

Einfluss der DNA-Konformation auf die Bindungsaffinität von wt und mutiertem p53

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von Thomas Göhler
aus Oldenburg

Hamburg, April 2003

Diese Arbeit wurde am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Deppert, Abteilung für Tumorstudiologie, durchgeführt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Deppert, W., Göhler, T., Koga, H. und Kim, E. (2000). Mutant p53: „gain of function“ through perturbation of nuclear structure and function. J. Cell. Biochem., Suppl. 35, 115-122

Göhler, T., Reimann, M., Cherny, D., Walter, K., Warnecke, G., Kim, E. und 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 (43), 41192-41203

Wölcke, J., Reimann, M., Klumpp, M., Göhler, T., Kim, E. und Deppert, W. (2003). Analysis of p53 „Latency“ and „Activation“ by Fluorescence Correlation Spectroscopy: Evidence for Different modes of High Affinity DNA Binding. Zur Veröffentlichung eingereicht.

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Deppert
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Hahn

Datum der Disputation: 30.5.2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Tumorsuppressorprotein p53	1
1.2 Struktur des p53-Proteins	2
1.3 Vergleich der p53-spezifischen Bindungsstellen	6
1.4 P53 als DNA-bindendes Protein	8
1.5 Regulation der p53-Stabilität	11
1.6 Funktionen von wt p53	12
1.7 Funktionen von mutiertem p53	14
2. Aufgabenstellung	17
3. Materialien und Methoden	19
3.1 Chemikalien, Biochemikalien und andere Materialien	19
3.2 Geräte	20
3.3 Oligonukleotide	22
3.4 Proteine	23
3.5 Antikörper	24
3.6 Enzyme	24
3.7 Puffer und Ladepuffer	24
3.8 Molekulargewichtsstandards	25
3.9 Proteinbiochemische Methoden	25
3.9.1 Isolierung von humanem rekombinanten p53 aus Baculovirus infizierten Insektenzellen	25
3.9.2 Aufreinigung von rekombinantem p53 durch FPLC (E <u>ast</u> P <u>rotein</u> L <u>iquid</u> C <u>hromatography</u>)	26
3.9.3 Reinigung eines GST-MDM2-Fusionsproteins aus Baculovirus infizierten Insektenzellen	27
3.9.4 Crosslinking und Immundetektion von p53-Oligomeren	27
3.9.5 <i>In vitro</i> Ubiquitinierung von p53	28
3.9.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.9.7 Coomassie-Färbung von Protein-Gelen	29
3.9.8 Western-Blotting	29
3.9.9 Bindung von linearen und strukturierten DNA-Substraten an ein p53-Protein-Array	30

3.10 Methoden zur Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren	30
3.10.1 Agarose-Gelelektrophorese	30
3.10.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
3.10.3 Quantifizierung von Nukleinsäure-Lösungen	31
3.11 DNA-Bindungsassay	31
3.11.1 Radioaktive 5´-Markierung von Oligonukleotiden	31
3.11.2 Herstellung von radioaktiv markierten Substraten für DNA-Bindungsassays	32
3.11.3 Diffusionselution von Oligonukleotiden aus Polyacrylamid-Gelen	32
3.11.4 Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Substraten durch Gelfiltration	33
3.11.5 DNA-Bindungsassay (Electrophoretic Mobility Shift Assay "EMSA")	33
3.11.6 Detektion der Protein- und DNA-Komponenten eines EMSA-Assays durch Semi-Dry-Blotting	34
3.11.7 DNase I Protektionassay	34
3.12 Reinigung von Antikörpern	35
3.13 Herstellung eines DNA-Substrates für elektronenmikroskopische Untersuchungen	35
3.14 Elektronenmikroskopie	36
3.15 Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch FIDA (Fluorescence <u>i</u> ntensity <u>d</u> istribution <u>a</u> nalys <u>i</u> s)	36
4. Ergebnisse	38
4.1 Herstellung von strukturierten DNA-Substraten	38
4.2 Wt p53 bindet an strukturierte DNA ohne Aktivierung durch den C-terminalen Antikörper PAb421	40
4.3 P53 bindet an strukturierte DNA als Tetramer	43
4.4 Die Interaktion von p53 mit nicht-linearer DNA ist sequenzabhängig	45
4.5 Die Interaktion von wt p53 mit nicht-linearer DNA ist struktur- spezifisch	47
4.6 Der C-Terminus des p53-Proteins reguliert die Wechselwirkung mit strukturierter DNA	50

4.7 Analyse von p53-DNA-Komplexen durch Elektronenmikroskopie	54
4.8 Mutiertes p53 zeigt höhere Affinität zu strukturierter als zu linearer DNA	57
4.9 Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch Fluorescence intensity distribution analysis (FIDA)	62
4.10 Bindung an strukturierte DNA ist eine generelle Eigenschaft von mutiertem p53	64
4.11 P53 im Komplex mit strukturierter DNA ist gegen eine MDM2-abhängige Ubiquitinierung geschützt	70
5. Diskussion	74
6. Zusammenfassung	85
7. Summary	86
8. Literaturverzeichnis	87
9. Anhang	100
9.1 Verwendete Abkürzungen	100

1. Einleitung

1.1 Das Tumorsuppressorprotein p53

Innerhalb von Körperzellen gibt es zwei Wege, auf denen Mutationen zu der für Krebs charakteristischen unkontrollierten Zellteilung und der Fähigkeit zur Metastasenbildung führen.

Der erste besteht darin ein Gen zu überaktivieren, welches die Zellproliferation und das Zellwachstum stimuliert. Derartige Mutationen sind dominant und nur eine der beiden Genkopien in der Zelle muss diese Veränderung durchmachen damit es zur Krebsentstehung kommt. Ein derart stimulierendes Gen wird als Onkogen und das entsprechende normale Allel als Proto-Onkogen bezeichnet. Zu den Onkogenen gehören z.B. die Gene *myc*, *ras*, *sis* oder *erb-4*.

Der zweite Weg, der zur Krebsentstehung führen kann, ist die Inaktivierung eines Gens, welches die Zellproliferation hemmt. Solche Mutationen werden als rezessiv bezeichnet und heben nur dann die Wachstumsbeschränkungen der Zelle auf, wenn beide Genkopien inaktiviert sind oder fehlen. Solche Gene werden als Tumorsuppressorgene bezeichnet. Zu den bekanntesten zählen das Retinoblastom-Gen *Rb* und *p53*.

Innerhalb der Tumorsuppressoren nimmt p53 als Tumorsuppressor eine zentrale Rolle ein, die dadurch unterstrichen wird, dass das *p53*-Gen das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren ist. In ca. 50% aller Tumoren ist das *p53*-Gen inaktiviert (Hollstein *et al.*, 1996). Diese Rate liegt bei häufig auftretenden Tumoren, wie Kolonkarzinomen, sogar noch etwas höher. In diesen Fällen beträgt die Rate über 60%.

Das p53-Protein wurde 1979 im Komplex mit dem großen T-Antigen von SV40 transformierten Zellen isoliert (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979).

Frühe Untersuchungen legten nahe, dass p53 ein klassisches Proto-Onkogen ist (Crawford *et al.*, 1981; Eliyahu *et al.*, 1984). In den folgenden Jahren stellte sich jedoch heraus, dass diese ersten Untersuchungen mit mutiertem p53 durchgeführt wurden. Wt p53 ist dagegen in der Lage, die Transformation durch Onkogene zu unterdrücken und Zellen, die einen transformierten Phänotyp aufweisen in den nicht-transformierten Zustand zurückzuführen (Finlay *et al.*, 1989; Hinds *et al.*, 1989). P53

wurde daraufhin entsprechend seiner Wildtyp-Eigenschaften als Tumorsuppressor klassifiziert.

P53 ist ein nukleares Phosphoprotein, welches in normalen Zellen eine sehr kurze Halbwertszeit aufweist (6-30 min) und nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorkommt (1000-10000 Kopien pro Zelle). Tumorzellen mit mutiertem p53 enthalten dagegen eine bis zu 100fach höhere Konzentration an p53.

1.2 Struktur des p53-Proteins

Das humane *p53*-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p13.1) und kodiert für ein 53 kDa großes Protein aus 393 Aminosäuren. Das *p53*-Gen besteht aus 11 Exons, von denen die Exons 2-11 translatiert werden.

Auf der Polypeptidkette von p53 unterscheidet man verschiedene Domänen, denen unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden können (Abb. 1).

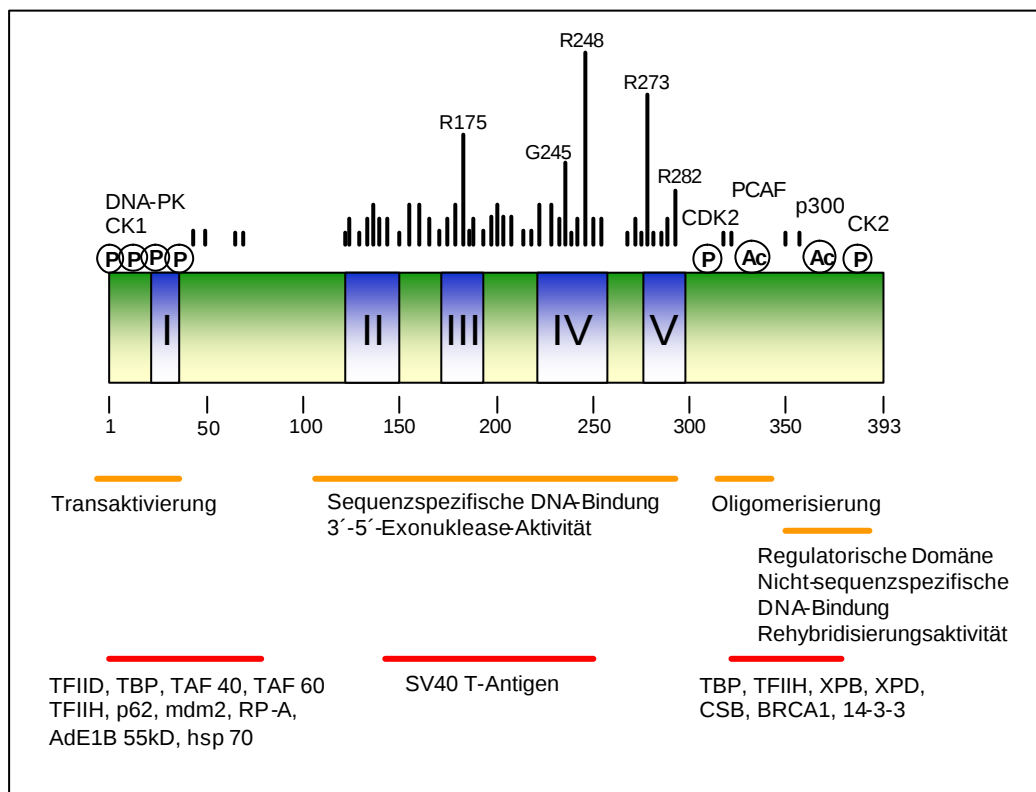


Abb. 1: Struktur von p53. Eingezeichnet sind die konservierten Domänen (blau mit römischen Ziffern), Acetylierungsstellen (Ac), Phosphorylierungsstellen (P) jeweils mit den entsprechenden Enzymen. Punktmutationen sind als vertikale schwarze Striche dargestellt. Die häufigsten Punktmutationen sind gekennzeichnet. Funktionelle Domänen sind als orangefarbene Balken und Interaktionsdomänen für verschiedene zelluläre und virale Proteine sind als rote Balken markiert.

Die N-terminale Region des p53-Proteins (Aminosäuren 1-42) stellt die Transaktivierungsdomäne dar (Fields und Jang, 1990; Unger *et al.*, 1992). Sie ist durch einen

hohen Anteil saurer Aminosäuren gekennzeichnet und fungiert durch die Interaktion mit basalen Transkriptionsfaktoren als Transaktivator von spezifischen Zielgenen. Die Aminosäuren 13-23 sind bei vielen Spezies identisch. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren F19, L22 und W23 für die transkriptionelle Aktivität des Proteins essentiell sind (Lin *et al.*, 1995).

An den N-Terminus von p53 können eine Vielzahl von viralen und zellulären Proteinen binden. Dazu gehören unter anderem das E1b-Protein (Braithwaite und Jenkins, 1989; Kao *et al.*, 1990), MDM2 (Chen *et al.*, 1993; Onliner *et al.*, 1993), RP-A (Dutta *et al.*, 1993), hsp70 (Lam und Calderwood, 1992), TATA-Box bindendes Protein (TBP; Seto *et al.*, 1992; Truant *et al.*, 1993) und TBP assoziierte Faktoren (TAF; Lu und Levine, 1995; Thut *et al.*, 1995).

Die Bindung des E1b- oder des MDM2-Proteins an die N-terminale Region von p53 führt zu einer Inhibierung der Transaktivierungsfunktion von p53 (Momand *et al.*, 1992; Yew und Berk, 1992; Onliner *et al.*, 1993; Levine, 1997). In beiden Fällen spielen die Aminosäuren L22 und W23 eine wichtige Rolle für diese Protein-Protein-Interaktionen (Lin *et al.*, 1994; Levine, 1997).

Im N-terminalen Bereich von p53 befindet sich weiter eine Prolin-reiche Region (Aminosäuren 63-97), die sich durch fünf Wiederholungen des Motivs PxxP auszeichnet (P = Prolin, x = beliebige Aminosäure). Die große Ähnlichkeit dieser Sequenz mit dem SH3-Bindungsmotiv anderer Proteine legt eine Interaktion mit Elementen von Signaltransduktionswegen nahe. Es konnte gezeigt werden, dass diese Region für die Suppressoreigenschaften des Proteins (Walker und Levine, 1996), für die Apoptoseinduktion (Sakamuro *et al.*, 1997; Venot *et al.*, 1998) und für die Bindung des HPV-16 E6-Proteins notwendig ist (Li und Coffino, 1996).

Die Kerndomäne (Aminosäuren 102-292) ist für die zentrale Funktion des p53-Proteins als transkriptioneller Aktivator verantwortlich. Hier finden sich 90% aller Punktmutationen im *p53*-Gen, die zu einem Aminosäureaustausch führen. Auch sind in der Kerndomäne vier der fünf evolutionär konservierten Regionen des Proteins vereinigt (Soussi *et al.*, 1990). In dieser liegen auch die am häufigsten vorkommenden Punktmutationen („hot-spot“ Mutationen). Als primäre Eigenschaft vermittelt die Kerndomäne die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 (Kern *et al.*, 1991; Funk *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 1994). Durch röntgenkristallographische Untersuchungen der Kerndomäne im Komplex mit DNA (Cho *et al.*, 1994) konnten wichtige Hinweise auf die molekularen Wechselwirkungen innerhalb des Protein-DNA-Komplexes gewon-

nen werden. Die Aminosäuren S241, R273, A276 und R283 stehen in direktem Kontakt mit dem Phosphatrückgrat innerhalb der großen Furche der DNA, während die Aminosäuren K120, C277 und R280 Wasserstoffbrückenbindungen zu Nukleobasen ausbilden. Die Aminosäure R248 bildet mehrere Wasserstoffbrücken zum Phosphatrückgrat innerhalb der kleinen Furche der DNA-Helix aus.

Die in der Kerndomäne auftretenden Mutationen können aufgrund kristallographischer Daten in zwei Gruppen unterteilt werden. Klasse I Mutationen betreffen diejenigen Aminosäuren, die in direktem Kontakt mit der DNA stehen. Dazu gehören R248 und R273, die am häufigsten mutierten Aminosäuren im p53-Molekül. Klasse II Mutationen betreffen Aminosäuren, die einen stabilisierenden Effekt auf die Konformation der Kerndomäne ausüben. Dazu gehören R175, G245, R249 und R282. Drei dieser Aminosäuren sind Arginine, die mit ihren Seitenketten durch van-der-Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrücken mit anderen Seitenketten oder Carbonylgruppen der Polypeptidkette wechselwirken. Mehr als 40% aller Punktmutationen im p53-Protein betreffen die Aminosäuren R175, G245, R248, R249, R273 und R282, die entweder eine wichtige Rolle für die strukturelle Integrität der Kerndomäne oder für die Wechselwirkung mit DNA spielen.

Neben der DNA-Bindung ist in der Kerndomäne die 3'-5' gerichtete Exonuklease-Aktivität von p53 (Mummenbrauer *et al.*, 1996) und dessen Fähigkeit seine mRNA zu binden (Mosner *et al.*, 1995) lokalisiert. Die mit der Bindung an DNA unvereinbare Exonuklease-Aktivität wird gegenläufig zur sequenzspezifischen DNA-Bindung über die C-terminale Domäne und über Phosphorylierung reguliert (Janus *et al.*, 1999).

Die C-terminale Region von p53 (Aminosäuren 300-393) enthält eine flexible „linker“-Domäne (Aminosäuren 300-318), die die Kerndomäne mit der C-terminalen Domäne verbindet. Es folgt eine Oligomerisierungsdomäne, die dafür verantwortlich ist, dass p53 in Zellen als Tetramer vorliegt (Aminosäuren 323-356). Im Anschluss an die Oligomerisierungsdomäne folgt eine stark basische Region (Aminosäuren 363-393). Diese Domäne ist in der Lage unspezifisch an ungepaarte Basen und einzelsträngige DNA-Enden zu binden. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Region eine unspezifische Bindungsaktivität gegenüber DNA und RNA vermittelt (Wang *et al.*, 1993; Bakalkin *et al.*, 1995; Bayle *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1995). Der C-Terminus katalysiert darüber hinaus auch die Hybridisierung von Einzelstrang-DNA oder RNA zu Doppelsträngen und kann spezifisch an geschädigte DNA binden (Bakalkin *et al.*, 1994; Brain und Jenkins, 1994; Prives *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995).

Über Modifikationen in dieser Region kann die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität der Kerndomäne positiv reguliert werden (Halazonetis und Kandil, 1993; Hupp und Lane, 1994; Hupp *et al.*, 1995; Shaw *et al.*, 1996; Ko und Prives, 1996; Okorokov *et al.*, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1998;).

Das p53-Protein besitzt darüber hinaus im C-Terminus drei Kernlokalisierungssignale (NLS 1: AS 312-318; NLS 2: AS 365-370; NLS 3: 375-380), von denen dem NLS 1 die größte Bedeutung zukommt (Dang und Lee, 1989; Shaulsky *et al.*, 1990). Neben den Kernlokalisierungssignalen wird die subzelluläre Lokalisation von einem Kernexportsignal (NES: AS 340-351) bestimmt. Dieses ist jedoch im p53-Tetramer maskiert, da es in der Oligomerisierungsdomäne des Proteins liegt (Middeler *et al.*, 1997; Stommel *et al.*, 1999).

1.3 Vergleich der p53-spezifischen Bindungsstellen

Die Konsensussequenz der p53-Bindungsstelle besteht aus zwei Kopien (Dekameren) der Sequenz 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy - 3' (Pu = Purine, Py = Pyrimidine), die durch 0 bis 13 Basenpaaren voneinander getrennt sind (el-Deiry *et al.*, 1992). Diese Sequenz befindet sich in räumlicher Nähe zu den meisten p53-regulierten Promotoren.

Die Zusammensetzung der p53-Konsensussequenz lässt theoretisch eine Vielzahl von möglichen p53-Bindungsstellen zu, da nur zwei von zehn Basen (C an Position 4 und G an Position 7) konserviert sind. Vergleicht man diese „perfekte“ Sequenz mit den p53-Bindungsstellen nativer Promotoren, so wird deutlich, dass diese von der Konsensussequenz erheblich abweichen (Tab. 1)

p53 Zielgen	Sequenz der p53 Bindungsstelle	Literatur
<i>p21</i>	<u>GAACATGTCC</u> cAACATGTTg	el-Deiry <i>et al.</i> , 1993
<i>pcna</i>	<u>GAACAAGTCC</u> GGGCATAgT	Morris <i>et al.</i> , 1996
<i>Cyclin G</i>	AGACcTGCCC <u>GGGCAAGCCT</u>	Okamoto <i>et al.</i> , 1994
<i>msh2</i>	<u>AGGCTAGTTT</u> AAGtTtcCTT	Scherer <i>et al.</i> , 1996
<i>gml</i>	AtGCTTGCCC <u>AGGCATGTCC</u>	Komiya <i>et al.</i> , 1999
<i>mdm2</i>	GGtCAAGTTg GGACAcGTCC-N ₁₇ GAGCTAaGTC tGACATGTCT	Juven <i>et al.</i> , 1993
<i>egf-r</i>	AGACTAGgCC <u>GAGCTAGCC</u> <u>GAGCgAGCTC</u>	Deb <i>et al.</i> , 1994
<i>p2xm</i>	GAACAAGggc <u>GAGCTTGTCT</u>	Urano <i>et al.</i> , 1997
<i>pa26</i>	<u>GGACAAGTCT</u> ccACAAGTTC	Velasco-Miguel <i>et al.</i> , 1999
<i>c-fos</i>	<u>GGACTTGTCT</u> GAGCgcGTgC AcACTTGTCa	Elkeles <i>et al.</i> , 1999
<i>bax1</i>	tACAAGTTa <u>AGACAAGCCT</u> GGGCgTGggC	Miyashita <i>et al.</i> , 1995
<i>puma</i>	ctGCAAGTCC tGACTTGTCC	Yu <i>et al.</i> , 2001
<i>Fas/apo1</i>	cAACATGgTg-N ₃ AGACT-GTTTT-N ₈ GGGCATGTac AAACATGTCa	Munsch <i>et al.</i> , 2000
<i>c-HA-ras</i>	AtACTTGTC ggag GcACcAGCgCcgcg GGGCctGCa ggctg GcACTAGCCT gccc GGGCAcGCCgt	Deguin-Chambon <i>et al.</i> , 2000
<i>mck</i>	tGGCgTGTgC tccc tGGCAAGCCTatGACATGgCCG GGGCctGCCT	Jackson <i>et al.</i> , 1998
<i>pig3</i>	cAGCTTGCCC AccCATGCTC	Polyak <i>et al.</i> , 1997
<i>tgf-α</i>	GGGCAgGCCC tGcCTAGTCT tGGCAAGCgg	Shin <i>et al.</i> , 1995
<i>ibp-3</i>	AAACAAGCCac cAACATGCTT	Buckbinder <i>et al.</i> , 1995
<i>p202</i>	cTACATGaCTT ctAccCATGCTT cAGCTAGTTT tAAcAcCTTGaTC	D'Souza <i>et al.</i> , 2001

Tab. 1: p53-Bindungsstellen in nativen p53-regulierten Promotoren. Dekamere, die der Konsensussequenz entsprechen, sind unterstrichen. Basen, die von dieser Sequenz abweichen, sind in Kleinbuchstaben geschrieben.

Der Vergleich zeigt, dass diese nativen Bindungsstellen nicht aus zwei identischen Dekameren aufgebaut sind und zum Teil eine erhebliche Sequenzheterogenität aufweisen. In vielen Promotoren entspricht nur ein Dekamer der p53-Konsensussequenz, wogegen die übrigen Dekamere in unterschiedlichem Ausmaß von dieser Sequenz abweichen (z.B. *bax1*, *c-fos*, *msh2*). Es wurden auch p53-Bindungsstellen identifiziert, in denen keines der Dekamere der Konsensussequenz entspricht (z.B. *c-HA-ras*, *pig3*, *fas/apo1*, *tgf- α*).

Auffällig ist weiterhin, dass die p53-Bindungsstellen vieler zellulärer Promotoren nicht nur aus zwei (z.B. *p21*, *pcna*, *msh2*), sondern aus mehreren Dekameren zusammengesetzt sind (z.B. *egf-r*, *p202*, *mdm2*).

Als gemeinsame Eigenschaft weisen die p53-Bindungsstellen jedoch interne symmetrische Elemente auf, die es erlauben, *non-B-DNA* Strukturen auszubilden, die je nach Zusammensetzung mehr oder weniger stabil sind.

Der Grund für die Sequenzvariabilität innerhalb der p53-Bindungsstellen und deren unterschiedliche Zusammensetzung ist nicht vollständig geklärt, da diese Heterogenität nicht mit der hohen Spezifität der p53-DNA-Interaktion vereinbar ist. In verschiedenen Arbeiten wurde jedoch vorgeschlagen (Kim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Espinosa und Emerson, 2001), dass diese Variabilität dazu beiträgt konformationell flexible p53-Bindungsstellen zu gewährleisten. Es wurde postuliert, dass nicht nur die Anwesenheit einer spezifischen Sequenz, sondern auch strukturelle Eigenschaften der DNA-Bindungsstelle ein entscheidender Parameter bei der Interaktion von p53 mit seinen spezifischen Bindungselementen darstellt (Kim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999).

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass nicht nur die p53-spezifischen Bindungsstellen für die Induktion von p53-Zielgenen entscheidend sind. Contente *et al.* (2002) haben gezeigt, dass die p53-abhängige Transkription des *pig3*-Gens von der Anwesenheit der Pentanukleotidsequenz (TGYCC)_n abhängt (Y=C oder T). Diese Sequenz, die nur geringe Homologie zur Konsensussequenz aufweist, vermittelt die p53-abhängige Transkription des *pig3*-Gens, wogegen eine potentielle p53-Bindungsstelle im Promotor eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

1.4 P53 als DNA-bindendes Protein

Die am besten charakterisierte und wohl auch wichtigste biologische Funktion des Tumorsuppressors p53 ist die eines Transkriptionsfaktors. Nach genotoxischem Stress induziert p53 die Transkription bzw. Repression einer großen Anzahl von Genen.

Für ein am C-Terminus unmodifiziertes p53-Protein ist die Affinität für die p53-Konsensussequenz 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy - 3' nur sehr schwach („latentes“ p53). Die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität kann jedoch durch Modifikationen am C-Terminus des Proteins aktiviert werden („aktiviertes“ p53). Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Regulation ist nicht vollständig geklärt. Es wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen, die den Einfluss der C-terminalen Region auf die sequenzspezifischen Bindungseigenschaften des Proteins beschreiben.

Das allosterische Modell:

Die Vorstellung, dass p53 ein latenter Transkriptionsfaktor ist, der erst durch genotoxischen Stress aktiviert wird, korreliert mit den *in vitro* Beobachtungen, dass unmodifiziertes wt p53 nicht an Oligonukleotide binden kann, die p53-spezifische DNA-Sequenzen enthalten. Erst durch Modifikationen des C-Terminus wie beispielsweise Phosphorylierung, Acetylierung oder Deletion der basischen Aminosäuren (AS 363-393) werden die DNA-Bindungseigenschaften des Proteins aktiviert (Hupp *et al.*, 1992; Hupp und Lane, 1994; Hupp *et al.*, 1995; Jayaraman und Prives, 1995). Dieser Effekt kann *in vitro* auch durch Bindung des C-terminal spezifischen Antikörpers PAb421 ausgelöst werden (Hupp *et al.*, 1995). Durch Mikroinjektion konnte *in vivo* gezeigt werden, dass der Antikörper die Transkriptionsaktivität stimulieren kann (Hupp *et al.*, 1995).

Aufgrund dieser Daten wurde postuliert, dass der basische C-Terminus eine negative allosterische Wirkung auf die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne des p53-Proteins ausübt. Demnach interagiert der C-Terminus mit der DNA-Bindungsdomäne und verhindert so die sequenzspezifische Bindung. Durch Modifizierungen innerhalb des C-Terminus kommt es zu einer Konformationsänderung, die die allosterische Inhibierung durch den C-Terminus aufhebt und p53 von der latenten in die aktivierte Form überführt (Hupp *et al.*, 1992). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass der isolierte C-Terminus und Fragmente dieser Domäne (AS 361-

382), die Bindungseigenschaften von p53 *in vitro* aktivieren können (Hupp *et al.*, 1995; Jayaraman *et al.*, 1995; Selivanova *et al.*, 1997). Diese Beobachtung führte zu der Interpretation, dass isolierte C-terminale Peptide den C-Terminus von wt p53 von der DNA-Bindungsdomäne verdrängen und dadurch eine Konformationsänderung verursachen, die p53 in ein DNA-bindendes Protein umwandelt.

Gegen diese Hypothese sprechen jedoch Daten, die in NMR-Strukturuntersuchungen ermittelt wurden (Ayed *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Untersuchungen zeigte sich, dass die Konformationen von wt p53 und p53-?30 (ein am C-Terminus um 30 AS verkürztes Protein) identisch sind. Da diese beiden Proteinformen die „latente“ bzw. „aktive“ Form von p53 repräsentieren unterstützen diese Daten nicht das allosterische Bindungsmodell in dem postuliert wird, dass die Konformationen beider Proteine unterschiedlich sind (Hupp *et al.*, 1995).

Das sterische Modell:

In diesem Modell wird der inhibierende Effekt des C-Terminus durch seine Fähigkeit unspezifisch an DNA binden zu können erklärt (Anderson *et al.*, 1997). Nach diesem Modell verhindert die Bindung des C-Terminus an unspezifische DNA die sequenzspezifische Bindung, die über die Kerndomäne vermittelt wird. Durch Modifizierungen des C-Terminus, wie beispielsweise Phosphorylierung oder Bindung des Antikörpers PAb421, verliert der C-Terminus seine DNA-Bindungsaktivität und ermöglicht dadurch die sequenzspezifische Bindung durch die Kerndomäne (Anderson *et al.*, 1997). Dieses Modell wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die sequenzspezifische Bindung von wt p53 an kurze DNA durch lange nicht-spezifische DNA inhibiert werden kann. Dieser Effekt wird bei C-terminal verkürztem p53 nicht beobachtet (Hupp und Lane, 1994).

Das zwei Bindungsstellen Modell:

Dieses Modell stützt sich auf die Beobachtungen, dass „latentes“ wt p53 über seine Kerndomäne und den C-Terminus an superhelikale Plasmid-DNA und lange unspezifische lineare DNA binden kann (Bakalkin *et al.*, 1995; Palecek *et al.*, 2001; Yakovleva *et al.*, 2001). Diese Eigenschaft ist weder mit dem *allosterischen* noch mit dem *sterischen* Modell vereinbar, in denen keine Interaktion der Kerndomäne von „latentem“ wt p53 mit DNA postuliert wird.

In diesem Modell wird vorgeschlagen, dass die Bindung des C-Terminus an DNA die Wechselwirkung der Kerndomäne mit spezifischen jedoch nicht mit unspezifischen DNA-Sequenzen inhibiert (Yakovleva *et al.*, 2001; Yakovleva *et al.*, 2002). Ein monomeres p53-Molekül kann über die Kerndomäne und den C-Terminus an DNA binden. Da p53 als Tetramer an DNA bindet ergeben sich so acht mögliche Bindungsstellen. Nach diesem Modell beeinflussen die an DNA gebundenen C-Termini die Orientierung und Position der Kerndomänen, insbesondere Arginin an Position 280 und verhindern auf diese Weise eine Bindung an spezifische DNA-Sequenzen. Die besondere Rolle von Arginin an Position 280 liegt darin, dass die Bindung dieser Aminosäure an die konservierten Guanine von p53-spezifischen DNA-Zielsequenzen Voraussetzung für eine stabile Bindung von p53 ist (Nagaich *et al.*, 1997). Bei der Interaktion mit unspezifischen Sequenzen kommt dieser Aminosäure jedoch keine besondere Bedeutung zu (Cho *et al.*, 1994). Modifizierungen der C-Termini verhindern deren unspezifische Bindung an DNA und ermöglichen somit den Kerndomänen die sequenzspezifische Bindung.

Neben diesen Bindungsmodellen, die dem C-Terminus einen negativen Einfluss auf die sequenzspezifische Bindung von p53 zuordnen, haben neuere Untersuchungen eine alternative Möglichkeit offenbart. Espinosa und Emerson (2001) konnten zeigen, dass der C-Terminus von wt p53 die sequenzspezifische Bindung an den p21-Promotor nur dann inhibiert, wenn kurze DNA-Fragmente verwendet wurden. Ist dieser Promotor *in vitro* in Chromatin organisiert wird dieser Effekt nicht beobachtet. Darüber hinaus verringerte eine Deletion des C-Terminus die sequenzspezifische Bindung von p53 und dadurch auch die Transaktivierung des im Chromatin organisierten p21-Promotors. Aufgrund dieser Daten wurde postuliert, dass für die sequenzspezifische DNA-Bindung von p53 ein bestimmtes Maß an struktureller Organisation innerhalb der p53-Bindungsstelle notwendig ist.

Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kamen auch McKinney und Prives (2002), die zeigen konnten, dass wt p53 eine höhere Affinität zu zirkulärer DNA als zu linearer DNA aufweist. Für diese Art der Interaktion kommt dem C-Terminus ebenfalls eine entscheidende Funktion zu, da eine Deletion dieser Domäne zu einer Verminderung der Bindungsaffinität von wt p53 führte (McKinney und Prives, 2002).

Diese Daten bestätigen Untersuchungen von Kim *et al.* (1997, 1999) in denen gezeigt wurde, dass wt p53 mit spezifischen Promotoren in Abhängigkeit von der DNA-

Struktur unterschiedlich interagiert. In diesen Untersuchungen wurde dem C-Terminus eine wichtige regulatorische Rolle für diese Wechselwirkung zugesprochen.

1.5 Regulation der p53-Stabilität

In normalen Zellen liegt p53 nur in sehr geringen Konzentrationen vor, da es kurz nach der Synthese bereits wieder abgebaut wird (Kubbutat *et al.*, 1998). Aufgrund von posttranslationalen Modifikationen nach genotoxischem Stress kommt es jedoch zu einer Akkumulation von p53 innerhalb der Zelle.

Grund für den raschen Abbau des p53-Proteins ist die Proteolyse durch das 26S Proteasom. Diese Form des Abbaus erfordert das Zusammenspiel mehrerer Enzyme, die die Ubiquitinierung von Proteinen katalysieren, um sie dadurch für den proteolytischen Abbau zu markieren (Jentsch, 1992; Hochstrasser, 1996; Varshavsky, 1997). Eine der wichtigsten Komponenten für den Abbau von p53 ist MDM2. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass MDM2 als Ubiquitin-Ligase fungiert (Honda *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1999). Die Ligaseaktivität von MDM2 ist dabei von der p53-bindenden Region im N-Terminus sowie von der Ringfinger-Domäne im C-Terminus des Proteins abhängig (Kubbutat *et al.*, 1999).

Verschiedene Mechanismen regulieren den MDM2-abhängigen Abbau von p53. Dies geschieht durch Faktoren, die die Aktivität von MDM2 inhibieren bzw. verstärken, durch Modifikationen von p53 und die Regulierung der subzellulären Lokalisation von p53 und MDM2. Inhibierende Faktoren von MDM2 sind ARF (Honda *et al.*, 1999; Midgley *et al.*, 2000), MDMX (Sharp *et al.*, 1999; Jackson und Berberich, 2000; Stad *et al.*, 2000; Tanimura *et al.*, 2000) und die kovalente Modifikation durch SUMO (Buschmann *et al.*, 2000a). Die Bindung von ARF und MDMX an MDM2 inhibiert den Abbau von p53, wogegen die Modifikation durch SUMO die Ligaseaktivität von MDM2 verstärkt.

Der Export von p53 vom Zellkern in das Cytoplasma spielt ebenso eine regulatorische Rolle für den MDM2-abhängigen Abbau von p53. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung dieses Exports zu einer Stabilisierung von p53 führt (Freedman und Levine, 1998; Roth *et al.*, 1998). Der Grund, weshalb p53 aus dem Zellkern exportiert werden muss um degradiert werden zu können ist nicht vollständig geklärt, da sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma Proteasome lokalisiert sind (Rivett,

1998). Des Weiteren kann p53 in beiden Kompartimenten durch MDM2 ubiquitiniert werden (Yu *et al.*, 2000).

Phosphorylierungen im N-Terminus von p53 können ebenfalls zu einer Stabilisierung führen. P53 wird an vielen Stellen in Folge von DNA-Schäden phosphoryliert und eine Vielzahl von Kinasen sind in diesen Prozess eingebunden (Meek, 1998). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Kinasen Chk1 und Chk2 den N-Terminus von p53 phosphorylieren. Dies führt zu einer Schwächung der p53-MDM2-Interaktion und verhindert auf diese Weise die Degradierung von p53 (Chehab *et al.*, 2000; Shieh *et al.*, 2000).

1.6 Funktionen von wt p53

Zur Erhaltung ihrer genomischen Integrität haben eukaryontische Zellen Mechanismen entwickelt, um geschädigte Chromosomen zu reparieren bevor sie repliziert werden. P53 trägt entscheidend dazu bei diese Integrität von Zellen zu erhalten, bzw. irreparabel geschädigte Zellen aus dem Organismus zu entfernen. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde p53 auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Nach dem Auftreten von DNA-Schäden (z.B. IR-Strahlung, UV-Strahlung, Hypoxie) akkumuliert p53 aufgrund von posttranslationalen Modifikationen im Zellkern. Dort transaktiviert p53 eine Vielzahl von Genen, deren Funktion darin besteht zu verhindern, dass die Schäden an Tochterzellen weitergegeben werden und sich als Mutationen manifestieren. Dies kann durch einen Zellzyklus-Arrest erreicht werden, um dadurch DNA-Reparaturprozesse einzuleiten zu können, oder durch Aktivierung der Apoptose, um die geschädigte Zelle in den programmierten Zelltod zu führen. Der Zellzyklus besteht aus einer Phase der DNA-Replikation (Synthese- oder S-Phase) und einer Phase der Zellteilung (Mitose- oder M-Phase), die durch die G₁- und G₂-Phasen (gap-Phasen) getrennt sind. Die Progression einer Zelle durch den Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (Cdks) reguliert. Die katalytische Einheit der Cdks ist nur dann aktiv, wenn sie mit einer regulatorischen Untereinheit, den so genannten Cyclinen, assoziiert ist. Darüber hinaus wird die Aktivität der Cyclin-Cdk-Komplexe durch Phosphorylierung, Sequestrierung und durch inhibitorische Proteine reguliert.

G₁-Arrest: Der p53-induzierte G₁-Arrest ist von der Transaktivierung des *p21^{waf}*-Gens abhängig. Das Produkt dieses Gens (p21) verhindert den Eintritt in die S-Phase durch Blockierung von G₁-spezifischen Cyclin-abhängigen-Kinasen (Cdk, Cyclin-dependent-kinase, el-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993; Dulic *et al.*, 1994).

In der G₁-Phase führt die Aktivität von Cyclin D-Cdk4/6 und Cyclin E-Cdk2 zur sequentiellen Phosphorylierung des Retinoblastomproteins Rb. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Proteinen der E2F-Familie, die durch hypophosphoryliertes Rb gebunden und sequestriert werden (Giaccia und Kastan, 1998; Sherr, 1998). Die Freisetzung von E2F führt zu einer transkriptionellen Aktivierung von Genen, die für den Eintritt in die S-Phase notwendig sind.

Die Inhibierung von Cyclin D-Cdk4/6 und Cyclin E-Cdk2 durch p21 führt zu einer Akkumulation der unphosphorylierten Form von Rb und vermittelt auf diese Weise einen G₁-Arrest, der eine DNA-Reparatur vor dem Eintritt in die S-Phase ermöglicht.

G₂-Arrest: Für den G₂-Arrest ist die p53-abhängige Transaktivierung von 14-3-3 σ notwendig (Hermeking *et al.*; 1997). 14-3-3 σ bindet an die phosphorylierte Form von Cdc25C, einer Phosphatase, die die Aktivität von Cdk1 reguliert (Furnari *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1997). Cdk1 ist eine Cyclin-abhängige Kinase, die die Mitose einleiten kann (Pines, 1991). Die Bindung von 14-3-3 σ an Cdc25C führt zu einer Sequestrierung des Proteins. In diesem Zustand ist Cdc25C nicht mehr in der Lage, Cdk1 zu dephosphorylieren und damit zu aktivieren.

Ein weiterer Mechanismus, der zu einem G₂-Arrest führen kann, ist die Transaktivierung von GADD45. Dieses Protein führt durch seine Bindung an den Cyclin B-Cdk1-Komplex ebenso zu einem G₂-Arrest (Zhan *et al.*, 1999).

Apoptose: Alternativ zu einem Zellzyklus-Arrest nach DNA-Schädigung ist p53 in der Lage, Apoptose zu induzieren. Die Apoptoseinduktion kann dabei über verschiedene Mechanismen erfolgen.

P53 kann den „death receptor“ Signalweg durch die Transkription von „Todesrezeptoren“ („death receptors“) aktivieren. Diese Rezeptoren gehören der Superfamilie der TNF-Rezeptoren an und induzieren Apoptose durch die Bindung von extrazellulären Liganden („death ligands“, Ashkenazi und Dixit, 1998). Zu den „Todesrezeptoren“, die von p53 transkribiert werden gehören beispielsweise CD95/FAS/Apo1 und

DR5/Killer, der durch den Liganden TRAIL aktiviert wird (Owen-Schaub *et al.*, 1995; Reinke und Lozano, 1997; Wu *et al.*, 1997).

Eine weitere Möglichkeit der p53-induzierten Apoptose besteht in der Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs. In diesen Organellen sind wichtige apoptotische Aktivatoren wie beispielsweise Cytochrom C lokalisiert (Goldstein *et al.*, 2000). Eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, einhergehend mit dem Zusammenbruch des Membranpotentials, führt zur Freisetzung dieser Aktivatoren und dadurch zur Apoptose. Die Freisetzung von apoptotischen Aktivatoren aus den Mitochondrien wird durch Proteine der Bcl-2-Familie reguliert, die in der Lage sind die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran auszulösen. P53 kann die Transkription von Mitgliedern dieser Protein-Familie induzieren (z.B. Bax, NOXA, PUMA, Miyashita und Reed, 1995; Oda *et al.*, 2000; Nakano und Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die p53-abhängige Expression von Bax die Permeabilität der Mitochondrienmembran erhöht und zur Freisetzung von Cytochrom C führt (Hsu *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1998).

Alternativ zu diesen beiden Signalwegen wurde ein weiteres Modell zur p53-induzierten Apoptose von Polyak *et al.* (1997) vorgeschlagen. Diesem Modell zufolge werden von p53 eine Reihe von Genen induziert (*PIGs*, *p53-induced genes*), die die Bildung von ROS (*reactive oxygen species*) stimulieren. Dadurch kommt es zur oxidativen Schädigung der Mitochondrien und zum Zusammenbruch der mitochondrialen Integrität wodurch ebenfalls Apoptose ausgelöst wird.

1.7 Funktionen von mutiertem p53

Ein bemerkenswerter Unterschied im Mutationsspektrum zwischen p53 und anderen Tumorsuppressoren wie beispielsweise Rb, APC und BRCA1 liegt darin, dass diese Proteine durch Deletion, Trunkierung oder Abschalten ihrer Gene inaktiviert werden. Im Gegensatz dazu werden im *p53*-Gen am häufigsten Punktmutationen gefunden, die zur Synthese eines mutierten p53 mit einem Aminosäureaustausch führen. Dies impliziert, dass während der Tumorentstehung auf diese Mutationen selektioniert wurde und dass Tumore, die solch ein mutiertes p53 exprimieren, einen selektiven Wachstumsvorteil besitzen.

Der Beitrag von mutiertem p53 zur Krebsentstehung hängt von einer dominant-negativen Wirkung auf Funktionen von wt p53 und von einem wt p53-unabhängigen onkogenen Funktionsgewinn ab („gain of function“).

Die dominant-negative Wirkung von mutiertem p53 wurde für eine Vielzahl von physiologischen Prozessen untersucht, in denen wt p53 involviert ist. Dazu gehören die Repression der wt p53 vermittelten Differenzierung (Aloni-Grinstein *et al.*, 1993, 1993; Soddu *et al.*, 1996; Wallingford *et al.*, 1997), Apoptose (Lotem und Sachs, 1993; Gottlieb *et al.*, 1994), Wachstumsarrest (Aloni-Grinstein *et al.*, 1995), konstitutive p21-Expression (Tang *et al.*, 1998), genomische Stabilität (Liu *et al.*, 1996; Mekeel *et al.*, 1997), Immortalisierung (Cao *et al.*, 1997) und die Inhibition der RAS-abhängigen Transformation von Rattenembryo-Fibroblasten (Finlay *et al.*, 1989).

Der allgemein akzeptierte Mechanismus hinter der dominant-negativen Wirkung von mutiertem p53 ist die Inhibierung der wt p53-Funktionen durch Heteroligomerisierung. Die Funktion von wt p53 als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor erfordert die Tetramerisierung des Proteins, die über die Oligomerisierungsdomäne vermittelt wird (Friedman *et al.*, 1993; Halazonetis und Kandil, 1993; Pieterpol *et al.*, 1994; McLure und Lee, 1998). Mutiertes p53 mit einer intakten Oligomerisierungsdomäne ist ebenfalls zur Tetramerisierung in der Lage (Unger *et al.*, 1993; Chene, 1998). Die Heteroligomerisierung zwischen wt p53 und mutiertem p53 verändert die Konformation von wt p53 und vermindert dadurch die Fähigkeit sequenzspezifisch an Zielpromotoren zu binden und somit die Transaktivierung von p53-spezifischen Zielgenen (Milner und Medcalf 1991; Kern *et al.*, 1992; Shaulian *et al.*, 1992; Srivastava *et al.*, 1993; Unger *et al.*, 1993; Chene, 1998).

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mutiertes p53 auch wt p53-unabhängige onkogene Effekte auslösen kann. So fördert mutiertes p53 das Zellwachstum durch Verstärkung der Proliferationsrate in p53-negativen humanen Saos-2 oder murinen 10(3) Zellen (Dittmer *et al.*, 1993). Ebenso führt mutiertes p53 zu einem erhöhten Potential von Tumoren zur Metastasenbildung (Pohl *et al.*, 1988; Crook und Vousden, 1992; Hsiao *et al.*, 1994) und kann in Tumorzellen p53-unabhängige apoptotische Signalwege nach der Behandlung mit chemotherapeutischen Reagenzien blockieren (Peled *et al.*, 1996; Blandino *et al.*, 1999).

Der diesem Funktionsgewinn zugrunde liegende Mechanismus ist nicht eindeutig geklärt. Es wurde jedoch berichtet, dass mutiertes p53 *in vivo* zur Transaktivierung von Promotoren fähig ist, die in Zusammenhang mit dem Zellwachstum stehen (Chin *et al.*, 1992; Deb *et al.*, 1992). So aktiviert mutiertes p53 die Promotoren von MDR-1, c-myc, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), EGFR (epidermal growth factor receptor), Interleukin-6, BFGF (basic fibroblast growth factor), VEGF (vascular endo-

thelial growth factor) und hsp70 (heat shock protein) (Deb *et al.*, 1992; Dittmer *et al.*, 1993; Margulies und Sehgal, 1993; Kieser *et al.*, 1994; Ueba *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995; Tsutsumi-Ihse *et al.*, 1995; Ludes-Meyers *et al.*, 1996; Frazier *et al.*, 1998). Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob mutiertes p53 dabei direkt an regulatorische DNA-Sequenzen oder an andere DNA-bindende Transkriptionsfaktoren bindet. Für die Bindung an regulatorische DNA-Sequenzen spricht jedoch die Tatsache, dass die Aminosäuren an Position 22 und 23 in der N-terminalen Region von mutiertem p53 (Asp²⁸¹ → Gly) für die Transaktivierung des *mdr-1*-Promotors notwendig sind (Lin *et al.*, 1995). Diese Aminosäuren spielen auch für die Transaktivierungsaktivität von wt p53 eine entscheidende Rolle.

Zusätzlich zur Transaktivierungsdomäne scheint auch die Oligomerisierungsdomäne von mutiertem p53 eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Promotoren und der Tumorgenese zu spielen (Lanyi *et al.*, 1998; Chene, 1999).

Die Interaktion von p53 mit DNA ist komplex. Neben der sequenzspezifischen DNA-Bindung kann wt p53 unspezifisch an einzel- und doppelsträngige DNA, an DNA-Enden, Holliday-Junctions und Rekombinations-Intermediate binden (Albrechtsen *et al.*, 1999). Bei diesen Interaktionen ist die p53-Kerndomäne involviert und Mutationen innerhalb dieser Domäne (mutiertes p53) verhindern mit Ausnahme der unspezifischen Bindung an Einzel- und Doppelstrang-DNA diese Interaktion. In verschiedenen Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass mutiertes p53 eine starke Affinität zu MAR/SAR-DNA-Elementen *in vitro* aufweist (Mueller *et al.*, 1996; Will und Deppert, 1998a; Will *et al.*, 1998b; Will *et al.*, 1998c). Die Interaktion mit diesen DNA-Elementen erfolgt dabei mit einer 100-1000fach höheren Affinität als für wt p53. Dies lässt darauf schließen, dass es sich dabei um eine für mutiertes p53 spezifische Wechselwirkung handelt. Die untersuchten DNA-Elemente zeichnen sich durch einen hohen AT-Gehalt aus und können in MAR/SAR-DNAs die Bildung von *non-B*-DNA-Strukturen fördern (Will *et al.*, 1998c).

In weiteren Untersuchungen konnte durch ChIP-Assay (chromatin immunoprecipitation assay) gezeigt werden, dass mutiertes p53 Ser²⁴⁵ (Gly²⁴⁵ → Ser) in der Lage ist, *in vivo* an DNA-Elemente zu binden, die potentiell *non-B*-DNA-Strukturen ausbilden können. Interessanterweise zeigte mutiertes p53 His²⁷³ (Arg²⁷³ → His) keine Bindungsaktivität (Koga und Deppert, 2000).

2. Aufgabenstellung

Die am besten charakterisierte und wohl auch wichtigste molekulare Funktion des Tumorsuppressors p53 ist die eines Transkriptionsfaktors. Deshalb zeigt sich eine p53-Aktivierung, wie sie z. B. durch DNA-Schädigung induziert wird, in erster Linie in Veränderungen des Expressionsmusters p53-regulierter Gene. Die p53-abhängige transkriptionelle Aktivierung solcher Zielgene setzt voraus, dass p53 an deren Promotoren bindet und die Bildung eines aktiven Transkriptionskomplexes initiiert. Die Vielzahl der bekannten p53-Zielgene sowie deren sehr unterschiedliche und sich teilweise gegenseitig ausschließenden biologischen Funktionen bedingen, dass ihre transkriptionelle Aktivierung streng reguliert ist. Die meisten Promotoren können in unterschiedlichen Konformationen als *B*- bzw. *non-B*-DNA-Strukturen vorliegen. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden (Kim *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999), dass p53 mit den verschiedenen möglichen DNA-Strukturen sehr unterschiedlich interagiert. Demnach werden p53-Zielgene in Abhängigkeit von der DNA-Struktur ihrer Promotoren auch mit unterschiedlicher Effizienz transkribiert.

Ziel dieser Arbeit ist es mit unterschiedlichen Methoden wie beispielsweise EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), FIDA (Eluorescence intensity distribution analysis) und Elektronenmikroskopie die Wechselwirkung von wt p53 mit spezifischen Promotoren in *non-B*-DNA-Konformation zu untersuchen. Dabei sollte zum Einen ein möglicher Einfluss der funktionellen Proteindomänen von p53 (Kerndomäne, Oligomerisierungsdomäne, regulatorische C-terminale Region) auf diese Interaktion untersucht werden, zum Anderen inwieweit strukturelle Parameter der DNA-Substrate diese Wechselwirkung beeinflussen können.

P53 mit Punktmutationen in der Kerndomäne ist nicht mehr in der Lage sequenzspezifisch an DNA zu binden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass mutiertes p53 *in vitro* und *in vivo* an DNA-Elemente binden kann, die die Tendenz zur Bildung von *non-B*-DNA-Strukturen aufweisen (Will *et al.*, 1998c; Koga und Deppert, 2000). Ziel dieser Arbeit ist es, die Wechselwirkung von mutiertem p53 mit *non-B*-DNA-Substraten weiter zu charakterisieren. Eine mögliche strukturspezifische DNA-Bindungsaktivität dieser Proteine könnte Hinweise auf deren biologische Funktion („gain of function“) geben, deren molekulare Grundlagen noch nicht geklärt sind.

Mutiertes p53 weist gegenüber wt p53 eine erhöhte Halbwertszeit auf. Der allgemein akzeptierte Mechanismus hinter dieser erhöhten Stabilität liegt in dem Verlust der

Transaktivierungsfunktion von mutiertem p53. Durch diesen Funktionsverlust kann die Expression von MDM2, ein für p53 wichtiges regulatorisches Protein, nicht induziert werden (Bullock und Fersht, 2001). Dies erklärt jedoch nicht warum einige Tumorzellen einen hohen Spiegel an mutiertem p53, bei gleichzeitiger Expression von MDM2, aufweisen (Cordon-Cardo et al., 1994; Landers et al., 1997).

Mutiertes p53 akkumuliert in Tumorzellen im Zellkern und ist mit nuklearen Strukturen, wie beispielsweise der Kernmatrix und dem Chromatin assoziiert (Zerrahn et al., 1992). Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob eine eventuelle strukturspezifische DNA-Bindungsaktivität von mutiertem p53 einen Einfluss auf die Interaktion mit dem wichtigen regulatorischen Protein MDM2 hat. Dies könnte einen regulatorischen Mechanismus für die erhöhte Stabilität von mutiertem p53 darstellen.

3. Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien, Biochemikalien und andere Materialien

Es wurden handelsübliche Chemikalien in p.a. Qualität der Firmen Biorad (München), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), und Sigma (München) bezogen. Spezielle (Bio)chemikalien und Materialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

APS (Merck; Darmstadt)

Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (19:1) (Serva; Heidelberg)

Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (37,5:1) (Serva; Heidelberg)

[γ -³²P]-ATP (Hartmann; Braunschweig)

Bio-Rad Protein Assay (Biorad; München)

BSA (New England Biolabs; USA)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva; Heidelberg)

p-Cumarin Säure (Sigma; München)

DTT (Biomol; Hamburg)

Expressarray™ p53 (Sense Proteomics; Cambridge, UK)

Filterpapier Whatmann 3MM (Roche; Basel)

Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Bioscience; Uppsala)

Glutathion (Merck; Darmstadt)

Glutaraldehyd (Serva; Heidelberg)

HEPES (Merck; Darmstadt)

Hybond™-N⁺ Nylon Membran (Amersham Bioscience; Uppsala)

Hybond™- C Super Nitrocellulose Membran (Amersham Bioscience; Uppsala)

HiTrap™ Heparin HP (Amersham Bioscience; Uppsala)

Kodak X-OMAT®, Röntgenfilm (Kodak; USA)

Luminol (Fluka; Neu-Ulm)

Leupeptin (Serva; Heidelberg)

Magermilchpulver (De-Vau-Ge Gesundheitskostwerk GmbH; Lüneburg)

2-Mercaptoethanol (Sigma; München)

Poly (dI)·Poly (dC) (Amersham Bioscience; Uppsala)

Pefablock SC (Biomol; Hamburg)

Pepstatin A (Biomol; Hamburg)
PVDF Membran (Millipore; Eschborn)
Protein-G-Sepharose (Amersham Bioscience; Uppsala)
Pluronic F-68 (Sigma; München)
Poly-Prep™ Chromatography Columns (Biorad; München)
Quick Spin™ Columns Sephadex® G-25 (Roche; Basel)
SDS (Serva; Heidelberg)
Trasylol (Bayer; Leverkusen)
Tween-20 (Fluka; Neu-Ulm)
TEMED (Sigma; München)
Trizma Base (Sigma; München)
Ubiquitin (Sigma; München)

3.2 Geräte

Agarose-Gel Kammer:

- "Horizon® 58" (Life Technologies™, Gaithersburg)

Analysenwaage:

- "PE 360" (Mettler, Giessen)

Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC):

- "ÄKTA Purifier" (Pharmacia Biotech, Uppsala)

FIDA-Spektrometer:

- "FCS plus + Research Reader" (Evotec-Oai, Hamburg)

Flüssigkeitsszintillationszähler:

- "LS 5000 TD" (Beckmann, Fullerton)

Gel-Kammer für DNA-Bindungsassay:

- "PROT-RESOLV MINI-LC" (PHASE GmbH, Lübeck)

Heizblock:

- "Dri-Block DB-2A" (Techne, Cambridge)

Mixer:

- "Mixer 5432" (Eppendorf, Hamburg)

SDS-Page Gelkammer:

- "Mighty Small ?? SE 250/SE260" (Hoefer Pharmacia Biotech, San-Francisco)

Semi-Dry Blottingkammer:

- "ancos semi-dry electroblotter model A" (Ancos Denmark Aps, Højby)

Spannungsquellen:

- "Power Pac 300" (Bio Rad, Hercules)
- "Power Pac 3000" (Bio Rad, Hercules)
- "EPS 2A200" (Hoefer Pharmacia Biotech, San-Francisco)

Schüttler & Mischgerät, wippend:

- "Polymax 2040" (Heidolph, Kelheim)

UV/VIS-Photometer:

- "Bio-Spec-1601 E" (Shimadzu, Meryland)

Vortex-Mixer:

- "Certomat MV" (B.-Braun Biotech, Melsungen)

Wasserbad:

- "Multitemp ???" (LKB Bromma, Bromma)

Western Blotting Kammer:

- "Mini Trans-Blot Cell" (Biorad, Hercules)

Zentrifugen:

- "Biofuge pico" (Heraus Instruments, Osterode)
- "Centrifuge 5415 D" (Eppendorf, Hamburg)
- "Centrifuge 5415 C" (Eppendorf, Hamburg)
- "Centrifuge 5810 R" (Eppendorf, Hamburg)
- "Centrifuge 5417 R" (Eppendorf, Hamburg)
- "L-70 Ultracentrifuge" (Beckmann, San-Francisco)

3.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech bezogen und sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Bezeichnung	Oligonukleotide für spez. lineare Substrate
p21 (lin/s)	5'- gctctgcc GAACATGTCCcAACATGTTg ccgctctg - 3'
p21 (lin/as)	5'- cagagcgg CAACATGTTgGGACATGTTTC ggcagagc - 3'
p21f (lin/s)	5'- gctctgcc GAACATGTCC ccgctctg - 3'
p21g (lin/as)	5'- cagagcgg GGACATGTTTC ggcagagc - 3'
	Oligonukleotide für unspez. lineare Substrate
T3-1	5'- ccgcggtacat tacctaaggcgtc - 3'
T3-2	5'- gacgccttaggta atggtaccgcgg - 3'
	Oligonukleotide für strukturierte Substrate
T3-1	5'- <u>ccgcggtacat</u> tacctaaggcgtc - 3'
p21-dec1	5'- <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgcct GAACATGTCC ggcctgccgtgg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
p21-dec2	5'- <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgcct CAACATGTTg ggcctgccgtgg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
p21-dec1+2	5'- <u>gacgccttaggta</u> cctgcc GAACATGTCCcAACATGTTg gggcctg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
EGF-R	5'- <u>gacgccttaggta</u> AGACTAGgCCGAGCTAGCCCGAGCgAGCTC agactaggcc <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
TGF- α -dec3	5'- <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgcct AGcCAAGTCT gggcctgcctgg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
CON-loop	5'- <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgcct GGACTTGCTT ggcctgcctgg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
MUT-loop	5'- <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgcct GGAgTTcCCT ggcctgcctgg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
C $\Rightarrow$ g	5'- <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgcct GGAgTTGCTT ggcctgcctgg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
G $\Rightarrow$ c	5'- <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgcct GGACTTcCCT ggcctgcctgg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
CON-paired	5'- <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgcc GGACTTGCTT ggcaggccagg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
SCR-loop A	5'- <u>gacgccttaggta</u> cctgccctcgctcgctcaccgtgcgctggctgg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'
SCR-loop	5'- <u>gacgccttaggta</u> ccagcctccgcacgctcaccgagcgctggcagg <u>atggtaccgcgg</u> - 3'

SCR-paired	5' - <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgccacgctcaccgtggcaggccagg atggtaccgcgg -3'
	Oligonukleotide für Elektronenmikroskopie
Stem-1	5' - <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgccacgctcaccgtggcaggccagg atggtaccgcgg -3'
Stem-2	5' - <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgccacgctcaccgtggcaggccagg -3'
LOOP	5' - <u>gacgccttaggta</u> cctggcctgccacgctcaccgtggcaggccagg -3'
	Oligonukleotid für FIDA
T3-1-Tamra	5' - ^{Tamra} cgcggtaccat tacctaaggcgtc -3'

Tabelle 2: Aufgeführt sind Oligonukleotide, die für die Herstellung von linearen und strukturierten DNA-Substraten verwendet wurden. p53-Bindungsstellen sind rot markiert. Unterstrichene Sequenzen sind komplementär zum T3-1 Oligonukleotid

3.4 Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden aus Baculovirus infizierten Sf9-Insektenzellen aufgereinigt und sind in Tabelle 3 aufgeführt. Einige dieser Proteine wurden mit Polyhistidin bzw. Glutathion-S-Transferase als Fusionspartner ("tag") exprimiert.

Protein	Beschreibung
wt p53	Wildtyp p53
p53-? 30	Am C-Terminus um 30 Aminosäuren deletiertes Protein
p53-? 70	Am C-Terminus um 70 Aminosäuren deletiertes Protein
p53-? DBD	p53 ohne DNA-Bindungsdomäne
248P	Mutation an Position 248 Arg ²⁴⁸ →Pro
245S	Mutation an Position 245 Gly ²⁴⁵ →Ser (Polyhistidin-Tag)
273H	Mutation an Position 273 Arg ²⁷³ →His (Polyhistidin-Tag)
GST-MDM2	MDM2 mit Glutathion-S-Transferase als Fusionspartner

Tabelle 3: Verwendete Proteine.

3.5 Antikörper

PAb421	anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper, erkennt den C-Terminus von p53 (AS 371-380)
DO-1	anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper, erkennt den N-Terminus von p53 (AS 21-25)
PAb1801	anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper, erkennt den N-Terminus von p53 (AS 46-55)
PAb240	anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper, erkennt die denaturierte DNA-Bindungsdomäne von p53 (AS 213- 217)
Ziege anti-Maus IgG	konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, wurde im Western-Blot eingesetzt

3.6 Enzyme

T4 Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs)

T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)

Ubiquitin Activating Enzyme E1 (Calbiochem)

Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 (Calbiochem)

3.7 Puffer und Ladepuffer

10 X TBE: 890 mM Tris-Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH 8,0

10 X TBS: 1,37 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7,3

10 X TBST: 1,37 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 7,3, 0,5% (v/v) Tween 20

10 X PBS: 1,37 M NaCl, 81 mM Na₂HPO₄, 27 mM KCl, 14,7 mM KH₂PO₄

6 X SDS-Probenpuffer: 130 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% (v/v) Mercaptoethanol, 60% (v/v) Glycerin, 4,6% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau

6 X DNA-Ladepuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 60% (v/v) Glycerin, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol

3.8 Molekulargewichtsstandards

Für die Größenzuordnung bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen und DNA dienten die folgenden Molekulargewichtsstandards:

- DNA Standards:
 - 100 Base Pair Ladder (New England Biolabs)
 - 10 Base Pair Step Ladder (Promega)
- Protein Standard:
 - SDS-7B Prestained Mixture (Sigma)

3.9 Proteinbiochemische Methoden

3.9.1 Isolierung von humanem rekombinanten p53 aus Baculovirus infizierten Insektenzellen

Beim Baculovirus-Expressionssystem werden Insektenzellen mit einem rekombinanten Baculovirus infiziert, das sowohl das rekombinante Virus als auch das interessierende Fremdprotein exprimiert.

Die im Verlauf der Reinigung verwendeten Lösungen enthalten 0,5 mg/ml Pefabloc SC, 1 µg/ml Pepstatin A und 1 µg/ml Leupeptin als Proteaseinhibitoren.

Die Zellen werden 48 h nach der Infektion geerntet, anschließend viermal mit 1 X PBS bei 4 °C gewaschen, in 10 ml Puffer A resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wird in einen Dounce-Glasschliff-Homogenisator überführt und mit dem Pistill dreißigmal auf- und abgezogen. Der Homogenisator wird dabei auf Eis gekühlt. Das Lysat wird für 45 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C bei 5000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und als Fraktion A auf Eis gekühlt. Der verbleibende Zellrückstand wird in 10 ml Puffer B resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4 °C, 5000 x g, 10 min) wird der Überstand als Fraktion B auf Eis gekühlt. Der Zellrückstand wird in 10 ml Puffer C resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Suspension (4 °C, 5000 x g, 10 min) wird der Überstand als Fraktion C auf Eis gekühlt. Abschließend wird der Rückstand in 10 ml Puffer D resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wird abschließend für 10 min bei 5000 x g, 4 °C zentrifugiert und der Überstand als Fraktion D auf Eis gekühlt. Die Fraktionen A-D werden abschließend für 30 min bei

5000 x g, 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert, zur Lagerung aliquotiert und bei -70 °C eingefroren. Durch Western-Blotting und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Coomassie-Färbung werden die einzelnen Fraktionen auf ihren Gehalt an p53 analysiert. Der Hauptteil von p53 befindet sich in Fraktion C.

Puffer A: 10 mM HEPES pH 7,4, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 mM KCl

Puffer B: 10 mM HEPES pH 9,0, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 5 mM KCl

Puffer C: 10 mM HEPES pH 9,0, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 200 mM KCl

Puffer D: 10 mM HEPES pH 9,0, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 500mM KCl

3.9.2 Aufreinigung von rekombinantem p53 durch FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Nach der Extraktion von p53 aus Insektenzellen wird die Fraktion mit dem größten Gehalt an p53 durch FPLC weiter gereinigt. Für diese affinitätschromatographische Reinigung von p53 wird eine Heparin-Sepharose-Säule verwendet. Heparin-Sepharose weist ähnliche Eigenschaften wie DNA-Zellulose auf, bei allerdings wesentlich größerer Kapazität und Stabilität als immobilisierte DNA. Proteine mit einer DNA-Bindungsdomäne binden an diese Matrix, wobei das Heparin als Kompetitor zum natürlichen DNA-Substrat wirkt.

Zur Reinigung von p53 wird die entsprechende Fraktion auf eine 1 ml HiTrap Heparin-Sepharose-Säule geladen, die zuvor in 20 mM Tris, 100 mM KCl, 0.1% Mercaptoethanol pH 8,0 (Puffer A) äquilibriert wird. Die Säule wird mit drei Säulenvolumen Puffer A gewaschen und das Protein wird mit einem linearen Salzgradienten (100 – 1000 mM KCl) bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Es werden 0,5 ml Fraktionen gesammelt und jede Fraktion auf ihren Gehalt an p53 durch SDS-PAGE und Western-Blotting analysiert. Der Hauptteil von p53 eluiert bei einer KCl-Konzentration zwischen 250 und 300 mM.

3.9.3 Reinigung eines GST-MDM2-Fusionsproteins aus Baculovirus infizierten Insektenzellen

Sf9-Insektenzellen werden 48 h nach der Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus geerntet, viermal in 1 X PBS bei 4 °C gewaschen und anschließend in 1 X PBS resuspendiert. Die Zellen werden anschließend durch Ultraschallbehandlung lysiert. Das Lysat wird bei 5000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit 1 ml Glutathion-Sepharose ÜN bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wird die Lösung 5 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Sepharose-Matrix wird mit 5 ml 1 X PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (500 x g, 5 min). Der Überstand wird abgenommen und die Sepharose-Matrix erneut zweimal mit je 5 ml 1 X PBS gewaschen.

Zur Sepharose-Matrix werden anschließend 0,5 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM reduziertes Glutathion pH 8,0 gegeben und das Fusionsprotein durch leichtes Schütteln bei RT für 15 min eluiert. Die Lösung wird für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand mit dem eluierten Protein abgenommen wurde, wird der Elutionsschritt zweimal wiederholt. Die Elutionsfraktionen werden aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und Western-Blotting wird der Gehalt an GST-MDM2-Fusionsprotein analysiert.

3.9.4 Crosslinking und Immundetektion von p53-Oligomeren

Um den Oligomerisierungsstatus von DNA-gebundenem p53 zu bestimmen, wurde eine Methode von Wang *et al.* (1993) verwendet. Dabei werden durch Crosslinking mit Glutaraldehyd verschiedene p53-Oligomere hergestellt, deren Migrationsverhalten in einem nativen Polyacrylamid-Gel mit einem p53-DNA-Komplex verglichen werden kann.

Zur Herstellung der p53-Oligomere werden jeweils 500 ng wt p53 mit steigenden Konzentrationen von Glutaraldehyd (0,01-0,2% (v/v)) für 60 min auf Eis inkubiert. Durch Erhitzen der Reaktionslösung für 2 min bei 100 °C, in Gegenwart von 2% (w/v) SDS, wird das Crosslinking partiell wieder rückgängig gemacht. Um das Migrationsverhalten von monomerem p53 zu bestimmen, werden 500 ng p53-?70 ebenfalls mit Glutaraldehyd behandelt. Diesem Protein fehlt die

Oligomerisierungsdomäne und liegt in Lösung als Monomer vor, es ist aber in der Lage, instabile Oligomere durch Wechselwirkungen zwischen den DNA-Bindungsdomänen zu bilden. Die hergestellten p53-Oligomere werden durch Elektrophorese mit einem p53-DNA-Komplex verglichen. Für dessen Darstellung werden 500 ng wt p53 mit radioaktiv markiertem DNA-Substrat (20,000 c.p.m) für 30 min in 25 mM HEPES pH 7,4, 50 mM KCl, 20% (v/v) Glycerol, 1 mM DTT und 2 µg BSA bei RT inkubiert.

Anschließend werden die Proben auf ein natives 4%iges Polyacrylamid-Gel (0,3 X TBE) geladen und durch Elektrophorese (200 V, 4 °C, 2 h) aufgetrennt. Nach erfolgter Elektrophorese werden die p53-Oligomere und der p53-DNA-Komplex durch Semi-Dry-Blotting auf eine Nitrocellulose- bzw. Hybond-N⁺-Membran transferiert. Die p53-Oligomere und die Proteinkomponente des DNA-p53-Komplexes werden durch Immundetektion mit den p53-spezifischen Antikörpern PAb421, PAb240, DO-1 und PAb1801 detektiert. Die DNA-Komponente des p53-DNA-Komplexes wird durch Autoradiographie detektiert.

3.9.5 *In vitro* Ubiquitinierung von p53

In einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß werden 50 ng p53-Protein mit steigenden Mengen an DNA-Substrat in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% (v/v) Glycerol, 50 mM NaCl und 2 µg BSA für 30 min bei RT inkubiert (Gesamtvolumen 20 µl). Zu der Reaktionslösung werden anschließend 1 µl E1 (250 ng), 1 µl E2 (500 ng), 3 µl Ubiquitin (15µg), 5 µl GST-MDM2 (150 ng) in 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP und 2 mM DTT gegeben. Das Gesamtvolumen der Reaktion beträgt 40 µl. Die Lösung wird für 90 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wird p53 und seine ubiquitinierten Formen durch Western-Blotting mit dem p53-spezifischen Antikörper DO-1 detektiert.

3.9.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der analytischen Trennung von Proteingemischen und erlaubt eine Abschätzung des Molekulargewichtes von Proteinen.

Die Proben werden mit 6 X SDS-Probenpuffer versetzt und bei 100 °C 1 min erhitzt. Die Proteine werden dann in einer diskontinuierlichen Elektrophorese (Laufpuffer: 25 mM Tris pH 8,9, 200 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) zunächst in einem Sammelgel

(130 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% (w/v) Acrylamid, 0,15% (w/v) SDS, 0,09% APS (w/v) und 0,03% (v/v) TEMED) fokussiert und dann in einem Trenngel (130 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS (w/v), 10% Acrylamid (w/v), 0,05% (w/v) APS und 0,12% (v/v) TEMED) aufgetrennt. Die Fokussierung der Proteine erfolgt bei 60 V und für die folgende Auftrennung der Proteine wird die Spannung auf 90 V erhöht. Die Proteine werden anschließend durch Coomassie-Färbung und/oder Western-Blotting detektiert.

3.9.7 Coomassie-Färbung von Protein-Gelen

Die Proteinbanden in Polyacrylamid-Gelen werden für 20 min in Coomassie-Färbelösung (0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250, 45,55% (v/v) Methanol, 9,2% (v/v) Essigsäure) angefärbt. Anschließend werden die Gele mit Entfärbelösung (10% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure) geschwenkt, bis sich der Hintergrund entfärbt hat und die Proteinbanden gut sichtbar sind.

3.9.8 Western-Blotting

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt werden, können auf eine Membran transferiert werden (blotting) und sind dann zugänglich für eine Immundetektion. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran können die Proteine spezifisch einer Nachweisreaktion unterzogen werden.

Nach der SDS-PAGE wird eine in Methanol aktivierte PVDF-Membran mit Transferpuffer (192 mM Glycin, 50 mM Tris-HCl pH 8,3) äquilibriert. Der Transfer erfolgt in einer mit Transferpuffer gefüllten Blotting-Kammer für 90 min bei 60 V. Nach dem Transfer wird die Membran unter einer Rotlichtlampe getrocknet und auf einem Schwenktisch in 10 ml Blocking-Lösung (5% (w/v) Trockenmilch in 1 X TBST) für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper (verdünnt in 10 ml Blocking-Lösung) für 1 h. Nicht gebundener Antikörper wird durch dreimaliges Waschen für 10 min mit 1 X TBST (10 ml) entfernt. Anschließend erfolgt die Inkubation für 30 min mit dem in 10 ml Blocking-Lösung verdünnten Zweitantikörper. Nach erneutem Waschen (dreimal mit 10 ml 1 X TBST, je 10 min) erfolgt die Detektion der Immunkomplexe über eine Chemilumineszenzreaktion. Dazu wird die Membran mit 20 ml Detektionslösung (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Cumarinsäure, 5,4 mM H_2O_2) für

15 s inkubiert. Die feuchte Membran wird dann in eine Filmkassette überführt, mit Folie bedeckt und einem Röntgenfilm exponiert.

3.9.9 Bindung von linearen und strukturierten DNA-Substraten an ein p53-Protein-Array

Vor der Bindung von markierten DNA-Substraten an die immobilisierten Proteine des Arrays, wird dreimal für 5 min mit 2 ml 25 mM HEPES pH 7,4, 50 mM KCl, 1 mg/ml BSA, 20% (v/v) Glycerin, 0,1% (v/v) Triton-X 100 und 1 mM DTT (Assay-Puffer) unter leichtem Schwenken bei RT gewaschen. Anschließend werden die Arrays mit 500,000 c.p.m. des jeweiligen DNA-Substrates für 30 min in 2 ml Assay-Puffer bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert.

Um ungebundenes Substrat zu entfernen, werden die Membranen anschließend dreimal für jeweils 5 min in 2 ml Assay-Puffer gewaschen. Anschließend wird die gebundene DNA durch Autoradiographie detektiert.

3.10 Methoden zur Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

3.10.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen Trennung von DNA-Fragmenten. Lineare DNA-Fragmente wandern im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Je nach Fragmentgröße werden Agarosegele von 0,8-1,5% verwendet.

Die Agarose wird durch Aufkochen in 1 X TBE gelöst, nach Abkühlen auf ca. 50 °C mit EtBr-Lösung (1 µl; 1mg/ml Stammlösung) versetzt und in die Gelkammer gegossen. Die Proben werden mit 6 X DNA-Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Zusätzlich wird ein Längenstandard (Marker) aufgetragen. Die Elektrophorese wird in 1 X TBE durchgeführt. Die Banden werden nach Beendigung der Elektrophorese durch UV-Illumination sichtbar gemacht.

3.10.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente werden aus dem Gel mit dem QIAEX ??-Kit (Qiagen) isoliert. Dazu wird die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß

überführt. Nach der Zugabe von drei Gelvolumina QX1-Puffer und 30 µl QX ??-Lösung wird die Agarose durch Inkubation bei 50 °C für 10 min unter gelegentlichem Mischen aufgelöst. Die Lösung wird für 30 s bei 2500 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Rückstand wird dreimal mit QX1-Puffer gewaschen und anschließend für 15 min an der Luft getrocknet. Anschließend wird die DNA in 20 µl 100 mM Tris-HCL pH 7,4, 5 mM EDTA pH 8,0 resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Die Lösung wird nun für 30 s bei 2500 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die eluierte DNA wird photometrisch quantifiziert.

3.10.3 Quantifizierung von Nukleinsäure-Lösungen

Die Quantifizierung der Nukleinsäurelösungen erfolgt photometrisch. DNA und RNA zeigen ein charakteristisches Absorptionsspektrum im UV-Bereich mit einem Maximum bei 260 nm, das zur Konzentrationsbestimmung herangezogen wird.

Zur Messung in einer Quarzküvette (Volumen 100 µl) wird die DNA mit H₂O verdünnt und aus dem gemessenen OD₂₆₀ die Konzentration der DNA-Lösung folgendermaßen bestimmt (für ds-DNA):

$$C_{\text{DNA}} [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.11 DNA-Bindungsassay

3.11.1 Radioaktive 5' - Markierung von Oligonucleotiden

Die radioaktive Markierung einzelsträngiger DNA erfolgt mit Hilfe von [γ -³²P]-ATP. Dabei wird in einer durch das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase katalysierten Reaktion die γ -Phosphatgruppe des [γ -³²P]-ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe des Oligonukleotids übertragen.

Dazu wird in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß 1 µl (100 pmol, 1 µg) des Oligonukleotids mit 2 µl T4-Polynukleotid-Kinase (20 U), 2 µl Polynukleotid-Kinase-Puffer (700 mM Tris-HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂ und 50 mM DTT) und 3 µl [γ -³²P]-ATP (entspricht 30 µCi) und 12 µl H₂O für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Inkubation für 10 min bei 75 °C wird die Kinase anschließend deaktiviert.

3.11.2 Herstellung von radioaktiv markierten Substraten für DNA-Bindungsassays

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten DNA-Substrate wurden aus synthetischen Oligonukleotiden (MWG Biotech) hergestellt, die in Tabelle 2 aufgelistet sind. Zur Herstellung von linearen Substraten werden die zuvor radioaktiv markierten Oligonukleotide im äquimolaren Verhältnis mit ihrem komplementären Strang in 30 µl 60 mM Tris-HCl pH 7,8, 60 mM NaCl hybridisiert. Dazu wird die Lösung für 5 min auf 75 °C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (1-2 h). Die hergestellten Substrate werden durch Diffusionselution aus einem 8%igem Polyacrylamid-Gel (0,5 X TBE) von Verunreinigungen getrennt.

Nicht-lineare Substrate werden durch hybridisieren von zwei unterschiedlich langen Oligonukleotiden hergestellt, von denen nur eines radioaktiv markiert wurde (T3-1 Oligonukleotid). Das längere Oligonukleotid enthält palindrome Sequenzen die es ermöglichen, durch intramolekulare Basenpaarung nicht-lineare DNA-Strukturen auszubilden. Die Oligonukleotide werden in 30 µl 60 mM Tris-HCl pH 7,8, 60 mM NaCl in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt und für 5 min auf 75 °C erhitzt. Anschließend wird die Lösung langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die hergestellten Substrate werden durch Gelfiltration über eine Sephadex G-25 Säule gereinigt.

3.11.3 Diffusionselution von Oligonukleotiden aus Polyacrylamid-Gelen

Durch Auftragen der linearen DNA-Substrate auf ein 8%iges Polyacrylamid-Gel (0,5 X TBE) und anschließender einstündiger Elektrophorese bei 200 V (Laufpuffer: 0,5 X TBE) werden die Oligonukleotide von überschüssigem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und einzelsträngiger DNA getrennt. Die Substrate werden durch Autoradiographie detektiert, die entsprechenden Banden ausgeschnitten und in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Das Gelstück wird zerkleinert und nach Zugabe von 500 µl 500 mM NH_4Ac , 10 mM $\text{Mg}(\text{Ac})_2$ und 1 mM EDTA pH 8,0 werden die Oligonukleotide ÜN bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wird die Lösung für 1 min bei 2500 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die eluierten DNA-Substrate werden mit Ethanol gefällt und in 50 µl 60 mM Tris-HCl pH 7,8, 60 mM NaCl resuspendiert.

3.11.4 Reinigung von radioaktiv markierten DNA-Substraten durch Gelfiltration

Zur Reinigung von 5' - markierten Substraten durch Gelfiltration wurden Sephadex G-25 Säulen verwendet. Diese Säulen besitzen ein Ausschlussvolumen von < 10 Basenpaaren und ermöglichen die Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden im Anschluss an die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden.

Die Säulen werden zunächst für 2 min bei 1100 x g zentrifugiert, um den Säulen-Puffer abzutrennen. Anschließend werden die hergestellten Substrate auf die Säule geladen und für 4 min bei 1100 x g zentrifugiert. Im Säulenmaterial verbleiben nicht eingebautes [γ -³²P]-ATP, wogegen sich das hergestellte DNA-Substrat im Eluat befindet.

3.11.5 DNA-Bindungsassay (Electrophoretic Mobility Shift Assay "EMSA")

Das EMSA-Assay stellt die Standardmethode zur Identifizierung und Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen *in vitro* da. Hierzu wird ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment mit dem zu analysierenden Protein inkubiert und die entstandenen Komplexe in einem nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Neben dem Signal des nicht komplexierten DNA-Fragmentes tritt bei der Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes eine zusätzliche Bande mit verändertem Laufverhalten auf (Shift). Um die Identität des DNA-Bindeproteins zu überprüfen kann die Analyse in Gegenwart eines gegen das Protein gerichteten Antikörpers durchgeführt werden. Tritt eine zusätzliche Bande mit verzögertem Laufverhalten auf (Super-Shift), lässt sich das DNA-Bindeprotein spezifisch nachweisen.

In den durchgeführten EMSA-Assays werden in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß 50 ng rekombinantes p53-Protein mit 5ng poly (dI)(dC) und 2 µg BSA in 20 µl 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT und 50 mM NaCl für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 20,000 c.p.m. des markierten DNA-Substrates zugefügt und für weitere 25 min inkubiert. Die Proben werden auf ein natives 4%iges Polyacrylamid-Gel gegeben und die Elektrophorese erfolgt in 10 mM Tris-HCl pH 7,8, 0,2 mM EDTA, 1,25 mM NaOAc und 8 mM Essigsäure bei 200 V für 2,5 h bei RT. Nach der Elektrophorese werden die Gele getrocknet und die radioaktiv markierte DNA durch Autoradiographie detektiert.

3.11.6 Detektion der Protein- und DNA-Komponenten eines EMSA-Assays durch Semi-Dry-Blotting

Mit dieser Methode ist es möglich, die Protein- und DNA-Komponenten eines EMSA-Assays getrennt voneinander zu identifizieren. Die Protein-DNA-Komplexe werden nach dem Auftrennen in einem Polyacrylamid-Gel durch Semi-Dry-Blotting auf Membranen transferiert, die spezifisch Proteine bzw. DNA binden. Anschließend werden die Proteine durch Immunoblotting und die DNA durch Autoradiographie detektiert.

Für den Transfer werden zunächst drei Lagen Whatmann 3MM Filterpapier in Transferpuffer getränkt (48 mM Tris pH 8,5, 39 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) und auf die untere Elektrode der Blotapparatur gelegt. Darauf werden eine Lage Hybond-N⁺-Membran, dann eine Lage getränktes Whatmann 3MM Filterpapier, eine Lage Nitrocellulose-Membran, dann das Acrylamid-Gel und abschließend drei Lagen getränktes Filterpapier geschichtet. Die verwendeten Membranen werden vor dem Transfer 30 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Größe des Filterpapiers und der Membran muss genau der des Gels entsprechen. Danach wird die obere Elektrode aufgelegt. Die angelegte Stromstärke richtet sich nach der Größe des verwendeten Gels und beträgt $0,8 \text{ mA} \times \text{Geloberfläche (cm}^2\text{)}$. Der Transfer wird für 1 h bei RT durchgeführt.

Die DNA-Komponenten des Protein-DNA-Komplexes werden durch Autoradiographie und die Protein-Komponenten durch Immundetektion mit den p53-spezifischen Antikörpern DO-1, PAb421, PAb1801 und PAb240 identifiziert.

3.11.7 DNase I Protektionassay

Mit dieser Methode ist es möglich spezifische Bindungsstellen von Proteinen an DNA zu identifizieren. Die Methode basiert auf der Tatsache, dass gebundene Proteine die DNA vor einer DNase I katalysierten Hydrolyse schützen. Die Bindungsstellen werden durch Autoradiographie der durch Hydrolyse entstandenen DNA-Fragmente identifiziert.

In dem Assay werden 500 ng rekombinantes wt p53 unter identischen Bedingungen wie unter Abschnitt 3.11.5 beschrieben an das DNA-Substrat gebunden. Anschließend werden 20 µl einer 10 mM CaCl₂/20 mM MgCl₂ Lösung hinzugegeben und für 1 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 U DNase I (Promega) wird der

partielle Verdau für 10 min bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktion wird durch Zugabe der Stop-Lösung (150 mM NaOAc, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,5% SDS, 5 mM EDTA, 0,1 mg/ml Proteinase K, 0,05 mg/ml Hefe-tRNA) und anschließender Inkubation bei 37 °C für 15 min beendet. Danach werden die Proteine durch Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt.

Der getrocknete Rückstand wird in Formamid-Beladungspuffer (98% (v/v) Formamid, 50 mM EDTA, Bromphenolblau) gelöst und die DNA durch Erhitzen für 5 min bei 100 °C denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in einem 20%igem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (8 M Harnstoff, 20% Acrylamid/Bis (1:19), APS, TEMED, 879 mM Tris-HCl, pH 8,0, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) mit 1 X TBE als Laufpuffer bei 70 W. Nach dem Trocknen wird die radioaktiv markierte DNA durch Autoradiographie detektiert.

3.12 Reinigung von Antikörpern

Zu 50 ml Hybridomaüberstand wird zur Einstellung des optimalen pH-Wertes 5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 hinzugegeben. Anschließend wird die Lösung mit 1 ml 50%iger Protein-G-Sepharose ÜN bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Lösung wird in eine Polyrep-Chromatographie-Säule überführt und die Matrix einmal mit 5 ml 100 mM Tris pH 8,0 und anschließend einmal mit 5 ml 10 mM Tris pH 8,0 gewaschen. Der gebundene Antikörper wird mit 100 mM Glycin pH 3,0 eluiert, wobei die Elution in 500 µl Portionen durchgeführt wird. Die einzelnen Fraktionen werden in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen gesammelt, in denen 50 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0 vorgelegt werden. Die Konzentration des Antikörpers wird über die Absorption bei 595 nm bestimmt und durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

3.13 Herstellung eines DNA-Substrates für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Zur Herstellung des DNA-Substrates für die elektronenmikroskopischen Untersuchung werden 1,2 nmol Stem-1 Oligonukleotid mit 1,2 nmol Stem-2 Oligonukleotid in 20 µl 60 mM Tris-HCl pH 7,8, 60 mM NaCl für 5 min auf 75 °C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Anschließend wird die resultierende DNA-I mit 1,2 nmol LOOP-DNA mit T4-DNA-Ligase (2000 U, Gesamtvolumen 50 µl) ÜN bei

16 °C inkubiert. Nachdem die resultierende DNA-II aus einem 2%igem Agarose-Gel eluiert und photometrisch quantifiziert wird, folgt die Hybridisierung mit T3-1 DNA.

Dazu werden 500 pmol T3-1 DNA mit 500 pmol DNA-II in 30 µl 60 mM Tris-HCl pH 7,8, 60 mM NaCl für 5 min auf 75 °C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt. Die resultierende DNA-III wird aus einem 1,6%igem Agarose-Gel eluiert und anschließend für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt.

3.14 Elektronenmikroskopie

Zur Darstellung der p53-DNA-Komplexe werden die verwendeten DNA-Substrate mit dem jeweiligen Protein in 10 µl 10 mM HEPES pH 7,5, 50 mM KCl und 0,01% (v/v) Triton X-100 für 30-40 min bei RT inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wird von der Reaktionslösung ein Aliquot abgenommen (1-2 µl) und in 10 mM Na-HEPES pH 7,5, 10 mM KCl verdünnt (1:20). Anschließend wird die Lösung auf einen Proben-träger gegeben, der zuvor nach einer Methode von Dubochet *et al.* (1971) aktiviert wird. Nach einer Absorptionsdauer von 2-4 min wird der Proben-träger mit einer 2%igen Uranacetat-Lösung gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die Untersuchung der p53-DNA-Komplexe erfolgt mit einem Philips CM12 Elektronenmikroskop bei einer 60,000fachen Vergrößerung.

3.15 Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch FIDA (Fluorescence-intensity distribution analysis)

Die zur Bestimmung der Bindungskonstanten verwendeten DNA-Substrate werden wie unter 3.11.2 beschrieben hergestellt. Anstelle von radioaktiv markierten Oligonukleotiden wird in diesem Fall ein 5'-TAMRA modifiziertes Oligonukleotid verwendet (siehe Tabelle 2). Die Konzentration der verwendeten Substrate wird auf 1 nM eingestellt und die Bestimmung der Bindungskurven erfolgt durch Aufnahme einer Protein-Titrationsreihe über einen Bereich von 0-375 nM bei konstanter Substratkonzentration. Die Messungen werden in einem Volumen von 20 µl mit 5 ng poly (dl)(dC), 2 µg BSA in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM NaCl und 0,05% (v/v) Pluronic bei RT durchgeführt. Die DNA-Substrate werden mit den Proteinen für 20 min bei RT inkubiert und die Messungen erfolgen in einer 24-well Platte bei einer Messzeit von jeweils 5 s pro well.

Als Parameter zur Bestimmung der Bindungskurven und der Dissoziationskonstanten wird die Lebensdauer des angeregten Zustandes des Fluorophors herangezogen. Zur graphischen Darstellung der Bindungskurven und Berechnung der Dissoziationskonstanten wird das Programm SigmaPlot, Version 4.00 verwendet.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung von strukturierten DNA-Substraten

In dieser Arbeit wurde das DNA-Bindungsverhalten des Tumorsuppressorproteins p53 gegenüber linearen und strukturierten DNA-Substraten untersucht. Zu diesem Zweck wurden Sequenzen von verschiedenen p53-spezifischen Bindungselementen in unterschiedlichen Konformationen in DNA-Bindungsstudien eingesetzt. Dazu gehörten die Bindungsstellen des p21-, EGF-R- und des TGF- α -Promotors. Diese Konsensuselemente zeigen untereinander nur geringe Sequenzhomologie und unterscheiden sich weiterhin in der Anzahl von Dekameren aus denen sie zusammengesetzt sind (siehe Einleitung, Tabelle 1). Als gemeinsame Eigenschaft weisen sie jedoch interne symmetrische Elemente auf, die es ihnen ermöglichen nicht-lineare DNA-Strukturen auszubilden. So kann die p53-Bindungsstelle des p21-Promotors formal zwei unterschiedliche nicht-lineare Strukturen ausbilden, in denen die beiden Dekamere zu unterschiedlichen Teilen integriert sind (siehe Abb. 2).

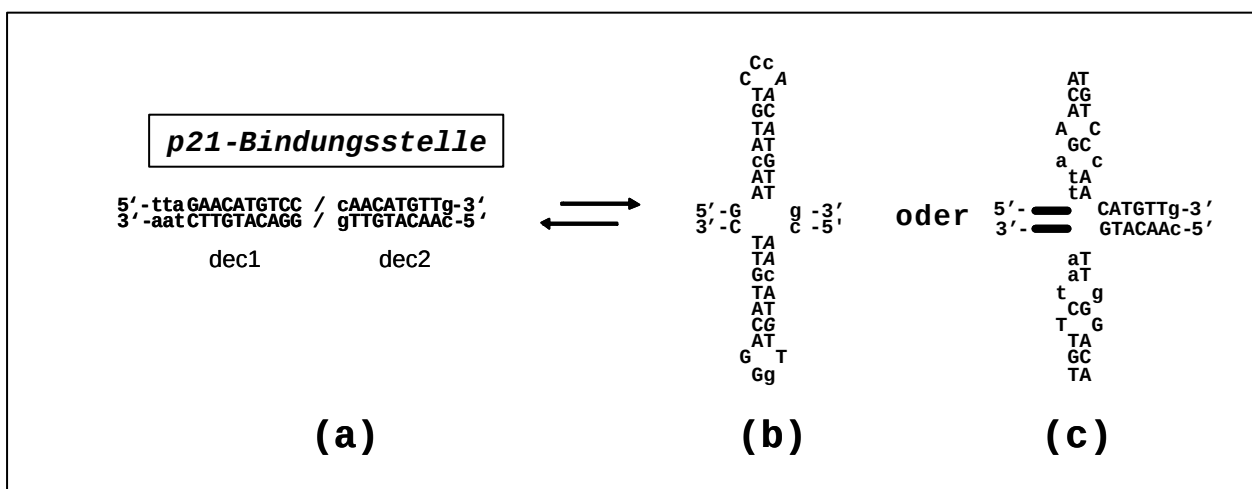


Abb. 2: Schematische Darstellung von verschiedenen nicht-linearen DNA-Strukturen der p21-Bindungsstelle. Abb. (a) zeigt beide Dekamere der p21-Bindungsstelle in linearer Form (dec1/dec2). Mögliche Sekundärstrukturen sind in Abb. (b) bzw. (c) dargestellt. Basen, die nicht der Konsensussequenz entsprechen, sind klein geschrieben.

Ebenso wie die p53-Zielsequenz des p21-Promotors sind unter anderem auch die Bindungsstellen des EGF-R- bzw. TGF- α -Promotors zur Ausbildung solcher Sekundärstrukturen in der Lage.

Als Modellstrukturen für die DNA-Bindungsstudien wurden in dieser Arbeit DNA-Substrate mit Haarnadelstruktur eingesetzt. Zu deren Darstellung wurde eine Methode verwendet, die schon häufiger zur Herstellung von strukturierter DNA

eingesetzt wurde (Bianchi *et al.*, 1989; Pearson *et al.*, 1995). Dabei werden zwei unterschiedlich lange Oligonukleotide miteinander hybridisiert von denen das längere die p53-spezifische Bindungsstelle trägt. Dadurch kommt es zur Bildung einer asymmetrischen Struktur, in der das längere Oligonukleotid eine haarnadel-ähnliche Struktur bildet. In Abb. 3 ist diese Vorgehensweise schematisch dargestellt.

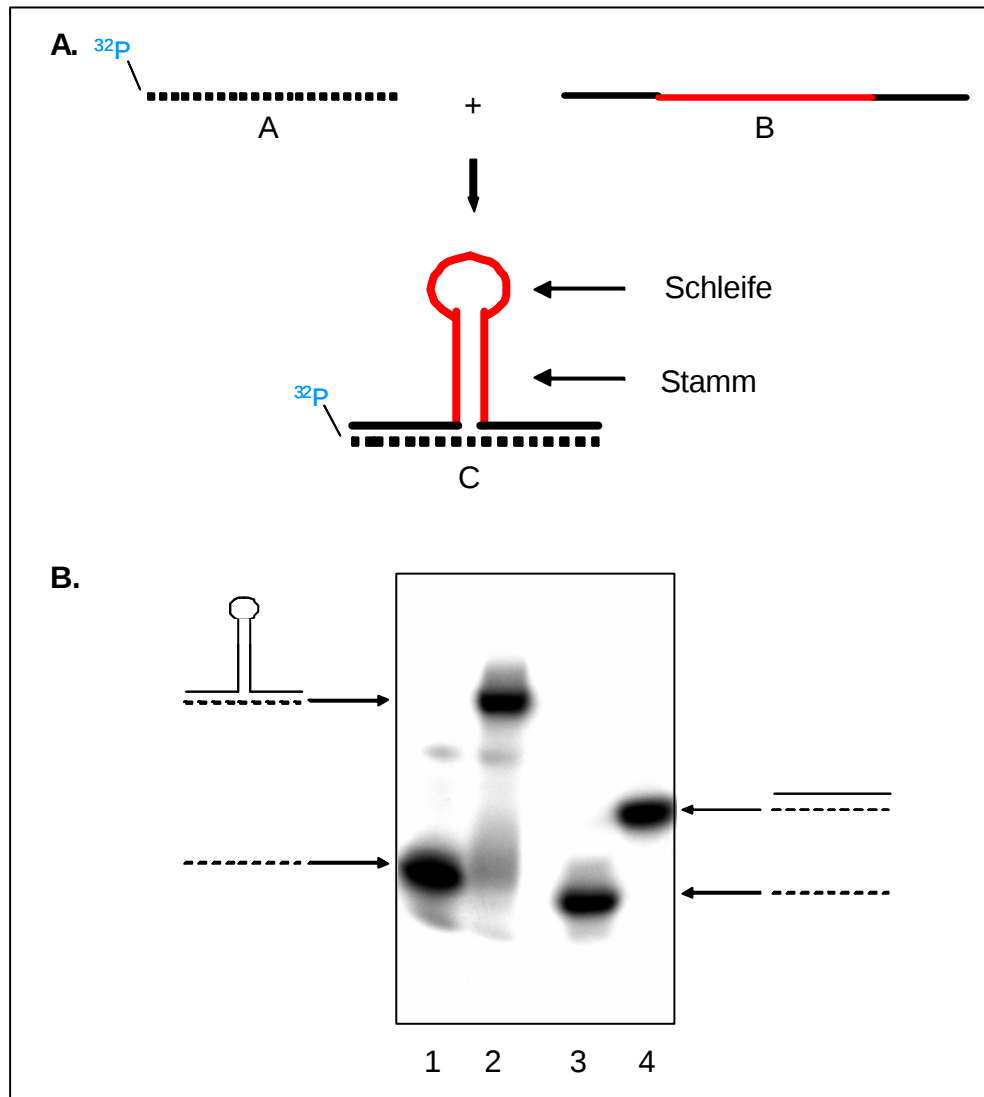


Abb. 3: Schematische Darstellung zur Herstellung von DNA-Substraten mit Haarnadelstruktur. A, 5'-markiertes T3-1 Oligonukleotid (A) wird mit einem Oligonukleotid hybridisiert, welches eine p53-spezifische Bindungsstelle (in rot) trägt (B). Es resultiert ein Substrat mit Haarnadelstruktur (C). B, Migrationsverhalten von linearen und strukturierten DNA-Substraten in einem 8%igem Polyacrylamid-Gel. Radioaktiv markiertes T3-1 Oligonukleotid vor (Bahn 1) und nach der Hybridisierung mit ungelabeltem p21-dec1+2 Oligonukleotid (Bahn 2). Die Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide p21 (lin/s) und p21 (lin/as) führt zur Bildung von linearer Doppelstrang-DNA (Bahn 4). Einzelsträngiges p21 (lin/s) Oligonukleotid ist in Bahn 3 gezeigt.

4.2 Wt p53 bindet an strukturierte DNA ohne Aktivierung durch den C-terminalen Antikörper PAb421

In dieser Arbeit wurde das Bindungsverhalten von wt p53 gegenüber linearen und strukturierten DNA-Substraten durch EMSA und elektronenmikroskopischen Methoden untersucht.

EMSA-Experimente zeigten, dass wt p53 nur geringe Affinität gegenüber spezifischen linearen DNA-Substraten aufweist. Diese latente DNA-Bindungseigenschaft kann durch den Einsatz des spezifischen Antikörpers PAb421 verstärkt werden. Dieser ist gegen ein C-terminales Epitop des Proteins gerichtet und führt zu einer deutlich stärkeren Bindung an das Substrat (siehe Abb. 4, Bahn 5 und 6).

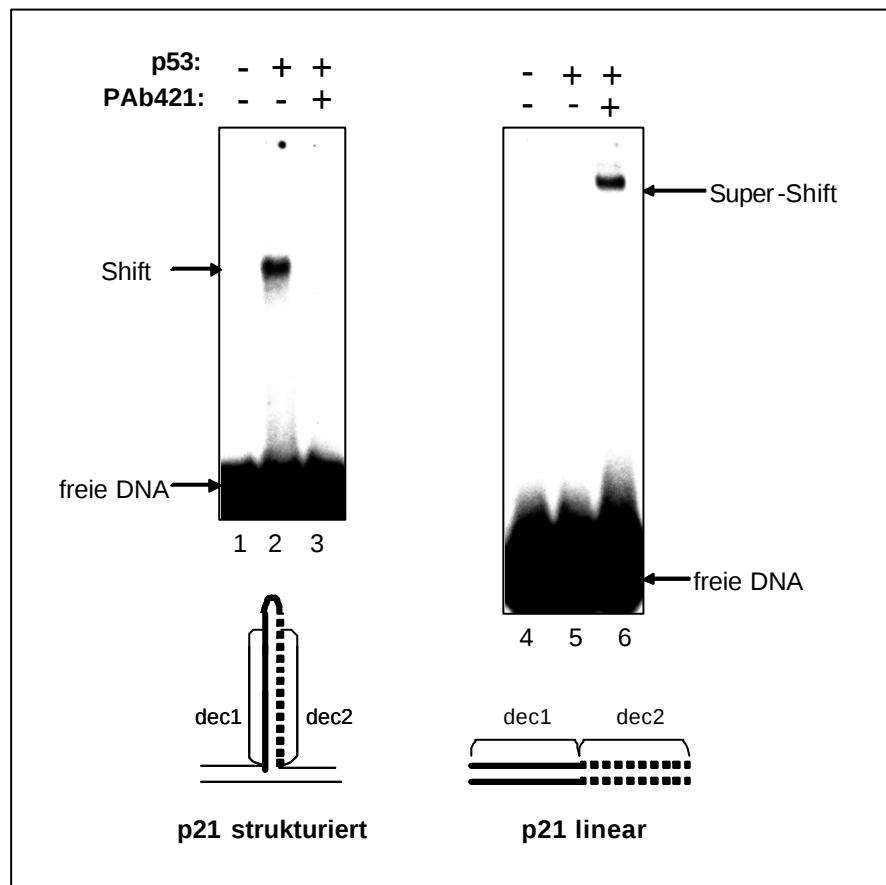


Abb. 4: Untersuchung der Bindungseigenschaften von wt p53 gegenüber linearen und strukturierten DNA-Substraten. Substrate mit der p53-spezifischen Bindungsstelle des p21-Promotors in strukturierter (p21-dec1 + 2, Bahn 1-3) und linearer Form (p21 lin/s +as, Bahn 4-6), wurden mit 50 ng wt p53 mit (Bahn 3 und 6) bzw. ohne PAb421 (Bahn 2 und 5) inkubiert. P53-DNA-Komplexe und freie DNA sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Liegen die beiden Dekamere der spezifischen Bindungsstelle in strukturierter Form vor ändert sich das Bindungsverhalten von wt p53. Es war deutlich, ohne vorherige

Aktivierung durch den C-terminalen Antikörper, eine starke Bindung an das Substrat zu erkennen (Abb. 4 Bahn 2). Im Unterschied zum linearen Substrat führte die Modifizierung durch den Antikörper nicht zu einer Verstärkung der Bindung sondern zu einer starken Inhibierung (Abb. 4 Bahn 3).

Die beobachtete hohe Affinität von wt p53 gegenüber strukturierter DNA konnte durch Titrationsexperimente bestätigt werden. In Abb. 5, Bahn 20 ist zu erkennen, dass bei einer Proteinmenge von 100 ng nahezu sämtliche strukturierte DNA in gebundenem Zustand vorliegt wogegen sich beim linearen Substrat unter identischen Bedingungen keine Bindung nachweisen lässt (Abb. 5, Bahn 10).

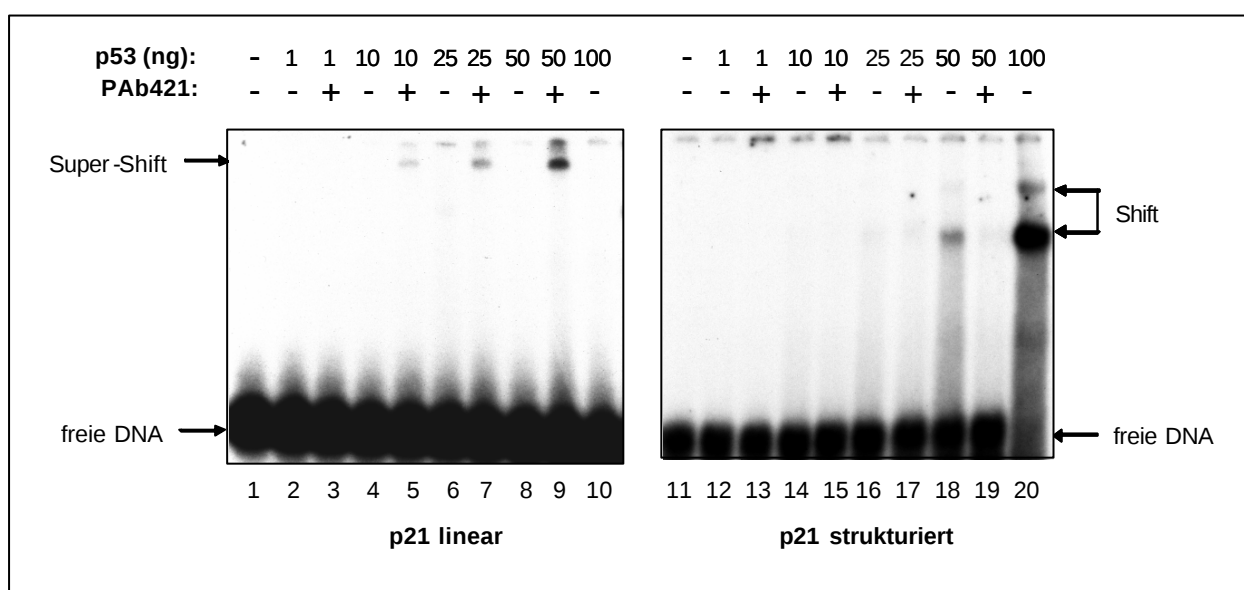


Abb. 5: Wt p53 zeigt höhere Affinität zu DNA-Substraten in strukturierter Konformation. Substrate mit der p53-spezifischen Bindungsstelle des p21-Promotors in strukturierter (p21-dec1 + 2, Bahn 1-10) und linearer Form (p21 lin/s + as, Bahn 11-20) wurden mit steigenden Mengen an wt p53 inkubiert (1-100 ng). Die Zugabe von PAb421 ist angegeben. P53-DNA-Komplexe und freie DNA sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass für eine stabile Komplexbildung zwischen wt p53 und spezifischen linearen Substraten die Anwesenheit von mindestens zwei Dekameren innerhalb einer Bindungsstelle notwendig ist (McLure und Lee, 1998).

Zur Klärung der Frage, ob dies auch für strukturierte DNA-Substrate der Fall ist, wurde ein Substrat untersucht, in dem nicht beide sondern nur ein Dekamer der p53-spezifischen Bindungsstelle des p21-Promotors vorliegt.

Die Experimente zeigten, dass auch dieses Substrat von wt p53 gebunden wird (Abb. 6, Bahn 2). Die Zugabe des C-terminalen Antikörpers führte auch in diesem Fall nicht zu einer Aktivierung der Bindungseigenschaften sondern zu einer Inhibierung (Abb. 6, Bahn 3).

Liegt dieses Dekamer als lineares Substrat vor war selbst bei Aktivierung von wt p53 durch PAb421 keine Bindung zu erkennen (Abb. 6, Bahn 6).

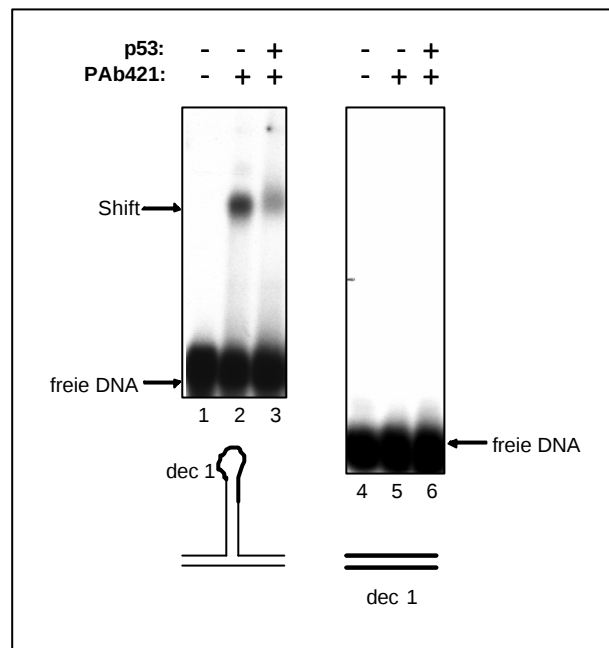


Abb. 6: Ein Dekamer ist ausreichend, um die Bindung von wt p53 an strukturierte DNA zu ermöglichen. Substrate mit einem Dekamer der p53-spezifischen Bindungsstelle des p21-Promotors in linearer (p21-dec1, Bahn 1-3) und strukturierter (p21f lin/s, Bahn 4-6) Form wurden mit 50 ng wt p53 inkubiert. Die Zugabe von PAb421 (Bahn 3 und 6) ist angegeben. P53-DNA-Komplexe und freie DNA sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Das beobachtete Bindungsverhalten von wt p53 ist nicht auf die Sequenz der p21-Bindungsstelle beschränkt. Identische Bindungsmuster ließen sich auch bei Verwendung von strukturierten Substraten erkennen, die von der TGF- α - bzw. EGF-R-Bindungsstelle gebildet wurden (Abb. 7, Bahn 1-2 und 3-4).

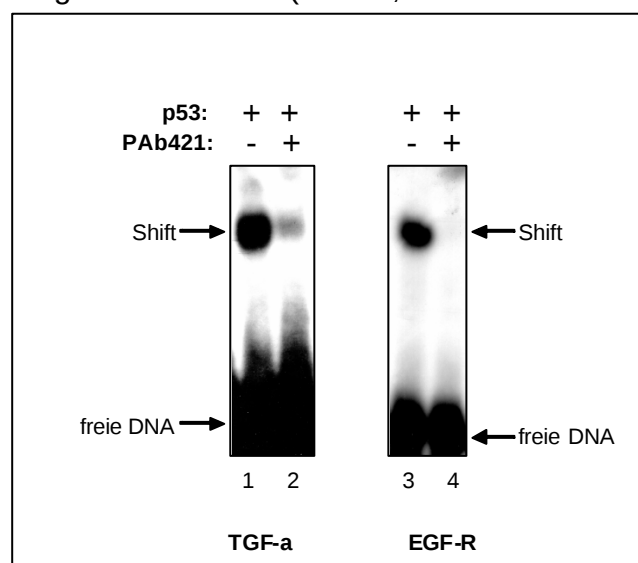


Abb. 7: Wt p53 bindet an strukturierte Substrate, die von verschiedenen Zielsequenzen gebildet werden. Strukturierte DNA mit der vollständigen Bindungsstelle des EGF-R-Promotors (EGF-R, Bahn 3 und 4) und einem Dekamer der TGF- α -Bindungsstelle (TGF- α -dec3, Bahn 1-2) wurden mit 50 ng wt p53 inkubiert. Protein-DNA-Komplexe und freie DNA sind gekennzeichnet.

4.3 p53 bindet an strukturierte DNA als Tetramer

Um als Transkriptionsfaktor wirksam zu sein muss wt p53 als Tetramer an die Bindungsstellen im jeweiligen Zielpromotor binden. Daher sollte die Frage geklärt werden ob wt p53 an strukturierte DNA ebenfalls als Tetramer bindet und somit in der transkriptionell aktiven Form vorliegt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene p53-Oligomere durch Crosslinking mit Glutaraldehyd hergestellt. Diese dienen als Marker um den Oligomerisierungsstatus von p53 zu bestimmen welches im Komplex mit strukturierter DNA vorliegt.

Durch die Behandlung mit Glutaraldehyd ließen sich verschiedene Proteinoligomere herstellen, die sich in einem nativen Polyacrylamid-Gel als monomere, dimere, trimere, tetramere und oktamere Formen trennen ließen (Abb. 8, Bahn 2).

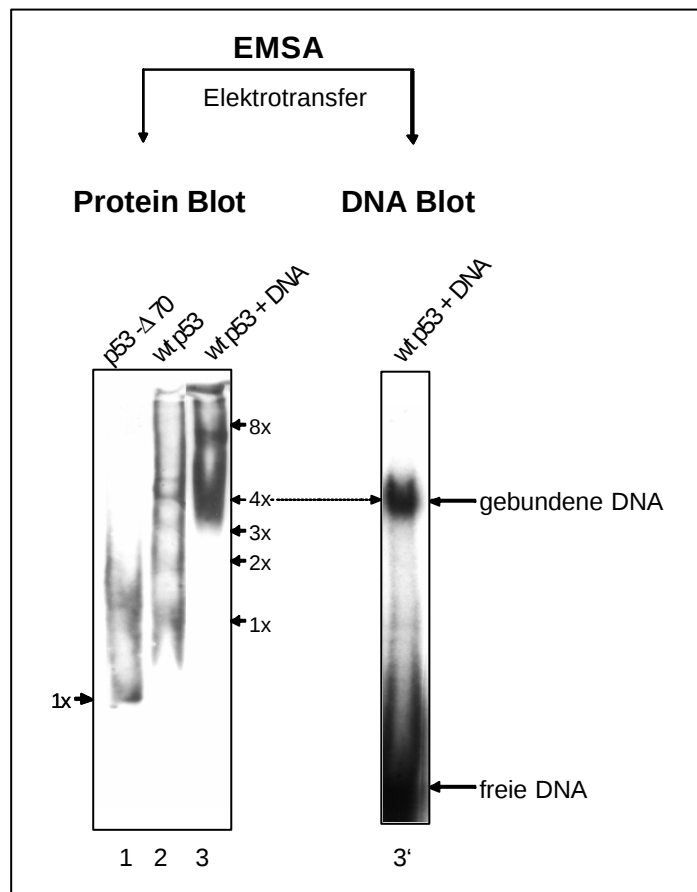


Abb. 8: Bestimmung des Oligomerisierungsstatus von gebundenem p53. 500 ng wt p53 wurde mit strukturierter DNA der p21-Bindungsstelle inkubiert (Bahn 3 und 3') und zusammen mit verschiedenen p53-Oligomeren (Bahn 2), die durch Crosslinking mit Glutaraldehyd hergestellt wurden, auf ein natives Polyacrylamid-Gel geladen. Zur Bestimmung der Position von monomeren p53 wurden 500 ng p53- Δ 70 Protein ebenfalls mit Glutaraldehyd behandelt und auf das Gel geladen (Bahn 1). Durch die C-terminale Deletion haben Monomere von p53- Δ 70 ein geringeres Molekulargewicht als monomeres wt p53 und weisen dadurch ein verändertes Migrationsverhalten auf (siehe Banden 1x in Bahn 1 und 2). Nach der Elektrophorese wurde die gelabelte DNA und das Protein auf eine Hybond N⁺ bzw. Nitrocellulose-Membran transferiert. P53 wurde durch Western-Blotting („Protein Blot“) und die DNA durch Autoradiographie detektiert („DNA Blot“). P53-DNA-Komplexe und verschiedene p53-Oligomere sind durch Pfeile markiert.

Um die Position von monomerem p53 bestimmen zu können wurde p53- Δ 70 ebenfalls mit Glutaraldehyd behandelt. Dieses C-terminal verkürzte Protein liegt in Lösung als Monomer vor, ist aber in der Lage durch Wechselwirkungen einzelner Kerndomänen instabile Oligomere zu bilden. Diese wandern im Gel als diffuse Banden oberhalb der Bande, die monomeres p53 repräsentiert (Abb. 8, Bahn 1).

Ein Vergleich des Migrationsverhaltens des DNA-Proteinkomplexes mit den p53-Oligomeren zeigt deutlich, dass p53 als Tetramer an das strukturierte Substrat bindet. Gebundenes p53 zeigte in diesem Experiment ein Migrationsverhalten, dass tetramerem p53 entspricht (Abb. 8, Bahn 2 und 3').

Da in dem durchgeführten Band-Shift-Assay das Migrationsverhalten eines DNA-Protein-Komplexes von der Größe des Proteins und nicht von der DNA bestimmt wurde, ließ sich mit dieser Methode zeigen, dass wt p53 im Komplex mit strukturierter DNA in der transkriptionell aktiven Form vorliegt.

4.4 Die Interaktion von p53 mit nicht-linearer DNA ist sequenzabhängig

In Untersuchungen mit linearer DNA konnte gezeigt werden, dass wt p53 sequenzspezifische DNA-Bindungseigenschaften aufweist und an die p53-Konsensussequenz 5'- PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy – 3' bindet (el-Deiry, 1992). Daher stellte sich die Frage, ob die Wechselwirkung mit strukturierter DNA ebenfalls sequenzspezifische Eigenschaften aufweist.

Zur Klärung dieser Frage wurden verschiedene Substrate untersucht, die entweder ein perfektes p53-Konsensusdekamer (CON-loop) tragen oder Substrate bei denen in diesem Dekamer die konservierten Basen an Position C₄ bzw. G₇ vertauscht wurden (C⇒g, G⇒c, MUT-loop). Das hierbei verwendete Konsensusdekamer leitet sich von dem RGC-Bindungselement ab, eine der ersten und am besten charakterisierte natürliche p53-Bindungsstelle (Kern et al., 1991), die häufig für p53-DNA-Bindungsstudien eingesetzt wurde (Abb. 9).

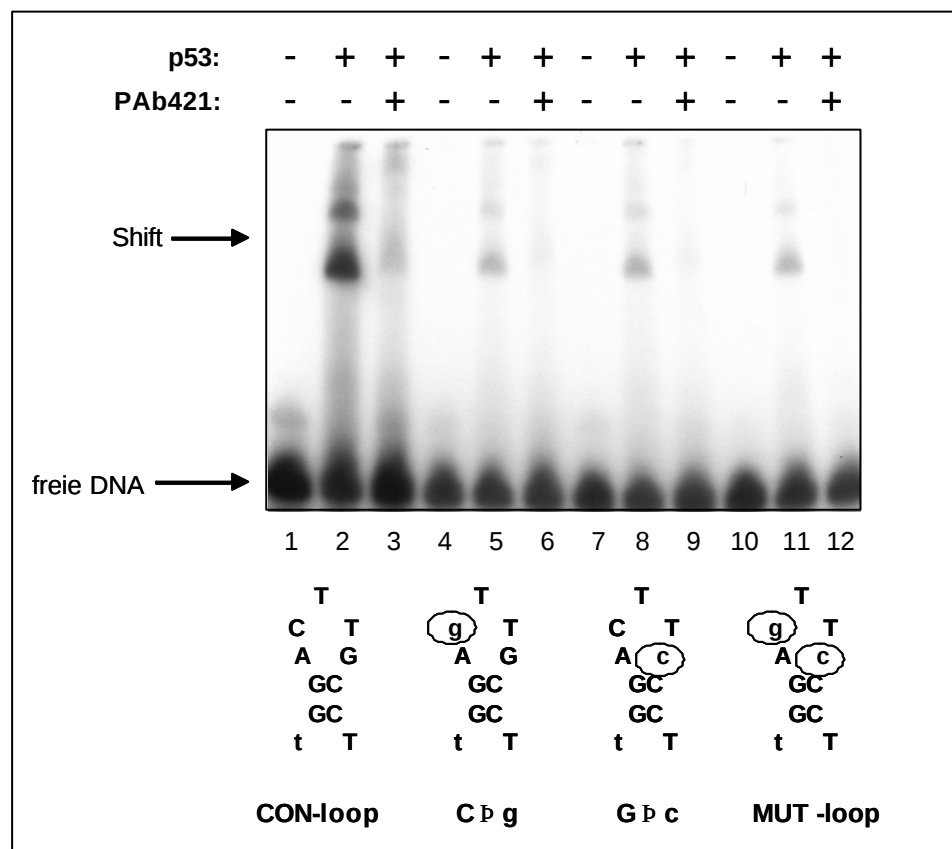


Abb. 9: Die Interaktion von wt p53 mit strukturierter DNA ist sequenzspezifisch. Wt p53 wurde mit strukturierter DNA, die ein perfektes Konsensusdekamer (CON-loop, Bahn 1-3) trägt und strukturierter DNA, in der die konservierten Basen dieses Dekamers vertauscht sind, inkubiert (C⇒g, Bahn 4-6, G⇒c, Bahn 7-9 und MUT-loop, Bahn 10-12). Die betreffenden Regionen der Substrate sind unterhalb des Gelbildes dargestellt. Die Sequenz des perfekten Dekamers ist in Großbuchstaben geschrieben, vertauschte Basen sind eingekreist und klein geschrieben.

In den Bindungsstudien zeigte sich, dass ein Austausch der konservierten Basen zu einer Verminderung der Bindung von wt p53 führt. Das Substrat mit dem intakten Bindungsmotiv wurde in stärkerem Maße gebunden als die Substrate, in denen die Basen an Position C₄ bzw. G₇ vertauscht wurden (Abb. 9, Bahn 2-12). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die konservierten Basen innerhalb der Dekamere für die Interaktion von wt p53 mit strukturierten DNA-Substraten von besonderer Bedeutung sind.

4.5 Die Interaktion von wt p53 mit nicht-linearer DNA ist strukturspezifisch

Alle bisher getesteten DNA-Substrate enthalten ungepaarte Basen innerhalb der Haarnadelschleife. Daher besteht die Möglichkeit, dass die starke Interaktion von wt p53 mit diesen Substraten durch dessen Eigenschaft verursacht wird, einzelsträngige DNA in sequenz-unabhängiger Weise binden zu können. Die Bindung von wt p53 an diese Substrate könnte somit durch das Erkennen ungepaarter Basen im Bereich der Haarnadelschleife hervorgerufen werden, wogegen die Bindung an eine spezifische Sequenz nur eine untergeordnete Rolle spielen würde.

Zur Klärung dieser Frage wurden verschiedene DNA-Substrate durch DNase I Protektionassay untersucht. Diese Methode bietet die Möglichkeit, diejenigen Regionen im Substrat zu identifizieren, die von dem Protein gebunden werden. Sind Proteine an die DNA gebunden schützen diese den entsprechenden DNA-Bereich vor dem Abbau durch die DNase. Vergleicht man den Reaktionsansatz mit Protein mit einer Kontrolle ohne Protein werden möglicherweise geschützte DNA-Bereiche entdeckt, die durch die Bindung des Proteins einem DNase-Abbau entgangen sind.

In einem der untersuchten Substrate wird die Schleife der Haarnadelstruktur durch ein perfektes p53-Konsensusdekamer gebildet (CON-loop, Abb. 10), wogegen beim zweiten Substrat die konservierten Basen an Position C₄ und G₇ miteinander vertauscht wurden (MUT-loop, Abb. 10). In Abwesenheit von p53 zeigte sich ein charakteristisches Spaltungsmuster der Substrate, hervorgerufen durch die DNase I katalysierte Hydrolyse der Substrate (Abb. 10, Bahn 2 und 5). In Anwesenheit von p53 wurden im CON-loop Substrat der Stamm und die Schleife, in der sich das p53-Konsensusdekamer befindet, vor der DNase I katalysierten Hydrolyse geschützt. Diese Regionen wurden demnach von wt p53 in diesem Substrat gebunden (Abb. 10, Bahn 3).

Ein Austausch der konservierten Basen führte zu einer verminderten Bindung von p53 im Bereich der Schleife des MUT-Loop DNA-Substrates, wogegen sich im Bereich des Stamms noch Bindung erkennen ließ (Abb. 10, Bahn 6).

Dies deutet darauf hin, dass in diesem Substrat nur der Stamm von wt p53 gebunden wird, jedoch nicht die Basen im Bereich der Schleife. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Vorhandensein einer spezifischen Sequenz und nicht ungepaarte Basen im Bereich der Haarnadelschleife den bestimmenden Faktor bei der Interaktion von wt p53 mit den untersuchten Substraten darstellt.

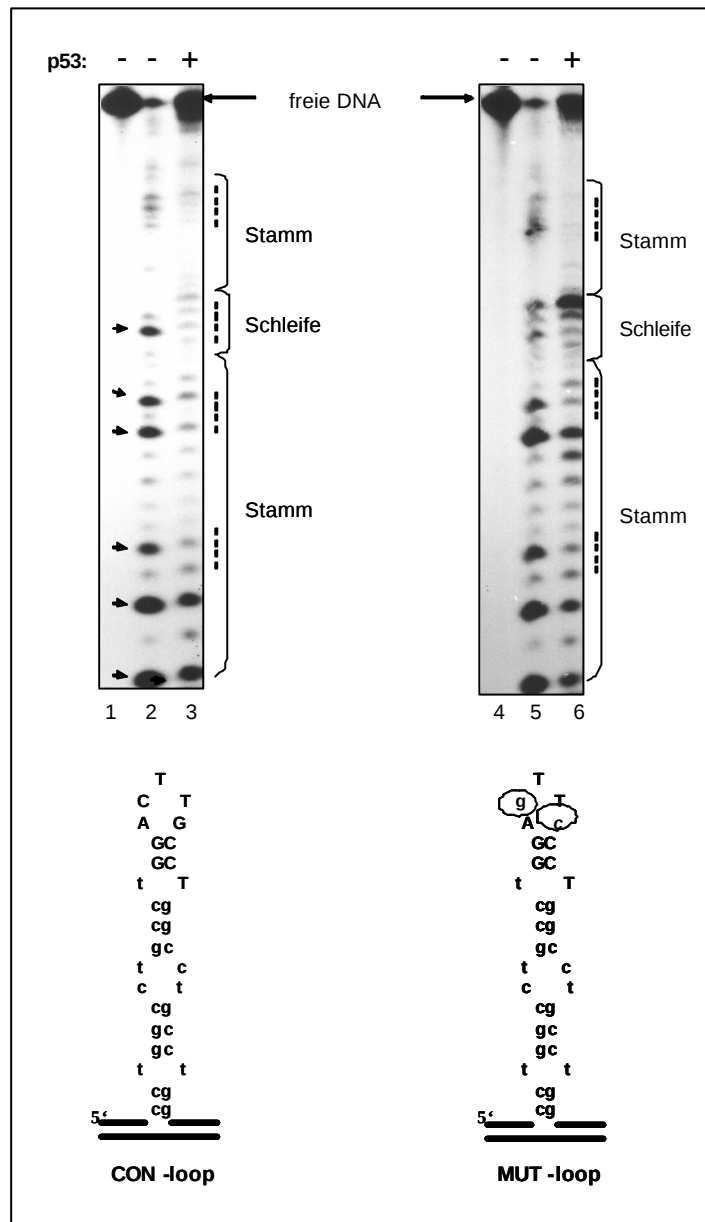


Abb. 10: Untersuchung von p53-DNA-Komplexen durch DNase I Protektionassay. CON-loop und MUT-loop DNA enthalten ein perfektes bzw. mutiertes Konsensusdekamer. Die Konsensussequenz ist in Großbuchstaben geschrieben. Basen, die vertauscht wurden, sind eingekreist und klein geschrieben. Die Strukturen der Substrate sind unter dem Gel dargestellt. In Bahn 1 und 4 sind radioaktiv markierte Substrate ohne Behandlung mit DNase I dargestellt. In Bahn 2 und 5 wurden die Substrate mit DNase I in Abwesenheit von wt p53 behandelt. In Bahn 3 und 6 sind Substrate, die in Anwesenheit von wt p53 mit DNase I behandelt wurden, dargestellt. Gestrichelte Regionen der Substrate werden durch p53 vor der Hydrolyse durch DNase I geschützt. Mit Klammern sind diejenigen Regionen der Substrate gekennzeichnet, die den Stamm bzw. die Schleife der Substrate bilden.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit den EMSA-Experimenten in denen gezeigt werden konnte, dass CON-loop DNA stärker gebunden wird als MUT-loop DNA.

Eine weitere gemeinsame Eigenschaft der verwendeten DNA-Substrate ist das Vorhandensein von ungepaarten Basen im Bereich des Stamms der Haarnadelstrukturen. P53 ist in der Lage mit dem C-Terminus und der DNA-Bindungsdomäne sequenzunspezifisch an ungepaarte Basen zu binden. Daher ist

anzunehmen, dass ungepaarte Basen eine wichtige Voraussetzung für die Bindung von wt p53 an die untersuchten Haarnadelstrukturen darstellen können. Um dies zu überprüfen wurden zwei Substrate getestet, von denen eines ungepaarte Basen im Bereich des Stamms (SCR-loop, Abb. 11) aufweist, wogegen beim zweiten Substrat keine ungepaarten Basen in diesem Bereich auftreten (SCR-paired, Abb. 11).

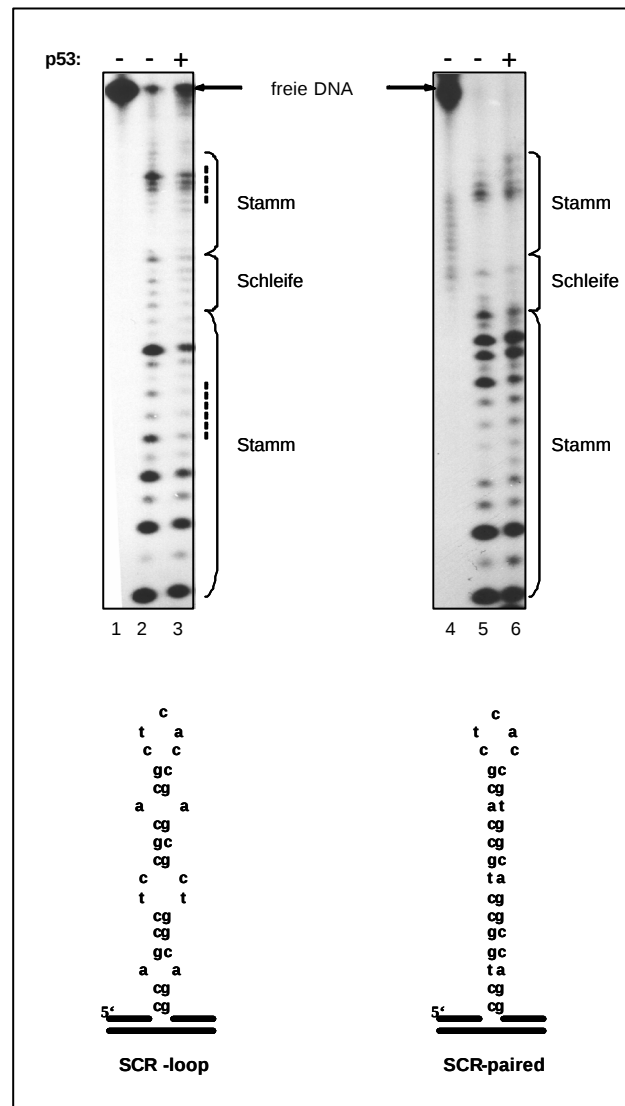


Abb. 11: Untersuchung von p53-DNA-Komplexen durch DNase I Protektionassay. SCR-loop und SCR-paired DNA enthalten kein p53-Konsensusdekamer, SCR-paired zeigt zusätzlich keine fehlgepaarten Basen im Bereich des Stamms. Die Substrate sind unter dem Gel dargestellt. In Bahn 1 und 4 sind radioaktiv markierte Substrate ohne Behandlung mit DNase I dargestellt. In Bahn 2 und 5 wurden die Substrate mit DNase I in Abwesenheit von wt p53 behandelt. In Bahn 3 und 6 sind Substrate, die in Anwesenheit von wt p53 mit DNase I behandelt wurden, dargestellt. Gestrichelte Regionen der Substrate werden durch p53 vor der Hydrolyse durch DNase I geschützt. Mit Klammern sind diejenigen Regionen der Substrate gekennzeichnet, die den Stamm bzw. die Schleife der Substrate bilden.

In den DNase I Protektionassays konnte gezeigt werden, dass der Bereich, in dem sich die ungepaarten Basen der SCR-loop DNA befinden, vor der Hydrolyse

geschützt ist (Abb. 11, Bahn 3). Beim SCR-paired Substrat ließ sich diese Protektion nicht erkennen, was darauf schließen lässt, dass ungepaarte Basen im Bereich des Stammes eine strukturspezifische Bindung von wt p53 verursachen (Abb. 11, Bahn 6). Dies ließ sich auch mit EMSA-Experimenten nachweisen, in denen gezeigt werden konnte, dass wt p53 besser an ein Substrat mit ungepaarten Basen bindet als an ein Substrat, in dem die Basen gepaart vorliegen. Dies trifft sowohl für DNA-Substrate mit p53-Bindungsstelle (CON-loop bzw. CON-paired, Abb. 12 **A**) sowie auf Substrate ohne p53-Bindungsstelle (SCR-loop bzw. SCR-paired) zu (Abb. 12 **B**).

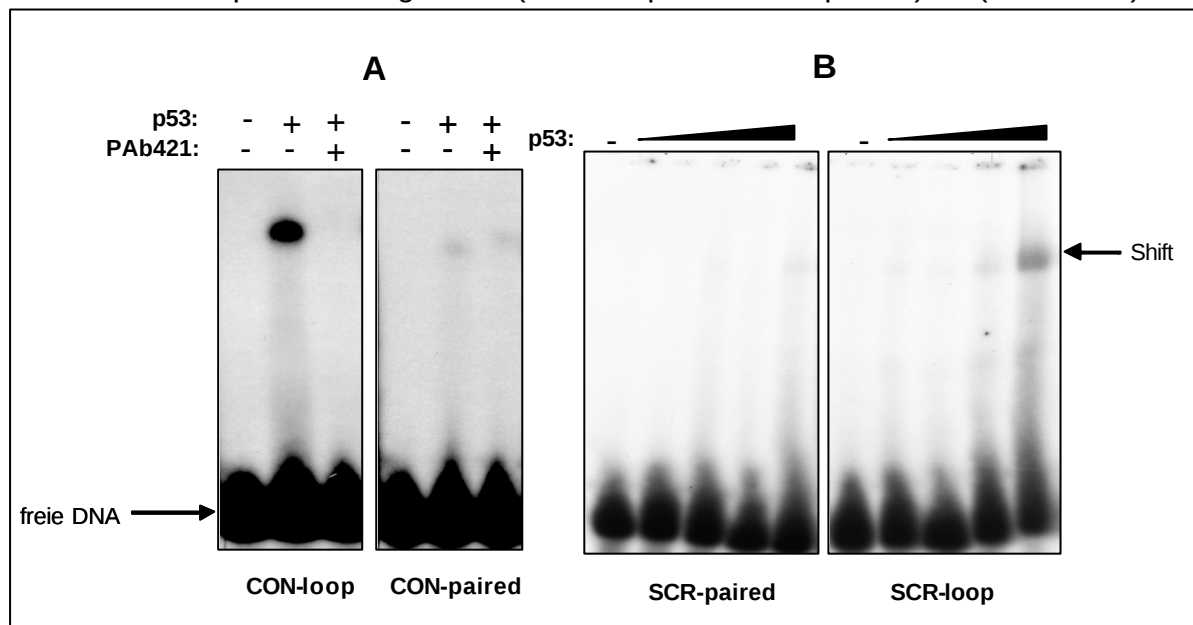


Abb. 12: Analyse der p53 Bindung an Substrate mit unterschiedlichen Strukturen. A: CON-loop und CON-paired DNA tragen ein perfektes Konsensusdekamer der RGC-Sequenz. CON-paired DNA hat keine fehlgepaarten Basen im Bereich des Stammes. Beide Substrate wurden mit 50 ng wt p53 inkubiert. **B:** SCR-paired und SCR-loop DNA tragen kein p53-Konsensusdekamer. SCR-paired fehlen zusätzlich fehlgepaarte Basen im Bereich des Stammes. Die Substrate wurden mit steigenden Mengen von wt p53 inkubiert (5-50 ng).

4.6 Der C-Terminus des p53-Proteins reguliert die Wechselwirkung mit strukturierter DNA

In EMSA-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von wt p53 eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der DNA-Bindungsaktivität des Proteins spielt. Die Bindung an lineare DNA wird verstärkt, wenn das Protein mit dem C-terminalen Antikörper PAb421 modifiziert wird. Bei der Verwendung von strukturierten DNA-Substraten wird die Bindung in Gegenwart des Antikörpers stark inhibiert. Diese Inhibierung ist spezifisch für diesen Antikörper, da der N-terminal spezifische Antikörper DO-1 nur zu einem "Super-Shift" in DNA

Bindungsexperimenten führte jedoch nicht zu einer Inhibierung der Bindung (Abb. 13, Bahn 2 und 3).

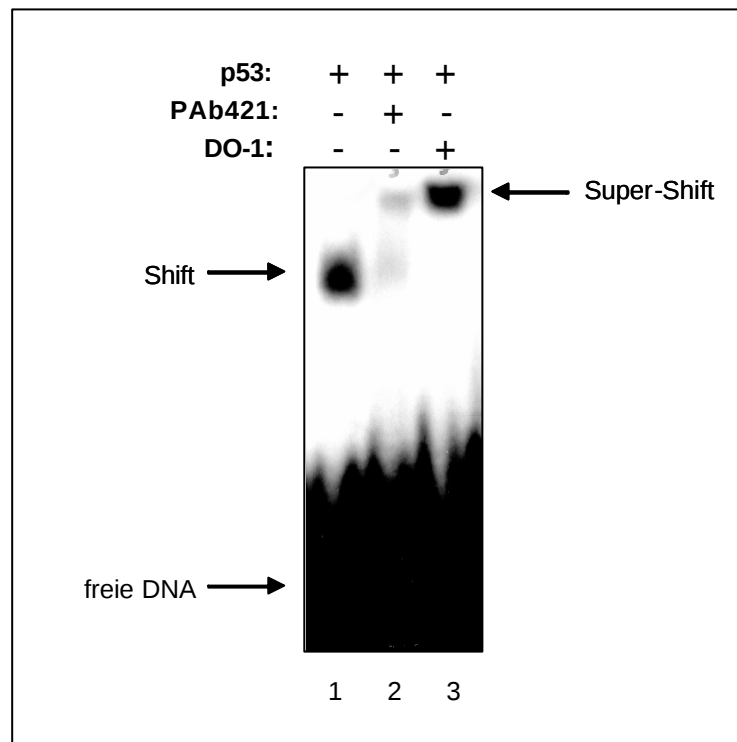


Abb. 13: Der Nterminal spezifische Antikörper DO-1 führt zu einem Super-Shift in EMSA-Experimenten. CON-loop DNA-Substrat wurde mit 50 ng wt p53 ohne Antikörper (Bahn 1), mit dem C-terminal spezifischen Antikörper PAb421 (Bahn 2) und dem N-terminal spezifischen Antikörper DO-1 (Bahn 3) inkubiert.

Um die Rolle des C-Terminus und anderer funktioneller Proteindomänen, wie beispielsweise der Kerndomäne, bei der Bindung von wt p53 an strukturierte DNA weiter zu charakterisieren wurden verschiedene p53-Deletionsmutanten auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht. Der Einfluss der regulatorischen C-terminalen Region wurde mit p53-?30 und die Rolle der Oligomerisierungsdomäne mit p53-?70 untersucht. Diese Proteine sind am C-Terminus um 30 bzw. 70 Aminosäuren verkürzt.

Wie in der Literatur beschrieben ist die Affinität des C-terminal verkürzten p53-?30 Proteins im Vergleich zu dem nicht verkürzten Protein für spezifische lineare DNA höher (Abb. 14, Bahn 2'-4'). Liegt die Bindungsstelle in strukturierter Konformation vor ließ sich mit dem verkürzten Protein keine Bindung mehr nachweisen wogegen wt p53 an das Substrat bindet (Abb. 14, Bahn 2-4). Analoges Bindungsverhalten zeigte sich, wenn strukturierte Substrate mit den Bindungsstellen des EGF-R- und des TGF- α - Promotors verwendet wurden.

In Untersuchungen mit linearer DNA konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Tetrameren eine Voraussetzung für die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität von wt p53 darstellt. Monomeres p53 dagegen zeigt keine Bindungsaktivität. Zur Klärung der Frage, ob monomeres p53 in der Lage ist an strukturierte DNA zu binden wurde ein Protein untersucht, welches keine Oligomerisierungsdomäne trägt und somit in Lösung als Monomer vorliegt (p53- Δ 70). Die Experimente zeigten deutlich, dass die Oligomerisierung des p53-Proteins eine Voraussetzung dafür ist, an lineare und strukturierte DNA binden zu können. Weder für das lineare noch für das strukturierte Substrat ließ sich eine Bindung für p53- Δ 70 nachweisen (Abb. 14, Bahn 5 und 5').

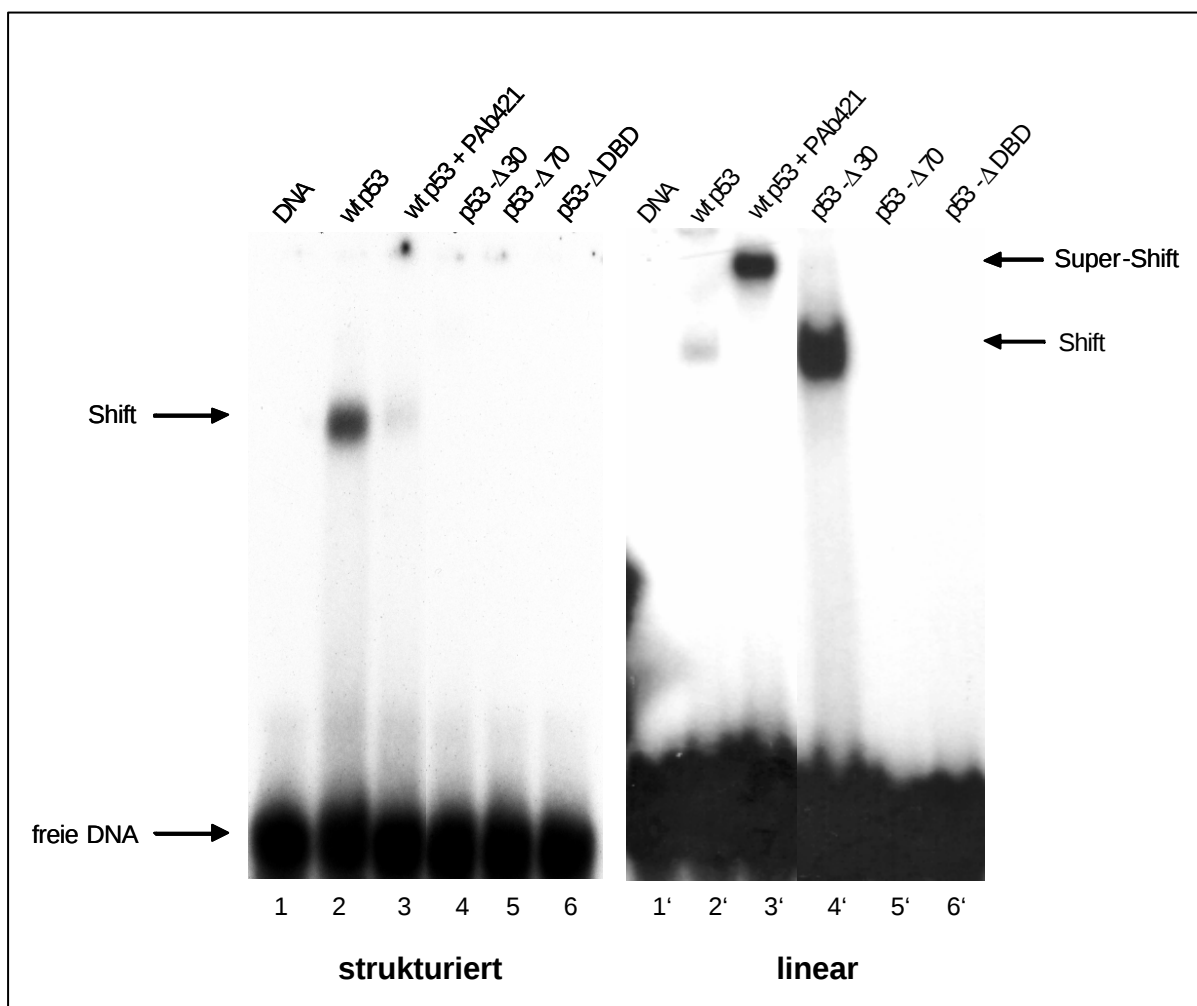


Abb. 14: Rolle des C-Terminus von wt p53 bei der Interaktion mit linearer und strukturierter DNA. Substrate mit der p53-spezifischen Bindungsstelle des p21-Promotors in strukturierter (p21-dec1 +2, Bahn 1-6) und linearer Form (p21 lin/s + as, Bahn 1'-6') wurden mit verschiedenen p53-Deletionsmutanten (50 ng) inkubiert. Aminosäuren 360-393 (regulatorische C-terminale Domäne) und 110-280 (DNA-Bindungsdomäne) sind im p53- Δ 30 und p53- Δ DBD Protein deletiert. Der Deletionsmutante p53- Δ 70 fehlt die regulatorische C-terminale Region und die Oligomerisierungsdomäne (Aminosäuren 320-393). In Bahn 1 und 1' wurde kein Protein zur Bindungsreaktion zugegeben. In Bahn 3 und 3' wurde wt p53 vor der Bindungsreaktion mit PAb421 inkubiert.

Um den Einfluss der DNA-Bindungsdomäne von p53 zu bestimmen wurde ein Protein untersucht dem diese Domäne fehlt (p53- Δ DBD).

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass dieses Protein ebenso wie monomeres p53 nicht in der Lage ist an lineare bzw. strukturierte DNA zu binden (Abb. 14, Bahn 6 und 6'). In Abwesenheit der DBD ist die Bindung des C-Terminus von wt p53 an ungepaarte Basen der strukturierten Substrate somit nicht ausreichend um stabile Protein-DNA-Komplexe zu bilden.

4.7 Analyse von p53-DNA-Komplexen durch Elektronenmikroskopie

Von mehreren Arbeitsgruppen wurde berichtet, dass die Anwendung verschiedener Methoden bei der Analyse von p53-DNA-Interaktionen zu widersprüchlichen Ergebnissen führen kann. Dies wurde beispielsweise bei Untersuchungen mittels EMSA- bzw. DNase I Protektionassay beschrieben (Kim *et al.*, 1999; Cain *et al.*, 2000; Espinosa und Emerson, 2001). Zusätzlich kann die Größe der verwendeten DNA-Substrate die Wechselwirkung von p53 mit spezifischen Bindungsstellen beeinflussen (Espinosa und Emerson, 2001).

Durch den Einsatz von elektronenmikroskopischen Untersuchungen können p53-DNA-Interaktionen mit unterschiedlich großen DNA-Substraten untersucht werden. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die erzielten EMSA-Ergebnisse auf die geringe Größe der untersuchten Substrate zurückzuführen sind. Als lineares Substrat diente eine p53-spezifische Bindungsstelle, die in einem 474 Bp-Fragment eingebettet ist (Cherny *et al.*, 1999). Als strukturierte DNA wurde ein Substrat mit einem verlängerten Stamm, im Vergleich zu den EMSA-Substraten, verwendet. Die Herstellung dieses Substrates ist in Abb. 15 schematisch dargestellt.

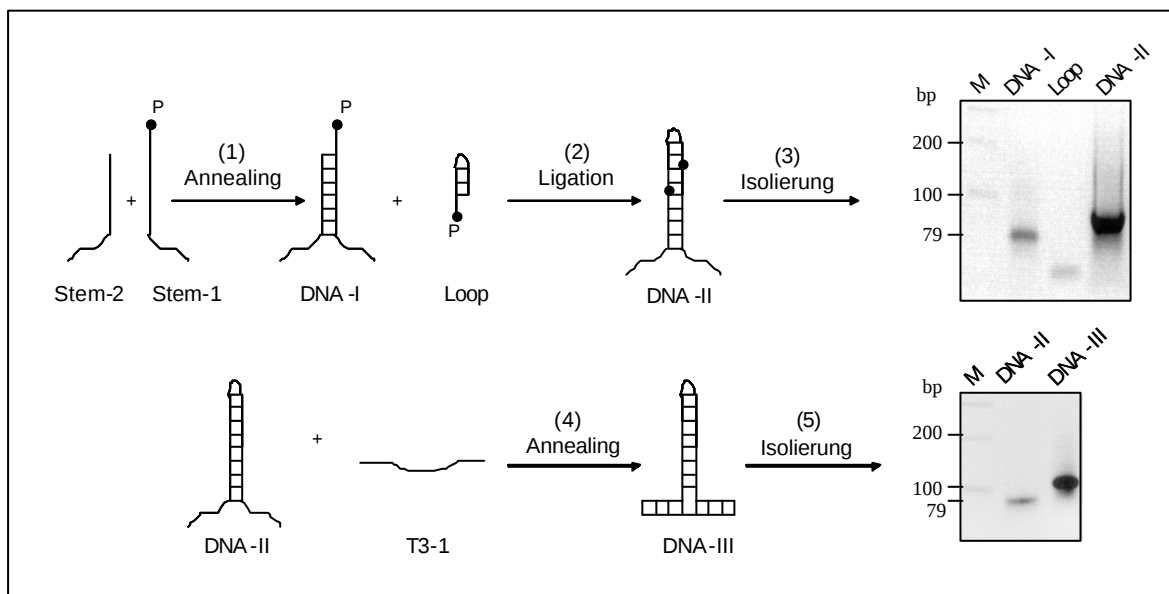


Abb. 15: Herstellung eines strukturierten Substrates für elektronenmikroskopische Untersuchungen. Für eine detaillierte Beschreibung der Darstellung siehe „Materialien und Methoden“. 5'-phosphorylierte Oligonukleotide sind mit *P* markiert. Die nach Schritt 5 isolierte DNA III wurde in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt.

In den Bindungsexperimenten wurden wt p53 und verschiedene Deletionsmutanten untersucht.

Im Verlauf der Untersuchungen konnten frühere Beobachtungen bestätigt werden (Cherny *et al.*, 1999), in denen eine Komplexbildung zwischen der isolierten p53-

Bindungsdomäne (Aminosäuren 94-312) und der spezifischen Bindungsstelle innerhalb des linearen 474 Bp-Fragmentes beschrieben wurde (Abb. 16, Abb. a-c).

In Übereinstimmung mit den EMSA-Ergebnissen ließ sich auch eine Komplexbildung bei Verwendung des C-terminal verkürzten p53- Δ 30 Proteins beobachten (Abb. 16, Abb. d-f).

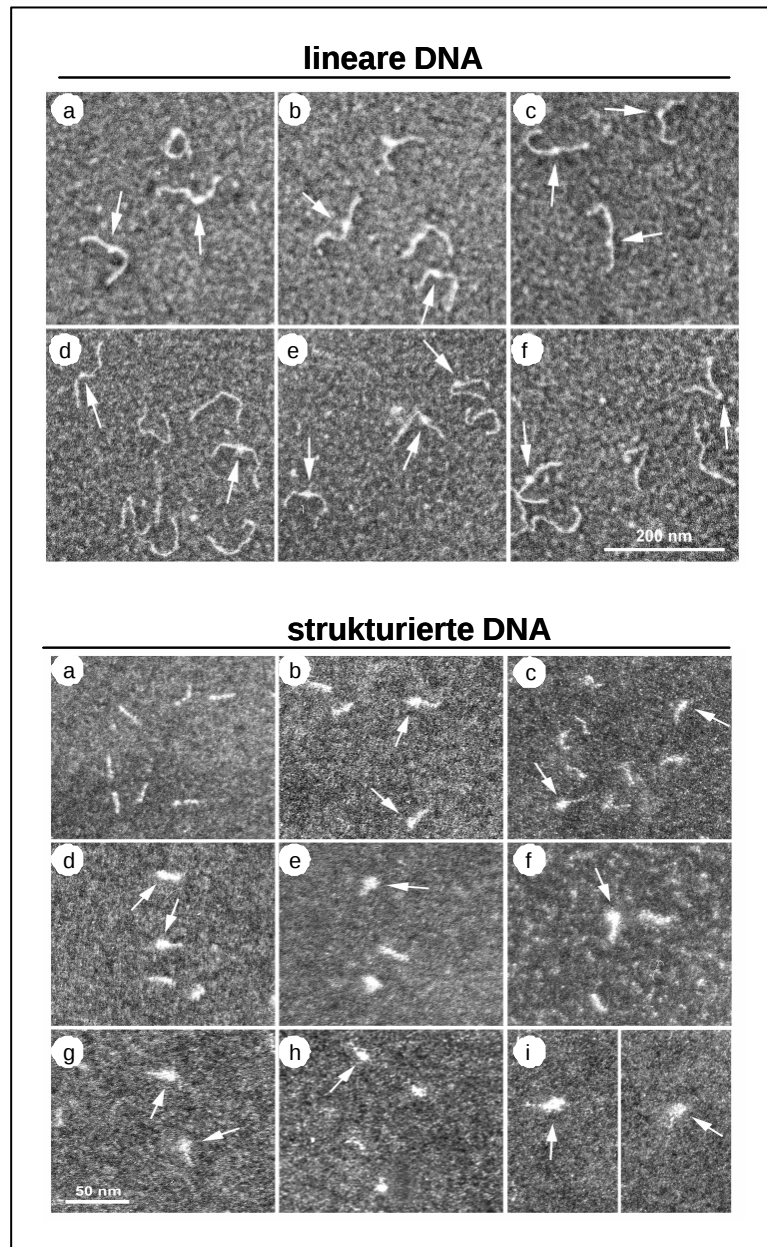


Abb. 16: Analyse der p53-DNA-Interaktion durch Elektronenmikroskopie. Im oberen Teil der Abbildung sind p53-DNA-Komplexe mit einem linearen 474 Bp-Fragment dargestellt. Es werden Komplexe mit der isolierten DNA-Bindungsdomäne (a-c) und von p53- Δ 30 (d-f) gezeigt. Das molare Verhältnis Protein:DNA beträgt ~ 4 für p53- Δ DBD und ~ 3.5 für p53- Δ 30. Gebundene Proteine sind mit Pfeilen markiert. Im unteren Teil der Abbildung sind Komplexe mit DNA III dargestellt. Es werden Komplexe mit der isolierten DNA-Bindungsdomäne (b-f) und wt p53 gezeigt (g-i). Das molare Verhältnis Protein:DNA beträgt ~ 0.5 - 1.0 für p53- Δ DBD und ~ 2.5 für wt p53. Gebundene Proteine sind mit Pfeilen markiert. Im unteren Teil der Abbildung (a) ist DNA III dargestellt.

Bei der Untersuchung des strukturierten DNA-Substrates kam es zur Komplexbildung mit der isolierten p53-Bindungsdomäne sowie mit wt p53 (Abb. 16, Abb. d-f bzw. Abb. g-i). Die Komplexbildung wurde dabei nur an einer Seite des DNA-Substrates beobachtet. Es wurde kein DNA-Substrat von zwei oder mehr Proteinen gleichzeitig gebunden. Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung spezifisch an der Stelle im DNA-Substrat erfolgt, in der die p53-spezifische Bindungsstelle lokalisiert ist. Diese Aussage wurde zusätzlich durch die Beobachtung unterstützt, dass weder die isolierte p53-Bindungsdomäne noch p53- Δ 30 an DNA-Enden binden (Abb. 16, Abb. a-c bzw. Abb. d-f).

Des Weiteren konnten mit den durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Ergebnisse der EMSA-Experimente in denen das p53- Δ 30 Protein verwendet wurde bestätigt werden. Es konnte keine Komplexbildung mit dem strukturierten DNA-Substrat beobachtet werden. Im Zusammenhang mit diesem Ergebnis ist die beobachtete Bindung der isolierten p53-Bindungsdomäne an das strukturierte Substrat überraschend, da aufgrund der fehlenden C-terminalen Region keine Bindung der isolierten Bindungsdomäne zu erwarten wäre. Die Komplexbildung ist jedoch auf das gleichzeitige Fehlen des N-Terminus zurückzuführen. Auf diesen Zusammenhang wird in der Diskussion näher eingegangen.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Bindungsdomäne von p53 für eine stabile Bindung an die verwendeten strukturierten Substraten notwendig ist. Eine Deletion des C-Terminus führt zu einer verstärkten Bindung an lineare DNA, inhibiert jedoch die Bindung an strukturierte Substrate. Beide Domänen sind demnach für eine strukturabhängige Wechselwirkung von wt p53 mit der DNA notwendig.

4.8 Mutiertes p53 zeigt höhere Affinität zu strukturierter als zu linearer DNA

In den durchgeführten EMSA-Experimenten konnte gezeigt werden, dass wt p53 sequenz- und strukturspezifisch an nicht-lineare DNA binden kann. Im Gegensatz zu linearer DNA erfolgt die Bindung ohne zusätzliche Aktivierung des Proteins über Modifikationen des C-Terminus. Da schon in früheren Untersuchungen berichtet wurde, dass mutiertes p53 an DNA-Sequenzen binden kann, die in der Lage sind Sekundärstrukturen auszubilden, stellte sich die Frage, ob mutiertes p53 ähnlich wie wt p53 strukturspezifische DNA-Bindungseigenschaften aufweist.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene p53-Proteine untersucht, die in der DNA-Bindungsdomäne Punktmutationen tragen. Sie gehören zu den so genannten "hot-spot" Mutationen also zu denjenigen Mutationen, die im p53-Molekül am häufigsten auftreten. Die untersuchten Proteine tragen Punktmutationen an Aminosäureposition 248 (Arg→Pro; 248P), 245 (Gly→Ser; 245S) und an Position 273 (Arg→His; 273H). Wie in Abb. 17 zu sehen ist, können diese Proteine aufgrund der Veränderung in der Aminosäuresequenz nicht mehr sequenzspezifisch an lineare DNA binden. Im Gegensatz zu wt p53 ist selbst in Gegenwart des aktivierenden Antikörpers PAb421 keine Bindung der mutierten Proteine an das lineare Substrat erkennbar (Abb. 17, Bahn 2-9).

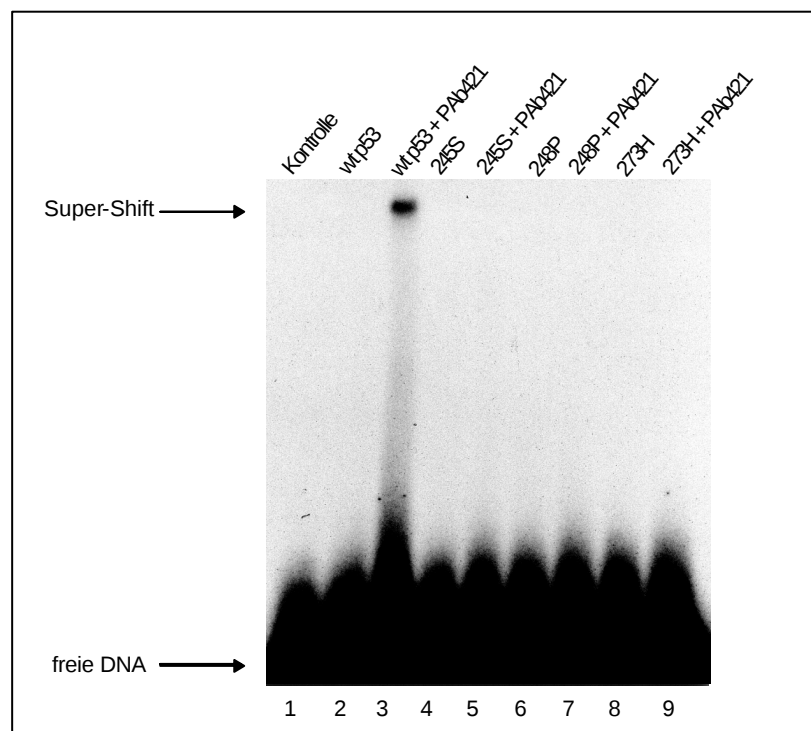


Abb. 17: Bindung von mutiertem p53 an spezifische lineare DNA. Lineare DNA (p21 lin/s + as) mit der p53-spezifischen Bindungsstelle des p21-Promotors, wurde mit wt p53 (Bahn 2) und mutiertem p53 (Bahn 4, 6 und 8) inkubiert. Die Zugabe von PAb421 ist angegeben (Bahn 3, 5, 7 und 9). P53-DNA-Komplexe und freie DNA sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Um zu überprüfen, ob mutierte p53-Proteine generell die Fähigkeit verloren haben, mit linearer DNA zu komplexieren wurden in Titrationsexperimenten verschiedene Mengen von mutiertem p53 mit einem unspezifischen linearen DNA-Substrat inkubiert (Abb. 18).

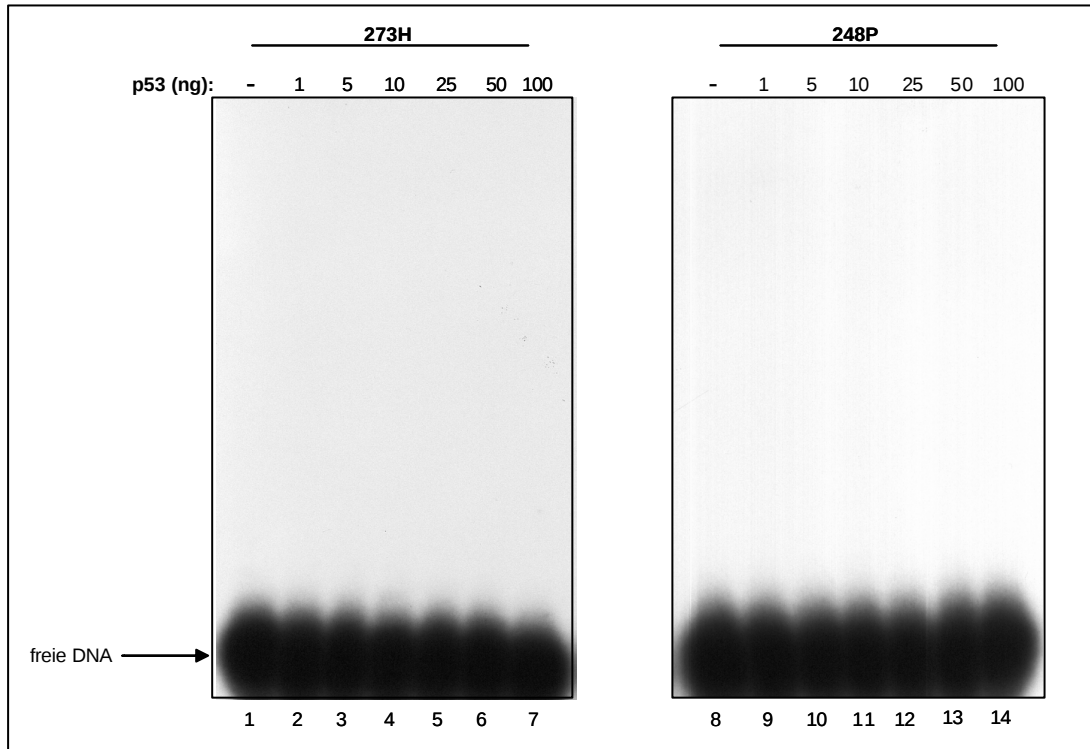


Abb. 18: Bindung von mutiertem p53 an unspezifische lineare DNA. Lineare DNA (T3-1/T3-2) wurde mit steigenden Mengen an 273H (Bahn 27) und 248P (Bahn 914) inkubiert. Verwendete Proteinmengen sind angegeben. Freie DNA ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Es zeigte sich, dass die untersuchten Proteine (248P und 273H) nicht an unspezifische lineare DNA binden können. Selbst bei hohen Konzentrationen (Abb. 18, Bahn 2-7 bzw. Bahn 9-14) war keine Komplexbildung zu beobachten.

Zur Klärung der Frage, ob mutiertes p53 in der Lage ist strukturspezifisch an DNA zu binden wurden weitere EMSA-Experimente durchgeführt. Wurde statt des linearen ein unspezifisches strukturiertes Substrat (SCR-loop A) verwendet, so zeigte sich für die untersuchten Proteine ein verändertes Bindungsverhalten. In Titrationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass mit strukturiertem Substrat keine Komplexbildung mit 273H zu beobachten ist (Abb. 19, Bahn 1-7). Im Gegensatz dazu ließen sich Protein-DNA-Komplexe mit 248P nachweisen (Abb. 19, Bahn 1'-7'). Schon bei einer Menge von 25 ng des Proteins konnte in dem durchgeführten Experiment eine Komplexbildung beobachtet werden (Abb. 19, Bahn 5').

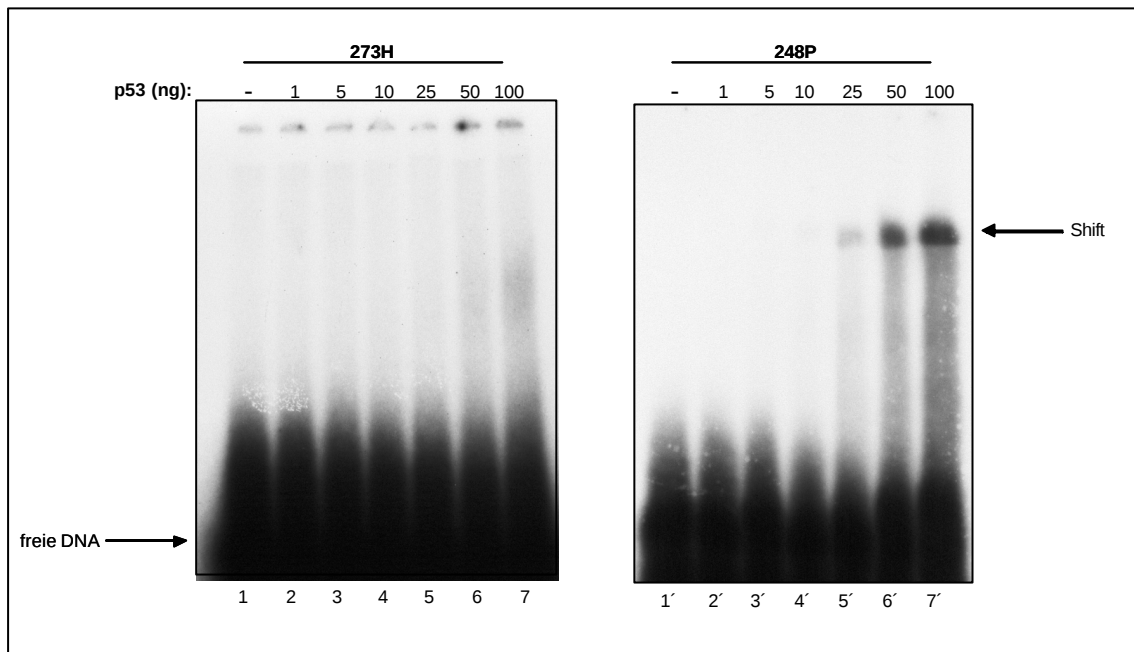


Abb. 19: Bindung von mutiertem p53 an unspezifische strukturierte DNA. Strukturierte DNA ohne p53-spezifische Bindungsstelle (SCR-loop A), wurde mit steigenden Mengen 273H (Bahn 2-7) und 248P (Bahn 2'-7') inkubiert. Eingesetzte Proteinmengen sind angegeben. P53-DNA-Komplexe und freie DNA sind mit Pfeilen markiert.

Die Fähigkeit von mutiertem p53 an strukturierte DNA zu binden, ist nicht nur auf 248P beschränkt, denn auch p53 mit einer Punktmutation an Position 245 (245S) zeigte deutliche Komplexbildung mit diesen Substraten (Abb. 20).

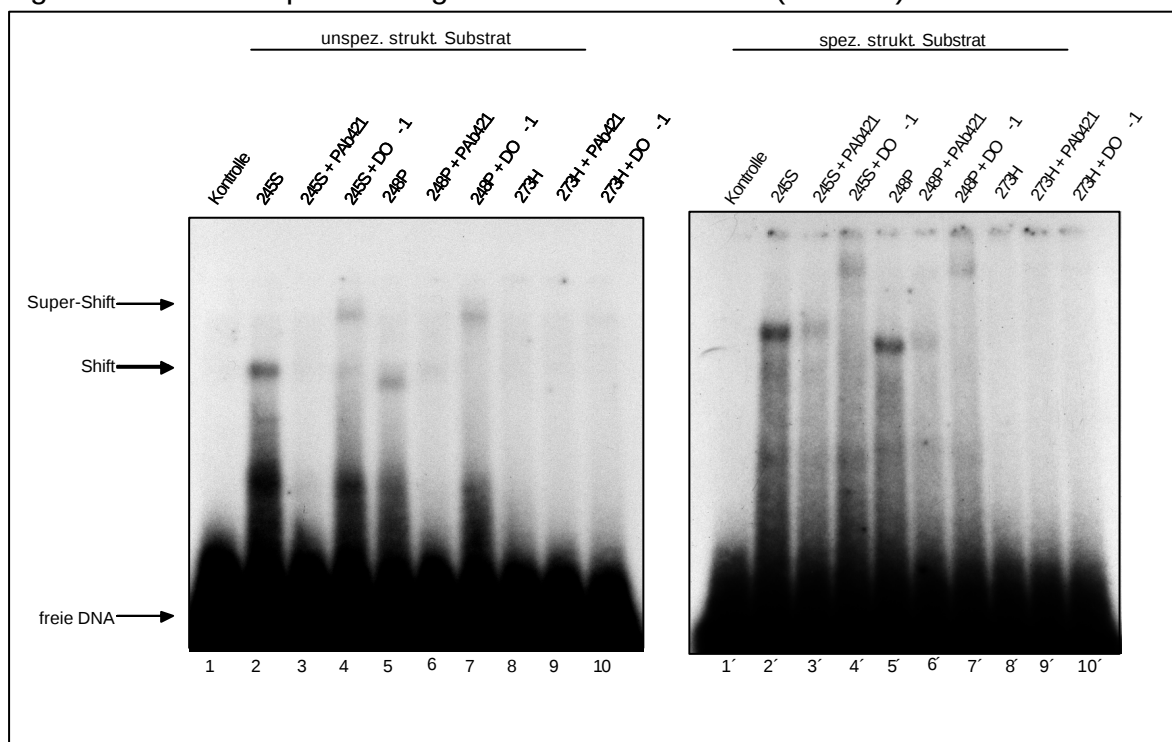


Abb. 20: Einfluss der Antikörper PAb421 und DO-1 auf die Bindung von mutiertem p53 an strukturierte DNA. Strukturierte DNA ohne p53-spezifische Bindungsstelle (SCR-loop A, Bahn 1-10) und mit der Bindungsstelle des p21-Promotors (p21-dec1 + 2, Bahn 1'-10'), wurde mit 50 ng 245S (Bahn 2-4, 2'-4'), 248P (Bahn 5-7, 5'-7') und 273H (Bahn 8-10, 8'-10') inkubiert. Die Zugabe der Antikörper ist angegeben. P53-DNA-Komplexe und freie DNA sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die untersuchten Proteine (245S und 248P) binden sowohl an spezifische strukturierte Substrate als auch an unspezifische Substrate, die keine p53-Bindungsstelle enthalten (Abb. 20, Bahn 2 und 5 bzw. 2' und 5').

Wie bei wt p53 zu beobachten war, scheint der C-Terminus für die Bindung an strukturierte Substrate eine zentrale Rolle zu spielen. Wurden die Proteine mit dem C-terminalen Antikörper PAb421 modifiziert, so führt dies zu einer deutlichen Inhibierung der Bindung (Abb. 20, Bahn 3 und 6 bzw. 3' und 6'). Dieses Phänomen wurde schon bei den Untersuchungen von wt p53 festgestellt.

Die Bindung des N-terminal spezifischen Antikörpers DO-1 führte, ebenso wie bei wt p53, nicht zu einer Inhibierung sondern zu einem Super-Shift (Abb. 20, Bahn 4 und 7 bzw. 4' und 7').

Die EMSA-Experimente zeigen, dass p53 mit Punktmutationen in der DNA-Bindungsdomäne in der Lage ist an strukturierte DNA zu binden wogegen die untersuchten Proteine keine signifikante Affinität gegenüber spezifischer und unspezifischer linearer DNA zeigen. Diese Eigenschaft scheint bei verschiedenen p53 Mutationen unterschiedlich ausgeprägt zu sein, da 273H weder mit linearer noch mit strukturierter DNA zur Komplexbildung neigt.

Die Untersuchungen mit wt p53 haben gezeigt, dass dieses Protein sequenz- und strukturspezifisch an *non-B*-DNA binden kann. Für die hohe Spezifität dieser Bindung spielen die Kerndomäne und der C-Terminus eine wichtige Rolle. Da mutiertes p53 aufgrund des Aminosäureaustausches in der Kerndomäne die Fähigkeit zur sequenzspezifischen Bindung verloren hat sind die in den EMSA-Experimenten beobachteten Bindungseigenschaften ausschließlich strukturspezifisch. Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass verschiedene strukturierte Substrate in unterschiedlichem Maße von mutiertem p53 gebunden werden. Wurden zwei verschiedene unspezifische strukturierte Substrate (SCR-loop und SCR-loop A) mit steigenden Mengen an 248P inkubiert zeigte sich, dass nur SCR-loop A von dem Protein gebunden wird (Abb. 21, Bahn 1-5 bzw. 1'-5'). Da sich die beiden Substrate nur in den fehlgepaarten Basen im Bereich des Stamms voneinander unterscheiden, scheint ein Austausch dieser Basen zu unterschiedlichen Strukturen zu führen, die die Bindung von mutiertem p53 negativ bzw. positiv beeinflussen können.

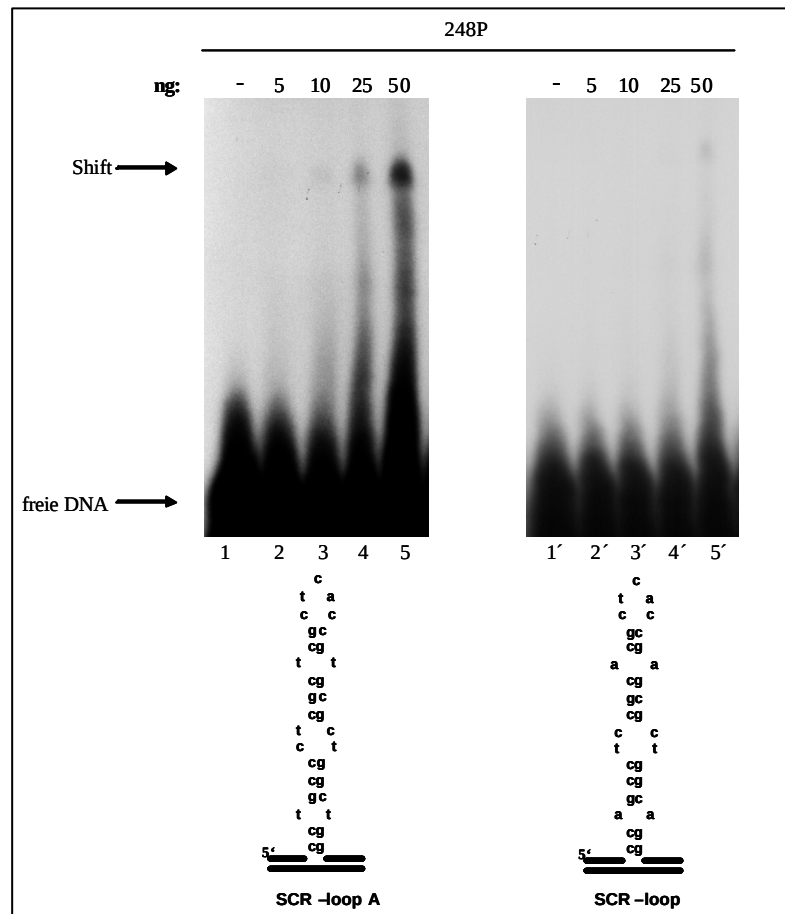
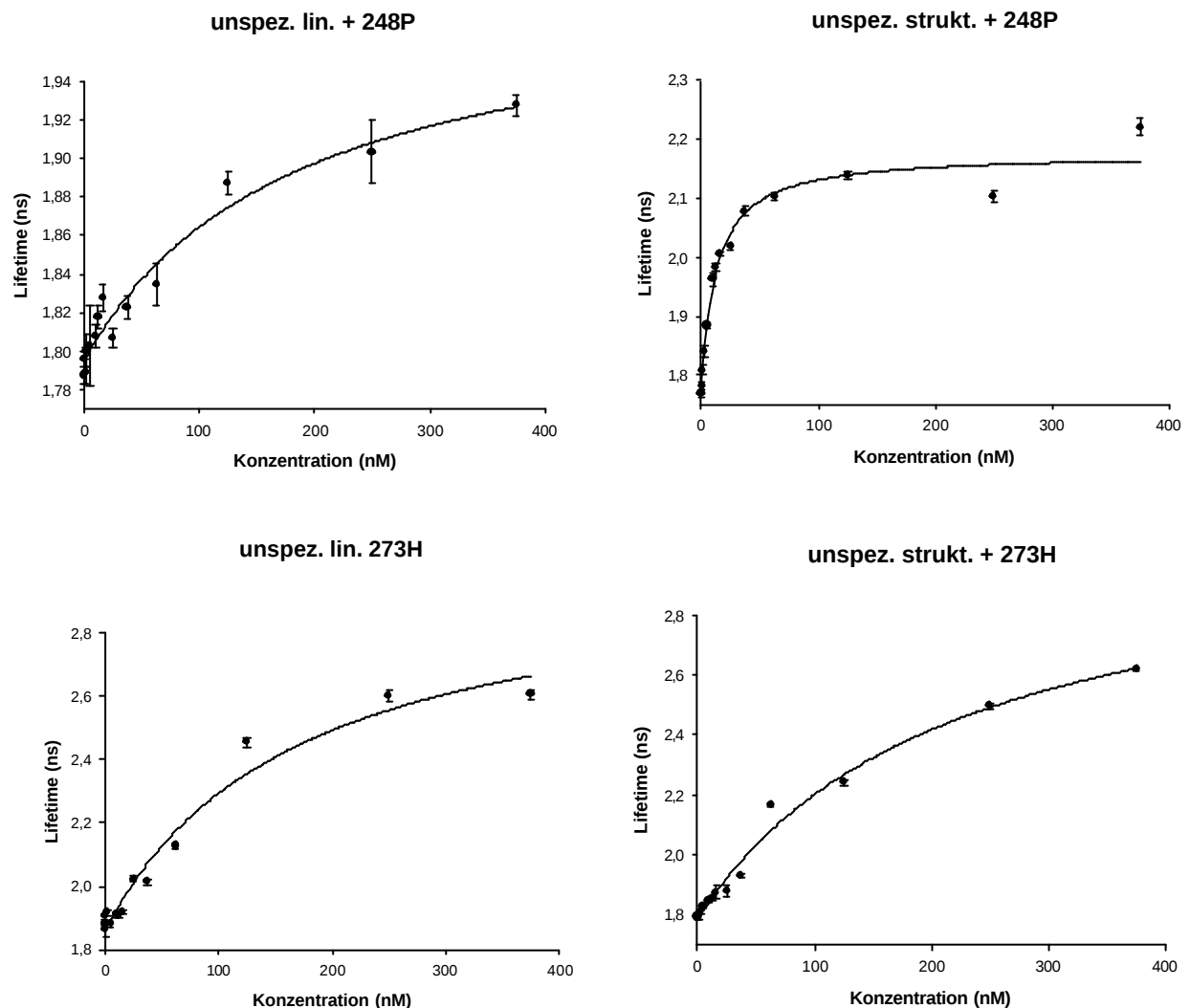


Abb. 21: Bindung von mutiertem p53 an verschiedene unspezifische strukturierte Substrate. Strukturierte Substrate ohne p53-Bindungsstelle (SCR-loop A, Bahn 1-5; SCR-loop, Bahn 1'-5') wurden mit steigenden Mengen an 248P inkubiert. Verwendete Proteinmengen sind angegeben. Freie DNA und Protein-DNA-Komplexe sind gekennzeichnet. Die Strukturen der Substrate sind unter dem Gel dargestellt.

4.9 Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch Fluorescence intensity distribution analysis (FIDA)

FIDA wurde erst kürzlich als Ergänzung zur Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) entwickelt (Kask *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999). Beide Techniken zählen zu den Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie-Methoden, die es ermöglichen Interaktionen zwischen Molekülen in Lösung zu untersuchen, wie beispielsweise Protein-DNA-Bindungen. Das Detektionsvolumen ist in beiden Methoden mikroskopisch klein (ca. 1 Femtoliter). Bei geeigneter Verdünnung (üblicherweise ca. 1 nM Farbstoff) diffundieren nur wenige Moleküle durch das Messvolumen, was die Anwendung von Fluktuationmethoden ermöglicht. Die FCS beruht auf der Messung von Fluktuationen in Abhängigkeit von der Zeit (Madge *et al.*, 1972; Rigler *et al.*, 1993), wogegen in FIDA-Messungen Fluktuationen der Amplitude, d.h. die molekulare Helligkeit von fluoreszenz-markierten Molekülen, untersucht werden (Kask *et al.*, 1999). Auswerteparameter bei FCS sind Diffusionszeit und Konzentration, bei FIDA molekulare Helligkeit und Konzentration. Des Weiteren können im konfokalen Volumen auch andere Fluoreszenzparameter wie beispielsweise die Fluoreszenzlebensdauer oder die Fluoreszenzpolarisation gemessen werden (Turconi *et al.*, 2001, Jäger *et al.*, submitted). Die Fluoreszenzlebensdauer wurde schon in verschiedenen anderen Anwendungen zur Untersuchung von Molekülen eingesetzt (Lakowicz, 1983) und eignet sich ebenfalls als Parameter zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen. Die Fluoreszenzlebensdauer eines Fluorophors ist von seiner chemischen Umgebung abhängig, was die Durchführung von DNA-Protein-Bindungsstudien ermöglicht wenn einer der Interaktionspartner mit einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde. Die Fluoreszenzlebensdauer des freien Substrats unterscheidet sich von der Fluoreszenzlebensdauer im gebundenen Zustand. In Titrationsexperimenten können somit Bindungskurven erstellt und Dissoziationskonstanten von Protein-DNA-Komplexen bestimmt werden. Die in den EMSA-Experimenten beobachteten unterschiedlichen Bindungseigenschaften der untersuchten Proteine konnten mit dieser Methode bestätigt werden. In Abb. 22 sind repräsentative Bindungskurven mit den errechneten Dissoziationskonstanten der Protein-DNA-Komplexe dargestellt.



K_d (nM)	SCR-loop A	unspez.linear
248P	$12,56 \pm 2,39$	$182,01 \pm 64,96$
245S	$34,11 \pm 6,09$	$360,14 \pm 159,10$
273H	$219,15 \pm 48,45$	$168,36 \pm 50,42$

Abb. 22: Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_d) von p53-DNA-Komplexen. Gezeigt sind repräsentative Bindungskurven für verschiedene p53 Mutationen mit strukturierten und linearen DNA-Substraten (SCR-loop A bzw. T3-1/T3-2). Die ermittelten Dissoziationskonstanten der untersuchten p53-DNA-Komplexe sind in der Tabelle aufgeführt.

Die Daten zeigen, dass die untersuchten Proteine 248P und 245S eine höhere Affinität gegenüber strukturierter DNA aufweisen. Bei der Verwendung von strukturiertem Substrat lag die Bindungsaffinität gegenüber dem linearen Substrat um ein 10-15faches höher.

In Übereinstimmung mit den EMSA-Ergebnissen konnte auch mit dieser Methode keine signifikante Bindung für 273H für strukturierte bzw. lineare DNA nachgewiesen werden.

4.10 Bindung an strukturierte DNA ist eine generelle Eigenschaft von mutiertem p53

In den EMSA-Experimenten und FIDA-Messungen konnte gezeigt werden, dass mutiertes p53 eine höhere Affinität zu strukturierter als zu linearer DNA aufweist. Um zu prüfen, ob diese Eigenschaft ein generelles Phänomen dieser Proteine darstellt war es notwendig eine größere Zahl von Proteinen auf ihr Bindungsverhalten zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Bindungsstudien mit einem p53-Protein-Array durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Membran auf der verschiedene p53-Proteine immobilisiert sind. Dazu gehören wt p53, 46 Punktmutationen bzw. Deletionsmutanten, p53 mit Mutationen im Bereich der MDM2-Bindungsstelle (W23A und W23G) sowie p53 mit einer Mutation an Position 392 (S392A), einer Phosphorylierungsstelle der Kasein Kinase II (Abb. 23).

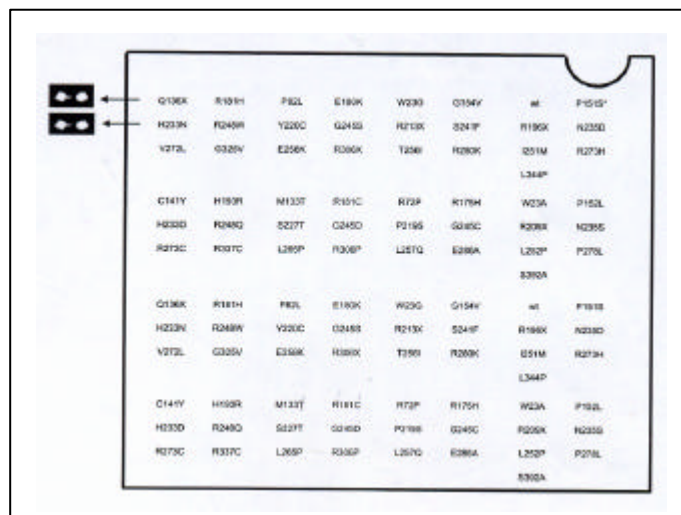


Abb. 23: Schematische Darstellung des p53-Protein-Arrays. In der Abbildung sind die immobilisierten p53-Proteine abgebildet. Die Proteine sind paarweise an die Membran gebunden (siehe oben links).

Mit dieser Membran können somit eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht werden und direkt mit wt p53 verglichen werden.

Nach Herstellerangaben sind auf jedem Proteinspot 200 pg spezifisches Protein immobilisiert. Um dies zu überprüfen, wurde ein Western-Blot-Experiment mit dem C-terminal spezifischen Antikörper PAb421 durchgeführt. In diesem Experiment konnte eine einheitliche Verteilung der Proteine bestätigt werden.

In den durchgeführten Experimenten wurden die Membranen mit strukturierten und linearen, radioaktiv markierten DNA-Substraten inkubiert und die gebundene DNA durch Autoradiographie detektiert.

Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Unterschied bei der Verwendung von linearer und strukturierter DNA (Abb. 24, **A-C**).

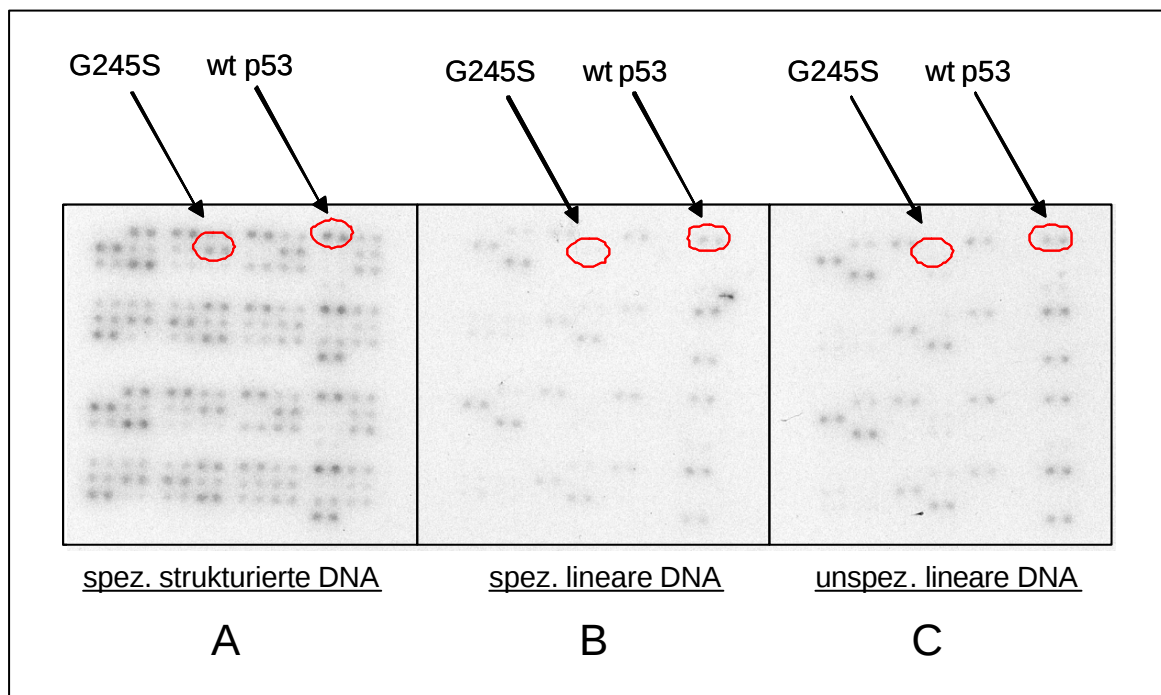


Abb. 24: Bindung von strukturierten und linearen Substraten an ein p53-Protein-Array. P53-Membranen wurden mit einem spezifischen strukturiertem Substrat (p21-dec1 + 2, **A**), spezifischen linearen Substrat (p21 lin/s + as, **B**) und unspezifischen linearen Substrat (T3-1/T3-2, **C**) inkubiert. Die Signale für wt p53 und G245S sind mit Kreisen markiert.

Wurde die Membran mit einem strukturierten Substrat inkubiert so waren deutlich Bindungssignale für den Großteil der immobilisierten Proteine erkennbar (Abb. 24, **A**), wogegen mit den linearen DNA Substraten (Abb. 24, **B** und **C**) deutlich weniger Signale zu erkennen waren. Bei Verwendung des strukturierten Substrates konnten Bindungssignale für alle immobilisierten „hot-spot“ Mutationen detektiert werden. Das mit diesem Assay, im Gegensatz zu den EMSA-Experimenten, auch Bindungssignale für 273H detektiert werden konnten, lässt sich mit einer erhöhten Sensitivität

des Assays erklären. Die Versuchsbedingungen sind denen eines South-Western-Blots sehr ähnlich. Diese Methode zeichnet sich im Vergleich mit EMSA durch eine erhöhte Sensitivität aus, wodurch auch Proteine mit einer schwachen Bindungsaffinität detektiert werden können.

Bindungssignale für die immobilisierten „hot-spot“ Mutationen waren mit den linearen Substraten nicht erkennen. Für diese Substrate waren Bindungssignale für wt p53 und für Proteine mit Mutationen im Bereich der MDM2-Bindungsstelle detektierbar (W23A und W23G). Auch für Proteine mit Punktmutationen in der Kerndomäne, die nicht zu den „hot-spot“ Mutationen zählen, ließen sich Signale detektieren (z.B. H233N und S227T). Es ist besonders zu erwähnen, dass die Signalmuster des spezifischen bzw. unspezifischen linearen Substrates identisch sind (Abb. 24, **B** und **C**). Dies lässt darauf schließen, dass die beobachtete Bindung für die linearen Substrate unspezifischer Natur ist. Eine Auswertung der Signale für wt p53 und die verschiedenen „hot-spot“ Mutationen durch Densiometrie zeigte deutlich, dass die strukturierte DNA im Vergleich zum spezifischen linearen Substrat stärker an wt p53 bindet (Abb. 25). Für die „hot-spot“ Mutationen ließen sich nur für das strukturierte Substrat Bindungssignale erkennen, die in ihrer Intensität voneinander abweichen. Auffällig ist, dass verschiedene Mutationen an einer Aminosäureposition zu einem unterschiedlichen Bindungsverhalten führen (vergl. 273H/273C und 248W/248Q, 245S/245D/245C, Abb. 24).

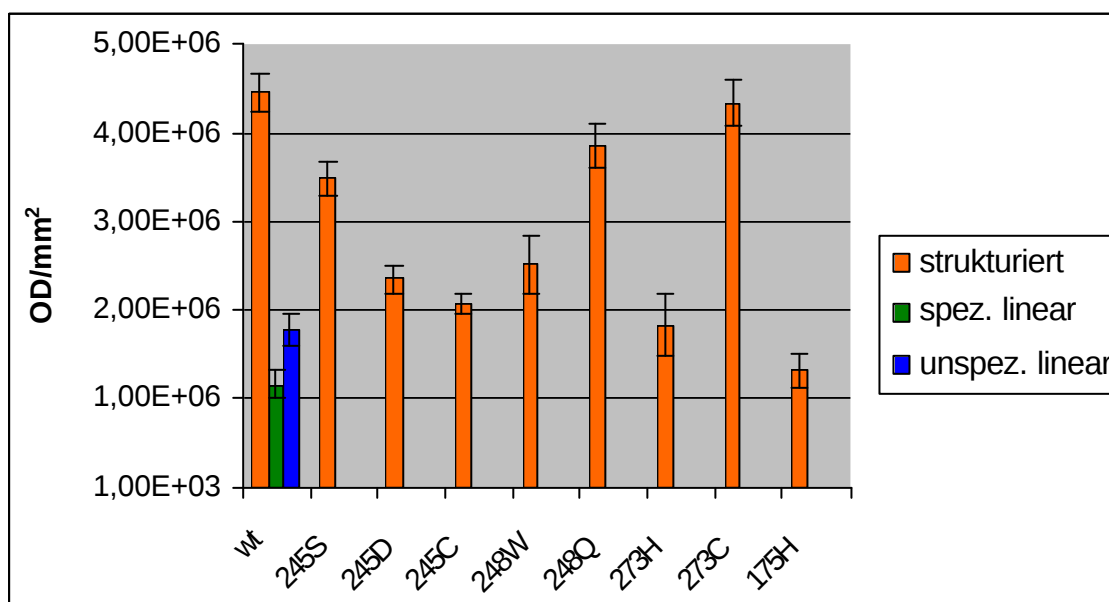


Abb. 25: Auswertung der Bindungsaffinitäten von mutiertem p53 durch Densiometrie. Ausgewertet wurden die Signale der immobilisierten „hot-spot“ Mutationen und für wt p53. Die Fehlerbalken sind angegeben.

Die Spezifität der strukturierten Bindung konnte in einem Konkurrenzexperiment nachgewiesen werden (Abb. 26, **A-C**). Dazu wurden Membranen, die mit dem spezifischen strukturierten bzw. linearen Substrat inkubiert wurden, nacheinander mit steigenden Mengen spezifischer linearer Kompetitor-DNA inkubiert (p21 lin/s + as). Als Kontrolle wurde eine Membran, die zuvor mit unspezifischer linearer DNA inkubiert wurde, in gleicher Weise jedoch ohne Zusatz von Kompetitor-DNA, behandelt (Abb. 26, **C**).

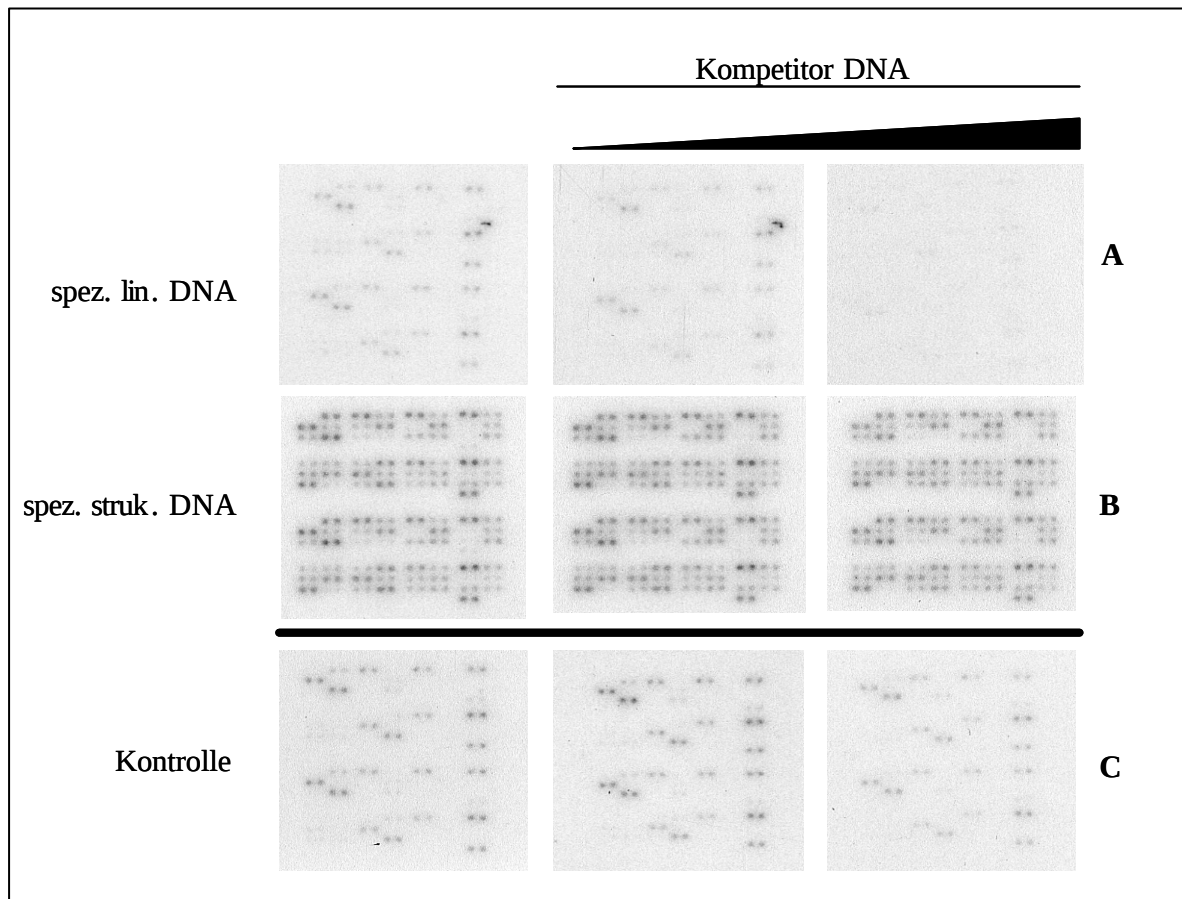


Abb. 26: Konkurrenzexperiment mit spezifischer linearer Kompetitor-DNA. P53-Membranen wurden nach der Bindungsreaktion mit spezifischer linearer und spezifischer strukturierter DNA (p21 lin/s + as, **A** bzw. p21-dec1 + 2, **B**) mit steigenden Mengen spezifischer linearer Kompetitor-DNA inkubiert (p21 lin/s + as). Das molare Verhältnis von markiertem Substrat:Kompetitor betrug 1:1 und 1:5. Als Kontrolle diente eine Membran, die nach der Bindungsreaktion mit unspezifischer linearer DNA (T3-1/T3-2, **C**) ohne Zusatz von Kompetitor-DNA inkubiert wurde.

Es zeigte sich, dass die Signalintensitäten für die spezifische lineare DNA mit steigenden Mengen Kompetitor-DNA stark abnehmen (Abb. 26, **A**). Die Signalintensitäten des spezifischen strukturierten Substrates blieben jedoch nahezu konstant (Abb. 26, **B**). Dies bestätigt die höhere Affinität der immobilisierten Proteine gegenüber strukturierter DNA. Die beobachtete Abnahme der Signalintensitäten ist nicht auf die aufeinander folgenden Inkubationsschritte der Membranen mit Puffer-

Lösung zurückzuführen, da sich in der Kontrollreaktion ohne Kompetitor-DNA keine signifikante Änderung der Signalintensitäten beobachten ließ (Abb. 26, **C**).

Auch in diesem Assay wurde der Einfluss des C-terminalen Antikörpers PAb421 untersucht. Dazu wurden zwei Membranen mit strukturierter DNA inkubiert von denen eine zuvor mit dem Antikörper behandelt wurde. Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Membran mit einem spezifischen linearen Substrat inkubiert und ebenfalls vor der Bindungsreaktion mit dem Antikörper behandelt (Abb. 27, **A-C**).

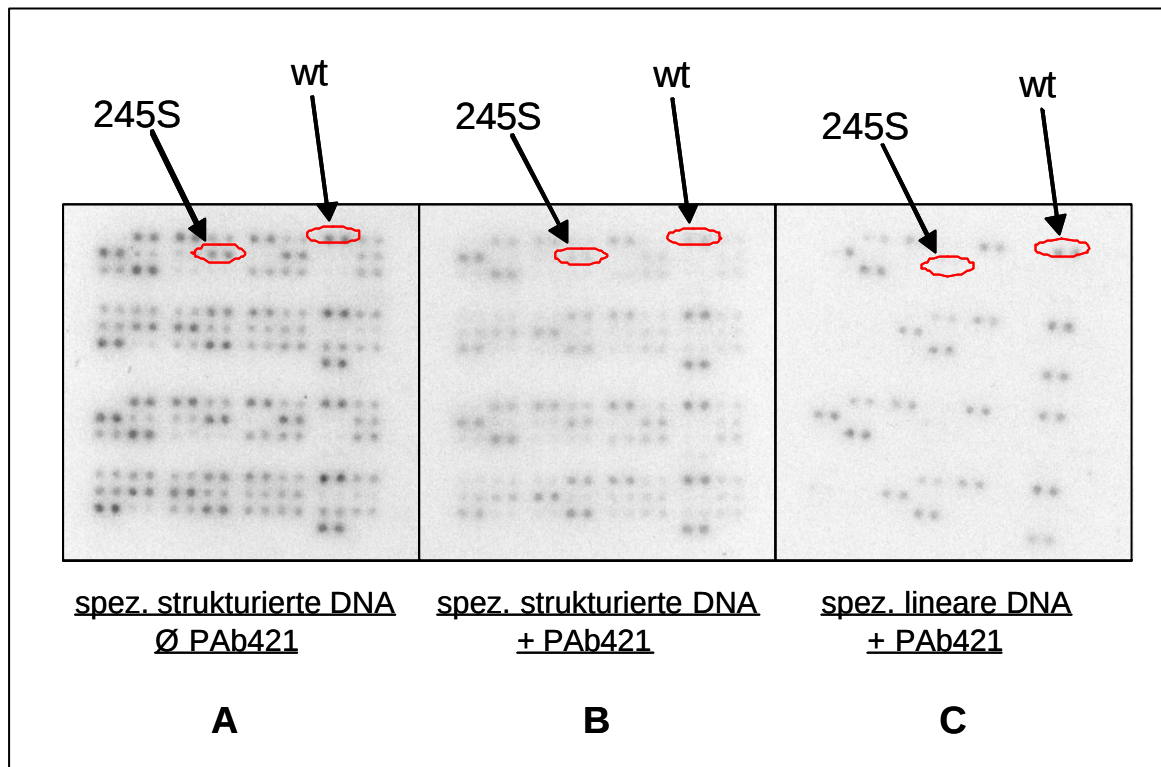


Abb. 27: Einfluss des C-terminal spezifischen Antikörpers PAb421 auf die Bindung an ein p53-Protein-Array. P53-Membranen wurden vor der Bindungsreaktion ohne (**A**) und mit PAb421 inkubiert (**B** und **C**). Anschließend erfolgte Inkubation mit einem spezifischen strukturierten Substrat (p21-dec1 + 2, **A** und **B**) und einem spezifischen linearen Substrat (p21 lin/s + as, **C**).

Die Auswertung der Signale zeigte deutlich, dass die Modifizierung der immobilisierten Proteine durch den Antikörper, die Bindungsaffinität von wt p53 und den „hot-spot“ Mutationen gegenüber der strukturierten DNA stark herabsetzt. Nur für 248W ließ sich eine geringe Inhibierung feststellen. Für spezifische lineare DNA ließ sich auch in diesem Fall nur eine Bindung von wt p53 beobachten. Die beobachtete Bindung ist auch durch eine Aktivierung durch den Antikörper schwächer als für die strukturierte DNA (Abb. 28).

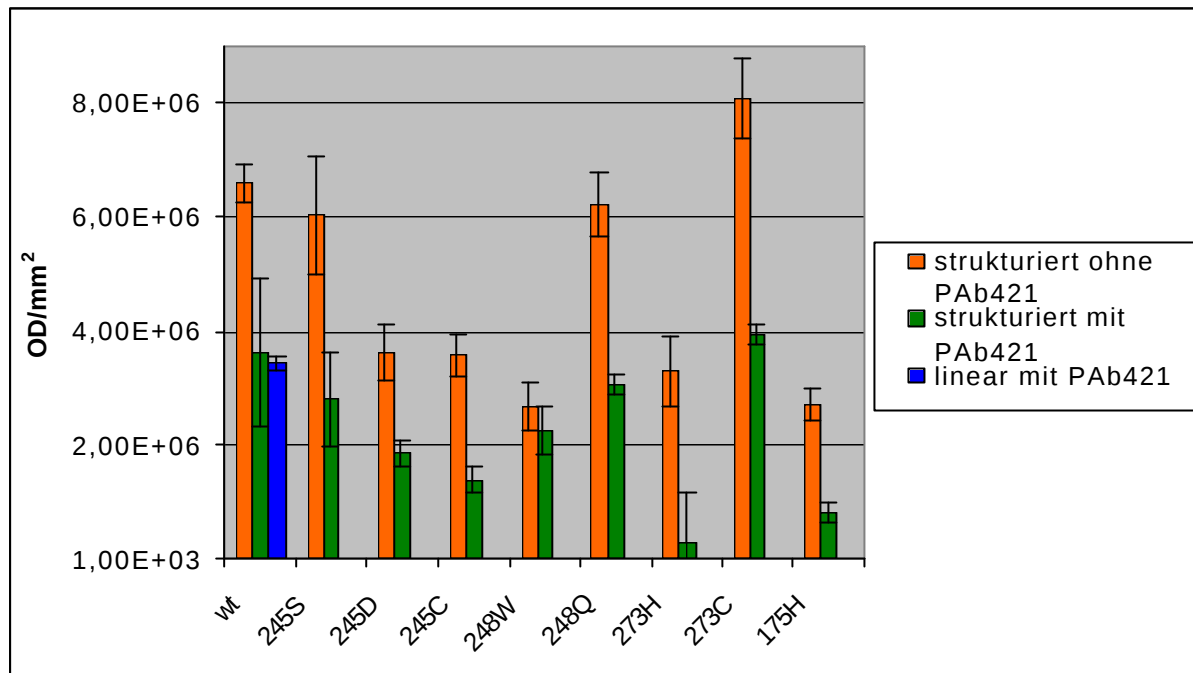


Abb. 28: Einfluss des C-terminal spezifischen Antikörpers PAb421 auf die Bindung an ein p53-Protein-Array, ausgewertet durch Densitometrie. Ausgewertet wurden die Signale der immobilisierten „hot-spot“ Mutationen und wt p53. Die Fehlerbalken sind angegeben.

Mit den durchgeführten Bindungsexperimenten konnten die Ergebnisse der EMSA- und FIDA-Experimente bestätigt werden. Die Bindung an strukturierte DNA scheint eine generelle Eigenschaft von mutiertem p53 zu sein, da für alle untersuchten „hot-spot“ Mutationen eine Bindung beobachtet werden konnte. Auch p53-Proteine mit Mutationen im Bereich der MDM2-Bindungsstelle (W23G und W23A) sowie mit Mutationen in der C-terminalen regulatorischen Domäne (S392A) zeigten deutliche Bindungssignale bei der Verwendung von strukturierter DNA. Die Bindungsaffinität variiert jedoch unter den verschiedenen Mutationsformen und auch die Art des Aminosäureaustausches an einer Position des Proteins scheint für die Bindung eine wichtige Rolle zu spielen. Lineare DNA wurde von p53-Mutanten („hot-spot“ Mutationen) nicht gebunden und die beobachtete Bindung von wt p53 war, mit und ohne Aktivierung durch den C-terminalen Antikörper, schwächer im Vergleich zur strukturierter DNA.

4.11 P53 im Komplex mit strukturierter DNA ist gegen eine MDM2-abhängige Ubiquitinierung geschützt

In den Experimenten mit mutiertem p53 konnte gezeigt werden, dass diese Proteine strukturspezifisch an DNA binden können wobei der C-Terminus dieser Proteine eine entscheidende Rolle für diese Bindung spielt.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die beobachteten DNA-Bindungseigenschaften einen Einfluss auf die Stabilität von mutiertem p53 haben. Diese Proteine zeichnen sich im Vergleich mit wt p53 durch eine erhöhte Halbwertszeit aus. Der allgemein akzeptierte Mechanismus für diese Stabilität liegt in dem Verlust der Transaktivierungsfunktion von mutiertem p53, wodurch MDM2 nicht induziert werden kann. MDM2 fungiert als Ubiquitin-Ligase und katalysiert die Bindung von Ubiquitin an Lysin-Reste im C-Terminus von p53. Die Ubiquitinierung von p53 stellt den ersten Schritt im proteasomalen Abbau durch das 26S Proteasom dar. Dies kann jedoch nicht erklären warum einige Tumorzellen einen hohen Spiegel an mutiertem p53, bei gleichzeitiger Expression von MDM2, aufweisen.

Aufgrund der schon früher beschriebenen Beobachtungen, dass mutiertes p53 im Zellkern akkumuliert und dort mit nuklearen Strukturen wie der Kernmatrix und dem Chromatin assoziiert ist, sollte untersucht werden, ob die strukturspezifischen DNA-Bindungseigenschaften von mutiertem p53 einen Einfluss auf die MDM2-abhängige Ubiquitinierung haben. Durch die Bindung an spezifische Strukturen innerhalb des Zellkerns könnte der C-Terminus von mutiertem p53 maskiert vorliegen und dadurch einer Ubiquitinierung durch MDM2 nicht länger zugänglich sein. Dies könnte einen Mechanismus darstellen, wie die intrazelluläre Stabilität von mutiertem p53 reguliert wird. Zu diesem Zweck wurde das EMSA-Assay mit einem *in vitro* Ubiquitin-Assay kombiniert um einen eventuellen Einfluss der DNA-Bindung auf die Ubiquitinierungseffizienz der Proteine zu untersuchen.

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass wt p53 im Komplex mit linearer DNA gegen einen proteasomalen Abbau geschützt ist (Molinari und Milner, 1995). Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob wt p53 im Komplex mit strukturierter DNA gegen eine MDM2-abhängige Ubiquitinierung am C-Terminus geschützt ist. In Abb. 29 ist zunächst der Ausgang eines *in vitro* Ubiquitin-Assays von wt p53 dargestellt. In Abwesenheit von Ubiquitin war wt p53 als einzelne Bande im Western-Blot zu erkennen (Abb. 29, Bahn 1). Wurde Ubiquitin zu der

Reaktionslösung gegeben, erkennt man höhermolekulare p53-Spezies, die jeweils ubiquitinierte Formen des Proteins repräsentieren (Abb. 29, Bahn 2).

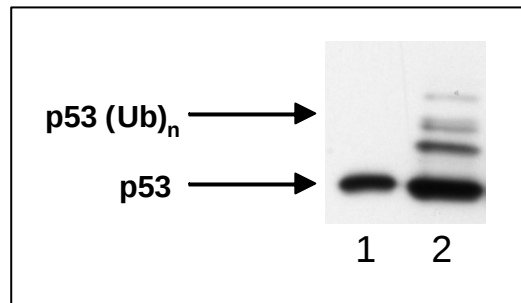


Abb. 29: *In vitro* Ubiquitin-Assay mit wt p53. Wt p53 wurde ohne (Bahn 1) und mit (Bahn 2) Ubiquitin behandelt. Beide Reaktionslösungen enthielten MDM2 und die zur Ubiquitinierung notwendigen Cofaktoren. Wt p53 und ubiquitinierte Formen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

In den Bindungs/Ubiquitin-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl wt p53 als auch mutiertes p53 im Komplex mit strukturierter DNA gegen eine Ubiquitinierung durch MDM2 geschützt sind. In Abb. 30 ist ein typisches Experiment für wt p53 dargestellt.



Abb. 30: Einfluss von strukturierter und linearer DNA auf die Ubiquitinierungseffizienz von wt p53. Wt p53 wurde mit steigenden Mengen (1 pmol, 10 pmol und 100 pmol) an strukturierter (p21-dec1 + 2, Bahn 3-5) und linearer DNA (p21 lin/s + as, Bahn 6-8) inkubiert. In Bahn 2 ist die *in vitro* Ubiquitinierung ohne DNA durchgeführt worden. Wt p53 ist in Bahn 1 dargestellt.

Bereits bei Verwendung von 10 pmol des strukturierten Substrates sind keine ubiquitinierten Formen von p53 detektierbar (Abb. 30, Bahn 3). Bei der Verwendung von linearer DNA ist erst bei einer Substratmenge von 100 pmol ein leichter Rückgang der ubiquitinierten Spezies erkennbar (Abb. 30, Bahn 8). Dieses Ergebnis korreliert mit den EMSA-Ergebnissen, in denen gezeigt werden konnte, dass wt p53 eine höhere Affinität zu strukturierter als zu linearer DNA aufweist.

Gleiches wurde auch für 248P festgestellt. Ist dieses Protein an strukturierte DNA gebunden, konnte ebenfalls ein deutlicher Rückgang der Ubiquitinierungseffizienz mit steigenden Mengen an DNA-Substrat festgestellt werden. Dies ist unabhängig davon, ob ein spezifisches oder unspezifisches Substrat verwendet wurde (Abb. 31,

A bzw. **B**, Bahn 3-6). Wurde dagegen lineare DNA als Substrat verwendet, hat dies keinen Einfluss auf die Ubiquitinierung des Proteins (Abb. 31, **A** und **B**, Bahn 7-10).

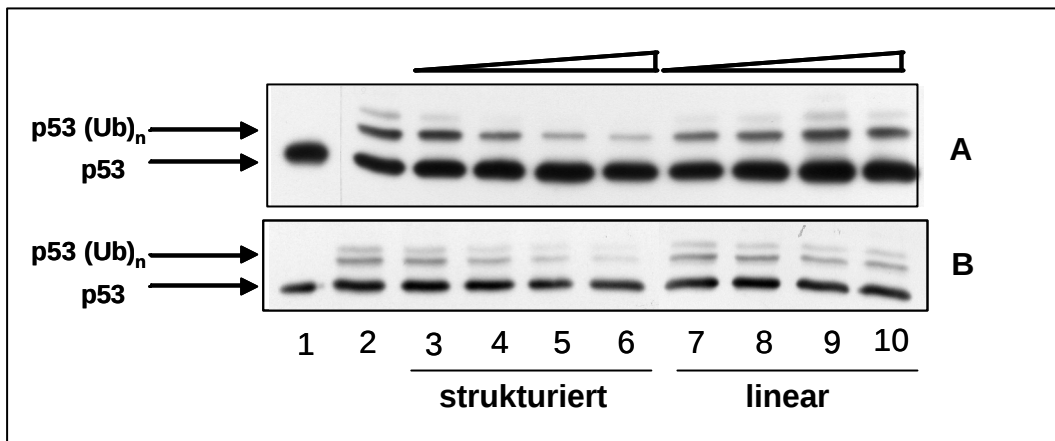


Abb. 31: Einfluss von strukturierter und linearer DNA auf die Ubiquitinierungseffizienz von 248P. 50 ng 248P wurden mit steigenden Mengen an spezifischer (p21-dec1 + 2, **A**; Bahn 3-6) und unspezifischer strukturierter DNA (SCR-loop A, **B**; Bahn 3-6) bzw. spezifischer linearer (p21 lin/s + as, **A**; Bahn 7-10) und unspezifischer linearer DNA (T3-1/T3-2, **B**; Bahn 7-10) inkubiert (10, 50, 100 und 200 pmol). Kontrollreaktion ohne DNA ist in Bahn 2 dargestellt (**A** und **B**). 248P ist in Bahn 1 dargestellt (**A** und **B**). Ubiquitinierte Formen von 248P und nicht-ubiquitiniertes 248P sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Da in den EMSA- und FIDA-Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass 273H weder an lineare noch an strukturierte DNA binden kann, dürfte die Inkubation dieses Proteins mit strukturierter DNA keinen Einfluss auf die Ubiquitinierungseffizienz haben. Tatsächlich ließ sich mit diesem Assay kein Unterschied für lineare und strukturierte Substrate feststellen. Erst bei der Verwendung von 200 pmol DNA wurde ein Rückgang der ubiquitinierten Formen von p53 festgestellt (Abb. 32, Bahn 3-10).

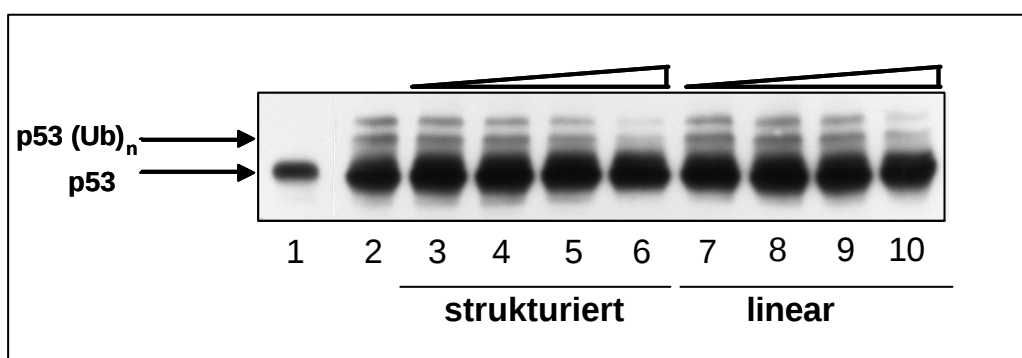


Abb. 32: Einfluss von strukturierter und linearer DNA auf die Ubiquitinierungseffizienz von 273H. 50 ng 273H wurden mit steigenden Mengen an spezifischer strukturierter DNA (p21-dec1 + 2, Bahn 3-6) und spezifischer linearer DNA (p21 lin/s + as, Bahn 7-10) inkubiert (10, 50, 100 und 200 pmol). Kontrollreaktion ohne DNA ist in Bahn 2 dargestellt. 273H ist in Bahn 1 gezeigt.

Mit der Verwendung dieses Assays konnte *in vitro* gezeigt werden, dass wt und mutiertes p53 im Komplex mit strukturierter DNA gegen eine Ubiquitinierung durch MDM2 geschützt sind. In den EMSA-Experimenten konnte keine strukturspezifische

DNA-Bindungsaktivität von 273H festgestellt werden. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte auch keine Protektion gegenüber einer MDM2-abhängigen Ubiquitinierung beobachtet werden. Da sich jedoch 273H in Tumorzellen ebenfalls durch eine erhöhte Stabilität auszeichnet müssen noch andere Mechanismen existieren, die zur intrazellulären Stabilität von mutiertem p53 beitragen. Ebenso ist es möglich, dass 273H durch Bindung an andere DNA-Strukturen gegenüber einer MDM2-abhängigen Ubiquitinierung geschützt ist. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass 273H *in vitro* an MAR-DNA-Elemente bindet, die zur Ausbildung von *non-B*-DNA-Strukturen in der Lage sind, wobei der C-Terminus für diese Bindung notwendig ist.

5. Diskussion

Wt p53 zeigt unterschiedliche Bindungsaffinitäten gegenüber Bindungselementen in linearer und strukturierter Konformation

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass die häufig verwendeten Begriffe „latent“ und „aktiviert“, in Bezug auf DNA-Bindungseigenschaften von wt p53, nur unter bestimmten *in vitro* Voraussetzungen bei der Interaktion mit spezifischer linearer DNA zutreffend sind. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei der Anwendung von alternativen Methoden zur Untersuchung von p53-DNA-Interaktionen eine Aktivierung des Proteins nicht notwendig ist (Kim *et al.*, 1999; Cain *et al.*, 2000; Espinosa und Emerson, 2001; Kaeser und Iggo, 2002).

Wt p53 bindet mit einem hohen Grad an Spezifität an Zielsequenzen in linearer und nicht-linearer DNA. Diese Wechselwirkung ist jedoch stark davon abhängig in welcher Konformation die Bindungsstellen vorliegen. Die Bindungsaffinität für spezifische lineare DNA ist nur schwach ausgeprägt, kann jedoch durch Modifizierung oder Deletion der regulatorischen C-terminalen Region stark erhöht werden. Liegen p53-spezifische Bindungsstellen in strukturierter Konformation vor fördert dies die Bindung des Proteins, wobei der C-Terminus für diese Interaktion eine entscheidende Rolle spielt.

Die hohe Spezifität dieser strukturabhängigen Wechselwirkung wird durch zwei Faktoren hervorgerufen. Dies sind zum Einen strukturelle Eigenschaften der DNA und zum Anderen die Anwesenheit einer p53-spezifischen Bindungsstelle innerhalb des Substrates.

Es konnte gezeigt werden, dass die konservierten Basen an Position C₄ und G₇ der Bindungsstellen eine wichtige Rolle bei der Erkennung der untersuchten Substrate spielen. Ein Austausch dieser Basen setzt die Bindungsaffinität von wt p53 stark herab, wobei die nicht-konservierten Basen variieren können. Dies bestätigen auch frühere Untersuchungen (Nagaich *et al.*, 1997), in denen gezeigt wurde, dass den Guaninen innerhalb der hochkonservierten C(A/T)(T/A)G Sequenz von p53-Bindungsstellen eine große Bedeutung für die DNA-Bindungseigenschaften zukommt. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu erwähnen, dass ein Austausch der konservierten Basen C₄ und G₇ innerhalb der untersuchten Substrate auch zu einer konformationellen Veränderung des Substrates führen kann. Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch eine eventuelle Strukturänderung eine Rolle bei dem beobachteten veränderten Bindungsverhalten dieser Substrate spielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ebenso, dass ungepaarte Basen in bestimmten Regionen der untersuchten Substrate eine wichtige Voraussetzung für die Interaktion von wt p53 darstellen. Bindungsstudien mit verschiedenen p53-Deletionsmutanten haben offenbart, dass C-terminal verkürztes p53 stark an spezifische lineare DNA, jedoch nur schwache Wechselwirkung mit strukturierter DNA zeigt. Die Bedeutung des C-Terminus für die Bindung an die untersuchten strukturierten Substrate kann durch die beschriebene Affinität dieser funktionellen Proteindomäne für ungepaarte Basen erklärt werden (Lee *et al.*, 1995; Szak *et al.*, 1999). Durch diese Affinität zu fehlgepaarten Basen im Bereich des Stamms der untersuchten Substrate trägt der C-Terminus von wt p53 zu der hohen Spezifität der strukturabhängigen Wechselwirkung bei.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Bedeutung des C-Terminus für die Bindung an strukturierte DNA abnimmt, wenn der N-Terminus des Proteins deletiert ist. Diese Beobachtung legt nahe, dass der C-Terminus nur bei intakter N-terminaler Region für eine spezifische Interaktion von wt p53 mit strukturierter DNA notwendig ist. In früheren Untersuchungen wurde festgestellt, dass der N-Terminus von wt p53 die Bindung an DNA negativ beeinflusst, indem diese Domäne die Dissoziation von p53-DNA-Komplexen fördert (Cain *et al.*, 2000). Die durch elektronenmikroskopische Untersuchungen erzielten Ergebnisse stehen in Einklang mit dieser Beobachtung und deuten darauf hin, dass die C- und N-terminale Region die strukturspezifische Bindung von wt p53 in Abhängigkeit voneinander regulieren.

Strukturelle Flexibilität von p53-spezifischen Bindungsstellen

Die gezeigten Bindungseigenschaften von wt p53 mit spezifischen Zielsequenzen in nicht-linearer Konformation könnten eine Erklärung für die hohe Sequenzvariabilität und unterschiedliche Zusammensetzung von natürlichen Bindungsstellen darstellen. Frühere Untersuchungen mit linearer DNA deuteten darauf hin, dass mehrere Dekamere innerhalb einer Bindungsstelle notwendig sind um eine stabile Komplexbildung mit wt p53 zu gewährleisten (McLure und Lee, 1998). Es wurde postuliert, dass zwei Dimere eines p53-Tetramers jeweils an ein Dekamer gebunden sind. Durch kooperative Wechselwirkungen zwischen den Dimeren kommt es zu einer Stabilisierung des p53-DNA-Komplexes (McLure und Lee, 1998). Eine stabile Komplexbildung wurde jedoch nur durch die Modifizierung mit dem C-terminal

spezifischen Antikörper PAb421 beobachtet. In Abwesenheit des Antikörpers wurde, unabhängig von der Anzahl der Dekamer innerhalb der Bindungsstelle, keine Bindung beobachtet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein einziges Dekamer in nicht-linearer Konformation ausreichend ist um eine Bindung von wt p53 ohne Aktivierung durch den C-terminalen Antikörper PAb421 zu ermöglichen. Dies wirft die Frage auf, warum p53-spezifische Bindungsstellen aus mehr als einem Dekamer zusammengesetzt sein müssen um spezifisch gebunden zu werden.

Die Fähigkeit von p53-Bindungsstellen zur Ausbildung von Sekundärstrukturen ist davon abhängig, ob selbst-komplementäre Regionen innerhalb der Basensequenz vorkommen. Die strukturelle Flexibilität eines einzelnen Dekamers ist geringer als einer p53-Bindungsstelle, die aus mehreren Dekameren zusammengesetzt ist, da in diesem Fall die notwendigen selbst-komplementären Regionen von mehreren Dekameren für strukturelle Übergänge zur Verfügung gestellt werden (siehe Abb. 2). Die Zusammensetzung der p53-spezifischen Bindungsstellen aus mehreren Dekameren ermöglicht die Bildung von Sekundärstrukturen. Durch diesen Mechanismus könnten durch Konformationsänderungen einzelne Dekamere von einer „schwachen“ in eine „starke“ Bindungsstelle umgewandelt werden. Dies könnte auch eine Erklärung dafür liefern, warum in natürlichen Bindungsstellen häufig nur ein Dekamer dem p53 Konsensusselement 5' – PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy – 3' entspricht, wogegen die anderen von dieser Sequenz abweichen (siehe Tab. 1).

Physiologische Relevanz der strukturabhängigen DNA-Bindung von wt p53

Die Tatsache, dass wt p53 ohne Aktivierung durch den Antikörper PAb421 mit hoher Affinität an spezifische Bindungsstellen in nicht-linearer Konformation bindet, wirft die Frage auf inwieweit diese Beobachtung von physiologischer Relevanz ist. Bis vor kurzem wurde der aktivierende Effekt dieses Antikörpers auf die DNA-Bindungseigenschaften von wt p53 als physiologisch relevant betrachtet. Es wurde postuliert, dass die Bindung des Antikörpers eine Modifikation des Proteins nachahmt, die für die DNA-Bindungsaktivität *in vivo* notwendig ist.

In kürzlich veröffentlichten *in vitro* Untersuchungen, die den physiologischen Bedingungen näher kommen als die allgemein verwendeten Methoden zur Untersuchung von p53-DNA-Interaktionen, konnte jedoch gezeigt werden, dass wt p53 ohne Aktivierung durch PAb421 an DNA binden kann und transkriptionell aktiv

ist. Modifiziertes wt p53 zeigte dagegen in diesen Untersuchungen eine geringere Aktivität (Espinosa und Emerson, 2001). Diese Daten lassen somit den Schluss zu, dass die Bindung von nicht aktiviertem wt p53 als ein physiologischer Prozess betrachtet werden kann.

Eine wichtige Frage in Bezug auf die physiologische Relevanz der Bindung von wt p53 an strukturierte DNA ist, ob und wenn ja, unter welchen Bedingungen p53-spezifische Bindungsstellen strukturellen Übergängen ausgesetzt sind. Aus thermodynamischer Sicht ist die Bildung von Sekundärstrukturen aus doppelsträngiger DNA energetisch eher ungünstig. Während Transkriptions- und Replikationsvorgängen müssen jedoch ds-DNA-Stränge räumlich voneinander separiert werden. Unter solchen Bedingungen könnte die Bildung von nicht-linearen DNA-Strukturen durch intramolekulare Basenpaarung energetisch begünstigt werden. In *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es unter bestimmten Bedingungen zur Ausbildung von ungewöhnlichen DNA-Strukturen kommt (Zannis-Hadjopoulos *et al.*, 1988; Ward *et al.*, 1990; Ward *et al.*, 1991; Pluciennik *et al.*, 2000). Die Bildung solcher Strukturen wurde mit Rekombinations-, Replikations- und Transkriptionsprozessen in Zusammenhang gebracht (Van Holde und Zlatanova, 1994; Pearson *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 2001; Napierala *et al.*, 2002).

Verschiedene Beobachtungen unterstützen die aufgestellte Hypothese, dass die Wechselwirkung von wt p53 und spezifischen Bindungsstellen von der DNA-Struktur abhängt:

- Transkriptionell aktives wt p53 bindet an spezifische Bindungsstellen, die in Chromatin organisiert sind. Eine Bindung an lineare DNA wurde in diesen Untersuchungen nicht beobachtet (Espinosa und Emerson, 2001).
- P53-spezifische Bindungsstellen weisen charakteristische Merkmale von strukturell flexiblen DNA-Sequenzen auf (Sequenzwiederholungen, interne Symmetrie)
- Wt p53 bindet *in vitro* und *in vivo* mit unterschiedlicher Effizienz an verschiedene Bindungsstellen (Hecker *et al.*, 1996; Chin *et al.*, 1997; Kaeser und Iggo, 2002).
- Die Wechselwirkung von wt p53 mit spezifischen Bindungsstellen wird durch das HMG1-Protein (high mobility group, Jayaraman *et al.*, 1998) verstärkt. Dieses Protein beeinflusst die helikale Struktur der DNA und kann an ungewöhnliche DNA-Strukturen binden und diese stabilisieren (Bianchi *et al.*, 1989; Waga *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 2000).

Ein weiterer Punkt ist, dass die in dieser Arbeit beschriebene Regulation der Protein-DNA-Wechselwirkung durch die DNA-Struktur nicht auf wt p53 beschränkt ist sondern an beobachtete spezifische Wechselwirkungen des Transkriptionsfaktors CREB mit DNA erinnert (Spiro *et al.*, 1993; Gacy und McMurray, 1994). Es wurde festgestellt, dass die Bindung von CREB an spezifische DNA durch die Bildung von Haarnadelstrukturen verstärkt wird. Ungepaarte Basen sind für die Bindung dieses Proteins ebenfalls von Bedeutung (Spiro *et al.*, 1993).

Eine Vielzahl von Genen mit unterschiedlichen Funktionen wird durch wt p53 reguliert. Die transkriptionelle Regulation dieser Gene bedarf einer exakten Koordination um die gleichzeitige Stimulation von entgegengesetzt wirkenden Signalkaskaden zu vermeiden (Zellzyklus-Arrest bzw. Apoptose).

Die unterschiedliche Wechselwirkung von wt p53 mit Bindungsstellen in linearer und nicht-linearer Konformation stellt einen möglichen Mechanismus dar, über den p53-regulierte Promotoren selektiv angeschaltet werden können. Diesem Modell zu Folge könnte die Bindung von wt p53 an spezifische Promotoren von der DNA-Struktur abhängen und durch Proteine reguliert werden, die entweder DNA-Strukturen stabilisieren (z.B.: HMG1, Jayaraman *et al.*, 1998) oder solche Strukturen wieder auflösen vermögen (z.B.: Topoisomerasen, Gobert *et al.*, 1999; Cowell *et al.*, 2000). Strukturelle Übergänge von DNA werden meist während der S-Phase des Zellzyklus beobachtet (Ward *et al.*, 1990; Pearson *et al.*, 1996; Novac *et al.*, 2002). Die aufgestellte Hypothese, dass strukturelle Übergänge innerhalb von p53-Bindungsstellen die selektive Promotor-Transaktivierung durch p53 bestimmen, würde voraussetzen, dass die Bindung von p53 an einige Promotoren von der DNA Replikation abhängt. In jüngsten Untersuchungen konnte tatsächlich gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivierung von einigen wt p53-spezifischen Promotoren durch Blockierung der DNA-Replikation inhibiert werden kann (Gottifredi *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit präsentierte strukturabhängige Wechselwirkung von wt p53 mit spezifischen Bindungsstellen könnte zum tieferen Verständnis beitragen, wie p53 spezifisch bestimmte Promotoren erkennt und transaktiviert.

Mutiertes p53 zeigt strukturabhängige DNA-Bindungseigenschaften

In den Untersuchungen mit mutiertem p53 konnte gezeigt werden, dass p53 mit Punktmutationen in der Kerndomäne DNA-bindende Eigenschaften aufweist. Aufgrund dieser Mutation hat mutiertes p53 die Fähigkeit zur sequenzspezifischen

DNA-Bindung verloren. In den durchgeführten EMSA-Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass mutiertes p53 eine hohe Affinität zu strukturierter DNA aufweist. Im Unterschied zu wt p53, welches sequenz- und strukturspezifisch an *non-B*-DNA binden kann, ist die beobachtete Wechselwirkung bei mutiertem p53, aufgrund des Aminosäureaustausches in der Kerndomäne, ausschließlich strukturspezifisch. Wie auch bei wt p53 zu beobachten war ist der C-Terminus für diese Bindung von entscheidender Bedeutung. Eine Blockierung dieser Domäne, durch Modifizierung mit dem C-terminal spezifischen Antikörper PAb421, führt zu einer deutlichen Inhibierung der Bindung. Diese Inhibierung ist spezifisch für den Antikörper PAb421, da die Modifizierung mit dem N-terminal spezifischen Antikörper DO-1 zu einem Super-Shift in den EMSA-Experimenten führte. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch schon bei der Wechselwirkung von mutiertem p53 mit MAR-DNA-Elementen gemacht werden. Auch in diesem Fall führte eine Modifizierung mit dem C-terminal spezifischen Antikörper zu einer Blockierung der Bindung an diese DNA-Substrate (Deppert, 1996).

In den durchgeführten FIDA-Messungen wurden verschiedene p53 Mutanten auf ihr Bindungsverhalten gegenüber linearer und strukturierter DNA untersucht. Dabei zeigte sich eine höhere Affinität der Proteine für strukturierte DNA-Substrate. Diese beobachteten Bindungseigenschaften scheinen ein generelles Phänomen dieser Proteine darzustellen. Die Untersuchungen einer Vielzahl von p53 Mutationen durch ein Protein-Array haben ergeben, dass alle untersuchten „hot-spot“ Mutationen strukturspezifisch an DNA binden können.

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die Bindungsaffinitäten der einzelnen Proteine gegenüber strukturierter DNA zum Teil erheblich voneinander abweichen. Interessant ist dabei der Unterschied der untersuchten Klasse I Mutationen 248P und 273H. Im Gegensatz zu 248P zeigt 273H in den EMSA- und FIDA-Experimenten keine Affinität gegenüber strukturierten DNA-Substraten. Dies hat jedoch nicht notwendigerweise zur Folge, dass 273H nicht strukturspezifisch an DNA binden kann. Vielmehr könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass dieses Protein an andere *non-B*-DNA-Strukturen bindet als 248P. Diese Hypothese unterstützen Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass 273H an MAR-DNA-Elemente binden kann (Will *et al.*, 1998b), die ebenfalls *non-B*-DNA-Strukturen ausbilden können.

Auffällig ist weiterhin, dass die Art des Aminosäureaustausches an einer Position des Proteins die Bindungseigenschaften gegenüber strukturierter DNA beeinflussen kann. So zeigen die p53 Mutanten 248W/248Q, 273H/273C und 245S/245D/245C, in den Untersuchungen mit dem Protein-Array, voneinander abweichende Bindungsaffinitäten.

P53 im Komplex mit strukturierter DNA ist gegen eine MDM2-abhängige Ubiquitinierung geschützt

Diese Art der strukturspezifischen DNA-Bindung von wt und mutiertem p53, hat Auswirkungen auf die MDM2-abhängige Ubiquitinierung dieser Proteine. MDM2 fungiert als Ubiquitin-Ligase und katalysiert die Bindung von Ubiquitin an Lysine im C-Terminus von p53, dem ersten Schritt im proteasomalen Abbau von p53. In einem kombinierten *in vitro* Bindungs/Ubiquitin-Assay konnte gezeigt werden, dass durch Bindung von wt und mutiertem p53 an strukturierte DNA der C-Terminus dieser Proteine für eine Anbindung von Ubiquitin nicht mehr zugänglich ist. Dieser Effekt trat bei Verwendung von linearer DNA nicht auf und unterstreicht die besondere Rolle des C-Terminus für die strukturspezifische Bindung von wt und mutiertem p53. Diese Daten könnten einen weiteren Mechanismus aufzeigen wie die Stabilität von wt und mutiertem p53 in Zellen reguliert wird. In Untersuchungen wurde gezeigt, dass Phosphorylierungen am N-Terminus (Chehab *et al.*, 2000; Shieh *et al.*, 1997), die subzelluläre Lokalisation von p53 (Freedman und Levine, 1998; Roth *et al.*, 1998) und die Bindung an zelluläre Proteine (Kamijo *et al.*, 1998) die Stabilität von wt p53 beeinflussen können. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass zusätzlich auch die Bindung an strukturierte DNA zur Stabilität von wt p53 beitragen kann.

Die Akkumulation von mutiertem p53 in Zellen wird mit dem Verlust der Transaktivierungsfunktion begründet. Dadurch können diese Proteine die Expression von MDM2 nicht mehr stimulieren und somit nicht mehr für den proteasomalen Abbau markiert werden. Dies kann jedoch nicht erklären, warum einige Zelllinien einen hohen Spiegel an wt und mutiertem p53 bei gleichzeitiger Expression von MDM2 aufweisen (Cordon-Cardo *et al.*, 1994; Landers *et al.*, 1997).

In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Stabilität von mutiertem p53 in Tumorzellen mit der Bindung an stabilisierende Proteine, wie beispielsweise hsp90 und p14^{ARF} (Nagata *et al.*, 1999; Buschmann *et al.*, 2000b), in

Zusammenhang gebracht werden kann. Es wurde postuliert, dass auch andere Proteine, wie p300/CBP zu dieser Stabilität beitragen (Grossman *et al.*, 1998). Ein Einfluss von N-terminalen Phosphorylierungen und der spezifischen Konformation von mutiertem p53 konnten in diesen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Neben diesen Möglichkeiten könnte die erhöhte Stabilität von mutiertem p53, bei gleichzeitiger Expression von MDM2, auch in der Maskierung des C-Terminus durch Bindung an *non-B-DNA*-Strukturen liegen. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstrichen, dass mutiertes p53 im Zellkern akkumuliert und mit nuklearen Strukturen, wie der Kernmatrix und dem Chromatin assoziiert ist. Dies könnte eine Maskierung des C-Terminus von mutiertem p53 verursachen.

Dass neben dieser Möglichkeit noch andere Mechanismen existieren müssen, die die Stabilität von mutiertem p53 regulieren, wird durch die Untersuchungen mit 273H deutlich. In dem kombinierten *in vitro* Bindungs/Ubiquitin-Assay konnte, in Übereinstimmung mit den EMSA- und FIDA-Experimenten, keine Protektion gegenüber einer MDM2-abhängigen Ubiquitinierung festgestellt werden. Da dieses Protein in Zellen ebenfalls eine erhöhte Halbwertszeit aufweist und im Zellkern akkumuliert, liegt die Vermutung nahe, dass noch weitere regulatorische Mechanismen die intrazelluläre Stabilität von mutiertem p53 gewährleisten. Ebenso ist es möglich, dass 273H durch Bindung an andere DNA-Strukturen innerhalb des Zellkerns stabilisiert wird.

Biologische Relevanz der strukturellen DNA-Bindung von mutiertem p53

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Daten stellt sich die Frage, ob die strukturspezifischen DNA-Bindungseigenschaften von mutiertem p53 eine Rolle bei den beobachteten physiologischen Eigenschaften dieser Proteine darstellen. Die dominant-negativen Funktionen von mutiertem p53 werden durch Ausschaltung der wt p53 Funktionen durch Heteroligomerisierung erklärt. Durch diesen Vorgang wird die Fähigkeit von wt p53 zur sequenzspezifischen DNA-Bindung und Transaktivierung von spezifischen Zielgenen herabgesetzt (Sigal und Rotter, 2000).

Die Gründe für den onkogenen Funktionsgewinn („gain of function“) von mutiertem p53 sind dagegen nicht geklärt. Ein möglicher Mechanismus könnte in der transkriptionellen Transaktivierung verschiedener Gene liegen, die das Zellwachstum stimulieren (Roemer, 1999). Die beobachtete Transaktivierungsfunktion ist jedoch Zelltyp-spezifisch und von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängig. Es ist

nicht geklärt, ob mutiertes p53 dabei direkt oder durch Interaktion mit DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren an regulatorische DNA-Sequenzen bindet. Für eine direkte DNA-Bindung spricht, dass zum einen die Transaktivierungsdomäne und zum anderen der C-Terminus von mutiertem p53 für eine transkriptionelle Stimulation notwendig ist. Es ist denkbar, dass mutiertes p53 an Promotoren in *non-B*-DNA-Konformation bindet und durch Assoziierung mit Zelltyp-spezifischen Cofaktoren die Transaktivierung spezifischer Gene stimuliert.

Eine weitere Erklärung für den Funktionsgewinn von mutiertem p53 beruht auf der Tatsache, dass diese Proteine zu einer erhöhten genetischen Instabilität von Zellen führen können (Liu *et al.*, 1996). Diese Instabilität wird auf eine Interaktion zwischen mutiertem p53 und Topoisomerase I zurückgeführt (Albor *et al.*, 1998; El-Hizawi *et al.*, 2002). Topoisomerasen sind in vielen verschiedenen zellulären Prozessen wie beispielsweise Replikation, Transkription und DNA-Reparatur involviert (Andersen *et al.*, 1996). Es wurde postuliert, dass mutiertes p53 die katalytische Aktivität von Topoisomerase I verstärkt und in Kombination mit fehlenden Tumorsuppressor-eigenschaften zu einer Erhöhung der nicht-homologen Rekombination und somit zu genetischer Instabilität beiträgt (Albor *et al.*, 1998).

Ein weiteres Modell für den Funktionsgewinn, mit dem die in dieser Arbeit erzielten Daten in Einklang gebracht werden können, ist die beobachtete Fähigkeit von mutiertem p53 an MAR-DNA-Elemente (matrix associated regions) zu binden (Weissker *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 1996; Will *et al.*, 1998a-c). Diese DNA-Sequenzen werden von Proteinen gebunden, die Teil der Kernmatrix sind. Es wurde postuliert, dass diese Sequenzen die Basis der chromosomalen Schleifen bilden. Mit Hilfe solcher chromosomaler Anheftungsstellen könnte die Matrix dazu beitragen, die Chromosomen zu organisieren, Gene örtlich festzulegen und die DNA-Transkription und Replikation innerhalb des Zellkerns zu regulieren. MAR-DNA-Elemente sind häufig in der Nähe von Enhancer-Regionen lokalisiert und legen die Grenzen von aktiven Chromatin-Domänen fest (Bode *et al.*, 1992).

In mehreren Untersuchungen konnte tatsächlich gezeigt werden, dass MAR-DNA-Elemente mit Transkriptions- und Replikationsvorgängen in Zusammenhang gebracht werden können (Stief *et al.*, 1989; Phi-Van und Strätling 1990; Klehr *et al.*, 1991; Polack *et al.*, 1991; Poljak *et al.*, 1994; Piechaczek *et al.*, 1999).

In dem Modell wird vorgeschlagen, dass die Bindung von mutiertem p53 an MAR-DNA-Elemente für den onkogenen Funktionsgewinn dieser Proteine verantwortlich

ist. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die von mutiertem p53 gebundenen MAR-DNA-Elemente sich in ihrer Größe und Basenzusammensetzung voneinander unterscheiden (Will *et al.*, 1998c). Sie zeichnen sich jedoch durch einen hohen AT-Gehalt aus und enthalten Variationen eines AATATATT „unwinding“ Motivs, welches mit der Funktion der MAR-DNA-Elemente in Zusammenhang gebracht wird (Mielke *et al.*, 1990; Bode *et al.*, 1992). Diese Elemente werden auch als „base unpairing regions“ (BUR) bezeichnet. Sie fördern strukturelle Veränderungen innerhalb des Chromatins, unter anderem können sie regional dazu beitragen DNA-Stränge räumlich voneinander zu separieren (Bode *et al.*, 1992; Benham *et al.*, 1997). Aufgrund des hohen AT-Gehaltes dieser Motive zeigen sie Tendenz zur Ausbildung von *non-B*-DNA-Strukturen. Es wurde gezeigt, dass mutiertes p53 an diese Motive in MAR-DNA-Elementen bindet und dadurch deren Fähigkeit zur Veränderung der DNA-Struktur gefördert wird.

In vivo konnte durch ChIP-Assay (chromatin immunoprecipitation assay) gezeigt werden, dass mutiertes p53 an Position 245 (Gly²⁴⁵ → Ser) an DNA binden kann. Die identifizierten ChIP-DNA-Fragmente zeigen keine Sequenzhomologie und es ist daher unwahrscheinlich, dass die Bindung von 245S durch eine spezifische Sequenz vermittelt wird. Einige der identifizierten Sequenzen weisen Ähnlichkeit zu *Alu*-Sequenzen auf, von denen ebenfalls einige als MAR-DNA-Elemente angesehen werden (Boulikas, 1993).

Diese Daten führten zu der Schlussfolgerung, dass die MAR-DNA-Bindung von mutiertem p53 durch BUR-Elemente vermittelt wird, die in der Lage sind *non-B*-DNA-Strukturen auszubilden. Da MAR-DNA-Elemente mehrere repetitive Sequenzen enthalten, die zur Ausbildung solcher Strukturen in der Lage sind, könnten mehrere p53-Moleküle an ein einziges MAR-DNA-Element binden.

Die Bindung von mutiertem p53 an bestimmte *non-B*-DNA-Strukturen in MAR-DNA-Elementen könnte dazu führen, dass dadurch das Auseinanderwinden der DNA-Helix gefördert und die Gen-Expression und DNA-Replikation im negativen wie auch im positiven Sinne beeinflusst wird. Die Bildung der dazu notwendigen Protein-Komplexe könnte durch die Fähigkeit von mutiertem p53, über seine N-terminale Transaktivierungsdomäne mit anderen Transkriptionsfaktoren zu interagieren verstärkt werden. Eine andere Eigenschaft von mutiertem p53, nämlich die Wechselwirkung mit der Kernmatrix (Deppert *et al.*, 1989), ist in diesem Zusammenhang ebenfalls von Bedeutung. Diese Proteine könnten geeignete MAR-

DNA-Elemente mit der Kern-Matrix verknüpfen und somit „aktive“ Chromatin-Domänen formen.

Dieses Modell stellt auch eine Erklärung für den Zelltyp-spezifischen Funktionsgewinn von mutiertem p53 dar. Da die Promotor- und Enhancer-Elemente eines bestimmten Gens in allen Zelltypen identisch sind, wird die Zelltyp-spezifische Gen-Expression durch die Verfügbarkeit von geeigneten Cofaktoren und durch eine geeignete Chromatinstruktur bestimmt. Die Tatsache, dass mutiertes p53 mit zwei wichtigen Faktoren von Transkriptions- und Replikationsvorgängen, der Kernmatrix und MAR-DNA-Elementen interagiert, könnte somit die Basis für die Zelltyp-spezifische Regulation der Gen-Expression durch mutiertes p53 sein. Dass MAR-DNA-Elemente in der Zelltyp-spezifischen Gen-Expression involviert sind, konnte schon in anderen Untersuchungen gezeigt werden (McKnight *et al.*, 1992 und 1996; Bonifer *et al.*, 1994).

Es gibt bereits Untersuchungen in denen gezeigt wurde, dass MAR-DNA-Elemente durch Wechselwirkung mit regulatorischen Proteinen die Proteinexpression beeinflussen können. Ein prominentes Beispiel ist SATB1 (special-AT-rich DNA-binding protein), ein Protein welches für die negative Regulation der Gewebespezifischen Gen-Expression notwendig ist (Dickenson *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass SATB1 an AT-reiche Regionen in MAR-DNA-Elementen bindet, die Variationen des AATATATTT „unwinding“ Motivs enthalten. Diese Bindung blockiert die strukturellen Veränderungen, die von diesem Motiv ausgehen und ist dadurch für die negative Gen-Regulation verantwortlich (Wang *et al.*, 1995; Kohwi-Shigematsu *et al.*, 1998).

Ein weiteres Beispiel ist SAF-B (scaffold attachment factor B, Nayler *et al.*, 1998), ein Protein welches ebenfalls an MAR-DNA-Elemente binden kann. In Transfektions-experimenten konnte gezeigt werden, dass SAF-B die transkriptionelle Aktivität von Promotoren beeinflusst, die von MAR-DNA-Elemente flankiert werden (Nayler *et al.*, 1998). In Analogie dazu könnte auch mutiertes p53 durch Bindung an MAR-DNA-Elemente die Gen-Expression beeinflussen.

Die in dieser Arbeit gezeigt Daten könnten eine Erklärung dafür liefern, wie mutiertes p53 an solche Elemente in MAR-DNAs bindet und dadurch für den onkogenen Funktionsgewinn dieser Proteine verantwortlich ist.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DNA-Konformation ein wichtiger Parameter für die Regulation der Wechselwirkung von wt p53 mit seinen spezifischen Zielsequenzen darstellt. Die Affinität zu spezifischer linearer DNA ist nur schwach ausgeprägt und kann durch Modifikationen des C-Terminus verstärkt werden. Liegen p53-spezifische Bindungsstellen in strukturierter Konformation vor wird die Bindung des Proteins gefördert. Der C-Terminus von p53 nimmt dabei eine besondere Rolle ein. Diese Domäne ist für eine Bindung an strukturierte DNA notwendig, wogegen diese Region die Bindung an spezifische lineare DNA negativ beeinflusst. Die strukturabhängige Wechselwirkung von wt p53 mit DNA wird durch topologische Parameter des DNA-Substrates und durch das Vorhandensein einer spezifischen Sequenz bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Austausch der konservierten Basen C₄ und G₇ innerhalb von p53-spezifischen Bindungsstellen zu einer Verminderung der Bindungseigenschaften von wt p53 führt. Ebenso sind ungepaarte Basen innerhalb der untersuchten Substrate eine wichtige Voraussetzung für eine stabile Komplexbildung von wt p53.

Die Untersuchungen mit mutiertem p53 haben gezeigt, dass diese Proteine DNA-bindende Eigenschaften aufweisen. Sie zeigen eine höhere Affinität gegenüber strukturierter DNA im Vergleich zu linearer DNA. Untersuchungen einer Vielzahl von p53 Mutanten haben gezeigt, dass diese DNA-Bindungseigenschaft ein generelles Phänomen dieser Proteine darstellt.

Diese Art der strukturabhängigen DNA-Bindung von wt und mutiertem p53 hat Auswirkungen auf die Interaktion mit MDM2. Es konnte gezeigt werden, dass wt und mutiertes p53 im Komplex mit strukturierter DNA gegen einen MDM2-abhängige Ubiquitinierung geschützt sind. Dies könnte einen neuen Mechanismus darstellen, wie die Stabilität von wt und mutiertem p53 in Zellen reguliert werden kann.

7. Summary

In this thesis I show that DNA topology is an important parameter for regulating the selective and highly specific interaction of p53 with its target binding sites. Specific binding of wild-type p53 is greatly enhanced when cognate binding sites are present in a non-linear stem-loop conformation. The C-terminal domain plays a key role in regulating the specific interactions of p53 with target binding sites in a DNA conformation-dependent manner. The C-terminal domain is required for binding to target sites in a non-linear DNA conformation. This is in contrast to the strong inhibitory effect of the C-terminus on p53 interaction with linear DNA. Sequence-specific and structure-specific DNA-recognition determines the strong interaction of p53 with target sites in stem-loop conformation. I propose that selective binding of p53 to various promoters may be determined by the DNA conformation within p53 cognate sites.

Experiments with mutant p53 show that these proteins exhibit a strong affinity to DNA substrates in *non-B*-DNA conformation. As shown for wt p53, the C-terminus of mutant p53 plays an important role for this interaction. Modifications of this domain with the C-terminal specific antibody PAb421 abolishes binding of mutant p53 to structured DNA. The DNA binding properties of mutant p53 seem to be a general phenomenon as revealed by analysis of a large number of different mutant p53 proteins immobilised on a protein-array. The DNA-binding properties of mutant p53 might provide clues to better understand the activities of mutant p53 related to its „gain of function“ properties.

The observed binding of wt and mutant p53 to DNA in non-B-DNA conformation has an impact on the interaction with Mdm2. I show that wt and mutant p53 in complex with structured DNA are resistant to Mdm2-dependent ubiquitination. Binding to DNA targets thus could be a new mechanism regulating p53 stability in cells.

8. Literaturverzeichnis

- Albor, A., Kaku, S. und Kulesz-Martin, M., 1998, *Cancer Res.*, 58, 2091-2094
- Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmueller, L. und Deppert, W., 1999, *Oncogene*, 18, 7706-7717
- Aloni-Grinstein, R., Schwartz, D. und Rotter, V., 1995, *EMBO J.*, 14, 1392-1401
- Aloni-Grinstein, R., Zan-Bar, I., Alboum, I., Goldfinger, N. und Rotter, V., 1993, *Oncogene*, 8, 3297-3305
- Andersen, A. H., Bendixen, C. und Westergaard, O., 1996, DNA- topoisomerases. In: M. L. DePanphilis (ed.), *DNA Replication in Eukaryontic Cells*, pp. 587-617. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Anderson, M. E., Woelker, B., Reed, M., Wang, P. und Tegtmeyer, P., 1997, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 6255-6264
- Ashkenazi, A. und Dixit, V. M., 1998, *Science*, 281, 1305-1308
- Ayed, A., Mulder, F. A., Yi, G. S., Lu, Y., Kay, L. E. und Arrowsmith, C. H., 2001, *Nat. Struct. Biol.*, 8, 756-760
- Balkalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K. P., Szekley, L., Klein, G., Terenius, L. und Wiman, K. G., 1995, *Nucleic Acid Research*, 23, 362-369
- Balkalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Szekley, E., Klein, G., Terenius, L. und Wiman, K. G., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 413-417
- Bayle, J. H., Elenbaas, B. und Levine, A. J., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 5729-5733
- Benham, C., Kohwi-Shigematsu, T. und Bode, J., 1997, *J. Mol. Biol.*, 274, 181-196
- Bianchi, M. E., Beltrame, M. und Paonessa, G., 1989, *Science*, 243, 1056-1059
- Blandino, G., Levine, A. J. und Oren, M., 1999, *Oncogene*, 18, 477-485
- Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C. und Kohwi-Shigematsu, T., 1992, *Science*, 255, 195-197
- Bonifer, C., Yannoutsos, N., Krueger, G., Grosveld, F. und Sippel, A. E., 1994, *Nucleic Acid Res.*, 22, 4202-4210
- Bouliskas, T., 1993, *J. Cell. Biochem.*, 52, 14-22
- Brain, R. und Jenkins, J. R., 1994, *Oncogene*, 9, 1775-1780

- Braithwaite, A. W. und Jenkins, J. R., 1989, *J. Virol.*, 63, 1792-1799
- Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B. R. und Kley, N., 1995, *Nature*, 377, 646-649
- Bullock, A. N. und Fersht, A. R., 2001, *Nat. Rev. Cancer*, 1, 68-76
- Buschmann, T., Fuchs, S. Y., Lee, C-G., Pan, Z-Q. und Ronai, Z., 2000a, *Cell*, 101, 753-762
- Buschmann, T., Minamoto, T., Wagle, N., Fuchs, S. Y., Adler, V. und Ronai, Z., 2000b, *J. Mol. Biol.*, 295, 1009-1021
- Cain, C. Miller, S., Ahn, J. und Prives, C., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 39944-39953
- Cao, Y., Gao, Q., Wazer, D. E. und Band, V., 1997, *Cancer Res.*, 57, 5584-5589
- Chehab, N. H., Malikzay, A., Appel, M. und Halazonetis, T. D., 2000, *Genes Dev.*, 14, 278-288
- Chen, J. D., Marechal, V. und Levine, A. J., 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13, 4107-4114
- Chen, Y., Müller, J. D., So, P. T. und Gratton, E., 1999, *Biophys. J.*, 77, 553-567
- Chene, P., 1998, *J. Mol. Biol.*, 281, 205-209
- Chene, P., 1999, *J. Mol. Biol.*, 288, 883-890
- Cherny, D. I., Striker, G., Subramaniam, V., Jett, S. D., Palecek, E. und Jovin, T. M., 1999, *J. Mol. Biol.*, 294, 1015-1026
- Chin, K-V, Ueda, K., Pastan, I. und Gottesman, M. M., 1992, *Science*, 255, 459-462
- Chin, P. L., Momand, J. und Pfeifer, G. P., 1997, *Oncogene*, 15, 87-99
- Cho, Y. J., Gorina, S., Jeffrey, P. D. und Pavletich, N. P., 1994, *Science*, 265, 346-355
- Cohen, S. M., Mikata, Y., He, Q. und Lippard, S. J., 2000, *Biochemistry*, 39, 11771-11776
- Contente, A., Dittmer, A., Koch, M. C., Roth, J. und Dobbelsstein, M., 2002, *Nat. Genet.*, 30, 315-320
- Cordon-Cardo, C., Latres, E., Drobnjak, M., Oliva, M. R., Pollack, D., Woodruff, J. M., Marechal, V., Chen, J., Brennan, M. F. und Levine, A. J., 1994, *Cancer Res.*, 54, 794-799
- Cowell, I. G., Okorokov, A. L., Cutts, S. A., Padget, K., Bell, M., Milner, J., und Austin, C. A., 2000, *Exp. Cell Res.*, 255, 86-94
- Crawford, L. V., Pim, D. C., Gurney, E. G., Goodfellow, P. und Taylor-Papadimitriou, J., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 41-45

- Crook, T. und Vousden, K. H., 1992, EMBO J., 11, 3935-3940
- D'Souza, S., Xin, H., Walter, S. und Choubey, D., 2001, J. Biol. Chem., 276, 298-305
- Dang, C. V. und Lee, W. M. F., 1989, J. Biol. Chem., 264, 18019-18023
- Deb, S. P., Munoz, R. M., Brown, D. R., Subler, M. A. und Deb, S., 1994, Oncogene, 9, 1341-1349
- Deb, S., Jackson, C. T., Subler, M. A. und Martin, D. W., 1992, J. Virol., 66, 6164-6170
- Deguin-Chambon, V., Vacher, M., Jullien, M., May, E. und Bourdon J. C., 2000, Oncogene, 19, 5831-5841
- Deppert, W., 1996, J. Cell. Biochem., 62, 172-180
- Deppert, W., Steinmayer, T. und Richter, W., 1989, Oncogene, 4, 1103-1110
- Dickinson, L. A., Dickinson, C. D. und Kohwi-Shigematsu, T., 1997, J. Biol. Chem., 272, 11463-11470
- Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A. K., Moore, M., Finlay, C. und Levine, A. J., 1993, Nat. Genet., 4, 42-46
- Dubochet, J., Ducommun, M., Zollinger, M. und Kellenberger, E., 1971, J. Ultrastruct. Res., 1, 147-167
- Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J. und Reed, S. I., 1994, Cell, 76, 1013-1023
- Dutta, A., Puppert, J. M., Aster, J. C. und Winchester, E., 1993, Nature, 365, 79-82
- el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1992, Nat. Genet., 1, 45-49
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. N., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1993, Cell, 75, 817-825
- El-Hizawi, S., Lagowski, J. P., Kulesz-Martin, M. und Albor, A., 2002, Cancer Res., 62, 3264-3270
- Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D. und Oren, M., 1984, Nature, 312, 646-649
- Elkeles, A., Juven-Gershon, T., Israeli, D., Wilder, S., Zalcenstein, A. und Oren, M., 1999, Mol. Cell. Biol., 19, 2594-2600
- Espinosa, J. M. und Emerson, B. M., 2001, Mol. Cell, 8, 57-69

- Fields, S. und Jang, J. A., 1990, *Science*, 249, 1046-1049
- Finlay, C. A., Hinds, P. W. und Levine, A. J., 1989, *Cell*, 57, 1083-1093
- Frazier, M. W., He, X., Wang, J., Gu, Z., Cleveland, J. L. und Zambetti, G. P., 1998, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 3735-3743
- Freedman, D. A. und Levine, A. J., 1998, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 7288-7293
- Friedman, P. N., Chen, X., Bargonetti, J. und Prives, C., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3319-3323
- Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E. und Shay, J. W., 1992, *Mol. Cell. Biol.*, 12, 2866-2871
- Furnari, B., Rhind, N. und Russell, P., 1997, *Science*, 277, 1495-1497
- Gacy, A. M. und McMurray, C. T., 1994, *Biochemistry*, 33, 11951-11959
- Giaccia, A. J. und Kastan, M. B., 1998, *Genes Dev.*, 12, 2973-2983
- Gobert, C., Skladanowski, A. und Larsen, A. K., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10355-10360
- Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., Evan, G. I. und Green, D. R., 2000, *Nat. Cell. Biol.*, 2, 156-162
- Gottifredi, V., Shieh, S., Taya, Y. und Prives, C., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 1036-1041
- Gottlieb, E., Haffner, R., von Ruden, T., Wagner, E. F. und Oren, M., 1994, *EMBO J.*, 13, 1368-1374
- Gross, A., Jockel, J., Wie, M. C. und Korsmeyer, S. J., 1998, *EMBO J.*, 17, 3878-3885
- Grossman, S. R., Perez, M., Kung, A. L., Joseph, M., Mansur, C., Xiao, Z.-X., Kumar, S., Howley, P. M. und Livingston, D., 1998, *Mol. Cell*, 2, 405-415
- Halazonetis, T. D. und Kandil, A. N., 1993, *EMBO J.*, 12, 5057-5064
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wie, M., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J., 1993, *Cell*, 75, 805-816
- Hecker, D., Page, G., Lohrum, M., Weiland, S. und Scheidtmann, K. H., 1996, *Oncogene*, 12, 953-961
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S. und Kinzler, K. W., 1997, *Mol. Cell*, 1, 3-11
- Hinds, P., Finlay, C. und Levine, A. J., 1989, *J. Virol.*, 63, 739-746
- Hochstrasser, M., 1996, *Annu. Rev. Genet.*, 30, 405-439

- Hollstein, M., Shimer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., 1996, *Nucleic Acid Research* 24, 141-146
- Honda, R. und Yasuda, H., 1999, *EMBO J.*, 18, 22-27
- Honda, R., Tanaka, H. und Yasuda, H., 1997, *FEBS Lett.*, 420, 25-27
- Hsiao, M., Low, J., Dorn, E., Ku, D., Pattengale, P., Yeargin, J. und Haas, M., 1994, *Am. J. Pathol.*, 145, 702-714
- Hsu, Y. T., Wolter, K. G. und Joule, R. J., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3668-3672
- Hupp, T. R. und Lane, D. P., 1994, *Curr. Biol.*, 4, 865-875
- Hupp, T. R., Meek, D., Midgley, C. A. und Lane, D. P., 1992, *Cell*, 71, 875-886
- Hupp, T. R., Sparks, A. und Lane, D. P., 1995, *Cell*, 83, 237-245
- Jackson, M. W. und Berberich, S. J., 2000, *Mol. Cell. Biol.*, 20, 1001-1007
- Jackson, P., Mastangelo, I., Reed, M., Tegtmeyer, P., Yardley, G. und Barret, J., 1998, *Oncogene*, 16, 283-292
- Jäger, S., *J. Biomol. Screen.*, submitted
- Janus, F., Albrechtsen, N., Knippschild, U., Wiesmueller, L., Grosse, F. und Deppert, W., 1999, *Mol. Cell. Biol.*, 19, 2155-2168
- Jayaraman, L. und Prives, C., 1995, *Cell*, 81, 1021-1029
- Jayaraman, L., Moorthy, N. C., Murthy, K. G., Manley, J. L., Bustin, M. und Prives, C., 1998, *Genes Dev.*, 12, 462-472
- Jentsch, S., 1992, *Annu. Rev. Genet.*, 26, 179-207
- Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D. L. und Oren, M., 1993, *Oncogene*, 8, 3411-3416
- Kaeser, M. D. und Iggo, R. D., 2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 95-100
- Kamijo, T., Weber, J., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M. und Sherr, C. J., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8292-8297
- Kao, C. C., Yew, P. R. und Berk, A. J., 1990, *Virology*, 179, 806-814
- Kask, P. K., Palo, D. U. und Gall, K., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13756-13761
- Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. und Vogelstein, B., 1991, *Science*, 252, 1708-1710
- Kern, S., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Seymor, A., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1992, *Science*, 256, 827-830

- Kieser, A., Weich, H. A., Brandner, G., Marme, D. und Koch, W., 1994, *Oncogene*, 9, 963-969
- Kim, E., Albrechtsen, N. und Deppert, W., 1997, *Oncogene*, 15, 857-869
- Kim, E., Rohaly, G., Heinrichs, S., Gimnopoulos, D., Meissner, H. und Deppert, W., 1999, *Oncogene*, 18, 7310-7318
- Klehr, D., Maass, K. und Bode, J., 1991, *Biochemistry*, 30, 1264-1270
- Ko, L. J. und Prives, C., 1996, *Genes Dev.*, 10, 1054-1072
- Koga, H. und Deppert, W., 2000, *Oncogene*, 19, 4178-4183
- Kohwi-Shigematsu, T., Maass, K. und Bode, J., 1997, *Biochemistry*, 36, 12005-12010
- Komiya, T., Hirashima, T., Kikui, M., Fukuoda, M., Ohno, A. und Kawase, I., 1999, *Anticancer Res.* 19, 4315-4319
- Kubbutat, M. H. G., Ludwig, R. L., Ashcroft, M. und Vousden, K. H., 1998, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 5690-5698
- Kubbutat, M. H. G., Ludwig, R. L., Levine, A. J. und Vousden, K. H., 1999, *Cell Growth Diff.*, 10, 87-92
- Lakowicz, J. R., 1983, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, London
- Lam, K. T. und Calderwood, S. K., 1992, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184, 167-174
- Landers, J. E., Cassel, S. L. und George, D. L., 1997, *Cancer Res.*, 57, 3562-3568
- Lane, D. P. und Crawford, L. V., 1979, *Nature*, 278, 261-263
- Lane, D. P., 1992, *Nature*, 358, 15-16
- Lanyi, A., Deb, D., Seymour, R. C., Ludes-Meyers, J. H. und Subler, M. A., 1998, *Oncogene*, 16, 3169-3176
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, J. und Griffith, J., 1995, *Cell*, 81, 1013-1020
- Levine, A. J., 1997, *Cell*, 88, 323-331
- Li, X. und Coffino, P., 1996, *J. Virol.*, 70, 4509-4516
- Lin, J. Y., Chen, J. D., Elenbaas, B. und Levine, A. J., 1994, *Genes Dev.*, 8, 1235-1246
- Lin, J., Teresky, A. K. und Levine, A. J., 1995, *Oncogene*, 10, 2387-2390

- Lin, J., Wu, X., Chen, J., Chang, A und Levine, A. J., 1995, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. LIX, 215-223
- Linzer, D. I. und Levine, A. J., 1979, Cell, 17, 43-52
- Liu, J., Bramblett, D., Zhu, Q., Lozano, M., Ruoslati, E. und Dudley, J. P., 1997, Mol. Cell. Biol., 17, 5275-5287
- Liu, P. K., Kraus, E., Wu, T. A., Strong, L. C. und Tainsky, M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2267-2278
- Lotem, J. und Sachs, L., 1993, Cell Growth Differ., 4, 41-47
- Lu, H. und Levine, A. J., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 5154-5158
- Ludes-Meyers, J. H., Subler, M. A., Shivakumar, V., Munoz, R. M., Jiang, P., Bigger, J. E., Brown, D. R., Deb, S. P. und Deb, S., 1996, Mol. Cell. Biol., 16, 6009-6019
- Magde, D., Elson, E. L. und Webb, W. W., 1972, Phys. Rev. Lett., 29, 704-708
- Margulies, L. und Sehgal, P. B., 1993, J. Biol. Chem., 268, 15096-15100
- McKinney, K. und Prives, C., 2002, Mol. Cell. Biol., 22, 6797-6808
- McKnight, R. A., Sharnay, A., Sankaran, L., Wall, R. J. und Henninghausen, L., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 6943-6947
- McKnight, R. A., Spencer, M., Wall, R. J. und Henninghausen, L., 1996, Mol. Reprod. Dev., 44, 179-184
- McLure, K. G. und Lee, P. W., 1998, EMBO J., 17, 3342-3350
- Meek, D. W., 1998, Cell Signal., 10, 159-166
- Mekeel, K. L., Tang, W., Kachnic, L. A., Juo, C-M., DeFrank, J. S. und Powell, S. N., 1997, Oncogene, 14, 1847-1857
- Middeler, G., Zerf, K., Jenovai, S., Thulig, A., Tscodrich-Rotter, M., Kubitscheck, U. und Peters, R., 1997, Oncogene, 14, 1407-1417
- Midgley, C. A., Desterro, J. M., Saville, M. K., Howard, S., Sparks, A., Hay, R. T. und Lane, D. P., 2000, Oncogene, 19, 1312-1323
- Mielke, C., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T. und Bode, J., 1990, Biochemistry, 29, 7475-7485
- Milner, J. und Medcalf, E. A., 1991, Cell, 65, 765-774
- Miyashita, T. und Reed, J. C., 1995, Cell, 80, 293-299
- Molinari, M. und Milner, J., 1995, Oncogene, 10, 1849-1854

- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. und Levine, A. J., 1992, *Cell*, 69, 1237-1245
- Morris, G. F., Bisschoff, J. R. und Mathews, M. B., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 895-899
- Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Szakiel, G., Grosse, F. und Deppert, W., 1995, *EMBO J.*, 14, 4442-4449
- Mueller, B. F., Paulsen, D. und Deppert, W., 1996, *Oncogene*, 12, 1941-1952
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Mueller, B., Wiesmueller, L., Deppert, W. und Grosse, F., 1996, *Cell*, 85, 1089-1099
- Munsch, D., Watanabe-Fukunaga, R., Bourdon, J. C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E. und Reisdorf, P., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 3867-3872
- Nagaich, A. K., Zhurkin, V. B., Sakamoto, H., Gorin, A. A., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Appella, E. und Harrington, R. E., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 14830-14841
- Nagata, Y., Anan, T., Yoshida, T., Mizukami, T., Tayt, Y., Fujiwara, T., Kato, H., Says, H., Nakao, M., 1999, *Oncogene*, 18, 6037-6049
- Nakano, K. und Vousden, K. H., 2001, *Mol. Cell*, 7, 683-694
- Napierala, M., Parniewski, P., Pluciennik, A. und Wells, R. D., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 34087-34100
- Nayler, O., Strätling, W., Bourquin, J.P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A. M., Fackelmayer, F. O., Ullrich, A. und Stamm, S., 1998, *Nucleic Acid Res.*, 26, 3542-3549
- Novac, O., Alvarez, D., Pearson, C. E., Price, G. B. und Zannis-Hadjopoulos, M., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 11174-11183
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamshita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. und Tanaka, N., 2000, *Science*, 288, 1053-1058
- Okamoto, K. und Beach, D., 1994, *EMBO J.*, 13, 4816-4822
- Okorokov, A. L., Ponchel, F. und Milner, J., 1997, *EMBO J.*, 16, 6008-6017
- Onliner, J. D., Pieterpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, L., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1993, *Nature*, 362, 857-860
- Owen-Schaub, L. B., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Deisseroth, A. B., Zhang, W-W., Kruzel, E. und Radinsky, R., 1995, *Mol. Cell. Biol.*, 15, 3032-3040

- Palecek, E., Brazdova, M., Brazda, V., Palecek, J., Billova, S., Subramaniam, V. und Jovin, T. M., 2001, *Eur. J. Biochem.*, 268, 573-581
- Pearson, C. E., Zannis-Hadjopoulos, M., Price, G. B. und Zorbas, H., 1995, *EMBO J.*, 14, 1571-1580
- Pearson, C. E., Zorbas, H., Price, G. B., und Zannis-Hadjopoulos, M., 1996, *J. Cell. Biochem.* 63, 1-22
- Peled, A., Zipori, D. und Rotter, V., 1996, *Cancer Res.*, 56, 2148-2156
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S. und Piwnicka-Worms, H., 1997, *Science*, 277, 1501-1505
- Phi-Van, L. und Strätling, W. H., 1990, *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 11, 1-11
- Piechaczek, C., Fetzer, C., Baiker, A., Bode, J. und Lipps, H. J., 1999, *Nucleic Acid Res.*, 27, 426-428
- Pietenpol, J. A., Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W. S. und Kinzler, K. W., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1998-2002
- Pines, J., 1991, *Cell Growth Differ.*, 2, 305-310
- Pluciennik, A., Iyer, R. R., Parniewski, P. und Wells, R. D., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 28386-28397
- Pohl, J., Goldfinger, N., Radler-Pohl, A., Rotter, V. und Schirmacher, V., *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 8, 2078-2081
- Polack, A., Stobls, L., Feederle, R., Schweizer, M., Koch, E., Eick, D., Wiegand, H. und Bornkamm, G. W., 1991, *Oncogene*, 6, 2033-2040
- Poljak, L., Seum, C., Mattioni, T. und Laemmli, U. K., 1994, *Nucleic Acid Res.*, 22, 4386-4394
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1997, *Nature*, 389, 300-305
- Prives, C., Bargonetti, J., Farmer, G., Ferrari, E., Friedlander, P., Wang, Y., Jayaraman, L., Pavletich, N. und Hubscher, U., 1994, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 59, 207-213
- Reed, M., Woelker, B., Wang, P., Wang, Y., Anderson, M. E. und Tegtmeyer, P., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9455-9459
- Reinke, V. und Lozano, G., 1997, *Oncogene*, 15, 1527-1534
- Rigler, R., Mets, Ü., Widengren, J. und Kask, P., 1993, *Eur. Biophys. J.*, 22, 169-175
- Rivett, A. J., 1998, *Curr. Opin. Immunol.*, 10, 110-114

- Roemer, K., 1999, *Biol. Chem.*, 380, 879-887
- Roth, J., Dobbelstein, M., Freedman, D. A., Shenk, T. und Levine, A. J., 1998, *EMBO J.*, 17, 554-564
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W. und Appella E., 1998, *Genes Dev.*, 12, 2831-2841
- Sakamoto, N., Ohshima, K., Montermini, L., Pandolfo, M. und Wells, R. D., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 27171-27177
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E. und Prendergast, G. C., 1997, *Oncogene*, 15, 887-898
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H. und Elledge, S. J., 1997, *Science*, 277, 1497-1501
- Scherer, S. J., Welter, C., Zang, K. D. und Dooley, S., 1994, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221, 722-728
- Selivanova, G., Iotsova, V., Okan, I., Fritsche, M., Strom, M., Groner, B., Grafstrom, R. C. und Wiman, K. G., 1997, *Nat. Med.*, 3, 632-638
- Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., 12. Levine, A. J. und Shenk, T., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 12028-12032
- Sharp, D. A., Kratomicz, S. A., Sank, M. J. und George, D. L., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 38189-38196
- Shaulian, E., Zaubermann, A., Grinsberg, D. und Oren, M., 1992, *Mol. Cell. Biol.*, 12, 5581-5592
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Benzeev, A. und Rotter, V., 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10, 6565, 6577
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R. und Iggo, R., 1996, *Oncogene*, 12, 921-930
- Sherr, C. J., 1998, *Genes Dev.*, 12, 2984-2991
- Shieh, S-Y, Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. und Prives, C., 2000, *Genes Dev.*, 14, 289-300
- Shin, T. H., Paterson, A. J. und Kudlow, J. E., 1995, *Mol. Cell. Biol.*, 15, 4694-4701
- Stief, A., Winter, D. M., Strätling, W. H. und Sippel, A. E., 1989, *Nature*, 341, 343-345
- Sigal, A. und Rotter, V., 2000, *Cancer Res.*, 60, 6788-6793

- Soddu, S., Blandino, G., Scardigli, R., Coen, S., Marchetti, A., Rizzo, M. G., Bossi, G., Ciminio, L., Crescenzi, M. und Sacchi, A., 1996, *J. Cell Biol.*, 134, 1-12
- Soussi, T., Caron de Fromental, C. und May, P., 1990, *Oncogene*, 5, 945-952
- Spiro, C., Richards, J. P., Chandrasekaran, S., Brennan, R. G. und McMurray, C. T., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 4606-4610
- Srivastava, S., Wang, S., Tong, Y. O., Hao, Z. M. und Chang, E., 1993, *Cancer Res.*, 53, 4452-4455
- Stad, R., Ramos, Y. F. M., Litle, N., Grivell, S., Attema, J., van der Erb, A. J. und Jochmsen, A. G., *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 28039-28044
- Stommel, J. M., Marchenko, N. D., Jimenez, G. S., Moll, U. M., Hope, T., J. und Wahl, G. M., 1999, *EMBO J.*, 18, 1660-1672
- Szak, S. T. und Pietenpol, J. A., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274, 3904-3909
- Tang, H. Y., Zhao, K., Pizzolato, J. F., Fonarev, M., Langer, J. C. und Manfredi, J., 1998, *J. Biol. Chem.*, 273, 29156-29163
- Tanimura, S., Ohtsuka, S., Mitsui, K., Shirouzu, K., Yoshimura, A. und Ohtsubo, M., 2000, *FEBS Lett.*, 447, 5-9
- Thut, C. J., Chen, J. L., Klemm, R. und Tjian, R., 1995, *Science*, 267, 100-104
- Truant, R., Xiao, H., Ingles, C. J. und Greenblatt, J., 1993, *J. Biol. Chem.*, 268, 2284-2287
- Tsutsumi-Ihisi, Y., Todakoro, K., Hanaoka, F. und Tsuchida, N., 1995, *Cell Growth Differ.*, 6, 1-8
- Turconi, S., Bingham, R. P., Haupts, U. und Pope, A. J., 2001, *DDT*, 6, 27-39
- Ueba, T., Nosaka, T., Takahashi, J. A., Shibata, F. und Florkiewicz, R. Z., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9009-9013
- Unger, T., Mietz, J. A., Scheffner, M., Yee, C. L. und Howley, P. M., 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13, 5186-5194
- Unger, T., Nau, M. M., Segal, S., und Minna, J. D., 1992, *EMBO J.*, 11, 1383-1390
- Urano, T., Nishimori, H., Han, H., Furuhashi, T., Kimura, Y., Nakamura, Y. und Tokino, T., 1997, *Cancer Res.*, 57, 3281-3287
- van Holde, K. und Zlatanova, J., 1994, *Bioessays*, 16, 59-68
- Varshavsky, A., 1997, *Trends Biochem. Sci.*, 22, 383-387
- Velasco-Miguel, S., Buckbinder, L., Jean, P., Gelbert, L., Talbott, R., Laidlaw, J., Seizinger, B. und Kley, N., 1999, *Oncogene*, 18 127-137

- Venot, C. Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L. und Debussche, L., 1998, EMBO J., 17, 4668-4679
- Waga, S., Shirakawa, H., Mizuno, S. und Yoshida, M., 1990, Nucleic Acids Symp. Ser., 22, 81-82
- Walker, K. K. und Levine, A. J., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 15335-15340
- Wallingford, J. B., Seufert, D. W., Virta, V. C. und Vize, P. D., 1997, Curr. Biol., 7, 747-757
- Wang, B., Dickinson, L. A., Koivunen, E., Ruoslahti, E. und Kohwi-Shigematsu, T., 1995, J. Biol. Chem., 270, 23239-23242
- Wang, Y., Reed, M., Wang, P., Stenger, J. E. Mayr, G., Anderson, M. E., Schwedes, J. F. und Tegtmeyer, P., 1993, Genes Dev., 7, 2575-2586
- Ward, G. K., McKenzie, R., Zannis-Hadjopoulos, M. und Price, G. B., 1990, Exp. Cell Res., 188, 235-246
- Ward, G. K., Shihab-el-Deen, A., Zannis-Hadjopoulos, M. und Price, G. B., 1991, Exp. Cell Res., 195, 92-98
- Weissker, S., Müller, B., Homfeld, A. und Deppert, W., 1992, Oncogene, 7, 1921-1932
- Will, K. und Deppert, W., 1998a, Gene Ther. Mol. Biol., 1, 543-549
- Will, K., Warnecke, G., Albrechtsen, N., Boulikas, T. und Deppert, W., 1998b, J. Cell. Biochem., 69, 260-270
- Will, K., Wamecke, G., Wiesmueller, L. und Deppert, W., 1998c, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13681-13686
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, III E. R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G. und el-Deiry, W., 1997, Nat. Genet., 17, 141-143
- Wu, L., Bayle, J. H., Elenbaas, B., Pavletich, N. P. und Levine, A. J., 1995, Mol. Cell. Biol., 15, 497-504
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, S., Regier, J. L., Trizenberg, S. J., Reinberg, D., Flores, O. und Ingles, C. J., 1993, Nature, 366, 701-704
- Yakovleva, T., Pramanik, A., Kawasaki, T., Tan-No, K., Gileva, I., Lindegren, H., Langel, U., Ekstrom, T. J., Rigler, R., Terenius, L. und Bakalkin, G., 2001, J. Biol. Chem., 276, 15650-15658

-
- Yakovleva, T., Pramanik, A., Terenius, L., Ekstrom, T. und Bakalkin, G., 2002, Trends Biochem. Sci., 27, 612-618
 - Yew, P. R. und Berk, A. J., 1992, Nature, 357, 82-85
 - Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 2001, Mol. Cell, 7, 673-682
 - Yu, Z. K., Geyer, R. K. und Maki, C. G., 2000, Oncogene, 19, 5892-5897
 - Zannis-Hadjopoulos, M., Frappier, L., Khoury, M. und Price, G. B., 1988, EMBO J., 7, 1837-1844
 - Zerrahn, J., Deppert, W., Weidemann, D., Patschinsky, T., Richards, F. und Milner, J., 1992, Oncogene, 7, 1371-1381
 - Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C. und Fornace, A. J. Jr., 1999, Oncogene, 18, 2892-2900

9. Anhang

9.1 Verwendete Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Alanin
Abb	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
c.p.m.	counts per minute
ca	circa
C	Cystein
c	Konzentration
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin
Gly	Glycin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
H	Histidin
His	Histidin
h	Stunde(n)
IR	Infrarot
k	Kilo-
L	Leucin
mA	Milliampere
MAR	matrix associated regions
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
pg	Picogramm
pmol	Picomol
PVDF	Polyvinylidenfluorid

R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAR	Scaffold attachment regions
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
s	Sekunde(n)
S	Serin
Tab	Tabelle
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA
TBS	tris buffered saline
TBST	TBS mit Tween
TEMED	N, N, N', N',-Tetraethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T	Threonin
ÜN	über Nacht
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Tryptophan
wt	Wildtyp

Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Dr. Wolfgang Deppert für die Überlassung des Themas und der Bereitstellung des Laborplatzes. Besonderer Dank geht an Dr. Ella Kim für die fachliche Betreuung und zahlreichen wertvollen Anregungen und Diskussionen. Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Tumorstudiologie“ für die gute Zusammenarbeit und Hilfestellung bei praktischen Problemen.

Besonderer Dank geht an Dipl. Chem. Korden Walter, Dr. Marie Brazdova und Gabriele Warnecke für die gute Stimmung im Labor und das gute Teamwork.

Dr. Stefan Jäger danke ich für die Hilfestellungen bei den FIDA-Messungen und Dr. D. Cherny für die Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und Birte, ohne die diese Arbeit wohl nicht zu Stande gekommen wäre.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

"Einfluss der DNA-Konformation auf die Bindungsaffinität von
wt und mutiertem p53"

selbständig verfasst und keine als die angegebenen Quellen verwendet habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Hamburg, 10.04.03

Thomas Göhler

Lebenslauf

Name:		Thomas Göhler
Geburtsdatum:		28.01.1972
Geburtsort:		Oldenburg i.O.
Familienstand:		ledig
Schulbildung:	1978-1982	Grundschule in Oldenburg
	1982-1984	Orientierungsstufe in Oldenburg
	1984-1991	Gymnasium in Oldenburg
Zivildienst:	1991-1993	Rotes Kreuz/Oldenburg
Hochschule:	1993-1996	Studium der Chemie, Rheinisch Westfälische Technische Hochschule Aachen, Vordiplom 1996
	1996-1999	Studium der Chemie, Universität Bremen, Diplom 1999 Titel der Diplomarbeit: „Strukturuntersuchung von supramolekularen Aggregaten aus DNA,- Protein- und Metallkomponenten durch Transmissionselektronen- mikroskopie“; Abt. Biotechnologie und molekulare Genetik; Prof.Dr. D. Blohm
Promotion:	2000-2003	Heinrich-Pette Institut, Hamburg Titel der Dissertation: „Einfluss der DNA- Konformation auf die Bindungsaffinität von wt und mutiertem p53“; Abt. Tumorstudiologie; Prof.Dr. W. Deppert