

**Der Einfluss des Redox-Faktors 1
auf den humanen Tumorsuppressor p53**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Sven Hanson

Hamburg

2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. DEPPERT
Weitere Gutachter der Dissertation:
Frau Professor Dr. E. PRATJE

Tag der Disputation: 02. Mai 2003

Hamburg, den 18. April 2003



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Frühwald".

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

»Immer wenn man meint, die Natur im Griff zu haben,
beweist sie einem das Gegenteil«

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Der Tumorsuppressor p53	2
1.1.1 Historischer Rückblick	2
1.1.2 Das p53-Gen und sein Produkt	2
1.1.3 Struktur und Funktion von p53	3
1.1.3.1 Der Aminoterminus von p53	4
1.1.3.2 Die Kerndomäne von p53	5
1.1.3.3 Der Carboxyterminus von p53	6
1.1.4 Modelle zur Regulation der spezifischen Bindung	6
1.1.5 Redoxregulation der spezifischen Bindung	9
1.1.6 Das Homotetramer, die aktive Form von p53	10
1.1.7 Der Signalweg: Funktionen von p53	13
1.1.7.1 p53-vermittelter G ₁ /S-Arrest	13
1.1.7.2 p53-vermittelter G ₂ /M-Arrest	14
1.1.7.3 p53-vermittelte Apoptose	14
1.1.7.4 DNA-Reparatur	15
1.1.7.5 Der Abbauweg von p53	16
1.2 Der Redox-Faktor 1	17
1.2.1 Ref-1: Vom Gen zum Protein	17
1.2.2 Der Carboxyterminus von Ref-1: Struktur und Funktion	18
1.2.3 Der Aminoterminus von Ref-1: Struktur und Funktion	19
1.2.4 Regulation von Ref-1	19
1.2.5 Ref-1 als Aktivator von Transkriptionsfaktoren	20
2 Aufgabenstellung	22
3 Material	24
3.1 Zelllinien	24
3.1.1 Prokaryota	24
3.1.2 Eukaryota	24
3.2 Oligonukleotide	25
3.2.1 PCR-Primer	25
3.2.2 Kompetitoren	25
3.2 Vektoren	26
3.3 Konstrukte	26

3.4 Viren	27
3.5 Nukleinsäure-Substrate	28
3.6 Antikörper	30
3.7 Enzyme und andere Proteine	31
3.8 Chemikalien und andere Materialien	32
4 Methoden	33
4.1 Zellkultur	33
4.1.1 Prokaryotische Zellkultur	33
4.1.1.1 Stammhaltung von Bakterienzellen	33
4.1.1.2 Gewinnung transformationskompetenter Bakterien	33
4.1.1.3 Transformation kompetenter Bakterien	34
4.1.1.4 Expression von rekombinantem Ref-1 in Bakterien	34
4.1.2 Eukaryotische Zellkultur	35
4.1.2.1 Erhaltungskultur von Sf9 und High Five™-Zellen	35
4.1.2.2 Herstellung von hochtiter Baculovirusstocks mit Sf9-Zellen	35
4.1.2.3 Expression von rekombinantem p53 in High Five™-Zellen	35
4.2 Molekularbiologische Methoden	37
4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	37
4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
4.2.3 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	38
4.2.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	39
4.2.5 Herstellung von stumpfen Enden zur <i>blunt-end</i> -Ligation	39
4.2.6 Agarosegelelektrophorese	39
4.2.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
4.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion	41
4.2.9 Ethanolfällung von DNA	41
4.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten	41
4.2.11 Sequenzierung von DNA	42
4.2.12 Herstellung von EMSA-Substraten	43
4.2.12.1 Herstellung der DNA-Substrate	43
4.2.12.2 Herstellung des RNA-Substrats (<i>in vitro</i> - Transkription)	43
4.2.13 Reinigung der EMSA-Substrate	44
4.3 Proteinbiochemische Methoden	45
4.3.1 Proteinreinigungsverfahren	45
4.3.1.1 FPLC-Reinigung von rekombinantem p53 über Heparin-Sepharose	45
4.3.1.2 Reinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomüberständen	45

4.3.1.3 Kopplung des gereinigten Antikörpers an Bromcyan-aktivierte Sepharose	46
4.3.1.4 Immunaффinitätschromatographie von rekombinantem p53	46
4.3.1.5 Metallaffinitätschromatographie von rekombinantem Ref-1	47
4.3.2 Dialyse	47
4.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	48
4.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	48
4.3.5 Native Polyacrylamidgelelektrophorese	49
4.3.6 Coomassie Brillant Blau Proteinfärbung	50
4.3.7 Western Blot und Immunodetektion	50
4.3.8 Färbung mit Ponceau S Rot	51
4.3.9 <i>Elektrophoresis-Mobility-Shift-Assay</i> (EMSA)	51
4.3.10 Densitometrische Vermessung radioaktiver Banden	52
4.3.11 Kreuzvernetzung von Proteinen durch Diamid	52
5 Ergebnisse	53
5.1 Die Proteine	53
5.1.1 Rekombinanter humaner Redox-Faktor 1	53
5.1.1.1 Klonierung	53
5.1.1.2 Reinigung	54
5.1.2 Rekombinantes humanes p53	55
5.1.3 Dialyse zur Vermeidung oxidativer Schäden	56
5.2 Der Einfluss von pAb421 bzw. DTT auf die p53-Nukleinsäurebindung	57
5.2.1 Der Einfluss von pAb421 bzw. DTT auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53	58
5.2.2 Der Einfluss von pAb421 bzw. DTT auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53	61
5.2.3 Der Einfluss von pAb421 bzw. DTT auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53	63
5.3 Der Einfluss von Ref-1 auf die p53-Nukleinsäurebindung	66
5.3.1 Der Einfluss von Ref-1 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53	66
5.3.2 Der Einfluss von Ref-1 auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53	70
5.3.3 Der Einfluss von Ref-1 auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53	73
5.4 Der Einfluss von Ref-1 auf die Quartärstruktur von p53	77
5.4.1 Der Einfluss von Ref-1 auf p53-Oligomere und Multimere	77
5.4.2 Der Einfluss von Ref-1 auf das p53-Protein	79
5.4.3 Der Einfluss von Ref-1 auf die Bildung des p53-Homotetramers	81
5.5 Redox-Abhängigkeit der Tetramerisierung von p53	84
5.6 Redox-Abhängigkeit der Überführung von p53-Multimeren in das p53-Tetramer	87
5.6.1 Die Bildung von p53-Multimeren durch oxidative Schäden als Folge der Lagerung	87
5.6.2 Redox-Abhängigkeit der Ref-1-vermittelten Entstapelung von p53 zum Tetramer	89

5.7 Die Aktivierung von p53 durch Ref-1 erfolgt durch drei unterschiedliche Prozesse	92
5.8 Lokalisation des p53-aktivierenden Einflusses auf dem Ref-1-Protein	94
5.8.1 Vergleich des Einflusses der Ref-1-Redox-Regulations- und Reparaturdomäne auf p53	95
5.8.2 Aktivierung von p53 durch die Ref-1-Redox-Regulationsdomäne	96
6 Diskussion	99
6.1 Die Ref-1-vermittelte Redoxregulation von p53	99
6.2 Die Ref-1-vermittelte Reparatur oxidativer Schäden des p53-Proteins	105
6.3 Ref-1 als Aktivator des Transkriptionsfaktors p53	105
6.4 Die Ref-1-vermittelte Stabilisierung des p53-Tetramers	107
6.5 Die Rolle von p53 und Ref-1 in der Basen-Exzisionsreparatur	109
7 Zusammenfassung	113
8 Literatur	115
Abkürzungsverzeichnis	V
Danksagung	VIII

1 Einleitung

Die Phylogenese setzte schon auf der Ebene der Protista eine kontrollierte Zellteilung voraus. Die Entwicklung zur Vielzelligkeit führte neben der Differenzierung der Zellen zur Arbeitsteilung auch erstmalig zum physiologischen Tod der Zellen. Teilung, Differenzierung und Tod werden, abhängig von Funktion und Differenzierungsgrad, über Wechselwirkungen der Zellen untereinander und über den Zellzyklus der Einzelzelle geregelt. Das koordinierte Wachstum von Zellen innerhalb eines Verbandes wird hauptsächlich durch zwei Klassen von Genen kontrolliert:

Proto-Onkogene (griechisch, *oncos*: Geschwulst) kodieren für stimulierend wirkende Signale wie z.B. Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, für zytoplasmatische Mediatoren und Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren kommen auch in der Gruppe der Tumorsuppressoren (lateinisch, *tumor*: Geschwulst) vor. Im Gegensatz zu den Produkten der Proto-Onkogene beschreibt diese Gruppe inhibitorisch wirkende Proteine, die in allen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sein können. Ein solcher Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor ist das Protein p53. Normalerweise ist die Mutation eines Allels eines Tumorsuppressor-Gens und der damit einhergehende Funktionsverlust des Proteins rezessiv, da er durch die Funktion des anderen Allels und dem von diesem kodierten funktionellen Protein komplementiert werden kann. Mutieren jedoch beide Allele eines Tumorsuppressor-Gens, kann sich der rezessive Funktionsverlust manifestieren.

Durch einen mehrstufigen Prozess können sich im Verlauf der Ontogenese somatische Mutationen in verschiedenen Genen akkumulieren, die zur Entstehung eines Tumors führen (Bishop, 1991; Fearon & Vogelstein, 1990; Vogelstein & Kinzler, 1993; Weinberg, 1989). Hierbei entzieht sich die Zelle dem koordinierten Wachstum des Verbandes und proliferiert unkontrolliert. In mehr als der Hälfte aller menschlichen Tumore ist das Tumorsuppressor-Protein p53 mutiert (Harris & Hollstein, 1993; Hollstein et al., 1991; Soussi et al., 1994; Vogelstein & Kinzler, 1992).

1.1 *Der Tumorsuppressor p53*

1.1.1 *Historischer Rückblick*

p53 wurde 1979 als ein Protein entdeckt, das in Simian Virus 40 infizierten Zellen einen Komplex mit dem großen Tumor-Antigen des Virus bildet (Chang *et al.*, 1979; Kress *et al.*, 1979; Lane & Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979). Das Protein wurde anfangs als Onkogen eingestuft, da es in der Lage war, Zellen zu immortalisieren (Jenkins *et al.*, 1984) oder diese in Kooperation mit aktivierten Onkogenen vollständig zu transformieren (Eliyahu *et al.*, 1984; Parada *et al.*, 1984). Nach der Klonierung der p53 cDNA im Jahre 1985 durch Zakut-Houri *et al.* stellte sich jedoch heraus, dass die bisherigen Versuche, die zur Einstufung als Proto-Onkogen führten, mit einer onkogenen Mutante von p53 durchgeführt worden waren. Wildtyp p53 war statt dessen in der Lage, die Transformation von Zellen durch andere Onkogene zu hemmen (Finlay *et al.*, 1989; Hinds *et al.*, 1989), das Wachstum bereits transformierter Zellen zu inhibieren (Baker *et al.*, 1990; Diller *et al.*, 1990) und das unkontrollierte Wachstum von neoplastischen Zellen zu unterdrücken (Chen *et al.*, 1990; Shaulsky *et al.*, 1991). Diese Eigenschaften führten zu der Einstufung des p53 Proteins als Tumorsuppressor.

1.1.2 *Das p53-Gen und sein Produkt*

Das Gen des Tumorsuppressors p53 ist beim Menschen auf der terminalen Bande des kurzen Arms des Chromosoms 17 (17p13.105-p12) lokalisiert (Benchimol *et al.* 1985; Isobe *et al.*, 1986; McBride *et al.*, 1985 & 1986; van Tuinen & Ledbetter, 1987). Das Gen umspannt ca. 20kb und besitzt eine Exon/Intron Struktur, die 11 Exons und 10 Introns beinhaltet (Bienz *et al.*, 1984). Es weist in der regulatorischen Region zwei Promotoren auf, wobei der eine 100 bis 250bp stromaufwärts des ersten nicht-codierenden Exons lokalisiert ist, während der andere innerhalb des ersten Introns liegt (Reisman *et al.*, 1988). Die mRNA von p53 besitzt je nach Spezies eine Länge von 1,8kb bis 3,0kb (Soussi *et al.*, 1990). Strukturanalysen ergaben bei der murinen mRNA eine im 5'-untranslatierten Bereich gelegene Haarnadel-Struktur (Bienz *et al.*, 1984), die jedoch bei der humanen mRNA fehlt (Fu *et al.*, 1996). Die Protein-Expression ist in intakten Zellen zyklisch und erreicht in der S-Phase des Zellzyklus ihren Höhepunkt (Mosner & Deppert, 1994). Sie wird zumindest in murinen Zellen zum Teil durch eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife mit dem 5'-UTR der eigenen mRNA kontrol-

liert, an die p53 bindet (Mosner et al. 1995). Die mRNA kodiert beim Menschen für ein Protein mit einer Länge von 393 Aminosäuren (Levine & Momand, 1990). Daraus errechnet sich eine molare Masse von 43,7kDa. Das aberrante Laufverhalten bei 53kDa in der SDS-PAGE, das zur Namensgebung des Proteins führte, beruht auf einer Anhäufung von helixbrechenden Prolinresten im Aminoterminus (Oren, 1985). Das Protein wird in normalen Zellen nur in geringen Mengen von 1.000 bis 10.000 Molekülen pro Zelle exprimiert (Oren *et al.*, 1981; Patschinsky & Deppert, 1990) und besitzt eine Halbwertszeit von 30 bis 50 Minuten (Ashcroft & Vousden, 1999).

1.1.3 *Struktur und Funktion von p53*

Vergleiche zwischen den p53-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies wiesen fünf konservierte Regionen innerhalb des Proteins auf (Soussi *et al.*, 1990; Soussi & May, 1996). Diese Regionen werden mit römischen Ziffern als Domänen I bis V bezeichnet und sind entscheidend für unterschiedliche Funktionen von p53 (Soussi & May, 1996).

Das Protein wird in drei Domänen gegliedert: Der Aminoterminus enthält die transkriptionelle Aktivator-domäne. In der Kerndomäne ist die sequenzspezifische DNA-Bindung lokalisiert. Die Kerndomäne bindet zusammen mit dem Carboxyterminus strukturspezifisch DNA und RNA. Der Carboxyterminus beinhaltet die Oligomerisierungsdomäne, die eine Assemblierung von p53 zum Tetramer bewirkt und die regulatorische Domäne des Proteins, die zusammen mit der Kerndomäne an der Nukleinsäurebindung beteiligt ist. Die konservierte Domäne I liegt innerhalb des Aminoterminus, die anderen konservierten Domänen II bis V innerhalb der Kerndomäne.

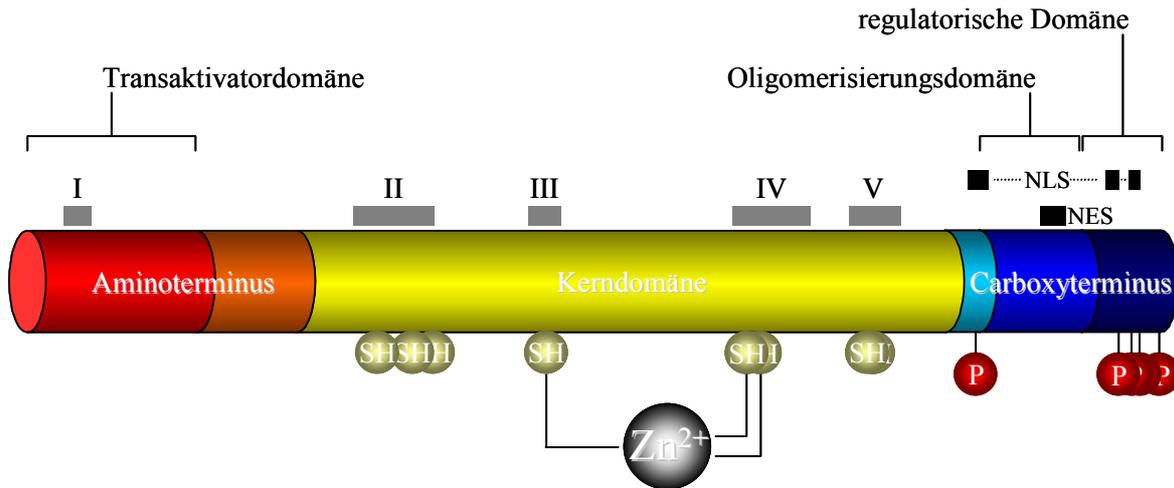


Abb. 1-1 Schematische Darstellung des Tumorsuppressors p53. Rot: Aminoterminus mit der Transaktivierungsdomäne. Gelb: Kerndomäne mit einer Reihe von Cysteinresten, die an den DNA-bindenden Strukturen beteiligt sind. Ein bivalentes Zinkion wird u. a. von drei Cysteinresten komplexiert. Die Cysteinreste sind in den konservierten Regionen des Proteins lokalisiert (graue Balken mit römischen Ziffern). Blau: Carboxyterminus mit der Oligomerisierungsdomäne und der regulatorischen Domäne. Drei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) sind über den Carboxyterminus verteilt. Ein nukleäres Exportsignal (NES) ist in der Oligomerisierungsdomäne lokalisiert. Die Phosphorylierung des Carboxyterminus beeinflusst die Oligomerisierung und die Nukleinsäurebindung von p53. (Abbildung verändert nach Bargonetti & Manfredi, 2002; May & May, 1999; Rainwater *et al.*, 1995).

1.1.3.1 Der Aminoterminus von p53

Der saure Aminoterminus beinhaltet die transkriptionelle Aktivator-domäne (Aminosäurereste: 1-42) zur Transaktivierung bestimmter Zielgene (Fields & Jang, 1990; Unger *et al.*, 1992). Ebenso befindet sich dort eine prolinreiche Region (Aminosäurereste: 63-97) mit fünf Wiederholungen des SH3-Bindungsmotivs PXXP, das für die p53 vermittelte Apoptose benötigt wird (Sakamuro *et al.*, 1997) und mit Elementen aus der Signaltransduktion interagiert (Venot *et al.*, 1998). Der Aminoterminus tritt mit Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie in Wechselwirkung (Lu & Levine, 1995; Thut *et al.*, 1995) und ist Bindungsstelle für das zelluläre Proto-Onkoprotein Mdm2 (*murine double minute 2*) (Momand *et al.*, 1992; Otto & Depert, 1993).

1.1.3.2 Die Kerndomäne von p53

Das Protein besitzt eine Proteolyse-resistente Kerndomäne aus überwiegend hydrophoben Resten der Aminosäuren 102 bis 292 (Bargonetti *et al.*, 1993; Donehower & Bradley, 1993). Sie dient der spezifischen Bindung von DNA an eine Konsensussequenz in der Promotorregion von Zielgenen (el-Deiry *et al.*, 1992).

Röntgenstrukturanalysen haben ergeben, dass die Kerndomäne sich in zwei Schichten antiparalleler β -Faltblätter mit vier und fünf Strängen faltet, die ein Gerüst für zwei große Schleifen und ein *Loop-Sheet-Helix*-Motiv bilden. Die zwei Schleifen, die durch ein tetraedrisch koordiniertes Zinkion zusammengehalten werden, bilden mit dem *Loop-Sheet-Helix*-Motiv die DNA-bindende Oberfläche von p53. Aminosäurereste des *Loop-Sheet-Helix*-Motivs interagieren mit der großen Furche der DNA. Ein Aminosäurerest aus einer der großen Schleifen bindet in der kleinen Furche, die andere Schleife stabilisiert die DNA-bindende Schleife (Cho *et al.*, 1994).

Die Kerndomäne ist der Ort der sequenzspezifischen DNA-Bindung an die p53-Konsensussequenz (el-Deiry *et al.*, 1992; Funk *et al.*, 1992). Darüber hinaus bindet die p53 Kerndomäne strukturspezifisch zusammen mit dem Carboxyterminus an DNA der p53-Konsensussequenz (Göhler *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 1997 & 1999) und an die Haarnadelschleife im 5'-UTR der murinen p53 mRNA. Dies bewirkt eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife in der p53-Expression (Bauer, 1999; Mosner *et al.*, 1995). Neben der spezifischen Nukleinsäurebindung bindet die Kerndomäne auch in Verbindung mit dem Carboxyterminus an interne Segmente langer unspezifischer einzel- und doppelsträngiger DNA (Bakalkin *et al.*, 1995; Yakovleva *et al.*, 2001), sowie superhelikale DNA (Palecek *et al.*, 2001). Die Kerndomäne besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die durch den Carboxyterminus reguliert wird (Janus *et al.*, 1999; Mummenbrauer *et al.*, 1996). Verschiedene Modelle zur Korrekturlesefunktion sind vorgeschlagen worden (Bakhanashvili, 2001; Huang, 1998; Melle & Nasheuer, 2002), die biologische Bedeutung der Exonukleaseaktivität ist jedoch noch unklar. Die Kerndomäne vermittelt auch Interaktionen zu anderen Proteinen, wie dem großen Tumor-Antigen des Simian Virus 40, das zur Entdeckung von p53 geführt hat. Andere zelluläre Proteine treten ebenfalls mit der Kerndomäne in Wechselwirkung (Gorina & Pavletich, 1996; Iwabuchi *et al.*, 1994; Jenkins *et al.*, 1988; Ruppert & Stillman, 1993).

Die Bedeutung der Kerndomäne für die Funktion von p53 wird bei der Analyse von mutiertem p53 in humanen Tumoren klar. In über 90% der in diesen Tumoren vorkommenden Veränderungen von p53 finden sich Deletionen und *Missense*-Mutationen im Bereich der DNA-

bindenden Strukturen (Levine *et al.*, 1994). Diese entsprechen den phylogenetisch konservierten Regionen von p53 (Cho *et al.*, 1994; Soussi *et al.*, 1990).

1.1.3.3 *Der Carboxyterminus von p53*

Der Carboxyterminus besteht aus einer flexiblen Region (Aminosäurereste: 300-318), die die Kerndomäne mit dem Carboxyterminus verbindet, einer Oligomerisierungsdomäne (Aminosäurereste: 323-356) (Clore *et al.*, 1994; Jeffrey *et al.*, 1995; Kraiss *et al.*, 1988) und der regulatorischen Domäne (Aminosäurereste: 363-393) (Halazonetis *et al.*, 1993; Hupp *et al.*, 1992). Drei nukleäre Lokalisationssignale (NLS, *nuclear localization signal*) konnten in der carboxyterminalen Region identifiziert werden. Eine Mutation im NLS1 (Aminosäurereste: 316-325) bewirkt eine vollständig zytoplasmatische Lokalisation, während Mutationen in NLS2 (Aminosäurereste: 369-375) und NLS3 (Aminosäurereste: 379-384) zu einer Verteilung von p53 auf das Zytoplasma und den Kern führen (Dang & Lee, 1989; Shaulsky *et al.*, 1990). Innerhalb der Oligomerisierungsdomäne befindet sich ein hydrophobes Leucin-reiches nukleäres Exportsignal (NES, *nuclear export signal*), das die Aminosäuren 340 bis 351 umfasst (Stommel *et al.*, 1999).

Der unmodifizierte Carboxyterminus bindet unspezifisch an einzel- und doppelsträngige, sowie an geschädigte DNA (Bakalkin *et al.*, 1994; Bayle *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1993) und RNA (Oberosler *et al.*, 1993) und besitzt eine Hybridisierungsaktivität für komplementäre Einzelstränge von DNA oder RNA (Bakalkin *et al.*, 1995; Brain & Jenkins, 1994; Wu *et al.*, 1995). Die Kerndomäne ist an der unspezifischen und strukturspezifischen Nukleinsäurebindung des Carboxyterminus beteiligt (Kapitel 1.1.3.2 & 1.1.4).

1.1.4 *Modelle zur Regulation der spezifischen Bindung*

p53 bindet spezifisch an eine Ziel-DNA mit der Konsensussequenz zweier sich wiederholender Dekamere: 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' (Pu: Purinbase, Py: Pyrimidinbase), zwischen denen ein Abstand von 0 bis 13 Basenpaaren besteht (el-Deiry *et al.*, 1992; Funk *et al.*, 1992). Die p53-Kerndomäne bindet primär die pentamere Halbseite eines Dekamers der Kon-

sensussequenz (Cho *et al.*, 1994). *In vivo* treten in den meisten Fällen Abweichungen von der idealisierten Konsensussequenz bei p53-Zielgenen auf (Kim *et al.*, 1997; Göhler *et al.*, 2002). Die Transaktivierung dieser p53-spezifischen Zielgene führt zum Zellzyklus-Arrest in G₁/S oder G₂/M oder zum Tod der Zelle durch Apoptose (Kapitel 1.1.7). Um eine kontrollierte Proliferation der Zellen zu ermöglichen, muss die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor streng kontrolliert werden. Es hat sich *in vitro* sowie *in vivo* gezeigt, dass die Phosphorylierung des Carboxyterminus durch verschiedene Kinasen die spezifische Bindung der Kerndomäne moduliert.

Der Serinrest 315 wird durch Zyklin-abhängige Kinasen (CDK) phosphoryliert (Blaydes *et al.*, 2001), der Serinrest 392 durch Kasein Kinase II (CKII) (Herrmann *et al.*, 1991; Hupp *et al.*, 1992 & 1993). Für diese Kinasen konnte nachgewiesen werden, dass sie die transkriptionelle Aktivität von p53 aktivieren. Die sequenzspezifische DNA-Bindung wird durch die Phosphorylierung der Serinreste 371, 376 und 378 durch die Proteinkinase C (PKC) stimuliert (Delphin & Baudier, 1994; Hupp & Lane, 1994; Takenaka *et al.*, 1995). Die Phosphorylierungsstellen der PKC entsprechen dem Epitop des monoklonalen Antikörpers pAb421 (Aminosäurereste: 371-380), dessen Bindung ebenfalls aktivierend auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 wirkt (Mundt *et al.*, 1997; Ullrich *et al.*, 1992).

Dies führte zu der Vorstellung, dass der Carboxyterminus in der unmodifizierten Form einen negativen Einfluss auf die sequenzspezifische DNA-Bindung der Kerndomäne ausübt. Unterstützt wird diese Theorie durch eine Aktivierung der sequenzspezifischen DNA-Bindung nach Deletion der regulatorischen Domäne (Hupp *et al.*, 1992). Eine veränderte Sequenz des p53-Carboxyterminus kommt natürlicherweise in einer alternativ gespleissten Form von murinem p53 vor, die ebenfalls eine verstärkte sequenzspezifische DNA-Bindung aufweist (Wolkowicz *et al.*, 1998).

Derzeit existieren drei Modelle, die die Regulation der spezifischen Bindung von p53 erklären sollen:

Das Modell der allosterischen Regulation beschreibt das carboxyterminal unmodifizierte p53 als ein für sequenzspezifische DNA-Bindung latentes Protein. Der Carboxyterminus blockiert durch Assoziation mit der Kerndomäne und der Prolin-reichen Region des Aminoterminus die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53. Durch carboxyterminale Modifikation wird eine Konformationsänderung induziert, die zur Freigabe der Kerndomäne führt und das latente p53 in ein für sequenzspezifische DNA-Bindung aktives Protein umwandelt (Halazonetis & Kandil, 1993; Hupp *et al.*, 1995; Hupp & Lane, 1994; Muller-Tiemann *et al.*, 1998).

Es wurde jedoch gezeigt, dass sich weder die Kerndomänen von latentem und aktivem p53 in ihren Konformationen unterscheiden, noch dass die regulatorische Domäne des Carboxyterminus mit einer anderen Domäne des Proteins interagiert (Ayed *et al.*, 2001).

Nach dem Modell der kompetitiven Regulation konkurriert die nicht-sequenzspezifische DNA-Bindung des Carboxyterminus mit der sequenzspezifischen DNA-Bindung der Kerndomäne (Anderson *et al.*, 1997). Der Carboxyterminus bindet bevorzugt an strukturelle Besonderheiten der DNA wie freie Enden (Selivanova *et al.*, 1996), Distorsionen (Lee *et al.*, 1995) und Modifikationen, wie sie durch γ -Strahlung verursacht werden (Reed *et al.*, 1995). Wird DNA über den p53-Carboxyterminus gebunden, ist die sequenzspezifische DNA-Bindung durch die Kerndomäne sterisch gehindert. Eine Modifikation des Carboxyterminus senkt dessen Affinität für DNA. p53 kann deshalb sequenzspezifisch an DNA binden (Anderson *et al.*, 1997).

Das Modell der Konformations-selektiven Bindung bezieht neben der posttranslationalen Modifikation von p53 auch die Konformation der gebundenen DNA mit ein.

Strukturelle Veränderungen des Chromatins sind eine Folge der DNA-Replikation oder Transkription. Solche Prozesse bewirken eine lokale Separation von DNA-Strängen und führen damit zur Bildung von Sekundärstrukturen in der DNA (Pearson *et al.*, 1996; van Holde & Zlatanova, 1994; Ward *et al.*, 1990).

p53 interagiert mit verschiedenen, die DNA-Topologie verändernden Proteinen wie HMG1 (*high mobility group*), Topoisomerase I und anderen Chromatin-verändernden Proteinen. HMG1 bindet kreuzförmige DNA und stimuliert *in vitro* die spezifische Bindung von p53 an die p53-Konsensussequenz durch Beugung der p53-Konsensussequenz (Cowell *et al.*, 2000; Gobert *et al.*, 1999; Jayaraman *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001).

DNA der p53-Konsensussequenz mit kreuzförmiger oder gebeugter Struktur wird sowohl von der Kerndomäne als auch von der regulatorischen Domäne gebunden. Kurze DNA-Abschnitte der p53-Konsensussequenz in linearer Konformation werden ausschließlich von der p53-Kerndomäne gebunden (Göhler *et al.*, 2002; McKinney & Prives, 2002; Yakovleva *et al.*, 2002).

Wird die Interaktion der DNA mit der regulatorischen Domäne von p53 verhindert, führt das zu einer Inhibition der spezifischen Bindung an nicht-lineare DNA-Strukturen und die p53-Kerndomäne bindet ausschließlich sequenzspezifisch an DNA mit linearer Struktur (Göhler *et al.*, 2002; McKinney & Prives, 2002; Yakovleva *et al.*, 2002).

Die Bindung von DNA an die regulatorische Domäne von p53 kann zum einen durch Phosphorylierung aufgrund der Zunahme negativer Ladung oder einfach durch sterische Hinderung, beispielsweise durch die Bindung des monoklonalen Antikörpers pAb421 an die regulatorische Domäne, verhindert werden (Göhler *et al.*, 2002; Yakovleva *et al.*, 2002).

Wird die Interaktion der regulatorischen Domäne von p53 mit DNA verhindert, führt das *in vitro* nicht nur zur Inhibition der spezifischen Bindung von p53 an die p53-Konsensussequenz mit nicht-linearer Struktur, sondern auch *in vivo* zu einer Inhibition der spezifischen Bindung von p53 an die p53-Konsensussequenz in assembliertem Chromatin (Kim *et al.*, 1997; Göhler *et al.*, 2002; McKinney & Prives, 2002; Espinosa & Emerson, 2001).

Die p53-Konsensussequenz scheint zwar die Spezifität der p53-Bindung zu determinieren, aber die strukturellen Eigenschaften innerhalb der Konsensussequenz verändern die Affinität der Bindung (Göhler *et al.*, 2002; McKinney & Prives, 2002).

Die Regulation der Transaktivierung durch die posttranslationale Modifikation des p53-Proteins und über die Konformation der Chromatin-DNA ermöglicht dem Tumorsuppressor eine selektive Antwort auf unterschiedliche Signale der Zelle (Göhler *et al.*, 2002).

1.1.5 Redoxregulation der spezifischen Bindung

Das DNA-Bindungsmotiv der p53-Kerndomäne wird durch ein tetraedrisch koordiniertes bivalentes Zinkion stabilisiert. Die koordinative Bindung wird von dem Histidinrest 179 und von den drei Cysteinresten 176, 238 und 242 gebildet (Cho *et al.*, 1994). Das Entfernen des Zinkions führt *in vitro* zur Oxidation der Thiolgruppen zu Disulfidbrücken und zur intermolekularen Vernetzung von p53 zu hochmolekularen Aggregaten. Die entstehende Konformation entspricht immunologisch der Mutantenkonformation (Delphin *et al.*, 1994; Hainaut & Milner, 1993).

Die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 benötigt *in vitro* Thiol-reduzierende Agenzien wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol und ist durch diese konzentrationsabhängig bis zu einem Maximum von 10mM steigerbar (Delphin *et al.*, 1994; Hainaut & Milner, 1993; Rainwater *et al.*, 1995).

Die DNA-Bindungsdomäne enthält neben den Cysteinresten zur Bindung des Zinkions sieben weitere konservierte Cysteinreste. Die Cysteinreste 275 und 277 sind in der Schleife des *Loop-Sheet-Helix*-Motivs lokalisiert, die an DNA-Strukturen in der großen Furche der Konsensus-DNA bindet. Hier dient der Cysteinrest 277 als Wasserstoffbrücken-Akzeptor einer Base

innerhalb der großen Furche (Cho *et al.*, 1994). Mutanten von murinem p53 haben gezeigt, dass die anderen Cysteinreste (Cys 124, 135, 141 & 275) der Bindungsdomäne ebenfalls an der Redoxregulation der sequenzspezifischen DNA-Bindung *in vitro* beteiligt sind. Die beiden anderen Cysteinreste 182 und 229 scheinen für die sequenzspezifische DNA-Bindung ohne Bedeutung zu sein (Rainwater *et al.*, 1995).

Oxidations-Experimente mit Diamid zeigten, dass sowohl die sequenzspezifische DNA-Bindung als auch die strukturspezifische Nukleinsäurebindung *in vitro* durch Oxidation gehemmt wird (Bauer, 1999; Fojta *et al.*, 1999).

Expressionsstudien in *Saccharomyces cerevisiae* zeigten, dass eine Mutation oder Deletion des Hefe-eigenen Thioredoxin-Reduktase Gens *trr1* die p53-regulierte Expression eines Reportergens inhibiert (Casso & Beach, 1996; Pearson & Merrill, 1998). In Mammaliazellen führt eine Kotransfektion von p53 mit Thioredoxin (Trx), einem Dithiol-reduzierenden Enzym, das signifikanten Anteil am Redoxstatus der Zelle hat, zu einer verstärkten p53-vermittelten Transkription des p53-Zielgens *p21*, das für einen Inhibitor Zyklin-abhängiger Kinasen kodiert. Die Kotransfektion mit einer dominant-negativen Mutante von Trx unterdrückt diesen Effekt (Ueno *et al.*, 1999).

Trx interagiert darüber hinaus mit einem weiteren Protein, dem Redox-Faktor 1 (Ref-1) oder auch Apurine/Apyrimidine-Endonuklease 1 (APE1) (Hirota *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 1999). Ref-1 ist ein bifunktionelles Enzym, mit einer Redoxregulations- und einer DNA-Reparaturaktivität. Ref-1 stimuliert die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 *in vitro* und reguliert dessen transkriptionelle Aktivität *in vivo* (Kapitel 1.2).

1.1.6 Das Homotetramer, die aktive Form von p53

Die Struktur der Oligomerisierungsdomäne von p53 wurde durch Röntgenkristallographie und Kernresonanzspektroskopie aufgeklärt (Chène *et al.*, 1997; Clore *et al.*, 1994 & 1995; Jeffrey *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1996; Mittl *et al.*, 1998).

Die Oligomerisierungsdomäne eines p53-Monomers enthält ein β -Faltblatt (Aminosäurereste: 326-333), das mit einer α -Helix (Aminosäurereste: 335-355) über einen einzelnen Aminosäurerest (Gly 334) verknüpft ist. Die Sekundärstruktur ist V-förmig und jeder Ast wird von einem der beiden Strukturelemente gebildet.

p53 bildet über seine Oligomerisierungsdomäne strukturell ein Dimer aus Dimeren (Lee *et al.*, 1994; Mateu *et al.*, 1999). Zwei Monomere assoziieren durch Bildung eines antiparallelen β -

Faltblatts und eines doppelhelikalen Bündels. Das antiparallele β -Faltblatt führt zur Bildung von acht Wasserstoffbrücken und eines hydrophoben Kerns, an dessen Aminosäureresten auch das doppelhelikale Bündel beteiligt ist (β -Faltblatt: Phe 328, Leu 330 & Ile 332; α -Helix: Phe 338, Phe 341 & Asn 345). Darüber hinaus existiert wahrscheinlich eine Salzbrücke zwischen dem Argininrest 337 des einen und dem Aspartatrest 352 des anderen Monomers. Zwei Dimere interagieren nur über ihre α -Helices miteinander, die β -Faltblätter befinden sich an der Außenseite des Tetramers und sind nicht direkt in die Assoziation der beiden Dimere involviert. Die Interaktion der α -Helices ist hauptsächlich hydrophober Natur (Aminosäurereste: Met 340, Leu 344, Ala 347, Leu 348 & Leu 350) (Cloure *et al.*, 1995; Jeffrey *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994; Surridge, 1994).

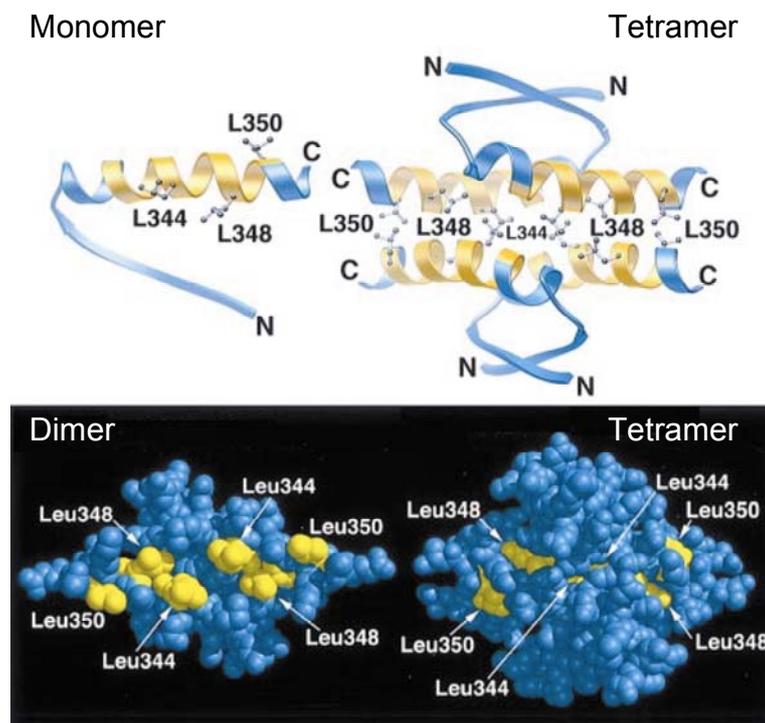


Abb. 1-2 Oben: Schematische Darstellung der p53-Oligomerisierungsdomäne (AS 326-353) im Monomer (links) und im Tetramer (rechts). Zu erkennen ist die V-förmige Struktur aus β -Faltblatt und α -Helix. Unten: Kalottenmodell der Oligomerisierungsdomäne im Dimer (links) und im Tetramer (rechts). Das Leucin-reiche nukleäre Exportsignal (gelb) ist im Tetramer maskiert. (Abbildung aus Stommel *et al.*, 1999; verändert).

Die Oligomerisierungsdomäne ist frei von Cysteinresten. Mutationsstudien haben ergeben, dass hydrophobe Wechselwirkungen die treibende Kraft in der Stabilisierung des p53-Tetramers darstellen (Johnson *et al.*, 1995; Mateu & Fersht, 1998; McCoy *et al.*, 1997).

p53 kann zudem Multimere über eine Assoziation bilden, die nicht von der Oligomerisierungsdomäne sondern von der Kerndomäne vermittelt wird. Diese Assoziation, bei der sich p53-Tetramere zu Multimeren zusammenfügen, wird als Stapelung (*stacking*) bezeichnet (Stenger *et al.*, 1992; Stenger *et al.*, 1994).

Die Bildung eines p53-Tetramers hat Auswirkungen auf die sequenzspezifische DNA-Bindung. Gegenüber dem Monomer erhöht sich beim Tetramer die Bindungsaffinität für die Konsensussequenz durch einen kooperativen Effekt um das 10fache bis 100fache (Balaguru-moorthy *et al.*, 1995). Ein Dimer bindet eine dekamere Halbseite der Konsensussequenz und erhöht damit die Möglichkeit des zweiten Dimers, an das Dekamer der anderen Halbseite zu binden (McLure & Lee, 1998 & 1999). Die DNA wird bei der Bindung gebeugt und verdrillt. Durch die Bildung des Tetramers vergrößern sich die Winkel in der Konformation der DNA und erhöhen die Gesamtstabilität des Protein-DNA-Komplexes (Halazonetis *et al.*, 1993; Halazonetis & Kandil, 1993; McLure & Lee, 1996 & 1999; Nagaich *et al.*, 1999; Waterman *et al.*, 1995).

Die Oligomerisierungsdomäne und ihre Quartärstruktur haben ebenfalls Auswirkungen auf die Interaktionen von p53 mit anderen Proteinen. Verschiedene Proteine binden direkt an die Oligomerisierungsdomäne. Die CKII bindet an die Aminosäurereste 325 bis 344 (Gotz *et al.*, 1999) und PKC an die Aminosäurereste 320 bis 346 (Delphin *et al.*, 1997). S100, ein Ca²⁺-bindendes Protein, bindet an die Oligomerisierungs- und die regulatorische Domäne und inhibiert die Bildung des p53-Tetramers und dessen Phosphorylierung durch PKC (Baudier *et al.*, 1992; Rustandi *et al.*, 2000; Wilder *et al.*, 1998). *In vivo* führt dies zu einer Verminderung der p53-vermittelten Transaktivierung (Lin *et al.*, 2001).

Andere Protein-Protein-Interaktionen sind auf p53 als Tetramer beschränkt wie die Bindung von MDM2 (Lomax *et al.*, 1998; Marston *et al.*, 1995) und von TBP (TATA-box binding protein) (Liu *et al.*, 1993) an den p53-Aminoterminus, sowie die Bindung von c-Abl, einer Tyrosinkinase, an den Carboxyterminus (Nie *et al.*, 2000) und die Bindung von HIF-1 α an die p53-Kerndomäne (Hansson *et al.*, 2002).

Die Ubiquitinierung zum Abbau von p53 erfolgt nur im oligomerisierten Zustand (Maki, 1999) und der Abbau wird gestoppt, wenn die Formierung des Tetramers inhibiert wird (Kubbutat *et al.*, 1998).

p53 wird an Polysomen kotranslational dimerisiert (Nicholls *et al.*, 2002) und kann sich durch nukleäre Im- und Exportsignale sowohl im Zytoplasma als auch im Kern aufhalten (Hara *et al.*, 2000; Klotzsche *et al.*, 1998; Middeler *et al.*, 1997; Stommel *et al.*, 1999). Nach Aktivierung im Kern bildet p53 ein Tetramer (Dimer aus Dimeren) und maskiert damit das nukleäre Exportsignal in der Oligomerisierungsdomäne (Stommel *et al.*, 1999). p53 akkumuliert im Kern und kann seine Funktionen in Zellzyklus, DNA-Reparatur und Apoptose übernehmen.

Die Regulation der Bildung von p53 Homooligomeren ist noch nicht geklärt. *In vitro* Versuche mit p53-Proteinfragmenten weisen auf eine mögliche Regulation durch posttranslationale Modifikationen hin, die im Fall der Phosphorylierung des Serinrestes 392 zu der Bildung des Tetramers führen sollen. Die Phosphorylierung des Serinrestes 315 destabilisiert dagegen das Tetramer (Sakaguchi *et al.*, 1997). *In vivo* Studien haben jedoch gezeigt, dass die Phosphorylierung des Serinrestes 315 ebenfalls zu einer Aktivierung des p53 als Transkriptionsfaktor führt (Blaydes *et al.*, 2001).

1.1.7 Der Signalweg: Funktionen von p53

p53 wird aufgrund seiner Funktion als Tumorsuppressor von einer Reihe zellschädigender Einflüsse wie DNA-Schäden, Nukleotid-Depletion, Hypoxie, Hitzeschock, aktivierte Onkogene etc. aktiviert. Der wohl am besten untersuchte Weg ist die Aktivierung des p53 durch ionisierende Strahlung.

1.1.7.1 p53-vermittelter G₁/S-Arrest

5 Gy ionisierender Strahlung führen zu einem p53-vermittelten G₁/S-Wachstumsarrest in proliferierenden Fibroblasten (Kastan *et al.*, 1991). Die entstandenen DNA-Schäden werden über den Carboxyterminus von p53 gebunden (Nelson & Kastan, 1994). ATM (*ataxia-telangectasia mutated kinase*), eine Proteinkinase, phosphoryliert p53 am Serinrest 15 (Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998). Dies verhindert die MDM2-vermittelte Degradation und

führt zu einem Anstieg der p53-Konzentration (Chao *et al.*, 2000). Das aktivierte p53 bindet als Transkriptionsfaktor an den Promotor des Kinaseinhibitors p21, was zu dessen Transaktivierung führt. p21 hemmt die Komplexe Zyklin D – CDK 4/6 und Zyklin E – CDK 2 (El-Deiry *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993). Diese sind nicht mehr in der Lage, pRB (*retinoblastoma*), einen Inhibitor des Transkriptionsfaktors E2F, im Komplex mit E2F zu phosphorylieren, was die Voraussetzung für die Freisetzung von E2F ist. E2F aktiviert eine Reihe von S-Phase spezifischen Genen. Die Zelle ist dadurch nicht in der Lage, in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten und verbleibt in einem G₁/S-Arrest (el-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993). Durch Induktion von c-Jun ist die Zelle in der Lage, in den Zellzyklus zurückzukehren (Shaulian *et al.*, 2000).

1.1.7.2 p53-vermittelter G₂/M-Arrest

Durch Transaktivierung des Gens für 14-3-3 σ , das für einen Phosphataseinhibitor kodiert, ist p53 auch in der Lage, den Zellzyklus vor der Mitose in G₂/M zu arretieren (Hermeking *et al.*, 1997). 14-3-3 σ bindet und inaktiviert die phosphorylierte Form von CDC25C (*cell division cycle*), einer Phosphatase, und sequestriert diese im Zytoplasma (Yang *et al.*, 1999; Zeng & Piwnica-Worms, 1999). CDC25C ist essentiell für die Aktivierung der CDK1, die im Komplex mit Zyklin B für den Übergang aus der G₂-Phase in die Mitose verantwortlich ist (Sanchez *et al.*, 1997). Dieser Komplex (Zyklin B – CDK1) wird ebenfalls durch 14-3-3 σ gebunden und im Zytoplasma sequestriert (Chan *et al.*, 1999). Während die p53-vermittelte Transaktivierung von p21 in der G₁-Phase zu einem Zellzyklusarrest führt, bewirkt die Transaktivierung von p21 nach einem G₂/M-Arrest die Rückkehr in den Zellzyklus. p21 bewirkt über pRB und E2F eine Inhibition der *chk1*-Transkription. Die CHK1-vermittelte Phosphorylierung von CDC25C wird unterbunden und die Zelle tritt in die Mitose-Phase ein (Gottifredi *et al.*, 2001).

1.1.7.3 p53-vermittelte Apoptose

Eine Alternative zur Reparatur ist die Eliminierung einer geschädigten Zelle aus dem Zellverband. Welchem Mechanismus die Entscheidung zwischen Reparatur und Apoptose zugrunde liegt, ist derzeit noch nicht geklärt, die Schwere des Schadens, der physiologische Zustand der

Zelle und der Zelltyp scheinen dabei jedoch eine Rolle zu spielen (Fei *et al.*, 2002; Li & Ho, 1998; Offer *et al.*, 2002; White, 1996).

p53 ist an der Regulation einer Reihe von Genen beteiligt, deren Expression auf unterschiedlichen Wegen zur Einleitung der Apoptose führt:

p53 transreprimiert das Gen *bcl-2* (*B-cell cll/lymphoma 2*) (Miyashita *et al.*, 1994), dessen Protein eine antiapoptotische Wirkung besitzt und dessen Überexpression die p53-vermittelte Apoptose zu unterdrücken vermag (Chiou *et al.*, 1994). Gleichzeitig werden die Gene für *bax* (Lindsten *et al.*, 2000; Miyashita *et al.*, 1994) und *peg3* (Deng & Wu, 2000) transaktiviert. *Peg3* (*paternally expressed gene 3*) bewirkt die Translokation des Bax (*Bcl-2 – assoziiated X protein*) vom Zytoplasma in die Mitochondrien (Deng & Wu, 2000). Dort führt Bax zur Freisetzung des Cytochroms *c* (Jurgensmeier *et al.*, 1998; Rosse *et al.*, 1998). Cytochrom *c* aktiviert in Verbindung mit *Apaf1* (*apoptotic protease activating factor 1*) die Caspase-9 (Li *et al.*, 1997). *Apaf1* kodiert für eine Untereinheit des Caspase-9-Holoenzym und wird ebenfalls durch p53 transaktiviert (Moroni *et al.*, 2001). Caspasen (*cystein aspartic acid proteases*) bewirken in einer proteolytischen Kaskade die Zerstörung zelleigener Proteine (Li *et al.*, 1997). p53 steigert auch die Konzentration von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch Transaktivierung der *pig*-Gene (*p53-induced gene*). Die reaktiven Sauerstoffverbindungen schädigen die Mitochondrienmembran und führen zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Polyak *et al.*, 1997).

Darüber hinaus erhöht p53 durch Transaktivierung von *cd95/fas/apo-1* und *killer/dr-5* die Rezeptordichte für Apoptose-induzierende Rezeptoren. Die Bindung von Liganden an diese Rezeptoren leitet über die Aktivierung einer Caspase-Kaskade die Apoptose ein (Locksley *et al.*, 2001).

1.1.7.4 DNA-Reparatur

Ein p53-vermittelter Zellzyklusarrest in der G₁- oder G₂-Phase ermöglicht der Zelle, den DNA-Schaden durch Reparatur zu beheben. Eine Reihe von Hinweisen deuten jedoch auch auf eine direkte Beteiligung von p53 an DNA-Reparaturprozessen hin:

Depletions-Studien an Kernextrakten mit überexprimiertem p53 zeigten eine verstärkte Basen-Exzisionsreparatur in Gegenwart von p53 (Offer *et al.*, 1999). Dies wurde durch Vergleiche der Basen-Exzisionsreparatur von Zelllinien mit Mutanten und Wildtyp p53 bestätigt (Seo *et al.*, 2002). Mutationen in der Kerndomäne oder Deletion der regulatorischen Domäne von

p53 führen zu einer starken Verminderung der zellulären Reparaturaktivität (Offer *et al.*, 2001). Der Einfluss von p53 auf die Basen-Exzisionsreparatur ist abhängig von der Schwere des DNA-Schadens (Offer *et al.*, 2002) und der Phase des Zellzyklus und kann neben der Stimulation auch zum Rückgang der Reparaturprozesse und zur Einleitung der Apoptose führen (Offer *et al.*, 2001). Die Dephosphorylierung des Serinrestes 376 führt zu einer Zunahme der DNA-Reparatur, während die ATM-vermittelte Phosphorylierung des Serinrestes 15 einen Rückgang der Reparaturaktivität bewirkt (Offer *et al.*, 2002).

In vitro Studien haben gezeigt, dass p53 in Gegenwart der AP-Endonuklease Ref-1 (Kapitel 1.2) in der Lage ist, die Interaktion der DNA-Polymerase β mit apuriner oder apyrimidiner DNA zu stabilisieren (Zhou *et al.*, 2001).

Das durch p53 transaktivierte p21 bindet PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), die Ringklemme um den DNA-Strang, die der DNA-Polymerase die Prozessivität verleiht. Hierdurch wird die PCNA-vermittelte Replikation der DNA ebenso wie die Reparatur durch die DNA-Polymerase δ inhibiert, nicht jedoch die Reparatur durch die DNA-Polymerase β (Flores-Rozas *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994; Tom *et al.*, 2001; Waga *et al.*, 1994). Ref-1 wirkt hier als Assemblierungs- und Koordinations-Faktor, der die Wirkung von p21 auf den Protein-komplex der DNA-Polymerase δ zu kompensieren vermag. (Tom *et al.*, 2001).

1.1.7.5 Der Abbauweg von p53

Nach erfolgreicher Reparatur wird das im Kern akkumulierte p53 wieder abgebaut. Mdm2, dessen Gen ebenfalls durch p53 transaktiviert wird, wirkt hierbei über eine negative Rückkopplungsschleife. Es bindet an die Transkriptions-aktive Form mit p53 als Tetramer (Maki, 1999) und fügt durch seine intrinsische E3-Ligase-Aktivität Ubiquitin an verschiedene Lysinreste in dessen Carboxyterminus an (Nakamura *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2000). Dies führt zu einer Konformationsänderung der Quartärstruktur, die das nukleäre Exportsignal, das sonst im Tetramer maskiert vorliegt, exponiert (Gu *et al.*, 2001). Der Mdm2 vermittelte Export des p53 aus dem Kern führt im Zytoplasma zum Proteasom-vermittelten Abbau des Proteins (Ashcroft & Vousden, 1999).

1.2 Der Redox-Faktor 1

Der humane Redox-Faktor 1 (Ref-1) (Xanthoudakis & Curran, 1992) ist ein bifunktionelles Protein mit der Fähigkeit, die DNA-Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren zu beeinflussen. Es besitzt eine apurinische/apyrimidinische Endonukleaseaktivität, die zur Namensgebung des Proteins als APE1 (*apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*) (Dempfle *et al.*, 1991) oder HAP1 (*human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1*) (Robson & Hickson, 1991) führte. Eine Interaktion von Ref-1 mit dem Tumorsuppressor p53 wurde *in vitro* sowie *in vivo* bestätigt.

1.2.1 Ref-1: Vom Gen zum Protein

Im humanen Genom ist *ref-1* auf der Bande q11.2-12 des Chromosoms 14 lokalisiert. Das komplette Gen umfasst 2,6kb und setzt sich aus fünf Exons und vier Introns zusammen. Das erste Exon kodiert nicht für das Protein. Dem basalen Promotor fehlt die TATA-Box. Er umfasst ca. 300bp und ist in einer CpG-Insel angesiedelt. Neben einer CCAAT-Box findet sich eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1. Ebenso finden sich in den 800bp der CpG Insel Konsensussequenzen für weitere Transkriptionsfaktoren, wie USF (*upstream stimulatory factor*), AP-1 (*activator protein 1*), CREB (*cyclic AMP response binding protein*) und ATF (*activating transcription factor*) (Akiyama *et al.*, 1994; Harrison *et al.*, 1995; Robson *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1992).

Ref-1 wird in Abhängigkeit vom Zellzyklus exprimiert. Die Expression erreicht, entsprechend der Expression von p53, in der S-Phase ihr Maximum (Fung *et al.*, 2001). Die Transkription ist über die CRE-Bindungsstelle im Promotor durch oxidativen Stress induzierbar (Grosch & Kaina, 1999).

Ref-1 ist ein monomeres Protein von 318 Aminosäuren und hat eine molare Masse von 35,6kDa (Seki *et al.*, 1992). Es besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen, sich überlappenden Domänen, die durch Phosphorylierung in ihren Aktivitäten reguliert werden.

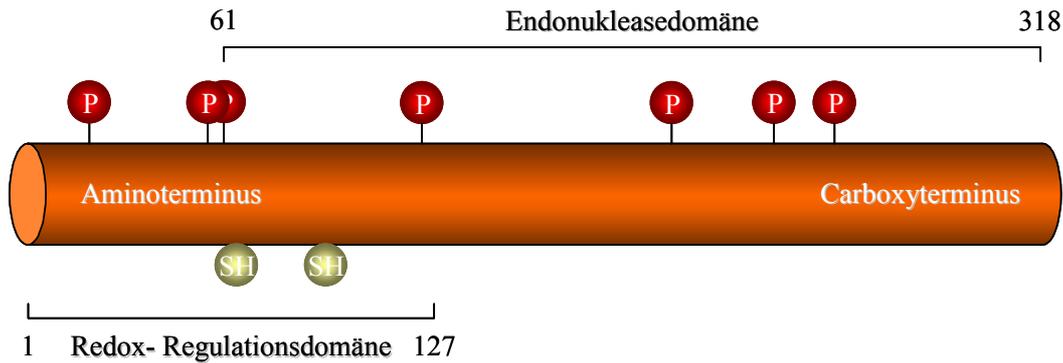


Abb. 1-3 Schematische Darstellung des Redox-Faktors 1 (Ref-1). Das Protein besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen, sich überlappenden Domänen. Die Redox-Regulationsdomäne umfasst die Aminosäuren 1 bis 127. Die reaktiven Cysteinreste 65 und 93 der Redox-Regulationsdomäne sind eingezeichnet. Phosphorylierung durch CKII und PKC steigert die Redox-Regulations-Aktivität von Ref-1. Die Endonukleasedomäne umfasst die Aminosäurereste 61 bis 318. (Abbildung verändert nach Evans *et al.*, 2000).

1.2.2 Der Carboxyterminus von Ref-1: Struktur und Funktion

Die carboxyterminale Domäne nimmt den größten Teil des Proteins ein und umfasst die Aminosäuren 61 bis 318 (Izumi & Mitra, 1998). Der Carboxyterminus bildet eine feste globuläre Domäne aus zwei Schichten sechssträngiger β -Faltblätter. Diese sind von α -Helices umgeben. Ref-1 zeigt eine strukturelle Homologie zur Exonuklease III von *Escherichia coli* (Gorman *et al.*, 1997).

In der carboxyterminalen Domäne sind eine Reihe von Reparaturfunktionen lokalisiert, mit denen das Protein an der Exzisionsreparatur beteiligt ist:

Das Protein ist eine Apurin/Apyrimidin-Endonuklease, die das Phosphodiester-Rückgrad der DNA an der 5'-gelegenen Seite der apurinen oder apyrimidinen (AP) Stelle schneidet und ein freies 3'-Hydroxyl-Nukleotid zum Ansetzen für die DNA-Polymerase hinterlässt (Barzilay *et al.*, 1995). Ref-1 besitzt darüber hinaus eine ca. 200fach schwächere 3'-Diesterase- oder Phosphataseaktivität, die dem Entfernen blockierender Gruppen am 3'-Ende der DNA dient (Wallace, 1998).

Ref-1 unterstützt nach der Hydrolyse der Phosphodiesterbindung die Bindung der DNA-Polymerase β an die AP-Stelle und stimuliert daraufhin das Entfernen der 5'-Desoxyribosephosphatgruppe durch die Polymerase. Die Polymerase kann anschließend die

entstandene Lücke wieder auffüllen (Bennett *et al.*, 1997). In diesem Vorgang, der als Basen-Exzisionsreparatur bezeichnet wird, wirkt Ref-1 auch stimulierend auf die p53-vermittelte Stabilisierung des Polymerase-DNA-Komplexes (Kapitel 1.1.7.3).

1.2.3 *Der Aminoterminus von Ref-1: Struktur und Funktion*

Die aminoternale Domäne umfasst die Aminosäuren 1 bis 127 (Xanthoudakis *et al.*, 1994). Der äußere Aminoterminus ist flexibel und kristallographisch nicht zu erfassen (Strauß & Holt, 1998).

Die Domäne ist in der Lage, andere Proteine durch Redoxmodulation mittels eines aktiven Cysteinrests zu aktivieren. Dieser katalytisch aktive Cysteinrest 65 geht im oxidierten Zustand des Proteins eine Disulfidbrücke mit dem Cysteinrest 93 ein. Im reduzierten Zustand ist der Cysteinrest 65 frei (Walker *et al.*, 1993). Die Kristallstruktur weist den Cysteinrest 65 als in einer Tasche des Proteins verborgen aus, deren Zugang durch den Tryptophanrest 83 blockiert ist (Gorman *et al.*, 1997; Strauß *et al.*, 1998). Eine Computersimulation (*molecular dynamics simulation*) der Struktur des Proteins zeigt jedoch, dass dieser Rest eine gewisse Drehbarkeit besitzt, die nach Rotation des Restes die sterische Hinderung auf den Zugang zur Tasche freigibt. Dies könnte durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden (Beernink *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2000).

1.2.4 *Regulation von Ref-1*

Ref-1 wird durch ionisierende Strahlung und durch reaktive Sauerstoffverbindungen, verursacht durch Hypoxie oder Hyperoxie, in einem zweistufigen Mechanismus induziert (Grosch *et al.*, 1998; Ramana *et al.*, 1998; Tell *et al.*, 2000). Der erste Schritt bewirkt eine Translokation vom vorhandenen Ref-1 aus dem Zytoplasma in den Kern. Dieser Vorgang dauert je nach Zelltyp ein bis mehrere Stunden. Die zweite Stufe ist die *de novo* Synthese des Proteins über die transkriptionelle Aktivierung des *ref-1*-Promotors (Gillardon *et al.*, 1997; Ramana. *et al.*, 1998; Tell *et al.*, 2000).

Das Protein kann an verschiedenen Stellen durch Kinasen phosphoryliert werden, die auch die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 aktivieren:

Potentielle Phosphorylierungsstellen befinden sich in verschiedenen Serin- und Threoninresten an den Positionen Thr 19, Ser 123 und Thr 233 für CKII und an den Positionen Ser 56, Thr 61, Ser 123, Ser 201 und Ser 252 für PKC. Beide Kinasen sind in der Lage, die Redox-Aktivität von Ref-1 zu erhöhen (Hsieh *et al.*, 2001; Yacoub *et al.*, 1997).

Aktiviert Ref-1 einen Transkriptionsfaktor durch Reduktion, muss der aktive Cysteinrest 65 in der Redoxregulationsdomäne von Ref-1 oxidiert werden. Dieser Rest wird durch die Interaktion mit Thioredoxin (Trx), einem Dithiol reduzierenden Protein, wieder reduziert. Hierzu ist Trx in der Lage, einen stabilen Komplex in Form eines Heterodimers mit Ref-1 zu bilden (Hirota *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 1999).

1.2.5 Ref-1 als Aktivator von Transkriptionsfaktoren

Ref-1 ist in der Lage, eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (Hirota *et al.*, 1997; Xanthoudakis & Curran, 1992), NF- κ B (*nuclear factor* - κ B) (Mitomo *et al.*, 1994; Xanthoudakis *et al.*, 1992), HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor* - 1 α) (Carrero *et al.*, 2000; Ema *et al.*, 1999; Lando *et al.*, 2000) und auch p53 durch Redoxmodulation zu aktivieren.

Die Erkenntnis Jayaramans *et al.* (1997), dass Ref-1 p53 zu aktivieren vermag, stammt ursprünglich aus *in vitro* Transkriptionsversuchen mit Kernextrakten, die keinen Unterschied zwischen bindungsaktivem und inaktivem p53 erkennen ließen. Eine schrittweise Reinigung der Kernextrakte identifizierte Ref-1 als aktivierenden Faktor für bindungsinaktives p53.

In vitro Versuche durch *Elektrophoresis-Mobility-Shift-Assays* (EMSA) mit rekombinantem Wildtyp p53 und rekombinantem bakteriell exprimiertem Ref-1 zeigten, dass Ref-1 die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 in Gegenwart eines reduzierenden Agens wie Dithiothreitol (DTT) um den Faktor 10 bis 30 zu steigern vermag. Ein p53-Protein, dem die regulatorische Domäne fehlte (p53 Δ C30), wird nicht durch Ref-1 aktiviert, sehr wohl jedoch durch DTT. Demgegenüber kann Wildtyp p53 im reduzierten Zustand durch carboxyterminale Modifikation, wie Bindung durch den monoklonalen Antikörper pAb421, in der sequenzspezifischen DNA-Bindung aktiviert werden, der oxidierte Wildtyp jedoch nicht. Dies führte zu dem Postulat, dass Ref-1 nicht nur in der Lage ist, p53 durch Redoxmodulation zu aktivieren, sondern dass es auch einen redox-unabhängigen Mechanismus über eine carboxyterminale Interaktion geben müsse, die auf der Aufhebung des inhibitorischen Effekts der regulatorischen Domäne von p53 basiert.

Diese Interaktion wurde in einem transienten Transfektions-Experiment durch zwei Reporter-konstrukte mit Segmenten aus dem *zyklin G* - Promotor und dem *p21*-Promotor bestätigt. Hier war Ref-1 in der Lage, die Transaktivierung durch Wildtyp p53 zu stimulieren, nicht jedoch die von p53 Δ C30 oder der Mutante p53His175 (Jayaraman *et al.*, 1997).

Studien mit Ref-1-*antisense*-RNA an einer p53-induzierbaren Zelllinie zeigten eine signifi-kante Verminderung der p53-vermittelten p21-Induktion. Gleichzeitig konnte durch eine Überexpression von p53 in Gegenwart der Ref-1-*antisense*-RNA eine Abnahme der Apoptose festgestellt werden, während eine Koexpression von p53 mit Ref-1 zu einer Zunahme an apo-totischen Zellen führte (Gaiddon *et al.*, 1999).

Weiterhin konnte durch EMSA und transiente Transfektionsexperimente gezeigt werden, dass Trx als Redoxregulator der Zelle die aktivierende Wirkung von Ref-1 auf p53 weiter zu stei-gern vermag (Ueno *et al.*, 1999).

Eine Interaktion von p53 mit Ref-1 *in vivo* wurde durch immunohistochemische Untersu-chungen mit Fluoreszenzmikroskopie bestätigt, die beide Proteine in der Zelle kolokalisieren konnte (Tan *et al.*, 2002).

2 Aufgabenstellung

Ref-1 aktiviert durch die Reduktion von Disulfidbrücken verschiedene Transkriptionsfaktoren. Jayaraman *et al.* (1997) konnten auch für p53 eine Ref-1-vermittelte Steigerung der spezifischen Bindung von p53 an die p53-Konsensussequenz in linearer Konformation durch Reduktion von Disulfidbrücken in der p53-Kerndomäne nachweisen. Darüber hinaus postulierten sie einen redox-unabhängigen Einfluss auf die regulatorische Domäne des p53-Carboxyterminus, der dem der Bindung des monoklonalen Antikörpers pAb421 gleichkommt. pAb421 verhindert die Interaktion der regulatorischen Domäne von p53 mit der DNA und steigert dadurch die spezifische Bindung der p53-Kerndomäne an die p53-Konsensussequenz in linearer Konformation, unabhängig von einer Disulfid-Reduktion in der p53-Kerndomäne. Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Frage, ob Ref-1, in Analogie zu pAb421, tatsächlich redox-unabhängig die Bindung der regulatorischen Domäne von p53 an DNA verhindert und dadurch die spezifische Bindung von p53 an die p53-Konsensussequenz zu steigern vermag. Um diese Frage klären zu können, sollte der Einfluss, den pAb421 auf die p53-Nukleinsäurebindung ausübt, mit dem von Ref-1 verglichen werden.

Für diese Bindungsstudien sollten drei verschiedene Substrate verwendet werden, die mit p53 spezifisch interagieren:

- Ein sequenzspezifisches DNA-Substrat (el-Deiry *et al.*, 1993): Die p53-Konsensussequenz des p21-Promotors in linearer Konformation, die ausschließlich von der p53-Kerndomäne gebunden wird.
- Ein strukturspezifisches DNA-Substrat (Göhler *et al.*, 2002): Die p53-Konsensussequenz des p21-Promotors in nicht-linearer Konformation, in der die Konsensussequenz in einer Baumstruktur stabilisiert ist. Für diese strukturspezifische Bindung ist neben der Bindung durch die p53-Kerndomäne auch die Bindung durch die regulatorische Domäne von p53 notwendig.
- Ein strukturspezifisches RNA-Substrat (Bauer, 1999): Der untranslatierte Bereich am 5'-Ende der murinen p53 mRNA, der eine Sekundärstruktur in Form einer Haarnadelschleife bildet, an die p53 spezifisch bindet. Für diese strukturspezifische Bindung ist neben der Bindung durch die p53-Kerndomäne auch die Bindung durch die regulatorische Domäne von p53 notwendig.

Steigert Ref-1 die spezifische Bindung von p53 an die p53-Konsensussequenz in linearer Konformation durch eine redox-unabhängige Interaktion mit der regulatorischen Domäne von

p53, bedeutet das, dass Ref-1 die Interaktion der regulatorischen Domäne von p53 mit der Nukleinsäure verhindern muss.

Wird die Interaktion der regulatorischen Domäne von p53 mit der Nukleinsäure verhindert, kann p53 nicht mehr an die strukturspezifischen Substrate, sondern nur noch an das sequenzspezifische Substrat binden. Interagiert Ref-1 in Analogie zur Bindung durch den monoklonalen Antikörper pAb421 mit der regulatorischen Domäne von p53, muss dies zu einer Hemmung der spezifischen Bindung von p53 an das strukturspezifische DNA- und das strukturspezifische RNA-Substrat führen.

Um eine redox-unabhängige Interaktion von Ref-1 mit der regulatorischen Domäne von p53 von der Ref-1-vermittelten Disulfid-Reduktion in der p53-Kerndomäne unterscheiden zu können, sollte zunächst untersucht werden, in welcher Weise das Disulfid-reduzierende Dithiothreitol (DTT) die spezifische Bindung von p53 an die Nukleinsäuresubstrate beeinflusst. DTT steigert wie Ref-1 die spezifische Bindung von p53 an das sequenzspezifische DNA-Substrat durch Disulfid-Reduktion der p53-Kerndomäne. Der Einfluss von DTT sollte als Referenz für den Einfluss einer Disulfid-Reduktion auf die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 an diese drei Substrate verwendet werden.

Anhand dieser vergleichenden Analysen sollte ermittelt werden, ob Ref-1 den Tumorsuppressor p53 durch zwei verschiedene Mechanismen (Redoxregulation und/oder Interaktion mit der regulatorischen Domäne) in seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor beeinflusst.

3 *Material*

3.1 *Zelllinien*

3.1.1 *Prokaryota*

Zur Klonierung und zur Expression des Redox-Faktors 1 wurde der Bakterienstamm *Echerischia coli* DH5 α (Hanahan, 1983) verwendet.

Genotyp: *endA1 hsdR17* (r_k - m_k +) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (NaI r) *relA1* Δ (*lacIZYA-argF*) U169 *deoR* (80 *dlac* (*lacZ*) Δ M15)

3.1.2 *Eukaryota*

Sf9 (Vaughn *et al.*, 1977)

Zur Produktion und Amplifikation von Bakulovirenstocks diente eine Insektenzelllinie aus Ovarienzellen von *Spodoptera frugiperda* (Invitrogen), da in diesen die Rekombinationsrate reduziert ist.

High FiveTM (Wickham *et al.*, 1992)

Zur Expression von humanem Wildtyp p53 diente eine Insektenzelllinie aus Eizellen von *Trichoplusia Ni* (Invitrogen).

3.2 Oligonukleotide

3.2.1 PCR-Primer

5'-PCR-Primer *ref-1* AS 1-127

5' - CGC G|GATTC ATG CCG AAG CGT GGG - 3'

*Bam*HI AS 1

3'-PCR-Primer *ref-1* AS 1-127

5' - CCG G|AATTC TTA CCC TTC CTT GTC CGA AG - 3'

*Eco*RI AS 127

5'-PCR-Primer *ref-1* AS 61-318

5' - CGC G|GATTC ACA CTC AAG ATC TGC TC - 3'

*Bam*HI AS 61

3'-PCR-Primer *ref-1* AS 61-318

5' - CCG G|AATTC TTA CAG TGC TAG GTA TAG - 3'

*Eco*RI AS 318

Die Oligonukleotide der PCR stammten von der Firma TIB MOLBIOL

3.2.2 Kompetitoren

Für sequenzspezifische DNA Bindungsstudien diente Poly(dI:dC) (Boehringer) als Kompetitor im EMSA.

Für strukturspezifische DNA-Bindungsstudien wurde ein Kompetitor gewählt, der nicht spezifisch an p53 bindet, aber eine dem strukturspezifischen DNA-Substrat ähnliche Sekundärstruktur bildet:

sense-Strang: 5'- GAC GCC TTA GGT ACC TGG CCT GCC ACG CTC ACC GTG GCA GGC CAG GAT GGT ACC GCG G - 3'

antisense-Strang: 5'- CTG CGG AAT CCA TTA CCA TGG CGC C - 3'

Die beiden Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Dr. Ella Kim (HPI Hamburg) zur Verfügung gestellt.

3.2 Vektoren

pH6Ex3 (Berthold *et al.*, 1992)

Der bakterielle Expressionsvektor pH6Ex3 kodiert nach Insertion der cDNA in die MCS für ein rekombinantes Fusionsprotein mit einem aminoterminalen Histidin-Hexapeptid. Dieses ermöglicht eine Reinigung des exprimierten Proteins mittels Metallaffinitätschromatographie. Die Expression der inserierten DNA läßt sich über einen *tac* Promotor durch Zugabe von 1mM IPTG induzieren. Der Vektor enthält als Selektionsmarker das Ampicillinresistenz-Gen. In dieser Arbeit wurde die 5'-gelegene *Bam*HI und die 3'-gelegene *Eco*RI Schnittstelle der MCS zur Insertion verwendet.

3.3 Konstrukte

ref-1 wt / pGEX-2T

Die *ref-1* cDNA des humanen Wildtyps wurde über die 5'-gelegene *Bam*HI und die 3'-gelegene *Eco*RI Schnittstelle in die MCS des Vektors pGEX-2T (Smith & Johnson, 1988) inseriert. Der Vektor enthält als Selektionsmarker das Ampicillinresistenz-Gen.

Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Kaina (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

ref-1 wt / pH6Ex3

Die *ref-1* cDNA des humanen Wildtyps wurde über die 5'-gelegene *Bam*HI und die 3'-gelegene *Eco*RI Schnittstelle aus dem Konstrukt *ref-1* wt / pGEX-2T isoliert und über die gleichen Schnittstellen in den Vektor pH6Ex3 inseriert.

Das Konstrukt wurde in dieser Arbeit hergestellt (Kapitel 5.1).

ref-1 AS 1-127 / pH6Ex3

Der für die Aminosäuren 1 bis 127 kodierende Bereich der *ref-1* cDNA wurde mittels PCR über die Primer 5'-PCR-Primer *ref-1* AS 1-127 (*Bam*HI) und 3'-PCR-Primer *ref-1* AS 1-127 (*Eco*RI) selektiv amplifiziert und über die in den Primern enthaltenen Schnittstellen (*Bam*HI und *Eco*RI) in den Vektor pH6Ex3 inseriert. Als Template für die PCR diente das Konstrukt *ref-1* wt / pGEX-2T.

Das Konstrukt wurde in dieser Arbeit hergestellt (Kapitel 5.1).

ref-1 AS 61-318 / pH6Ex3

Der für die Aminosäuren 61 bis 318 kodierende Bereich der *ref-1* cDNA wurde mittels PCR über die Primer 5'-PCR-Primer *ref-1* AS 61-318 (*Bam*HI) und 3'-PCR-Primer *ref-1* AS 61-318 (*Eco*RI) selektiv amplifiziert und über die in den Primern enthaltenen Schnittstellen (*Bam*HI und *Eco*RI) in den Vektor pH6Ex3 inseriert. Als Template für die PCR diente das Konstrukt *ref-1* wt / pGEX-2T.

Das Konstrukt wurde in dieser Arbeit hergestellt (Kapitel 5.1).

Kontrollkonstrukt

Die *ref-1* cDNA wurde aus dem Konstrukt *ref-1* wt / pH6Ex3 über die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI ausgeschnitten und der Vektor ohne Insert nach Herstellung von stumpfen Enden religiert.

Das Konstrukt wurde in dieser Arbeit hergestellt (Kapitel 5.1).

Maus p53 Exon I / pBSIISK

Das Exon I vom murinen p53 wurde in die MCS des Vektors pBluescript II SK inseriert. Das Konstrukt diente als Matritze der *in vitro* Transkription zur Herstellung des strukturspezifischen RNA-Substrats.

Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Christian Bauer (HPI Hamburg) zur Verfügung gestellt.

3.4 Viren

Zur Gewinnung von humanem rekombinanten Wildtyp p53 wurden Insektenzellen als eukaryotisches Expressionssystem mit rekombinanten Bakuloviren infiziert.

Der Bakulovirusstock zur Expression von humanem rekombinanten Wildtyp p53 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Thierry Soussi (Institut Curie, Paris) zur Verfügung gestellt.

3.5 Nukleinsäure-Substrate

In dieser Arbeit wurden drei Nukleinsäuresubstrate für Bindungsstudien im EMSA verwendet:

Das sequenzspezifische DNA-Substrat entspricht der p53-Bindungsstelle im Promotor des humanen *p21*-Gens (Position –2281 bis –2262). Das sequenzspezifische DNA-Substrat besteht aus zwei miteinander hybridisierten komplementären Oligonukleotid-Strängen (Abb. 3-1) (el-Deiry *et al.*, 1993).

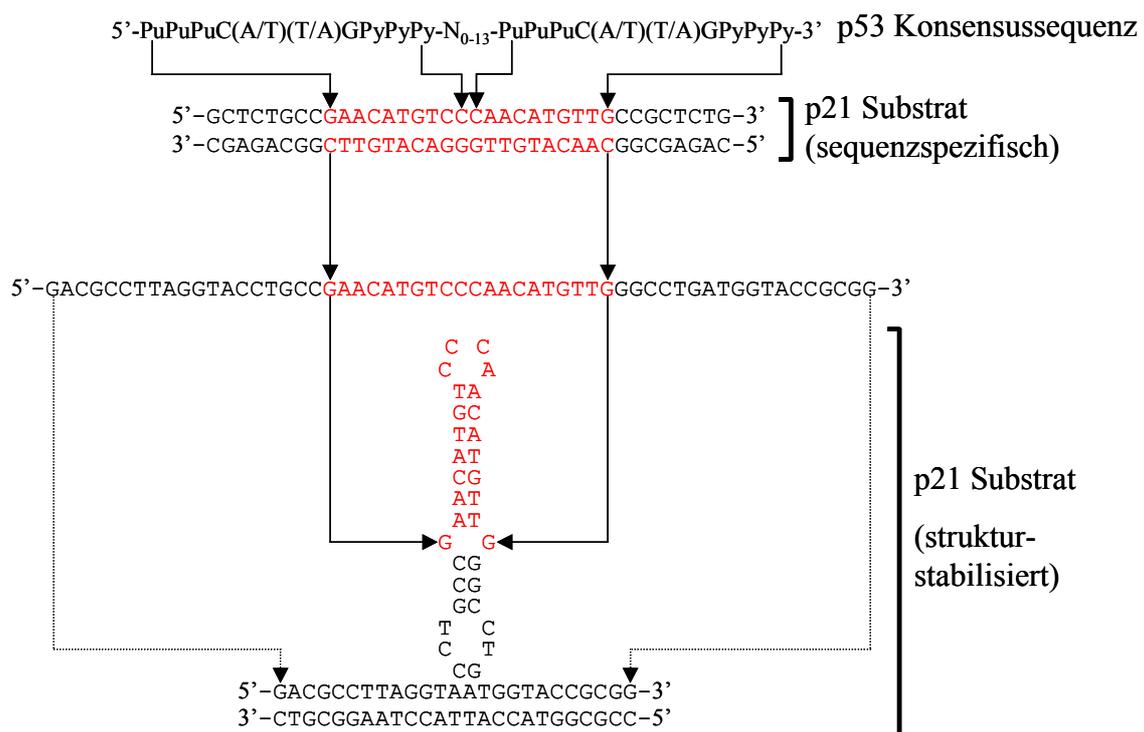


Abb. 3-1 Die Abbildung zeigt die im EMSA verwendeten doppelsträngigen DNA-Substrate. Die Sequenz der p53-Bindungsstelle im humanen *p21*-Promotor an Position –2282 bis –2262 wurde rot hervorgehoben. Die *p21*-Promotorsequenz (el-Deiry *et al.*, 1993) stimmt in der zweiten Halbseite des Palindroms in zwei Basen nicht mit der von el-Deiry *et al.* (1992) gefundenen Konsensussequenz für die p53-Bindungsstelle überein.

Das strukturspezifische DNA-Substrat enthält die gleiche p53-Bindungssequenz wie das sequenzspezifische DNA-Substrat. Die umgebende Sequenz des Oligonukleotids mit der p53-Bindungssequenz führt jedoch zur Bildung einer Baumstruktur. Diese Sekundärstruktur wird durch Hybridisierung mit einem weiteren Oligonukleotid ohne die p53-Bindungssequenz stabilisiert (Abb. 3-1) (Kim *et al.*, 1997; Göhler *et al.*, 2002).

Der *antisense*-Strang der DNA-Substrate wurde vor der Hybridisierung durch radioaktiven Phosphor (^{32}P) mit Polynukleotid-Kinase markiert.

Die Oligonukleotide für die DNA-Substrate wurden freundlicherweise von Dr. Ella Kim (HPI Hamburg) zur Verfügung gestellt.

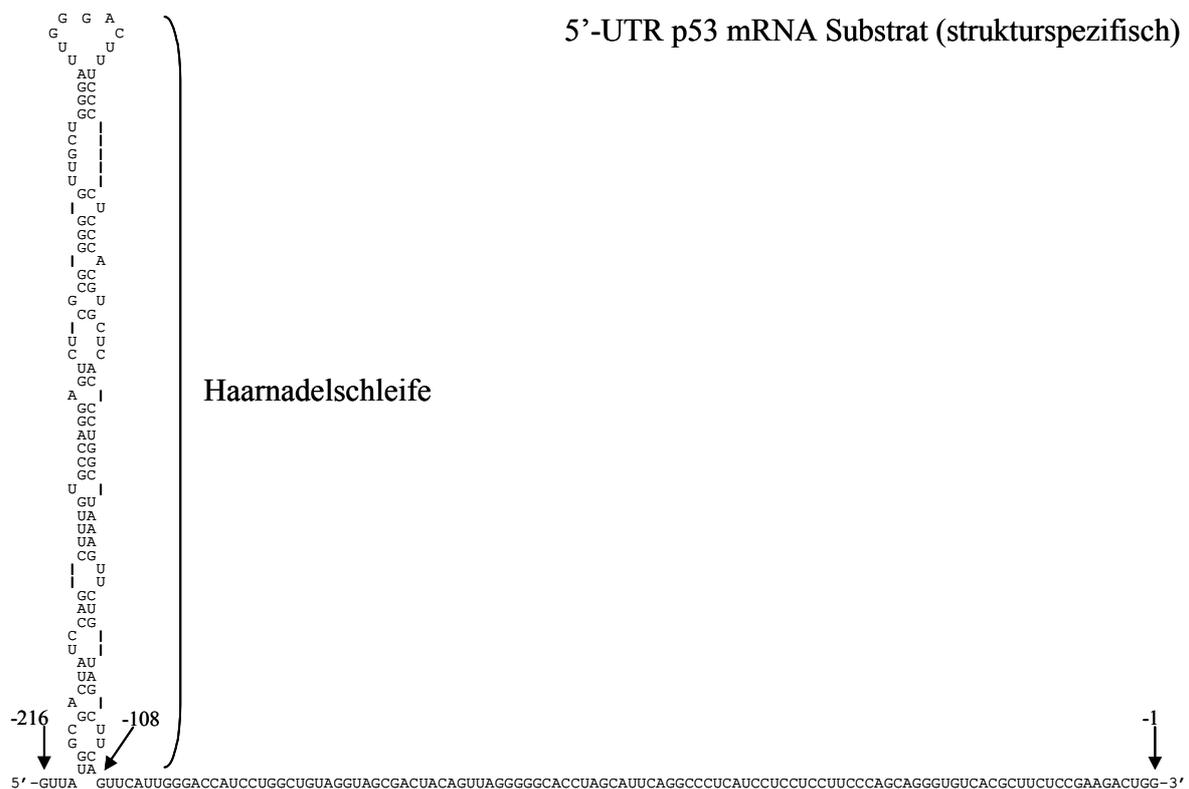


Abb. 3-2 Die Abbildung stellt die Haarnadelschleife im untranslatierten Bereich des 5'-Endes der murinen p53 mRNA dar. Das verwendete RNA-Substrat besitzt, wie in der Abbildung gezeigt, die Sequenz der mRNA von Position -216 bis -1. Die Sekundärstruktur erstreckt sich nach S1-Nuklease Verdau auf den Bereich von -216 bis -108 (Bienz *et al.*, 1984). Die abgebildete Sequenz entspricht dem strukturspezifischen RNA-Substrat in den Bindungsstudien mit p53 im EMSA.

Das strukturspezifische RNA-Substrat entspricht einem Bereich der untranslatierten Region am 5'-Ende der murinen p53 mRNA (Abb. 3-2). Die verwendete Sequenz von Position -216 bis Position -1 der mRNA bildet am 5'-Ende eine Haarnadelschleife (Bienz *et al.*, 1984), an die p53 spezifisch bindet (Mosner *et al.*, 1995).

Die Sekundärstruktur im 5'-UTR der murinen mRNA ist in der humanen p53 mRNA nicht vorhanden (Fu *et al.*, 1996). Das humane p53 bindet jedoch mit gleicher Affinität wie das murine p53 an die Haarnadelschleife der murinen mRNA (Mosner *et al.*, 1995; Bauer, 1999).

Die RNA wurde bei der *in vitro* Transkription durch radioaktiven Phosphor (^{32}P) markiert. Das Konstrukt zur Herstellung des strukturspezifischen RNA-Substrats wurde freundlicher Weise von Dr. Christian Bauer (CCS Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Weiterhin wurde ein unspezifisches doppelsträngiges DNA-Substrat verwendet:

sense-Strang: 5' - GAC GCC TTA GGT AAT GGT ACC GCG G - 3'

antisense-Strang: 5' - CTG CGG AAT CCA TTA CCA TGG CGC C - 3'

Der *antisense*-Strang des DNA-Substrats wurde vor der Hybridisierung durch radioaktiven Phosphor (^{32}P) mit Polynukleotid-Kinase markiert.

Die beiden Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Dr. Ella Kim (HPI Hamburg) zur Verfügung gestellt.

3.6 Antikörper

DO-1 (Vojtesek *et al.*, 1992)

Muriner monoklonaler Antikörper der IgG2a-Klasse. Er bindet ein aminotermiales Epitop von humanem p53 zwischen den Aminosäureresten 21 und 25. Eine entsprechende Hybridomzelllinie zur Herstellung des Antikörpers wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Lane (University of Dundee, Schottland) zur Verfügung gestellt.

pAb421 (Harlow *et al.*, 1981)

Muriner monoklonaler Antikörper der IgG2a-Klasse. Er bindet ein carboxyterminales Epitop von p53 zwischen den Aminosäureresten 371 und 380. Eine entsprechende Hybridomzelllinie

zur Herstellung des Antikörpers wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Lane (University of Dundee, Schottland) zur Verfügung gestellt.

Anti-Maus IgG (Biomol, Hamburg)

Antikörper aus der Ziege gegen Maus IgG Antikörper gerichtet, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase.

3.7 *Enzyme und andere Proteine*

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen New England Biolabs, Boehringer Mannheim bzw. Roche und Sigma-Aldrich bezogen.

SDS-PAGE Marker für Molekulargewichte:

SigmaMarkerTM High Range (Sigma-Aldrich)

36.000 (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Kaninchenmuskel)

45.000 (Ovalbumin, Hühnerei)

55.000 (Glutamat Dehydrogenase, Rinderleber)

66.000 (Albumin, Rinderserum)

84.000 (Fruktose-6-Phosphat Kinase, Kaninchenmuskel)

97.000 (Phosphorylase b, Kaninchenmuskel)

116.000 (Galaktosidase, *Echerischia coli*)

205.000 (Myosin, Kaninchenmuskel)

Combithek (Boehringer)

20.000 (Trypsin Inhibitor)

27.000 (Triosephosphat Isomerase)

39.000 (Aldolase)

56.000 (Glutamat-Dehydrogenase)

85.000 (Fruktose-6-Phosphat Kinase)

116.000 (β -Galaktosidase)

3.8 *Chemikalien und andere Materialien*

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich, Merk, Pharmacia Biotech, Serva Feinbiochemika und Riedel de Hën bezogen. Radioaktive Biochemikalien stammten von der Firma Hartmann.

4 Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Prokaryotische Zellkultur

4.1.1.1 Stammhaltung von Bakterienzellen (Sambrook *et al.*, 1989)

5ml flüssiges LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Bei Selektion von Trägern bestimmter Vektoren und Konstrukte wurde das Antibiotikum-Medium LB_{amp} verwendet. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37°C und 180upm auf dem Schüttler inkubiert. Zur Aufbewahrung der Stämme wurde die Kultur nach der Anzucht mit 50% Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

Luria Bertani (LB) Medium: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, pH 7,5

LB_{amp}: LB-Medium mit 0,01% (w/v) Ampicillin

4.1.1.2 Gewinnung transformationskompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)

Zur Gewinnung kompetenter *Echerischia coli* - Zellen des Stammes DH5 α nach der Mehrionentechnik wurden 500 μ l einer über Nacht Kultur in 50ml Ψ -Broth überführt und auf dem Schüttler bei 37°C und 180upm ca. 2,5h bis zu einer OD₅₅₀ von 0,22 bis 0,3 angezogen. Die Bakteriensuspension wurde für 15min auf Eis inkubiert und für 15min bei 4°C und 5.000g zentrifugiert. Nach dem Resuspendieren der sedimentierten Bakterien in Tfb-I Puffer wurden die Zellen für 15min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine 10min Zentrifugation bei 4°C und 5.000g geerntet, die sedimentierten Bakterien in 4ml eiskaltem Tfb-II resuspendiert und für 15min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde zu je 150 μ l aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Ψ -Broth: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 10mM MgSO₄, 10mM MgCl₂, pH 7,6

Transformations-Puffer (Tfb) I: 100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 10mM CaCl₂, 30mM KAc, 15% (v/v) Glycerol, pH 5.8

Transformations-Puffer (Tfb) II: 10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerol, pH 7,0

4.1.1.3 Transformation kompetenter Bakterien (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Transformation dient der Aufnahme und Amplifikation von Plasmid-DNA. Die Plasmid-Lösung oder der Ligationsansatz wurde mit vorgekühltem TCM-Puffer auf ein Volumen von 35µl ergänzt. Zur Transformation wurden 150µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit der DNA-Lösung vereinigt und 45min auf Eis inkubiert. Zur erleichterten Aufnahme der adsorbierten DNA durch die Bakterien wurde der Ansatz einem Hitzeschock von 42°C für 60s in einem Wasserbad oder Heizblock ausgesetzt und anschließend 2min auf Eis gekühlt. Dem Ansatz wurde 1ml LB-Medium zugesetzt und zur Ausprägung der mit den Plasmiden erworbenen Antibiotikaresistenz 1h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Der Transformationsansatz wurde in unterschiedlichen Verdünnungen mit einem Drygalski-Spatel auf LB_{amp}-Platten ausplattiert. Bei Bedarf wurde das Volumen des Ansatzes durch Zentrifugation bei 5.000g eingengt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

TCM-Puffer: 10 mM Tris / HCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 8,0

Luria Bertani (LB)_{amp}-Platten: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 0,01% (w/v) Ampicillin, 1,5% (w/v) Agar, pH 7,5

4.1.1.4 Expression von rekombinantem Ref-1 in Bakterien (Berthold *et al.*, 1992)

Zur Expression von Ref-1 wurden *Escherichia coli* - Zellen des Stammes DH5α mit einem der Ref-1 Expressions-Konstrukte transformiert und über Nacht in LB_{amp}-Medium auf dem Schüttler bei 37°C und 180upm angezogen. Mit dieser Kultur wurde ein LB_{amp}-Medium auf eine OD₅₉₅ von 0,05 angeimpft und auf dem Schüttler bei 37°C und 180upm bis zu einer OD₅₉₅ von 0,7 bis 0,9 kultiviert. Die Expression erfolgte nach Induktion mit 1mM IPTG für 2h auf dem Schüttler bei 15°C und 180upm. Die Zellen wurden bei 5.000g geerntet und mit PBS-Puffer gewaschen. Das Bakteriensediment wurde bis zur Proteinreinigung bei -80°C gelagert.

Luria Bertani (LB)_{amp}-Medium: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 0,01% (w/v) Ampicillin, pH 7,5

PBS-Puffer: 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4

4.1.2 *Eukaryotische Zellkultur*

Die Handhabung der eukaryotischen Zellkultur der Insektenzellen Sf9 und High FiveTM erfolgte nach den Angaben des Herstellers der Firma Invitrogen.

4.1.2.1 *Erhaltungskultur von Sf9 und High FiveTM - Zellen*

Die Insektenzelllinien wurden in Nährmedium als adhärenente Zellkulturen in Zellkulturflaschen bei 27°C bis zur Konfluenz expandiert. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage durch leichtes Abschlagen vom Flaschenboden gelöst und in einem Verhältnis von 1:3 passagiert.

Nährmedium: TC100-Medium mit 2mM L-Glutamin (PAA), 10% (v/v) fötales Kälberserum (Biochrom)

4.1.2.2 *Herstellung von hochtiter Baculovirusstocks mit Sf9-Zellen*

Sf9-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml in 175cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Anhaftung der Zellen (ca. 15min) wurden die Zellen mit einer MOI von 0,5 des Baculovirusstocks infiziert und 1h bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die infizierten Zellen für 3 bis 5 Tage bei 27°C weiter inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, wenn eine 80 bis 90%ige Lyse der Zellen durch eine massive Virusfreisetzung beobachtet werden konnte. Der Virus-haltige Überstand wurde durch Zentrifugation bei 4.000g geklärt und unter Lichtabschluß bei 4°C gelagert.

Nährmedium: TC100-Medium mit 2mM L-Glutamin (PAA), 10% (v/v) fötales Kälberserum (Biochrom)

4.1.2.3 *Expression von rekombinantem p53 in High FiveTM - Zellen*

High FiveTM - Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden in dreistöckigen Zellkulturflaschen ausgesät und bis zu einer 70 bis 80%igen Konfluenz expandiert. Die Zellen wurden anschließend mit einer MOI von 5 bis 10 des entsprechenden Hochtiter-Baculovirusstocks infiziert und für 44h bei 27°C inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch leichtes Abschlagen vom Flaschenboden mit anschließender Sedimentation bei 150g.

Das Sediment wurde mit kaltem PBS gewaschen und bis zur Proteinreinigung bei -80°C gelagert.

Nährmedium: TC100-Medium mit 2mM L-Glutamin (PAA), 10% (v/v) fötales Kälberserum (Biochrom)

PBS-Puffer: 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Birnboim & Doly, 1979)

1,5ml Flüssigkultur wurden für 45s bei maximaler Drehzahl in der Tischzentrifuge sedimentiert und das Sediment in 100µl Plasmid-Isolierungslösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Plasmid-Isolierungslösung 2 wurde durch Invertieren des Reaktionsgefäßes die Lösung gemischt und die Zellen für 1min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde das Lysat mit 150µl eiskalter Plasmid-Isolierungslösung 3 vermischt und für 10min auf Eis inkubiert. Die Zellreste wurden für mindestens 30min bei 4°C und maximaler Drehzahl der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert und somit von der Plasmid-Lösung getrennt. Die Plasmide im Überstand wurden mit 2-Propanol gefällt und das lyophilisierte Sediment in 50 bis 100µl autoklaviertem ddH₂O mit 500ng RNase A resuspendiert. Die RNA wurde durch Inkubation von 1h bei 37°C abgebaut und die Plasmid-DNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Die isolierten Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

Plasmid-Isolierungslösung 1: 50mM Glucose, 25mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8.0

Plasmid-Isolierungslösung 2: 0,2N NaOH, 1% (w/v) SDS

Plasmid-Isolierungslösung 3: 3M KAc, 11,5% (v/v) Eisessig

4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985)

Die Polymerase Kettenreaktion dient der spezifischen Vervielfältigung eines DNA-Fragments in einem zyklisch ablaufenden Prozess. Die Reaktion beruht auf der komplementären Bindung und der Verlängerung zweier Oligonukleotide, die die zu amplifizierende DNA flankieren.

Die PCR diente der Herstellung der zwei Fragmente *ref-1* AS 1-127 und *ref-1* AS 61-318 aus der Wildtyp *ref-1* cDNA. An diese in der PCR hergestellten Fragmente wurde über die Primer jeweils am 5'-Ende eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Eco*RI-Schnittstelle eingefügt.

Das Reaktionsgemisch wurde in einem Volumen von 25µl angesetzt:

DNA-Template	20 – 40ng/µl
5'-Primer	0,1µM
3'-Primer	0,1µM
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	je 50µM
PCR-Puffer mit Mg ²⁺	1,5mM MgCl ₂
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,1U/µl

Die Reaktion erfolgte mit einem Warmstart. Dabei wurde dem Heizblock nach Erreichen von 96°C das Reaktionsgefäß zugeführt.

01 ×	96°C	02min	Denaturierung der DNA
35 ×	96°C	30s	Denaturierung der DNA
	45°C	30s	Primer Hybridisierung
	72°C	01min	Verlängerung der Primer durch <i>Taq</i> DNA Pol.
01 ×	72°C	07min	Finale Verlängerung der Primer durch <i>Taq</i> DNA Pol.

Das PCR-Produkt wurde Phenol-Chloroform-extrahiert und mit *Bam*HI und *Eco*RI gespalten. Die geschnittenen PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel eluiert. Die geschnittenen und isolierten Fragmente wurden für die Ligation in den Vektor pH6Ex3 eingesetzt.

4.2.3 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration (Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration wurde die Extinktion des Lösungsmittels der Probe in einer Quarzküvette abgeglichen und nach Zugabe der Probe die Extinktion bei Wellenlängen von $\lambda = 260\text{nm}$ und 280nm bestimmt. Dabei gilt bei einer OD₂₆₀ von 1 für doppelsträngige DNA = 50µg/µl und für RNA = 40µg/µl. Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung ergibt sich aus dem Quotienten von OD₂₆₀ und OD₂₈₀. Als Richtwerte gelten 1,8 für DNA und 2,0 für RNA. Die Konzentrationsbestimmung für die isolierte RNA erfolgte in 1mM Na₂HPO₄, da saure pH-Werte den Messwert für RNA beeinflussen können.

4.2.4 *Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen* (Fuchs & Blakesley, 1983)

Die Behandlung von DNA mit spezifischen Restriktionsendonukleasen dient dem Schnitt des Makromoleküls in, je nach Anzahl der Erkennungssequenzen, ein oder mehrere definierte Fragmente.

50 bis 100ng/ μ l DNA wurde in einem Doppelverdau mit *Bam*HI (New England Biolabs) und *Eco*RI (New England Biolabs) in einem Volumen von 20 μ l in *Eco*RI-Puffer (New England Biolabs) mit BSA (New England Biolabs) durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit einer Enzymkonzentration von 0,5U/ μ l für 3h bei 37°C nach Herstellerangaben inkubiert.

Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss an den Verdau im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das geschnittene DNA-Fragment aus dem Gel eluiert.

*Eco*RI-Puffer mit BSA: 100mM Tris/HCl, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0,025% (v/v) Triton X-100, 0,1mg/ml BSA, pH 7,5

4.2.5 *Herstellung von stumpfen Enden zur blunt-end-Ligation* (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Herstellung von stumpfen Enden zur Religation des Kontrollkonstruktes erfolgte nach dem Ausschneiden der *ref-1*-cDNA mit *Bam*HI und *Eco*RI aus dem Konstrukt *ref-1* wt / pH6Ex3. Die einzelsträngigen DNA-Überhänge von 50ng/ μ l der Vektor-DNA wurden mit 0,1U/ μ l des großen Fragments der DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) (MBI) in einem Volumen von 20 μ l bei 37°C für 30min zu doppelsträngiger DNA aufgefüllt. Der Vektor wurde über Elution aus einem Agarosegel gereinigt und religiert.

Klenow Fragment – Puffer: 50mM Tris-HCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 0,05mM dNTPs, pH 8,0

4.2.6 *Agarosegelelektrophorese* (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäuren eines Größenbereichs von 0,05 bis 30kb. Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearer DNA in Agarosegelelektrophoren ist antiproportional dem dekadischen Logarithmus ihrer Länge in Basenpaaren. Durch Auftragen eines DNA-Längenstandards kann die Größe von DNA-Fragmenten bestimmt werden. Für die Analyse isolierter Plasmide sowie zur Aufreinigung von geschnittenen Vektoren

wurden Agarosegele einer Konzentration von 0,8% (w/v) verwendet. Für Analysen und zur Aufreinigung von geschnittener cDNA sowie für PCR-Ansätze erfolgte die Auftrennung in 1%igen (w/v) Agarosegelen.

In 30ml TAE-Puffer wurde 0,8% bzw. 1% (w/v) Agarose in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Bei einer Temperatur von ca. 60°C wurde die Lösung mit 0,07% (w/v) Ethidiumbromid versetzt, in den Gießstand gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach ca. 20min, wenn das Gel vollständig ausgehärtet war, wurde der Gießstand entfernt, das Gel in der Kammer mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden in DNA-Proben-Puffer zusammen mit einem Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von ca. 10V/cm. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden dadurch sichtbar gemacht, dass der interkalierende DNA-Ethidiumbromidkomplex in UV-Durchlicht orange fluoreszierte. Verwendet wurde langwelliges UV-Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 254\text{nm}$. Die Gele wurden mit einer Gel-Dokumentationsanlage fotografiert.

TAE-Puffer: 40mM Tris/HAc, 2mM EDTA, pH 8,4

DNA-Probenpuffer: 5% (v/v) Glycerin, 0,25% (v/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) SDS, 10mM EDTA pH 8,0

4.2.7 *Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen*

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des Qiaex II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen). DNA-Fragmente wurden über die Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und unter UV-Durchlicht bei möglichst kurzer Exposition mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde aus den Gelstücken nach Herstellerangaben des Qiaex II Agarose Gel Extraction Kit eluiert. Dieser Aufreinigung liegt die Adsorption von DNA an Silicagel-Partikel in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen zugrunde. Die Agarose bleibt in Lösung und wird durch mehrere Waschschrirte entfernt. Die Elution erfolgt in einer Lösung niedriger Salzkonzentration bei 1mM Tris/HCl pH 7,5.

4.2.8 *Phenol-Chloroform-Extraktion* (Sambrook *et al.*, 1989)

100µl wässrige DNA-Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit TE-Puffer äquilibriertem Phenol versetzt, mit dem Vortex gemischt und nach 5min Inkubation die Phasen bei max. Drehzahl in der Tischzentrifuge 5min lang getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Vorgang mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Isoamylalkohol zur besseren Phasentrennung) im Verhältnis 25:24:1 und Chloroform-Isoamylalkohol 24:1 als organische Phasen wiederholt. Die dreimal extrahierte wässrige Phase wurde mit Ethanol gefällt.

4.2.9 *Ethanol-fällung von DNA* (Sambrook *et al.*, 1989)

100µl wässrige DNA-Lösung wurden im Verhältnis 1:10 mit 3M NaAc-Lösung und dem 2,5fachen Volumen an 96%igem Ethanol (-20 °C) versetzt, gemischt und für 5min bei -80°C ausgesalzen. Anschließend wurde die Probe 20min bei 4°C und max. Drehzahl der Tischzentrifuge präzipitiert und die sedimentierte DNA mit 70%igem Ethanol 1min bei RT gewaschen, um verbliebene Salz-Kontaminationen zu entfernen. Die lyophilisierte DNA wurde je nach Bedarf erneut gelöst.

4.2.10 *Ligation von DNA-Fragmenten* (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Ligation dient der kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten. Die Reaktion wurde in einem möglichst kleinen Volumen von 10µl oder 20µl durchgeführt. Sie erfolgte mit einem Verhältnis von Vektor und Insert von 1:1 bis 1:3 mit 0,5U/µl bis 1U/µl T4 DNA-Ligase (Boehringer, Mannheim) über Nacht.

Eine Bestimmung der Verhältnisse erfolgte durch einen Vergleich der Bandenintensitäten von Vektor und Insert in einem Agarosegel. Unterstützend wurden die Intensitäten densitometrisch vermessen und daraus die molaren Verhältnisse ermittelt.

Die Ligationen von Fragmenten mit kohäsiven Enden erfolgten in einem Wasserbad bei 14°C. Ligationen mit stumpfen Enden wurden bei Raumtemperatur inkubiert.

Ligase-Puffer: 66mM Tris/HCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM ATP, pH 7,5

4.2.11 Sequenzierung von DNA (Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierung beruht auf dem Prinzip des zufälligen Kettenabbruchs entlang der Basenabfolge eines zu untersuchenden DNA-Fragments durch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide. Als Template wurde eine durch eine Phenol-Chlorophorm-Extraktion aufgereinigte DNA verwendet und mit dem „ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit“ von Applied Biosystems sequenziert.

Reaktionsansatz:

Das Reaktionsgemisch wurde in einem Volumen von 20µl angesetzt.

DNA-Template	25 - 50ng/µl
Primer zur Sequenzierung	0,75µM
Premix (Applied Biosystems)	20% (v/v)

Programm:

Die Reaktion erfolgte mit einem Warmstart. Dabei wurde dem Heizblock erst nach Erreichen von 96°C das Reaktionsgefäß zugeführt.

01 ×	96°C	02min	Denaturierung der DNA
25 ×	96°C	30s	Denaturierung der DNA
	45°C	15s	Primer Hybridisierung
	60°C	04min	Verlängerung der Primer durch <i>AmpliTaq</i> DNA Pol.

Der Ansatz wurde auf 100µl mit dd H₂O aufgefüllt mit 240mM NaAc versetzt und die DNA dem 2,5fachen Volumen Ethanol ausgesalzen. Der lyophilisierte Reaktionsansatz wurde im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie am UKE Eppendorf in Hamburg analysiert.

4.2.12 Herstellung von EMSA-Substraten

4.2.12.1 Herstellung der DNA-Substrate (Weaver & Weißmann, 1979)

Als DNA-Substrate wurden im EMSA radioaktiv markierte DNA-Doppelstrang-Substrate verwendet. Hierzu wurde das radioaktive Phosphat von 5 μ Ci [γ -³²P]-ATP mit 10U T4-Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs) auf die 5'-Hydroxyltermini von 10pmol des DNA-*Antisense*-Strangs übertragen. Der Reaktionsansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert und die Polynukleotid-Kinase anschließend bei 65°C für 20min inaktiviert. Es wurden 100pmol des DNA-*Sense*-Strangs zugegeben, der Ansatz auf 96°C erhitzt und langsam zur Ausbildung der Sekundärstruktur auf Raumtemperatur abgekühlt. Der radioaktiv markierte DNA-Doppelstrang wurde mittels Polyakrylamid-Gelelektrophorese gereinigt.

Polynukleotid-Kinase-Puffer (New England Biolabs): 70mM Tris/HCl, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, pH 7,6

4.2.12.2 Herstellung des RNA-Substrats (*in vitro* - Transkription) (Bauer, 1999)

Die *in vitro*-Transkription wurde entsprechend der Beschreibung des Kit-Herstellers (Promega) mit den mitgelieferten Polymerasen und Puffern durchgeführt. In der Regel wurden in einem Ansatz 2,5 bis 10 μ g des Konstrukts Maus p53 Exon I / pBSIISK eingesetzt, um das Plasmid-codierte Fragment durch die T7-RNA-Polymerase zu transkribieren. Die Transkription wurde mit folgendem 20 μ l Ansatz durchgeführt:

- 4 μ l (5 \times) TSC-Puffer
- 10mM DTT
- 1U/ μ l RNasin
- je 500 μ M rATP, rCTP und rGTP
- 100 μ M rUTP
- 2,5 μ Ci/ μ l [α -³²P]-UTP
- 100ng/ μ l bis 500ng/ μ l Konstrukt
- 0,5 μ l T7-RNA-Polymerase

Die *in vitro*-Transkription wurde für 1,5 Stunden bei 37°C durchgeführt, im Anschluss daran wurde das Konstrukt mit 20U DNase I für 15min bei 37°C verdaut und die RNA mittels Polyakrylamid-Gelelektrophorese gereinigt.

4.2.13 *Reinigung der EMSA-Substrate* (Hupp *et al.*, 1992)

Der Reaktionsansatz mit dem radioaktiv markierten Nukleinsäuresubstrat wurde in DNA-Probenpuffer auf ein natives kontinuierliches Trenngel einer Konzentration von 10% Polyakrylamid in (0,25×) TBE-Puffer geladen und bei einer Spannung von konstant 200V im elektrischen Feld in (0,25×) TBE-Puffer getrennt. Die Position der radioaktiv markierten Nukleinsäure wurde durch Autoradiographie ermittelt, das entsprechende Gelstück ausgeschnitten und über Nacht bei 4°C in TE-Puffer auf dem Inkubationsschüttler eluiert. Die gereinigte radioaktiv markierte Nukleinsäure im Eluat wurde durch Messung mit dem Scintillationszähler quantifiziert.

DNA-Probenpuffer: 5% (v/v) Glycerin, 0,25% (v/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) SDS, 10mM EDTA pH 8,0

TBE-Elektrophorese-Puffer: 89mM Tris Base, 89mM Borsäure, 2mM EDTA

TE-Puffer: 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Proteinreinigungsverfahren

4.3.1.1 FPLC-Reinigung von rekombinatem p53 über Heparin-Sepharose (Janus et al., 1999)

Ein Zellsediment aus 10^8 High FiveTM Insektenzellen mit überexprimiertem rekombinatem humanen Wildtyp p53 wurde für 1h bei 4°C auf dem Rollenmischer in 10ml Lysispuffer resuspendiert. Nach einem möglichst kurzen und schonenden Ultraschall-Aufschluss wurden die Zelltrümmer bei 4°C mit 35.000upm im SW41 Rotor (Beckman) für 35min sedimentiert. Der klare Überstand wurde auf eine 1ml HighTrap Heparin-Sepharose-Säule (Pharmacia) gegeben. Die Beladung der Säule, das anschließende Waschen und Eluieren erfolgte in einem automatisierten Verfahren durch eine FPLC (*fast protein liquid chromatography*). Hierzu wurde das ÄKTApurifier 100 System (Pharmacia) verwendet.

Nach Beladen der Säule wurde diese mit 15 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen und anschließend mit einem Gradienten von 100mM bis 1M KCl in 20 Säulenvolumina eluiert und das Eluat fraktioniert. Die Protein-haltigen Fraktionen des Eluats wurden vereinigt und auf eine Immunaффinitätschromatographie-Säule gegeben. Alle Reinigungsschritte erfolgten mit Eis-gekühlten Puffern.

Lysispuffer: 20mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 0,5% (v/v) NP-40, 1mM DTT, Proteaseinhibitoren (2mM Na₂SO₄, 2mM Pefabloc (Boehringer), 50µg/ml Leupeptin, 1% (v/v) Trasylol), pH 8,0

Waschpuffer: 20mM Tris/HCl, 100mM KCl, 1mM DTT, pH 8,0

Elutionspuffer: 20mM Tris/HCl, 100mM bis 1M KCl, 1mM DTT, pH 8,0

4.3.1.2 Reinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomüberständen (Sambrook et al., 1989)

Die Reinigung von Antikörpern basiert auf dem Prinzip der spezifischen Bindung von Antikörpern an Protein A.

Hybridomüberstand wurde im Verhältnis 1:10 mit (10×) Bindungspuffer versetzt und ausgefallene Proteine für 5min bei 4°C mit 20.000g sedimentiert. Protein A – Sepharose wurde mit PBS äquilibriert, zur Bindung des Antikörpers zu dem Überstand aus der Zentrifugation gege-

ben und für 2h bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert. Das Sediment der Protein A – Sepharose mit dem gebundenen Antikörper wurde mit 20 Säulenvolumina Bindungspuffer gewaschen. Nach Zugabe des Elutionspuffers wurde das Eluat fraktioniert und mit Tris Base neutralisiert. Die Protein-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und dialysiert. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

PBS-Puffer: 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na₂HPO₄, 1,4mM KH₂PO₄, pH 7,3

Bindungspuffer: 100mM NaGlycinat, 300mM NaCl, pH 9,0

Elutionspuffer: 100mM KCitrat pH 3,0

4.3.1.3 *Kopplung des gereinigten Antikörpers an Bromcyan-aktivierte Sepharose (Schneider et al., 1982)*

Zur Herstellung einer 1ml Immunaффinitätschromatographie-Säule wurden 300mg BrCN-Sepharose 4B (Pharmacia) für 20min in 10ml 1mM HCl bei 4°C auf dem Rollenmischer gequollen. Die gequollene BrCN-Sepharose wurde mit 1mM HCl gewaschen und mit Kopplungspuffer äquilibriert. 5 bis 10mg gereinigter monoklonaler Anti-p53-Antikörper pAb421 in Kopplungspuffer wurde bei 4°C auf dem Rollenmischer über Nacht an die BrCN-Sepharose gekoppelt. Die Kopplung wurde durch eine Analyse des Überstands und der Matrix mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung quantifiziert. Die Matrix wurde in eine Polypropylen-säule (BioRad) gegeben und mit 50 Säulenvolumina Kopplungspuffer gewaschen. Freie Stellen der BrCN-Sepharose wurden mit 100mM Tris/HCl pH 8,0 bei 4°C blockiert. Vor dem Einsatz wurde die Säule mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert.

Kopplungspuffer: 100mM NaHCO₃, 500mM NaCl, pH 8,3

4.3.1.4 *Immunaффinitätschromatographie von rekombinantem p53 (Huang, 1998)*

Die vereinigten Fraktionen des Eluats aus der Heparin-Sepharose-Chromatographie wurden auf eine äquilibrierte Immunaффinitäts-Chromatographie-Säule gegeben. Als Matrix diente der Bromcyan-Sepharose gekoppelte monoklonale Anti-p53-Antikörper pAb421. Die beladene Säule wurde mit 10 Säulenvolumina Waschpuffer I und 10 Säulenvolumina Waschpuffer II gewaschen. Nach Zugabe des Elutionspuffers wurde das Eluat fraktioniert und die Protein-

haltigen Fraktionen vereinigt und dialysiert. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Waschpuffer I: 20mM Tris/HCl, 150mM KCl, 1mM DTT, pH 8,0

Waschpuffer II: 20mM Tris/HCl 500mM KCl, 1mM DTT, pH 8,0

Elutionspuffer: 20mM Tris/HCl 2M KCl, 1mM DTT, pH 9,0

4.3.1.5 Metallaffinitätschromatographie von rekombinantem Ref-1

Das verwendete Reinigungsverfahren entsprach den Angaben des Herstellers der Ni-NTA-Agraeose (Qiagen).

Das Sediment aus 500ml Bakterienkultur mit überexprimiertem rekombinantem humanen Ref-1 oder den Fragmenten Ref-1 AS 1-127 und Ref-1 AS 61-318 wurde für 1h bei 4°C auf dem Rollenmischer in 10ml Lysispuffer resuspendiert. Nach Ultraschall-Aufschluss wurden die Zelltrümmer bei 4°C mit 12.000g für 20min sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte Metallaffinitätschromatographie-Säule mit Ni-NTA-Agraeose gegeben. Die Säule wurde mit 50 Säulenvolumina Waschpuffer I und 50 Säulenvolumina Waschpuffer II gewaschen und anschließend auf Waschpuffer I äquilibriert. Nach Zugabe des Elutionspuffers wurde das Eluat fraktioniert und die Haupt-Protein-Fraktion dialysiert. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Lysispuffer: 20mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 0,5% (v/v) NP-40, 1mM DTT, Proteaseinhibitoren (2mM Na₂SO₄, 2mM Pefabloc (Boehringer), 50µg/ml Leupeptin, 1% (v/v) Trasylol), pH 8,0

Waschpuffer I: 20mM Tris/HCl, 100mM KCl, 20mM Imidazol, pH 8,0

Waschpuffer II: 20mM Tris/HCl 500mM KCl, 20mM Imidazol, pH 8,0

Elutionspuffer: 20mM Tris/HCl 100mM KCl, 300mM Imidazol, pH 8,0

4.3.2 Dialyse (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Dialyse diente dem Austausch des Elutionspuffers einer Proteinlösung gegen den Lagerungspuffer zum Einfrieren gereinigter Proteine.

10 bis 20cm lange Dialyseschläuche wurden für 10min in 2% (w/v) NaHCO₃ und 1mM EDTA pH 8,0 gekocht. Anschließend wurden die Schläuche mit Wasser gespült und erneut für 10min in 1mM EDTA pH 8,0 gekocht. Die Schläuche wurden in 50% Ethanol und 1mM ED-

TA bei 4°C gelagert. Vor der Benutzung wurden die Dialyseschläuche mit destilliertem Wasser gespült.

Das Eluat der Proteinreinigung wurde im Verhältnis 1:1000 gegen den Lagerungspuffer über Nacht unter Rühren bei 4°C dialysiert.

Lagerungspuffer (p53): 20mM Tris/HCl, 150mM KCl, 1mM DTT, pH 7,5

Lagerungspuffer (Ref-1): 10mM HEPES/KOH, 1mM DTT, pH 7,9

4.3.3 *Bestimmung der Proteinkonzentration* (Bradford, 1976)

Die Konzentrationsbestimmung basiert auf der Anfärbung der Proteine mit dem anionischen blauen Farbstoff Coomassie Brillant Blau G-250.

10µl der Proteinlösung wurden mit ddH₂O auf 800µl aufgefüllt und mit 200µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad) versetzt. Nach einer Inkubation von 10min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595nm gegen einen Leerwert gemessen und mit einer entsprechend erstellten BSA-Eichreihe verglichen.

4.3.4 *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese* (Laemmli, 1970)

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in einer denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese ist antiproportional dem dekadischen Logarithmus ihrer molaren Massen. Um dies trotz unterschiedlicher Konformationen zu ermöglichen, werden die Proteine in einem SDS-haltigen Probenpuffer Hitze-denaturiert. Die Denaturierung gleicht unterschiedliche Konformationen weitestgehend ab und das SDS bewirkt eine gleichmäßige Ladungsverteilung für die Wanderung im elektrischen Feld.

Zur Qualitätskontrolle der gereinigten Proteine wurden 10µl Proteinlösung mit 2µl (6×) SDS-Probenpuffer versetzt und 5min bei 96°C inkubiert. Die Proben wurden auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel bestehend aus Sammel- und Trenngel geladen und bei konstant 15mA im elektrischen Feld aufgetrennt. Der pH-Sprung am Übergang vom Sammelgel zum Trenngel, sowie die deutlich höhere Akrylamidkonzentration im Trenngel führen zu einer Fokussierung der Proteinbanden und damit zu einer besseren Separation unterschiedlicher Proteine im Trenngel.

Zur Analyse von kreuzvernetztem p53 wurden 40µl Reaktionsansatz mit 9µl (6×) SDS-Probenpuffer ohne DTT versetzt. Die Proben wurden auf ein kontinuierliches Polyakrylamidgel bestehend aus einem Gradienten von 2-15% geladen und bei konstant 100V im elektrischen Feld aufgetrennt. Das Gradientengel wurde mit einem Gradientenmischer aus einer 2%igen und 15%igen Akrylamidlösung hergestellt. Gradientengele ermöglichen eine bessere Auftrennung von Proteinen mit sehr unterschiedlicher molarer Masse, da die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld mit von der Akrylamid-Konzentration des Gels bestimmt wird.

SDS-Probenpuffer: 47mM Tris/HCl, 5% (v/v) Glycerin, 0,2% (w/v) SDS, 0,0002% (w/v) Bromphenolblau, 83mM DTT, pH 6,8

Sammelgel-Puffer: 125mM Tris/HCl, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED, pH 6,8

Trenngel-Puffer: 375mM Tris/HCl, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED, pH 8,8

Elektrophorese-Puffer: 25mM Tris Base, 200mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

4.3.5 *Native Polyacrylamidgelelektrophorese* (Schägger & Jagow, 1987)

Zur Trennung oligomerer und multimerer p53-Komplexe und p53/DNA-Komplexe wurde eine native Gradienten-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde mit einem Gradientenmischer ein kontinuierliches Trenngel einer Konzentration von 2% bis 6% Polyakrylamid in (0,5×) TBE-Puffer gegossen.

Zur Analyse der Interaktion von p53, Ref-1 und DTT wurden die Komponenten in den im Experiment angegebenen Konzentrationen dem Reaktionspuffer zugefügt. Wurden bei dem Experiment radioaktiv markierte Nukleinsäuresubstrate verwendet, wurden diese mit 500cpm/µl (gemessen im Scintillationszähler) ohne Kompetitor-DNA dem Reaktionsansatz zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurden für 30min bei Raumtemperatur inkubiert und direkt auf das native Gradienten-Gel geladen. Die Trennung erfolgte im elektrischen Feld mit einer Spannung von konstant 200V in (0,5×) TBE-Puffer. Proteine und DNA wurden nach dem Lauf auf eine PVDF-Membran transferiert.

Reaktionspuffer: 50mM Tris/HCl, 4mM EDTA, 50mM NaCl, 100ng/µl BSA, 20% Glycerol, pH 7,5

TBE-Elektrophorese Puffer: 89mM Tris Base, 89mM Borsäure, 2mM EDTA

4.3.6 Coomassie Brilliant Blau Proteinfärbung (Blakesley & Boezi, 1977)

Zum unspezifischen Nachweis von Proteinen nach der Auftrennung in einer denaturierenden SDS-PAGE wurden die Proteine im Polyakrylamidgel mit Coomassie Brilliant Blau eingefärbt.

Das Gel wurde nach dem Lauf in eine Coomassie-Färbelösung gegeben und für 15-30min unter Schwenken eingefärbt. Anschließend wurde das Gel in Wasser von den Resten der Färbelösung befreit und in Schnellentfärber unter Schwenken entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Um ein Reißen des Gels beim Trocknen zu verhindern, wurde das Gel für eine Stunde in einer Trocknungslösung eingelegt und in Azetatfolie getrocknet.

Coomassie-Färbelösung: 0,05% (w/v) Coomassie Serva Blue R-250 (Biomol), 45% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure

Schnellentfärber: 10% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure

Trocknungslösung: 35% (v/v) Ethanol, 2% (v/v) Glycerol

4.3.7 Western Blot und Immunodetektion (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979)

Proteine aus einer nativen oder denaturierenden Polyakrylamidgelelektrophorese wurden mit einer Semi-Dry-Blottingapparatur (Bio-Rad) durch ein elektrisches Feld auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Immobilon-P Transfermembran (Millipore) transferiert.

Die PVDF-Membran wurde zur besseren Benetzung der hydrophoben Oberfläche kurz in Methanol eingebracht und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Das Polyakrylamidgel wurde blasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt und beiderseits mit jeweils drei Lagen Whatmanpapier bedeckt, die zuvor mit Transferpuffer befeuchtet wurden. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur für 1h bei einer Stromstärke von $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$.

Wurde ein Reaktionsansatz aufgetrennt und transferiert, der radioaktiv markierte DNA enthielt, wurde zunächst ein Autoradiogramm durch die Exposition der PVDF-Membran mit einem Biomax Röntgenfilm (Kodak) oder mit einem Phosphorimager Screen (Fujifilm) bei 4°C erstellt.

Der erfolgreiche Transfer von Proteinen konnte durch eine Färbung mit Ponceau S Rot ermittelt werden. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran in Blockierungslösung für 1h bei Raumtemperatur geschwenkt. Zur Reaktion von

transferiertem p53 mit dem monoklonalen Antikörper DO-1 wurde die Membran mit Hybridomüberstand im Verhältnis 1:10 in Blockierungspuffer über Nacht bei 4°C geschwenkt. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen in Blockierungspuffer entfernt und ein mit Peroxidase gekoppelter Antikörper gegen DO-1 (Anti-Maus IgG) im Verhältnis 1:10.000 in Blockierungspuffer zu der Membran gegeben. Die Membran wurde 1h bei Raumtemperatur geschwenkt und der überschüssige Antikörper anschließend durch waschen mit TTBS entfernt.

Die spezifische Detektion der p53 Proteinbanden erfolgte über eine Chemilumineszenzreaktion, bei der die Peroxidase des sekundären Antikörpers den Farbstoffs Luminol spaltet.

Die ECL-Lösungen I und II wurden miteinander gemischt und nach einer Minute Inkubation bei Raumtemperatur die Membran in die Lösung gegeben. Die Chemilumineszenzreaktion wurde durch Exposition mit einem Röntgenfilm (Kodak) dokumentiert.

Transferpuffer (Harlow & Lane): 48mM Trisbase, 39mM Glycin, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

Blockierungspuffer: 100mM Tris/HCl, 0,9% (w/v) NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, 5% (w/v) Magermilchpulver, pH 7,5

TTBS: 100mM Tris/HCl, 0,9% (w/v) NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,5

ECL-Lösung I: 100mM Tris/HCl, 2,5mM Luminol, 400mM Paracoumarinsäure, pH 8,5

ECL-Lösung II: 100mM Tris/HCl, 0,1% (v/v) H₂O₂, pH 8,5

4.3.8 Färbung mit Ponceau S Rot

Die PVDF-Membran wurde für 5min bei Raumtemperatur in der Ponceau S Lösung gefärbt und anschließend für 2min in Wasser entfärbt, um die Färbung der Proteinbanden von der Membran abzuheben. Nach der Dokumentation konnte die Färbung durch eine Inkubation von 10min in Wasser vollständig entfärbt werden.

Ponceau S Lösung: 0,5% (w/v) Ponceau S, 1% (v/v) Eisessig

4.3.9 Elektrophoresis-Mobility-Shift-Assay (EMSA) (Göhler *et al.*, 2002)

Zur Analyse des Einflusses von pAb421, DTT bzw. Ref-1 auf p53 wurden die Komponenten in den im Experiment angegebenen Konzentrationen dem Reaktionspuffer zugefügt. Die entsprechenden radioaktiv markierten Nukleinsäuresubstrate wurden in einer Konzentration von

500cpm/ μ l (gemessen im Scintillationszähler) mit 12,5ng/ μ l der entsprechenden Kompetitor-DNA dem Reaktionsansatz zugesetzt. Differenzen in den Volumina bei der Zusammenstellung der Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Proteinmengen wurden durch Zugabe des entsprechenden Dialysepuffers ausgeglichen. Die Kontroll-Proteinreinigung wurde mit dem gleichen Volumen wie das höchste zugegebene Volumen der verwendeten Ref-1-Proteinpräparation zugefügt.

Die Reaktionsansätze wurden für 30min bei Raumtemperatur inkubiert und direkt auf das native EMSA-Gel geladen. Die Trennung erfolgte im elektrischen Feld mit einer Spannung von konstant 200V in (0,25 \times) Elektrophorese-Puffer. Nach dem Lauf wurde das Gel auf Whatmanpapier getrocknet und autoradiographisch ausgewertet.

Reaktionspuffer: 50mM Tris/HCl, 4mM EDTA, 50mM NaCl, 100ng/ μ l BSA, 20% Glycerol, pH 7,5

Elektrophorese-Puffer: 40mM Tris Base, 1,1mM EDTA, 37mM NaAc/HAc pH 7,8

EMSA-Gel: 4% PAA, (0,5 \times) Elektrophorese-Puffer, 15% (v/v) Glycerol

4.3.10 *Densitometrische Vermessung radioaktiver Banden*

Exponierte Phosphorimager-Screens (Fujifilm) wurde mit einem Phosphorimager (Molecular Dynamics) eingelesen. Röntgenfilme wurden mit einem ScanJet 4c (Hewlett Packard) digitalisiert. Die densitometrische Vermessung der digitalisierten Banden erfolgte mit dem Software-Programm Tina V2.09

4.3.11 *Kreuzvernetzung von Proteinen durch Diamid (Xanthoudakis et al., 1994)*

Die Kreuzvernetzung basiert auf der Oxidation reaktiver Cysteinreste interagierender Proteine durch Diamid (Azodicarboxylsäurebis[dimethylamid]).

0,15 μ M p53 und/oder 1 μ M Ref-1 wurden in EMSA-Puffer für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation wurde nach Zugabe von 10mM Diamid (Sigma) für 20min fortgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend durch eine denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine nach einem Western Blot durch Immunodetektion analysiert.

Reaktionspuffer: 50mM Tris/HCl, 4mM EDTA, 50mM NaCl, 100ng/ μ l BSA, 20% Glycerol, pH 7,5

5 Ergebnisse

5.1 Die Proteine

Die für diese Arbeit verwendeten Proteinreinigungsverfahren entsprachen etablierten Methoden, die für die entsprechenden Proteine nachweislich reine und funktionsfähige rekombinante Proteine liefern.

5.1.1 Rekombinanter humaner Redox-Faktor 1

5.1.1.1 Klonierung

Die Wildtyp cDNA des humanen Redox-Faktors 1 wurde als ein bakteriell exprimierbares Konstrukt eines GST-Fusionsproteins freundlicherweise von Prof. Dr. Kaina zur Verfügung gestellt und im Zuge dieser Arbeit in den bakteriellen Expressionsvektor pH6Ex3 inseriert (Konstrukt: *ref-1* wt / pH6Ex3).

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden zwei Fragmente der Wildtyp cDNA amplifiziert, die für die beiden funktionellen Domänen des Ref-1-Proteins kodieren. Diese wurden wie die Wildtyp cDNA in den Vektor pH6Ex3 inseriert. Die Basensequenz 1 bis 381 (Aminosäurereste: 1-127) kodiert für die Ref-1-Redox-Regulationsdomäne (Konstrukt: *ref-1* AS 1-127 / pH6Ex3). Die Basensequenz 382 bis 954 (Aminosäurereste: 61-318) kodiert für die Ref-1-Reparaturdomäne (Konstrukt: *ref-1* AS 61-318 / pH6Ex3).

Eine Übersicht zeigt Abbildung 5-1.

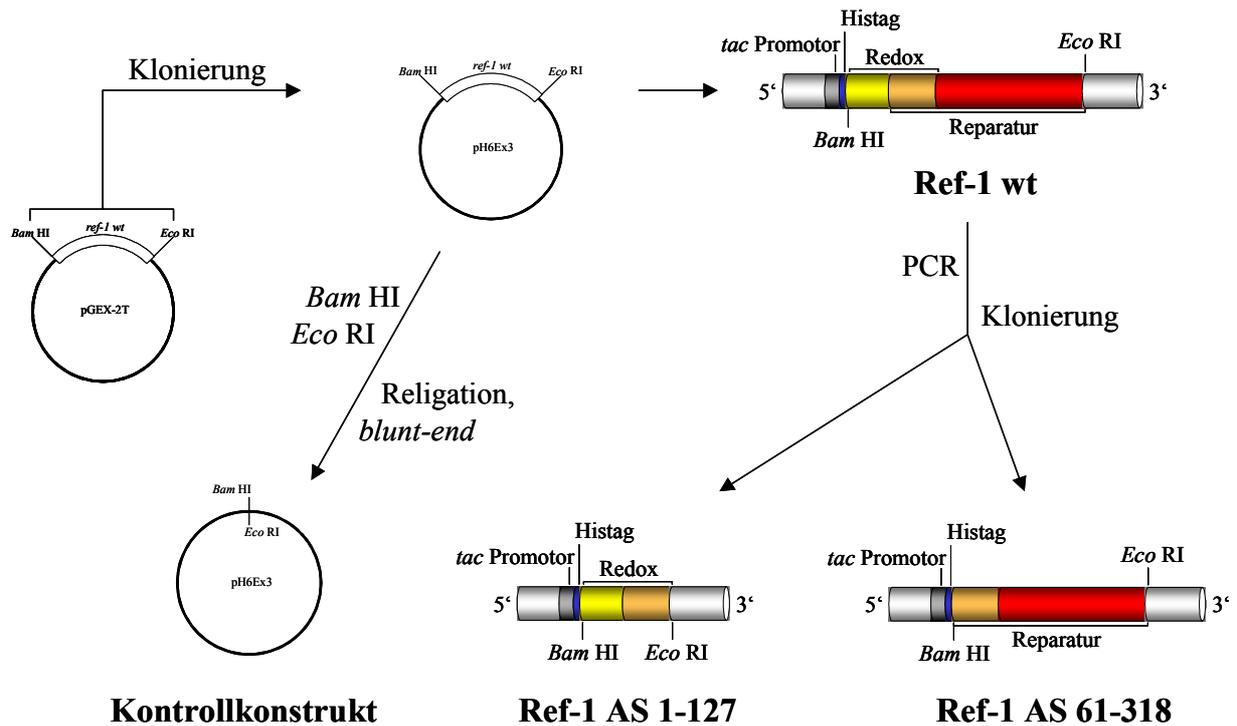


Abb. 5-1 Klonierung der *ref-1* cDNA. Die cDNA von Wildtyp *ref-1* wurde aus dem Vektor pGEX-2T mit *Bam* HI und *Eco* RI ausgeschnitten und in den bakteriellen Expressionsvektor pH6Ex3 inseriert. Durch spezifische *Primer* wurde das Wildtyp-Gen mittels PCR in zwei Fragmenten amplifiziert, die in den Vektor pH6Ex3 inseriert wurden. Blau: Aminoterminales Histidin-Hexapeptid und Vektorsequenz bis zur *Bam* HI-Schnittstelle, gelb: Aminoterminaler Teil der Redox-Regulationsdomäne, orange: Überlappungsbereich der Redox-Regulations- und Reparaturdomäne, rot: Reparaturdomäne, dunkelgrau: *tac* Promotor, hellgrau: Teil der unspezifischen Vektorsequenz von pH6Ex3. Als Kontrollkonstrukt für die bakteriell exprimierte Proteine wurde der Vektor pH6Ex3 mit *Bam* HI und *Eco* RI geschnitten und nach der Bildung von stumpfen Enden religiert.

5.1.1.2 Reinigung

Ref-1 AS 1-127 und Ref-1 AS 61-318 wurden wie Wildtyp Ref-1 in *Escherichia coli* DH5 α bakteriell als rekombinante Proteine mit einem aminoterminalen Histidin-Hexapeptid exprimiert. Dies ermöglichte eine Reinigung der Proteine durch Metallaffinitäts-Chromatographie (Abb. 5-2). Die Reinigung mittels Metallaffinitäts-Chromatographie führte zu der Begründung von Ref-1 als Redox-modulierender Aktivator (Xanthoudakis & Curran, 1992).

Als Kontrolle für eventuelle Verunreinigungen bei der Proteinreinigung von Ref-1, die zu einer Ref-1-unabhängigen Beeinflussung von p53 in den Experimenten führen könnten, wurde die Wildtyp *ref-1*-cDNA aus dem Vektor pH6Ex3 wieder ausgeschnitten und der leere

Vektor religiert (Abb. 5-1). Mit diesem Vektor wurden den drei *ref-1*-Konstrukten entsprechend *Escherichia coli* Zellen transformiert und nach Expression der Proteine das Bakterien-Lysat über Metallaffinitäts-Chromatographie gereinigt.

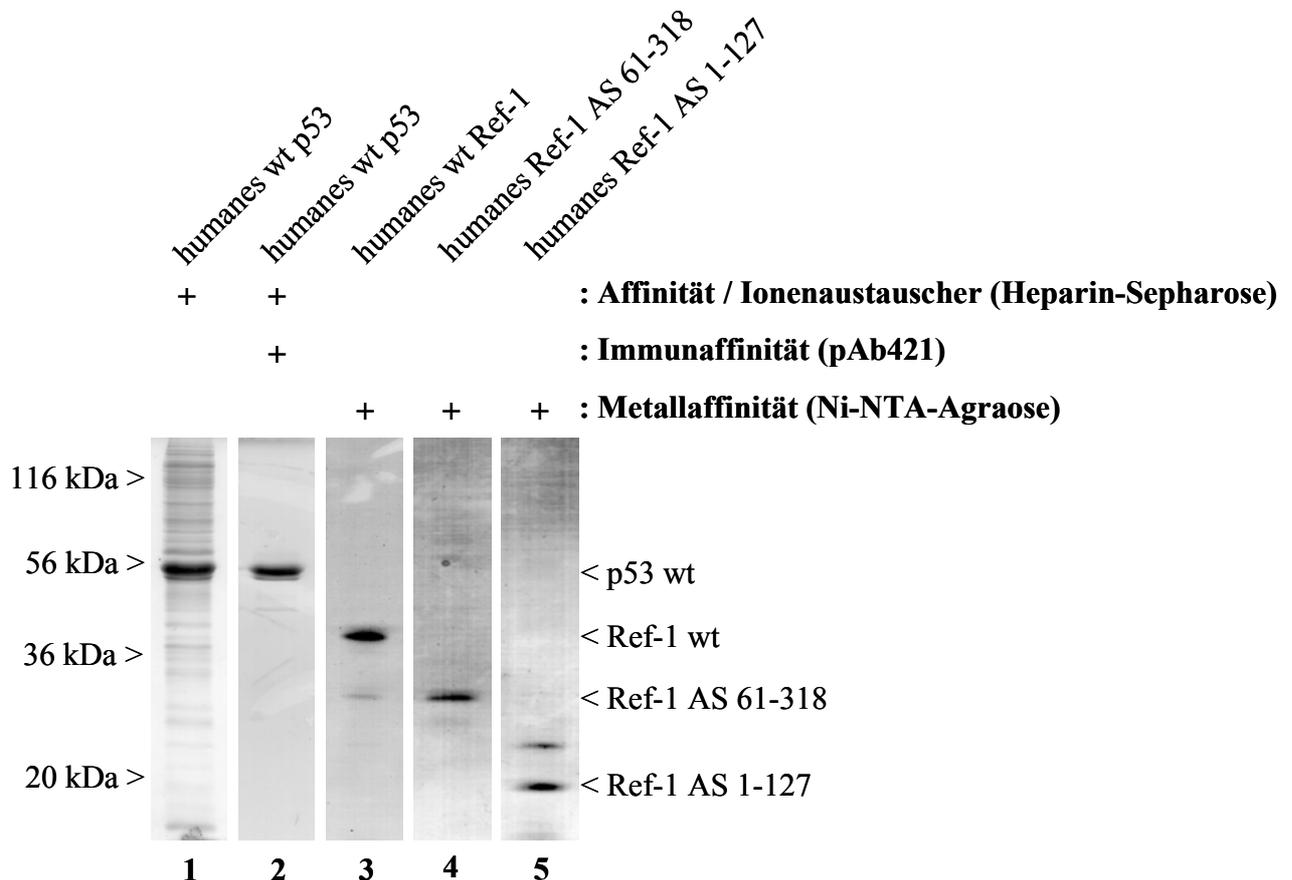


Abb. 5-2 SDS-PAGE der gereinigten Proteine. Die rekombinanten Proteine wurden in *High-Five*-Insektenzellen (p53) oder *Escherichia coli* DH5 α (Ref-1) exprimiert und mit verschiedenen Verfahren gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliantblau angefärbt.

5.1.2 Rekombinantes humanes p53

Der humane Tumorsuppressor p53 wurde als rekombinantes Wildtyp-Protein in *High-Five*-Insektenzellen aus Eizellen der Spezies *Trichoplusia Ni* exprimiert anschließend in einem zweistufigen Prozess gereinigt (Abb. 5-2). Durch dieses Reinigungsverfahren konnte rekombinantes humanes Wildtyp p53 ohne die Hilfe eines *tag* gereinigt werden, so dass der im Folgenden untersuchte Einfluss von Ref-1 auf p53 nicht beeinträchtigt werden konnte.

Im ersten Schritt der Reinigung wurde das exprimierte Protein an eine Heparin-Sepharose-Säule gebunden (Janus *et al.*, 1999). Der zweite Schritt der Reinigung erfolgte mittels Immunaффinitäts-Chromatographie (Huang, 1998); hierzu wurde das Protein an Bromcyan-Sepharose gekoppelte monoklonale Antikörper pAb421 gebunden. Die gereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Färbung mit Coomassie Brilliantblau auf ihre Reinheit untersucht (Abb. 5-2).

5.1.3 *Dialyse zur Vermeidung oxidativer Schäden*

In dieser Arbeit sollte die Regulation von p53 durch Redoxmodulation von Ref-1 untersucht werden. Der Oxidationsgrad von p53 war für die Experimente deshalb von entscheidender Bedeutung.

Eine Oxidation von p53 führt zum Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit des Proteins, was u.a. auf eine Freisetzung des komplexierten Zink-Ions zurückzuführen ist. Die Reduktion des Proteins stellt die DNA-Bindungsfähigkeit prinzipiell wieder her. Hierbei gilt es jedoch zu bedenken, dass eine Oxidation und ein damit verbundener Verlust eines koordinierenden Metall-Ions einer partiellen Denaturierung des Proteins gleich kommt, da die Tertiärstruktur des Proteins beeinträchtigt wird. Eine anschließende Reduktion des Proteins müsste somit einen Renaturierungsvorgang einleiten, bei dem nicht gewährleistet ist, dass die korrekte Konformation und Funktionalität des Proteins wieder hergestellt wird. Um eine Denaturierung und anschließende Renaturierung zu verhindern, wurde das Protein bei einer Konzentration von 1mM DTT dialysiert. Eine Oxidation und die damit einhergehende Schädigung des Proteins sollte damit von vornherein vermieden werden. Die Konzentration von 1mM DTT liegt um den Faktor 10 niedriger als die DTT-Konzentration, bei der die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 ihr Maximum erreicht (Kapitel 5.2). Für den DNA-Bindungs-Assay ergibt sich zusätzlich eine 40fache Verdünnung, so dass p53 ohne eine weitere Zugabe von DTT sich in einer Konzentration von 0,025mM DTT befand und somit 400fach unterhalb des Optimums.

5.2 Der Einfluss von pAb421 bzw. DTT auf die p53-Nukleinsäurebindung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Ref-1, in Analogie zu pAb421, die Bindung der regulatorischen Domäne von p53 an DNA verhindert und dadurch die spezifische Bindung von p53 an die p53-Konsensussequenz in linearer oder nicht-linearer Konformation reguliert. Modifikationen der regulatorischen Domäne von p53, wie Phosphorylierung, Deletion oder die Bindung des monoklonalen Antikörpers pAb421, verhindern die Bindung der regulatorischen Domäne von p53 an DNA. Dies führt zu einer Steigerung der Bindung von p53 an die p53-Konsensussequenz in linearer Konformation, während die Bindung an die Konsensussequenz in nicht-linearer Konformation gehemmt wird (Kapitel 1.1.4).

Um den Einfluss von Ref-1 auf p53 untersuchen zu können, sollten zunächst die Voraussetzungen für diese Untersuchungen geschaffen werden.

In den Bindungsstudien dieser Arbeit, die zur Aufklärung des Einflusses von Ref-1 auf p53 dienen sollten, wurde die Bindung an drei Nukleinsäuresubstrate (Kapitel 3.5) untersucht:

Die spezifische Bindung von p53 an die p53-Konsensussequenz in linearer Konformation wird ausschließlich von der p53-Kerndomäne vermittelt. Für eine effektive Bindung muss eine Interaktion der regulatorischen Domäne von p53 mit der DNA verhindert werden. Diese Bindung wird im Folgenden als sequenzspezifische DNA-Bindung bezeichnet. Zur Untersuchung dieser Bindung wurde die p53-Konsensussequenz aus dem Promotor des *p21*-Gens verwendet, das im Folgenden als sequenzspezifisches DNA-Substrat bezeichnet wird.

Die spezifische Bindung von p53 an die p53-Konsensussequenz in nicht-linearer Konformation wird sowohl von der Kerndomäne als auch von der regulatorischen Domäne vermittelt. Für eine effektive Bindung muss die regulatorische Domäne von p53 mit der DNA interagieren.

Diese Bindung wird im Folgenden als strukturspezifische DNA-Bindung bezeichnet. Zur Untersuchung dieser Bindung wurde die p53-Konsensussequenz aus dem Promotor des *p21*-Gens verwendet und in einer Baumstruktur stabilisiert. Im Folgenden wird diese DNA als strukturspezifisches DNA-Substrat bezeichnet.

Die spezifische Bindung von p53 an den untranslatierten Bereich der murinen *p53* mRNA wird, ebenso wie die strukturspezifische DNA-Bindung, sowohl von der Kerndomäne als auch von der regulatorischen Domäne vermittelt. Auch hier muss für eine effektive Bindung die regulatorische Domäne von p53 mit der RNA interagieren können. Die Bindung von p53 an die von dieser RNA gebildete Haarnadelschleife wird im Folgenden als strukturspezifische RNA-Bindung bezeichnet, die RNA als strukturspezifisches RNA-Substrat.

Die Redox-unabhängige Bindung von pAb421 an die regulatorische Domäne von p53 verhindert die Bindung dieser Domäne an die drei beschriebenen Nukleinsäuresubstrate. Dieser Einfluss auf die spezifische Bindung von p53 sollte von dem Einfluss einer Redox-abhängigen Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne unterschieden werden. Das Disulfid-reduzierende DTT steigert die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 (Kapitel 1.1.5). Der Einfluss von DTT auf die spezifische Bindung von p53 an die verwendeten strukturspezifischen Substrate wurde bislang noch nicht untersucht.

Die Auswirkungen einer Bindung von pAb421 an die regulatorischen Domäne von p53 und die Auswirkungen der DTT-vermittelten Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne auf die p53-spezifische Bindung an die drei verschiedenen Nukleinsäuresubstrate sind hier noch einmal tabellarisch zusammengefasst:

Art der p53-Nukleinsäurebindung	pAb421	Reduktion (DTT)
Sequenzspezifische DNA-Bindung	Steigerung	Steigerung
Strukturspezifische DNA-Bindung	Minderung	?
Strukturspezifische RNA-Bindung	Minderung	?

Im Folgenden wird der Einfluss von pAb421 bzw. DTT auf die spezifische Bindung von p53 an die drei Nukleinsäuresubstrate untersucht und verglichen.

5.2.1 Der Einfluss von pAb421 bzw. DTT auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53

Der Einfluss von pAb421 auf die Bindung von p53 an das sequenzspezifische DNA-Substrat wurde bei einer Konzentration von 1mM DTT im EMSA untersucht. Die Reaktionsansätze wurden hierzu in einem nativen Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Abbildung 5-3a zeigt das Autoradiogramm des radioaktiv markierten Substrats. In Spur 1 ist die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 in Abwesenheit von pAb421 zu erkennen. Die sichtbare Verschiebung (*Shift*) der Bande (Spur 1 oben) gegenüber dem ungebundenen sequenzspezifischen DNA-Substrat (Spur 1 unten) wird durch die Bindung von p53 und die damit einhergehende Verringerung der Mobilität des Substrats verursacht. p53 besitzt in Abwesenheit von pAb421 eine geringe Affinität zum Substrat. Durch Zugabe des Antikörpers

pAb421 nimmt die Intensität der *Shiftbande* um das 30fache zu (Spur 2). Die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 wird durch die pAb421-Bindung gesteigert. Gleichzeitig führt die Bindung des Antikörpers an p53 zu einer weiteren Verringerung der Mobilität des p53/DNA-Komplexes. Es kommt im EMSA zu einem *Supershift*.

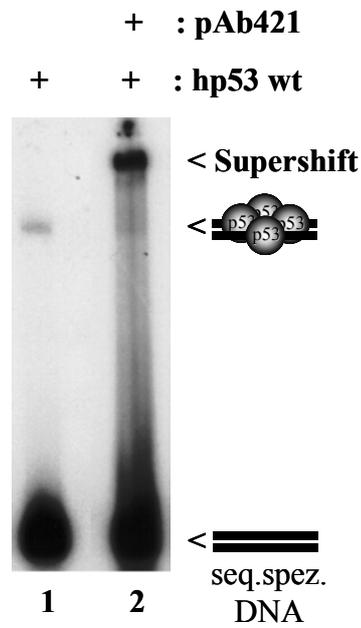


Abb. 5-3a Einfluss des monoklonalen Antikörpers pAb421 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 im EMSA. Die Substratbindung wird durch pAb421 gesteigert. Es kommt zu einem durch die Antikörperbindung bedingten *Supershift*. Spur 1: 0,15µM p53 ohne pAb421. Spur 2: 0,15µM p53 mit 1µM pAb421.

Der Einfluss von pAb421 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 sollte mit dem Einfluss einer Reduktion verglichen werden. Hierzu wurde die Bindung von p53 an das sequenzspezifische DNA-Substrat bei steigender DTT-Konzentration in Abwesenheit von pAb421 im EMSA untersucht.

Abbildung 5-3b zeigt den Einfluss des Reduktionsmittels DTT auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53. In Spur 1 ist die Bindung von p53 ohne Zugabe von DTT gering. Durch Zugabe von DTT wird die Bindung von p53 bis zu einer Konzentration von 10mM verdoppelt (Spur 2-6). Eine weitere Erhöhung der DTT-Konzentration auf 100mM führt zu einer 6fachen Verminderung der DNA-Bindung von p53 (Spur 8).

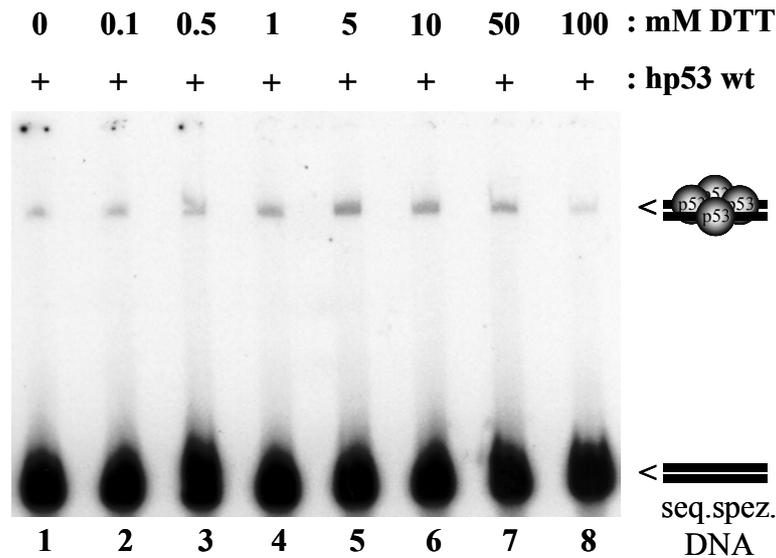


Abb. 5-3b Einfluss des Disulfid-reduzierenden DTT auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 im EMSA. Dem Ansatz wurde DTT in steigenden Konzentrationen zugegeben. Die Substratbindung wird bis zu einer Konzentration von 10mM DTT gesteigert und bei weiterer Erhöhung vermindert. Spur 1: 0,15µM p53 ohne Zugabe von DTT. Spur 2-8: 0,15µM p53 mit 0,1 bis 100mM DTT.

Die Reduktion von p53 führt somit zu einer gesteigerten Bindung von p53 an das sequenzspezifische DNA-Substrat. Diese Bindung wird durch eine verstärkte Reduktion aber wieder vermindert.

Ein Vergleich des Einflusses von pAb421 mit dem Einfluss von DTT auf p53 zeigt, dass pAb421 die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 deutlich stärker steigert als DTT.

pAb21 steigert nicht die sequenzspezifische DNA-Bindung an oxidiertes p53, da die Oxidation zu einer partiellen Denaturierung der p53-Kendomäne führt, die nicht mehr sequenzspezifisch DNA binden kann (Kapitel 1.1.5). Der additive Effekt von DTT und pAb421 ist bei geringen DTT-Konzentrationen von 1mM deutlich zu erkennen (Abb. 5-3a). Hohe DTT-Konzentrationen führen dagegen zu einer Denaturierung des Antikörpers durch Spaltung von Disulfidbrücken und konnten aus diesem Grund nicht untersucht werden.

5.2.2 Der Einfluss von pAb421 bzw. DTT auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53

Der Einfluss von pAb421 auf die Bindung von p53 an das strukturspezifische DNA-Substrat wurde bei einer Konzentration von 1mM DTT im EMSA untersucht.

Abbildung 5-4a zeigt in Spur 1 die strukturspezifische DNA-Bindung von p53 ohne den Einfluss von pAb421. p53 besitzt eine hohe Affinität zum Substrat. Durch die Zugabe des Antikörpers wird die strukturspezifische DNA-Bindung von p53 deutlich verringert (Abb. 5-4a, Spur 2).

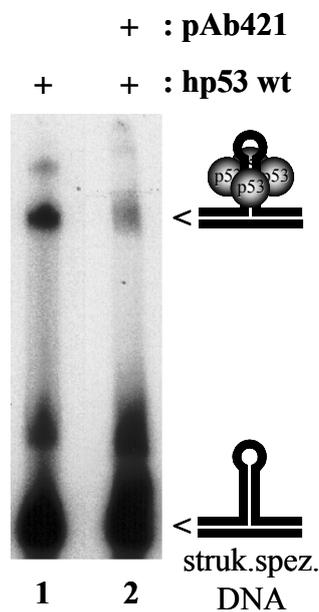


Abb. 5-4a Einfluss des monoklonalen Antikörpers pAb421 auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53 im EMSA. Die Substratbindung wird durch pAb421 vermindert. Spur 1: 0,15μM p53 ohne pAb421. Spur 2: 0,15μM p53 mit 1μM pAb421.

Die strukturspezifische DNA-Bindung von p53 wird durch die pAb421-Bindung vermindert. pAb421 verhindert die Bindung der regulatorische Domäne von p53 an das spezifische DNA-Substrat. Die Affinität der p53-Kerndomäne für das strukturspezifische DNA-Substrat ist ohne Bindung durch die regulatorische Domäne gering. Die sequenzspezifische DNA-Bindung wird hingegen ausschließlich von der p53-Kerndomäne vermittelt. Aufgrund dieses Unterschiedes lässt sich anhand der spezifischen Nukleinsäurebindung ein Redox-unabhängiger Einfluss auf die regulatorischen Domäne von p53 erkennen.

Der Einfluss von pAb421 auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53 sollte mit dem Einfluss einer Reduktion verglichen werden. Hierzu wurde die Bindung von p53 an das strukturspezifische DNA-Substrat bei steigender DTT-Konzentration im EMSA untersucht.

Abbildung 5-4b zeigt den Einfluss des Reduktionsmittels DTT auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53. In Spur 1 ist die Bindung von p53 ohne Zugabe von DTT zu sehen. Durch Zugabe von DTT wird die Bindung von p53 bis zu einer Konzentration von 10mM gesteigert (Spur 2-7). Eine weitere Erhöhung der DTT Konzentration auf 100mM führt zu keiner signifikanten Veränderung der DNA-Bindung von p53 (Spur 8).

Die Reduktion von p53 führt somit zu einer gesteigerten Bindung von p53 an das strukturspezifische DNA-Substrat, die sich durch eine verstärkte Reduktion aber nicht weiter steigern lässt.

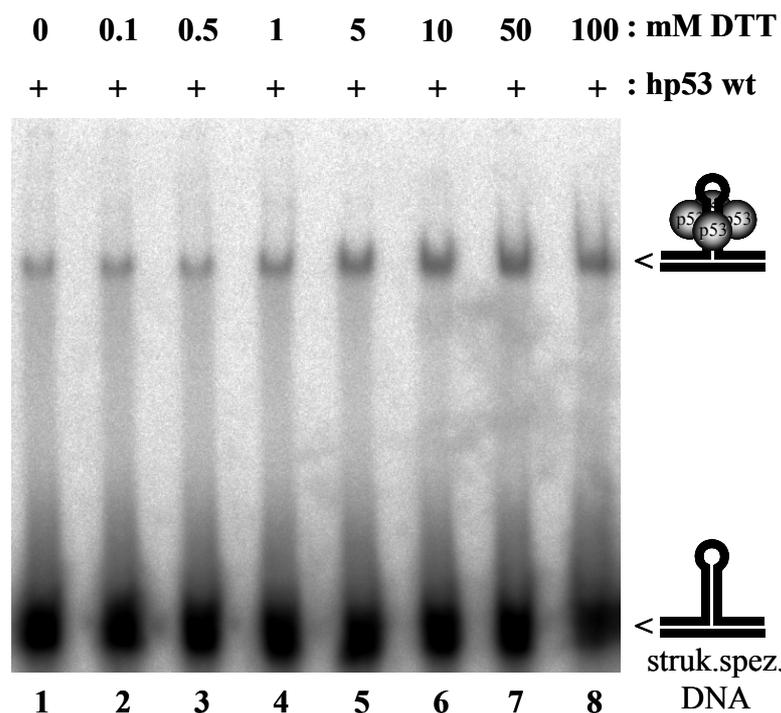


Abb. 5-4b Einfluss des Disulfid-reduzierenden DTT auf die Bindung des p53 an das strukturspezifische DNA-Substrat im EMSA. Dem Ansatz wurde DTT in steigenden Konzentrationen zugegeben. Die Substratbindung wird bis zu einer Konzentration von 10mM DTT aktiviert, verändert sich bei weiterer Erhöhung jedoch nicht. Spur 1: 0,15µM p53 ohne Zugabe von DTT. Spur 2-8: 0,15µM p53 mit 0,1 bis 100mM DTT.

5.2.3 Der Einfluss von pAb421 bzw. DTT auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53

Der Einfluss von pAb421 auf die Bindung von p53 an das strukturspezifische RNA-Substrat wurde bei einer Konzentration von 1mM DTT im EMSA untersucht.

Die Abbildung 5-5a zeigt in Spur 1 die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 ohne den Einfluss von pAb421. p53 besitzt eine hohe Affinität zum Substrat. Durch die Zugabe des Antikörpers wird die Bindung von p53 fast vollständig inhibiert (Abb. 5-5a, Spur 2).

Die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 wird durch die pAb421-Bindung vermindert.

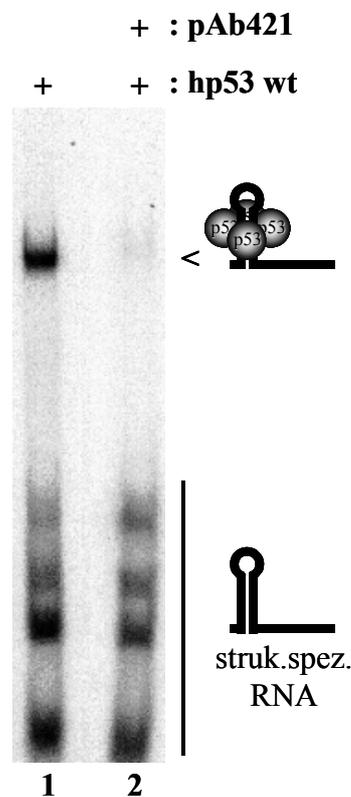


Abb. 5-5a Einfluss des monoklonalen Antikörpers pAb421 auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 im EMSA. Die Substratbindung wird durch pAb421 inhibiert. Spur 1: 0,15µM p53 ohne pAb421. Spur 2: 0,15µM p53 mit 1µM pAb421.

Der Einfluss von pAb421 auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 sollte mit dem Einfluss einer Reduktion verglichen werden. Hierzu wurde die Bindung von p53 an das strukturspezifische RNA-Substrat bei steigender DTT-Konzentration im EMSA untersucht.

Abbildung 5-5b zeigt den Einfluss des Reduktionsmittels DTT auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53. In Spur 1 ist die Bindung von p53 ohne Zugabe von DTT zu sehen. Durch Zugabe von DTT wird die Bindung von p53 bis zu der maximal eingesetzten Konzentration von 100mM gesteigert (Spur 2-8). Auch durch hohe DTT-Konzentrationen wird die p53-Bindung an das RNA-Substrat nicht beeinträchtigt.

Die Reduktion von p53 führt somit zu einer gesteigerten Bindung von p53 an das strukturspezifische RNA-Substrat, die sich auch durch eine verstärkte Reduktion weiter steigern lässt.

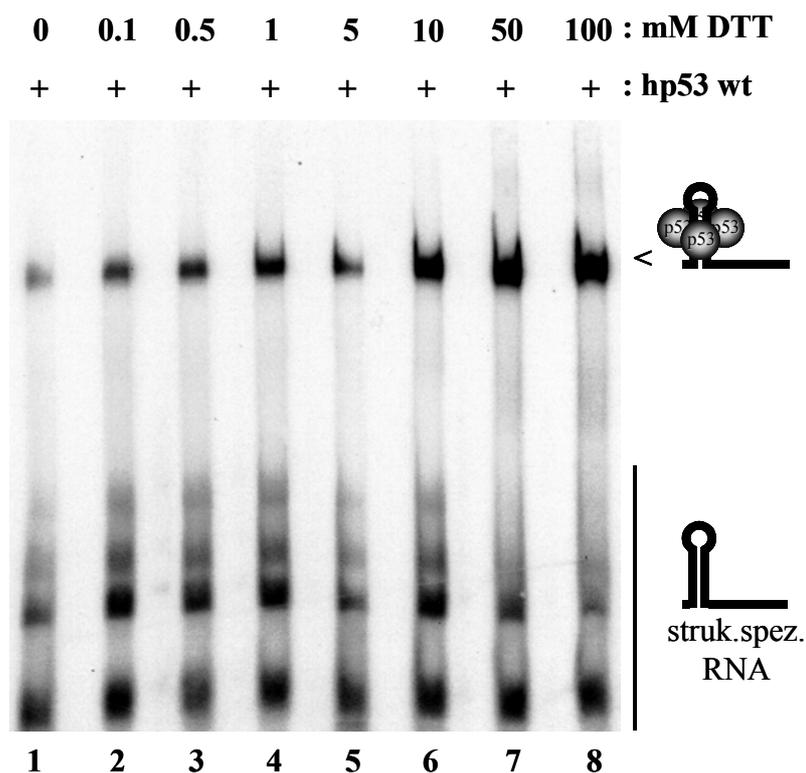


Abb. 5-5b Einfluss des Disulfid-reduzierenden DTT auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 im EMSA. Dem Ansatz wurde DTT in steigenden Konzentrationen zugegeben. Die Substratbindung lässt sich bis zu einer Konzentration von 100mM DTT steigern. Spur 1: 0,15µM p53 ohne Zugabe von DTT. Spur 2-8: 0,15µM p53 mit 0,1 bis 100mM DTT.

Die Erkenntnisse aus Kapitel 5.2 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Der Redox-unabhängige Einfluss von pAb421 auf die regulatorische Domäne von p53 führt durch den Verlust der Bindungsaktivität dieser Domäne an das Nukleinsäuresubstrat, zu einer signifikanten Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung durch die p53-Kerndomäne. Die Bindung an das strukturspezifische DNA-Substrat und an das strukturspezifische RNA-Substrat wird hingegen deutlich vermindert.

Das Disulfid-reduzierende DTT bewirkt bei der spezifischen Nukleinsäurebindung von p53 im Gegensatz zu der Wirkung von pAb421 eine Steigerung der Bindung an alle eingesetzten Nukleinsäure-Substrate.

Die zu Beginn dieses Kapitels dargestellte Tabelle kann somit vervollständigt werden:

Art der p53-Nukleinsäurebindung	pAb421	Reduktion (DTT)
Sequenzspezifische DNA-Bindung	Steigerung	Steigerung
Strukturspezifische DNA-Bindung	Minderung	Steigerung
Strukturspezifische RNA-Bindung	Minderung	Steigerung

DTT und pAb421 unterscheiden sich demnach grundsätzlich in ihrem Einfluss auf p53. Damit kann der Redox-unabhängige Einfluss auf die regulatorische Domäne von p53 von dem Redox-abhängigen Einfluss der Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne anhand der Bindung von p53 an die drei unterschiedlichen Nukleinsäuresubstrate unterschieden werden.

Der Vergleich des Einflusses, den pAb421 bzw. DTT auf die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 ausüben, kann dazu verwendet werden, den Einfluss von Ref-1 auf p53 zu charakterisieren.

Verhindert die Interaktion von Ref-1 mit der regulatorischen Domäne von p53 die Bindung dieser Domäne an das Nukleinsäuresubstrat, führt dies zu einer Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung. Entsprechend muss bei diesem Redox-unabhängigen Einfluss die strukturspezifische Nukleinsäurebindung an das DNA- und das RNA-Substrat vermindert werden.

Ist Ref-1 hingegen in der Lage, die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 an alle drei Substrate zu steigern, dann ist der Einfluss von Ref-1 ausschließlich Redox-abhängig und die Wirkung auf eine Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne beschränkt.

5.3 Der Einfluss von Ref-1 auf die p53-Nukleinsäurebindung

Die gewonnenen Erkenntnisse aus dem Vergleich des Einflusses von pAb421 bzw. DTT auf die p53-spezifische Nukleinsäurebindung sollen hier für die Untersuchung des Einflusses, der von Ref-1 auf p53 ausgeübt wird, verwendet werden.

Die Auswirkungen des Einflusses von pAb421 bzw. des Einflusses von DTT auf die Nukleinsäurebindung von p53 bei Verwendung der drei verschiedenen Nukleinsäuresubstrate soll auf Ref-1 erweitert werden:

Art der p53 Nukleinsäurebindung	pAb421	Reduktion (DTT)	Ref-1
Sequenzspezifische DNA-Bindung	Steigerung	Steigerung	Steigerung
Strukturspezifische DNA-Bindung	Minderung	Steigerung	?
Strukturspezifische RNA-Bindung	Minderung	Steigerung	?

Im folgenden wird der Einfluss von Ref-1 auf die spezifische Bindung von p53 an die drei in Kapitel 5.2 verwendeten Nukleinsäuresubstrate untersucht und mit dem Einfluss von pAb421 bzw. DTT auf die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 verglichen.

Ziel dieses Vergleichs war es zu ermitteln, ob Ref-1 Redox-unabhängig die Bindung der regulatorischen Domäne von p53 an DNA verhindert und dadurch die sequenzspezifische DNA-Bindung steigert.

5.3.1 Der Einfluss von Ref-1 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53

In einer Kontrollreaktion wurde untersucht, ob gereinigtes Ref-1-Protein Verunreinigungen aufweist, die zu einer Verfälschung der folgenden Experimente führen könnten. Hierzu wurde das Kontrollkonstrukt, das den religierten Expressionsvektor nach Ausschnitt der Wildtyp *ref-1*-cDNA darstellt (Abb. 5-1), in *Escherichia coli* DH5 α exprimiert und das Bakterienlysat anschließend durch Metallaffinitäts-Chromatographie gereinigt. Das dialysierte Eluat dieser Reinigung wurde zum Vergleich einem von zwei p53-Reaktionsansätzen zugegeben. Die p53-Reaktionsansätze wurden ebenso wie Ref-1 auf die Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat bei einer Konzentration von 10mM DTT im EMSA untersucht.

Abbildung 5-6a zeigt in Spur 1 die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 bei einer Konzentration von 10mM DTT. Durch die Zugabe der Kontroll-Proteinreinigung wird die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 nicht verändert (Spur 2). Ref-1 selbst bindet nicht an das sequenzspezifische DNA-Substrat (Spur 3).

Der Einfluss, den Ref-1 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 ausübt, stammt weder von einer Verunreinigung durch die Proteinreinigung, noch durch die Bindung von Ref-1 an das verwendete Substrat.

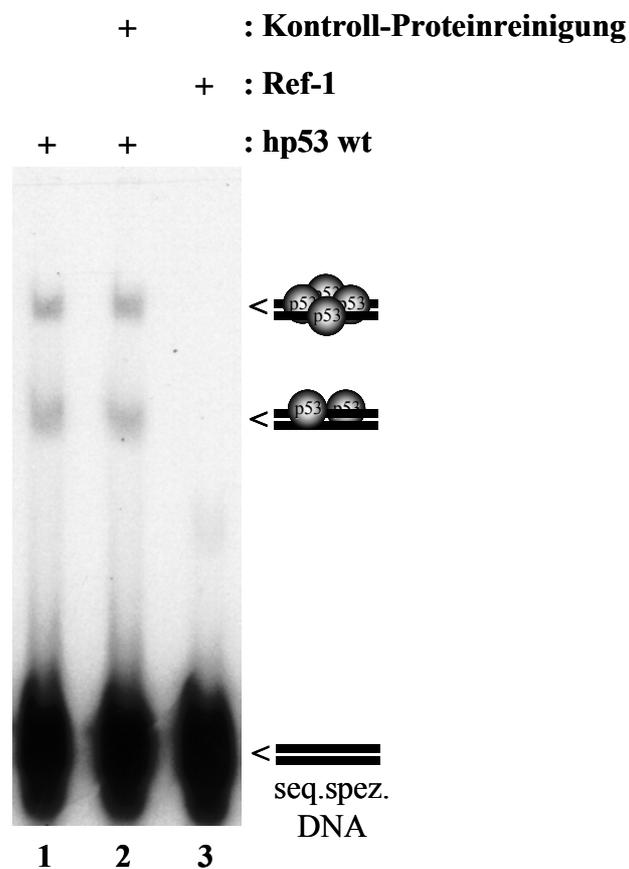


Abb. 5-6a Untersuchung des Einflusses von Ref-1 auf die p53-Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat im EMSA. Die Zugabe der Kontroll-Proteinreinigung zeigt keinen Einfluss auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53. Ref-1 bindet nicht an das sequenzspezifische DNA-Substrat. Spur 1: 0,15µM p53 mit 10mM DTT. Spur 2: 0,15µM p53 mit Kontroll-Proteinreinigung. Spur 3: 1,5µM Ref-1 ohne p53.

Der Einfluss, den pAb421 bzw. DTT auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 ausüben (Kapitel 5.2.1), sollte mit dem Einfluss, den Ref-1 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 ausübt, verglichen werden. Hierzu wurde zunächst die Redox-Abhängigkeit des Einflusses von Ref-1 auf die p53-Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat in Abwesenheit von pAb421 durch eine steigende DTT-Konzentration bei gleichbleibender Ref-1-Konzentration untersucht (Abb. 5-6b). Anschließend wurde, ebenfalls in Abwesenheit von pAb421, der Einfluss einer steigenden Ref-1-Konzentration bei einer konstanten Konzentration von 10mM DTT im EMSA untersucht (Abb. 5-6c).

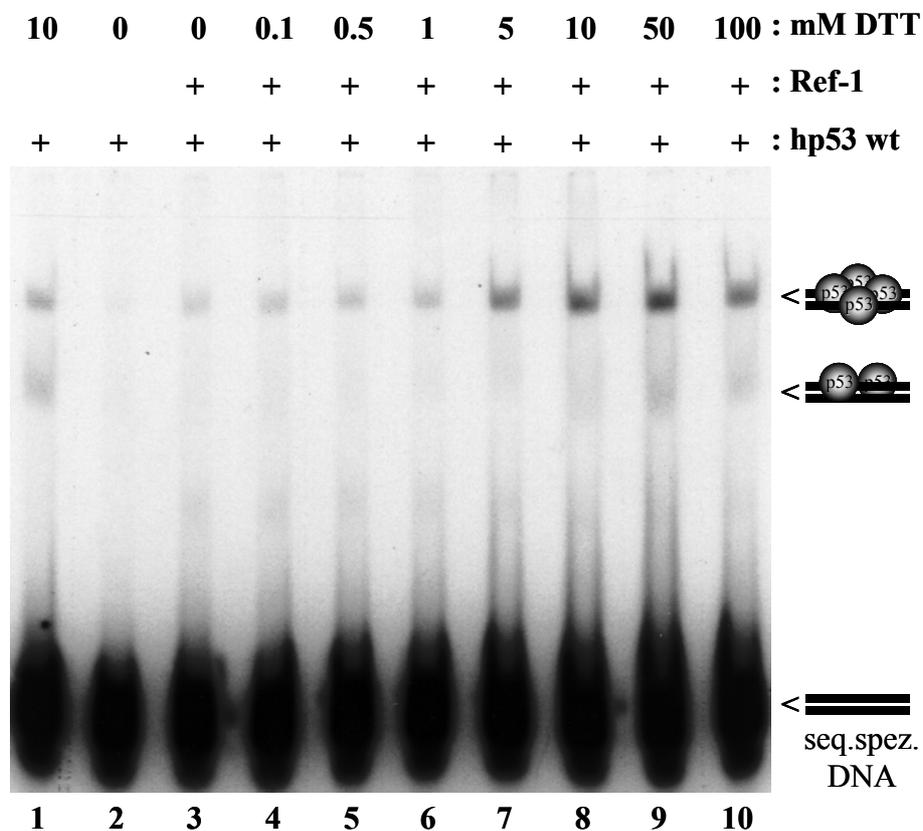


Abb. 5-6b Einfluss des reduzierenden Sulphydrylreagenzes DTT auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 bei konstanter Ref-1-Konzentration im EMSA. Dem Ansatz wurde DTT in steigenden Konzentrationen zugegeben. Die Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung von p53 durch Ref-1 ist abhängig von der DTT Konzentration. Spur 1: 0,15μM p53 ohne Ref-1 bei 10mM DTT. Spur 2: 0,15μM p53 ohne Ref-1 und ohne DTT. Spur 3: 0,15μM p53 mit 1μM Ref-1 ohne DTT. Spur 4-10: 0,15μM p53 mit 1μM Ref-1 bei 0,1 bis 100mM DTT.

Abbildung 5-6b zeigt den Einfluss von DTT auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 in Gegenwart von Ref-1. In Spur 1 ist die p53-Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat bei einer Konzentration von 10mM DTT zu erkennen. Spur 2 zeigt die gleiche Reaktion ohne Zugabe von DTT. Die Bindung von p53 ohne Zugabe von DTT an das sequenzspezifische DNA-Substrat (Spur 2) ist deutlich schwächer als die von reduziertem p53 (Spur 1). Zugabe von Ref-1 führt zu einer leichten Steigerung der p53-Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat (Spur 3). Durch Zugabe von DTT bei konstanter Ref-1-Konzentration wird die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 gesteigert (Spur 4-9). Die Gegenwart von Ref-1 bewirkt eine 4fach höhere Steigerung der Bindung (Spur 8) als bei gleicher DTT-Konzentration ohne Ref-1 (Spur 1). Eine weitere Erhöhung der DTT-Konzentration auf 100mM führt zu einer Verminderung der sequenzspezifischen DNA-Bindung von p53 (Spur 10).

Dieser Versuch zeigte, dass der Einfluss, den Ref-1 auf p53 ausübt, durch Zugabe von DTT deutlich gesteigert werden kann. DTT und Ref-1 wirken additiv.

Abbildung 5-6c zeigt den Einfluss von Ref-1 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 bei einer Konzentration von 10mM DTT. In Spur 1 ist die Bindung von p53 in Abwesenheit von Ref-1 zu sehen. Durch Zugabe steigender Ref-1-Konzentrationen wird die Bindung von p53 um das 4fache gesteigert (Spur 2-7).

Ref-1 bewirkt in Gegenwart von DTT eine gesteigerte Bindung von p53 an das sequenzspezifische DNA-Substrat über die Steigerung der Bindung hinaus, die durch DTT allein maximal möglich ist.

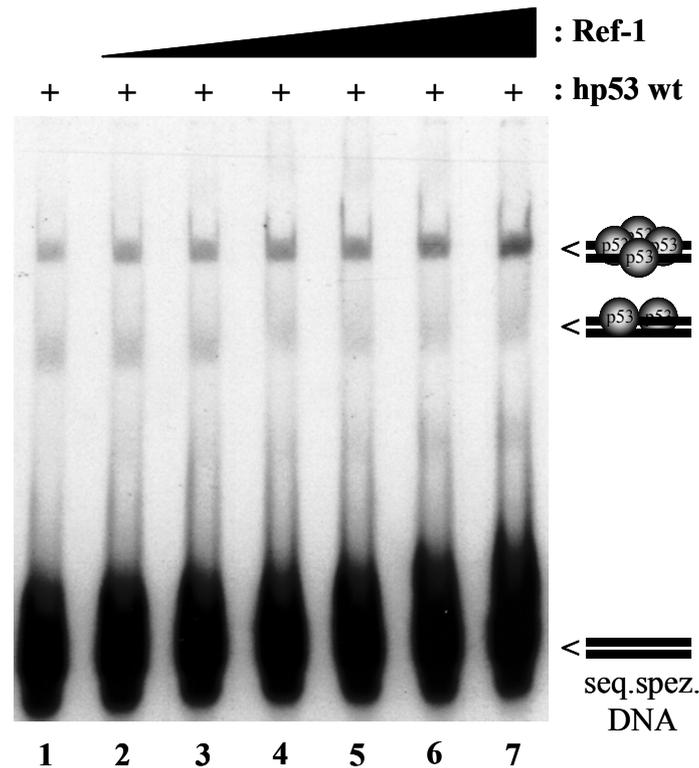


Abb. 5-6c Einfluss von Ref-1 auf die p53 Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat im EMSA. Dem Ansatz wurde Ref-1 in steigender Konzentration bei einer konstanten DTT Konzentration von 10mM zugegeben. Die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 wird in Gegenwart von DTT durch Ref-1 gesteigert. Spur 1: 0,15µM p53 ohne Ref-1. Spur 2-7: 0,15µM p53 mit 0,05 bis 1,5µM Ref-1.

5.3.2 Der Einfluss von Ref-1 auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53

Der Einfluss der Kontroll-Proteinreinigung auf die p53-Bindung an das strukturspezifische DNA-Substrat wurde bei einer Konzentration von 10mM DTT im EMSA untersucht. Ferner wurde die Bindung von Ref-1 an das gleiche Substrat bei einer Konzentration von 10mM DTT überprüft.

Abbildung 5-7a zeigt in Spur 1 die strukturspezifische DNA-Bindung von p53 bei einer Konzentration von 10mM DTT. Durch Zugabe der Kontroll-Proteinreinigung wird die Bindung von p53 nicht verändert (Spur 2). Ref-1 selbst bindet signifikant an das Substrat (Spur 3). Die Mobilität des Ref-1/DNA-Komplexes ist jedoch deutlich größer als die des p53/DNA-Komplexes. Die *Shiftbanden* beider Komplexe überlagern sich nicht.

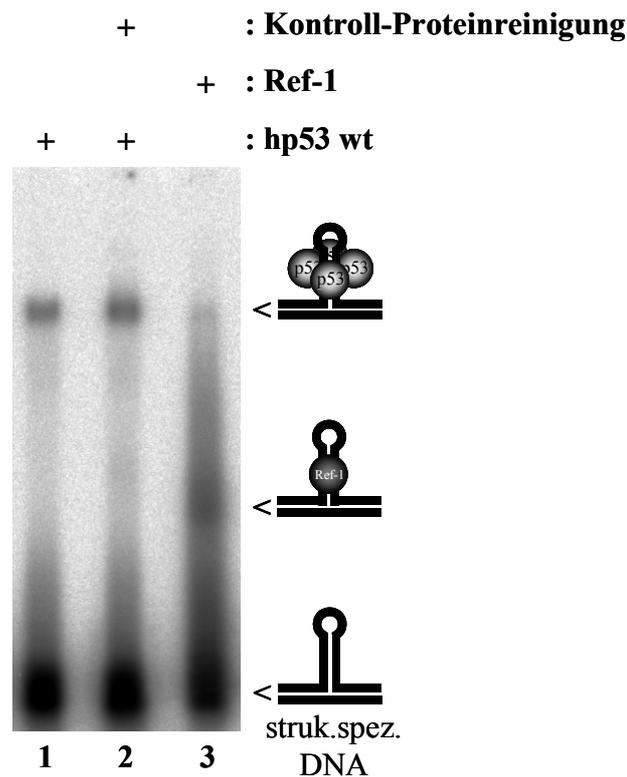


Abb. 5-7a Untersuchung des Einflusses von Ref-1 auf die p53-Bindung an das strukturspezifische DNA-Substrat im EMSA. Die Kontroll-Proteinreinigung zeigt keinen Einfluss auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53. Ref-1 bindet mit signifikanter Affinität an das Substrat. Die *Shiftbande* von Ref-1 überlagert sich jedoch nicht mit der von p53. Spur 1: 0,15µM p53 mit 10mM DTT. Spur 2: 0,15µM p53 mit Kontroll-Proteinreinigung. Spur 3: 1,5µM Ref-1 ohne p53.

Der Einfluss, den Ref-1 auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53 ausübt, stammt nicht von einer Verunreinigung durch die Proteinreinigung, jedoch besitzt Ref-1 unter den gegebenen Bedingungen eine signifikante Bindungsaffinität zum Substrat.

Der Einfluss, den pAb421 bzw. DTT auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53 ausüben (Kapitel 5.2.2), sollte mit dem Einfluss, den Ref-1 auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53 ausübt, verglichen werden. Hierzu wurde die Bindung von p53 an das strukturspezifische DNA-Substrat bei steigender Ref-1-Konzentration bei einer konstanten Konzentration von 10mM DTT im EMSA untersucht.

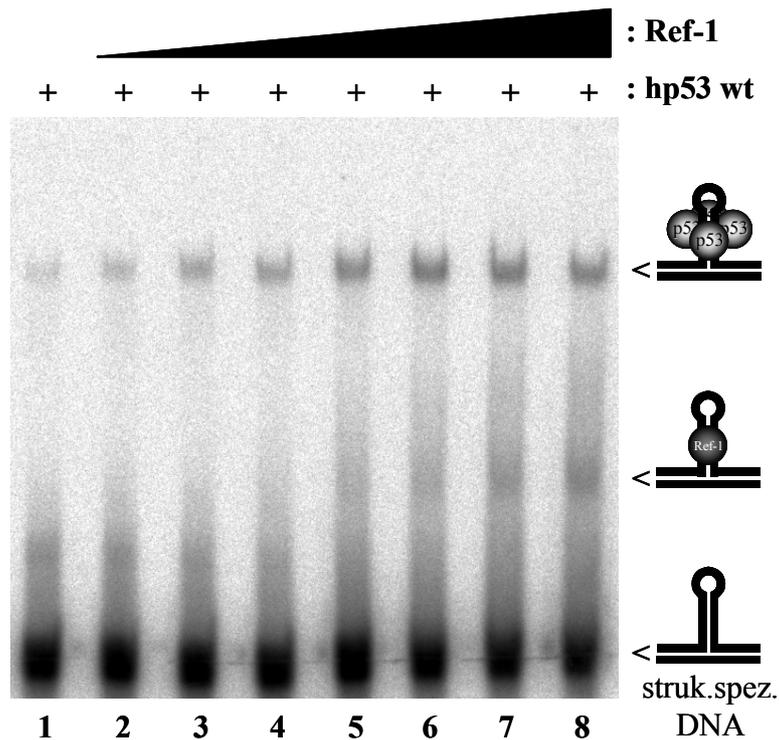


Abb. 5-7b Einfluss von Ref-1 auf die p53-Bindung an das strukturspezifische DNA-Substrat im EMSA. Dem Ansatz wurde Ref-1 in steigender Konzentration bei einer konstanten DTT-Konzentration von 10mM zugegeben. Die Bindung von p53 wird in Gegenwart von DTT durch Ref-1 gesteigert. Die Zugabe hoher Ref-1-Konzentrationen führt zur Konkurrenz mit p53 um das Substrat. Spur 1: 0,15μM p53 ohne Ref-1. Spur 2-8: 0,15μM p53 mit 0,05 bis 1,5μM Ref-1.

Abbildung 5-7b zeigt den Einfluss von Ref-1 auf die strukturspezifische DNA-Bindung von p53 bei einer Konzentration von 10mM DTT. In Spur 1 ist die Bindung von p53 in Abwesenheit von Ref-1 zu sehen. Durch Zugabe von Ref-1 wird die Bindung von p53 um das 5fache gesteigert (Spur 2-6). Eine weitere Erhöhung der Ref-1-Konzentration führt zu einer leichten Verminderung der DNA-Bindung von p53 (Spur 7 & 8). In gleichem Maß nimmt hier die Bindung von Ref-1 an das Substrat zu (Spur 7 & 8). Ref-1 konkurriert mit p53 um das Substrat, was zu einer Verminderung der p53-Bindung an das Substrat führt.

Ref-1 bewirkt in Gegenwart von DTT eine gesteigerte Bindung von p53 an das strukturspezifische DNA-Substrat.

2). Die Mobilität des Ref-1/RNA-Komplexes ist jedoch größer als die des p53/RNA-Komplexes. Die *Shiftbanden* beider Komplexe überlagern sich nicht.

Der Einfluss, den Ref-1 auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 ausübt, stammt nicht von einer Verunreinigung durch die Proteinreinigung, jedoch besitzt Ref-1 unter den gegebenen Bedingungen eine signifikante Bindungsaffinität zum Substrat.

Der Einfluss, den pAb421 bzw. DTT auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 ausüben (Kapitel 5.2.3), sollte mit dem Einfluss, den Ref-1 auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 ausübt, verglichen werden. Hierzu wurde die Bindung von p53 an das strukturspezifische RNA-Substrat bei steigender Ref-1-Konzentration bei einer konstanten Konzentration von 10mM DTT im EMSA untersucht.

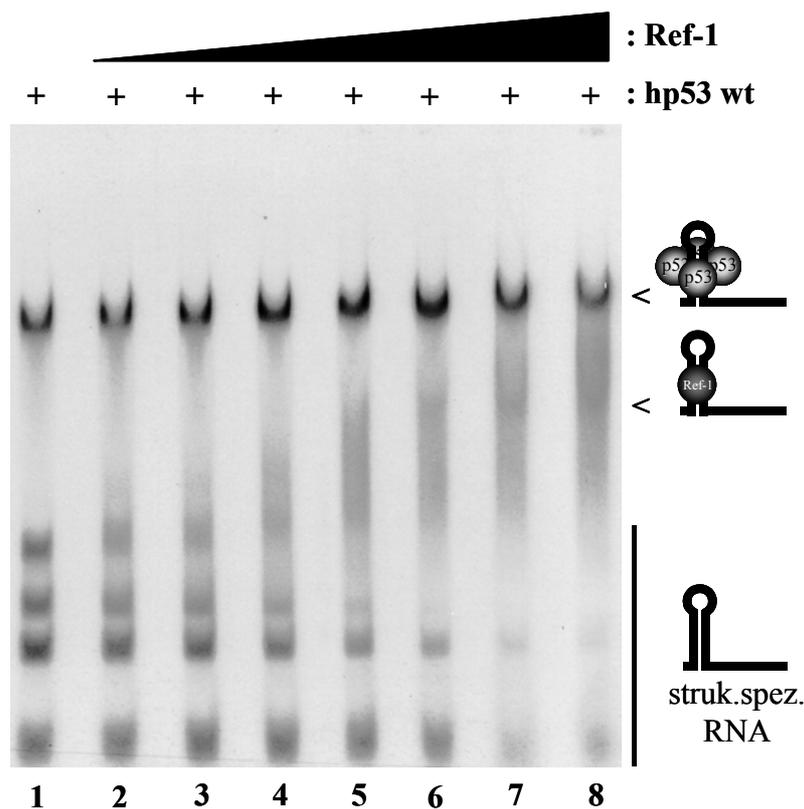


Abb. 5-8b Einfluss von Ref-1 auf die p53-Bindung an das strukturspezifische RNA-Substrat im EMSA. Dem Ansatz wurde Ref-1 in steigender Konzentration bei einer konstanten DTT-Konzentration von 10mM zugegeben. Die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 wird in Gegenwart von DTT durch Ref-1 gesteigert. Die Zugabe hoher Ref-1-Konzentrationen führt zur Konkurrenz mit p53 um das Substrat und zu dessen Degradation. Spur 1: 0,15µM p53 ohne Ref-1. Spur 2-8: 0,15µM p53 mit 0,05 bis 1,5µM Ref-1.

Abbildung 5-8b zeigt den Einfluss von Ref-1 auf die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 bei einer Konzentration von 10mM DTT. In Spur 1 ist die Bindung von p53 in Abwesenheit von Ref-1 zu sehen. Durch Zugabe steigender Ref-1-Konzentrationen wird die Bindung von p53 um das 2fache gesteigert (Spur 2-6). Eine weitere Erhöhung der Ref-1-Konzentration führt zu einer Verminderung der Bindung von p53 (Spur 7 & 8). In gleichem Maß nimmt hier die Bindung von Ref-1 an das Substrat zu (Spur 5-8). Ref-1 konkurriert mit p53 um das Substrat, was zusammen mit einer Degradation des RNA-Substrats zu einer Verminderung der p53-Bindung an das Substrat führt.

Ref-1 bewirkt in Gegenwart von DTT eine gesteigerte Bindung von p53 an das strukturspezifische RNA-Substrat.

Die Erkenntnisse aus Kapitel 5.3 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Der Einfluss, den Ref-1 auf die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 ausübt, führt zu einer signifikanten Steigerung der spezifischen Nukleinsäurebindung an alle eingesetzten Nukleinsäure-Substrate.

Die zu Beginn dieses Kapitels dargestellte Tabelle kann vervollständigt werden:

Art der p53-Nukleinsäurebindung	pAb421	Reduktion (DTT)	Ref-1
Sequenzspezifische DNA-Bindung	Steigerung	Steigerung	Steigerung
Strukturspezifische DNA-Bindung	Minderung	Steigerung	Steigerung
Strukturspezifische RNA-Bindung	Minderung	Steigerung	Steigerung

Der Einfluss, den Ref-1 auf die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 ausübt, wirkt auf die p53-Nukleinsäurebindung analog zum Disulfid-reduzierenden DTT.

Würde Ref-1, durch die Interaktion mit der regulatorischen Domäne von p53, die Bindung dieser Domäne an DNA verhindern und dadurch die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 steigern, hätte Ref-1 die Bindung von p53 an die strukturspezifischen Substrate hemmen müssen. Ref-1 steigert jedoch die strukturspezifische Nukleinsäurebindung sowohl an das DNA- als auch an das RNA-Substrat.

Der Vergleich des Einflusses von pAb421 mit dem Einfluss von Ref-1 auf die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 zeigt, dass die Ref-1-vermittelte Aktivierung von p53 nicht durch die Interaktion mit der regulatorischen Domäne von p53 verursacht wird.

Folglich muss die Ref-1-vermittelte Steigerung der spezifischen Nukleinsäurebindung von p53 auf einer Redoxregulation von p53 basieren. Die Analogie des Einflusses von Ref-1 mit dem Einfluss des Disulfid-reduzierenden DTT auf die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 stützt dieses Ergebnis. Die Interaktion von Ref-1 mit p53 basiert somit nicht auf einer, durch Ref-1 verursachten, gestörten Bindungsaktivität der regulatorischen Domäne von p53 an DNA, sondern auf einer Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne.

Ref-1 steigert in Gegenwart von DTT die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 über die Steigerung der Bindung durch DTT hinaus.

5.4 Der Einfluss von Ref-1 auf die Quartärstruktur von p53

p53 ist ein heterogenes Protein, das sich bei eukaryotischer Expression durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen und durch zahlenmäßig unterschiedlich assemblierte Protomere unterscheiden kann. In nativen Gelen kann dies aufgrund unterschiedlicher Mobilitäten zur Auftrennung in mehrere Banden führen.

In den Experimenten zur Ref-1-vermittelten Steigerung der spezifischen Nukleinsäurebindung von p53 wiesen einige Proteinreinigungen unterschiedlich assembliertes p53 auf (Kapitel 5.3.1, Abb. 5-6a bis 5-6c). Der Einfluss von Ref-1 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung der unterschiedlichen p53-Komplexe war nicht identisch. p53 bildet Oligomere durch Assemblierung von Protomeren zu Dimeren und von Dimeren zu Tetrameren. Diese Assemblierung wird durch die Oligomerisierungsdomäne des p53-Carboxyterminus vermittelt. p53-Tetramere können sich weiter zu Multimeren zusammenlagern. Diese Assoziation wird von der Kerndomäne vermittelt und als Stapelung (*stacking*) bezeichnet (Kapitel 1.1. 6).

Der Einfluss, den Ref-1 auf die Veränderung der p53-Quartärstruktur ausübt, wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht.

5.4.1 Der Einfluss von Ref-1 auf p53-Oligomere und Multimere

Der Einfluss, den Ref-1 auf eine p53-Proteinreinigung aus unterschiedlichen Oligomeren und Multimeren ausübt, wurde durch Zugabe von Ref-1 zu einer solchen Proteinpräparation deutlich. Die unterschiedlichen p53-Komplexe waren im EMSA durch die Bindung von p53 an das sequenzspezifische DNA-Substrat bei einer Konzentration von 1mM DTT nachweisbar.

Abbildung 5-9 zeigt den Einfluss von Ref-1 auf unterschiedliche Oligomere und Multimere von p53. Die Kontrolle (Spur 1) enthält nur das sequenzspezifische DNA-Substrat. Als weitere Kontrolle wurde zu dem sequenzspezifischen DNA-Substrat Ref-1 hinzugegeben (Spur 2). Ref-1 weist keine signifikante Bindung an das Substrat auf. p53 bildet unterschiedliche Oligomere und Multimere (Spur 3). Diese werden durch eine unterschiedliche Mobilität der p53/DNA-Komplexe bei der Bindung an das Substrat nachweisbar. Ein Vergleich der relativen Mobilität von p53-Komplexen im nativen Gel nach Göhler *et al.* (2002) weist die vorhandenen *Shiftbanden* als p53-Komplexe des Dimers, Trimers, Tetramers und Oktamers aus

(Spur 3). Das p53-Trimer stellt keine native Quartärstruktur von p53 dar, sondern ist sehr wahrscheinlich ein Artefakt der Proteinreinigung.

Zugabe von Ref-1 zu dem gleichen Reaktionsansatz führt zur Auflösung der *Shiftbanden* 1, 2 und 4 und zur Intensivierung der *Shiftbande* 3, dem angenommenen p53-Tetramer/DNA-Komplex (Spur 4). Die Summe der Intensitäten der *Shiftbanden* aus Spur 3 entspricht der Intensität der *Shiftbande* aus Spur 4.

Die Bindung von pAb421 an p53 führt zu einer weiteren Verringerung der Mobilität unterschiedlicher *Shiftbanden* verschiedener p53-Komplexe zu einer *Supershiftbande* und bestätigt damit, dass die *Shiftbanden* in Spur 3 von p53 verursacht werden (Spur 5).

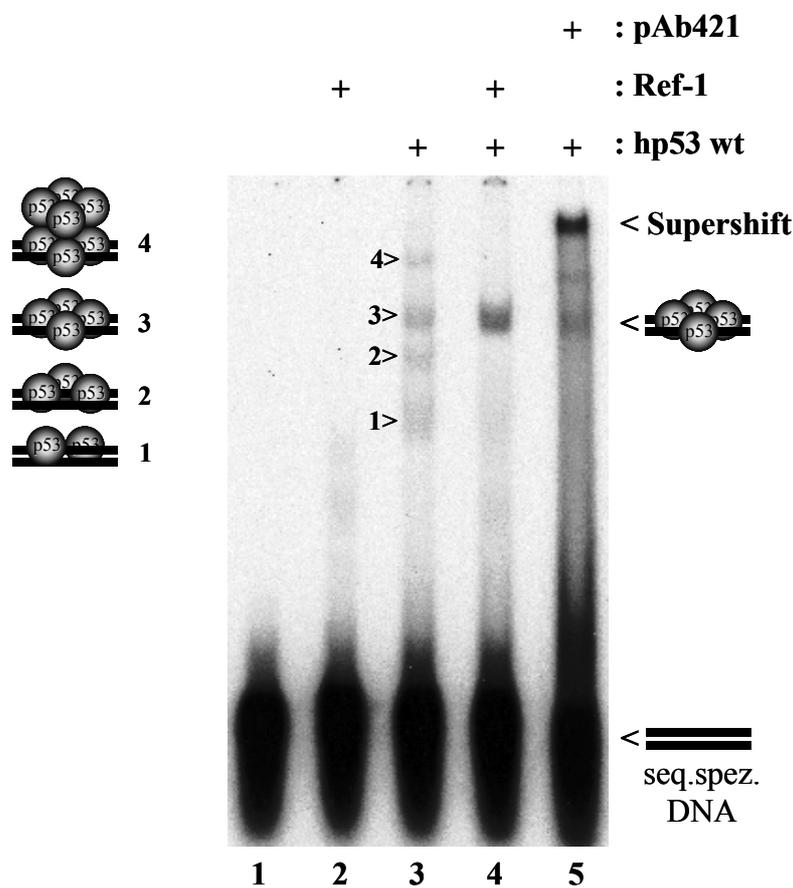


Abb. 5-9 Einfluss von Ref-1 auf die Bindung unterschiedlicher p53-Oligomere und Multimere an das sequenzspezifische DNA-Substrat im EMSA. Die Zugabe von Ref-1 zu einer Proteinpräparation aus unterschiedlichen p53-Oligomeren und Multimeren resultiert in einer gesteigerten Bindung des p53-Tetramers an das sequenzspezifische DNA-Substrat. Der *Supershift* durch pAb421 bestätigt die p53-spezifische Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat. Die Reaktionsansätze enthielten 1mM DTT. Spur 1: sequenzspezifisches DNA-Substrat ohne Protein. Spur 2: 1µM Ref-1 ohne p53. Spur 3: 0,15µM p53 ohne Ref-1. Spur 4: 0,15µM p53 mit 1µM Ref-1. Spur 5: 0,15µM p53 mit 0,5µM pAb421.

Aus diesem Experiment ergeben sich zwei Möglichkeiten des Einflusses von Ref-1 auf p53:

- Ref-1 könnte das p53-Tetramer in der sequenzspezifischen DNA-Bindung steigern, während die anderen Oligomere und Multimere in der Bindung gehemmt werden
- Ref-1 könnte die p53-Oligomere und Multimere in das Tetramer überführen

5.4.2 Der Einfluss von Ref-1 auf das p53-Protein

Der Einfluss, den Ref-1 auf unterschiedliche p53-Oligomere und Multimere ausübt, könnte auf eine Veränderung der spezifischen Bindung von p53 an das Substrat oder auf eine Veränderung der Zusammensetzung unterschiedlicher Oligomere und Multimere zurückzuführen sein.

Zur Klärung dieser Frage wurde Ref-1 einer p53-Präparation mit unterschiedlichen p53-Multimeren zugegeben. Die p53-Präparation wurde ebenso wie eine Ref-1-Präparation mit dem sequenzspezifischen DNA-Substrat bei einer Konzentration von 10mM DTT inkubiert. Die Ansätze wurden in einem nativen Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferriert. Das Autoradiogramm der Membran wurde mit dem Signal einer p53-spezifischen Immunodetektion verglichen.

Abbildung 5-10 zeigt den Einfluss von Ref-1 auf die Zusammensetzung von p53-Multimeren und ihre sequenzspezifische DNA-Bindung. Spuren 1 bis 3 zeigen die p53-spezifische Immunodetektion und Spuren 4 bis 6 das Autoradiogramm der selben Membran.

In der Immunodetektion ist zu erkennen, dass der Anti-p53-Antikörper nicht an Ref-1 bindet (Spur 1). Dem Autoradiogramm lässt sich entnehmen, dass Ref-1 allein nicht an das sequenzspezifische Substrat bindet (Spur 4). Das aufgetrennte p53-Protein weist in Abwesenheit von Ref-1 eine Reihe von Multimeren mit geringer Mobilität auf (Spur 2). Die Mobilität der Proteinbanden in Spur 2 ist deutlich geringer als die *Shiftbande* schwacher Intensität der entsprechenden Spur 5. Das bedeutet, dass fast das gesamte p53-Protein in Spur 2 nicht an das sequenzspezifische DNA-Substrat bindet. Das postulierte bindungsaktive p53-Tetramer ist durch die Immunodetektion fast nicht nachweisbar. Nach Zugabe von Ref-1 ist nur noch die Proteinbande mit der höheren Mobilität des postulierten p53-Tetramers zu erkennen (Spur 3). Durch die Zugabe von Ref-1 wird die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 um das 30fache gesteigert (Spur 6).

Fast das gesamte p53-Protein in Spur 2 bindet nicht an das sequenzspezifische DNA-Substrat. Erst nach Zugabe von Ref-1 wird es bindungsaktiv.

Der Versuch zeigt, dass p53 vor dem Einfluss von Ref-1 in verschiedenen Multimeren vorlag. Nur das postulierte Tetramer band an das sequenzspezifische DNA-Substrat. Dieses war durch die Immunodetektion fast nicht nachweisbar. Durch Zugabe von Ref-1 wurde die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 signifikant gesteigert. Die Zusammensetzung der p53-Multimere wurde zugunsten des bindungsaktiven p53-Tetramers verschoben. Ref-1 überführt somit p53-Proteinkomplexe in ein bestimmtes Oligomer.

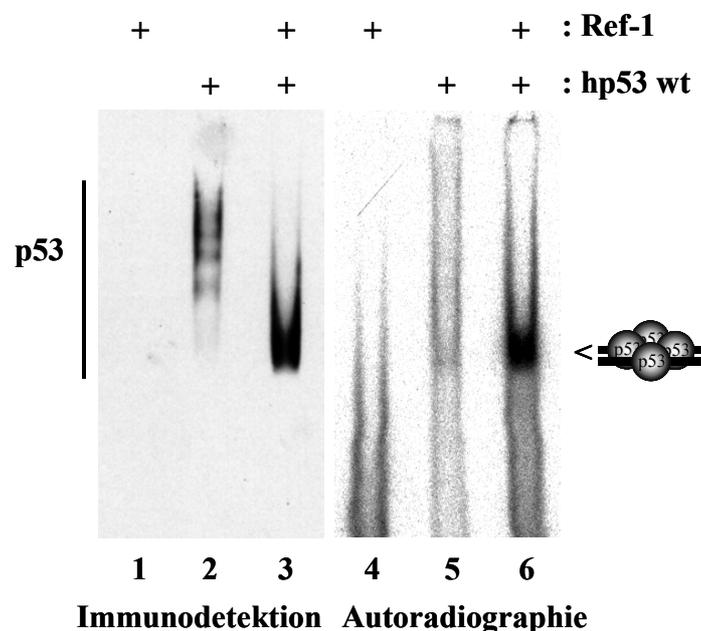


Abb. 5-10 Einfluss von Ref-1 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung und Zusammensetzung unterschiedlicher p53-Multimere bei einer Konzentration von 10mM DTT. Die Reaktionsansätze wurden nach Auftrennung im nativen Gel auf eine PVDF-Membran transferiert und die Autoradiographie mit dem p53-spezifischen Signal einer Immunodetektion verglichen. Die Detektion mit Hilfe des monoklonalen Anti-p53-Antikörpers DO-1 zeigt die Bildung eines bestimmten p53-Oligomers aus einer Mischung unterschiedlicher p53-Multimere nach Zugabe von Ref-1. Das Autoradiogramm lässt eine signifikante Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung von p53 nach Zugabe von Ref-1 erkennen. Die Mobilität des durch Ref-1 begünstigten p53-Oligomers stimmt mit der Mobilität der *Shiftbande* im Autoradiogramm überein. Die Reaktionsansätze enthielten keine Kompetitor-DNA. Spur 1 & 4: 1,5µM Ref-1 ohne p53. Spur 2 & 5: 0,15µM p53 ohne Ref-1. Spur 3 & 6: 0,15µM p53 mit 1,5µM Ref-1.

Der Versuch zeigt, dass Ref-1 die Quartärstruktur von p53 verändert, indem Ref-1 p53-Multimere entstapelt. Abbildung 5-9 ist zu entnehmen, dass Ref-1 nicht nur Multimere entstapelt, sondern auch p53-Dimere assembliert. Das resultierende Oligomer konnte aufgrund seiner relativen Mobilität im nativen Gel dem p53-Tetramer zugeordnet werden (Kapitel 5.4.1). Die Ref-1-vermittelte Überführung von p53-Oligomeren und Multimeren in das p53-Tetramer sollte durch ein Kreuzvernetzungs-Experiment bestätigt werden.

5.4.3 Der Einfluss von Ref-1 auf die Bildung des p53-Homotetramers

Durch ein Kreuzvernetzungs-Experiment sollte die molare Masse des Homooligomers bestimmt werden, in das p53 durch Ref-1 überführt wird.

Hierzu wurde eine Proteinpräparation mit unterschiedlichen p53-Oligomeren und Multimeren mit Diamid versetzt, was zu einer Oxidation reaktiver Cysteinreste interagierender Proteine führt, die dadurch kovalent verknüpft werden. Ein Reaktionsansatz wurde zuvor mit Ref-1 inkubiert, ein anderer blieb zur Kontrolle unbehandelt. Die mittels Diamid kovalent verknüpften Proteine wurden anschließend durch eine denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot mit einer p53-spezifischen Immunodetektion untersucht.

Abbildung 5-11 zeigt die spezifische Immunodetektion von kreuzvernetztem p53 nach Auftrennung in einer denaturierenden SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot. Der Anti-p53-Antikörper bindet nicht an Ref-1 (Spur 1). Die aufgetrennte p53-Präparation weist nach Zugabe von Diamid eine Reihe von kovalent verknüpften p53-Proteinkomplexen auf, die aus zahlenmäßig unterschiedlichen Protomeren bestehen (Spur 2). Die molare Masse der größten Komplexe reicht deutlich über 205kDa hinaus, wird also von p53-Multimeren verursacht, die mehr Untereinheiten aufweisen, als die des Tetramers. Durch Inkubation mit Ref-1 konnten keine p53-Komplexe kovalent verknüpft werden, die mehr als vier Untereinheiten aufwiesen (Spur 3). Die molare Masse des größten Komplexes entspricht der des p53-Homotetramers. Monomere, Dimere und Trimere in Spur 3 sind Produkte einer unvollständigen Verknüpfung des p53-Tetramers. Durch die denaturierende SDS-PAGE dissoziieren alle nicht kovalent miteinander verknüpften Untereinheiten aus dem Tetramer.

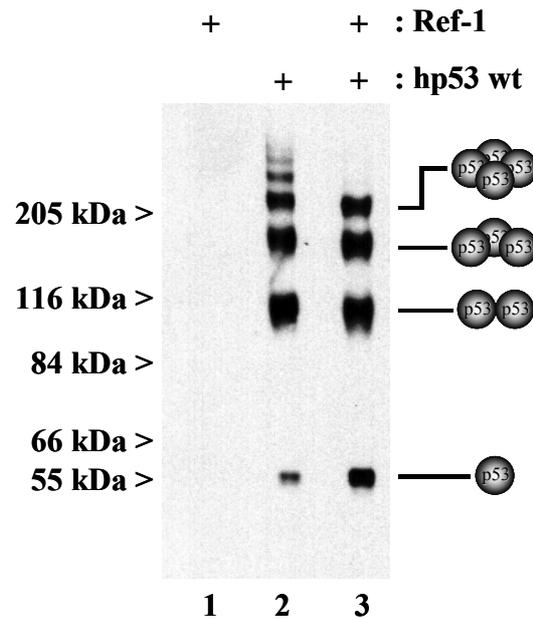


Abb. 5-11 Immunodetektion eines Western Blots von kreuzvernetztem p53 vor und nach einer Inkubation mit Ref-1. Ein Reaktionsansatz eines Gemisches aus unterschiedlichen p53-Oligomeren und Multimeren wurde mit Ref-1 inkubiert (Spur 3), ein anderer blieb als Kontrolle frei von Ref-1 (Spur 2). Den Reaktionsansätzen wurde eine Konzentration von 10mM Diamid zugegeben. Diese wurden in einer SDS-PAGE mit einem Gradienten von 2-15% Polyacrylamid denaturiert aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Anti-p53-Antikörpers DO-1. p53 besitzt nach Zugabe von Ref-1 keine kovalent verknüpften Untereinheiten, deren molare Masse über der des p53-Tetramers liegt, wie es in Abwesenheit von Ref-1 der Fall ist. Die Komplexe in Spur 3 mit geringerer molarer Masse als die des p53-Tetramers sind Produkte einer unvollständigen Verknüpfung des Tetramers durch Diamid. Es fand keine Kreuzvernetzung zwischen p53 und Ref-1 statt. Spur 1: 1 μ M Ref-1 ohne p53. Spur 2: 0,15 μ M p53 ohne Ref-1. Spur 3: 0,15 μ M p53 mit 1 μ M Ref-1.

Die Proteinpräparation aus unterschiedlichen p53-Subpopulationen besteht aus einer zahlenmäßig unterschiedlichen Assemblierung von p53-Protomeren. Durch den Einfluss von Ref-1 sind nur die p53-Oligomere stabil, deren molare Massen die des Tetramers nicht übersteigen.

Die Erkenntnisse aus Kapitel 5.4 lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Humanes rekombinantes Wildtyp p53 kommt in manchen Proteinpräparationen als Gemisch verschiedener p53-Oligomere und Multimere vor. Ref-1 ist in der Lage, ein Gemisch verschiedener p53-Oligomere und Multimere in ein bestimmtes Oligomer zu überführen. Dieses

Oligomer konnte durch Kreuzvernetzung mit Diamid als p53-Homotetramer identifiziert werden.

Abbildung 5-9 lässt sich entnehmen, dass Ref-1 sowohl p53-Oktamere als auch p53-Dimere in das Tetramer zu überführen vermag.

Die Assemblierung zweier Dimere führt zur Bildung des p53-Tetramers. Sie ist von der Oligomerisierungsdomäne des p53-Proteins vermittelt. Die Bildung von p53-Multimeren, wie die des Oktamers, ist hingegen von der Kerndomäne vermittelt und verläuft über die Stapelung von p53-Tetrameren (Kapitel 1.1.6).

Der Ref-1-vermittelte Einfluss auf die Quartärstruktur von p53 vermag somit sowohl p53-Dimere zu Tetrameren zu assemblieren als auch p53-Multimere zu Tetrameren zu entstapeln. Die Immunodetektion von p53 in Abbildung 5-10 zeigt die Entstapelung von p53-Multimeren zum Tetramer.

Im folgenden sollte untersucht werden, ob die Redoxregulations-Aktivität von Ref-1, die zur Steigerung der spezifischen Nukleinsäurebindung von p53 führt (Kapitel 5.3), auch an der Ref-1-vermittelten Bildung des p53-Tetramers beteiligt ist.

Die Nachweismethode des EMSA wird auch in den folgenden Experimenten beibehalten. Durch sie ist gleichzeitig die Veränderung des p53-Proteins durch Assemblierung und Entstapelung als auch die Zunahme der Nukleinsäurebindung von p53 zu erkennen. Der Intensitätsverlust von p53-spezifischen *Shiftbanden* in Gegenwart von Ref-1 wird im Folgenden als Überführung des entsprechenden p53-Oligomers bzw. Multimers in das Tetramer gewertet.

5.5 Redox-Abhängigkeit der Tetramerisierung von p53

Ref-1 ist in der Lage p53 durch Assemblierung von p53-Dimeren in das Tetramer zu überführen (Kapitel 5.4). Der Ref-1-vermittelte Einfluss auf die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 basiert auf einer Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne und ist damit Redox-abhängig (Kapitel 5.3).

Die Assemblierung von p53-Protomeren und Dimeren zum Tetramer wird von der Oligomerisierungsdomäne des p53-Proteins vermittelt. Diese Domäne ist frei von Cysteinresten. Die Tetramerisierung selbst ist deshalb Redox-unabhängig und auf hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen (Kapitel 1.1.6).

Da ein Einfluss der Redox-sensitiven Kerndomäne auf die Assemblierung von p53-Dimeren zum Tetramer nicht ausgeschlossen werden kann, sollte überprüft werden, ob die Assemblierung durch Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne zu beeinflussen ist. Hierzu wurde der Einfluss steigender DTT-Konzentrationen auf eine Proteinpräparation, bestehend aus einem Gemisch von p53-Dimeren und Tetrameren, im EMSA untersucht. Die unterschiedlichen p53-Oligomere konnten durch die Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat nachgewiesen werden (Abb. 5-12).

Abbildung 5-12a zeigt den Einfluss des Reduktionsmittels DTT auf die Assemblierung von p53-Dimeren. In Abbildung 5-12b ist die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten der *Shiftbanden* aus Abbildung 5-12a dargestellt. In Spur 1 der Abbildung 5-12 ist die Bindung des p53-Tetramers und des p53-Dimers an das sequenzspezifische DNA-Substrat ohne Zugabe von DTT zu erkennen. Die Intensitäten der *Shiftbanden* beider p53-Oligomere sind fast identisch. Durch die Zugabe von DTT wird das Verhältnis der Intensitäten beider *Shiftbanden* zueinander nicht verändert (Spur 2-8).

p53-Dimer und Tetramer weisen beide die gleiche Stabilität gegenüber dem Disulfid-reduzierenden Einfluss von DTT auf. Die Assemblierung von Dimeren zum Tetramer wird nicht durch eine unspezifische Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne beeinflusst.

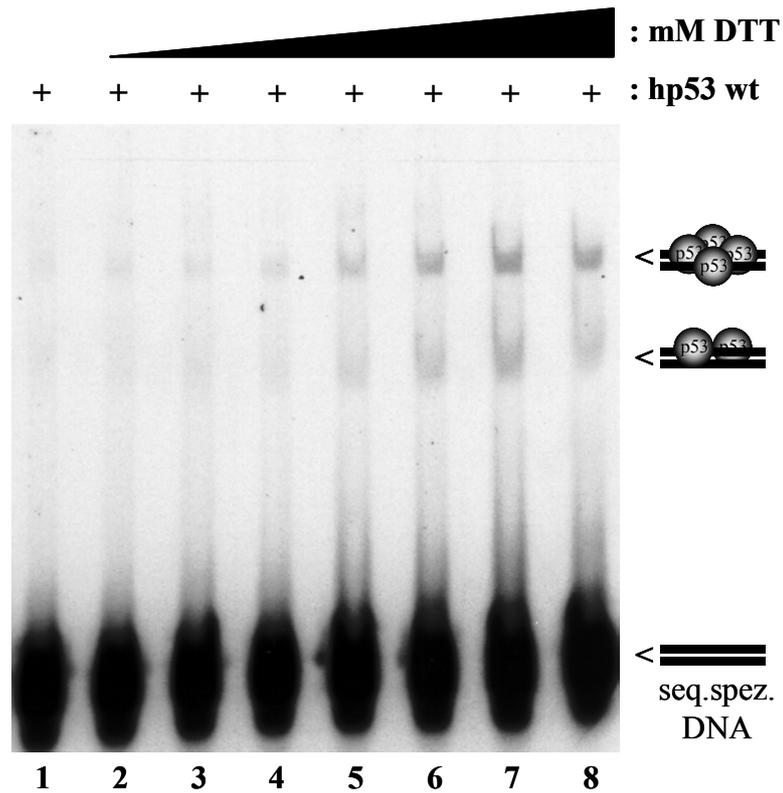


Abb. 5-12a Einfluss des Disulfid-reduzierenden DTT auf die Quartärstruktur von p53 im EMSA. Dem Ansatz wurde DTT in steigenden Konzentrationen zugegeben. Das Verhältnis zwischen dem p53-Dimer und Tetramer wird durch die Bindung der p53-Oligomere an das sequenzspezifische DNA-Substrat nachweisbar. Das Verhältnis der Intensität von der *Shiftbande* des Dimer/DNA-Komplexes und der *Shiftbande* des Tetramer/DNA-Komplexes ändert sich nicht. DTT hat keinen Einfluss auf die Bildung des p53-Tetramers. Spur 1: 0,15µM p53 ohne Zusatz von DTT. Spur 2-8: 0,15µM p53 mit 0,1 bis 100mM DTT.

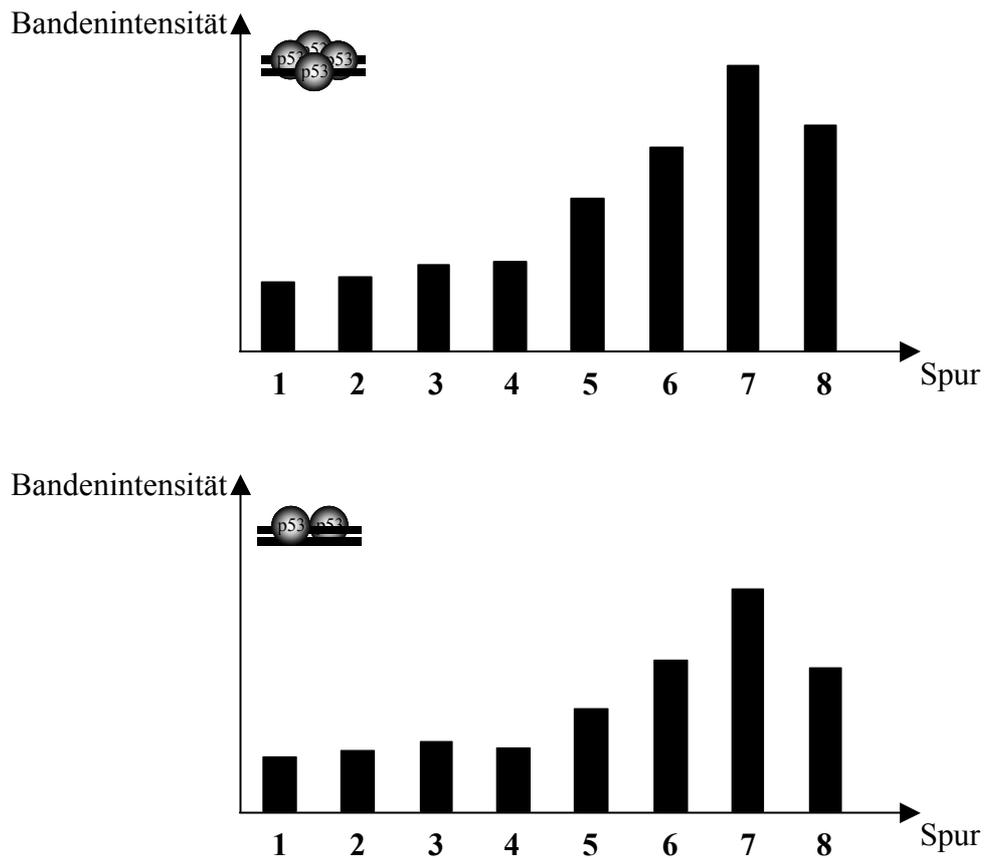


Abb. 5-12b Die *Shiftbanden* des EMSA aus der Abbildung 5-12a wurden densitometrisch vermessen und das Ergebnis graphisch dargestellt. Die Graphik zeigt, dass die Bandenintensitäten der *Shiftbanden* des p53-Dimers und des p53-Tetramers bei steigender DTT-Konzentration korrelieren.

Obwohl eine Redox-Abhängigkeit nicht ausgeschlossen werden kann, ist bei der Assemblierung von p53-Dimeren zum Tetramer keine Redox-Abhängigkeit nachzuweisen. Da Ref-1 ebenfalls in der Lage ist, p53-Multimere zum Tetramer zu entstapeln, sollte im Folgenden untersucht werden, ob bei dieser Ref-1-vermittelten Aktivität eine Redox-Abhängigkeit nachzuweisen ist.

5.6 Redox-Abhängigkeit der Überführung von p53-Multimeren in das p53-Tetramer

5.6.1 Die Bildung von p53-Multimeren durch oxidative Schäden als Folge der Lagerung

Studien haben ergeben, dass eine längere Lagerung von p53 zur Bildung von intermolekularen Disulfid-Bindungen rekombinanter Wildtyp p53-Proteine führt (Delphin *et al.*, 1994). Die Bildung dieser Disulfidbrücken ist ein Prozess, der die Quartärstruktur des Proteins in seiner nativen Form beeinträchtigt. Die Bindungsaktivität wird hierdurch nicht beeinflusst (Delphin *et al.*, 1994), aber die Untersuchungen an p53 sollten in seiner nativen Quartärstruktur durchgeführt werden, da ansonsten die Oxidation des Proteins zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen könnte.

Disulfidbrücken, die sich nach längerer Lagerung des Proteins bilden, können durch Reduktion mit DTT gespalten werden. Dies konnte in dieser Arbeit experimentell bestätigt werden (Abb. 5-13). Hierzu wurde der Einfluss steigender DTT-Konzentrationen auf eine mehrere Monate bei -80°C gelagerte Proteinpräparation, resultierend in p53-Multimeren, im EMSA untersucht. Die unterschiedlichen p53-Multimere konnten durch die Bindung an ein unspezifisches DNA-Substrat nachgewiesen werden (Abb. 5-13).

Die Abbildung 5-13 zeigt in Spur 1 p53-Multimere, die in Abwesenheit von DTT durch die Bindung an ein DNA-Substrat mit unspezifischer Sequenz nachweisbar sind.

Die Zugabe steigender DTT-Konzentrationen führt zu einer Reduktion der Disulfidbrücken und zu einem Zerfall der p53-Multimere zum Tetramer (Spur 2-6).

Die unspezifische DNA-Bindung von p53 ist nicht Redox-abhängig (Parks *et al.*, 1997). Die Zugabe von DTT führt deshalb nicht zu einer Steigerung der unspezifischen DNA-Bindung von p53. Nur die Bildung von p53-Tetrameren aus Multimeren führt zu einer leichten Intensivierung der *Shiftbande* des p53-Tetramers.

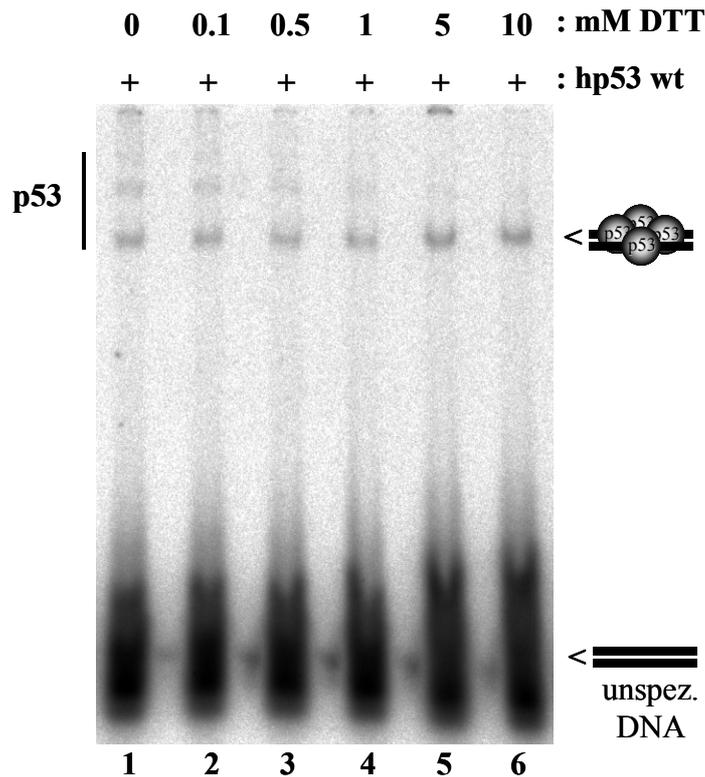


Abb. 5-13 Bindung von p53 an eine unspezifische Sequenz doppelsträngiger DNA im EMSA. p53 bildet durch Oxidation von Cysteinresten vernetzte Multimere. DTT reduziert diese Disulfidbrücken und löst die Verknüpfung. Das Resultat ist das p53-Tetramer, das durch die Oligomerisierungsdomäne und nicht durch Disulfidbrücken assoziiert ist. Die Reaktionsansätze enthielten keine Kompetitor-DNA. Spur 1: 0,15µM p53 ohne Zusatz von DTT. Spur 2-6: 0,15µM p53 mit 0,1 bis 10mM DTT.

Experimentell lässt sich dies auch durch eine Immunodetektion der p53-Multimere nach elektrophoretischer Auftrennung in einem nativen Gel und anschließendem Western Blot auf eine PVDF-Membran bestätigen (Abb. 5-14).

In Spur 1 der Abbildung 5-14 sind außer dem p53-Tetramer zwei p53-Multimerbanden zu erkennen. Der Reaktionsansatz wurde vor der Auftrennung bei einer DTT-Konzentration von 1mM inkubiert. Die nach langer Lagerung entstandenen Disulfidbrücken zwischen den p53-Molekülen bleiben intakt. Erst nach Inkubation mit 10mM DTT wurden die Disulfidbrücken zu Gunsten des p53-Tetramers reduziert (Spur 3).

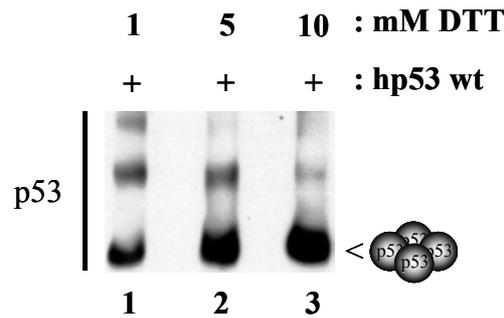


Abb. 5-14 Immunodetektion eines Western Blots nach Auftrennung in einem nativen Gel. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers DO-1. p53 bildet nach einer längeren Lagerung des Proteins bei -80°C multimere Komplexe durch Oxidation (Delphin *et al.*, 1994). DTT führt zur Disulfidreduktion und zum Zerfall der durch Disulfidbrücken verknüpften Multimere zu Gunsten des p53-Tetramers, dessen Protomere durch hydrophobe Wechselwirkungen assembliert sind. Spur 1-3: $0,15\mu\text{M}$ p53 mit 1-10mM DTT.

p53-Multimere, die durch Disulfidbrücken entstanden sind, sind bei einer Konzentration von 10mM DTT nicht mehr stabil (Abb. 5-13 & 5-14). Damit sind die durch Oxidation und intermolekulare Disulfidbrücken-Bildung entstandenen p53-Multimere von den p53-Multimeren zu unterscheiden, die durch die Stapelung von Tetrameren entstehen. Die durch die Kerndomäne vermittelte Stapelung von p53-Tetrameren zu Multimeren ist ein Redox-unabhängiger Prozess. Die Mutation von Cysteinresten beeinflusst nicht die Stapelung von Tetrameren. Diese Multimere sind in Gegenwart von DTT stabil (Rainwater *et al.*, 1995).

5.6.2 Redox-Abhängigkeit der Ref-1-vermittelten Entstapelung von p53 zum Tetramer

p53-Multimere werden durch Stapelung von p53-Tetrameren gebildet. Die Stapelung wird von der Kerndomäne des p53-Proteins vermittelt (Kapitel 1.1.6). p53-Multimere können auch durch oxidative Schäden entstehen. Diese Multimere sind bei einer Konzentration von 10mM DTT nicht stabil (Kapitel 5.6.1). Die p53-Multimere der Abb. 5-10 waren in Gegenwart von 10mM DTT stabil. Die Bildung dieser p53-Multimere konnte somit nicht auf oxidativen Schäden basieren, sondern auf der als Stapelung bezeichneten Assoziation der p53-Kerndomänen. Ref-1 entstapelte diese p53-Multimere in Gegenwart von 10mM DTT zu p53-Tetrameren. Die Gegenwart des Disulfid-reduzierenden DTT ist für eine effektive Ref-1-vermittelte Redox-abhängige Steigerung der spezifischen Nukleinsäurebindung von p53 not-

wendig (Abb. 5-6b). Da die Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne durch 10mM DTT nicht zur Entstapelung von gestapelten p53-Multimeren führt, galt es die Frage zu klären, ob die Gegenwart des Disulfid-reduzierenden DTT für die Ref-1-vermittelte Entstapelung von p53-Multimeren notwendig ist.

Drei verschiedene Reaktionsansätze mit einem Gemisch aus unterschiedlichen p53-Multimeren wurden mit Ref-1 inkubiert. Drei weitere Ansätze blieben als Kontrolle frei von Ref-1. Zwei Reaktionsansätze mit und ohne Ref-1 wurden nicht mit DTT versetzt, den übrigen wurde eine Konzentration von 10mM DTT zugegeben.

Weiterhin wurde überprüft, ob für die Ref-1-vermittelte Entstapelung von p53-Multimeren die Gegenwart der p53-Konsensussequenz notwendig ist. Das sequenzspezifische DNA-Substrat wurde in zwei DTT-haltige Reaktionsansätze mit und ohne Ref-1 gegeben. Als Kontrolle diente das Ref-1-Protein ohne p53. Die Reaktionsansätze wurden in einem nativen Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die spezifische Immunodetektion von p53 ist Abbildung 5-15 zu entnehmen.

Ref-1 wird von dem p53-spezifischen Antikörper (DO-1) nicht gebunden (Abb. 5-15, Spuren 1, 4 & 7). Die aufgetrennten p53-Reaktionsansätze ohne Ref-1 weisen unter allen Reaktionsbedingungen verschiedene p53-Multimere mit geringer Mobilität auf (Spuren 2, 5 und 8). Durch die Zugabe von Ref-1 wird in jedem Fall das p53-Tetramer gebildet (Spur 3, 6 & 9).

Die Ref-1-vermittelte Entstapelung der p53-Multimere zum Tetramers ist unabhängig von der Bindung der Proteine an das sequenzspezifische DNA-Substrat und von einer Reduktion durch DTT.

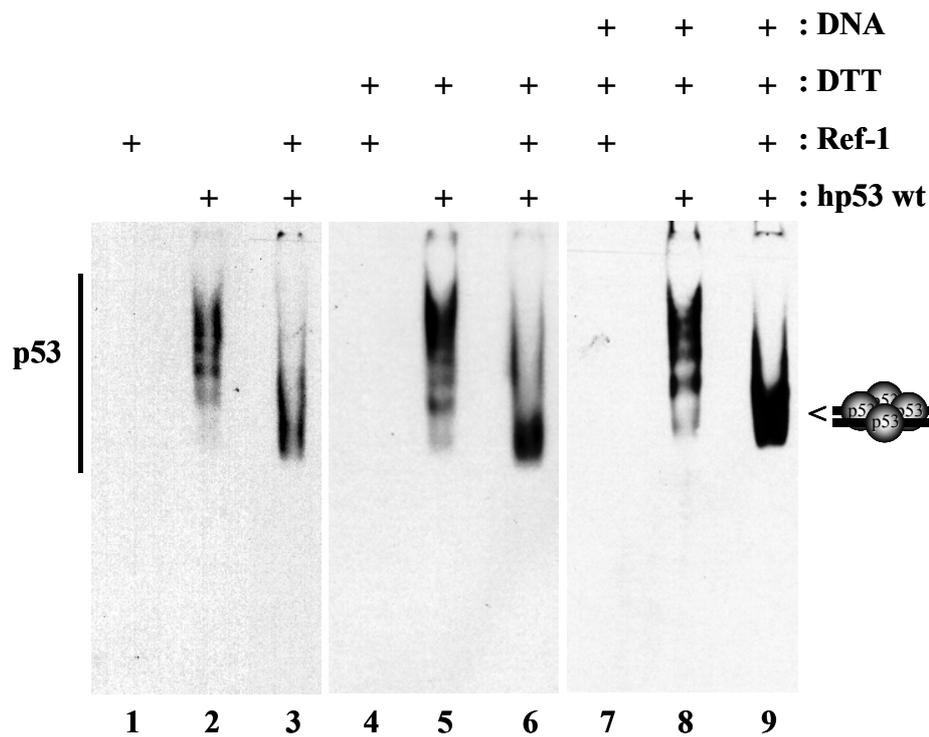


Abb. 5-15 Ref-1-vermittelte Entstapelung von p53-Multimeren zum Tetramer. Reaktionsansätzen ohne DTT (Spuren 1-3) wurden Reaktionsansätzen gegenübergestellt, die eine Konzentration von 10mM DTT enthielten (Spuren 4-9). Gleichzeitig wurden in den DTT-haltigen Reaktionsansätzen der Einfluss des sequenzspezifischen DNA-Substrats untersucht (Spur 7-9). Die Abbildung zeigt die Entstapelung von p53-Multimeren zum Tetramer durch Ref-1. Die Bildung des p53-Tetramers durch Ref-1 ist unabhängig von den verwendeten Reaktionsbedingungen. Die Auftrennung der Reaktionsansätze erfolgte in einem (0,5×) TBE Gradientengel mit 2-6% Polyakrylamid. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers DO-1 durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten keine Kompetitor-DNA. Spur 1, 4 & 7: 1,5µM Ref-1 ohne p53. Spur 2, 5 & 8: 0,15µM p53 ohne Ref-1. Spur 3, 6 & 9: 0,15µM p53 mit 1,5µM Ref-1.

p53-Multimere sind in Gegenwart von 10mM DTT stabil. Für die Ref-1-vermittelte Entstapelung der Multimere in Tetramere wird kein Reduktionsmittel benötigt. Obwohl auch hier eine Redox-Abhängigkeit nicht ausgeschlossen werden kann, ist für die Ref-1-vermittelte Entstapelung von p53-Multimeren eine Redox-Abhängigkeit nicht nachweisbar.

5.7 Die Aktivierung von p53 durch Ref-1 erfolgt durch drei unterschiedliche Prozesse

In Kapitel 5.3 wurde gezeigt, dass die Ref-1-vermittelte Steigerung der spezifischen Nukleinsäurebindung ein auf Reduktion basierender Prozess ist. Darüber hinaus zeigt Kapitel 5.4, dass das p53-Tetramer unter dem Einfluß von Ref-1 stabilisiert wird.

Es wurde der Einfluss einer steigenden Ref-1-Konzentration auf die Bindung verschiedener p53-Oligomere (Dimer und Tetramer) und Multimere (Oktamer) an das sequenzspezifische DNA-Substrat bei einer Konzentration von 10mM DTT im EMSA untersucht.

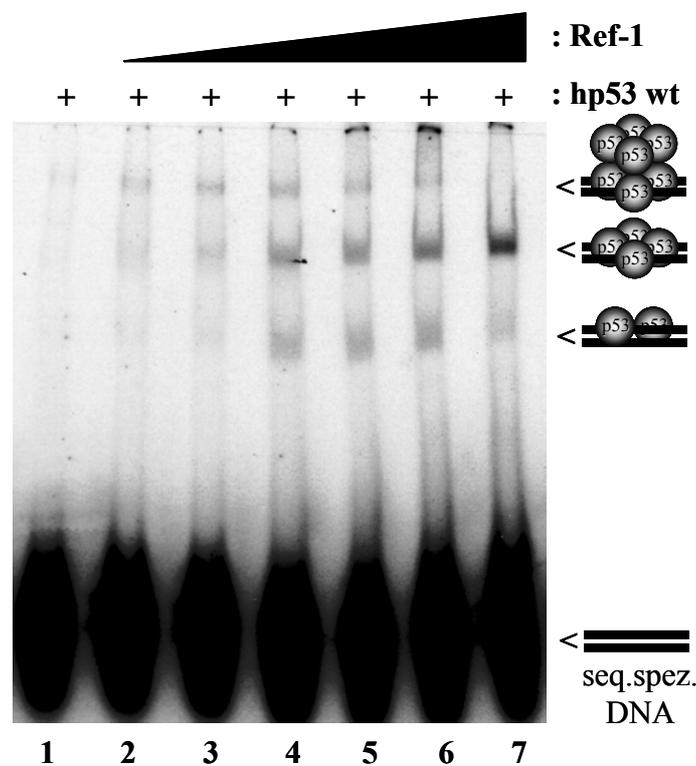


Abb. 5-16a Die Ref-1-vermittelte Aktivierung von p53 erfolgt durch drei unterschiedliche Prozesse. Ein Gemisch von p53-Dimeren, Tetrameren und Oktameren wurde bei einer Konzentration von 10mM DTT mit steigenden Ref-1-Konzentrationen versetzt und im EMSA untersucht. Die Substratbindung aller p53-Komplexe wird zunächst durch Reduktion stimuliert. Es folgt dann eine Entstapelung der p53-Oktamere und eine Assemblierung der p53-Dimere zum p53-Tetramer. Spur 1: 0,15μM p53 ohne Ref-1. Spur 2-7: 0,15μM p53 mit 0,05 bis 1,5μM Ref-1.

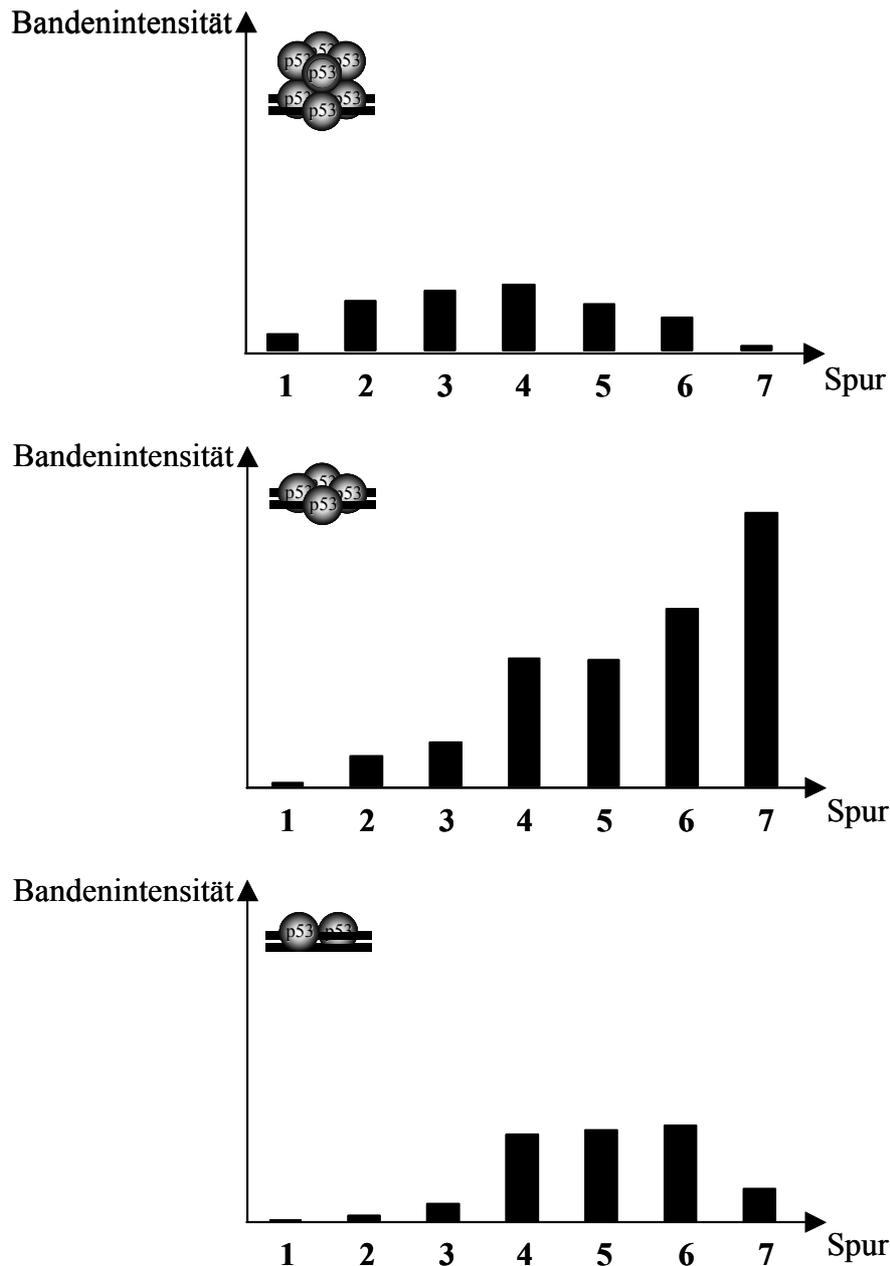


Abb. 5-16b Die *Shiftbanden* des EMSA aus der Abbildung 5-16a wurden densitometrisch vermessen und das Ergebnis graphisch dargestellt. Die Intensitäten der *Shiftbanden* des p53-Tetramers nehmen bei steigender Ref-1-Konzentration kontinuierlich zu. Die Bandenintensitäten der *Shiftbanden* des p53-Oktamers und des p53-Dimers nehmen bei geringer Konzentration von Ref-1 zunächst zu und anschließend bei höheren Ref-1-Konzentrationen wieder ab.

Abbildung 5-16a zeigt den Einfluss von Ref-1 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53, die Assemblierung von p53-Dimeren zum Tetramer und die Entstapelung von p53-Multimeren zum Tetramer. In Abbildung 5-16b ist die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten der *Shiftbanden* aus Abbildung 5-16a dargestellt. Die p53-Komplexe binden

das sequenzspezifische DNA-Substrat ohne Zugabe von Ref-1 (Abb. 5-16, Spur 1). Durch Zugabe steigender Ref-1-Konzentrationen wird die Bindung der p53-Oligomere und Multimere zunächst gesteigert (Spuren 2-4). Eine weitere Erhöhung der Ref-1-Konzentration führt zur Endstapelung des p53-Oktamers zum Tetramer (Spuren 5-7). Das p53-Dimer assembliert ebenfalls zum Tetramer (Spur 7).

Durch die Redox-vermittelte Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung und der Assemblierung des p53-Dimers und der Entstapelung des p53-Oktamers zum Tetramer nimmt die Intensität der *Shiftbande* des Tetramers um mehr als das 30fache zu (Spuren 2-7). Die Zunahme der Bandenintensität durch Redox-Modulation und Bildung des Tetramers entspricht hier quantitativ der einer carboxyterminal vermittelten Aktivierung von p53 durch den monoklonalen Antikörper pAb421 im EMSA (vgl. Abb. 5-3a). Die Ursache ist jedoch unterschiedlich.

Ref-1 bewirkt demnach zunächst eine generelle Redox-vermittelte Aktivierung der sequenzspezifischen DNA-Bindung aller p53-Oligomere und Multimere über die maximale Steigerung der Bindung durch DTT hinaus. Höhere Ref-1 Konzentrationen führen dann zur Entstapelung von p53-Oktameren und zur Assemblierung von p53-Dimeren zum Tetramer.

5.8 Lokalisation des p53-aktivierenden Einflusses auf dem Ref-1-Protein

In Kapitel 5.7 wurde deutlich, dass die Ref-1-vermittelte Aktivierung von p53 durch eine Disulfidreduktion in der Kerndomäne der p53-Untereinheiten und durch die Bildung des Tetramers erfolgt. Diese Eigenschaften von Ref-1 sollten den funktionellen Domänen des Ref-1-Proteins zugeordnet werden.

Hierzu wurde die *ref-1*-cDNA mittels PCR in zwei Fragmente zerlegt, die für die Aminosäurereste 1 bis 127 (Redox-Regulationsdomäne) und 61 bis 318 (Reparaturdomäne) kodieren (Abb. 5-1). Diese Fragmente wurden entsprechend dem Wildtyp Ref-1-Protein exprimiert und gereinigt (Abb. 5-2).

5.8.1 Vergleich des Einflusses der Ref-1-Redox-Regulations- und Reparaturdomäne auf p53

Der Einfluss, den Ref-1 AS 1-127 (Redox-Regulationsdomäne) und Ref-1 AS 61-318 (Reparaturdomäne) auf ein Gemisch von bindungsaktiven p53-Dimeren und Tetrameren ausübt, sollte durch die Zugabe der Ref-1-Proteinfragmente zu den p53-Oligomeren untersucht werden. Die unterschiedlichen p53-Oligomere konnten in einem EMSA durch die Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat bei einer Konzentration von 10mM DTT nachgewiesen werden.

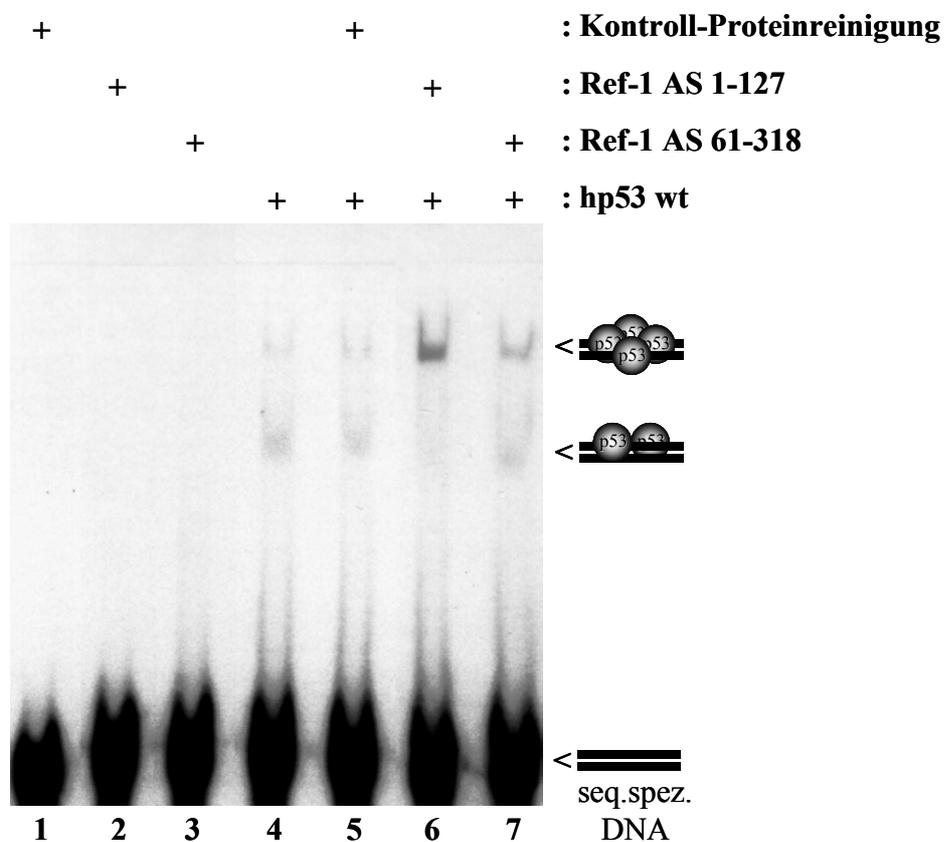


Abb. 5-17 Vergleich des Einflusses von Ref-1 AS 1-127 und Ref-1 AS 61-318 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 im EMSA. Es wurde die Substratbindung des p53-Dimers und Tetramers bei einer Konzentration von 10mM DTT untersucht. Die aminoterminalen Redox-Regulationsdomäne von Ref-1 kann die Substratbindung des p53-Tetramers aktivieren. Spur 1: Kontroll-Proteinreinigung. Spur 2: 1,5μM Ref-1 AS 1-127 ohne p53. Spur 3: 1,5μM Ref-1 AS 61-318 ohne p53. Spur 4: 0,15μM p53. Spur 5: 0,15μM p53 mit Kontroll-Proteinreinigung. Spur 6: 0,15μM p53 mit 1,5μM Ref-1 AS 1-127. Spur 7: 0,15μM p53 mit 1,5μM Ref-1 AS 61-318.

Abbildung 5-17 zeigt den Einfluss von Ref-1 AS 1-127 und Ref-1 AS 61-318 auf p53. Die Ref-1-Fragmente binden selbst nicht an das sequenzspezifische DNA-Substrat (Spuren 1-3). Das p53-Dimer und das p53-Tetramer binden bei einer Konzentration von 10mM DTT an das sequenzspezifische DNA-Substrat (Spur 4). Durch die Zugabe der Kontroll-Proteinreinigung (Expression des leeren Vektors pH6Ex3 und Reinigung des Bakterienlysats über Metallaffinitätschromatographie, Kapitel 5.1.1.2) wird die sequenzspezifische DNA-Bindung der p53-Oligomere nicht verändert (Spur 5). Die Zugabe von Ref-1 AS 1-127 führt zu einer signifikanten Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung des p53-Tetramers. Das p53-Dimer wird zum Tetramer assembliert (Spur 6). Ref-1 AS 61-318 zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Substratbindung von p53 oder die Assemblierung des p53-Dimers (Spur 7).

Ref-1 AS 1-127 ist sowohl zur Redox-vermittelte Steigerung der spezifischen Nukleinsäurebindung als auch zur Stabilisierung des p53-Tetramers fähig.

5.8.2 Aktivierung von p53 durch die Ref-1-Redox-Regulationsdomäne

Zur Bestätigung der in Kapitel 5.8.1 gewonnenen Erkenntnisse wurde der Einfluss einer steigenden Konzentration von Ref-1 AS 1-127 auf die Bindung eines Gemisches von bindungsaktiven p53-Dimeren und Tetrameren an das sequenzspezifische DNA-Substrat untersucht. Die unterschiedlichen p53-Oligomere konnten in einem EMSA durch die Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat bei einer Konzentration von 10mM DTT nachgewiesen werden (Abb. 5-18).

Abbildung 5-18a zeigt den Einfluss von Ref-1 AS 1-127 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung des p53-Dimers und Tetramers bei einer Konzentration von 10mM DTT. In Abbildung 5-18b ist die densitometrische Auswertung der Intensitäten der *Shiftbanden* aus Abbildung 5-18a dargestellt. Die p53-Oligomere binden das Substrat ohne Zugabe von Ref-1 AS 1-127 (Abb. 5-18, Spur 1). Durch Zugabe steigender Konzentrationen von Ref-1 AS 1-127 wird die Bindung des p53-Tetramers signifikant gesteigert (Spuren 2-7). Das p53-Dimer assembliert durch Zugabe steigender Konzentrationen von Ref-1 AS 1-127 zum Tetramer (Spuren 2-7).

Die Erkenntnisse aus dem Kapitel 5.8.1 können hiermit bestätigt werden. Die aminoternale Redox-Regulationsdomäne Ref-1 AS 1-127 fungiert als Redoxmodulator für p53 und stabilisiert das p53-Protein als Tetramer.

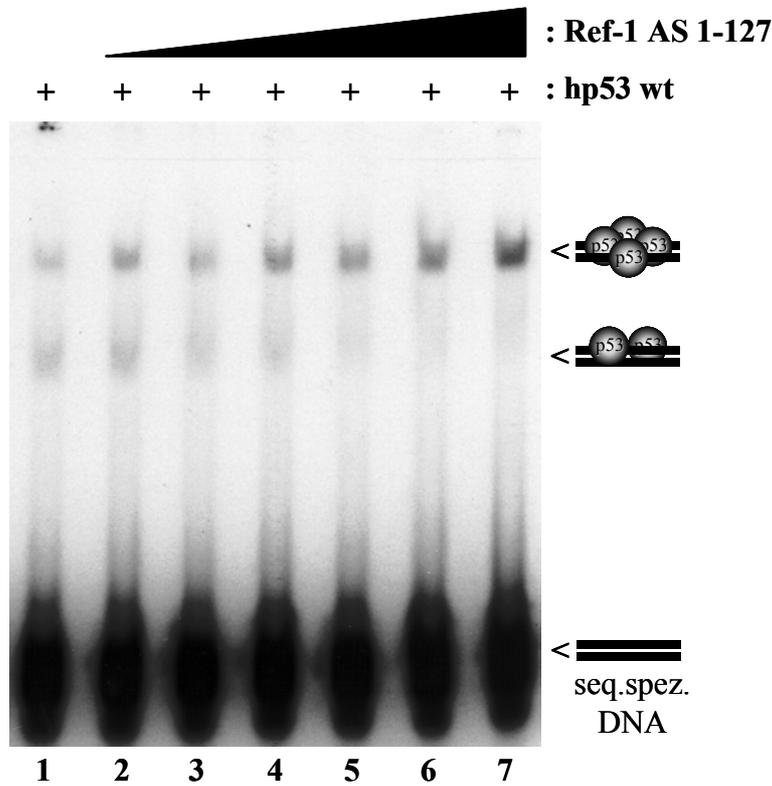


Abb. 5-18a Einfluss von Ref-1 AS 1-127 auf die Bindung an das sequenzspezifische DNA-Substrat und die Quartärstruktur von p53 im EMSA. p53 wurden bei einer Konzentration von 10mM DTT steigende Konzentrationen von Ref-1 AS 1-127 zugegeben. Die Substratbindung des p53-Tetramers wird durch Ref-1 Zugabe aktiviert. Die *Shiftbande* des p53-Dimers verliert bei steigender Konzentration von Ref-1 AS 1-127 an Intensität. Die aminoternale Redox-Regulationsdomäne von Ref-1 vermittelt die Reduktion von p53 und die Stabilisierung von p53 als Tetramer. Spur 1: 0,15μM p53 ohne Ref-1 AS 1-127. Spur 2-7: 0,15μM p53 mit 0,05-1,5μM Ref-1 AS 1-127.

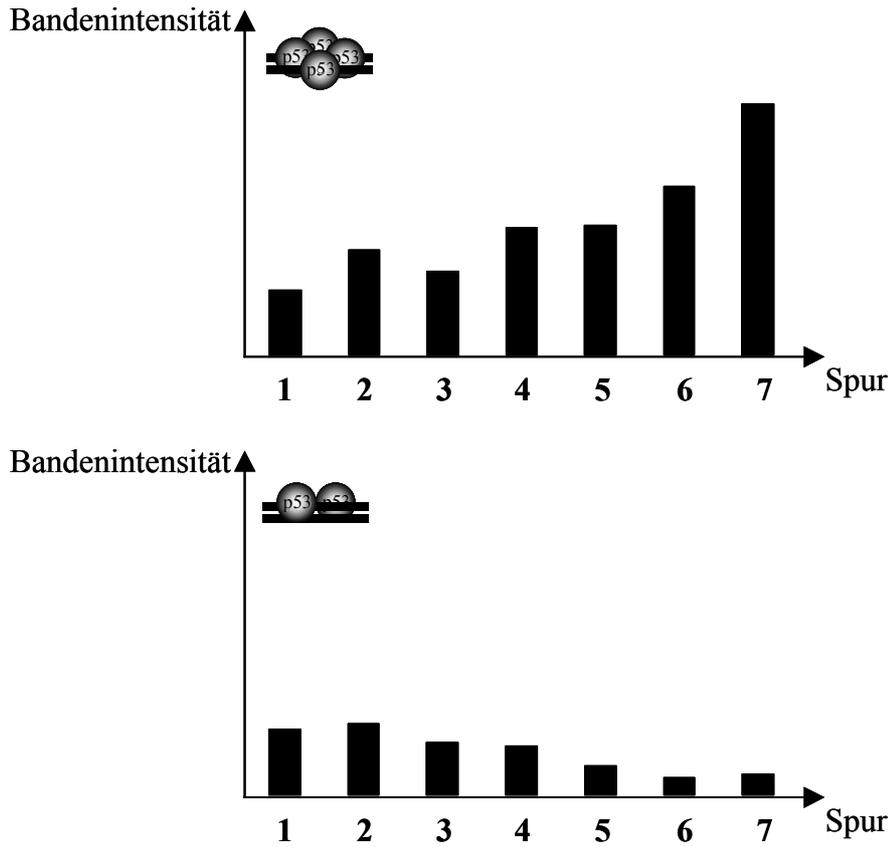


Abb. 5-18b Die *Shiftbanden* des EMSA aus der Abbildung 5-18a wurden densitometrisch vermessen und das Ergebnis graphisch dargestellt. Die Intensitäten der *Shiftbanden* des p53-Tetramers nehmen bei steigender Konzentration von Ref-1 AS 1-127 kontinuierlich zu. Die Intensitäten der *Shiftbanden* des p53-Dimers nehmen mit zunehmender Konzentrationen von Ref-1 AS 1-127 ab.

6 Diskussion

6.1 Die Ref-1-vermittelte Redoxregulation von p53

Diese Arbeit hat gezeigt, dass Ref-1 in Gegenwart von DTT die spezifische Nucleinsäurebindung von p53 an sequenz- und strukturspezifische Nucleinsäuresubstrate steigert (Kapitel 5.3). Die Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung von p53 durch Ref-1 wirkt zur Steigerung durch DTT additiv. Sie kann einen Faktor erreichen, der einer carboxyterminal-vermittelten Aktivierung durch den monoklonalen Antikörper pAb421 im EMSA gleich kommt.

Die spezifische Bindung von p53 an das sequenzspezifische DNA-Substrat, der p53-Konsensussequenz in linearer Konformation, wird ausschließlich von der p53-Kerndomäne vermittelt. Für eine effektive Bindung von p53 an dieses Substrat muss die DNA-Bindung der regulatorischen Domäne von p53 verhindert werden (Kapitel 1.1.4). Dies zeigt sich in der signifikanten Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung von p53 durch die Bindung des monoklonalen Antikörpers pAb421 an die regulatorische Domäne von p53 (Kapitel 5.2, Abb. 5-3a).

Die spezifische Bindung von p53 an das strukturspezifische DNA-Substrat, der p53-Konsensussequenz in nicht-linearer Konformation, wird sowohl von der p53-Kerndomäne, als auch von der regulatorischen Domäne von p53 vermittelt. Für die effektive Bindung von p53 an dieses Substrat muss die regulatorische Domäne von p53 an das Substrat binden (Kapitel 1.1.4). Wird dies durch die Bindung von pAb421 verhindert, wird das strukturspezifische DNA-Substrat nicht mehr effektiv gebunden (Kapitel 5.2, Abb. 5-4a).

Dies gilt entsprechend für die spezifische Bindung von p53 an das strukturspezifische RNA-Substrat, der Haarnadelschleife des 5'-UTR der murinen *p53* mRNA. Die Bindung von pAb421 an die regulatorische Domäne von p53 hemmt die strukturspezifische RNA-Bindung von p53 (Kapitel 5.2, Abb. 5-5a).

Jayaraman *et al.* (1997) zeigten, dass die Interaktion von Ref-1 mit der regulatorischen Domäne von p53 notwendig ist, da ein p53-Protein, dem die letzten 30 Aminosäuren fehlen (p53 Δ C30), nicht durch Ref-1 aktiviert werden kann. p53 Δ C30 führt darüber hinaus, im Gegensatz zu Wildtyp p53, zu einer starken Verminderung der zellulären Basen-Exzisionsreparatur, an der Ref-1 entscheidend beteiligt ist (Offer *et al.*, 2001).

Obwohl Ref-1 und DTT bei der Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung additiv wirken (Kapitel 5.3, Abb. 5-6c), kann die additive Wirkung nicht darauf zurückgeführt werden, dass Ref-1 die Bindung der regulatorischen Domäne von p53 an das sequenzspezifische DNA-Substrat verhindert. Wäre dies der Fall, würde Ref-1 die strukturspezifische Nukleinsäurebindung von p53 hemmen. Ref-1 steigert jedoch auch diese strukturspezifische Bindung von p53 in Gegenwart von DTT (Kapitel 5.3, Abb. 5-7b & 5-8b). Ref-1 verhindert somit nicht die Bindung der regulatorischen Domäne, in Analogie zur Bindung durch den monoklonalen Antikörper pAb421, an DNA und steigert auf diese Weise damit die sequenzspezifische DNA-Bindung.

Der Einfluss von Ref-1 und der Einfluss von pAb421 auf die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 sind im EMSA nicht additiv (Jayaraman *et al.*, 1997). Es muss davon ausgegangen werden, dass die Bindungsaffinität von pAb421 an die regulatorische Domäne von p53 zu hoch ist, als dass die transiente Interaktion von Ref-1 mit der regulatorischen Domäne von p53 stattfinden kann.

Ref-1 müsste demnach die regulatorische Domäne von p53 als Bindungsstelle für eine Interaktion mit der p53-Kerndomäne benötigen, wodurch die Nukleinsäurebindung der regulatorischen Domäne bei dieser Interaktion jedoch nicht beeinträchtigt wird. Die strukturspezifische Bindung bleibt damit erhalten.

Die Analogie des Einflusses von Ref-1 und des Einflusses von DTT auf die Steigerung der spezifischen Nukleinsäurebindung von p53 an die drei verwendeten Substrate legen den Schluss nahe, dass die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 durch eine reine Redoxmodulation von p53 gesteigert wird.

Die Reduktion der p53-Kerndomäne, wie durch DTT verursacht, war derzeit die einzige bekannte Aktivierung von p53, die eine Steigerung der spezifischen Bindung von p53 an sequenz- und strukturspezifische Substrate bewirkt.

Während die spezifische Bindung von p53 an das strukturspezifische RNA-Substrat mit DTT bis zu einer Konzentration von 100mM steigerbar war (Kapitel 5.2.3, Abb. 5-5b), führten DTT-Konzentrationen oberhalb von 10mM wieder zu einer Verminderung der sequenzspezifischen DNA-Bindung (Kapitel 5.2.1, Abb. 5-3b). DTT bewirkt in einer Redoxreaktion die Spaltung einer Disulfidbindung. Indem es selbst oxidiert wird und eine intramolekulare Disulfidbrücke bildet. Eine Konzentration von 10mM DTT kann nur zur Reduktion von Disulfidbrücken in der Kerndomäne von p53 führen. Dies beeinflusst die DNA-bindenden Strukturen der Kerndomäne, die eine spezifische Nukleinsäurebindung begünstigen. Eine Erhöhung

der DTT-Konzentration über 10mM DTT hinaus kann nur zur Spaltung weiterer Disulfidbrücken führen, die die strukturspezifische RNA-Bindung weiter begünstigen, die sequenzspezifische DNA-Bindung jedoch hemmen. Hieraus könnte der Schluss gezogen werden, dass für eine effektive sequenzspezifische DNA-Bindung eine oder mehrere Disulfidbrücken in p53 notwendig sind. Das Phänomen, dass Ref-1 und DTT additiv auf die sequenzspezifische DNA-Bindung wirken, obwohl eine weitere Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung durch DTT allein nicht mehr möglich ist, könnte darauf zurückzuführen sein, dass Ref-1 eine Substratspezifität besitzt. Ref-1 könnte die Spaltung bestimmter Disulfidbrücken im p53-Molekül katalysieren, aber andere u. U. notwendige Disulfidbrücken intakt lassen. Eine hohe DTT-Konzentration, die zu einer quantitativen Reduktion der durch Ref-1 reduzierten Disulfidbrücken führen würde, bewirkt bei der unspezifischen Wirkung des DTT die Spaltung von Disulfidbrücken, deren Existenz jedoch eine Voraussetzung für eine effektive sequenzspezifische DNA-Bindung darstellen. Eine diagonale Elektrophorese könnte darüber Aufschluss geben. Dieses Modell ist für p53 zwar hypothetisch, es finden sich aber Parallelen bei anderen Transkriptionsfaktoren, wie OxyR, einem Transkriptionsfaktor von *Escherichia coli*, der an der Redoxregulation der Zelle entscheidend beteiligt ist (Kim et al., 2002). Es würde außerdem erklären, warum es Unterschiede in der Aktivierbarkeit von struktur- und sequenzspezifischer Nukleinsäurebindung durch DTT gibt und warum DTT und Ref-1 die Bindung an struktur- und sequenzspezifische Substrate zwar steigern können, die Einflüsse aber trotzdem Unterschiede aufweisen.

Zusätzlich hat die Überführung von p53-Oligomeren und Multimeren in das p53-Tetramer im EMSA einen steigernden Effekt auf die spezifische Nukleinsäurebindung. Dieser ist innerhalb des Assays nur begrenzt von einer Affinitätssteigerung des Tetramers zu unterscheiden. Auch das könnte ein Grund sein, warum sich die Ref-1-vermittelte Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung zur DTT-vermittelten Steigerung additiv verhält. p53, das im EMSA zuvor keine Substratbindung zeigte, wird durch die Ref-1-vermittelte Reduktion der p53-Kerndomäne und die Überführung in das Tetramer zur Substratbindung befähigt (Abb. 5-10). Dies steigert die Intensität der p53-*Shiftbande* über die Intensität nach Aktivierung durch DTT allein hinaus.

Ref-1 stimuliert die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 über die Reduktion eines reaktiven Cysteinrests, wie es auch schon für die Ref-1-vermittelte Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren gezeigt wurde (Kapitel 1.2.3).

Das humane p53 enthält in der Primärstruktur 10 Cysteinreste, die verschiedene Funktionen in der Kerndomäne des gefalteten p53-Proteins übernehmen (Kapitel 1.1.5) und als potentielle Ziele für die Reduktion durch Ref-1 in Frage kommen (Abb. 6-1 & 6-2).

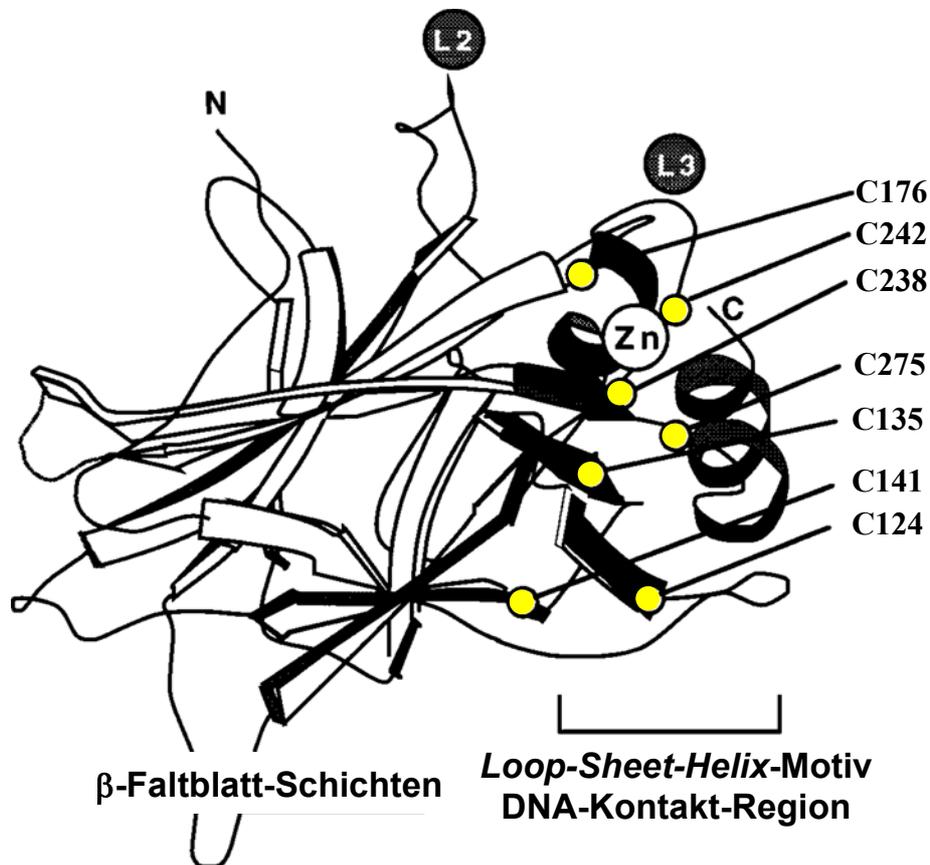


Abb. 6-1 Schematische Darstellung der p53-Kerndomäne. Verschieden Cysteinreste der DNA-Kontakt-Region sind als gelbe Punkte dargestellt. L2 und L3 kennzeichnen Schleifen in der Kerndomäne. Zn zeigt die Position des bivalenten Zinkions an, das durch die Cysteinreste C176, C238 und C242 komplexiert wird. (Abbildung aus Rainwater *et al.*, 1995; verändert)

Der Cysteinrest 277 ist über eine Wasserstoffbrücke direkt an der Bindung der ersten Pyrimidinbase in dem Konsensuspentamer (A/T)CPuPuPu beteiligt (Cho *et al.*, 1994). Dieser Cysteinrest kann eine Wasserstoffbrücke vom N4 des Cytosins akzeptieren (Cho *et al.*, 1994), oder über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Mercaptogruppe des Cysteinrests und der Methylgruppe am Thymin interagieren (Chene, 1999). Die verwendete p53-Konsensussequenz des *p21*-Promotors enthält an den entscheidenden Positionen zur Bindung des Cysteinrests 277 nur Thymine und keine Cytosine. Die Interaktion verläuft hier also über

hydrophobe Wechselwirkungen. Eine Oxidation oder Reduktion des Cysteinrests 277 beeinflusst aber nur die Wasserstoffbrückenbindung an Cytosin, nicht die hydrophobe Wechselwirkung zum Thymin (Buzek *et al.*, 2002). Da Ref-1 die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 an die Konsensussequenz des *p21*-Promotors jedoch signifikant steigern konnte, scheidet der Cysteinrest 277 als Ziel der Reduktion durch Ref-1 aus.

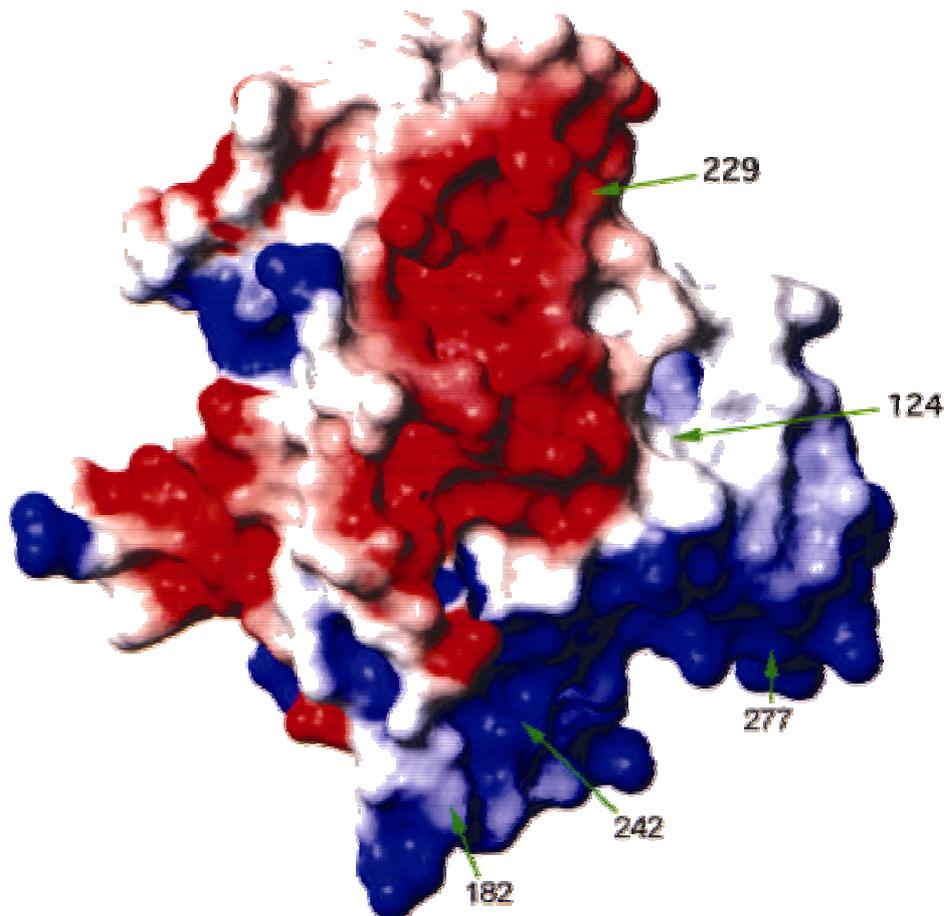


Abb. 6-2 Kalottenmodell der p53-Kerndomäne. An der Oberfläche des Proteins exponiert Cysteinreste sind durch grüne Pfeile und die Nummern der Cysteinreste gekennzeichnet. Die Farben geben das elektrostatische Potential der Kerndomäne wieder. Blau: Aminosäurereste mit geringer Elektronendichte. Rot: Aminosäurereste mit hoher Elektronendichte. Die DNA-Kontakt-Region kann durch ihre elektrostatisch positive Ladung (blau) mit der DNA interagieren. Der Cysteinrest 277 ist direkt an der DNA-Bindung beteiligt. (Abbildung aus Wu *et al.*, 1999; verändert)

Es befinden sich weitere Cysteinreste (Cys 124, 135, 141 & 275) im Bereich des *Loop-Sheet-Helix*-Motivs. Der Redoxstatus dieser Cysteinreste hat Auswirkungen auf die Konformation der Kerndomäne. Drei weitere Cysteinreste (Cys 176, 238 und 242) komplexieren zusammen mit einem Histidinrest ein Zn^{2+} -Ion (Kapitel 1.1.5). Sie kommen ebenfalls als potentielle Ziele für eine Redoxregulation durch Ref-1 in Frage.

Ein Austausch der Cysteinreste, die an der Stabilisierung der Konformation beteiligt sind, führt nur zu einer Verminderung der sequenzspezifischen DNA-Bindung. Der Austausch eines Cysteinrests, der an der Komplexierung des Zn^{2+} -Ions beteiligt ist, führt hingegen zur vollständigen Inhibition der sequenzspezifischen DNA-Bindung von p53 (Rainwater *et al.*, 1995).

Ref-1 wurde als ein Protein identifiziert, das in der Lage ist, den AP-1-Komplex aus den Proteinen Jun und Fos durch Redoxmodulation zu aktivieren (Xanthoudakis & Curran, 1992). Hier konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindung durch den Redoxstatus eines bestimmten Cysteinrests in der DNA-Bindungsdomäne der beiden Proteine reguliert wird (Abate *et al.*, 1990). Der Cysteinrest liegt in einer Sequenz, die eine Homologie zu der p53-Sequenz besitzt, in der der Cysteinrest 242 angesiedelt ist (Rainwater *et al.*, 1995). Die DNA-Bindungsregionen von Jun und Fos besitzen ebenfalls Homologie zu der Sequenz, die einen Cysteinrest in der DNA-Bindungsdomäne von Myb (*avian myeloblastosis viral oncogene homolog*) flankiert (Carr & Mott, 1991). Myb wird ebenfalls durch Ref-1 aktiviert (Xanthoudakis *et al.*, 1992).

Sequenz (Fos): CX₁NRRX₂LTX₁TLX₆L

Sequenz (p53 mit C = Cys 242): CX₄NRRX₂LTX₂TLX₆L

mit X als beliebigen Aminosäurerest

Das genaue Ziel der Ref-1-vermittelten Reduktion der p53 Kerndomäne ist derzeit noch ungewiss. Ein Versuch zur Ref-1-vermittelten Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung mit den Cysteinmutanten von p53, die Rainwater *et al.* (1995) verwendeten, könnte Aufschluss über den kritischen Cysteinrest geben.

6.2 Die Ref-1-vermittelte Reparatur oxidativer Schäden des p53-Proteins

Eine Erhöhung der zellulären Konzentration von reaktiven Sauerstoffverbindungen wie H_2O_2 führt sowohl zur transkriptionellen Aktivierung von Ref-1 (Grosch & Kaina, 1999) als auch zur Akkumulation von p53 (Chandel *et al.*, 2000).

H_2O_2 entsteht überwiegend mitochondrial als Nebenprodukt des Komplexes III (CoQ-Cytochrom-*c*-Reduktase) der Atmungskette (Turrens *et al.*, 1985). Eine Veränderung der reduzierenden Umgebung in der Zelle kann Auswirkungen auf die Faltung und Aktivität von Proteinen haben (Cabiscol *et al.*, 2000). Wird Wildtyp p53 H_2O_2 ausgesetzt, führt dies zur Oxidation der Cysteinreste und zum Verlust des komplexierten Zn^{2+} -Ions. p53 bildet inter- und intramolekulare Disulfidbrücken aus und nimmt einen immunologischen Mutanten-Phänotyp ein, der nicht mehr zur sequenzspezifischen DNA-Bindung befähigt ist (Hainaut & Milner, 1993). Obwohl die Oxidation von Proteinen durch reaktive Sauerstoffverbindungen *in vivo* bisher noch nicht bewiesen werden konnte, wird dieser theoretische Zustand als „Disulfid-Stress“ bezeichnet (Aslund *et al.*, 1999). Ref-1 könnte bei p53 eine Schutzfunktion ausüben, die durch Reduktion oxidierter Cysteinreste sicherstellt, dass der Tumorsuppressor auch unter Bedingungen, die durch „Disulfid-Stress“ verursacht werden, seine Aufgabe als Transkriptionsfaktor wahrnehmen kann.

Ionisierende Strahlen wie nahes UV oder γ -Strahlung führen ebenfalls zur Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen. Durch die Radiolyse von Wasser entstehen hierbei Hydroxylradikale, die Proteine irreversibel oxidieren (Berlett & Stadtman, 1997; Stadtman, 1992). Die Hydroxylradikale können durch die Cu/Zn-Superoxid-Dismutase in H_2O_2 umgewandelt werden. Eine Oxidation von p53 durch H_2O_2 wäre wieder reversibel.

6.3 Ref-1 als Aktivator des Transkriptionsfaktors p53

Das Genom von Mammaliazellen enthält viele potentielle p53-Bindungssequenzen mit Homologie zur p53-Konsensussequenz. Nur einige dieser Sequenzen dienen tatsächlich der p53-vermittelten Transaktivierung von Zielgenen (Bourdon *et al.*, 1997; Hoh *et al.*, 2002; Polyak *et al.*, 1997; Tokino *et al.*, 1994). Die von p53 transaktivierten Zielgene weisen außerdem *in vivo* eine starke Gewebespezifität auf (Fei *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der p53-spezifischen Genaktivität von der Chromatinstruktur abhängen könnte. Espino-

sa und Emerson (2001) haben Versuche mit *in vitro* assembliertem Chromatin durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass die regulatorische Domäne für eine effektive Bindung an die p53-Konsensussequenz in assembliertem Chromatin notwendig ist. Wird die Bindung der regulatorischen Domäne von p53 an die p53-Konsensussequenz in assembliertem Chromatin durch Modifikation verhindert, führt das zu einer signifikant verminderten Bindung (Kapitel 1.1.4). Entsprechend zeigen Versuche in *Saccharomyces cerevisiae*, dass das Transaktivierungspotential von p53 mit deletierter regulatorischer Domäne geschwächt ist (Inga *et al.*, 2002). Weiterhin steigern verschiedene die Chromatinstruktur oder DNA-Topologie verändernde Proteine die spezifische DNA-Bindung und die Transaktivierungsaktivität von p53. Hierzu gehören HMG1 (*high mobility group*) (McKinney & Prives, 2002), Topoisomerase I (Mao *et al.*, 2002), Histon-Acetyltransferase und Histon-Deacetylase (Avantaggiati *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; Koumenis *et al.*, 2001; Lill *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Murphy *et al.*, 1999; Scolnick *et al.*, 1997), hADA3 (*human transcriptional adaptor 3 – like*) (Wang *et al.*, 2001), der SWI/SNF-Komplex (Lee *et al.*, 2002) und p300/CPB (*E1A-binding protein / CREB-binding protein*) (Barlev *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2000). Die vermehrten Hinweise auf eine eher strukturspezifische DNA-Bindung von p53 bei der Transaktivierung von p53-spezifischen Zielgenen spiegeln sich auch in der p53-Bindungsstelle des *pig3*-Promotors wieder. Die p53-Bindungsstelle besteht aus Wiederholungen der Sequenz (TGYCC)_N und weist keine Übereinstimmung mit der klassischen p53-Konsensussequenz auf (Contente *et al.*, 2002). Die Sequenzspezifität der DNA-Bindung wird von der p53-Kerndomäne vermittelt. Die Kerndomäne ist für eine effektive Bindung an so unterschiedliche Sequenzen wie die p53-Konsensussequenz, die Bindungssequenz im *pig3*-Promotor und den 5'-UTR der murinen *p53* mRNA notwendig, so dass bei diesen Bindungen kaum noch von einer sequenzspezifischen Bindung durch die Kerndomäne gesprochen werden kann.

Da demnach die struktur- und nicht die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 die für die Transaktivierung von Zielgenen relevante Aktivität darstellt, müsste diese strukturspezifische DNA-Bindung durch Ref-1 aktiviert werden, wenn die Ref-1-vermittelte Aktivierung von p53 eine biologische Relevanz besitzen soll. Dieses konnte in dieser Arbeit bestätigt werden.

Würde Ref-1 hingegen die Bindung der regulatorischen Domäne von p53 an DNA verhindern und dadurch Redox-unabhängig nur die sequenzspezifische DNA-Bindung steigern, würde p53 nicht mehr an Promotoren in assembliertem Chromatin binden können und letztendlich die Aktivität als Transkriptionsfaktor verlieren.

6.4 Die Ref-1-vermittelte Stabilisierung des p53-Tetramers

Im Verlauf dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass Ref-1 zur Bildung des p53-Tetramers führt (Kaptitel 5.4). Höhere Ref-1-Konzentrationen führen zu einer Entstapelung von p53-Multimeren und zur Assemblierung von p53-Dimeren zum Tetramer (Kapitel 5.7). Diese Eigenschaften sind auf der Redox-Regulationsdomäne, den ersten 127 Aminosäureresten des Ref-1-Proteins, lokalisiert (Kapitel 5.8 & 5.9). Obwohl eine Redox-Abhängigkeit nicht völlig ausgeschlossen werden kann, konnten keine Hinweise für eine Redox-regulierte Bildung des p53-Tetramers gefunden werden (Kapitel 5.5 & 5.6).

Wird von einer Substratspezifität der Ref-1-vermittelten Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne ausgegangen (Kapitel 6.1), muss es sich bei der katalysierten Reaktion um eine bestimmte Disulfidbrücke im p53-Molekül handeln. DTT steigert ebenso wie Ref-1 die spezifische Nukleinsäurebindung von p53. Es muss somit davon ausgegangen werden, dass die Disulfidbrücke, die durch Ref-1 reduziert wird, zumindest teilweise auch durch DTT reduziert wird. Die Auswirkungen sind bei einer Konzentration von 10mM DTT nachweisbar (Kapitel 5.2, Abb. 5-3b). Die Assemblierung von p53-Dimeren zu Tetrameren zeigt bei einer Konzentration von 10mM DTT jedoch keine Veränderung (Kapitel 5-5, Abb. 5-12a) und p53-Multimere sind in Gegenwart von 10mM DTT stabil (Kapitel 5-4, Abb. 5-10 & Kapitel 5-6, Abb. 5-15). Die Ref-1-vermittelte Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung von p53 zeigt eine eindeutige DTT-Abhängigkeit (Kapitel 5-3, Abb. 5-6b). Für die Entstapelung von p53-Multimeren ist eine Zugabe von DTT dagegen nicht erforderlich (Kapitel 5.6, Abb. 5-15). Würde die Ref-1-vermittelte Reduktion einer spezifischen Disulfidbrücke die Bildung des p53-Tetramers begünstigen, müsste die Bildung des p53-Tetramers mit der Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung einher gehen. Zur Überführung von p53-Oligomeren und Multimeren in das Tetramer sind jedoch höhere Ref-1-Konzentrationen erforderlich, als zur Steigerung der sequenzspezifischen DNA-Bindung von p53 (Kapitel 5.7, Abb. 5-16). In Abbildung 5-16 ist zu erkennen, dass Ref-1 zuerst die sequenzspezifische DNA-Bindung aller p53-Oligomere und Multimere steigert und erst anschließend das p53-Multimer entstapelt und das Dimer assembliert. Würde also die Redox-abhängige Reduktion einer spezifischen Disulfidbrücke in der p53-Kerndomäne sowohl die DNA-Bindung als auch die Quartärstruktur von p53 beeinflussen, müssten diese Prozesse auch gleichzeitig ablaufen.

Eine Redox-Abhängigkeit der Bildung von p53-Tetrameren wurde in der Literatur nicht beschrieben. p53-Cystein-Mutanten sind ebenso wie Wildtyp p53 in der Lage, Tetramere und Multimere zu bilden (Rainwater *et al.*, 1995). Eine Redox-vermittelte Bildung des p53-

Tetramers ist daher unwahrscheinlich. Vielmehr sind hydrophobe Wechselwirkungen der Oligomerisierungsdomäne und Interaktionen der Kerndomäne für die Bildung von p53-Oligomeren verantwortlich. p53-Multimere sind über Wechselwirkungen der p53-Kerndomäne assoziiert (Stenger *et al.*, 1994). Man spricht hier von einer Stapelung der p53-Tetramere zu Multimeren. Die Wechselwirkung mit Ref-1 muss zu einer Entstapelung dieser p53-Tetramer-Stapel führen. Die Abbildungen 5-9, 5-10, 5-15 und 5-16 zeigen die Bildung von p53-Tetrameren aus p53-Multimeren nach Zugabe von Ref-1.

Die biologische Relevanz von p53-Multimeren *in vivo* ist nicht geklärt. Es wäre möglich, dass Ref-1 durch die Entstapelung von p53-Multimeren eine Schutzfunktion für p53 in der Zelle übernimmt, die eine unkontrollierte Aggregation des p53-Proteins verhindern soll.

p53 wird im Zytoplasma der Zelle kotranslational als Dimer synthetisiert (Nicholls *et al.*, 2002). Die Assemblierung zum Tetramer erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen der Oligomerisierungsdomäne am Carboxyterminus von p53 (Johnson *et al.*, 1995; Mateu & Fersht, 1998; McCoy *et al.*, 1997). Ref-1 muss demnach ebenfalls in der Lage sein, die Assemblierung zweier p53-Dimere zum Tetramer zu begünstigen. Die Abbildungen 5-6b, 5-6c, 5-9, 5-16, 5-17 und 5-18 zeigen die Bildung von p53-Tetrameren aus p53-Dimeren nach Zugabe von Ref-1.

Der Mechanismus für diese Aktivität ist derzeit noch unklar. Ref-1 wirkt jedoch als Assemblierungs- und Koordinierungsfaktor für den Komplex der PCNA-vermittelten Basen-Exzisionsreparatur wirkt (Tom *et al.*, 2001):

Die DNA-Polymerase δ vermittelte Basen-Exzisionsreparatur benötigt die koordinierte Abfolge verschiedener Proteine wie DNA-Glykosylase, Ref-1, FEN1 (*flap structure-specific endonuclease 1*), DNA-Ligase I, RPA (*replication protein A*) und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Matsumoto *et al.*, 1999; Pascucci *et al.*, 1999). In Abwesenheit von Ref-1 stört die Zugabe des p21-Proteins die Interaktion von PCNA mit FEN1 und DNA-Ligase I. Die Folge ist eine Inhibition der DNA-Polymerase δ - vermittelten Basen-Exzisionsreparatur durch Bindung von p21 an PCNA. Ref-1 stimuliert die Basen-Exzisionsreparatur in Anwesenheit von p21 (Tom *et al.*, 2001). Ein Vergleich mit DNA-Polymerase β zeigte, dass der stimulierende Einfluss von Ref-1 nicht direkt auf DNA-Polymerase δ zu wirken scheint. Tom *et al.* folgerten, dass Ref-1 eine assemblierende und koordinierende Wirkung auf den Komplex mit DNA-Polymerase δ ausüben müsse.

6.5 Die Rolle von p53 und Ref-1 in der Basen-Exzisionsreparatur

Die Hinweise für eine direkte Beteiligung von p53 an der Basen-Exzisionsreparatur haben sich in den letzten Jahren deutlich gemehrt (Kapitel 1.1.7.3). Zhou *et al.* (2001) haben in einem *in vitro* Assay gezeigt, dass p53 die Basen-Exzisionsreparatur stimuliert. Ein Kompetitions-Assay konnte die Stimulierung auf eine Erhöhung der Affinität von DNA-Polymerase β zum DNA-Substrat zurückführen. Die Verstärkung der Bindung an die AP-Stelle des Substrats wirkt jedoch nur in Gegenwart von Ref-1 (Zhou *et al.*, 2001). Die Bedeutung von p53 in der Basen-Exzisionsreparatur wurde mit Zellextrakten und *in vivo* mit p53-Mutanten bestätigt (Offer *et al.*, 1999; Offer *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001).

Hier stellt sich die Frage, wie der Einfluss von Ref-1 die Beteiligung von p53 an der Basen-Exzisionsreparatur beeinflusst.

Ref-1 steigert die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 durch Redoxmodulation der p53-Kerndomäne (Gaiddon *et al.*, 1999; Jayaraman *et al.*, 1997; Ueno *et al.*, 1999; diese Arbeit). Die Transaktivierungsaktivität von p53 ist für die Stimulierung der Basen-Exzisionsreparatur jedoch nicht von Bedeutung (Offer *et al.*, 2001). Der p53-Redoxstatus beeinflusst die Bindung an superhelikale DNA (Fojta *et al.*, 1999), aber nicht die Bindung von p53 an unspezifische oder fehlgepaarte DNA (Parks *et al.*, 1997).

Ein Einfluss des p53-Redoxstatus auf die Interaktion von p53 mit der DNA-Polymerase β kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist dennoch wahrscheinlich, dass die Ref-1-vermittelte Redoxregulation von p53 unabhängig von einer Stimulierung der Basen-Exzisionsreparatur durch p53 ist. Diese Vorstellung wird dadurch unterstützt, dass Ref-1 andere Transkriptionsfaktoren durch Redoxmodulation zu aktivieren vermag, die nicht an der Basen-Exzisionsreparatur beteiligt sind (Kapitel 1.2.5).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Ref-1 das p53-Tetramer stabilisiert (Kapitel 5.4). Das p53-Tetramer erfüllt eine Reihe von Funktionen in der spezifischen Nukleinsäurebindung, der zellulären Lokalisation aber auch bei der Wechselwirkung mit anderen Proteinen (Kapitel 1.1.6). Die stabile Interaktion von p53 mit der DNA-Polymerase β wurde durch Immunopräzipitation, Far-Western-Assay und Kreuzvernetzung gezeigt (Zhou *et al.*, 2001). Der Oligomerisierungszustand von p53, der für eine Interaktion mit DNA-Polymerase β notwendig ist, wurde bisher noch nicht untersucht. Ein Vergleich zwischen Wildtyp p53 und einer Oligomerisierungsmutante in einem Basen-Exzisionsreparatur-Assay könnte darüber Aufschluss geben.

Ref-1 dient für den Komplex aus DNA-Polymerase δ , FEN1 und DNA-Ligase I als Assemblierungsfaktor (Tom *et al.*, 2001). Das Protein stabilisiert das p53-Tetramer (Kapitel 5.4) und ist für eine p53-vermittelte Stimulierung der DNA-Polymerase β notwendig (Zhou *et al.*, 2001). Ref-1 könnte demnach auch bei dem Komplex aus DNA-Polymerase β und p53 als Assemblierungs- und Koordinierungsfaktor wirken, wie es zuvor schon von Tom *et al.* (2001) beschrieben wurde. Dies würde bedeuten, dass Ref-1 beide Komplexe der Basen-Exzisionsreparatur kontrolliert.

Zhou *et al.* (2001) schlugen vor, dass Ref-1 als „molekularer Schalter“ zur Aktivierung von p53 als Tumorsuppressor dient. Dieser Vorschlag stützt sich auf zwei Dinge: p53 ist an einem Prozeß beteiligt, der in direktem Zusammenhang mit dem DNA-Schaden der Zelle steht und wird durch ein Protein in der sequenzspezifischen DNA-Bindung aktiviert, das in einem Komplex mit p53 an dieser DNA-Reparatur beteiligt ist.

Diese Idee wird von einer weiteren Arbeitsgruppe gestützt, die zeigen konnte, dass die Schwere des DNA-Schadens, gemessen an der Basen-Exzisionsreparatur der Zelle, darüber entscheidet, ob es zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose der Zelle kommt (Offer *et al.*, 2001; Offer *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von p53 scheint in der Regulierung der Basen-Exzisionsreparatur ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen: Dephosphorylierung von p53 am Serinrest 376 führt zu einer Verstärkung der Basen-Exzisionsreparatur (Offer *et al.*, 2002). Der Serinrest 376 ist Teil des Epitops zur Bindung durch den monoklonalen Antikörper pAb421 und wird durch die Proteinkinase C phosphoryliert (Kapitel 1.1.4). Die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C steigert auch die Redoxmodulations-Aktivität Ref-1 (Kapitel 1.2.4). Ref-1 wiederum aktiviert die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 durch Redoxmodulation.

Weiterhin führt die ATM (*ataxia-telangectasia mutated kinase*) vermittelte Phosphorylierung von p53 am Serinrest 15 zu einer Reduzierung der Basen-Exzisionsreparatur-Aktivität (Offer *et al.*, 2002). Dabei wird p53 stabilisiert, indem der phosphorylierte Serinrest 15 die Mdm2-vermittelte Degradation des Proteins verhindert (Kapitel 1.1.7.1).

Die Bildung des p53-Tetramers liefert darüber hinaus eine Reihe anderer Voraussetzungen, die jedoch nicht zwingend eine p53-vermittelte Antwort als Tumorsuppressor zur Folge haben (Kapitel 1.1.6): Die Bildung des Tetramers führt zu einer nukleären Lokalisation, da das Exportsignal des Proteins maskiert wird. Das p53-Tetramer ermöglicht die kooperative Bindung an die p53-Konsensussequenz. Das Tetramer ermöglicht die Interaktion mit dem TBP (*TA-TA-box binding protein*). Ref-1 schafft mit der Bildung des p53-Tetramers eine wichtige Vor-

aussetzung zur Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor. Die Aktivität wird jedoch über einen zweiten unabhängigen Weg kontrolliert, da die Phosphorylierung darüber entscheidet, ob p53 wirklich als Transkriptionsfaktor aktiv wird oder weiterhin die Reparatur direkt stimuliert (Abb. 6-3).

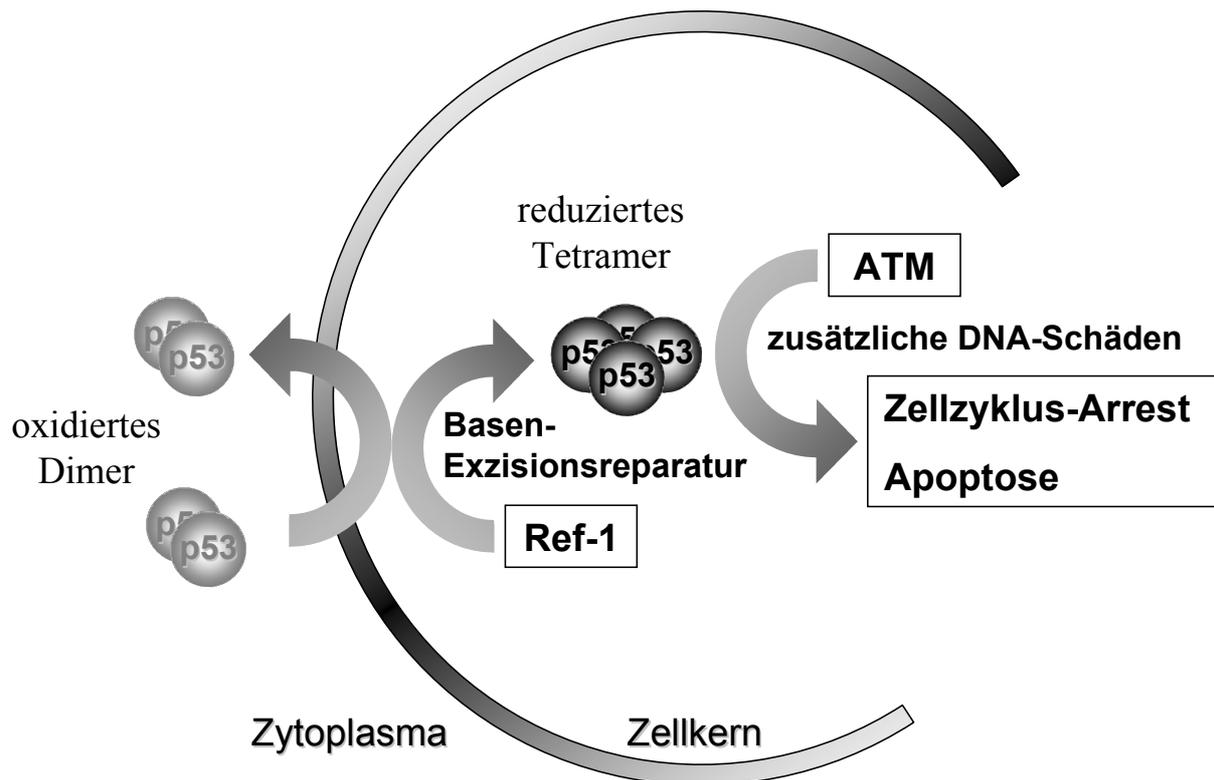


Abb. 6-3 Ref-1-vermittelte Aktivierung von p53 als Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor in der Zelle. p53 wird kotranslational als Dimer im Zytoplasma synthetisiert. Als solches wird es in den Zellkern importiert und auch wieder ins Zytoplasma ausgeschleust. Durch eine direkte Beteiligung von p53 an der Basen-Exzisionsreparatur tritt p53 mit dem Redox-Faktor 1 (Ref-1) in Wechselwirkung. Ref-1 assembliert das p53-Dimer zum Tetramer. Das nukleäre Exportsignal ist im Tetramer maskiert und p53 akkumuliert im Kern. Zusätzlich führt die Ref-1-vermittelte Disulfidreduktion in der p53-Kerndomäne zu einer Steigerung der spezifischen DNA-Bindung von p53. Treten zusätzliche DNA-Schäden in der Zelle auf, bewirken Kinasen wie ATM (*ataxia-telangectasia mutated kinase*) eine Phosphorylierung des p53-Aminoterminus, die p53 vor einer Mdm2-vermittelten Degradation schützt. Die p53-spezifische Transaktivierung führt zur Expression verschiedener Gene, die an der Arretierung des Zellzyklus und/oder der Apoptose beteiligt sind.

Die Ref-1-vermittelte Bildung des p53-Tetramers stellt demnach einen ebenso wichtigen Schritt in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 als Tumorsuppressor dar wie die Ref-1-vermittelte Redoxmodulation von p53. Diese Arbeit unterstützt somit die Vorstellung von Ref-1 als „molekularen Schalter“ für den Tumorsupressor p53 und liefert einen weiteren Schritt zum möglichen Mechanismus der Aktivierung.

7 Zusammenfassung

Der Tumorsuppressor p53 ist ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor, der in Abhängigkeit von der Schwere eines DNA-Schadens einen Zellzyklus-Arrest zur Reparatur der Zelle oder die Apoptose auslöst. Der Redox Faktor 1 (Ref-1) ist ein Protein der Basen-Exzisionsreparatur, an der auch p53 aktiv beteiligt ist, und vermag verschiedene Transkriptionsfaktoren, u. a. auch p53, durch Redoxmodulation zu aktivieren. Zur Aktivierung von p53 durch Ref-1 wurde ein Redox-unabhängiger Mechanismus, entsprechend einer Bindung durch den monoklonalen Anti-p53-Antikörper pAb421, vorgeschlagen. pAb421 verhindert die Bindung der regulatorischen Domäne von p53 an DNA, was zu einer effektiven Bindung der p53-Kerndomäne an die p53-Konsensussequenz in linearer Konformation führt (sequenzspezifische DNA-Bindung).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Ref-1-vermittelte Aktivierung von p53 ausschließlich Redox-reguliert ist oder ob Ref-1 zusätzlich die Bindung der regulatorischen Domäne von p53 an DNA verhindert und dadurch Redox-unabhängig die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 steigert. Zur Klärung der Frage wurde der Einfluss von pAb421, Dithiothreitol (DTT) und Ref-1 auf die spezifische Bindung von p53 an drei verschiedene Nukleinsäuresubstrate untersucht. Während pAb421 die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 an ein sequenzspezifisches Substrat steigerte und die Bindung an strukturspezifische Substrate (spezifische DNA und RNA in nicht-linearer Konformation) verminderte, steigerten DTT und Ref-1 die spezifische Nukleinsäurebindung von p53 an alle drei Substrate.

Die signifikant unterschiedlichen Einflüsse von pAb421 und Ref-1 auf die strukturspezifische Nukleinsäurebindung von p53 beweisen, dass Ref-1 nicht wie pAb421 die Bindung der regulatorischen Domäne an DNA verhindert. Die Analogie des Einflusses von Ref-1 und DTT in der Steigerung der spezifischen Nukleinsäurebindung von p53 hingegen legen den Schluss nahe, dass die Interaktion in einer reinen Redoxmodulation von p53 resultiert.

In dieser Arbeit hat sich weiterhin gezeigt, dass Ref-1 die Quartärstruktur von p53 beeinflusst. p53 bildet aus Protomeren Dimere und Tetramere. Diese Assemblierung wird durch die Oligomerisierungsdomäne von p53 vermittelt. Ref-1 wirkt auch als Assemblierungs- und Koordinierungsfaktor für den Proteinkomplex der Basen-Exzisionsreparatur. Diese Arbeit zeigt, dass der Einfluss von Ref-1 zu einer Assemblierung von p53-Dimeren zum Tetramer führt. Die Tetramerisierung von p53 wird von der Redox-Regulationsdomäne vermittelt. Für eine Redox-abhängige Bildung des p53-Tetramers konnten jedoch keine Hinweise gefunden werden.

p53-Tetramere können weiter zu Multimeren assoziieren. Dies wird als Stapelung bezeichnet und wird von der p53-Kerndomäne vermittelt. Die Stapelung von p53 ist ebenfalls ein Redox-unabhängiger Vorgang. Diese Arbeit zeigt, dass der Einfluss von Ref-1 zu einer Entstapelung von p53-Multimeren zum Tetramer führt.

Das Tetramer stellt einen wichtigen Schritt zur Aktivierung von p53 als Tumorsuppressor dar. Die gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Annahme, dass Ref-1 einen „molekularen Schalter“ für die Aktivität des Tumorsuppressors p53 darstellt.

8 Literatur

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J. 3rd, Curran, T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* *249*, 1157-1161.
- Akiyama, K., Seki, S., Oshida, T., Yoshida, M. C. (1994). Structure, promoter analysis and chromosomal assignment of the human APEX gene. *Biochim Biophys Acta* *1219*, 15-25.
- Aladjem, M. I., Spike, B. T., Rodewald, L. W., Hope, T. J., Klemm, M., Jaenisch, R., Wahl, G. M. (1998). ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr Biol* *8*, 145-155.
- Anderson, M. E., Woelker, B., Reed, M., Wang, P., Tegtmeier, 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*, 6255-6264.
- Ashcroft, M., Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene* *18*, 7637-7643.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 6161-6165.
- Avantaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S., Kelly, K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* *89*, 1175-1184.
- Ayed, A., Mulder, F. A., Yi, G. S., Lu, Y., Kay, L. E., Arrowsmith, C. H. (2001). Latent and active p53 are identical in conformation. *Nat Struct Biol* *8*, 756-760.
- Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K. P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L., 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*, 362-369.
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., Wiman, K. G. (1994). p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 413-417.
- Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson, J. K., Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* *249*, 912-915.
- Bakhanashvili, M. (2001). Exonucleolytic proofreading by p53 protein. *Eur J Biochem* *268*, 2047-2054.
- Balagurumoorthy, P., Sakamoto, H., Lewis, M. S., Zambrano, N., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Appella, E., 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*, 8591-8595.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., Ziv, Y. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* *281*, 1674-1677.

- Bargonetti, J., Manfredi, J. J. (2002). Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* 14, 86-91.
- Bargonetti, J., Manfredi, J. J., Chen, X., Marshak, D. R., 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, 2565-2574.
- Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T. D., Berger, S. L. (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8, 1243-1254.
- Barzilay, G., Mol, C. D., Robson, C. N., Walker, L. J., Cunningham, R. P., Tainer, J. A., Hickson, I. D. (1995). Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. *Nat Struct Biol* 2, 561-568.
- Baudier, J., Delphin, C., Grunwald, D., Khochbin, S., Lawrence, J. J. (1992). Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11627-11631.
- Bauer, C. (1999). Spezifische Interaktion von Wildtyp p53 mit dem 5'-UTR der p53 mRNA als Basis der translationalen Autoregulation der p53 Biosynthese. Doktorarbeit, HPI
- Bayle, J. H., Elenbaas, B., 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, 5729-5733.
- Beernink, P. T., Segelke, B. W., Hadi, M. Z., Erzberger, J. P., Wilson, D. M. 3rd, Rupp, B. (2001). Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/aprimidinic endonuclease, Ape1: implications for the catalytic mechanism. *J Mol Biol* 307, 1023-1034.
- Benchimol, S., Lamb, P., Crawford, L. V., Sheer, D., Shows, T. B., Bruns, G. A., Peacock, J. (1985). Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somat Cell Mol Genet* 11, 505-510.
- Bennett, R. A., Wilson, D. M. 3rd, Wong, D., Demple, B. (1997). Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7166-7169.
- Berlett, B. S., Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313-20316.
- Berthold, H., Scanarini, M., Abney, C. C., Frorath, B., Northemann, W. (1992). Purification of recombinant antigenic epitopes of the human 68-kDa (U1) ribonucleoprotein antigen using the expression system pH6EX3 followed by metal chelating affinity chromatography. *Protein Expr Purif* 3, 50-56.
- Bienz, B., Zakut-Houri, R., Givol, D., Oren, M. (1984). Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen p53. *EMBO J* 3, 2179-2183.

- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235-248.
- Blakesley, R. W., Boezi, J. A. (1977). A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 82, 580-582.
- Blaydes, J. P., Luciani, M. G., Pospisilova, S., Ball, H. M., Vojtesek, B., Hupp, T. R. (2001). Stoichiometric phosphorylation of human p53 at Ser315 stimulates p53-dependent transcription. *J Biol Chem* 276, 4699-4708.
- Bourdon, J. C., Deguin-Chambon, V., Lelong, J. C., Dessen, P., May, P., Debuire, B., May, E. (1997). Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene* 14, 85-94.
- 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, 248-254.
- Brain, R., Jenkins, J. R. (1994). Human p53 directs DNA strand reassociation and is photolabelled by 8-azido ATP. *Oncogene* 9, 1775-1780.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Buzek, J., Latonen, L., Kurki, S., Peltonen, K., Laiho, M. (2002). Redox state of tumor suppressor p53 regulates its sequence-specific DNA binding in DNA-damaged cells by cysteine 277. *Nucleic Acids Res* 30, 2340-2348.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E., Ros, J. (2000). Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 27393-27398.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3, 3-8.
- Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B., Siliciano, J. D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-1679.
- Carr, M. D., Mott, R. F. (1991). The transcriptional control proteins c-Myb and v-Myb contain a basic region DNA binding motif. *FEBS Lett* 282, 293-294.
- Carrero, P., Okamoto, K., Coumailleau, P., O'Brien, S., Tanaka, H., Poellinger, L. (2000). Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 20, 402-415.
- Casso, D., Beach, D. (1996). A mutation in a thioredoxin reductase homolog suppresses p53-induced growth inhibition in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 252, 518-529.

- Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* *401*, 616-620.
- Chandel, N. S., Vander Heiden, M. G., Thompson, C. B., Schumacker, P. T. (2000). Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene* *19*, 3840-3848.
- Chang, C., Simmons, D. T., Martin, M. A., Mora, P. T. (1979). Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J Virol* *31*, 463-471.
- Chao, C., Saito, S., Anderson, C. W., Appella, E., Xu, Y. (2000). Phosphorylation of murine p53 at ser-18 regulates the p53 responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 11936-11941.
- Chen, P. L., Chen, Y. M., Bookstein, R., Lee, W. H. (1990). Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* *250*, 1576-1580.
- Chene, P. (1999). Mutations at position 277 modify the DNA-binding specificity of human p53 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* *263*, 1-5.
- Chene, P., Mittl, P., Grutter, M. (1997). In vitro structure-function analysis of the beta-strand 326-333 of human p53. *J Mol Biol* *273*, 873-881.
- Chiou, S. K., Rao, L., White, E. (1994). Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* *14*, 2556-2563.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., Pavletich, N. P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* *265*, 346-355.
- Clore, G. M., Omichinski, J. G., Sakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E., Gronenborn, A. M. (1994). High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science* *265*, 386-391.
- Clore, G. M., Omichinski, J. G., Sakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E., Gronenborn, A. M. (1995). Interhelical angles in the solution structure of the oligomerization domain of p53: correction. *Science* *267*, 1515-1516.
- Contente, A., Dittmer, A., Koch, M. C., Roth, J., Dobbelstein, M. (2002). A polymorphic microsatellite that mediates induction of PIG3 by p53. *Nat Genet* *30*, 315-320.
- Cowell, I. G., Okorokov, A. L., Cutts, S. A., Padget, K., Bell, M., Milner, J., Austin, C. A. (2000). Human topoisomerase IIalpha and IIbeta interact with the C-terminal region of p53. *Exp Cell Res* *255*, 86-94.
- Dang, C. V., 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*, 18019-18023.
- Delphin, C., Baudier, J. (1994). The protein kinase C activator, phorbol ester, cooperates with the wild-type p53 species of Ras-transformed embryo fibroblasts growth arrest. *J Biol Chem* *269*, 29579-29587.

- Delphin, C., Cahen, P., Lawrence, J. J., 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, 683-692.
- Delphin, C., Huang, K. P., Scotto, C., Chapel, A., Vincon, M., Chambaz, E., Garin, J., Baudier, J. (1997). The in vitro phosphorylation of p53 by calcium-dependent protein kinase C--characterization of a protein-kinase-C-binding site on p53. *Eur J Biochem* 245, 684-692.
- Demple, B., Herman, T., Chen, D. S. (1991). Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11450-11454.
- Deng, Y., Wu, X. (2000). Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing Bax translocation from cytosol to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12050-12055.
- Diller, L., Kassel, J., Nelson, C. E., Gryka, M. A., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Ozturk, M., Baker, S. J., Vogelstein, B., Friend, S. H. (1990). p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol* 10, 5772-5781.
- Donehower, L. A., Bradley, A. (1993). The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* 1155, 181-205.
- Eizenberg, O., Faber-Elman, A., Gottlieb, E., Oren, M., Rotter, V., Schwartz, M. (1996). p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. *Mol Cell Biol* 16, 5178-5185.
- el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1, 45-49.
- 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., Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, :817-825.
- Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* 312, 646-649.
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 18, 1905-1914.
- Espinosa, J. M., Emerson, B. M. (2001). Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* 8, 57-69.
- Evans, A. R., Limp-Foster, M., Kelley, M. R. (2000). Going APE over ref-1. *Mutat Res* 461, 83-108.
- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

- Fei, P., Bernhard, E. J., el-Deiry, W. S. (2002). Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res* 62, 7316-7327.
- Fields, S., Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249, 1046-1049.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-1093.
- Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F. B., Pan, Z. Q., Harper, J. W., Elledge, S. J., O'Donnell, M., Hurwitz, J. (1994). Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8655-8659.
- Fojta, M., Kubiarova, T., Vojtesek, B., Palecek, E. (1999). Effect of p53 protein redox states on binding to supercoiled and linear DNA. *J Biol Chem* 274, 25749-25755.
- Fu, L. N., Minden, M. D., and Benchimol, S. (1996). Translational regulation of human p53 gene expression. *EMBO J* 15, 4392-4401.
- Fuchs, R., Blakesley, R. (1983). Guide to the use of type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol* 100, 3-38.
- Fung, H., Bennett, R. A., Demple, B. (2001). Key role of a downstream specificity protein 1 site in cell cycle-regulated transcription of the AP endonuclease gene APE1/APEX in NIH3T3 cells. *J Biol Chem* 276, 42011-42017.
- Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E., Shay, J. W. (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol* 12, 2866-2871.
- Gaiddon, C., Moorthy, N. C., Prives, C. (1999). Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO J* 18, 5609-5621.
- Gillardon, F., Bottiger, B., Hossmann, K. A. (1997). Expression of nuclear redox factor ref-1 in the rat hippocampus following global ischemia induced by cardiac arrest. *Brain Res Mol Brain Res* 52, 194-200.
- Gobert, C., Skladanowski, A., Larsen, A. K. (1999). The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10355-10360.
- Göhler, T., Reimann, M., Cherny, D., Walter, K., Warnecke, G., Kim, E., Deppert, W. (2002). Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain. *J Biol Chem* 277, 41192-41203.
- Gorina, S., Pavletich, N. P. (1996). Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* 274, 1001-1005.

- Gorman, M. A., Morera, S., Rothwell, D. G., de La Fortelle, E., Mol, C. D., Tainer, J. A., Hickson, I. D., Freemont, P. S. (1997). The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites. *EMBO J* 16, 6548-6558.
- Gottifredi, V., Karni-Schmidt, O., Shieh, S. S., Prives, C. (2001). p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 21, 1066-1076.
- Gotz, C., Scholtes, P., Prowald, A., Schuster, N., Nastainczyk, W., Montenarh, M. (1999). Protein kinase CK2 interacts with a multi-protein binding domain of p53. *Mol Cell Biochem* 191, 111-120.
- Grosch, S., Fritz, G., Kaina, B. (1998). Apurinic endonuclease (Ref-1) is induced in mammalian cells by oxidative stress and involved in clastogenic adaptation. *Cancer Res* 58, 4410-4416.
- Grosch, S., Kaina, B. (1999). Transcriptional activation of apurinic/aprimidinic endonuclease (Ape, Ref-1) by oxidative stress requires CREB. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 859-863.
- Gu, J., Nie, L., Wiederschain, D., Yuan, Z. M. (2001). Identification of p53 sequence elements that are required for MDM2-mediated nuclear export. *Mol Cell Biol* 21, 8533-8546.
- Gu, W., Shi, X. L., Roeder, R. G. (1997). Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* 387, 819-823.
- Hainaut, P., Milner, J. (1993). A structural role for metal ions in the "wild-type" conformation of the tumor suppressor protein p53. *Cancer Res* 53, 1739-1742.
- Hainaut, P., Milner, J. (1993). Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. *Cancer Res* 53, 4469-4473.
- Halazonetis, T. D., Davis, L. J., Kandil, A. N. (1993). Wild-type p53 adopts a 'mutant'-like conformation when bound to DNA. *EMBO J* 12, 1021-1028.
- Halazonetis, T. D., 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, 5057-5064.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hansson, L. O., Friedler, A., Freund, S., Rudiger, S., Fersht, A. R. (2002). Two sequence motifs from HIF-1alpha bind to the DNA-binding site of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10305-10309.
- Hara, T., Arai, K., Koike, K. (2000). Form of human p53 protein during nuclear transport in *Xenopus laevis* embryos. *Exp Cell Res* 258, 152-161.

- Harlow, E., Crawford, L. V., Pim, D. C., Williamson, N. M. (1981). Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J Virol* 39, 861-869.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Harris, C. C., Hollstein, M. (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329, 1318-1327.
- Harrison, L., Ascione, A. G., Wilson, D. M. 3rd, Dimple, B. (1995). Characterization of the promoter region of the human apurinic endonuclease gene (APE). *J Biol Chem* 270, 5556-5564.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1, 3-11.
- Herrmann, C. P., Kraiss, S., Montenarh, M. (1991). Association of casein kinase II with immunopurified p53. *Oncogene* 6, 877-884.
- Hinds, P., Finlay, C., Levine, A. J. (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 63, 739-746.
- Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3633-3638.
- Hoh, J., Jin, S., Parrado, T., Edington, J., Levine, A. J., Ott, J. (2002). The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8467-8472.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- Hsieh, M. M., Hegde, V., Kelley, M. R., Deutsch, W. A. (2001). Activation of APE/Ref-1 redox activity is mediated by reactive oxygen species and PKC phosphorylation. *Nucleic Acids Res* 29, 3116-3122.
- Huang, P. (1998). Excision of mismatched nucleotides from DNA: a potential mechanism for enhancing DNA replication fidelity by the wild-type p53 protein. *Oncogene* 17, 261-270.
- Hupp, T. R., Lane, D. P. (1994). Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol* 4, 865-875.
- Hupp, T. R., Lane, D. P. (1994). 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., Meek, D. W., Midgley, C. A., Lane, D. P. (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71, 875-886.

- Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A., Lane, D. P. (1993). Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic Acids Res* 21, 3167-3174.
- Hupp, T. R., Sparks, A., Lane, D. P. (1995). Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* 83, 237-245.
- Inga, A., Storici, F., Darden, T. A., Resnick, M. A. (2002). Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol Cell Biol* 22, 8612-8625.
- Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M., Croce, C. M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320, 84-85.
- Iwabuchi, K., Bartel, P. L., Li, B., Marraccino, R., Fields, S. (1994). Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6098-6102.
- Izumi, T., Mitra, S. (1998). Deletion analysis of human AP-endonuclease: minimum sequence required for the endonuclease activity. *Carcinogenesis* 19, 525-527.
- Janus F, Albrechtsen N, Knippschild U, Wiesmuller L, Grosse F, Deppert W. (1999). Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* 19, 2155-2168.
- Jayaraman, L., Moorthy, N. C., Murthy, K. G., Manley, J. L., Bustin, M., Prives, C. (1998). High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Genes Dev* 12, 462-472.
- Jayaraman, L., Murthy, K. G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S., Prives, C. (1997). Identification of redox/repair protein Ref-1 as a potent activator of p53. *Genes Dev* 11, 558-570.
- Jeffrey, P. D., Gorina, S., Pavletich, N. P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267, 1498-1502.
- Jenkins, J. R., Chumakov, P., Addison, C., Sturzbecher, H. W., Wade-Evans, A. (1988). Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T antigen. *J Virol* 62, 3903-3906.
- Jenkins, J. R., Rudge, K., Currie, G. A. (1984). Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312, 651-654.
- Johnson, C. R., Morin, P. E., Arrowsmith, C. H., Freire, E. (1995). Thermodynamic analysis of the structural stability of the tetrameric oligomerization domain of p53 tumor suppressor. *Biochemistry* 34, 5309-5316.
- Jurgensmeier, J. M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., Reed, J. C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4997-5002.

- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51, 6304-6311.
- Kim, E., Albrechtsen, N., Deppert, W. (1997). DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene* 15, 857-869.
- Kim, E., Rohaly, G., Heinrichs, S., Gimnopoulos, D., Meissner, H., Deppert, W. (1999). Influence of promoter DNA topology on sequence-specific DNA binding and transactivation by tumor suppressor p53. *Oncogene* 18, 7310-7318.
- Kim, S. O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W. F. Jr, Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A., Stamler, J. S. (2002). OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* 109, 383-396.
- Klotzsche, O., Etzrodt, D., Hohenberg, H., Bohn, W., Deppert, W. (1998). Cytoplasmic retention of mutant tsp53 is dependent on an intermediate filament protein (vimentin) scaffold. *Oncogene* 16, 3423-3434.
- Koumenis, C., Alarcon, R., Hammond, E., Sutphin, P., Hoffman, W., Murphy, M., Derr, J., Taya, Y., Lowe, S. W., Kastan, M., Giaccia, A. (2001). Regulation of p53 by hypoxia: dissociation of transcriptional repression and apoptosis from p53-dependent transactivation. *Mol Cell Biol* 21, 1297-1310.
- Kraiss, S., Quaiser, A., Oren, M., Montenarh, M. (1988). Oligomerization of oncoprotein p53. *J Virol* 62, 4737-4744.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31, 472-483.
- Kubbutat, M. H., Ludwig, R. L., Ashcroft, M., Vousden, K. H. (1998). Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Mol Cell Biol* 18, 5690-5698.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lando, D., Pongratz, I., Poellinger, L., Whitelaw, M. L. (2000). A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha and the HIF-like factor. *J Biol Chem* 275, 4618-4627.
- Lane, D. P., Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A., Griffith, J. (1995). p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 81, 1013-1020.

- Lee, W., Harvey, T. S., Yin, Y., Yau, P., Litchfield, D., Arrowsmith, C. H. (1994). Solution structure of the tetrameric minimum transforming domain of p53. *Nat Struct Biol* 1, 877-890.
- Lee, D., Kim, J. W., Seo, T., Hwang, S. G., Choi, E. J., Choe, J. (2002). SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J Biol Chem* 277, 22330-22337.
- Levine, A. J., Chang, A., Dittmer, D., Notterman, D. A., Silver, A., Thorn, K., Welsh, D., Wu, M. (1994). The p53 tumor suppressor gene. *J Lab Clin Med* 123, 817-823.
- Levine, A. J., Momand, J. (1990). Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. *Biochim Biophys Acta* 1032, 119-136.
- Li, G., Ho, V. C. (1998). p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol* 139, 3-10.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., Stillman, B. (1994). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371, 534-537.
- Lill, N. L., Grossman, S. R., Ginsberg, D., DeCaprio, J., Livingston, D. M. (1997). Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* 387, 823-827.
- Lin, J., Blake, M., Tang, C., Zimmer, D., Rustandi, R. R., Weber, D. J., Carrier, F. (2001). Inhibition of p53 transcriptional activity by the S100B calcium-binding protein. *J Biol Chem* 276, 35037-35041.
- Lindsten, T., Ross, A. J., King, A., Zong, W. X., Rathmell, J. C., Shiels, H. A., Ulrich, E., Waymire, K. G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V. M., Adelman, D. M., Simon, M. C., Ma, A., Golden, J. A., Evan, G., Korsmeyer, S. J., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. (2000). The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6, 1389-1399.
- Linzer, D. I., 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.
- Liu, X., Miller, C. W., Koeffler, P. H., Berk, A. J. (1993). The p53 activation domain binds the TATA box-binding polypeptide in Holo-TFIID, and a neighboring p53 domain inhibits transcription. *Mol Cell Biol* 13, 3291-3300.
- Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., Berger, S. L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* 19, 1202-1209.
- Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.

- Lomax, M. E., Barnes, D. M., Hupp, T. R., Picksley, S. M., Campjohn, R. S. (1998). Characterization of p53 oligomerization domain mutations isolated from Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like family members. *Oncogene* *17*, 643-649.
- Lu, H., Levine, A. J. (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 5154-5158.
- Maki, C. G. (1999). Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *J Biol Chem* *274*, 16531-16535.
- Mao, Y., Mehl, I. R., Muller, M. T. (2002). Subnuclear distribution of topoisomerase I is linked to ongoing transcription and p53 status. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1235-1240.
- Marston, N. J., Jenkins, J. R., Vousden, K. H. (1995). Oligomerisation of full length p53 contributes to the interaction with mdm2 but not HPV E6. *Oncogene* *10*, 1709-1715.
- Mateu, M. G., 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*, 2748-2758.
- Mateu, M. G., Sanchez Del Pino, M. M., Fersht, A. R. (1999). Mechanism of folding and assembly of a small tetrameric protein domain from tumor suppressor p53. *Nat Struct Biol* *6*, 191-198.
- Matsumoto, Y., Kim, K., Hurwitz, J., Gary, R., Levin, D. S., Tomkinson, A. E., Park, M. S. (1999). Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/aprimidinic sites with purified human proteins. *J Biol Chem* *274*, 33703-33708.
- May, P., May, E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* *18*, 7621-7636.
- McBride, O. W., Merry, D., Givol, D. (1986). The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 130-134.
- McBride, O. W., Merry, D. E., Oren, M., and Givol, D. (1985). Human p53 cellular tumor antigen is on chromosome 17p13. *Cytogenet Cell Genet* *40*, 694-695.
- McCoy, M., Stavridi, E. S., Waterman, J. L., Wieczorek, A. M., Opella, S. J., Halazonetis, T. D. (1997). Hydrophobic side-chain size is a determinant of the three-dimensional structure of the p53 oligomerization domain. *EMBO J* *16*, 6230-6236.
- McKinney, K., Prives, C. (2002). Efficient specific DNA binding by p53 requires both its central and C-terminal domains as revealed by studies with high-mobility group 1 protein. *Mol Cell Biol* *22*, 6797-6808.
- McLure, K. G., Lee, P. W. (1996). A PAb240+ conformation of wild type p53 binds DNA. *Oncogene* *13*, 1297-1303.
- McLure, K. G., Lee, P. W. (1998). How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J* *17*, 3342-3350.

- McLure, K. G., Lee, P. W. (1999). p53 DNA binding can be modulated by factors that alter the conformational equilibrium. *EMBO J* 18, 763-770.
- Melle, C., Nasheuer, H. P. (2002). Physical and functional interactions of the tumor suppressor protein p53 and DNA polymerase alpha-primase. *Nucleic Acids Res* 30, 1493-1499.
- Meplan, C., Richard, M. J., Hainaut, P. (2000). Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene* 19, 5227-5236.
- Middeler, G., Zerf, K., Jenovai, S., Thulig, A., Tschodrich-Rotter, M., Kubitscheck, U., Peters, R. (1997). The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. *Oncogene* 14, 1407-1417.
- Miller, M., Lubkowski, J., Rao, J. K., Danishefsky, A. T., Omichinski, J. G., Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Appella, E., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. (1996). The oligomerization domain of p53: crystal structure of the trigonal form. *FEBS Lett* 399, 166-170.
- Mitomo, K., Nakayama, K., Fujimoto, K., Sun, X., Seki, S., Yamamoto, K. (1994). Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the p50 subunit of NF-kappa B in vitro. *Gene* 145, 197-203.
- Mittl, P. R., Chene, P., Grutter, M. G. (1998). Crystallization and structure solution of p53 (residues 326-356) by molecular replacement using an NMR model as template. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 86-89.
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., Reed, J. C. (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 54, 3131-3135.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.
- Moll, U. M., Riou, G., Levine, A. J. (1992). Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7262-7266.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245.
- Moroni, M. C., Hickman, E. S., Denchi, E. L., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H., Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3, 552-558.
- Mosner, J., Deppert, W. (1994). p53 and mdm2 are expressed independently during cellular proliferation. *Oncogene* 9, 3321-3328.
- Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F., Deppert, W. (1995). Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J* 14, 4442-4449.

-
- Muller-Tiemann, B. F., Halazonetis, T. D., 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*, 6079-6084.
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Muller, B., Wiesmuller, L., Deppert, W., Grosse, F. (1996). p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* *85*, 1089-1099.
- Mundt, M., Hupp, T., Fritsche, M., Merkle, C., Hansen, S., Lane, D., Groner, B. (1997). Protein interactions at the carboxyl terminus of p53 result in the induction of its in vitro transactivation potential. *Oncogene* *15*, 237-244.
- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K. K., Hoffman, W. H., Evans, R. M., Levine, A. J., George, D. L. (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* *13*, 2490-2501.
- Nagaich, A. K., Zhurkin, V. B., Durell, S. R., Jernigan, R. L., Appella, E., 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*, 1875-1880.
- Nakamura, S., Roth, J. A., 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*, 9391-9398.
- Nelson, W. G., Kastan, M. B. (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* *14*, 1815-1823.
- Nguyen, L. H., Barsky, D., Erzberger, J. P., Wilson, D. M. 3rd. (2000). Mapping the protein-DNA interface and the metal-binding site of the major human apurinic/apyrimidinic endonuclease. *J Mol Biol* *298*, 447-459.
- Nicholls, C. D., McLure, K. G., Shields, M. A., 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*, 12937-12945.
- Nie, Y., Li, H. H., Bula, C. M., Liu, X. (2000). Stimulation of p53 DNA binding by c-Abl requires the p53 C terminus and tetramerization. *Mol Cell Biol* *20*, 741-748.
- Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., Stahl, H. (1993). p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J* *12*, 2389-2396.
- Offer, H., Erez, N., Zurer, I., Tang, X., Milyavsky, M., Goldfinger, N., Rotter, V. (2002). The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis* *23*, 1025-1032.
- Offer, H., Milyavsky, M., Erez, N., Matas, D., Zurer, I., Harris, C. C., Rotter, V. (2001). Structural and functional involvement of p53 in BER in vitro and in vivo. *Oncogene* *20*, 581-589.

- Offer, H., Wolkowicz, R., Matas, D., Blumenstein, S., Livneh, Z., Rotter, V. (1999). Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett* 450, 197-204.
- Offer, H., Zurer, I., Banfalvi, G., Reha'k, M., Falcovitz, A., Milyavsky, M., Goldfinger, N., Rotter, V. (2001). p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res* 61, 88-96.
- Oren, M. (1985). The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 823, 67-78.
- Oren, M., Maltzman, W., Levine, A. J. (1981). Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* 1, 101-110.
- Otto, A., Deppert, W. (1993). Upregulation of mdm-2 expression in Meth A tumor cells tolerating wild-type p53. *Oncogene* 8, 2591-2603.
- Palecek, E., Brazdova, M., Brazda, V., Palecek, J., Billova, S., Subramaniam, V., Jovin, T. M. (2001). Binding of p53 and its core domain to supercoiled DNA. *Eur J Biochem* 268, 573-581.
- Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D., Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312, 649-651.
- Parks, D., Bolinger, R., Mann, K. (1997). Redox state regulates binding of p53 to sequence-specific DNA, but not to non-specific or mismatched DNA. *Nucleic Acids Res* 25, 1289-1295.
- Pascucci, B., Stucki, M., Jonsson, Z. O., Dogliotti, E., Hubscher, U. (1999). Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem* 274, 33696-33702.
- Patschinsky, T., Deppert, W. (1990). Phosphorylation of p53 in primary, immortalised and transformed Balb/c mouse cells. *Oncogene* 5, 1071-1076.
- Pearson, G. D., Merrill, G. F. (1998). Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *J Biol Chem* 273, 5431-5434.
- Pearson, C. E., Zorbas, H., Price, G. B., Zannis-Hadjopoulos, M. (1996). Inverted repeats, stem-loops, and cruciforms: significance for initiation of DNA replication. *J Cell Biochem* 63, 1-22.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.
- Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. P., Kuszewski, J., Gronenborn, A. M. (1996). The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal. *Structure* 4, 613-620.

- Rainwater, R., Parks, D., Anderson, M. E., Tegtmeier, P., Mann, K. (1995). Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol Cell Biol* *15*, 3892-3903.
- Ramana, C. V., Boldogh, I., Izumi, T., Mitra, S. (1998). Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 5061-5066.
- Reed, M., Woelker, B., Wang, P., Wang, Y., Anderson, M. E., Tegtmeier, P. (1995). The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9455-9459.
- Reisman, D., Greenberg, M., Rotter, V. (1988). Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 5146-5150.
- Robson, C. N., Hickson, I. D. (1991). Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res* *19*, 5519-5523.
- Robson, C. N., Hochhauser, D., Craig, R., Rack, K., Buckle, V. J., Hickson, I. D. (1992). Structure of the human DNA repair gene HAP1 and its localisation to chromosome 14q 11.2-12. *Nucleic Acids Res* *20*, 4417-4421.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P., Hay, R. T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* *20*, 8458-8467.
- Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borner, C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* *391*, 496-499.
- Ruppert, J. M., Stillman, B. (1993). Analysis of a protein-binding domain of p53. *Mol Cell Biol* *13*, 3811-3820.
- Rustandi, R. R., Baldisseri, D. M., Weber, D. J. (2000). Structure of the negative regulatory domain of p53 bound to S100B(beta-beta). *Nat Struct Biol* *7*, 570-574.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-1354.
- Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M. S., Anderson, C. W., Erickson, J. W., Appella, E., Xie, D. (1997). Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* *36*, 10117-10124.
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E., Prendergast, G. C. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* *15*, 887-898.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd Edition; Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.

- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497-1501.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schagger, H., and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.
- Schneider, C., Newman, R. A., Sutherland, D. R., Asser, U., and Greaves, M. F. (1982). A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem* 257, 10766-10769.
- Scolnick, D. M., Chehab, N. H., Stavridi, E. S., Lien, M. C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S. L., Halazonetis, T. D. (1997). CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 57, 3693-3696.
- Seki, S., Hatsushika, M., Watanabe, S., Akiyama, K., Nagao, K., Tsutsui, K. (1992). cDNA cloning, sequencing, expression and possible domain structure of human APEX nuclease homologous to Escherichia coli exonuclease III. *Biochim Biophys Acta* 1131, 287-299.
- Selivanova, G., Iotsova, V., Kiseleva, E., Strom, M., Bakalkin, G., Grafstrom, R. C., Wiman, K. G. (1996). The single-stranded DNA end binding site of p53 coincides with the C-terminal regulatory region. *Nucleic Acids Res* 24, 3560-3567.
- Seo, Y. R., Fishel, M. L., Amundson, S., Kelley, M. R., Smith, M. L. (2002). Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene* 21, 731-737.
- Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E. F., Karin, M. (2000). The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 103, 897-907.
- Shaulsky, G., Ben-Ze'ev, A., Rotter, V. (1990). Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 5, 1707-1711.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 10, 6565-6577.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Rotter, V. (1991). Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. *Cancer Res* 51, 5232-5237.
- Smith, D. B., Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Soussi, T., Caron de Fromentel, C., May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5, 945-952.

- Soussi, T., Legros, Y., Lubin, R., Ory, K., Schlichtholz, B. (1994). Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 57, 1-9.
- Soussi, T., May, P. (1996). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol* 260, 623-637.
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224.
- Stenger, J. E., Mayr, G.A., Mann, K., Tegtmeyer, P. (1992). Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. *Mol Carcinog* 5, 102-106.
- Stenger, J. E., Tegtmeyer, P., Mayr, G. A., Reed, M., Wang, Y., Wang, P., Hough, P. V., Mastrangelo, I. A. (1994). p53 oligomerization and DNA looping are linked with transcriptional activation. *EMBO J* 13, 6011-6020.
- Stommel, J. M., Marchenko, N. D., Jimenez, G. S., Moll, U. M., Hope, T. J., 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, 1660-1672.
- Strauß, P. R., Holt, C. M. (1998). Domain mapping of human apurinic/aprimidinic endonuclease. Structural and functional evidence for a disordered amino terminus and a tight globular carboxyl domain. *J Biol Chem* 273, 14435-14441.
- SurrIDGE, C. (1994). Forewarned is four-armed. *Nature* 372, 482.
- Takenaka, I., Morin, F., Seizinger, B. R., Kley, N. (1995). Regulation of the sequence-specific DNA binding function of p53 by protein kinase C and protein phosphatases. *J Biol Chem* 270, 5405-5411.
- Tan, Z., Sankar, R., Tu, W., Shin, D., Liu, H., Wasterlain, C. G., Schreiber, S. S. (2002). Immunohistochemical study of p53-associated proteins in rat brain following lithium-pilocarpine status epilepticus. *Brain Res* 929, 129-138.
- Tell, G., Pellizzari, L., Pucillo, C., Puglisi, F., Cesselli, D., Kelley, M. R., Di Loreto, C., Damante, G. (2000). TSH controls Ref-1 nuclear translocation in thyroid cells. *J Mol Endocrinol* 24, 383-390.
- Thut, C. J., Chen, J. L., Klemm, R., Tjian, R. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267, 100-104.
- Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W. S., Waldman, T., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1994). p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum Mol Genet* 3, 1537-1542.
- Tom, S., Ranalli, T. A., Podust, V. N., Bambara, R. A. (2001). Regulatory roles of p21 and apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in base excision repair. *J Biol Chem* 276, 48781-48789.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

Turrens, J. F., Alexandre, A., Lehninger, A. L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237, 408-414.

Ueno, M., Masutani, H., Arai, R. J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J., Nikaido, T. (1999). Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 274, 35809-35815.

Ullrich, S. J., Mercer, W. E., Appella, E. (1992). Human wild-type p53 adopts a unique conformational and phosphorylation state in vivo during growth arrest of glioblastoma cells. *Oncogene* 7, 1635-1643.

Unger, T., Nau, M. M., Segal, S., Minna, J. D. (1992). p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. *EMBO J* 11, 1383-1390.

van Holde, K., Zlatanova, J. (1994). Unusual DNA structures, chromatin and transcription. *Bioessays* 16, 59-68.

van Tuinen, P., Ledbetter, D. H. (1987). Construction and utilization of a detailed somatic cell hybrid mapping panel for human chromosome 17: localization of an anonymous clone to the critical region of Miller-Dieker syndrome, deletion 17p13. *Cytogenet Cell Genet* 46, 708-709.

Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13, 213-217.

Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L., 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, 4668-4679.

Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* 70, 523-526.

Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9, 138-141.

Vojtesek, B., Bartek, J., Midgley, C. A., 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, 237-244.

Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-578.

Walker, L. J., Robson, C. N., Black, E., Gillespie, D., Hickson, I. D. (1993). Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. *Mol Cell Biol* 13, 5370-5376.

Wallace, S. S. (1998). Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res* 150, 60-79.

- Wang, T., Kobayashi, T., Takimoto, R., Denes, A. E., Snyder, E. L., el-Deiry, W. S., Brachmann, R. K. (2001). hADA3 is required for p53 activity. *EMBO J* 20, 6404-6413.
- Wang, Y., Reed, M., Wang, P., Stenger, J. E., Mayr, G., Anderson, M. E., Schwedes, J. F., Tegtmeier, P. (1993). p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev* 7, 2575-2586.
- Ward, G. K., McKenzie, R., Zannis-Hadjopoulos, M., Price, G. B. (1990). The dynamic distribution and quantification of DNA cruciforms in eukaryotic nuclei. *Exp Cell Res* 188, 235-246.
- Waterman, J. L., Shenk, J. L., Halazonetis, T. D. (1995). The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *EMBO J* 14, 512-519.
- Weaver, R. F., Weissmann, C. (1979). Mapping of RNA by a modification of the Berk-Sharp procedure: the 5' termini of 15 S beta-globin mRNA precursor and mature 10 s beta-globin mRNA have identical map coordinates. *Nucleic Acids Res* 7, 1175-1193.
- Weinberg, R. A. (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 49, 3713-3721.
- White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 10, 1-15.
- Wickham, T. J., Davis, T., Granados, R. R., Shuler, M. L., Wood, H. A. (1992). Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog* 8, 391-396.
- Wilder, P. T., Rustandi, R. R., Drohat, A. C., Weber, D. J. (1998). S100B(beta-beta) inhibits the protein kinase C-dependent phosphorylation of a peptide derived from p53 in a Ca²⁺-dependent manner. *Protein Sci* 7, 794-798.
- Wolkowicz, R., Peled, A., Elkind, N. B., 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.
- Wu, H.-H., Sherman, M., Yuan, Y.-C., Momand, J. (1999). Direct redox modulation of p53 protein: potential sources of redox control and potential outcomes. *Gene Ther Mol Biol* 4, 119-132.
- Wu, L., Bayle, J. H., Elenbaas, B., Pavletich, N. P., Levine, A. J. (1995). Alternatively spliced forms in the carboxy-terminal domain of the p53 protein regulate its ability to promote annealing of complementary single strands of nucleic acids. *Mol Cell Biol* 15, 497-504.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556.
- Xanthoudakis, S., Curran, T. (1992). Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J* 11, 653-665.

Xanthoudakis, S., Miao, G. G., Curran, T. (1994). The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 23-27.

Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y. C., Curran, T. (1992). Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J* *11*, 3323-3335.

Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* *366*, 701-704.

Yacoub, A., Kelley, M. R., Deutsch, W. A. (1997). The DNA repair activity of human redox/repair protein APE/Ref-1 is inactivated by phosphorylation. *Cancer Res* *57*, 5457-5459.

Yakovleva, T., Pramanik, A., Kawasaki, T., Tan-No, K., Gileva, I., Lindegren, H., Langel, U., Ekstrom, T. J., Rigler, R., Terenius, L., 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*, 15650-15658.

Yakovleva, T., Pramanik, A., Terenius, L., Ekstrom, T., Bakalkin, G. (2002). p53 latency - out of the blind alley. *Trends Biochem Sci* *27*, 612-618.

Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., Kornbluth, S. (1999). Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *EMBO J* *18*, 2174-2183.

Zakut-Houri, R., Bienz-Tadmor, B., Givol, D., Oren, M. (1985). Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J* *4*, 1251-1255.

Zeng, Y., Piwnicka-Worms, H. (1999). DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* *19*, 7410-7419.

Zhao, B., Grandy, D. K., Hagerup, J. M., Magenis, R. E., Smith, L., Chauhan, B. C., Henner, W. D. (1992). The human gene for apurinic/apyrimidinic endonuclease (HAP1): sequence and localization to chromosome 14 band q12. *Nucleic Acids Res* *20*, 4097-4098.

Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S. H., Prives, C. (2001). A role for p53 in base excision repair. *EMBO J* *20*, 914-923.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BrCN	Bromcyan
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>copy</i> DNA
cm	Zentimeter
cpm	Zählpulse pro Minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Nuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>Elektrophoresis-Mobility-Shift-Assay</i>
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm bzw. Gravitationskonstante
G ₁ /S	Übergang von der <i>Gap1</i> - in die Synthese-Phase

G ₂ /M	Übergang von der <i>Gap2</i> -Phase in die Mitose
GST	Glutathion-S-Transferase
Gy	Gray
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylproperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPI	Heinrich-Pette Institut
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luri Bertani
M	molar
mA	Milliampere
max.	maximal
MCS	multiple Klonierungsstelle
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
NES	nukleäres Exportsignal
ng	Nanogramm
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Pikomol
Pol.	Polymerase
PVDF	Polyvinylidenflourid
rATP	Adenosintriphosphat

rCTP	Cytidintriphosphat
Ref-1	Redox-Faktor 1
rGTP	Guansintriphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rUTP	Uridintriphosphat
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	src-Homologie-Domäne
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TCM	Tris/Calcium/Magnesium
TE	Tris/EDTA
TfB	Transformationspuffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTBS	Tween 20 / <i>Tris-buffered saline</i>
U	Unit(s)
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Deppert für das interessante und abwechslungsreiche Thema. Seine Ideen und seine stete Diskussionsbereitschaft haben mich immer wieder inspiriert.

Frau Prof. Dr. E. Pratje möchte ich für die freundliche Übernahme des Gutachtens dieser Arbeit und für ihr ehrliches Interesse an meinem Fortkommen danken.

Mein Dank gebührt ebenfalls den rezenten und den ehemaligen Mitforschern dieser Abteilung. Die gute Zusammenarbeit hat viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

An dieser Stelle dürfen auch meine und Svenja's Familie nicht unerwähnt bleiben, die mit ihrer Hilfsbereitschaft und Fürsorge immer für einen da waren.

Svenja gilt mein Dank für alle Höhen und Tiefen, die ich mit ihr durchleben durfte.