durch eine 0.02 μm Membran filtriert. Die Messung erfolgte bei 20°C mit einem thermostatisierten DynaPro *Molecular Sizing Instrument* (Protein Solutions).

UV- und Fluoreszenz-Spektroskopie

Die spektroskopische Charakterisierung der untersuchten Proteine erfolgte wie beschrieben (Price, 2000; Schmid, 1997). UV-Spektren von 220-350 nm und die Extinktion der Proben bei 280/260 nm wurden mit einem UVIKON 933 Spektrophotometer (Kontron) sowie mit einem Varian Cary-50 UV/Vis Spektrophotometer gemessen. Fluoreszenz-Spektren wurden von 1-4 μM Protein in 40 mM KP (pH 7.0), 5 mM DTT (\pm 6 M Harnstoff/GdnCl für denaturierte Spektren) in 1.0 cm thermostatisierten Quartz-Küvetten bei 15°C mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm bzw. 295 nm und Emissionswellenlängen zwischen 300-400 nm mit einem FluoroMax-2 Fluorimeter (Spex, Jobin Yvon) gemessen. Für den spektroskopischen Vergleich der p53 Konstrukte wurde der folgende Puffer verwendet: 40 mM KP (pH 7.0), 25 mM KCl, 2 mM DTT.

CD-Spektroskopie

Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proben wurde durch CD-Spektroskopie untersucht (Adler *et al.*, 1973; Schmid, 1997). Messungen erfolgten mit jeweils 8 μM (Fern-UV) oder 80 μM (Nah-UV) Protein in 40 mM KP (pH 7.0) (± 6 M Harnstoff/GdnCl für denaturierte Spektren) in 0.1/0.2 cm bzw. 1.0 cm thermostatisierten Quartz-Küvetten bei 15°C mit einem J-715 Spektropolarimeter (Jasco), das mit einem PTC-351S Peltier Element ausgestattet war. Proteine wurden vor der Messung durch Dialyse in die entgasten Meßpuffer überführt. Alle Spektren wurden für den Beitrag des Puffers korrigiert und auf mittlere molare Elliptizität bezogen auf die Anzahl der Aminosäuren im Protein umgerechnet. Die thermische, irreversible Entfaltung von Proteinen beim Erhitzen der Probe von 15°-85°C wurde mit einer Rate von 30°C/h anhand der Veränderung der Elliptizität bei 218 nm verfolgt. Für den spektroskopischen Vergleich der p53 Konstrukte wurde der folgenden Puffer verwendet: 40 mM KP (pH 7.0), 25 mM KCl, 2 mM DTT. Die Sekundärstruktur von Proteinen wurde aus den Fern-UV CD-Spektren durch Dekonvolution mit den Programmen CDSSTR (Sreerama und Woody, 2000) und CDNN (Böhm *et al.*, 1992) basierend auf einer erweiterten Datenbank an Referenzspektren abgeschätzt (Greenfield, 1996). Zum Vergleich verschiedener p53 Konstrukte wurden Consensus Sekundärstrukturelemente mit den folgenden Algorithmen vorhergesagt (Network Protein Sequence @analysis tool, IBCP, Lyon, France; <http://npsa-pbil.ibcp.fr/>): SOPM (Geourjon und Deleage, 1994), SOPMA (Geourjon und Deleage, 1995), DPM (Deleage und Roux, 1987), DSC (King *et al.*, 1997), GOR III (Gibrat *et al.*, 1987), GOR IV (Garnier *et al.*, 1990), PHD (Rost *et al.*, 1994), PREDATOR (Frishman und Argos, 1996) und SIMPA96 (Levin *et al.*, 1986). Aus den Sekundärstrukturelementen der bekannten p53 Strukturen wurde der Anteil an α -Helices und an β -Faltblattstrukturen im Gesamtprotein errechnet. Die übrigen Regionen wurden als ungeordnete oder *coil* Regionen zusammengefaßt.

Gleichgewichtsentfaltung

Die Faltungsstabilität von Proteinen wurde durch Harnstoff- und GdnCl-induzierte Gleichgewichtsentfaltung analysiert (Bullock *et al.*, 2000; Pace, 1986; Pace, 1990; Pace und Shaw, 2000). Die Übergänge wurden bei Proteinkonzentrationen von 1 μM (Fluoreszenz-Spektroskopie) bzw. 6-8 μM (CD-Spektroskopie) gemessen. Die Ent- und Rückfaltungskurven der p53 und p63 DBDs waren identisch und damit reversibel. Die Entfaltung der p53 und p63 DBDs wurde bei 15°C in 40 mM KP (pH 7.0) in Gegenwart von 1 mM DTT durchgeführt, um alle Cysteine reduziert zu halten. Für jeden Datenpunkt der Denaturierung wurden 50 μL einer 160 μM bzw. einer 80 μM Lösung der p63 DBD bzw. p53 DBD in 40 mM KP (pH 7.0), 1 mM DTT mit 950 μL der entsprechenden Harnstoff-Lösung verdünnt. Die Denaturans-Stocklösungen wurden gravimetrisch hergestellt, die entsprechenden Verdünnungen volumimetrisch und anschließend refraktrometrisch bestätigt (Pace und Scholtz, 1997). Für Harnstoff gilt: $117.66(\Delta N) + 29.753(\Delta N)^2 + 185.56(\Delta N)^3$, für GdnCl gilt: $57.147(\Delta N) + 38.68(\Delta N)^2 - 91.60(\Delta N)^3$, wobei ΔN für die Differenz der Brechungsindices zwischen Puffer und Denaturans-Verdünnung in Puffer steht. Alle Proben wurden zur Gleichgewichtseinstellung über Nacht bei 15°C inkubiert. Die Entfaltungsübergänge von p53 DBD, p63 DBD und p53C312 wurden bei 15°C in 0.1 cm bzw. 0.2 cm thermostatisierten Quartz-Küvetten anhand der Zunahme des mittleren CD-Signals bei 222 nm bzw. besser bei 218 nm (Bandbreite 1 nm, Acquisitionszeit 1 min) verfolgt. Die Entfaltungsübergänge wurden zudem durch Fluoreszenz-Spektroskopie in 1 cm thermostatisierten Quartzküvetten bei 15°C mit

einer Anregungswellenlänge von 280 nm beruhend auf der Änderung der Intensität der Fluoreszenzemission bei konstanter Wellenlänge bzw. der Verschiebung der Wellenlänge des Emissionsmaximums zwischen 295-400 nm verfolgt (Inkrement 0.1 nm, Integrationszeit 0.1 s, 5 Acquisitionen). Die Entfaltung der p53 DBD konnte anhand der Zunahme des auf den isofluoreszenten Punkt normalisierten Fluoreszenz-Signals bei 356 nm (Bullock *et al.*, 2000) verfolgt werden. Für den Vergleich der p53 Konstrukte wurden alle Messungen bei 15°C in 40 mM KP (pH 7.5), 25 mM KCl, 2 mM DTT mit ansteigenden Denaturans-Konzentrationen durchgeführt. Reversible Entfaltungsübergänge wurden auf der Basis eines Zwei-Zustand-Modells (Clarke und Fersht, 1993; Tang *et al.*, 1999) durch nicht-lineare Kurvenanpassung mit Excel (Microsoft) und Sigmaplot 4.0 (SPSS Inc.) beruhend auf der Methode der kleinsten Fehlerquadrate analysiert. Aus dem Übergang wurden die thermodynamischen Parameter berechnet (Clarke und Fersht, 1993; Tang *et al.*, 1999).

Differential Scanning Kalorimetrie (DSC)

DSC-Experimente zur Bestimmung der Thermostabilität und des Schmelzpunkts (T_m) (Jelesarov und Bosshard, 1999; Plotnikov *et al.*, 1997) wurden mit einem 5106 N-DSC Nano Differential Scanning Calorimeter (Applied Thermodynamics) mit einem Zellvolumen von 867.2 μ L durchgeführt. Temperaturen von 5°C bis 90°C wurden mit einer Rate von 0.5-1°C/min gescannt. Alle Proteine wurden vor der Analyse in 40 mM KP (pH 7.0), 150 mM KCl, 1 mM DTT bzw. 40 mM KP (pH 7.5), 25 mM KCl überführt, auf eine Konzentration von 35-40 μ M eingestellt und vor der Messung entgast. Der Dialysepuffer wurde für die Bestimmung der Basislinie sowie für die Befüllung der Referenzzelle verwendet. Das System wurde vor Beginn der Messung für 15 min bei 4°C äquilibriert; die Messung erfolgte bei einem Druck von 3 bar. Die erhaltenen Thermogramme wurden mit der Nano-DSC Software (Calorimetry Sciences) analysiert. Die Schmelzkurven wurden um die Referenzmessung korrigiert und auf Proteinkonzentration normalisiert. Nach Abzug der Basislinie wurden die Daten zur Bestimmung der Schmelztemperatur T_m an ein Modell für einen einfachen Übergang angepaßt und die Temperatur am Maximum der Wärmekapazität (T_m) abgelesen. Da alle Übergänge irreversibel waren, wurde auf eine quantitative Auswertung verzichtet.

Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Durch isotherme Titrationskalorimetrie können thermodynamische Bindungskonstanten anhand der bei der Ligandenbindung freiwerdenden Reaktionswärmen in Lösung bestimmt werden (Cooper, 1999; Jelesarov und Bosshard, 1999; Leavitt und Freire, 2001; Wiseman *et al.*, 1989). Alle ITC-Experimente wurden mit einem Titrationskalorimetern des Typs VP-ITC (MicroCal) bei 20°C durchgeführt. Jeweils 30 Aliquots à 10 μ L der zu analysierenden Peptid- oder Substanzlösung wurden schrittweise aus einer rotierenden Spritze (300 μ L) in die Meßkammer (1.36 mL) injiziert. Alle Proben wurden vor der Messung in den gleichen Puffer dialysiert und 10 min entgast. Die Injektionsdauer wurde auf 10-20 s, die Zeit zwischen den einzelnen Injektionen auf 4 min festgelegt. Sämtliche Bindungsstudien mit hXDM2 Konstrukten wurden in 50 mM KP (pH 7.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM TCEP durchgeführt. Zur Untersuchung der Peptidbindung an hXDM2 wurde das gereinigte hXDM2 (13-119) in die Meßkammer vorgelegt (40 μ M) und mit 15-fach konzentrierteren Peptidlösungen (600 μ M im angegebenen Puffer) titriert. Die Proteinkonzentration in der Meßzelle wurde so eingestellt, daß die Zellkonzentration mindestens der fünffachen K_D -Konzentration der untersuchten

Interaktion entsprach. Typischerweise wurden die Injektionen zur Bestimmung der Verdünnungswärmen bis zur Sättigung der Bindung durchgeführt. Nach Subtraktion der Verdünnungswärmen wurden die kalorimetrischen Daten unter Verwendung des Programms MicroCal Origin Version 5.0 (MicroCal) ausgewertet. Durch Integration der Rohdaten wurden die pro Injektion freigesetzten Wärmen (Reaktionsenthalpien, ΔH) berechnet und gegen die molaren Verhältnisse der in der Meßzelle befindlichen Bindungspartner aufgetragen. Die thermodynamische Assoziationskonstanten (K_A) sowie der Stöchiometriefaktor (n) der Bindung können aus den erhaltenen Titrationskurven durch nicht-lineare Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate errechnet werden (Pierce *et al.*, 1999). In allen betrachteten Fällen wurde ein 1:1 Bindungsmodell zur Auswertung herangezogen. Erhielt man aufgrund zu schwacher Wechselwirkungen keine auswertbaren Titrationskurven, wurde für die Interaktion die Proteinkonzentration in der Meßzelle als kleinstmöglicher K_D -Wert angegeben.

DNA-Bindungstest (EMSA)

Die DNA-Bindungsaktivität der Proteinkonstrukte wurde qualitativ durch *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) analysiert (Hansen *et al.*, 1996a; Hupp *et al.*, 1992). Im allgemeinen wurden die spezifischen komplementären Oligonukleotide z.B. die 20-mere p53 Consensus-DNA-Bindungsstelle PG-HindIII (El-Deiry *et al.*, 1992) enthielten, mit [γ - 32 P]-ATP radioaktiv markiert, annealt und aufgereinigt (siehe oben). Im allgemeinen wurden ca. 50 ng des gereinigten Proteins in 10 μ L DNA-Bindungspuffer mit 10 μ L DNA-Bindungspuffer versetzt, der 10 ng des markierten spezifischen p53 Consensus-DNA-Oligonukleotids und 5 nM einer unmarkierten unspezifischen pBluescript II SK+ (pBS) Kompetitor-DNA (Stratagene) enthielt. Aktivierende Antikörper wie PAb 122 (Roche Molecular Biochemicals) oder DO-1 (Calbiochem-Novabiochem) wurden in einer Endkonzentration von 200-400 ng pro Ansatz zugegeben und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die genauen Inkubationsbedingungen sind in den Legenden der Abbildungen angegeben. Das Reaktionsansatz wurde anschließend auf ein 4%-iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 200 V und 4°C für 2 h aufgetrennt.

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die quantitative Analyse der DNA-Bindungsaktivität erfolgte mit einem ConfoCor Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer (Carl Zeiss und Evotec OAI). FCS ermöglicht die Bestimmung von freien Diffusionskoeffizienten in Lösung (Maiti *et al.*, 1997; Van Craenenbroeck und Engelborghs, 2000). Die Diffusionszeit eines individuellen fluoreszenten Moleküls wurde aus der zeitabhängig gemessenen Fluktuation des Fluoreszenzsignals im konfokalen Volumenelement berechnet. Um die Dimensionen des Exzitationsvolumens zu bestimmen, wurde zudem vor jeder Meßreihe eine Messung an Rhodamin 6G durchgeführt, dessen Diffusionskoeffizient bekannt ist. Wenn der Unterschied in den Diffusionskoeffizienten des freien und des gebundenen Moleküls groß genug ist, kann die Bindung des fluoreszenzmarkierten Moleküls an ein anderes Molekül analysiert werden. Laserlicht eines He/Ne Lasers passierte einen 543 nm Filter und wurde via ein Zeiss C-Apochromat Objektiv in die Probenlösung fokussiert. Streuung des Laserlichts wurde durch einen dichromatischen Spiegel blockiert. Die Fluoreszenz wurde mit einer Avalanche-Photodiode detektiert und mit einer 288-Kanal Hardware Korrelator PC-Karte prozessiert. Die experimentellen Autokorrelationskurven wurden anschließend anhand theoretischer Autokorrelationskurven mit der FCS-plus 1.0 Software (Evotec OAI) gefittet. Daraus

ergaben sich die Diffusionszeiten der freien und der gebundenen fluoreszenten DNA-Oligonukleotide und so die relativen Komplexanteile. Zur Bestimmung der DNA-Affinitäten wurden 5'-TAMRA-markierte Oligonukleotide, die z.B. eine p53 Consensus-DNA-Bindungsstelle umfaßten (Pavletich *et al.*, 1993) mit den entsprechenden komplementären DNA-Oligonukleotiden annealt.

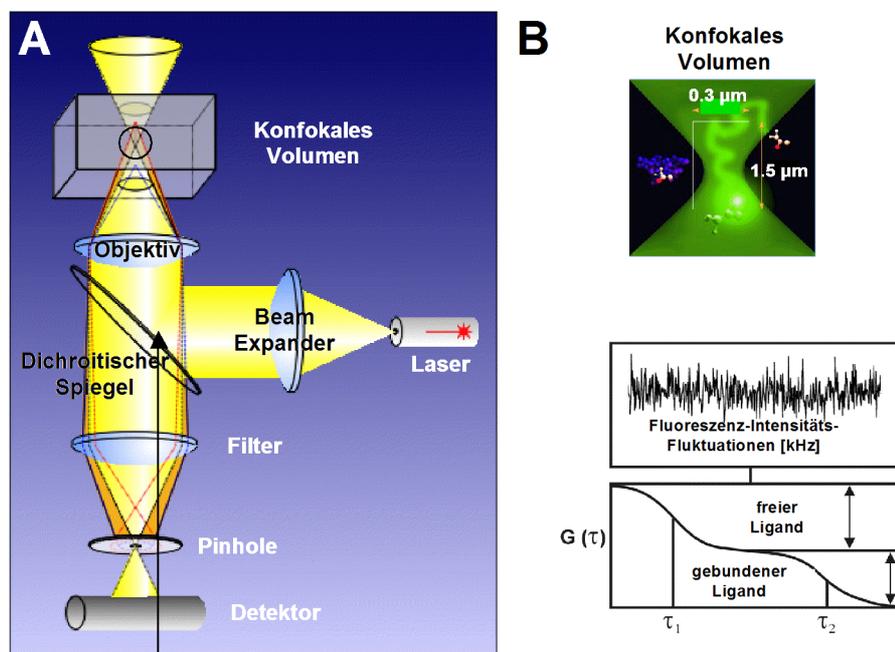


Abb. 4.2: Schematischer Überblick über das Funktionsprinzip der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. A) Aufbau eines FCS-Mikroskops. B) Ein durch das konfokale Volumenelement diffundierender Fluorophor wird zur Fluoreszenz angeregt und emittiert Photonen. Das Meßvolumen beträgt ca. 0,4 fL. Aus der Fluktuationsanalyse der Fluoreszenz des Moleküls, das das konfokale Volumen durchquert, kann über eine Autokorrelationsfunktion die Diffusionszeit bestimmt werden. Aus dem Verhältnis der Diffusionszeiten läßt sich bei einem ausreichenden Unterschied in der Diffusionszeit zwischen freiem und gebundenem Zustand (Faktor 5-10) der Anteil an freiem und gebundenem Molekül berechnen. Abb. 4.2B adaptiert aus (Yakovleva *et al.*, 2001).

Ihre Konzentration wurde spektroskopisch im konfokalen Volumen bestimmt und für alle Messungen auf 1-5 nM bzw. auf ein äquimolares Verhältnis in bezug auf monomere p53 Consensus-DNA-Bindungsstellen eingestellt (z.B. 3 nM für CON2x5, 1,5 nM für CON4x5). Alle Messungen wurden bei 20°C mit typischen Meßvolumina von 40 µL in 384-well Mikrotiterplatten in 40 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM DTT, 0,1% (v/v) Triton X-100 bzw. unter NMR-Bedingungen in 50 mM KP (pH 7,0), 50 mM KCl, 5 mM DTT, 0,1% (v/v) Triton X-100 durchgeführt. Um unspezifische DNA-Bindung zu unterdrücken, erfolgten alle Messungen in Gegenwart von 1-10 nM unspezifischer pBluescript DNA (Stratagene). Die Konzentration der Protein-Konstrukte lag in einem Bereich von 0,1-1000 nM. Die typische Meßzeit betrug 15 s. Zur Bestimmung der apparenten Bindungskonstanten wurde die folgende Gleichung für Bindung an eine Bindungsstelle mit GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software) angefitet: $f = \frac{[DBD]}{[DBD] + K_D}$, wobei gelten muß: $[DNA] \ll [DBD]$ und $[DNA] \ll K_D$. f steht dabei für den Anteil an komplexiertem TAMRA-markiertem Oligonukleotid und K_D ist die apparente Dissoziationskonstante.

Strukturanalyse von Proteinen

Darstellungen von Kristallstrukturen und Strukturmodellen wurden mit MOLOC (Roche Basel, Paul Gerber Molecular Design), WebLabViewer, Version 4.0 sowie Insight (beide Accelrys) erstellt.

Kristallisation von Proteinen

Kristallisationsexperimente wurden nach der Dampfdiffusionsmethode (McPherson, 1976; McPherson, 1990) durchgeführt. Dabei wurden definierte Volumen der Proteinlösung mit konzentrierter Reservoirlösung gemischt und in einem abgeschlossenen Kompartiment inkubiert. Über den Dampfdruck stellt sich im verdünnten Tropfen die Konzentration der Reservoirlösung ein. Das langsame Aufkonzentrieren der Lösung (in Gegenwart von Zusätzen) führt zur Übersättigung der Proteinlösung, und unter geeigneten Bedingungen zur geordneten Kristallisation des Proteins (Ducruix und Giegé, 1999). Im allgemeinen wurden Screening-Experimente mit konzentrierten Proteinlösungen ($c=10-20$ mg/mL) nach dem *sitting drop* Verfahren in Polystyrol-Cryschem-Platten bei 4°C, 13°C und 20°C durchgeführt (Tropfen/Reservoir-Verhältnis 1:1, Reservoirvolumen 300-500 μ L). Für die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen wurden inkomplette faktorielle Screens (*sparse matrix screens*) verwendet, in denen eine Reihe von Zusätzen (wie Präzipitationsmittel, Lösungsmittel, Stabilisatoren, Salze etc.) gegen verschiedene pH Werte variiert wurden (Abergel *et al.*, 1991; Carter und Carter, 1979; Cudney *et al.*, 1994; Hennessy *et al.*, 2000; Jancarik und Kim, 1991). Die Screens umfaßten jeweils 168 (Roboterscreen der Abt. Strukturforschung) bzw. 96 Bedingungen (Hampton Crystal Screen I und II). Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden zudem alternative Kristallisationsmethoden wie *hanging drop* und *microbatch* Verfahren sowie Kristallisation im Gel eingesetzt (Chayen, 1998).

Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Kristalle wurden für die Datensammlung durch Kapillarkräfte direkt aus dem Kristallisationsansatz in eine Quarzkapillare mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm geerntet und mit einer ausgezogenen Pasteurpipette und einem dünnen Papierstreifen trockengelegt. Um ein Austrocknen des Kristalls zu verhindern, wurde etwas Reservoirlösung in der Kapillare belassen und diese an beiden Enden mit Wachs (Hampton Research) verschlossen. Zur Lösung der Struktur wurde von einem geeigneten Kristall ein Datensatz aufgenommen. Die Messung erfolgte bei 4°C mit Graphit-monochromatisierter Cu-K α -Röntgenstrahlung ($\lambda=1.5418$ Å) mit einem Rigaku RU300-Generator (maximale Auflösung 2.014 Å) und einem Image Plate Detektor (Marresearch). Der Drehwinkel je Aufnahme betrug 1° über einen Meßbereich von 106°, die Belichtungszeit pro Aufnahme betrug 20 min. Die Bestimmung der Kristallorientierung und Raumgruppe sowie die Verfeinerung der Elementarzellenparameter und die Integration der Reflexintensitäten erfolgten mit dem Programm MOSFLM (Version 6.0) (Leslie, 1994). Für die Kristallstrukturanalyse wurde der CCP4 Programmsuite verwendet (Version 5.0) (CCP4, 1994). Die Datenreduktion wurde mit den Programmen SORTMTZ, SCALA und TRUNCATE durchgeführt. Eine erste Bestimmung der Lage des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes in der Elementarzelle erfolgte mit der Patterson-Suchmethode mit Hilfe des Programms MOLREP ohne *rigid body* Minimierung unter Verwendung der Daten mit einer Auflösung von 3.0 Å. Die Struktur des hXDM2-NVP-Peptid-Komplexes wurde schließlich basierend auf der Struktur des hXDM2-IP3-Peptidkomplexes (S. Palme,

pers. Mitteilung) in mehreren Zyklen von manuellem Modellbau mit MOLOC gefolgt von automatischer Verfeinerung nach einem *maximum likelihood* Algorithmus (Murshudov *et al.*, 1997) mit dem Programm REFMAC verfeinert. Die Qualität der Modelle wurde nach jedem Schritt mit dem Programm Procheck Version 3.3 (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft.

NMR-Spektroskopie

NMR-spektroskopischen Messungen und deren Auswertung erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. M. Schwaiger (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) und Dr. T. Diercks (Novaspin Biotech GmbH, München). Diffusions- und Sättigungstransfer-Messungen sowie hydrodynamischen Berechnungen wurden von Dr. T. Diercks durchgeführt. Im folgenden werden die dabei angewendeten Methoden kurz beschrieben. Die Untersuchungen der p53 DBD erfolgten mit BRUKER DMX750 und DMX600 NMR-Spektrometern (Institut für Organische Chemie, Technische Universität München) die mit inversen Drei- (^1H , ^{13}C , ^{15}N) und Vierkanal (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P) Probenköpfen ausgestattet waren. Die Unterdrückung von Wassersignalen wurde mit *magic angle* Gradienten (Mattiello *et al.*, 1996) unter Anwendung von hetero- oder homonukleären *WATERGATE* Gradienten Echos (Piotto *et al.*, 1992) erreicht. NMR-Diffusionsexperimente wurden unter Anwendung einer Kompensation erster Ordnung für lineare Konvektionseffekte mit bipolaren rechteckigen Diffusions-kodierenden gepulsten magnetischen Feldgradienten (2 ms Dauer, Stärke von 3 bis zu 57 G/cm) durchgeführt (Jerschow und Muller, 1998); ein *WATERGATE* Suppressionsschema diente gleichzeitig als longitudinale *eddy current* Kompensationsverzögerung. Die Diffusionsmischzeit wurde auf 125 ms gesetzt. Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit dem Programmpaket SYBYL/Triad (TRIPOS). Die Standard-Pufferbedingungen für die p53 DBD waren 50 mM KP (pH 6.8), 50 mM KCl, 5 mM DTT, 5% (v/v) D_2O ; die Standard-Meßtemperatur betrug 293 K. Den NMR-Signalen der ^1H , ^{15}N -Korrelationspektren wurden die Aminosäure-Reste entsprechend dem publizierten *assignment* der p53 DBD (Mulder *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 1999) zugeordnet. Die untersuchten DNA-Oligonukleotide (PG, CON1x5, CON2x5, CON4x5, TL) wurden in Puffer M (50 mM TRIS (pH 7), 10 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 1 mM DTT) gelöst, für 5 min auf 100°C erhitzt, durch langsames Abkühlen auf 20°C annealt und anschließend in Standard-Puffer verdünnt. Der pH-Wert der DNA-Oligonukleotid-Stocklösungen wurde vor der Titration der NMR-Probe kontrolliert. Im allgemeinen war ein mindestens 1.2-1.5 molarer Überschuß an pentamerem Consensus-Bindungsstellen im DNA-Oligonukleotid in bezug auf die p53 DBD notwendig, um eine stöchiometrische Bindung zu erzielen. Während der Messungen wurde der korrekte pH-Wert der NMR-Probe durch Messung der ^{31}P -NMR chemischen Verschiebung des Phosphatpuffers bestätigt. Hydrodynamische Berechnungen (Orekhov *et al.*, 1995) wurden mit dem DIFFC Modul des DASHA Software Pakets (Version 3.48b) auf der Basis der publizierten Kristallstruktur der p53 DBD (PDB-Code: 1TSR, Kette B) und des unten beschriebenen Modells für den dimeren p53 DBD-DNA-Komplex durchgeführt. Für die Simulation wurde ein *bead* Modell angewendet, das Moleküle als einen Satz von Kugel-artigen sphärischen Reibungszentren repräsentiert, wobei alle CA-, CG- und CZ- (Seitenketten von Arg, Tyr, Phe, Trp) Atome des Proteins als auch alle C2 (Nukleobasen), C3'(Ribose) und Phosphoratome der DNA zentriert waren. Diese wurden gleich skaliert und um eine Hydratations-Schale vom 0.5-fachen des Atomdurchmessers ergänzt. Sättigungstransfer-Differenz (STD) Experimente (Mayer und Meyer, 1999) wurden durch selektive Anregung entweder der Iminprotonen der

DNA (bei 12.2 – 13.8 ppm) oder der Methylprotonen der p53 DBD (bei 0.28 ppm) unter Anwendung einer Serie von 120° Gauss-Pulsen (für 3 s) durchgeführt. Das WATERGATE Suppressionschema wurde gleichzeitig als ein T₂ Filter (20 ms Dauer) benutzt, um Restsignale des komplexierten Zustands zu unterdrücken.

Molecular Modelling

Auf der Basis der Kristallstruktur des p53 DBD-DNA-Komplexes (Cho *et al.*, 1994) (PDB-Code: 1TSR) und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde von Dr. E. Planker (Novaspin Biotech GmbH, München) mit dem Programm X-PLOR (Brünger, 1992b) ein NMR-basiertes und Energie-minimiertes Modell des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes erstellt. Die dabei angewendeten Methoden werden im folgenden kurz beschrieben. Da die Aminosäure Kette B, die einzige Untereinheit darstellt, die in der Kristallstruktur des p53 DBD-DNA-Komplexes spezifisch an DNA gebunden ist (Cho *et al.*, 1994), wurde durch Anwendung einer C₂-symmetrischen Operation aus dieser p53 DBD unter Verwendung des *parallhdg* Kraftfelds eine Anfangsstruktur des p53 Dimers generiert. In einem ersten Schritt wurde die erhaltene Struktur mit festgelegten internen atomaren Koordinaten optimiert bis keine Abstoßung zwischen den Untereinheiten mehr detektiert werden konnte. In einem zweiten Schritt wurden die Koordinaten entsprechend den Änderungen der chemischen Verschiebung in den durchgeführten NMR-Experimenten festgelegt; Atome, die nur kleine Änderungen der chemischen Verschiebung zeigten, wurden fixiert, während die Atome, die die größten Änderungen aufwiesen, keinen Beschränkungen unterlagen. Das System wurde in 300 Schritten eines Konjugat-Gradient Zyklus minimiert, anschließend in 5000 Schritten (3 fs, Temperatur 300 K) relaxiert und abschließend in 300 weiteren Schritten minimiert. Außerdem wurde der Konformationsraum der Dimerisierungs-Kontaktfläche nach eventuellen konformativen Freiheiten abgesucht, wobei für die Kraftfeldberechnungen die folgenden Randbedingungen bestanden: a) Die C₂-Symmetrie gilt auch für die Kontaktfläche der Monomere und b) nur diejenigen Aminosäuren zeigen eine konformationelle Flexibilität, die eine Änderung der chemischen Verschiebung nach DNA-Bindung aufweisen. Von den Aminosäuren R174-G187 wurde daher angenommen, daß sie frei beweglich wären. Jedoch zeigte sich, daß die Konformation der Kontaktfläche aus geometrischen und sterischen Gründen nicht definiert war, da die Freiheitsgrade des Systems zu hoch waren. Auch wenn die dem verwendeten Kraftfeld (*parallhdg*, X-PLOR v. 3.851) zugrunde liegenden Energien eine Faltblattstruktur bevorzugten, erlaubte die Cheminformatik kein verlässliches Modell für die Kontaktfläche. Versuche, ein hochaufgelöstes Modell des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes zu erstellen, wurden nicht weiter verfolgt.

Das Sequenz-basierte Homologie-Modell der p53 DBD wurde freundlicherweise von Dr. G. Georges (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) auf der Basis der Kette B der Kristallstruktur des p53 DBD-DNA-Komplexes (Cho *et al.*, 1994) (PDB-Code: 1TSR) erstellt, da die p53 DBD im Komplex mit DNA vorliegt. Ein Vergleich mit der sehr ähnlichen Struktur der p53 DBD im Komplex mit 53BP2 (Gorina und Pavletich, 1996) (PDB-Code: 1YCS) half bei der Identifikation flexibler Regionen. Das Modell wurde mit den *Homology* und *Discover* Modulen von InsightII (Accelrys) erstellt, überprüft und minimiert. Sequenz-Alignments und Recherchen wurden mit Fasta durchgeführt. Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit NNPREP (Kneller *et al.*, 1990) und NNSSP (Salamov und Solovyev, 1995) durchgeführt. Lipophile Oberflächenpotentiale wurden mit einem Roche-eigenen Programm berechnet, das jedem Atom einen ClogP Wert zuordnet.

5 ERGEBNISSE

5.1 Untersuchungen an der p53 DNA-Bindungsdomäne

Expression, In-Vitro-Faltung und Reinigung der p53 DBD

Für biochemische, mechanistische und strukturelle Untersuchungen der p53 DNA-Bindung sollte im Rahmen dieser Arbeit die p53 DBD in homogener und reiner Form gewonnen werden. Die **Expression der p53 DBD** erfolgte zu diesem Zweck in einem bakteriellen Expressionssystem. Das für die Überexpression der p53 DBD verwendete Plasmid p17007-7 beruhte auf einem modifizierten pQE40 Vektor (Qiagen), in dem die p53 DBD unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren T5 Promoters steht (Bujard *et al.*, 1987; Stuber *et al.*, 1990). Die Expression der p53 DBD erfolgte in den *E. coli* Stämmen BL21 und HB101, die mit dem Repressorplasmid pUBS520 cotransfiziert waren. pUBS520 umfaßt neben dem *lac I* Repressor das *dnaY* Gen, das für die in *E. coli* seltene Arginin-tRNA_{AGA/AGG} codiert (Brinkmann *et al.*, 1989). Eine schematische Karte des zur Überexpression in *E. coli* verwendeten Vektorkonstrukts ist in Abb. 5.1.1 gezeigt.

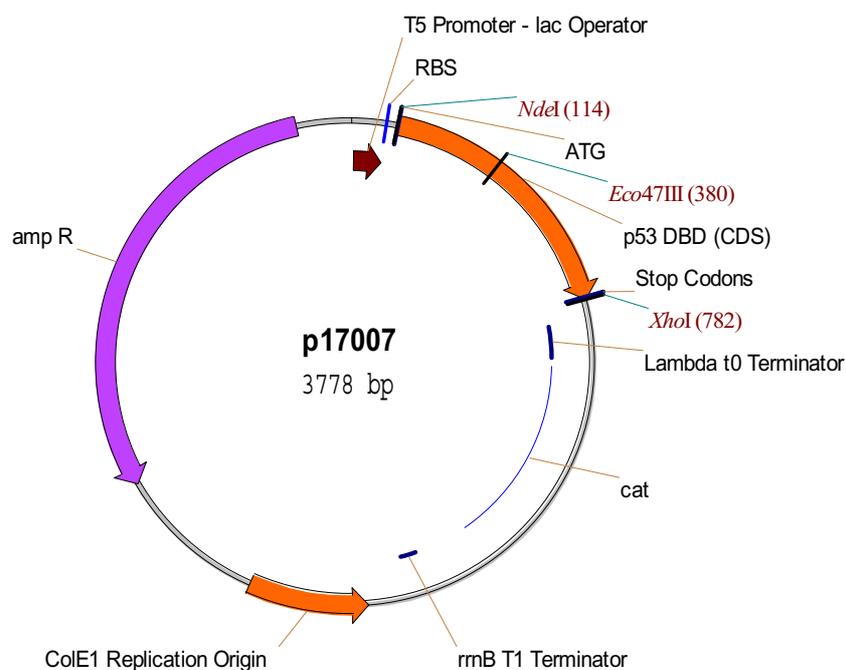


Abb. 5.1.1: Schematische Vektorkarte des für die Expression der p53 DBD verwendeten Plasmids p17007-7. Die wichtigsten Elemente des Expressionsvektors sind bezeichnet.

Abb. 5.1.2 zeigt einen Überblick über die Expression der p53 DBD bei unterschiedlichen Temperaturen. Die p53 DBD konnte insbesondere bei 37°C in hohen Ausbeuten exprimiert werden, wobei sie vornehmlich in Form von unlöslichen *inclusion bodies* (IBs) anfiel. Die Expressionsausbeuten entsprachen Ausbeuten, wie sie mit dem T7-Expressionssystem erzielt werden. Auch nach Erniedrigung der Wachstums- und Induktionstemperatur auf 20°C wurde ein Großteil des Proteins unlöslich in IBs exprimiert. Der Anteil an löslichem Protein war gering, reichte bei erniedrigten Temperaturen aber für eine Isolation der p53 DBD aus dem löslichen Überstand für vergleichende Untersuchungen aus.

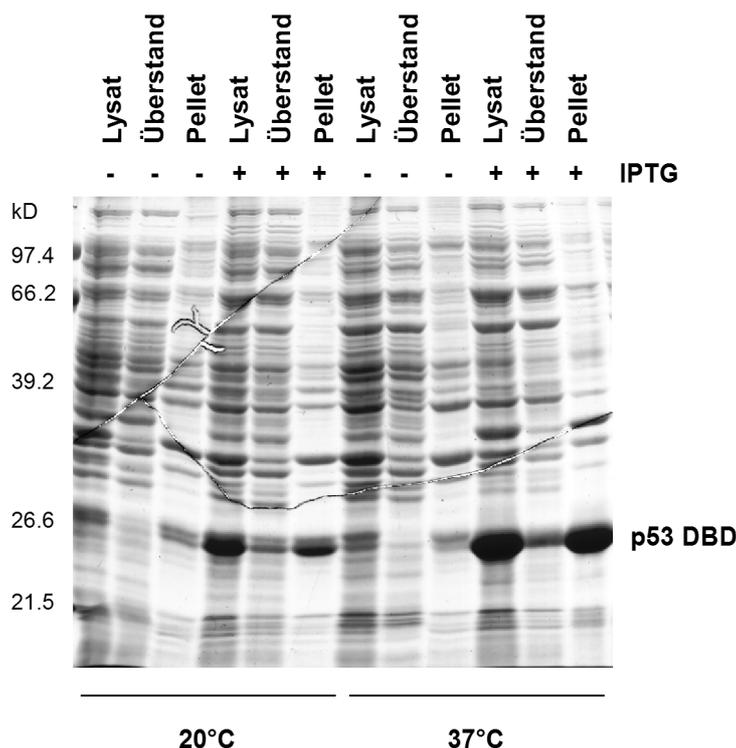


Abb. 5.1.2: Expressionsanalyse der p53 DBD. Das p53 DBD Expressionsplasmid p17007-7 wurde mit dem Repressorplasmid pUBS520 in *E. coli* BL21 transfiziert. Anschließend wurde die Expression in 5 mL Kulturen mit 0.1 mM IPTG (20°) bzw. 1 mM IPTG (37°C) für 8 h induziert. Die Zellen wurden geerntet, durch Ultraschallung lysiert und abzentrifugiert. Gleiche Mengen von Lysat, Überstand und unlöslichem Pellet, das die IBs enthielt, wurden auf einer 12.5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Position der MG-Standards ist angezeigt.

Zur Gewinnung großer Mengen der funktionellen und reinen p53 DBD wurde zu Beginn dieser Arbeit ein effizientes **Verfahren zur *In-Vitro*-Faltung und Reinigung** etabliert. Abb. 5.1.3 zeigt schematisch das dabei gewählte Vorgehen. Die Effizienz der *In-Vitro*-Faltung wird von vielen Faktoren beeinflusst und muß für jedes Protein empirisch bestimmt werden. Die optimalen *In-Vitro*-Faltungsbedingungen sollten so gewählt sein, daß sie die zellulären Faltungsbedingungen imitieren (Beissinger und Buchner, 1998; Buchner, 1996; Buchner und Walter, 2002; Ellis, 2001a; Ellis, 2001b; Ellis und Hartl, 1999; Schwarz *et al.*, 1996). Abhängig vom untersuchten Protein kann der Zusatz von Detergenzien, chemischen Chaperonen und polaren Verbindungen wie Glycerin, L-Arginin oder Osmolyten wie Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) sowie von chaotropen Agenzien wie GdnCl und Harnstoff die Aggregation während der *In-Vitro*-Faltung zum funktionellen Protein vermindern. Insbesondere L-Arginin wirkt während der Faltung wie ein chemisches Chaperon, das es dem Protein ermöglicht, innerhalb der mehrdimensionalen Faltungslandschaft seine native Konformation einzunehmen (De Bernardez Clark *et al.*, 1999). Die Faltung wird zudem von einer Vielfalt an Faktoren wie Temperatur, pH, Redoxpotential, Ionenstärke, Proteinkonzentration, Anwesenheit von Liganden u.v.a. bestimmt (Buchner und Rudolph, 1991; Lilie *et al.*, 1998; Rudolph und Lilie, 1996).

Für die *In-Vitro*-Faltung der p53 DBD wurden die IBs aus den Bakterien isoliert, mit Detergenzien gewaschen und anschließend in 6 M GdnCl, 100 mM TRIS (pH 7.5), 5 mM DTT solubilisiert (Lilie *et al.*, 1998). In einem ersten *trial-and-error*-

Ansatz zur Optimierung der Faltungsbedingungen wurden verschiedene Parameter und Additive, die sich in der Vergangenheit als effektiv erwiesen haben, unter reduzierenden Bedingungen² getestet und variiert. Im einzelnen waren dies: Temperatur (4-20°C), Proteinkonzentration (0.05-1 mg/mL), Pulsanzahl (1-8x) und Pulsdauer (1-8 h), pH-Wert (3-10), L-Arginin-Konzentration (0.05-1 M), sowie verschiedene Puffer und Additive wie z.B. TRIS, HEPES, CAPS, Triethylamin oder Pyrophosphat. Dabei zeigte sich, daß in 1 M TRIS (pH 8.0), 5 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin, 10 µM ZnCl₂ bei 10°C mit 4 über 24 h verteilten Pulsen à 50-150 µg/mL eine funktionelle und stabile p53 DBD isoliert werden konnte. Da die Ausbeuten der *In-Vitro*-Faltung unter diesen Bedingungen schwankten und es im Verlauf der Reinigung zu Präzipitation kam, wurde zur Optimierung der Faltungsbedingungen ein auf die p53 DBD adaptierter **faktorieller Ansatz** gewählt.

Bei diesem Ansatz wurde die *In-Vitro*-Faltung der p53 DBD nach Verdünnung in Puffer unterschiedlicher faktorieller Zusammensetzung analysiert wie von Gouaux beschrieben (Armstrong *et al.*, 1999; Chen und Gouaux, 1997). Während bei konventionellen Ansätzen zur Optimierung der Faltungsbedingungen viele unterschiedliche Faktoren getrennt voneinander variiert werden, hatte der gewählte fraktionelle faktorielle Ansatz den Vorteil, daß mit nur 16 Experimenten gleichzeitig 12 verschiedene Faktoren auf ihren Einfluß auf die Proteinfaltung hin untersucht werden können (siehe Tab. 5.1.1). Dagegen hätte ein vollständiger faktorieller Ansatz theoretisch 4096 Experimente umfaßt. Dabei wurde die Annahme vorausgesetzt, daß sich die nach einem definierten Schema variierten Faktoren untereinander nicht (bzw. nicht wesentlich) beeinflussten. Jedem Faktor wurden zwei Zustände, + für anwesend und – für abwesend, zugeordnet.

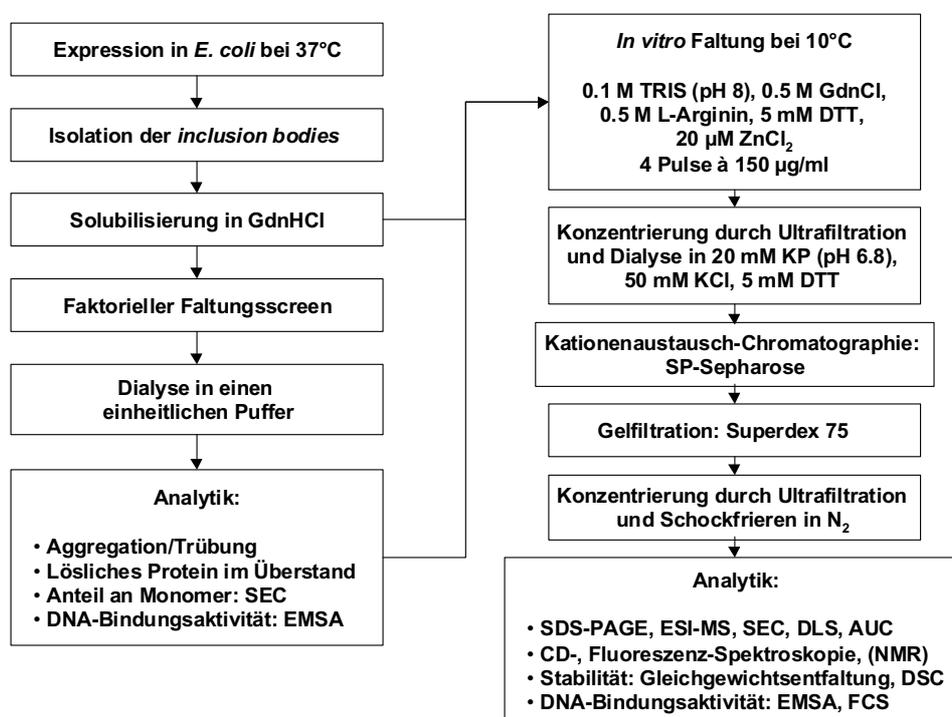


Abb. 5.1.3: *In-Vitro*-Faltung und Reinigung der p53 DBD. Links: Schematischer Überblick über den fraktionellen faktoriellen Faltungsscreen. Rechts: Schema der *In-Vitro*-Faltung und Reinigung der p53 DBD unter (faktoriell) optimierten Bedingungen.

² p53 liegt als intrazelluläres Protein reduziert vor und enthält keine Disulfidbrücken.

Tab. 5.1.1: Faktoren des fraktionellen faktoriellen Faltungsscreens. Die Faktoren wurden entsprechend vorhergehenden Erfahrungen ausgewählt. +/- Faktor-Niveaus sind 1) TRIS/MES (9:1) Puffer: 0.1 M (-), 0.8 M (+); 2) Protein: 0.2 mg/mL (-), 0.8 mg/mL (+); 3) polares Additiv L-Arginin: 0 M (-), 0.5 M (+); 4) Detergenz n-Dodecylmaltosid: 0 mM (-), 0.3 mM (+); 5) pH: 6.0 (-), 8.0 (+); 6) polares Additiv Glycerin: 0% (-), 10% (+); 7) chaotropes Agens GdnCl: 0 M (-), 0.5 M (+); 8) Ionenstärke KCl: 10 mM (-), 250 mM (+); 9) Divalentes Kation Zn^{2+} : 0.01 mM (-), 1 mM (+); 10) Polares Additiv PEG 4000: 0% (-), 0.05% (+); 11) Pyrophosphat: 0 mM (-), 40 mM (+); 12) Polares Additiv Ethylenglykol (EG): 0% (-), 10% (+). - Niveaus sind dunkelgrau; + Niveaus hellgrau unterlegt. Nach (Armstrong *et al.*, 1999).

	Schema	Puffer [M]	Protein [mg/mL]	L-Arg [M]	Det. [mM]	pH	Glycerin [%]	GdnCl [M]	KCl [mM]	ZnCl ₂ [mM]	PEG 4000 [%]	PP [mM]	EG [%]
1	-----+	0.1	0.2	0	0	8.0	0	0	250	0.01	0.05	40	0
2	-----+	0.1	0.2	0	0.3	6.0	10	0.5	10	1	0	0	0
3	-----+	0.1	0.2	0.5	0	6.0	10	0.5	10	0.01	0.05	40	10
4	-----+	0.1	0.2	0.5	0.3	8.0	0	0	250	1	0	0	10
5	-----+	0.1	1.0	0	0	6.0	10	0	250	1	0	40	10
6	-----+	0.1	1.0	0	0.3	8.0	0	0.5	10	0.01	0.05	0	10
7	-----+	0.1	1.0	0.5	0	8.0	0	0.5	10	1	0	40	0
8	-----+	0.1	1.0	0.5	0.3	6.0	10	0	250	0.01	0.05	0	0
9	-----+	0.8	0.2	0	0	6.0	0	0.5	250	1	0.05	0	10
10	-----+	0.8	0.2	0	0.3	8.0	10	0	10	0.01	0	40	10
11	-----+	0.8	0.2	0.5	0	8.0	10	0	10	1	0.05	0	0
12	-----+	0.8	0.2	0.5	0.3	6.0	0	0.5	250	0.01	0	40	0
13	-----+	0.8	1.0	0	0	8.0	10	0.5	250	0.01	0	0	0
14	-----+	0.8	1.0	0	0.3	6.0	0	0	10	1	0.05	40	0
15	-----+	0.8	1.0	0.5	0	6.0	0	0	10	0.01	0	0	10
16	-----+	0.8	1.0	0.5	0.3	8.0	10	0.5	250	1	0.05	40	10

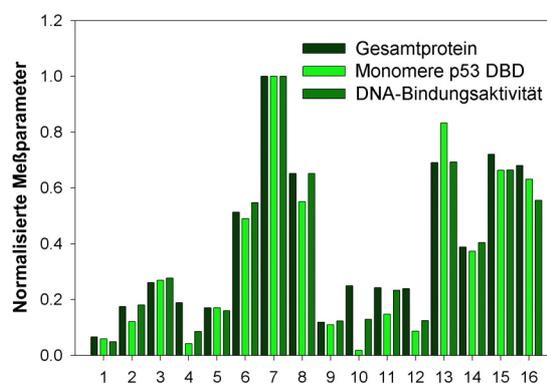


Abb. 5.1.4: Normalisierte Ergebnisse des fraktionellen faktoriellen Faltungsscreens als Balkendiagramm. Für die 16 faktoriell zusammengesetzten Lösungen wurden nach Dialyse und Zentrifugation die folgenden Meßparameter bestimmt: a) Gesamtausbeute an löslichem Gesamtprotein (in μg); b) Peakfläche des Monomers durch analytische Gelfiltration (in $\text{mAU}\cdot\text{min}$) und c) Gesamt-DNA-Bindungsaktivität durch EMSA (in cps). Zur Darstellung wurden die Meßwerte auf maximale Ausbeute normalisiert. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Einfachbestimmung.

Auf der Grundlage der vorhergehenden Erfahrungen mit der *In-Vitro*-Faltung von p53 und anderen intrazellulären Proteinen wurden die folgenden **Faktoren** in den Screen miteinbezogen und auf ihren Einfluß auf die Faltungseffizienz hin untersucht: Ionenstärke; Puffer-Konzentration; Proteinkonzentration; Zusatz der polaren Additive

L-Arginin, Glycerin, PEG 4000 und Ethylenglycol (Sichler, 2001); Zusatz des chaotropen Agens GdnCl; Zusatz von N-Dodecylmaltosid als Detergenz; Zusatz von Zn^{2+} -Ionen, die für die Faltung der p53 DBD essentiell sind, und Zusatz von Pyrophosphat, das das DNA-Rückgrat imitieren könnte (S. Bell, pers. Mitteilung). Für den Faltungsscreen wurden über einen Zeitraum von 24 h bei 10°C jeweils Aliquots des Proteinsolubilisats mit 4 Pulsen in je 10 mL der Lösungen 1-16 verdünnt und inkubiert. Diese 16 Lösungen waren durch eine definierte Zusammensetzung der 12 gewählten Faktoren gemäß dem in Tab. 5.1.1 definierten Muster charakterisiert. Um für die nachfolgende Analytik identische Bedingungen zu schaffen, wurden nach der *In-Vitro*-Faltung alle 16 Lösungen in den gleichen Puffer: 50 mM TRIS (pH 7.0), 100 mM KCl, 5 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin dialysiert. Nach Zentrifugation des Dialysats wurden drei Parameter quantitativ bestimmt: a) die Menge an löslichem Gesamtprotein im Überstand, b) der Anteil an monomerer p53 DBD durch analytische Gelfiltration und c) die spezifische DNA-Bindungsaktivität durch EMSA. Die jeweiligen Meßergebnisse für die 16 Lösungen wurden entsprechend den im Test eingesetzten Proteinmengen bzw. Volumina für den gesamten *In-Vitro*-Faltungsansatz berechnet und anschließend auf die maximal erzielte Ausbeute normiert (Abb. 5.1.4). Während einige Lösungen zu guten Ausbeuten an monomerem und funktionellem Protein führten (#7, #8, #13, #15, #16), unterstützten andere die Faltung zum funktionellen Protein nicht (#1, #4, #9). Entsprechend der Anwesenheit oder Abwesenheit der Faktoren in der entsprechenden Lösung konnte anschließend mit einer Matrix der positive (oder negative) Effekt, den jeder einzelne Faktor auf die Faltungseffizienz hatte, quantitativ für die untersuchten **Parameter** (maximale Proteinausbeute, monomeres Protein und volle DNA-Bindungsaktivität) analysiert werden. Dazu wurden für jeden gemessenen Parameter, z.B. die DNA-Bindungsaktivität, getrennt die Haupteffekte jedes einzelnen Faktors nach der folgenden Formel berechnet: Haupteffekt = $(\sum \text{"+" Ergebnisse} - \sum \text{"- Ergebnisse"})/8$.

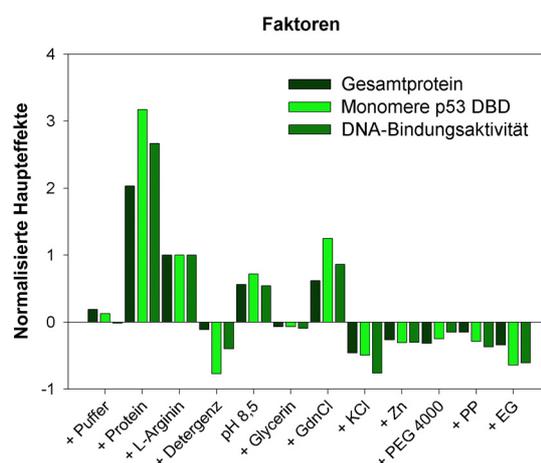


Abb. 5.1.5: Normalisierte Haupteffekte der im faktoriellen Faltungsscreen untersuchten Faktoren als Balkendiagramm. Die Hauptfaktoren wurden entsprechend der Formel Haupteffekt = $(\sum + \text{Ergebnisse} - \sum - \text{Ergebnisse})/8$ aus den Ergebnissen der 16 faktoriell zusammengesetzten Lösungen für die drei Parameter lösliches Gesamtprotein, monomere p53 DBD und DNA-Bindungsaktivität errechnet und normalisiert. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Einfachbestimmung.

Anschließend wurden die Haupteffekte aller Faktoren in Gegenwart von 0.5 M L-Arginin auf 1.0 normiert. Abb. 5.1.5 stellt die quantitative Auswertung graphisch dar. Es ist klar ersichtlich, daß die drei Meßparameter und insbesondere der Monomeranteil und die DNA-Bindungsaktivität miteinander korrelierten. So förderten alle Faktoren, die den Anteil an monomerer p53 DBD erhöhten, auch die Faltung von funktioneller DNA-Bindungs-aktiver p53 DBD und umgekehrt. Testete man gleiche Mengen an p53 DBD aus den verschiedenen Ansätzen, ergab sich für alle Ansätze eine vergleichbare spezifische DNA-Bindungsaktivität, was dafür spricht, daß alle Domänen funktionell gefaltet waren und es nicht bei bestimmten Bedingungen zur Bildung alternativer, DNA-Bindungs-inaktiver Konformationen kam. Der Zusatz von 0.5 M GdnCl und 0.5 M L-Arginin bei pH 8.0 sowie eine Erhöhung der Proteinkonzentration steigerten die Ausbeute an monomerer, funktioneller p53 DBD maßgeblich. Dagegen hatten der Zusatz von TRIS und Glycerin keinen, alle anderen untersuchten Faktoren sogar einen negativen Einfluß. In der Annahme, daß sich die Faktoren voneinander unabhängig und angenähert additiv verhielten, wurde anschließend durch die Kombination der positiven Faktoren ein neuer ***In-Vitro-Faltungspuffer*** zusammengestellt. Dieser setzte sich wie folgt zusammen: 0.1 M TRIS (pH 8.0), 0.5 M GdnCl, 0.5 M L-Arginin, 20 µM ZnCl₂, 5 mM DTT, 1 mM Benzamidin. Das gesamte Verfahren wurde bei 4°C über 24 h mit 3 Pulsen à 200 µg/mL auf einen 4 L Maßstab übertragen (*upscaling*). Gegenüber den ursprünglich gewählten Bedingungen ergab sich bezogen auf die Menge an eingesetztem Gesamtprotein bei Verwendung der faktoriell optimierten Bedingungen eine reproduzierbare Steigerung der Ausbeute nach Dialyse um den Faktor 4. So konnten in einem direkten Vergleich aus 2400 mg solubilisiertem Protein der p53 DBD IB-Präparation nach dem alten Verfahren ca. 300 mg (12.5%), nach dem faktoriell optimierten Verfahren dagegen ca. 1200 mg Protein (50%) als Ausgangsmaterial für die darauffolgende Reinigung der p53 DBD gewonnen werden. Zudem trat im Verlauf der Reinigung keine weitere Proteinpräzipitation mehr auf. Die erzielte Ausbeute war damit so hoch, daß keine Optimierung der Parameter durch einen weiteren faktoriellen Screen notwendig erschien.

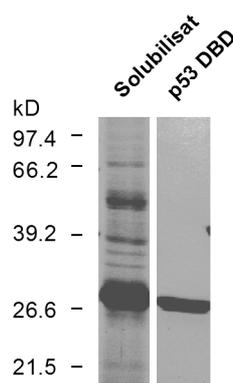


Abb. 5.1.6: SDS-PAGE der *In-Vitro*-Faltung und Reinigung der p53 DBD. 20 µg der solubilisierten IBs und 10 µg der *in vitro* gefalteten und gereinigten p53 DBD Präparation wurden auf einer 12.5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Position der MG-Standards ist eingezeichnet.

Die **Reinigung der p53 DBD** erfolgte bei 4°C entsprechend dem Schema in Abb. 5.1.3 durch Kationenaustauschchromatographie an SP-Sepharose (zur Gewinnung einer ladungsmäßig homogenen Präparation) und durch präparative

Gelfiltration an einer Superdex 75-Säule (zur Abtrennung von Aggregaten und höher oligomeren Zuständen), gefolgt von der Vereinigung und Konzentrierung der Fraktionen durch Ultrafiltration. Alle Präparationen wurden durch SDS-PAGE, analytische Gelfiltration und Analyse der DNA-Bindungsaktivität analysiert. Die Identität und Reinheit der Präparation (>98%) wurde zudem durch ESI-MS und UV-Spektroskopie bestätigt; in der RP-HPLC erschien die Präparation homogen (Daten nicht gezeigt). Abb. 5.1.6 zeigt beispielhaft ein Gel der *In-Vitro*-Faltung und Reinigung der p53 DBD. In Tab. 5.1.2 ist zudem ein Überblick über die *In-Vitro*-Faltung und Reinigung der unmarkierten p53 DBD zusammen mit der Präparation Isotopen-markierter p53 DBDs für NMR-Spektroskopie gegeben (siehe Tab. 5.1.2). Die *in vitro* gefaltete p53 DBD Präparation enthielt wie die lösliche exprimierte Präparation neben der aktiven, an DNA-bindenden p53 DBD in der wildtyp Konformation, die mit PAb1620 reagierte, auch einen Anteil an p53 DBD in der mutanten Konformation, der mit PAb 240 reagierte. Eine quantitative Abschätzung der relativen Anteile durch ELISA wurde aufgrund der unterschiedlichen Bindungsaktivitäten und Spezifitäten der Antikörper nicht weiter verfolgt.

Bei einer Induktionstemperatur von 20°C konnte die p53 DBD für Vergleichszwecke durch **lösliche Expression** aus dem Überstand isoliert werden (siehe Abb. 5.1.2). Die Reinigung der **wildtyp p53 DBD** und von drei **Mutanten His-175, Trp-248 und Val-138** aus dem löslichen Überstand erfolgte analog zur obigen Reinigung, ergab jedoch trotz eines zusätzlichen Heparin HiTrap Schritts im Vergleich zur *in vitro* gefalteten p53 DBD einen niedrigeren Reinheitsgrad von > 90-95% (Abb. 5.1.10). Bei löslicher Expression konnten aus einer 10 L Schüttelkultur (ca. 30 g Bakterienfeuchtmasse) je 50-80 mg der wildtyp p53 DBD und Trp-248 p53 DBD sowie je 20-30 mg Val-138 und His-175 p53 DBD isoliert werden. Aus den IBs eines 10 L Fermentationsansatz (ca. 90 g) könnten zum Vergleich insgesamt mehr als 3400 mg hochreine p53 DBD gewonnen werden (Tab. 5.1.2). Wie weiter unten gezeigt wird, sind die *in vitro* gefaltete und die aus der löslichen Fraktion von *E. coli* aufgereinigte p53 DBD (Bullock *et al.*, 1997) in den untersuchten Eigenschaften (Spektroskopie, Stabilität) und in ihrer DNA-Bindungsaktivität vergleichbar. Für Bindungsstudien mit dem C-terminalen Peptid (ELISA, HTRF, Biacore) wurde zudem löslich exprimierte **GST-p53 DBD** durch eine Kombination von Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose und Gelfiltration aus dem Überstand gereinigt. Durch Spaltung mit Thrombin konnte die p53 DBD quantitativ aus GST-p53 DBD freigesetzt und isoliert werden. Neben der p53 DBD wurden für vergleichende und strukturelle Untersuchungen zudem zwei *in vitro* gefaltete, N-terminal verlängerte Konstrukte verwendet (siehe unten): 1801-p53 DBD (AS 40-312) und insbesondere **p53C312 (AS 1-312)**, das einen zusätzlichen N-terminalen (RGS)-His₆-Tag beinhaltet und sich ebenfalls löslich exprimieren ließ. Zur Gewinnung größerer Mengen wurde p53C312 bei 37°C in IBs exprimiert, unter denaturierenden Bedingungen in 6 M GdnCl an Zn-NTA-Sepharose vorgereinigt und anschließend in 1 M L-Arginin, 0.1 M TRIS (pH 8), 10 µM ZnCl₂, 5 mM DTT *in vitro* gefaltet, konzentriert und dialysiert. Die Reinigung erfolgte über eine Heparin HiTrap Säule und eine abschließende präparative Gelfiltration an einer Superdex 75-Säule (Daten nicht gezeigt). Aus 10 L einer Schüttelkultur in LB (35 g Naßgewicht) konnten so ca. 120 mg p53 C312 für weitergehende Untersuchungen mit einer Reinheit >95% gewonnen werden.

Expression, In-Vitro-Faltung und Reinigung der p53 DBD für NMR-Spektroskopie

Für **NMR-spektroskopische Untersuchungen** wurde das Verfahren zur Expression, *In-Vitro*-Faltung und Reinigung der p53 DBD analog zur Gewinnung der einfach bzw. doppelt Isotopen-markierten p53 DBD adaptiert. Entsprechend den kleineren absoluten Proteinmengen wurde mit 25-100 µg/mL Protein gepulst.

Tab. 5.1.2: Übersicht über die Ausbeuten der Expression und Reinigung der [U-¹⁵N]- und [U-¹³C, ¹⁵N]-markierten p53 DBDs im Vergleich zur unmarkierten p53 DBD.

Fraktion	p53 DBD*	[U- ¹⁵ N]-p53 DBD*	[U- ¹³ C, ¹⁵ N]-p53 DBD
Kulturvolumen	10 L Fermentation	10 L Fermentation	2 L Schüttelkolben
<i>E. coli</i> – Stamm	HB101	BL21	BL21
Naßgewicht Bakterien	491 g	67 g	11 g
Naßgewicht IBs	90 g (12 g)	14.5 g (3.2 g)	2 g
Solubilisat	18 g (2400 mg)	4.4 g (970 mg)	620 mg
Gesamtprotein			
Pool vor SP-Sepharose	9 g (1200 mg)	2.0 g (450 mg)	400 mg
Gesamtprotein			
Pool nach SP-Sepharose	4.5 g (600 mg)	945 mg (210 mg)	165 mg
Gesamtprotein			
Pool nach Superdex 75	3.4 g (450 mg)	720 mg (160 mg)	110 mg
Gesamtprotein#			

* für p53 DBD und [U-¹⁵N]-p53 DBD wurde nicht der gesamte Fermentationsansatz-Ansatz aufgearbeitet. Die angegebenen Ausbeuten sind entsprechend den (mit dem optimierten Protokoll) erzielten Ausbeuten hochgerechnet; in Klammer sind die tatsächlich erzielten Ausbeuten angegeben. # Konzentration 300-500 µM, Reinheit >98%.

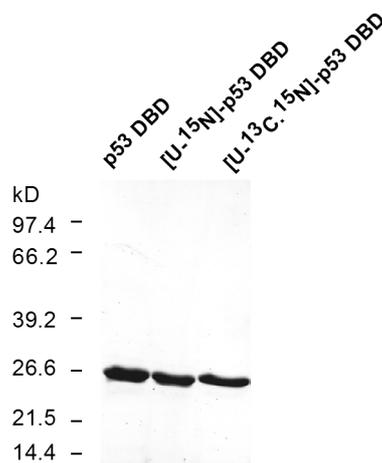


Abb. 5.1.7: SDS-PAGE der p53 DBD im Vergleich zu den [U-¹⁵N]- und [U-¹³C, ¹⁵N]-markierten p53 DBD NMR-Präparationen. Jeweils 10 µg der gereinigten p53 DBD Präparationen wurden auf einer 12.5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Position der MG-Standards ist eingezeichnet.

Tab. 5.1.3 zeigt eine Übersicht über die Ausbeuten der Reinigung der **Isotopen-markierten p53 DBDs**. Die Ausbeuten lagen im Bereich der unmarkierten p53 DBD und ermöglichten es, aus 1 bis 2 L M9-Minimalmedium mindestens 50 mg Protein für NMR-Messungen zu gewinnen. Bezogen auf das Naßgewicht der IBs

waren die Ausbeuten an Isotopen-markierten p53 DBDs mit dem optimierten *In-Vitro*-Faltungs- und Reinigungsprotokoll vergleichbar. Abb. 5.1.7 zeigt ein Übersichts-Gel der [U- ^{15}N]- und [U- ^{13}C , ^{15}N]-p53 DBD Präparationen im Vergleich zur unmarkierten p53 DBD. Zur Bestätigung der Markierung und zur Bestimmung des Markierungsgrads wurden die Präparationen durch ESI-MS analysiert. Während die unmarkierte p53 DBD (theoretisch: 24551 kD; gemessen: 24542 kD) und die [U- ^{15}N]-p53 DBD (theoretisch: 24869 kD; gemessen: 24866 kD) eine enge Massenverteilung und im Rahmen der Meßgenauigkeit das erwartete Molekulargewicht aufwiesen, zeigte die [U- ^{13}C , ^{15}N] p53 DBD eine breitere Massenverteilung und ein um 21 Da zu niedriges Molekulargewicht (theoretisch: 25917 kD; gemessen: 25896 kD). Diese Differenz entspricht einem ^{13}C -Markierungsgrad von ca. 98% und konnte auf eine unvollständige ^{13}C -Markierung zurückgeführt werden.

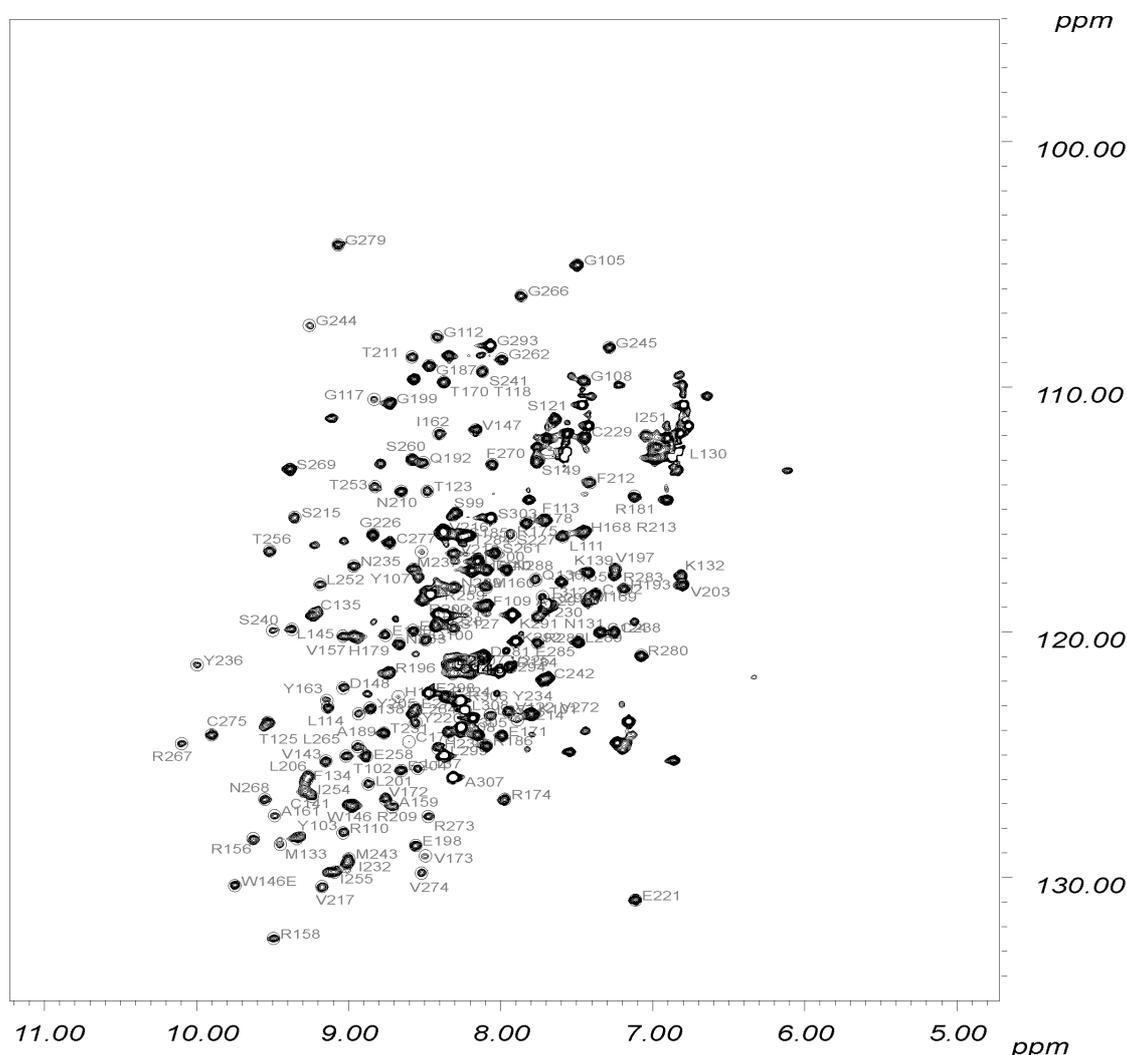


Abb. 5.1.8: ^{15}N , ^1H -HSQC-Spektrum der [U- ^{15}N]-p53 DBD bei 750 MHz und 293K. Die für die p53 DBD publizierte Zuordnung ist in grau überlagert gezeigt (Wong *et al.*, 1999).

Eine qualitative Analyse des ^1H -Protonen-Spektrums der [U- ^{15}N]-markierten p53 DBD zeigte alle Charakteristika einer stabil gefalteten Proteindomäne mit einem hohen β -Faltblatt-Anteil (Daten nicht gezeigt): Das Spektrum wies eine hohe Dispersion mit scharfen Signalen zwischen 5-10 ppm, ein Trp-Signal bei >9 ppm,

sowie Signale der von Aromaten-bedeckten Methylgruppen (*Aromatenringstrom*) bei <0.9 ppm auf. Das entsprechend gefilterte ^{15}N , ^1H -HSQC-Spektrum (Abb. 5.1.8) zeigte diskrete und klar unterscheidbare Signale und bestätigte, daß die Domäne stabil gefaltet war. Zudem entsprach es dem im Verlauf dieser Arbeit publizierten HSQC-Spektrum einer aus der löslichen Fraktion aufgereinigten $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -markierten p53 DBD (Wong *et al.*, 1999). Diese Tatsache ermöglichte eine eindeutige Zuordnung der Signale der Rückgrat ^{15}N -Amid-Protonen (Prolin-Reste und N-Terminus ausgenommen) entsprechend der publizierten NMR-Zuordnung (Wong *et al.*, 1999). Für 166 von 219 Aminosäure-Resten (18 Prolin-Reste) konnten die Amid-Signale im erhaltenen HSQC-Spektrum zugeordnet werden. In den folgenden Experimenten wurde diese Zuordnung übernommen. Das Vorhandensein einer Kristallstruktur der p53 DBD im Komplex mit DNA (Cho *et al.*, 1994) sowie die NMR-Zuordnung der Signale der freien p53 DBD (Wong *et al.*, 1999) ermöglichten es, sich mit den beschriebenen p53 DBD Präparationen im Rahmen dieser Arbeit auf struktureller Ebene experimentell durch *chemical shift perturbation mapping* mit verschiedenen Fragestellungen zu befassen, die die DNA-Bindung von p53 sowie ihre allosterische Regulation betrafen (siehe Kapitel 5.2 und 5.3).

Kristallisation der p53 DBD

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die strukturelle Basis der Regulation der p53 DNA-Bindung näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde neben NMR-spektroskopischen Untersuchungen versucht, die freie humane p53 DBD zu kristallisieren, um so mögliche Interaktionspartner und konformationelle Unterschiede zwischen der freien und der DNA-gebundenen Form untersuchen zu können.

Tab. 5.1.3: Ausgewählte Kristallisationsbedingungen der freien humanen p53 DBD bei 4°C. Je 2 μL 10 mg/mL p53 DBD in 10 mM TRIS (pH 7.0), 40 mM KCl, 1 mM TCEP wurden mit 2 μL Reservoirlösung gemischt und in Cryschem-Platten bei 4°C inkubiert. Gezeigt sind einige exemplarische Bedingungen, unter denen es reproduzierbar zur Bildung von Kristallen kam. Die grau unterlegten Bedingungen erschienen am besten geeignet und wurden weiter optimiert.

Screen-Bedingung	Konz [M]	Puffer	pH	Konz [M]	Salz	Konz [%]	Präzipitanz	Form
Hampton II – 7	-	-	-	-	-	10	PEG 1000	Plättchen + Büschel
Hampton I – 10	0.1	NaAcetat	4.5	0.2	(NH_4)Acetat	30	PEG 4000	Plättchen + Büschel
Hampton I – 18	0.1	Na-Cacodylat	6.5	0.2	$\text{Mg}(\text{Acetat})_2$	20	PEG 8000	Büschel + Plättchen
Hampton I - 19, HF 79	0.1	TRIS/HCl	8.5	0.2	(NH_4)Acetat	30	Isopropanol	Büschel
Hampton I - 36, HF 83	0.1	TRIS/HCl	8.5			8	PEG 8000	Plättchen + Büschel
HF 78	0.1	MES /NaOH	6.5	0.2	$\text{Mg}(\text{Acetat})_2$	20	PEG 8000	Plättchen + Büschel
HF 88	0.1	MES /NaOH	6.5	0.2	$\text{Zn}(\text{Acetat})_2$	18	PEG 8000	Plättchen + Büschel
HF 89	0.1	MES /NaOH	6.5	0.2	$\text{Ca}(\text{Acetat})_2$	18	PEG 8000	Plättchen

Die *in vitro* gefalteten p53 DBD Präparationen waren $>98\%$ rein und wiesen in DLS-Experimenten eine monomodale Verteilung auf, was für eine gute Kristallisationswahrscheinlichkeit sprach. In mehreren inkompletten faktoriellen Screens wurden Kristallisationsbedingungen für die Apo-p53 DBD gesucht. Die p53 DBD wies bei Proteinkonzentrationen von 10 bis 20 mg/mL nur eine geringe Präzipitationsneigung auf. Bei 4°C konnten unter ca. 15 Bedingungen Kristalle der p53 DBD nachgewiesen werden (Tab. 5.1.3), wogegen bei 20°C nur wenige, instabile

Kristalle beobachtet wurden. Allerdings waren alle Kristalle aufgrund ihrer Form (Büschel, Nadeln und Plättchen) für eine Röntgenstrukturanalyse ungeeignet. Anschließend wurde versucht, über eine Vielzahl von Parametern (pH, Additive, Detergenzien, PEG, Salze, Temperatur) sowie durch Kristallisation mit unterschiedlichen Verfahren (*hanging drop*, *microbatch*, im Gel) die Wachstumsbedingungen zur Bildung von dreidimensionalen Kristallen zu optimieren (Ducruix und Giegé, 1999). Mikroseeding bei 13°C in HF 89 führte schließlich zu einer Verbesserung der Form und Größe der Kristalle. Abb. 5.1.9 zeigt exemplarische **Kristalle der p53 DBD**, die durch Seeding bei 13°C erhalten wurden, im Vergleich zu den Büscheln, wie sie ohne Seeding bei 4°C auftraten. Allerdings handelte es sich bei den erhaltenen Kristallen um kleine Kristallplättchen, die einer weiteren Optimierung bedürfen (maximal ca. 80x20x4 µm). Die Analyse des Streuvermögens zeigte, daß die Apo-p53 DBD Plättchen nur bis knapp 4 Å streuten. Ein Versuch über die genau kontrollierte Regulation des Wassergehalts der Kristalle mit Lazarus das Streuverhalten der Kristalle zu optimieren (Estebanez-Perpina *et al.*, 2000; Kiefersauer *et al.*, 2000), führte zu keiner Verbesserung der Auflösung. Aufgrund der geringen Größe der Kristalle könnte aber möglicherweise mit Synchrotronstrahlung eine ausreichende Auflösung der Reflexe für die Aufnahme eines Datensatzes erzielt werden (H. Brandstetter, pers. Mitteilung)³. Die Zugabe von spezifischen Consensus-DNA-Oligonukleotiden (PG, CON4x5, CON2x5) sowie potentiellen Liganden der p53 DBD wie dem p53 C-terminalem Peptid (AS 361-382) (siehe Kapitel 5.2) oder den mutmaßlichen p53-stabilisierenden Substanzen CP-31398 und Trimeprazin (Foster *et al.*, 1999) hatte keinen positiven Einfluß auf die Kristallisation. Versuche zur Kristallisation von N-terminal verlängerten p53 Konstrukten wie p53C312 (alleine und im Komplex mit hXDM2 als Bindepartner) waren vermutlich als Folge der Flexibilität der NTD negativ (siehe unten).

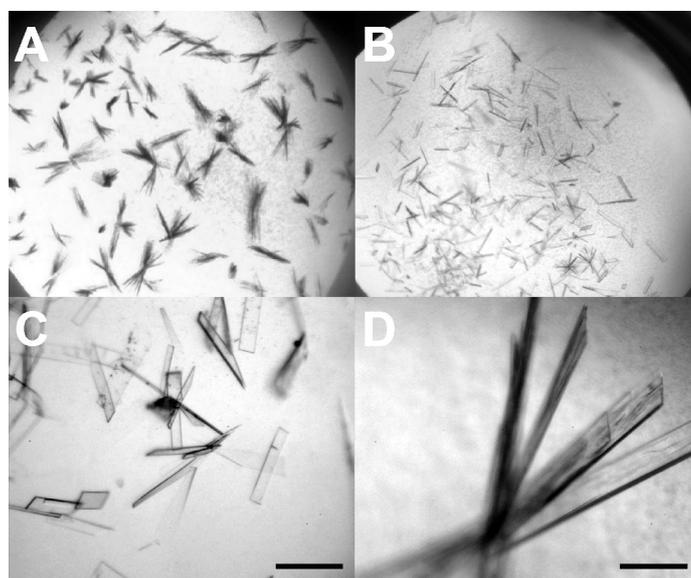


Abb. 5.1.9: Kristalle der Apo-p53 DBD vor und nach Seeding in HF 89. A) Nadeln und Büschel der p53 DBD ohne Seeding; B-D) Nach Mikroseeding kristallisierten dünne Plättchen, die eine dreidimensionale Ausdehnung hatten. Proteinkonzentration 10 mg/mL; Tropfen/Reservoir-Verhältnis 1:2, Temperatur 13°C. Der Maßstab entspricht ca. 100 µm.

³ Die Kristallisationsbedingungen (HF 89) sind mit dem Einfrieren der Kristalle kompatibel.

Biochemische Charakterisierung der p53 DBD

Die p53 DBD wurde in den letzten Jahren biophysikalisch und strukturell untersucht (Bullock *et al.*, 2000). Der Vergleich der *in vitro* gefalteten p53 DBD mit der löslich exprimierten p53 DBD zeigte, daß beide Domänen in ihren biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften übereinstimmen. Zu Vergleichszwecken wurden zudem drei löslich exprimierte exemplarische Mutanten der p53 DBD gereinigt und analysiert: a) die Kontaktmutante Trp-248, b) die Konformationsmutante His-175 und c) die Temperatur-sensitive Mutante Val-138 (Abb. 5.1.10A) (Bullock und Fersht, 2001; Bullock *et al.*, 2000). Durch analytische Gelfiltration wurde bestätigt, daß alle Präparationen als Monomer mit vergleichbaren Retentionszeiten vorlagen (Daten nicht gezeigt). Die *in vitro* gefaltete und die löslich exprimierte wildtyp p53 DBD Präparation sowie die Mutante Val-138 banden im EMSA spezifisch an das PG Consensus-DNA-Oligonukleotid. Dagegen war für die beiden Mutanten Trp-248 und His-175 keinerlei DNA-Bindungsaktivität mehr nachweisbar (Abb. 5.1.10B). Die *in vitro* gefaltete isolierte p53 DBD wies in einem semiquantitativen EMSA im Vergleich zu tetramerem f.l. p53 (Daten nicht gezeigt) und zu den homologen p63 und p73 DBDs (Kapitel 5.4) ein vergleichbares Spezifitätsprofil für ausgewählte (natürliche) p53 Consensus-DNA-Oligonukleotide wie PG, *p21*, *gadd45*, *cyclin G*, *bax* und *mdm2* auf. In einem FCS-Test hatten die *in vitro* gefaltete und die löslich exprimierte p53 DBD Präparation eine vergleichbare DNA-Bindungsaffinität mit einem apperenten K_D von 10-15 nM für ein TAMRA-markiertes PG Consensus-DNA-Oligonukleotid.

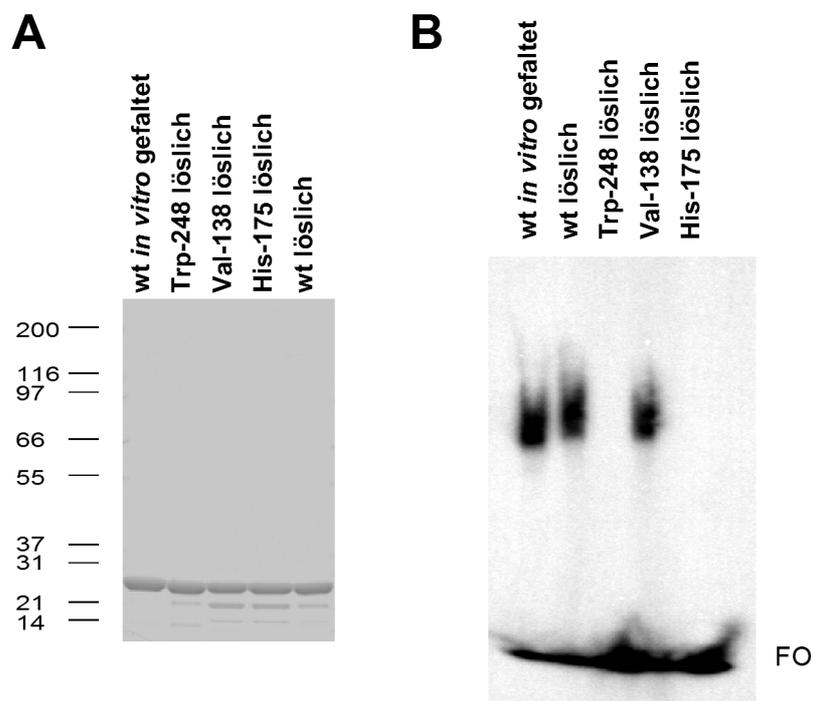


Abb. 5.1.10: SDS-PAGE und DNA-Bindungsaktivität der wildtyp und mutanten p53 DBD Präparationen. **A) SDS-PAGE:** Jeweils 10 µg der gereinigten p53 DBD Präparationen wurden auf einer 12.5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Position der MG-Standards ist eingezeichnet. **B) EMSA:** Jeweils 50 ng der bezeichneten p53 DBD Präparationen wurden für ihre DNA-Bindungsaktivität an das radioaktiv markierte p53 Consensus-Oligonukleotid PG untersucht. FO steht für freies Oligonukleotid.

Der **spektroskopische Vergleich** durch Nah-UV CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie zeigte nur geringfügige Unterschiede der *in vitro* gefalteten und der löslich exprimierten p53 DBDs im nativen sowie im Harnstoff-denaturierten Zustand (Abb. 5.1.11). Nach Anregung bei 280 nm war das Fluoreszenz-Spektrum der p53 DBD vom Beitrag der Tyrosin-Resten bei 304 nm dominiert, wogegen der einzelne Tryptophan-Rest im nativen Zustand ausgelöscht wurde und nur eine geringe Fluoreszenz zeigte. Erst im Harnstoff-denaturierten Zustand war die Auslöschung der Tryptophan-Fluoreszenz aufgehoben und der Tryptophan-Rest zeigte eine intensive Fluoreszenz bei 354 nm (Rotverschiebung) (Bullock *et al.*, 1997). Beide p53 DBD Präparationen zeigten zudem ein für p53 charakteristisches, für ein β -Faltblattprotein jedoch untypisches Nah-UV CD-Spektrum mit einem Minimum im Bereich von 200 bis 210 nm auf (siehe unten).

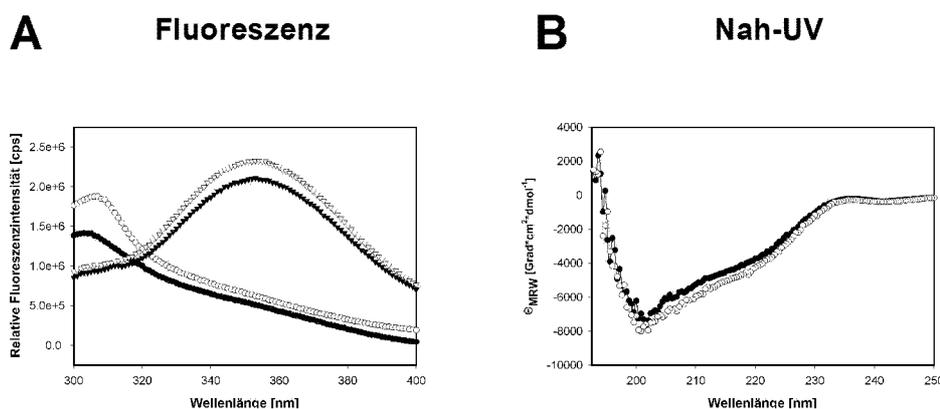


Abb. 5.1.11: Fluoreszenz- und Fern-UV CD-Spektren der *in vitro* gefalteten p53 DBD im Vergleich zur löslich exprimierten wildtyp p53 DBD. **A) Fluoreszenz-Spektren** des nativen und denaturierten Zustands wurden bei 15°C mit 1 μ M Lösungen der p53 DBD Präparationen in 40 mM KP (pH 7.5), 25 mM KCl, 1 mM DTT (\pm 6 M Harnstoff) mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm für Emissionswellenlängen zwischen 300 und 400 nm gemessen. **B) Fern-UV CD-Spektren** des nativen und denaturierten Zustands wurden bei 15°C mit 8 μ M Lösungen der p53 DBD Präparationen in 40 mM KP (pH 7.5), 25 mM KCl, 1 mM DTT aufgenommen. Die Kurven sind wie folgt bezeichnet: löslich exprimierte p53 DBD nativ (○), denaturiert (Δ); *in vitro* gefaltete p53 DBD nativ (●), denaturiert (\blacktriangle).

Der **kalorimetrische Vergleich** der Stabilität gegenüber irreversibler thermischer Denaturierung durch DSC ergab, daß beide wildtyp p53 DBD Präparationen eine identische Thermostabilität mit einem Schmelzpunkt T_m von 44.5°C und damit eine vergleichbare Faltungstabilität aufwiesen. Entsprechend vorhergehenden Untersuchungen der Faltungstabilität von Mutanten der p53 DBD durch Harnstoff-induzierte Gleichgewichtsentfaltung (Bullock *et al.*, 1997) wies die Kontaktmutante p53 DBD Trp-248 mit einem T_m von ca. 42.6°C in der DSC nur eine geringfügig verringerte Thermostabilität auf; die Konformationsmutante p53 DBD His-175 zeigte dagegen mit einem T_m von ca. 34.2°C eine starke Destabilisierung. Die Stabilität der Temperatur-sensitiven Mutante p53 DBD Val-138 war mit einem T_m von ca. 35.1°C trotz der vorhandenen DNA-Bindungsaktivität ähnlich destabilisiert. Die Identität der *in vitro* gefalteten und der löslich exprimierten p53 DBD Präparationen wurde schließlich durch NMR-Spektroskopie bestätigt. Zum einen war das HSQC-Spektrum der *in vitro* gefalteten [U - ^{15}N]-p53 DBD mit dem kürzlich publizierten HSQC-Spektrum einer aus der löslichen Fraktion aufgereinigten [U - ^{15}N]-

p53 DBD (Wong *et al.*, 1999) identisch (Abb. 5.1.8). Zum anderen war das $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektren der in den Versuchen verwendeten *in vitro* gefalteten $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -p53 DBD Präparation mit dem Spektrum einer durch Thrombinspaltung aus löslich exprimiertem $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -GST-p53 DBD gewonnenen p53 DBD Präparation identisch (Abb. 5.1.13). Zusammengenommen ergab die Charakterisierung der p53 DBD Präparationen, daß strukturelle Unterschiede der p53 DBD durch den *In-Vitro*-Faltungsprozeß so gut wie ausgeschlossen werden können. Durch *In-Vitro*-Faltung kann die konformationell labile p53 DBD somit in ihrem nativen Zustand in großen Mengen präpariert werden. Der Vorteil der *In-Vitro*-Faltung im Vergleich zur löslichen Expression liegt dabei in der Reinheit und den hohen erzielbaren Ausbeuten bei Expression von IBs.

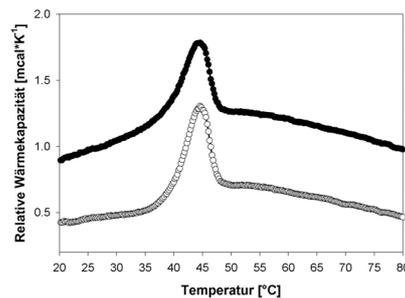


Abb. 5.1.12: Thermostabilität der *in vitro* gefalteten p53 DBD (●) im Vergleich zur löslich exprimierten wildtyp p53 DBD (○). Die irreversible thermische Denaturierung wurde kalorimetrisch durch DSC bestimmt. Der apparente Schmelzpunkt T_m betrug $45.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ für beide wildtyp p53 DBD Präparationen. Die exemplarischen Thermogramme wurden für $40 \mu\text{M}$ Lösungen der DBDs in 40 mM KP (pH 7.5), 25 mM KCl, 1 mM DTT mit einer Heizrate von $1^\circ\text{C}/\text{min}$ bestimmt. Die Puffer-Basislinie wurde von den Meßwerten abgezogen, der Achsenabschnitt ist verschoben. Es sind exemplarische Werte gezeigt.

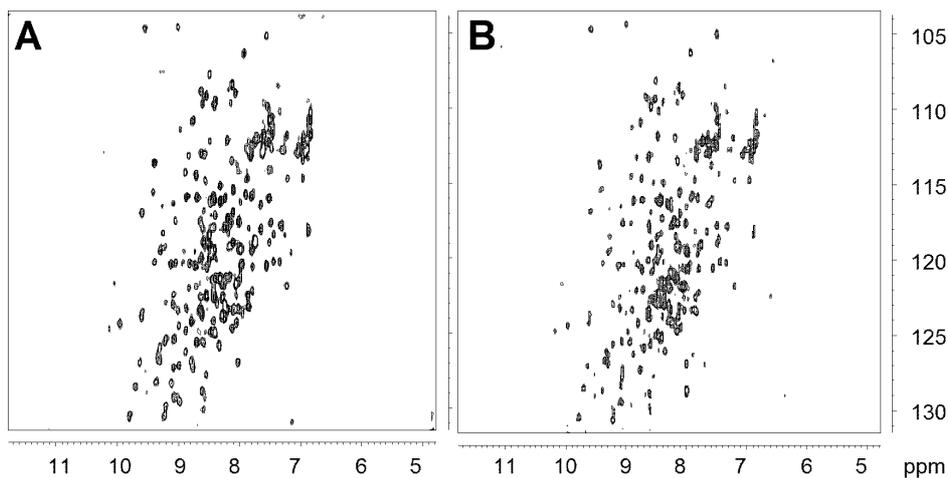


Abb. 5.1.13: Vergleich der $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektren. A) *In vitro* gefaltete $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -p53 DBD Präparation; B) Durch Thrombinspaltung aus löslich exprimiertem $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -GST-p53 DBD gewonnene $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -p53 DBD Präparation.

Die p53 DBD im Kontext des tetrameren p53 Gesamtproteins

Gemeinsam mit Dr. S. Bell und L. Müller (Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München) wurde eine eingehende vergleichende biochemische und biophysikalische Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit präparierten monomeren p53 DBD-Konstrukte (p53 DBD und p53C312) mit den tetrameren p53 Konstrukten (p53 und N93p53) durchgeführt, die S. Bell im Rahmen seiner Doktorarbeit präpariert hatte (Bell, 2001; Bell *et al.*, 2002b). Diese Untersuchungen zeigten, daß p53 im nativen Zustand außerhalb der DBD große unstrukturierte Bereiche enthält und vermutlich der Klasse intrinsisch flexibler Protein angehört.

Tab. 5.1.4: Übersicht über die analysierten p53 Konstrukte

Konstrukt	MG*	AS	Aminosäuren	Tetramer	Tag [#]
p53	44920	1-393	404	ja	(RGS)-His ₆
N93p53	33823	94-393	301	ja	-
p53C312	35973	1-312	325	nein	(RGS)-His ₆
p53 DBD	24551	94-312	219	nein	-

* bezogen auf das Monomer, [#] zur Erhöhung der Proteinexpression

In früheren Studien wurde f.l. p53 aus Retikulozytenlysat oder Sf9-Insektenzellen charakterisiert (Butcher *et al.*, 1994; Chalkley *et al.*, 1994; Delphin *et al.*, 1994; Friedman *et al.*, 1993). Um den Beitrag der einzelnen funktionellen Domänen zu den strukturellen Eigenschaften und der Stabilität des vollständigen p53 Proteins zu untersuchen, wurden entsprechend der Domänenstruktur verschiedene N- und C-terminal verkürzte p53 Fragmente im Vergleich zum tetrameren p53 Protein untersucht (Abb. 5.1.14A).

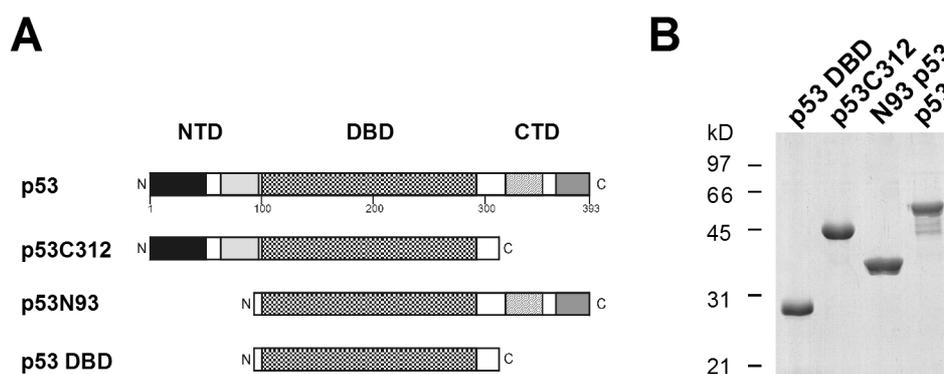


Abb. 5.1.14: Design der analysierten p53 Konstrukte. A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur. Die funktionellen Domänen sind unterschiedlich dargestellt. N-terminale TAD: schwarz; Prolin-reiche Region: grau; DBD: kariert; TD: schraffiert; CTRD: dunkelgrau. B) SDS-PAGE: Jeweils 10 µg der gereinigten p53 Konstrukte wurden auf einer 12,5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Position der MG-Standards ist eingezeichnet.

p53 DBD (AS 94-312) umfaßte die kristallisierte, oben beschriebene DNA-Bindungsdomäne (Cho *et al.*, 1994). p53C312 (AS 1-312) beinhaltete zusätzlich zur DBD die N-terminale Domäne und einen N-terminalen (RGS)-His₆-Tag, wogegen

N93p53 (AS 93-393) zusätzlich die C-terminale Domäne mit der TD enthält. p53 enthält zur Verbesserung der Expression ebenfalls einen N-terminalen (RGS)-His₆-Tag. Die vier Konstrukte wurden in *E. coli* exprimiert⁴ und mit einem abschließenden Gelfiltrationsschritt zur Homogenität gereinigt. Abb. 5.1.14B zeigt eine SDS-PAGE der vier Konstrukte. Die **Analyse der Quartärstruktur** und der hydrodynamischen Eigenschaften durch analytische Gelfiltration (Abb. 5.1.15) im Vergleich zu Standardproteinen ermöglichte es, durch lineare Regression die apparenten Molekulargewichte abzuschätzen: Gegenüber der Erwartung (siehe Tab. 5.1.4) zeigten bis auf die monomere p53 DBD alle Konstrukte ein mindestens doppelt so hohes apparentes Molekulargewicht, was dafür spricht, daß sich diese Konstrukte nicht wie globuläre Proteine verhalten. Ein abnormes Laufverhalten wurde schon früher für p53 beschrieben (Friedman *et al.*, 1993) und ist vermutlich auf die Flexibilität der NTD und der CTD (inklusive der TD) zurückzuführen.

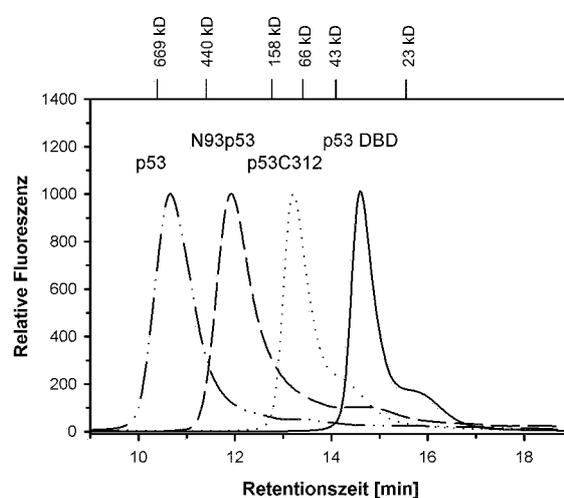


Abb. 5.1.15: Analyse der Quartärstruktur der p53 Konstrukte durch analytische Gelfiltration. Jeweils 100 ng der gereinigten p53 Konstrukte p53 DBD (—), p53C312 (---), N93p53 (----), p53 (----) wurden auf eine BioSep SEC-3000 Säule aufgetragen und aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch einen Fluoreszenzdetektor. Die Signale wurden auf gleiche relative Fluoreszenzintensität normiert. Die Retentionszeit der Eichstandards ist angegeben: Thyroglobulin (669 kD), Ferritin (440 kD), Aldolase (158 kD), BSA (66 kD), Ovalbumin (44 kD) und Chymotrypsinogen (23 kD).

Alle p53 Konstrukte wurden durch EMSA auf ihre **spezifische DNA-Bindungsaktivität** und auf die Modulation der DNA-Bindung durch Antikörper untersucht (Abb. 5.1.16). Die p53 Fragmente banden spezifisch an ein p53 Consensus-DNA-Oligonukleotid, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität. Wie beschrieben band p53 DBD kooperativ an DNA (Klein *et al.*, 2001b; Pavletich *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995b). p53C312 band ebenfalls kooperativ an DNA, aber mit deutlich verringerter Affinität. Erst in Gegenwart des Antikörpers DO-1, der an ein Epitop in der NTD bindet (Vojtesek *et al.*, 1992), war die Affinität deutlich erhöht, und es kam zu einem *supershift* des Signals zu größeren Molekulargewichten. Tetrameres p53 und N93p53 dagegen waren in Gegenwart von unspezifischer DNA

⁴ D.h. sie waren frei von posttranslationalen Modifikationen, die die Aktivität von p53 regulieren. p53 DBD, N93p53 und p53 wurden löslich exprimiert; p53C312 wurde *in vitro* gefaltet.

inaktiv (latent) und konnten erst durch Zugabe des Antikörpers PAb 122, der an ein Epitop in der CTRD bindet (Rotter *et al.*, 1983), zur DNA-Bindung aktiviert werden. Der Antikörper DO-1 vergrößerte die Affinität von p53 (+/- PAb 122) nicht weiter, sondern führte nur zu einer Verschiebung des Komplexes zu höherem Molekulargewicht (*supershift*). Während die DNA-Bindung von p53, N93p53 und p53C312 durch die entsprechenden Antikörper aktiviert werden konnte, zeigte alleine die p53 DBD eine konstitutive DNA-Bindungsaktivität (Cain *et al.*, 2000).

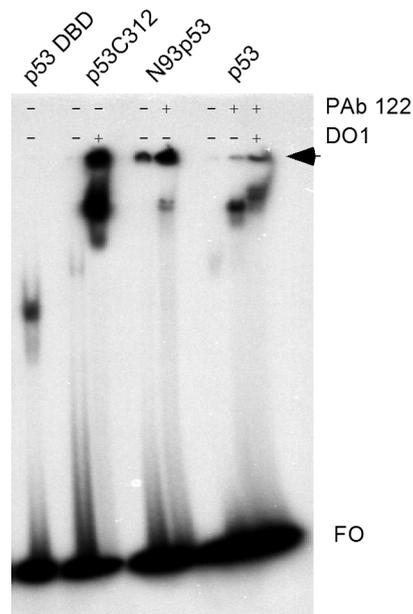


Abb. 5.1.16: Analyse der DNA-Bindungsaktivität der p53 Konstrukte durch EMSA. p53 DBD (10 ng), p53C312 (100 ng), N93p53 (200 ng) und p53 (200 ng) wurden vor und nach Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern PAb 122 und DO-1 auf ihre DNA-Bindungsaktivität getestet. Die DNA-Bindungsaktivität von p53C312 wurde durch Zugabe von 400 ng DO-1, die von N93p53 und p53 durch Zugabe von 400 ng PAb 122 aktiviert. Die Zugabe der Antikörper führte durch die Zunahme des Molekulargewichts des Komplexes zu einem *supershift* im Gel. Der Pfeil markiert Komplexe, die nicht in das Gel einliefen. Der Anteil an N93p53, das in der Tasche hängen blieb, war vermutlich als Folge des basischen pI hoch. FO steht für freies Oligonukleotid.

Zur **Untersuchung der thermodynamischen Stabilität** wurde die Entfaltung der p53 Konstrukte über Änderungen der Fluoreszenz und der Elliptizität nach Zugabe der denaturierenden Agenzien Harnstoff und GdnCl bestimmt (Abb. 5.1.17, Tab. 5.1.5). Die p53 DBD enthält nur einen einzigen Tryptophan-Rest, der im nativen Zustand nicht fluoresziert (siehe oben). Da N93p53 über keine weiteren Tryptophan-Reste verfügt, konnte die Entfaltung der p53 DBD und von N93p53 anhand der Fluoreszenz-Spektren verfolgt werden (Abb. 5.1.20A, oben). Da p53 und p53C312 dagegen über zusätzliche Tryptophan-Reste in der NTD verfügen, die stark Solvens-exponiert sind, reichten die Änderungen in den Fluoreszenz-Spektren von p53 und p53C312 nicht aus, um die Entfaltung zu verfolgen (Abb. 5.1.20, unten). Die Entfaltung von p53 DBD war reversibel und zeigte sowohl mit Harnstoff als auch mit GdnCl einen breiten Entfaltungsübergang (Bullock *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu war die Entfaltung von N93p53 unter den getesteten Bedingungen nicht reversibel (Abb. 5.1.17B). Zudem zeigte das tetramere N93p53 eine signifikant erniedrigte Stabilität im Vergleich zur monomeren p53 DBD (Tab. 5.1.5). Während die

Fluoreszenz-Spektroskopie primär Aussagen über die Tertiärstruktur macht, wurden die Entfaltungsübergänge durch CD-Spektroskopie auf der Basis der Sekundärstruktur analysiert (Abb. 5.1.17A). Der Übergang der p53 DBD erfolgte bei 1.1 M GdnCl. p53C312 zeigte ebenfalls einen kooperativen, einphasigen Übergang mit einem Wendepunkt von 1.0 M GdnCl. p53 und N93p53, die beide die stabile TD umfassen, zeigten beide zweiphasige Übergänge mit mittlerer Kooperativität. Die Wendepunkte der Übergänge waren 1.3 M und 2.1 M für N93p53 und 1.2 M und 2.1 M für p53 (Tab. 5.1.5). Die isolierte TD zeigt zum Vergleich in der Fern-UV Spektroskopie einen Wendepunkt bei 2.7 M GdnCl (Johnson *et al.*, 1995; Mateu und Fersht, 1998).

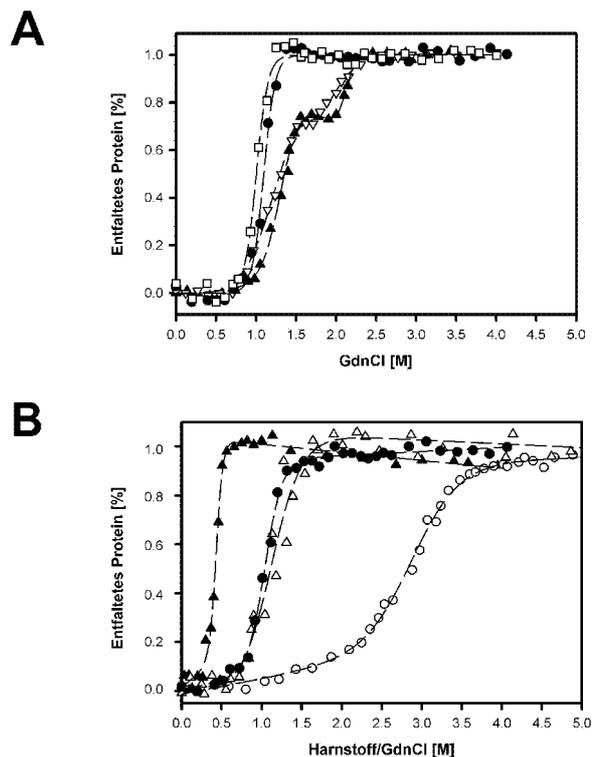


Abb. 5.1.17: Chemisch-induzierte Entfaltungsübergänge der p53 Konstrukte. A) Stabilität der Sekundärstruktur. Die GdnCl-induzierte Entfaltungsübergänge von jeweils 5 μ M p53 DBD (●), p53C312 (□), N93p53 (▲) und p53 (▼) wurden durch CD-Spektroskopie bei 218 nm und 15°C verfolgt. **B) Stabilität der Tertiärstruktur.** GdnCl- und Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge von jeweils 1 μ M p53 DBD (GdnCl: ●, Harnstoff: ○) und N93p53 (GdnCl: ▲, Harnstoff: △) wurden anhand der intrinsischen Fluoreszenz mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm bei der Wellenlänge verfolgt, bei der der größte Unterschied zwischen nativem und denaturiertem Zustand bestand. Die Fluoreszenzintensität von p53 DBD wurde auf den iso fluoreszenten Punkt bei 321 nm normiert. Alle Proben wurden vor der Messung der Elliptizität bzw. Fluoreszenz für 24 h bei 15°C in 40 mM KP (pH 7.5), 25 mM KCl, 1 mM DTT mit der entsprechenden GdnCl- bzw. Harnstoff-Konzentration inkubiert. Die experimentellen Daten wurden durch nicht-lineare Kurvenanpassung ausgewertet. Die Linien entsprechen dem berechneten Fit. Die Ergebnisse der Entfaltungsübergänge sind in Tab. 5.1.5 angegeben.

Um die **Stabilität** von p53 und seinen Fragmenten weiter zu untersuchen, wurden die Temperaturübergänge durch Fern-UV CD (Abb. 5.1.18A) und DSC (Abb. 5.1.18B) bestimmt. Die Schmelzpunkte (T_m) sind in Tab. 5.1.5 angegeben. Unter den gewählten Bedingungen zeigten alle Proteine irreversible Entfaltung als Folge von Aggregation bei höheren Temperaturen. Daher konnten die gemessenen

Schmelzpunkte nicht thermodynamisch interpretiert werden. Der CD-spektroskopisch verfolgte Übergang von p53 DBD war hoch kooperativ und erfolgte innerhalb von 5°C mit einem Schmelzpunkt von 44.5°C. Die Zunahme der Elliptizität um 40°C spricht für eine konformationelle Umordnung vor der Entfaltung. p53C312 entfaltete mit einer Schmelztemperatur von 43°C geringfügig früher. Im Gegensatz dazu haben die beiden tetrameren Konstrukte N93p53 und p53 niedrige thermische Stabilitäten mit Schmelzpunkten von 33.8°C und 32.1°C. Beide Fragmente entfalteten über einen Bereich von 10°C, was für einen weniger kooperativen Charakter der Entfaltung im Vergleich zu den monomeren Konstrukten spricht. Für p53 DBD und p53C312 existiert eine gute Übereinstimmung zwischen den CD-spektroskopischen und den DSC-Messungen. Beide DSC-Messungen zeigten einen einzelnen Peak von vergleichbarer Intensität und einem Schmelzpunkt von 43.9°C. Die DSC-Profile von N93p53 und p53 dagegen zeigten kleinere absolute Änderungen der Wärmekapazität bei der Entfaltung sowie zwei unterschiedliche, aufeinander folgende Entfaltungsübergänge.

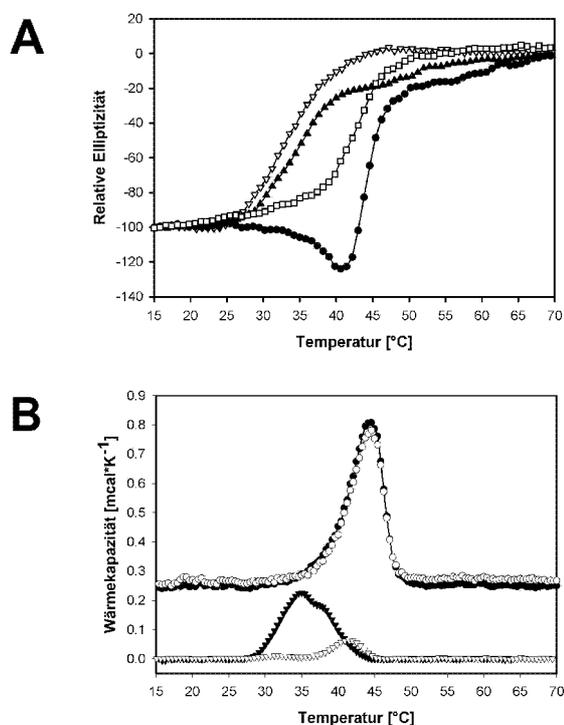


Abb. 5.1.18: Thermische Stabilität der p53 Konstrukte. **A) CD-Spektroskopie:** Zur Analyse der irreversiblen thermischen Denaturierung wurde die Elliptizität bei 218 nm von jeweils 5 μ M p53 DBD (●), p53C312 (□), N93p53 (▲) und p53 (∇) in 40 mM KP (pH 7.5), 25 mM KCl, 1 mM DTT in Abhängigkeit von der Temperatur mit einer Heizrate von 30°C/h registriert. Die apparenten Übergangstemperaturen (Schmelzpunkte) betragen 44.5°C (p53 DBD), 43.0°C (p53C312), 33.8°C (N93p53) und 32.1°C (p53). **B) DSC:** Alternativ wurde die irreversible thermische Denaturierung durch die Messung der Veränderung der Wärmekapazität beim Erwärmen der Probe verfolgt. Dazu wurden jeweils 35–40 μ M p53 DBD (●), p53C312 (○), N93p53 (▲), p53 (∇) in 40 mM KP (pH 7.5), 25 mM KCl, 1 mM DTT mit 30°C/h erwärmt. Die Daten wurden durch Subtraktion der Werte der Puffer-Kontrolle und einer berechneten Basislinie normalisiert und durch ein statistisches Lorentz-Modell angepaßt. Die apparenten Übergangstemperaturen T_m betragen 43.9°C (p53 DBD), 43.9°C (p53C312), 34.7, 38.8°C (N93p53) und 31.4, 41.3°C (p53). Es sind exemplarische Werte gezeigt; der Achsenabschnitt ist verschoben.

Tab. 5.1.5: Zusammenfassung der thermodynamischen Parameter und Stabilität von wildtyp p53 und p53 Fragmenten. An die DSC-Meßwerte wurde zur Bestimmung des Mittelpunkts der asymmetrischen Kurven ein Lorentz-Modell angepaßt (Abb. 5.1.18). Die Harnstoff- und GdnCl-induzierten Entfaltungsübergänge wurden wie in Abb. 5.1.17 beschrieben in 40 mM KP (pH 7.5), 40 mM KCl, 1 mM DTT durchgeführt und ausgewertet. n.b.: nicht bestimmt.

Konstrukt	Schmelzpunkt T_m [°C]		Entfaltungsübergänge [D] _{50%} [M]		
	Fern-UV CD	DSC	Fern-UV CD	Fluoreszenz	Fluoreszenz
			GdnCl	GdnCl	Harnstoff
p53 DBD	44.5	43.9	1.1	1.0	2.9
p53C312	43.0	43.9	1.0	n.b.	n.b.
N93p53	33.8	34.7 & 38.8	1.3 & 2.1	0.4	1.1
p53	32.1	31.4 & 41.3	1.2 & 2.1	n.b.	n.b.

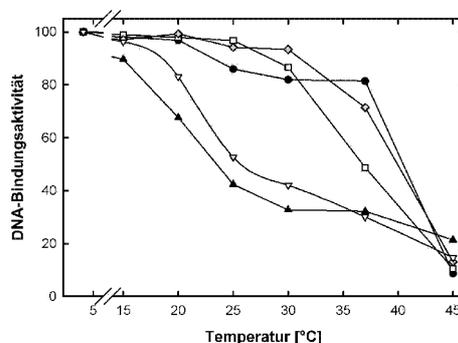


Abb. 5.1.19: Relative DNA-Bindungsaktivität der p53 Konstrukte in Abhängigkeit von der Temperatur. Die gereinigten p53 Konstrukte wurden für 5 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert und anschließend durch EMSA analysiert. Die DNA-Bindungsaktivität wurde mit einem Phosphorimager quantifiziert und auf eine Aktivität von 100% bei 4°C normalisiert. p53 DBD (20 ng) (●), p53C312 (200 ng) (□), p53C312 (50 ng) + DO-1 (○), N93p53 (200 ng) + PAb 122 (400 ng) (▲), p53 (200 ng) + PAb 122 (400 ng) (▽).

Nach der Analyse der thermodynamischen Stabilität auf struktureller Ebene wurde der **Einfluß der Temperatur auf die DNA-Bindungsaktivität** getestet. Alle p53 Konstrukte wurden für ihre spezifische DNA-Bindungsaktivität nach 5 min Inkubation bei der angegebenen Temperatur in Gegenwart der aktivierenden Antikörper PAb 122 bzw. DO-1 (für p53C312, N93p53 und p53) untersucht (Abb. 5.1.19). Die DNA-Bindungsaktivität von p53 und N93p53 war schon nach Inkubation bei 20°C reduziert und nach Inkubation bei 30°C fast vollständig aufgehoben. In Übereinstimmung mit den Daten der thermischen Denaturierung zeigten p53 DBD und p53 C312 auch bei 30°C und 37°C noch DNA-Bindung. Nach Inkubation bei 45°C hatten p53 DBD und p53C312 ihre DNA-Bindungsaktivität irreversibel verloren. Die Coinkubation mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 (Vojtesek *et al.*, 1992) konnte die thermische Stabilität der DNA-Bindung auf das Niveau der p53 DBD bringen (Cohen *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 1998). Generell war die Inaktivierung der DNA-Bindung irreversibel, da keines der Konstrukte in Gegenwart des Consensus-DNA-Oligonukleotids seine Aktivität bei der Inkubation vor der

Gelelektrophorese wiedererlangte. Zusammengefaßt zeigten die Versuche, daß die geringe thermische Stabilität funktionell in der stark temperaturempfindlichen DNA-Bindungsaktivität widerspiegelt wird (Hansen *et al.*, 1996a).

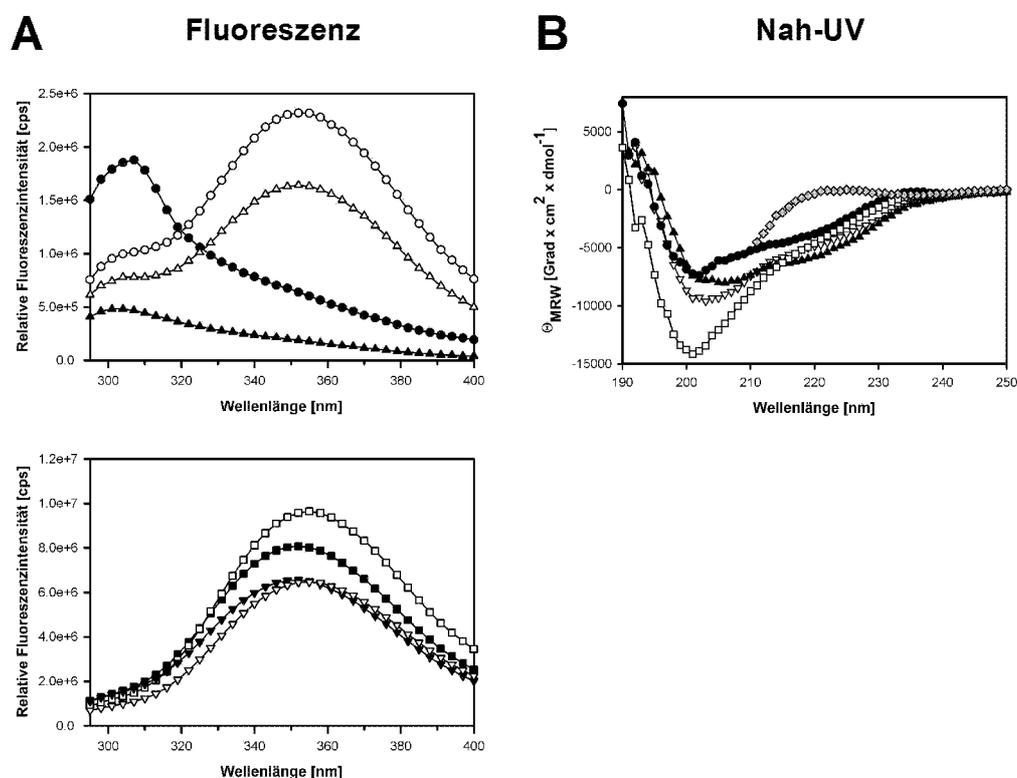


Abb. 5.1.20: Spektroskopische Charakterisierung der Struktur der p53 Konstrukte. A) Tertiärstruktur: Fluoreszenz-Spektren von 1 μ M Lösungen der nativen und denaturierten p53 Konstrukte in 40 mM KP (pH 7.5), 25 mM KCl, 1 mM DTT (\pm 6 M Harnstoff) wurden mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm und Emissionswellenlängen zwischen 300 und 400 nm bei 15°C gemessen. Oben: p53 DBD nativ (●), p53 DBD denaturiert (○), N93p53 nativ (▲), N93p53 denaturiert (Δ). Unten: p53C312 nativ (■), p53C312 denaturiert (□), p53 nativ (▼) p53 denaturiert (∇). **B) Sekundärstruktur: Nah-UV CD-Spektren** der nativen und denaturierten p53 Konstrukte (200 μ g/mL) wurden in 40 mM KP (pH 7.5), 25 mM KCl, 1 mM DTT (\pm 6 M Harnstoff) bei 15°C aufgenommen. Die Spektren für den nativen Zustand sind identisch, zur besseren Übersichtlichkeit ist nur eine exemplarische denaturierte Kurve gezeigt (). p53 DBD (●), p53C312 (□), N93p53 (▲), p53 (∇). Alle Spektren sind für den Beitrag des Puffers korrigiert.

Die Analyse der Stabilität und Funktion von p53 und den drei p53 Fragmenten zeigte somit, daß die Konstrukte funktionelle und strukturelle Einheiten darstellen. Im folgenden wurden sie mit dem Ziel spektroskopisch charakterisiert, **Einblick in die strukturellen Eigenschaften** des p53 Proteins zu gewinnen. Bei Anregung bei 280 nm wurde das Fluoreszenz-Spektrum von N93p53 wie das der p53 DBD von der Tyrosin-Emission dominiert (Bullock *et al.*, 1997). Nach chemischer Entfaltung ergab sich eine dramatische Steigerung der Intensität und das Emissionsmaximum wurde zu 353 nm verschoben (Abb. 5.1.20A, oben). Die Fluoreszenzintensitäten von p53 und N93p53 dagegen waren als Folge der drei Tryptophan-Reste in der NTD (W23, W53, W91) mindestens dreifach höher. Bei Entfaltung wurde das Emissionsmaximum leicht von 350 nm auf 354 nm verschoben (Abb. 5.1.20, unten). Zusammengefaßt legten diese Beobachtungen nahe, daß die Tryptophane der NTD im

nativen Zustand Solvens-exponiert vorliegen. Um die Sekundärstruktur der p53 Konstrukte zu untersuchen, wurden Fern-UV CD-Spektren aufgenommen. Die Spektren aller Konstrukte wiesen Minima im Bereich von 200 bis 210 nm auf, wogegen Minima zwischen 210 und 220 nm, die typisch für α -helikale und β -Faltblatt-Regionen sind, nicht nachweisbar waren (Abb. 5.1.20B). Allerdings unterschieden sich alle Spektren klar von den Spektren der chemisch denaturierten Spezies. Basierend auf den gezeigten CD-Spektren wurden die Sekundärstruktur-Anteile der Konstrukte mit den Dekonvolutions-Programmen CDNN und CDSSTR (Böhm *et al.*, 1992; Sreerama und Woody, 2000) vorhergesagt und analysiert (Tab. 5.1.6, obere Hälfte).

Tab. 5.1.6: Vorhersage der Sekundärstruktur von p53 durch CD-Spektroskopie. Aus den Fern-UV CD-Spektren von p53 und den p53 Fragmenten (siehe Abb. 5.1.20 für Details) wurde die Sekundärstruktur durch Dekonvolution mit den Programmen CDNN 2.1 (Böhm *et al.*, 1992) und CDSSTR (Sreerama und Woody, 2000) vorhergesagt. Anschließend wurden die Sekundärstrukturanteile der NTD, der DBD und der CTD durch Subtraktion der entsprechenden Fragmente rechnerisch bestimmt. Durch Addition der drei funktionellen Regionen von p53 wurde schließlich die theoretische Sekundärstruktur von p53 errechnet. Diese aus den Fragmenten berechnete Sekundärstruktur stimmte sehr gut mit der auf den CD-Spektren beruhenden Sekundärstrukturvorhersage für p53 überein. Die Zahlen in Klammer sind um den N-terminalen (RGS)-His₆-Tag korrigiert.

Sekundärstruktur-Vorhersage	Typ	α -Helix	β -Faltblatt	coil/turn	Σ
p53 DBD	%	8.4	38.4	53.2	100
	AS	18	84	117	219
N93p53	%	12.9	30.2	56.9	100
	AS	39	91	171	301
p53C312	%	9.2	28.9	61.9	100
	AS	30	94	201	325
p53	%	12.6	28.5	58.9	100
	AS	51	115	238	404
Berechnung					
NTD (p53C312-p53 DBD)	AS	12	10	83 (70)*	105 (92)
DBD (p53DBD)	AS	18	84	117	219
CTD (N93p53-p53DBD)	AS	21	7	53	81
$\Sigma =$ p53 (NTD + DBD + CTD)	AS	51	101	253 (240)*	405 (392)

Die Vorhersage erlaubte es, die Anzahl an Aminosäuren der einzelnen Domänen in den unterschiedlichen **Sekundärstrukturelementen** zu bestimmen und mit der Sekundärstruktur zu vergleichen, die von der 3D-Struktur der isolierten p53 Domänen bekannt ist (siehe Abb. 3.1) (Cho *et al.*, 1994; Clore *et al.*, 1995a; Clore *et al.*, 1995b; Jeffrey *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994; Mateu und Fersht, 1998). Die Sekundärstrukturvorhersagen durch Dekonvolution für die p53 DBD (α -Helices: 18 AS, β -Faltblätter: 84 AS, *turns* und *coils*: 117 AS) korrelierte sehr gut mit der bekannten Struktur (α -Helices: 19 AS, β -Faltblätter: 70 AS, *turns* und *coils*: 131 AS). Diese Daten wurden benutzt, um den Sekundärstrukturgehalt der NTD und der CTD durch Subtraktion zu berechnen (Tab. 5.1.6, untere Hälfte). Für die CTD inklusive der TD ergab sich eine gute Übereinstimmung (α -Helices: 21 AS, β -Faltblätter: 7 AS, *turns* und *coils*: 53 AS) mit den Daten für die isolierte TD (α -Helices: 22 AS, β -Faltblätter: 3 AS, *turns* und *coils*: 3 AS). Die NTD, für die bis auf ein kurzes N-terminales p53-Peptid keine strukturellen Daten existieren, wies 70 von

105 Resten in unstrukturierten *coil* Regionen auf. Hiermit ließ sich die theoretische Sekundärstruktur des gesamten p53 Proteins durch Addition der Werte der drei individuellen Domänen errechnen. Dieser theoretisch errechnete Wert stimmte sehr gut mit den Werten überein, die die Sekundärstrukturvorhersage aus dem CD-Spektrum des gereinigten p53 Proteins ergab. Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse einen bemerkenswert hohen Anteil an **unstrukturierten Regionen** für die p53 Fragmente, und im gleichen Ausmaß für das vollständige tetramere p53 Protein. Dies spricht dafür, daß nur kleine strukturelle Unterschiede zwischen den isolierten Domänen und dem kompletten Protein bestehen.

5.2 Das allosterische Modell der p53 Aktivierung

Zu Beginn dieser Arbeit war das **allosterische Modell** das allgemein akzeptierte Modell der Regulation der DNA-Bindungsaktivität von p53 durch die CTRD (Ahn und Prives, 2001). Nach dem allosterischen Modell aktivieren die Phosphorylierung und Acetylierung der CTRD, die Bindung von Antikörpern an die CTRD sowie die Interaktion der p53 DBD mit C-terminalen p53 Peptiden latentes p53 zur spezifischen DNA-Bindung, da als Folge dieser Stimuli die Interaktion zwischen der p53 DBD und CTRD aufgehoben wird. Im folgenden werden Experimente beschrieben, die den Mechanismus der p53 Regulation durch die CTRD näher untersuchten. Dabei konnte in biochemischen und zellulären Versuchen bestätigt werden, daß die spezifische DNA-Bindung von p53 tatsächlich durch von der CTRD abgeleitete Peptide aktiviert werden kann, und daß diese Peptide die p53-vermittelte Transkription in Zellen aktivieren. Allerdings unterstützen die durchgeführten Experimente das allosterische Modell der p53 Regulation nicht. Vielmehr spricht im Licht dieser Experimente vieles dafür, daß die von der CTRD abgeleiteten Peptide ihre Funktion über ihre Fähigkeit zur unspezifischen DNA-Bindung (Hoffmann *et al.*, 1998; Jayaraman und Prives, 1995) entsprechend dem Interferenzmodell ausüben (Anderson *et al.*, 1997; Bayle *et al.*, 1995) bzw. daß Modelle zutreffen, die auf der Interaktion der CTRD mit unspezifischer DNA im zellulären Kontext von Chromatinkomplexen beruhen (Espinosa und Emerson, 2001; Kaeser und Iggo, 2002; Yakovleva *et al.*, 2001). Zudem konnte *in vitro* die beschriebene Reaktivierung der DNA-Bindungsaktivität von Mutanten der p53 DBD (His-175, Trp-248, Val-138) durch C-terminale Peptide (Selivanova *et al.*, 1997; Selivanova *et al.*, 1999) nicht bestätigt werden.

Aktivierung von p53 durch Tat-C-terminale Peptide

Biologisch aktive Peptide und funktionelle Proteine können (unabhängig von ihrer Größe) durch kurze **Proteintransduktionsdomänen (PTD)** über die Membranbarriere in Zellen und sogar in Organismen (Schwarze *et al.*, 1999) transduziert werden (Derossi *et al.*, 1998; Lindgren *et al.*, 2000; Wadia und Dowdy, 2002). Beispiele für PTDs stellen Anntenapedia-Penetratin, FGF-MTS, HBV-PreS2, HSV-VP22, Pep-1 und HIV-Tat dar (Derossi *et al.*, 1994; Fawell *et al.*, 1994; Ford *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2001; Rojas *et al.*, 1998). Durch Fusion mit VP22 konnte funktionelles p53 in Zellen eingeschleußt werden (Phelan *et al.*, 1998; Wills *et al.*, 2001). Der genaue Mechanismus der PTD-vermittelten Transduktion über Zellmembranen ist bis heute ungeklärt (Wadia und Dowdy, 2002). Insbesondere die **Tat-vermittelte Peptid- und Proteintransduktion** sowie optimierte Arginin-reiche Tat-Sequenzen (Futaki *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2001; Wender *et al.*, 2000) haben in den letzten drei Jahren als effizienteste Transduktionsmethode ein breites Interesse gefunden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Tat-vermittelte Peptidtransduktion als eine schnelle und einfache Methode zur Targetvalidierung etabliert. Nach der Transduktion in zelluläre Modellsysteme kann untersucht werden, welche Effekte die Modellpeptide und Proteine z.B. als Antagonisten einer Protein-Protein-Interaktion haben. Die Tat-vermittelte Proteintransduktion stellt damit eine Alternative zu Methoden wie transiente oder virale Transfektion, Mikroinjektion von Proteinen, Gentherapie- und Antisense-Ansätzen oder RNAi dar (Barstead, 2001; Zamore, 2001). Beispiele für die erfolgreiche Anwendung der basischen N-terminalen

11-mer Tat-Sequenz zur Transduktion von funktionellen Peptiden und Proteinen umfassen β -Galaktosidase (Schwarze *et al.*, 1999), HIV Protease (Vocero-Akbani *et al.*, 1999), p16INK4 (Gius *et al.*, 1999), p27 (Nagahara *et al.*, 1998), p21 (Zezula *et al.*, 2001), p73 (Lissy *et al.*, 2000), Rho-A (Chellaiah *et al.*, 2000), Bcl-2 (Wang *et al.*, 2000b) oder H-Ras (Hall *et al.*, 2001).

Wildtyp: OregonGreen-GGGG-YGRKKRRQRRR-GGGG-HLKS~~SK~~QGQSTS~~SR~~HKKL-NH₂

Kontrolle: OregonGreen-GGGG-YGRKKRRQRRR-GGGG-HLKS~~AK~~QGQSTS~~AH~~KAL-NH₂

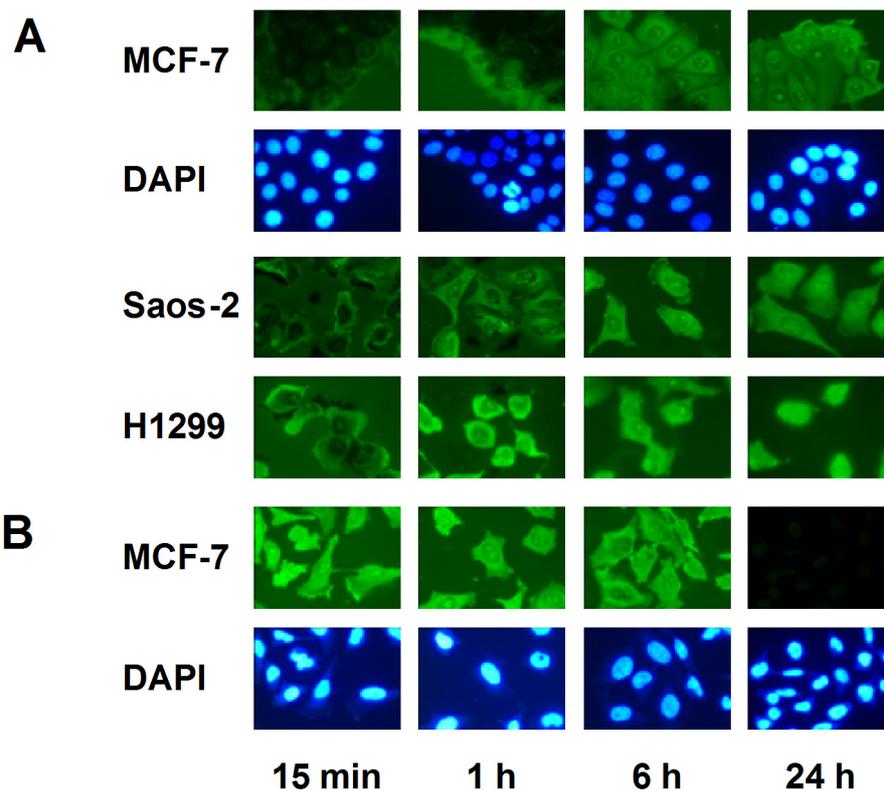


Abb. 5.2.1: Peptidtransduktion mit Oregon Green-markierten Tat-C-terminalen Peptiden. **A)** Zeitkinetik der Transduktion von wildtyp Tat-C-terminalem Peptid in MCF-7, Saos-2 und H1299 Zellen. Die Zellen wurden für die angegebene Zeit mit 1 μ M wildtyp Tat-C-terminalem Peptid in DMEM/10% FKS inkubiert. **B)** *Pulse-chase* Experiment mit wildtyp Tat-C-terminalem Peptid. MCF-7 Zellen wurden für 1 h mit 1 μ M wildtyp Tat-C-terminalem Peptid in DMEM/10% FKS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die angegebene Zeit ohne Peptidzusatz inkubiert. Alle Zellen wurden vorsichtig gewaschen, mit 4% (v/v) Paraformaldehyd für 15 min fixiert und durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die DAPI-Kernfärbung zeigt die Nuclei der entsprechenden Zellen.

In zwei vorangehenden Publikationen fanden Penetratin-gekoppelte C-terminale p53 Peptide Anwendung, die Proliferationshemmung, Apoptose und Zellzyklus-Arrest in humanen Tumorzellen induzieren sowie mutantes p53 reaktivieren konnten (Kim *et al.*, 1999a; Selivanova *et al.*, 1997). Da diese Ergebnisse mit Penetratin-gekoppelten Peptiden in unserem Labor nicht reproduziert werden konnten, wurde im Hinblick auf eine allgemeine Anwendung in der „*Targetvalidierung*“ von pharmazeutisch relevanten Fragestellungen ein Protokoll zur effizienten Transduktion von Fluoreszenz-markierten Tat-gekoppelten Peptiden etabliert und evaluiert. Anschließend wurde der Einfluß von Tat-C-terminalen p53

Peptiden auf die p53 Antwort in zellulären Tests untersucht. Die Primärstruktur des Tat-Peptids und eines mutierten Kontroll-Peptids, bei dem drei essentielle basische Reste (2x Lys/1x Arg) durch Alanin ersetzt wurden, ist oben gezeigt. Die Tat-Sequenz (blau) enthält eine **nukleoläre Lokalisationssequenz** (unterstrichen) (Dang und Lee, 1989) und ist über einen Glycin-Linker mit der p53 Sequenz (AS 386-383) (rot) verknüpft. Beide Peptide waren N-terminal mit einem stabilen und hydrophilen Fluoreszenzfarbstoff (Oregon Green) markiert. In Vorversuchen wurde die Effizienz der Transduktion von Tat-Peptiden und Tat-Proteinen (Tat-p53 DBD) mit ausgewählten Zelllinien getestet. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, daß Tat-p53 DBD (Daten nicht gezeigt) und alle untersuchten Tat-Peptide sehr effizient und in kurzer Zeit nahezu alle Zellen der untersuchten adhärenen Tumorzelllinien transduzierten (MCF-7, Saos-2, H1299, HeLa, HCT 116 etc.) (Abb. 5.2.1A). Mit Ausnahme von Verbänden von MCF-7 Zellen, die die Tat-Peptide lateral vom Rand penetrierten, waren innerhalb weniger Minuten alle untersuchten Zellen transduziert. Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Experimente zeigten, daß die Konzentration der TAT-Peptide in der Zelle linear von der Konzentration im Medium abhängt und daß bei Konzentrationen >400 nM nach weniger als 1 h nahezu 100% aller Zellen transduziert waren (Daten nicht gezeigt). Die Konzentration an Peptid in der Zelle konnte somit durch die Konzentration im Medium gesteuert werden.

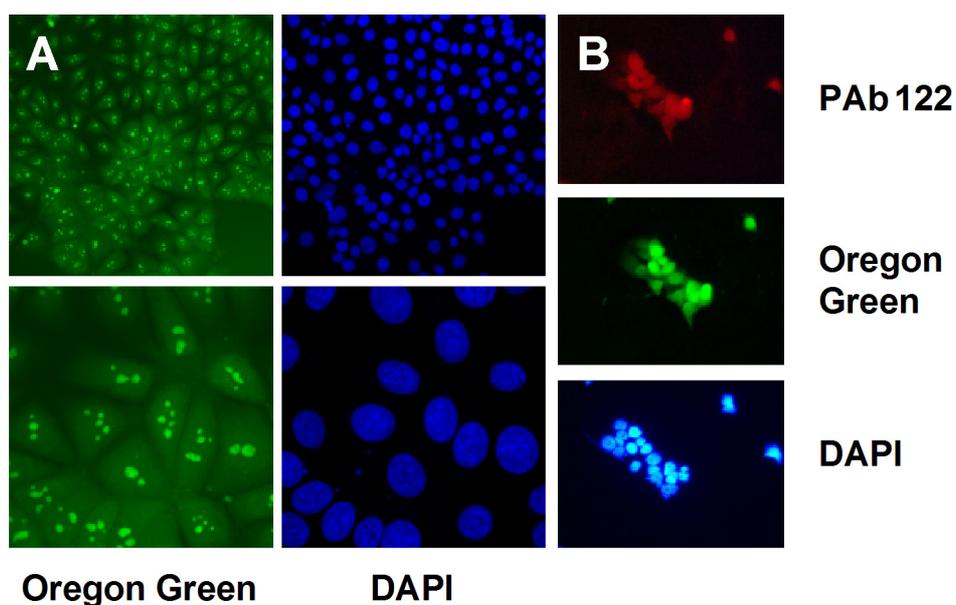


Abb. 5.2.2: Oregon Green-markierte Tat-C-terminale Peptide transduzieren in MCF-7 Zellen. **A) Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen** bestätigten die intrazelluläre Lokalisation des Oregon Green-markierten Tat-C-terminalen Peptids nach der Transduktion. Auffällig ist die starke nukleoläre Lokalisation. MCF-7 Zellen wurden für die Aufnahme 1 h mit 800 nM Oregon Green-markiertem wildtyp Tat-C-terminalem Peptid in DMEM/10% FKS inkubiert, anschließend vorsichtig gewaschen und mit 4% (v/v) Paraformaldehyd für 15 min fixiert. **B) Colokalisation:** MCF-7 Zellen wurden mit 1 μ M Oregon Green-markiertem wildtyp Tat-C-terminalem Peptid inkubiert, vorsichtig gewaschen und mit 4% (v/v) Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis der Internalisierung des C-terminalen Peptids wurde eine Cofärbung mit dem monoklonalen Antikörper PAb 122 durchgeführt, der ein Epitop innerhalb des C-terminalen Peptids erkennt. Es ist eine klare Colokalisation von Oregon Green-markiertem Tat-C-terminalem Peptid und PAb 122 zu erkennen. Eine DAPI-Kernfärbung bestätigte, daß alle Zellen transduziert wurden.

Bei einem stetigen Nachschub des Tat-Peptids aus dem Medium blieb die Fluoreszenz für >24 h innerhalb der Zellen nachweisbar (Abb. 5.2.1A). Wurden die Tat-Peptide dagegen wieder von den Zellen entfernt (*pulse-chase* Experiment), war die Fluoreszenz in den Zellen für ca. 8 h nachweisbar. Durch **konfokale Lasermikroskopie** konnte schließlich gezeigt werden, daß sich die Peptide nach der Transduktion innerhalb der Zellen befanden, und nicht nur Oberflächen-assoziiert vorlagen (Abb. 5.2.2A). Die Tat-Peptide lagen cytoplasmatisch und Membran-assoziiert vor. Als Folge der nukleolären Lokalisationsequenz waren sie aber besonders stark in den Nukleoli angereichert (Abb. 5.2.2A), was möglicherweise zu einer Verringerung der nukleären Konzentration führen und damit eine Limitation der Tat-vermittelten Peptidtransduktion für funktionelle Studien darstellen kann.

Aufgrund der Effizienz der Tat-vermittelten Peptidtransduktion wurde in Folgeexperimenten daher untersucht, ob die Tat-C-terminalen Peptide spezifische funktionelle Effekte auf Tumorzellen auslösen. Trotz der effizienten Transduktion war aber in allen untersuchten Tumorzelllinien (p53 Status: wildtyp, mutant und negativ) im Gegensatz zu den beschriebenen Effekten (Kim *et al.*, 1999a; Selivanova *et al.*, 1997) weder eine Hemmung der Proliferation (MTT-, Neutralrot-Test), noch ein Zellzyklusarrest (FACS-Analyse) oder eine Induktion von Apoptose (TUNEL, sub-G1, Caspase-Assay, Cell Death Detection ELISA) eindeutig nachweisbar. Allerdings war das wildtyp Tat-C-terminale Peptid in der Lage, p53 spezifisch und konzentrationsabhängig in einem **transienten Luziferase Reporter-Gen-Test** zu aktivieren. Die Aktivierung war mit einem Faktor von 4-5 bei Konzentrationen von 2.5 μ M Tat-Peptid ausgeprägt. Ein mutiertes Kontrollpeptid dagegen hatte keinen Effekt auf die p53 Transkriptionsaktivität. Unter den gleichen Versuchsbedingungen konnte mit dem Tat-C-terminalen Peptid keine Wiederherstellung der DNA-Bindungsaktivität der p53 Mutanten His-273, Trp-248 und Ala-138 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

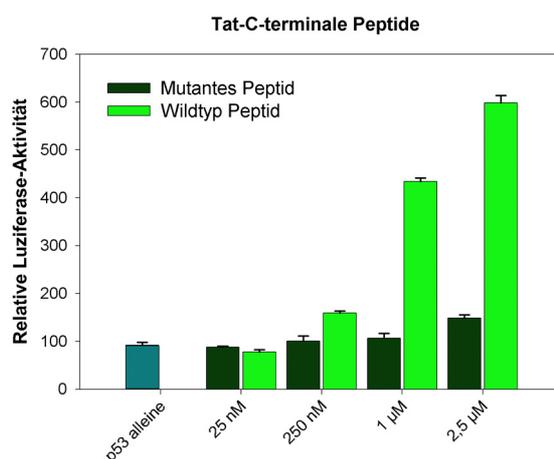


Abb. 5.2.3: Spezifische Aktivierung von p53 durch das Tat-C-terminale Peptid in einem Luziferase Reporter-Gen-Test. $1.25 \cdot 10^5$ p53-negative Saos-2 Zellen pro 12-Well wurden mit 50 ng p53 Plasmid und 100 ng p53-induzierbarem PG-Luziferase Reporter-Plasmid transfiziert und für 20 h inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend für 20 h mit Oregon Green-markiertem Tat-C-terminalem Peptid und einem Kontrollpeptid inkubiert. Die Luziferase-Aktivität wurde in den Zellysaten bestimmt und auf gleiche Proteinkonzentration normalisiert. Dreifachbestimmung.

Aktivierung der latenten DNA-Bindung von p53

Erste Versuche bestätigten die Erkenntnisse aus der Literatur. In der Tat banden die aus *E. coli* bzw. aus Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen (Präparation von S. Hansen) isolierten latenten Fraktionen von tetramerem p53 Gesamtprotein in Anwesenheit von unspezifischer pBS Kompetitor-DNA nur sehr schwach an p53-spezifische Consensus-DNA-Bindungsstellen. Durch die Zugabe des monoklonalen Antikörpers PAb 122 (bzw. PAb 421), der an ein Epitop in der CTRD von p53 (AS 370-382) bindet, als auch durch Zugabe von C-terminalen p53 Peptiden (AS 369-383 bzw. AS 361-382) konnte die spezifische DNA-Bindungsaktivität von p53 induziert werden (Abb. 5.2.4A) (Hupp *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu einer kürzlichen Veröffentlichung (Yakovleva *et al.*, 2001) konnte eine **Aktivierung von latentem p53** durch PAb 122 (und auch durch C-terminales Peptid) in einem FCS-Assay nachvollzogen werden (Abb. 5.2.4B). Dabei war in Gegenwart von PAb 122 eine Erhöhung der apperenten Dissoziationskonstanten für DNA nachweisbar (p53: $K_D=85 \pm 21$ nM; p53 + PAb 122: $K_D=27 \pm 6$ nM), so daß sich bei kleinen Konzentrationen ein Fenster zur Unterscheidung der latenten und aktiven p53 Form ergab.

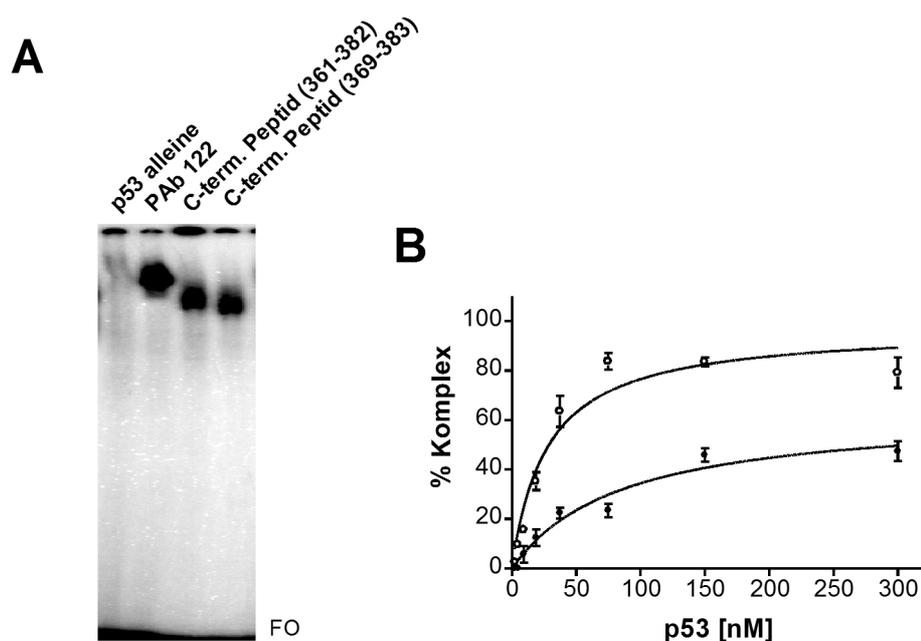


Abb. 5.2.4: Latenz der p53 DNA-Bindung. A) EMSA: 25 ng latentes p53 aus *E. coli* konnte durch Zugabe von 200 ng PAb 122 bzw. 50 μ M C-terminalem p53 Peptid: AS 361-382 und AS 369-383 zur DNA-Bindung an das radioaktiv markierte p53 Consensus-Oligonukleotid PG aktiviert werden. FO steht für freies Oligonukleotid. B) FCS: Die latente Fraktion von latentem p53 aus Sf9-Insektenzellen konnte durch Zugabe PAb 122 zur DNA-Bindung an das TAMRA-markierte p53 Consensus-Oligonukleotid PG aktiviert werden. ●: ohne PAb 122, ○: in Gegenwart von 10 nM PAb 122.

Um Einblick in die **Struktur-Wirkungsbeziehungen** der C-terminalen Peptide zu gewinnen, wurden verschiedene Varianten des C-terminalen Peptids im EMSA auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung der spezifischen DNA-Bindung von latentem p53 untersucht. Abb. 5.2.5 zeigt einen Überblick über die dabei verwendeten Peptidvarianten. Bei der Peptidsynthese variierte Parameter waren unter anderem

Peptidlänge, Linkerlänge und Aminosäureladung. Abb. 5.2.6 zeigt die Effekte der Inkubation mit diesen Peptiden auf die spezifische DNA-Bindung im EMSA zusammen mit einer relativen Quantifizierung der Aktivierung. Die Untersuchung dieser Peptide zeigte, daß die Länge des Linkers zwischen den beiden Lysin- und Arginin-haltigen Boxen einen Einfluß auf das Aktivierungspotential zu haben scheint. So wirkten Peptide ohne bzw. mit einem kurzen GS-Linker (02, 03, 06) aktivatorisch, während Peptide mit längeren GS-Linkern (08, 09) kaum aktivatorisch wirkten. Auch konnten Arginin- und Lysin-Reste an den entsprechenden Positionen gegeneinander ausgetauscht werden, ohne die Peptide vollkommen zu inaktivieren (13-16). Tauschte man dagegen Lysin und Arginin gegen Glutamat aus (18), so ging die Aktivität verloren. Die geringe Spezifität der Aktivierung von p53 durch Varianten des C-terminalen Peptids ließ keine eindeutige Aussage über eine Consensus-Aktivierungssequenz zu und wurde durch die Tatsache illustriert, daß sogar (vermutlich ladungsbedingt) ein Peptid stark aktivatorisch wirkte, in dem die Aminosäuren des C-terminalen Peptids in zufälliger Reihenfolge angeordnet sind (17).

			Sequenz
01	C1	GSRAHSSHLKSKKGQSTS	RHKK 361-382
02	V17	KSKK-----	RHKK
03	V12	HLKSKK-----	RHKKLNle
04	V13	HLKSKKG-----	RHKKLNle
05	V14	HLKSKKGS---	RHKKLNle
06	V9	KSKKGS---	RHKK
07	V15	HLKSKKGS--	RHKKLNle
08	V16	HLKSKKGS-	RHKKLNle
09	V10	KSKKGS--	RHKK
10	V3	KSKKGQSTS	RHKK
11	V4	LKSKKGQSTS	RHKK
12	C2	LKSKKGQSTS	RHKKL 369-383
13	V5	KRKKGQSTS	RHKK
14	V6	RSRRGQSTS	RHKK
15	V7	KSKKGQSTS	RHRR
16	V8	RSRRGQSTS	RHRR
17	V2	GHSKTHSKRSKHRGQSAKSL	scrambled
18	V11	DSDDGQSTSEHDD	
	Poly-Lysin	(KKKKKKKKKKKKKK) _n	

Abb. 5.2.5: Überblick über die Primärstruktur der untersuchten Varianten des C-terminalen p53 Peptids. Die gezeigten Peptidvarianten wurden auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung der spezifischen DNA-Bindung von p53 getestet. Nle steht für nor-Leucin.

Die hohe notwendige Peptid-Konzentration und die **Promiskuität der Aktivierung** spricht gegen eine spezifischen Interaktion zwischen p53 DBD und CTRD sowie gegen die Existenz einer definierten Bindungstasche wie vom allosterischen Modell vorgeschlagen. Zusammengenommen sprechen die Ergebnisse vielmehr dafür, daß die basischen Peptide mit der unspezifischen DNA-Bindung der CTRD von p53 interferieren, indem sie unspezifisch an negativ geladene DNA binden (Anderson *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 1998). In einem FCS-Test konnte die unspezifische Bindung von TAMRA-markiertem C-terminalem Peptid an pBS DNA und an 50-mer Poly-dT_dC DNA durch eine Erhöhung der Diffusionszeit nachgewiesen werden. Da die Bindung der Peptide an die DNA unspezifisch erfolgte und mehrere Peptide gleichzeitig an ein DNA-Molekül binden können, war es

schwierig, mit den vorhandenen Peptiden und Testsystemen quantitative Aussagen über die unspezifische DNA-Bindungsaktivität und den Einfluß der Linkerlänge auf diese zu machen. Um die unspezifische DNA-Bindungsaktivität für ausgewählte Peptidvarianten abzuschätzen, wurde in einem FCS-Test die unspezifische Bindung eines TAMRA-markierten C-terminalen Peptids (AS 361-382) an 50-mer Poly-dTdc DNA durch Zugabe ausgewählter Peptide kompetiert. Dabei zeigte sich, daß die aktivatorischen Peptide (01, 03, 17) die unspezifische DNA-Bindung des C-terminalen Peptids bei IC_{50} -Konzentrationen von 40-70 μM kompetierten, während die nicht-aktivatorischen Peptide die Bindung erst bei Konzentrationen $>200 \mu\text{M}$ (09) bzw. gar nicht (18) kompetierten. Die Fähigkeit latentes p53 zur DNA-Bindung zu aktivieren, scheint demnach annähernd mit der **Stärke der unspezifischen DNA-Bindung** zu korrelieren.

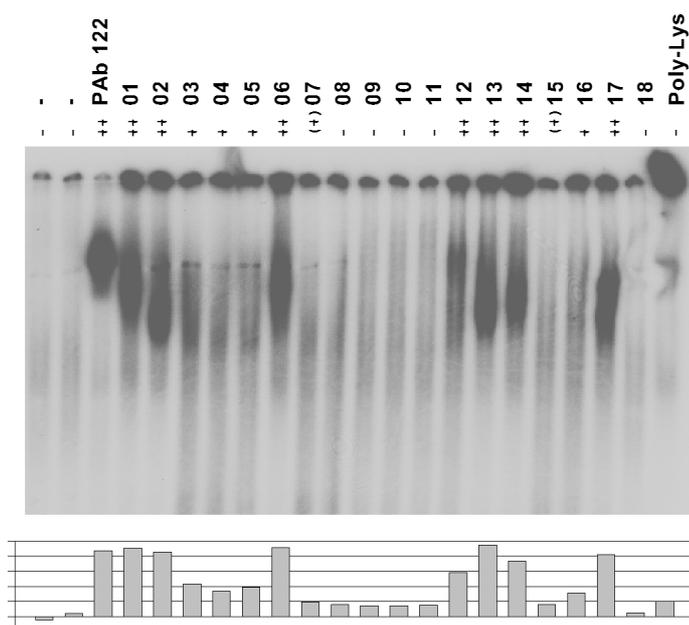


Abb. 5.2.6: Aktivierung der spezifischen DNA-Bindung von latentem p53 durch C-terminale Peptidvarianten und PAb 122. Der Effekt der Inkubation mit 50 μM Peptid auf die Bindung von 300 ng latentem p53 aus *E. coli* an radioaktiv markiertes PG Consensus-Oligonukleotid wurde in Gegenwart 100 ng unspezifischer pBS Kompetitor-DNA durch EMSA analysiert. Die Signale der p53-DNA-Komplexe wurden mit einem Phosphorimager quantifiziert. Die relative Signalstärke ist unter der entsprechenden Spur gezeigt. Die Sequenz der Peptide ist in Abb. 5.2.5 angegeben.

Vorversuche zeigten, daß die verwendeten Antikörper PAb 421 und PAb 122 hochaffin an ein TAMRA-markiertes C-terminales Peptid (AS 361-382) banden: PAb 421 mit einem apperenten K_D von $2.8 \pm 0.4 \text{ nM}$, PAb 122 mit einem apperenten K_D von $1.9 \pm 0.2 \text{ nM}$ (Bindungskurve nicht gezeigt). Antikörper, die an die CTRD von p53 binden, könnten p53 auf zwei Weisen aktivieren. Erstens, indem sie entsprechend dem allosterischen Modell die Interaktion der CTRD mit der DBD durch Bindung an die CTRD unterbinden; oder zweitens indem sie nach dem Interferenzmodell die Interaktion der CTRD mit in der Probe vorhandenen unspezifischen DNA inhibieren. Die folgenden zusammen mit Dr. K.-P. Künkele (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) durchgeführten FCS-Experimente legten die Annahme nahe, daß PAb 122 p53 durch die Inhibition der unspezifischen DNA-

Bindung entsprechend dem **Interferenzmodell** aktiviert. Eine aktive p53-Fraktion, die aus Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen gewonnen wurde, band im Gegensatz zur latenten Fraktion mit einem apperenten K_D von 1.4 ± 0.3 nM an das p53 Consensus-Oligonukleotid PG (Abb. 5.2.7A), so daß bei p53-Konzentrationen von 10 nM eine Sättigung der Bindung erreicht wurde. Eine Coinkubation dieser Fraktion mit PAb 122 führte zu keiner weiteren signifikanten Steigerung der DNA-Bindungsaktivität (Daten nicht gezeigt). Durch Titration der spezifischen p53 DNA-Bindung mit unspezifischer 50-mer Poly-dTdC-DNA konnte die DNA-Bindung der p53 Fraktion fast vollständig kompetiert und aufgehoben werden (Abb. 5.2.7B). Die durch Zugabe von unspezifischer DNA erhaltene p53 Fraktion zeigte **Latenz**, da ihre spezifische DNA-Bindungsaktivität anschließend durch Zugabe und Titration mit PAb 122 wieder fast vollständig reaktiviert werden konnte⁵.

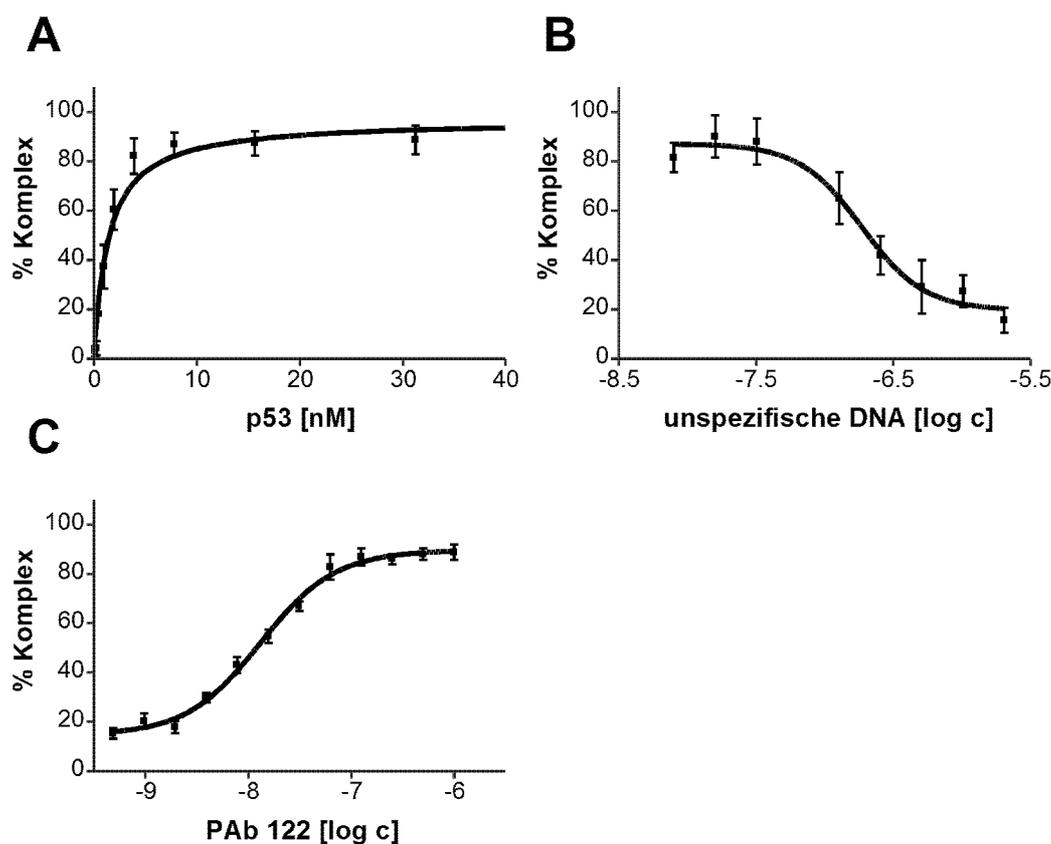


Abb. 5.2.7: Experimente zur Latenz der p53 DNA-Bindung. **A)** Aktives p53 aus Baculovirus-infizierten Sf9-Insektenzellen band spezifisch mit einem apperenten K_D von 1.4 ± 0.3 nM an das TAMRA-markierte p53 Consensus-Oligonukleotid PG ($c=1$ nM). **B)** Durch Titration mit unspezifischer 50-mer Poly-dTdC-DNA konnte die spezifische DNA-Bindung von 8 nM p53 Protein aus A) fast vollständig inhibiert werden. **C)** Die Titration von PAb 122 zu 8 nM p53 in Gegenwart von Poly-dTdC-DNA stellte die spezifische DNA-Bindung von p53 wieder her.

Offensichtlich konnte also eine zuvor aktive p53 Fraktion durch Zugabe von unspezifischer DNA in den sogenannten latenten Zustand überführt werden; durch

⁵ Latente und aktive p53 Präparationen aus *E. coli* und Sf9-Insektenzellen unterscheiden sich demnach aller Wahrscheinlichkeit in ihrem Gehalt an Spuren unspezifischer DNA aus der Präparation. Die unterschiedliche Aktivität beruht daher nicht nur auf dem Phosphorylierungsstatus der CTRD (Fuchs *et al.*, 1995; Hupp and Lane, 1994a; Hupp and Lane, 1994b; Mundt *et al.*, 1997).

Titration mit PAb 122, der die Bindung der CTRD an die unspezifische DNA kompetitiv aufhebt, konnte die p53 DNA-Bindung anschließend wiederhergestellt werden. Die unterschiedlichen Eigenschaften von p53 Präparationen (latent/aktiv) sowie die Probleme bei der reproduzierbaren Gewinnung von latenten oder aktiven p53 Präparationen mögen gemäß dieser Interpretation auf ihren unterschiedlichen Gehalt an (bei der Präparation mitgereinigten) DNA-Spuren zurückzuführen sein. Von der CTRD abgeleitete Peptide und deren basische Varianten wirken nach dieser Interpretation aktivatorisch, da sie mit der CTRD von p53 um die Bindung an unspezifische DNA kompetieren.

Die postulierte Interaktion zwischen der p53 DBD und CTRD

Wie oben gezeigt aktivieren C-terminale p53 Peptide und Varianten dieser Peptide die spezifische DNA-Bindung von p53. Die im vorangehenden Teil beschriebenen Evidenzen sprechen jedoch dafür, daß das allosterische Modell nicht zutrifft. Eine Hypothese des allosterischen Modells ist, daß eine **Interaktion zwischen der CTRD und der p53 DBD** besteht, die p53 in einem für die spezifische DNA-Bindung inaktivem Zustand hält (Hupp und Lane, 1994a; Hupp *et al.*, 1992; Hupp *et al.*, 1993). Eine den Versuchen vorangehende Analyse der Kristallstruktur und des Oberflächenpotentials (Cho *et al.*, 1994) auf eine Interaktion mit dem basischen C-terminalen p53 Peptid ergab keine offensichtliche Bindungsstelle auf der Oberfläche der p53 DBD. Zudem sind die Strukturen der an DNA-gebundenen und der freien p53 DBD fast identisch, was ebenfalls gegen eine Konformationsänderung bei DNA-Bindung spricht, da die drei Domänen in der Kristallstruktur ansonsten distinkte Konformationen annehmen sollten. Bislang wurde eine **direkte Interaktion** zwischen wildtyp bzw. mutanten p53 DBDs und C-terminalen Peptiden nur in einer Publikation durch vergleichsweise unselektive Methoden wie Immunpräzipitationen und native Gele gezeigt (Selivanova *et al.*, 1999). In anderen Publikation dagegen konnte eine Interaktion nicht beobachtet werden (Jayaraman und Prives, 1995; Muller-Tiemann *et al.*, 1998). Die folgenden direkten Interaktionsstudien widerlegten die Annahme des allosterischen Modells von einem unabhängigen experimentellen Standpunkt aus. So konnte in diversen Versuchen im Rahmen der Arbeit die postulierte Interaktion nicht nachgewiesen werden.

Die Interaktionsstudien wurden durch die Tatsache kompliziert, daß die p53 DBD und die basischen C-terminalen Peptide auch unspezifisch an DNA binden können. Daher könnten schon geringe Spuren an DNA⁶, insbesondere aus der Präparation von löslich exprimiertem Protein, eine Bindung vortäuschen, bei der p53 DBD und das C-terminale Peptid vermutlich in einem ternären Komplex gleichzeitig an unspezifische DNA gebunden vorliegen. Vermutlich daher legten erste Bindungstests zwischen p53 DBD-Konstrukten (z.B. GST-p53 DBD) und an Streptavidin-immobilisiertem biotinylierten C-terminalem Peptid in ELISA-, HTRF-, TRF- und Biacore-SPR-Formaten nahe, daß es eine Interaktion zwischen der p53 DBD und dem C-terminalem Peptid geben könnte. In diesen Fällen war die nachgewiesene Bindung durch Zugabe von C-terminalem Peptid mit einem IC₅₀ von 1-10 µM bis auf ca. 20-30% des maximalen Bindungsanteils kompetierbar (IC₅₀: 1µM in HTRF-FRET, 5 µM in Biacore, 10 µM im TRF-ELISA) (Daten nicht gezeigt).

⁶ DNA-Spuren waren durch eine Messung der Proteinpräparation bei 260 nm nicht nachweisbar.

Allerdings konnte zum einen die Bindung durch Zugabe von unspezifischer DNA gesteigert werden, zum anderen war sie gegenüber einer **Inkubation mit DNase** (Benzonase) suszeptibel. All diese Beobachtungen verdeutlichten die Rolle von unspezifischer DNA als mutmaßlichem Adaptermolekül bei der Vermittlung einer Bindung. In der Folge wurden daher Versuche mit hochreinen, *in vitro* gefalteten, aber auch mit löslich exprimierten p53 DBD Präparationen durchgeführt. Die zum Nachweis der postulierten Interaktion angewandten Methoden umfaßten ein breites Spektrum: EMSA, native Gele, analytische Gelfiltration, Coimmunpräzipitation, Fluoreszenztitration, FCS und ITC (Daten nicht gezeigt) sowie NMR-Spektroskopie. Die publizierte NMR-Zuordnung der p53 DBD (Wong *et al.*, 1999) und die Verfügbarkeit einer [U-¹⁵N]-markierten p53 DBD (siehe Kapitel 5.1 und 5.3) ermöglichten es, die postulierte Interaktion (Selivanova *et al.*, 1999) zwischen C-terminalen Peptiden und der p53 DBD auf molekularer Ebene durch NMR-Spektroskopie und **chemical shift perturbation mapping** zu analysieren (Klein *et al.*, 2001b). Bei einer Bindung verändert sich die chemische Umgebung der betroffenen Aminosäuren und es kommt zu Änderungen der chemischen Verschiebung, die dann auf die Oberfläche der bekannten Struktur der p53 DBD projiziert werden können. Zudem ist die NMR-Spektroskopie auch bei schwachen Interaktionen sehr sensitiv. Zusammen mit Dr. M. Schwaiger (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) und Dr. T. Diercks (Novaspin Biotech GmbH, München) wurden NMR-spektroskopische Methoden angewandt, die durch ein Bindungsereignis induzierte Änderungen auf Seiten des Proteins (¹⁵N, ¹H-HSQC) und des Peptids (¹H-Spektren, Diffusionszeit-Bestimmung, *inversion recovery* und Sättigungstransfer-Differenz-Experimente (STD) mit selektiver Sättigung der p53 DBD Methygruppen) detektieren sollten (Daten nicht gezeigt). Zur Messung wurden *in vitro* gefaltete und löslich exprimierte Präparationen der [U-¹⁵N]-p53 DBD unter variierten Bedingungen (Temperatur, pH, Ionenstärke) mit steigenden Konzentrationen (2- bis 10-facher Überschuß) des C-terminalen Peptids (AS 361-382) titriert. Außerdem wurden phosphorylierte Varianten des C-terminalen Peptids (P2, P3) auf eine eventuelle Bindung untersucht. Kein Experiment ergab jedoch einen Hinweis auf eine molekulare Interaktion zwischen p53 DBD und C-terminalem Peptid. Eine direkte Interaktion mit der p53 DBD konnte gleichermaßen auch nicht für ein Peptid aus der Prolin-reichen Region von p53 (AS 76-94) (Muller-Tiemann *et al.*, 1998) nachgewiesen werden. Die NMR-spektroskopische Analyse eines N-terminal verlängerten [U-¹⁵N]-p53 DBD Konstrukts (AS 40-312) zeigte, daß der N-Terminus hoch flexibel ist, jedoch war die durch *molecular modelling* postulierte Interaktion (Kim *et al.*, 1999a) zwischen dem C-terminalen Peptid (AS 361-382) und der Prolin-reichen Region ebenfalls nicht nachweisbar. Schließlich wurde die Hypothese überprüft, ob es bei der DNA-Bindung der p53 DBD eventuell zu einer Konformationsänderung kommen könnte, so daß das C-terminale Peptid möglicherweise nur an p53 DBD im Komplex mit DNA (siehe Kapitel 5.3) binden könnte. Auch dies konnte ausgeschlossen werden. Zwar band das C-terminale Peptid schwach an das verwendete DNA-Oligonukleotid, was zu titrierbaren Änderungen der chemischen Verschiebung der isolierten DNA-Iminoprotonen führte, jedoch konnten auf Seite der p53 DBD im Komplex mit DNA keine Änderungen beobachtet werden. Alles in allem ergab keines der durchgeführten Experimente einen Hinweis auf eine direkten Bindung von C-terminalen p53 Peptiden an die DBD nach dem allosterischen Modell der p53 Regulation (Klein *et al.*, 2001b).

5.3 Experimentelle Aufklärung der p53 Dimerisierungs-Kontaktfläche

NMR-spektroskopische Untersuchungen der p53 DBD-DNA-Bindung

Die *In-Vitro*-Faltung und Reinigung der Isotopen-markierten p53 DBD (siehe Kapitel 5.1) sowie das Vorhandensein einer Kristallstruktur der p53 DBD im Komplex mit DNA (Cho *et al.*, 1994) zusammen mit der kürzlich erfolgte Publikation der Zuordnung der NMR-Signale der freien p53 DBD (Wong *et al.*, 1999) ermöglichten es, sich im Rahmen dieser Arbeit auf struktureller Ebene experimentell durch **chemical shift perturbation mapping** mit verschiedenen Fragestellungen zu befassen, die die DNA-Bindung von p53 sowie ihre allosterische Regulation (siehe Kapitel 5.2) betrafen (Klein *et al.*, 2001b). Die im folgenden dargestellten **NMR-Experimente** wurden in Zusammenarbeit mit Dr. M. Schwaiger (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) und Dr. T. Diercks (Novaspin Biotech GmbH, München) geplant und an 500, 600 und 750 MHz-NMR-Spektrometern gemessen; die aufgeführten Sättigungstransfer-Differenz- und Diffusions-Messungen sowie die hydrodynamische Simulation wurden freundlicherweise von Dr. T. Diercks durchgeführt.

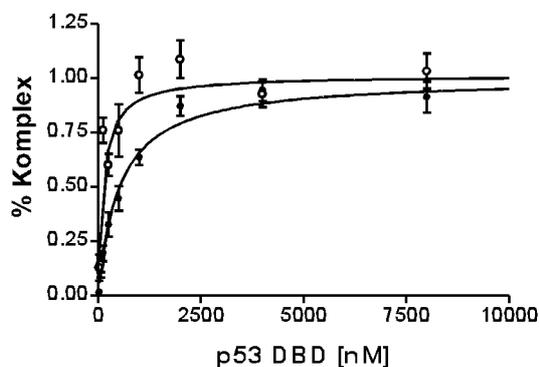


Abb. 5.3.1: DNA-Bindungsaktivität der p53 DBD. Die p53 DBD bindet kooperativ an CON2x5 und mit höherer Affinität und Kooperativität an CON4x5 Consensus-DNA-Oligonukleotide, während eine Bindung an CON1x5 DNA-Oligonukleotide nicht nachweisbar ist. Die exemplarischen Bindungskurven der Bindung von p53 DBD an TAMRA-markierte CON2x5 (●) und CON4x5 (○) DNA-Oligonukleotide in 50 mM KP (pH 6.8), 50 mM KCl, 5mM DTT wurden mit FCS unter NMR-Bedingungen bei 20°C bestimmt. Die apparenten Bindungskonstanten betragen $K_D=519 \pm 65$ nM für CON 2x5 und $K_D=124 \pm 26$ nM für CON4x5. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001b).

Die Kristallstruktur der p53 DBD im Komplex mit DNA (Cho *et al.*, 1994) ermöglicht einen weitgehenden Einblick in die molekulare Grundlage der DNA-Bindung von p53 und zeigt strukturell, wie Mutationen in der p53 DBD zu einer Inaktivierung der DNA-Bindungsaktivität der p53 DBD führen. Die Art und Weise wie vollständiges tetrameres p53 an DNA bindet und die molekulare Grundlage der kooperativen DNA-Bindung der p53 DBD sind aber bis heute ungeklärt, da tetrameres p53 trotz der Bemühungen vieler Arbeitsgruppen bisher nicht kristallisiert werden konnte. Frühere Untersuchungen und die im vorangehenden Kapitel angeführten DNA-Bindungsstudien zeigten, daß die isolierte p53 DBD auch in Abwesenheit einer TD kooperativ und sequenzspezifisch an die p53 Consensus-DNA-Bindungsstellen binden kann (Balagurumoorthy *et al.*, 1995; Bullock *et al.*, 2000; McLure und Lee, 1998; Pavletich *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995b). p53 DBD bindet dabei mit höchster Affinität an eine vollständige tetramere 20 bp Consensus-DNA-

Bindungsstelle, mit geringerer Affinität an eine dimere 10 bp Consensus-Bindungsstelle und mit im EMSA nicht detektierbarer Affinität an eine einfache pentamere 5 bp Untereinheit der Consensus-Bindungsstelle (McLure und Lee, 1998; Pavletich *et al.*, 1993). p53 muß daher zusätzlich zu der TD über eine weitere, in der p53 DBD lokalisierte Oligomerisierungs-Region verfügen, die aber bisher nicht näher experimentell charakterisiert wurde (Balagurumoorthy *et al.*, 1995; McLure und Lee, 1998; Stenger *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995b). Die folgenden biochemischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen ermöglichten die erste experimentelle Identifikation der Aminosäure-Reste, die an der Ausbildung der **p53 Dimerisierungs-Kontaktfläche** beteiligt sind, und damit eine Aufklärung der molekularen Grundlage der DNA-Bindungs Kooperativität der p53 DBD. Bindungsstudien mit EMSA (Daten nicht gezeigt) und FCS (Abb. 5.3.1) bestätigten, daß die [U-¹⁵N]-markierte p53 DBD unter NMR-Bedingungen mit höchster Affinität und Kooperativität an das tetramere CON4x5 DNA-Oligonukleotid (apparenter $K_D=519 \pm 65$ nM) und mit verringerter Affinität und Kooperativität an das dimere CON2x5 DNA-Oligonukleotid band (apparenter $K_D=124 \pm 26$ nM), während eine Bindung an das monomere CON1x5 DNA-Oligonukleotid unter den gewählten Bedingungen nicht mehr detektiert werden konnte.

Wie erwartet konnte bei Zugabe eines unspezifischen DNA-Oligonukleotids (TL) wie bei Zugabe der monomeren CON1x5 DNA-Sequenz im Kontext des TL-Oligonukleotids (TL-CON) (Abb. 5.3.2B) zur [U-¹⁵N]-markierten p53 DBD keine Veränderung im ¹⁵N,¹H-Korrelations-Spektrum beobachtet werden, da die Affinität der nicht-kooperativen Bindung von p53 DBD an diese Oligonukleotide zu gering war. Daher wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen des p53 DBD-DNA-Komplexes mit dem hochaffinen CON4x5/PG-Hind DNA-Oligonukleotid durchgeführt (Abb. 5.3.2E). Nach Zugabe eines 0.25-fachen molaren Äquivalents des 26-mer CON4x5 Oligonukleotids zu der [U-¹⁵N]-markierten p53 DBD wurde eine starke Linienverbreiterung verbunden mit **dramatischen Intensitätsverlusten** im ¹⁵N,¹H-Korrelations-Spektrum der p53 DBD beobachtet. Ursprünglich wurden diese Effekte auf das hohe Molekulargewicht des gebildeten Komplexes von ca. 120 kD zurückgeführt (4 x p53 DBD, 1x CON4x5 Oligonukleotid), das zu einer sehr langsamen Rotation des Komplexes führen sollte. Versuche, die Spektrenqualität des p53 DBD-CON4x5-Komplexes zu verbessern, schlugen fehl. Versuche mit dem für die Cokristallisation der p53 DBD verwendeten 21-mer DNA-Oligonukleotid (CON-Struktur) (Cho *et al.*, 1994), das eine dimere p53 Consensus-Bindungsstelle umfaßt, führten ebenfalls zu einer starken Linienverbreiterung, so daß ein Teil der Signale verschwand (Abb. 5.3.2C). Um das Molekulargewicht des untersuchten Komplexes zu verkleinern, wurde im folgenden die Bindung von p53 DBD an ein dimeres 16-mer CON2x5 DNA-Oligonukleotid untersucht, das nur eine halbe p53 Consensus-DNA-Bindungsstelle umfaßt (Abb. 5.3.2D). Der erwartete ternäre Komplex besteht aus zwei p53 DBDs, die kooperativ an ein CON2x5 DNA-Oligonukleotid gebunden sind. Die Bildung dieses Komplexes konnte durch NMR-Diffusionsexperimente bestätigt werden (siehe unten).

Im folgenden wird dieser Komplex daher als **dimerer p53 DBD-DNA-Komplex** bezeichnet. Mit dem CON2x5 DNA-Oligonukleotid konnten im Verlauf der Untersuchungen Spektren erhalten werden, die weniger ausgeprägte Signalverluste aufwiesen und damit eine Aussage über die kooperative p53 DBD-DNA-Interaktion möglich machten. Die Zugabe eines > 0.5-fachen molaren Äquivalents des CON2x5 Oligonukleotids zu der [U-¹⁵N]-markierten p53 DBD führte zu Änderungen der chemischen Verschiebung sowohl im ¹⁵N,¹H-Korrelations-Spektrum als auch der gut

voneinander getrennten Iminoprotonen (12.2 – 13.8 ppm) der DNA, während die ^{31}P -Signale der DNA zu breit waren und zu stark überlappten als daß Änderungen wahrgenommen werden konnten. Allerdings kam es auch mit dem CON2x5 Oligonukleotid, wenn auch bedeutend schwächer ausgeprägt als mit dem CON4x5 Oligonukleotid, zu einer dramatischen Reduktion der $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC Signalintensitäten. Die Inkubation des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes mit DNaseII führte wieder zum Original-Spektrum der p53 DBD, was irreversible Effekte wie Proteinpräzipitation, Aggregation oder Proteindegradation als Ursache für die geringe Qualität der Spektren ausschloß.

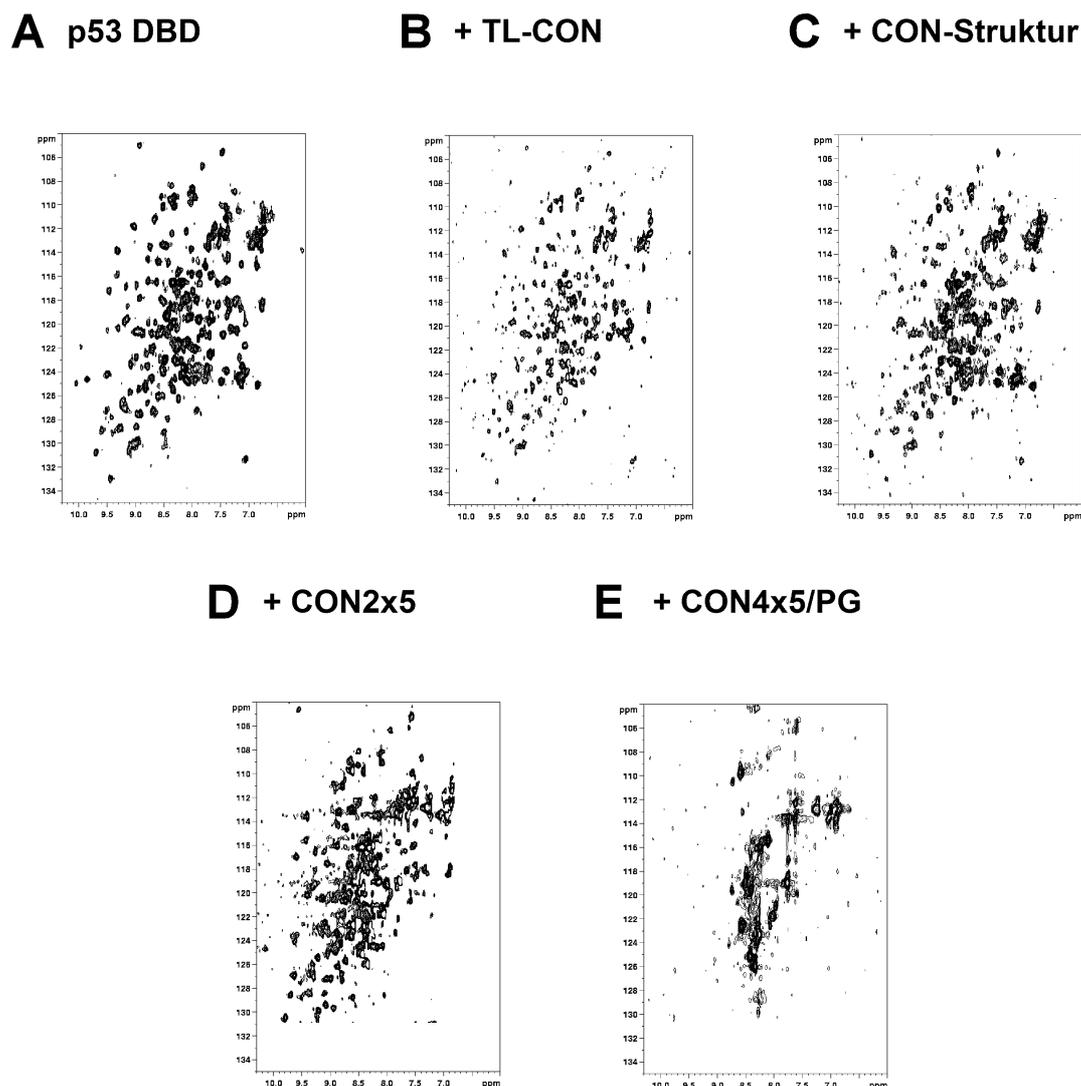


Abb. 5.3.2: Gegenüberstellung der $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Korrelationspektren der $[\text{U}-^{15}\text{N}]$ -markierten p53 DBD vor und nach Zugabe verschiedener spezifischer DNA-Oligonukleotide. A) p53 DBD alleine; B) p53 DBD + TL-CON; C) p53 DBD + CON-Struktur (Cho *et al.*, 1994); D) p53 DBD + CON2x5; E) p53 DBD + PG-Hind (El-Deiry *et al.*, 1992; Hupp *et al.*, 1992). Sequenzen der Oligonukleotide siehe Tab. 4.1.

Daher wurde die Reduktion der Signalintensitäten anfangs ebenfalls auf Relaxationsverluste als Folge der Größenzunahme auf ca. 60 kD und auf die verringerte globale Mobilität des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes zurückgeführt. Solche größenabhängigen Relaxationseffekte können effizient durch Aufnahme einer

kürzlich entwickelten Form von $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektren unterdrückt werden, die als $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY (Pervushin *et al.*, 1997) bezeichnet werden. In diesen Spektren wird nur der $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -gekoppelte Spinzustand ausgewählt, der eine negative Interferenz von zwei bedeutenden Relaxationswegen erfährt. Die resultierende Aufhebung der Relaxationsverluste verbessert sich mit zunehmender Feldstärke. Allerdings führte die Anwendung von $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY auf den dimeren p53 DBD-DNA-Komplex selbst bei 750 MHz nicht zu der erwünschten Verbesserung der Signale. Stattdessen konnten die Signalintensitäten durch Standard $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC mit minimierter Dauer ohne zeitaufwendige Kohärenz-selektive Gradienten im Durchschnitt verdreifacht werden. Dafür wurde eine $^1\text{J}_{\text{HN}}$ Kopplungs-Evolutions-Verzögerung verwendet, die auf den halben theoretischen Wert festgelegt wurde (2.8 ms statt 5.5 ms), zusätzlich wurde ohne Verlängerung der Pulssequenz ein WATERGATE Wasser-Unterdrückungs-Schema während des letzten ReINEPT Schritts implementiert. Während eine Verkürzung der Pulssequenzen die Relaxationsverluste im allgemeinen minimiert, schloß das Versagen von TROSY aus, daß größenabhängige Relaxationsmechanismen für den dimeren p53 DBD-DNA-Komplex von großer Bedeutung sind. Daher blieben nur langsame Prozesse wie chemischer Austausch (d.h. Dissoziation) bzw. konformationelle Beweglichkeit (z.B. Umlagerungen) als Ursache für die beobachtete drastische ^1H -Linienverbreiterung von teilweise mehr als 100 Hz bei 600 MHz übrig. Diese ging mit starken Intensitätsverlusten einher, und sprach daher für Lebenszeiten des (assoziierten) Komplexes und/oder der spezifische Konformationen im Bereich von μs -ms. Zudem waren Versuche, das System aus der Koaleszenz-Region entweder in die Region von langsamem oder von schnellem Austausch zu schieben, nicht erfolgreich. So hatte z.B. weder eine Abkühlung von 293 auf 283 K, noch eine Erhöhung der Temperatur auf 303 K einen positiven Einfluß auf die $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-Spektren. Dies war auch für die entsprechenden TROSY-Spektren bei 750 MHz der Fall. Während eine Erhöhung der KCl-Konzentration von 100 mM auf 250 mM wieder zu dem $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -Korrelations-Spektrum der freien p53 DBD und damit zur Komplexdissoziation führte, hatte die Absenkung der Salzkonzentration auf 40 mM keine Stabilisierung des ternären Komplexes und damit keine Verbesserung des entsprechenden Spektrums zur Folge. Ungeachtet dieser Tatsachen, konnte eine Verbesserung der $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC und $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY-Spektren beim Wechsel von 600 zu 750 MHz beobachtet werden, was für eine leichte von der magnetischen Feldstärke abhängigen Verschiebung in die Region des langsamen Austauschs spricht.

Die Beobachtung, daß der Komplex durch Verringerung der Salzkonzentration nicht wahrnehmbar stabilisiert werden konnte, war ein erster Hinweis, daß vermutlich nicht eine Komplex-Dissoziation, sondern vielmehr die interne molekulare Dynamik des Komplexes für die beobachtete starke Linienverbreiterung und die Koaleszenzphänomene ursächlich war. Diese Schlußfolgerung wurde durch Konvektions-kompensierte **NMR-Diffusions-Experimente** bei 293 K verifiziert (Jerschow und Muller, 1998). In diesen Messungen zeigte sich eine Reduktion des Diffusionskoeffizienten des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes um etwa ein Drittel im Vergleich zur freien p53 DBD ($7.3 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ vs. $5.0 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$; die Fehler der Messung liegen in einem Bereich von 5-10%; der Referenz-Diffusionskoeffizient von H_2O lag mit $1.9 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ca. 5% unter dem Literaturwert für reines Wasser). Die experimentell bestimmte Reduktion der Diffusionskoeffizienten um -31.5% und ihr Verhältnis nach DNA-Bindung stimmten sehr gut mit der durch hydrodynamische Simulation berechneten theoretischen Reduktion um -30% überein und unterstützen die Existenz des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes.

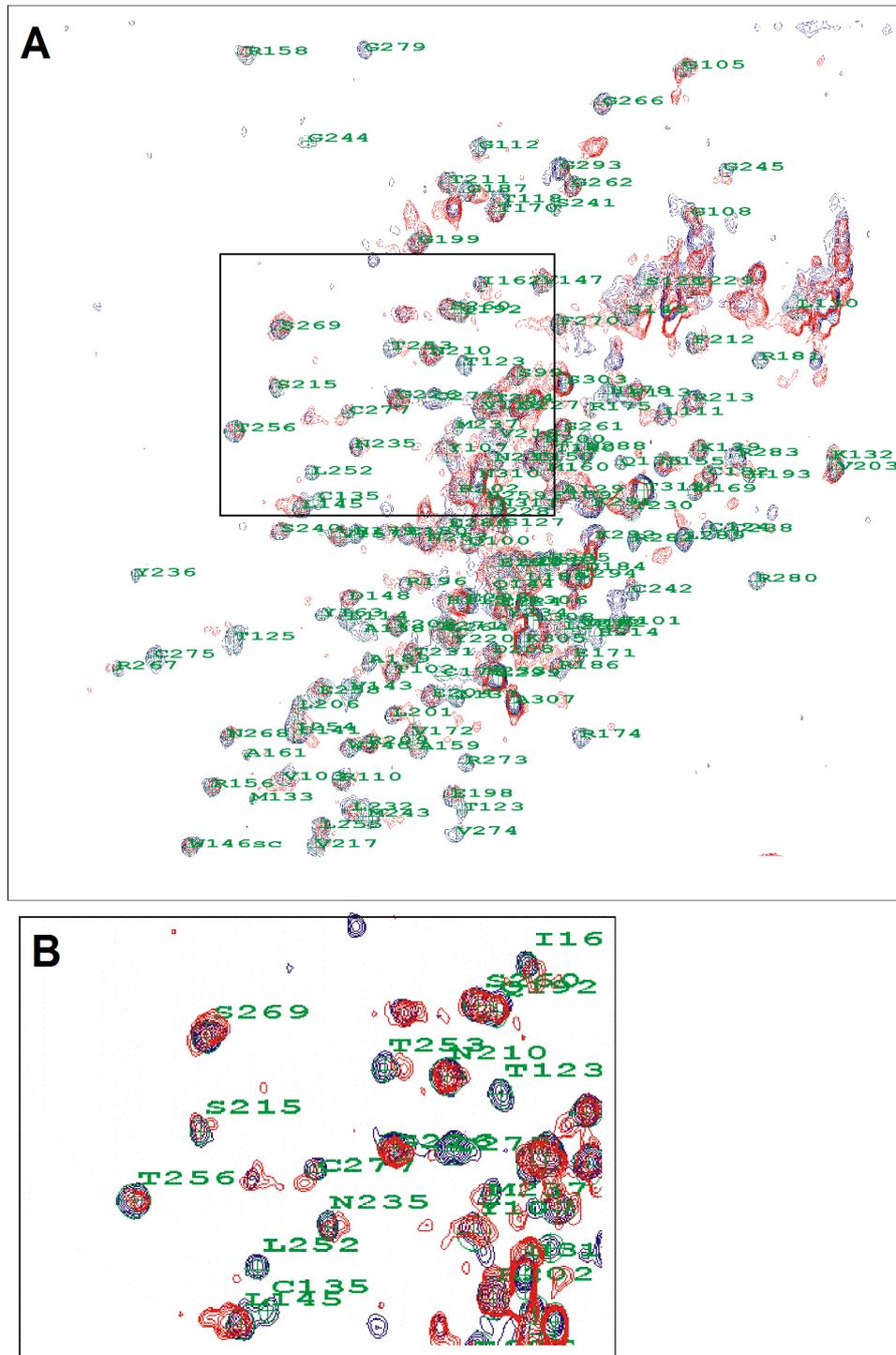


Abb. 5.3.3: Überlagerung der $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -Korrelationspektren der freien (blau) und der DNA-gebundenen (rot) $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -markierten p53 DBD nach Zugabe eines 0.6 molaren Äquivalents des CON2x5 Consensus-DNA-Oligonukleotids bei 750 MHz. Das *peak assignment* entsprechend (Wong *et al.*, 1999) ist in grün gezeigt. B) Bezeichneter Ausschnitt aus A). Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001b).

Offensichtlich trägt das zusätzliche DNA-Molekül im p53 DBD Dimer nur unwesentlich zur Erhöhung der Diffusionsrate bei, da eine Reduktion um ca. 30% auch für andere Monomer-Dimer-Gleichgewichte beschrieben wurde (Altieri *et al.*, 1995), so daß die DNA im Komplex integriert sein muß und nicht exponiert erscheint.

Im Prinzip könnte die gemessene Diffusionszeit jedoch immer noch eine zeitliche Mittelung höher und niedriger oligomerer Zustände widerspiegeln. Allerdings ist eine Oligomerisierung höherer Ordnung der p53 DBD am CON2x5 Oligonukleotid aufgrund sterischer Gründe und aufgrund fehlender weiterer Bindungsstellen sehr unwahrscheinlich. Zudem konnte im Komplex zwischen p53 DBD und DNA kein Sättigungstransfer nachgewiesen werden, der in den freien Zustand übertragen worden wäre. Der negative Ausgang dieses Sättigungstransfer-Differenz-Experiments (Mayer und Meyer, 1999) zeigte, daß der Austausch zwischen der gebundenen und der freien Spezies ziemlich niedrig sein muß, und impliziert, daß der Komplex nicht leicht dissoziiert, so daß der K_D im sub-mikromolaren Bereich liegen sollte (Balagurumorthy *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1999). Da die von beiden Methoden abgedeckten Affinitäts- und Lebenszeit-Bereiche vergleichbar sind, hätte eine postulierte Mittelung der gemessenen Diffusionskoeffizienten einen beobachtbaren Sättigungstransfer zwischen freiem und gebundenem Zustand nach sich ziehen müssen. (Klein *et al.*, 2001b). Zusammenfassend waren die NMR-Resultate starke Evidenzen dafür, daß die p53 DBD bei CON2x5 DNA-Bindung dimerisiert und daß der p53 DBD-DNA-Komplex im Zeitfenster der Messung mit einer Lebenszeit von ca. 10^{-2} – 10^{-1} s stabil assoziiert bleibt. Im Gegensatz dazu zeigte der Komplex substanzielle interne Dynamik auf der μ s-ms Zeitskala, was höchstwahrscheinlich die Ursache für die beobachtete massive Linienverbreiterung ist. Die Natur der dafür verantwortlichen Bewegungen oder konformationellen Änderungen bleibt spekulativ.

Aufklärung der p53 Dimerisierungs-Kontaktfläche

Um die Interaktion zwischen p53 DBD und ihrer Consensus-DNA-Bindungsstelle sowie die Dimerisierungs-Kontaktfläche der p53 DBDs bei der kooperativen DNA-Bindung durch *chemical shift perturbation mapping* (Zuiderweg, 2002) zu untersuchen, wurden ^{15}N , ^1H -Korrelationspektren der [U- ^{15}N]-markierten p53 DBD vor und nach Zugabe eines >0.6 molaren Äquivalents des CON2x5 Oligonukleotids aufgenommen. Abb. 5.3.3 zeigt eine **Überlagerung** dieser Spektren. Trotz der schwachen Intensitäten, die lange Meßzeiten erforderten, der geringen Auflösung und breiten Linienform des Komplexes, sind selektive, charakteristische Änderungen der chemischen Verschiebung nach DNA-Bindung klar erkenn- und unterscheidbar. Aufgrund der starken Linienverbreiterung von Teilen der Resonanzen war es allerdings schwierig, genaue Werte für die Änderung der chemischen Verschiebung zu bestimmen. Daher wurde die Verschiebung der Signale ausschließlich qualitativ klassifiziert. Dabei wurde davon ausgegangen, daß ein nach DNA-Zugabe in der Umgebung eines zugeordneten Signals befindliches Signal diesem Rest zugeordnet werden konnte bzw. daß beim Fehlen eines Signals in der näheren Umgebung, dieses verschwunden war oder zumindest eine starke Verschiebung erfahren hatte (*nearest neighbour assumption*). In Abb. 5.3.4 ist der Effekt der Titration der DNA auf die ^{15}N - und ^1H -chemischen Verschiebungen gegen die Aminosäure-Position aufgetragen. Die Aminosäure-Reste, deren Signale eine Änderungen der chemischen Verschiebung zeigten, sind zudem in Abb. 5.3.5 auf eine Oberflächendarstellung der Kristallstruktur der p53 DBD im Komplex mit DNA projiziert (PDB-Code: 1TSR, Kette B) (Cho *et al.*, 1994). Die Änderungen der chemischen Verschiebung waren klar in distinkten Regionen zu finden, die fast perfekt mit den vier konservierten Regionen II (AS 117-142), III (AS 171-181), IV (AS 234-258) und V (AS 270-286) der p53 DBD übereinstimmen (in Abb. 5.3.4 in rot

markiert). Diese konservierten Regionen bilden die in der Kristallstruktur (Cho *et al.*, 1994) identifizierte p53-DNA-Kontaktfläche (in Abb. 5.3.4 in blau markiert): L2 Loop (AS 163-195), L3 Loop (AS 236-251) und Loop-Sheet-Helix Motiv aus L1 Loop (AS 112-124), S2-S2' Hairpin (AS 124-141), S10 β Faltblatt (AS 271-274) und H2 Helix (AS 278-286) sowie die mutmaßliche Dimerisierungs-Kontaktfläche, die von der kurzen H1 Helix (AS 177-182) als Teil des L2 Loops gebildet wird.

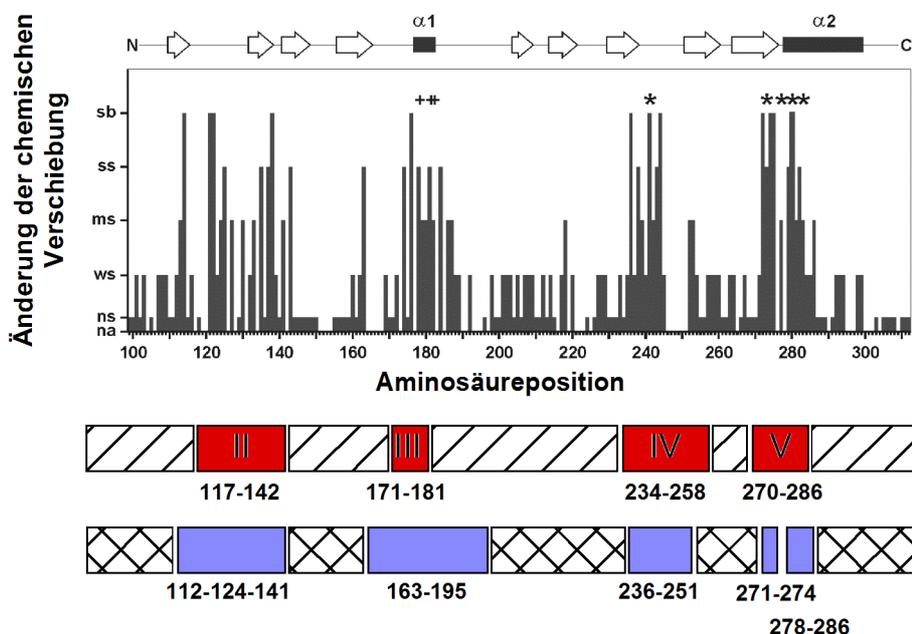


Abb. 5.3.4: Änderungen der chemischen Verschiebung nach DNA-Bindung (*chemical shift perturbation experiment*): Effekt der Titration mit CON2x5 Consensus-DNA-Oligonukleotid auf die Rückgrat ^{15}N - und ^1H -chemischen Verschiebungen der p53 DBD entsprechend Abb. 5.3.3. Die Änderungen der chemischen Verschiebung sind schematisch gegen die Aminosäure-Position aufgetragen. Die Sekundärstruktur ist oben schematisch eingezeichnet. Die konservierten Regionen der p53 DBD sind unten in rot, die Regionen, die zur DNA-Bindung beitragen, in blau eingezeichnet. Aufgrund der starken Linienverbreiterung von Teilen der Resonanzen war es schwierig, genaue Werte für die Änderung der chemischen Verschiebung zu bestimmen. Daher wurden die Reste ausschließlich qualitativ klassifiziert: sb: Signal verschwindet aufgrund starker Linienverbreiterung oder verschiebt sich weit in eine andere spektrale Region; ss: Verschiebung größer als die Linienbreite; ms: Verschiebung größer als die halbe Linienbreite; ws: Verschiebung kleiner als die halbe Linienbreite; ns: keine Verschiebung detektierbar; na: Aminosäure nicht zugeordnet. Die konservierten Reste H178, R181 und C182 sind mit + markiert; Reste, die intermolekulare Wasserstoffbrücken mit der DNA ausbilden, sind mit * markiert. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001b).

Änderungen der chemischen Verschiebung nach DNA-Zugabe bedeuten entweder intermolekulare Kontakte oder durch die Bindung induzierte konformationelle Änderungen. Die Auswertung der Änderungen der chemischen Verschiebung der ^{15}N , ^1H -Korrelationsspektren (*chemical shift perturbation mapping*) anhand der Kristallstruktur der p53 DBD (Cho *et al.*, 1994) (Abb. 5.3.5) korreliert sehr gut mit den kristallographischen Ergebnissen. Der größte Teil der Unterschiede in der ^{15}N , ^1H -chemischen Verschiebung ist auf eine Seite der p53 DBD beschränkt und betrifft v.a. die Kontaktfläche der DNA-Bindungsstelle sowie in ausgeprägter Weise die **H1 Helix**, die nahe der Zn^{2+} Koordinationsstelle liegt. Die auffälligsten Veränderungen der chemischen Verschiebung treten im Bereich der Aminosäuren R174 bis G187 auf und umfassen damit einen Teil der konservierten Region III und

einen Teil des für die DNA-Bindung strukturell wichtigen L2 Loops (AS 163-195) mit der kurzen H1 Helix (P177-C182) und den Zn^{2+} -koordinierenden Resten C176 und H179. Entsprechend der Kristallstruktur (Cho *et al.*, 1994) spielt diese Region allerdings keinerlei Rolle bei der DNA-Bindung. Die Tatsache, daß die DNA-Bindung der p53 DBD **kooperativ** erfolgt (Balagurumoorthy *et al.*, 1995; Bargonetti *et al.*, 1993; Pavletich *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995b), zieht automatisch die Existenz einer **symmetrischen intermolekularen Dimerisierungs-Kontaktfläche** auf beiden p53 DBDs nach sich, wie sie bereits in einem Modell für p53 vorgeschlagen wurde (Cho *et al.*, 1994). Die Rolle der H1 Helix als maßgeblicher Kontaktfläche für die Dimerisierung konnte somit NMR-spektroskopisch durch das durchgeführte *chemical shift perturbation mapping* unterstützt werden. Das einzige Modell für den dimeren p53 DBD-DNA-Komplex, das alle experimentellen Ergebnisse und die nötigen strukturellen Anforderungen erfüllt, ist eine C_2 -symmetrische Anordnung der beiden p53 DBDs auf der DNA, die die C_2 -Symmetrie der zwei pentameren Consensus-DNA-Bindungsstellen widerspiegelt (siehe Kapitel 6.3).

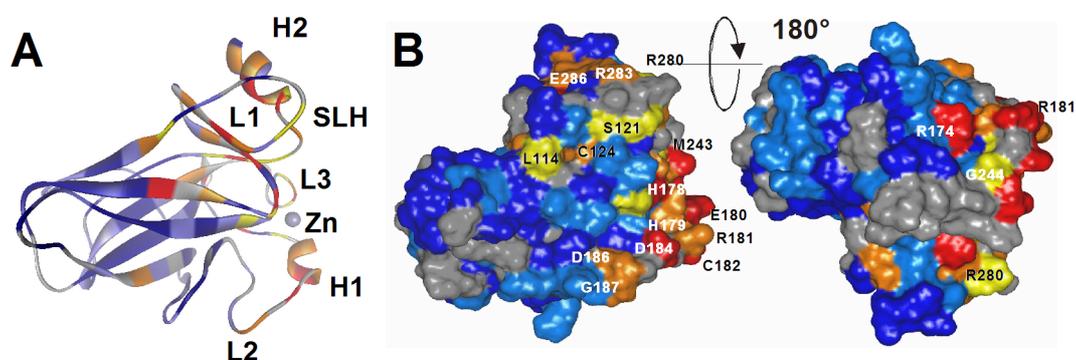


Abb. 5.3.5: Änderungen der chemischen Verschiebung nach DNA-Bindung (*chemical shift perturbation experiment*): Effekt der Titration mit CON2x5 Consensus-DNA Oligonukleotid auf die Rückgrat ^{15}N - und 1H -chemischen Verschiebungen der p53 DBD entsprechend Abb. 5.3.3. Aminosäure-Reste, die eine Änderung der chemischen Verschiebung zeigen (siehe Abb. 5.3.3 und 5.3.4), sind entsprechend dem angegebenen Farbschema auf die Kristallstruktur der p53 DBD (Cho *et al.*, 1994) projiziert: **A) Schematische Sekundärstrukturdarstellung; B) Connolly-Oberflächendarstellungen** der p53 DBD rotiert um 180° . Gelb: Signal verschwindet aufgrund starker Linienverbreiterung oder verschiebt sich weit in eine andere spektrale Region; rot: Verschiebung größer als die Linienbreite; orange: Verschiebung größer als die halbe Linienbreite; blau: Verschiebung kleiner als die halbe Linienbreite; dunkelblau: keine Verschiebung detektierbar; grau: Aminosäure nicht zugeordnet. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001b).

Datenbank-Recherchen (Altschul *et al.*, 1997) in der PDB (Berman *et al.*, 2000) ergaben keine homologen Strukturelemente für die Dimerisierungs-Kontaktfläche (R174-G187). Das **Sequenz-Alignment** der bekannten p53 Sequenzen aus verschiedenen Spezies sowie der Sequenzen der bekannten p53 Homologen zeigt allerdings, daß das Segment R174-187 ein hohes Maß an Konservierung innerhalb der p53 DBDs aus verschiedenen Organismen aufweist, obwohl die H1 Helix gar nicht direkt in die DNA-Bindung involviert ist (Abb. 5.3.6). Diese Konservierung kann durch die Rolle der Reste der H1 Helix bei der Stabilisierung der Domäne und durch intramolekulare Wechselwirkungen wie z.B. der Zn^{2+} -Koordination erklärt werden. Die hohe funktionelle Bedeutung der Solvens-zugänglichen Reste H178, R181 und C182 in der H1 Helix dagegen wird durch die Tatsache unterstrichen, daß auch sie

einen hohen Grad von **Konservierung** aufweisen, obwohl sie im freien p53 DBD Monomer nach außen deuten und somit keine Rolle bei der Stabilisierung der freien p53 DBD selbst spielen dürften. Ihre Konservierung kann daher am besten durch die Einbindung in essentielle intermolekulare Kontakte verstanden werden, wie sie für die p53 DBD Dimerisierung notwendig sein dürften. An dieser Stelle sollte angemerkt werden, daß die drei Solvens-exponierten Reste in den homologen p63 und p73 DBDs nicht konserviert sind; was erklären könnte, warum die homologen p63 und p73 DBDs im Gegensatz zu p53 keine kooperative DNA-Bindung zeigen (siehe Kapitel 5.4).

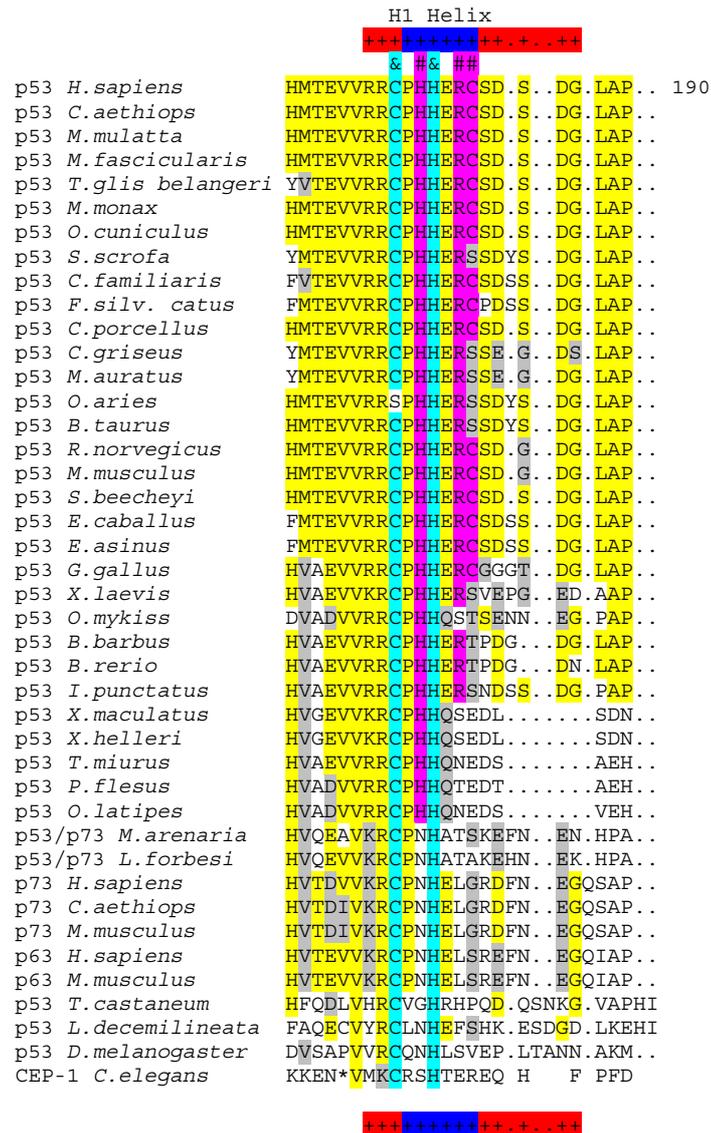


Abb. 5.3.6: Ausschnitt des Sequenz-Alignments der H1 Helix-Regionen von p53 sowie seiner Homologen p63 und p73 aus verschiedenen Organismen. Die Zn²⁺-koordinierenden Reste (C176, H179) sind in cyan (&) hervorgehoben. Die H1 Helix (177-182) ist blau markiert; die Region um die H1 Helix (174-187), die auffällige Änderungen der chemischen Verschiebung zeigt, ist rot (+) markiert. Hoch konservierte Reste sind gelb, die Solvens-exponierten Reste H178, R181 und C182 violett (#) und konservative Substitutionen grau unterlegt. * steht für eine Insertion von VEYAIRNPRSD in CEP-1. Das Sequenz-Alignment wurde mit ClustalW 1.7 (Thompson *et al.*, 1994) erstellt.

Weitergehende Versuche, die DNA-Bindung und die Dimerisierungs-Kontaktfläche über direkte oder indirekte Methoden NMR-spektroskopisch zu charakterisieren, waren aufgrund der niedrigen Spektrenqualität des ternären Komplexes nicht erfolgreich. So war es unmöglich, mit NOESY-Experimenten p53 DBD-DNA-Kontakte (unter Verwendung von [U- ^{13}C , ^{15}N]-markierter p53 DBD) oder intermolekulare p53 DBD Kontakte in der Dimerisierungs-Kontaktfläche (unter Verwendung einer 1:1 Mischung von nicht-markierter und [U- ^{13}C , ^{15}N]-markierter p53 DBD) zu messen. Auch war es nicht möglich, die Region der Kontaktfläche indirekt durch Messung der Solvens-zugänglichen Proteinoberfläche via H^{N} - H_2O Austausch-Raten oder via paramagnetische Relaxationsauslöschung nach Zugabe von 20 mM 4-Hydroxy-TEMPO (Petros *et al.*, 1990) mit ausreichender Genauigkeit zu charakterisieren. Versuche durch NMR-Spektroskopie mit dem gewählten dimeren p53 DBD-DNA-Komplex eine Struktur des p53 DBD-DNA-Dimers bzw. wenigstens eine teilaufgelöste Struktur der p53 Dimerisierungs-Kontaktfläche in Lösung zu bestimmen, können aufgrund der geschilderten Schwierigkeiten daher vermutlich unter den gegebenen Bedingungen und Feldstärken prinzipiell nicht erfolgreich sein (Dotsch, 2001). Da der p53 DBD-DNA-Komplex zudem entweder in einer Kristallform kristallisiert, die die kooperative DNA-Bindung und Dimerisierung ausschließt (Cho *et al.*, 1994), bzw. die Kristallisation zum Ausschluß der DNA im Kristall führte (Zhao *et al.*, 2001), sind alle bisherigen Versuche, die natürliche Wechselwirkung der p53 DBDs im Komplex mit einer palindromen DNA-Sequenz röntgenkristallographisch aufzuklären, fehlgeschlagen. In der Diskussion wird basierend auf den *chemical shift perturbation* Daten aber ein **plausibles Modell** für den dimeren p53 DBD-DNA-Komplex vorgestellt.

5.4 Vergleich der p63 DBD mit der homologen p53 DBD

Da die zu p53 homologe p63 DBD in der Literatur bisher noch nicht näher untersucht worden war, wurde sie in dieser Arbeit im Vergleich zur p53 DBD charakterisiert. Der biochemische Vergleich der p63 DBD mit der p53 DBD zeigte, daß sich die p63 DBD von der homologen p53 DBD durch ihre hohe Thermostabilität und die fehlende Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung unterscheidet.

Klonierung, Expression und Reinigung (einer neuen Isoform) der p63 DBD

Die Region, die für die DBD des p63 Proteins codiert, wurde durch PCR mit genspezifischen Primern aus einer humanen Plazenta cDNA-Bank (Clontech) amplifiziert. Unerwarteterweise wies die klonierte cDNA in der C-terminalen Region der p63 DBD eine Deletion von 12 bp auf, die für den Austausch von fünf Aminosäuren (SerThrLysArgPro) durch Alanin codiert (Abb. 5.4.1). Diese Deletion in der DBD ist schon für die γ -Isoform von murinem p63 bekannt, wurde bisher aber nicht für humane p63 Isoformen beschrieben (Abb. 5.4.2). Allerdings konnten kurze EST-Sequenzen, die diese Deletion enthalten, in der humanen EMBL dbEST Nukleotid Sequenz Datenbank gefunden werden (siehe Material und Methoden). Die klonierte cDNA codiert daher höchstwahrscheinlich analog zum murinen p63 für eine neue humane p63 Isoform, die vorläufig als **p63- δ** bezeichnet wurde. Die identifizierte Nukleotid-Sequenz der p63- δ DBD wurde in der *GenBank/EBI Data Bank* unter der Zugangsnummer AJ315499 abgelegt.

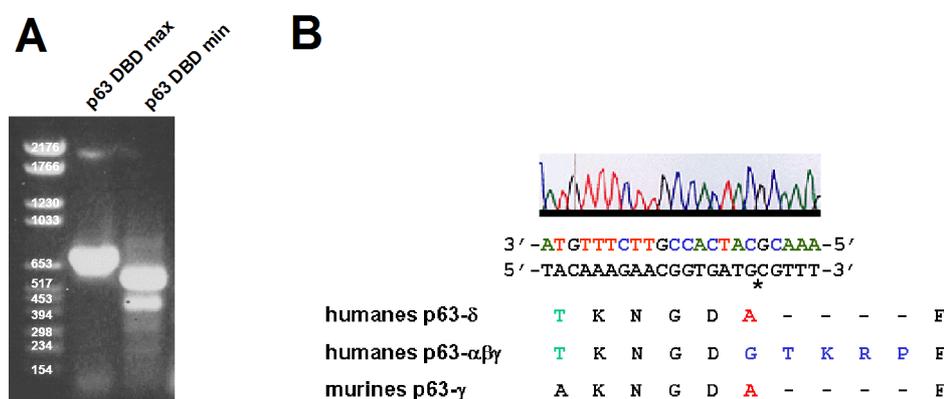


Abb. 5.4.1: Klonierung und Sequenzierung der p63- δ Isoform der p63 DBD. A) 1%-iges Agarosegel der PCR-Amplifikationsprodukte aus einer Plazenta cDNA-Bibliothek (Clontech), die für die p63 DBD (maximales und minimales Konstrukt) codieren. B) Ausschnitt des Elektropherogramms der Sequenzierung der p63 DBD von p63- δ . Die klonierte Sequenz wies eine Deletion von 12 bp (GTACGAAGCGCC) auf, die für einen Austausch von GTKRP durch A codiert. Diese Deletion wurde für murines p63- γ beschrieben, ist für die bekannten humanen p63 Isoformen α , β , und γ bisher jedoch nicht beschrieben worden. Daher wurde die klonierte Isoform vorläufig als p63- δ bezeichnet. * markiert die Position der Deletion.

Die p63 DBD, die in dieser Arbeit charakterisiert wurde (p63 DBD max), umfaßte die Aminosäure-Reste 114-349 und wurde auf der Grundlage des Struktur-basierten Sequenz-Alignments der Mitglieder der p53 Familie ausgewählt (Abb. 5.4.2). Sie entspricht der p53 DBD (94-312), die in den vorhergehenden Kapiteln und in mehreren anderen Untersuchungen verwendet wurde (Bullock *et al.*, 1997;

Pavletich *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 1994), und umfaßt in Ergänzung zum minimalen gefalteten Kern kurze, vermutlich unstrukturierte N- und C-terminale Reste. Der Grad der Identität zwischen den p63 und p53 DBDs liegt bei 55.4%. Eine um die (vermutlich) flexiblen Enden verkürzte Version, p63 DBD min (141-322), zeigte unter den gewählten Bedingungen keine Expression. Daher wurde im folgenden nur mit der p63 DBD (114-349) gearbeitet. Expressionsplasmide mit der p63 DBD (Abb. 5.4.3) und GST-p63 DBD (Daten nicht gezeigt) ergaben nach Induktion sogar bei 37°C hohe Ausbeuten von löslichem Protein in *E. coli* und zeigten fast gar keine Tendenz zur Bildung von IBs. Diese Beobachtung führte schon früh zu dem Schluß, daß sich die p63 DBD von der p53 DBD durch eine geringe Aggregationsneigung und eine **hohe Faltungs- bzw. Thermostabilität** auszeichnet.

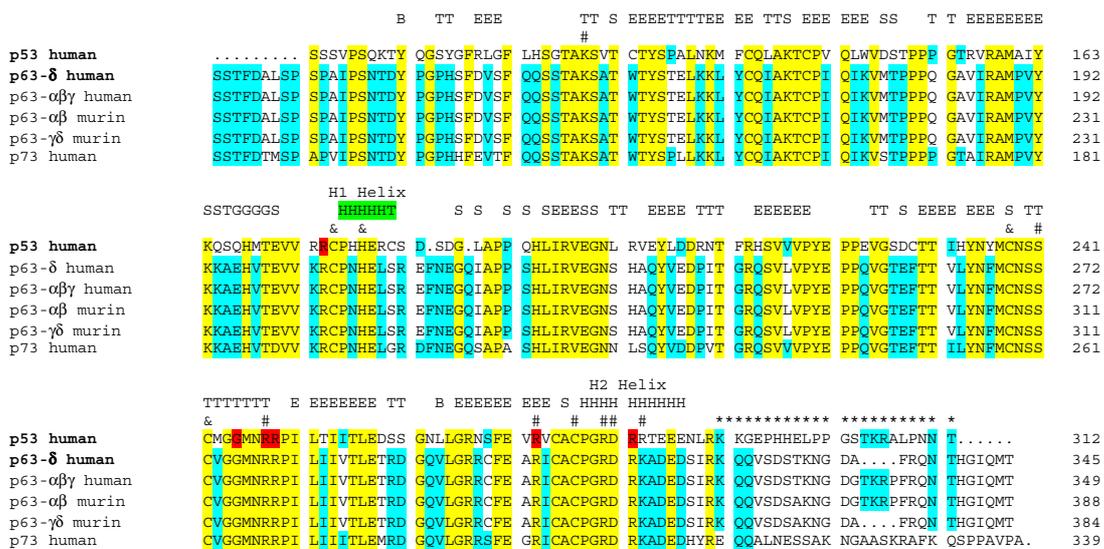


Abb. 5.4.2: Primärstruktur-Alignments der p63 DBDs und der homologen Domänen von p53 und p73. Die Sequenz der humanen p53 DBD ist der Sequenz der p63-δ DBD gegenübergestellt, die in dieser Arbeit identifiziert wurde. Zudem sind in dem Alignment die Sequenzen von humanem p63-α,-β,-γ, murinem p63-α,-β, murinem p63-γ und humanem p73 angegeben. Reste, die in allen DBDs identisch sind, sind gelb unterlegt; Reste, die in zwei DBDs identisch sind, sind cyan unterlegt. Die Sekundärstruktur ist entsprechend der Kristallstruktur der p53 DBD (PDB-Code: 1TSR, Kette B) (Cho *et al.*, 1994) folgendermaßen bezeichnet: H: α-Helix; B: isoliertes β-Faltblatt-Brücke; E: ausgedehntes β-Faltblatt; G: 310 Helix; T: Turn mit Wasserstoffbrücke; S: *bend* (Kabsch und Sander, 1983). Die H1 Helix ist in grün markiert. Reste, die in der Kristallstruktur der p53 DBD nicht aufgelöst sind, sind mit * markiert; die sechs häufigsten Punktmutationen in der p53 DBD sind in rot hervorgehoben, Reste, die Zn²⁺ koordinieren, sind mit & markiert und Reste, die spezifische Kontakte mit der DNA ausbilden, mit #. Das Sequenz-Alignment wurde mit ClustalW 1.7 (Thompson *et al.*, 1994) erstellt. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001a).

Die p63 DBD wurde unter Anwendung einer effizienten Kombination von Kationenaustauschchromatographie und Gelfiltration gereinigt. Dieses Schema ergab Ausbeuten von ca. 30 mg an >98% homogener und monomerer p63 DBD pro 1 L Schüttelkultur (2-3 g Bakterienfeuchtmasse), wie durch SDS-PAGE (Abb. 5.4.4A, Spuren 1-5), analytische Gelfiltration (Abb. 5.4.4B) und ESI-Massenspektroskopie gezeigt wurde. Die Analyse der hydrodynamischen Eigenschaften durch dynamische Lichtstreuung (DLS) zeigte, daß sowohl die p53 DBD als auch die p63 DBD ähnliche hydrodynamische Radien (Rh) sowie eine monomodale Verteilung mit kleinen relativen Polydispersitäten von ungefähr 0.1 aufwiesen. Die Beobachtung einer hohen Stabilität der p63 DBD wurde zudem von der Tatsache unterstützt, daß sich die

gereinigte p63 DBD auf Konzentrationen >100 mg/mL aufkonzentrieren ließ, ohne daß es zu Präzipitation oder Aggregation kam. Die hohe erzielbare Proteinkonzentration und Stabilität sowie die niedrigen Polydispersitätsindices und die monomodale Verteilung legten nahe, daß die p63 DBD eine hohe Kristallisationswahrscheinlichkeit aufweisen könnte (Ferre-D'Amare *et al.*, 1997; Ferre-D'Amare und Burley, 1994). Dennoch wurden in den bisher durchgeführten faktoriellen Experimenten keine geeigneten Kristallisationsbedingungen gefunden.

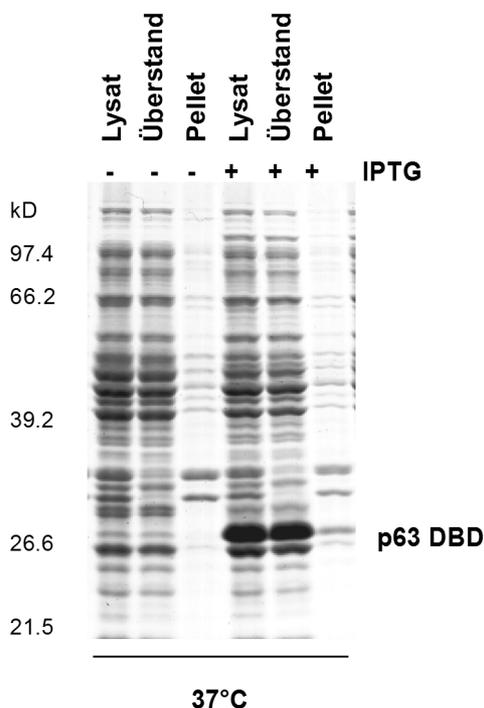


Abb. 5.4.3: Expressionsanalyse der p63 DBD. Die Expression der p53 DBD wurde in jeweils 5 mL einer HB101 Kultur, die mit dem p63 DBD Expressionsplasmid p20020-1 transfiziert war, für 14 h induziert. Die Zellen wurden anschließend geerntet, durch Ultraschallung lysiert und zentrifugiert. Gleiche Volumina von Lysat, Überstand und der unlöslichen Fraktion mit den IBs („Pellet“) wurden auf einer 12.5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Position der MG-Standards ist eingezeichnet.

Tab. 5.4.1: Analyse der hydrodynamischen Parameter durch dynamische Lichtstreuung (DLS). Die p53 und p63 DBDs wurden vor der Messung in 40 mM KP (pH 7.0), 5 mM DTT auf eine Konzentration von 2 mg/mL verdünnt und durch eine 0.02 µm Membran filtriert. Die Messung erfolgte bei 20°C mit einem DynaPro *Molecular Sizing Instrument*. Rh steht für den mittleren hydrodynamischen Radius, Cp für die absolute Polydispersität; Cp/Rh ist die relative Polydispersität und damit ein Maß für den Polydispersitätsindex (pdi) $[(Cp/Rh)^2]$. Aus den Diffusionskoeffizienten kann das ungefähre Molekulargewicht abgeschätzt werden.

	p53 DBD	p63 DBD
Rh	2.74 nm	2.90 nm
Cp	0.6 nm	0.8 nm
Cp/Rh	22.6%	28.5%
pdi	0.06	0.13
Verteilung	monomodal	monomodal
MW	ca. 33.5 kD	ca. 38.4 kD

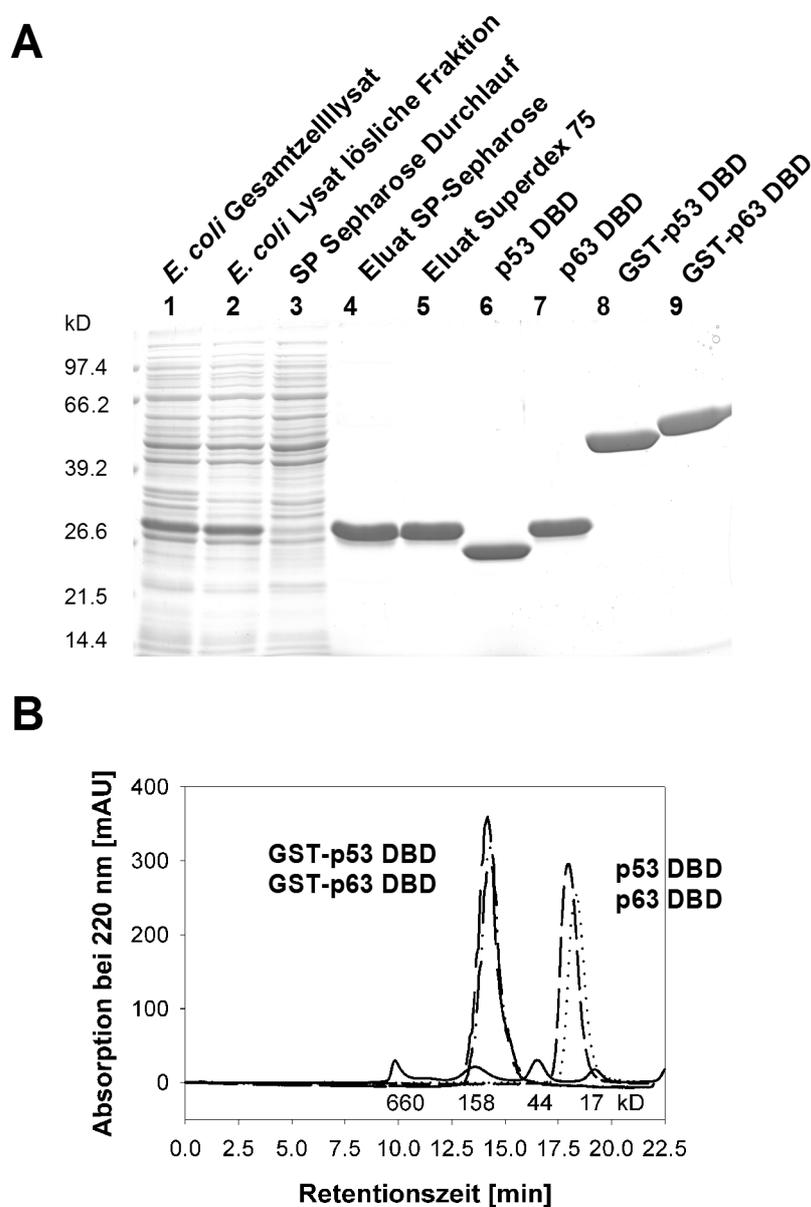


Abb. 5.4.4: Analytik der untersuchten Proteine. A) SDS-PAGE: Reinigung der p63 DBD und der gereinigten p63 und p53 DBD Konstrukte. Spuren 1-5: Analyse der Fraktionen der Reinigung der p63 DBD aus *E. coli*. Spur 6-9: Gereinigte p63 DBD und p53 DBD Präparationen, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Jede Spur wurde mit 10 μ g Protein beladen. Die Proben wurden auf 12.5%-igen Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Die Position der Molekulargewichts-Standards in kD ist eingezeichnet. **B) Oligomerisierungszustand der p63 und p53 DBDs.** Jeweils 50 μ g der gereinigten p53 DBD (·····), p63 DBD (— —), GST-p53 DBD (— ···) und GST-p63 DBD (— — —) wurden durch analytische Gelfiltration in 50 mM KP (pH 7.0), 150 mM KCl, 5 mM DTT mit einer analytischen TSK Gel G 3000SW (TosoHaas) Gelfiltrationssäule bei einem Fluß von 0.5 mL/min auf ihren Assoziationszustand hin untersucht. Die Retentionszeiten der Molekulargewichts-Standards in kD sind eingezeichnet. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001a).

Die Reinigung des GST-p63 DBD Fusionsproteins wurde mit einer Kombination aus Affinitätschromatographie gefolgt von einer abschließenden Gelfiltration durchgeführt. Die Ausbeuten lagen bei ca. 20 mg an >95% homogenem Protein (Abb. 5.4.4A, Spur 9) pro 1 L Schüttelkultur in dimerem Zustand (Abb. 5.4.4B), wie durch analytische Gelfiltration bestätigt wurde. Die p53 DBD und GST-p53 DBD für Vergleichszwecke wurden entsprechend aus der löslichen Fraktion von *E. coli* gereinigt und charakterisiert (siehe Kapitel 5.1). Allerdings erfolgte die Expression von p53 DBD und GST-p53 DBD im Unterschied zu p63 bei 20°C, um eine lösliche Expression zu gewährleisten. In Abb. 5.4.4 ist ein Überblick über die im Rahmen dieser Untersuchungen gereinigten und für die folgenden Versuche verwendeten Proteine gezeigt (Abb. 5.4.4A; Spuren 6-9; Abb. 5.4.4B).

DNA-Bindungsaktivität und Spezifität der p63 DBD

Mehrere Studien anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß tetramere p63 Isoformen mit p53 Consensus-Bindungsstellen interagieren und daß p63 als Transkriptionsfaktor fungieren kann, der die Promotoren verschiedener p53-responsiver Gene in Reporter-Gen-Tests aktiviert (einschließlich *p21*, *bax* und der künstlichen Consensus-Bindungsstelle PG) (Shimada *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1998). Daher wurde die **DNA-Bindungsaktivität** der isolierten p63 DBD gegenüber der p53-responsiven PG Consensus-Bindungsstelle (El-Deiry *et al.*, 1992; Hupp *et al.*, 1992) im Vergleich zur p53 DBD qualitativ durch EMSA analysiert. Die p53 DBD band an eine einzelne 5 bp Consensus-Untereinheit nur mit sehr niedriger Affinität, die im EMSA in Gegenwart unspezifischer Kompetitor-DNA nicht detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Nach Zugabe der vollständigen tetrameren PG Consensus-Bindungsstelle tetramerisierte die p53 DBD und band kooperativ mit hoher Affinität (Abb. 5.4.5A, Spur 1) (Balagurumoorthy *et al.*, 1995; Bargonetti *et al.*, 1993; Nagaich *et al.*, 1997b; Pavletich *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995b). Im Gegensatz dazu war die freie p63 DBD nicht dazu in der Lage, unter identischen Bedingungen an die PG Consensus-Bindungsstelle zu binden. (Abb. 5.4.5A, Spur 2). Eine Coinkubation der p53 DBD mit der p63 DBD interferierte nicht mit der DNA-Bindung der p53 DBD (Daten nicht gezeigt). Um zu testen, ob die p63 DBD prinzipiell in der Lage ist, an p53 Consensus-Bindungsstellen zu binden, wurde die p63 DBD N-terminal mit einer GST-Domäne fusioniert und auf DNA-Bindung getestet. GST wirkt als **artifizielle Dimerisierungsdomäne** (Ji *et al.*, 1992; McTigue *et al.*, 1995a; McTigue *et al.*, 1995b) und führte zu einer Dimerisierung der p63 DBD (Abb. 5.4.4B), die die DNA-Affinität erhöhen sollte. In der Tat war das dimerisierte GST-p63 DBD Fusionsprotein in der Lage an die PG Consensus-Bindungsstelle mit einer Affinität zu binden, die vergleichbar zu der von GST-p53 DBD war (Abb. 5.4.5A, Spuren 3, 4). Dies sprach dafür, daß **Affinität und Spezifität** der p63 und p53 DBDs prinzipiell vergleichbar sind. Um zu bestätigen, daß die p63 DBD im Kontext des GST-Fusionsproteins nicht unterschiedlich gefaltet ist, wurden die Fusionsproteine mit Thrombin verdaut und die DBDs proteolytisch freigesetzt. Wie erwartet, zeigte die aus GST-p53 DBD durch Thrombin freigesetzte p53 DBD DNA-Bindungsaktivität, während Thrombin gespaltenes GST-p63 DBD jegliche DNA-Bindungsaktivität verloren hatte (Abb. 5.4.5A Spuren 5-8). Das Fehlen einer meßbaren DNA-Bindungsaktivität legte die Schlußfolgerung nahe, daß die p63 DBD

nicht in der Lage ist, kooperativ an DNA zu binden. In der Diskussion wird ein schematisches Modell zur Interpretation der Versuchsergebnisse gegeben (Abb. 6.10).

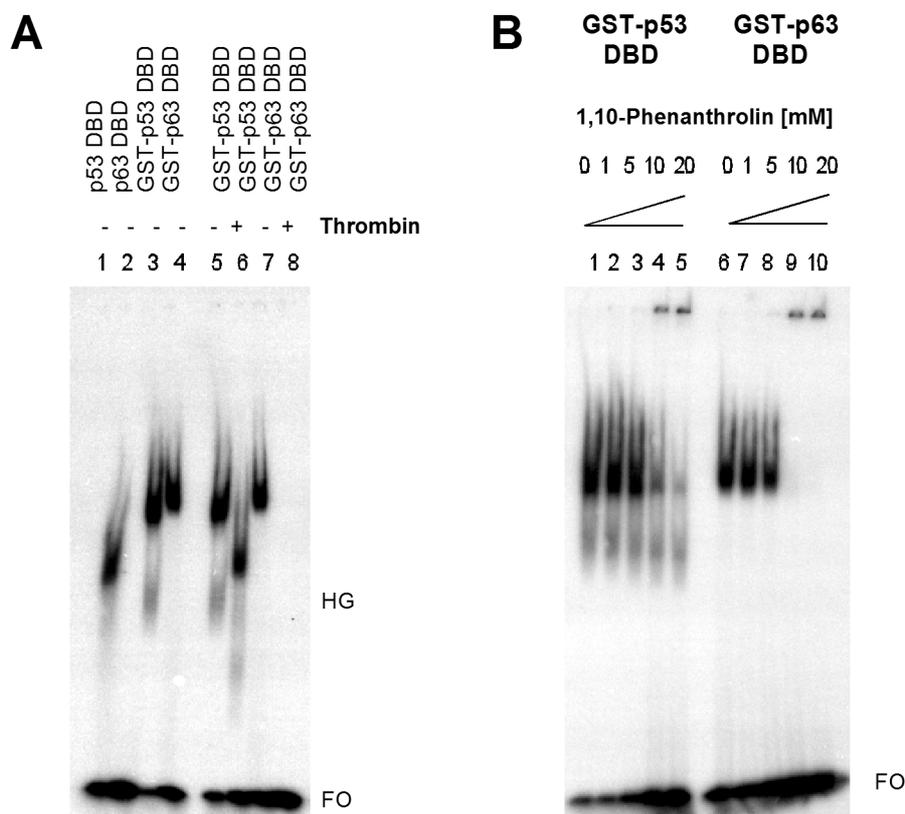


Abb. 5.4.5: A) DNA-Bindungsaktivität der p63 DBD und der p53 DBD Konstrukte. Spuren 1-4: 50 ng p53 DBD (Spur 1), p63 DBD (Spur 2), GST-p53 DBD (Spur 3) und GST-p63 DBD (Spur 4) wurden durch EMSA auf ihre DNA-Bindungsaktivität untersucht. Spuren 5-8: 50 ng GST-p53 DBD (Spuren 5, 6) und GST-p63 DBD (Spuren 7, 8) wurden auf ihre DNA-Bindungsaktivität vor (-) und nach (+) Spaltung mit 1 μ g Thrombin untersucht. HG ist vermutlich eine Hintergrund Bande durch einen kleinen Anteil an monomerem GST-p53 DBD, das im Gleichgewicht mit dimerem Protein ist und nicht durch Gelfiltration detektiert wird. **B) Einfluß von 1,10-Phenanthrolin** auf die DNA-Bindungsaktivität. 50 ng GST-p53 DBD (Spuren 1-5) und GST-p63 DBD (Spuren 6-10) wurden für 10 min mit der angegebenen Konzentration 1,10-Phenanthrolin bei 4°C inkubiert und anschließend durch EMSA bei 4°C analysiert. FO bezeichnet freies Oligonukleotid. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001a).

Studien mit p53 zeigten, daß die **Zn²⁺-Koordination für die DNA-Bindung** des p53 Proteins essentiell ist (Pavletich *et al.*, 1993). Die Kristallstruktur des p53 DBD-DNA-Komplexes zeigt, daß die Faltung der p53 DBD durch ein Zn²⁺-Ion stabilisiert wird, das tetrahedral von drei Cysteinen (Reste 176, 238 und 242) und einem Histidin (Rest 179) koordiniert wird (Abb. 3.1) (Cho *et al.*, 1994). Behandlung von p53 mit Metall-Chelatoren verursacht die Freisetzung von Zn²⁺ und die Oxidation der essentiellen Cystein-Reste. Dies hat eine Auflösung der Tertiärstruktur mit Verlust der DNA-Bindungsaktivität zur Folge. Dadurch werden Epitope, die im gefalteten Protein verborgen sind, exponiert und einer Erkennung durch den monoklonalen Antikörper PAb 240 zugänglich (Gannon *et al.*, 1990; Meplan *et al.*, 2000; Rainwater *et al.*, 1995), der spezifisch für eine mutante Konformationen der p53 DBD ist (Gannon *et al.*, 1990; Stephen und Lane, 1992). Die Primärstruktur von p63 legt nahe, daß diese Metall-abhängige Struktur auch in der homologen p63 DBD konserviert ist,

da alle Reste, die mutmaßlich Zn^{2+} koordinieren, konserviert sind (Abb. 5.4.2) (Arrowsmith, 1999; Cho *et al.*, 1994; Schmale und Bamberger, 1997; Yang *et al.*, 1998). Daher wurde der Effekt von Metall-Chelatoren auf die DNA-Bindungsaktivität untersucht. Abb. 5.4.5B zeigt, daß die Inkubation mit 1,10-Phenanthrolin die DNA-Bindungsaktivität der GST-p53 DBD und der GST-p63 DBD (Spuren 1-10) deutlich reduzierte. Überraschenderweise schien Zn^{2+} mit höherer Affinität von GST-p53 DBD gebunden zu werden, da Konzentrationen von >20 mM Phenanthrolin notwendig waren, um die DNA-Bindung vollständig aufzuheben, während das stabilere GST-p63 DBD seine DNA-Bindungsaktivität schon bei niedrigeren Konzentrationen verlor. Da der Effekt der Zn^{2+} -Chelatierung mit der Inkubationszeit und Temperatur variierte, wurde darauf verzichtet, den Einfluß von 1,10-Phenanthrolin auf die DNA-Bindung quantitativ zu bestimmen. Die für die Zn^{2+} -Koordination zuständigen Reste sind für die Struktur und Funktion der p63 DBD absolut essentiell. So ließ sich nach der Mutation des Rests H208R kein funktionelles Protein exprimieren (Daten nicht gezeigt).

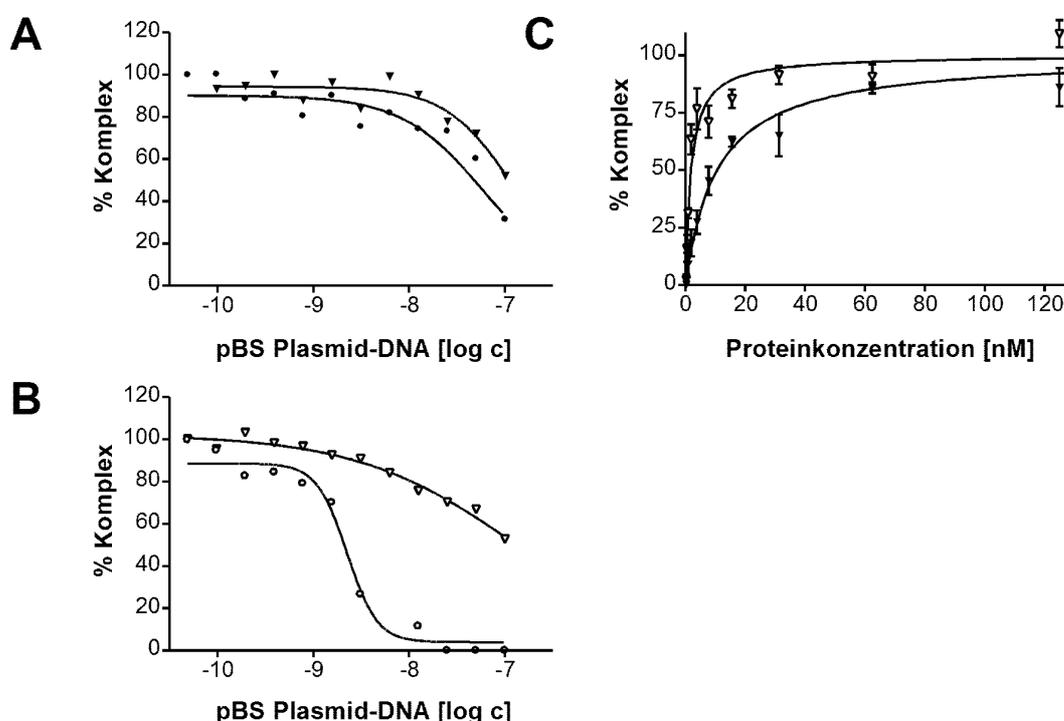


Abb. 5.4.6: Einfluß von unspezifischer DNA auf die DNA-Bindungsaktivität. Affinität von **A**) 62.5 nM GST-p53 DBD und p53 DBD oder **B**) 62.5 nM GST-p63 DBD und p63 DBD für 1 nM spezifische TAMRA-markierte PG Consensus-Oligonukleotide. Die Bindung wurde mit den gezeigten Konzentrationen von unspezifischer pBS DNA kompetiert. **C**) **Quantitative Analyse der DNA-Bindungsaktivität.** Exemplarische Kurve für die Bindung von GST-p63 DBD und GST-p53 DBD an 1 nM TAMRA-markiertes *p21* Oligonukleotid. Die DNA-Bindung wurde mit FCS quantitativ analysiert. Die Kurven wurden normalisiert und wie folgt bezeichnet: p63 DBD (○), p53 DBD (●), GST-p63 DBD (Δ), GST-p53 DBD (▲). Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001a).

Für eine **quantitative Analyse der DNA-Bindungsaktivität und Spezifität** der p63 DBD wurden durch FCS die apparenten Bindungskonstanten der p63 und p53 DBDs für verschiedene Fluoreszenz-markierte p53 Consensus-DNA-Oligonukleotide bestimmt. In Vorversuchen wurde der Einfluß von unmarkierter, nicht spezifischer *supercoiled* pBS Kompetitor-DNA auf die DNA-Bindung der p63 und p53 DBDs an

ein spezifisches TAMRA-markiertes PG Oligonukleotid bestimmt (Abb. 5.4.6). Während die Bindung der p53 DBD und GST-p53 DBD (Abb. 5.4.6A) sowie der GST-p63 DBD (Abb. 5.4.6B) an PG spezifisch war und über einen breiten Konzentrationsbereich kaum beeinflusst wurde, war die DNA-Bindung der p63 DBD (Abb. 5.4.6B) unspezifisch und konnte schon bei Konzentrationen von 5 nM pBS DNA kompetiert werden. Diese Konzentration an unspezifischer pBS DNA entsprach der im EMSA benutzten Konzentration (Abb. 5.4.5A); FCS und EMSA zeigten somit übereinstimmend, daß die p63 DBD nicht spezifisch an DNA bindet.

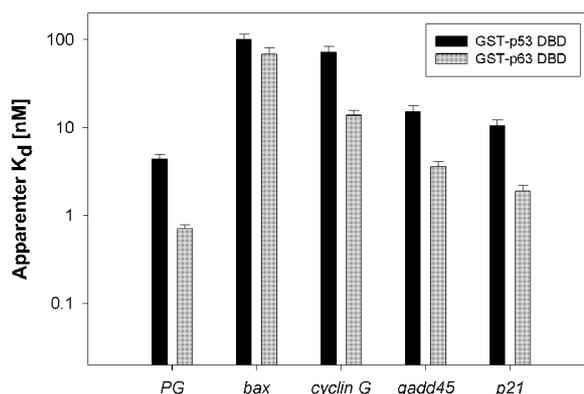


Abb. 5.4.7: Apparente Bindungskonstanten der Bindung von GST-p63 DBD und GST-p53 DBD an TAMRA-markierte p53 Consensus-DNA-Oligonucleotide. Siehe Tab. 5.4.2 für Details.

Tab. 5.4.2: Apparente Bindungskonstanten der Bindung von GST-p63 DBD und GST-p53 DBD an TAMRA-markierte p53 Consensus-DNA-Oligonucleotide. Die quantitative Analyse der DNA-Bindung erfolgte analog Abb. 5.4.6C. Die Bindungskurven wurden durch nicht-lineare Regression ausgewertet. Der Standardfehler der Bestimmungen ist angegeben.

p53 Consensus-DNA-Oligonucleotide	K_D (GST-p53 DBD)	K_D (GST-p63 DBD)
	nM	nM
PG	4.4 ± 0.5	0.7 ± 0.08
p21	10.6 ± 1.6	1.9 ± 0.3
gadd45	15.2 ± 2.3	3.6 ± 0.5
cyclin G	72.2 ± 11.4	13.8 ± 2.0
bax	99.7 ± 15.0	68.7 ± 11.9

In den folgenden Experimenten wurde die **spezifische Bindungsaktivität** der GST-DBDs an 1 nM TAMRA-markierte p53 Consensus-Oligonucleotide daher in Gegenwart von 10 nM pBS bestimmt. Um einen vergleichenden Überblick über die DNA-Spezifität der GST-DBDs zu erlangen, wurde die Affinität für verschiedene natürlich vorkommende p53 Consensus-Oligonucleotide bestimmt. Eine exemplarische Bindungskurve der Bindung von GST-p53 und GST-p63 DBDs an ein TAMRA-markiertes p21 Oligonucleotide ist in Abb. 5.4.6C gezeigt. Die apparenten K_D -Werte für die Bindung an die verschiedenen Oligonucleotide sind in Tab. 5.4.2 gegeben; in Abb. 5.4.7 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die dimeren GST-p63 und p53 DBDs wiesen Affinitäten in einer vergleichbaren Größenordnung und ein **beinahe identisches Spezifitätsprofil** auf. Mit Ausnahme des *bax*

Oligonukleotids, zeigte GST-p63 DBD eine Affinität für p53 Consensus-Oligonukleotide, die ca. 3-5-fach höher als die von GST-p53 DBD war, so daß die relativen Affinitäten in bezug auf die betrachteten Consensus-Bindungsstellen vergleichbar waren. Beide GST-DBDs zeigten die höchste Affinität für die künstliche PG Sequenz, gefolgt von den *p21*, *gadd45* und der *cyclin G* Consensus-Bindungsstelle. Die Affinität für die *bax* Consensus-Bindungsstelle war bei beiden DBDs am niedrigsten.

Spektroskopie der p63 DBD

Zum Vergleich der p63 und p53 DBDs wurden die beiden Domänen durch CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie charakterisiert. CD-Spektren der nativen und denaturierten p63 DBD im Vergleich zur p53 DBD sind in Abb. 5.4.8 gezeigt. Das Fern-UV CD-Spektrum (Abb. 5.4.8A) der p63 DBD wies auf einen hohen Anteil an β -Faltblatt Sekundärstruktur hin, die nach Inkubation mit 6 M Harnstoff verloren ging. Die p53 DBD wies, wie schon in Kapitel 5.1 gezeigt, ein eher untypisches Spektrum auf. Eine auf den CD-Spektren basierte Abschätzung der Sekundärstruktur mit dem auf einem neuronalen Netzwerk beruhenden Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992) ergab für beide DBDs vergleichbare Werte: α -helikaler Anteil: p53 8.1%, p63 9.3%; β -Faltblatt Anteil: p53 46.4%, p63 45.7%. Im Rahmen der Genauigkeit von CD-basierten Sekundärstrukturvorhersagen (Greenfield, 1996) deuten diese Werte auf eine ähnliche Faltung der DBDs hin und stimmen mit den aus Kristallstruktur der p53 DBD (Cho *et al.*, 1994) und dem Homologie-Modell der p63 DBD (siehe Diskussion) berechneten Sekundärstrukturanteilen überein (Tab. 5.4.3). Da die tatsächliche dreidimensionale Struktur und Dynamik der p63 DBD unbekannt ist, können die Unterschiede in den Fern-UV CD-Spektren der strukturell homologen p63 und p53 DBDs nicht eindeutig erklärt werden. Unterschiede in der Aminosäuresequenz und in der Aminosäure-Zusammensetzung können zu den beobachteten Unterschieden beitragen. Da der α -helikale Anteil der p63 und p53 DBDs klein ist, können sowohl kleine Unterschiede im Verhältnis und in der Stabilität der β -Faltblatt und *coil* Segmente als auch kleine Unterschiede in den helikalen Anteilen der Domänen für die Unterschiede ursächlich sein. Auf der einen Seite könnte die größere Signalintensität im Spektrum der p63 DBD die höhere Thermostabilität der p63 DBD im Vergleich zur p53 DBD widerspiegeln (siehe unten). Eine erhöhte konformationelle Stabilität der Sekundärstrukturelemente der p63 DBD über die Zeit könnte ein wichtiger Grund für die erhöhte Signalintensität sein. Auf der anderen Seite könnte die höhere Signalintensität trotz der generell angenommenen homologen Faltung der Domänen auch für kleinere Unterschiede in der Struktur sprechen (siehe Modell in der Diskussion). Die Nah-UV CD-Spektren der DBDs sind in Abb. 5.4.8B gezeigt. Sie zeigten, daß beide Domänen eine stabile Tertiärstruktur aufweisen. Im Unterschied zu p53 wies die p63 DBD eine Bande im positiven Bereich auf.

Das charakteristische Fluoreszenz-Spektrum der nativen und denaturierten p63 DBD im Vergleich zum Spektrum der p53 DBD (siehe Kapitel 5.1) ist in Abb. 5.4.8C zu sehen. Nach Anregung bei 280 nm wurde das Spektrum der p53 DBD vom Beitrag von sieben Tyrosin-Resten bei 304 nm dominiert, wogegen der einzelne Tryptophan-Rest im nativen Zustand ausgelöscht wurde und nur eine geringe Fluoreszenz zeigte; nach Denaturierung durch Harnstoff war die Auslöschung der Tryptophan-Fluoreszenz aufgehoben und der Tryptophan-Rest zeigte eine intensive Fluoreszenz bei 354 nm (Bullock *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu wurde das Fluoreszenz-

Spektrum der p63 DBD von dem einzelnen, nicht konservierten Tryptophan-Rest in der DBD dominiert. Nach Denaturierung verschob sich das Emissionsmaximum von 342 nm auf 354 nm („Rotverschiebung“). Abb. 5.4.8D zeigt zudem die entsprechenden UV-Spektren.

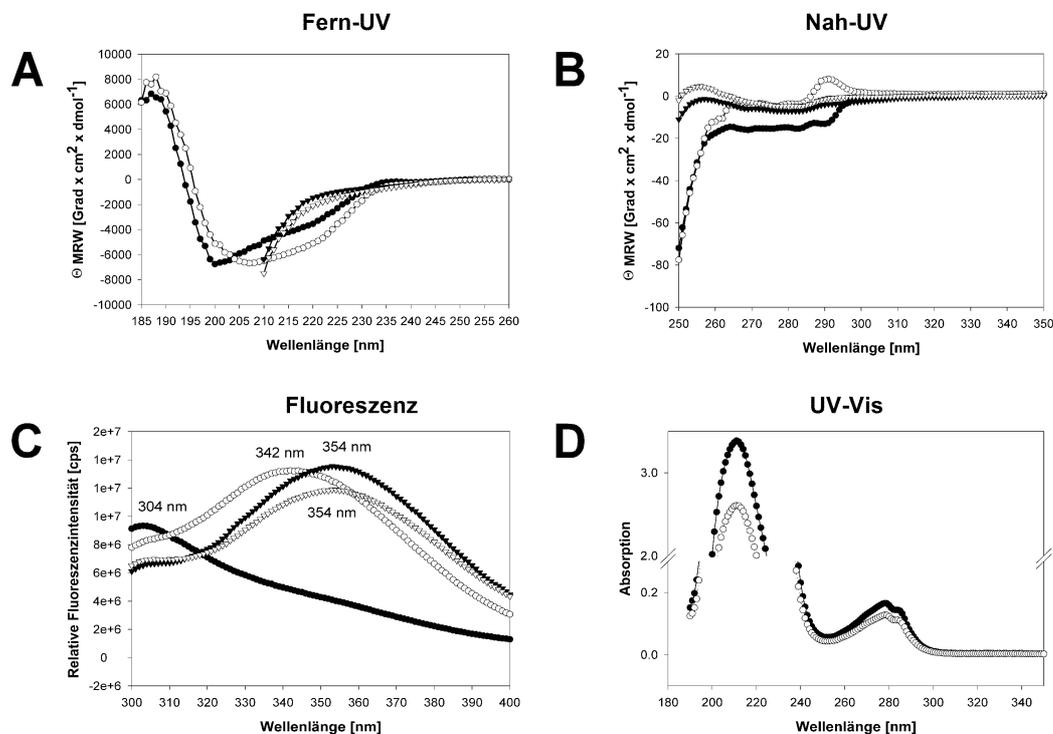


Abb. 5.4.8: Spektroskopische Charakterisierung der p63 und p53 DBDs. **A) Fern-UV CD-Spektren** des nativen und denaturierten Zustands wurden bei 15°C mit 8 μM Lösungen der p63 und p53 DBD in 40 mM KP (pH 7.0) (\pm 6 M Harnstoff) aufgenommen. **B) Nah-UV CD-Spektren** des nativen und denaturierten Zustands wurden bei 15°C mit 80 μM Lösungen der p63 und p53 DBD in 40 mM KP (pH 7.0), 1 mM DTT (\pm 6 M Harnstoff) aufgenommen. **C) Fluoreszenz-Spektren** des nativen und denaturierten Zustands wurden bei 15°C mit 1 μM Lösungen der p63 und p53 DBD in 40 mM KP (pH 7.0), 5 mM DTT (\pm 6 M Harnstoff) mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm für Emissionswellenlängen zwischen 300 und 400 nm gemessen. **D) UV-Spektren** der p63 und p53 DBD wurden bei 20°C mit 40 μM Lösungen der p63 und p53 DBD in 40 mM KP (pH 7.0) aufgenommen. Die Kurven sind wie folgt bezeichnet: Nativer Zustand: p63 DBD (○), p53 DBD (●); denaturierter Zustand: p63 DBD (Δ), p53 DBD (▲). Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001a).

Tab. 5.4.3: Vergleich der Sekundärstrukturanteile (%) der p53 DBD und p63 DBD. Abgeleitet aus den Fern-UV CD-Spektren mit dem Dekonvolutions-Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992) im Vergleich zur Zusammensetzung abgeleitet aus der Kristallstruktur der p53 DBD (PDB-Code: 1TSR, Kette B) (Cho *et al.*, 1994).

[%]	α -Helix	β -Faltblatt	turn	coil
p53 DBD				
Kristallstruktur	8.7	34.2	14.6	42.5
p53 DBD				
CD Vorhersage	8.1	46.4	19.9	25.6
p63 DBD				
CD Vorhersage	9.3	45.7	19.6	25.4

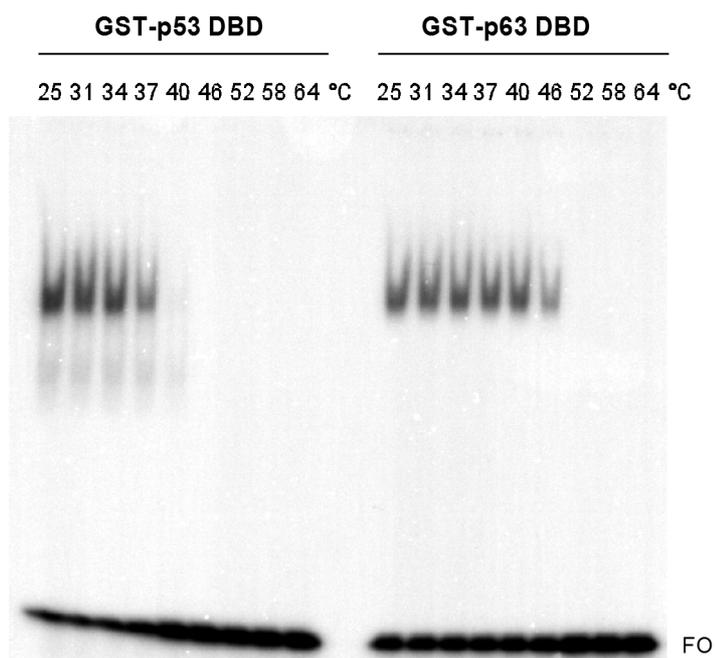
Erhöhte thermodynamische Stabilität der p63 DBD - Thermostabilität

Abb. 5.4.9: Effekt der Temperatur auf die DNA-Bindungsaktivität der GST-p53 DBD und GST-p63 DBD. 50 ng der humanen GST-p53 DBD und GST-p63 DBD wurden für 5 min bei der angegebenen Temperatur inkubiert, auf Eis überführt und darauf folgend in einem EMSA bei 4°C auf ihre DNA-Bindungsaktivität getestet. FO steht für freies Oligonukleotid. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001a).

Die p63 DBD konnte bei 37°C in löslicher Form exprimiert werden, wogegen die p53 DBD bei dieser Temperatur fast ausschließlich in IBs anfiel und zudem stark temperatur-empfindlich war (Bullock *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1996a). Zudem zeigte die p63 DBD auch bei erhöhten Temperaturen (>25°C für mehrere Tage) fast gar keine Tendenz zur Aggregatbildung und Präzipitation wie durch SDS-PAGE, analytische Gelfiltration (Daten nicht gezeigt) und NMR (siehe unten) gezeigt wurde. Diese Beobachtungen unterstützten die Annahme, daß die p63 DBD eine erhöhte **Thermostabilität** zeigt.

Um die Hypothese der erhöhten Thermostabilität zu prüfen, wurde der Effekt der Temperatur auf die **DNA-Bindungsaktivität** der GST-p63 und GST-53 DBDs nach 5 min Inkubation bei 30, 34, 37, 40, 45, 50, 55, 60 und 70°C untersucht. Anschließend wurden die Proben auf Eis überführt und bei 4°C in einem EMSA analysiert. Abb. 5.4.9 zeigt, daß die DNA-Bindungsaktivität der GST-p53 DBD nach Inkubation bei 37°C reduziert und nach Inkubation bei 40°C nicht mehr nachweisbar war. Im Gegensatz dazu verlor die GST-p63 DBD ihre DNA-Bindungsaktivität erst nach Inkubation bei 52°C für 5 min.

Die Thermostabilität der p63 und p53 DBDs gegenüber Hitzedenaturierung wurde durch kalorimetrische **DSC-Experimente** bestätigt. Wie für die p53 DBD (Bullock *et al.*, 1997) war die Hitzedenaturierung der p63 DBD irreversibel und trat im Verlauf eines einzigen DSC-Laufs auf. Daher wurde auf eine quantitative thermodynamische Auswertung der Daten und auf eine Bestimmung der ΔH_{cal} - und $\Delta G(T)$ -Werte verzichtet. Die bestimmten Schmelzpunkte (T_m) können jedoch als semi-quantitatives Maß für die Thermostabilität der DBDs herangezogen werden.

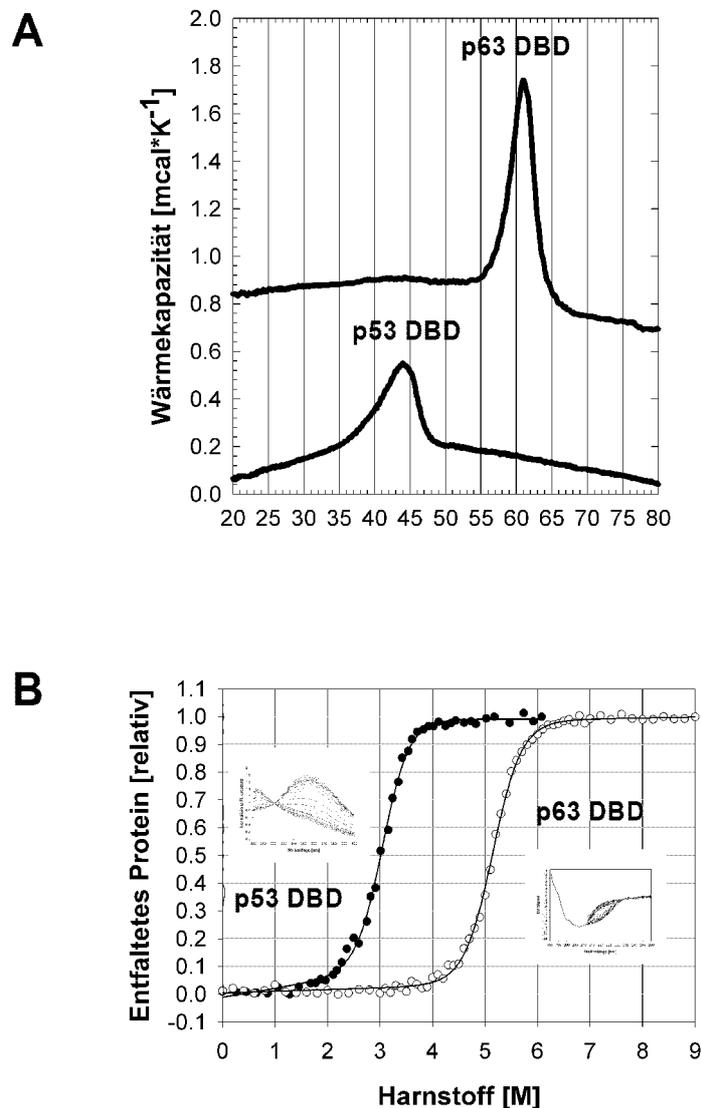


Abb. 5.4.10: (Thermo-) Stabilität der p63 DBD im Vergleich zur p53 DBD. A) Irreversible thermische Denaturierung der p63 und p53 DBDs durch DSC. Der apparente Schmelzpunkt T_m beträgt $61.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (obere Kurve) für die p63 DBD und $44.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (untere Kurve) für die p53 DBD. Die exemplarischen Thermogramme wurden für $40 \mu\text{M}$ Lösungen der DBDs in 40 mM KP (pH 7.0), 150 mM KCl, 1 mM DTT bestimmt. Die Puffer-Basislinie wurde von den Meßwerten abgezogen, der Achsenabschnitt ist verschoben.

B) Reversible Harnstoff-Gleichgewichtsentfaltung der p63 und der p53 DBDs. Entfaltungsübergänge werden als Anteil von entfaltetem Protein in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration dargestellt. Die Übergänge wurden bei 15°C in 40 mM KP (pH 7.0), 1 mM DTT durch CD-Spektroskopie für die p63 DBD (O) und durch Fluoreszenz-Spektroskopie für die p53 DBD (●) verfolgt. Die Kurvenschar der jeweiligen Entfaltung ist jeweils neben der Kurve gezeigt. Die experimentellen Daten wurden entsprechend einem Zwei-Zustandsmodell durch nicht-lineare Kurvenanpassung ausgewertet (Clarke und Fersht, 1993). Die Linien entsprechen dem berechneten Fit. Die Proteinkonzentration betrug $8 \mu\text{M}$ für die p63 DBD und $4 \mu\text{M}$ für die p53 DBD. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001a).

Die thermische Entfaltung konnte für beide DBDs gemessen werden und war in hohem Maße reproduzierbar. Die p63 DBD zeigte eine signifikant erhöhte Thermostabilität mit einem apparenten Schmelzpunkt von $61.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ gegenüber einem Schmelzpunkt von $44.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ für die p53 DBD (Abb. 5.4.10A). Die DNA-Bindungsaktivitäten der GST-p63 und GST-p53 DBDs waren daher also bei Temperaturen nicht mehr nachweisbar, bei denen die DBDs noch keine Anzeichen einer thermischen Denaturierung zeigten. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, daß dies nicht auf den GST-Anteil des Fusionsproteins zurückzuführen ist, da das isolierte GST-Protein erst bei einem Schmelzpunkt von 57.3°C entfaltete und seine Enzymaktivität vollständig nach Inkubation bei 58°C für 5 min verlor, während GST-p63 DBD seine DNA-Bindungsaktivität schon nach Inkubation bei 52°C verlor (Daten nicht gezeigt).

Die Beobachtung einer erhöhten thermodynamischen Stabilität der p63 DBD wurde schließlich durch **Harnstoff-induzierte Gleichgewichtsentfaltung** bestätigt. Die Entfaltung der p63 DBD wurde bei 15°C basierend auf der Zunahme des CD-Signals bei 222 nm während der Entfaltung verfolgt (Abb. 5.4.8A, Abb. 5.4.10B). Wie für die p53 DBD (Bullock *et al.*, 1997) waren die Übergänge der p63 DBD unter den gewählten Bedingungen bei dieser Temperatur reversibel. Daher konnten die Daten entsprechend einem **Zwei-Zustands-Übergangsmodell** durch nicht-lineare Kurvenanpassung beruhend auf der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ausgewertet werden (Clarke und Fersht, 1993; Tang *et al.*, 1999). Da die Fluoreszenz-Spektren der p53 DBD für eine quantitative Auswertung besser geeignet waren als die CD-Spektren, wurde die Gleichgewichtsentfaltung der p53 DBD aus vergleichenden Gründen basierend auf der Zunahme des normalisierten Fluoreszenz-Signals bei Entfaltung bei 356 nm ausgewertet (Abb. 5.4.8C, Abb. 5.4.10B). Die Übergänge wurden unter den angegebenen Bedingungen bei 15°C durchgeführt und waren unabhängig von der verwendeten Proteinkonzentration (4-8 μM). Trotz der geringeren Qualität der CD-Entfaltungsdaten, ergaben diese Übergänge vergleichbare Resultate zu den Übergängen, die durch Fluoreszenz-Spektroskopie verfolgt wurden (insbesondere bei Messung bei 218 nm anstatt von 222 nm). Tabelle 5.4.4 faßt die experimentell bestimmten thermodynamischen Parameter der Gleichgewichtsentfaltung der p63 und p53 DBDs zusammen.

Tab. 5.4.4: Thermodynamische Parameter für die Harnstoff-induzierte Gleichgewichtsentfaltung der p53 und p63 DBDs. Die Entfaltung wurde bei 15°C in 40 mM KP (pH 7.0), 1 mM DTT mit CD- (8 μM , p63 DBD) bzw. Fluoreszenz-Spektroskopie (4 μM , p53 DBD) verfolgt. Die experimentellen Daten wurden durch nicht-lineare Regression entsprechend einem Zwei-Zustands-Modell angepaßt (Clarke und Fersht, 1993). Die Standardfehler der thermodynamischen Parameter sind angegeben.

Thermodynamische Parameter	p53 DBD	p63 DBD
$[\text{Urea}]_{50\%}$, M	3.06 ± 0.02	5.15 ± 0.01
m, $\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}$	-2.277 ± 0.110	-2.098 ± 0.068
$\Delta G(\text{H}_2\text{O})$, kcal mol^{-1}	6.97 ± 0.29	10.80 ± 0.33
$\Delta\Delta G([\text{Urea}]_{50\%})$, kcal mol^{-1}	-	-4.57 ± 0.21

Die p63 DBD wird von einem im Vergleich zur p53 DBD bemerkenswerten $[\text{Urea}]_{50\%}$ von 5.15 ± 0.01 M charakterisiert, wogegen die weniger stabile p53 DBD ein $[\text{Urea}]_{50\%}$ von 3.06 ± 0.02 M aufweist. Im Vergleich zur p53 DBD ist die p63

DBD daher um die (berechnete) Stabilisierungsenthalpie $\Delta\Delta G([\text{Urea}]_{50\%})$ von $-4.57 \pm 0.21 \text{ kcal mol}^{-1}$ stabiler. Der $[\text{Urea}]_{50\%}$ -Wert und die Steigung des Übergangs vom nativen zum denaturierten Zustand (m-Wert) der Gleichgewichtsentfaltung der p53 DBD bei 15°C liegt im Bereich der unter vergleichbaren, aber nicht identischen Bedingungen in der Literatur bestimmten Werte für die p53 DBD ($[\text{Urea}]_{50\%}$: 3.33-2.66 M bei 10°C-25°C, m-Wert: 2.40-3.25 $\text{kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ bei 10°C) (Bullock *et al.*, 1997; Bullock *et al.*, 2000; Nikolova *et al.*, 1998; Nikolova *et al.*, 2000).

Sequenz-basierter Vergleich der p63 und p53 DBDs

Um Einblick in den molekularen Mechanismus der Thermostabilität der p63 DBD und in mögliche Unterschiede der p53 und p63 DBDs zu gewinnen, die die Dimerisierungseigenschaften betreffen, erfolgte ein **Sequenz-basierter statistischer Vergleich** der p63 und p53 DBDs. In Tab. 5.4.5 ist der statistische Vergleich der p63 und p53 DBDs gezeigt. Die meisten Parameter sind für beide DBDs vergleichbar, allerdings zeigt die p63 DBD sowohl eine höhere Hydropathizität (*GRAVY*) (Kyte und Doolittle, 1982) und einen höheren aliphatischen Index (Ikai, 1980) als auch einen niedrigeren Instabilitätsindex (Guruprasad *et al.*, 1990), was ein Zeichen für eine höhere Thermostabilität sein kann. Gemäß dem hohen Grad an Identität und Homologie von ca. 60% der p63 DBD mit der p53 DBD ist das Struktur-basierte Sequenz-Alignment (Abb. 5.4.2) eindeutig und erlaubt die Annahme, daß die generelle Faltung der homologen p63 DBD vergleichbar zur bekannten Faltung der p53 DBD (Cho *et al.*, 1994) ist.

Tab. 5.4.5: Statistischer Sequenz-basierter Vergleich der humanen p53 und p63 DBDs mit dem Programm ProtParam (Appel *et al.*, 1994).

Sequenz-basierter Vergleich	p53 DBD	p63 DBD
Saure Reste (Asp + Glu)	21 (8+13)	23 (10+13)
Basische Reste (Arg + Lys)	27 (19+8)	26 (15+11)
Berechneter pI	8.83	8.42
Unpolare Reste	90	102
Aliphahtischer Index	62.69	67.34
Hydropathizität (GRAVY)	-0.638	-0.497
Instabilitätsindex	72.2	47.8

Unter den wichtigen Resten, die Zn^{2+} koordinieren, die DNA-Bindung und Faltung der Domäne aufrechterhalten, und von denen daher häufig Mutationen in p53 beschrieben werden, sind bis auf eine Ausnahme alle Reste identisch. Einzige Ausnahme ist R283 (p53), das im p53 im direkten Kontakt mit der DNA steht, aber im p63 durch K314 (p63) ersetzt worden ist. In der Umgebung dieser essentiellen Reste können vier nicht homologe Substitutionen zwischen p63 und p53 gefunden werden. 1.) Q165 (p53) wird K194 (p63). In der Struktur ist Q165 Solvens-exponiert, die Ladung des Lysins wird vermutlich von einem Glutamat kompensiert, das sich zwei Aminosäure-Reste weiter befindet. 2.) Q192 (p53) wird S223 (p63) und ist vermutlich ebenfalls Solvens-exponiert. 3.) T284 (p53) wird A315 (p63), das in der Nähe der großen DNA-Furche liegt und eventuell eine Rolle in der Erkennung der Consensus-DNA-Sequenz spielen könnte. 4.) Der größte und auffallendste Unterschied im Sequenz-Alignment der beiden DBDs betrifft den Austausch von S183 (p53) gegen R212 (p63). Dieser Rest ist Teil einer Region von 10 Aminosäure-

Resten (LSREFNEGQI), die direkt auf die H1 Helix folgt. Dieser Abschnitt von Aminosäure-Resten ist nicht strikt konserviert und weist eine Insertion von zwei Aminosäuren auf. Wie in Kapitel 5.3 gezeigt wurde, ist die **H1 Helix** für die Dimerisierung der p53 DBD bei der DNA-Bindung verantwortlich und beinhaltet H179, das Zn^{2+} koordiniert. Bei der Dimerisierung spielen vermutlich die konservierten, aber Solvens-exponierten Reste H178, R181 und C182 eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 5.3). Wie im Sequenz-Alignment der H1 Helix-Regionen von p53 und seinen Homologen gezeigt ist (Abb. 5.2.9), sind die drei Reste H178, R181, C182, in der p63 DBD nicht konserviert, sondern durch N207, L210 und S211 substituiert und daher möglicherweise für die unterschiedliche Kooperativität der DNA-Bindung ursächlich. Basierend auf dem Sequenz-Alignment und der Kristallstruktur der p53 DBD im Komplex mit DNA (Cho *et al.*, 1994) wurde freundlicherweise von Dr. G. Georges (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) ein Homologie-Modell der p63 DBD erstellt, dessen Implikationen in der Diskussion näher besprochen werden.

NMR-spektroskopische Untersuchungen der p63 DBD

Wie oben beschrieben zeichnet sich die p63 DBD durch eine hohe Thermostabilität aus und zeigt auch bei erhöhten Temperaturen (z.B. 25°C für mehrere Tage) fast gar keine Tendenz zur Aggregatbildung und Präzipitation. Kristallisationsexperimente mit der p63 DBD waren mit Proteinkonzentrationen von 10-50 mg/mL negativ. Daher lag es nahe, daß die p63 DBD ein geeignetes System zur Untersuchung der p53 Familienmitglieder durch NMR-Spektroskopie darstellen könnte. Die im folgenden gezeigten NMR-spektroskopischen Messungen wurden in Kooperation mit Dr. A. Kühlewein, Dr. J. Furrer, Dr. G. Gemmecker und Prof. Dr. H. Kessler (Institut für Organische Chemie und Biochemie II, Technische Universität München) durchgeführt.

Für erste NMR-Experimente wurde eine einfach [$U-^{15}N$]-markierte p63 DBD löslich bei 37°C in M9-Minimalmedium exprimiert und entsprechend dem für die unmarkierte p63 DBD etablierten Protokoll aufgereinigt. Nachdem sich zeigte, daß die Isotopen-markierte, löslich exprimierte [$U-^{15}N$]-p63 DBD sehr gut für NMR-spektroskopische Untersuchungen geeignet war und die Probe im NMR-Gerät unter Meßbedingungen bei 25°C für mehrere Wochen stabil blieb, wurde in Bioexpress 1000 Medium (CIL) unter Zusatz von 80% (v/v) D_2O dreifach [$U-^2D,^{13}C,^{15}N$]-markierte p63 DBD exprimiert. Zuvor wurde der Expressionsstamm BL21 in mehreren Vorkulturen mit steigenden D_2O Konzentrationen langsam an das Wachstum in D_2O adaptiert (Arrowsmith und Wu, 1998; Goto und Kay, 2000). Abb. 5.4.11 zeigt das Übersichtsgel der Expression und der Reinigung der [$U-^2D,^{13}C,^{15}N$]-markierten p63 DBD. Zwar war die absolute Bakterienfeuchtmasse bei Expression in Bioexpress 1000 Medium unter Zusatz von 80% (v/v) D_2O der Anzucht in anderen Medien vergleichbar, jedoch war die relative Expression an löslichem [$U-^2D,^{13}C,^{15}N$]-p63 DBD bezogen auf das Gesamtprotein vermindert. Trotzdem war die Ausbeuten für die dreifach-markierte p63 DBD mit >30 mg/L für alle NMR-Experimente ausreichend. Tab. 5.4.6 zeigt eine Zusammenfassung der Ausbeuten der Reinigung der Isotopen-markierten DBDs im Vergleich zur unmarkierten p63 DBD und gibt außerdem eine Übersicht über die Ergebnisse der ESI-MS-Analytik der drei p63 DBD-Präparationen. Alle Präparationen waren <98% rein. Die unmarkierte und die [$U-^{15}N$]-p63 DBD wiesen eine enge Massenverteilung und (im Rahmen der

Meßgenauigkeit) das erwartete Molekulargewicht auf. Dagegen wies die [U-²D,¹³C,¹⁵N]-p53 DBD aufgrund der maximal zu erzielenden 80%-igen Deuterierung wie erwartet ein zu geringes Molekulargewicht sowie (aufgrund von Unterschieden im Markierungsgrad der Population) eine breite Massenverteilung auf. Aus dieser Molekulargewichtsverteilung errechnete sich ein durchschnittlicher Markierungsgrad von 98% für die ¹³C-Markierung und von mindestens 75% für die Deuterierung.

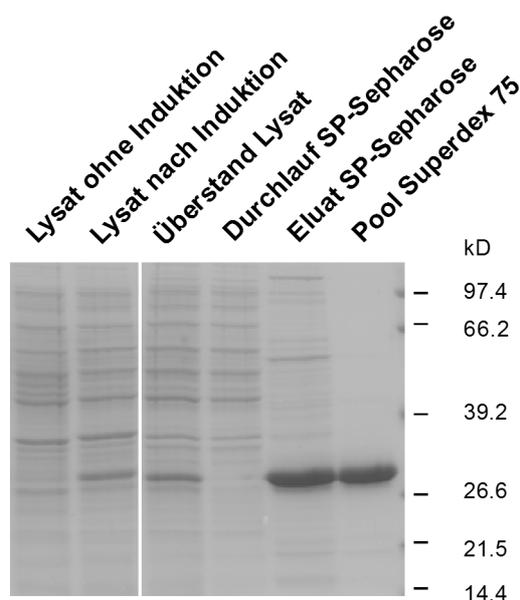


Abb. 5.4.11: Isotopenmarkierung der p63 DBD. SDS-PAGE der Fraktionen der Expression und Reinigung der [U-²D,¹³C,¹⁵N]-markierten p63 DBD. Jeweils 10 µg der Fraktionen wurden auf einer 12.5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Die Position der MG-Standards ist eingezeichnet.

Tab. 5.4.6: Übersicht über die Ausbeuten der Expression und Reinigung der [U-¹⁵N]- und [U-²D,¹³C,¹⁵N]-markierten p53 DBDs in *E. coli* im Vergleich zur unmarkierten p53 DBD. Übersicht über die Ergebnisse der ESI-MS-Analytik.

Fraktion	p63 DBD*	[U- ¹⁵ N]-p63 DBD*	[U- ² D, ¹³ C, ¹⁵ N]-p63 DBD
Kulturvolumen	10 L Schüttelkolben	2 L Schüttelkolben	1 L Schüttelkolben
Medium	LB-Medium	M9-Minimalmedium	Bioexpress 1000
<i>E. coli</i> – Stamm	HB101	BL21	BL21
Naßgewicht Bakterien	22 g	6 g	4 g
Lysat vor SP-Sepharose			
Gesamtprotein	1000 mg	400 mg	290 mg
Pool nach SP-Sepharose			
Gesamtprotein	340 mg	100 mg	50 mg
Pool nach Superdex 75			
Gesamtprotein (Ausbeute)	250 mg (25%)	60 mg (15%)	33 mg (11%)
Konzentration	400 µM	360 µM	1.07 mM
ESI-MS Analytil			
Theoretische Masse	25832 kD	26155 kD	29052 kD
Gemessene Masse	25831 kD	26150 kD	28275 kD

Das ^1H -Protonen-Spektrum der $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -markierten p63 DBD sowie das zugehörige gefilterte $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum waren typisch für eine gefaltete Proteindomäne mit einem hohen β -Faltblatt-Anteil und zeigten beide diskrete und klar unterscheidbare Signale (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich mit dem $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum der p53 DBD zeigt, daß die beiden homologen Spektren vergleichbar sind (Abb. 5.4.12). Da die chemische Umgebung der meisten Reste bei einer Identität von ca. 60% allerdings verändert ist, ist bis auf Ausnahmen keine direkte Zuordnung der Signale durch Transfer anhand der p53 Zuordnung möglich, auch wenn viele Signale nur leicht verschoben sind. Momentan erfolgt an der Technischen Universität München gerade die Zuordnung der Signale des $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektrums mit dem Endziel die Struktur der mit ca. 26 kD vergleichsweise großen p63 DBD aufzuklären. Desweiteren sind vergleichende Messungen zur molekularen Dynamik und Faltungsstabilität der p63 und p53 DBDs geplant, um NMR-spektroskopisch Einblick in die Faltungsstabilität und strukturelle Regulation der DBDs zu gewinnen.

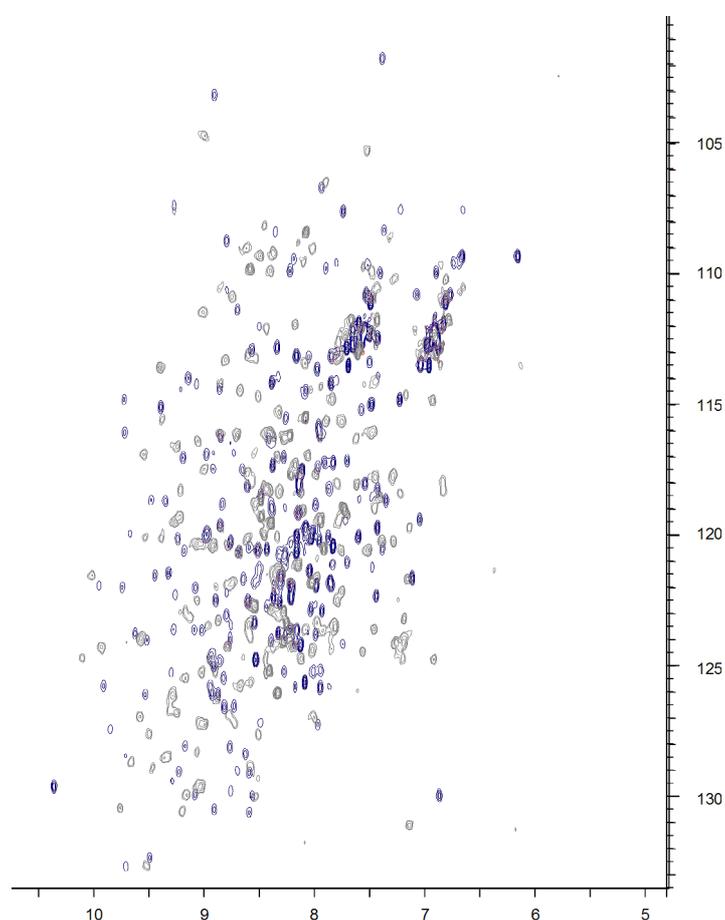


Abb. 5.4.12: $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum der $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -p63 DBD bei 303 K und 750 MHz (blau) im Vergleich zum $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -HSQC-Spektrum der $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -p53 DBD (grau).

5.5 Röntgenstrukturanalyse der N-terminalen Domäne von hXDM2 im Komplex mit einem hochaffinen p53 Peptidantagonisten

Biophysikalische Analyse der MDM2 Peptidbindung

Die **p53-MDM2-Interaktion** ist zentral für die Regulation von p53 (Freedman *et al.*, 1999; Momand *et al.*, 2000). Die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne des humanen HDM2 (AS 17-125) sowie des homologen XDM2 (AS 13-119) aus dem Krallenfrosch *X. laevis* wurde im Komplex mit kurzen vom N-Terminus von p53 abgeleiteten Peptiden (AS 15-29 für HDM2 bzw. AS 13-29 für XDM2) aufgeklärt und zeigte, daß p53 über eine amphipathische α -Helix mit den Resten Phe¹⁹, Trp²³ und Leu²⁶ in die hydrophobe Bindungstasche von MDM2 bindet (Kussie *et al.*, 1996). Biostrukturelle Arbeiten und insbesondere die Cokristallisation mit Peptiden bzw. Antagonisten erwiesen sich durch die hohe Oberflächenhydrophobizität der p53 Bindungstasche (Scarsi *et al.*, 1999) als sehr schwierig⁷. Insbesondere HDM2 weist eine sehr hohe Aggregationsneigung auf. Dagegen zeichnen sich XDM2-Konstrukte durch eine verringerte Aggregationsneigung und gute Kristallisationsfähigkeit aus. Versuche, freie MDM2-Konstrukte ohne Ligand zu kristallisieren, waren bislang nicht erfolgreich.

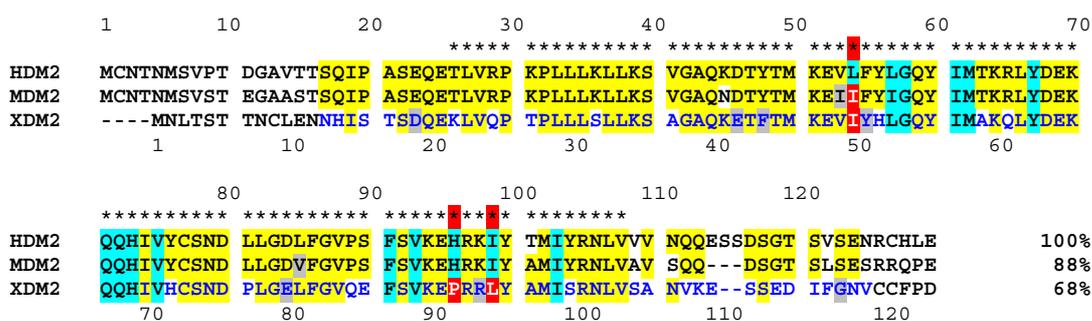
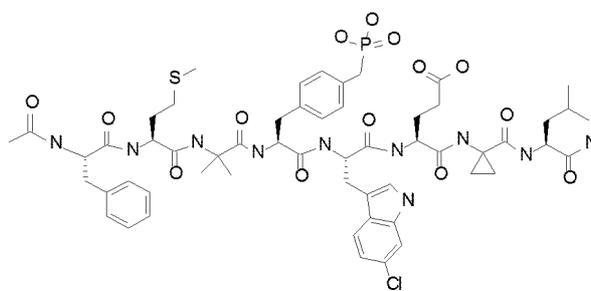


Abb. 5.5.1: Sequenz-Alignment der N-terminalen Domänen von HDM2 (*H. sapiens*), MDM2 (*M. musculus*) und XDM2 (*X. laevis*). Die Reste von XDM2 (13-119) sind blau markiert. Die in der Kristallstruktur geordnete Region ist mit * bezeichnet (Kussie *et al.*, 1996). In mindestens zwei Spezies homologe Reste sind gelb; konservative Mutationen sind grau unterlegt; homologe Reste, welche die hydrophobe Peptidbindungstasche ausbilden, sind türkis unterlegt. Die drei einzigen Reste in der p53-Bindungsstelle, in denen sich HDM2 und XDM2 unterscheiden, sind rot markiert. Die Mutation von I50L, P92H und L95I (LHI) reicht somit zur Humanisierung der Bindungsstelle aus. Adaptiert nach S. Palme.

Abb. 5.5.1 zeigt ein Alignment der N-terminalen Domänen von MDM2 aus verschiedenen Organismen. Die Identität der N-terminalen Domäne von XDM2 mit von HDM2 (AS 17-125) beträgt auf Proteinsequenzebene ca. 68% (Abb. 5.5.1). Als Ausgangspunkt für Kristallisationsexperimente wurde daher von Dr. S. Palme (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) auf der Basis des Sequenz-Alignments und der Strukturen von XDM2 und HDM2 durch *site directed mutagenesis* eine XDM2-Variante mit einer **humanisierten p53-Bindungsstelle** hergestellt, welche die guten Aggregations- und Kristallisationseigenschaften von XDM2 und die humane Bindungsstelle von HDM2 vereint (Kussie *et al.*, 1996). Zur Humanisierung der hydrophoben Bindungstasche (türkis markiert) mußten drei essentielle Reste mutiert

⁷ Die Cokristallisation mit nichtpeptidischen Antagonisten ist mittlerweile erstmals gelungen.

werden: I50L, P92H und L95I (rot markiert)⁸. Die beiden humanisierten XDM2 LHI-Varianten 13-119 und 21-105, im folgenden als hXDM2 bezeichnet, zeichnen sich wie XDM2 durch eine geringe Aggregationsneigung und verbesserte Kristallisationseigenschaften aus, obwohl ihre thermodynamische Faltungstabilität im Vergleich zu HDM2 deutlich verringert ist. Die Affinität von hXDM2 für das p53-Peptid konnte durch die Humanisierung im Vergleich zu XDM2 um den Faktor 2 gesteigert werden, allerdings lag sie immer noch um den Faktor 6 unter der Affinität des humanen HDM2 für das p53-Peptid (S. Palme und P. Rüger, pers. Mitteilung). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die thermodynamischen Parameter der Bindung ausgewählter Peptide an hXDM2 durch **isotherme Titrationskalorimetrie** untersucht sowie hXDM2 im Komplex mit dem hochaffinen NVP-Peptid kristallisiert (Abb. 5.5.2). Versuche zur Kristallisation von hXDM2 mit einem p73-Peptid und dem p53C312 Protein, das die NTD und die DBD umfaßt, waren nicht erfolgreich⁹. Das NVP-Peptid ist ein potenter Peptidantagonist der p53-HDM2-Interaktion (Chene *et al.*, 2000), der mehrere unnatürliche Aminosäuren enthält und auf dem durch *phage display* optimierten IP3-Peptid basierend (Bottger *et al.*, 1996) durch semirationales Design optimiert wurde (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000).



Ac-Phe¹⁹-Met-Aib-Pmp-6-Cl-Trp²³-Glu-Ac₃c-Leu²⁶-NH₂

Abb. 5.5.2: Strukturformel des NVP-Peptids. Das von dem IP3-Peptid (Bottger *et al.*, 1996) abgeleitete enantiomerenreine 8-mer NVP-Peptid enthält die unnatürlichen Aminosäuren Aib (α -Aminoisobutyrat), Pmp (Phosphonomethylphenylalanin), L-6-Cl-Trp (6-Chlor-Tryptophan) sowie Ac₃c (1-Aminocyclopropancarboxylat) und ist N-terminal acetyliert sowie C-terminal amidiert (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000).

Die dargestellten isothermen Titrationsexperimente wurden mit **hXDM LHI (13-119)** bei 20°C durchgeführt, da dieses Konstrukt bei 20°C eine höhere Stabilität und eine geringe Aggregationsneigung als hXDM2 (21-105) aufweist. Daher wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen ebenfalls mit hXDM2 (13-119) durchgeführt (S. Palme, pers. Mitteilung). Für Kristallisationsexperimente wurde dagegen die verkürzte Variante hXDM2 LHI (21-105) verwendet, der flexible Termini fehlen. Dieses Konstrukt kristallisierte leichter und die erhaltenen Kristalle streuten besser. Die kalorimetrisch bestimmten thermodynamischen Werte für den Stöchiometriefaktor n der Bindung sowie für die Änderung der freien Energie ΔG und die Dissoziationskonstante K_D sind in Tab. 5.5.1 angegeben. Ihre Größenordnung stimmt mit den durch Fluoreszenztitration bestimmten Werten überein (S. Palme, pers. Mitteilung). Das p53-Peptid wies eine Dissoziationskonstante von ca. 1.7 μM auf; der Austausch von Leu²² gegen Tyr²² analog dem IP3-Peptid führte zu einer

⁸ Die Numerierung der Reste variiert zwischen den DM2 Homologen aus verschiedenen Spezies!

⁹ In Konkurrenzexperimenten kompetierte p53C312 die Bindung des p53-Peptids an HDM2 mit einem IC₅₀ von 0.5 μM . Der Komplex konnte aber nicht über Gelfiltration isoliert werden.

Steigerung der Affinität um den Faktor 2.7. Das durch *phage display* optimierte IP3-Peptid schließlich band mit einer Dissoziationskonstante von 91 nM um den Faktor 19 affiner als das p53-Peptid. Für hochaffine Bindungen mit K_D -Werten <1 nM ($\Delta G >12$ kcal/mol) kann die Affinität kalorimetrisch nicht mehr akkurat bestimmt werden, da die optimalen Liganden-Konzentrationen zu niedrig sind, um Enthalpieänderungen zu messen. Größere Mengen an Ligand können dagegen nicht eingesetzt werden, da sonst die Steigung der Isothermen unendlich wird (Jelesarov und Bosshard, 1999). Aus diesen Gründen konnten die thermodynamischen Parameter der Bindung des NVP-Peptids nicht mehr kalorimetrisch bestimmt werden und wurden daher abgeschätzt. In Konkurrenzexperimenten war das NVP-Peptid um den Faktor 350 aktiver als das IP3-Peptid: IC_{50} im ELISA: NVP: 1.2 nM, IP3: 410 nM, p53: 8.5 μ M (E. Liu, pers. Mitteilung). In der Publikation, in der das NVP-Peptid ursprünglich beschrieben wurde, war das NVP-Peptid dagegen nur um den Faktor 60 aktiver als das IP3-Peptid: IC_{50} im ELISA: NVP: 5 nM, IP3: 313 nM, p53: 8.7 μ M (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000). Das Verhältnis der IC_{50} -Werte für p53 und IP3 stimmt mit einem Faktor von 20 mit dem kalorimetrisch bestimmten Verhältnis der K_D -Werte überein; demgemäß ist die relative Bindungsstärke bzw. Aktivität der Peptide vermutlich vergleichbar. Unter dieser Voraussetzung sollte die Dissoziationskonstante K_D des NVP-Peptids zwischen 250 pM und 1.5 nM (K_A ca. $4 \cdot 10^9$ M^{-1} bis ca. $6.7 \cdot 10^8$ M^{-1}) betragen. Die Ergebnisse machen darüber hinaus deutlich, daß die thermodynamisch in Lösung bestimmte Bindungskonstanten mit einem Faktor von 5-10 deutlich kleiner als die IC_{50} -Werte der Peptide in Wettbewerbs- und Biacore-Experimenten waren. Der Verlauf der ΔH und ΔS Werte vom p53- zum IP3-Peptid könnte ein Indiz für eine entropisch nicht begünstigte Interaktion sein, die mit einer Zunahme der Ordnung und einer Abnahme der Entropie im System einhergeht, so daß die Änderung der freien Enthalpie ΔG kleiner ausfällt, als anhand der Reaktionswärmen ΔH erwartet werden könnte. Allerdings muß bei der Interpretation einschränkend berücksichtigt werden, daß es sich bei den Werten für ΔH und ΔS im Gegensatz zur freien Enthalpie ΔG um apparente Werte handelt, die voneinander abhängig sind und sich über die Enthalpie-Entropie-Kompensation gegenseitig beeinflussen (Cooper, 1999; Leavitt und Freire, 2001).

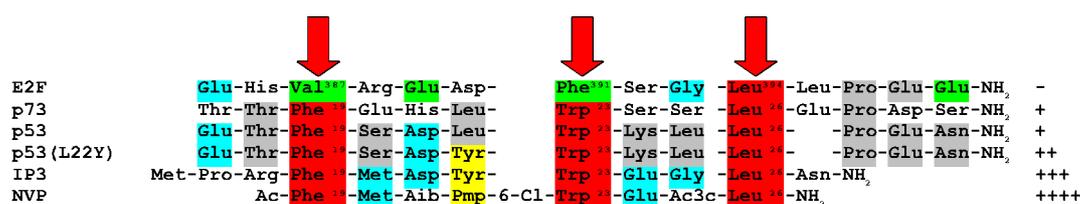


Abb. 5.5.3: Sequenz-Alignment von (potentiell) an MDM2-bindenden Peptiden. Das p53-Peptid (AS 17-29) ist aus der NTD von p53 abgeleitet, seine Röntgenstruktur wurde im Komplex mit HDM2 und mit XDM2 gelöst (Kussie *et al.*, 1996). Das p73-Peptid (AS 13-26) ist aus der NTD von p73 abgeleitet (Wang *et al.*, 2001e). p53(L22Y) entspricht dem p53-Peptid; der Austausch von Leu²² gegen Tyr²² erfolgte analog zum IP3-Peptid. Die Bindung von IP3 (16-27) an HDM2 wurde durch *phage display* optimiert (Bottger *et al.*, 1996). Aus IP3 wurde das kurze, hochaffine NVP-Peptid (19-26) abgeleitet (siehe Abb. 5.5.2) (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000). Für das E2F-Peptid (385-398) wurde in der Literatur aufgrund der Konservierung hydrophober Reste (grün unterlegt) und seiner Interaktion mit MDM2 eine Bindung an MDM2 postuliert (Kussie *et al.*, 1996; Martin *et al.*, 1995; Momand *et al.*, 2000). Die für die Bindung an MDM2 essentiellen Aminosäuren Phe¹⁹, Trp²³ und Leu²⁶ sind rot unterlegt und mit Pfeilen markiert. Die relative Affinität der Peptide ist rechts von – nach + angegeben. Grau und blau unterlegte Reste sind in mindestens zwei Peptiden konserviert; gelb markierte Reste führen zu einer Steigerung der Bindungsaffinität.

Tab. 5.5.1: Thermodynamische Parameter der Peptidbindung an hXDM2 (13-119) bei 20°C. Die Parameter wurden durch isotherme Titrationskalorimetrie und durch Anpassen eines 1:1 Bindungsmodells an die erhaltenen Meßdaten bestimmt (siehe Abb. 5.5.4). n ist der Stöchiometriefaktor. Für ΔG gilt: $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$ und $\Delta G^\circ = R \cdot T \cdot \ln(K_A)$, wobei $K_A = 1/K_D$ n.d.: keine Bindung detektierbar; K_D ist größer als die vorgelegte Proteinkonzentration (40 μM). n.b.: nicht bestimmbar, da Affinität für eine kalorimetrische Messung zu hoch war.

Peptid	n	K_a [1/M]	ΔG [kcal/mol]	K_D (1/ K_a) [nM]	ΔH_{app} [kcal/mol]	ΔS_{app} [cal/mol*K]
E2F	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
p53	1.137	$5.734 \text{ E}5 \pm 1.9 \text{ E}4$	-7.971	1744 ± 58	-7.98 ± 0.04	-0.86
L22Y	1.079	$1.555 \text{ E}6 \pm 9.0 \text{ E}4$	-8.295	643 ± 37	-10.92 ± 0.06	-8.96
IP3	1.099	$1.096 \text{ E}7 \pm 4.3 \text{ E}5$	-9.446	91 ± 4	-13.210 ± 0.02	-12.82
NVP	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

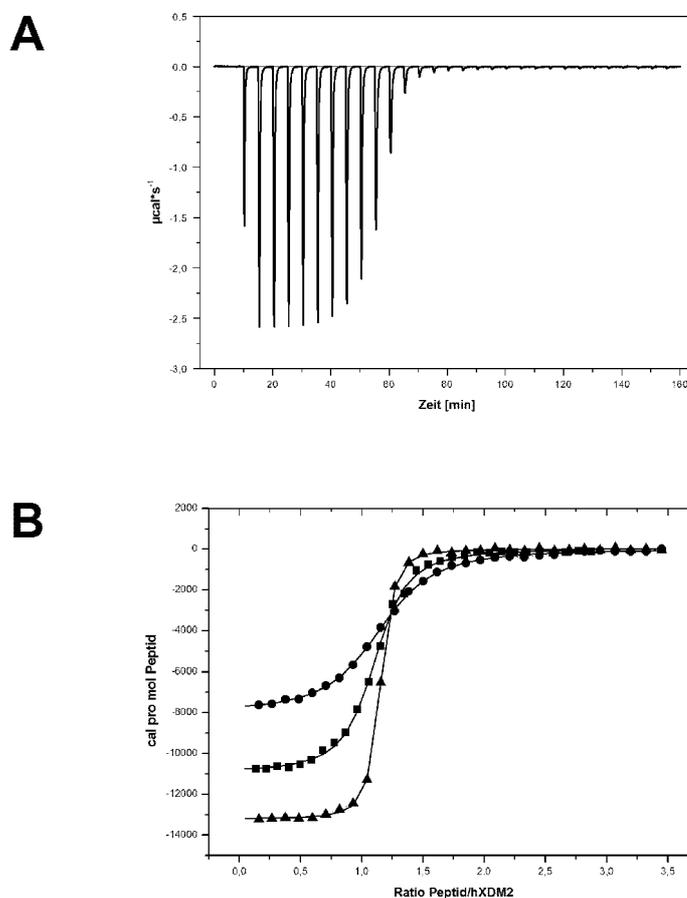


Abb. 5.5.4: Kalorimetrische isotherme Titrationsmessungen der Peptidbindung an hXDM2 (13-119). Repräsentative Bindungsisothermen für die Titration eines 15-fachen Peptidüberschusses an p53- (●), p53(L22Y)- (■) und IP3- (▲) Peptid in eine 40 μM Lösung von hXDM2 (13-119) in 50 mM KP (pH 7.0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM TCEP bei 20°C. **A)** Exemplarische inkrementelle und Basislinien-korrigierte Wärmeänderung nach Titration des IP3-Peptids (600 μM) zu hXDM2 (40 μM). **B)** Die integrierte Enthalpieveränderung ist gegen das Verhältnis an Peptid zu hXDM2 aufgetragen. Die Werte wurden entsprechend einem 1:1 Bindungsmodell gefittet. Die experimentell bestimmten molaren Verhältnisse und Bindungskonstanten sind in Tab. 5.5.1 angegeben.

Kristallisation

Um näheren Einblick in die Interaktion von hXDM2 mit einem hochaffinen Liganden zu erhalten, wurde hXDM2 (21-105) im Komplex mit dem NVP-Peptid (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000) kristallisiert. Dazu wurde hXDM2 (21-105) mit einem dreifachen Überschuß an NVP-Peptid inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes Peptid abgetrennt und der stabile Peptid-Komplex über Gelfiltration an einer Superdex 75-Säule isoliert. Im Gegensatz zum freien Protein ließ sich der **hXDM2-NVP-Peptidkomplex** durch Ultrafiltration auf Konzentrationen >10 mg/mL konzentrieren, was einen ersten Hinweis auf die erfolgte Komplexbildung darstellte. Für die Kristallisation war die Isolation des Peptidkomplexes unerlässlich. Die Kristallisation des Komplexes erfolgte schließlich bei verschiedenen Temperaturen im Dampfdiffusionsverfahren nach der *sitting drop* Methode. Geeignete Kristallisationsparameter wurden durch Variation der für das IP3-Peptid optimierten Bedingungen gefunden. Es ergaben sich die folgenden optimierten Kristallisationsbedingungen: **0.1 M MES (pH 6.2), 2 M LiSO₄, 4°C**, Tropfen/Reservoir-Verhältnis 4:3. Innerhalb weniger Tage wuchsen bei 4°C kleine keilförmige Kristalle. Durch Mikroseeding wuchsen einzelne Kristalle bis zu einer Größe von ca. 250x150x50 μm (Abb. 5.5.5). Diese Kristalle wurden mit einer 0.5 mm Kapillare geerntet und waren für eine Röntgenstrukturanalyse geeignet.

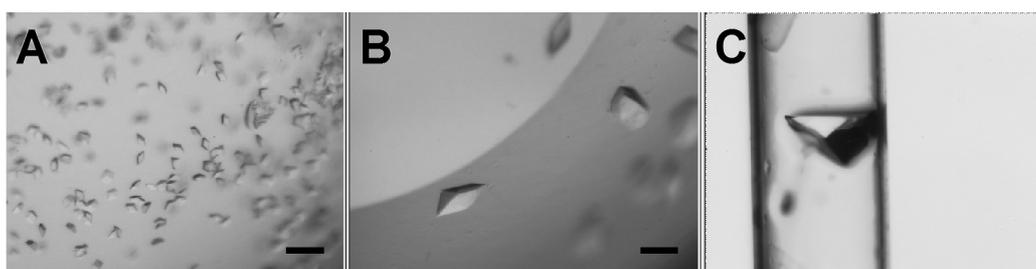


Abb. 5.5.5: Kristalle des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes. Kristalle des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes wurden bei 4° nach mehreren Tagen mit 0.1 M MES (pH 6.2), 2 M LiSO₄ nach der *sitting drop* Methode erhalten. **A)** Kristalle ohne Seeding. **B)** Kristalle nach Mikroseeding. **C)** In einer 500 μm -Kapillare montierter Kristall, mit dem der für die Aufklärung der Struktur verwendete Datensatz aufgenommen wurde. Maßstab: 150 μm .

Datensammlung

Der zur Lösung der Struktur verwendete Datensatz wurde mit dem in Abb. 5.5.5C gezeigten Kristall mit Graphit-monochromatisierter Cu-K α -Röntgenstrahlung ($\lambda=1.5418$ Å, Rigaku RU300-Generator, maximale Auflösung 2.014 Å) bei 4°C auf einem Image Plate Detektor gemessen. Unter den Meßbedingungen streuten die Kristalle bis zu einer maximalen Auflösung von 2.035 Å (Abb. 5.5.6). Der Drehwinkel je Aufnahme betrug 1° über einen Meßbereich von 106°, die Belichtungszeit pro Aufnahme betrug 20 min. Die Bestimmung der Kristallorientierung und Raumgruppe R32 sowie die Verfeinerung der Elementarzellenparameter und die Integration der Reflexintensitäten erfolgten mit dem Programm MOSFLM (Version 6.0) (Leslie, 1994). Die Datenreduktion wurde mit den Programmen SORTMTZ, SCALA und TRUNCATE (CCP4, 1994) durchgeführt. Die

Datenprozessierungsstatistik ist in Tab. 5.5.2 zusammengefaßt. Eine erste Bestimmung der Lage des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes in der Elementarzelle erfolgte mit der Patterson-Suchmethode (*molecular replacement*) mit Hilfe des Programms MOLREP (CCP4, 1994) ohne *rigid body* Minimierung unter Verwendung der Daten mit einer Auflösung von 3.0 Å. Als Suchmodell dienten die Koordinaten der Kristallstruktur von XDM2 im Komplex mit dem p53-Peptid (PDB-Code: 1YCQ) (Kussie *et al.*, 1996). Es ergaben sich zwei Rotationslösungen mit einem σ von 8.36 (erste Lösung) bzw. 3.7 (zweite Lösung). Die Translationsfunktion ergab eine Lösung mit einem Korrelationskoeffizienten von $c=0.643$. Der kristallographische R-Faktor betrug 0.387.

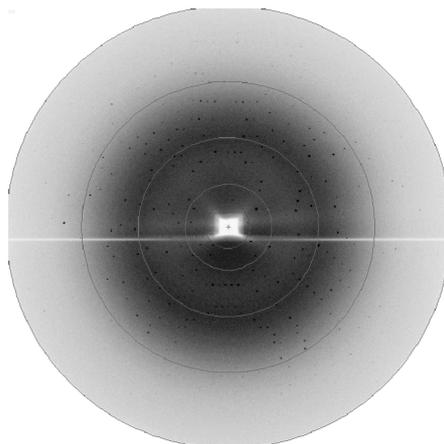


Abb. 5.5.6: Beugungsbild einer 1° Rotationsaufnahme des hXDM2-Kristalls im Komplex mit dem NVP-Peptid. Der Plattenrand entspricht einer Auflösung von 2.04 Å, die konzentrischen Kreise entsprechen 2.7 Å, 4.0 Å und 8.0 Å.

Tab. 5.5.2: Datenprozessierungsstatistik des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes.

Datensammlung	
Raumgruppe	R32 (155)
Zellkonstanten (Å°)	
a	84.7349
b	84.7349
c	87.9705
α	90
β	90
γ	120
Einheitszellvolumen [Å ³]	631629
MW Komplex (hXDM2 + NVP)	11.152 kD
V _m [Å ³ /Da] (entspricht% H ₂ O)	2.7 (54.5%)
Komplexe pro asymmetrische Einheit	1
Begrenzende Auflösung [Å]	2.035
Gemessene Reflexe	73680
Unabhängige Reflexe	7913
I/ σ	8.4
Vollständigkeit der Daten	99.4
R _{sym}	0.080
Multiplizität	6.0
Letzte Schale: 2.03 Å – 2.14 Å	
I/ σ	1.7
Vollständigkeit der Daten	99.4
R _{sym}	0.417

*Modellbau und Verfeinerung***Tab. 5.5.3: Verfeinerungsstatistik des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes.**

Verfeinerung	
Auflösungsbereich	2.035-24.470 Å
Verwendete Reflexe	7956
Reflexe im Arbeitsset	7096
Reflexe im Testset	766
R-Faktor [%]	18.94
R _{free} [%]	20.84
r.m.s.-Abweichungen von Idealwerten der	
Bindungslängen [Å]	0.011
Bindungswinkel [°]	1.702
r.m.s. B [Å ²] Hauptkette	0.672
r.m.s. B [Å ²] Seitenketten	2.864
Mittlerer B-Faktor	
Hauptkettenatome [Å ²]	22.155
Seitenkettenatome [Å ²]	26.595
Wassermoleküle [Å ²]	35.129
Peptidatome [Å ²]	24.986
Anzahl der Atome in der asymmetrischen Einheit	833
Proteinatome ohne Wasserstoff	699
Inhibitoratome ohne Wasserstoff	83
Solvensmoleküle	46
Sulfatome	5
(Φ, Ψ)-Winkel Verteilung im	
bevorzugten Bereich	70 (90.9%)
zusätzlich erlaubten Bereich	9.1 (9.1%)

Die Raumgruppe des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes (R32) entsprach derjenigen von hXDM2 im Komplex mit dem durch *phage display* optimierten IP3-Peptid mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit (S. Palme, pers. Mitteilung). Daher wurde die Lage des Komplexes in der asymmetrischen Einheit endgültig durch *rigid body* Minimierung mit dem Programm REFMAC (CCP4, 1994) unter Zuhilfenahme der Koordinaten des hXDM2-IP3-Peptidkomplexes mit den Daten bis 2.035 Å bestimmt. Der R-Faktor lag nach der ersten Minimierung bei 0.3212. Nach der ersten Positionsverfeinerung wurden die Atome des IP3-Peptids gegen die Atome des NVP-Peptids ausgetauscht. Da das NVP-Peptid unnatürliche Aminosäuren enthält, wurde mithilfe von MOLOC eine *library* Datei für die Struktur des NVP-Peptids erstellt und in die eindeutige Elektronendichte eingefügt. Die Bindungslängen und Winkel der unnatürlichen Aminosäuren des NVP-Peptids wurden nach einer Recherche in der Cambridge Structural Database (CSD) entsprechend Daten aus den Kristallstrukturen niedermolekularer Verbindungen parametrisiert. Daraufhin wurde die Struktur des hXDM2-NVP-Peptid-Komplexes in mehreren Zyklen von manuellem Modellbau mit MOLOC gefolgt von automatischer Verfeinerung nach dem *maximum likelihood* Algorithmus (Murshudov *et al.*, 1997) mit dem Programm REFMAC (CCP4, 1994) weiter verfeinert. Zudem wurden ein SO₄²⁻-Ion in die Dichte eingebaut; unter Zuhilfenahme des Programms WATPEAK (CCP4, 1994) wurden insgesamt 46 Solvensmoleküle positioniert. Entsprechend den Fourier- und Differenzfourierdichten wurde die Besetzung von Resten mit alternativen bzw. nicht definierten Konformationen angepaßt und in die Verfeinerung einbezogen. Die Qualität der Modelle wurde nach jedem Schritt mit dem Programm Procheck Version 3.3 (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft. Die R-Faktoren nach der

endgültigen Verfeinerung betragen: $R=18.94\%$ und $R_{\text{free}}=20.84\%$. In Tab. 5.5.3 ist die Verfeinerungsstatistik des finalen Modells zusammengefaßt. Eine Überprüfung der Bindungsgeometrien der Proteinhauptkette (mit Ausnahme von Gly und Pro) zeigte, daß 90,9% aller Reste im bevorzugten Bereich liegen; die restlichen 9,1% befinden sich im zusätzlich erlaubten Bereich. In Abb. 5.5.7. ist die Ramachandran-Statistik (Ramachandran und Sasisekharan, 1968) aller Aminosäuren des finalen Modells gezeigt.

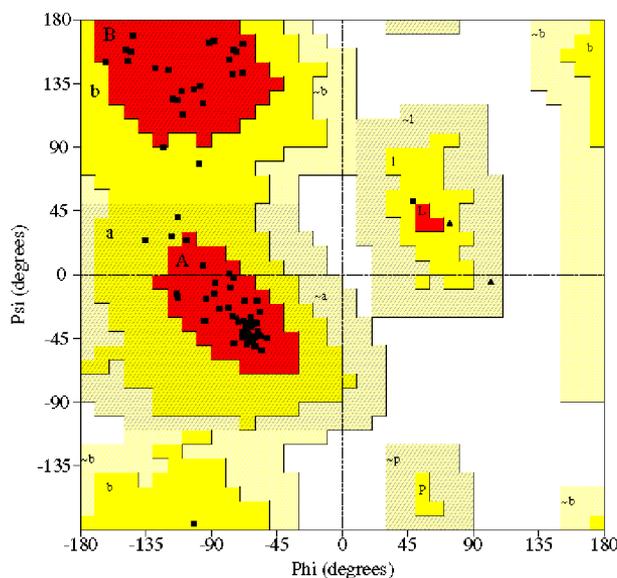


Abb. 5.5.7: Ramachandran-Plot der dihedralen Hauptkettenwinkel Phi und Psi des finalen Modells des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes. Die für L-Aminosäuren erlaubten Bereiche sind gelb, die sterisch günstigsten Regionen rot und die sterisch verbotenen Bereiche weiß unterlegt.

Strukturbeschreibung

hXDM2 kristallisierte im Komplex mit dem NVP-Peptid in der gleichen Raumgruppe (R32) wie mit dem IP3-Peptid (S. Palme, pers. Mitteilung), jedoch in einer anderen Raumgruppe als HDM2 (C2221) (PDB-Code: 1YCR) bzw. XDM2 (P6322) (PDB-Code: 1YCQ) im Komplex mit p53-Peptiden (Kussie *et al.*, 1996). Mit 2.0 Å konnte im Vergleich zu den Kristallstrukturen von XDM2 (2.3 Å) und HDM2 (2.6 Å) zudem eine höhere Auflösung erzielt werden. Im finalen verfeinerten Molekülmodell von hXDM2 LHI (21-105) im Komplex mit dem NVP-Peptid sind abgesehen von einigen nicht interpretierbaren flexiblen Seitenkettenatomen alle Aminosäuren von hXDM2 (21-105) sehr gut in ihrer gewichteten $2F_o-F_c$ -Elektronendichte definiert, so daß die Aminosäurekette in einer kontinuierlichen Elektronendichte verfolgt werden kann. Das N-terminale M21A des Startcodons ist durch Kontakte im Kristall fixiert. Abb. 5.5.9 zeigt in einem exemplarischen Ausschnitt aus der finalen Elektronendichte das Molekülmodell des NVP-Peptids im Komplex mit hXDM2. Alle Reste des NVP-Peptids mit Ausnahme des Solvens-exponierten Glutamat-Rests sind in der $2F_o-F_c$ -Elektronendichte sehr schön definiert. Zudem ist in der Elektronendichte in der Nähe der Kontaktfläche im Kristall und in der Nähe der H92A-, R93A- und Y96A-Seitenketten von hXDM2 ein gut definiertes Sulfat-Anion zu sehen, das aus dem Kristallisationspuffer stammt.

Abb. 5.5.8 zeigt die Sekundärstruktur von hXDM2 (21-105) im Komplex mit dem NVP-Peptid im Vergleich zur Struktur von XDM2 und HDM2 im Komplex mit p53-Peptiden (Kussie *et al.*, 1996). Der Vergleich der vier Strukturen ergibt, daß sich der Verlauf des C α -Rückgrats der N-terminalen Domänen von hXDM2, XDM2 und HDM2 im Komplex mit den drei unterschiedlich affinen Peptiden nur geringfügig unterscheidet¹⁰. Eine Berechnung der **RMS-Abweichung** der Rückgrat-Atome des hXDM2-NVP-Komplexes im Vergleich zu den bekannten MDM2-Peptidkomplexen ergab die folgenden Werte: hXDM2-IP3-Peptid: 0.29 Å, XDM2-p53-Peptid: 0.35 Å und HDM2-p53-Peptid: 0.83 Å. Da hXDM2 durch Mutagenese von drei Oberflächen-Resten aus XDM2 hervorging, war die Abweichung zu XDM2 erwartungsgemäß sehr gering. Die **Topologie von hXDM2** entspricht der für HDM2 und XDM2 bereits beschriebenen (Kussie *et al.*, 1996). Zusammenfassend ähnelt die N-terminale Domäne von MDM2 einem verdrehten Trog, der als auffälligstes Merkmal eine zentrale hydrophobe Vertiefung aufweist, in die das NVP-Peptid mit seinen hydrophoben Resten als amphiphile α -Helix bindet¹¹. Im Unterschied zu den meisten anderen bekannten Protein-Peptidkomplexen (wie z.B. MHC I und II, SH2, SH3, TPR etc.) spielen polare Interaktionen und Wasserstoffbrücken im MDM2-p53-Komplex keine signifikante Rolle (Kussie *et al.*, 1996). Die hydrophobe Bindungstasche wird an den Seiten von zwei längeren Helices und an der unteren Seite von zwei kürzeren Helices gebildet, die über zwei dreisträngige β -Faltblätter an ihren Enden miteinander verknüpft werden. Obwohl die Domäne aus zwei *repeats* aufgebaut ist, die auf der folgenden Abfolge beruhen: β -Strang, α -Helix, β -Strang, längere α -Helix, β -Strang und eine ähnliche Tertiärstruktur haben, ist die hydrophobe Bindungstasche asymmetrisch aufgebaut (siehe Kussie *et al.* (1996) für Details).

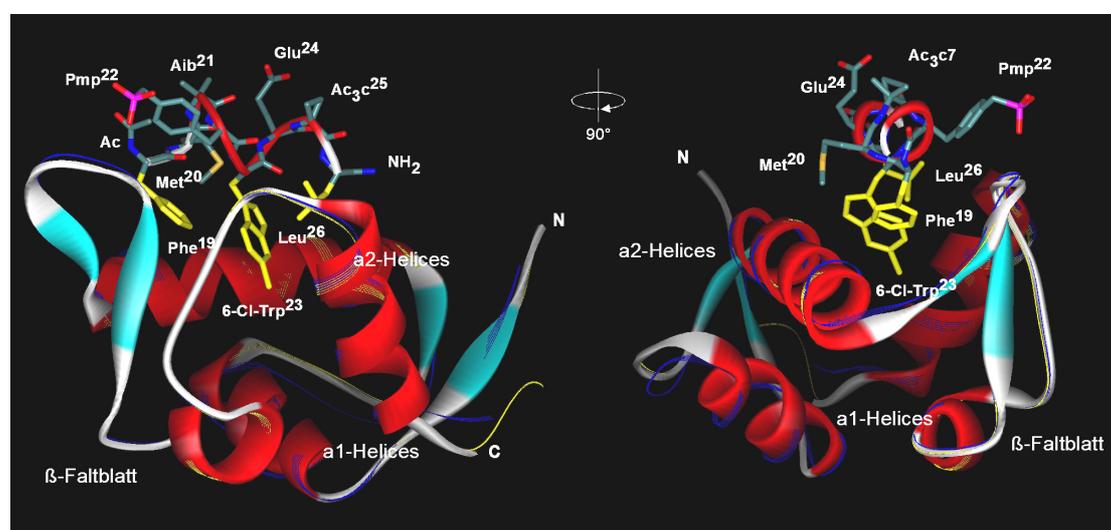


Abb. 5.5.9: Überblick über die Topologie des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes. Die Topologie von hXDM2 in einer Sekundärstrukturdarstellung (türkis: Faltblatt, rot: Helix) ist im Komplex mit dem NVP-Peptid als Stab- und Sekundärstrukturdarstellung aus zwei Raumrichtungen rotiert um 90° gezeigt. Zum Vergleich ist die Sekundärstruktur von HDM2 in blau (PDB-Code: 1YCR) bzw. XDM2 in gelb (PDB-Code: 1YCQ) im Komplex mit p53-Peptiden (Kussie *et al.*, 1996) überlagert. Die für die Bindung essentiellen Reste Phe¹⁹, 6-Cl-Trp²³ und Leu²⁶ sind in gelb hervorgehoben.

¹⁰ Die Identität der HDM2 und XDM2-Domänen auf Proteinsequenzebene beträgt ca. 68%.

¹¹ Die nach außen weisenden polaren Reste des NVP-Peptids kommen durch die Kristallpackung in der Nähe der Kontaktfläche im Kristall zu liegen.

Kürzlich wurde vorgeschlagen, daß diese Topologie einem Cluster aus vier EF-Hand-Modulen ähnelt, wie er von Calmodulin, Troponin, Myosin, Calcineurin und S100 Proteinen bekannt ist (Milner-White, 1999). Vertreter dieser Klasse von Domänen besitzen wie MDM2 ein zentrale Vertiefung, die von zwei EF-Hand-(ähnlichen)-Modulen gebildet wird, und für die Interaktion mit kurzen hydrophoben α -Helices von anderen Proteinen verantwortlich ist.

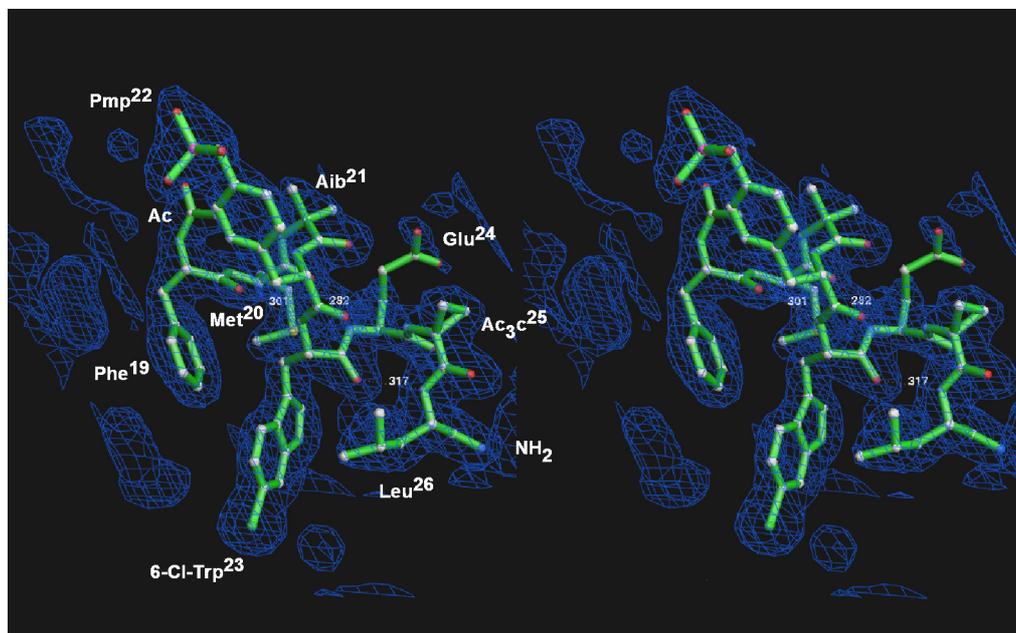


Abb. 5.5.9: Stereodarstellung des Molekülmodells des NVP-Peptids im Komplex mit hXDM2 in der experimentell bestimmten gewichteten $2F_o - F_c$ -Elektronendichte (Ausschnitt). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur das Molekülmodell des NVP-Peptids gezeigt. Die finale gewichtete $2mF_o - dF_c$ -Elektronendichte ist mit 1σ konturiert.

Im Gegensatz zu den ausgedehnten p53-Peptiden im Komplex mit HDM2 und XDM2 sind alle acht Aminosäuren des minimalen NVP-Peptids in der Kristallstruktur über die gesamte Länge des Peptids geordnet¹². Von α, α -disubstituierten Aminosäuren ist bekannt, daß sie α - und 3_{10} -helikalen Strukturen in Peptiden stabilisieren (Marshall *et al.*, 1990). Um die amphipathische Helixstruktur des p53-Peptids im Komplex mit HDM2 zu stabilisieren und damit die Struktur der für die HDM2 Bindung essentiellen Aminosäuren zu imitieren und gleichzeitig konformationell zu restringieren, wurden im NVP-Peptid die nicht direkt in die HDM2-Bindung involvierten Reste Asp²¹ und Gly²⁵ durch die α, α -disubstituierten Aminosäuren Aib²¹ und Ac₃c²⁵ ersetzt (Garcia-Echeverria *et al.*, 2001). Die Kristallstruktur zeigt, daß die **Konformation des NVP-Peptids** im Komplex mit hXDM2 gemäß dem Wasserstoffbrückenbindungsmuster

¹² In der Struktur des IP3-Peptids (AS 16-27) mit hXDM2 sind die N- und C-terminalen Reste Met¹⁶ und Asn²⁷ sowie die Seitenketten von Pro¹⁷ und Arg¹⁸ in der Elektronendichte nicht definiert und vermutlich ungeordnet (S. Palme, pers. Mitteilung). In der Struktur des p53-Peptids (AS 13-29) mit XDM2 sind die vier N-terminalen und die beiden C-terminalen Reste ungeordnet; Glu¹⁷ und Pro²⁷ haben hohe B-Faktoren (Kussie *et al.*, 1996). In der Kristallstruktur des p53-Peptids (AS 15-29) mit HDM2 schließlich sind die beiden N-terminalen Reste ungeordnet; Glu¹⁷ hat hohe B-Faktoren; die C-terminalen Reste sind mit Ausnahme von Pro²⁷ partiell ungeordnet bzw. vermutlich nur durch Kristallpackungseffekte fixiert, ohne signifikant zur Bindung beizutragen (Kussie *et al.*, 1996). Zusammengenommen spricht alles dafür, daß die Reste außerhalb der hydrophoben Kernsequenz von Phe¹⁹ bis Leu²⁶ für die Peptidbindung an MDM2 nicht erforderlich bzw. vernachlässigbar sind.

von einer idealen α -helikalen Konformation abweicht, wie sie für den größten Teil der amphipathischen Helix des p53-Peptids im Komplex mit HDM2 mit Ausnahme des C-terminalen Bereichs beschrieben wurde (Kabsch und Sander, 1983; Kussie *et al.*, 1996). Das NVP-Peptid bildet von Met²⁰ bis Glu²⁴ eine amphiphile Helixstruktur aus, bei der die hydrophoben Reste primär in Richtung der hXDM2-Bindungstasche angeordnet sind und hydrophile Reste nach außen gewandt sind. Allerdings existieren innerhalb des Peptidrückgrats nur im N-terminalen Bereich zwei α -helikale Wasserstoffbrücken ($i - i+4$) (Phe¹⁹-C=O - H-N-6-Cl-Trp²³ und Met²⁰-C=O - H-N-Glu²⁴). Zum C-terminalen Bereich des Peptids hin wird die Helix enger und zeigt ein für 3_{10} -Helix typisches Wasserstoffbrückenbindungsmuster ($i - i+3$) (Pmp²²-C=O - H-N-Ac₃c²⁵ und 6-Cl-Trp²³-C=O - H-N-Leu²⁶), das zwischen 6-Cl-Trp²³-C=O - H-N-Leu²⁶ in eine Typ I β -turn-artige Struktur übergeht. Gleichzeitig bleibt aber der generelle Bindungsmodus des Peptids erhalten.

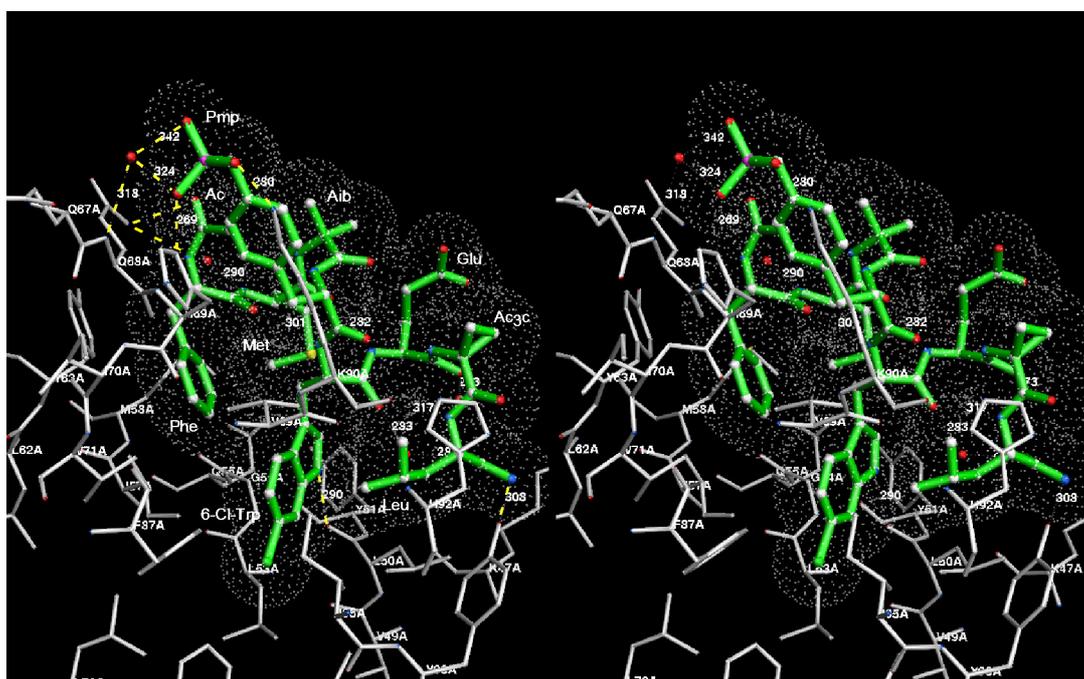


Abb. 5.5.10: Stereodarstellung der hydrophoben Bindungstasche für das NVP-Peptid im hXDM2-NVP-Peptidkomplex. Alle hXDM2-Reste, die sich in einem Abstand von 8 Å in der Umgebung des NVP-Peptids befinden und die (hydrophobe) Bindungstasche ausbilden, sind als Stäbchenmodell in weiß dargestellt. Die Aminosäure-Reste sind bezeichnet. Das NVP-Peptid ist in grün mit der zugehörigen Connolly-Oberfläche gezeigt. Die Abbildung zeigt die molekularen Wechselwirkungen, die für die Affinität des NVP-Peptids verantwortlich sind sowie gebundene Wassermoleküle und putative Wasserstoffbrücken in gelb.

In Abb. 5.5.10 ist eine Stereodarstellung des NVP-Peptids in der zugehörigen Connolly-Oberfläche zusammen mit den hXDM2 Resten gezeigt, die sich innerhalb von 8 Å um das Peptid befinden und die **hydrophobe Bindungstasche** ausbilden. Die Struktur (Abb. 5.5.10) und die Oberflächendarstellungen des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes (Abb. 5.5.11, Abb. 5.5.12) verdeutlichen, daß das NVP-Peptid optimal über die hydrophobe Triade aus den Resten Phe¹⁹, 6-Cl-Trp²³ und Leu²⁶ in die hydrophobe Bindungstasche von hXDM2 bindet. Diese ist aus drei kleineren Taschen aufgebaut, die jeweils einen der drei hydrophoben Reste beherbergen. Der Bindungsmodus ist fast ausschließlich durch hydrophobe und van-der-Waals-

Wechselwirkungen bestimmt. Der stark hydrophobe Charakter der Bindung führt dabei zum entropisch vorteilhaften Ausschluß von Wasser aus der Bindungstasche (*hydrophobic effect*, hydrophobe Wechselwirkung). Durch das polarisierbare Cl-Atom füllt 6-Cl-Trp²³ im Vergleich zum unsubstituierten Trp²³ im p53-Peptid den vorher leeren Raum in der tiefen Bindungstasche fast vollständig aus. Da durch die hohe sterische Oberflächenkomplementarität (*shape complementarity*) das NVP-Peptid zudem die gesamte Bindungstasche fast vollständig ausfüllt, tragen entfernungsabhängig induzierte Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (van-der Waals-Kontakte) wie im p53-Peptid wesentlich zur Bindungsaffinität des NVP-Peptids bei. Die Bindungstasche in hXDM2 wird von einer Reihe an konservierten hydrophoben Aminosäure-Resten ausgebildet, die multiple van-der-Waals-Kontakte mit dem NVP-Peptid eingehen. Im einzelnen sind dies¹³: M46A, L50A*, L53A, G54A, I57A und M58A aus der α 2-Helix; Y63A, H69A, V71A, F87A und V89A aus dem mittlerem β -Faltblatt sowie H92A*, I95A* und Y96A aus der α 2'-Helix. Die Tasche für 6-Cl-Trp²³ wird dabei vornehmlich von L50A*, L53A, G54A, I57A, F87A, V89A sowie L78A, F82A, I95A, I99A für das Chlor-Atom, die Tasche für Phe¹⁹ von G54A, I57A sowie M58A, Y63A und Q68A und schließlich die Tasche für Leu²⁶ auf dem β -Faltblatt von L50A, V89A, H92A* und I95A* ausgebildet. Die Substitution von Ser²⁰ im p53-Peptid gegen das hydrophobe Met²⁰ könnte durch die Nähe der terminalen Methylgruppe zu M58A, G54A und Q59A, die sich in einer Entfernung von ca. 4-5 Å befinden, mit zusätzlichen hydrophoben Kontakten zur Bindungsaffinität beitragen.

Die Substitution von Leu²² gegen das Tyrosin-Derivat Pmp²² führte wie der Austausch von Leu²² gegen Tyr²² zu einer signifikanten Steigerung der Affinität. Vermutlich als Folge der Ausbildung der Wasserstoffbrücken der Phosphonomethylgruppe mit K90A und H69A ist der Phenylring von Pmp²² im Vergleich zum Tyr²² in der Struktur des hXDM2-IP3-Peptidkomplexes jedoch um ca. 10° aus der Ebene gekippt; so daß keine zusätzlichen hydrophoben Kontakte des aromatischen Rings mit hXDM2 existieren. Die im p53-Peptid nicht vorhandenen α,α -disubstituierten Aminosäuren Aib²¹ und Ac₃C²⁵ sind wie Asp²¹ und Gly²⁵ im p53-Peptid Solvens-exponiert und bilden keine weiteren Interaktionen aus, die für die erhöhte Affinität verantwortlich sein könnten.

Polare **intermolekulare Wasserstoffbrücken** existieren innerhalb der Bindungstasche nur zwischen den Amidprotonen des Indolrings im 6-Cl-Trp²³ und dem Carbonylsauerstoff von L50A*. Außerhalb der eigentlichen Bindungstasche existieren Wasserstoffbrücken mit nicht idealer Geometrie 1) zwischen dem Seitenketten-Carbonylsauerstoff von Q68A und den Amidprotonen von Phe¹⁹ bzw. in einer alternativen Konformation durch Drehung um die C _{γ} -C _{δ} -Bindung zwischen den Seitenketten-Amidprotonen von Q68A und dem Carbonylsauerstoff der N-terminalen Acetatschutzgruppe; 2) zwischen den C-terminalen Amidprotonen des Peptids und dem Hydroxylsauerstoff von Y96A sowie 3) zwischen den ϵ -Amidprotonen von K90A bzw. den δ -Amidprotonen von H69A und jeweils einem Sauerstoffatom der Phosphonomethylgruppe von Pmp²². Pmp²² ist mit Q68A zudem in die Koordination eines Wassermoleküls im Kristall involviert.

¹³ Die humanisierten Reste I50L, P92H und L95I sind durch einen Stern (*) gekennzeichnet.

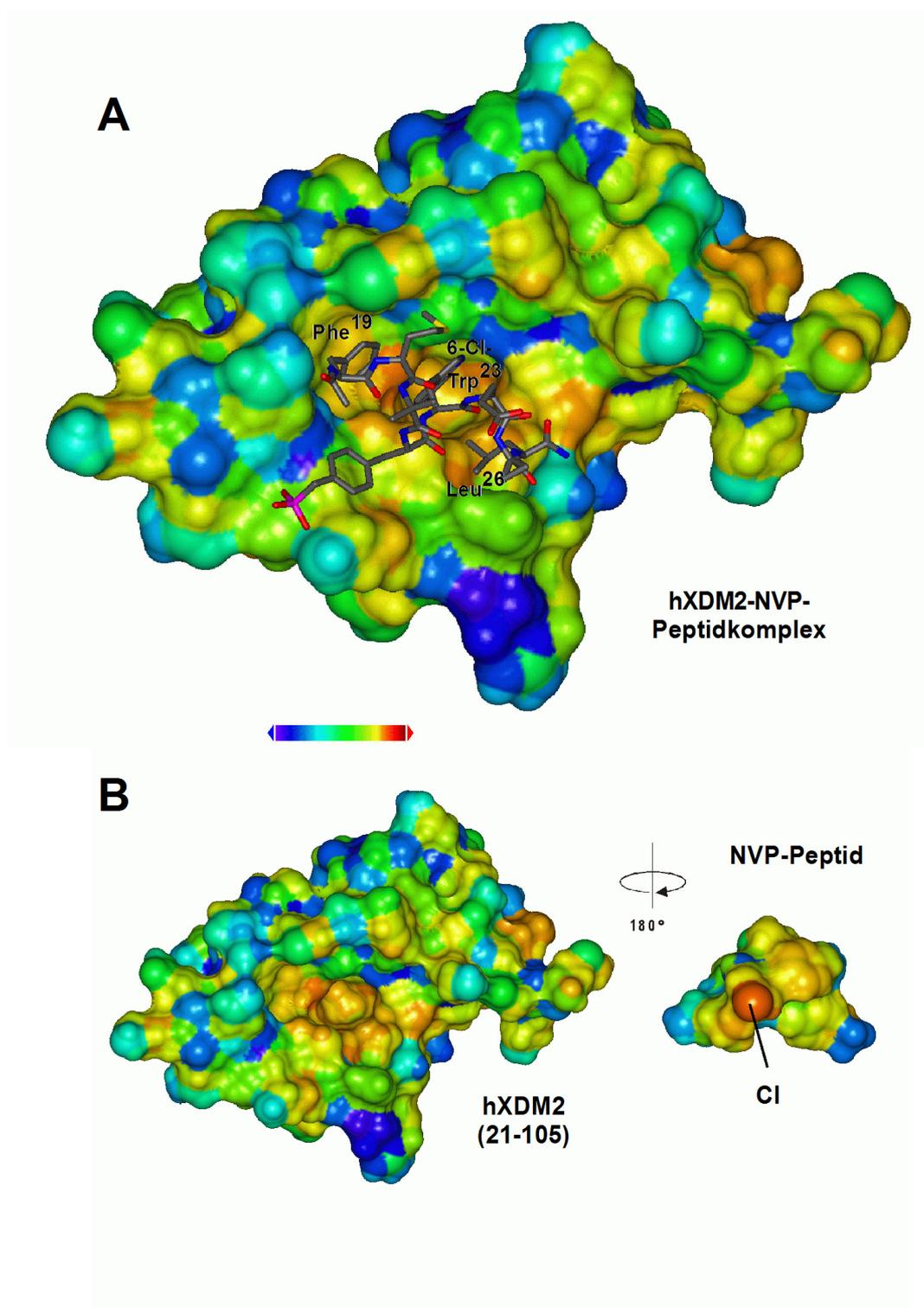


Abb. 5.5.11: Komplementarität (*shape complementarity*) des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes. **A)** Lipophiles Oberflächenpotential des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes. Das NVP-Peptid ist in einer Stabdarstellung abgebildet. Die drei hydrophoben Bindungstaschen für Phe¹⁹, 6-Cl-Trp²³ und Leu²⁶ sind bezeichnet. **B)** Das Peptid ist um 180° aus der Ebene des Komplexes gedreht. Beide Oberflächen sind als Connolly-Oberfläche dargestellt. Die Hydrophobizität der Reste wurde als ClogP für jedes einzelne Atom berechnet und ist als lipophiles Oberflächenpotential dargestellt. Blau steht für negative hydrophile, rot für positive lipophile Werte. Die Abbildung demonstriert wie ideal das NVP-Peptid die hydrophobe Bindungstasche von hXDM2 ausfüllt bzw. von dieser aufgenommen wird.

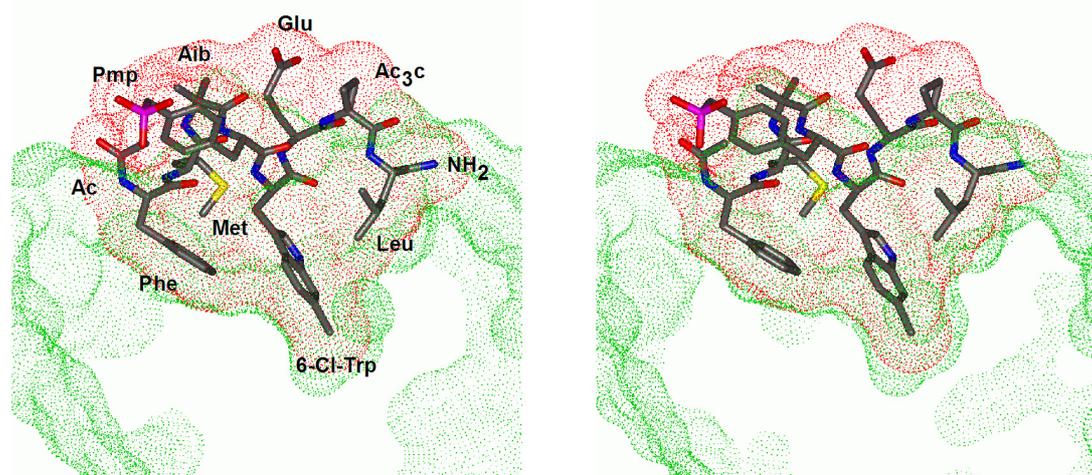


Abb. 5.5.12: Oberflächensterendarstellung der NVP-Bindungsstelle im hXDM2-NVP-Peptidkomplex. Oberflächendarstellung des NVP-Peptids in der Oberfläche des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes mit den drei Bindungstaschen für das NVP-Peptid. Die Connolly-Oberfläche des NVP-Peptids ist in rot; die Oberfläche von hXDM2 in grün abgebildet.

Abgesehen von Unterschieden in der Konformation einiger Oberflächen-Reste und als Folge der beschriebenen unterschiedlichen Sequenz der kristallisierten Peptide sind die charakteristischen Unterschiede in der Struktur des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes im Vergleich zum XDM2- und HDM2-p53-Komplex auf das NVP-Peptid und auf die Peptidbindungsstelle beschränkt. Trotz geringer Unterschiede entspricht der **Bindungsmodus** des NVP-Peptids grundsätzlich dem des natürlichen p53-Peptids, so daß die höhere Affinität des NVP-Peptids nicht die Folge größerer konformationeller Umlagerungen auf Seiten des Peptids bzw. auf Seiten von hXDM2, sondern die Folge der beschriebenen zusätzlichen Kontakte sowie entropischer Effekte ist. Auf Seiten des Proteins sind bei Bindung des NVP-Peptids vor allem zwei strukturelle Veränderungen auffällig. Da dem kurzen NVP-Peptid der auf Leu²⁶ folgende Pro²⁷-Rest fehlt, kommt es im Kristall zu keinem engen Kontakt zwischen Pro²⁷ und Y96A. Dagegen sind im Komplex von HDM2 mit dem p53-Peptid die Reste 17-29 strukturiert. Der ausgedehnte C-Terminus des p53-Peptids führt im Komplex mit HDM2 dazu, daß das homologe Y100A um ca. 90° aus der Ebene klappt, um die Bindungstasche für das Peptid ausbilden zu können. Der zweite auffällige Unterschied betrifft das humanisierte **H92A***, das im Komplex mit dem NVP-Peptid um ca. 40° in Richtung der Carbonylgruppe des α,α -disubstituierten Ac_{3c}²⁵-Rests gekippt ist. Eine Überlagerung des NVP-Peptids (im Komplex mit hXDM2) im Vergleich zu den beiden p53-Peptiden (im Komplex mit HDM2 bzw. XDM2) zeigt, daß sich die relativen Positionen der beiden für die Bindung wichtigsten Reste Phe¹⁹ und 6-Cl-Trp²³ im Vergleich zum Komplex mit dem unmodifizierten p53-Peptid nur minimal verändert haben (Abb. 5.5.13)¹⁴. 6-Cl-Trp²³ sitzt in der Struktur des hXDM2-NVP-Komplexes etwas tiefer in der hydrophoben Tasche als im XDM2-p53-Komplex und etwas über der Position im HDM2-p53-Komplex. Das Chlor-Atom als Substituent in der 6-Position des Indolrings von Trp²³ füllt die vorhandene hydrophobe Tasche besser aus als im p53-Peptid. Phe¹⁹ befindet sich an derselben Position wie im XDM2-p53-Komplex, allerdings ist Phe¹⁹ im

¹⁴ Die Unterschiede im Vergleich zum IP3-Peptid waren abgesehen von Unterschieden durch die unterschiedliche Aminosäuresequenz der Peptide noch schwächer ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

HDM2-p53-Komplex leicht in Richtung von Trp²³ verschoben. Im Rahmen der Humanisierung wurde P92A gegen das voluminösere H92A* ausgetauscht; es liegt in der Struktur von hXDM2 in der gleichen Position wie der homologe H96A-Rest in HDM2, allerdings wie schon erwähnt um ca. 40° gekippt. Vermutlich als Folge dieser Mutation ist das C-terminale Leu²⁶ im NVP-Peptid im Vergleich zur Struktur des nicht humanisierten XDM2 in Richtung der Position von Leu²⁶ im humanen HDM2-p53-Komplex verschoben. Im Vergleich zur Struktur des humanen HDM2-p53-Komplexes kommen die beiden C-terminalen Methylgruppen von Leu²⁶ in dem hier vorgeschlagenen Strukturmodell für den hXDM2-NVP-Komplex allerdings durch eine 160° Drehung um die C_β-C_γ-Bindung in einer alternativen Rotamer-Konformation zu liegen. Die beiden anderen bei der Humanisierung konservativ veränderten Reste I50L* und L95I* haben keinen signifikanten Einfluß auf die Konformation der Peptide und zeigen zudem auch keine auffälligen Unterschiede zur Struktur von HDM2, was für den prinzipiellen Erfolg der Humanisierung der p53-Peptidbindungsstelle in XDM2 spricht.

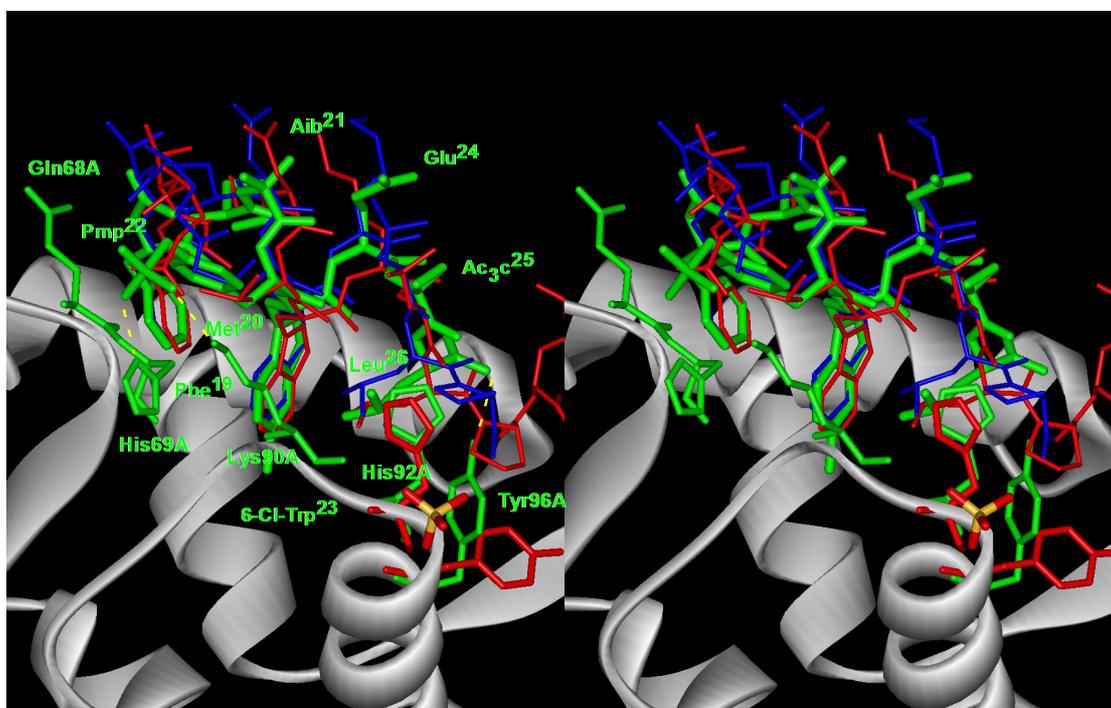


Abb. 5.5.13: Überlagerung des NVP-Peptids im Komplex mit hXDM2 mit den p53-Peptidstrukturen aus den Komplexen mit HDM2 und XDM2. Die Struktur des NVP-Peptids (19-26) ist in grün vor dem Hintergrund der hXDM2 Sekundärstruktur gezeigt. Das p53-Peptid im Komplex mit HDM2 (AS 17-29) ist in rot, das p53-Peptid im Komplex mit XDM2 (AS 17-29) in blau gezeigt (Kussie *et al.*, 1996). Die Reste H92A*, Y96, K90, H69, Q68 und das Sulfat-Ion sind als Stabdarstellung in grün für hXDM2 und rot für HDM2 gezeigt. Die Sequenzen der NVP- und p53-Peptide unterscheiden sich bis auf die essentiellen Reste Phe¹⁹, Trp²³ und Leu²⁶.

6 DISKUSSION

6.1 Untersuchungen an der p53 DNA-Bindungsdomäne

Die Inaktivierung des Transkriptionsfaktor p53 ist von zentraler Bedeutung bei der Entwicklung von Krebs. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit biochemische und strukturelle Untersuchungen mit der p53 DBD durchgeführt, die für die Transkriptionsaktivität von p53 essentiell ist. Wildtyp und mutante p53 DBDs standen in den letzten Jahren im Fokus verschiedener biochemischer und biophysikalischer Untersuchungen zur **Faltung und Funktion von p53** (Balagurumoorthy *et al.*, 1995; Bargonetti *et al.*, 1993; Pavletich *et al.*, 1993). Diese Studien zeigten, daß wildtyp p53 DBD eine geringe thermodynamische Stabilität aufweist (Bullock *et al.*, 1997; Bullock *et al.*, 2000). Die meisten Mutationen führen zu einer thermodynamischen Destabilisierung durch lokale strukturelle Veränderungen (Bullock *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1999). Die Kristallstruktur der p53 DBD im Komplex mit DNA (Cho *et al.*, 1994) zeigte, daß fast alle bekannten Mutationen Aminosäure-Reste betreffen, die entweder in direktem Kontakt mit der DNA stehen oder die Tertiärstruktur der DBD aufrechterhalten. Allerdings bindet in der Kristallstruktur nur eine von drei p53 DBDs sequenzspezifisch an DNA, während die beiden anderen Domänen durch Kristallpackungseffekte nicht bzw. nicht spezifisch an DNA binden. Kürzlich wurde die Kristallstruktur der freien murinen p53 DBD aufgeklärt (Zhao *et al.*, 2001), die eine ähnliche Kristallpackung wie die Struktur im Komplex mit DNA aufweist. NMR-spektroskopische Untersuchungen erlaubten Einblick in die Faltung von wildtyp und mutanten p53 DBDs in Lösung (Wong *et al.*, 1999).

Die Überexpression von Proteinen in *E. coli* führt oft zur irreversiblen Bildung von unlöslichem Protein, das in den Zellen in Form von **inclusion bodies** anfällt. Insbesondere wenn die Proteinsynthese bei 37°C und optimalen Wachstumsbedingungen sehr effizient erfolgt und damit die Kapazität der Zelle zur Proteinfaltung übersteigt, können nicht gefaltete Bereiche über hydrophobe Kräfte aggregieren und zur Bildung von IBs führen. Dies kann für die Expression humaner Proteine in *E. coli* ein Problem darstellen. Durch Absenken der Induktionstemperatur und damit einer Verringerung der hydrophoben Wechselwirkungen und einer Verlangsamung des Bakterienstoffwechsels und der Proteinsynthese kann die Bildung von IBs vermindert und die Bildung von löslichem Protein gefördert werden. Andererseits bietet die starke Überexpression in IBs gefolgt von der **In-Vitro-Faltung** des betrachteten Proteins einige Vorteile. Versuche mit f.l. p53 zeigten, daß es grundsätzlich möglich ist, tetrameres p53 Protein durch *In-Vitro-Faltung* in kleinen Mengen herzustellen (Bell, 2001; Bell *et al.*, 2002a). Für vergleichende biochemische und strukturelle Untersuchungen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein effizientes **In-Vitro-Faltungs- und Reinigungsprotokoll** für die p53 DBD und N-terminal verlängerte p53 DBD Konstrukte etabliert. Zur Optimierung der Faltungsbedingungen fand dabei ein für p53 adaptierter faktorieller Faltungsscreen Anwendung (Armstrong *et al.*, 1999; Chen und Gouaux, 1997). Die *In-Vitro-Faltung* wurde durch verschiedene Additive im Hinblick auf die drei Parameter Ausbeute, monomeres Protein und DNA-Bindungsaktivität optimiert (Buchner und Rudolph, 1991; Lilie *et al.*, 1998; Rudolph und Lilie, 1996). Die optimalen *In-Vitro-Faltungsbedingungen* sollten so gewählt sein, daß sie eine Aggregation während der Faltung verhindern und die zellulären Faltungsbedingungen imitieren (Beissinger und Buchner, 1998; Schwarz *et al.*, 1996). Der faktorieller Ansatz ermöglichte zusammen mit der quantitativen Auswertung der Ergebnisse eine zuverlässige und universell

anwendbare **Optimierung der *In-Vitro*-Faltungsbedingungen**. Mit dem in einem Durchgang optimierten *In-Vitro*-Faltungsprotokoll wurde gegenüber einem vorläufigen Protokoll eine Steigerung der Ausbeute um den Faktor 4 erzielt. Die Untersuchung der Funktionalität der DNA-Bindung der *in vitro* gefalteten p53 DBD sowie der Vergleich der biochemischen und spektroskopischen Eigenschaften mit der aus der löslichen Fraktion von *E. coli* gewonnen p53 DBD (Bullock *et al.*, 1997; Cho *et al.*, 1994) zeigte, daß die *in vitro* gefaltete und die löslich exprimierte p53 DBD in ihren Eigenschaften übereinstimmen. Diese Schlußfolgerung wird letztlich durch die Identität des HSQC-Spektrums der *in vitro* gefalteten p53 DBD mit dem Spektrum einer löslich exprimierten, Thrombin-gespaltene GST-p53 DBD sowie mit dem im Verlauf der Arbeit publizierten HSQC-Spektrum der p53 DBD (Wong *et al.*, 1999) unterstützt. Die konformationell labile und wenig stabile p53 DBD kann demgemäß durch *In-Vitro*-Faltung in einer Form dargestellt werden, die für die in dieser Arbeit beschriebenen weiterführenden biochemische, strukturellen und funktionellen Studien geeignet ist. Die *In-Vitro*-Faltung bietet mit ihrer hohen Ausbeute an reiner monomerer und funktioneller p53 DBD gegenüber der Reinigung aus dem löslichen Überstand Vorteile. Dazu zählen: i) Die hohe Expressionsausbeute¹⁵ durch Wachstum bei 37°C; insbesondere bei Hochdichte-Fermentation der Bakterien, bei der eine lösliche Expression aufgrund der optimalen Wachstumsbedingungen und der niedrigen notwendigen Temperatur schwierig ist. ii) Die hohe Reinheit des Proteins nach Isolation und Vorreinigung der IBs, als deren Folge die p53 DBD nach *In-Vitro*-Faltung eine sehr hohe Reinheit hat; so daß im weiteren Verlauf auf zusätzliche Reinigungsschritte wie die Verwendung einer Heparin HiTrap-Säule verzichtet werden kann, welche zur Reinigung der löslichen p53 DBD notwendig ist¹⁶ (Bullock *et al.*, 1997).

Trotz großer Anstrengungen ist das p53 System kristallographisch strukturell schwer zugänglich, was auf die geringe Stabilität und vermutlich auf die inhärente Flexibilität der NTD und CTD zurückzuführen ist (siehe unten) und durch das Fehlen struktureller Information für das intakte tetramere p53 Protein illustriert wird. In dieser Arbeit wurde versucht, durch kristallographische Studien Einblick in die Regulation der DNA-Bindung der p53 DBD zu gewinnen. Da die in der Literatur beschriebenen Voraussetzungen der allosterischen Regulation der p53 DNA-Bindung als nicht zutreffend erkannt wurden (siehe Kapitel 5.2), konnten allerdings Versuche einer Cokristallisation der p53 DBD mit C-terminalen p53 Peptiden nicht erfolgreich sein. Bei der Kristallisation der freien humanen p53 DBD ergaben sich kleine Kristalle. Die Streufähigkeit dieser **Kristallplättchen** reichte mit ca. 4 Å trotz diverser Optimierungsversuche nicht für eine Lösung der Struktur aus. Möglicherweise könnte jedoch eine weitere Optimierung und das Messen eines Datensatz der Apo-p53 DBD Kristalle mit Synchrotron-Strahlung eine Lösung der Struktur ermöglichen. Die höhere Reinheit der *in vitro* gefalteten p53 DBD erschien für die Proteinkristallisation von Bedeutung. So kristallisierten Präparationen der *in vitro* gefalteten freien p53 DBD unter mehreren Bedingungen, während die aus der löslichen Fraktion gereinigte p53 DBD Präparation unter diesen Bedingungen nicht kristallisierte. Trotz der bekannten Strukturen könnte eine Kristallstruktur der freien humanen p53 DBD mögliche (konformationelle) Unterschiede zu den Kristallstrukturen der humanen p53 DBD im Komplex mit DNA (Cho *et al.*, 1994)

¹⁵ Eine maximale Ausbeute ist für die kostenintensive Gewinnung von Isotopen-markierten p53 DBDs für NMR-spektroskopische Studien von Bedeutung.

¹⁶ Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde für die Charakterisierung der p53 DBD im Vergleich zu p53 Fragmenten und zur p63 DBD jedoch auch auf löslich exprimierte Präparationen zurückgegriffen.

bzw. mit 53BP1 (Joo *et al.*, 2002) und 53BP2 (Gorina und Pavletich, 1996) sowie zu der im Verlauf dieser Arbeit publizierten Kristallstruktur der freien murinen p53 DBD (Zhao *et al.*, 2001) aufzeigen. Die Cokristallisation bzw. *soaking* Experimente von Apo-p53 DBD Kristallen mit niedermolekularen Verbindungen wie z.B. CP-31398 oder PRIMA-1 könnte zudem die Entwicklung von p53-stabilisierenden Substanzen beschleunigen. Schließlich könnte eine andere Kristallpackung auch Einblick in die native Anordnung der p53 DBDs im tetrameren p53 Komplex gewähren (siehe Kapitel 6.3). Versuche zur Kristallisation eines N-terminal verlängerten p53 DBD Konstrukts 1801-p53 DBD (AS 40-312) und des Konstrukt p53C312 (AS 1-312) alleine und im Komplex mit seinem N-terminalen Bindungspartner hXDM2 (13-119) waren ebenso wie Versuche durch Cokristallisation mit tetrameren bzw. dimeren p53 Consensus-DNA-Oligonukleotiden strukturellen Einblick in die native Anordnung der p53 DBDs im Komplex mit DNA zu gewinnen, nicht erfolgreich. Daher wurden in der Folge parallel NMR-spektroskopische Untersuchungen des p53 DBD-DNA-Komplexes durchgeführt, die Einblick in die Organisation des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes ermöglichten (siehe Kapitel 5.3) (Klein *et al.*, 2001b).

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten mit der Gewinnung ausreichender Mengen von homogenen p53 Präparationen für biophysikalische und strukturelle Studien gibt es bis heute nur wenige Erkenntnisse zur **Struktur und Stabilität des vollständigen tetrameren p53 Proteins**. Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. S. Bell, L. Müller und Prof. Dr. J. Buchner (Lehrstuhl für Biotechnologie, Technische Universität München) wurden verschiedene p53 Konstrukte biochemisch und biophysikalisch charakterisiert, um die p53 DBD im Kontext des Gesamtproteins zu untersuchen und weiteren Einblick in die Struktur und Funktion von p53 zu gewinnen. Alle p53 Konstrukte wurden in *E. coli* exprimiert und waren nicht posttranslational modifiziert. Zuerst wurde die DNA-Bindungsaktivität der Konstrukte untersucht. Die monomere p53 DBD und p53C312 binden kooperativ an DNA (Balagurumoorthy *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995b). Tetrameres p53 und N93p53 dagegen sind latent und müssen durch Zugabe des monoklonalen Antikörpers PAb 122 zur DNA-Bindung aktiviert werden (Ahn und Prives, 2001). Die Beobachtung, daß N93p53 ebenso wie p53 durch PAb 122 aktiviert werden kann, zeigt allerdings, daß die Gegenwart der NTD für die Regulation der DNA-Bindung nicht essentiell ist. Die Modelle für die Latenz der DNA-Bindung von p53 werden in Kapitel 6.2 näher diskutiert. Das hohe apparente Molekulargewicht, das in der Gelfiltration beobachtet wurde, läßt vermuten, daß bis auf die isolierte p53 DBD alle p53 Konstrukte eine ungewöhnliche Form haben (Friedman *et al.*, 1993), vermutlich als Folge der konformationellen Flexibilität der unstrukturierten Bereiche zusammen mit der durch die TD erzwungenen D₂-symmetrischen Anordnung der Monomere (Clare *et al.*, 1995a; Jeffrey *et al.*, 1995). Die spektroskopische Analyse von p53 und den p53 Fragmenten ermöglichte es, die einzelnen Domänen im Vergleich zum gesamten p53 Protein eingehend strukturell zu charakterisieren. Zur Abschätzung der Sekundärstruktur wurde CD-Spektroskopie zusammen mit Sequenz-basierten Algorithmen zur **Sekundärstrukturvorhersage** eingesetzt. Alles in allem ergibt sich eine gute Korrelation zwischen der Strukturvorhersage und der strukturellen Information, die in der Literatur vorhanden ist. Vorhersage und Dekonvolution von CD-Spektren zeigten beide, daß das tetramere p53 Protein große unstrukturierte Bereiche enthält, die ungefähr zwei Drittel des Proteins ausmachen, während der Großteil an Sekundärstruktur in der DBD und TD konzentriert ist.

Die Untersuchung der **Stabilität** der p53 Konstrukte bestätigte die Schlußfolgerungen aus der Spektroskopie. Im Gegensatz zur p53 DBD und TD existiert für f.l. p53 nur ein beschränktes Maß an thermodynamischen Daten. Da p53 und N93p53 irreversibel entfalten, können die Daten nur auf qualitativer Ebene verglichen werden. Die Entfaltungs- und Thermoübergänge von p53 DBD und p53C312 unterscheiden sich kaum, so daß angenommen werden kann, daß p53C312 aus der stabil gefalteten DBD und einer NTD besteht, die keine Sekundärstruktur aufweist. p53 und N93p53 dagegen zeigen beide zweiphasige Übergänge. Der Vergleich mit der p53 DBD läßt es als wahrscheinlich erscheinen, daß der erste Übergang der Entfaltung der DBD entspricht (Bullock *et al.*, 1997), wogegen der zweite Übergang vermutlich die Entfaltung der TD widerspiegelt (Johnson *et al.*, 1995; Mateu und Fersht, 1998). Die relativ große Signalveränderung, die mit dem zweiten Übergang einhergeht, impliziert gleichzeitig eine Abnahme der Sekundärstruktur, die bei einer einfachen Dissoziation eines oligomeren Proteins in seine Untereinheiten nicht beobachtet werden sollte. Es ist auffallend, daß auf der Basis der Sekundärstruktur (CD-Spektroskopie) der Entfaltungsübergang für die p53 DBD im Kontext der tetrameren Proteine leicht nach rechts verschoben ist (1.2-1.3 M vs. 1.1 M GdnCl), was für eine leichte Stabilisierung der p53 DBD im tetrameren Protein sprechen würde, obwohl die Thermostabilität der monomeren Konstrukte p53 DBD und p53C312 in bezug auf alle anderen Parameter (Tertiärstruktur in der Fluoreszenz-Spektroskopie, Kalorimetrie und funktionelle DNA-Bindungstest) signifikant höher als die der tetrameren p53 Konstrukte ist. In Übereinstimmung mit den Daten der chemischen Entfaltung kann für p53C312 nur ein Entfaltungsübergang in der Kalorimetrie beobachtet werden. Diese Schlußfolgerungen sind in Übereinstimmung mit früheren Publikationen, nach denen die DNA-Bindung von p53 sehr temperaturempfindlich ist (Ponchel und Milner, 1998) und mit einem Verlust der Quartärstruktur und Aggregation einhergeht (Friedlander *et al.*, 1996; Hainaut *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1996a). Auf funktioneller Ebene wurde bestätigt, daß dem Verlust der strukturellen Integrität der Verlust der DNA-Bindungsaktivität vorangeht. So ist nach 5 min bei 25°C die DNA-Bindungsaktivität um 50% reduziert, obwohl in der CD-Spektroskopie bei dieser Temperatur noch kein Verlust der Struktur festgestellt werden kann. Im Gegensatz zu einer kürzlichen Publikation, in der mit einem T_m von 73°C und DNA-Bindungsaktivität bis zu 50°C eine bemerkenswert hohe Thermostabilität für p53 nachgewiesen wurde¹⁷ (Nichols und Matthews, 2001a; Nichols und Matthews, 2001b), implizieren die Daten alles in allem, daß tetrameres N93p53 und f.l. p53 gegenüber der isolierten p53 DBD thermodynamisch destabilisiert sind und schon bei niedrigen Temperaturen entfaltet vorliegen. In der erwähnten Untersuchung (Nichols und Matthews, 2001a; Nichols und Matthews, 2001b) wurde die unwahrscheinlich hohe Thermostabilität von f.l. p53 auf intramolekulare Domänenwechselwirkung zurückgeführt und durch DNA-Filterbindungstests und CD-Spektroskopie nachgewiesen; kalorimetrische Untersuchungen und eine Analyse des oligomeren Zustands der p53 Präparation durch Gelfiltration wurden allerdings nicht durchgeführt. Da die p53 Präparation nicht durch Gelfiltration gereinigt wurde, obwohl p53 aufgrund der großen exponierten hydrophoben Bereiche in der NTD eine Neigung zur Bildung großer oligomerer Aggregate hat, könnte die hohe beobachtete Stabilität der f.l. p53 Präparation auf die Anwesenheit von löslichen p53 Aggregaten zurückzuführen sein, die möglicherweise eine erhöhte Thermostabilität zeigen und weder in DNA-Filterbindungstests noch in

¹⁷ Die isolierte p53 DBD weist einen T_m von 42-45°C auf (Bullock *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 2001).

der CD-Spektroskopie von tetrameren nativen Spezies unterschieden werden können. Zusammen mit der Beobachtung, daß der Sekundärstrukturgehalt von p53 mit dem der isolierten p53 Domänen übereinstimmt, legen die durchgeführten Experimente die Schlußfolgerung nahe, daß es im vollständigen tetrameren f.l. p53 Protein **keine stabilisierenden Interdomänen-Wechselwirkungen** gibt. Diese Schlußfolgerung wurde kürzlich durch umfassende NMR-Experimente mit p53 Dimeren bestätigt (Ayed *et al.*, 2001).

p53 ist ein Protein mit einer niedrigen Halbwertszeit *in vivo*. Vor dem Abbau durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg (Woods und Vousden, 2001) ist die Entfaltung des Proteins notwendig. Die *in vitro* Daten zeigen, daß p53 ein instabiles und **konformationell flexibles Protein** ist, das leicht entfalten kann. Auf der Grundlage dieser Evidenzen kann postuliert werden, daß p53 *in vivo* in einem Gleichgewicht zwischen einem partiell gefalteten funktionellen Zustand und einem entfalteten, aggregationsanfälligen Zustand vorliegt. Dieses Gleichgewicht könnte durch posttranslationale Modifikationen und die Interaktion mit molekularen Chaperonen wie Hsp90 oder Hsp70 (Whitesell *et al.*, 1998; Zylicz *et al.*, 2001), oder Partnerproteinen wie MDM2 (Botuyan *et al.*, 1997; Uesugi und Verdine, 1999) oder S100B (Delphin *et al.*, 1999) beeinflusst werden, die eine Struktur in der Bindungsregion induzieren und p53 vor einer thermischen Inaktivierung schützen können. In Übereinstimmung damit wurde für ein kurzes von der CTRD abgeleitetes Peptid (AS 367-388) gezeigt, daß es erst im Komplex mit S100B eine helikale Struktur einnimmt (Rustandi *et al.*, 2000). NMR-Experimente zeigten zudem, daß kurze N-terminale Strukturelemente nur kurzzeitig besetzt sind (Botuyan *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2000), und daß die Faltung vermutlich nicht induziert wird, bevor es zur Komplexbildung mit Cofaktoren wie MDM2 kommt (Kussie *et al.*, 1996; Uesugi und Verdine, 1999). Zu seiner Aktivierung wird p53 schnell phosphoryliert (Ryan *et al.*, 2001; Woods und Vousden, 2001). Kürzlich wurde gezeigt, daß die Phosphorylierung der NTD zu konformationellen Änderungen führt, die eine Interaktion mit Proteinen der Transkriptionsmaschinerie wie p300/CBP erlauben könnte (Kar *et al.*, 2002). Wie es am Beispiel von p53 S392E illustriert wurde, könnten Phosphorylierungsstimuli außerdem zu konformationellen Umlagerungen führen (Nichols und Matthews, 2002). So kann die Mutation S392E, die eine Phosphorylierung von Ser-392 nachahmt, p53 thermodynamisch stabilisieren. Zusammengefasst betonen die Ergebnisse, daß das native p53 Protein ein komplexes Multidomänenprotein mit großen teilweise unstrukturierten und flexiblen Bereichen und einer niedrigen Gesamtstabilität ist (Goodsell, 1999). Es könnte daher der wachsenden Klasse von lose gefalteten bzw. **partiell unstrukturierten Proteinen** zugeordnet werden (Wright und Dyson, 1999). Das Konzept der intrinsisch flexiblen und teilweise ungeordneten Proteine steht in einem engen Zusammenhang mit Bindungsdiversität und der Potenzierung von Protein-Protein-Interaktionen (Dyson und Wright, 2002) wie z.B. für p21 (Kriwacki *et al.*, 1996) und p14^{ARF} (Bothner *et al.*, 2001) gezeigt. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Proteinen identifiziert, denen eine intrinsische globuläre Struktur fehlt. Das Fehlen einer Struktur scheint aber in allen Fällen mit funktionellen Vorteilen einherzugehen (Wright und Dyson, 1999). Im Falle von p53 könnte strukturelle Flexibilität geradezu eine Notwendigkeit sein, da p53 als zentrale Schaltstelle eine Vielzahl von Signalen durch die Interaktion mit einer noch nicht überschaubaren Anzahl von Proteinen integrieren muß, um so die Zelle vor Schäden zu schützen und zwischen Proliferations- und Apoptose-Signalen zu unterscheiden.

Die fehlerhafte Faltung und Aggregation von Proteinen wird mit neurodegenerativen Erkrankungen und Amyloidosen in Verbindung gebracht (Bucciantini *et al.*, 2002; Radford und Dobson, 1999). Ein therapeutischer Ansatz besteht in der Korrektur von Proteinmißfaltung durch Peptide oder niedermolekulare Verbindungen (Soto, 2001), die unter dem Begriff der chemischen oder pharmakologischen Chaperone zusammengefaßt werden (Morello *et al.*, 2000). Beispiele für die Anwendung **chemischer Chaperone** umfassen das CFTR-Protein (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Sato *et al.*, 1996), α 1-Antitrypsin (Burrows *et al.*, 2000), verzweigt-kettige α -Ketosäure Decarboxylase (Song und Chuang, 2001), Prionprotein- und β -Amyloid-Aggregation (Perrier *et al.*, 2000; Soto *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1999b) sowie die Wiederherstellung der wildtyp Konformation von mutantern p53 (Bullock und Fersht, 2001; DeDecker, 2000).

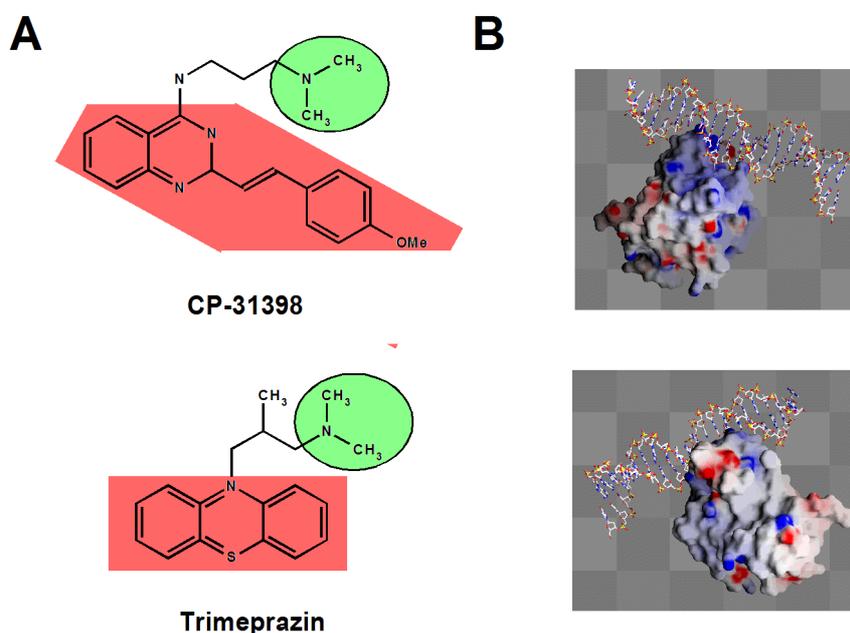


Abb 6.1: Stabilisierung der wildtyp Konformation der p53 DBD durch niedermolekulare Verbindungen. **A)** Strukturformel zweier Vertreter der Substanzklasse, für die eine Stabilisierung der p53 wildtyp Konformation beschrieben wurde. Die hydrophobe Gruppe ist rot, die hydrophile Gruppe grün gekennzeichnet. **B)** Oberflächenpotential der p53 DBD entsprechend der Kristallstruktur der p53 DBD (Cho *et al.*, 1994) aus zwei Raumrichtungen (PDB-Code: 1TSR, Kette B). Es ist keine putative Bindungsstelle offensichtlich. Das Oberflächenpotential wurde mit Grasp berechnet (rot: sauer; blau: basisch) (Nicholls *et al.*, 1993).

Da die DNA-bindungsaktive Konformation des Tumorsuppressors p53 in 50% aller Tumoren durch Mutationen inaktiviert ist, bestand neben Ansätzen die DNA-Bindungsaktivität durch C-terminale Peptide wiederherzustellen (Selivanova *et al.*, 1997) (siehe Kapitel 6.2), die Idee, die wildtyp Konformation bestimmter Konformations-Mutanten der p53 DBD durch niedermolekulare Verbindungen zu stabilisieren (Anderson und Tegtmeyer, 1995; Bullock *et al.*, 1997; Harris, 1996; Hupp *et al.*, 2000; Milner, 1995; Wong *et al.*, 1999). Beispielsweise führen Consensus-DNA und Heparin zu einer (Thermo-) Stabilisierung der p53 DBD (Bullock *et al.*, 1997; Nikolova *et al.*, 1998). Für Glycerin und TMAO sowie für das Aminothiold WR1065 (Aminofostine) wurde beschrieben, daß sie die aktive wildtyp Konformation von Temperatur-sensitiven p53 Mutanten *in vivo* stabilisieren können

(Brown *et al.*, 1997; Maurici *et al.*, 2001; North *et al.*, 2000; North *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2000; Ohnishi *et al.*, 1999a; Ohnishi *et al.*, 1999b). In einem *random screen* mit einer Substanzbibliothek von >100000 niedermolekularen Verbindungen wurde eine Substanzklasse identifiziert, die das PAb 1620-Epitop der wildtyp Konformation der p53 DBD (Milner *et al.*, 1987) gegenüber Hitzedenaturierung stabilisieren soll (Foster *et al.*, 1999). CP-31398 als potentester Vertreter dieser Klasse von Verbindungen ist pharmakologisch aktiv und weist eine anti-Tumor-Aktivität in Tiermodellen auf (Coffey *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 1999). Zudem wurde gezeigt, daß CP-31398 eine spezifische p53 Antwort und Apoptose in Tumorzellen induzieren kann (Smith und Fornace, 2002; Takimoto *et al.*, 2002). Gemeinsames Merkmal dieser Klasse von Substanzen (*structure activity relationship, SAR*) ist jeweils eine hydrophobe (R1) und eine hydrophile Gruppe (R2), die über einen definierten Linker (L) miteinander verbunden sind (Abb. 6.1A). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, daß diese Substanzklasse über die beiden Gruppen an zwei unterschiedliche Bindungsstellen auf der Oberfläche der p53 DBD binden, und so die wildtyp Konformation der Domäne stabilisieren könnte. Allerdings existieren für diesen Mechanismus weder Bindungskonstanten noch publizierte strukturelle Evidenzen; auch sind auf der Oberfläche der p53 DBD keine offensichtlichen Bindungsstellen (*cavities*) z.B. für virtuelle *docking* Experimente auszumachen (Abb. 6.1B). **CP-31398 und Trimeprazin**, ein von Sigma frei erhältliches Derivat aus dieser Substanzklasse (Foster *et al.*, 1999), wurden im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf die Stabilisierung der p53 DBD untersucht (Daten nicht gezeigt). In der Patentschrift wurde für Trimeprazin ein EC₅₀ von 38 µM bei der Stabilisierung der PAb 1620-positiven Konformation beschrieben (Coffey *et al.*, 2000). Bei der Reproduktion der Ergebnisse mit löslich exprimierten wildtyp und mutanten p53 DBDs sowie mit *in vitro* gefalteter p53 DBD konnte mit einem 10-20-fachen Überschuß an CP-31398 bzw. Trimeprazin im EMSA allerdings keinerlei Schutz der DNA-Bindungsaktivität gegenüber Erwärmung beobachtet werden. Auch war in DSC-Experimenten keine Thermostabilisierung mit einer Verschiebung des Schmelzpunkts nachweisbar. Zudem war durch Fluoreszenztitration und ITC keine direkte Bindung nachweisbar und durch *chemical shift perturbation mapping* mit [¹⁵N]-p53 DBD NMR-spektroskopisch keine Interaktionsstelle lokalisierbar. Die Zugabe der Substanz führte schließlich auch nicht zu einer Verbesserung des Kristallisationsverhaltens der p53 DBD¹⁸. Bis auf die beobachtete p21 Induktion deuteten in unserem Labor erhobene zelluläre Daten mit verschiedenen Tumorzelllinien auf eine unspezifische und damit p53-unabhängige Toxizität der Substanz in p53-negativen Zelllinien hin. Auch auf f.l. p53 hat die genannte Substanz keinen stabilisierenden Einfluß (Daten nicht gezeigt und S. Bell, pers. Mitteilung). Parallel zu diesen Untersuchungen konnten von anderen Arbeitsgruppen für CP-31398 und Derivate ebenfalls weder eine Stabilisierung noch eine direkte Bindung oder die beschriebenen p53-spezifischen zellulären Effekte nachgewiesen werden (A. Fersht, pers. Mitteilung) (Friedler *et al.*, 2002; Rippin *et al.*, 2002a). Vielmehr erwies sich CP-31398 als DNA-Interkalator. Da sich die Stabilität und Konformation der klassischen DNA-Kontaktmutante R273H zudem kaum vom wildtyp unterscheidet (Bullock *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1999), stellt sich darüber hinaus die Frage, wie CP-31398 einerseits die Konformation von Konformationsmutanten wiederherstellen und andererseits gleichzeitig die für die DNA-Bindung essentiellen Aminosäure-Reste in Kontaktmutanten ersetzen kann. Der postulierte Mechanismus der Substanzen ist

¹⁸ *Soaking*-Experimente mit den vorhandenen p53 DBD Kristallplättchen waren nicht möglich.

daher alles in allem fragwürdig (Rippin *et al.*, 2002b). Es wäre denkbar, daß CP-31398 die DNA-Bindungsaktivität von mutantern p53 während der Biosynthese wiederherstellt. Möglicherweise binden die Substanzen nur an einen Übergangszustand während der Entfaltung bzw. an einen kleinen Anteil der p53 Präparation, der mit den gewählten Methoden nicht nachweisbar ist. So führt F. Rastinejad den negativen Ausgang der Experimente darauf zurück, daß alle p53 DBD Präparationen nur ca. 5% CP-31398-bindungsaktives und mit dem Konformationsantikörper PAb 1620 reaktives p53 Protein enthalten (Rippin *et al.*, 2002a). Um diese Hypothese zu prüfen, könnte der Frage nachgegangen werden, ob sich bei einer *in vitro* Translation bzw. durch Variation der *In-Vitro*-Faltungsbedingungen Unterschiede in der Stabilität, Konformation, Struktur und Funktionalität der p53 DBD ergeben (z.B. im Hinblick auf DNA-Spezifität, Reaktivität mit PAb 1620 oder Fähigkeit zur Interaktion mit CP-31398 und stabilisierenden Peptiden); und ob dies möglicherweise durch die Gegenwart von CP-31398 beeinflusst werden kann. Erste Experimente zeigten zumindest keine Unterschiede in der Ausbeute an aktivem Protein nach *In-Vitro*-Faltung in Gegenwart von CP-31398. In diesem Zusammenhang wäre es ebenfalls interessant, erstmals *in vitro* den Einfluß von chemischen Chaperonen wie TMAO und Glycerin auf die Stabilität, Faltung, Konformation, Struktur und Dynamik der p53 DBD durch NMR-Spektroskopie und Kalorimetrie ähnlich p19^{ARF} zu untersuchen (Renner *et al.*, 1998; Zeeb *et al.*, 2002). Untersuchungen der Dynamik und Konformation der p53 DBD bei der Entfaltung durch steigende Konzentrationen an chaotropen Reagenzien könnten helfen, die für die Faltung und strukturelle Integrität der Domäne essentiellen Bereiche zu identifizieren. Auch könnte die Hypothese geprüft werden, ob ohne die Anwesenheit der TD eine mutante p53 DBD in einer Prion-artigen Weise ihre mutante Konformation auf eine DNA-bindungsaktive wildtyp p53 DBD übertragen kann. Kürzlich wurde in einem zellulären Screen eine neuartige Substanz, **PRIMA-1**, identifiziert, die p53 Kontakt- und Konformationsmutanten reaktivieren und bei hohen Konzentrationen massive Apoptose in Zelllinien mit mutantern p53 sowie in Xenograft Tiermodellen induzieren soll (Bykov *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu CP-31398 stabilisiert die Inkubation mit dieser Verbindung die p53 wildtyp Konformation nicht, sondern soll sogar in der Lage sein, bereits synthetisiertes mutantes p53 in die aktive wildtyp Konformation zu überführen. Ob diese Vorhersagen zutreffen, wird aber erst die detaillierte Analyse von PRIMA-1 auf biochemischer und struktureller Ebene mit den erwähnten Methoden erweisen können. Da für CP-31398 und für PRIMA-1 Strukturinformation fehlt, wurden in einem semirationalen Ansatz auf der Basis der Kristallstruktur des p53 DBD-53BP2-Komplexes (Gorina und Pavletich, 1996) die mit p53 interagierenden Loops des p53 Interaktionspartner 53BP2 als kurze lineare Peptide synthetisiert und auf ihre stabilisierende Wirkung hin untersucht (Friedler *et al.*, 2002). Das von der SH3-Domäne von 53BP2 abgeleitete **CDB3 Peptid AS 490-498** interagiert mit der p53 DBD wie durch HSQC-Experimente nachgewiesen wurde und stabilisierte die Domäne in einer Chaperon-artigen Art Weise. So war CBD3 in der Lage in DSC-Experimenten die thermische Stabilität der wildtyp und R249S p53 DBD zu erhöhen sowie die DNA-Bindung von I195T wiederherzustellen. Die Aufklärung der Struktur dieses Peptidkomplexes sowie die Struktur der *loops* in der Struktur der p53 DBD im Komplex mit 53BP2 (Gorina und Pavletich, 1996) könnte als Ausgangspunkt für das semirationale Design von p53-stabilisierenden Substanzen dienen.

6.2 Das allosterische Modell der p53 Aktivierung

Außer der NMR-Struktur des C-terminalen Peptids im Komplex mit dem regulatorischen Protein S100B($\beta\beta$), die kürzlich gelöst wurde (Rustandi *et al.*, 2000), existiert für die CTRD von p53 bisher keine strukturelle Information. Durch NMR-Spektroskopie wurde gezeigt, daß das C-terminale Peptid eine α -helikale Struktur einnehmen kann, die durch Phosphorylierung aufgehoben wird (Hoffmann *et al.*, 1998). Das **allosterische Modell der p53 Regulation** geht davon aus, daß die CTRD mit der p53 DBD interagiert und das Protein so in einem latenten Zustand hält, bis die inhibitorische Interaktion durch Phosphorylierung bzw. Acetylierung der CTRD aufgehoben wird (Abb. 6.2A) (Gu und Roeder, 1997; Hupp und Lane, 1994a; Hupp *et al.*, 1995). Für dieses Modell existiert bis heute kein experimenteller Beweis, es war jedoch bis vor kurzem das allgemein akzeptierte Modell der p53 Regulation (Ahn und Prives, 2001; Prives und Hall, 1999). Die zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten Bindungsexperimente machten deutlich, daß entgegen den Vorhersagen in der Literatur vermutlich **keine Interaktionen** a) zwischen dem C-terminalen Peptid und der freien und der DNA-gebundenen DBD (Selivanova *et al.*, 1999), b) zwischen einem Peptid aus der Prolin-reichen Region der NTD und der DBD (Muller-Tiemann *et al.*, 1998), sowie c) zwischen der Prolin-reichen Region eines N-terminal verlängerten p53 DBD Konstrukts und dem C-terminalen Peptid (Kim *et al.*, 1999a) existieren. Damit ergaben sich keine Hinweise für die Richtigkeit des allosterischen Modells der p53 Regulation, welches eine direkte Interaktion zwischen C-terminalem Peptid und der p53 DBD postuliert. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die experimentellen Evidenzen das allosterische Modell nicht unterstützen bzw. seine Vorhersagen widerlegen (Ahn und Prives, 2001; Klein *et al.*, 2001b). Keine der durch Immunpräzipitationen und andere Methoden für p53 vorhergesagten Wechselwirkungen war mit den isolierten p53 Fragmenten nachweisbar. Nach Veröffentlichung dieser Daten wurde in einer weiteren biochemischen NMR-Studie, wenn auch auf einer anderen Fragestellung basierend, bestätigt, daß weder vom N-Terminus abgeleitete, noch vom C-Terminus abgeleitete (phosphorylierte) Peptide mit der p53 DBD interagieren (Friedler *et al.*, 2002).

Tab. 6.1: Übersicht über die postulierten Interaktionen der p53 DBD.

Postulierte Interaktionspartner		Interaktion ?	Zitat für Interaktion
C-terminale Peptide AS 361-382, AS 369-383	p53 DBD (94-312)	Nein	(Selivanova <i>et al.</i> , 1999)
Phosphorylierte C-terminale Peptide AS 369-393 (P2, P3)	p53 DBD (94-312)	Nein	(Friedler <i>et al.</i> , 2002)
N-terminales Peptid AS 76-94	p53 DBD (94-312)	Nein	(Muller-Tiemann <i>et al.</i> , 1998)
C-terminales Peptid AS 361-382	1801-p53 DBD (AS 40-312)	Nein	(Kim <i>et al.</i> , 1999a)

Die negativen Ergebnisse sind mit größter Wahrscheinlichkeit nicht darauf zurückzuführen, daß nur mit isolierten Domänen und Peptiden und nicht mit dem tetrameren Gesamtprotein gearbeitet wurde. Denn eine kürzlich veröffentlichte NMR-spektroskopische Untersuchung (Ayed *et al.*, 2001) kam mit künstlichen latenten und aktiven p53 Dimeren (Mulder *et al.*, 2000; Davison *et al.*, 2001) zu vergleichbaren Schlußfolgerungen. Diese Studie zeigte auf der Basis von HSQC-Spektren schlüssig, daß erstens **latente und aktive p53 Dimere** die gleiche Konformation besitzen und so

keine latente p53 Konformation existiert, sowie zweitens, daß im Gesamtprotein keine signifikanten Interaktionen zwischen den einzelnen Domänen bestehen und so keine Autoinhibition der p53 DBD durch die CTRD nachweisbar ist (Ayed *et al.*, 2001; Mulder *et al.*, 2000). Die Schlußfolgerung, daß keine bzw. allenfalls sehr schwache Interdomänenwechselwirkungen innerhalb des p53 Proteins bestehen, wird auch vom Vergleich der CD-Spektren des tetrameren p53 Gesamtproteins mit den CD-Spektren der isolierten Domänen bestätigt (siehe Kapitel 5.1).

Die durchgeführten Bindungsstudien implizierten allerdings, daß kleine Mengen an DNA-Spuren ausreichen können, um eine Bindung vorzutäuschen; insbesondere, da das C-terminale unmodifizierte p53 Peptid stark basisch ist und unspezifisch mit DNA-Oligonukleotiden (im Komplex mit p53 DBD) interagiert (siehe Kapitel 5.2) (Hoffmann *et al.*, 1998). Wenn man diese Interpretation berücksichtigt, könnten Spuren von unspezifischer DNA-Kontamination aus der Proteinpräparation mit Experimenten interferiert haben, die eine direkte Interaktion von GST-53 DBD mit dem C-terminalen Peptid beschrieben (Selivanova *et al.*, 1999). Die Ergebnisse unterstützen daher die aktuelle NMR-Studie zur Konformation von p53 (Ayed *et al.*, 2001) und favorisieren gegenüber dem allosterischen Modell ein alternatives **Interferenz-Modelle** der (negativen) p53 Regulation (Abb. 6.2B). Die alternativen Modelle haben gemeinsam, daß sie annehmen, daß die CTRD von p53 mit langer unspezifischer DNA interagiert, was eine spezifische DNA-Bindung verhindert (Anderson *et al.*, 1997; Bayle *et al.*, 1995; Nichols und Matthews, 2001b; Yakovleva *et al.*, 2001). Als Folge von Phosphorylierung (Hoffmann *et al.*, 1998) und Acetylierung der CTRD oder *in vitro* als Folge der Bindung von PAb 122 an die CTRD bzw. durch Konkurrenz mit freiem C-terminalem Peptid um die Bindung an unspezifische DNA wird die Bindung der CTRD an unspezifische DNA aufgehoben, so daß p53 spezifisch an DNA binden kann und seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben kann. Die Interpretation, daß die posttranslationale Modifikation (Acetylierung) der CTRD von p53 die Wechselwirkung mit DNA inhibiert, erscheint mit dem derzeitigen Wissensstand aus einem anderen Gesichtspunkt heraus wahrscheinlich (Bayle und Crabtree, 1997; Prives und Manley, 2001). Zwar sind konkrete Protein-Protein-Interaktion bekannt, die durch die (De-)Acetylierung eines Partnerproteins reguliert werden werden (Chen *et al.*, 1999a; Dhalluin *et al.*, 1999; Waltzer und Bienz, 1998). Acetylierungsprozesse werden zudem im Rahmen der Assemblierung von Acetyltransferase-Komplexen diskutiert. In dem meisten bekannten Fällen jedoch reguliert die Acetylierung von Proteinen direkt die Interaktionen mit DNA (Bannister *et al.*, 2000; Kouzarides, 2000). Kürzlich wurde ein weiteres Modell vorgeschlagen, nach dem ein inhibitorisches, aber bisher nicht identifiziertes Protein X mit der spezifischen DNA-Bindung interferiert (Abb. 6.2C) (Wiederschain *et al.*, 2001). In beiden Interferenzmodellen wird als Folge der Aktivierung die Interaktion mit unspezifischer DNA bzw. dem vermuteten Inhibitor aufgehoben, so daß p53 an seine Consensus-Bindungstelle binden und seine spezifischen Zielgene aktivieren kann. Möglicherweise könnte Mts1/S100A4 (Grigorian *et al.*, 2001) oder auch S100B(β) ein Kandidat für einen derartigen natürlichen Inhibitor darstellen (Rustandi *et al.*, 2000). Im Fall von S100B(β) wird die Situation zusätzlich dadurch kompliziert, daß es nicht nur mit der CTRD sondern auch mit für die Tetramerisierung essentiellen Regionen interagiert, und so die Tetramerisierung von p53 inhibiert (Lin *et al.*, 2001). Leider haben die Interferenzmodelle ebenfalls ihre Schwächen. Innerhalb der Interferenzmodelle ist es zwar nachzuvollziehen, daß Phosphorylierung bzw. Acetylierung die unspezifische

DNA-Bindung der CTRD oder eventuell auch die Bindung eines Inhibitors X aufheben könnte.

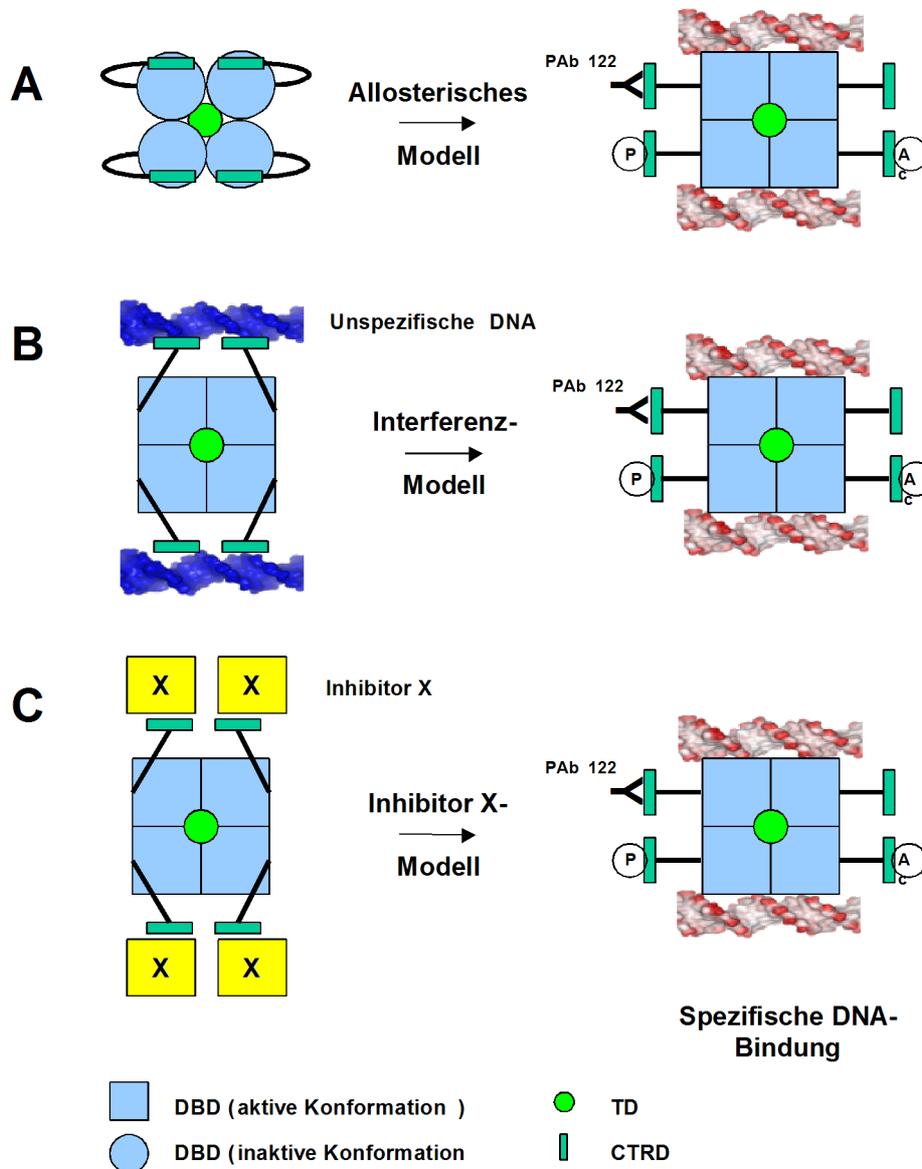


Abb 6.2: Modelle für die negative Regulation der spezifischen p53 DNA-Bindung der p53 DBD durch die CTRD. **A) Allosterisches Modell:** Im tetrameren p53 interagiert die CTRD mit der DBD und hält sie so in einer Konformation, die nicht an DNA binden kann. Durch posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung P, Acetylierung Ac), Bindung von Antikörpern (PAb 122) oder zellulären Proteinen wie Chaperonen, bzw. durch Deletion und Mutation der CTRD sowie durch Konkurrenz der CTRD durch freies C-terminales Peptid wird diese Interaktion aufgehoben; die DBD erfährt eine Konformationsänderung und kann spezifisch an DNA binden (Gu und Roeder, 1997; Hupp und Lane, 1994b). **B, C) Interferenz-Modelle:** Die Interaktion der CTRD mit unspezifischer DNA (Anderson *et al.*, 1997; Bayle *et al.*, 1995) oder einem vermuteten Inhibitor X (Wiederschain *et al.*, 2001) verhindert (aus sterischen Gründen) die Bindung der DBD an spezifische DNA. Erst wenn diese Interaktion durch Phosphorylierung oder Acetylierung bzw. durch Bindung von Antikörpern oder Konkurrenz mit C-terminalem Peptid aufgehoben wird, ist die DBD für eine Bindung an spezifische DNA frei, ohne daß es dabei zu einer Konformationsänderung kommt.

Auch würde die Zugabe von überschüssigem C-terminalem Peptid mit der CTRD um die Bindung an unspezifische DNA oder einen Inhibitor X kompetieren, und so die Interferenz mit der spezifischen DNA-Bindung aufheben. Allerdings ist es nach diesem Modell nicht zu verstehen, warum die Bindung eines voluminösen Antikörpermoleküls wie PAb 122 an die CTRD nicht mit der spezifischen DNA-Bindung interferieren sollte. Eine Vielzahl an biochemischen und an zellulären Studien hat gezeigt, daß die CTRD eine wichtige Rolle bei der Regulation von p53 spielt. Insbesondere wurde gezeigt, daß zellgängige, vom C-Terminus abgeleitete Peptide eine p53 Antwort mit der Induktion von Apoptose und Proliferationsinhibition in humanen Tumorzellen auslösen können (Kim *et al.*, 1999a; Selivanova *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anwendung von **Tat-gekoppelten C-terminalen Peptiden** etabliert, um diese Ergebnisse mit einem effizienten System zur Transduktion von Peptiden in Zellen nachzuvollziehen (Becker-Hapak *et al.*, 2001; Schwarze und Dowdy, 2000; Snyder und Dowdy, 2001; Wadia und Dowdy, 2002). Die Experimente machen deutlich, daß die Tat-vermittelte Peptidtransduktion eine effiziente Methode zur Transduktion von Peptiden in Zellen ist, die generell für eine Vielzahl von Zelllinien anwendbar erscheint. Nach kurzer Inkubation zeigen nahezu alle Zellen eine Aufnahme des Tat-Peptids in einer zeit- und konzentrationsabhängigen Art und Weise. In der Tat konnte als Folge der Inkubation mit Tat-C-terminalen Peptiden eine **spezifische konzentrationsabhängige transkriptionelle Aktivierung von p53** in einem p53 Luziferase-Reporter-Gen-Test beobachtet werden. Allerdings konnten weder eine Proliferationshemmung, noch die Induktion von Apoptose oder Zellzyklus-Arrest festgestellt werden. Dies kann möglicherweise auf die stark nukleoläre Lokalisation der Tat-C-terminalen Peptide zurückgeführt werden, da die Tat-Sequenz als starke nukleoläre Lokalisationssequenz wirkt (Dang und Lee, 1989). Aus diesen Überlegungen heraus wurden neue Tat-C-terminale Peptide synthetisiert, die über eine starke zusätzliche SV40 nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) verfügen. Diese Peptide zeigen auch nukleoläre Lokalisation, sind aber in hoher Konzentration im Nukleus zu finden. Eine erste Analyse dieser Peptide in unserem Labor scheint zu zeigen, daß sie effizient p53 Zielgene aktivieren und in hohen Konzentrationen auch spezifisch *membrane blebbing* und Apoptose in humanen p53-positiven Tumorzellen (H460) auslösen können, wogegen p53-defiziente Zellen (Saos-2) davon nicht betroffen sind (Teixeira, 2002). Um die starke nukleoläre Lokalisation zu umgehen, könnten zudem S-S verbrückte Tat-S-S-C-terminale Peptide synthetisiert werden, die intrazellulär im reduzierenden Milieu der Zelle gespalten werden.

Ein **weiteres Modell** zur Regulation von p53 wurde kürzlich in neueren Publikationen vorgeschlagen (Abb. 6.3) (Barlev *et al.*, 2001; Espinosa und Emerson, 2001; Kaeser und Iggo, 2002; Prives und Manley, 2001). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß im Gegensatz zum generell akzeptierten Standpunkt die p53 DNA-Bindung nicht von der Acetylierung beeinflusst wird, sondern daß p53 ohne Acetylierung bzw. ohne Antikörperbindung ein aktiv DNA-bindendes Protein ist, in dem die CTRD nicht inhibitorisch wirkt, sondern für die Assoziation mit bestimmten Zielsequenzen in der Promoterregion, insbesondere in den Nukleosomen, essentiell ist. Die Beobachtungen, die auf eine Latenz von p53 schließen ließen, wurden zwar von Espinosa und Emerson bestätigt, sind nach ihrer Interpretation aber darauf zurückzuführen, daß in den verwendeten experimentellen Systemen mit optimierten kurzen DNA-Consensus-Sequenzen und nicht mit DNA im natürlichen Kontext gearbeitet wird. Verwendet man dagegen die spezifischen DNA-Bindungsstellen im Kontext von langer unspezifischer DNA (>60 Nukleotide) oder im Kontext von

Chromatin, so ist keine negative Regulation durch die CTRD beobachtbar. Acetylierung, Antikörper-Bindung an die CTRD oder Deletion der CTRD führen in diesem Fall sogar dazu, daß p53 gar nicht mehr an DNA im natürlichen Kontext binden kann (Barlev *et al.*, 2001; Espinosa und Emerson, 2001; Kaeser und Iggo, 2002; Prives und Manley, 2001). Ungeachtet der Fragen, die alle aktuellen Modelle der p53 Regulation aufweisen, lassen die experimentell beobachtbaren Effekte nur den Schluß zu, daß die CTRD bei der Regulation der p53 DNA-Bindung eine unerläßliche, wenn auch in den molekularen Details unverstandene Rolle spielt. Wie die Experimente in dieser Arbeit zusammen mit den diskutierten Erkenntnissen zeigen, beschreibt das Modell der allosterische Regulation die Mechanismen dieser Regulation mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht. Mit **c-Myb** existiert interessanterweise ein weiterer Transkriptionsfaktor, der ähnlich wie p53 über eine C-terminale Domäne verfügt, deren Phosphorylierung (Cures *et al.*, 2001), Acetylierung (Tomita *et al.*, 2000) und Sumoylierung (Bies *et al.*, 2002) die DNA-Bindung reguliert (Dubendorff und Lipsick, 1999; Oh und Reddy, 1998; Oh und Reddy, 1999). Teile der Struktur von c-Myb sind strukturell aufgeklärt (Kanei-Ishii *et al.*, 1996; McIntosh *et al.*, 1998; Morikawa *et al.*, 1995; Oda *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 2000; Tahirov *et al.*, 2001; Tahirov *et al.*, 2002). Allerdings existieren für die Regulation von c-Myb wie für p53 keine mechanistischen Einblicke oder strukturellen Studien. Der genaue Mechanismus der Regulation von p53 bleibt somit zum derzeitigen Zeitpunkt trotz der Anstrengungen vieler Arbeitsgruppen unklar (Ahn und Prives, 2001). Die nähere Zukunft wird aber hoffentlich mit neuen Erkenntnissen helfen, die p53 Regulation besser zu verstehen.

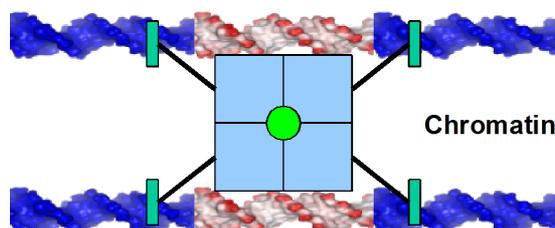


Abb 6.3: Modell für die spezifische p53 DNA-Bindung in p53 Consensus-Bindungsstellen wie sie in Nukleosomen vorkommen. Wenn p53 Bindungsstellen im Kontext von langer unspezifischer DNA oder im Chromatin vorkommen, so stabilisiert die unspezifische DNA-Bindung der CTRD die Interaktion der DBD mit der Bindungsstelle. Die posttranslationale Modifikation der CTRD durch Phosphorylierung oder Acetylierung bzw. Antikörperbindung führen in diesem Modell zum Verlust der DNA-Bindungsaktivität (Espinosa und Emerson, 2001). Abb. adaptiert aus (Ahn und Prives, 2001). Legende siehe Abb. 6.2.

6.3.1 Die p53 DBD Dimerisierungs-Kontaktfläche

NMR-spektroskopische Studien an p53 haben sich in der Vergangenheit mit der p53 TD (Clore *et al.*, 1995a; Clore *et al.*, 1994; Clore *et al.*, 1995b; Lee *et al.*, 1994), der CTRD im Komplex mit S100B($\beta\beta$) (Rustandi *et al.*, 1999; Rustandi *et al.*, 2000; Rustandi *et al.*, 1998) und erst im zeitlichen Rahmen dieser Doktorarbeit auch mit der p53 DBD befaßt (Nikolova *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 1999), da größere Mengen an homogenem und tetramerem p53 Protein in der für NMR-Spektroskopie notwendigen Konzentration und Stabilität nur schwer zugänglich sind (Bell, 2001; Bell *et al.*, 2002a; Bell *et al.*, 2002b; Nichols und Matthews, 2001b). Abgesehen davon würde das tetramere Protein mit einem hohen Molekulargewicht von ca. 172 kD und seinem hohen Anteil an flexiblen N- und C-Termini auch bei Anwendung der TROSY-Technologie ein Problem für die NMR-Spektroskopie darstellen. Eine kürzlich erschienene Publikation versuchte erfolgreich, diese Probleme durch Einführung einer mutierten TD zu umgehen, die zur Bildung einer dimeren p53 Variante führt, die einer NMR-spektroskopischen Untersuchung zugänglich ist (Mulder *et al.*, 2000). Mit diesen artifiziellen Dimeren wurde die Konformation von latentem und aktivem p53 durch NMR untersucht (Ayed *et al.*, 2001). Tab. 6.2 faßt die Erfahrungen und Möglichkeiten zur NMR-spektroskopischen Untersuchung des p53-DNA-Systems sowie deren Limitationen zusammen.

Tab. 6.2: NMR-Spektroskopie des p53-DNA-Systems: Möglichkeiten und Limitationen

Protein	Consensus-DNA-Oligonukleotid	MG [kD]	Bemerkungen
p53	duodekamer/tetramer	190	Nativer tetramerer p53-DNA-Komplex Markierung und Reinigung p53 schwierig Homogenität und Stabilität der NMR-Probe gering Hohes MG für NMR problematisch
p53 DBD	duodekamer/tetramer	120	Tetramerer p53 DBD-DNA-Komplex Markierung und Reinigung p53 DBD möglich Hohes MG für NMR problematisch Starke Signalreduktion und Linienverbreiterung nach DNA-Bindung
p53 DBD	dekamer/dimer	60	Kooperativer dimerer p53 DBD-DNA-Komplex Markierung und Reinigung p53 DBD möglich MG für NMR geeignet Signalreduktion und Linienverbreiterung nach DNA-Bindung
p53 DBD	pentamer/monomer	30	Monomerer p53 DBD-DNA-Komplex Markierung und Reinigung p53 DBD möglich Keine Bindung an DNA detektierbar

Im Rahmen dieser Arbeit wurden NMR-spektroskopische Studien mit einem Dimer der p53 DBD im Komplex mit einer halben palindromen Consensus-Bindungsstelle durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führten zur ersten auf experimentellen Daten beruhende **Beschreibung der Dimerisierungs-Kontaktfläche der p53 DBDs im Komplex mit DNA** (Klein *et al.*, 2001b) und wurden in der Zwischenzeit in einem Review besprochen (Chene und Jahnke, 2002). Die Ergebnisse ergänzen zum einen das Wissen der p53-DNA-Interaktion, das aus der Kristallstruktur des p53 DBD-DNA-Komplexes abgeleitet wurde (Cho *et al.*, 1994), und bestätigen zum anderen experimentell frühere theoretische Modelle der p53 Organisation nach DNA-Bindung (Lebrun *et al.*, 2001; Nagaich *et al.*, 1999; Nagaich

et al., 1997b). Das p53 Protein bindet als Tetramer sequenzspezifisch an eine palindrome p53 Consensus-DNA-Bindungsstelle, die aus zwei aufeinander folgenden 10 bp 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' Sequenzen (Pu: Purinbasen; Py: Pyrimidinbasen) besteht, wobei eine dieser Sequenzen aus je zwei Kopf-an-Kopf stehenden, invertierten 5 bp Untereinheiten gebildet wird (El-Deiry *et al.*, 1992; Funk *et al.*, 1992; Kern *et al.*, 1991; Waterman *et al.*, 1995). Wie oben gezeigt, bindet die p53 DBD kooperativ an DNA (Balagurumoorthy *et al.*, 1995; Bargonetti *et al.*, 1993; Pavletich *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995b).

NMR-Diffusionsexperimente bestätigten, daß p53 DBD nach der Zugabe des dekameren CON2x5 Consensus-DNA-Oligonukleotid dimerisiert. Die Qualität der erhaltenen ^{15}N , ^1H -Korrelations-Spektren des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes ist stark durch Koaleszenzphänomene als Folge von chemischem oder konformationellem Austausch behindert, die zu der starken beobachteten Linienverbreiterung führen. Die Ergebnisse der Diffusionsexperimente und das Fehlen jeglichen intermolekularen Sättigungstransfers zwischen der p53 DBD und der DNA implizieren eine Komplexstabilität im sub-mikromolaren Bereich. Diese Bindungskonstante konnte durch FCS-Messungen bestätigt werden. Daher kann eine Komplexdissoziation (d.h. chemischer Austausch) im entscheidenden zeitlichen Fenster als wahrscheinlicher Grund für die Linienverbreiterung ausgeschlossen werden. Stattdessen muß diese auf eine interne Mobilität des Systems zurückgeführt werden. Eine Möglichkeit die die Spektrenqualität stark vermindernenden Koaleszenzeffekte zu minimieren und die Qualität der Spektren zu verbessern, könnte es sein, das System in die Region des langsamen Austauschs zu schieben. Versuche eine Linienverengung durch Veränderungen der Temperatur oder Salzkonzentration herbeizuführen, ergaben allerdings nicht das erhoffte Resultat. Möglicherweise könnte jedoch ein Wechsel zu noch höheren Feldstärken (als den angewendeten 750 MHz) z.B. mit einem 900 MHz Spektrometer sowie eine weitere Verkürzung der Länge der Consensus-DNA-Oligonukleotide (auf 10-12 bp) unter Erhalt der Bindungseigenschaften eine Verbesserung der Spektrenqualität ermöglichen. Die geringe Spektrenqualität ermöglicht es vermutlich prinzipiell nicht, NMR-spektroskopisch näheren Einblick in die Dynamik der p53 DBD-DNA-Bindung im Vergleich zur Dynamik der freien p53 DBD zu gewinnen und eine hochaufgelöste Struktur des p53 DBD-DNA-Komplexes bzw. der Dimerisierungskontaktfläche zu erstellen. Ungeachtet der suboptimalen Spektren war die Qualität der mit langen Meßzeiten aquirierten ^{15}N , ^1H -Korrelations-Spektren ausreichend, um ein schlüssiges *chemical shift perturbation mapping* auf die Kristallstruktur der p53 DBD durchzuführen (Cho *et al.*, 1994). Klare **Veränderungen der chemischen Verschiebung** als Folge von DNA-Bindung und damit einhergehender Dimerisierung treten in der bekannten DNA-Bindungsregion sowie in der Region um die H1 Helix auf. Schon eine nähere Analyse und Rotation der in der Kristallstruktur spezifisch an DNA gebundenen p53 DBD (Cho *et al.*, 1994) zeigte unter Berücksichtigung der NMR-Ergebnisse und des palindromen Aufbaus der p53 Consensus-Bindungsstelle, daß die H1 Helix offensichtlich in intermolekulare Interaktionen zwischen den DNA-gebundenen p53 DBDs involviert ist, wie es schon früher theoretisch vorhergesagt wurde (Cho *et al.*, 1994; Lebrun *et al.*, 2001; Nagaich *et al.*, 1999). Das einzige Modell für den dimeren p53 DBD-DNA-Komplex, das die experimentellen Ergebnisse und die nötigen strukturellen Anforderungen erfüllt, ist eine C_2 -symmetrische Anordnung der beiden p53 DBDs auf der DNA, die die C_2 -Symmetrie der zwei pentameren Consensus-DNA-Bindungsstellen widerspiegelt (siehe Abb. 6.4). Basierend auf den genannten Voraussetzungen und den Veränderungen der

chemischen Verschiebung wurde von E. Planker (Novaspin Biotech GmbH, München) ein Energie-minimiertes Modell der beiden an ihre Consensus-DNA-Bindungsstelle gebundenen p53 DBDs berechnet, das in Abb. 6.4 abgebildet ist. Dieses **NMR-basierte Modell des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes** erklärt die experimentellen Resultate vollständig und ist in Übereinstimmung mit einem aus der Kristallstruktur abgeleiteten Vorschlag für die Struktur des tetrameren p53-DNA-Komplexes, in dem die H1 Helix in die Ausbildung einer hypothetischen Protein-Protein-Kontaktfläche involviert ist (Cho *et al.*, 1994; Jeffrey *et al.*, 1995). Das NMR-basierte Modell legt zudem nahe, daß ohne substantielle konformationelle Änderungen die identifizierte Kontaktregion nur eine Seite der H1 Helix umfassen und daher am diskutierten unteren Oberflächenlimit für Protein-Protein-Interaktionen liegen würde, um eine kooperative DNA-Bindung zu erlauben (Jones und Thornton, 1996; Lebrun *et al.*, 2001; Stites, 1997; Valdar und Jones, 2001). Auch wenn der Erhalt der Helix-Region bei der Dimerisierung wahrscheinlich ist, könnten gerade die starken Änderungen der chemischen Verschiebung in der H1 Helix für ihre konformationelle Umordnung und eventuell sogar Auflösung bei der Dimerisierung sprechen, was zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche führen könnte (*induced fit*). Das Dimer-Modell könnte zudem eine Krümmung der DNA voraussetzen, damit die mutmaßliche Kontaktfläche ausgebildet werden kann (Cherny *et al.*, 1999; Lebrun *et al.*, 2001; Nagaich *et al.*, 1999; Nagaich *et al.*, 1997b). Eine kürzlich erschienene Arbeit hat den Versuch unternommen, ein (atomar) hochaufgelöstes Modell der Dimerisierungs-Kontaktfläche zu modellieren (Lebrun *et al.*, 2001); da derartige Modelle aber letztlich nicht auf hochaufgelösten strukturellen Daten beruhen und daher hypothetisch bleiben, erscheint die Erstellung eines hochaufgelösten Modells basierend auf den qualitativen NMR-Daten nicht sinnvoll. Bisher existierte kein experimenteller Hinweis auf die Richtigkeit des vorgeschlagenen Modells und für die Beteiligung der H1 Helix bei der Dimerisierung der p53 DBDs nach kooperativer DNA-Bindung. Insbesondere ist die identifizierte **Dimerisierungs-Kontaktfläche** in keiner der beiden publizierten Kristallstrukturen mit der p53 DBD (Cho *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2001) zu finden. Zwar existiert eine Kristallstruktur der p53 DBD im Komplex mit einer artifiziellen dimeren Consensus-DNA (Cho *et al.*, 1994). Jedoch ist in der asymmetrischen Einheit nur eine von drei DBDs spezifisch an die DNA gebunden, während die beiden anderen Domänen nicht bzw. unspezifisch an DNA binden. Parallel zu dieser Arbeit wurde versucht, die murine p53 DBD im Komplex mit einem tetrameren Consensus-DNA-Oligonukleotid zu kristallisieren (Zhao *et al.*, 2001). Überraschenderweise zeigte erst die Kristallstrukturanalyse, daß der Komplex gar keine DNA enthielt. In beiden Kristallstrukturen war demnach die Kristallpackung nicht kompatibel mit einer kooperativen DNA-Bindung. Beide Kristallstrukturen zeigen keine C₂-Symmetrie der p53 DBDs, sondern vielmehr eine Kontaktfläche, die nicht kompatibel mit einer kooperativen DNA-Bindung ist, und daher die Anordnung der p53 DBDs im nativen p53-DNA-Komplex nicht widerspiegeln kann (Zhao *et al.*, 2001). Um strukturellen Einblick in die Anordnung der p53 DBDs im Komplex mit DNA zu gewinnen, wurde parallel zu den NMR-spektroskopischen Untersuchungen versucht, die p53 DBD mit verschiedenen hochaffinen tetrameren (PG und CON4x5) und dem in den NMR-Studien verwendeten dimeren (CON2x5) Consensus-DNA-Oligonukleotiden zu kokristallisieren. Diese Versuche ergaben allerdings ebenfalls keine Komplexkristalle. Da die freie p53 DBD in Abwesenheit der DNA nicht dimerisiert und in Lösung als Monomer vorliegt (Balagurumoorthy *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2001), unterstreichen die NMR-Ergebnisse mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit die essentielle Rolle der kurzen **H1 Helix** (P177-C182) für die

intermolekulare Dimerisierung bei DNA-Bindung. Umgekehrt ist die Fähigkeit zur Dimerisierung eine Voraussetzung für die kooperative DNA-Bindung, da die freie p53 DBD als Monomer in Lösung nur mit sehr geringer Affinität an DNA mit einer einzelnen pentameren Consensus-Bindungsstelle bindet (Lebrun *et al.*, 2001; McLure und Lee, 1998). In einer kürzlich erschienenen Publikation wurden diese Ergebnisse unabhängig reproduziert und bestätigt (Rippin *et al.*, 2002c).

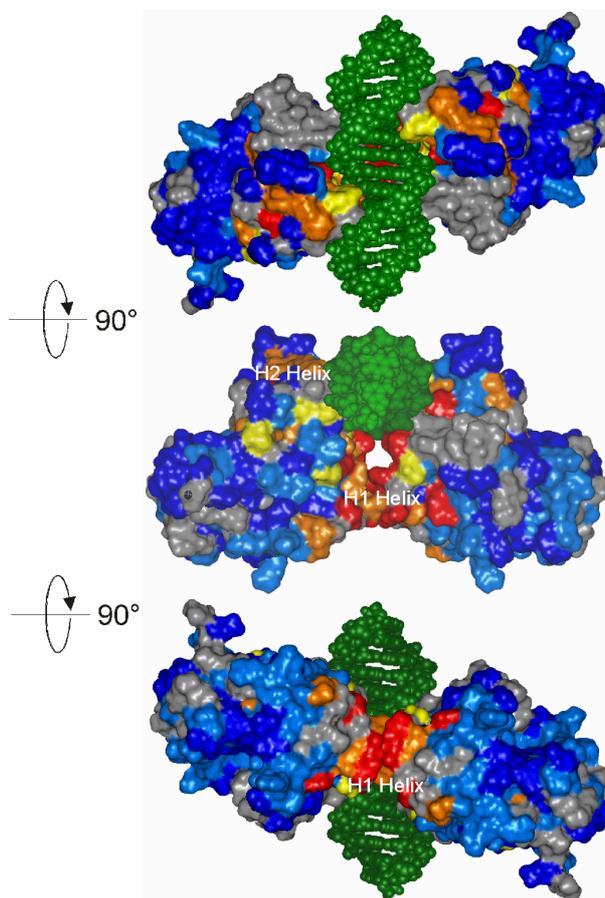


Abb. 6.4: NMR-basiertes Modell des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes entsprechend der Kristallstruktur der p53 DBD (Cho *et al.*, 1994). Die p53 DBD bindet Sequenzspezifisch an die DNA; die Symmetrie der beiden p53 DBDs ist in Übereinstimmung mit der palindromen Consensus-DNA-Bindungsstelle. Connolly-Oberflächendarstellungen des Modells jeweils um 90° rotiert von vorne, von oben und von unten werden gezeigt. Die Aminosäure-Reste der p53 DBD sind entsprechend dem Farbschema in Abb. 5.3.5 markiert. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001b).

Das dimere p53 DBD-DNA-Modell wird zudem durch die Beobachtung gestützt, daß die Dimerisierungs-Kontaktfläche in humanen Tumoren häufig inaktivierende **Mutationen** innerhalb des erwähnten Clusters der Codons 173-181 aufweist. Mutationen sind dabei besonders häufig in den drei Solvens-zugänglichen Resten P177, H178 und R181, für die eine Beteiligung in Protein-Protein-Interaktionen vorhergesagt wurde (Walker *et al.*, 1999). Interessanterweise bindet der mutmaßliche **p53 Inhibitor 53BP2** (Iwabuchi *et al.*, 1994; Iwabuchi *et al.*, 1998) und das erst kürzlich identifizierte ASPP2 Protein (Samuels-Lev *et al.*, 2001) über drei Loops genau an zwei Stellen an die p53 DBD: zum einen über seine *src* Homologie-Domäne (SH3) an die DNA-Bindungs-Kontaktfläche und zum anderen über einen seiner *ankyrin repeats* genau an die identifizierte Dimerisierungs-Kontaktfläche der H1

Helix (Thukral *et al.*; 1994; Gorina und Pavletich, 1996). 53BP2 blockiert die p53 DBD somit an beiden Stellen, die für eine kooperative DNA-Bindung notwendig sind (Abb. 6.5), indem es den p53 DBD-DNA-Komplex molekular imitiert (*molecular mimicry*).

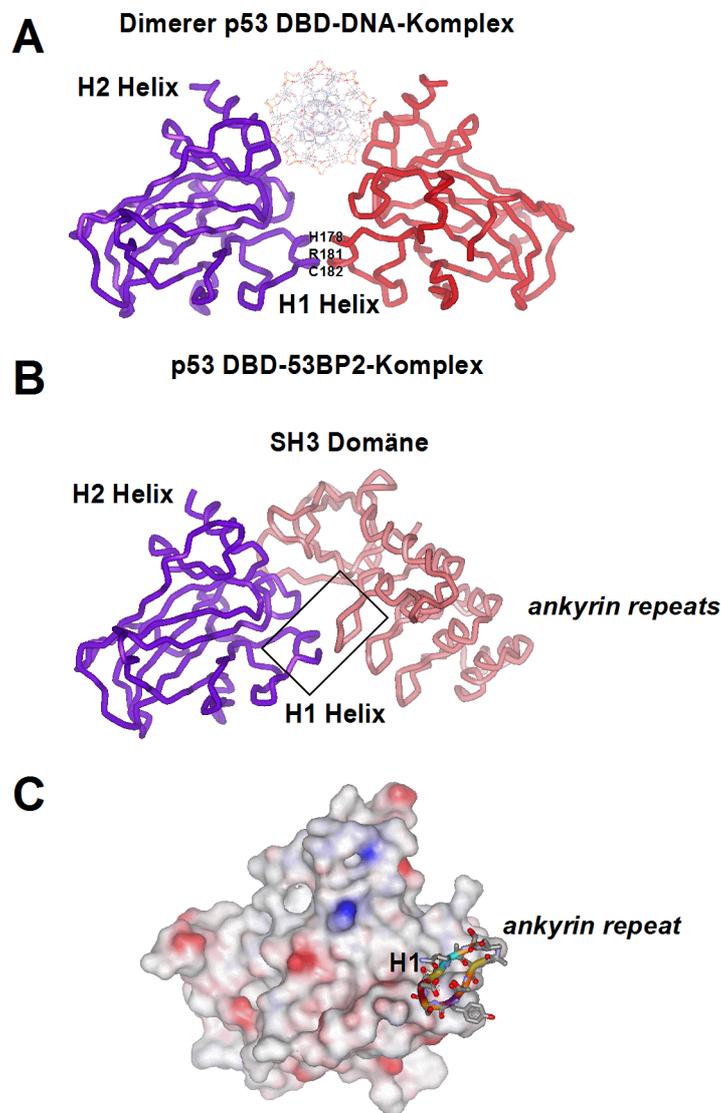


Abb 6.5: NMR-basiertes Modell des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes im Vergleich zu der Kristallstruktur der p53 DBD im Komplex mit 53BP2. **A)** Rückgrat-Darstellung des Modells für den dimeren p53 DBD-DNA-Komplex. Die Solvens-exponierten Reste H178, R181, C182 sind hervorgehoben. **B)** Rückgrat-Darstellung der Kristallstruktur der p53 DBD (gelb) im Komplex mit 53BP2 (blau) (Gorina und Pavletich, 1996) in der gleichen Orientierung. **C)** Ausschnitt der Connolly-Oberflächendarstellung der Dimerisierungs-Kontaktfläche im Komplex mit dem 53BP2 *ankyrin repeat* (Reste 421-430) als möglichen Angriffspunkt für eine Inhibition der p53 DBD Dimerisierung und DNA-Bindung. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001b).

Neben den DnaK Bindungsstellen in der CTRD (Fourie *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1996b) beinhaltet die p53 Dimerisierungs-Kontaktfläche ein Consensus-Peptidmotiv für die Bindung von DnaK (Rudiger *et al.*, 1997). Die biologische Bedeutung dieser Interaktion wurde aber nicht weiter verfolgt. Schließlich stimmt das Modell mit dem C₂-symmetrischen Bindungsmodus DNA-bindender homodimerer

Protein überein, wie ein Vergleich der mittlerweile 250 bekannten Strukturen von DNA-bindenden Proteinen zeigte (Garvie und Wolberger, 2001; Jones *et al.*, 1999; Luscombe *et al.*, 2000; Luscombe *et al.*, 1998; Tan und Richmond, 1998; Warren, 2002). Trotz der intensiven Anstrengungen, die zweifelsohne bisher unternommen wurden, um Einblick in die strukturelle Organisation des tetrameren p53 Proteins im Komplex mit DNA zu gewinnen, macht das Fehlen detaillierter Information für den multimeren p53-DNA-Komplex die bestehende Schwierigkeit dieses Systems wie hohe Flexibilität, Größe und Tetramerisierung deutlich. Die durchgeführten Untersuchungen am dimeren p53 DBD-DNA-Komplex stellen den ersten experimentellen Beweis für die Art und Weise der kooperativen p53 DBD-DNA-Interaktion dar und lassen die Schlußfolgerung zu, daß die dabei lokalisierte Dimerisierungs-Kontaktfläche auch die tatsächliche Kontaktfläche im nativen tetrameren p53-DNA-Komplex in Lösung bildet (Wang *et al.*, 1994).

Es ist ein interessanter Nebenaspekt, daß sich die p53 DBD und die homologe p63 DBD, die keine kooperative DNA-Bindung zeigt, gerade in den drei **Solvens-exponierten Resten der H1 Helix** und in der auf die H1 Helix folgenden Region unterscheiden (Klein *et al.*, 2001a). Daraus kann abgeleitet werden, daß die spezifische Konformation dieser Region in p63 das Dimerisierungsverhalten der p63 DBD modifizieren und damit für die fehlende Kooperativität der p63 DBD DNA-Bindung verantwortlich sein könnte (siehe unten). Zur unabhängigen experimentellen Verifikation der Bedeutung der H1 Helix für die Dimerisierung und zur Identifikation, der für die Dimerisierung essentiellen Reste, wurden durch *site directed mutagenesis* Mutanten der p53 DBD erzeugt, bei denen die Solvens-exponierten Reste der Kontaktfläche in der H1 Helix (H178, R181, C182) gegen Alanin bzw. Glutamat ausgetauscht wurden. Die Analyse der DNA-Bindungsaktivität und Dimerisierungsfähigkeit dieser Mutanten als freie p53 DBD und als GST-Fusionsprotein durch DNA-Bindungstests und Ultrazentrifugation mit der gleichzeitigen Analyse der konformationellen Integrität der Domänen durch Kalorimetrie und NMR erfolgt derzeit zusammen mit A. Dehner (Institut für Organische Chemie und Biochemie II, Technische Universität München). Durch die Integration der Mutationen in tetrameres f.l. p53 Protein könnte auch die Frage geklärt werden, ob die Inhibition der Dimerisierungs-Kontaktfläche ausreichend ist, um die DNA-Bindung des p53 Proteins in Gegenwart der funktionellen TD zu unterbinden.

Die Tatsache, daß die Dimerisierungs-Kontaktfläche häufig Mutationen in Tumoren aufweist, ist ein Hinweis, der diese Arbeitshypothese stützt (Martin *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 1999). Sollte experimentell bestätigt werden, daß das 53BP2 Protein und/oder Mutationen in der Dimerisierungs-Kontaktfläche die DNA-Bindungsaktivität von tetramerem p53 inhibieren, könnten sich aus dem Dimer-Modell neue Ansätze zu einer pharmakologischen **Inhibition der p53 DNA-Bindung** z.B. durch peptidische oder niedermolekulare Dimerisierungs-Inhibitoren ergeben, welche die p53 H1 Helix bzw. den 53BP2 *ankyrin repeat* (Sedgwick und Smerdon, 1999) imitieren, indem sie analog an die Dimerisierungs-Kontaktfläche binden und diese dadurch für die Dimerisierung und damit DNA-Bindung blockieren (Abb. 6.5C). Durch einen zellulären Screen wurden zwei als Pifithrin- α und Pifithrin- β bezeichnete Substanzen identifiziert, die spezifisch eine p53-vermittelte Antwort in der Folge von Bestrahlung und Chemotherapie inhibieren (Culmsee *et al.*, 2001; Gudkov *et al.*, 2000; Komarov *et al.*, 1999; Lakkaraju *et al.*, 2001). Das molekulare Target der dafür verantwortlichen niedermolekularen Verbindungen konnte allerdings bisher nicht identifiziert werden. Zwar inhibieren die frei erhältlichen Pifithrin-Derivate tatsächlich p53-vermittelte Transkription, wie auch in unserem Labor in

Reporter-Gen-Tests reproduziert wurde, allerdings an einer bisher nicht aufgeklärten Stelle im p53 Netzwerk und nicht direkt auf der Ebene von p53 bzw. des p53-DNA-Komplexes. So konnte weder eine Inhibition der DNA-Bindung von verschiedenen p53 Konstrukten durch Pifithrin noch eine direkte Interaktion von p53 und Pifithrin in ITC und NMR gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Vielzahl von Transkriptionsfaktoren in humanen Zellen dürfte es schwierig sein, selektive Inhibitoren für die großen und polaren Kontaktflächen von Protein-DNA-Interaktionen zu finden und entwickeln. Daher könnte eine Strategie, die p53 DNA-Bindung indirekt und spezifisch zu inhibieren, die Suche nach Tetramerisierungs-Inhibitoren sein (Clore *et al.*, 1995a). Ein weiterer Ansatzpunkt zur Inhibition der p53 DNA-Bindung könnte aber auch die Entwicklung von Inhibitoren sein, die die Dimerisierungs-Kontaktfläche blockieren. **Inhibitoren** der p53 DNA-Bindung bzw. Oligomerisierung würden voraussichtlich wie Pifithrin die Nebenwirkungen einer Chemo- oder Strahlentherapie bzw. die Folgen von Verbrennungen im Normalgewebe vermindern, indem sie eine p53-abhängige Transkriptionsaktivierung verhindern. Basierend auf den NMR-Ergebnissen könnten aus dem *ankyrin repeat* von 53BP2 (Reste 421-430) Peptide und Peptidomimetika abgeleitet werden, die die Dimerisierung und damit die DNA-Bindung der p53 DBD inhibieren, und so zu einer vorläufigen Targetvalidierung und als Ausgangspunkte für ein rationales *lead design* dienen könnten (Diercks *et al.*, 2001; Pellecchia *et al.*, 2002; Roberts, 2000). Vermutlich müßte ein davon abgeleitetes Peptid konformationell restringiert sein, da ansonsten die Affinität der kleinen Interaktionsfläche zu niedrig sein dürfte. Diese Annahme wurde kürzlich im Hinblick auf die Stabilisierung der p53 DBD durch Peptidbindung bestätigt. Dabei zeigte sich, daß ein aus dem Loop des *ankyrin repeats* von 53BP2 abgeleitetes lineares Peptid (AS 422-428) keine durch NMR und andere biophysikalische Methoden nachweisbare Affinität für die p53 DBD hat (Friedler *et al.*, 2002). Für einen beschriebenen Peptid-Inhibitor der p53 DNA-Bindung (AS 105-126) (Wiman und Selivanova, 1999), der von der p53 DBD abgeleitet ist, konnte die Inhibition der DNA-Bindung weder im EMSA noch in einem FCS-Test nachvollzogen werden. Eine direkte Interaktion des Peptids mit der p53 DBD war ebenfalls nicht nachweisbar. Die beschriebene inhibitorische Wirkung ist zudem aus einem strukturellen Gesichtspunkt nicht verständlich.

Mit den beschriebenen Proteinen könnte ein Hochdurchsatz-fähiger Fluoreszenz-basierter **DNA-Bindungs- bzw. Dimerisierungs-Test** für ein Primärscreening entwickelt werden (Abb. 6.6). Durch Inkubation bei 45°C könnten mit einem derartigen Test auch stabilisatorische Substanzen identifiziert werden, die die wildtyp Konformation der p53 DBD gegen Hitzedenaturierung schützen (Foster *et al.*, 1999). Nach Bestätigung in einem Sekundärscreening könnten die Substanzen durch NMR-Spektroskopie auf direkte Bindung an die p53 DBD Dimerisierungs-Kontaktfläche sowie auf die Aufhebung des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes hin überprüft werden. Die weitere Optimierung der Substanzen durch zellbiologische Tests, medizinische Chemie und Pharmakologie (Böhm *et al.*, 1996; Drews, 2000) könnte im weiteren Verlauf wie für die p53 inhibitorischen und aktivatorischen Substanzen beschrieben erfolgen (Foster *et al.*, 1999; Komarov *et al.*, 1999). Alternativ könnte in einem NMR-Screening (Fejzo *et al.*, 1999; Lepre, 2001) bzw. einem *SAR by NMR*-Ansatz (Shuker *et al.*, 1996) direkt nach Substanzen bzw. Strukturelemente gesucht werden, die an die Dimerisierungsregion der p53 DBD binden. Durch Verknüpfung von niedrigaffinen Liganden, die benachbarte Bindungsstellen haben, könnte aus diesen Elementen ein hochaffiner Ligand generiert werden (Erlanson *et al.*, 2000; Maly *et al.*, 2000), der die p53 DNA-Bindung inhibiert.

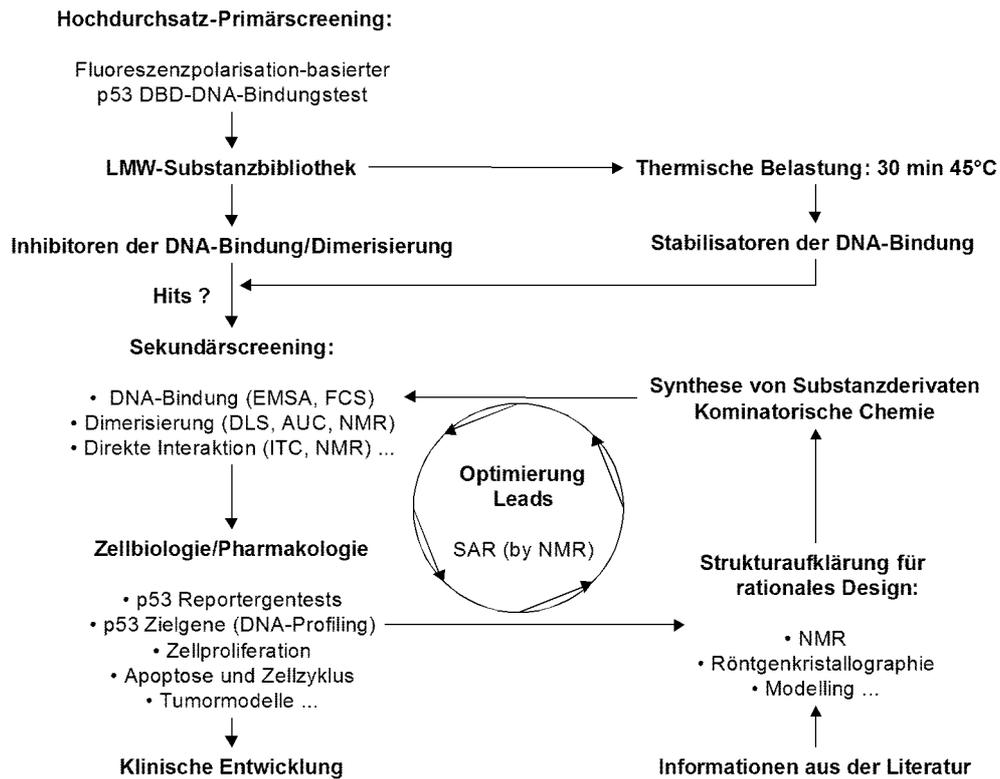


Abb 6.6: Schematisches Konzept eines hochdurchsatzfähigen Screening-Tests zur Identifikation und Entwicklung von niedermolekularen Stabilisatoren und (Dimerisierungs-) Inhibitoren der p53 DBD-DNA-Bindung.

6.3.2 Ein Sandwich-artiges Modell des p53-DNA-Komplexes?

p53 liegt in Lösung als Tetramer vor (Friedman *et al.*, 1993). Mehrere Studien haben basierend auf den Strukturen der p53 DBD (Cho *et al.*, 1994) und der TD (Clore *et al.*, 1994; Jeffrey *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994) versucht, Einblick in die **Organisation von tetramerem p53** gebunden an die Consensus-DNA-Bindungsstelle zu gewinnen (Arrowsmith und Morin, 1996; Cho *et al.*, 1994; Pennisi, 1996; Prives, 1994). Trotz großer Bemühungen, den Bindungsmodus von tetramerem p53 Protein gebunden an DNA strukturell aufzuklären, ist man bisher nicht über theoretische Modelle herausgekommen.

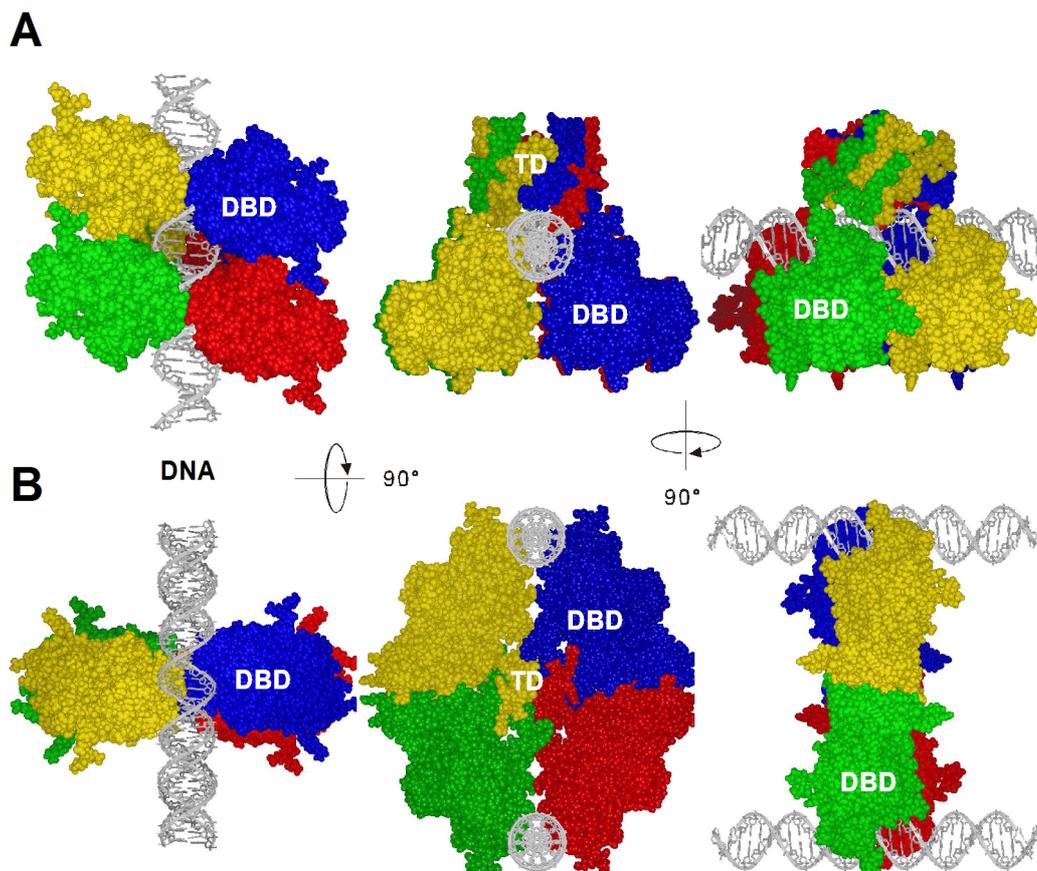


Abb. 6.7: Gegenüberstellung der Modelle für den tetrameren p53-DNA-Komplex aus drei Raumrichtungen basierend auf den bekannten Strukturen der p53 DBD und TD. **A) Altes Modell.** Jeweils zwei C_2 -symmetrische p53 DBD Dimere binden benachbart an einer Seite der DNA, während die TD auf der gegenüberliegenden Seite orientiert ist, so daß p53 DBD und TD die DNA umgeben. Diese Anordnung führt zu einem Symmetriebruch, so daß für die Linker zwischen DBD und TD keine einheitlichen, sondern unterschiedliche Konformationen angenommen werden müssen (Cho *et al.*, 1994). **B) Sandwich-artiges Modell.** Basierend auf den NMR-Ergebnissen für den dimeren p53 DBD-DNA-Komplex und unter Berücksichtigung der D_2 -Symmetrie der TD kann alternativ angenommen werden, daß tetrameres p53 ohne Symmetriebruch gleichzeitig an zwei gegenüberliegende Consensus Bindungsstellen binden kann. Adaptiert nach E. Planker, (Klein *et al.*, 2001b).

Das derzeit akzeptierte Modell postuliert, daß tetrameres p53 mit zwei aufeinander folgenden p53 DBD-Dimere auf einer Seite der DNA an zwei Paare der Consensus-Bindungsstelle bindet, die in einer regulär gestaffelten Anordnung mit pseudo-Achsensymmetrie angeordnet sind. Dabei werden die DBDs durch die TD

verbunden, die auf der entgegengesetzten Seite der DNA zu liegen kommt, so daß die DNA von vier DBDs und der TD umgeben ist (Abb. 6.7) (Cho *et al.*, 1994; McLure und Lee, 1998; Nagaich *et al.*, 1997b; Wang *et al.*, 1995b). Allerdings kann dieses Modell die C_2 -Symmetrie des DNA-gebundenen p53 DBD-Dimers und die D_2 -Symmetrie der p53 TD nicht in Einklang bringen. Eine Konsequenz der zwangsläufig damit einhergehenden **Aufhebung der Symmetrie** ist, daß die Kontaktflächen zwischen der DBD und der TD nicht einheitlich sein können und/oder daß die vier Linker, die die DBD und TD verknüpfen, entweder unstrukturiert sein oder unterschiedliche Konformationen haben müssen, wie es in der Kristallstruktur des *lac* Repressor-Tetramers beobachtet wurde (Friedman *et al.*, 1995).

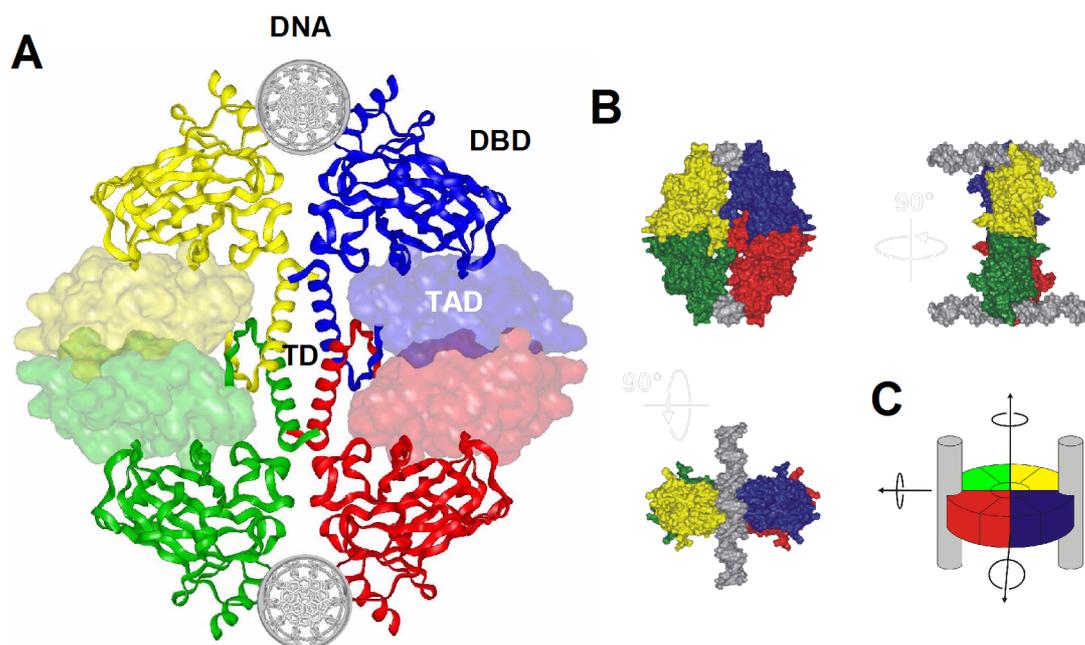


Abb. 6.8: **A) Sandwich-artiges Modell des tetrameren p53-DNA-Komplexes.** **A)** Ansicht von oben: Die p53 DBDs und die TD sind als Rückgrat-Darstellung gezeigt. Das 4-Helix Bündel der TD liegt in der Mitte des Komplexes. Um anzudeuten, daß die TADs in den Komplex integriert werden können und alle sterischen und geometrischen Anforderungen erfüllen, wurde für die Connolly-Oberflächendarstellung der TAD eine unbestimmte Faltung postuliert. **B)** Überblick über den Komplex aus drei unterschiedlichen Raumrichtungen. **C)** Schematische Darstellung des p53-DNA-Komplexes, welche die D_2 -Symmetrie illustriert. Diese wird von drei orthogonalen C_2 -Achsen bestimmt. Die Form des Komplexes ähnelt einem flachen Zylinder, so daß sich nach der DNA-Bindung mehrere p53 Tetramere entlang der Consensus-DNA-Bindungsstelle aufreihen und kooperativ zu höheren Oligomeren (z.B. Oktameren) assemblieren können, die durch "Stapel"-Wechselwirkungen (*stacking*) stabilisiert werden. Adaptiert nach E. Planker, (Klein *et al.*, 2001b).

Dieser Symmetriebruch wurde schon in früheren Untersuchungen bemerkt, die vorschlugen, daß das freie p53 eine durch die TD bestimmte D_2 -Symmetrie aufweist und nur nach DNA-Bindung in eine asymmetrische Konformation übergeht (Waterman *et al.*, 1995)¹⁹. Zudem wurde vorgeschlagen, daß p53 Tetramere mit verkürzten Linkern in der flexiblen Gelenkregion zu den notwendigen konformationellen Umlagerungen nicht mehr in der Lage sein sollten. Stattdessen sollten diese **Sandwich-artige Komplexe** ausbilden, welche die dihedrale Symmetrie

¹⁹ Der *lac* Repressor zeigt vermutlich auch in der freien Form keine D_2 -Symmetrie, wie experimentell gezeigt wurde (Friedman *et al.*, 1995).

aufrechterhielten und dadurch mit ihren entgegengesetzten Enden an zwei DNA-Stränge bänden (Kong *et al.*, 2001; Waterman *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, daß eine thermodynamische Analyse der DNA-Bindung von tetramerem p53 keinen Hinweis auf größere konformationelle Umlagerungen bei DNA-Bindung ergab (Nichols und Matthews, 2001b). Frühere Studien haben zudem gezeigt, daß p53 an DNA nicht nur als Tetramer, sondern, wenn auch mit verminderter Affinität und Kooperativität, als Dimer binden kann (Halazonetis und Kandil, 1993; McLure und Lee, 1998; McLure und Lee, 1999; Waterman *et al.*, 1995). Zudem wurde ebenfalls gezeigt, daß aus Baculovirus gereinigtes rekombinates p53 als Dimer an Consensus-Bindungsstellen bindet (Tarunina und Jenkins, 1993) und es dabei sogar zur Auflösung des p53 Tetramers zum Dimer kommen kann (Delphin *et al.*, 1994). Artificielle p53 Dimere binden an p53 Consensus-Bindungsstellen (Halazonetis *et al.*, 1993; McLure und Lee, 1998) und transaktivieren p53-Zielgene in Reporter-Gen-Tests (Davison *et al.*, 2001; Pietenpol *et al.*, 1994; Waterman *et al.*, 1995). Ein Dimer des p53 Tetramers könnte daher in der Lage sein, mit einer halben Consensus-Bindungsstelle zu interagieren, wogegen das andere in der Lage sein könnte, mit einer weiteren zweiten Consensus-Bindungsstelle zu interagieren (Stenger *et al.*, 1994).

Um die sterischen Probleme zu umgehen, die aus dem Versuch resultieren, die unterschiedlichen Symmetrien der vier DBDs und der TD in einem Komplex mit einer einzelnen Consensus-DNA-Bindungsstelle zu vereinen, wurde basierend auf den NMR-Ergebnissen zusammen mit E. Planker alternativ vorgeschlagen, daß das gesamte p53 Tetramer zwei auf der DNA räumlich voneinander getrennte Consensus-Bindungsstellen entsprechend dem **Sandwich-artigen Modell über eine DNA-Schleife** verknüpft bzw. verbrückt, so daß sie im Komplex einander gegenüber zu liegen kommen (Abb. 6.8) (Klein *et al.*, 2001b). Das Sandwich-artige Modell berücksichtigt die D_2 -Symmetrie der p53 TD und impliziert, daß alle p53 Untereinheiten eine identische Konformation haben. Es umfaßt folgende Schlußfolgerungen und wird durch experimentelle Beobachtungen gestützt: a) Die p53 DBD bindet als Dimer kooperativ und mit C_2 -Symmetrie an palindrome Consensus-DNA-Bindungsstellen (siehe Kapitel 5.3). b) Als Folge der durch die TD festgelegten Symmetrie zeigt tetrameres p53 D_2 -Symmetrie und bindet an zwei entgegengesetzte Consensus-Bindungsstellen. c) **Elektronenmikroskopie** zeigte, daß ein einzelnes p53 Tetramer an zwei getrennte Consensus-Bindungsstellen binden und diese verknüpfen kann (Abb. 6.9B) (Jackson *et al.*, 1998; Stenger *et al.*, 1994). Aus den elektronenmikroskopischen Bildern (Stenger *et al.*, 1994) kann abgeschätzt werden, daß der Abstand der verknüpften DNA-Stränge in der Dimension von 100 Å liegt, was in Übereinstimmung mit den Dimensionen des Sandwich-artigen Modells ist (Abb. 6.9). Die Bilder zeigen darüber hinaus, daß die DNA am Rand von p53 gebunden ist, so daß DBD und TD auf einer Seite der DNA angeordnet erscheinen, wie vom Sandwich-artigen Modell nahegelegt wird. Dies steht im Gegensatz zum derzeitigen Modell, das voraussetzt, daß die DNA vom p53 Tetramer umschlossen wird. d) Frühere Studien haben gezeigt, daß verschiedene Promoterregionen von p53-Zielgenen (z.B. *p21*, *cyclin G*, *MCK*) proximale und distale Kopien der palindromen p53 Consensus-Bindungsstelle innerhalb ihrer regulatorischen Region enthalten (El-Deiry *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1995; Zauberman *et al.*, 1995). Die Verknüpfung dieser proximalen und distalen Bindungsstellen (**DNA looping**) spielt eine synergistische Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung durch p53 (Abb. 6.9A) (Jackson *et al.*, 1998; Stenger *et al.*, 1994); **DNA looping** und Sandwich-artige Komplexe wurden auch im Zusammenhang mit der transkriptionellen Funktion des

lac Repressors diskutiert (Alberti *et al.*, 1993; Kramer *et al.*, 1987). e) Der lange Linker zwischen den Domänen ermöglicht es, daß alle Domänen auf einer Seite der DNA zu liegen kommen. Aufgrund des Fehlens von Strukturinformation wurden die Linker nicht in das Modell integriert. Das Modell erfüllt aber alle geometrischen und sterischen Anforderungen, um die fehlenden Elemente zu beherbergen. Die CTRD könnte zwischen den p53 DBD-Dimeren zu liegen kommen, wogegen die NTD zwischen DBD und TD lokalisiert sein könnte. Die NTD umfaßt insgesamt fast 100 Reste ohne definierte Tertiärstruktur (Lee *et al.*, 2000); ihre Faltung wird vermutlich erst durch Komplexbildung mit zusätzlichen Cofaktoren induziert (Uesugi und Verdine, 1999). f) **Kooperative Dimer-Dimer Interaktionen** stabilisieren die p53 DNA-Bindung unabhängig von der Anwesenheit der TD (McLure und Lee, 1998). Daher kann die Bindung von zwei p53 Tetrameren an entgegengesetzte Bindungsstellen durch "Stapel"-Wechselwirkungen (*stacking*) zwischen den beiden Tetrameren stabilisiert werden (oktamerer p53-DNA-Komplex).

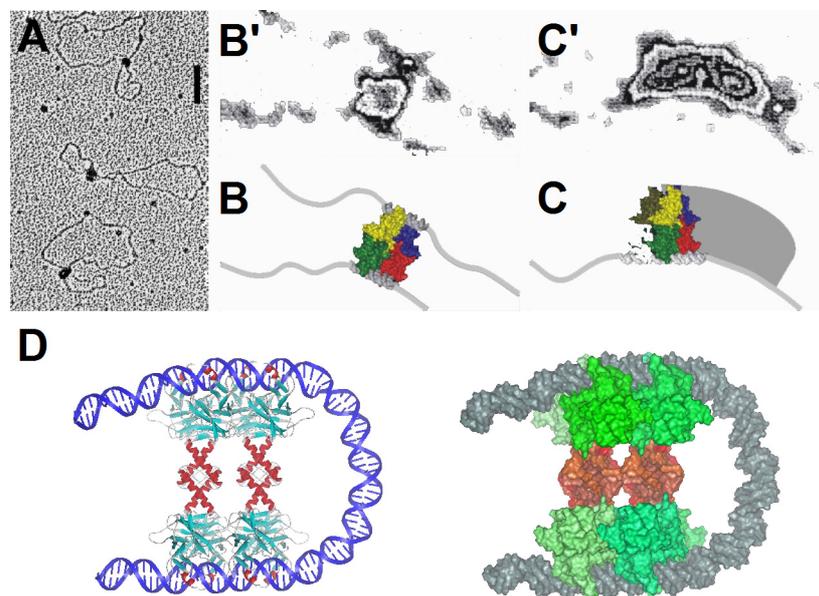


Abb. 6.9: Sandwich-artiges Modell des tetrameren p53-DNA-Komplexes. A-C: **Elektronenmikroskopische Aufnahmen im Vergleich zum Sandwich-artigen Modell.** A) p53 verknüpft zwei DNA-Stränge; es kommt zur Bildung einer DNA-Schleife. B) Ein p53 Tetramer verknüpft zwei Consensus-DNA-Bindungsstellen. Der Abstand zwischen den DNA-Strängen liegt bei ca. 100 Å. C) Mehrere p53 Tetramere stapeln entlang der DNA. Nur eine dimere Bindungsstelle des p53 Tetramers ist von der DNA besetzt. Die Dimensionen weiterer p53 Tetramere sind schematisch abgebildet. D) **Theoretisches D₂-symmetrisches Modell eines oktameren p53-DNA-Komplexes**, in dem zwei aufeinander folgende p53 Tetramere einen DNA-Loop ausbilden. Vom Gesamtkomplex sind nur die strukturell bekannten Regionen: p53 DBD (grün) und TD (rot) in einer Sekundärstruktur- (links) und einer Oberflächendarstellung (rechts) gezeigt. Die elektronenmikroskopischen Abbildungen wurden aus Abb. 4A (Stenger *et al.*, 1994) reproduziert (Copyright 1994, The EMBO Journal); die Koordinaten für den oktameren Komplex stammen von E. Planker. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001b).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß p53 Tetramere Stapel bilden können und in oktameren und höher oligomeren Zuständen an DNA gebunden vorliegen (Jackson *et al.*, 1998; Stenger *et al.*, 1994). Abb. 6.9C illustriert wie sich p53 Tetramere entlang von mehreren p53 Bindungsstellen

an der DNA wie eine Perlenkette aufreihen könnten (Stenger *et al.*, 1994). Natürlich kann das Sandwich-artige Modell nicht erklären, wie p53 als Tetramer an eine einzelne p53 Consensus-Bindungsstelle bindet (McLure und Lee, 1998; Stenger *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995b). Tatsächlich könnte die inhärente Flexibilität von p53 und seiner DNA-Bindung, wie sie unter anderem durch die Vielzahl an elektronenmikroskopisch beobachteten p53-DNA-Komplexen illustriert wird (Stenger *et al.*, 1994), eine konformationelle Umschaltung bei DNA-Bindung ermöglichen (Waterman *et al.*, 1995) und in einer nicht D₂-symmetrischen Quartärstruktur resultieren (Friedman *et al.*, 1995). Trotzdem ist das Modell verlockend und es spricht vieles dafür, daß das Sandwich-artige Modell einen von mehreren möglichen DNA-Bindungsmodi darstellt, der in die **transkriptionelle Aktivierung** der entsprechenden Zielgene involviert sein könnte. Von einem strukturellen Standpunkt aus und unter Berücksichtigung der Symmetriebetrachtungen hat das Sandwich-artige Modell zudem den Vorteil, daß in ihm keine unterschiedlichen Konformationen der p53 Untereinheiten im Tetramer und keine größeren strukturellen Umordnungen bei der DNA-Bindung vorausgesetzt werden müssen. Zudem scheint das Modell mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen übereinzustimmen. Das Sandwich-artige Modell wird daher hoffentlich das p53 Feld inspirieren und neuen Impetus für weitere biochemische und strukturelle Studien geben, um zwischen den verschiedenen Modellen zu differenzieren und den Mechanismus aufzuklären, wie p53 *in vivo* an seine Zielsequenzen bindet.

6.4 Vergleich der p63 DBD mit der homologen p53 DBD

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gereinigte und monomere p63 DBD mit der des homologen Tumorsuppressors p53 biochemisch und biophysikalisch verglichen (Klein *et al.*, 2001a). Im Gegensatz zur p53 DBD ist die isolierte p63 DBD nicht in der Lage, kooperativ und spezifisch an eine p53 Consensus-Bindungsstelle zu binden. Für dieses Resultat gab es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Im ersten Fall könnte die p63 DBD inaktiv für die DNA-Bindung sein, da z.B. die klonierte Domäne für die DNA-Bindung nicht ausreicht, die Domäne falsch gefaltet ist, die Domäne in einer falschen Konformation für DNA-Bindung ist und erst aktiviert werden muß oder eine kleinere Affinität bzw. unterschiedliche Spezifität hat. Im zweiten Fall könnte der p63 DBD die Fähigkeit zur kooperativen DNA-Bindung fehlen, so daß die Bindung einer einzelnen Domäne als Folge der geringen Affinität im EMSA nicht detektiert werden kann. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden und die Affinität künstlich zu erhöhen, wurde die p63 DBD N-terminal mit einer GST-Domäne fusioniert, die als artifizielle Dimerisierungsdomäne fungiert (Ji *et al.*, 1992; McTigue *et al.*, 1995a; McTigue *et al.*, 1995b). In einem anderen, vergleichbaren Beispiel wurde ein Bcr-Abl-Konstrukt ohne Oligomerisierungsdomäne durch GST-induzierte Dimerisierung partiell reaktiviert (Maru *et al.*, 1996). Tatsächlich bindet GST-p63 DBD mit vergleichbarer Affinität und Spezifität wie GST-p53 DBD an mehrere p53 Consensus-Bindungsstellen, wogegen es nach Abspaltung der GST-Domäne mit Thrombin seine DNA-Bindungsaktivität wieder verliert. Diese Resultate unterstützten die Schlußfolgerung, daß die p63 DBD richtig gefaltet und ausreichend ist, um an DNA zu binden, aber unter den gewählten Bedingungen nicht kooperativ an DNA binden kann. Abb. 6.10 zeigt ein schematisches Modell, das eine Erklärung für die unterschiedlichen DNA-Bindungsaktivitäten der p63 und p53 DBDs darstellt. Während die p53 DBD über eine **Dimerisierungs-Kontaktfläche** verfügt, fehlt der p63 DBD eine funktionelle Kontaktfläche, so daß sie nur nach GST-vermittelter Dimerisierung an DNA binden kann. Diese Diskrepanz kann auf Unterschiede in der mutmaßlichen Dimerisierungs-Kontaktfläche zurückgeführt werden, die im p53 von der H1 Helix gebildet wird (siehe Kapitel 5.3, siehe unten).

Verschiedene Untersuchungen haben die Fähigkeit der p53 Familienmitglieder untersucht, verschiedene p53-responsive Promotoren in Reporter-Gen-Tests zu aktivieren. Für p73 α und p73 β wurde gezeigt, daß sie eine große Anzahl, aber nicht alle identifizierten p53-Zielgene aktivieren (Di Como *et al.*, 1999; Senoo *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1998). Für p63 wurden im Vergleich zu p53 nur kleine Unterschiede in der transkriptionellen Aktivierung mehrerer zellulärer p53-Zielgene gefunden (Shimada *et al.*, 1999). In dieser Studie wurde auch gezeigt, daß p63 den *bax*-Promoter effizienter als p53 und auf ein Niveau ähnlich dem von *p21* aktivieren kann. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden die isolierten GST-p53 und GST-p63 DBDs im Hinblick auf **DNA-Spezifität und Selektivität** verglichen, indem die Affinität für verschiedene natürliche p53 Consensus-DNA-Bindungsstellen bestimmt wurde. Im allgemeinen unterscheiden sich die Affinitäten demselben Muster entsprechend, so daß die GST-p53 und GST-p63 DBDs eine vergleichbare Spezifität für die ausgewählten p53 Consensus-Bindungsstellen aufweisen. Die Affinität der GST-p53 DBD im Vergleich zur GST-p63 DBD ist mit Ausnahme der *bax* Consensus-Bindungsstelle, an die beide mit niedrigster Affinität binden, für die PG, *p21*, *gadd45* und *cyclin G* Consensus-Bindungsstellen relativ 3-5-fach höher. Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß die GST-p63 DBD mit ähnlicher Spezifität und wenigstens gleicher Affinität an bekannte p53 Consensus-Bindungsstellen bindet. Wie das Beispiel *bax* zeigt, können

die mit isolierten Oligonukleotiden *in vitro* bestimmten Bindungsaffinitäten der GST-DBDs und der Grad an Reporter-Gen-Aktivierung in zellulären Tests unter Verwendung der natürlichen Promoter Sequenzen nicht direkt miteinander korreliert werden. Offensichtlich unterscheiden sich die isolierten DBDs und die vollständigen Proteine in ihrer Spezifität; zudem beeinflussen zusätzliche Sequenzelemente die Reporter-Gen-Aktivierung *in vivo* (Szak *et al.*, 2001; Thornborrow und Manfredi, 2001).

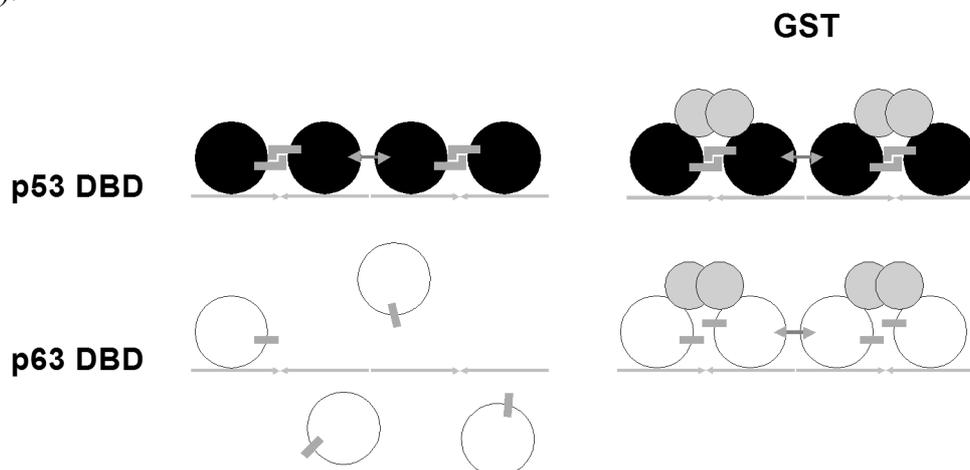


Abb. 6.10: Schematisches Modell für die DNA-Bindungseigenschaften der p63 und p53 DBDs und der entsprechenden GST-Fusionsproteine. Die p53 DBD (schwarze Kreise) beinhaltet eine funktionelle Dimerisierungs-Kontaktfläche in der H1 Helix (grauer Haken) und ist in der Lage kooperativ an Consensus-DNA zu binden. Der p63 DBD (weiße Kreise) dagegen bindet als Folge einer unterschiedlichen oder fehlenden Dimerisierungs-Kontaktfläche (graues Rechteck) nicht kooperativ an DNA. Eine künstliche Dimerisierung vermittelt durch Fusion mit GST (graue Kreise) stellt die DNA-Bindungsaktivität der p63 DBD wieder her. GST-p63 DBD und GST-p53 DBD binden mit vergleichbarer Affinität und Spezifität an Consensus-DNA-Bindungsstellen. Die Pfeile repräsentieren weitere intermolekulare Oligomerisierungs-Kontaktflächen. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001a).

Die beobachtete differentielle Erkennung der p53 Promotoren ist vermutlich für die distinkte Rolle der p53 Familienmitglieder in der Tumorsuppression und der Entwicklung verantwortlich (Levrero *et al.*, 2000). Es wurde daher vorgeschlagen, daß die differentielle Antwort der Zielgene auf kleine Unterschiede in der DNA-Spezifität oder Konformation der homologen DBDs zurückzuführen seien (Shimada *et al.*, 1999). Allerdings unterstützen die Resultate der Bindungsstudien diese Hypothese nicht. Es erscheint wahrscheinlicher, daß die Unterschiede in der Spezifität der Homologen auf unterschiedliche Spezifitäten der Gesamtproteine im zellulären Kontext zurückzuführen sind. Die differentiellen Effekte mögen teilweise von den C-terminalen Regionen der Proteine vermittelt werden (Shimada *et al.*, 1999). Trotz der genannten Limitationen könnten umfassendere **quantitative DNA-Bindungsstudien** mit den vollständigen p53, p63 und p73 Proteinen sowie ihren Isotypen und den isolierten DBDs (möglicherweise unter Miteinbeziehung posttranslationaler Modifikationen) bei Verwendung einer Vielzahl an natürlichen Promotoren bzw. Consensus-DNA-Varianten helfen, die unterschiedlichen zellulären Antworten p53-regulierter Gene als Folge einer p53 bzw. p63 und p73 Aktivierung (Yu *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000) und die Zielgen-Diskriminierung innerhalb der p53 Familie weiter zu verstehen (Arrowsmith und Morin, 1996). Bisher wurden derartige Studien aber nicht konsequent durchgeführt.

Die p63 DBD kann bei 37°C in löslicher Form exprimiert werden, während die p53 DBD bei dieser Temperatur stark Temperatur-sensitiv ist (Bullock *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 1996a) und fast ausschließlich in Form unlöslicher *inclusion bodies* anfällt. Diese und andere Beobachtungen unterstützten schon früh die Hypothese, daß die p63 DBD im Gegensatz zur p53 DBD eine hohe **Thermostabilität** und selbst bei erhöhten Temperaturen eine geringe Aggregations- und Präzipitationsneigung in Lösung aufweist, was die p63 DBD zu einem idealen System für NMR-spektroskopische Untersuchungen macht. Die erhöhte thermodynamische Stabilität der p63 DBD konnte durch DSC und Harnstoff-Gleichgewichtsentfaltung bestätigt werden und ist mit einer experimentell bestimmten Stabilisierungsenthalpie von $\Delta\Delta G([\text{Urea}]_{50\%}) = -4.57 \text{ kcal mol}^{-1}$ ($T_m = 61^\circ\text{C}$ versus 44°C und $[\text{Urea}]_{50\%} = 5.15 \text{ M}$ versus 3.06 M für die p53 DBD) bemerkenswert. Es ist allerdings überraschend, daß das Zn^{2+} -Ion in der thermodynamisch instabileren p53 DBD stabiler koordiniert erscheint, insbesondere da alle vier Reste, die für seine Koordination verantwortlich sind, in der p63 DBD hoch konserviert sind. Die leichte Destabilisierung der Koordination dürfte daher die Konsequenz einer nur im p63 auftretenden Abfolge von 10 Aminosäuren sein, die direkt auf die H1 Helix folgt, welche einen der Zn^{2+} -koordinierenden Reste (p63 H208) beinhaltet. Genaueres Wissen über die molekulare Grundlage der Thermostabilisierung der p63 DBD könnte es ermöglichen, essentielle Reste zu identifizieren, um so rational thermostabilere p53 DBD-Varianten z.B. zur Anwendung in Gentherapie-Ansätzen zu generieren (*protein engineering*) (Lehmann *et al.*, 2000; Lehmann und Wyss, 2001). Mit aus diesem Grunde wurden in den letzten Jahren mehrere Versuche unternommen, die p53 DBD durch Mutationen zu stabilisieren. Durch zielgerichtete Evolutionsansätze (*directed evolution, DNA shuffling*) konnten 20 Aminosäure-Reste (AS 101-120) in der p53 DBD identifiziert werden, die für einen thermostabilen Phänotyp verantwortlich sind (Xirodimas und Lane, 1999). Durch semirationales Design einer Vierfach-Mutante (M133L, V203A, N239Y, N268D) konnte ebenfalls eine signifikante Stabilisierung erzielt werden ($\Delta\Delta G([\text{Urea}]_{50\%}) = -2.65 \text{ kcal mol}^{-1}$, $T_m = 47.2^\circ\text{C}$, $[\text{Urea}]_{50\%} = 4.17 \text{ M}$) (Nikolova *et al.*, 1998). Zwei dieser Reste (L133, A203) können interessanterweise auch in der homologen p63 DBD gefunden werden. Ihr stabilisierender Effekt ist allerdings strukturell schwer zu erklären (Nikolova *et al.*, 1998). Schließlich wurden durch *in vitro* Evolution thermostabile p53 DBD-Varianten hergestellt (Matsumura und Ellington, 1999), die kürzlich zur Erhöhung der Stabilität von p53 für NMR-spektroskopische Studien verwendet wurden. Zwei der drei stabilisierenden Mutationen liegen in der p53 DBD (N239Y, N268D) und sind Suppressor-Mutationen, die die wildtyp Funktion von p53 wiederherstellen können. Sie wurden ebenfalls durch semirationales Design gefunden (Nikolova *et al.*, 1998); sind aber nicht in der p63 DBD vorhanden. Allerdings erreichten alle bisher unternommenen Versuche, die p53 DBD zu stabilisieren, bei weitem nicht die Stabilität der p63 DBD. Zusammen mit Dr. N. Budisa (MPI für Biochemie) werden derzeit Versuche unternommen, die thermodynamisch sehr gut charakterisierte p53 DBD sowie die p63 DBD durch den erzwungenen Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren unter selektivem Druck weiter zu stabilisieren (Budisa *et al.*, 1999; Minks *et al.*, 1999). Die erhaltenen Konstrukte können im Anschluß an die Markierung und Reinigung kalorimetrisch und spektroskopisch auf ihre Stabilität und spektroskopischen Eigenschaften sowie durch NMR-Spektroskopie und eventuell Kristallographie strukturell analysiert werden.

Die **Stabilität globulärer** Proteine in Lösung hängt von einer Reihe von Faktoren ab, die nur verhältnismäßig schwer vorherzusagen sind (Jaenicke, 1998;

Jaenicke, 1999; Jaenicke, 2000a; Jaenicke, 2000b; Jaenicke und Böhm, 1998; Robertson und Murphy, 1997). Trotz der im Grunde großen Unterschiede auf Sequenzebene weisen homologe Proteine im allgemeinen eine vergleichbare Faltung und eine große Ähnlichkeit in ihrer dreidimensionalen Struktur auf. Die Thermostabilität ist in den meisten Fällen jedoch nur auf einige wenige molekulare Interaktionen zurückzuführen, die zudem oft Oberflächen-exponierte Reste betreffen (Dams *et al.*, 2000; Esser *et al.*, 1999; Perl und Schmid, 2001; Perl und Schmid, 2002).

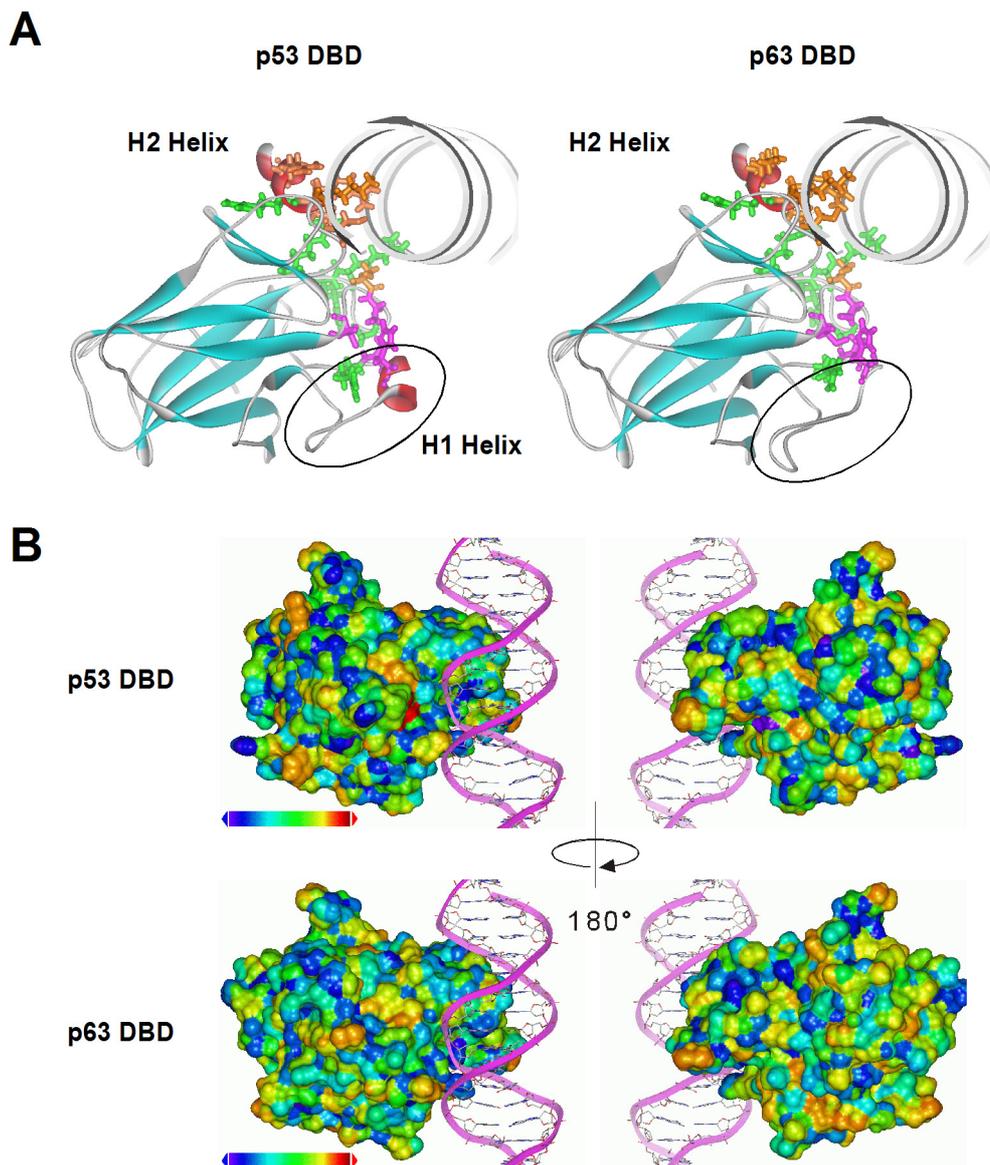


Abb. 6.11: A) Gegenüberstellung der Rückgrat-Darstellungen der p53 DBD Kristallstruktur (links) (Cho *et al.*, 1994) und des p63 DBD Homologie-Modells (rechts). Die vier Zn^{2+} -koordinierenden Reste sind violett, die sechs Mutations *hotspots* von p53 grün und die Reste, die mit der DNA interagieren, orange markiert. Die gebundene DNA-Doppelhelix ist schematisch in grau eingezeichnet. Das Oval hebt den Hauptunterschied der beiden Strukturmodelle in der Region nach der H1 Helix hervor. B) Gegenüberstellung der lipophilen Oberflächenpotentiale rotiert um 180°. Der ClogP wurde für jedes Atom der p53 DBD Struktur (oben) und des p63 DBD Modells (unten) berechnet. Blau steht für negative polare, rot für positive hydrophobe Werte. Adaptiert aus (Klein *et al.*, 2001a).

Ein statistischer Vergleich der p63 und p53 DBDs ergab keine größeren Unterschiede. Allerdings weist die p63 DBD einen niedrigeren Instabilitätsindex (Guruprasad *et al.*, 1990) und eine erhöhte Anzahl an hydrophoben Resten auf, die den hydrophoben Kern der Domäne stabilisieren könnten. Basierend auf dem Sequenz-Alignment der p63 und p53 DBD kann davon ausgegangen werden, daß beide Domänen eine vergleichbare Faltung mit kleineren strukturellen Unterschieden aufweisen. Dr. G. Georges (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) erstellte freundlicherweise ein **Homologie-Modell der p63 DBD** ähnlich zu Celli *et al.* (1999). Der Sequenz-basierte Vergleich der Domänen zeigte, daß sich die p63 und p53 DBD hauptsächlich in der erwähnten Region von 10 Aminosäure-Resten unterscheiden, die direkt auf die H1 Helix in p53 folgt. Eine Suche für diese kurze Sequenz in der PDB ergab keine auffallend homologen Strukturen für dieses Segment. Allerdings wurden unter Verwendung von aus der PDB extrahierten C α -Koordinaten drei potentielle Rückgrat *loops* für die nicht-konservierte Region vorgeschlagen. Der erste zeigt ein ausgedehntes *hairpin* Motiv auf der Oberfläche des Proteins. Der zweite verlängert die Helix, die das erwähnte Histidin (H208) beinhaltet und fügt einen dementsprechend verkürzten *loop* hinzu. Der dritte vorgeschlagene *loop* weist keine definierte Sekundärstruktur auf. Von den drei Homologie-Modellen ist vermutlich das mit dem *hairpin* Motiv am stabilsten (Abb. 6.11A). Der strukturelle Vergleich der Domänen ergibt keine größeren Unterschiede zwischen der p63 DBD-Modell- und der p53 DBD-Ursprungs-Struktur in bezug auf molekulare Oberfläche und Volumen. Allerdings zeigt das lipophile Oberflächenpotential (Abb. 6.11B) des p63 DBD-Modells und der p53 DBD-Struktur durchaus, daß die p63 DBD vermutlich weniger polar als die p53 DBD ist; besonders ausgeprägt ist dies für die Oberfläche, die der DNA-Bindungsregion gegenüber liegt (Abb. 6.11B, rechts). Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß das p63 DBD Homologie-Modell die potentielle Konformation eines ausgedehnten *hairpin loops* auf der Oberfläche der p63 DBD hervorhebt.

Diese auf die H1 Helix folgende Region, die den augenfälligsten Unterschied der p63 und p53 DBDs darstellt, ist auch die Region, deren Konformation in den beiden bekannten Kristallstrukturen der p53 DBD neben kleineren Unterschieden nahe der H2 Helix die größte Modulation aufweist (Cho *et al.*, 1994; Gorina und Pavletich, 1996). Dies impliziert, daß diese Region konformationell flexibel ist, und unterstützt die Annahme, daß Änderungen in der Struktur der p63 DBD in dieser Region wahrscheinlich sind. Die Bedeutung der H1 Helix für die p53 DBD Dimerisierungs-Kontaktfläche im tetrameren p53-DNA-Komplex wurde schon früh vorgeschlagen (Cho *et al.*, 1994) und konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals experimentell bestätigt werden (Kapitel 5.3). Untersuchungen der Struktur des p53 DBD-DNA-Komplexes legten darüber hinaus nahe, daß die DNA gekrümmt wird, um eine sterische Behinderung in der Kontaktfläche von vier an DNA-gebundenen p53 DBDs zu vermeiden (Nagaich *et al.*, 1997a; Nagaich *et al.*, 1997b). Die Tatsache, daß die in den p53 DBDs konservierten Reste H178, R181 und C182, die vermutlich eine Rolle bei der Dimerisierung der p53 DBDs spielen, in der p63 DBD nicht konserviert sind, sowie die Tatsache, daß die Region, die auf die H1 Helix folgt, den Hauptunterschied der p63 und p53 DBDs darstellt, und die spezielle Beschaffenheit und Orientierung des *hairpin* Motivs im Modell der p63 DBD lassen es sehr wahrscheinlich erscheinen, daß diese Region für die **fehlende Kooperativität der DNA-Bindung** der p63 DBD verantwortlich ist, z.B. indem sie mit der H1 Helix interferiert und/oder für die Dimerisierung notwendige konformationelle Umordnungen verhindert. Abb. 6.12 verdeutlicht an einem schematischen Modell für den dimeren p63 DBD-DNA-Komplex im Vergleich zum experimentell bestätigten

Modell des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes, daß die für eine Dimerisierung notwendige Kontaktfläche im Falle des p63 DBD wohl unter der erforderlichen Minimalfläche liegt, und so keine kooperative DNA-Bindung erlaubt. Es ist eine interessante Frage zu spekulieren, wie der vermutete Unterschied in den Dimerisierungs-Kontaktflächen der DBDs die DNA-Bindungseigenschaften der tetrameren Gesamtproteine beeinflusst. Auf dem Sequenz-Alignment und der modellierten Struktur beruhend könnten für weitergehende biochemische und zelluläre Studien chimäre p53 DBDs entworfen werden, denen die Dimerisierungs-Kontaktfläche fehlt, bzw. chimäre p63 DBDs, welche die Dimerisierungs-Kontaktfläche von p53 aufweisen.

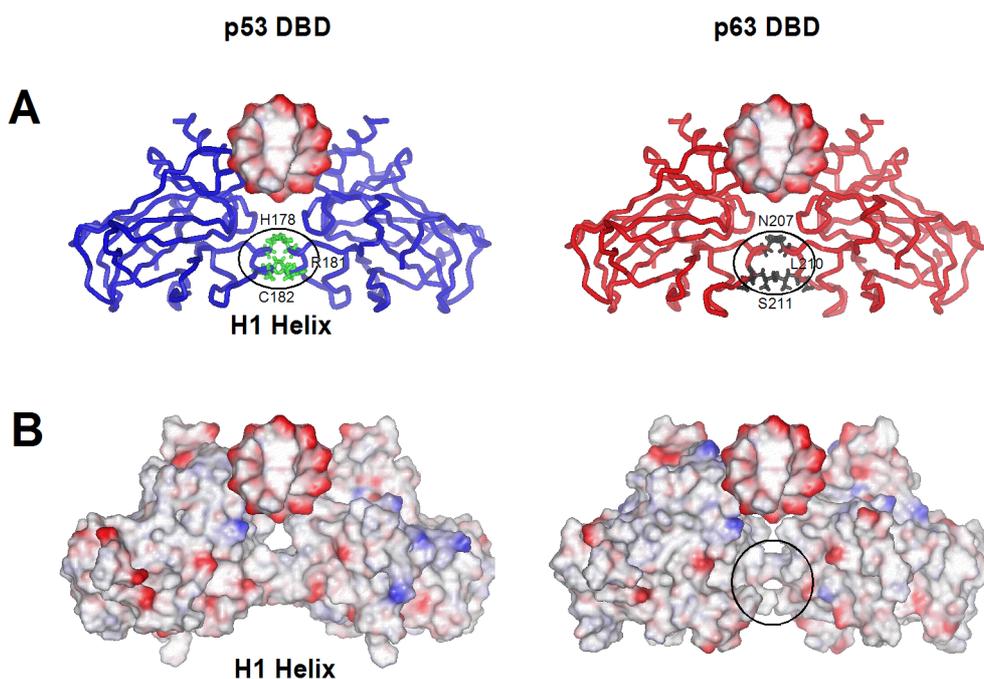


Abb. 6.12: Hypothetisches Modell zur Erklärung der fehlenden DNA-Bindungs-Kooperativität der p63 DBD im Vergleich zur p53 DBD. Das Modell für den dimeren p53 DBD-DNA-Komplex (links) beruht auf der Kristallstruktur der p53 DBD (Cho *et al.*, 1994) und den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NMR-spektroskopischen Studien (Kapitel 5.3). Auf der Grundlage des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes wurde ein Modell für den p63 DBD-DNA-Komplex erstellt (rechts). **A) Rückgrat-Darstellung.** Die Solvens-exponierten Reste H178, R181, C182 in p53 sind grün, die homologen Reste N207, L210, S211 in p63 schwarz hervorgehoben. **B) Connolly-Oberflächendarstellung** der dimeren DBD-DNA-Komplexe. Die Dimer-Kontaktfläche ist nicht minimiert.

Da das Modell der p63 DBD die N- und C-terminalen Regionen des gesamten p63 Proteins nicht beinhaltet, spiegelt es unter Umständen das tatsächliche Verhalten des Proteins nicht korrekt wider. Zumindest bietet aber der hydrophobe Charakter des Proteins zusammen mit der gepackten Konformation des *hairpin* Motivs eine Möglichkeit zur Erklärung der hohen Thermostabilität und des Fehlens der kooperativen DNA-Bindung der p63 DBD. Letztlich wird allerdings erst die Strukturanalyse des vollständigen p63 bzw. wenigstens der p63 DBD zeigen können, ob die gemachten Vorhersagen zutreffen. Bisher konnten keine Bedingungen gefunden werden, unter denen die p63 DBD kristallisiert. Da die p63 DBD aber sehr gut für NMR-spektroskopische Untersuchungen geeignet ist, werden momentan in

einer Kooperation mit Dr. G. Gemmecker (Institut für Organische Chemie und Biochemie II, Technische Universität München) die NMR-Signale der p63 DBD zugeordnet, um weiteren Einblick in die Struktur der p63 DBD zu gewinnen. Mit der Zuordnung sollte es schon in absehbarer Zeit möglich sein, weitere *chemical shift perturbation* Experimente z.B. zur Untersuchung des Modus der vermutlich nicht kooperativen DNA-Bindung durchzuführen. Zudem wurde kürzlich gezeigt, daß bestimmt p63 Isotypen Komplexe mit p53 bilden, und daß diese Interaktion von den beiden DBDs vermittelt wird (Ratovitski *et al.*, 2001). Andere Experimente unterstützen abhängig von dem polymorphen Arg72Pro-Allel (Marin *et al.*, 2000) eine direkte Interaktion zwischen von Tumoren abgeleiteten mutanten p53 DBDs und p63 bzw. p73 (Gaiddon *et al.*, 2001; Strano *et al.*, 2002; Strano *et al.*, 2000). Die Verfügbarkeit von gereinigten, monomeren und Isotopen-markierten p63 und p53 DBDs macht es nun möglich die molekulare Basis dieser Interaktionen zwischen den DBDs mit verschiedenen Methoden wie z.B. Immunpräzipitationen, ITC und NMR (*chemical shift perturbation mapping*) näher zu untersuchen. Im Rahmen erster Untersuchungen konnten aber keine Hinweise auf eine eventuelle Interaktion der p63 DBD und wildtyp p53 DBD gefunden werden.

Um weiteren Einblick in das Verhalten der p53 Homologen zu gewinnen wurde von M. Kreuzler in seiner Diplomarbeit die homologe **p73 DBD** kloniert, exprimiert und anschließend biochemisch und biophysikalisch im Vergleich zur p53 DBD charakterisiert (Kreuzler, 2002). Trotz der hohen Sequenzhomologie ließ sich die freie p73 DBD ohne GST-Tag im Unterschied zu p53 und p63 nur schwer in *E. coli* exprimieren. Das Sequenz-Alignment der DBDs der Mitglieder der p53 Familie zeigt zwischen p73 und p63 eine hohe Identität insbesondere auch in der für die Dimerisierung von p53 zuständigen H1 Helix Region. Gemäß der oben für p63 beschriebenen Erwartung band die freie p73 DBD ebenfalls nicht kooperativ an Consensus-DNA. Als dimerisiertes GST-Fusionsprotein band die GST-p73 DBD jedoch analog zu p63 mit vergleichbarer Affinität an die betrachteten natürlichen p53 Consensus-Sequenzen. Die p73 und p53 DBDs wiesen zudem ebenfalls ein vergleichbares Profil ihrer DNA-Spezifitäten auf. Auf der Ebene der DBDs war demgemäß mit den getesteten Consensus-DNA-Oligonukleotiden für alle Mitglieder der p53 Familie kein Unterschied in der DNA-Erkennung ersichtlich, der für die unterschiedlichen Funktionen der Homologen ursächlich sein könnte. Mit einem Schmelzpunkt von $T_m=51^\circ\text{C}$ nahm die p73 DBD in bezug auf seine Stabilität DBD eine Zwischenstellung zwischen der thermolabilen p53 DBD und der thermostabilen p63 DBD ein. Ähnlich wie GST-p63 DBD verlor GST-p73 DBD allerdings trotz der im Vergleich zu p53 erhöhten Thermostabilität seine DNA-Bindungsaktivität bei Inkubation mit niedrigeren Konzentrationen an Phenanthrolin, was auf eine schwächere Koordination des Zn^{2+} -Ions in der p73 DBD schließen läßt.

Das p63 Protein ist möglicherweise das älteste Mitglied der p53 Familie (Yang *et al.*, 1998; Yang und McKeon, 2000). Die erhöhte *in vitro* Thermostabilität der p63 DBD könnte die evolutionäre Entwicklung und die unterschiedliche *in vivo* Funktion von p53, p63 und p73 widerspiegeln („**Regulation der Funktion durch Proteininstabilität**“ (Lohrum und Vousden, 2000). Über die zelluläre Stabilität der p63 und p73 Isoformen ist wenig bekannt (Ratovitski *et al.*, 2001). Die N-terminale TAD scheint bei der Regulation der Stabilität von p63 eine Rolle zu spielen (Osada *et al.*, 2001). Aus der konstitutiven physiologischen Funktion während der Entwicklung und Epithelregeneration läßt sich aber ableiten, daß p63 vermutlich eine längere Halbwertszeit als das Tumorsuppressorprotein p53 aufweist, und daß p73 in diesem Kontext eine Zwischenstellung einnimmt. p53 kommt normalerweise in geringen

Konzentrationen in der Zelle vor und hat eine kurze Halbwertszeit; als Folge seiner potentiellen „Toxizität“ für normale Zellen wird es unter physiologischen Bedingungen streng kontrolliert. Erst als Folge von zellulären Stress-Signalen wird p53 über post-translationale Mechanismen aktiviert und akkumuliert in der Zelle (Maltzman und Czyzyk, 1984; Reich *et al.*, 1983). Ein Weg diese strenge Kontrolle zu erreichen, mag die geringe thermodynamische Stabilität der p53 DBD sein, die zu einem schnellen Umsatz von inaktivem, entfaltetem p53 Protein vermittelt durch das Ubiquitin-Proteasom-System führt. Diese Interpretation wird dadurch unterstützt, daß MDM2 an die N-terminale Region von p53 bindet, und dadurch die transkriptionelle Aktivität von p53 inhibiert und es dem proteolytischen Abbau zuführt (Ashcroft und Vousden, 1999; Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997; Prives, 1998), wogegen p63 thermodynamisch sehr stabil und unabhängig von MDM2 ist, da weder MDM2 noch MDMX fähig sind, an die N-terminale TAD von p63 zu binden und/oder es dem proteolytischen Abbau zuzuführen (Little und Jochemsen, 2001; Wang *et al.*, 2001e). Die Betrachtung von p73, dessen thermodynamische Stabilität zwischen der von p53 und p63 angesiedelt ist, unterstützt die Interpretation einer Zwischenstellung von p73. So wird die transkriptionelle Aktivität von p73 durch die Bindung an MDM2 und durch Phosphorylierung der NTD reguliert; allerdings wird p73 durch MDM2 nicht dem Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt (Wang *et al.*, 2001e).

p53 hat in den letzten Jahren ein beträchtliches Interesse in der Erforschung der Mechanismen der Tumorigenese und ihrer Verhinderung gewonnen, da es das wichtigste Tumorsuppressorprotein in Säugern ist. Daher hat die vergleichsweise späte Entdeckung einer p53 Familie eine Reihe von wichtigen Fragen aufgeworfen, die die biologische Funktion der Homologen p63 und p73 betreffen. Offensichtlich ist die Struktur, Bindungsspezifität und Stabilität der DNA-Bindungsdomäne dieser Familie von Transkriptionsfaktoren für die Modulation ihrer Funktion von essentieller Bedeutung. Bisher war aber für die p53 homologen Proteine p63 und p73 nur sehr wenig über Struktur-Funktions-Beziehungen bekannt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die **p63 DBD** erstmals biochemisch und biophysikalisch im direkten Vergleich zur p53 DBD charakterisiert. Zusammengefaßt ermöglichte die biochemische und biophysikalische Charakterisierung der p63- δ DBD Einblick in einige bisher unbekannte Eigenschaften der p63 DBD im Vergleich zu p53, die von allgemeinem Interesse für die Untersuchung der p53 Familienmitglieder sind. Im Gegensatz zu p53 kann die freie p63 DBD nicht kooperativ an DNA binden; während die durch N-terminale Fusion mit GST dimerisierte GST-p63 DBD sequenzspezifisch an DNA bindet und vergleichbare Tendenzen in der Affinität und Spezifität für ausgewählte natürlich vorkommende p53 Consensus-Bindungsstellen wie GST-p53 DBD zeigt. Dies legt den Schluß nahe, daß beide DBDs das gleiche Consensus-Bindungsmotiv erkennen. Im Gegensatz zu p53 ist die p63 DBD thermodynamisch bemerkenswert stabil. Diese Ergebnisse können als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen, die Struktur von p63 aufzuklären, um letztendlich die molekulare Basis der unterschiedlichen Funktionen der p53 Familienmitglieder p53, p63 und p73 bei der Tumorigenese und in der Entwicklung besser zu verstehen.

6.5 Struktur des Onkoproteins hXDM2 im Komplex mit einem hochaffinen p53 Peptidantagonisten

Proteininteraktionen können durch Technologien wie *two hybrid screening* und Massenspektroskopie mittlerweile auf Proteomebene untersucht werden (Gavin *et al.*, 2002; Schwikowski *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2002; Uetz *et al.*, 2000). Die Entwicklung von Proteinarray-Formaten trägt momentan dazu bei, das Wissen über Proteininteraktionsnetzwerke massiv zu erweitern (Emili und Cagney, 2000; Zhu *et al.*, 2001). Die exponentiell wachsende Zahl an Proteininteraktionen und ihre Bedeutung für die Regulation zellulärer Prozesse wird dazu führen, daß Agonisten und Antagonisten von Proteininteraktionen in der Zukunft eine größere Bedeutung im Wirkstoffdesign erlangen werden. Ein Überblick über die Prinzipien von Proteininteraktionen (Jones und Thornton, 1996; Lebrun *et al.*, 2001; Stites, 1997) macht allerdings auch deutlich, daß die **Inhibition von Protein-Interaktionen** durch niedermolekulare Verbindungen aufgrund der großen Interaktionsflächen und der Affinität der Interaktionen schwierig ist (Babine und Bender, 1997; Cochran, 2000). Insbesondere in den letzten Jahren wurden aber einige Beispiele für niedermolekulare und peptidische Antagonisten und Agonisten von Protein-Interaktionen beschrieben (Cochran, 2001). Beispiele umfassen Mimetika von Insulin (Zhang *et al.*, 1999) und Erythropoitin (Qureshi *et al.*, 1999), Antagonisten von Mitgliedern der Bcl-2 Familie (Degterev *et al.*, 2001; Tzung *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000a) sowie Antagonisten der HIV Protease-Dimerisierung und der HIV Membranfusion (Blair *et al.*, 2000; Eckert *et al.*, 1999; Sodroski, 1999) u.v.a. Bei der Entwicklung niedermolekularer Antagonisten finden zur Optimierung der Affinität natürlicher Peptidliganden Methoden wie *phage display* und kombinatorische Ansätze Anwendung, die im Idealfall über Peptidomimetika zu niedermolekularen Verbindungen führen (Buolamwini, 1999; Fairlie *et al.*, 1998; Kay *et al.*, 2000; Kay *et al.*, 1998; Park und Raines, 2000).

Wie die Transaktivierungsdomänen anderer Transkriptionsfaktoren enthält die N-terminale p53 TAD ein α -helikales **Fxx Φ Φ -Motiv** (F: Phenylalanin, x: beliebige Aminosäure, Φ : hydrophobe Aminosäure; in p53: Trp²³), das für die Interaktion mit MDM2 und mit Faktoren der Transkriptionsmaschinerie wie hTAF_{II}31 verantwortlich ist (Kussie *et al.*, 1996; Uesugi und Verdine, 1999). NMR Experimente zeigten, daß die freie p53 TAD keine definierte Tertiärstruktur aufweist (Botuyan *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1995; Kar *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2000); erst durch die Interaktion mit MDM2 oder hTAF_{II}31 wird die Faltung zu einer amphiphilen Helix induziert (Blommers *et al.*, 1997; Kussie *et al.*, 1996; Uesugi und Verdine, 1999). Im Gegensatz zur geringen Spezifität von hTAF_{II}31 ist MDM2 durch seine spezifische Struktur in der Lage, zwischen der TAD von p53 und den TADs von p65-NF- κ B und VP16 zu differenzieren, so daß MDM2 spezifisch nur die Transkription von p53 inhibiert. Trp²³ und Leu²⁶ sind dabei die entscheidenden Spezifitätsdeterminanten, anhand derer MDM2 die TAF-Bindungsstellen von p53 und VP16 bzw. NF- κ B unterscheidet (Uesugi und Verdine, 1999). Aufgrund der Bedeutung der durch diese Interaktion regulierten p53-MDM2-Rückkopplungsschleife (*feedback loop*) bei der Tumorsuppression bzw. der Tumorentstehung haben Ansätze zu einer Reaktivierung der p53 Aktivität großes Interesse in der Entwicklung neuartiger Tumorthapeutika gefunden (Cochran, 2001; Lane, 1999; Moll und Zaika, 2000; Picksley *et al.*, 2001; Zhang und Wang, 2000). Eine therapeutische Intervention basierend auf der Inhibition der p53-HDM2-Interaktion sollte in p53 wildtyp Tumorzellen, die über einen funktionellen p53 Weg verfügen und im Idealfall eine gleichzeitige Überexpression

von HDM2 aufweisen (Momand *et al.*, 1998), durch Induktion einer p53-vermittelten Antwort einen hohen therapeutischen Nutzen versprechen. Daneben könnte die Inhibition der p53-HDM2-Interaktion Tumorzellen für eine konventionelle Chemotherapie im Rahmen einer Kombinationstherapie sensibilisieren (*Chemosensitizer*). Beide Ansätze machen eine Patienten-Stratifizierung zur Bestimmung des p53 Status vor einer Therapie erforderlich (Soussi und Beroud, 2001). Die Validität dieses therapeutischen Ansatzes ist in einer Reihe von Publikationen gezeigt worden (*proof-of-principle*) (Lane und Hall, 1997). Mit HDM2 Antisense-Oligonukleotide konnte p53 in diversen zellulären Modellsystemen aktiviert und p53-vermittelt Apoptose und Zellzyklus-Arrest induziert werden (Chen *et al.*, 1999c; Geiger *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001a; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1999). In Zellkultursystemen konnte durch Mikroinjektion eines monoklonalen Antikörpers (3G5), der die p53-Bindungsstelle von HDM2 blockiert (Bottger *et al.*, 1997a), die p53-vermittelte Transkription drastisch gesteigert werden (Blaydes *et al.*, 1997; Bottger *et al.*, 1997b). Schließlich konnte die Interaktion zwischen der N-terminalen Transaktivierungsdomäne von p53 und der N-terminalen Domäne von HDM2 durch peptidische Modellantagonisten inhibiert werden. Ausgehend von N-terminalen p53-Peptiden wurde in einem kombinatorischen Ansatz durch *phage display* ein neues, potentes und verkürztes IP3-Peptid mit verbesserten Bindungseigenschaften identifiziert (Bottger *et al.*, 1996) (Abb. 6.12). Die intrazelluläre Expression von Fusionsproteinen des IP3-Peptids mit Thioredoxin bzw. mit GST führte in Tumorzellen zur transkriptionellen Aktivierung von p53 und zur Induktion p53-vermittelter Apoptose (Bottger *et al.*, 1997b; Wasyluk *et al.*, 1999). Peptidische Inhibitoren der p53-HDM2-Interaktion wie das IP3-Peptid und das NVP-Peptid waren gekoppelt an eine PTD ebenfalls in der Lage, eine p53-vermittelte Antwort in zellulären Systemen zu induzieren (Chene *et al.*, 2000; Garcia-Echeverria *et al.*, 2001; Kanovsky *et al.*, 2001)^{20, 21}.

Basierend auf dem Konzept der **Inhibition der p53-MDM-Interaktion** wurden diverse ELISA bzw. Fluoreszenz-basierte hochdurchsatzfähige Assay-Formate für das Screening nach niedermolekularen Antagonisten der p53-HDM2-Interaktion entwickelt (Kane *et al.*, 2000; Knight *et al.*, 2002). In den letzten Jahren wurden mehrere niedermolekulare Antagonisten der p53-MDM-Interaktion beschrieben, die einen Ausgangspunkt für ein rationales Wirkstoffdesign darstellen (Lane, 1999; Picksley *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2002). Aus einer Bibliothek von mikrobiellen Extrakten konnte das zyklische Nonapeptid Chlorofusin isoliert werden (Duncan *et al.*, 2001). Chlorofusin wird von dem Pilz *Fusarium* synthetisiert (Duncan *et al.*, 2002) und inhibiert die p53-HDM2-Interaktion mit einem IC₅₀ von 4.6 µM. Es stellt aufgrund seiner komplexen Struktur und Größe von ca. 1400 kD eine Leitstruktur für das Design einfacherer Analoga dar. Basierend auf dem IP3-Peptid (Bottger *et al.*, 1996) und der Struktur von HDM2 im Komplex mit dem p53-Peptid (Kussie *et al.*, 1996) wurden bei Astra Zeneca durch strukturbasiertes Design und kombinatorische Chemie zyklische Pentapeptide und Acylaminosäurepiperazide identifiziert, die die p53-HDM2-Interaktion mit einem IC₅₀ von 0.5 µM inhibieren (Luke *et al.*, 2000). Schließlich wurden bei Roche in einem Screening niedermolekulare Phenoxysäurederivate und Chalcone (1,3-diphenyl-2-propen-1-one) identifiziert (di Domenico *et al.*, 1999). Chalcone inhibieren die p53-HDM2-Interaktion in einem ELISA mit einem IC₅₀ von ca. 50 µM und setzen HDM2 in

²⁰ Das NVP-Peptid transduziert bei Konzentrationen von 100 µM auch ohne PTD in Zellen!

²¹ Die Reproduktion dieser Versuche mit Tat-gekoppelten Peptiden zeigte nur bei hohen Peptid-Konzentrationen schwache Effekte.

einem DNA-Bindungstest aus dem vorgeformten p53-HDM2-Komplex frei (Daten nicht gezeigt) (Stoll *et al.*, 2001). Durch NMR-Spektroskopie (*chemical shift perturbation mapping*) konnte zudem gezeigt werden, daß Chalcone in der p53-Peptidbindungstasche binden (Stoll *et al.*, 2001; Stoll *et al.*, 2000). Als Mimetika von Protein- α -Helices könnten zudem Biphenyle bei der Inhibition der p53-HDM2-Interaktion Anwendung finden (Jacoby, 2002).

Aus den durch *phage display* identifizierten Peptidsequenzen konnte für die Bindung an MDM2 das folgende Consensus-Aminosäuremotiv **PxFxDYWxxL** bestimmt werden, das der natürlich vorkommenden p53 Sequenz sehr nahekommt (Bottger *et al.*, 1997a; Bottger *et al.*, 1999; Bottger *et al.*, 1996). Die kombinatorische Permutation der Aminosäuren dieses Motivs mit natürlichen Aminosäuren ermöglichte es, den Beitrag der einzelnen Aminosäure-Reste zur Bindung zu ermitteln. Dabei zeigte sich, daß Phe¹⁶ und Trp²³ sowie der korrekte Abstand dieser beiden Anker-Aminosäuren für die Bindung absolut unerlässlich sind. Weder Phe¹⁶ noch Trp²³ können durch andere natürliche Aminosäuren ersetzt werden, wogegen die dritte Anker-Aminosäure Leu²⁶ nicht absolut konserviert ist. Allerdings führt der Austausch von Leu²⁶ gegen eine hydrophobe Aminosäure zu einer deutlichen Verringerung der Affinität um den Faktor 3-5. Peptide, die Tyr²² enthalten, sind schließlich um den Faktor 10 aktiver als Peptide mit der natürlich vorkommenden Aminosäure Leu²². Obwohl die Aminosäuren Pro¹⁷ und Asp²¹ im *phage display* häufig auffielen, ist ihr ihre Konservierung und ihr Beitrag zur Bindungsaffinität eher gering einzuschätzen (Bottger *et al.*, 1997a). Die experimentellen Daten für die Bindung der Peptide an MDM2 lassen sich anhand der Kristallstruktur von HDM2 im Komplex mit dem p53-Peptid sehr gut rationalisieren (Kussie *et al.*, 1996). Sie spiegeln darüber hinaus auch die Vorhersagen von *molecular dynamics* Ansätzen wieder, bei denen basierend auf der Kristallstruktur und den *phage display* Ergebnissen die Effekte von Mutationen auf die freien Bindungsenergien im p53-MDM2-Komplex simuliert wurden (Massova und Kollmann, 1999). Diese Ansätze haben u.a. das Ziel, Modelle über quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen (*QSAR*) für die Entwicklung niedermolekularer MDM2-Antagonisten zu etablieren (Galatin und Abraham, 2001; Wollacott and Desjarlais, 2001).

p53		Glu	-Thr-	Phe ¹⁶	-Ser-	Asp	-Leu-		Trp ²³	-Lys-	Leu	-Leu ²⁶	-Pro-	Glu-	Asn-NH ₂	+
p53 (L22Y)		Glu	-Thr-	Phe ¹⁶	-Ser-	Asp	-Tyr-		Trp ²³	-Lys-	Leu	-Leu ²⁶	-Pro-	Glu-	Asn-NH ₂	++
IP3	Met-Pro-	Arg	-Phe ¹⁶	-Met-	Asp	-Tyr-		Trp ²³	Glu-Gly	-Leu ²⁶	-Asn-NH ₂					+++
NVP		Ac-Phe ¹⁶	-Met-	Aib	-Pmp-	6-Cl-		Trp ²³	Glu-Ac3c	-Leu ²⁶	-NH ₂					++++

Abb. 6.13: Sequenz-Alignment der diskutierten MDM2-bindenden Peptide. Die für die Bindung an MDM2 essentiellen Aminosäuren Phe¹⁶, Trp²³ und Leu²⁶ sind rot unterlegt und mit Pfeilen markiert. Die relative Affinität der Peptide ist rechts angegeben. Die gelb markierten Reste führen zu einer Steigerung der Bindungsaffinität.

Wie die Kristallstruktur des IP3-Peptids im Komplex mit hXDM2 (S. Palme, pers. Mitteilung) zusammen mit den oben gezeigten kalorimetrischen ITC-Experimenten zeigen, sind für die erhöhte Affinität des IP3-Peptids im Vergleich zum natürlichen p53-Peptid (K_D 91 nM versus 1.7 μ M für das p53-Peptid) vor allem zusätzliche van-der-Waals-Kontakte als Folge des Austausch von Leu²² gegen Tyr²² sowie von Ser²⁰ gegen Met²⁰ verantwortlich. Diese Reste vergrößern die hydrophobe Kontaktfläche und damit die Affinität (siehe unten). Alleine der Austausch von Leu²² gegen Tyr²² führt zu einer Steigerung der Affinität des p53-Peptids um den Faktor 3. Die Beiträge der Solvens-exponierten und ungeordneten flankierenden terminalen Reste zur Bindung sind dagegen nur schwer abzuschätzen und wohl nur von

sekundärer Bedeutung für die Affinität. Bei Novartis Pharma (Basel, Schweiz) wurde ausgehend von der Sequenz des IP3-Peptids (Bottger *et al.*, 1996) durch semirationales Design und mithilfe von NMR-spektroskopischen Daten das synthetische **NVP-Peptid** entworfen (Abb. 6.1.3). Dieses zeichnet sich durch ein kleines Molekulargewicht von 1.210 kD aus und ist in zellulären Testsystemen aktiv (Chene *et al.*, 2000; Garcia-Echeverria *et al.*, 2000). Das NVP-Peptid umfaßt nur eine Minimalsequenz mit den zentralen für eine Bindung essentiellen Resten Phe¹⁹ bis Leu²⁶. Es wurde mit dem Ziel entworfen, die Affinität des Peptids durch zwei Faktoren zu erhöhen. Da konformationell restringierte Peptide entropisch bevorzugt binden, wurden zum einen die Solvens-exponierten Aminosäuren Asp²¹ und Gly²⁵ durch die unnatürlichen α,α -disubstituierten Aminosäuren Aib²¹ und Ac₃c²⁵ ausgetauscht, die die α -helikale Konformationen stabilisieren sollten (Marshall *et al.*, 1990). Zum anderen sollten durch den Austausch von Tyr²² und Trp²³ gegen das Phosphonomethyl-substituierte Tyrosin-Derivat Pmp²¹ bzw. das 6-Chlor-substituierte Tryptophan-Derivat 6-Cl-Trp²³ im Vergleich zum IP3-Peptid zusätzliche polare und van-der-Waals-Kontakte in das Peptid eingeführt werden (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000). Mit diesen Veränderungen konnte in Konkurrenzexperimenten eine relative Steigerung der Affinität um den Faktor 60 (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000) bzw. 350 (E. Liu, pers. Mitteilung) erzielt werden.

Da bisher alle Versuche zur Kristallisation von freiem HDM2 bzw. MDM2 im Komplex mit niedermolekularen Antagonisten vermutlich aufgrund der Hydrophobizität und Aggregationsneigung der N-terminalen MDM2-Domäne fehlschlugen, wurde für Kristallisationsexperimente im Rahmen dieser Arbeit humanisiertes XDM2 aus *Xenopus laevis* (Marechal *et al.*, 1997) verwendet. hXDM2 verfügt über eine humane p53 Bindungsstelle, eine verringerte Aggregationsneigung sowie gute Kristallisationseigenschaften (S. Palme, pers. Mitteilung). hXDM2 ließ sich im Komplex mit dem hochaffinen NVP-Minimalpeptid kristallisieren. Die **Kristallstruktur** konnte bis zu einer Auflösung von 2.0 Å gelöst werden. Sie verdeutlicht den stark hydrophoben Charakter der Bindung, die auf van-der-Waals-Kontakten (induzierten Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) und dem hydrophoben Ausschluß von Wasser beruht; sowie die hohe Paßform bzw. sterische Oberflächenkomplementarität (*shape complementarity*) der Bindungspartner (Jain *et al.*, 2001), die eine essentielle Voraussetzung für die Ausbildung von van-der-Waals-Kontakten darstellt. Das NVP-Peptid bindet über eine hydrophobe Triade aus den Resten Phe¹⁹, 6-Cl-Trp²³ und Leu²⁶ in die hydrophobe Bindungstasche von hXDM2 und füllt sie fast vollständig aus. Insbesondere durch das polarisierbare Cl-Atom füllt 6-Cl-Trp²³ die tiefe hydrophobe Bindungstasche besser als das p53-Peptid aus. Trotz geringer Unterschiede entspricht der **Bindungsmodus** des NVP-Peptids erwartungsgemäß grundsätzlich dem des natürlichen p53-Peptids, wie er durch die Konformation der Bindungstasche vorgegeben ist. Die im p53-Peptid nicht vorhandenen α,α -disubstituierten Aminosäuren Aib²¹ und Ac₃c²⁵ sind wie Asp²¹ und Gly²⁵ im p53-Peptidkomplex Solvens-exponiert und bilden keine weiteren Interaktionen aus, die für die erhöhte Affinität verantwortlich sein könnten. Ihre Wirkung bei der Erhöhung der Affinität ist daher nur als Folge der konformationellen Stabilisierung der für die Bindung optimalen Konformation des NVP-Peptids in Lösung zu verstehen (siehe unten) (Marshall *et al.*, 1990). Polare **intermolekulare Wasserstoffbrücken** innerhalb der eigentlichen Bindungstasche existieren nur zwischen der Amidgruppe des Indolrings im 6-Cl-Trp²³ und der Carbonylgruppe von L50A*. Sie ist jedoch für die Bindung vermutlich nicht essentiell, da Trp²³ gegen Naphtyl-Reste ausgetauscht werden kann (W. Schäfer, pers. Mitteilung). Die

Substitution von Tyr²² gegen das Tyrosin-Derivat Pmp²² im NVP-Peptid führt zur Ausbildung der vorhergesagten stabilisierenden Wasserstoffbrücke der Phosphonomethylgruppe mit K90A und zusätzlich, wie nicht vorhergesagt, mit H69A an der Oberfläche der Peptidbindungstasche (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000). In der Struktur mit dem NVP-Peptid ist der Phenylring von Pmp²² aus der Ebene gekippt; so daß vermutlich keine zusätzlichen van-der-Waals-Kontakte mit hXDM2 wie im Komplex mit dem IP3-Peptid existieren. Zwar erhöht die Substitution von Tyr²² durch Pmp²² die Affinität des Peptids; andererseits sind aber alle außerhalb der Bindungstasche auftretenden Wasserstoffbrücken leicht Solvens-zugänglich. Es ist daher nur sehr schwer abzuschätzen, welchen tatsächlichen Beitrag die Wasserstoffbrücken zur Bindungsaffinität haben (Böhm *et al.*, 1996). Möglicherweise spielen sie eine Funktion bei der Orientierung des Peptids während der Bindung und der Selektivität. In Abb. 6.14 ist ein zweidimensionales schematisches Modell der Struktur-Beziehungen gezeigt, die bei der Interaktion des NVP-Peptids mit hXDM2 im Kristall eine Rolle spielen.

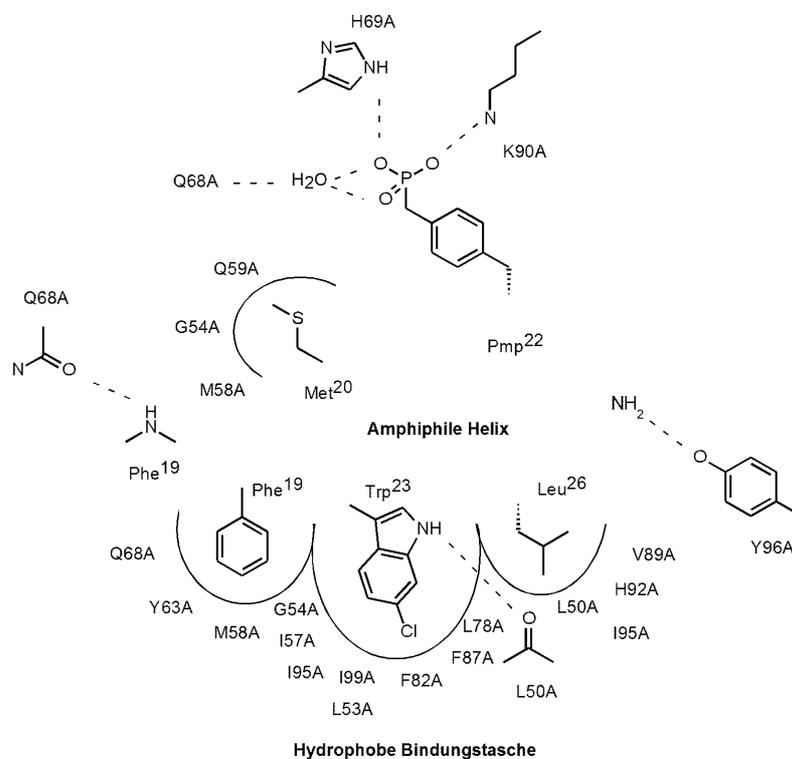


Abb. 6.14: Zweidimensionales vereinfachtes Schema der Bindungstasche in der Kristallstruktur von hXDM2 im Komplex mit dem NVP-Peptid mit den wichtigsten Resten und Interaktionen.

Mithilfe des Programms AREAIMOL (CCP4, 1994) wurde die **bedeckte Kontaktfläche** des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes nach der folgenden Formel: $\text{Kontaktfläche} = (\text{Fläche MDM2} + \text{Fläche Peptid} - \text{Fläche Komplex})/2$ berechnet und mit dem hXDM2-IP3-Komplex und den HDM2- und XDM2-p53-Komplexen verglichen. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten und zusätzliche Kontaktflächen durch Kristallpackungseffekte auszuschließen²², wurden die

²² Vermutlich als Folge der Kristallpackung sind die C-terminalen Reste des p53-Peptids in der Kristallstruktur mit HDM2 fixiert und damit partiell geordnet, obwohl sie außerhalb der eigentlichen Bindungsstelle liegen, dort nicht zur Bindung beitragen und in Lösung vermutlich ungeordnet und

Berechnungen für das IP3- und die p53-Peptide auf die Aminosäuren Phe¹⁹ bis Leu²⁶ beschränkt, welche bei allen Peptiden die für die Bindung absolut erforderlichen Reste darstellen (S. Palme, pers. Mitteilung) (Kussie *et al.*, 1996). Die ausgeschlossenen Reste inklusive Pro²⁷ tragen aller Wahrscheinlichkeit nicht bzw. nur in sehr geringem Ausmaße zur Bindung bei (siehe oben) (Bottger *et al.*, 1997a; Kussie *et al.*, 1996; Massova und Kollmann, 1999).

Tab. 6.3: Bedeckte Kontaktflächen der strukturell aufgeklärten DM2-Peptidkomplexe sowie Berechnung der freien Bindungsenthalpie pro Å² bedeckter Oberfläche. * S. Palme und P. Rürger, pers. Mitteilung. Die freien Bindungsenthalpien wurden Tab. 5.5.1 entnommen; für das NVP-Peptid wurde die freie Bindungsenthalpie anhand von Konkurrenzexperimenten abgeschätzt.

Komplex	Fläche DM2	Fläche Peptid	Fläche Komplex	Kontaktfläche	K _D	G/Fläche
hXDM2-NVP	5504 Å ²	1190 Å ²	5561 Å ²	567 Å ²	0.25- 1.5 nM	95 J/mol*Å ² - 87 J/mol*Å ²
hXDM2-IP3	5625 Å ²	1098 Å ²	5711 Å ²	506 Å ²	91 nM	78 J/mol*Å ²
HDM2-p53	5287 Å ²	1090 Å ²	5423 Å ²	477 Å ²	240 nM*	77 J/mol*Å ²
XDM2-p53	5428 Å ²	1120 Å ²	5671 Å ²	439 Å ²	2900 nM*	63 J/mol*Å ²

Der Vergleich der bedeckten Kontaktflächen in Tab. 6.3 zeigt, daß die berechneten Oberflächen den Verlauf der Affinitäten unter diesen Voraussetzungen gut widerspiegeln. Das hochaffine NVP-Peptid im Komplex mit hXDM2 hat die größte Kontaktfläche (567 Å²) gefolgt vom IP3-Peptid im Komplex mit hXDM2 (506 Å²). Der Komplex des p53-Peptids mit HDM2 (477 Å²) weist schließlich eine größere Kontaktfläche als der Komplex mit XDM2 (439 Å²) auf. Diese Berechnungen zeigen, daß die hohe Potenz und Affinität des NVP-Peptids auf die signifikant erhöhte bedeckte Kontaktfläche zurückzuführen ist, die unter anderem aus dem Austausch von Trp²³ gegen das hydrophobere 6-Cl-Trp²³ resultiert. Zusammen mit der konformationellen Stabilisierung der Konformation konnte dadurch eine signifikante Steigerung der bedeckten hydrophoben Kontaktfläche (Garcia-Echeverria *et al.*, 2001) erzielt werden. Gleichzeitig führte der Austausch von Leu²⁵ gegen Pmp²⁵ zur Ausbildung zusätzlicher polarer Interaktionen an der Oberfläche der Domäne, deren Bedeutung für die Affinität aufgrund der hohen Solvens-Exposition allerdings fraglich ist. Basierend auf statistischen Berechnungen der Kontaktflächen in bekannten Proteinkomplexen aus der PDB und auf theoretischen Vorhersagen liegt die minimal notwendige Kontaktfläche für Protein-Protein-Interaktionen bei ca. 600 Å² (Jones und Thornton, 1996; Stites, 1997). Diese Kontaktfläche kann theoretisch von drei hydrophoben Aminosäuren wie z.B. Phe (135 Å²), Met (115 Å²) und Trp (180 Å²) (siehe unten) begraben werden; statistische Untersuchungen an Proteinkomplexstrukturen zeigten jedoch, daß im allgemeinen mehr Aminosäure-Reste in Protein-Protein-Interaktionen involviert sind. Mit einer Kontaktfläche von 567 Å² liegt der Komplex des 8-er NVP-Peptids mit hXDM2 nahe an der unteren Grenze für Protein-Protein-Interaktionen und gleichzeitig nahe an der theoretisch möglichen bedeckten Kontaktfläche für ein amphiphiles 8-er Peptid. Es ist auffällig, daß die Oberfläche des hXDM2-NVP-Komplexes nur geringfügig größer als die

flexibel sind. Bei der Berechnung der bedeckten Oberfläche würden diese Reste eine in Lösung nicht vorhandene Interaktionsfläche vortäuschen. Die Hypothese der Flexibilität der Reste außerhalb der Bindungsstelle, könnte durch NMR-Spektroskopie in Lösung experimentell bestätigt werden.

Fläche der freien hXDM2-Domäne ist, was für den minimalen Charakter des NVP-Peptids und eine hohe Oberflächenkomplementarität spricht.

Interessanterweise bedeckt das p53-Peptid in der Komplexstruktur mit HDM2 mit seinen drei Resten Phe¹⁹, Trp²³ und Leu²⁶ 69% der am stärksten hydrophoben Bereiche der HDM2-Domäne (Scarsi *et al.*, 1999). Für das NVP-Peptid kann von einer noch vollständigeren Bedeckung der hydrophoben hXDM2-Oberfläche ausgegangen werden. Durch die Vergrößerung und Verbesserung der Paßform der Kontaktfläche von NVP-Peptid und hXDM2 werden im Vergleich zu niedriger affinen Peptiden van-der-Waals-Kontakte sowie die beschriebenen polaren Interaktionen gefördert. Daneben spielen bei der Steigerung der Affinität aber auch **entropische Effekte** eine wichtige Rolle (Böhm *et al.*, 1996). NMR-Untersuchungen mit dem p53-Peptid (Blommers *et al.*, 1997) und einer Variante des NVP-Peptids (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000) zeigten, daß Phe¹⁹ und Trp²³ im freien und im komplexierten Zustand ähnlich wie im hydrophoben Inneren von Proteinen gepackt sind und in wässrigen Lösungen einen rigiden Kern aus den hydrophoben Aminosäuren Phe¹⁹, Tyr²², Trp²³ und Leu²⁶ ausbilden. Zusätzlich zu dieser intramolekularen Interaktion ist das NVP-Peptid durch den Austausch von Leu²⁵ gegen Ac₃c²⁵ konformationell restringiert und nimmt in Lösung wohl eine rigide Konformation ein, die der an hXDM2 gebundenen Konformation sehr ähnlich ist (Garcia-Echeverria *et al.*, 2000). Das präorientierte und starre NVP-Peptid erfährt bei der Bindung vermutlich nur noch einen geringen Verlust an inneren Freiheitsgraden und kann somit mit höherer Affinität binden als die bisher beschriebenen p53-Peptide. Auch wenn die Interpretation kalorimetrisch bestimmter Bindungsentropien aufgrund der Enthalpie-Entropie-Kopplung nicht zweifelsfrei ist (Cooper, 1999; Leavitt und Freire, 2001), legen die ITC-Messungen in Tab. 5.5.1 die Vermutung nahe, daß die Bindung des IP3-Peptids an hXDM2 im Vergleich zum p53-Peptid entropisch nicht begünstigt ist; der Verlust an Entropie wird vermutlich durch eine Steigerung der Reaktionsenthalpie als Folge der zusätzlichen stabilisierenden hydrophoben Interaktionen von Met²¹ und Tyr²² kompensiert. Im Gegensatz zum NVP-Peptid und gemäß der Erwartung ist das IP3-Peptid möglicherweise weniger konformationell restringiert und erfährt bei der Bindung einen Verlust an inneren Freiheitsgraden, der sich negativ auf die Entropie der Bindung auswirkt²³. Im allgemeinen ist der Beitrag **hydrophober Wechselwirkungen** zur Bindungsaffinität proportional zur Oberfläche, die von dem Liganden belegt wird, und damit nicht mehr für Wasser zugänglich ist (Wasserausschluß) (Böhm *et al.*, 1996). Typischerweise tragen lipophile Kontaktflächen mit ca. -100-200 J/mol pro Å² bedeckter Kontaktfläche zur freien Bindungsenthalpie bei (Böhm *et al.*, 1996). Das NVP-Peptid trägt im Komplex mit hXDM2 durch Bedeckung einer Kontaktfläche von ca. 567 Å² mit ca. 87-95 J/mol*Å² zur freien Bindungsenthalpie bei. Dieser Wert ist Rahmen der Erwartung für eine lipophile Interaktion. Er ist außerdem für das NVP-Peptid am höchsten und spiegelt die relativen Affinitäten der Peptide wieder. Dies spricht dafür, daß hydrophobe Wechselwirkungen durch Wasserausschluß einen wichtigen Beitrag zur Bindungsenthalpie des NVP-Peptids liefern.

²³ Die Bindung des NVP-Peptids dagegen sollte gegenüber dem IP3-Peptid entropisch begünstigt sein. Aufgrund der hohen Affinität des NVP-Peptids waren kalorimetrische Messungen, die diese Interpretation unterstützten, aber nicht möglich.

Zusammenfassend kann die hohe Bindungsaffinität des NVP-Peptids für hXDM2 auf eine Reihe von Faktoren zurückgeführt werden. Dabei betreffen die Punkte 1 und 2 die Reaktionsenthalpie, die Punkte 3 und 4 die Reaktionsentropie:

- Optimierung von van-der-Waals-Kontakten durch Erhöhung der Kontaktfläche und der Oberflächenkomplementarität (*shape complementarity*) als Folge des Austauschs von Ser²⁰ gegen Met²⁰ sowie von Trp²³ gegen 6-Cl-Trp²³.
- Einführung zusätzlicher stabilisierender Wasserstoffbrücken durch Pmp²².
- Stabilisierung der rigiden MDM2-bindungsaktiven Konformation in Lösung durch Einführung von Aib²¹ und Ac₃c²⁵.
- Vergrößerung der bedeckten lipophilen Kontaktfläche (hydrophobe Wechselwirkungen mit Wasserausschluß) als Folge des Austauschs von Ser²⁰ gegen Met²⁰ sowie von Trp²³ gegen 6-Cl-Trp²³.

Durch kombinatorische Peptidchemie und *phage display* wurde gezeigt, daß Leu²⁶ im Gegensatz zu Phe¹⁶ und Trp²³ für die Bindung von p53-Peptiden nicht absolut essentiell ist, obwohl es die Affinität stark erhöht. Peptide, bei denen Leu²⁶ gegen Ala²⁶ ausgetauscht wurde, weisen eine verringerte, aber nachweisbare Affinität für MDM2 auf (W. Schäfer, pers. Mitteilung). Unter dieser Voraussetzung könnte die Struktur des hXDM2-NVP-Komplex möglicherweise als Ausgangspunkt für das Design und die Synthese von niedermolekularen MDM2-Peptidantagonisten bzw. Peptidomimetika dienen (Abb. 6.15).

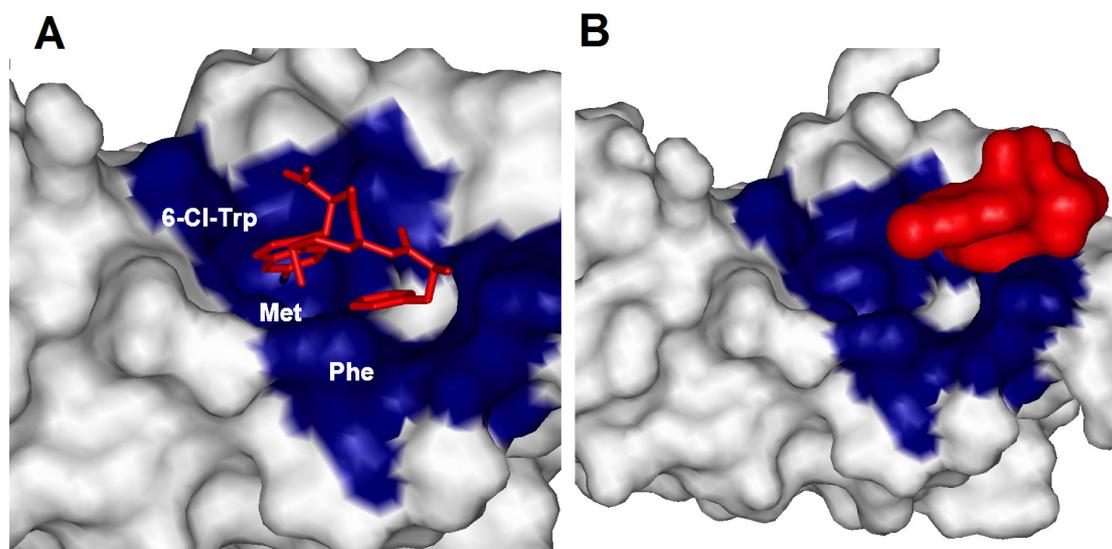


Abb. 6.15: Modell für das aus dem NVP-Peptid abgeleitete Tripeptid Phe¹⁹-Met²⁰-6-Cl-Trp²³-NH₂ im Komplex mit hXDM2 basierend auf der Kristallstruktur des hXDM2-NVP-Peptidkomplexes. hXDM2 ist in einer Connolly-Oberflächendarstellung gezeigt, die hydrophobe Peptidbindungstasche ist in blau hervorgehoben. Der putative MDM2 Antagonist ist **A**) als Tripeptid in einer Stabdarstellung bzw. **B**) in einer Connolly-Oberflächendarstellung gezeigt, die um ca. 60° aus der Bindungsebene gedreht ist.

Durch Knüpfung einer cis-Amidbindung zwischen Met²⁰ und 6-Cl-Trp²³ könnten die beiden Solvens-exponierten Reste Aib²¹ und Pmp²² unter Erhalt der für die Bindung an MDM2 notwendigen Konformation umgangen werden. Das resultierende Tripeptid Phe¹⁹-Met²⁰-6-Cl-Trp²³-Amid könnte in der cis-Konformation die beiden essentiellen Bindungstaschen für Phe¹⁹ und Trp²³ analog zum NVP-Peptid

besetzen und über Met²⁰ zusätzliche stabilisierende hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden. Falls das Tripeptid Phe¹⁹-Met²⁰-6-Cl-Trp²³-Amid trotz der energetisch ungünstigen cis-Konformation tatsächlich eine Affinität für MDM2 aufweisen sollte, könnte in einem zweiten Schritt Met²⁰ gegen Reste ausgetauscht werden, die eine rigide Konformation induzieren bzw. stabilisieren und das Peptid konformationell restringieren (z.B. L-Prolin, D-Aminosäuren, Heterozyklen etc.). Außerdem müßte dabei vermutlich auch die Löslichkeit (amphiphiles Prinzip) und Zellgängigkeit optimiert werden.

Die stark hydrophobe Natur der Interaktion des p53-Peptids mit HDM2 und das daraus resultierende Fehlen von Coulombschen Kräften erschweren das Aufstellen eines klassischen Pharmakophormodells und machen es erforderlich, hydrophobe und möglichst rigide Inhibitoren basierend auf hydrophoben Interaktionen und der Paßform (*docking* durch *shape complementarity*) unter gleichzeitigem Erhalt der Löslichkeit und Penetrationsfähigkeit zu entwickeln (Blundell *et al.*, 2002). Zusammen mit der bekannten Struktur des HDM2-p53-Peptidkomplex (Kussie *et al.*, 1996) kann die in dieser Arbeit aufgeklärte hochaufgelöste Struktur von hXDM2 im Komplex mit dem synthetischen NVP-Minimalpeptid einen Ausgangspunkt für das strukturbasierte rationale Design von niedermolekularen Inhibitoren der p53-HDM2-Interaktion und für QSAR-Modelle bilden (Böhm *et al.*, 1996; Cochran, 2001; Galatin und Abraham, 2001; Gane und Dean, 2000).

6.6 Ausblick

Im Verständnis der p53 Funktion und Struktur bestehen trotz mehr als 20 Jahren Forschung eine Reihe offener Fragen, die zum Teil in dieser Arbeit angesprochen wurden und mit den Voraussetzungen dieser Arbeit weiter bearbeitet werden könnten. Ein Teil dieser Fragen betrifft mechanistische und strukturelle, ein anderer therapeutische Gesichtspunkte. So wird die Aufklärung des definitiven Mechanismus und der biologischen Funktion der Regulation der p53 DNA-Bindung durch die C-terminale Domäne die p53 Forschung vermutlich noch länger beschäftigen. Zum Verständnis könnte die Aufklärung der Struktur des tetrameren p53 Gesamtproteins beitragen, was jedoch möglicherweise aufgrund der Flexibilität des Proteins prinzipiell nicht möglich sein wird. Basierend auf dem Modell des dimeren p53 DBD-DNA-Komplexes sind Mutagenese-Studien geplant, die kombiniert mit NMR-Spektroskopie, Ultrazentrifugation, Kalorimetrie und DNA-Bindungstests das beschriebene Modell verifizieren sollten. Weitergehende Experimente könnten eventuell sogar die native Anordnung der p53 DNA-Bindungsdomänen gebunden an ihre Consensus-DNA aufklären. Möglicherweise lassen sich aus der Struktur der nativen Dimerisierungs-Kontaktfläche allosterische Inhibitoren der p53 DNA-Bindung ableiten. Zudem ist es eine interessante Frage, ob z.B. durch Elektronenmikroskopie und fluoreszenzbasierte DNA-Bindungstests weitere experimentelle Evidenzen für das Sandwich-artige Modell der DNA-Bindung gefunden werden können. Strukturelle Studien mit den DBDs und Teildomänen der p53 Homologen aus *D. melanogaster* und *C. elegans* (CEP-1) sowie mit den p53 Homologen p63 und p73 sollten weiteren Einblick in die DNA-Spezifität, Regulation, Evolution und die Thermostabilität der Mitglieder der p53 Familie im direkten Vergleich zu p53 ermöglichen. Die Aufklärung der Struktur von weiteren p53 und MDM2-Domänen und insbesondere die biochemische und strukturelle (NMR-spektroskopische) Kartierung der Interaktionssites von p53 und MDM2 untereinander sowie mit Partnerproteinen wie Chaperonen (insbesondere Hsp90 und HSc70), HPV E6, E6-AP, UBC9, p19, Rb, SV40 T-Antigen, Kinasen (z.B. ATM, CKII), Acetyltransferasen und Deacetylasen könnten das strukturelle Verständnis des p53 Netzwerks entscheidend bereichern. Neuere Publikationen lassen zudem eine direkte Interaktion der p53 DBD mit Regulatoren der mitochondrialen Apoptose wie Bcl-2 und Bcl-xL sehr wahrscheinlich erscheinen (Marchenko *et al.*, 2000; Moll und Zaika, 2001; Sansome *et al.*, 2001). Schließlich wäre die Aufklärung der strukturellen Basis der Wirkung von p53 Stabilisatoren durch NMR-Spektroskopie und Cokristallisation mit der p53 DBD sowie die Cokristallisation von HDM2 mit niedermolekularen Antagonisten ein Durchbruch für die Suche nach neuen und potenteren Verbindungen durch rationales Wirkstoffdesign. In diesem Zusammenhang wäre es außerdem interessant die Hitze- und Harnstoffdenaturierung der p53 DBD sowie den Einfluß von chemischen Chaperonen wie CDB3, TMAO oder von Aminofostine (WR2721) (Maurici *et al.*, 2001) auf die Konformation und Stabilität von p53 strukturell durch NMR-Spektroskopie zu untersuchen. Ob p53 aktivatorische und inhibitorische Verbindungen sowie Antagonisten der p53-HDM2-Interaktion ihren Weg in die Tumorthherapie finden werden, werden jedoch erst klinische Prüfungen in der Zukunft zeigen können.

7 LITERATUR

- Abarzua, P., LoSardo, J.E., Gubler, M.L. and Neri, A. (1995) Microinjection of monoclonal antibody PAb421 into human SW480 colorectal carcinoma cells restores the transcription activation function to mutant p53. *Cancer Res*, **55**, 3490-4.
- Abarzua, P., LoSardo, J.E., Gubler, M.L., Spathis, R., Lu, Y.A., Felix, A. and Neri, A. (1996) Restoration of the transcription activation function to mutant p53 in human cancer cells. *Oncogene*, **13**, 2477-82.
- Abbott, A. (2002) On the offensive. *Nature*, **416**, 470-4.
- Abergel, C., Moulard, M., Moreau, H., Loret, E., Cambillau, C. and Fontecilla-Camps, J.C. (1991) Systematic use of the incomplete factorial approach in the design of protein crystallization experiments. *J Biol Chem*, **266**, 20131-8.
- Adler, A.J., Greenfield, N.J. and Fasman, G.D. (1973) Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *Methods Enzymol*, **27**, 675-735.
- Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B. and Stark, G.R. (1998) The p53 network. *J Biol Chem*, **273**, 1-4.
- Ahn, J. and Prives, C. (2001) The C-terminus of p53: the more you learn the less you know. *Nat Struct Biol*, **8**, 730-2.
- Alberti, S., Oehler, S., von Wilcken-Bergmann, B. and Muller-Hill, B. (1993) Genetic analysis of the leucine heptad repeats of Lac repressor: evidence for a 4-helical bundle. *Embo J*, **12**, 3227-36.
- Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmuller, L. and Deppert, W. (1999) Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, **18**, 7706-17.
- Aleman, R., Balague, C. and Curiel, D.T. (2000) Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol*, **18**, 723-7.
- Almog, N., Goldfinger, N. and Rotter, V. (2000) p53-dependent apoptosis is regulated by a C-terminally alternatively spliced form of murine p53. *Oncogene*, **19**, 3395-403.
- Almog, N. and Rotter, V. (1998) An insight into the life of p53: a protein coping with many functions! Review of the 9th p53 Workshop, Crete, May 9-13, 1998. *Biochim Biophys Acta*, **1378**, R43-54.
- Altieri, A.S., Hinton, D.P. and Byrd, R.A. (1995) Association of biomolecular systems via pulsed field gradient NMR self-diffusion measurements. *J Am Chem Soc*, **117**, 7566-7.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-402.
- Amundson, S.A., Myers, T.G. and Fornace, A.J., Jr. (1998) Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene*, **17**, 3287-99.
- Anderson, M.E. and Tegtmeyer, P. (1995) Giant leap for p53, small step for drug design. *Bioessays*, **17**, 3-7.
- Anderson, M.E., Woelker, B., Reed, M., Wang, P. and Tegtmeyer, P. (1997) Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation. *Mol Cell Biol*, **17**, 6255-64.
- Appel, R.D., Bairoch, A. and Hochstrasser, D.F. (1994) A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExpASY WWW server. *Trends Biochem Sci*, **19**, 258-60.
- Appella, E. and Anderson, C.W. (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, **268**, 2764-72.
- Appella, E., Nagaich, A.K., Zhurkin, V.B. and Harrington, R.E. (1998) Analysis of the interaction between the p53 binding domain and the p21/Cip1 DNA response element: a novel architectural organization. *J Protein Chem*, **17**, 527-8.
- Armstrong, N., de Lencastre, A. and Gouaux, E. (1999) A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Sci*, **8**, 1475-83.
- Arrowsmith, C.H. (1999) Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ*, **6**, 1169-73.
- Arrowsmith, C.H. and Morin, P. (1996) New insights into p53 function from structural studies. *Oncogene*, **12**, 1379-85.
- Arrowsmith, C.H. and Wu, Y.S. (1998) NMR of large (greater-than-25 kDa) proteins and protein complexes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **32**, 277-86.
- Ashcroft, M. and Vousden, K.H. (1999) Regulation of p53 stability. *Oncogene*, **18**, 7637-43.
- Asker, C., Wiman, K.G. and Selivanova, G. (1999) p53-induced apoptosis as a safeguard against cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **265**, 1-6.
- Attardi, L.D. and Jacks, T. (1999) The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 48-63.
- Ayed, A., Mulder, F.A., Yi, G.S., Lu, Y., Kay, L.E. and Arrowsmith, C.H. (2001) Latent and active p53 are identical in conformation. *Nat Struct Biol*, **8**, 756-60.
- Babine, R.E. and Bender, S.L. (1997) Molecular Recognition of Protein-Ligand Complexes: Applications to Drug Design. *Chem Rev*, **97**, 1359-1472.
- Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K.P., Szekeley, L., Klein, G., Terenius, L. and Wiman, K.G. (1995) p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res*, **23**, 362-9.

- Balagurumorthy, P., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Zambrano, N., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Appella, E. and Harrington, R.E. (1995) Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8591-5.
- Balint, E., Bates, S. and Vousden, K.H. (1999) Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene*, **18**, 3923-9.
- Balint, E.E. and Vousden, K.H. (2001) Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer*, **85**, 1813-23.
- Ball, R.K., Siegl, B., Quellhorst, S., Brandner, G. and Braun, D.G. (1984) Monoclonal antibodies against simian virus 40 nuclear large T tumour antigen: epitope mapping, papova virus cross-reaction and cell surface staining. *Embo J*, **3**, 1485-91.
- Balla, A., Toth, B., Timar, G., Bak, J. and Krajcsi, P. (2001) Molecular targets for pharmacological cytoprotection. *Biochem Pharmacol*, **61**, 769-77.
- Bange, J., Zwick, E. and Ullrich, A. (2001) Molecular targets for breast cancer therapy and prevention. *Nat Med*, **7**, 548-52.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. and Ziv, Y. (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, **281**, 1674-7.
- Banks, L., Matlashewski, G. and Crawford, L. (1986) Isolation of human-p53-specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Eur J Biochem*, **159**, 529-34.
- Bannister, A.J., Miska, E.A., Gorlich, D. and Kouzarides, T. (2000) Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol*, **10**, 467-70.
- Baptiste, N., Friedlander, P., Chen, X. and Prives, C. (2002) The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene*, **21**, 9-21.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. and Oren, M. (1993) mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J*, **12**, 461-8.
- Bargonetti, J., Manfredi, J.J., Chen, X., Marshak, D.R. and Prives, C. (1993) A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev*, **7**, 2565-74.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell*, **8**, 1243-54.
- Barstead, R. (2001) Genome-wide RNAi. *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 63-6.
- Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J. (1997) The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res*, **237**, 1-6.
- Bartek, J., Falck, J. and Lukas, J. (2001) CHK2 kinase--a busy messenger. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 877-86.
- Bassi, L., Carloni, M., Fonti, E., Palma de la Pena, N., Meschini, R. and Palitti, F. (2002) Pifithrin-alpha, an inhibitor of p53, enhances the genetic instability induced by etoposide (VP16) in human lymphoblastoid cells treated in vitro. *Mutat Res*, **499**, 163-76.
- Bates, S. and Vousden, K.H. (1999) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 28-37.
- Bayle, J.H. and Crabtree, G.R. (1997) Protein acetylation: more than chromatin modification to regulate transcription. *Chem Biol*, **4**, 885-8.
- Bayle, J.H., Elenbaas, B. and Levine, A.J. (1995) The carboxyl-terminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5729-33.
- Bean, L.J. and Stark, G.R. (2002) Regulation of the accumulation and function of p53 by phosphorylation of two residues within the domain that binds to Mdm2. *J Biol Chem*, **277**, 1864-71.
- Beaudry, G.A., Bertelsen, A.H. and Sherman, M.I. (1996) Therapeutic targeting of the p53 tumor suppressor gene. *Curr Opin Biotechnol*, **7**, 592-600.
- Becker-Hapak, M., McAllister, S.S. and Dowdy, S.F. (2001) TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods*, **24**, 247-56.
- Beissinger, M. and Buchner, J. (1998) How chaperones fold proteins. *Biol Chem*, **379**, 245-59.
- Bell, S. (2001) Expression, Renaturierung und Charakterisierung von menschlichem p53. *Dissertation*, Fakultät für Chemie der Technischen Universität München.
- Bell, S., Hansen, S. and Buchner, J. (2002a) Refolding and structural characterization of the human p53 tumor suppressor protein. *Biophys Chem*, **96**, 243-57.
- Bell, S., Klein, C., Müller, L., Hansen, S. and Buchner, J. (2002b) p53 contains large unstructured regions in its native state. *zur Publikation eingereicht*.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, **28**, 235-42.
- Bernier-Villamor, V., Sampson, D.A., Matunis, M.J. and Lima, C.D. (2002) Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell*, **108**, 345-56.
- Bessard, A.C., Garay, E., Lacroix, V., Legros, Y., Demarquay, C., Houque, A., Portefaix, J.M., Granier, C. and Soussi, T. (1998) Regulation of the specific DNA binding activity of *Xenopus laevis* p53: evidence for conserved regulation through the carboxy-terminus of the protein. *Oncogene*, **16**, 883-90.

- Bies, J., Markus, J. and Wolff, L. (2002) Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem*, **277**, 8999-9009.
- Birch, J.M., Alston, R.D., McNally, R.J., Evans, D.G., Kelsey, A.M., Harris, M., Eden, O.B. and Varley, J.M. (2001) Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene*, **20**, 4621-8.
- Birboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-23.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. and McCormick, F. (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, **274**, 373-6.
- Blagosklonny, M.V. (2000) p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of- function, and dominant-negative effect. *Faseb J*, **14**, 1901-7.
- Blagosklonny, M.V. (2002) P53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *Int J Cancer*, **98**, 161-6.
- Blagosklonny, M.V., Toretzky, J., Bohlen, S. and Neckers, L. (1996) Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8379-83.
- Blagosklonny, M.V., Toretzky, J. and Neckers, L. (1995) Geldanamycin selectively destabilizes and conformationally alters mutated p53. *Oncogene*, **11**, 933-9.
- Blain, S.W. and Massague, J. (2000) Different sensitivity of the transforming growth factor-beta cell cycle arrest pathway to c-Myc and MDM-2. *J Biol Chem*, **275**, 32066-70.
- Blair, W.S., Lin, P.F., Meanwell, N.A. and Wallace, O.B. (2000) HIV-1 entry - an expanding portal for drug discovery. *Drug Discov Today*, **5**, 183-194.
- Blaydes, J.P., Gire, V., Rowson, J.M. and Wynford-Thomas, D. (1997) Tolerance of high levels of wild-type p53 in transformed epithelial cells dependent on auto-regulation by mdm-2. *Oncogene*, **14**, 1859-68.
- Blommers, M.J.J., Fendrich, G., Garcia-Echeverria and Chene, P. (1997) On the interaction between p53 and MDM2: Transfer NOE study of a p53-derived peptide ligated to MDM2. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3425-6.
- Blundell, T., Jhoti, H. and Abell, C. (2002) High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nat Rev Drug Design*, **1**, 45-54.
- Böhm, G., Muhr, R. and Jaenicke, R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng*, **5**, 191-5.
- Böhm, H.J., Klebe, G. and Kubinji, H. (1996) Wirkstoffdesign. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- Bolivar, F. and Backman, K. (1979) Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors. *Methods Enzymol*, **68**, 245-67.
- Bork, P., Holm, L. and Sander, C. (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol*, **242**, 309-20.
- Bothner, B., Lewis, W.S., DiGiammarino, E.L., Weber, J.D., Bothner, S.J. and Kriwacki, R.W. (2001) Defining the molecular basis of Arf and Hdm2 interactions. *J Mol Biol*, **314**, 263-77.
- Bottger, A., Bottger, V., Garcia-Echeverria, C., Chene, P., Hochkeppel, H.K., Sampson, W., Ang, K., Howard, S.F., Picksley, S.M. and Lane, D.P. (1997a) Molecular characterization of the hdm2-p53 interaction. *J Mol Biol*, **269**, 744-56.
- Bottger, A., Bottger, V., Sparks, A., Liu, W.L., Howard, S.F. and Lane, D.P. (1997b) Design of a synthetic Mdm2-binding mini protein that activates the p53 response in vivo. *Curr Biol*, **7**, 860-9.
- Bottger, V., Bottger, A., Garcia-Echeverria, C., Ramos, Y.F., van der Eb, A.J., Jochemsen, A.G. and Lane, D.P. (1999) Comparative study of the p53-mdm2 and p53-MDMX interfaces. *Oncogene*, **18**, 189-99.
- Bottger, V., Bottger, A., Howard, S.F., Picksley, S.M., Chene, P., Garcia-Echeverria, C., Hochkeppel, H.K. and Lane, D.P. (1996) Identification of novel mdm2 binding peptides by phage display. *Oncogene*, **13**, 2141-7.
- Botuyan, M.V., Momand, J. and Chen, Y. (1997) Solution conformation of an essential region of the p53 transactivation domain. *Fold Des*, **2**, 331-42.
- Bourdon, J.C., Deguin-Chambon, V., Lelong, J.C., Dessen, P., May, P., Debuire, B. and May, E. (1997) Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene*, **14**, 85-94.
- Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J Mol Biol*, **41**, 459-72.
- Brachmann, R.K., Yu, K., Eby, Y., Pavletich, N.P. and Boeke, J.D. (1998) Genetic selection of intragenic suppressor mutations that reverse the effect of common p53 cancer mutations. *Embo J*, **17**, 1847-59.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Branden, C.-I. and Tooze, J. (1999) Introduction to protein structure. *Garland Science Publishing*, Amden, USA.
- Brinkmann, U., Mattes, R.E. and Buckel, P. (1989) High-level expression of recombinant genes in Escherichia coli is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene*, **85**, 109-14.
- Brodsky, M.H., Nordstrom, W., Tsang, G., Kwan, E., Rubin, G.M. and Abrams, J.M. (2000) Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell*, **101**, 103-13.
- Brooks, G. and La Thangue, N.B. (1999) The cell cycle and drug discovery: the promise and the hope. *Drug Discov Today*, **4**, 455-464.

- Brown, C.R., Hong-Brown, L.Q. and Welch, W.J. (1997) Correcting temperature-sensitive protein folding defects. *J Clin Invest*, **99**, 1432-44.
- Brown, J.M. and Wouters, B.G. (1999) Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res*, **59**, 1391-9.
- Brünger, A.T. (1992a) The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, **355**, 472-74.
- Brünger, A.T. (1992b) A System for X-ray Crystallography and NMR. *Yale University Press*, New Haven, USA.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M. and Stefani, M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, **416**, 507-11.
- Buchner, J. (1996) Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *Faseb J*, **10**, 10-9.
- Buchner, J. and Rudolph, R. (1991) Routes to active proteins from transformed microorganisms. *Curr Opin Biotechnol*, **2**, 532-8.
- Buchner, J. and Walter, S. (2002) Molecular chaperones: Cellular machines for protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 1098-113.
- Budisa, N., Minks, C., Alefelder, S., Wenger, W., Dong, F., Moroder, L. and Huber, R. (1999) Toward the experimental codon reassignment in vivo: protein building with an expanded amino acid repertoire. *Faseb J*, **13**, 41-51.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahim, I., Haeuptle, M.T. and Dobberstein, B. (1987) A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol*, **155**, 416-33.
- Bullock, A. and Fersht, A. (2001) Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer*, **1**, 68-76.
- Bullock, A.N., Henckel, J., DeDecker, B.S., Johnson, C.M., Nikolova, P.V., Proctor, M.R., Lane, D.P. and Fersht, A.R. (1997) Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14338-42.
- Bullock, A.N., Henckel, J. and Fersht, A.R. (2000) Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene*, **19**, 1245-56.
- Buolamwini, J.K. (1999) Novel anticancer drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 500-9.
- Burch, L.R., Midgley, C.A., Currie, R.A., Lane, D.P. and Hupp, T.R. (2000) Mdm2 binding to a conformationally sensitive domain on p53 can be modulated by RNA. *FEBS Lett*, **472**, 93-8.
- Burley, S.K. (1994) p53: a cellular Achilles' heel revealed. *Structure*, **2**, 789-92.
- Burrows, J.A., Willis, L.K. and Perlmutter, D.H. (2000) Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1- antitrypsin (alpha 1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1796-801.
- Buschmann, T., Fuchs, S.Y., Lee, C.G., Pan, Z.Q. and Ronai, Z. (2000) SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell*, **101**, 753-62.
- Butcher, S., Hainaut, P. and Milner, J. (1994) Increased salt concentration reversibly destabilizes p53 quaternary structure and sequence-specific DNA binding. *Biochem J*, **298 Pt 3**, 513-6.
- Butz, K., Denk, C., Ullmann, A., Scheffner, M. and Hoppe-Seyler, F. (2000) Induction of apoptosis in human papillomaviruspositive cancer cells by peptide aptamers targeting the viral E6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6693-7.
- Bykov, V.J., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G. and Selivanova, G. (2002) Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat Med*, **8**, 282-8.
- Cadwell, C. and Zambetti, G.P. (2001) The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*, **277**, 15-30.
- Cain, C., Miller, S., Ahn, J. and Prives, C. (2000) The N terminus of p53 regulates its dissociation from DNA. *J Biol Chem*, **275**, 39944-53.
- Campomenosi, P., Monti, P., Aprile, A., Abbondandolo, A., Frebourg, T., Gold, B., Crook, T., Inga, A., Resnick, M.A., Iggo, R. and Fronza, G. (2001) p53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene*, **20**, 3573-9.
- Carnero, A., Hudson, J.D., Price, C.M. and Beach, D.H. (2000) p16INK4A and p19ARF act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat Cell Biol*, **2**, 148-55.
- Caron de Fromental, C., Gruel, N., Venot, C., Debussche, L., Conseiller, E., Dureau, C., Teillaud, J.L., Tocque, B. and Bracco, L. (1999) Restoration of transcriptional activity of p53 mutants in human tumour cells by intracellular expression of anti-p53 single chain Fv fragments. *Oncogene*, **18**, 551-7.
- Carter, C.W., Jr. and Carter, C.W. (1979) Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J Biol Chem*, **254**, 12219-23.
- CCP4. (1994) Collaborative Computational Project: The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography, Number 4. *Acta Cryst.*, **D50**, 760-3.
- Celli, J., Duijif, P., Hamel, B.C., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A.P., Newbury-Ecob, R., Hennekam, R.C., Van Buggenhout, G., van Haeringen, A., Woods, C.G., van Essen, A.J., de Waal, R., Vriend, G., Haber, D.A., Yang, A., McKeon, F., Brunner, H.G. and van Bokhoven, H. (1999) Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell*, **99**, 143-53.
- Chalkley, G.E., Knowles, P.P., Whitehead, P.C. and Coffey, A.I. (1994) Biochemical characterisation of purified human wild-type p53 overexpressed in insect cells. *Eur J Biochem*, **221**, 167-75.

- Chang, C., Simmons, D.T., Martin, M.A. and Mora, P.T. (1979) Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J Virol*, **31**, 463-71.
- Chang, E.H., Pirolo, K.F. and Bouker, K.B. (2000) Tp53 gene therapy: a key to modulating resistance to anticancer therapies? *Mol Med Today*, **6**, 358-64.
- Chang, J., Kim, D.H., Lee, S.W., Choi, K.Y. and Sung, Y.C. (1995) Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein. *J Biol Chem*, **270**, 25014-9.
- Chayen, N.E. (1998) Comparative studies of protein crystallization by vapour-diffusion and microbatch techniques. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 8-15.
- Chellaiah, M.A., Soga, N., Swanson, S., McAllister, S., Alvarez, U., Wang, D., Dowdy, S.F. and Hruska, K.A. (2000) Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J Biol Chem*, **275**, 11993-2002.
- Chen, G.Q. and Gouaux, E. (1997) Overexpression of a glutamate receptor (GluR2) ligand binding domain in Escherichia coli: application of a novel protein folding screen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13431-6.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D. and Evans, R.M. (1999a) Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell*, **98**, 675-86.
- Chen, J., Marechal, V. and Levine, A.J. (1993) Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol*, **13**, 4107-14.
- Chen, J.M., Rosal, R., Smith, S., Pincus, M.R. and Brandt-Rauf, P.W. (2001) Common conformational effects of p53 mutations. *J Protein Chem*, **20**, 101-5.
- Chen, J.M., Smith, S.J., Marion, M.J., Pincus, M.R. and Brandt-Rauf, P.W. (1999b) Common conformational effects in the p53 protein of vinyl chloride- induced mutations. *J Protein Chem*, **18**, 467-72.
- Chen, L., Lu, W., Agrawal, S., Zhou, W., Zhang, R. and Chen, J. (1999c) Ubiquitous induction of p53 in tumor cells by antisense inhibition of MDM2 expression. *Mol Med*, **5**, 21-34.
- Chene, P. (2001a) p53 as a drug target in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Patents*, **11**, 923-35.
- Chene, P. (2001b) The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*, **20**, 2611-7.
- Chene, P. and Bechter, E. (1999) p53 mutants without a functional tetramerisation domain are not oncogenic. *J Mol Biol*, **286**, 1269-74.
- Chene, P., Fuchs, J., Bohn, J., Garcia-Echeverria, C., Furet, P. and Fabbro, D. (2000) A small synthetic peptide, which inhibits the p53-hdm2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumour cell lines. *J Mol Biol*, **299**, 245-53.
- Chene, P. and Jahnke, W. (2002) Oligomerisation of p53 upon cooperative DNA binding - Towards a structural understanding of p53 function. *Angewandte Chemie-International Edition*, **41**, 1702-3.
- Cherny, D.I., Striker, G., Subramaniam, V., Jett, S.D., Palecek, E. and Jovin, T.M. (1999) DNA bending due to specific p53 and p53 core domain-DNA interactions visualized by electron microscopy. *J Mol Biol*, **294**, 1015-26.
- Chi, S.W., Ayed, A. and Arrowsmith, C.H. (1999) Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *Embo J*, **18**, 4438-45.
- Chin, L., Artandi, S.E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S.L., Gottlieb, G.J., Greider, C.W. and DePinho, R.A. (1999) p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell*, **97**, 527-38.
- Chin, L., Pomerantz, J. and DePinho, R.A. (1998) The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends Biochem Sci*, **23**, 291-6.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-55.
- Choi, J. and Donehower, L.A. (1999) p53 in embryonic development: maintaining a fine balance. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 38-47.
- Chompret, A. (2002) The Li-Fraumeni syndrome. *Biochimie*, **84**, 75-82.
- Clarke, J. and Fersht, A.R. (1993) Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry*, **32**, 4322-9.
- Clayman, G.L. (2000) The current status of gene therapy. *Semin Oncol*, **27**, 39-43.
- Clore, G.M., Ernst, J., Clubb, R., Omichinski, J.G., Kennedy, W.M., Sakaguchi, K., Appella, E. and Gronenborn, A.M. (1995a) Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53. *Nat Struct Biol*, **2**, 321-33.
- Clore, G.M., Omichinski, J.G., Sakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E. and Gronenborn, A.M. (1994) High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science*, **265**, 386-91.
- Clore, G.M., Omichinski, J.G., Sakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E. and Gronenborn, A.M. (1995b) Interhelical angles in the solution structure of the oligomerization domain of p53: correction. *Science*, **267**, 1515-6.
- Cochran, A.G. (2000) Antagonists of protein-protein interactions. *Chemistry & Biology*, **7**, R85-94.
- Cochran, A.G. (2001) Protein-protein interfaces: mimics and inhibitors. *Curr Op Chem Biol*, **5**, R654-9.
- Coffer, A.I. and Knowles, P.P. (1994) Divalent metal ions induce conformational change in pure, human wild-type p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta*, **1209**, 279-85.
- Coffey, H.A., Connell, R.D., Foster, B.A. and Rastinejad, F. (2000) Methods and compositions for restoring conformational stability of a protein of the p53 family. *Patentschrift*, PCT/IB99/01916 beruhend auf WO00/32175.

- Cohen, P.A., Hupp, T.R., Lane, D.P. and Daniels, D.A. (1999) Biochemical characterization of different conformational states of the Sf9 cell-purified p53His175 mutant protein. *FEBS Lett*, **463**, 179-84.
- Cohen, P.A., Mani, J.C. and Lane, D.P. (1998) Characterization of a new intrabody directed against the N-terminal region of human p53. *Oncogene*, **17**, 2445-56.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110-4.
- Contegno, F., Cioce, M., Pelicci, P.G. and Minucci, S. (2002) Targeting protein inactivation through an oligomerization chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1865-9.
- Cook, A. and Milner, J. (1990) Evidence for allosteric variants of wild-type p53, a tumour suppressor protein. *Br J Cancer*, **61**, 548-52.
- Cooper, A. (1999) Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 557-63.
- Costanzo, A., Merlo, P., Pediconi, N., Fulco, M., Sartorelli, V., Cole, P.A., Fontemaggi, G., Fanciulli, M., Schiltz, L., Blandino, G., Balsano, C. and Levrero, M. (2002) DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell*, **9**, 175-86.
- Cox, L.S., Midgley, C.A. and Lane, D.P. (1994) *Xenopus* p53 is biochemically similar to the human tumour suppressor protein p53 and is induced upon DNA damage in somatic cells. *Oncogene*, **9**, 2951-9.
- Crawford, L. and Harlow, E. (1982) Uniform nomenclature for monoclonal antibodies directed against virus-coded proteins of simian virus 40 and polyoma virus. *J Virol*, **41**, 709.
- Creighton, T.E.e. (1997a) Protein Function. *IRL Press*, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Creighton, T.E.e. (1997b) Protein Structure. *IRL Press*, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Crook, T., Ludwig, R.L., Marston, N.J., Willkomm, D. and Vousden, K.H. (1996) Sensitivity of p53 lysine mutants to ubiquitin-directed degradation targeted by human papillomavirus E6. *Virology*, **217**, 285-92.
- Cudney, B., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y. and McPherson, A. (1994) Screening and optimization strategies for molecular crystal growth. *Acta Cryst*, **D50**, 414-23.
- Culmsee, C., Zhu, X., Yu, Q.S., Chan, S.L., Camandola, S., Guo, Z., Greig, N.H. and Mattson, M.P. (2001) A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J Neurochem*, **77**, 220-8.
- Cures, A., House, C., Kanei-Ishii, C., Kemp, B. and Ramsay, R.G. (2001) Constitutive c-Myb amino-terminal phosphorylation and DNA binding activity uncoupled during entry and passage through the cell cycle. *Oncogene*, **20**, 1784-92.
- Damalas, A., Ben-Ze'ev, A., Simcha, I., Shtutman, M., Leal, J.F., Zhurinsky, J., Geiger, B. and Oren, M. (1999) Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *Embo J*, **18**, 3054-63.
- Damalas, A., Kahan, S., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A. and Oren, M. (2001) Deregulated beta-catenin induces a p53- and ARF-dependent growth arrest and cooperates with Ras in transformation. *Embo J*, **20**, 4912-22.
- Dams, T., Auerbach, G., Bader, G., Jacob, U., Ploom, T., Huber, R. and Jaenicke, R. (2000) The crystal structure of dihydrofolate reductase from *Thermotoga maritima*: molecular features of thermostability. *J Mol Biol*, **297**, 659-72.
- Dang, C.V. and Lee, W.M. (1989) Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, Hsp70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem*, **264**, 18019-23.
- Danks, M.K., Whipple, D.O., McPake, C.R., Lu, D. and Harris, L.C. (1998) Differences in epitope accessibility of p53 monoclonal antibodies suggest at least three conformations or states of protein binding of p53 protein in human tumor cell lines. *Cell Death Differ*, **5**, 678-86.
- Davis, P.K. and Dowdy, S.F. (2001) p73. *Int J Biochem Cell Biol*, **33**, 935-9.
- Davison, T.S., Nie, X., Ma, W., Lin, Y., Kay, C., Benchimol, S. and Arrowsmith, C.H. (2001) Structure and functionality of a designed p53 dimer. *J Mol Biol*, **307**, 605-17.
- Davison, T.S., Yin, P., Nie, E., Kay, C. and Arrowsmith, C.H. (1998) Characterization of the oligomerization defects of two p53 mutants found in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome. *Oncogene*, **17**, 651-6.
- De Bernardes Clark, E., Schwarz, E. and Rudolph, R. (1999) Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol*, **309**, 217-36.
- De Laurenzi, V. and Melino, G. (2000) Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann N Y Acad Sci*, **926**, 90-100.
- DeDecker, B.S. (2000) Allosteric drugs: thinking outside the active-site box. *Chem Biol*, **7**, R103-7.
- Degterev, A., Lugovskoy, A., Cardone, M., Mulley, B., Wagner, G., Mitchison, T. and Yuan, J. (2001) Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL. *Nat Cell Biol*, **3**, 173-82.
- Degtyareva, N., Subramanian, D. and Griffith, J.D. (2001) Analysis of the binding of p53 to DNAs containing mismatched and bulged bases. *J Biol Chem*, **276**, 8778-84.
- Deleage, G. and Roux, B. (1987) An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng*, **1**, 289-94.
- Delphin, C., Cahen, P., Lawrence, J.J. and Baudier, J. (1994) Characterization of baculovirus recombinant wild-type p53. Dimerization of p53 is required for high-affinity DNA binding and cysteine oxidation inhibits p53 DNA binding. *Eur J Biochem*, **223**, 683-92.
- Delphin, C., Ronjat, M., Deloulme, J.C., Garin, G., Debussche, L., Higashimoto, Y., Sakaguchi, K. and Baudier, J. (1999) Calcium-dependent interaction of S100B with the C-terminal domain of the tumor suppressor p53. *J Biol Chem*, **274**, 10539-44.

- Deppert, W., Gohler, T., Koga, H. and Kim, E. (2000) Mutant p53: "gain of function" through perturbation of nuclear structure and function? *J Cell Biochem, Suppl*, 115-22.
- Derossi, D., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1998) Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol*, **8**, 84-7.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G. and Prochiantz, A. (1994) The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, **269**, 10444-50.
- Derry, W.B., Putzke, A.P. and Rothman, J.H. (2001) *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*, **294**, 591-5.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K. and Zhou, M.M. (1999) Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, **399**, 491-6.
- Di Como, C.J., Gaiddon, C. and Prives, C. (1999) p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **19**, 1438-49.
- Di Como, C.J. and Prives, C. (1998) Human tumor-derived p53 proteins exhibit binding site selectivity and temperature sensitivity for transactivation in a yeast-based assay. *Oncogene*, **16**, 2527-39.
- di Domenico, R., Hansen, S., Kaluza, B., Mento, E. and Schumacher, R. (1999) Derivatives of phenoxy acetic acid and phoxymethyltetrazole having antitumor activity. *Patentschrift*, EP 0947494A1.
- Diercks, T., Coles, M. and Kessler, H. (2001) Applications of NMR in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 285-91.
- DiGiammarino, E.L., Filippov, I., Weber, J.D., Bothner, B. and Kriwacki, R.W. (2001) Solution structure of the p53 regulatory domain of the p19Arf tumor suppressor protein. *Biochemistry*, **40**, 2379-86.
- DiGiammarino, E.L., Lee, A.S., Cadwell, C., Zhang, W., Bothner, B., Ribeiro, R.C., Zambetti, G. and Kriwacki, R.W. (2002) A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol*, **9**, 12-6.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S. and Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, **356**, 215-21.
- Dotsch, V. (2001) Protein-DNA interactions. *Methods Enzymol*, **339**, 343-57.
- Drenth, J. (1999) Principles of Protein X-ray Crystallography. *Springer Verlag*, Berlin.
- Drews, J. (2000) Drug discovery: a historical perspective. *Science*, **287**, 1960-4.
- Druker, B.J. (2002) STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med*, **8**, S14-8.
- Dubendorff, J.W. and Lipsick, J.S. (1999) Transcriptional regulation by the carboxyl terminus of c-Myb depends upon both the Myb DNA-binding domain and the DNA recognition site. *Oncogene*, **18**, 3452-60.
- Ducruix, A. and Giegé, R. (1999) Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. *IRL Press*, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Dudenhoffer, C., Kurth, M., Janus, F., Deppert, W. and Wiesmuller, L. (1999) Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of P53. *Oncogene*, **18**, 5773-84.
- Dudenhoffer, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W. and Wiesmuller, L. (1998) Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol*, **18**, 5332-42.
- Duncan, S.J., Gruschow, S., Williams, D.H., McNicholas, C., Purewal, R., Hajek, M., Gerlitz, M., Martin, S., Wrigley, S.K. and Moore, M. (2001) Isolation and structure elucidation of Chlorofusin, a novel p53-MDM2 antagonist from a *Fusarium* sp. *J Am Chem Soc*, **123**, 554-60.
- Duncan, S.J., Williams, D.H., Ainsworth, M., Martin, S., Ford, R. and Wrigley, S.K. (2002) On the biosynthesis of an inhibitor of the p53/MDM2 interaction. *Tetrahedron Letters*, **43**, 1075-78.
- Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2002) Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 54-60.
- Eckert, D.M., Malashkevich, V.N., Hong, L.H., Carr, P.A. and Kim, P.S. (1999) Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell*, **99**, 103-15.
- Edelhoch, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, **6**, 1948-54.
- El-Deiry, W.S. (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol*, **8**, 345-57.
- El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, **1**, 45-9.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-25.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J.D., Velculescu, V.E., Burrell, M., Hill, D.E., Healy, E., Rees, J.L. and Hamilton, S.R. (1995) Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res*, **55**, 2910-9.
- Ellis, R.J. (2001a) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 114-9.
- Ellis, R.J. (2001b) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*, **26**, 597-604.
- Ellis, R.J. and Hartl, F.U. (1999) Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 102-10.
- Emili, A.Q. and Cagney, G. (2000) Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays. *Nat Biotechnol*, **18**, 393-7.
- Engh, R.A. and Huber, R. (1991) Accurate bond angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst*, **A47**, 392-400.

- Erlanson, D.A., Braisted, A.C., Raphael, D.R., Randal, M., Stroud, R.M., Gordon, E.M. and Wells, J.A. (2000) Site-directed ligand discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9367-72.
- Espinosa, J.M. and Emerson, B.M. (2001) Transcriptional Regulation by p53 through Intrinsic DNA/Chromatin Binding and Site-Directed Cofactor Recruitment. *Mol Cell*, **8**, 57-69.
- Esser, D., Rudolph, R., Jaenicke, R. and Böhm, G. (1999) The HU protein from *Thermotoga maritima*: recombinant expression, purification and physicochemical characterization of an extremely hyperthermophilic DNA-binding protein. *J Mol Biol*, **291**, 1135-46.
- Estebanez-Perpina, E., Fuentes-Prior, P., Belorgey, D., Braun, M., Kiefersauer, R., Maskos, K., Huber, R., Rubin, H. and Bode, W. (2000) Crystal structure of the caspase activator human granzyme B, a proteinase highly specific for an Asp-P1 residue. *Biol Chem*, **381**, 1203-14.
- Evan, G.I. and Vousden, K.H. (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, **411**, 342-8.
- Fahraeus, R., Fischer, P., Krausz, E. and Lane, D.P. (1999) New approaches to cancer therapies. *J Pathol*, **187**, 138-46.
- Fairlie, D.P., West, M.L. and Wong, A.K. (1998) Towards protein surface mimetics. *Curr Med Chem*, **5**, 29-62.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. and Weissman, A.M. (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem*, **275**, 8945-51.
- Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L.L., Pepinsky, B. and Barsoum, J. (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 664-8.
- Fejzo, J., Lepre, C.A., Peng, J.W., Bemis, G.W., Ajay, Murcko, M.A. and Moore, J.M. (1999) The SHAPES strategy: an NMR-based approach for lead generation in drug discovery. *Chem Biol*, **6**, 755-69.
- Ferbeyre, G. and Lowe, S.W. (2002) The price of tumour suppression? *Nature*, **415**, 26-7.
- Ferre-D'Amare, A.R., Adrian, R. and Burley, S.K. (1997) Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules. *Methods in Enzymology*, **276**, 157-166.
- Ferre-D'Amare, A.R. and Burley, S.K. (1994) Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. *Structure*, **2**, 357-9.
- Fields, S. and Jang, S.K. (1990) Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, **249**, 1046-9.
- Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F. and Jacks, T. (2002) p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*, **416**, 560-4.
- Foord, O.S., Bhattacharya, P., Reich, Z. and Rotter, V. (1991) A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. *Nucleic Acids Res*, **19**, 5191-8.
- Ford, K.G., Souberbielle, B.E., Darling, D. and Farzaneh, F. (2001) Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Ther*, **8**, 1-4.
- Foster, B.A., Coffey, H.A., Morin, M.J. and Rastinejad, F. (1999) Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science*, **286**, 2507-10.
- Fourie, A.M., Hupp, T.R., Lane, D.P., Sang, B.C., Barbosa, M.S., Sambrook, J.F. and Gething, M.J. (1997) Hsp70 binding sites in the tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem*, **272**, 19471-9.
- Freedman, D.A., Epstein, C.B., Roth, J.C. and Levine, A.J. (1997) A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein. *Mol Med*, **3**, 248-59.
- Freedman, D.A. and Levine, A.J. (1998) Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol*, **18**, 7288-93.
- Freedman, D.A. and Levine, A.J. (1999) Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein--thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res*, **59**, 1-7.
- Freedman, D.A., Wu, L. and Levine, A.J. (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 96-107.
- Friedlander, P., Legros, Y., Soussi, T. and Prives, C. (1996) Regulation of mutant p53 temperature-sensitive DNA binding. *J Biol Chem*, **271**, 25468-78.
- Friedler, A., Hansson, L.O., Veprintsev, D.B., Freund, S.M., Rippin, T.M., Nikolova, P.V., Proctor, M.R., Rudiger, S. and Fersht, A.R. (2002) A peptide that binds and stabilizes p53 core domain: Chaperone strategy for rescue of oncogenic mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 937-42.
- Friedman, A.M., Fischmann, T.O. and Steitz, T.A. (1995) Crystal structure of lac repressor core tetramer and its implications for DNA looping. *Science*, **268**, 1721-7.
- Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J. and Prives, C. (1993) The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3319-23.
- Frishman, D. and Argos, P. (1996) Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng*, **9**, 133-42.
- Fuchs, B., Hecker, D. and Scheidtmann, K.H. (1995) Phosphorylation studies on rat p53 using the baculovirus expression system. Manipulation of the phosphorylation state with okadaic acid and influence on DNA binding. *Eur J Biochem*, **228**, 625-39.
- Funk, W.D., Pak, D.T., Karas, R.H., Wright, W.E. and Shay, J.W. (1992) A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol*, **12**, 2866-71.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K. and Sugiura, Y. (2001) Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*, **276**, 5836-40.
- Futreal, P.A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J.C., Wooster, R. and Stratton, M.R. (2001) Cancer and genomics. *Nature*, **409**, 850-2.

- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T. and Prives, C. (2001) A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol*, **21**, 1874-87.
- Galatin, P.S. and Abraham, D.J. (2001) QSAR: hydrophobic analysis of inhibitors of the p53-mdm2 interaction. *Proteins*, **45**, 169-75.
- Gane, P.J. and Dean, P.M. (2000) Recent advances in structure-based rational drug design. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 401-4.
- Gannon, J.V., Greaves, R., Iggo, R. and Lane, D.P. (1990) Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *Embo J*, **9**, 1595-602.
- Garcia-Echeverria, C., Chene, P., Blommers, M.J. and Furet, P. (2000) Discovery of potent antagonists of the interaction between human double minute 2 and tumor suppressor p53. *J Med Chem*, **43**, 3205-8.
- Garcia-Echeverria, C., Furet, P. and Chene, P. (2001) Coupling of the antenapedia third helix to a potent antagonist of the p53/hdm2 protein-protein interaction. *Bioorg Med Chem Lett*, **11**, 2161-4.
- Garnier, J., Levin, J.M., Gibrat, J.F. and Biou, V. (1990) Secondary structure prediction and protein design. *Biochem Soc Symp*, **57**, 11-24.
- Garvie, C.W. and Wolberger, C. (2001) Recognition of specific DNA sequences. *Mol Cell*, **8**, 937-46.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M.A., Copley, R.R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, **415**, 141-7.
- Geiger, T., Husken, D., Weiler, J., Natt, F., Woods-Cook, K.A., Hall, J. and Fabbro, D. (2000) Consequences of the inhibition of Hdm2 expression in human osteosarcoma cells using antisense oligonucleotides. *Anticancer Drug Des*, **15**, 423-30.
- Geourjon, C. and Deleage, G. (1994) SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction. *Protein Eng*, **7**, 157-64.
- Geourjon, C. and Deleage, G. (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci*, **11**, 681-4.
- Ghosh, G., van Duyn, G., Ghosh, S. and Sigler, P.B. (1995) Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature*, **373**, 303-10.
- Gibbs, J.B. (2000) Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*, **287**, 1969-73.
- Gibrat, J.F., Garnier, J. and Robson, B. (1987) Further developments of protein secondary structure prediction using information theory. New parameters and consideration of residue pairs. *J Mol Biol*, **198**, 425-43.
- Gill, S. and von Hippel, P. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-26.
- Gius, D.R., Ezhevsky, S.A., Becker-Hapak, M., Nagahara, H., Wei, M.C. and Dowdy, S.F. (1999) Transduced p16INK4a peptides inhibit hypophosphorylation of the retinoblastoma protein and cell cycle progression prior to activation of Cdk2 complexes in late G1. *Cancer Res*, **59**, 2577-80.
- Goodsell, D.S. (1999) The molecular perspective: p53 tumor suppressor. *Stem Cells*, **17**, 189-90.
- Gorina, S. and Pavletich, N.P. (1996) Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science*, **274**, 1001-5.
- Goto, N.K. and Kay, L.E. (2000) New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 585-92.
- Green, D.R. and Evan, G.I. (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell*, **1**, 19-30.
- Greenfield, N.J. (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal Biochem*, **235**, 1-10.
- Grigorian, M., Andresen, S., Tulchinsky, E., Kriajevska, M., Carlberg, C., Kruse, C., Cohn, M., Ambartsumian, N., Christensen, A., Selivanova, G. and Lukanidin, E. (2001) Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem*, **276**, 22699-708.
- Grob, T.J., Fey, M.F. and Tobler, A. (2002) The two faces of p73. *Cell Death Differ*, **9**, 229-30.
- Grob, T.J., Novak, U., Maisse, C., Barcaroli, D., Luthi, A.U., Pirnia, F., Hugli, B., Graber, H.U., De Laurenzi, V., Fey, M.F., Melino, G. and Tobler, A. (2001) Human DeltaNp73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ*, **8**, 1213-23.
- Grodberg, J. and Dunn, J.J. (1988) ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*, **170**, 1245-53.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463-71.
- Grossman, S.R. (2001) p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem*, **268**, 2773-8.
- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.
- Gu, W., Shi, X.L. and Roeder, R.G. (1997) Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature*, **387**, 819-23.
- Gudkov, A., Komarov, P. and Komarova, E. (2000) p53 inhibitors and therapeutic use of the same. *Patentschrift*, PCT/US00/02104 beruhend auf WO00/44364.

- Guruprasad, K., Reddy, B.V. and Pandit, M.W. (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng*, **4**, 155-61.
- Hainaut, P., Butcher, S. and Milner, J. (1995) Temperature sensitivity for conformation is an intrinsic property of wild-type p53. *Br J Cancer*, **71**, 227-31.
- Hainaut, P., Hernandez, T., Robinson, A., Rodriguez-Tome, P., Flores, T., Hollstein, M., Harris, C.C. and Montesano, R. (1998) IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res*, **26**, 205-13.
- Hainaut, P. and Mann, K. (2001) Zinc binding and redox control of p53 structure and function. *Antioxid Redox Signal*, **3**, 611-23.
- Halazonetis, T.D., Davis, L.J. and Kandil, A.N. (1993) Wild-type p53 adopts a 'mutant'-like conformation when bound to DNA. *Embo J*, **12**, 1021-8.
- Halazonetis, T.D. and Kandil, A.N. (1993) Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *Embo J*, **12**, 5057-64.
- Hall, A.R. and Milner, J. (1997) Specific p53-DNA complexes contain an mdm2-related protein. *Oncogene*, **14**, 1371-6.
- Hall, D.J., Cui, J., Bates, M.E., Stout, B.A., Koenderman, L., Coffey, P.J. and Bertics, P.J. (2001) Transduction of a dominant-negative H-Ras into human eosinophils attenuates extracellular signal-regulated kinase activation and interleukin-5-mediated cell viability. *Blood*, **98**, 2014-21.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F.R. (1991) Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. *Methods Enzymol*, **204**, 63-113.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Hansen, S., Hupp, T.R. and Lane, D.P. (1996a) Allosteric regulation of the thermostability and DNA binding activity of human p53 by specific interacting proteins. *J Biol Chem*, **271**, 3917-24.
- Hansen, S. and Kaluza, B. (1999) Possible therapeutic interventions in oncology. *Onkologie*, **22**, 106-12.
- Hansen, S., Lane, D.P. and Midgley, C.A. (1998) The N terminus of the murine p53 tumour suppressor is an independent regulatory domain affecting activation and thermostability. *J Mol Biol*, **275**, 575-88.
- Hansen, S., Midgley, C.A., Lane, D.P., Freeman, B.C., Morimoto, R.I. and Hupp, T.R. (1996b) Modification of two distinct COOH-terminal domains is required for murine p53 activation by bacterial Hsp70. *J Biol Chem*, **271**, 30922-8.
- Hao, M., Lowy, A.M., Kapoor, M., Deffie, A., Liu, G. and Lozano, G. (1996) Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo. *J Biol Chem*, **271**, 29380-5.
- Hara, T., Arai, K. and Koike, K. (2000) Form of human p53 protein during nuclear transport in Xenopus laevis embryos. *Exp Cell Res*, **258**, 152-61.
- Harlow, E., Crawford, L.V., Pim, D.C. and Williamson, N.M. (1981) Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J Virol*, **39**, 861-9.
- Harris, C.C. (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst*, **88**, 1442-55.
- Harris, E.L.V. and Angal, S. (1994) Protein purification methods. *IRL Press*, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, **387**, 296-9.
- Hecker, D., Page, G., Lohrum, M., Weiland, S. and Scheidtmann, K.H. (1996) Complex regulation of the DNA-binding activity of p53 by phosphorylation: differential effects of individual phosphorylation sites on the interaction with different binding motifs. *Oncogene*, **12**, 953-61.
- Hengstermann, A., Linares, L.K., Ciechanover, A., Whitaker, N.J. and Scheffner, M. (2001) Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1218-23.
- Hennessy, D., Buchanan, B., Subramanian, D., Wilkosz, P.A. and Rosenberg, J.M. (2000) Statistical methods for the objective design of screening procedures for macromolecular crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56**, 817-27.
- Hibi, K., Trink, B., Patturajan, M., Westra, W.H., Caballero, O.L., Hill, D.E., Ratovitski, E.A., Jen, J. and Sidransky, D. (2000) AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5462-7.
- Hickman, E.S., Moroni, M.C. and Helin, K. (2002) The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 60-6.
- Hietanen, S., Lain, S., Krausz, E., Blattner, C. and Lane, D.P. (2000) Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8501-6.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J. and Mak, T.W. (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, **287**, 1824-7.
- Ho, A., Schwarze, S.R., Mermelstein, S.J., Waksman, G. and Dowdy, S.F. (2001) Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **61**, 474-7.
- Hoffmann, R., Craik, D.J., Pierens, G., Bolger, R.E. and Otvos, L., Jr. (1998) Phosphorylation of the C-terminal sites of human p53 reduces non- sequence-specific DNA binding as modeled with synthetic peptides. *Biochemistry*, **37**, 13755-64.

- Hoh, J., Jin, S., Parrado, T., Edington, J., Levine, A.J. and Ott, J. (2002) The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8467-72.
- Hollstein, M., Hergenhahn, M., Yang, Q., Bartsch, H., Wang, Z.Q. and Hainaut, P. (1999) New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. *Mutat Res*, **431**, 199-209.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- Honda, R. and Yasuda, H. (1999) Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J*, **18**, 22-7.
- Hsieh, J.K., Chan, F.S., O'Connor, D.J., Mitnacht, S., Zhong, S. and Lu, X. (1999) RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell*, **3**, 181-93.
- Huang, P. and Oliff, A. (2001) Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Trends Cell Biol*, **11**, 343-8.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M. and Howley, P.M. (1993) Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol*, **13**, 4918-27.
- Hupp, T.R. (1999) Regulation of p53 protein function through alterations in protein- folding pathways. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 88-95.
- Hupp, T.R. and Lane, D.P. (1994a) Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol*, **4**, 865-75.
- Hupp, T.R. and Lane, D.P. (1994b) Regulation of the cryptic sequence-specific DNA-binding function of p53 by protein kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **59**, 195-206.
- Hupp, T.R. and Lane, D.P. (1995) Two distinct signaling pathways activate the latent DNA binding function of p53 in a casein kinase II-independent manner. *J Biol Chem*, **270**, 18165-74.
- Hupp, T.R., Lane, D.P. and Ball, K.L. (2000) Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J*, **352 Pt 1**, 1-17.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A. and Lane, D.P. (1992) Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell*, **71**, 875-86.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A. and Lane, D.P. (1993) Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3167-74.
- Hupp, T.R., Sparks, A. and Lane, D.P. (1995) Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell*, **83**, 237-45.
- Ikai, A. (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem (Tokyo)*, **88**, 1895-8.
- Inga, A. and Resnick, M.A. (2001) Novel human p53 mutations that are toxic to yeast can enhance transactivation of specific promoters and reactivate tumor p53 mutants. *Oncogene*, **20**, 3409-19.
- Irwin, M.S. and Kaelin, W.G. (2001) p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth Differ*, **12**, 337-49.
- Ishioaka, C., Englert, C., Winge, P., Yan, Y.X., Engelstein, M. and Friend, S.H. (1995) Mutational analysis of the carboxy-terminal portion of p53 using both yeast and mammalian cell assays in vivo. *Oncogene*, **10**, 1485-92.
- Itahana, K., Dimri, G. and Campisi, J. (2001) Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem*, **268**, 2784-91.
- Iwabuchi, K., Bartel, P.L., Li, B., Marraccino, R. and Fields, S. (1994) Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6098-102.
- Iwabuchi, K., Li, B., Massa, H.F., Trask, B.J., Date, T. and Fields, S. (1998) Stimulation of p53-mediated transcriptional activation by the p53-binding proteins, 53BP1 and 53BP2. *J Biol Chem*, **273**, 26061-8.
- Jackson, P., Mastrangelo, I., Reed, M., Tegtmeyer, P., Yardley, G. and Barrett, J. (1998) Synergistic transcriptional activation of the MCK promoter by p53: tetramers link separated DNA response elements by DNA looping. *Oncogene*, **16**, 283-92.
- Jackson, P., Shield, M., Buskin, J., Hawkes, S., Reed, M., Perrem, K., Hauschka, S.D. and Braithwaite, A. (1995) p53-dependent activation of the mouse MCK gene promoter: identification of a novel p53-responsive sequence and evidence for cooperation between distinct p53 binding sites. *Gene Expr*, **5**, 19-33.
- Jacoby, E. (2002) Biphenyls as potential mimetics of protein alpha-helix. *Bioorg Med Chem Lett*, **12**, 891-3.
- Jaenicke, R. (1998) What ultrastable globular proteins teach us about protein stabilization. *Biochemistry (Mosc)*, **63**, 312-21.
- Jaenicke, R. (1999) Stability and folding of domain proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, **71**, 155-241.
- Jaenicke, R. (2000a) Do ultrastable proteins from hyperthermophiles have high or low conformational rigidity? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2962-4.
- Jaenicke, R. (2000b) Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J Biotechnol*, **79**, 193-203.
- Jaenicke, R. and Böhm, G. (1998) The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 738-48.
- Jain, D., Kaur, K.J. and Salunke, D.M. (2001) Enhanced binding of a rationally designed peptide ligand of concanavalin A arises from improved geometrical complementarity. *Biochemistry*, **40**, 12059-66.
- Jancarik, J. and Kim, S.H. (1991) Sparse Matrix Sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J Appl Cryst*, **24**, 409-11.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmuller, L., Grosse, F. and Deppert, W. (1999) The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 12-27.
- Jayaraman, J. and Prives, C. (1995) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus. *Cell*, **81**, 1021-9.

- Jayaraman, L., Freulich, E. and Prives, C. (1997) Functional dissection of p53 tumor suppressor protein. *Methods Enzymol*, **283**, 245-56.
- Jayaraman, L. and Prives, C. (1999) Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 76-87.
- Jeffrey, P.D., Gorina, S. and Pavletich, N.P. (1995) Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, **267**, 1498-502.
- Jelesarov, I. and Bosshard, H.R. (1999) Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit*, **12**, 3-18.
- Jerschow, A. and Muller, N. (1998) Efficient simulation of coherence transfer pathway selection by phase cycling and pulsed field gradients in NMR. *J Magn Reson*, **134**, 17-29.
- Jesenberger, V. and Jentsch, S. (2002) Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 112-21.
- Jett, S.D., Cherny, D.I., Subramaniam, V. and Jovin, T.M. (2000) Scanning force microscopy of the complexes of p53 core domain with supercoiled DNA. *J Mol Biol*, **299**, 585-92.
- Ji, X., Zhang, P., Armstrong, R.N. and Gilliland, G.L. (1992) The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2-A resolution. *Biochemistry*, **31**, 10169-84.
- Jiang, M., Axe, T., Holgate, R., Rubbi, C.P., Okorokov, A.L., Mee, T. and Milner, J. (2001) p53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress. *Oncogene*, **20**, 5449-58.
- Jin, S. and Levine, A.J. (2001) The p53 functional circuit. *J Cell Sci*, **114**, 4139-40.
- Jin, S., Martinek, S., Joo, W.S., Wortman, J.R., Mirkovic, N., Sali, A., Yandell, M.D., Pavletich, N.P., Young, M.W. and Levine, A.J. (2000) Identification and characterization of a p53 homologue in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7301-6.
- Johnson, C.R., Morin, P.E., Arrowsmith, C.H. and Freire, E. (1995) Thermodynamic analysis of the structural stability of the tetrameric oligomerization domain of p53 tumor suppressor. *Biochemistry*, **34**, 5309-16.
- Johnstone, R.W., Ruefli, A.A. and Lowe, S.W. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, **108**, 153-64.
- Jones, S. and Thornton, J.M. (1996) Principles of protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13-20.
- Jones, S., van Heyningen, P., Berman, H.M. and Thornton, J.M. (1999) Protein-DNA interactions: A structural analysis. *J Mol Biol*, **287**, 877-96.
- Jones, S.N., Hancock, A.R., Vogel, H., Donehower, L.A. and Bradley, A. (1998) Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15608-12.
- Joo, W.S., Jeffrey, P.D., Cantor, S.B., Finnis, M.S., Livingston, D.M. and Pavletich, N.P. (2002) Structure of the 53BP1 BRCT region bound to p53 and its comparison to the Brca1 BRCT structure. *Genes Dev*, **16**, 583-93.
- Jost, C.A., Marin, M.C. and Kaelin, W.G. (1997) p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, **389**, 191-4.
- Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D.L. and Oren, M. (1993) Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene*, **8**, 3411-6.
- Juven-Gershon, T. and Oren, M. (1999) Mdm2: the ups and downs. *Mol Med*, **5**, 71-83.
- Kabsch, W. and Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-637.
- Kaelin, W.G. (1999) The p53 gene family. *Oncogene*, **18**, 7701-5.
- Kaesler, M.D. and Iggo, R.D. (2002) From the Cover: Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 95-100.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F. and Caput, D. (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, **90**, 809-19.
- Kahyo, T., Nishida, T. and Yasuda, H. (2001) Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53. *Mol Cell*, **8**, 713-8.
- Kaku, S., Albor, A. and Kulesz-Martin, M. (2001a) Dissociation of DNA binding and in vitro transcriptional activities dependent on the C terminus of P53 proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 204-11.
- Kaku, S., Iwahashi, Y., Kuraishi, A., Albor, A., Yamagishi, T., Nakaike, S. and Kulesz-Martin, M. (2001b) Binding to the naturally occurring double p53 binding site of the Mdm2 promoter alleviates the requirement for p53 C-terminal activation. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1989-1993.
- Kane, S.A., Fleener, C.A., Zhang, Y.S., Davis, L.J., Musselman, A.L. and Huang, P.S. (2000) Development of a binding assay for p53/HDM2 by using homogeneous time-resolved fluorescence. *Anal Biochem*, **278**, 29-38.
- Kanei-Ishii, C., Nomura, T., Ogata, K., Sarai, A., Yasukawa, T., Tashiro, S., Takahashi, T., Tanaka, Y. and Ishii, S. (1996) Structure and function of the proteins encoded by the myb gene family. *Curr Top Microbiol Immunol*, **211**, 89-98.
- Kannan, K., Amariglio, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Kela, I., Kaminski, N., Getz, G., Domany, E. and Givol, D. (2001a) DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene*, **20**, 2225-34.

- Kannan, K., Kaminski, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Amariglio, N. and Givol, D. (2001b) DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene*, **20**, 3449-55.
- Kanovsky, M., Raffo, A., Drew, L., Rosal, R., Do, T., Friedman, F.K., Rubinstein, P., Visser, J., Robinson, R., Brandt-Rauf, P.W., Michl, J., Fine, R.L. and Pincus, M.R. (2001) Peptides from the amino terminal mdm-2-binding domain of p53, designed from conformational analysis, are selectively cytotoxic to transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12438-43.
- Kar, S., Sakaguchi, K., Shimohigashi, Y., Samaddar, S., Banerjee, R., Basu, G., Swaminathan, V., Kundu, T.K. and Roy, S. (2002) Effect of phosphorylation on the structure and fold of transactivation domain of P53. *J Biol Chem*, **277**, 15579-85.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. and Fornace, A.J. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, **71**, 587-97.
- Kay, B.K., Kasanov, J., Knight, S. and Kurakin, A. (2000) Convergent evolution with combinatorial peptides. *FEBS Lett*, **480**, 55-62.
- Kay, B.K., Kurakin, A. and Hyde-deRuyscher, R. (1998) From peptides to drugs via phage display. *DTT*, **3**, 370-8.
- Kelley, M.L., Winge, P., Heaney, J.D., Stephens, R.E., Farrell, J.H., Van Beneden, R.J., Reinisch, C.L., Lesser, M.P. and Walker, C.W. (2001) Expression of homologues for p53 and p73 in the softshell clam (*Mya arenaria*), a naturally-occurring model for human cancer. *Oncogene*, **20**, 748-58.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. and Vogelstein, B. (1991) Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*, **252**, 1708-11.
- Khuri, F.R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I.F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R.H., Heise, C., Randlev, B., Gillenwater, A.M., Brusco, P., Kaye, S.B., Hong, W.K. and Kim, D.H. (2000) A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med*, **6**, 879-85.
- Kiefersauer, R., Than, M.E., Dobbek, H., Gremer, L., Melero, M., Strobl, S., Dias, J.M., Soulimane, T. and Huber, R. (2000) A novel free-mounting system for protein crystals: transformation and improvement of diffraction power by accurately controlled humidity changes. *Journal of Applied Crystallography*, **33**, 1223-30.
- Kim, A.L., Raffo, A.J., Brandt-Rauf, P.W., Pincus, M.R., Monaco, R., Abarzua, P. and Fine, R.L. (1999a) Conformational and molecular basis for induction of apoptosis by a p53 C-terminal peptide in human cancer cells. *J Biol Chem*, **274**, 34924-31.
- Kim, E., Albrechtsen, N. and Deppert, W. (1997) DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene*, **15**, 857-69.
- Kim, E., Rohaly, G., Heinrichs, S., Gimnopoulos, D., Meissner, H. and Deppert, W. (1999b) Influence of promoter DNA topology on sequence-specific DNA binding and transactivation by tumor suppressor p53. *Oncogene*, **18**, 7310-8.
- King, F.W., Wawrzynow, A., Hohfeld, J. and Zylicz, M. (2001) Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *Embo J*, **20**, 6297-305.
- King, R.D., Saqi, M., Sayle, R. and Sternberg, M.J. (1997) DSC: public domain protein secondary structure prediction. *Comput Appl Biosci*, **13**, 473-4.
- Klein, C., Georges, G., Kunkle, K.P., Huber, R., Engh, R.A. and Hansen, S. (2001a) High thermostability and lack of cooperative DNA binding distinguish the p63 core domain from the homologous tumor suppressor p53. *J Biol Chem*, **276**, 37390-401.
- Klein, C., Planker, E., Diercks, T., Kessler, H., Kunkle, K.P., Lang, K., Hansen, S. and Schwaiger, M. (2001b) NMR spectroscopy reveals the solution dimerization interface of p53 core domains bound to their consensus DNA. *J Biol Chem*, **276**, 49020-7.
- Klotzsche, O., Etzrodt, D., Hohenberg, H., Bohn, W. and Deppert, W. (1998) Cytoplasmic retention of mutant tsp53 is dependent on an intermediate filament protein (vimentin) scaffold. *Oncogene*, **16**, 3423-34.
- Kneller, D.G., Cohen, F.E. and Langridge, R. (1990) Improvements in protein secondary structure prediction by an enhanced neural network. *J Mol Biol*, **214**, 171-82.
- Knight, S.M., Umezawa, N., Lee, H.S., Gellman, S.H. and Kay, B.K. (2002) A Fluorescence Polarization Assay for the Identification of Inhibitors of the p53-DM2 Protein-Protein Interaction. *Anal Biochem*, **300**, 230-6.
- Ko, L.J. and Prives, C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, **10**, 1054-72.
- Komarov, P.G., Komarova, E.A., Kondratov, R.V., Christov-Tselkov, K., Coon, J.S., Chernov, M.V. and Gudkov, A.V. (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*, **285**, 1733-7.
- Komarova, E.A. and Gudkov, A.V. (1998) Could p53 be a target for therapeutic suppression? *Semin Cancer Biol*, **8**, 389-400.
- Komarova, E.A. and Gudkov, A.V. (2000) Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy. *Biochemistry (Mosc)*, **65**, 41-8.
- Komarova, E.A. and Gudkov, A.V. (2001) Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol*, **62**, 657-67.
- Kong, X.T., Gao, H. and Stanbridge, E.J. (2001) Mechanisms of differential activation of target gene promoters by p53 hinge domain mutants with impaired apoptotic function. *J Biol Chem*, **276**, 32990-33000.
- Kouzarides, T. (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *Embo J*, **19**, 1176-9.

- Kovvali, G.K., Mehta, B., Epstein, C.B. and Lutzker, S.G. (2001) Identification of partial loss of function p53 gene mutations utilizing a yeast-based functional assay. *Nucleic Acids Res*, **29**, E28.
- Kramer, H., Niemoller, M., Amouyal, M., Revet, B., von Wilcken-Bergmann, B. and Muller-Hill, B. (1987) lac repressor forms loops with linear DNA carrying two suitably spaced lac operators. *Embo J*, **6**, 1481-91.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R. and May, P. (1979) Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol*, **31**, 472-83.
- Kreusler, M. (2002) Charakterisierung des p53 Homologen p63. *Diplomarbeit*, Fachbereich für Biowissenschaft und Psychologie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Kriwacki, R.W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S.I. and Wright, P.E. (1996) Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11504-9.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. and Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, **387**, 299-303.
- Kubbutat, M.H., Ludwig, R.L., Ashcroft, M. and Vousden, K.H. (1998) Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Mol Cell Biol*, **18**, 5690-8.
- Kubbutat, M.H. and Vousden, K.H. (1998) Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today*, **4**, 250-6.
- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J. and Pavletich, N.P. (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, **274**, 948-53.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, **157**, 105-32.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lai, Z., Auger, K.R., Manubay, C.M. and Copeland, R.A. (2000) Thermodynamics of p53 binding to hdm2(1-126): effects of phosphorylation and p53 peptide length. *Arch Biochem Biophys*, **381**, 278-84.
- Lai, Z., Ferry, K.V., Diamond, M.A., Wee, K.E., Kim, Y.B., Ma, J., Yang, T., Benfield, P.A., Copeland, R.A. and Auger, K.R. (2001) Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *J Biol Chem*, **276**, 31357-67.
- Lain, S., Xirodimas, D. and Lane, D.P. (1999) Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function. *Exp Cell Res*, **253**, 315-24.
- Lakin, N.D. and Jackson, S.P. (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, **18**, 7644-55.
- Lakkaraju, A., Dubinsky, J.M., Low, W.C. and Rahman, Y.E. (2001) Neurons are protected from excitotoxic death by p53 antisense oligonucleotides delivered in anionic liposomes. *J Biol Chem*, **276**, 32000-7.
- Lane, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-6.
- Lane, D.P. (1999) Exploiting the p53 pathway for cancer diagnosis and therapy. *Br J Cancer*, **80 Suppl 1**, 1-5.
- Lane, D.P. and Benchimol, S. (1990) p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev*, **4**, 1-8.
- Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, **278**, 261-3.
- Lane, D.P. and Hall, P.A. (1997) MDM2--arbiter of p53's destruction. *Trends Biochem Sci*, **22**, 372-4.
- Lane, D.P. and Lain, S. (2002) Therapeutic exploitation of the p53 pathway. *Trends Mol Med*, **8**, S38-42.
- Laskowski, R.A., W., M.M., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical qualities of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 283-91.
- Lassus, P., Bertrand, C., Zugasti, O., Chambon, J.P., Soussi, T., Mathieu-Mahul, D. and Hibner, U. (1999) Anti-apoptotic activity of p53 maps to the COOH-terminal domain and is retained in a highly oncogenic natural mutant. *Oncogene*, **18**, 4699-709.
- Le Bras, M., Delattre, V., Bensaad, K., Blandino, G. and Soussi, T. (2002) Monoclonal antibodies raised against Xenopus p53 interact with human p73. *Oncogene*, **21**, 1304-8.
- Leavitt, S. and Freire, E. (2001) Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 560-6.
- Lebrun, A., Lavery, R. and Weinstein, H. (2001) Modeling multi-component protein-DNA complexes: the role of bending and dimerization in the complex of p53 dimers with DNA. *Protein Eng*, **14**, 233-43.
- Lee, H., Mok, K.H., Muhandiram, R., Park, K.H., Suk, J.E., Kim, D.H., Chang, J., Sung, Y.C., Choi, K.Y. and Han, K.H. (2000) Local structural elements in the mostly unstructured transcriptional activation domain of human p53. *J Biol Chem*, **275**, 29426-32.
- Lee, S., Cavallo, L. and Griffith, J. (1997) Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J Biol Chem*, **272**, 7532-9.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. and Griffith, J. (1995) p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell*, **81**, 1013-20.
- Lee, W., Harvey, T.S., Yin, Y., Yau, P., Litchfield, D. and Arrowsmith, C.H. (1994) Solution structure of the tetrameric minimum transforming domain of p53. *Nat Struct Biol*, **1**, 877-90.
- Legube, G., Linares, L.K., Lemerrier, C., Scheffner, M., Khochbin, S. and Trouche, D. (2002) Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation. *Embo J*, **21**, 1704-1712.
- Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S.F. and Wyss, M. (2000) The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1543**, 408-415.

- Lehmann, M. and Wyss, M. (2001) Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr Opin Biotechnol*, **12**, 371-5.
- Leng, P., Brown, D.R., Shivakumar, C.V., Deb, S. and Deb, S.P. (1995) N-terminal 130 amino acids of MDM2 are sufficient to inhibit p53-mediated transcriptional activation. *Oncogene*, **10**, 1275-82.
- Lepre, C.A. (2001) Library design for NMR-based screening. *Drug Discov Today*, **6**, 133-140.
- Leslie, A.G.W. (1994) Mosflm User Guide, Mosflm Version 5.23. *MRC Laboratory of Molecular Biology*, Cambridge, UK.
- Lev Bar-Or, R., Maya, R., Segel, L.A., Alon, U., Levine, A.J. and Oren, M. (2000) Generation of oscillations by the p53-mdm2 feedback loop: A theoretical and experimental study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11250-5.
- Levin, J.M., Robson, B. and Garnier, J. (1986) An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity. *FEBS Lett*, **205**, 303-8.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-31.
- Leverro, M., De Laurenzi, V., Costanzo, A., Gong, J., Melino, G. and Wang, J.Y. (1999) Structure, function and regulation of p63 and p73. *Cell Death Differ*, **6**, 1146-53.
- Leverro, M., De Laurenzi, V., Costanzo, A., Gong, J., Wang, J.Y. and Melino, G. (2000) The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci*, **113**, 1661-70.
- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J. and Gu, W. (2002) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, **416**, 648-53.
- Liang, S.H. and Clarke, M.F. (2001) Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem*, **268**, 2779-83.
- Lilie, H., Schwarz, E. and Rudolph, R. (1998) Advances in refolding of proteins produced in E. coli. *Curr Opin Biotechnol*, **9**, 497-501.
- Lin, D., Tatham, M.H., Yu, B., Kim, S., Hay, R.T. and Chen, Y. (2002) Identification of a substrate recognition site on Ubc9. *J Biol Chem*, **4**, 4.
- Lin, J., Blake, M., Tang, C., Zimmer, D., Rustandi, R.R., Weber, D.J. and Carrier, F. (2001) Inhibition of p53 transcriptional activity by the S100B calcium-binding protein. *J Biol Chem*, **276**, 35037-41.
- Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A. and Langel, U. (2000) Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 99-103.
- Lindl, T. (2000) Zell- und Gewebekultur. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- Linzer, D.I. and Levine, A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, **17**, 43-52.
- Lissy, N.A., Davis, P.K., Irwin, M., Kaelin, W.G. and Dowdy, S.F. (2000) A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature*, **407**, 642-5.
- Little, N.A. and Jochemsen, A.G. (2001) Hdmx and Mdm2 can repress transcription activation by p53 but not by p63. *Oncogene*, **20**, 4576-80.
- Little, N.A. and Jochemsen, A.G. (2002) p63. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 6-9.
- Liu, Q., Jin, C., Liao, X., Shen, Z., Chen, D.J. and Chen, Y. (1999) The binding interface between an E2 (UBC9) and a ubiquitin homologue (UBL1). *J Biol Chem*, **274**, 16979-87.
- Liu, W.L., Midgley, C., Stephen, C., Saville, M. and Lane, D.P. (2001) Biological significance of a small highly conserved region in the N terminus of the p53 tumour suppressor protein. *J Mol Biol*, **313**, 711-31.
- Liu, Y. and Kulesz-Martin, M. (2001) p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis*, **22**, 851-60.
- Lohrum, M.A., Ashcroft, M., Kubbutat, M.H. and Vousden, K.H. (2000) Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat Cell Biol*, **2**, 179-81.
- Lohrum, M.A. and Vousden, K.H. (2000) Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol*, **10**, 197-202.
- Lottspeich, F. and Zorbas, H.e. (1997) Bioanalytik. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- Loughran, O. and La Thangue, N.B. (2000) Apoptotic and growth-promoting activity of E2F modulated by MDM2. *Mol Cell Biol*, **20**, 2186-97.
- Lowe, S.W. and Lin, A.W. (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, **21**, 485-95.
- Lu, W., Chen, L., Peng, Y. and Chen, J. (2001) Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression. *Oncogene*, **20**, 3206-16.
- Luciani, M.G., Hutchins, J.R., Zheleva, D. and Hupp, T.R. (2000) The C-terminal regulatory domain of p53 contains a functional docking site for cyclin A. *J Mol Biol*, **300**, 503-18.
- Luke, R.A., Jewsbury, P.J. and Cotton, R. (2000) Piperazine-4 phenyl derivatives as inhibitors of the interaction between MDM2 and p53. *Patentschrift*, PCT/GB99/02957 beruhend auf WO00/15657.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. and Gu, W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, **107**, 137-48.
- Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A. and Gu, W. (2000) Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature*, **408**, 377-81.
- Luscombe, N.M., Austin, S.E., Berman, H.M. and Thornton, J.M. (2000) An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol*, **1**.
- Luscombe, N.M., Laskowski, R.A., Westhead, D.R., Milburn, D., Jones, S., Karmirantzou, M. and Thornton, J.M. (1998) New tools and resources for analysing protein structures and their interactions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 1132-8.
- Maiti, S., Haupts, U. and Webb, W.W. (1997) Fluorescence correlation spectroscopy: diagnostics for sparse molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11753-7.

- Maki, C.G., Huibregtse, J.M. and Howley, P.M. (1996) In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res*, **56**, 2649-54.
- Maltzman, W. and Czyzyk, L. (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol*, **4**, 1689-94.
- Maly, D.J., Choong, I.C. and Ellman, J.A. (2000) Combinatorial target-guided ligand assembly: identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2419-24.
- Marchenko, N.D., Zaika, A. and Moll, U.M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria - a potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*, **275**, 16202-12.
- Marechal, V., Elenbaas, B., Taneyhill, L., Piette, J., Mechali, M., Nicolas, J.C., Levine, A.J. and Moreau, J. (1997) Conservation of structural domains and biochemical activities of the MDM2 protein from *Xenopus laevis*. *Oncogene*, **14**, 1427-33.
- Marin, M.C., Jost, C.A., Brooks, L.A., Irwin, M.S., O'Nions, J., Tidy, J.A., James, N., McGregor, J.M., Harwood, C.A., Yulug, I.G., Vousden, K.H., Allday, M.J., Gusterson, B., Ikawa, S., Hinds, P.W., Crook, T. and Kaelin, W.G., Jr. (2000) A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet*, **25**, 47-54.
- Marin, M.C. and Kaelin, W.G., Jr. (2000) p63 and p73: old members of a new family. *Biochim Biophys Acta*, **1470**, M93-M100.
- Marshall, G.R., Hodgkin, E.E., Langs, D.A., Smith, G.D., Zabrocki, J. and Leplawy, M.T. (1990) Factors governing helical preference of peptides containing multiple alpha,alpha-dialkyl amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 487-91.
- Marston, N.J., Ludwig, R.L. and Vousden, K.H. (1998) Activation of p53 DNA binding activity by point mutation. *Oncogene*, **16**, 3123-31.
- Martin, A.C., Facchiano, A.M., Cuff, A.L., Hernandez-Boussard, T., Olivier, M., Hainaut, P. and Thornton, J.M. (2002) Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Hum Mutat*, **19**, 149-64.
- Martin, K., Trouche, D., Hagemeyer, C., Sorensen, T.S., La Thangue, N.B. and Kouzarides, T. (1995) Stimulation of E2F1/DP1 transcriptional activity by MDM2 oncoprotein. *Nature*, **375**, 691-4.
- Martinez, J.D., Craven, M.T. and Pennington, M.E. (1998) Selective binding of different p53 response elements by p53 containing complexes. *Oncogene*, **16**, 453-8.
- Maru, Y., Afar, D.E., Witte, O.N. and Shibuya, M. (1996) The dimerization property of glutathione S-transferase partially reactivates Bcr-Abl lacking the oligomerization domain. *J Biol Chem*, **271**, 15353-7.
- Mary, M.N., Venot, C., Caron de Fromentel, C., Debussche, L., Conseiller, E., Cochet, O., Gruel, N., Teillaud, J.L., Schweighoffer, F., Tocque, B. and Bracco, L. (1999) A tumor specific single chain antibody dependent gene expression system. *Oncogene*, **18**, 559-64.
- Massova, I. and Kollmann, P.A. (1999) Computational Alanine Scanning To Probe Protein-Protein Interactions: A Novel Approach To Evaluate Binding Free Energies. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8133-43.
- Mateu, M.G. and Fersht, A.R. (1998) Nine hydrophobic side chains are key determinants of the thermodynamic stability and oligomerization status of tumour suppressor p53 tetramerization domain. *Embo J*, **17**, 2748-58.
- Mateu, M.G., Sanchez Del Pino, M.M. and Fersht, A.R. (1999) Mechanism of folding and assembly of a small tetrameric protein domain from tumor suppressor p53. *Nat Struct Biol*, **6**, 191-8.
- Matsumura, I. and Ellington, A.D. (1999) In vitro evolution of thermostable p53 variants. *Protein Sci*, **8**, 731-40.
- Mattiello, D.L., Warren, W.S., Mueller, L. and Farmer, B.T. (1996) Minimizing the Water Resonance in Biological Nmr - Characterization and Suppression of Intermolecular Dipolar Interactions By Multiple-Axis Gradients. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3253-61.
- Maurici, D., Monti, P., Campomenosi, P., North, S., Frebourg, T., Fronza, G. and Hainaut, P. (2001) Amifostine (WR2721) restores transcriptional activity of specific p53 mutant proteins in a yeast functional assay. *Oncogene*, **20**, 3533-40.
- May, P. and May, E. (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*, **18**, 7621-36.
- Mayer, M. and Meyer, B. (1999) Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl*, **38**, 1784-8.
- McCoy, M., Stavridi, E.S., Waterman, J.L., Wiczorek, A.M., Opella, S.J. and Halazonetis, T.D. (1997) Hydrophobic side-chain size is a determinant of the three-dimensional structure of the p53 oligomerization domain. *Embo J*, **16**, 6230-6.
- McIntosh, P.B., Frenkiel, T.A., Wollborn, U., McCormick, J.E., Klempner, K.H., Feeney, J. and Carr, M.D. (1998) Solution structure of the B-Myb DNA-binding domain: a possible role for conformational instability of the protein in DNA binding and control of gene expression. *Biochemistry*, **37**, 9619-29.
- McLure, K.G. and Lee, P.W. (1996) A PAb240+ conformation of wild type p53 binds DNA. *Oncogene*, **13**, 1297-303.
- McLure, K.G. and Lee, P.W. (1998) How p53 binds DNA as a tetramer. *Embo J*, **17**, 3342-50.
- McLure, K.G. and Lee, P.W. (1999) p53 DNA binding can be modulated by factors that alter the conformational equilibrium. *Embo J*, **18**, 763-70.
- McPherson, A., Jr. (1976) The growth and preliminary investigation of protein and nucleic acid crystals for X-ray diffraction analysis. *Methods Biochem Anal*, **23**, 249-345.
- McPherson, A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur J Biochem*, **189**, 1-23.
- McRee, D.E. (1999) Practical Protein Crystallography. *Academic Press*, London, UK.

- McTigue, M.A., Bernstein, S.L., Williams, D.R. and Tainer, J.A. (1995a) Purification and crystallization of a schistosomal glutathione S-transferase. *Proteins*, **22**, 55-7.
- McTigue, M.A., Williams, D.R. and Tainer, J.A. (1995b) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J Mol Biol*, **246**, 21-7.
- Meek, D.W. (1999) Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene*, **18**, 7666-75.
- Mendoza-Alvarez, H. and Alvarez-Gonzalez, R. (2001) Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosyl)ation. *J Biol Chem*, **276**, 36425-30.
- Meplan, C., Richard, M.J. and Hainaut, P. (2000) Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem Pharmacol*, **59**, 25-33.
- Metcalfe, S., Weeds, A., Okorokov, A.L., Milner, J., Cockman, M. and Pope, B. (1999) Wild-type p53 protein shows calcium-dependent binding to F-actin. *Oncogene*, **18**, 2351-5.
- Midgley, C.A., Desterro, J.M., Saville, M.K., Howard, S., Sparks, A., Hay, R.T. and Lane, D.P. (2000) An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene*, **19**, 2312-23.
- Midgley, C.A., Fisher, C.J., Bartek, J., Vojtesek, B., Lane, D. and Barnes, D.M. (1992) Analysis of p53 expression in human tumours: an antibody raised against human p53 expressed in *Escherichia coli*. *J Cell Sci*, **101**, 183-9.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R. and Bradley, A. (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, **398**, 708-13.
- Milner, J. (1995) Flexibility: the key to p53 function? *Trends Biochem Sci*, **20**, 49-51.
- Milner, J., Cook, A. and Sheldon, M. (1987) A new anti-p53 monoclonal antibody, previously reported to be directed against the large T antigen of simian virus 40. *Oncogene*, **1**, 453-5.
- Milner, J. and Medcalf, E.A. (1990) Temperature-dependent switching between "wild-type" and "mutant" forms of p53-Val135. *J Mol Biol*, **216**, 481-4.
- Milner, J. and Medcalf, E.A. (1991) Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell*, **65**, 765-74.
- Milner-White, E.J. (1999) The N-terminal domain of MDM2 resembles calmodulin and its relatives. *J Mol Biol*, **292**, 957-63.
- Minks, C., Huber, R., Moroder, L. and Budisa, N. (1999) Atomic mutations at the single tryptophan residue of human recombinant annexin V: effects on structure, stability, and activity. *Biochemistry*, **38**, 10649-59.
- Miyashita, T. and Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**, 293-9.
- Molinari, M., Okorokov, A.L. and Milner, J. (1996) Interaction with damaged DNA induces selective proteolytic cleavage of p53 to yield 40 kDa and 35 kDa fragments competent for sequence-specific DNA binding. *Oncogene*, **13**, 2077-86.
- Moll, U.M., Erster, S. and Zaika, A. (2001) p53, p63 and p73--solos, alliances and feuds among family members. *Biochim Biophys Acta*, **1552**, 47-59.
- Moll, U.M., Ostermeyer, A.G., Haladay, R., Winkfield, B., Frazier, M. and Zambetti, G. (1996) Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol Cell Biol*, **16**, 1126-37.
- Moll, U.M. and Zaika, A. (2001) Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett*, **493**, 65-9.
- Moll, U.M. and Zaika, A. (2000) Disrupting the p53-mdm2 interaction as a potential therapeutic modality. *Drug Resist Updat*, **3**, 217-221.
- Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S. and Niland, J. (1998) The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3453-9.
- Momand, J., Wu, H.H. and Dasgupta, G. (2000) MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*, **242**, 15-29.
- Momand, J. and Zambetti, G.P. (1996) Analysis of the proportion of p53 bound to mdm-2 in cells with defined growth characteristics. *Oncogene*, **12**, 2279-89.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. and Levine, A.J. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, **69**, 1237-45.
- Montano, X. (2001a) Biology of p53 and SV40 large T association. *Methods Mol Biol*, **165**, 201-11.
- Montano, X. (2001b) Common amino acid sequence motifs in p53, 14-3-3 and Akt protein families. *FEBS Lett*, **507**, 237-40.
- Morello, J.P., Petaja-Repo, U.E., Bichet, D.G. and Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 466-9.
- Morikawa, S., Ogata, K., Sekikawa, A., Sarai, A., Ishii, S., Nishimura, Y. and Nakamura, H. (1995) Determination of the NMR solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain. *J Biomol NMR*, **6**, 294-305.
- Morris, M.C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. and Divita, G. (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol*, **19**, 1173-6.
- Mulder, F.A., Ayed, A., Yang, D., Arrowsmith, C.H. and Kay, L.E. (2000) Assignment of 1H(N), 15N, 13C(alpha), 13CO and 13C(beta) resonances in a 67 kDa p53 dimer using 4D-TROSY NMR spectroscopy. *J Biomol NMR*, **18**, 173-6.
- Muller, C.W., Rey, F.A., Sodeoka, M., Verdine, G.L. and Harrison, S.C. (1995) Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature*, **373**, 311-7.

- Muller, S., Hoegge, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2001) SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 202-10.
- Muller-Tiemann, B.F., Halazonetis, T.D. and Elting, J.J. (1998) Identification of an additional negative regulatory region for p53 sequence-specific DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6079-84.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-50.
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Muller, B., Wiesmuller, L., Deppert, W. and Grosse, F. (1996) p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell*, **85**, 1089-99.
- Mundt, M., Hupp, T., Fritsche, M., Merkle, C., Hansen, S., Lane, D. and Groner, B. (1997) Protein interactions at the carboxyl terminus of p53 result in the induction of its in vitro transactivation potential. *Oncogene*, **15**, 237-44.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A. and Dodson, E.J. (1997) Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallogr.*, **D53**, 240-55.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A.M., Snyder, E.L., Ho, A., Latham, D.G., Lissy, N.A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S.A. and Dowdy, S.F. (1998) Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med*, **4**, 1449-52.
- Nagaich, A.K., Appella, E. and Harrington, R.E. (1997a) DNA bending is essential for the site-specific recognition of DNA response elements by the DNA binding domain of the tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem*, **272**, 14842-9.
- Nagaich, A.K., Zhurkin, V.B., Durell, S.R., Jernigan, R.L., Appella, E. and Harrington, R.E. (1999) p53-induced DNA bending and twisting: p53 tetramer binds on the outer side of a DNA loop and increases DNA twisting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1875-80.
- Nagaich, A.K., Zhurkin, V.B., Sakamoto, H., Gorin, A.A., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Appella, E. and Harrington, R.E. (1997b) Architectural accommodation in the complex of four p53 DNA binding domain peptides with the p21/waf1/cip1 DNA response element. *J Biol Chem*, **272**, 14830-41.
- Nakamura, S., Gomyo, Y., Roth, J.A. and Mukhopadhyay, T. (2002) C-terminus of p53 is required for G(2) arrest. *Oncogene*, **21**, 2102-7.
- Nakamura, S., Roth, J.A. and Mukhopadhyay, T. (2000) Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol Cell Biol*, **20**, 9391-8.
- Nakano, K. and Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-94.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. and Honig, B. (1993) Effect of intragastric application of N-methylnitrosourea in p53 knockout mice. *Biophys J*, **64**, A166.
- Nicholls, C.D., McLure, K.G., Shields, M.A. and Lee, P.W. (2002) Biogenesis of p53 Involves Cotranslational Dimerization of Monomers and Posttranslational Dimerization of Dimers. IMPLICATIONS ON THE DOMINANT NEGATIVE EFFECT. *J Biol Chem*, **277**, 12937-45.
- Nichols, N.M. and Matthews, K.S. (2001a) p53 unfolding detected by CD but not by tryptophan fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun*, **288**, 111-5.
- Nichols, N.M. and Matthews, K.S. (2001b) Protein-DNA Binding Correlates with Structural Thermostability for the Full-Length Human p53 Protein. *Biochemistry*, **40**, 3847-58.
- Nichols, N.M. and Matthews, K.S. (2002) Human p53 Phosphorylation Mimic, S392E, Increases Nonspecific DNA Affinity and Thermal Stability. *Biochemistry*, **41**, 170-8.
- Nie, Y., Li, H.H., Bula, C.M. and Liu, X. (2000) Stimulation of p53 DNA binding by c-Abl requires the p53 C terminus and tetramerization. *Mol Cell Biol*, **20**, 741-8.
- Niewolik, D., Vojtesek, B. and Kovarik, J. (1995) p53 derived from human tumour cell lines and containing distinct point mutations can be activated to bind its consensus target sequence. *Oncogene*, **10**, 881-90.
- Nikolova, P.V., Henckel, J., Lane, D.P. and Fersht, A.R. (1998) Semirational design of active tumor suppressor p53 DNA binding domain with enhanced stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14675-80.
- Nikolova, P.V., Wong, K.B., DeDecker, B., Henckel, J. and Fersht, A.R. (2000) Mechanism of rescue of common p53 cancer mutations by second-site suppressor mutations. *Embo J*, **19**, 370-8.
- Nikolova, P.V., Veprintsev, D.B. and Fersht, A.R. (2002) Structure-function studies of the p53 homologous protein p73. in *Vorbereitung*.
- Nordstrom, W. and Abrams, J.M. (2000) Guardian ancestry: fly p53 and damage-inducible apoptosis. *Cell Death Differ*, **7**, 1035-8.
- North, S., El-Ghissassi, F., Pluquet, O., Verhaegh, G. and Hainaut, P. (2000) The cytoprotective aminothioliol WR1065 activates p21waf-1 and down regulates cell cycle progression through a p53-dependent pathway. *Oncogene*, **19**, 1206-14.
- North, S., Pluquet, O., Maurici, D., El Ghissassi, F. and Hainaut, P. (2002) Restoration of wild-type conformation and activity of a temperature- sensitive mutant of p53 (p53(V272M)) by the cytoprotective aminothioliol WR1065 in the esophageal cancer cell line TE-1. *Mol Carcinog*, **33**, 181-8.
- Nuber, U., Schwarz, S.E. and Scheffner, M. (1998) The ubiquitin-protein ligase E6-associated protein (E6-AP) serves as its own substrate. *Eur J Biochem*, **254**, 643-9.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N. (2000a) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-8.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. and Taya, Y. (2000b) p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*, **102**, 849-62.

- Oda, M., Furukawa, K., Ogata, K., Sarai, A. and Nakamura, H. (1998) Thermodynamics of specific and non-specific DNA binding by the c-Myb DNA-binding domain. *J Mol Biol*, **276**, 571-90.
- Oh, I.H. and Reddy, E.P. (1998) The C-terminal domain of B-Myb acts as a positive regulator of transcription and modulates its biological functions. *Mol Cell Biol*, **18**, 499-511.
- Oh, I.H. and Reddy, E.P. (1999) The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene*, **18**, 3017-33.
- Ohnishi, K., Ota, I., Takahashi, A. and Ohnishi, T. (2000) Glycerol restores p53-dependent radiosensitivity of human head and neck cancer cells bearing mutant p53. *Br J Cancer*, **83**, 1735-9.
- Ohnishi, T., Matsumoto, H., Wang, X., Takahashi, A., Tamamoto, T. and Ohnishi, K. (1999a) Restoration by glycerol of p53-dependent apoptosis in cells bearing the mutant p53 gene. *Int J Radiat Biol*, **75**, 1095-8.
- Ohnishi, T., Ohnishi, K., Wang, X., Takahashi, A. and Okaichi, K. (1999b) Restoration of mutant TP53 to normal TP53 function by glycerol as a chemical chaperone. *Radiat Res*, **151**, 498-500.
- Okamoto, K. and Beach, D. (1994) Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *Embo J*, **13**, 4816-22.
- Okamura, S., Arakawa, H., Tanaka, T., Nakanishi, H., Ng, C.C., Taya, Y., Monden, M. and Nakamura, Y. (2001) p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. *Mol Cell*, **8**, 85-94.
- Okorokov, A.L. and Milner, J. (1997) Proteolytic cleavage of p53: a model for the activation of p53 in response to DNA damage. *Oncol Res*, **9**, 267-73.
- Okorokov, A.L. and Milner, J. (1999) An ATP/ADP-dependent molecular switch regulates the stability of p53-DNA complexes. *Mol Cell Biol*, **19**, 7501-10.
- Okorokov, A.L., Ponchel, F. and Milner, J. (1997) Induced N- and C-terminal cleavage of p53: a core fragment of p53, generated by interaction with damaged DNA, promotes cleavage of the N- terminus of full-length p53, whereas ssDNA induces C-terminal cleavage of p53. *Embo J*, **16**, 6008-17.
- Okorokov, A.L., Rubbi, C.P., Metcalfe, S. and Milner, J. (2002) The interaction of p53 with the nuclear matrix is mediated by F-actin and modulated by DNA damage. *Oncogene*, **21**, 356-67.
- Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L. and Vogelstein, B. (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, **358**, 80-3.
- Oliner, J.D., Pietsenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, **362**, 857-60.
- Ollmann, M., Young, L.M., Di Como, C.J., Karim, F., Belvin, M., Robertson, S., Whittaker, K., Demsky, M., Fisher, W.W., Buchman, A., Duyk, G., Friedman, L., Prives, C. and Kopczynski, C. (2000) Drosophila p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell*, **101**, 91-101.
- Orekhov, V.Y., Nolde, D.E., Golovanov, A.P., Korzhnev, D.M. and Arseniev, A.S. (1995) Processing of Heteronuclear NMR Relaxation Data With the New Software Dasha. *Applied Magnetic Resonance*, **9**, 581-8.
- Oren, M. (1997) Lonely no more: p53 finds its kin in a tumor suppressor haven. *Cell*, **90**, 829-32.
- Oren, M. (1999) Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, **274**, 36031-4.
- Ory, K., Legros, Y., Auguin, C. and Soussi, T. (1994) Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *Embo J*, **13**, 3496-504.
- Osada, M., Inaba, R., Shinohara, H., Hagiwara, M., Nakamura, M. and Ikawa, Y. (2001) Regulatory domain of protein stability of human P51/TAP63, a P53 homologue. *Biochem Biophys Res Commun*, **283**, 1135-41.
- Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M. and Ikawa, S. (1998) Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med*, **4**, 839-43.
- Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol*, **131**, 266-80.
- Pace, C.N. (1990) Measuring and increasing protein stability. *Trends Biotechnol*, **8**, 93-8.
- Pace, C.N. and Scholtz, J.M. (1997) Measuring the conformational stability of a protein. *Protein structure: A practical approach*, ed. T. Creighton, IRL Press, Oxford, UK, 299-322.
- Pace, C.N. and Shaw, K.L. (2000) Linear extrapolation method of analyzing solvent denaturation curves. *Proteins, Suppl*, 1-7.
- Palecek, E., Brazdova, M., Cernocka, H., Vlk, D., Brazda, V. and Vojtesek, B. (1999) Effect of transition metals on binding of p53 protein to supercoiled DNA and to consensus sequence in DNA fragments. *Oncogene*, **18**, 3617-25.
- Palecek, E., Vlk, D., Stankova, V., Brazda, V., Vojtesek, B., Hupp, T.R., Schaper, A. and Jovin, T.M. (1997) Tumor suppressor protein p53 binds preferentially to supercoiled DNA. *Oncogene*, **15**, 2201-9.
- Pan, Y. and Haines, D.S. (2000) Identification of a tumor-derived p53 mutant with novel transactivating selectivity. *Oncogene*, **19**, 3095-100.
- Papavassiliou, A.G. (2000) p53-Targeted drugs: intelligent weapons in the tumor-suppressing arsenal. *J Cancer Res Clin Oncol*, **126**, 117-8. 0.htm.
- Parant, J., Chavez-Reyes, A., Little, N.A., Yan, W., Reinke, V., Jochemsen, A.G. and Lozano, G. (2001) Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet*, **29**, 92-5.
- Park, S.H. and Raines, R.T. (2000) Genetic selection for dissociative inhibitors of designated protein-protein interactions. *Nat Biotechnol*, **18**, 847-51.

- Pavletich, N.P., Chambers, K.A. and Pabo, C.O. (1993) The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev*, **7**, 2556-64.
- Pellecchia, M., Sem, D.S. and Wüthrich, K. (2002) NMR in drug discovery. *Nat Rev Drug Design*, **1**, 211-9.
- Pennisi, E. (1996) Filling in the blanks in the p53 protein structure. *Science*, **274**, 921-2.
- Perl, D. and Schmid, F.X. (2001) Electrostatic stabilization of a thermophilic cold shock protein. *J Mol Biol*, **313**, 343-57.
- Perl, D. and Schmid, F.X. (2002) Some like it hot: The molecular determinants of protein thermostability. *CHEMBIOCHEM*, **3**, 39-44.
- Perrier, V., Wallace, A.C., Kaneko, K., Safar, J., Prusiner, S.B. and Cohen, F.E. (2000) Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6073-8.
- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G. and Wüthrich, K. (1997) Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12366-71.
- Petros, A.M., Mueller, L. and Kopple, K.D. (1990) NMR identification of protein surfaces using paramagnetic probes. *Biochemistry*, **29**, 10041-8.
- Phelan, A., Elliott, G. and O'Hare, P. (1998) Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat Biotechnol*, **16**, 440-3.
- Picksley, S.M., Darr, D.A., Mansoor, M.S. and Loadman, P.M. (2001) Current advances in the inhibition of the auto-regulatory interaction between the p53 tumour suppressor protein and MDM2 protein. *Expert Opin. Ther. Patents*, **11**, 1825-35.
- Picksley, S.M. and Lane, D.P. (1993) The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays*, **15**, 689-90.
- Picksley, S.M., Spicer, J.F., Barnes, D.M. and Lane, D.P. (1996) The p53-MDM2 interaction in a cancer-prone family, and the identification of a novel therapeutic target. *Acta Oncol*, **35**, 429-34.
- Picksley, S.M., Vojtesek, B., Sparks, A. and Lane, D.P. (1994) Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2; fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene*, **9**, 2523-9.
- Pierce, M.M., Raman, C.S. and Nall, B.T. (1999) Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods*, **19**, 213-21.
- Pietenpol, J.A., Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W.S., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1994) Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1998-2002.
- Piette, J., Neel, H. and Marechal, V. (1997) Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene*, **15**, 1001-10.
- Piotto, M., Saudek, V. and Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR*, **2**, 661-5.
- Pirollo, K.F., Bouker, K.B. and Chang, E.H. (2000) Does p53 status influence tumor response to anticancer therapies? *Anticancer Drugs*, **11**, 419-32.
- Plotnikov, V.V., Brandts, J.M., Lin, L.N. and Brandts, J.F. (1997) A new ultrasensitive scanning calorimeter. *Anal Biochem*, **250**, 237-44.
- Pochampally, R., Fodera, B., Chen, L., Lu, W. and Chen, J. (1999) Activation of an MDM2-specific caspase by p53 in the absence of apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 15271-7.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C. and DePinho, R.A. (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*, **92**, 713-23.
- Ponchel, F. and Milner, J. (1998) Temperature sensitivity of human wild-type and mutant p53 proteins expressed in vivo. *Br J Cancer*, **77**, 1555-61.
- Portefaix, J., Thebault, S., Bourgain-Guglielmetti, F., Del Rio, M., Granier, C., Mani, J., Navarro-Teulon, I., Nicolas, M., Soussi, T. and Pau, B. (2000) Critical residues of epitopes recognized by several anti-p53 monoclonal antibodies correspond to key residues of p53 involved in interactions with the mdm2 protein. *J Immunol Methods*, **244**, 17-28.
- Pospisilova, S., Brazda, V., Amrichova, J., Kamermeierova, R., Palecek, E. and Vojtesek, B. (2000) Precise characterisation of monoclonal antibodies to the C-terminal region of p53 protein using the PEPSCAN ELISA technique and a new non-radioactive gel shift assay. *J Immunol Methods*, **237**, 51-64.
- Pozniak, C.D., Radinovic, S., Yang, A., McKeon, F., Kaplan, D.R. and Miller, F.D. (2000) An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*, **289**, 304-6.
- Price, N.C. (2000) Conformational issues in the characterization of proteins. *Biotechnol Appl Biochem*, **31**, 29-40.
- Prives, C. (1994) How loops, beta sheets, and alpha helices help us to understand p53. *Cell*, **78**, 543-6.
- Prives, C. (1998) Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*, **95**, 5-8.
- Prives, C. and Hall, P.A. (1999) The p53 pathway. *J Pathol*, **187**, 112-26.
- Prives, C. and Manley, J.L. (2001) Why is p53 acetylated? *Cell*, **107**, 815-8.
- Pruschy, M., Rocha, S., Zaugg, K., Tenzer, A., Hess, C., Fisher, D.E., Glanzmann, C. and Bodis, S. (2001) Key targets for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis: the role of p53 and caspases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **49**, 561-7.
- Qureshi, S.A., Kim, R.M., Konteatis, Z., Biazzo, D.E., Motamedi, H., Rodrigues, R., Boice, J.A., Calaycay, J.R., Bednarek, M.A., Griffin, P., Gao, Y.D., Chapman, K. and Mark, D.F. (1999) Mimicry of erythropoietin by a nonpeptide molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12156-61.

- Radford, S.E. and Dobson, C.M. (1999) From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding. *Cell*, **97**, 291-8.
- Rainwater, R., Parks, D., Anderson, M.E., Tegtmeyer, P. and Mann, K. (1995) Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol Cell Biol*, **15**, 3892-903.
- Raj, K., Ogston, P. and Beard, P. (2001) Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature*, **412**, 914-7.
- Ramachandran, G.N. and Sasisekharan, V. (1968) Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.*, **23**, 283-437.
- Ratovitski, E.A., Patturajan, M., Hibi, K., Trink, B., Yamaguchi, K. and Sidransky, D. (2001) p53 associates with and targets Delta Np63 into a protein degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1817-22.
- Ravera, M.W., Carcamo, J., Brissette, R., Alam-Moghe, A., Dedova, O., Cheng, W., Hsiao, K.C., Klebanov, D., Shen, H., Tang, P., Blume, A. and Mandeck, W. (1998) Identification of an allosteric binding site on the transcription factor p53 using a phage-displayed peptide library. *Oncogene*, **16**, 1993-9.
- Reed, J.C. (2002) Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Design*, **1**, 111-21.
- Reed, M., Woelker, B., Wang, P., Wang, Y., Anderson, M.E. and Tegtmeyer, P. (1995) The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9455-9.
- Reich, N.C., Oren, M. and Levine, A.J. (1983) Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol*, **3**, 2143-50.
- Renner, C., Baumgartner, R., Noegel, A.A. and Holak, T.A. (1998) Backbone dynamics of the CDK inhibitor p19(INK4d) studied by 15N NMR relaxation experiments at two field strengths. *J Mol Biol*, **283**, 221-9.
- Resnick-Silverman, L., St Clair, S., Maurer, M., Zhao, K. and Manfredi, J.J. (1998) Identification of a novel class of genomic DNA-binding sites suggests a mechanism for selectivity in target gene activation by the tumor suppressor protein p53. *Genes Dev*, **12**, 2102-7.
- Richter, K. and Buchner, J. (2001) Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol*, **188**, 281-90.
- Rippin, T.M., Bykov, V.J.M., Freund, S.M.V., Selivanova, G., Wiman, K. and Fersht, A.R. (2002a) Characterization of the p53-rescue drug CP-31398 in vitro and in living cells. *Oncogene*, **21**, 2119-29.
- Rippin, T.M., Freund, S.M.V. and Fersht, A.R. (2002b) Concerning Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function, Technical comment. *Science*, in Vorbereitung.
- Rippin, T.M., Freund, S.M.V., Veprintsev, D.B. and Fersht, A.R. (2002c) Recognition of DNA by p53 core domain and location of intermolecular contacts of cooperative binding. *J Mol Biol*, **319**, 351-8.
- Roberts, G.C. (2000) Applications of NMR in drug discovery. *Drug Discov Today*, **5**, 230-40.
- Robertson, A.D. and Murphy, K.P. (1997) Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chem Rev*, **97**, 1251-68.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Lane, D.P. and Hay, R.T. (2000) Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, **20**, 8458-67.
- Roemer, K. (1999) Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem*, **380**, 879-87.
- Rojas, M., Donahue, J.P., Tan, Z. and Lin, Y.Z. (1998) Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability. *Nat Biotechnol*, **16**, 370-5.
- Rolley, N., Butcher, S. and Milner, J. (1995) Specific DNA binding by different classes of human p53 mutants. *Oncogene*, **11**, 763-70.
- Rost, B., Sander, C. and Schneider, R. (1994) PHD--an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *Comput Appl Biosci*, **10**, 53-60.
- Roth, J., Dobbelsstein, M., Freedman, D.A., Shenk, T. and Levine, A.J. (1998) Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo J*, **17**, 554-64.
- Rotter, V., Friedman, H., Katz, A., Zerivitz, K. and Wolf, D. (1983) Variation in antigenic determinants of p53 transformation-related protein obtained from various species. *J Immunol*, **131**, 329-33.
- Rudiger, S., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. and Bukau, B. (1997) Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *Embo J*, **16**, 1501-7.
- Rudolph, R. and Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *Faseb J*, **10**, 49-56.
- Rustandi, R.R., Baldisseri, D.M., Drohat, A.C. and Weber, D.J. (1999) Structural changes in the C-terminus of Ca²⁺-bound rat S100B (beta beta) upon binding to a peptide derived from the C-terminal regulatory domain of p53. *Protein Sci*, **8**, 1743-51.
- Rustandi, R.R., Baldisseri, D.M. and Weber, D.J. (2000) Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B(beta beta). *Nat Struct Biol*, **7**, 570-4.
- Rustandi, R.R., Drohat, A.C., Baldisseri, D.M., Wilder, P.T. and Weber, D.J. (1998) The Ca²⁺-dependent interaction of S100B(beta beta) with a peptide derived from p53. *Biochemistry*, **37**, 1951-60.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C. and Vousden, K.H. (2001) Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 332-7.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. and Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, **12**, 2831-41.
- Sakaguchi, K., Saito, S., Higashimoto, Y., Roy, S., Anderson, C.W. and Appella, E. (2000) Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem*, **275**, 9278-83.
- Salamov, A.A. and Solovyev, V.V. (1995) Prediction of protein secondary structure by combining nearest-neighbor algorithms and multiple sequence alignments. *J Mol Biol*, **247**, 11-5.
- Salomoni, P. and Pandolfi, P.P. (2002) The role of PML in tumor suppression. *Cell*, **108**, 165-70.

- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual, 3rd ed., Vols 1-3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Samuels-Lev, Y., O'Connor, D.J., Bergameschi, D., Trigiante, G., Hsieh, J.-K., Zhong, S., Campargue, I., Naumovski, L., Crook, T. and Lu, X. (2001) ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell*, **8**, 781-94.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N.D. and Moll, U.M. (2001) Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. *FEBS Lett*, **488**, 110-15.
- Sasaki, M., Ogata, K., Hatanaka, H. and Nishimura, Y. (2000) Backbone dynamics of the c-Myb DNA-binding domain complexed with a specific DNA. *J Biochem (Tokyo)*, **127**, 945-53.
- Sato, S., Ward, C.L., Krouse, M.E., Wine, J.J. and Kopito, R.R. (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem*, **271**, 635-8.
- Sawyers, C.L. (2002) Rational therapeutic intervention in cancer: kinases as drug targets. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 111-5.
- Scarsi, M., Majeux, N. and Cafilisch, A. (1999) Hydrophobicity at the surface of proteins. *Proteins*, **37**, 565-75.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. and Howley, P.M. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, **75**, 495-505.
- Scheibel, T. and Buchner, J. (1998) The Hsp90 complex--a super-chaperone machine as a novel drug target. *Biochem Pharmacol*, **56**, 675-82.
- Schmale, H. and Bamberger, C. (1997) A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene*, **15**, 1363-7.
- Schmid, F.X. (1997) Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. *Protein structure: A practical approach*, ed. T. Creighton, IRL Press, Oxford, UK, 261-296.
- Schumacher, B., Hofmann, K., Boulton, S. and Gartner, A. (2001) The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr Biol*, **11**, 1722-7.
- Schwarz, E., Lilie, H. and Rudolph, R. (1996) The effect of molecular chaperones on in vivo and in vitro folding processes. *Biol Chem*, **377**, 411-6.
- Schwarze, S.R. and Dowdy, S.F. (2000) In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 45-8.
- Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. and Dowdy, S.F. (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, **285**, 1569-72.
- Schwikowski, B., Uetz, P. and Fields, S. (2000) A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat Biotechnol*, **18**, 1257-61.
- Scopes, R.K. (1999) Protein purification. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sedgwick, S.G. and Smerdon, S.J. (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci*, **24**, 311-6.
- Selivanova, G., Iotsova, V., Kiseleva, E., Strom, M., Bakalkin, G., Grafstrom, R.C. and Wiman, K.G. (1996) The single-stranded DNA end binding site of p53 coincides with the C-terminal regulatory region. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3560-7.
- Selivanova, G., Iotsova, V., Okan, I., Fritsche, M., Strom, M., Groner, B., Grafstrom, R.C. and Wiman, K.G. (1997) Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nat Med*, **3**, 632-8.
- Selivanova, G., Kawasaki, T., Ryabchenko, L. and Wiman, K.G. (1998) Reactivation of mutant p53: a new strategy for cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, **8**, 369-78.
- Selivanova, G., Ryabchenko, L., Jansson, E., Iotsova, V. and Wiman, K.G. (1999) Reactivation of mutant p53 through interaction of a C-terminal peptide with the core domain. *Mol Cell Biol*, **19**, 3395-402.
- Sellers, W.R. and Fisher, D.E. (1999) Apoptosis and cancer drug targeting. *J Clin Invest*, **104**, 1655-61.
- Sengupta, S., Ralhan, R. and Waslyk, B. (2000) Tumour regression in a ligand inducible manner mediated by a chimeric tumour suppressor derived from p53. *Oncogene*, **19**, 337-50.
- Senoo, M., Seki, N., Ohira, M., Sugano, S., Watanabe, M., Inuzuka, S., Okamoto, T., Tachibana, M., Tanaka, T., Shinkai, Y. and Kato, H. (1998) A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73. *Biochem Biophys Res Commun*, **248**, 603-7.
- Senoo, M., Tsuchiya, I., Matsumura, Y., Mori, T., Saito, Y., Kato, H., Okamoto, T. and Habu, S. (2001) Transcriptional dysregulation of the p73L / p63 / p51 / p40 / KET gene in human squamous cell carcinomas: expression of Delta Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *Br J Cancer*, **84**, 1235-41.
- Serrano, M. (1997) The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res*, **237**, 7-13.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D. and DePinho, R.A. (1996) Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*, **85**, 27-37.
- Serrano, M. and Massague, J. (2000) Networks of tumor suppressors. Workshop: tumor suppressor networks. *EMBO Rep*, **1**, 115-9.
- Shair, M.D. (1997) A closer view of an oncoprotein-tumor suppressor interaction. *Chem Biol*, **4**, 791-4.
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R. and Iggo, R. (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene*, **12**, 921-30.
- Sherr, C.J. (1998) Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev*, **12**, 2984-91.
- Sherr, C.J. (2001) The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 731-7.

- Shibata, K., Yoshida, T., Hatanaka, S., Mizukami, T. and Yamasaki, M. (1998) Synthesis and activity of cyclic peptides derived from the C-terminal domain of p53 restoring the function of mutant p53. *Peptide Science*, 301-4.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, **91**, 325-34.
- Shimada, A., Kato, S., Enjo, K., Osada, M., Ikawa, Y., Kohno, K., Obinata, M., Kanamaru, R., Ikawa, S. and Ishioka, C. (1999) The transcriptional activities of p53 and its homologue p51/p63: similarities and differences. *Cancer Res*, **59**, 2781-6.
- Shimizu, H., Burch, L., Smith, A., Dornan, D., Wallace, M., Ball, K.L. and Hupp, T.R. (2002) The conformationally-flexible S9-S10 linker region in the core domain of p53 contains a novel MDM2-binding site whose mutation increases ubiquitination of p53 in vivo. *J Biol Chem*, **279**, 29.
- Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P. and Fesik, S.W. (1996) Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science*, **274**, 1531-4.
- Shvarts, A., Bazuine, M., Dekker, P., Ramos, Y.F., Steegenga, W.T., Merckx, G., van Ham, R.C., van der Houven van Oordt, W., van der Eb, A.J. and Jochemsen, A.G. (1997) Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx. *Genomics*, **43**, 34-42.
- Shvarts, A., Steegenga, W.T., Riteco, N., van Laar, T., Dekker, P., Bazuine, M., van Ham, R.C., van der Houven van Oordt, W., Hateboer, G., van der Eb, A.J. and Jochemsen, A.G. (1996) MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *Embo J*, **15**, 5349-57.
- Sichler, K. (2001) Struktur-Funktionsstudien an rekombinant hergestellten Varianten der Blutgerinnungsenzyme Faktor IXa, Faktor Xa und Faktor VII a. *Dissertation*, Fakultät für Chemie der Technischen Universität München.
- Sigal, A. and Rotter, V. (2000) Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*, **60**, 6788-93.
- Skalski, V., Lin, Z.Y., Choi, B.Y. and Brown, K.R. (2000) Substrate specificity of the p53-associated 3'-5' exonuclease. *Oncogene*, **19**, 3321-9.
- Smart, P., Lane, E.B., Lane, D.P., Midgley, C., Vojtesek, B. and Lain, S. (1999) Effects on normal fibroblasts and neuroblastoma cells of the activation of the p53 response by the nuclear export inhibitor leptomycin B. *Oncogene*, **18**, 7378-86.
- Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
- Smith, M.L. and Fornace, A.J. (2002) Chemotherapeutic targeting of p53. *Cancer Biology and Therapy*, 47-55.
- Snyder, E.L. and Dowdy, S.F. (2001) Protein/peptide transduction domains: potential to deliver large DNA molecules into cells. *Curr Opin Mol Ther*, **3**, 147-52.
- Sodroski, J.G. (1999) HIV-1 entry inhibitors in the side pocket. *Cell*, **99**, 243-6.
- Somasundaram, K. (2000) Tumor suppressor p53: regulation and function. *Front Biosci*, **5**, D424-37.
- Song, J.L. and Chuang, D.T. (2001) Natural osmolyte trimethylamine N-oxide corrects assembly defects of mutant branched-chain alpha-ketoacid decarboxylase in maple syrup urine disease. *J Biol Chem*, **276**, 40241-6.
- Song, S., MacLachlan, T.K., Meng, R.D. and El-Deiry, W.S. (1999) Comparative gene expression profiling in response to p53 in a human lung cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 891-5.
- Soto, C. (2001) Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett*, **498**, 204-7.
- Soto, C., Kacsak, R.J., Saborio, G.P., Aucouturier, P., Wisniewski, T., Prelli, F., Kacsak, R., Mendez, E., Harris, D.A., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, R.I. and Frangione, B. (2000) Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet*, **355**, 192-7.
- Soussi, T. and Beroud, C. (2001) Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature Rev Cancer*, **1**, 233-40.
- Soussi, T., Caron de Fromental, C., Mechali, M., May, P. and Kress, M. (1987) Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. *Oncogene*, **1**, 71-8.
- Soussi, T. and May, P. (1996) Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol*, **260**, 623-37.
- Sreerama, N. and Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem*, **287**, 252-60.
- Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S. and Mak, T.W. (2001) Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, **8**, 317-25.
- Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, F.U. and Pavletich, N.P. (1997) Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell*, **89**, 239-50.
- Steegenga, W.T., van der Eb, A.J. and Jochemsen, A.G. (1996) How phosphorylation regulates the activity of p53. *J Mol Biol*, **263**, 103-13.
- Stenger, J.E., Tegtmeyer, P., Mayr, G.A., Reed, M., Wang, Y., Wang, P., Hough, P.V. and Mastrangelo, I.A. (1994) p53 oligomerization and DNA looping are linked with transcriptional activation. *Embo J*, **13**, 6011-20.
- Stephen, C.W., Helminen, P. and Lane, D.P. (1995) Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol*, **248**, 58-78.

- Stephen, C.W. and Lane, D.P. (1992) Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. *J Mol Biol*, **225**, 577-83.
- Stiewe, T. and Putzer, B.M. (2002) Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ*, **9**, 237-45.
- Stites, W.E. (1997) Protein-Protein Interactions: Interface Structure, Binding Thermodynamics, and Mutational Analysis. *Chem Rev*, **97**, 1233-1250.
- Stoll, R., Renner, C., Hansen, S., Palme, S., Klein, C., Belling, A., Zeslawski, W., Kamionka, M., Rehm, T., Muhlhahn, P., Schumacher, R., Hesse, F., Kaluza, B., Voelter, W., Engh, R.A. and Holak, T.A. (2001) Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53. *Biochemistry*, **40**, 336-44.
- Stoll, R., Renner, C., Muhlhahn, P., Hansen, S., Schumacher, R., Hesse, F., Kaluza, B., Engh, R.A., Voelter, W. and Holo, T.A. (2000) Sequence-specific ¹H, ¹⁵N, and ¹³C assignment of the N-terminal domain of the human oncoprotein MDM2 that binds to p53. *J Biomol NMR*, **17**, 91-2.
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J. and Wahl, G.M. (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J*, **18**, 1660-72.
- Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., Harwood, C., Gardiol, D., Mantovani, F., Breuer, J., Leigh, I.M., Matlashewski, G. and Banks, L. (1998) Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*, **393**, 229-34.
- Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M.G., Monti, O., Baccarini, A., Del Sal, G., Levrero, M., Sacchi, A., Oren, M. and Blandino, G. (2002) Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *J Biol Chem*, **13**, 13.
- Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Cristofanelli, B., Shaul, Y., Castagnoli, L., Levine, A.J., Sacchi, A., Cesareni, G., Oren, M. and Blandino, G. (2000) Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p73. *J Biol Chem*, **275**, 29503-12.
- Strano, S., Rossi, M., Fontemaggi, G., Munarriz, E., Soddu, S., Sacchi, A. and Blandino, G. (2001) From p63 to p53 across p73. *FEBS Lett*, **490**, 163-170.
- Stuber, D., Bannwarth, W., Pink, J.R., Meloen, R.H. and Matile, H. (1990) New B cell epitopes in the Plasmodium falciparum malaria circumsporozoite protein. *Eur J Immunol*, **20**, 819-24.
- Szak, S.T., Mays, D. and Pietenpol, J.A. (2001) Kinetics of p53 binding to promoter sites in vivo. *Mol Cell Biol*, **21**, 3375-86.
- Szak, S.T. and Pietenpol, J.A. (1999) High affinity insertion/deletion lesion binding by p53. Evidence for a role of the p53 central domain. *J Biol Chem*, **274**, 3904-9.
- Tahirov, T.H., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Fujikawa, A., Sato, K., Kumasaka, T., Yamamoto, M. and Ogata, K. (2001) Crystals of ternary protein-DNA complexes composed of DNA-binding domains of c-Myb or v-Myb, C/EBPalpha or C/EBPbeta and tom-1A promoter fragment. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 1655-8.
- Tahirov, T.H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S. and Ogata, K. (2002) Mechanism of c-Myb-C/EBPbeta Cooperation from Separated Sites on a Promoter. *Cell*, **108**, 57-70.
- Takahashi, T., Carbone, D., Nau, M.M., Hida, T., Linnoila, I., Ueda, R. and Minna, J.D. (1992) Wild-type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res*, **52**, 2340-3.
- Takimoto, R., Wang, W., Dicker, D.T., Rastinejad, F., Lyssikatos, J. and S., E.-D.W. (2002) The mutant p53-conformation modifying drug, CP-31398, can induce apoptosis of human cancer cells and can stabilize wild-type p53 protein. *Cancer Biology and Therapy*, 47-55.
- Tan, S. and Richmond, T.J. (1998) Eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 41-8.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y. and Nakamura, Y. (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*, **404**, 42-9.
- Tang, K.S., Guralnick, B.J., Wang, W.K., Fersht, A.R. and Itzhaki, L.S. (1999) Stability and folding of the tumour suppressor protein p16. *J Mol Biol*, **285**, 1869-86.
- Tao, W. and Levine, A.J. (1999) P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6937-41.
- Tarunina, M. and Jenkins, J.R. (1993) Human p53 binds DNA as a protein homodimer but monomeric variants retain full transcription transactivation activity. *Oncogene*, **8**, 3165-73.
- Teixeira, J. (2002) Application of Tat-mediated peptide transduction to dissect cellular pathways. *Diplomarbeit*, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Thanos, C.D. and Bowie, J.U. (1999) p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein Sci*, **8**, 1708-10.
- Thomas, M., Pim, D. and Banks, L. (1999) The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, **18**, 7690-700.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, **22**, 4673-80.
- Thornborrow, E.C. and Manfredi, J.J. (1999) One mechanism for cell type-specific regulation of the bax promoter by the tumor suppressor p53 is dictated by the p53 response element. *J Biol Chem*, **274**, 33747-56.

- Thornborrow, E.C. and Manfredi, J.J. (2001) The tumor suppressor protein p53 requires a cofactor to activate transcriptionally the human BAX promoter. *J Biol Chem*, **276**, 15598-608.
- Thukral, S.K., Chad, G.C., Chang, K.K.H. and Fields, S. (1994) Distinct residues of human p53 implicated in binding to DNA, simian virus 40 large T antigen, 53BP1, and 53BP2. *Mol Cell Biol*, **14**, 8315-21.
- Tomita, A., Towatari, M., Tsuzuki, S., Hayakawa, F., Kosugi, H., Tamai, K., Miyazaki, T., Kinoshita, T. and Saito, H. (2000) c-Myb acetylation at the carboxyl-terminal conserved domain by transcriptional co-activator p300. *Oncogene*, **19**, 444-51.
- Tong, A.H., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G.D., Brannetti, B., Castagnoli, L., Evangelista, M., Ferracuti, S., Nelson, B., Paoluzi, S., Quondam, M., Zucconi, A., Hogue, C.W., Fields, S., Boone, C. and Cesareni, G. (2002) A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science*, **295**, 321-4.
- Trink, B., Okami, K., Wu, L., Sriuranpong, V., Jen, J. and Sidransky, D. (1998) A new human p53 homologue. *Nat Med*, **4**, 747-8.
- Trulson, J.A. and Millhauser, G.L. (1999) The effect of mutations on peptide models of the DNA binding helix of p53: evidence for a correlation between structure and tumorigenesis. *Biopolymers*, **49**, 215-24.
- Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., Hee Park, S., Thompson, T., Karsenty, G., Bradley, A. and Donehower, L.A. (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, **415**, 45-53.
- Tzatsos, A. and Papavassiliou, A.G. (1999) Molecular "rehabilitation" by rational drug targeting: the challenge of P53 in cancer treatment. *Anticancer Res*, **19**, 4353-6.
- Tzung, S.P., Kim, K.M., Basanez, G., Giedt, C.D., Simon, J., Zimmerberg, J., Zhang, K.Y. and Hockenbery, D.M. (2001) Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol*, **3**, 183-91.
- Uesugi, M. and Verdine, G.L. (1999) The alpha-helical FXXPhiPhi motif in p53: TAF interaction and discrimination by MDM2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14801-6.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. and Rothberg, J.M. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-7.
- Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M. and Haupt, Y. (1999) Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *Embo J*, **18**, 1805-14.
- Valdar, W.S.J. and Jones, J.M. (2001) Protein-protein interfaces: Analysis of amino acid conservation in homodimers. *Proteins*, **42**, 108-24.
- van Bokhoven, H. and McKeon, F. (2002) Mutations in the p53 homolog p63: allele-specific developmental syndromes in humans. *Trends Mol Med*, **8**, 133-9.
- Van Craenenbroeck, E. and Engelborghs, Y. (2000) Fluorescence correlation spectroscopy: molecular recognition at the single molecule level. *J Mol Recognit*, **13**, 93-100.
- van Oijen, M.G. and Slootweg, P.J. (2000) Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clin Cancer Res*, **6**, 2138-45.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L. and Weinberg, R.A. (2001) hSIR2(SIRT1) functions as a NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, **107**, 149-59.
- Venot, C., Maratrat, M., Dureau, C., Conseiller, E., Bracco, L. and Debussche, L. (1998) The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *Embo J*, **17**, 4668-79.
- Verhaegh, G.W., Richard, M.J. and Hainaut, P. (1997) Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper. *Mol Cell Biol*, **17**, 5699-706.
- Vocero-Akbani, A., Chellaiah, M.A., Hruska, K.A. and Dowdy, S.F. (2001) Protein transduction: delivery of Tat-GTPase fusion proteins into mammalian cells. *Methods Enzymol*, **332**, 36-49.
- Vocero-Akbani, A., Lissy, N.A. and Dowdy, S.F. (2000) Transduction of full-length Tat fusion proteins directly into mammalian cells: analysis of T cell receptor activation-induced cell death. *Methods Enzymol*, **322**, 508-21.
- Vocero-Akbani, A.M., Heyden, N.V., Lissy, N.A., Ratner, L. and Dowdy, S.F. (1999) Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med*, **5**, 29-33.
- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2001) Achilles' heel of cancer? *Nature*, **412**, 865-6.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-10.
- Vojtesek, B., Bartek, J., Midgley, C.A. and Lane, D.P. (1992) An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods*, **151**, 237-44.
- Vojtesek, B., Dolezalova, H., Lauerovala, L., Svitakova, M., Havlis, P., Kovarik, J., Midgley, C.A. and Lane, D.P. (1995) Conformational changes in p53 analysed using new antibodies to the core DNA binding domain of the protein. *Oncogene*, **10**, 389-93.
- Vojtesek, B., Fisher, C.J., Barnes, D.M. and Lane, D.P. (1993) Comparison between p53 staining in tissue sections and p53 proteins levels measured by an ELISA technique. *Br J Cancer*, **67**, 1254-8.
- Vousden, K.H. (2000) p53. Death star. *Cell*, **103**, 691-4.
- Vousden, K.H. (2002) Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta*, **1602**, 47-59.
- Vousden, K.H. and Woude, G.F. (2000) The ins and outs of p53. *Nat Cell Biol*, **2**, E178-80.

- Wadhwa, R., Sugihara, T., Yoshida, A., Nomura, H., Reddel, R.R., Simpson, R., Maruta, H. and Kaul, S.C. (2000) Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function. *Cancer Res*, **60**, 6818-21.
- Wadhwa, R., Takano, S., Robert, M., Yoshida, A., Nomura, H., Reddel, R.R., Mitsui, Y. and Kaul, S.C. (1998) Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member. *J Biol Chem*, **273**, 29586-91.
- Wadhwa, R., Yaguchi, T., Hasan, M.K., Mitsui, Y., Reddel, R.R. and Kaul, S.C. (2002) Hsp70 Family Member, mot-2/mthsp70/GRP75, Binds to the Cytoplasmic Sequestration Domain of the p53 Protein. *Exp Cell Res*, **274**, 246-53.
- Wadia, J.S. and Dowdy, S.F. (2002) Protein transduction technology. *Curr Opin Biotechnol*, **13**, 52-6.
- Wagener, C. (1999) Molekulare Onkologie. *Thieme*, Stuttgart.
- Wahl, G.M. and Carr, A.M. (2001) The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol*, **3**, E277-86.
- Walker, D.R., Bond, J.P., Tarone, R.E., Harris, C.C., Makalowski, W., Boguski, M.S. and Greenblatt, M.S. (1999) Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. *Oncogene*, **18**, 211-8.
- Walker, K.K. and Levine, A.J. (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15335-40.
- Waltzer, L. and Bienz, M. (1998) Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature*, **395**, 521-5.
- Wang, H., Nan, L., Yu, D., Agrawal, S. and Zhang, R. (2001a) Antisense anti-MDM2 oligonucleotides as a novel therapeutic approach to human breast cancer: in vitro and in vivo activities and mechanisms. *Clin Cancer Res*, **7**, 3613-24.
- Wang, H., Wang, S., Nan, L., Yu, D., Agrawal, S. and Zhang, R. (2002) Antisense anti-MDM2 mixed-backbone oligonucleotides enhance therapeutic efficacy of topoisomerase I inhibitor irinotecan in nude mice bearing human cancer xenografts: In vivo activity and mechanisms. *Int J Oncol*, **20**, 745-52.
- Wang, H., Zeng, X., Oliver, P., Le, L.P., Chen, J., Chen, L., Zhou, W., Agrawal, S. and Zhang, R. (1999) MDM2 oncogene as a target for cancer therapy: An antisense approach. *Int J Oncol*, **15**, 653-60.
- Wang, J.L., Liu, D., Zhang, Z.J., Shan, S., Han, X., Srinivasula, S.M., Croce, C.M., Alnemri, E.S. and Huang, Z. (2000a) Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7124-9.
- Wang, J.L., Zhang, Z.J., Choksi, S., Shan, S., Lu, Z., Croce, C.M., Alnemri, E.S., Korngold, R. and Huang, Z. (2000b) Cell permeable Bcl-2 binding peptides: a chemical approach to apoptosis induction in tumor cells. *Cancer Res*, **60**, 1498-502.
- Wang, L., Wu, Q., Qiu, P., Mirza, A., McGuirk, M., Kirschmeier, P., Greene, J.R., Wang, Y., Pickett, C.B. and Liu, S. (2001b) Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. *J Biol Chem*, **276**, 43604-10.
- Wang, P., Reed, M., Wang, Y., Mayr, G., Stenger, J.E., Anderson, M.E., Schwedes, J.F. and Tegtmeyer, P. (1994) p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol Cell Biol*, **14**, 5182-91.
- Wang, P.L., Sait, F. and Winter, G. (2001c) The 'wildtype' conformation of p53: epitope mapping using hybrid proteins. *Oncogene*, **20**, 2318-24.
- Wang, W.K., Bycroft, M., Foster, N.W., Buckle, A.M., Fersht, A.R. and Chen, Y.W. (2001d) Structure of the C-terminal sterile alpha-motif (SAM) domain of human p73alpha. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 545-51.
- Wang, X., Arooz, T., Siu, W.Y., Chiu, C.H.S., Lau, A., Yamashita, K. and Poon, R.Y.C. (2001e) MDM2 and MDMX can interact differently with ARF and members of the p53 family. *FEBS Lett*, **490**, 202-8.
- Wang, Y., Farmer, G., Soussi, T. and Prives, C. (1995a) Xenopus laevis p53 protein: sequence-specific DNA binding, transcriptional regulation and oligomerization are evolutionarily conserved. *Oncogene*, **10**, 779-84.
- Wang, Y. and Prives, C. (1995) Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature*, **376**, 88-91.
- Wang, Y., Reed, M., Wang, P., Stenger, J.E., Mayr, G., Anderson, M.E., Schwedes, J.F. and Tegtmeyer, P. (1993) p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev*, **7**, 2575-86.
- Wang, Y., Schwedes, J.F., Parks, D., Mann, K. and Tegtmeyer, P. (1995b) Interaction of p53 with its consensus DNA-binding site. *Mol Cell Biol*, **15**, 2157-65.
- Warren, A.J. (2002) Eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 107-14.
- Wasylyk, C., Salvi, R., Argentini, M., Dureuil, C., Delumeau, I., Abecassis, J., Debussche, L. and Wasylyk, B. (1999) p53 mediated death of cells overexpressing MDM2 by an inhibitor of MDM2 interaction with p53. *Oncogene*, **18**, 1921-34.
- Waterman, J.L., Shenk, J.L. and Halazonetis, T.D. (1995) The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *Embo J*, **14**, 512-9.
- Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J. and Bar-Sagi, D. (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol*, **1**, 20-6.
- Weissman, A.M. (2001) Themes and variations on ubiquitinylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 169-78.
- Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L. and Rothbard, J.B. (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13003-8.

- Whitesell, L., Sutphin, P.D., Pulcini, E.J., Martinez, J.D. and Cook, P.H. (1998) The physical association of multiple molecular chaperone proteins with mutant p53 is altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol Cell Biol*, **18**, 1517-24.
- Wieczorek, A.M., Waterman, J.L., Waterman, M.J. and Halazonetis, T.D. (1996) Structure-based rescue of common tumor-derived p53 mutants. *Nat Med*, **2**, 1143-6.
- Wiederschain, D., Gu, J. and Yuan, Z.M. (2001) Evidence for a Distinct Inhibitory Factor in the Regulation of p53 Functional Activity. *J Biol Chem*, **276**, 27999-8005.
- Wiesmuller, L. (2000) The tumor suppressor p53 in the center of a strategy aiming at the alleviation of side effects in cancer therapies. *Angewandte Chemie-International Edition*, **39**, 1768.
- Wills, K.N., Atencio, I.A., Avanzini, J.B., Neuteboom, S., Phelan, A., Philopena, J., Sutjipto, S., Vaillancourt, M.T., Wen, S.F., Ralston, R.O. and Johnson, D.E. (2001) Intratumoral spread and increased efficacy of a p53-VP22 fusion protein expressed by a recombinant adenovirus. *J Virol*, **75**, 8733-41.
- Wiman, K. and Selivanova, G. (1999) Inhibition of p53 function by a p53-derived substance. *Patentschrift*, PCT/SE99/00807 beruhend auf WO99/58566.
- Wiman, K.G. (1997) p53: emergency brake and target for cancer therapy. *Exp Cell Res*, **237**, 14-8.
- Wiman, K.G. (1998) New p53-based anti-cancer therapeutic strategies. *Med Oncol*, **15**, 222-8.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. and Lin, L.N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem*, **179**, 131-7.
- Wollacott, A.M. and Desjarlais, J.R. (2001) Virtual interaction profiles of proteins. *J Mol Biol*, **313**, 317-42.
- Wolkowicz, R., Peled, A., Elkind, N.B. and Rotter, V. (1998) DNA-binding activity of wild-type p53 protein is mediated by the central part of the molecule and controlled by its C terminus. *Cancer Detect Prev*, **22**, 1-13.
- Wolkowicz, R. and Rotter, V. (1997) The DNA binding regulatory domain of p53: see the C. *Pathol Biol (Paris)*, **45**, 785-96.
- Wong, K.B., DeDecker, B.S., Freund, S.M., Proctor, M.R., Bycroft, M. and Fersht, A.R. (1999) Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8438-42.
- Woods, D.B. and Vousden, K.H. (2001) Regulation of p53 function. *Exp Cell Res*, **264**, 56-66.
- Workman, P. and Kaye, S.B. (2002) Translating basic cancer research into new cancer therapeutics. *Trends Mol Med*, **8**, S1-9.
- Workman, P. and Maloney, A. (2002) Hsp90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther*, **2**, 3-24.
- Wright, J.D., Noskov, S.Y. and Lim, C. (2002) Factors governing loss and rescue of DNA binding upon single and double mutations in the p53 core domain. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1563-74.
- Wright, P.E. and Dyson, H.J. (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure- function paradigm. *J Mol Biol*, **293**, 321-31.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. and Levine, A.J. (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, **7**, 1126-32.
- Xirodimas, D., Saville, M.K., Edling, C., Lane, D.P. and Lain, S. (2001) Different effects of p14ARF on the levels of ubiquitinated p53 and Mdm2 in vivo. *Oncogene*, **20**, 4972-83.
- Xirodimas, D.P. and Lane, D.P. (1999) Molecular evolution of the thermosensitive PAb1620 epitope of human p53 by DNA shuffling. *J Biol Chem*, **274**, 28042-9.
- Yakovleva, T., Pramanik, A., Kawasaki, T., Tan-No, K., Gileva, I., Lindegren, H., Langel, U., Ekstrom, T.J., Rigler, R., Terenius, L. and Bakalkin, G. (2001) p53 Latency. C-terminal domain prevents binding of p53 core to target but not to nonspecific DNA sequences. *J Biol Chem*, **276**, 15650-8.
- Yamane, K., Katayama, E. and Tsuruo, T. (2001) p53 contains a DNA break-binding motif similar to the functional part of BRCT-related region of Rb. *Oncogene*, **20**, 2859-67.
- Yang, A., Kaghad, M., Caput, D. and McKeon, F. (2002) On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet*, **18**, 90-5.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. and McKeon, F. (1998) p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, **2**, 305-16.
- Yang, A. and McKeon, F. (2000) P63 and P73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 199-207.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. and McKeon, F. (1999a) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, **398**, 714-8.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F. and Caput, D. (2000) p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, **404**, 99-103.
- Yang, D.S., Yip, C.M., Huang, T.H., Chakrabarty, A. and Fraser, P.E. (1999b) Manipulating the amyloid-beta aggregation pathway with chemical chaperones. *J Biol Chem*, **274**, 32970-4.
- Yap, D.B., Hsieh, J.K., Chan, F.S. and Lu, X. (1999) mdm2: a bridge over the two tumour suppressors, p53 and Rb. *Oncogene*, **18**, 7681-9.
- Yolcu, E., Sayan, B.S., Yagci, T., Cetin-Atalay, R., Soussi, T., Yurdusev, N. and Ozturk, M. (2001) A monoclonal antibody against DNA binding helix of p53 protein. *Oncogene*, **20**, 1398-401.

- Yonish-Rouach, E. (1996) The p53 tumour suppressor gene: a mediator of a G1 growth arrest and of apoptosis. *Experientia*, **52**, 1001-7.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*, **7**, 673-82.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Rago, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1999) Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14517-22.
- Yu, J.L., Rak, J.W., Coomber, B.L., Hicklin, D.J. and Kerbel, R.S. (2002) Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science*, **295**, 1526-8.
- Yu, Z.K., Geyer, R.K. and Maki, C.G. (2000) MDM2-dependent ubiquitination of nuclear and cytoplasmic P53. *Oncogene*, **19**, 5892-7.
- Zamore, P.D. (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol*, **8**, 746-50.
- Zauberman, A., Lupo, A. and Oren, M. (1995) Identification of p53 target genes through immune selection of genomic DNA: the cyclin G gene contains two distinct p53 binding sites. *Oncogene*, **10**, 2361-6.
- Zeeb, M., Rosner, H., Zeslawski, W., Canet, D., Holak, T.A. and Balbach, J. (2002) Protein folding and stability of human CDK inhibitor p19(INK4d). *J Mol Biol*, **315**, 447-57.
- Zehbe, I., Voglino, G., Wilander, E., Genta, F. and Tommasino, M. (1999) Codon 72 polymorphism of p53 and its association with cervical cancer. *Lancet*, **354**, 218-9.
- Zeimet, A.G., Riha, K., Berger, J., Widschwendter, M., Hermann, M., Daxenbichler, G. and Marth, C. (2000) New insights into p53 regulation and gene therapy for cancer. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1153-63.
- ZeZula, J., Casaccia-Bonnel, P., Ezhevsky, S.A., Osterhout, D.J., Levine, J.M., Dowdy, S.F., Chao, M.V. and Koff, A. (2001) p21cip1 is required for the differentiation of oligodendrocytes independently of cell cycle withdrawal. *EMBO Rep*, **2**, 27-34.
- Zhang and Wang, H. (2000) MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy. *Curr Pharm Des*, **6**, 393-416.
- Zhang, B., Salituro, G., Szalkowski, D., Li, Z., Zhang, Y., Royo, I., Vilella, D., Diez, M.T., Pelaez, F., Ruby, C., Kendall, R.L., Mao, X., Griffin, P., Calaycay, J., Zierath, J.R., Heck, J.V., Smith, R.G. and Moller, D.E. (1999) Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*, **284**, 974-7.
- Zhang, Y. and Xiong, Y. (2001) Control of p53 Ubiquitination and Nuclear Export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ*, **12**, 175-186.
- Zhang, Y., Xiong, Y. and Yarbrough, W.G. (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, **92**, 725-34.
- Zhao, J., Wang, M., Chen, J., Luo, A., Wang, X., Wu, M., Yin, D. and Liu, Z. (2002) The initial evaluation of non-peptidic small-molecule HDM2 inhibitors based on p53-HDM2 complex structure. *Cancer Letters*, im Druck.
- Zhao, K., Chai, X., Johnston, K., Clements, A. and Marmorstein, R. (2001) Crystal Structure of the Mouse p53 Core DNA-binding Domain at 2.7 Å Resolution. *J Biol Chem*, **276**, 12120-12127.
- Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W.H., Tom, E., Mack, D.H. and Levine, A.J. (2000) Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev*, **14**, 981-93.
- Zhou, B.B. and Elledge, S.J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, **408**, 433-9.
- Zhou, X., Wang, X.W., Xu, L., Hagiwara, K., Nagashima, M., Wolkowicz, R., Zurer, I., Rotter, V. and Harris, C.C. (1999) COOH-terminal domain of p53 modulates p53-mediated transcriptional transactivation, cell growth, and apoptosis. *Cancer Res*, **59**, 843-8.
- Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., Mitchell, T., Miller, P., Dean, R.A., Gerstein, M. and Snyder, M. (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, **293**, 2101-5.
- Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W. and Chen, X. (1998) The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res*, **58**, 5061-5.
- Zotchev, S.B., Protopopova, M. and Selivanova, G. (2000) p53 C-terminal interaction with DNA ends and gaps has opposing effect on specific DNA binding by the core. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4005-12.
- Zuiderweg, E.R. (2002) Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **41**, 1-7.
- Zulauf, M. and D'Arcy, A. (1992) Light scattering of proteins as a criterion for crystallization. *J. Cryst. Growth*, **122**, 102-6.
- zur Hausen, H. (1998) Papillomavirus and p53. *Nature*, **393**, 217.
- Zylicz, M., King, F.W. and Wawrzynow, A. (2001) Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *Embo J*, **20**, 4634-8.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Geburtsdatum 14.07.1971
Geburtsort Freiburg i. Brsg.
Familienstand Ledig
Staatsangehörigkeit Deutsch

Ausbildung

- 1978-1982 Besuche der Grundschule in Waldshut-Tiengen.
- 08/1982 – Besuch des Klettgau Gymnasiums, Tiengen mit dem Abschluß der
06/1991 Allgemeinen Hochschulreife.
- 07/1991 – Zivildienst am Institut für Medizinische Mikrobiologie und
09/1992 Hygiene, Abt. Immunologie der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Vogt.
- 10/1992 – Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität
10/1997 Tübingen mit den Hauptfächern Biochemie, Organische Chemie
und Immunologie.
- 11/1997 – Diplomarbeit in Biochemie am Max-Planck-Institut für Biologie,
07/1998 Abt. Membranbiochemie, Tübingen unter Anleitung von Herrn
Prof. Dr. P. Overath.
Titel: „Reinigung und Charakterisierung eines neuartigen, von
Leishmania mexicana Promastigoten sekretierten, stadienspezifisch
glykosylierten Proteophosphoglykans.“
- 07/1998 Diplom in Physiologischer Chemie und Biochemie.
- 1994-1998 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes.
- 09/1998 – Promotion in der Pharmaforschung der Roche Diagnostics GmbH,
01/2001 Abt. Molekularbiologie, Penzberg unter Anleitung von Frau Dr. S.
Hansen und am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt.
Strukturforschung, Martinsried unter Anleitung von Herrn Prof. Dr.
Dr. R. Huber.
Titel: *Biochemische und strukturelle Untersuchungen an Proteinen
des p53 Tumorsuppressor-Netzwerks: p53, p63 und MDM2.*
- ab 02/2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter („Post Doc“) in der
Pharmaforschung der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg.

Penzberg, den 24. April 2002