

Trinucleotide Repeats (TNRs):
**DNA-Bindungssubstrate für Wildtyp und
mutiertes p53 und Modulatoren der
p53-abhängigen Transkription**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Korden Martin Walter
aus Hamburg

Hamburg 2004

Der praktische Teil der vorliegenden Doktorarbeit wurde in der Zeit von November 2000 bis September 2004 am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie der Universität Hamburg in der Abteilung Tumorstudiologie von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Teilergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit wurden bereits in folgenden Beiträgen veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Veröffentlichungen:

Walter, K., Brazdova, M., Warnecke, G., Kim, E. and Deppert, W. Interaction of wt and mutp53 with TNRs. In Vorbereitung

List, H.-J. und Walter, K. Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Bindeproteinen. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin. Im Druck

Konferenz:

Walter, K. (2002). Interaction of wild type p53 with TNRs *in vitro* and its implications for the p53-regulated transcription. *NATO Science Programme. Molecular Mechanisms of DNA Triplet Repeat Instability*. Norwich, UK.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Deppert für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas und für die hervorragende Betreuung.

Prof. Dr. Ulrich Hahn danke ich für die Übernahme des Gutachtens.

Desweiteren möchte ich Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein und Dr. Patrick Ziegel Müller für die Teilnahme als Fragesteller an der Disputation danken.

Außerdem geht mein Dank an Dr. Ella Kim für die fachliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Einen großen Anteil am Gelingen der vorliegenden Arbeit haben meine Kollegen Dr. Marie Brazdova, Dr. Thomas Göhler, Gabriele Warnecke und Doris Weidemann. In diesem Sinne: Ein herzliches Dankeschön für die sehr gute Laboratmosphäre.

Für das so wichtige „Drumherum“ der Promotionszeit geht mein Dank an Silke Dehde, Dr. Irene Dornreiter-Nicholas, Andrea Hermannstädter, Dr. Frauke Krepulat, Marion Kurth, Semsä Reus, Julia Ritz, Dr. Gabor Rohaly, Issaka Sherif Gigima, Lars Tögel und Britta Wittek.

Ich möchte mich natürlich auch bei meinen Schwiegereltern und allen Freunden bedanken, die - jeweils auf ihre Art und Weise - zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, Horst und Dagmar Walter, für die Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Frau Garnet (ohne Dich wäre diese Arbeit wohl nicht zu Stande gekommen) und an unsere Tochter Fenna (Dein Stern wird immer für uns „lachen“).

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	p53-Struktur	1
1.1.1	N-terminale Domäne	2
1.1.2	DNA-Bindungsdomäne	3
1.1.3	C-terminale Domäne	4
1.2	DNA-Bindung	5
1.2.1	p53-DNA-Konsensus-Sequenz	5
1.2.2	Tetramerisierung	5
1.2.3	Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53.....	6
1.2.3.1	Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 an lineare DNA	6
1.2.3.2	Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 an strukturierte DNA	7
1.2.4	Nicht-Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53	8
1.3	Regulation der p53-Aktivität	8
1.3.1	Stabilisierung von p53	9
1.3.2	Aktivierung der p53-abhängigen Transkription	10
1.4	Genomische Stabilität	11
1.4.1	Zellzyklus-Kontrolle	11
1.4.2	Apoptose	12
1.4.3	DNA-Reparatur	12
1.5	Funktionen von mutiertem p53	13
1.5.1	Dominant-negativer Effekt	14
1.5.2	<i>Gain of Function</i>	14
1.6	<i>Trinucleotide Repeats</i> (TNRs)	16
2.	AUFGABENSTELLUNG	18
3.	MATERIAL	20
3.1	Eukaryotische Zelllinien	20
3.1.1	Humane Zelllinien	20
3.1.2	Insektenzelllinien	20

3.2	Prokaryotische Zellen	20
3.3	Baculoviren	20
3.4	Plasmide	21
3.5	Antikörper	22
3.6	Enzyme	22
3.7	Molekulargewicht-Standards	23
3.8	Chemikalien	23
3.9	Radiochemikalien	25
3.10	Kits	25
3.11	Oligonukleotide	26
3.12	Verbrauchsmaterialien	27
3.13	Geräte	28
3.14	Puffer und Stammlösungen	29
3.15	Kulturmedien	30
4.	METHODEN	32
4.1	Herstellung von radioaktiv-markierten DNA-Substraten	32
4.1.1	Radioaktive 5'-Markierung von Oligonukleotiden	32
4.1.2	Hybridisierung von radioaktiv-markierten Oligonukleotiden	32
4.1.3	Diffusionselution von radioaktiv-markierten DNA-Substraten	33
4.1.4	Sequenzierung von Oligonukleotiden nach Maxam-Gilbert	33
4.2	Charakterisierung von Protein-DNA-Interaktionen	35
4.2.1	Bandshift-Analyse (EMSA)	35
4.2.2	Charakterisierung der DNA-Bindungsspezifität	36
4.2.3	DNase I-Protektionsexperiment	36
4.2.4	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	37
4.2.5	Luziferase-Reporter-Aktivitätstest	40
4.3	Charakterisierung von DNA-Sekundärstrukturen	41
4.3.1	Enzymatische Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur von DNA-Substraten mit struktur-spezifischen Endonukleasen	41
4.3.2	Chemische Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur von DNA-Substraten mit DEPC und OsO ₄	41
4.3.3	2D-Agarosegelelektrophorese	42

4.3.3.1	Generierung von DNA-Topoisomeren	43
4.3.3.2	2D-Agarosegelelektrophorese von DNA-Topoisomeren	43
4.4	Molekularbiologische Methoden	44
4.4.1	Quantifizierung von DNA	44
4.4.2	Gelelektrophoresen für DNA	44
4.4.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	45
4.4.2.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
4.4.2.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sequenziergel)	46
4.4.2.4	Färbung von DNA in Gelen	46
4.4.3	Reinigung von DNA	46
4.4.3.1	Elution von DNA aus Agarosegelen	46
4.4.3.2	Reinigung von PCR-Produkten	47
4.4.3.3	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	47
4.4.3.4	Ethanol-Fällung von DNA	47
4.4.4	Enzymatische Modifizierung von DNA	47
4.4.4.1	DNA-Restriktion	47
4.4.4.2	Generierung von glatten DNA-Enden	47
4.4.4.3	5'-Dephosphorylierung von DNA	48
4.4.4.4	5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden	48
4.4.4.5	DNA-Ligation	48
4.4.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
4.4.5.1	Standard-PCR	49
4.4.5.2	PCR von TNR-tragender Plasmid-DNA	49
4.4.5.3	PCR von TNR-tragender genomischer DNA	50
4.4.5.4	PCR von ChIP-DNA	50
4.4.4.5	PCR-Analyse von Bakterienkolonien	50
4.4.6	Transformation von Bakterien.....	51
4.4.6.1	Herstellung von chemisch-kompetenten Bakterien	51
4.4.6.2	Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien	51
4.4.7	Kultivierung von Bakterien	52
4.4.7.1	Anzucht von Bakterien	52
4.4.7.2	Anzucht von TNR-Plasmid-tragenden Bakterien	52
4.4.7.3	Anlegen von Dauerkulturen	52
4.4.8	Isolierung von Plasmid-DNA	52

4.4.8.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	52
4.4.8.2	Maxipräparation von Plasmid-DNA	52
4.4.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA (<i>Thermal Cycle Sequencing</i>)	53
4.4.10	Präparation von genomischer DNA	53
4.5	Konstruktion von Vektoren	54
4.5.1	Konstruktion des TNR-tragenden Vektors pEYFP-106/5	54
4.5.2	Konstruktion des pGL3-mdm2-APP-Vektors	54
4.5.2.1	Konstruktion von pGL3-mdm2-APP-Vektoren mit deletierten p53- Bindungsstellen	55
4.5.2.2	Konstruktion von pGL3-mdm2-APP-Vektoren mit insertierten TNR- Sequenzen	55
4.6	Proteinbiochemische Methoden	55
4.6.1	Proteinbestimmung nach Bradford	55
4.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
4.6.3	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	56
4.6.4	Western-Blotting	57
4.6.5	Extraktion von rekombinanten p53-Proteinen aus Insektenzellen	58
4.6.6	FPLC-Aufreinigung von rekombinanten p53-Proteinen	59
4.6.7	Quantifizierung von FPLC-gereinigten p53-Proteinen	60
4.6.8	Reinigung von Antikörpern	60
4.7	Zellkultur	60
4.7.1	Kultivierung von Insektenzellen	60
4.7.2	Baculovirus-Infektion von Insektenzellen zur Expression von rekombinanten p53-Proteinen	60
4.7.3	Kultivierung von adhärent wachsenden Zelllinien	61
4.7.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	61
4.7.5	Transfektion von Zellen mittels Nukleofektion	62
4.7.6	Transfektion von Zellen mittels Effectene™	62
4.7.7	Etablierung rekombinanter TNR-tragender Zelllinien	62
5.	ERGEBNISSE	64
5.1	Die struktur-spezifische Interaktion von p53 mit TNRs	64
5.1.1	Darstellung von TNR-Substraten für p53-TNR-Bindungsstudien	64

5.1.1.1	Darstellung von linearen TNR-Substraten	65
5.1.1.2	Darstellung von strukturierten TNR-Substraten	66
5.1.1.3	Restriktionskontrolle von linearen und strukturierten TNR-Substraten	67
5.1.2	Interaktion von wtp53 mit TNRs <i>in vitro</i>	67
5.1.2.1	DNA-Bindung von wtp53 an lineare und strukturierte TNR-Substrate	68
5.1.2.2	DNA-Bindung von p53 Δ 30 an lineare und strukturierte TNR-Substrate	69
5.1.3	Interaktion von mutp53 mit TNRs <i>in vitro</i>	70
5.1.3.1	DNA-Bindung von G245S an lineare und strukturierte TNR-Substrate	70
5.1.3.2	DNA-Bindung von R248P an lineare und strukturierte TNR-Substrate	71
5.1.3.3	DNA-Bindung von R273H an lineare und strukturierte TNR-Substrate	72
5.1.4	Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur von TNRs	73
5.1.5	Charakterisierung der DNA-Bindung von wtp53 und mutp53 R273H an TNRs	77
5.1.5.1	Charakterisierung der DNA-Bindung von wtp53 an lineare TNR-Substrate	78
5.1.5.2	Charakterisierung der DNA-Bindung von wtp53 an strukturierte TNR- Substrate	80
5.1.5.3	Charakterisierung der DNA-Bindung von mutp53 R273H an lineare TNR- Substrate	81
5.1.5.4	Charakterisierung der DNA-Bindung von mutp53 R273H an strukturierte TNR-Substrate	83
5.1.6	Interaktion von wtp53 und mutp53 R273H mit TNRs <i>in vivo</i>	84
5.2	Die sequenz-spezifische Interaktion von wtp53 mit dem humanen <i>mdm2</i> -Promotor	86
5.2.1	Der humane <i>mdm2</i> -Promotor	87
5.2.2	DNA-Bindung von wtp53 an die isolierten p53-Bindungsstellen des humanen <i>mdm2</i> -Promotors	88
5.2.3	Spezifität der DNA-Bindung von wtp53 an die isolierten p53- Bindungsstellen des humanen <i>mdm2</i> -Promotors	89
5.2.4	Charakterisierung der DNA-Bindung von wtp53 an die isolierte zweite p53- Bindungsstelle des humanen <i>mdm2</i> -Promotors	92
5.2.5	Einfluss des C-Terminus auf die DNA-Bindung von p53 an die isolierten p53-Bindungsstellen des humanen <i>mdm2</i> -Promotors	94
5.2.6	Funktionelle Analyse des humanen <i>mdm2</i> -Promotors <i>in vivo</i>	95
5.3	Der Einfluss von TNRs auf die wtp53-abhängige Transkription	97

5.3.1	Spezifität der DNA-Bindung von wtp53 an TNRs	97
5.3.2	Einfluss der TNR-Orientierung und -Position auf die wtp53-abhängige Transkription	99
5.3.3	Einfluss der TNR-Länge auf die wtp53-abhängige Transkription	101
5.3.4	Einfluss der TNR-Struktur auf die wtp53-abhängige Transkription	102
5.3.4.1	Bildung von DNA-Strukturen innerhalb TNR-tragender Plasmid-DNA	102
5.3.4.2	Einfluss der Plasmid-DNA-Topologie auf die wtp53-abhängige Transkription	105
6.	DISKUSSION	107
6.1	Interaktion von p53 mit TNRs	107
6.1.1	DNA-Bindung von wtp53 an lineare TNRs	107
6.1.2	DNA-Bindung von wtp53 an strukturierte TNRs	110
6.1.3	DNA-Bindung von mutp53 an TNRs	111
6.1.4	Einfluss von TNRs auf die wtp53-abhängige Transkription	113
6.1.5	Mögliche biologische Relevanz der p53-TNR-Interaktion	114
6.2	Interaktion von wtp53 mit dem humanen <i>mdm2</i> -Promotor	116
6.2.1	Sequenz-spezifische DNA-Bindung von wtp53 an lineare DNA	116
6.2.2	Sequenz-spezifische DNA-Bindung von wtp53 an strukturierte DNA	117
6.2.3	Einfluss der DNA-Konformation des humanen <i>mdm2</i> -Promotors auf die wtp53-abhängige Transkription	119
6.3	Komplexität der p53-DNA-Interaktion	120
7.	ZUSAMMENFASSUNG	122
8.	SUMMARY	123
9.	LITERATUR	124
	Lebenslauf	137
	Eidesstattliche Versicherung	138

ABKÜRZUNGEN

a	atto (10^{-18})
Ab	<i>Antibody</i>
abs.	absolut
Abb.	Abbildung
APS	Amminiumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base(n)
bp	Basenpaar(e)
BS	Bindungsstelle
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
c	centi (10^{-2})
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
CON	<i>DNA-consensus-sequence</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>
CTD	C-terminale Domäne
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
ds	<i>Double-stranded</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
EOI	<i>Efficiency of infection</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>
f	femto (10^{-15})
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FL	<i>Full length</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HACoCl ₃	Hexammincobalt(III)-chlorid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
HP	<i>Hairpin</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
k	kilo (10^3)
l	Liter
LB	Luria Bertani
LIN	<i>Linear</i>
LPA	<i>Linear polyacrylamide</i>
Luc	<i>Luciferase</i>
m	Meter oder milli (10^{-3})
M	molar
MAR/SAR	<i>Matrix/scaffold attachment region</i>
MBN	<i>Mung bean nuclease</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MES	2-[Morpholino]ethansulfonsäure
min	Minute(n)

MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mut	Mutante(n)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
n	nano (10 ⁻⁹)
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NTD	N-terminale Domäne
oc	<i>Open circle</i>
OD	optische Dichte
p	pico (10 ⁻¹²)
PAb	<i>Polyoma Antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PGS	Protein-G Sepharose
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	<i>Relaxed</i>
REG	Regulationsdomäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
sc	<i>Supercoiled</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ss	<i>Single-stranded</i>
T7-EndoI	T7-Endonuklease I
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAD	Transaktivierungsdomäne
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TET	Tetramerisierungsdomäne

TNR	<i>Trinucleotide repeat</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t-RNA	Transfer-RNA
U	<i>Units</i>
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

David Lane und Arnold Levine entdeckten 1979 unabhängig voneinander das Protein p53 (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Etwa zehn Jahre später stellte sich heraus, dass dieses Protein ein Tumorsuppressor ist und nicht, wie zuvor vermutet, ein Onkogen (Finlay *et al.*, 1989). Seitdem ist p53 ins Zentrum der Krebsforschung gerückt und wurde 1993 von der Fachzeitschrift *Science* sogar zum Molekül des Jahres gekürt. Bisläng (Stand: Oktober 2004) wurden mehr als 32.500 Veröffentlichungen zum Thema p53 publiziert; damit ist p53 das weltweit wohl am intensivsten untersuchte Molekül seit seiner Entdeckung.

Die besondere medizinische Bedeutung von p53 erklärt sich aus dem Befund, dass p53 in nahezu 50 % aller menschlichen Tumoren mutiert ist (Soussi und Beroud, 2001). Der humane Tumorsuppressor p53 reguliert nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion von Apoptose oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Der Verlust der p53-Funktion spielt daher eine kritische Rolle bei der Entstehung von Krebs (Hollstein *et al.*, 1991).

1.1 p53-Struktur

Das humane p53-Protein besteht aus 393 Aminosäuren und setzt sich modular aus insgesamt vier funktionellen Domänen zusammen: (1) der N-terminalen Domäne (NTD), (2) der zentralen DNA-Bindungsdomäne (DBD), (3) der C-terminalen Tetramerisierungs- (TET) und (4) der Regulationsdomäne (REG).

p53 ist ein evolutionär konserviertes Protein. Durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies konnten fünf phylogenetisch hochkonservierte Regionen (I-V) nachgewiesen werden (Soussi und May, 1996).

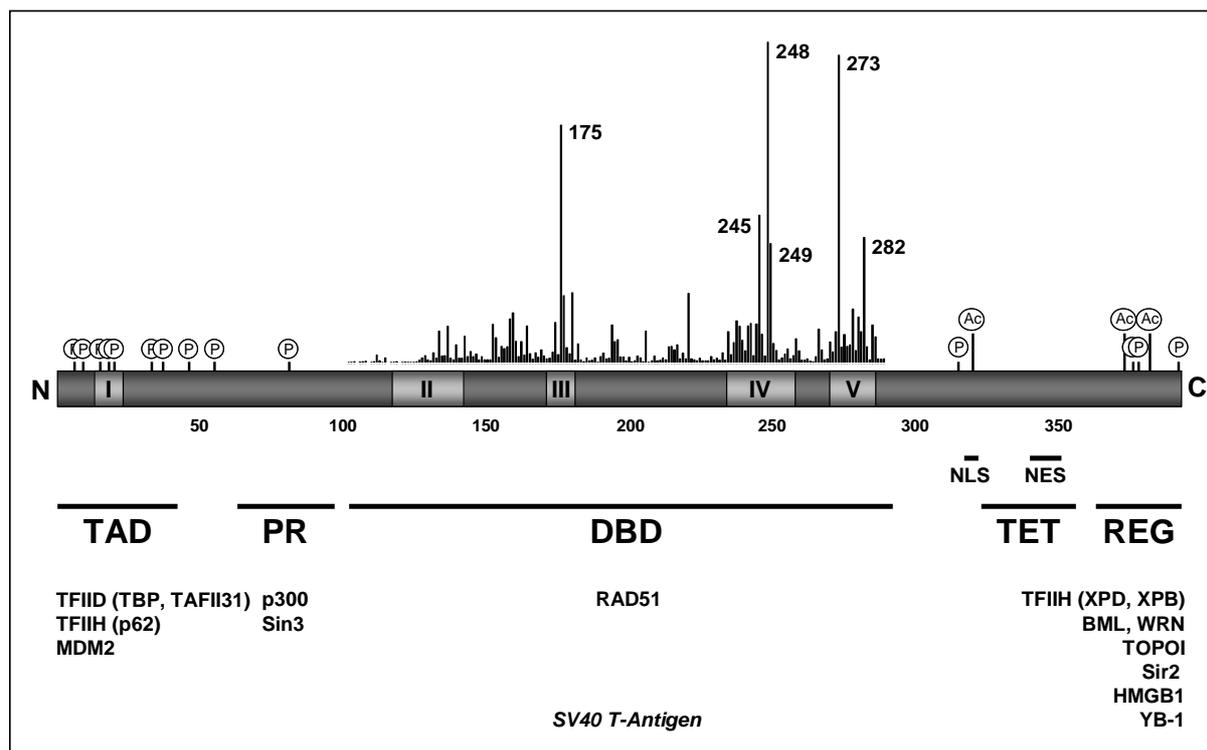


Abb. 1 Domänenstruktur von p53.

Römische Ziffern kennzeichnen die fünf phylogenetisch hochkonservierten Regionen von p53. Phosphorylierungs- (P) und Acetylierungsstellen (Ac) sind markiert. Die vertikalen Balken markieren Punktmutationen innerhalb der DBD, wobei die relative Länge der Balken die relative Häufigkeit widerspiegelt. Horizontale Balken unterhalb der p53-Struktur kennzeichnen die Domänen. Die aufgeführten Proteine interagieren mit den entsprechenden Domänen und werden im Text beschrieben.

1.1.1 N-terminale Domäne

Die N-terminale Domäne (NTD) setzt sich aus der Transaktivierungsdomäne (TAD) (Aminosäure 1 - 42), und der prolin-reichen Region (PR) (Aminosäure 63 - 97) zusammen (Fields und Jang, 1990; Walker und Levine, 1996). Strukturell existieren nur wenige Informationen über den N-terminalen Bereich von p53. Durch NMR-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der isolierte N-Terminus, bis auf kurze instabile Sekundärstrukturelemente, weitgehend unstrukturiert vorliegt (Lee *et al.*, 2000; Dawson *et al.*, 2003). Diese Beobachtung trifft auch auf eine Vielzahl von TADs anderer Transkriptionsfaktoren zu (Triezenberg, 1995).

Die TAD von p53 interagiert mit Komponenten des Transkriptionsfaktors TFIID als Bestandteil der basalen Transkriptionsmaschinerie. Die Initiation der p53-abhängigen Transkription erfolgt durch die Interaktion von p53 mit den beiden Komponenten TBP (*TATA-box binding*

protein) (Seto *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1993) und TAFII31 (*TBP-associated factor*) (Lu und Levine, 1995).

p53 kann als transkriptioneller Aktivator oder als transkriptioneller Repressor fungieren. Die Regulation der Transkriptionsaktivität wird durch Interaktion des Co-Aktivators p300 (Dornan *et al.*, 2003) bzw. des Co-Repressors Sin3 (Murphy *et al.*, 1999; Zilfou *et al.*, 2001) mit der prolinreichen Region erreicht. Die prolinreiche Region, die aus fünf Wiederholungen der Aminosäure-Sequenz PXXP (P: Prolin und X: beliebige Aminosäure) besteht, wird für die p53-vermittelte Apoptose (Sakamuro *et al.*, 1997; Venot *et al.*, 1998) und für die Unterdrückung des Tumorwachstums benötigt (Walker und Levine, 1996).

1.1.2 DNA-Bindungsdomäne

Die DNA-Bindungsdomäne (DBD) von p53 (Aminosäure 102 - 292) vereinigt zwei biochemische Funktionen von p53: die DNA-Bindungsaktivität (Pavletich *et al.*, 1993) und die 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Mummenbrauer *et al.*, 1996). Beide Funktionen werden gegensätzlich reguliert, d. h. p53 verliert seine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wenn es für die sequenz-spezifische Bindung aktiviert wird und umgekehrt (Janus *et al.*, 1999a, 1999b; Albrechtsen *et al.*, 1999).

Die Röntgenstrukturanalyse der isolierten DBD im Komplex mit DNA zeigt, dass die DNA-Bindungsdomäne von p53 aus einem β -Sandwich besteht, das aus zwei antiparallelen β -Faltblättern zusammengesetzt ist und den hydrophoben Kern der Domäne bildet (Cho *et al.*, 1994). Das β -Sandwich dient als Gerüst für zwei strukturelle Elemente, die die DNA-bindende Oberfläche von p53 darstellen: ein Loop-Sheet-Helix-Motiv (LSH-Motiv) und zwei große Loops (L2 und L3). Damit weist die zentrale Domäne von p53 eine bemerkenswerte Ähnlichkeit mit der Struktur von Immunoglobulinen auf (Cho *et al.*, 1994). Das Ig-Motiv DNA-bindender Proteine weisen neben p53 auch Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (*nuclear factor κ B*), NFAT1 (*nuclear factor of activated T-cells 1*), STAT1 und STAT3 β (*signal transducer and activator of transcription 1 und 3 β*) auf (Nagata *et al.*, 1999). L1 und H2 binden als Bestandteile des LSH-Motivs innerhalb der großen Furche, während L3 Kontakte mit der kleinen Furche eingeht. Die beiden Loops L2 und L3 bewirken zusammen mit der kurzen H1-Helix durch die tetraedrische Koordination eines Zn^{2+} -Ions die Stabilisierung der gesamten Domäne (Cho *et al.*, 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der H1-Helix eine essenzielle Rolle bei der intermolekularen Dimerisierung der DBD zukommt (Klein *et al.*, 2001).

Bis 2002 wurden mehr als 15.000 p53-Punktmutationen identifiziert, von denen etwa 96 % in der DBD lokalisiert sind. Dabei ist für bestimmte Codons die Häufigkeit von Mutationen extrem erhöht. Diese so genannten *Hot-Spot*-Mutationen betreffen die sechs Aminosäuren R175, G245, R248, R249, R273 und R282 (<http://www.iarc.fr/p53>; Martin *et al.*, 2002). Aufgrund der Strukturdaten werden die tumor-assoziierten Mutationen in zwei Klassen eingeteilt: DNA-Kontaktmutanten (Klasse I) betreffen Aminosäuren, die direkt an der DNA-Bindung beteiligt sind. Zu dieser Klasse gehören die beiden am häufigsten mutierten Aminosäuren R248 und R273. Strukturmutanten (Klasse II) hingegen betreffen Aminosäuren, die für die konformationelle Integrität der DBD verantwortlich sind. Zu dieser Klasse zählen R175, G245, R249 und R282 (Cho *et al.*, 1994).

1.1.3 C-terminale Domäne

Die C-terminale Domäne (CTD) enthält die Tetramerisierungsdomäne (TET) (Aminosäure 323 - 356) und die stark basische Regulationsdomäne (REG) (Aminosäure 363 - 393). Ferner verbindet ein flexibler Linker (*hinge region*) die DBD mit der TET (May und May, 1999). Darüber hinaus enthält die CTD das primäre Kernlokalisierungssignal (NLS; *nuclear localization signal*) (Aminosäure 317 - 322) und das Kernexportsignal (NES; *nuclear export signal*) (Aminosäure 340 - 351) (Dang und Lee 1989; Shaulsky *et al.*, 1990; Stommel *et al.*, 1999).

Die Struktur der TET wurde kristallographisch und NMR-spektroskopisch aufgeklärt (Clöre *et al.*, 1995; Jeffrey *et al.*, 1995). Die TET besteht aus einem β -Strang und einer α -Helix, die jeweils durch einen einzelnen Aminosäure-Rest voneinander getrennt sind. Die TET liegt unter physiologischen Bedingungen als Tetramer (Dimer eines Dimers) vor. Bei der Dimerisierung assoziieren zwei Monomere über ihre β -Stränge miteinander und bilden ein antiparalleles β -Faltblatt und ein Helix-Helix-Interface, über das wiederum zwei Dimere miteinander interagieren (Clöre *et al.*, 1995). Bei der DNA-Bindung spielt der Oligomerisierungsstatus von p53 eine entscheidende Rolle (vgl. 1.2.2).

Die REG innerhalb der CTD besteht aus neun basischen Aminosäuren und reguliert sowohl die sequenz-unspezifische (vgl. 1.2.4) als auch die sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 (vgl. 1.2.3).

1.2 DNA-Bindung

Der Tumorsuppressor p53 besitzt im Gegensatz zu vielen anderen Transkriptionsfaktoren zwei DNA-bindende Domänen: eine zentrale sequenz-spezifische DBD, die mit spezifischen Promotor-Elementen interagiert und eine basische REG, die im Gegensatz zur DBD keine Sequenz-Spezifität aufweist.

1.2.1 p53-DNA-Konsensus-Sequenz

p53 reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von mehr als 150 Genen (Zhao *et al.*, 2000). 1991 wurde RGC (*ribosomal gene cluster*), welches drei Kopien des Pentanukleotid-*Repeats* TGCCT aufweist, als erstes DNA-Bindungsmotiv für p53 identifiziert (Kern *et al.*, 1991). Bereits ein Jahr später wurde die DNA-Konsensus-Sequenz durch die systematische Analyse genomischer DNA ermittelt (El-Deiry *et al.*, 1992). Die p53-Konsensus-Sequenz (p53CON) besteht aus mindestens zwei hintereinander angeordneten Dekameren, wobei jedes Dekamer aus zwei invertierten pentameren *Repeats* besteht. Die Sequenz eines Dekamers setzt sich zusammen aus: 5'-[RRRCWWGYYY]-3' (R = A oder G, W = A oder T, Y = C oder T). Dabei können die dekameren Elemente durch einen *Spacer* von 0 bis 21 Basen voneinander getrennt werden, ohne dass p53 seine Bindungsaffinität verliert (Waterman *et al.*, 1995). Allerdings weisen funktionelle p53-Bindungsstellen keine oder nur sehr kurze *Spacer* auf (Tokino *et al.*, 1994). DNA-Bindungsstudien zeigten, dass Wildtyp p53 (wtp53) nur dann sequenz-spezifisch DNA binden kann, wenn sich die zuvor ermittelte p53CON aus mindestens zwei Pentameren zusammensetzt und die beiden dekameren Bindungsstellen auf der gleichen Seite der Doppelhelix lokalisiert, d. h. durch ganze helikale Windungen voneinander getrennt sind (Wang *et al.*, 1995).

1.2.2 Tetramerisierung

p53 interagiert als Tetramer (Dimer eines Dimers) sequenz-spezifisch mit der DNA-Konsensus-Sequenz. Tetramere sind in der Lage, durch die Interaktion eines Dimers mit einer Halbseite der Konsensus-Sequenz an DNA zu binden; allerdings wird für die stabile Bindung die simultane Interaktion des zweiten Dimers mit der anderen Halbseite benötigt (Friedman *et al.*, 1993; McLure und Lee, 1998, 1999). Daneben wird durch die p53-induzierte Krümmung (*bending*) und Verdrillung (*twisting*) der DNA zusätzlich die Stabilität des p53-DNA-Komplexes erhöht (Nagaich *et al.*, 1997a, 1997b). Da die N-Termini an der konvexen Seite der gekrümmten DNA

lokalisiert sind, kann die Interaktion mit anderen Proteinen infolge lokaler DNA-Konformationsänderungen zu einer erhöhten DNA-Bindungsaffinität führen. Der C-Terminus beeinflusst durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der DNA direkt die Bindungseigenschaften der DBD (Nagaich *et al.*, 1999).

Tetramere p53-DNA-Komplexe können zudem durch DNA-*Looping* mit anderen tetrameren p53-DNA-Komplexen interagieren und dadurch Multimere bilden. Diese Interaktion wird als *top-to-bottom* Interaktion bezeichnet und spielt neben der Tetramerisierung und den so genannten *side-to-side* Interaktionen zwischen monomeren p53-Molekülen eine wichtige Rolle bei der Transaktivierung (Stenger *et al.*, 1994).

1.2.3 Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53

Die Beobachtung, dass es sich bei p53 um einen latenten Transkriptionsfaktor handelt, der erst nach genotoxischem Stress aktiviert wird, führte in der Literatur zu einer Reihe von p53-DNA-Bindungsmodellen.

1.2.3.1 Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 an lineare DNA

C-terminal unmodifiziertes p53 liegt gegenüber linearer DNA als latentes Tetramer vor und bindet *in vitro* erst nach Aktivierung durch C-terminale Modifikationen sequenz-spezifisch an lineare DNA (Hupp *et al.*, 1992).

Die Überführung von der latenten in die aktive Form von p53 erfolgt nach dem allosterischen Modell durch die Aufhebung der intramolekularen Wechselwirkung zwischen der CTD und der DBD infolge einer Konformationsänderung durch C-terminale Modifikationen (Hupp und Lane, 1994). Mittels NMR-Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die Konformationen von latenten und aktiven p53-Molekülen nahezu identisch sind, und dass die CTD nicht mit der DBD von p53 interagiert (Ayed *et al.*, 2001). Das sterische Modell geht davon aus, dass die CTD durch sequenz-unspezifische Interaktion mit genomischer DNA die DBD von p53 daran hindert, sequenz-spezifisch zu binden (Anderson *et al.*, 1997). Jedoch konnte auch dieses Modell durch kompetitive DNA-Bindungsstudien widerlegt werden (Yakovleva *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum allosterischen und sterischen Modell geht das Zwei-Bindungsstellen Modell unter Berücksichtigung der p53-Proteinstruktur davon aus, dass die beiden DNA-bindenden Regionen von p53 direkt an der DNA-Bindung beteiligt sind (Palecek *et al.*, 2001; Yakovleva *et al.*, 2001). Der Aminosäurerest R280 ist innerhalb der H2 α -Helix der DBD von p53 lokalisiert und an der

sequenz-spezifischen nicht jedoch an der sequenz-unspezifischen DNA-Bindung beteiligt (Cho *et al.*, 1994; Nagaich *et al.*, 1997b). Bei der DNA-Bindung bewirkt die CTD, dass die H2 α -Helix der DBD aus sterischen Gründen nicht mit der DNA interagieren kann. Andere DNA-bindende Bereiche innerhalb der DBD sind jedoch nach wie vor dazu in der Lage. Modifikationen oder Deletion der REG führen zur Aufhebung dieser intramolekularen Wechselwirkung und die DBD kann über den Aminosäurerest R280 sequenz-spezifisch mit der DNA interagieren (Yakovleva *et al.*, 2001).

Die Aktivierung der sequenz-spezifischen Bindung von p53 an lineare B-DNA ist das Resultat zweier durch C-terminale Modifikationen hervorgerufene Eigenschaften: Inhibierung der sequenz-unspezifischen und Aktivierung der sequenz-spezifischen Bindung der DBD (Wölcke *et al.*, 2003).

1.2.3.2 Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 an strukturierte DNA

Im Gegensatz zu den vorherigen Bindungsmodellen beschreibt das DNA-Struktur Modell die sequenz-spezifische Bindung von p53 an strukturierte DNA (Kim *et al.*, 1997; Kim und Deppert, 2003).

Infolge interner Symmetrie-Elemente der p53CON haben p53-Bindungsstellen das Potential, DNA-Strukturen auszubilden. Deshalb wurde postuliert, dass nicht nur die DNA-Sequenz, sondern auch strukturelle Eigenschaften der p53CON bei der Interaktion mit p53 eine entscheidende Rolle spielen (Kim *et al.*, 1997, 1999; Göhler *et al.*, 2002). DNA-Bindungsstudien mit DNA-*Hairpins* (Göhler *et al.*, 2002), DNA-Mikrozirkeln (McKinney und Prives, 2002) und scDNAs (*supercoiled* DNA) (Palecek *et al.*, 2004) zeigen, dass p53 *in vitro* ohne Aktivierung sequenz-spezifisch an strukturierte DNA bindet und dass C-terminale Modifikationen die Bindung inhibieren. Infolgedessen fungiert die REG als positiver Regulator bei der sequenz-spezifischen Bindung von p53 an strukturierte DNA (Kim *et al.*, 1997; Kim und Deppert, 2003).

Das DNA-Struktur Modell wird außerdem durch die Beobachtung unterstützt, dass Proteine, die eine Änderung der DNA-Konformation induzieren, die DNA-Bindungseigenschaften von p53 beeinflussen. HMGB-1 (*high mobility group box 1*), ein chromosomales non-Histon Protein mit architektonischen DNA-Bindungseigenschaften, erhöht *in vitro* die DNA-Bindungsaffinität von p53 (McKinney und Prives, 2002). Daneben stimuliert die Interaktion von p53 mit SWI/SNF, einem *Chromatin-Remodeling-Komplex*, die Transkriptionsaktivität von p53 *in vivo* (Lee *et al.*, 2002).

1.2.4 Nicht-Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53

In einer Reihe von DNA-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass p53 auch nicht-sequenz-spezifische DNA-Bindungseigenschaften aufweist. p53 bindet *in vitro* eine Vielzahl ungewöhnlicher DNA-Substrate: ssDNA (*single stranded DNA*) und D-Loops (Bakalkin *et al.*, 1994, 1995; Selivanova *et al.*, 1996), IR-geschädigte DNA (Reed *et al.*, 1995), DNA mit Basenfehlpaarungen (*DNA mismatches*) (Lee *et al.*, 1995; Szak *et al.*, 1999; Degtyareva *et al.*, 2001), Holliday Junctions (Lee *et al.*, 1997), negative scDNA (Palecek *et al.*, 1997, 2001), Rekombinationsintermediate (Dudenhöffer *et al.*, 1998), ssDNA-Überhänge und interne ssDNA-Bereiche (*DNA gaps*) (Zotchev *et al.*, 2000), DNA-Aggregate (Yakovleva *et al.*, 2001) und t-Loops von Telomer-DNA (Stansel *et al.*, 2002).

Einige dieser Studien zeigen, dass bei der nicht-sequenz-spezifischen DNA-Bindung neben der REG auch die DBD von p53 beteiligt ist. Die beiden DNA-bindenden Domänen weisen jedoch unterschiedliche Substratspezifitäten auf. Die DBD interagiert nicht-sequenz-spezifisch mit inneren Bereichen, die REG indessen mit den Enden von ssDNA (Bakalkin *et al.*, 1995; Selivanova *et al.*, 1996). Außerdem benötigt p53 für die Bindung an DNA-Wölbungen (*DNA bulges*) die DBD mit intakter TET. Die REG wird für diese Bindung hingegen nicht benötigt (Szak *et al.*, 1999). Die nicht-sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 an scDNA erfordert sowohl die DBD als auch die REG. Die außergewöhnlich hohe Affinität wird auf einen neuen DNA-Bindungstyp zurückgeführt, den die Autoren als SCS (*supercoil-selective*) DNA-Bindung bezeichnen (Palecek *et al.*, 1997, 2001).

1.3 Regulation der p53-Aktivität

Biochemische Mechanismen, die die Aktivität von p53 infolge genotoxischen (IR, UV-Strahlung, DNA-modifizierende Reagenzien) und nicht-genotoxischen Stresses (Hypoxia, Depletion von Ribonukleotiden, Aktivierung von Onkogenen) regulieren, sind überaus komplex und konnten bis dato nicht bis ins Detail aufgeklärt werden. Allerdings wird davon ausgegangen, dass für die Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor zwei grundlegende Mechanismen verantwortlich sind: Stabilisierung und Aktivierung der p53-abhängigen Transkription (Anderson und Appella, 2002).

1.3.1 Stabilisierung von p53

In normalen Zellen sind die Halbwertszeit und die Konzentration von p53 sehr gering und korrelieren direkt mit der Aktivität von MDM2¹ (*murine double minute 2*). MDM2 bindet an den N-Terminus (Aminosäure 17 - 29) von p53 als Tetramer und katalysiert infolge der intrinsischen E3-Ligase-Aktivität die Ubiquitinierung verschiedener C-terminaler Lysin-Reste (Kussie *et al.*, 1996; Maki, 1999). Dadurch wird p53 für den proteolytischen Abbau durch das 26S Proteasom markiert. Eine geringe MDM2-Aktivität bewirkt durch Mono-Ubiquitinierung den nuklearen Export und die cytoplasmatische Proteolyse von p53. Dagegen katalysiert eine hohe MDM2-Aktivität die Poly-Ubiquitinierung von p53, was die nukleäre Proteolyse von p53 zur Folge hat (Li *et al.*, 2003; Shmueli und Oren, 2004).

Die Konzentrationen des Tumorsuppressors p53 und des Onkogens MDM2 werden durch eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife (*autoregulatory feedback loop*) kontrolliert (Wu *et al.*, 1993): p53 reguliert direkt die Expression von MDM2 durch Aktivierung des intronischen p53-spezifischen *mdm2*-Promotors (P2) (Zauberman *et al.*, 1995), wohingegen MDM2 die Transkriptionsaktivität von p53 infolge Protein-Protein-Interaktion oder durch die Initiation der ubiquitin-abhängigen Proteolyse inhibiert. Durch genotoxischen Stress wird die autoregulatorische Rückkopplungsschleife unterbrochen und p53 durch verschiedene Mechanismen stabilisiert.

Es existieren verschiedene Faktoren, die den Abbau von p53 durch die Regulation der MDM2-Aktivität kontrollieren. Es konnte gezeigt werden, dass p14^{ARF} (Stott *et al.*, 1998), MDMX (Sharp *et al.*, 1999; Jackson und Berberich, 2000) und HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*) (Chen *et al.*, 2003) die Funktion von MDM2 inhibieren. Ferner wird auch die Aktivität von MDM2 durch post-translationale Modifikationen reguliert (Meek und Knippschild 2003; Wang *et al.*, 2004).

Nach genotoxischem Stress wird p53 durch verschiedene Faktoren post-translationale modifiziert und akkumuliert im Zellkern. Phosphorylierungen im N-Terminus (Ser15 und Ser20) führen durch Inhibierung der p53-MDM2-Interaktion zur Stabilisierung von p53 (Shieh *et al.*, 1997; Chehab *et al.*, 1999). Daneben regulieren C-terminale Acetylierungen diverser Lysin-Reste (Nakamura *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2000) und der Phosphorylierungsstatus zweier konstitutiv phosphorylierter Serin-Reste (Ser376 und 378) die Stabilität von p53 (Chernov *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Phosphorylierung eines Threonin-Restes (Thr155) und benachbarter Aminosäure-Reste (Thr150 oder Ser149) innerhalb der DBD

durch CSN (*COP9 signalosome*) die ubiquitin-abhängige Proteolyse von p53 verstärkt wird (Bech-Otschir *et al.*, 2001).

[1] Da MDM2 zuerst in der Maus identifiziert wurde, wird MDM2 in der Literatur allgemein als Synonym für das humane HDM2 (*human double minute 2*) verwendet.

1.3.2 Aktivierung der p53-abhängigen Transkription

Die bisherige Hypothese, dass p53 als latenter Transkriptionsfaktor erst nach Aktivierung durch genotoxischen Stress an spezifische Promotor-Elemente bindet, konnte durch aktuelle Untersuchungen widerlegt werden.

In vivo bindet p53 konstitutiv an Promotoren der entsprechenden Zielgene und genotoxischer Stress hat nur einen geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität von p53 (Kaeser und Iggo, 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass einige dieser Promotoren in einer offenen Konformation, d. h. frei von Nukleosomen vorliegen (Xiao *et al.*, 1998; Braastad *et al.*, 2003) und auf einem niedrigen, basalen Level transkribiert werden, wobei p53 die Expression der untersuchten Gene nach Zellschädigung verstärkt (Braastad *et al.*, 2003).

Die Transkriptionsaktivität von p53 wird durch die stress-induzierte Rekrutierung von HATs (*histone acetyltransferase*) als Co-Aktivatoren und HDACs (*histone deacetylase*) als Co-Repressoren reguliert. Dabei wird die Transkriptionsaktivität von p53 durch Acetylierung stimuliert und durch Deacetylierung inhibiert (Murphy *et al.*, 1999; Vaziri *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2004). Daneben bewirkt die Rekrutierung von p300/CBP auch die Acetylierung von Histonen innerhalb p53-abhängiger Promotoren (Espinosa und Emerson, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Histon-Acetylierungsmuster spezifischer p53-Promotoren nach genotoxischem Stress voneinander unterscheiden (Kaeser und Iggo, 2004).

Der Vergleich von p53-Promotoren zeigt, dass die einzelnen p53-Bindungsstellen eine hohe Heterogenität bezüglich der Basenzusammensetzung aufweisen und dass allenfalls ein Pentamer von der Basenzusammensetzung her der p53CON entspricht. Es wurde deshalb postuliert, dass unterschiedliche p53-Bindungsstellen infolge interner Symmetrie-Elemente verschiedene konformationelle Isoformen einnehmen. Da die sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 durch den C-Terminus in Abhängigkeit von der DNA-Struktur reguliert wird, können somit p53-Bindungsstellen verschiedener Promotoren unterschiedliche Affinitäten aufweisen (Deppert und Kim, 2003). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die unterschiedliche Promotor-Affinität von p53 ungleiche Gradienten der RNA Polymerase II Promotor-Belegung

für verschiedene Gene generiert. Aufgrund der hohen Promotor-Affinität weisen Gene, die an der Kontrolle des Zellzyklus (oder der DNA-Reparatur) involviert sind, eine frühe Induktions-Kinetik mit niedriger p53-Konzentration auf (Espinosa *et al.*, 2003). Pro-apoptotische Gene weisen dagegen eine mittlere bis späte Induktionskinetik auf, und ihre Aktivierung benötigt relativ hohe Konzentrationen an p53 (Zhao *et al.*, 2000; Inga *et al.*, 2002).

1.4 Genomische Stabilität

Für die Entwicklung und den Erhalt höherer Organismen ist es entscheidend, dass bei der Zellteilung die genetische Information ohne Fehler von der Mutter- auf die Tochterzelle übertragen wird. Daher existieren im Verlauf der Zellteilung verschiedene Kontrollpunkte, an denen die Integrität des Genoms überprüft wird. Bei einem Fehler wird die Progression durch den Zellzyklus verlangsamt (attenuiert), um die Reparatur der Defekte zu ermöglichen und so die Weitergabe einer fehlerhaften Information zu verhindern. Falls die DNA-Schäden irreparabel sind, gibt es ferner die Möglichkeit, die geschädigte Zelle durch Apoptose zu eliminieren.

Die beiden wichtigsten Signalwege, über die p53 seine Funktion als Tumorsuppressor ausübt, sind die Kontrolle des Zellzyklus und die Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose). Aufgrund dieser Eigenschaft wird p53 als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). p53-Mutationen können durch den Verlust ihrer spezifischen Transkriptionsaktivität den Zellzyklus nicht mehr korrekt regulieren. Infolgedessen ist das Zeitfenster für die DNA-Reparatur nicht ausreichend, um eventuell auftretende DNA-Schäden zu beheben (Sieber *et al.*, 2003).

1.4.1 Zellzyklus-Kontrolle

Nach genotoxischem Stress kann ein p53-induzierter Wachstumsarrest sowohl am G1- als auch am G2/M-Kontrollpunkt des Zellzyklus erfolgen. Beide Signalwege sind eng mit der Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor verbunden. Bei einem DNA-Schaden wird der Zellzyklus vor dem Eintritt in die replikative S-Phase durch die p53-abhängige Transaktivierung von p21 in der G1-Phase attenuiert (El-Deiry, 1998). Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit die Progression des Zellzyklus vor dem Eintritt in die M-Phase zur Kontrolle der genomischen Integrität in der G2-Phase zu verlangsamen. Dieser G2-Kontrollpunkt wird durch die p53-abhängige Transaktivierung von 14-3-3 σ , p21 und/oder GADD45 (*growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45*) induziert (Taylor und Stark, 2001).

1.4.2 Apoptose

Bei einem irreparablen DNA-Schaden kann durch die p53-abhängige Transaktivierung spezieller Gene Apoptose induziert werden. Die resultierenden Genprodukte werden einem intrinsischen oder einem extrinsischen Signalweg zugeordnet. Die Regulation des intrinsischen Signalweges erfolgt durch die p53-abhängige Transaktivierung von pro-apoptotischen Genen der Bcl-2-Familie (*B-cell lymphoma 2*), wie BAX (*Bcl-2-associated X protein*), NOXA (*NADPH oxidase*) und PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), oder durch die p53-abhängige Expression von Proteinen, wie PIG3 (*p53-induced gene 3*), die die Konzentration von ROS (*reactive oxygen species*) erhöhen. Durch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und Interaktion mit APAF-1 (*apoptosis activating factor 1*) wird die Caspase-Kaskade aktiviert und folglich die apoptotischen Prozesse eingeleitet. Der extrinsische Signalweg wird hingegen durch die p53-abhängige Transkription von Oberflächenrezeptoren der TNFR-Familie (*tumor necrosis factor receptors*), wie Fas/APO-1 und Killer/DR5 reguliert. Die Bindung spezifischer Liganden führt direkt zur Aktivierung der Caspase-Kaskade.

Alternativ dazu ist p53 in der Lage, durch einen transkriptions-unabhängigen Prozess Apoptose zu induzieren. Dabei führt die stress-induzierte Akkumulation von p53 zu seiner mitochondrialen Lokalisation. Die damit verbundene Freisetzung von Cytochrom C und die anschließende Aktivierung der Caspase-Kaskade induziert den programmierten Zelltod (Haupt *et al.*, 2003; Fridman und Lowe, 2003).

1.4.3 DNA-Reparatur

Der Kontrolle der genomischen Stabilität liegen komplexe Regulationsmechanismen zugrunde. Der genomische Schaden wird durch einen Sensor erkannt. Der Sensor aktiviert seinerseits Signalwege in Richtung DNA-Reparatur, Zellzyklus-Kontrolle und eventuell Apoptose. Durch die Signalwege werden dann die entsprechenden Effektorsysteme aktiviert.

p53 aktiviert als Effektor die Expression von Genen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind: PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Shivakumar *et al.*, 1995), p48 (Hwang *et al.*, 1999), p53R2 (*p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2*) (Tanaka *et al.*, 2000) und MSH2 (*MutS homolog 2*) (Warnick *et al.*, 2001). Allerdings konnte bis dato kein Sensor für die Aktivierung von p53 identifiziert werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass p53 selbst als Sensor fungiert, da p53 durch die Interaktion mit DNA-Strukturen stabilisiert und die p53-abhängige

Transkription stimuliert wird (Jayaraman und Prives, 1995; Milyavsky *et al.*, 2001; Raj *et al.*, 2001).

Aktuelle Untersuchungen haben ergeben, dass p53 direkt am NER (*nucleotide excision repair*) (Rubbi und Milner, 2003) und BER (*base excision repair*) (Zhou *et al.*, 2001; Zurer *et al.*, 2004) beteiligt ist. Für eine direkte Beteiligung von p53 am MMR (*mismatch repair*) gibt es bisher allerdings nur Hinweise. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass heterozygote p53 Mäuse, bei denen MSH2 ausgeschaltet wurde, anstelle der charakteristischen Aneuploidie eine erhöhte Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) aufwiesen (Toft *et al.*, 2002). Außerdem stimuliert das MMR-Heterodimer MSH2-MSH6 die Interaktion zwischen p53 und Holliday Junctions und linearer DNA mit einer DNA-Wölbung *in vitro* (Subramanian und Griffith, 2002). Die homologe Rekombination (HR) stellt neben der NHEJ (*non-homologous end joining*) einen wichtigen Reparatur-Mechanismus von DNA-Doppelstrangbrüchen dar. In einem Modellsystem konnte gezeigt werden, dass wtp53 im Gegensatz zu p53 *Hot-Spot*-Mutanten die Integrität beider Prozesse kontrolliert (Akyüz *et al.*, 2002; Boehden *et al.*, 2003).

Einen weiteren Hinweis auf die direkte Beteiligung von p53 an DNA-Reparaturprozessen liefern dessen biochemische Eigenschaften. Der C-Terminus von p53 weist die Fähigkeit auf, nicht-sequenz-spezifisch mit DNA-Substraten zu interagieren, die geschädigter DNA oder Zwischenprodukten zellulärer Prozesse ähneln (vgl. 1.2.4). Darüber hinaus weist die CTD von p53 DNA-Hybridisierungs- und DNA-Strang-Transfer-Aktivitäten auf (Bakalkin *et al.*, 1994, 1995; Reed *et al.*, 1995). Die wohl wichtigste Eigenschaft in diesem Zusammenhang ist jedoch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von p53 (Mummenbrauer *et al.*, 1996).

1.5 Funktionen von mutiertem p53

Bei etwa 75 % aller tumorassoziierten p53-Mutationen handelt es sich um Punktmutationen, die phylogenetisch konservierte, d. h. funktionell bedeutsame Regionen des Genprodukts betreffen. Etwa 95 % der Punktmutationen sind in der DBD von p53 lokalisiert (Martin *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Beobachtungen wird davon ausgegangen, dass bestimmte p53-Mutationen infolge der *trans*-dominanten Unterdrückung von wtp53 (dominant-negativer Effekt) oder durch den wtp53-unabhängigen onkogenen Funktionsgewinn (GOF; *gain of function*) einen Selektionsvorteil aufweisen und direkt an der Progression von Tumoren beteiligt sind (Roemer, 1999; Deppert *et al.*, 2000).

1.5.1 Dominant-negativer Effekt

In diversen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der dominant-negative (DN) Effekt phänotypisch eine erhöhte Metastatisierung, ein verändertes Tumorspektrum, eine verzögerte Transaktivierung diverser p53-spezifischer Gene, Resistenz gegenüber Apoptose, genomische Instabilität und Immortalisierung zur Folge hat (Cao *et al.*, 1997; Gualberto *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; de Vries *et al.*, 2002). Dabei weisen Konformationsmutanten ein höheres onkogenes Potential als DNA-Kontaktmutanten auf (Cao *et al.*, 1997; Gualberto *et al.*, 1998).

Der genaue molekulare Mechanismus des DN-Effektes von mutiertem p53 (mutp53) konnte bis dato nicht eindeutig aufgeklärt werden. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass der DN-Effekt durch die Heterooligomerisierung von mut und wtp53 zustande kommt. So konnte gezeigt werden, dass mutp53 mit intakter TET in der Lage ist, mit wtp53 zu oligomerisieren (Milner und Medcalf, 1991; Milner *et al.*, 1991; Chene, 1998). Das wt/mutp53-Heterotetramer weist jedoch im Gegensatz zum wtp53-Homotetramer eine geringere DNA-Affinität auf (Friedlander *et al.*, 1996; Chene, 1998; Nicholls *et al.*, 2002) und zeigt eine verminderte Transkriptionsaktivität (Willis *et al.*, 2004). Da p53-Bindungsstellen innerhalb von Promotoren pro-apoptotischer Gene im Gegensatz zu Promotoren von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind, eine sehr geringe DNA-Affinität aufweisen, ist der DN-Effekt häufig nur bei der Transaktivierung pro-apoptotischer Gene zu beobachten (Aurelio *et al.*, 2000; Campomenosi *et al.*, 2001; Monti *et al.*, 2002; Qian *et al.*, 2002; Resnick und Inga, 2003).

1.5.2 Gain of Function

Der Verlust des wtp53 Allels (LOH; *loss of heterozygosity*) wird häufig bei humanen Tumoren mit mutp53 beobachtet und ist im Gegensatz zum DN-Effekt Voraussetzung für den wtp53-unabhängigen GOF. Phänotypisch führt die Expression von humanen p53 *Hot-Spot*-Mutanten sowohl zu einer erhöhten Mutationsrate als auch zur Verringerung der genomischen Stabilität und zu einer erhöhten Tumorgenität (Dittmer *et al.*, 1993; Iwamoto *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2000). Die Beobachtung, dass Konformationsmutanten ein höheres onkogenes Potential als DNA-Kontaktmutanten aufweisen, konnte auch bei der Resistenz von Tumorzellen gegenüber verschiedenen chemotherapeutischen Reagenzien beobachtet werden (Blandino *et al.*, 1999).

Die unterschiedlichen Phänotypen sind wahrscheinlich auf eine mutp53-abhängige Expression bestimmter Gene zurückzuführen. Obwohl bisher für mutp53 keine DNA-Konsensus-Sequenz identifiziert werden konnte, werden bestimmte Gene durch mutp53 reguliert. Der onkogene

Charakter von GOF-Mutanten zeigt sich darin, dass Gene aktiviert werden, die direkt Einfluss auf die Tumorgenese haben. Zellwachstum und Angiogenese von Tumorzellen können infolge der Aktivierung von VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*) (Kieser *et al.*, 1994), bFGF (*basic fibroblast growth factor*) (Ueba *et al.*, 1994), EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Ludes-Meyers *et al.*, 1996), IGFR-I (*insulin-like growth factor receptor I*) (Werner *et al.*, 1996) und IGF-II (*insulin-like growth factor II*) (Lee *et al.*, 2000) durch GOF-Mutanten stimuliert werden. Ebenso kann die Tumorprogression durch die Aktivierung des Onkogens c-MYC (Frazier *et al.*, 1998) beeinflusst werden. Sowohl die Aktivierung des anti-apoptotischen Gens BAG-1 (*Bcl-2-associated athanogene 1*) (Yang *et al.*, 1999) als auch die Repression des Todesrezeptors Fas/APO-1 (Zelcstein *et al.*, 2003) können Tumorzellen vor Apoptose schützen. Darüber hinaus führt die Transaktivierung von hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) zur Immortalisierung von Tumorzellen (Scian *et al.*, 2004). Die Hoch-Regulation von MDR-1 (*multidrug resistance 1*) (Chin *et al.*, 1992) und UTPase (Pugacheva *et al.*, 2002) führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Ansätzen.

Bis dato konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob mutp53 direkt durch DNA-Bindung oder indirekt durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren an der Transkription der zuvor erwähnten Gene beteiligt ist. Für den *mdr-1*-Promotor konnte gezeigt werden, dass wtp53 die Transkription inhibiert (Chin *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 2001) und dass für die mutp53-abhängige Aktivierung sowohl die TAD als auch die CTD essentiell sind (Lin *et al.*, 1995; Lanyi *et al.*, 1998; Chene, 1999). Dabei ist sowohl die mutp53-spezifische Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Ets-1 als auch die Ets-1 Bindungsstelle innerhalb des *mdr-1*-Promotors Voraussetzung für die Transaktivierung (Sampath *et al.*, 2001). Für die mutp53-abhängige Transkription wachstums-stimulierender Gene wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem mutp53 im Gegensatz zu wtp53 nicht in der Lage ist, sequenz-spezifisch an Promotor-Elemente wachstums-stimulierender Gene zu binden und die Transkription durch die Rekrutierung von Co-Repressoren wie Sin3 zu unterdrücken. Allerdings bindet mutp53 die Promotor-Region indirekt durch Protein-Protein-Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Sp1 oder Ets-1 und initiiert infolge der intakten TAD die Transkription dieser Gene (Scian *et al.*, 2004).

Einen weiteren Mechanismus für den GOF-Effekt stellt die spezifische *in vitro* Interaktion von mutp53 (175H und 273H) mit MAR/SAR-DNA-Elementen (*matrix/scaffold attachment region*) dar (Müller *et al.*, 1996; Will *et al.*, 1998a und 1998b). Da MAR/SAR-DNA-Elemente an der Regulation von Transkriptionsprozessen beteiligt sind, wird diskutiert, ob GOF-Mutanten die Expression bestimmter Gene durch diese Interaktion beeinflussen können (Deppert, 1996, 2000). Ein Charakteristikum von MAR/SAR-DNA-Elementen ist ihr hoher AT-Gehalt und die

Fähigkeit, unter bestimmten Bedingungen non-B-DNA-Strukturen zu bilden (Will *et al.*, 1998a und 1998b). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine andere GOF-Mutante (G245S) in der Lage ist, repetitive nicht-kodierende DNA-Elemente *in vivo* zu binden. Ein Großteil der charakterisierten DNA-Elemente weist ebenfalls das Potential auf, non-B-DNA-Strukturen auszubilden (Koga und Deppert, 2000).

Die Erhöhung der genomischen Instabilität ist eine weitere Konsequenz von GOF-Mutanten. Neben wtp53 sind die beiden *Hot-Spot*-Mutanten G245S und R273H in der Lage, mit Topoisomerase I zu interagieren und dadurch zu aktivieren (Albor *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu wtp53, welches mit Topoisomerase I infolge genotoxischen Stresses nur über eine zeitlich begrenzte Periode interagiert, erfolgt mit mutp53 eine konstitutive Interaktion (Gobert *et al.*, 1999). Dabei führt die Interaktion zwischen mutp53 und Topoisomerase I zu einer verstärkten Gen-Amplifikation infolge nicht-homologer Rekombination (El-Hizawi *et al.*, 2002).

1.6 *Trinucleotide Repeats (TNRs)*

Seit 1991 konnten mehr als 30 humane Erkrankungen identifiziert werden, bei denen die genomische Instabilität von *Trinucleotide Repeats (TNRs)* eine Rolle spielt. Davon sind mehr als die Hälfte auf die Expansion von [(CTG)·(CAG)]_n-*Repeats* (n = Anzahl der *Repeats*) innerhalb bestimmter Gene zurückzuführen. Dabei variiert sowohl die Position als auch die Länge der *Repeats* innerhalb der Gene. In der Regel sind *Repeats* in (CAG)-Orientierung innerhalb von Exons, *Repeats* in (CTG)-Orientierung hingegen in 3'-UTRs (*untranslated regions*) lokalisiert (Cleary und Pearson, 2003).

Ein grundlegendes Charakteristikum von TNRs ist ihre Fähigkeit, alternative DNA-Strukturen auszubilden, die sich von der klassischen kanonischen B-DNA unterscheiden (Watson und Crick, 1953). Für die Ausbildung alternativer DNA-Strukturen werden spezifische Symmetrie-Elemente benötigt. [(CTG)·(CAG)]_n-*Repeats* weisen als Symmetrie-Element quasi-palindrome (nicht-perfekt invertierte) repetitive Sequenzen auf. Aus diesem Grund sind [(CTG)·(CAG)]_n-*Repeats* in der Lage, infolge der erhöhten Flexibilität der DNA-Doppelhelix durch intramolekulare Basenpaarung DNA-*Hairpins* mit fehlgepaarten Basen auszubilden (Mitas *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1995; Bacolla *et al.*, 1997). DNA-*Hairpins* stellen kritische Komponenten von weitaus komplexeren DNA-Strukturen dar: Homoduplex S-DNA (*slipped DNA*), die zwischen zwei komplementären Strängen mit der gleichen Anzahl von *Repeats* und heteroduplex SI-DNA

(*slipped intermediate* DNA), die zwischen zwei komplementären Strängen mit unterschiedlicher Anzahl von *Repeats* gebildet wird (Pearson *et al.*, 2002). Diese DNA-Intermediate, die durch DNA-Strangseparierung während einer Vielzahl zellulärer Prozesse (Replikation, Rekombination, Reparatur, Transkription und DNA-*Breathing*) auftreten, bilden die Basis für die genomische Instabilität von TNRs (Cleary und Pearson, 2003).

Bis dato ist wenig über den genauen Mechanismus bekannt, der letztendlich für die Instabilität von TNRs verantwortlich ist. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass für die Instabilität multiple zelluläre Prozesse verantwortlich sind, die sich wiederum in Bezug auf Lokus, Zelltyp und Entwicklungsstadium voneinander unterscheiden (Cleary und Pearson, 2003).

2. Aufgabenstellung

Der Tumorsuppressor p53 weist gegenüber linearer DNA hoch-affine Bindungseigenschaften auf und verhält sich in Bezug auf die sequenz-spezifische DNA-Bindung als latentes Protein (Hupp und Lane, 1994). Dabei beeinflusst die C-terminale Regulationsdomäne (REG) als zusätzliche DNA-bindende Domäne die Bindung der DNA-Bindungsdomäne (DBD) von wtp53 an die DNA-Konsensus-Sequenz. Die Aktivierung der sequenz-spezifischen Bindung an lineare DNA wird durch die Inhibierung der nicht-sequenz-spezifischen und Aktivierung der sequenz-spezifischen Bindung der DBD durch die REG von wtp53 reguliert (Wölcke *et al.*, 2003). Gegenüber strukturierter DNA verhält sich wtp53 jedoch als aktives DNA-bindendes Protein, wobei die REG die sequenz-spezifische Bindung an strukturierte DNA durch Interaktion mit ungepaarten Basen innerhalb der DNA-Struktur fördert (Göhler *et al.*, 2002). Obwohl für mutp53 bisher keine DNA-Konsensus-Sequenz identifiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass mutp53 trotz des Verlustes der sequenz-spezifischen Bindung durchaus dazu in der Lage ist, *in vitro* struktur-spezifisch an DNA zu binden (Göhler *et al.*, 2004) und *in vivo* mit DNA-Sequenzen zu interagieren, die das Potential zur Bildung von non-B-DNA-Strukturen aufweisen (Deppert und Koga, 2000). Infolgedessen scheint die nicht-sequenz-spezifische Bindung von wt und mutp53 an strukturierte DNA eine generelle Eigenschaft von p53 darzustellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der nicht-sequenz-spezifischen Bindung von wt und mutp53 in Abhängigkeit von der DNA-Konformation mit biologisch relevanter DNA. Als Modellsubstrate für die struktur-spezifische DNA-Bindung dienten *Trinucleotide Repeats* (TNRs). Da TNRs mit der DNA-Sequenz [(CTG)·(CAG)]_n nicht der p53-Konsensus-Sequenz entsprechen (el-Deiry *et al.*, 1992) und aufgrund der quasi-palindromen repetitiven DNA-Sequenz in der Lage sind, durch intramolekulare Basenpaarung DNA-*Hairpins* mit fehlgepaarten Nukleotiden auszubilden (Pearson *et al.*, 2002), stellen TNRs exzellente Modellsubstrate für die Untersuchung der struktur-spezifischen DNA-Bindung von p53 dar. Weiterhin sind TNRs biologisch relevant, da sie aufgrund der Bildung alternativer DNA-Strukturen mit einer Vielzahl humaner Erkrankungen assoziiert sind (Cleary und Pearson 2003).

Neben der Frage, ob wt oder mutp53 in der Lage sind, mit TNR-Sequenzen zu interagieren, sollten Informationen über die DNA-Sekundärstrukturen Aufschluss über den genauen Bindungsmodus von wt und mutp53 geben. Da bis heute wenig über die biologische Bedeutung der nicht-sequenz-spezifischen DNA-Bindung von wtp53 bekannt ist, sollte in dieser Arbeit mit Hilfe der Analyse der p53-TNR-Interaktion auch die Frage über eine mögliche biologische

Funktion geklärt werden. Die am besten charakterisierte Funktion von wtp53 ist die eines Transkriptionsfaktors. Deshalb sollte der Einfluss von TNRs auf die wtp53-abhängige Transaktivierung eines TNR-assoziierten Promotors *in vivo* untersucht werden. Innerhalb des humanen Genoms sind TNRs sowohl in kodierenden als auch in nicht-kodierenden Regionen lokalisiert. Klinische Symptome treten auf, wenn die Anzahl der *Repeats* durch Expansion einen für die Erkrankung spezifischen Schwellenwert erreicht. Der resultierende TNR-Längen-Polymorphismus kann je nach Lokalisation die Expression und damit die Funktion des korrespondierenden Gen-Produktes beeinflussen (Cleary und Pearson 2003). Da Untersuchungen zur Regulation von endogenen, TNR-Sequenzen enthaltenden Genen durch p53 schwer durchführbar sind, sollten diese Untersuchungen mit Hilfe des von wtp53 regulierten *mdm2*-Promoters (P2) als Modellpromoter durchgeführt werden. Von diesem Promoter ist aus früheren Untersuchungen bekannt, dass die DNA Konformation für seine Aktivierung durch wtp53 eine wesentliche Rolle spielt (Kim *et al.*, 1999). In diesen Promoter sollten an verschiedenen Stellen TNR-Sequenzen unterschiedlicher Länge eingefügt werden und deren Rolle auf die wtp53-abhängige Transkription untersucht werden. Voraussetzung für diese Untersuchungen war die genaue Charakterisierung der Interaktionen von wtp53 mit diesem Promoter.

3. MATERIAL

3.1 Eukaryotische Zelllinien

3.1.1 Humane Zelllinien

Saos-2 Humane p53-defiziente Osteosarcoma-Zelllinie (ATCC #HTB-85).
 LN-Z308 Humane wtp53-induzierbare (Tet-On System) Glioblastoma-Zelllinie (Albertoni *et al.*, 2002). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. E. G. Van Meir (University Hospital, Lausanne, CH) zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Insektenzelllinien

Sf9 Insektenzelllinie aus *Spodoptera frugiperda* (Vaughn *et al.*, 1977) zur Amplifikation von Baculoviren (ATCC #CRL-1711).
 High Five™ Insektenzelllinie aus *Trichoplusia ni* (Wickham *et al.*, 1992) zur Expression von Proteinen (Invitrogen, Groningen, NL).

3.2 Prokaryotische Zellen

DH5α F⁻ *gyrA96* (Nal^r) *recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* (r_k⁻m_k⁺) *glnV44 deoR Δ(lacZYA-argF)U169[Φ80dΔ(lacZ)M15]*
 (Invitrogen, Groningen, NL)

3.3 Baculoviren

wtp53 Rekombinanter Baculovirus, enthält humanes wtp53. Das Virus wurde freundlicherweise von Prof. Dr. T. Soussi (Institut Curie, Paris, F) zur Verfügung gestellt.
 p53Δ30 Rekombinanter Baculovirus, enthält um 30 Aminosäuren C-terminal deletiertes humanes p53. Das Virus wurde freundlicherweise von Prof. Dr. C. Prives (Columbia University, New York, USA) zur Verfügung gestellt.

mutp53-G245S	Rekombinanter Baculovirus, enthält humanes mutp53 mit einer Gly → Ser Mutation an Position 245 (His-Tag). Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. H. Koga zur Verfügung gestellt.
mutp53-R248P	Rekombinanter Baculovirus, enthält humanes mutp53 mit einer Arg → Pro Mutation an Position 248. Das Virus wurde freundlicherweise von Prof. Dr. T. Soussi (Institut Curie, Paris, F) zur Verfügung gestellt.
mutp53-R273H	Rekombinanter Baculovirus, enthält humanes mutp53 mit einer Arg → His Mutation an Position 273 (His-Tag). Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. S. Süsse zur Verfügung gestellt.

3.4 Plasmide

pGL3-p21	Luziferase-Reportergen unter Kontrolle des p53-abhängigen <i>p21</i> -Promotors (Kim <i>et al.</i> , 1999). Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. E. Kim zur Verfügung gestellt.
pGL3-mdm2	Luziferase-Reportergen unter Kontrolle des p53-abhängigen <i>mdm2</i> -Promotors (Kim <i>et al.</i> , 1999). Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. E. Kim zur Verfügung gestellt.
pCMV-wtp53	Eukaryotischer Expressionsvektor kodiert für humanes wtp53 unter Kontrolle des CMV-Promotors (Rowan <i>et al.</i> , 1996). Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. M. Oren (Weizmann Institute of Science, Israel) zur Verfügung gestellt.
pCMV-Tag-R273H	Eukaryotischer Expressionsvektor kodiert für humanes mutp53 mit einer Arg → His Mutation an Position 273 (Flag-Tag) unter Kontrolle des CMV-Promotors. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von S. Dehde zur Verfügung gestellt.
pRB104	pUC19-Plasmid mit einem [(CTG)·(CAG)] ₉₂ -Insert. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. R. Bowater (University of East Anglia, UK) zur Verfügung gestellt.
pRB106	pUC19-Plasmid mit einem [(CTG)·(CAG)] ₁₉ -Insert. Das Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. R. Bowater (University of East Anglia, UK) zur Verfügung gestellt.

pEYFP-C1 Plasmid kodiert für EYFP unter Kontrolle des CMV-Promotors (Clontech, Heidelberg).

3.5 Antikörper

DO1 Anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper der IgG-Klasse, erkennt den N-Terminus (AS 21-25) von humanem p53 (Vojtesek *et al.*, 1992). Im Western-Blot wurde der Hybridoma-Überstand in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Die Hybridomazelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Lane (University of Dundee, UK) zur Verfügung gestellt.

PAb421 Anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper der IgG-Klasse, erkennt den C-Terminus (AS 371-380) von p53 (Wade-Evans und Jenkins, 1985). Im Western-Blot wurde der Hybridoma-Überstand in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt. Die Hybridomazelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. D. Lane (University of Dundee, UK) zur Verfügung gestellt.

p53(FL-393) Anti-p53 polyklonaler Antikörper aus Schaf (Santa Cruz, Heidelberg).

Ziege anti-Maus IgG HRP-konjugierter sekundärer Antikörper (Biomol, Hamburg), wurde im Western-Blot in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

3.6 Enzyme

Soweit nicht anders erwähnt, erfolgten enzymatische Reaktionen in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem.

DNase I (RQ1 RNase-Free)	Promega, Mannheim
Klenow-Fragment	MBI-Fermentas, Heidelberg
Mung Bean Nuclease	New England Biolabs, Schwalbach
Proteinase K (PCR grade)	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach

Shrimp Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Schwalbach
T7 Endonuklease I	New England Biolabs, Schwalbach
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, Köln
Topoisomerase I	Promega, Mannheim

3.7 Molekulargewicht-Standards

10 bp DNA Step Ladder	Promega, Mannheim
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Schwalbach
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Schwalbach
Prestained SDS Molecular Weight Marker (SDS-7B)	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.8 Chemikalien

Alle handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) in p. a. Qualität bezogen. Spezielle Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1)	National Diagnostics, Atlanta, USA
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Serva, Heidelberg
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	USB, Cleveland, USA
Aprotinin (Trasylo [®])	Bayer, Leverkusen
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
ATP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
2,2'-Bipyridin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	New England Biolabs, Schwalbach
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coenzym A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete (Protease Inhibitoren Cocktail)	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM-Pulver	Gibco BRL, Karlsruhe
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Steinheim
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
FCS	PAA, Pasching, A
Ficoll [®] 400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Geneticin-Sulfat (G418 [®])	Gibco BRL Life, Freiburg
GenElute [™] LPA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol	Serva, Heidelberg
HACoCl ₃	Sigma-Aldrich, Steinheim
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hydrazin	Fluka, Neu-Ulm
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Luciferin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Neuform, Lüneburg
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
MES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Cacodylat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim

Nonidet [®] P40 (NP-40)	Fluka, Neu-Ulm
dNTPs	MBI Fermentas, Heidelberg
Orange-G	Merck, Darmstadt
Osmiumtetroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pefablock [®] SC	Biomol, Hamburg
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Biomol, Hamburg
Piperidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly(dIdC) × poly(dIdC)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein-G-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Q-Solution	Qiagen, Hilden
t-RNA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salmon Sperm DNA	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Serva, Heidelberg
SYBR Green I	Sigma-Aldrich, Steinheim
TC100-Medium	Biochrom, Berlin
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tricine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma [®] Base (Tris Base)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween [®] 20	Fluka, Neu-Ulm
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.9 Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden von der Firma Hartmann Analytics (Braunschweig) bezogen.

3.10 Kits

BigDye [™] Terminator Cycle Sequencing	PE Biosystems, Weiterstadt
---	----------------------------

BioRad Protein Assay	BioRad, München
Effectene™ Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Nucleobond® PC 500	Macherey-Nagel, Düren
Nucleofector™ Kit R	Amara, Köln
NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel, Düren

3.11 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von der Firma Sigma-ARK (Steinheim) bezogen und sind in Tabelle 1, 2 und 3 aufgeführt.

Bezeichnung	T _m [°C]	DNA-Sequenz (5' → 3')
TNR-For(EcoRI)	53	CCTTGTAGCCGGGAATTCTG
TNR-Rev	53	CCGAAAGAAAGAAATGGTCTG
RV3	50	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
GL2	50	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA
EGFP-C	55	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
EYFP-For	55	CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC
EYFP-Rev	55	GGAACAACACTCAACCCTATCTCG
MDM2-For	55	GGTTGACTCAGCTTTTCTCTTG
MDM2-Rev	55	GGAAAATGCATGGTTTAAATAGCC
GAPDH-For	55	GTATTCCCCCAGGTTTACAT
GAPDH-Rev	55	TTCTGTCTTCCACTCACTCC

Tab. 1 PCR-Primer

Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer, die in PCR-Analysen eingesetzt wurden. Die Schmelztemperatur (T_m) bezieht sich auf die tatsächliche *Annealing*-Temperatur.

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5' → 3')
NEW-AflII (1)	CTAGCGACTCAGCTTTTCTCTTAAGCTGGTCAAGTTCAGACACGTTCCGAAACTGCA
NEW-AflII (2)	GTTTCAGAACGTGTCTGAACTTGACCAGCTTAAGAGGAAAAGCTGAGTCG
DEL-PvuII (1)	CTGGGGCTATTTAAACCATGCATTTTCCCTG
DEL-PvuII (2)	CAGGGAAAATGCATGGTTTAAATAGCCCCAG

Tab. 2 Oligonukleotide zur Generierung von pGL3-mdm2-APP

3.13 Geräte

Analysenwaagen:

Feinwaage H54AR (Mettler-Toledo, Giessen)

Oberschalenwaage PM460 (Mettler-Toledo, Giessen)

Begasungsbrutschrank Function Line (Heraeus, Hanau)

Brutschrank T5042 E (Heraeus, Hanau)

Flüssigkeitszintilationszähler LS-500 TD (Beckmann Coulter, Fullerton, USA)

FPLC ÄKTA Purifier (Amersham Biosciences, Uppsala, S)

Geldokumentationssystem BioDoc Analyze (Biometra, Göttingen)

Gelsysteme:

Agarosegelelektrophorese Horizon 58 (Gibco BRL, Maryland, USA)

Horizon 11-14 (Gibco BRL, Maryland, USA)

Horizon 20-25 (Gibco BRL, Maryland, USA)

Bandshift-Analysen PROT-RESOLV MINI-LC (Phase, Lüneburg)

Sequenziergel Model S2 (Gibco BRL, Maryland, USA)

SDS-PAGE Mighty Small II SE250 (Hoefer, San Francisco, USA)

Geltrockner Gel Dryer 583 (BioRad, München)

Heizblock Dri-Block[®] DB-2A (Techne, Cambridge, UK)

Inkubationsschüttler Multitron (Infors HT, Basel, CH)

Luminometer MicroLumat LB96 P (Berthold, Hannover)

Mikroskope:

Phasenkontrastmikroskop IMT-2 (Olympus, Hamburg)

Fluoreszenzmikroskop DMRA (Leica, Hamburg)

Milli-Q-Wasser Milli-Q[®] Reagent Water System (Millipore, Eschborn)

Nucleofector Nucleofector I (Amata, Köln)

PCR-Maschine PTC-200 (MJ Research, Massachusetts, USA)

pH-Meter PHM 82 (Radiometer, Kopenhagen, DK)

Schüttler und Mischgeräte:

Rollenschüttler RollerMixer SRT1 (Stuart Scientific, Watford, UK)

Taumelschüttler Polymax 2040 (Heidolph, Schwabach)

Thermomixer Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)

Spannungsquellen Power Pac 300 (BioRad, München)

Power Pac 3000 (BioRad, München)

	Model 3000Xi (BioRad, München)
Spektralphotometer	BioSpec-1601E (Shimadzu, Duisburg)
Sterilwerkbank	Lamin Air [®] (Heraeus, Hanau)
Tankblot-Apparatur	Mini Trans-Blot Cell (BioRad, München)
Ultraschallgerät	Sonifier [®] B-12 (Branson, Danbury, USA)
Zentrifugen:	
Evaporationszentrifuge	SpeedVac [®] SPD-101B (Savant, New York, USA)
Tischzentrifuge	5415D (Eppendorf, Hamburg)
Tischzentrifuge (Kühlung)	5417R (Eppendorf, Hamburg)
Tischzentrifuge (Kühlung)	5810R (Eppendorf, Hamburg)
Standzentrifuge (Kühlung)	RC-5C PLUS (Sorvall, Bad Homburg)
Ultrazentrifuge	Optima L-70 (Beckman, San Francisco, USA)

3.14 Puffer und Stammlösungen

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Lösungen wurden mit Milli-Q-Wasser (Millipore, Eschborn) angesetzt und durch Autoklavieren bzw. bei Hitzeempfindlichkeit durch Filtration (Membranfilter, Porengröße 0.2 µm) sterilisiert.

20 × EMSA-Puffer	800 mM Tris-CH ₃ COOH 100 mM NaOAc 20 mM EDTA pH 7.8	10 × TBS	500 mM Tris-HCl 1.5 M NaCl pH 7.3
50 × TAE-Puffer	2 M Tris Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 7.2	10 × TE-Puffer	100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH 8.0
10 × TBE-Puffer	900 mM Tris Base 900 mM Borsäure 10 mM EDTA pH 8.3	10 × PBS	1.37 M NaCl 27 mM KCl 43 mM Na ₂ HPO ₄ 14 mM K ₂ HPO ₄ pH 7.4

Proteinase-Inhibitor-Stammlösungen:

Aprotinin	(1000 ×)	2 mg × ml ⁻¹ in ddH ₂ O
Leupeptin	(1000 ×)	0.5 mg × ml ⁻¹ in ddH ₂ O
Pefablock [®] SC	(100 ×)	100 mg × ml ⁻¹ in ddH ₂ O
Pepstatin A	(1000 ×)	1 mg × ml ⁻¹ in Methanol

Antibiotika-Stammlösungen:

Ampicillin	(2000 ×)	100 mg × ml ⁻¹ in ddH ₂ O
Kanamycin	(1000 ×)	30 mg × ml ⁻¹ in ddH ₂ O
Geneticin (G418 [®])		50 mg × ml ⁻¹ in 1 × PBS
Neomycin		100 mg × ml ⁻¹ in 1 × PBS
Puromycin		1 mg × ml ⁻¹ in 1 × PBS
Doxycyclin		1 mg × ml ⁻¹ in 1 × PBS

3.15 Kulturmedien

Prokaryotische Kulturmedien wurden mit Milli-Q-Wasser (Millipore, Eschborn) angesetzt und durch Autoklavieren sterilisiert. Eukaryotische Kulturmedien wurden mit Wasser der Firma DeltaSelect (Pfullingen) angesetzt und sterilfiltriert.

Prokaryotische Kulturmedien:

LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0.5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl pH 7.0
LB-Agar	LB-Medium 1.5 % (w/v) Bacto-Agar pH 7.0
SOB-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton 0.5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt 0.05 % (w/v) NaCl 10 mM MgCl ₂ 2.5 mM KCl pH 7.0

SOC-Medium

SOB-Medium

20 mM Glucose

pH 7.0

Eukaryotische Kulturmedien:

DMEM

1.34 % (w/v) DMEM-Pulver

0.37 % (w/v) NaHCO₃

pH 7.4

TC100-Medium

Fertigmedium

4. METHODEN

4.1 Herstellung von radioaktiv-markierten DNA-Substraten

4.1.1 Radioaktive 5'-Markierung von Oligonukleotiden

Die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden erfolgt durch 5'-Phosphorylierung mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP. Dabei wird in einer durch das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase katalysierten Reaktion die γ -Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe des Oligonukleotids übertragen.

Dazu wurden 100 pmol des SENSE- bzw. LOOP-Oligonukleotids (Tab. 3), 30 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP und 10 U T4-Polynukleotid-Kinase in 20 μl T4-Polynukleotid Kinase-Puffer 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die T4-Polynukleotid-Kinase 10 min bei 75 °C inaktiviert.

T4-Polynukleotid Kinase-Puffer: 70 mM Tris-HCl (pH 7.6)
 10 mM MgCl_2
 5 mM DTT

4.1.2 Hybridisierung von radioaktiv-markierten Oligonukleotiden

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten DNA-Substrate wurden aus synthetischen Oligonukleotiden hergestellt (Tab. 3).

Zur Herstellung von DNA-Substraten für Protein-DNA-Bindungsstudien wurden 100 pmol des zuvor radioaktiv-markierten SENSE- bzw. LOOP-Oligonukleotids mit 200 pmol (linear) des komplementären ANTISENSE- bzw. 400 pmol (strukturiert) des BASE-Oligonukleotids in 100 μl Hybridisierungspuffer hybridisiert. Dazu wurde die Lösung 5 min auf 95 °C erhitzt und ÜN auf RT abgekühlt. Anschließend wurden die hergestellten DNA-Substrate durch Diffusionselution mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt (4.1.3).

Hybridisierungspuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.8)
 50 mM KCl
 0.1 mM EDTA

4.1.3 Diffusionselution von radioaktiv-markierten DNA-Substraten

Der Reaktionsansatz wurde über ein natives 8 %-iges Polyacrylamidgel bei 200 V für 1 h elektrophoretisch von überschüssigem [γ - 32 P]-ATP und einzelsträngiger DNA getrennt. Die Position der linearen bzw. strukturierten DNA-Substrate wurde durch Autoradiographie ermittelt, die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA-Substrate in 500 μ l Hybridisierungspuffer unter Schütteln 4 h bei 4 °C eluiert. Die Lösung wurde 5 min bei $2500 \times g$ zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zur Fällung der DNA wurde das Eluat mit 3 Vol. Aceton versetzt, 20 min bei $20.000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Sediment wurde 10 min bei RT getrocknet und in 20 μ l Hybridisierungspuffer aufgenommen.

Gel: 8 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
0.5 \times EMSA-Puffer
0.05 % (w/v) APS
0.05 % (v/v) TEMED

Laufpuffer: 0.25 \times EMSA-Puffer

4.1.4 Sequenzierung von Oligonukleotiden nach Maxam-Gilbert

Die DNA-Sequenzierung nach Maxam-Gilbert beruht auf der basenspezifischen Spaltung von DNA mit Hilfe chemischer Reagenzien (Maxam und Gilbert, 1977). Dazu wird das 5'-radioaktiv markierte DNA-Fragment in vier verschiedenen Reaktionen basen-spezifisch gespalten. Die Reaktionsbedingungen werden so gewählt, dass statistisch nur ein Strangbruch pro DNA-Molekül erfolgt, und somit die in den vier Reaktionen erzeugten Fragmente die Summe aller möglichen Spaltprodukte darstellen. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden mittels denaturierender Gelelektrophorese getrennt und durch Autoradiographie analysiert.

Dazu wurden 20.000 CPM des an einem Ende 5'-radioaktiv-markierten DNA-Substrats je Reaktion eingesetzt.

G-Reaktion:

5 μ l der DNA-Lösung wurden mit 200 μ l DMS-Puffer versetzt und nach Zugabe von 1 μ l DMS 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l G-Stop gestoppt.

4.2 Charakterisierung von Protein-DNA-Interaktionen

4.2.1 Bandshift-Analyse (EMSA)

Die Bandshift-Analyse (EMSA; *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) stellt die Standardmethode zur Identifizierung und Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen *in vitro* dar. Hierzu wird ein radioaktiv-markiertes DNA-Fragment mit dem zu analysierenden Protein inkubiert und die entstandenen Protein-DNA-Komplexe in einem nativen Polyacrylamidgel analysiert. Neben dem Signal des nicht-komplexierten DNA-Fragments tritt bei der Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes eine zusätzliche Bande mit deutlich verändertem Migrationsverhalten auf (*Bandshift*). Die Identität des DNA-bindenden Proteins wird in Gegenwart eines gegen das Protein gerichteten Antikörpers nachgewiesen. Dabei erhält man eine zusätzliche Bande mit verzögertem Laufverhalten (*Supershift*) oder eine deutliche Zu- bzw. Abnahme der Signalintensität des Bandshifts.

50 ng FPLC-gereinigtes rekombinantes p53 aus Insektenzellen wurden in Gegenwart von 5 ng Poly(dI-dC) × poly(dI-dC) als unspezifischer Kompetitor und 2 µg BSA in 15 µl Bandshift-Puffer 20 min bei RT inkubiert. Zum Nachweis der Identität von p53 erfolgte die Inkubation in Gegenwart von 1 µg anti-p53 Antikörper. Anschließend wurden 20.000 CPM des in 5 µl Bandshift-Puffer äquilibrierten radioaktiv-markierten DNA-Substrats dem Reaktionsansatz hinzugefügt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Die Bandshiftansätze wurden mit 0.1 Vol. EMSA-Ladepuffer versetzt und über ein natives 4 %-iges Polyacrylamidgel bei 200 V für 2 h elektrophoretisch getrennt. Die Detektion der Banden erfolgte durch Autoradiographie.

Bandshift-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7.8)
	50 mM KCl
	0.1 mM EDTA
	1 mM DTT
	20 % (v/v) Glycerol
EMSA-Ladepuffer:	10 mM Tris-HCl (pH 7.8)
	50 mM KCl
	0.1 mM EDTA
	50 % (v/v) Glycerol
	0.05 % (w/v) Bromphenolblau
	0.05 % (w/v) Xylencyanol
0.05 % (w/v) Orange-G	

EMSA-Gel:	4 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) 0.5 × EMSA-Puffer 10 % (v/v) Glycerol 0.05 % (w/v) APS 0.05 % (v/v) TEMED
EMSA-Laufpuffer:	0.25 × EMSA-Puffer

4.2.2 Charakterisierung der DNA-Bindungsspezifität

Die Spezifität von Protein-DNA-Komplexen wird über Konkurrenzexperimente nachgewiesen. Hierbei wird dem Reaktionsansatz zusätzlich zu dem radioaktiv-markierten DNA-Fragment ein Überschuss an nicht-markiertem DNA-Fragment (Kompetitor) zugesetzt. Die Fähigkeit des Kompetitors, das zu untersuchende Protein zu binden, bestimmt die Intensität des Signals und damit die Spezifität des Protein-DNA-Komplexes.

Konkurrenzexperimente wurden mit steigender Menge spezifischer Kompetitor-DNA bei konstanter Menge an Protein und radioaktiv-markiertem DNA-Fragment durchgeführt. Dazu erfolgte, wie unter 4.2.1 beschrieben, die Inkubation von p53 in Gegenwart von spezifischer anstelle von unspezifischer Kompetitor-DNA.

4.2.3 DNase I-Protektionsexperiment

Mit Hilfe von DNase I-Protektionsexperimenten (*DNase I Footprinting*) können innerhalb von DNA-Sequenzen spezifische Regionen identifiziert werden, die von Proteinen gebunden werden. Bei dieser Technik wird das zu untersuchende und an einem Ende 5'-radioaktiv-markierte DNA-Substrat in Abwesenheit und in Gegenwart des DNA-bindenden Proteins inkubiert und durch DNase I partiell hydrolysiert; d. h. die Reaktionsbedingungen werden so gewählt, dass statistisch jedes DNA-Molekül nur einmal hydrolysiert wird (*Single-Hit-Kinetik*). Gebundene DNA-Regionen sind vor der Hydrolyse durch DNase I geschützt und können nach der elektrophoretischen Trennung unter denaturierenden Bedingungen mittels Autoradiographie identifiziert werden (Schmitz und Galas, 1978).

Dazu wurden steigende p53-Mengen unter identischen Bedingungen wie unter 4.2.1 beschrieben mit einer konstanten Menge an einem Ende 5'-radioaktiv-markiertem DNA-Substrat (20.000 CPM) in einem Gesamtvolumen von 20 µl Bandshift-Puffer inkubiert. Die Hydrolyse

mit DNase I wurde nach Titration der optimalen DNase I-Konzentration durch die Zugabe von 30 μ l DNase I-Lösung initiiert und 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l DNase I-Stop-Lösung und 15 min Inkubation bei 37 °C gestoppt. Anschließend wurden die Proben durch Phenol-Chloroform-Extraktion (4.4.3.3) gereinigt und die DNA durch Ethanol-Fällung (4.4.3.4) präzipitiert. Die Proben wurden gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen getrennt (4.4.2.3) und die Banden durch Autoradiographie detektiert.

DNase I-Lösung: 0.1 - 1.0 U DNase I (Titration erforderlich)
10 mM Tris-HCl (pH 7.8)
50 mM KCl
8.3 mM MgCl₂
8.3 mM CaCl₂
0.1 mM EDTA
1 mM DTT
20 % (v/v) Glycerol

DNase I-Stop-Lösung: 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
300 mM NaOAc
100 mM NaCl
1 % (w/v) SDS
10 mM EDTA
200 μ g \times ml⁻¹ Proteinase K
100 μ g \times ml⁻¹ t-RNA

4.2.4 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe Protein-DNA-Interaktionen im Chromatin-Kontext lebender Zellen analysiert werden können (Orlando *et al.*, 1997). Dabei werden Protein-DNA- und Protein-Protein-Komplexe in der Zelle mittels Formaldehyd durch eine Kondensationsreaktion reversibel quervernetzt. Nach der Zell-Lyse und Fragmentierung der chromosomalen DNA erfolgt die Anreicherung der DNA-Elemente, die spezifisch von dem zu untersuchenden Protein gebunden wurden, durch selektive Immunpräzipitation (IP). Die DNA-Elemente werden nach einer Hydratisierungsreaktion unter milden Bedingungen (Umkehrreaktion) mittels PCR quantifiziert.

Die DNA von 2×10^6 Zellen einer 10 cm Zellkulturschale wurde durch die Zugabe von Formaldehyd (1 % Endkonzentration) und 10 min Inkubation bei 37 °C quervernetzt. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von Glycin (125 mM Endkonzentration) und 5 min Inkubation bei RT gestoppt. Das Medium wurde entfernt und die Zellen zweimal mit je 10 ml eiskaltem $1 \times$ PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml $1 \times$ PBS (mit Protease-Inhibitoren-Cocktail) überschichtet und mechanisch durch Abschaben auf Eis geerntet. Die Zellen wurden 5 min bei $500 \times g$ und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellsediment wurde in 200 µl SDS-Lysis-Puffer (mit Protease-Inhibitoren-Cocktail) pro 1×10^6 Zellen resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde die DNA durch Ultraschall bis zu einer Länge zwischen 200 und 1000 bp auf Eis geschert (fünfmal je 10 s bei 30 W). Die Proben wurden 10 min bei $20.000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit 9 Vol. ChIP Verdünnungspuffer (mit Protease-Inhibitoren-Cocktail) verdünnt. Zur späteren DNA-Quantifizierung wurde 1 % der Lösung abgenommen und als DNA-Kontrolle bis zur Umkehrreaktion bei -20 °C gelagert.

Zur Reduktion des unspezifischen Hintergrundes wurden pro ml des verdünnten Zell-Überstands 40 µl einer 25 %-igen PGS-Suspension hinzugefügt und 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurde die Sepharose 1 min bei $500 \times g$ und 4 °C sedimentiert und der Überstand in zwei gleich große Aliquote aufgeteilt. Dem ersten Aliquot wurden 2 µg polyklonaler anti-p53 Antikörper p53(FL-393) hinzugefügt und ÜN bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die Inkubation des zweiten Aliquots ohne Antikörper diente als Negativkontrolle. Anschließend wurden pro ml Zell-Überstand 15 µl einer 25 %-igen PGS-Suspension hinzugefügt und 2 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Die Sepharose wurde 1 min bei $500 \times g$ sedimentiert. Anschließend wurden die immunpräzipitierten p53-DNA-Komplexe sequentiell einmal mit je 1 ml ChIP-Waschpuffer 1, 1 ml ChIP-Waschpuffer 2, 1 ml ChIP-Waschpuffer 3 und 1 ml TE-Puffer für jeweils 5 min bei 4 °C unter Schütteln gewaschen. Dazu wurde die Sepharose nach jedem Waschschrift 1 min bei $500 \times g$ und 4 °C sedimentiert, der Überstand entfernt und im entsprechenden Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Sepharose in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und 10 % der Suspension als IP-Kontrolle abgenommen.

Die Sepharose wurde 1 min bei $500 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die p53-DNA-Komplexe durch Zugabe von 250 µl frisch angesetztem ChIP-Elutionspuffer 30 min bei RT unter Schütteln eluiert. Anschließend wurde die Sepharose 1 min bei $500 \times g$ zentrifugiert, das Eluat abgenommen und der Elutionsschritt ein weiteres Mal wiederholt. Die vereinigten Eluate und die DNA-Kontrolle, der zuvor 480 µl ChIP-Elutionspuffer hinzugefügt worden

waren, wurden zur Umkehrreaktion mit 20 µl 5 M NaCl versetzt und ÜN bei 65 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 20 µl 1 M Tris-HCl (pH 6.5), 10 µl 500 mM EDTA und 20 µg Proteinase K hinzugefügt und der Reaktionsansatz 1 h bei 45 °C unter Schütteln inkubiert. Die DNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion (4.4.3.3) gereinigt und durch Ethanol-Fällung (4.4.3.4) präzipitiert. Bei der DNA-Präzipitation diente GenElute™ LPA als inerter Carrier. Die DNA wurde in 100 µl TE aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

25 % PGS:	1.5 mg PGS 4.5 ml TE 500 µg BSA 500 µg Salmon Sperm DNA 0.05 % (w/v) Na-Azid
SDS-Lysis-Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 8.1) 10 mM EDTA 1 % (w/v) SDS
ChIP-Verdünnungspuffer:	16.7 mM Tris-HCl (pH 8.1) 167 mM NaCl 1.2 mM EDTA 0.01 % (w/v) SDS 1.1 % (v/v) Triton X-100
ChIP-Waschpuffer 1:	20 mM Tris-HCl (pH 8.1) 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0.1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Triton X-100
ChIP-Waschpuffer 2:	20 mM Tris-HCl (pH 8.1) 500 mM NaCl 2 mM EDTA 0.1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Triton X-100

ChIP-Waschpuffer 3:	10 mM Tris-HCl (pH 8.1)
	250 mM LiCl
	1 mM EDTA
	1 % (w/v) Na-Deoxycholat
	1 % (v/v) NP-40

ChIP-Elutionspuffer:	100 mM NaHCO ₃
	1 % (w/v) SDS

4.2.5 Luziferase-Reporter-Aktivitätstest

Die funktionelle Analyse von p53 und des von ihm gebundenen DNA-Fragments wurde *in vivo* mit Hilfe des Luziferase-Reporter-Aktivitätstests durchgeführt. Dazu wird das entsprechende DNA-Fragment in ein Testplasmid vor das Luziferase-Reportergen insertiert und der Einfluss dieses Fragments auf die p53-abhängige Transkription des Reporters gemessen.

LN-Z308-Zellen wurden in 6-Loch-Zellkulturschalen kultiviert und mit dem entsprechenden Reportergen-Konstrukt mittels Effectene™ transfiziert (4.7.6). 12 h nach Induktion von wtp53 (1 µg × ml⁻¹ Doxycyclin) wurden die Zellen zweimal mit 1 × PBS gewaschen, mit je 100 µl Lysispuffer versetzt, 10 min bei RT inkubiert und die lysierten Zellen durch Abschaben geerntet. Jeweils 20 µl des Zell-Lysats wurden in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Die photometrische Quantifizierung der Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte 10 s nach automatischer Zugabe von 100 µl Luziferase-Aktivitätstest-Lösung mit Hilfe eines Luminometers.

Lysispuffer:	25 mM Tris-Phosphat (pH 7.8)
	2 mM DTT
	10 % (v/v) Glycerol
	1 % (v/v) Triton X-100

Luziferase-Aktivitätstest-Lösung:	20 mM Tricine (N-[2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycin)
	1.07 mM (MgCO ₃) ₄ Mg(OH) ₂
	2.67 mM MgSO ₄
	0.1 mM EDTA
	33.3 mM DTT
	530 µM ATP
	270 µM Coenzym A
	470 µM Luciferin

4.3 Charakterisierung von DNA-Sekundärstrukturen

4.3.1 Enzymatische Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur von DNA-Substraten mit struktur-spezifischen Endonukleasen

Die enzymatische Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur von DNA-Substraten erfolgte mit Hilfe von zwei struktur-spezifischen Endonukleasen: T7-Endonuklease I (T7-EndoI) hydrolysiert einzelsträngige Bereiche von DNA-*Hairpin Junctions*, wohingegen *Mung Bean Nuclease* (MBN) einzelsträngige Bereiche innerhalb von DNA-*Hairpin Loops* hydrolysiert (Pearson *et al.*, 2002).

20.000 CPM des an einem Ende 5'-radioaktiv-markierten DNA-Substrats wurden 30 min bei RT in 50 µl des entsprechenden Endonuklease-Puffers äquilibriert. Anschließend erfolgte die hydrolytische Spaltung durch Zugabe von je 10 U T7-EndoI oder MBN in 50 µl Endonuklease-Puffer für 30 min bei RT. Dabei entsprachen die Reaktionsbedingungen der *Single-Hit*-Kinetik. Die Reaktion wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion (4.4.3.3) gestoppt und die DNA mittels Ethanol-Fällung (4.4.3.4) in Gegenwart von 200 µg × ml⁻¹ t-RNA als inerten Carrier präzipitiert. Die Proben wurden gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen getrennt (4.4.2.3) und die Banden durch Autoradiographie detektiert.

T7-Endo I-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.8)
 50 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 1 mM DTT

MBN-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.8)
 50 mM KCl
 2 mM ZnCl₂

4.3.2 Chemische Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur von DNA-Substraten mit DEPC und OsO₄

Die chemische Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur von DNA-Substraten erfolgte durch chemische Modifizierung mit Osmiumtetraoxid (OsO₄) (Palecek, 1992) und Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Kohwi-Shigematsu und Kohwi, 1992). OsO₄ modifiziert spezifisch Thymidin-Basen, wohingegen DEPC sowohl Adenin- als auch Guanin-Basen modifiziert.

Ungepaarte Basen weisen gegenüber der chemischen Modifizierung eine weitaus höhere Reaktivität auf. Die anschließende Spaltung der modifizierten Basen mit Piperidin führt schließlich zur Fragmentierung der DNA.

Vor der Reaktion wurden 20.000 CPM des zu analysierenden an einem Ende 5'-radioaktiv-markierten DNA-Substrats in 50 µl Bandshift-Puffer (ohne DTT) 30 min bei RT äquilibriert. Die Modifizierung der DNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl DEPC- bzw. OsO₄-Lösung. Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei RT inkubiert und die Reaktion durch Phenol-Chloroform-Extraktion (4.4.3.3) gestoppt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen der *Single-Hit*-Kinetik. Anschließend wurde die DNA mittels Ethanol-Fällung (4.4.3.4) in Gegenwart von 200 µg × ml⁻¹ t-RNA als inerte Carrier präzipitiert. Die modifizierte DNA wurde in 100 µl 1M Piperidin gelöst und 1 h bei 90 °C inkubiert. Danach wurde Piperidin durch Evaporation entfernt, die Proben gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen getrennt (4.4.2.3) und die Banden durch Autoradiographie detektiert.

DEPC-Lösung:	50 mM Na-Cacodylat
	0.5 mM EDTA
	2 % (v/v) DEPC
	in Bandshift-Puffer (ohne DTT)
OsO ₄ -Lösung:	4 mM OsO ₄
	4 mM 2,2'-Bipyridin
	in Bandshift-Puffer (ohne DTT)

4.3.3 2D-Agarosegelelektrophorese

Spezielle DNA-Sequenzen innerhalb von Plasmid-DNA sind durch die lokale Absorption der superhelikalen Spannung in der Lage, Strukturen auszubilden. Der Übergang von der normalen B-DNA- in die strukturierte non-B-DNA-Form erfolgt bei einem bestimmten Schwellenwert, der direkt von der Superhelizität der Plasmid-DNA abhängt. Mit Hilfe der 2D-Agarosegelelektrophorese kann die Ausbildung von DNA-Strukturen unter superhelikalem Stress analysiert werden. Dabei werden zunächst die Topoisomere der zu untersuchenden Plasmid-DNA in der ersten Dimension gelelektrophoretisch getrennt. Da B- und non-B-DNA-Konformere unter diesen Bedingungen co-migrieren, erfolgt die gelelektrophoretische Trennung in der zweiten Dimension in Gegenwart eines DNA-interkalierenden Agens (Chloroquin). Der DNA-Interkalator neutralisiert die superhelikale Spannung innerhalb der Plasmid-DNA, so dass

strukturierte DNA-Konformere wieder in die normale B-DNA-Form überführt werden und dadurch ein verändertes Migrationsverhalten aufweisen (Bowater *et al.*, 1992).

4.3.3.1 Generierung von DNA-Topoisomeren

Zur Generierung einer optimalen Verteilung von DNA-Topoisomeren für die 2D-Agarosegelelektrophorese wurden je 600 fmol Plasmid-DNA in Gegenwart von 10 U Topoisomerase I und unterschiedlicher Ethidiumbromid-Konzentration (0.25 bis 10 ng \times μl^{-1} Endkonzentration) in 20 μl Topoisomerase I-Puffer 12 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion (4.4.3.3) gestoppt. Zur vollständigen Entfernung des Ethidiumbromids wurde die DNA-Lösung insgesamt dreimal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v/v) extrahiert. Anschließend wurde die DNA durch Ethanol-Fällung (4.4.3.4) präzipitiert und in TE-Puffer aufgenommen. Da jeder Reaktionsansatz eine Boltzman-Verteilung von DNA-Topoisomeren in Abhängigkeit von der Ethidiumbromid-Konzentration generiert, wurden die Produkte mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Anhand der Intensitäten und Positionen der Banden wurden die einzelnen Reaktionsansätze gemischt, so dass die generierten DNA-Topoisomere für die 2D-Agarosegelelektrophorese in annähernd gleichen Konzentrationen vorlagen.

Topoisomerase I-Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	50 mM NaCl
	0.1 mM EDTA
	1 mM DTT
	20 % (v/v) Glycerol

4.3.3.2 2D-Agarosegelelektrophorese von DNA-Topoisomeren

Die elektrophoretische Trennung der DNA-Topoisomere mittels 2D-Agarosegelelektrophorese erfolgte in einem 0.6 %-igem Agarosegel (200 \times 200 \times 10 mm; runde Geltasche: \varnothing 2 mm) unter Rezirkulation des Laufpuffers (etwa 5 ml \times min⁻¹) bei einer konstanten Temperatur von 4 °C.

750 fmol einer optimalen Verteilung von DNA-Topoisomeren (4.3.3.1) wurden vor dem Auftragen in 12 μl Äquilibriumspuffer 1 h auf Eis inkubiert. Die Elektrophorese der ersten Dimension erfolgte 30 h bei einer konstanten Spannung von 2.4 V \times cm⁻¹. Anschließend wurde das Agarosegel 6 h bei 4 °C in 500 ml Laufpuffer unter leichtem Schütteln äquilibriert. Daraufhin wurde das Agarosegel in Bezug auf die erste Dimension um 90 ° gedreht und die

Elektrophorese der zweiten Dimension 30 h mit einer konstanten Spannung von $2.4 \text{ V} \times \text{cm}^{-1}$ durchgeführt. Die Färbung des Agarosegels erfolgte mit SYBR Green I.

Äquilibrierungspuffer: $0.25 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Chloroquin
 $0.25 \times \text{TBE}$
 $1 \times \text{DNA-Probenpuffer I (4.4.2)}$

1. Dimension:

Gel- und Laufpuffer: $0.25 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Chloroquin
 $0.25 \times \text{TBE}$

2. Dimension:

Gel- und Laufpuffer: $1.0 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Chloroquin
 $0.25 \times \text{TBE}$

4.4 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, wurde DNA in autoklaviertem Milli-Q-Wasser (ddH₂O) und nicht in TE-Puffer aufgenommen, um eine optimale Aktivität von DNA-modifizierenden Enzymen in Folgereaktionen zu gewährleisten.

4.4.1 Quantifizierung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

Die Quantifizierung geringer DNA-Mengen und nicht-markierter DNA-Substrate für Konkurrenzexperimente erfolgte nach der gelelektrophoretischen Trennung durch den densitometrischen Vergleich der Bandenintensitäten der zu untersuchenden DNA mit DNA-Fragmenten bekannter Konzentration (DNA-Molekulargewichtsmarker) als Standard.

4.4.2 Gelelektrophoresen für DNA

Die elektrophoretische Trennung von DNA erfolgte mit Hilfe von Agarose- und Polyacrylamid-Gelen unter nativen und denaturierenden Bedingungen. Unter nativen Bedingungen wurde die DNA-Probe vor dem Auftragen mit DNA-Probenpuffer I oder II (für kurze DNA-Fragmente)

versetzt, wohingegen unter denaturierenden Bedingungen die getrocknete DNA in Formamid-Farbmarker gelöst wurde.

6 × DNA-Probenpuffer I: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 60 mM EDTA
 10 % (v/v) Ficoll® 400
 0.05 % (w/v) Bromphenolblau
 0.05 % (w/v) Xylencyanol
 0.05 % (w/v) Orange-G

6 × DNA-Probenpuffer II: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 60 mM EDTA
 10 % (v/v) Ficoll® 400
 0.05 % (w/v) Bromphenolblau
 0.05 % (w/v) Orange-G

Formamid-Farbmarker: 98 % (v/v) Formamid (deionisiert)
 0.05 % (w/v) Bromphenolblau
 0.05 % (w/v) Xylencyanol

4.4.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse und präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten sowie von Plasmid-DNA wurden native Agarosegele eingesetzt. Die Agarose-Konzentration (0.7 - 2.0 %) richtete sich dabei nach dem entsprechenden Trennbereich. Die Elektrophorese erfolgte in einem horizontalen Agarose-Gelsystem bei einer konstanten Spannung von 5 bis 10 V × cm⁻¹.

Gel- und Laufpuffer: 1 × TAE

4.4.2.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Analyse und präparativen Isolierung von Oligonukleotiden eingesetzt. Die Polyacrylamid-Konzentration (4 - 16 %) richtete sich nach der optimalen Auflösung der zu trennenden Oligonukleotide. Die Elektrophorese erfolgte in einem vertikalen Gelsystem bei einer konstanten Spannung von 10 V × cm⁻¹.

Gel- und Laufpuffer: 0.5 × TBE

4.4.3.2 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin[®] Extract Kits* nach Angaben des Herstellers.

4.4.3.3 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Die zu reinigende DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v/v) und anschließend mit 1 Vol. Chloroform extrahiert. Zwischen den Extraktionsschritten wurde die Probe 30 s bei $15.000 \times g$ zentrifugiert und die wässrige Phase unter Vermeidung der Interphase in ein neues Gefäß überführt.

4.4.3.4 Ethanol-Fällung von DNA

Bei der Ethanol-Fällung wurde die DNA-Lösung mit 0.1 Vol. 3 M NaOAc (pH 4.8) und 2.5 Vol. Ethanol (abs.) gemischt, 10 min bei RT inkubiert und 20 min bei $15.000 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, die präzipitierte DNA mit 1 Vol. 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min bei $15.000 \times g$ zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die DNA etwa 10 min bei RT getrocknet.

4.4.4 Enzymatische Modifizierung von DNA

4.4.4.1 DNA-Restriktion

50 fmol DNA wurden in Gegenwart von 1 bis 2 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l inkubiert. Dabei richteten sich sowohl die Pufferbedingungen als auch Temperatur und Inkubationszeiten nach Angaben des Herstellers.

4.4.4.2 Generierung von glatten DNA-Enden

Die Generierung von glatten DNA-Enden mit 5'-überhängenden bzw. 5'-rezessiven Enden erfolgte mittels DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) bzw. T4-DNA-Polymerase.

50 fmol restringierter DNA wurden mit 1 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) und 0.05 mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in 20 μ l Klenow-Puffer 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 10 min bei 70 °C inaktiviert.

50 fmol restringierter DNA wurden mit 0.5 U T4-DNA-Polymerase und 0.1 mM dNTP-Mix in 20 μ l T4-DNA-Polymerase-Puffer 10 min bei 12 °C inkubiert. Das Enzym wurde durch Zugabe von EDTA (10 mM Endkonzentration) 20 min bei 75 °C inaktiviert.

Klenow-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
 5 mM MgCl₂
 1 mM DTT

T4-DNA-Polymerase-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.9)
 50 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 1 mM DTT

4.4.4.3 5'-Dephosphorylierung von DNA

Bis zu 0.2 pmol 5'-terminal-phosphorylierte DNA mit 5'-überhängenden bzw. 5'-rezessiven Enden wurden 10 min bei 37 °C mit 1 U SAP (Shrimp Alkalische Phosphatase) in 10 μ l SAP-Puffer inkubiert. Bei DNA mit glatten Enden betrug die Inkubationszeit hingegen 1 h. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 65 °C inaktiviert.

SAP-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)
 5 mM MgCl₂

4.4.4.4 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden

100 pmol chemisch-synthetisierte Oligonukleotide wurden zur Phosphorylierung der 5'-Termini mit 10 U T4-Polynukleotid Kinase und 1 mM ATP in 50 μ l T4-Polynukleotid Kinase-Puffer 30 min bei 37 °C inkubiert.

T4-Polynukleotid Kinase-Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 1 mM MgCl₂
 1 mM DTT
 2.5 μ g \times ml⁻¹ BSA

4.4.4.5 DNA-Ligation

In einem 20 μ l Ligationsansatz wurden 25 bis 50 fmol linearisierte Vektor-DNA und die entsprechend restringierte Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Dazu wurden Vektor- und Insert-DNA zunächst in einem Gesamtvolumen von 10 μ l 5 min bei

45 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Nach Zugabe von T4-DNA Ligase-Puffer und 200 U T4-DNA Ligase wurde der Ansatz ÜN bei 16 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

T4-DNA Ligase-Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
	1 mM MgCl ₂
	0.1 mM ATP
	1 mM DTT
	2.5 µg × ml ⁻¹ BSA

4.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*Polymerase Chain Reaktion*) stellt eine effiziente Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente dar (Saiki *et al.*, 1988).

4.4.5.1 Standard-PCR

Die PCR von 1 bis 10 amol Plasmid-DNA erfolgte in Gegenwart von je 100 nM Primer, 200 µM dNTP-Mix und 1 U Taq-DNA-Polymerase in 100 µl PCR-Puffer.

<u>PCR-Programm:</u>	1.	94 °C	2 min	
	2.	94 °C	30 s	} 25 - 30 Zyklen
		50 / 55 °C	30 s	
		72 °C	1 min	
	3.	72 °C	10 min	
	4.	4 °C	∞	

4.4.5.2 PCR von TNR-tragender Plasmid-DNA

Die PCR von 1 bis 10 fmol TNR-tragender Plasmid-DNA erfolgte in Gegenwart von je 100 nM Primer, 200 µM dNTP-Mix, 1 × Q-Solution und 1 U Taq-DNA-Polymerase in 100 µl PCR-Puffer.

<u>PCR-Programm:</u>	1.	94 °C	2 min	
	2.	94 °C	50 s	} 25 Zyklen
		53 / 55 °C	50 s	
		72 °C	1 min	
	3.	72 °C	10 min	
	4.	4 °C	∞	

4.4.5.3 PCR von TNR-tragender genomischer DNA

Die PCR von 0.1 bis 1.0 µg TNR-tragender genomischer DNA erfolgte in Gegenwart von je 100 nM Primer, 200 µM dNTP-Mix und 1 U Taq-DNA-Polymerase in 100 µl PCR-Puffer.

<u>PCR-Programm:</u>	1.	95 °C	2 min	
	2.	95 °C	50 s	} 30 - 35 Zyklen
		55 °C	50 s	
		72 °C	1 min	
	3.	72 °C	10 min	
	4.	4 °C	∞	

4.4.5.4 PCR von ChIP-DNA

Die Analyse der ChIP-DNA-Proben (4.2.4) erfolgte im linearen Bereich der PCR. Dazu wurde nach Bestimmung der optimalen DNA-Menge (1 % DNA-Kontrolle und 10 % ChIP-DNA) und Anzahl der PCR-Zyklen die Reaktion in Gegenwart von je 100 nM Primer, 200 µM dNTP-Mix und 2 U Taq-DNA-Polymerase in 100 µl PCR-Puffer durchgeführt.

<u>PCR-Programm:</u>	1.	95 °C	2 min	
	2.	95 °C	50 s	} 35 - 40 Zyklen
		55 °C	50 s	
		72 °C	1 min	
	3.	72 °C	10 min	
	4.	4 °C	∞	

4.4.4.5 PCR-Analyse von Bakterienkolonien

Die schnelle und effiziente Durchmusterung von Bakterienkolonien nach Klonierungen erfolgte mittels PCR. Hierzu wurde eine einzelne Kolonie selektiert, 3 ml Selektivmedium angeimpft und die verbliebenen Bakterien in ein PCR-Reaktionsgemisch überführt. Die anschließende gelelektrophoretische Trennung der PCR-Produkte zeigte anhand der Größe, ob die dazugehörige Kolonie positiv war. Die entsprechende Flüssigkultur wurde zur Präparation von Plasmid-DNA (4.4.8) und zur Anlegung einer Dauerkultur (4.4.7.3) verwendet.

4.4.6 Transformation von Bakterien

4.4.6.1 Herstellung von chemisch-kompetenten Bakterien

1 ml SOB-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie des *E. coli*-Stammes DH5 α von einer frischen SOB-Agarplatte inokuliert und ÜN bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. 100 ml SOB-Medium wurden mit 1 ml der ÜNK beimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0.2$ bis 0.3) bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei $2500 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellsediment vorsichtig in 20 ml eiskaltem FSB pro 50 ml Kulturvolumen resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei $2500 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die sedimentierten Zellen vorsichtig in 2 ml eiskaltem FSB pro 50 ml Kulturvolumen resuspendiert. Die vereinigten Zellsuspensionen wurden mit 140 μ l DMSO versetzt, vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden erneut 140 μ l DMSO hinzugegeben und die Zellsuspension vorsichtig auf Eis gemischt. Die chemisch-kompetenten DH5 α -Zellen wurden schließlich zu je 100 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert (Sambrook *et al.*, 1989).

FSB:

- 100 mM KCl
- 45 mM MnCl₂
- 10 mM CaCl₂
- 3 mM HAcCoCl₃
- 10 mM K-MES (pH 6.3)
- pH 6.2

4.4.6.2 Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien

Die chemisch-kompetenten DH5 α -Zellen wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig resuspendiert. Je 100 μ l chemisch-kompetente Zellen wurden mit 5 μ l des entsprechenden Ligationsansatzes oder mit etwa 1 ng Plasmid-DNA versetzt, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde der Transformationsansatz 90 s bei 42 °C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde mit 800 μ l SOC-Medium versetzt und 45 min bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen 1 min bei $500 \times g$ zentrifugiert, in 100 μ l LB-Selektivmedium resuspendiert und auf LB-Selektivagarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert (Sambrook *et al.*, 1989).

4.4.7 Kultivierung von Bakterien

4.4.7.1 Anzucht von Bakterien

5 ml LB-Selektivmedium wurden mit einer einzelnen Plasmid-tragenden *E. coli*-Kolonie einer LB-Selektivagarplatte oder mit *E. coli*-Zellen einer Dauerkultur inokuliert und 8 h (Vorkultur) bzw. ÜN (4.4.7.3 und 4.4.8.1) bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. 100 ml LB-Selektivmedium (4.4.8.2) wurden mit 100 µl der Vorkultur beimpft und die Kultur ÜN bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

4.4.7.2 Anzucht von TNR-Plasmid-tragenden Bakterien

Die Anzucht von TNR-Plasmid-tragenden Bakterien erfolgte bei 27 °C bis zum Erreichen der frühen stationären Phase wie oben beschrieben. Infolge der Temperaturerniedrigung verlängerte sich die Inkubationszeit um etwa 8 h.

4.4.7.3 Anlegen von Dauerkulturen

250 µl der ÜNK (4.4.7.1) wurden vorsichtig mit 250 µl einer 60 %-igen Glycerol-Lösung auf Eis gemischt und bei -80 °C gelagert (Sambrook *et al.*, 1989).

4.4.8 Isolierung von Plasmid-DNA

4.4.8.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® Plasmid Kits* nach Angaben des Herstellers. Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA über eine Silikagelmatrix gereinigt.

4.4.8.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Maxipräparation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *NucleoBond® PC 500 Kits* nach Angaben des Herstellers. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt bei dieser Methode mittels Anionenaustausch-Chromatographie.

4.4.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA (*Thermal Cycle Sequencing*)

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip des Didesoxynukleotidverfahrens nach Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Bei der modifizierten *Thermal Cycle Sequencing*-Methode erfolgt die Sequenzierung in Gegenwart von vier verschiedenen fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden und einer thermostabilen DNA-Polymerase in einem Reaktionsansatz.

Dazu wurden 150 fmol Plasmid-DNA und 5 pmol des entsprechenden Primers mit 3 μ l der *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing*-Reaktionslösung versetzt und mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 14 μ l eingestellt.

Die Sequenzierreaktion erfolgte nach folgendem Programm:

- | | | | |
|----|-------|----------|-------------|
| 1. | 96 °C | 3 min | |
| 2. | 96 °C | 15 s | } 25 Zyklen |
| | 50 °C | 15 s | |
| | 60 °C | 4 min | |
| 3. | 4 °C | ∞ | |

Die DNA wurde durch Ethanol-Fällung (4.4.3.4) präzipitiert und am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) auf einem ABI-Sequenator 377 der Firma Applied Biosystems analysiert. Die DNA-Sequenz wurde in Form eines Vier-Farben-Elektropherogramms dokumentiert.

4.4.10 Präparation von genomischer DNA

Die Reinigung genomischer DNA erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® Tissue Kits* nach Angaben des Herstellers.

4.5 Konstruktion von Vektoren

4.5.1 Konstruktion des TNR-tragenden Vektors pEYFP-106/5

Zur Konstruktion des TNR-tragenden Vektors pEYFP-106/5 wurde zunächst der Vektor pEYFP-C1 (Abb. 16) mit *Afl* II restringiert (4.4.4.1), glatte DNA-Enden generiert (4.4.4.2) und dephosphoryliert (4.4.4.3). Die TNR-Sequenz [(CTG)·(CAG)]₁₉ wurde mittels PCR aus dem Vektor pRB106 mit Hilfe der Primer TNR-For(EcoRI) und TNR-Rev (Tab. 1) amplifiziert (4.4.5.2), das PCR-Produkt mit *EcoR* I und *Sau3A* I restringiert (4.4.4.1), glatte DNA-Enden generiert (4.4.4.2) und unidirektional in den linearisierten Vektor ligiert (4.4.4.5). Sowohl die Sequenz als auch Anzahl und Orientierung der *Repeats* wurden durch DNA-Sequenzierung (4.4.9) mit Hilfe von EYFP-For- bzw. EYFP-Rev-Primern (Tab. 2) analysiert.

4.5.2 Konstruktion des pGL3-mdm2-APP-Vektors

Der pGL3-mdm2-APP-Vektor leitet sich vom pGL3-mdm2-Vektor (Kim *et al.*, 1999) ab und enthält drei Restriktionsschnittstellen, welche die beiden p53-Bindungsstellen flankieren (Abb. 24).

Die Konstruktion des pGL3-mdm2-APP-Vektors erfolgte in zwei Schritten: Im ersten Schritt wurde *upstream* der ersten p53-Bindungsstelle (BS1) des humanen *mdm2*-Promotors eine *Afl* II-Restriktionsschnittstelle durch einfache Basensubstitution (G gegen A) generiert. Dazu wurde der pGL3-mdm2-Vektor mit *Nhe* I und *Pst* I restringiert (4.4.4.1) und die beiden miteinander hybridisierten Oligonukleotide NEW-AflII (1) und (2) (Tab. 2) in den linearisierten Vektor ligiert (4.4.4.5). Im zweiten Schritt wurde die zweite *Pvu* II-Restriktionsschnittstelle *downstream* der zweiten p53-Bindungsstelle (BS2) durch einfachen Basenaustausch (A gegen T) deletiert. Dazu wurde das Konstrukt mit *Pvu* II restringiert (4.4.4.1) und dephosphoryliert (4.4.4.3). Die beiden Oligonukleotide DEL-PvuII (1) und (2) (Tab. 2) wurden miteinander hybridisiert, 5'-phosphoryliert (4.4.4.4) und in den restringierten Vektor ligiert (4.4.4.5).

Die Sequenz des resultierenden pGL3-mdm2-APP-Vektors wurde durch DNA-Sequenzierung (4.4.9) mittels RV3- bzw. GL2-Primer (Tab. 1) überprüft. Darüber hinaus wurde die Promotor-Aktivität im Luziferase-Reporter-Aktivitätstest (4.2.5) im Vergleich zum Ausgangskonstrukt kontrolliert.

4.5.2.1 Konstruktion von pGL3-mdm2-APP-Vektoren mit deletierten p53-Bindungsstellen

Zur Konstruktion von pGL3-mdm2-APP-Vektoren mit deletierten p53-Bindungsstellen wurde(n) die zu deletierende(n) p53-Bindungsstelle(n) durch sequentiellen Doppelverdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Abb. 24) entfernt (4.4.4.1), glatte DNA-Enden generiert (4.4.4.2) und der linearisierte Vektor re-ligiert (4.4.4.5). Die Sequenzen wurden durch DNA-Sequenzierung (4.4.9) mittels RV3- bzw. GL2-Primern (Tab. 1) überprüft.

4.5.2.2 Konstruktion von pGL3-mdm2-APP-Vektoren mit insertierten TNR-Sequenzen

Zur Konstruktion von pGL3-mdm2-APP-Vektoren mit insertierten TNR-Sequenzen wurden die TNRs mittels PCR amplifiziert und in den entsprechend restringierten pGL3-mdm2-APP-Vektor als Ausgangsprodukt ligiert.

Zunächst wurden die TNR-Sequenzen mittels PCR aus den Vektoren pRB104 oder pRB106 mit Hilfe der Primer TNR-For(EcoRI) und TNR-Rev (Tab. 1) amplifiziert (4.4.5.2). Der TNR-For(EcoRI)-Primer generiert am 5'-Ende der TNR-Sequenz durch einfache Basensubstitution (G gegen T) eine *EcoR* I-Restriktionsschnittstelle. Das PCR-Produkt wurde gereinigt (4.4.3.2), mit *EcoR* I und *Sau3A* I restringiert (4.4.4.1) und glatte DNA-Enden generiert (4.4.4.2). Der Vektor wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (Abb. 24) linearisiert (4.4.4.1), glatte DNA-Enden generiert (4.4.4.2), dephosphoryliert (4.4.4.3) und das PCR-Produkt unidirektional in den Vektor ligiert (4.4.4.5). Sowohl die Sequenz als auch Anzahl und Orientierung der *Repeats* wurden durch DNA-Sequenzierung (4.4.9) mit Hilfe von RV3- bzw. GL2-Primern (Tab. 1) analysiert.

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die zu bestimmende Protein-Probe wurde mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 µl eingestellt und mit 200 µl *BioRad Protein Assay*-Reagenz in Halbmikro-Plastikküvetten gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm gegen eine Blindprobe als Referenz gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Eichkurve im linearen Bereich ermittelt.

4.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der analytischen Trennung von Proteingemischen. Dabei werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen System voneinander separiert (Laemmli, 1970).

Die zu analysierende Protein-Probe wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 100 °C hitzedenaturiert. Danach wurde die Probe mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE zunächst 30 min bei 60 V im 4 %-igen Sammelgel fokussiert und anschließend im 10 %-igen Trenngel 60 min bei 90 V elektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte die Detektion durch Coomassie-Färbung (4.6.3) und/oder Western-Blotting (4.6.4).

2 × SDS-Probenpuffer:	250 mM Tris-HCl (pH 6.8) 2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol 20 mM DTT 0.01 % (w/v) Bromphenolblau
4 % Sammelgel:	4 % Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1) 125 mM Tris-HCl (pH 6.8) 0.1 % (w/v) SDS 0.05 % (w/v) APS 0.1 % (v/v) TEMED
10 % Trenngel:	10 % Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1) 125 mM Tris-HCl (pH 8.8) 0.1 % (w/v) SDS 0.05 % (w/v) APS 0.1 % (v/v) TEMED
Laufpuffer:	25 mM Tris 190 mM Glycin 0.1 % (w/v) SDS

4.6.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Detektion der Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen wurden die Gele unter leichtem Schütteln 10 bis 20 min bei RT in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurden die

Gele mit Entfärbelösung bis zur gewünschten Verringerung des Hintergrundes unter leichtem Schütteln bei RT entfärbt.

Coomassie-Färbelösung:	0.25 % (w/v) Coomassie Blue R-250
	50 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Methanol
	5 % (v/v) Essigsäure

4.6.4 Western-Blotting

Zum Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen wurde die Membran zunächst 1 min in Methanol inkubiert, mit ddH₂O gewaschen und in Transferpuffer äquilibriert. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Nassblotverfahren auf die Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Elektrobplot-Apparatur für 90 min bei 60 V unter Kühlung.

Zum immunologischen Nachweis wurden zunächst die freien Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in 10 ml Blocklösung 30 min unter leichtem Schütteln bei RT abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten, gegen das zu untersuchende Protein gerichteten spezifischen Antikörpers (verdünnt in 10 ml Blocklösung) ÜN bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 10 ml TBST für je 10 min bei RT entfernt. Die Inkubation mit dem zweiten, gegen das Fc-Fragment des Erst-Antikörpers gerichteten HRP-gekoppelten Antikörpers (verdünnt in 10 ml Blocklösung) erfolgte für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln. Nach dreimaligem Waschen mit 10 ml TBST für je 10 min bei RT wurde der HRP-konjugierte Zweit-Antikörper mittels Chemilumineszenzreaktion detektiert. Dazu wurde die Membran in 10 ml ECL-Detektionslösung für etwa 1 min bei RT inkubiert. Die Dokumentation der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe eines Röntgenfilms.

Transferpuffer:	50 mM Tris
	190 mM Glycin
TBST:	1 × TBS
	0.05 % (v/v) Tween [®] 20

Blocklösung:	1 × TBST 5 % (w/v) Magermilchpulver
ECL-Lösung 1:	100 mM Tris-HCl (pH 8.5) 2.5 mM Luminol 400 µM p-Cumarinsäure
ECL-Lösung 2:	100 mM Tris-HCl (pH 8.5) 0.1 % (v/v) H ₂ O ₂
ECL-Detektionslösung:	5 ml ECL-Lösung 1 und 5 ml ECL-Lösung 2 unmittelbar vor Verwendung unter Lichtabschluss miteinander mischen

4.6.5 Extraktion von rekombinanten p53-Proteinen aus Insektenzellen

Das Zellsediment (4.7.2) wurde in 10 ml eiskaltem Puffer A resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe eines Dounce-Glasschliff-Homogenisators auf Eis. Die aufgeschlossenen Zellen wurden 45 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C bei $5.000 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und als Fraktion A auf Eis gelagert. Der Zellrückstand wurde in 10 ml eiskaltem Puffer B resuspendiert, 45 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert ($5.000 \times g$, 10 min, 4 °C) und der Überstand als Fraktion B auf Eis gelagert. Die Isolierungsprozedur wurde nacheinander entsprechend mit je 10 ml eiskaltem Puffer C und D durchgeführt. Die Fraktionen A bis D wurden schließlich durch Ultrazentrifugation ($35.000 \times g$, 30 min, 4 °C) gereinigt und die Überstände bei -80 °C gelagert (Bessard *et al.*, 1998).

Die einzelnen Fraktionen wurden in Bezug auf Gehalt und Reinheit von p53 mittels SDS-PAGE analysiert (4.6.2).

Puffer A:	10 mM HEPES (pH 7.4) 5 mM KCl 1.5 mM MgCl ₂
-----------	--

Puffer B:	10 mM HEPES (pH 9.0) 5 mM KCl 1.5 mM MgCl ₂
Puffer C:	10 mM HEPES (pH 9.0) 200 mM KCl 1.5 mM MgCl ₂
Puffer D:	10 mM HEPES (pH 9.0) 500 mM KCl 1.5 mM MgCl ₂

Puffer A bis D enthalten darüber hinaus je 1 mM DTT und Protease-Inhibitoren.

4.6.6 FPLC-Aufreinigung von rekombinanten p53-Proteinen

Nach der Extraktion von p53 aus Insektenzellen (4.6.5) wurde die Fraktion mit der höchsten p53-Konzentration mittels FPLC aufgereinigt.

Die chromatographische Auftrennung von p53 erfolgte über eine Heparin-Sepharose-Säule (HiTrap, Säulenvolumen: 1 ml) in einem automatisierten Verfahren (ÄKTApurifier 100 System): Nach Äquilibrierung mit 20 Säulenvolumina Waschpuffer wurden 10 ml der entsprechenden Fraktion auf die Säule gegeben und mit 15 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte über einen linearen Salzgradienten (100 bis 1000 mM KCl) bei konstanter Flussrate ($1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$). Die Eluate wurden als 0.5 ml Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE (4.6.2) und Western-Blot (4.6.4) analysiert.

Waschpuffer:	20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 100 mM KCl 10 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT
Elutionspuffer:	20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 M KCl 10 % (v/v) Glycerol 1 mM DTT

4.6.7 Quantifizierung von FPLC-gereinigten p53-Proteinen

Die Bestimmung der Protein-Konzentration FPLC-gereinigter p53-Proteine erfolgte nach elektrophoretischer Trennung mittels SDS-PAGE (4.6.2) und anschließender Coomassie-Färbung (4.6.3) durch den densitometrischen Vergleich der Bandenintensitäten der zu untersuchenden Probe mit BSA bekannter Konzentration als Standard.

4.6.8 Reinigung von Antikörpern

50 ml Hybridomaüberstand wurden mit 0.1 Vol. 1 M Tris-HCl (pH 8.0) versetzt und mit 1 ml 50 %-iger PGS ÜN bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Suspension wurde in eine Poly-Prep™ Chromatographie-Säule überführt und die Sepharose nacheinander mit je 5 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 5 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte mit 100 mM Glycin (pH 3.0). Dabei wurden 500 µl Fraktionen in 1.5 ml Mikroreaktionsgefäßen, in denen zuvor 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 8.0) vorgelegt wurde, gesammelt (Ey *et al.*, 1978).

4.7 Zellkultur

4.7.1 Kultivierung von Insektenzellen

Insektenzellen wurden in geschlossenen Zellkulturflaschen in TC100-Medium mit 10 % (v/v) FCS und 2 mM Glutamin bei 27 °C kultiviert. Die Zellen wurden mechanisch durch leichtes Abschlagen vom Flaschenboden abgelöst und in geeigneter Verdünnung passagiert.

4.7.2 Baculovirus-Infektion von Insektenzellen zur Expression von rekombinanten p53-Proteinen

High Five™-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden in dreistöckigen Zellkulturflaschen ausgesät und bis zum Erreichen von etwa 80 % Konfluenz expandiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 5 bis 10 des entsprechenden Baculovirusstocks infiziert und für etwa 48 h bei 27 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen geerntet und 10 min bei

4.7.5 Transfektion von Zellen mittels Nukleofektion

Die Transfektion von Zellen mittels Nukleofektion basiert auf dem Konzept der Elektroporation durch Kombination zelltypspezifischer elektrischer Parameter und *Nucleofector*[™]-Pufferlösungen.

Die zu transfizierenden Zellen wurden, wie unter 4.7.3 beschrieben, mittels Trypsin/EDTA geerntet. 1×10^6 Zellen wurden 10 min bei $200 \times g$ zentrifugiert, mit $1 \times$ PBS gewaschen und erneut 10 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 100 μ l *Nucleofector*[™] *Solution R* resuspendiert, mit 1 μ g DNA (in maximal 5 μ l ddH₂O) versetzt und die Suspension in eine Amaxa-zertifizierte Küvette überführt. Die Nukleofektion erfolgte mit Hilfe des Nucleofectors I mit dem Programm A24. Danach wurden 500 μ l auf 37 °C vorgewärmtes Kulturmedium der Zellsuspension hinzugefügt, die Proben in eine 6-Loch-Zellkulturschale ausgesät und bis zur Analyse kultiviert.

4.7.6 Transfektion von Zellen mittels Effectene[™]

2×10^6 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und ÜN in DMEM mit 10 % (v/v) FCS kultiviert. 2 μ g Plasmid-DNA wurden mit *EC*-Puffer auf ein Volumen von 300 μ l eingestellt, mit 16 μ l *Enhancer*-Lösung versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 50 μ l *Effectene*[™] *Transfection Reagent* hinzugefügt und die Transfektions-Lösung 10 min bei RT inkubiert. In diesem Zeitraum wurden die Zellen mit $1 \times$ PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versetzt. Die Transfektions-Lösung wurde mit 1 ml Kulturmedium gemischt und tropfenweise auf die Zellen zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 12 h wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen 24 h bis zur Analyse kultiviert.

4.7.7 Etablierung rekombinanter TNR-tragender Zelllinien

Die Etablierung TNR-tragender Zelllinien erfolgte durch die stabile Integration des TNR-tragenden Vektor pEYFP-106/5 und des Ausgangsvektors pEYFP-C1 als Negativkontrolle in das Genom der p53-defizienten humanen Zelllinie Saos-2.

Dazu wurden die Zellen mittels Nukleofektion (4.7.5) mit den entsprechenden Neomycin-Resistenzgen-tragenden Vektoren transfiziert. Das Kulturmedium wurde 24 h nach der Transfektion durch Selektionsmedium ($1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ G418[®]) ersetzt und alle drei bis vier Tage gewechselt. Nach etwa zwei Wochen wurden einzelne Zellklone mit Hilfe von Klonierungs-

zylindern selektioniert, in 24-Loch-Zellkulturschalen transferiert und als Zelllinien etabliert. Dabei wurden Klone mit vergleichbarer EYFP-Expression ausgewählt, die genomische DNA präpariert (4.4.10) und die in das Genom der Zelle integrierte Vektorsequenz mittels PCR (4.4.5.3) unter Verwendung der Primer EGFP-C und EYFP-Rev (3.11, Tab.1) amplifiziert und sequenziert (4.4.9).

5. ERGEBNISSE

5.1 Die struktur-spezifische Interaktion von p53 mit TNRs

p53 weist neben der sequenz-spezifischen DNA-Bindung an die p53-Konsensus-Sequenz (s. 1.2.3) zusätzlich hoch-affine, aber nicht-sequenz-spezifische DNA-Bindungseigenschaften auf. Ein wesentliches Charakteristikum der nicht-sequenz-spezifischen DNA-Bindung ist, dass die Mehrzahl der *in vitro* untersuchten DNA-Substrate strukturierte DNA-Bereiche für die Interaktion mit p53 aufzeigen (s. 1.2.4).

In dieser Arbeit sollte die Interaktion zwischen p53 und TNRs untersucht werden. TNRs sind aufgrund der quasi-palindromen repetitiven Sequenz und der erhöhten Flexibilität der DNA-Doppelhelix in der Lage, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch intramolekulare Basenpaarung DNA-Strukturen auszubilden (Pearson *et al.*, 2002). Darüber hinaus weisen TNRs keinerlei Übereinstimmung mit der p53-Konsensus-Sequenz auf (el-Deiry *et al.*, 1992). Aus diesem Grund stellen TNRs exzellente Modellsubstrate für die Untersuchung der nicht-sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53 in Abhängigkeit von der DNA-Struktur dar.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die DNA-Bindungseigenschaften von humanem wt und mutp53 gegenüber TNRs in Abhängigkeit der DNA-Struktur *in vitro* charakterisiert werden.

5.1.1 Darstellung von TNR-Substraten für p53-TNR-Bindungsstudien

Für die p53-TNR-Bindungsstudien wurden synthetisch-hergestellte TNR-Substrate mit unterschiedlicher DNA-Konformation und Basenzusammensetzung eingesetzt:

- (1) (CTG)(CAG),
- (2) (CTG)(CTG) mit (T·T)-Basenfehlpaarungen,
- (3) (CAG)(CAG) mit (A·A)-Basenfehlpaarungen,
- (4) (CTG)-HP mit (T·T)-Basenfehlpaarungen und
- (5) (CAG)-HP mit (A·A)-Basenfehlpaarungen.

Neben dem linearen (CTG)(CAG) TNR-Substrat (Substrat 1) wurden strukturierte (CTG)- und (CAG)-HP (HP; *Hairpin*) TNR-Substrate (Substrat 4 und 5) verwendet. Lineare (CTG)(CTG) und (CAG)(CAG) TNR-Substrate mit (T·T)- und (A·A)-Basenfehlpaarungen (Substrat 2 und 3)

dienten als Modellssubstrate, um den Einfluss von Basenfehlpaarungen auf die Interaktion zwischen p53 und TNRs zu untersuchen.

5.1.1.1 Darstellung von linearen TNR-Substraten

Die Darstellung linearer TNR-Substrate ohne und mit Basenfehlpaarungen erfolgte durch Hybridisierung der (CXG)-SENSE und (CXG)-ANTISENSE Oligonukleotide (X = A oder T) (Tab. 3), wie unter 4.1.2 beschrieben. Um intermolekulare Basenpaarungen zwischen zwei gleichen Oligonukleotiden und intramolekulare Basenpaarungen innerhalb eines Oligonukleotids zu verhindern, tragen die verwendeten Oligonukleotide flankierende DNA-Sequenzen in antiparalleler Orientierung. Darüber hinaus enthalten beide Oligonukleotide 6 bp lange DNA-Sequenzen, die bei korrekter Hybridisierung eine *EcoR* I-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende generieren.

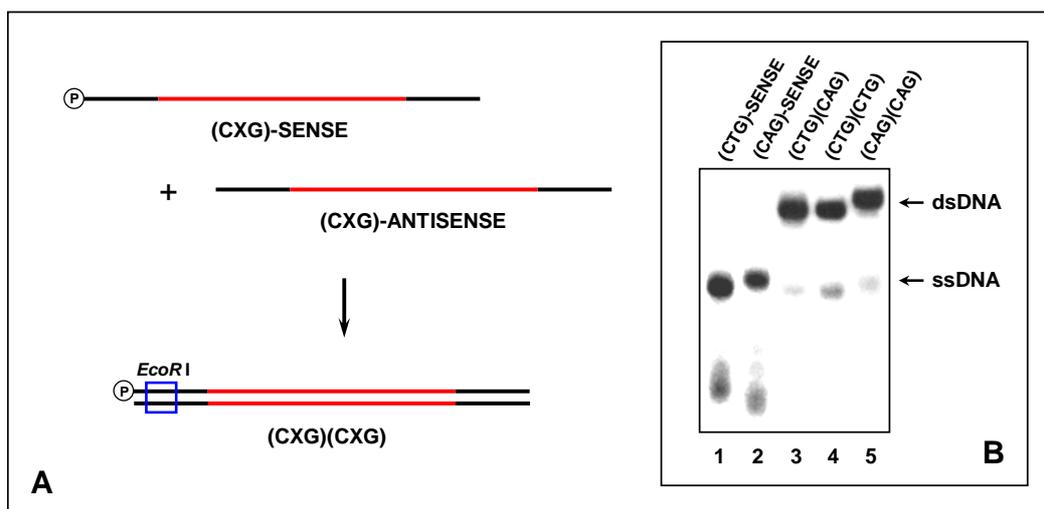


Abb. 2 Darstellung von linearen TNR-Substraten.

(A) Schematische Darstellung: Lineare TNR-Substrate wurden durch Hybridisierung des ^{32}P -markierten (CXG)-SENSE mit dem nicht-markierten (CXG)-ANTISENSE Oligonukleotid dargestellt. TNR-Sequenzen sind rot, flankierende Sequenzen zur Stabilisierung der Substrate schwarz markiert. Die *EcoR* I-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende ist als blaues Rechteck dargestellt. (B) Migrationsverhalten ^{32}P -markierter (CXG)-SENSE Oligonukleotide vor (Bahn 1 und 2) und nach der Hybridisierung (Bahn 3, 4 und 5) mit den entsprechenden (CXG)-ANTISENSE Oligonukleotiden in einem nativen 8 %-igen Polyacrylamidgel (4.4.2.2).

Trotz gleicher Anzahl an Basen wies das lineare (CAG)(CAG) TNR-Substrat im Gegensatz zu den linearen (CTG)(CAG) und (CTG)(CTG) TNR-Substraten in einem nativen 8 %-igen Polyacrylamidgel ein leicht verzögertes Migrationsverhalten auf (Abb. 2 B, Bahn 3, 4 und 5). Da die TNR-Substrate unter denaturierenden Bedingungen ein identisches Laufverhalten zeigten

(Resultate nicht dargestellt), ist dies ein Hinweis dafür, dass sich das lineare TNR-Substrat mit (A·A)-Basenfehlpaarungen in Bezug auf die DNA-Konformation von linearen TNR-Substraten ohne bzw. mit (T·T)-Basenfehlpaarungen unterscheidet.

5.1.1.2 Darstellung von strukturierten TNR-Substraten

Die Darstellung strukturierter TNR-Substrate erfolgte durch Hybridisierung der beiden Oligonukleotide (CXG)-BASE und (CXG)-LOOP (Tab. 3), wie unter 4.1.2 beschrieben. Das (CXG)-LOOP Oligonukleotid enthält neben dem entsprechenden TNR-Motiv flankierende DNA-Sequenzen, die komplementär zum (CXG)-BASE Oligonukleotid sind. Durch intramolekulare Basenpaarung der TNR-Sequenz wird eine DNA-*Hairpin*-Struktur gebildet, die durch intermolekulare Basenpaarung mit dem (CXG)-BASE Oligonukleotid stabilisiert wird (Göhler *et al.*, 2002). Darüber hinaus weisen beide Oligonukleotide eine 4 bp lange DNA-Sequenz auf, die nach korrekter Hybridisierung eine *Hae* III-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende generiert.

Die Sequenz des (CXG)-BASE Oligonukleotids entspricht der des T3-1 Oligonukleotids (Göhler *et al.*, 2002), mit dem Unterschied, dass zur Generierung der *Hae* III-Restriktionsschnittstelle ein Adenin- und ein Cytosin-Rest am 5'-Ende gegen je einen Guanin-Rest substituiert wurde.

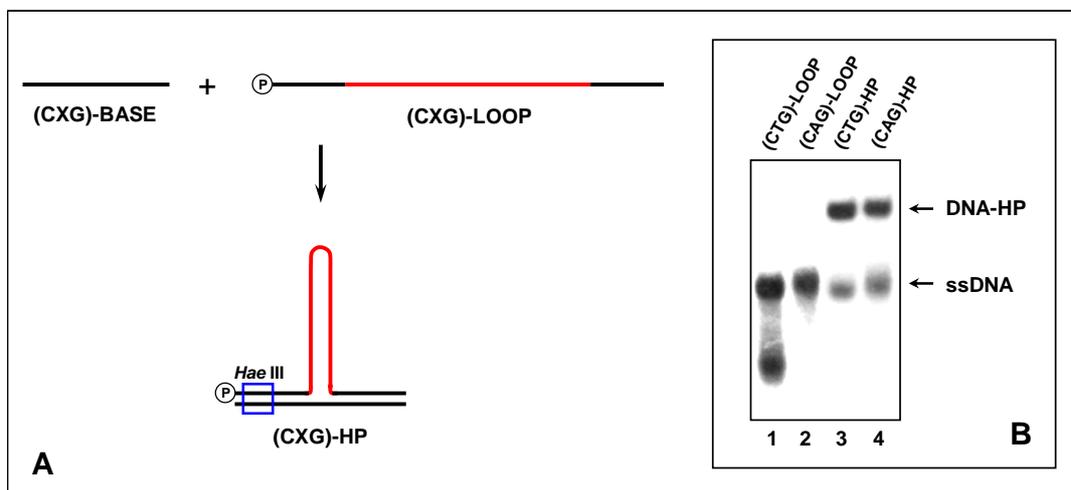


Abb. 3 Darstellung von strukturierten TNR-Substraten.

(A) Schematische Darstellung: Das ^{32}P -markierte Oligonukleotid (CXG)-LOOP bildet durch intramolekulare Basenpaarung des TNR-Motivs (rot) eine DNA-*Hairpin*-Struktur, die infolge intermolekularer Basenpaarung komplementärer DNA-Bereiche (schwarz) mit dem Oligonukleotid (CXG)-BASE stabilisiert wird. Die *Hae* III-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende wird durch ein blaues Rechteck repräsentiert. (B) Migrationsverhalten von

³²P-markierten (CTG)- bzw. (CAG)-LOOP Oligonukleotiden vor (Bahn 1 bzw. 2) und nach Hybridisierung mit dem (CXG)-BASE Oligonukleotid (Bahn 3 bzw. 4) in einem nativen 8 %-igen Polyacrylamidgel (4.4.2.2).

5.1.1.3 Restriktionskontrolle von linearen und strukturierten TNR-Substraten

Zur Kontrolle wurden die dargestellten TNR-Substrate mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (4.4.4.1) und gelelektrophoretisch analysiert. Aufgrund der Spezifität der Restriktionsendonukleasen für doppelsträngige DNA erfolgte die Hydrolyse lediglich bei korrekt hybridisierten TNR-Substraten.

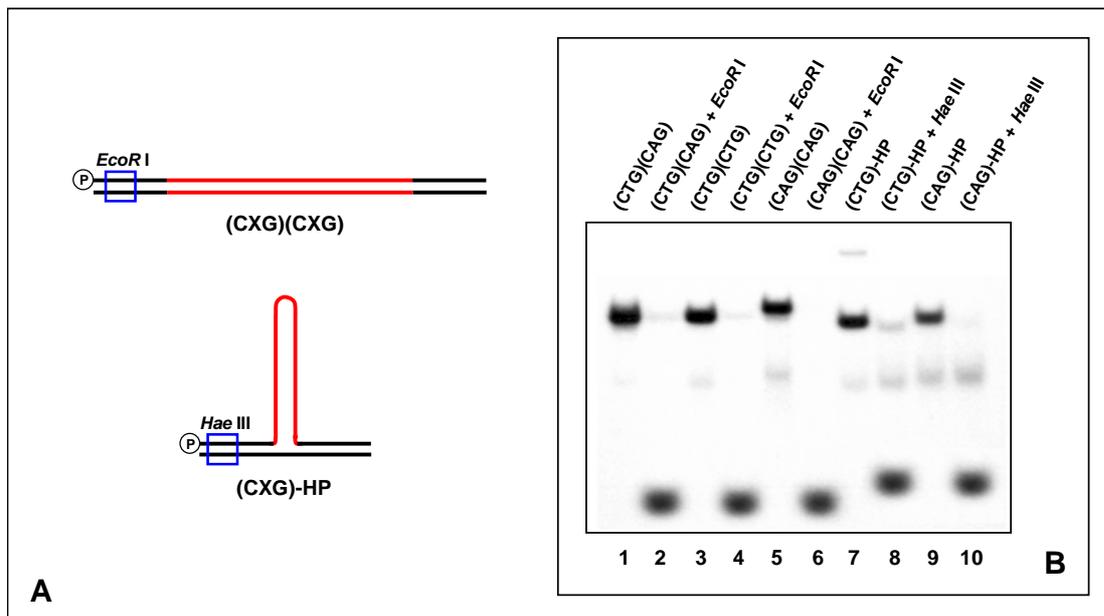


Abb. 4 Restriktionskontrolle von linearen und strukturierten TNRs.

(A) Schematische Darstellung linearer und strukturierter TNR-Substrate. (B) Analytische Trennung der TNR-Substrate vor und nach der Hydrolyse durch die entsprechend angegebenen Restriktionsendonukleasen mittels eines nativen 8 %-igen Polyacrylamidgels (4.4.2.2).

Da die Erkennungssequenzen jeweils am radioaktiv-markierten 5'-Ende der TNR-Substrate lokalisiert sind, ging das jeweilige Signal nach der Hydrolyse verloren. Bei korrekter Hybridisierung resultierte das in Abb. 4 B dargestellte charakteristische Spaltungsmuster.

5.1.2 Interaktion von wtp53 mit TNRs *in vitro*

Im Folgenden wurde das DNA-Bindungsverhalten von FPLC-gereinigtem, rekombinantem wtp53 aus Insektenzellen (4.6.6) gegenüber linearen und strukturierten TNR-Substraten mit Hilfe von Bandshift-Analysen (4.2.1) untersucht.

5.1.2.1 DNA-Bindung von wtp53 an lineare und strukturierte TNR-Substrate

Bandshift-Analysen zeigten, dass wtp53 mit niedriger Affinität an lineare TNRs, aber mit hoher Affinität an strukturierte TNRs bindet. Dabei ist die Bindung von wtp53 an (CTG)-HP wesentlich stärker als die Bindung an (CAG)-HP (Abb. 5, Bahn 10 und 18). Interessanterweise inhibierte der gegen die Regulationsdomäne (REG) gerichtete Antikörper PAb421 die Bindung von wtp53 an strukturierte TNRs nahezu vollständig (Abb. 5, Bahn 11, und 19). Der inhibitorische Einfluss des C-terminalen Antikörpers konnte bisher nur bei der sequenz-spezifischen Bindung von wtp53 an strukturierte DNA-Substrate beobachtet werden (Göhler *et al.*, 2002).

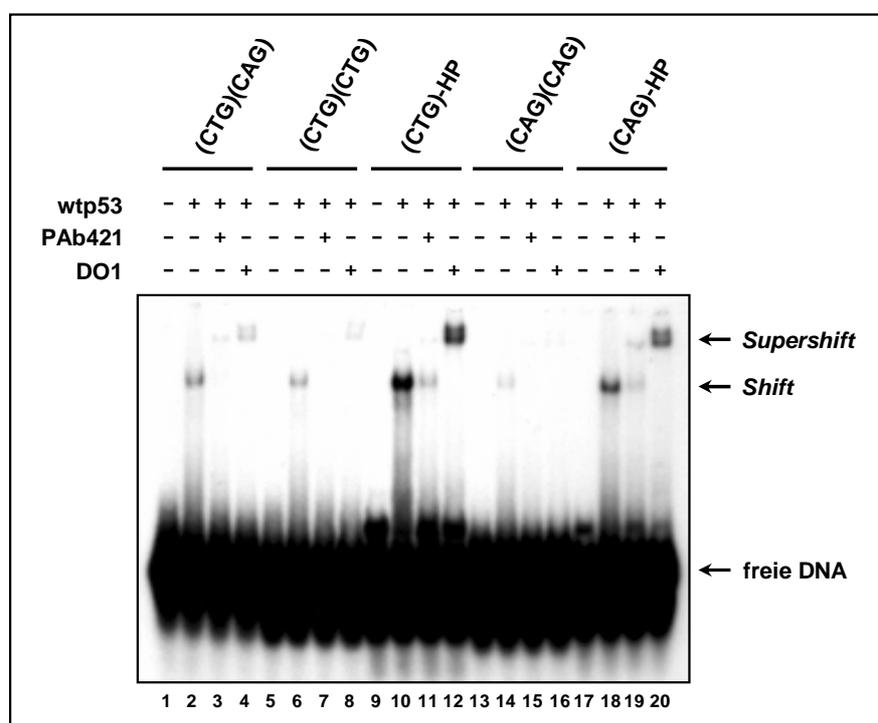


Abb. 5 DNA-Bindung von wtp53 an TNR-Substrate.

Bandshift-Analysen von TNR-Substraten ohne (Bahn 1, 5, 9, 13 und 17) und mit konstanten wtp53-Mengen (Bahn 2, 6, 10, 14 und 18) in Gegenwart des C-terminalen Antikörpers PAb421 (Bahn 3, 7, 11, 15 und 19) bzw. des N-terminalen Antikörpers DO1 (Bahn 4, 8, 12, 16 und 20). Ungebundene TNR-Substrate sowie p53/DNA- bzw. p53/DNA/Ab-Komplexe sind entsprechend durch Pfeile markiert.

Da strukturierte TNRs ungepaarte Basen enthalten, die als Erkennungsdeterminanten für die DNA-Bindung fungieren können (Göhler *et al.*, 2002), wurde der Einfluss von Basenfehlpaarungen auf die DNA-Bindungseigenschaft von wtp53 gegenüber linearen TNR-Substraten untersucht (Degtyareva *et al.*, 2001). Um die struktur-spezifische Bindung vom Einfluss der Basenfehlpaarungen zu separieren, wurde die DNA-Bindung von wtp53 gegenüber linearen

TNRs mit (T·T)- und (A·A)-Basenfehlpaarungen analysiert. Infolge der überaus schwachen Bindung von wtp53 an lineare TNR-Substrate mit (T·T)- und (A·A)-Basenfehlpaarungen (Abb. 5, Bahn 6 und 14), kann davon ausgegangen werden, dass ungepaarte Basen lediglich die struktur-spezifische Bindung beeinflussen. Diese Beobachtung wurde dadurch akzentuiert, dass wtp53 mit höherer Affinität an lineare TNR-Substrate ohne Basenfehlpaarungen bindet (Abb. 5, Bahn 2). Dies bestätigt, dass wtp53 eine hohe nicht-sequenz-spezifische Affinität gegenüber linearer DNA aufweist und dass die nicht-sequenz-spezifische Bindung durch C-terminale Modifikation inhibiert wird (Wölcke *et al.*, 2003). Der inhibitorische Effekt des C-terminalen Antikörpers PAb421 war auch bei der Interaktion von wtp53 mit linearen TNRs zu beobachten (Abb. 5, Bahn 3, 7 und 15). Dagegen führte der gegen den N-Terminus gerichtete Antikörper DO1 zu einem *Supershift* ohne direkt die Bindung von wtp53 zu beeinflussen (Abb. 5, Bahn 4, 8, 12, 16 und 20).

5.1.2.2 DNA-Bindung von p53 Δ 30 an lineare und strukturierte TNR-Substrate

Da der gegen die REG gerichtete C-terminale Antikörper PAb421 die Bindung von wtp53 an TNR-Substrate inhibierte (5.1.2.1), wurde der Einfluss der REG auf die Interaktion von p53 mit TNRs untersucht. Hierzu wurden Bandshift-Analysen mit der Deletionsmutante p53 Δ 30 durchgeführt, bei der die REG von wtp53 deletiert ist.

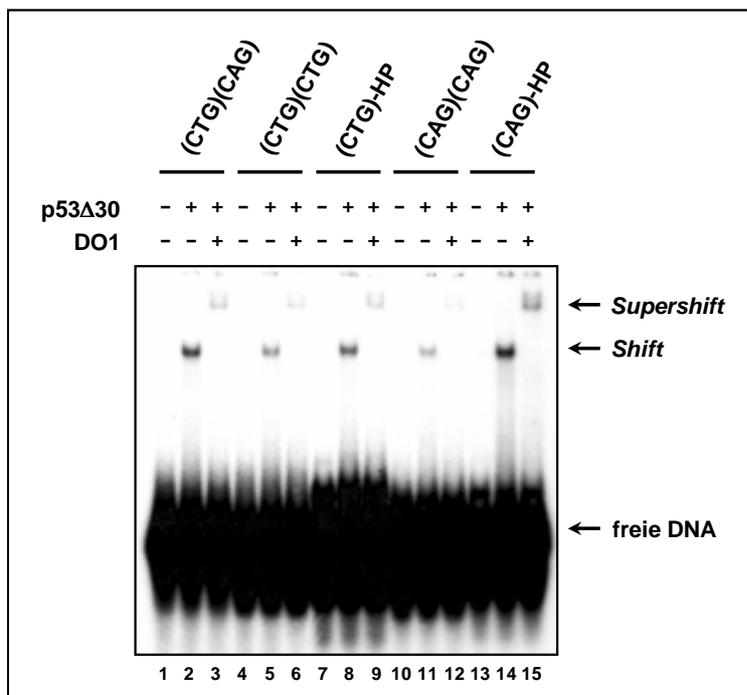


Abb. 6 DNA-Bindung von C-terminal deletiertem p53 Δ 30 an TNR-Substrate.

Bandshift-Analysen von TNR-Substraten ohne (Bahn 1, 4, 7, 10 und 13) und mit konstanten p53 Δ 30-Mengen (Bahn 2, 5, 8, 11 und 14) in Gegenwart des N-terminalen Antikörpers DO1 (Bahn 3, 6, 9, 12 und 15). Ungebundene TNR-Substrate sowie p53/DNA- bzw. p53/DNA/Ab-Komplexe sind entsprechend durch Pfeile markiert.

Wie aufgrund des positiven Einflusses des C-Terminus von wtp53 auf die struktur-spezifische Bindung zu erwarten war, wies p53 Δ 30 im Gegensatz zu wtp53 eine geringere Affinität gegenüber dem strukturierten (CTG)-HP TNR-Substrat auf (Abb. 6, Bahn 8). Interessanterweise wurde jedoch durch die Deletion der REG die Interaktion mit dem strukturierten (CAG)-HP TNR-Substrat kaum beeinflusst (Abb. 6, Bahn 14). Auch die Bindung von p53 Δ 30 an lineare TNRs ohne und mit Basenfehlpaarungen unterschied sich kaum von der des wtp53-Proteins (Abb. 6, Bahn 2, 5 und 11). Der N-terminale Antikörper DO1 bewirkte in allen Fällen eine deutliche Inhibierung der Bindung (Abb. 6, Bahn 3, 6, 9, 12 und 15). Da der gegen den N-Terminus gerichtete Antikörper die Bindung von Volle-Länge wtp53 (FL-wtp53) nicht beeinflusste, liegt die Vermutung nahe, dass die DNA-Bindung von p53 sowohl durch den C- als auch durch den N-Terminus reguliert wird. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass bei der sequenz-spezifischen Bindung von wtp53 an lineare DNA der N-Terminus die Dissoziation von p53 reguliert und die isolierte DBD (DNA-Bindungsdomäne) im Gegensatz zu wtp53 eine weitaus höhere Dissoziationskonstante aufweist (Cain *et al.*, 2000).

5.1.3 Interaktion von mutp53 mit TNRs *in vitro*

Nachfolgend wurden die DNA-Bindungseigenschaften von FPLC-gereinigten, rekombinanten p53 *Hot-Spot*-Mutanten aus Insektenzellen (4.6.6) gegenüber linearen und strukturierten TNR-Substraten mit Hilfe von Bandshift-Analysen (4.2.1) untersucht. Dafür wurden die Konformationsmutante G245S und die beiden DNA-Kontaktmutanten R248P und R273H verwendet.

5.1.3.1 DNA-Bindung von G245S an lineare und strukturierte TNR-Substrate

Die Konformationsmutante G245S wies gegenüber den TNR-Substraten ähnliche Affinitäten auf wie wtp53 (Abb. 7, Bahn 2, 6, 10, 14 und 18). Im Gegensatz zu wtp53 stimulierte der C-terminale Antikörper die Bindung von G245S an lineare TNRs (Abb. 7, Bahn 3, 7 und 15). Eine Inhibierung der Bindung konnte hingegen nur bei der Bindung an das strukturierte (CTG)-HP TNR-Substrat beobachtet werden (Abb. 7, Bahn 11). Dieser durch den Antikörper hervorgerufene stimulierende bzw. inhibierende Effekt wurde bisher lediglich bei der sequenz-

spezifischen Interaktion zwischen wtp53 und linearer bzw. strukturierter DNA beobachtet (Göhler *et al.*, 2002). Eine Inhibierung der Bindung von G245S an das strukturierte (CAG)-HP TNR-Substrat konnte hingegen nicht beobachtet werden (Abb. 7, Bahn 19). Die Gegenwart des N-terminalen Antikörpers DO1 führte in nahezu allen Fällen zu einem *Supershift* (Abb. 7, Bahn 4, 8, 12 und 16) und verstärkte lediglich die Bindung von G245S an (CAG)-HP (Abb. 7, Bahn 20).

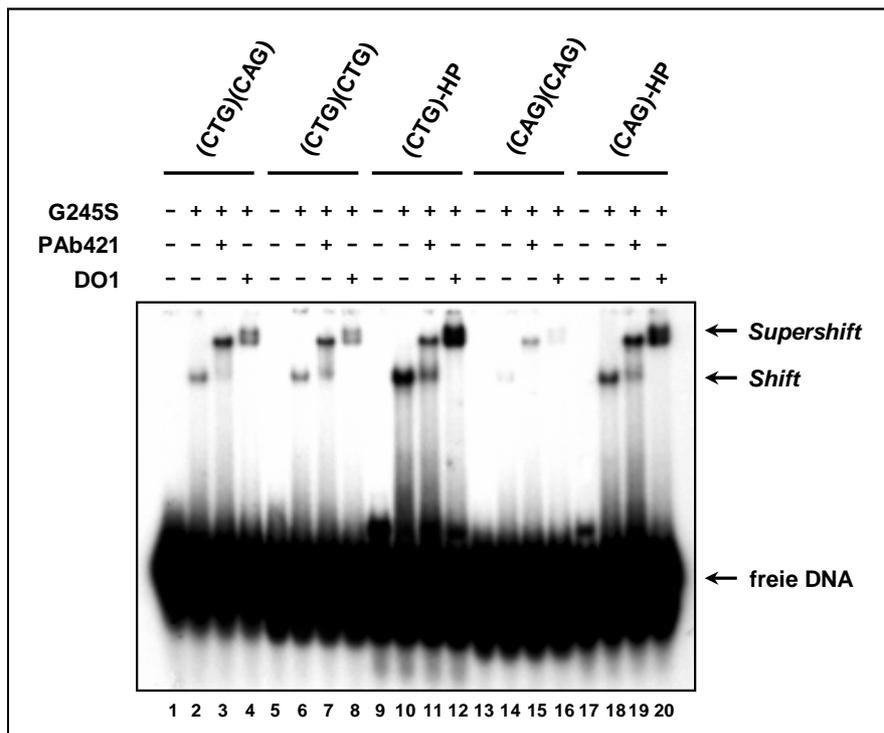


Abb. 7 DNA-Bindung der Konformationsmutante G245S an TNR-Substrate.

Bandshift-Analysen von TNR-Substraten ohne (Bahn 1, 5, 9, 13 und 17) und mit konstanten G245S-Mengen (Bahn 2, 6, 10, 14 und 18) in Gegenwart des C-terminalen Antikörpers PAb421 (Bahn 3, 7, 11, 15 und 19) bzw. des N-terminalen Antikörpers DO1 (Bahn 4, 8, 12, 16 und 20). Ungebundene TNR-Substrate sowie p53/DNA- bzw. p53/DNA/Ab-Komplexe sind entsprechend durch Pfeile markiert.

5.1.3.2 DNA-Bindung von R248P an lineare und strukturierte TNR-Substrate

Die DNA-Kontaktmutante R248P wies im Vergleich zu wtp53 gegenüber linearen vergleichbare und gegenüber strukturierten TNR-Substraten geringere Bindungsaffinitäten auf (Abb. 8, Bahn 2, 6 und 14 bzw. 10 und 18). Im Gegensatz zu wtp53 beeinflusste der C-terminale Antikörper PAb421 die Bindung von R248P an (CTG)-HP kaum, wohingegen der N-terminale Antikörper DO1 zu einer deutlichen Verstärkung der Bindung führte (Abb. 8, Bahn 11 und 12). Die Bindung von R248P an (CAG)-HP wurde hingegen sowohl durch den C- als auch durch den N-terminalen Antikörper deutlich verstärkt (Abb. 8, Bahn 19 und 20). Im Gegensatz zu wtp53

verstärkte der C-terminale Antikörper auch die Bindung an das lineare (CAG)(CAG) TNR-Substrat (Abb. 8, Bahn 15), wohingegen die Bindung an die linearen (CTG)(CAG) und (CTG)(CTG) TNR-Substrate nicht beeinflusst wurde (Abb. 8, Bahn 3 und 7). Die Gegenwart des N-terminalen Antikörpers hatte keinen Einfluss auf die Bindung von R248P an lineare TNR-Substrate (Abb. 8, Bahn 4, 8 und 16).

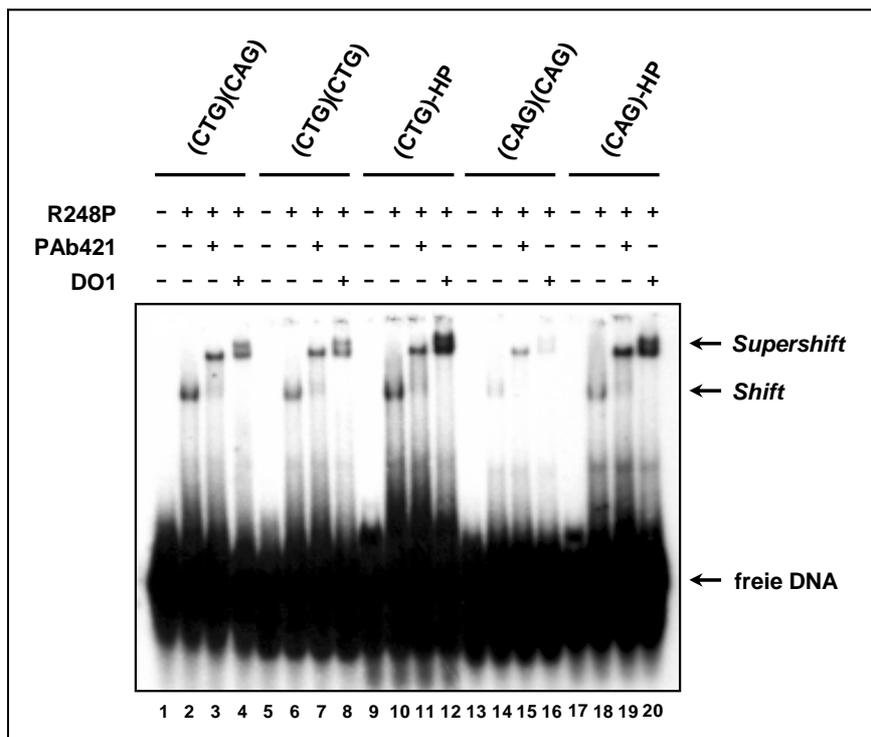


Abb. 8 DNA-Bindung der DNA-Kontaktmutante R248P an TNR-Substrate.

Bandshift-Analysen von TNR-Substraten ohne (Bahn 1, 5, 9, 13 und 17) und mit konstanten R248P-Mengen (Bahn 2, 6, 10, 14 und 18) in Gegenwart des C-terminalen Antikörpers PAb421 (Bahn 3, 7, 11, 15 und 19) bzw. des N-terminalen Antikörpers DO1 (Bahn 4, 8, 12, 16 und 20). Ungebundene TNR-Substrate sowie p53/DNA- bzw. p53/DNA/Ab-Komplexe sind entsprechend durch Pfeile markiert.

5.1.3.3 DNA-Bindung von R273H an lineare und strukturierte TNR-Substrate

Die DNA-Kontaktmutante R273H wies ein ähnliches Bindungsmuster wie wtp53 auf. Allerdings war die Affinität von R273H gegenüber den untersuchten TNR-Substraten generell wesentlich geringer (Abb. 9).

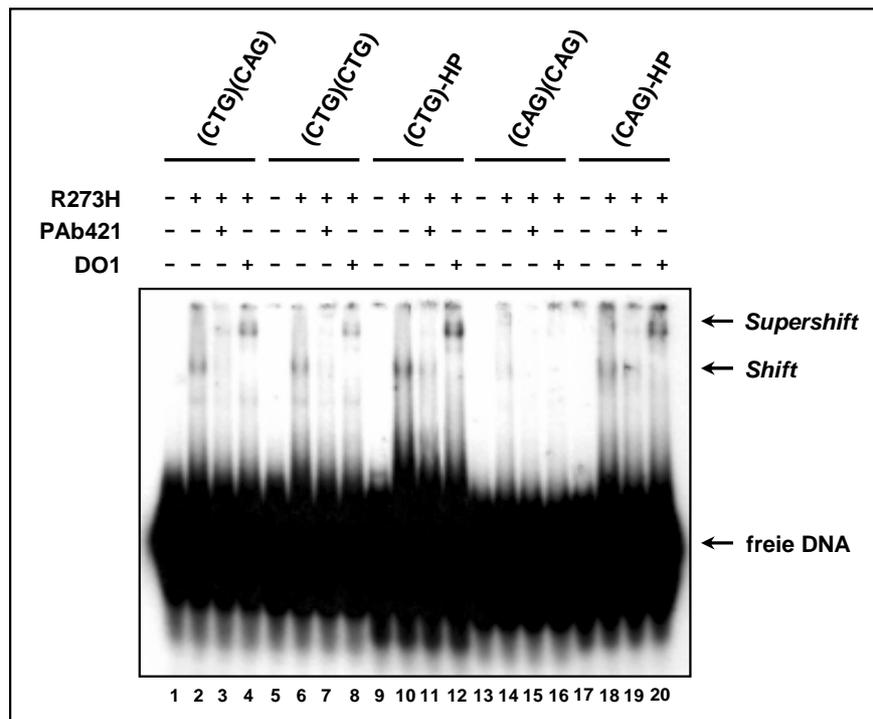


Abb. 9 DNA-Bindung der DNA-Kontaktmutante R273H an TNR-Substrate.

Bandshift-Analysen von TNR-Substraten ohne (Bahn 1, 5, 9, 13 und 17) und mit konstanten R273H-Mengen (Bahn 2, 6, 10, 14 und 18) in Gegenwart des C-terminalen Antikörpers PAb421 (Bahn 3, 7, 11, 15 und 19) bzw. des N-terminalen Antikörpers DOI (Bahn 4, 8, 12, 16 und 20). Ungebundene TNR-Substrate sowie p53/DNA- bzw. p53/DNA/Ab-Komplexe sind entsprechend durch Pfeile markiert.

5.1.4 Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur von TNRs

Um die struktur-spezifischen DNA-Bindungseigenschaften von p53 gegenüber TNRs interpretieren zu können, wurden die eingesetzten DNA-Substrate hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur sowohl enzymatisch als auch chemisch analysiert (4.3.1 und 4.3.2).

T7-Endonuklease I (T7-EndoI) ist eine struktur-spezifische Endonuklease, die einzelsträngige DNA von DNA-Hairpin Junctions hydrolysiert. Mung Bean Nuclease (MBN) hingegen ist eine einzelstrang-spezifische Endonuklease, die einzelsträngige Bereiche von DNA-Hairpin Loops hydrolysiert. Ein Nachteil der Charakterisierung von DNA mit struktur-spezifischen Nukleasen ist jedoch, dass infolge der Protein-DNA-Interaktion partiell strukturierte Bereiche induziert werden können, die bei Abwesenheit des Enzyms nicht ausgebildet werden. Deshalb wurden die TNR-Substrate zusätzlich durch chemische Modifikation mit Osmiumtetroxid (OsO₄) und Diethylpyrocarbonat (DEPC) untersucht. OsO₄ modifiziert spezifisch Thymidin-Basen, wohingegen DEPC sowohl Adenin- als auch Guanin-Basen modifiziert. Dabei weisen ungepaarte Basen gegenüber der chemischen Modifizierung eine weitaus höhere Reaktivität auf. Die

anschließende Spaltung der chemisch-modifizierten Basen mit Piperidin führt schließlich zur Fragmentierung der DNA.

Da Kationen, pH und Temperatur die Struktur der DNA beeinflussen können, wurden alle Untersuchungen zur Strukturaufklärung unter nahezu identischen Bedingungen durchgeführt. Darüber hinaus wurden alle Reaktionen unter Bedingungen der *Single-Hit*-Kinetik durchgeführt, um eine korrekte Strukturaufklärung zu gewährleisten.

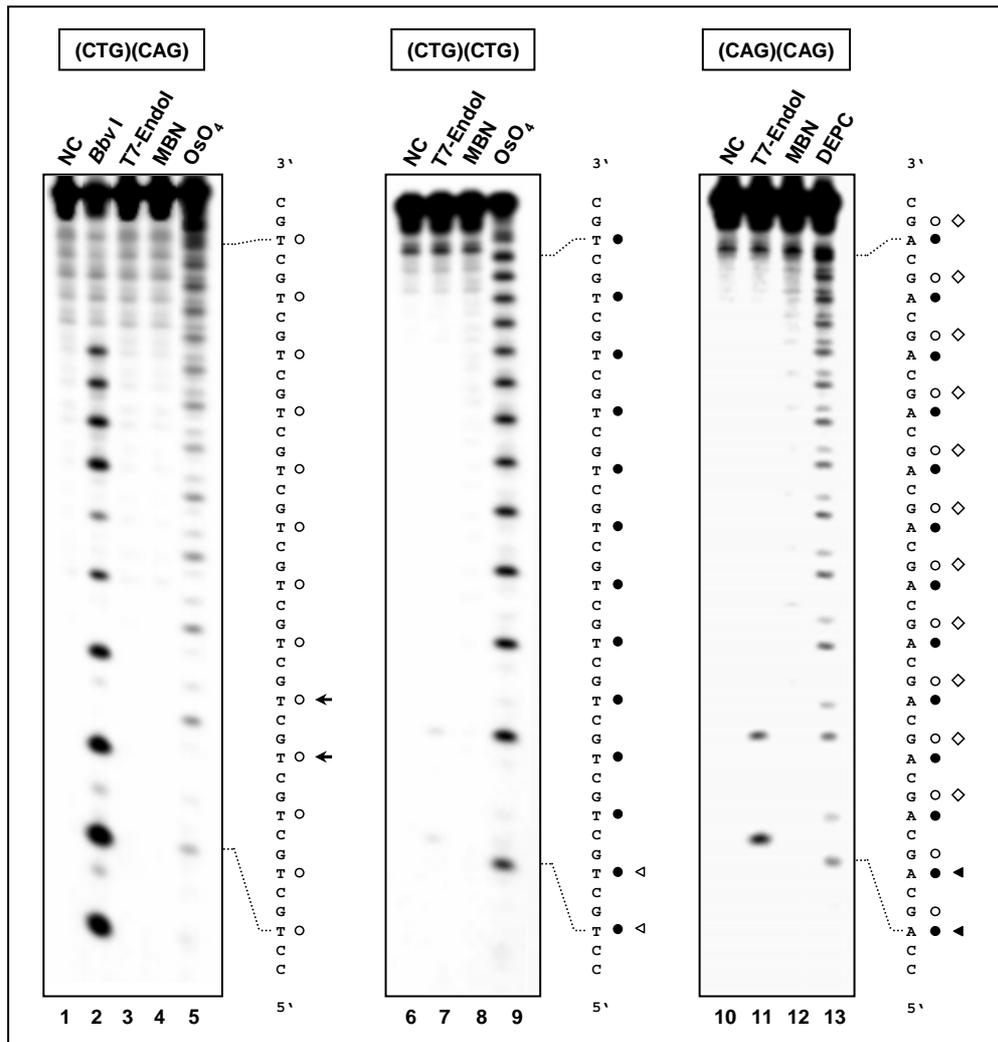


Abb. 10 Chemische und enzymatische Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur linearer TNR-Substrate.

Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur linearer (CTG)(CAG) (Bahn 1 - 5), (CTG)(CTG) (Bahn 6 - 7) und (CAG)(CAG) (Bahn 10 - 13) TNR-Substrate in Abwesenheit (Bahn 1, 6 und 10) und in Gegenwart von *Bbv I* (Bahn 2), *T7-EndoI* (Bahn 3, 7 und 11), *MBN* (4, 8 und 12) und *OsO₄* (Bahn 5 und 9) bzw. *DEPC* (Bahn 13). Nukleotide mit stark erhöhter (schwarz) bzw. leicht erhöhter Sensitivität (weiß) gegenüber *T7-EndoI* (▶), *MBN* (◆) und *OsO₄* bzw. *DEPC* (●) oder erhöhter Resistenz gegenüber *Bbv I* (→) sind neben der Oligonukleotid-Sequenz entsprechend markiert.

Um non-B-DNA-Bereiche innerhalb des linearen (CTG)(CAG) TNR-Substrats zu detektieren, wurde die Restriktionsendonuklease *Bbv* I eingesetzt. *Bbv* I hydrolysiert doppelsträngige, jedoch keine einzelsträngige DNA und erkennt eine Sequenz, die mehrmals in dem zu analysierenden TNR-Substrat wiederholt wird (Szybalski *et al.*, 1991). (CTG)(CAG) wurde bis auf den zentralen Bereich, der eine leicht erhöhte Resistenz gegenüber *Bbv* I aufwies, äquivalent hydrolysiert (Abb. 10, Bahn 2). Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass innerhalb der linearen DNA eventuell ein kurzer non-B-DNA-Bereich vorliegt. Zur weiteren Klärung wurde (CTG)(CAG) der Hydrolyse durch T7-EndoI und MBN unterzogen. Jedoch wies (CTG)(CAG) keine sensitiven Bereiche gegenüber diesen beiden struktur-spezifischen Endonukleasen auf (Abb. 10, Bahn 3 und 4). Auch die chemische Modifizierung durch Osmiumtetroxid zeigte für alle Thymidin-Basen ein äquivalentes Spaltungsmuster (Abb. 10, Bahn 5). Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, dass (CTG)(CAG) als lineare B-DNA vorliegt.

Das lineare (CTG)(CTG) TNR-Substrat mit (T·T)-Basenfehlpaarungen zeigte gegenüber der Hydrolyse durch T7-EndoI und MBN keine erhöhte Sensitivität (Abb. 10, Bahn 7 und 8). Die erhöhte Reaktivität der Thymidin-Basen von (CTG)(CTG) im Vergleich zu (CTG)(CAG) gegenüber der chemischen Modifizierung durch Osmiumtetroxid war jedoch ein eindeutiger Hinweis für den fehlgepaarten Charakter (Abb. 10, Bahn 9). Das äquivalente Spaltungsmuster und die Resistenz gegenüber der Hydrolyse durch struktur-spezifische Endonukleasen weist darauf hin, dass (CTG)(CTG) als lineare DNA mit fehlgepaarten Thymin-Basen vorliegt.

Die enzymatische Hydrolyse des linearen (CAG)(CAG) TNR-Substrats mit (A·A)-Basenfehlpaarungen wies gegenüber der Hydrolyse durch T7-EndoI am 5'-Ende und gegenüber der Hydrolyse durch MBN über die gesamte TNR-Sequenz eine leicht erhöhte Sensitivität auf (Abb. 10, Bahn 11 und 12). Die chemische Modifizierung durch DEPC führte zu einem äquivalenten Spaltungsmuster der Guanin- und Adenin-Basen innerhalb der TNR-Sequenz (Abb. 10, Bahn 13) und weist darauf hin, dass (CAG)(CAG) als lineares DNA-Molekül mit fehlgepaarten Adenin-Basen vorliegt. Die erhöhte Sensitivität gegenüber MBN zeigt jedoch auch, dass die DNA-Doppelhelix des (CAG)(CAG) TNR-Substrats im Gegensatz zum (CTG)(CTG) TNR-Substrat einzelsträngige Bereiche innerhalb der TNR-Sequenz aufweist.

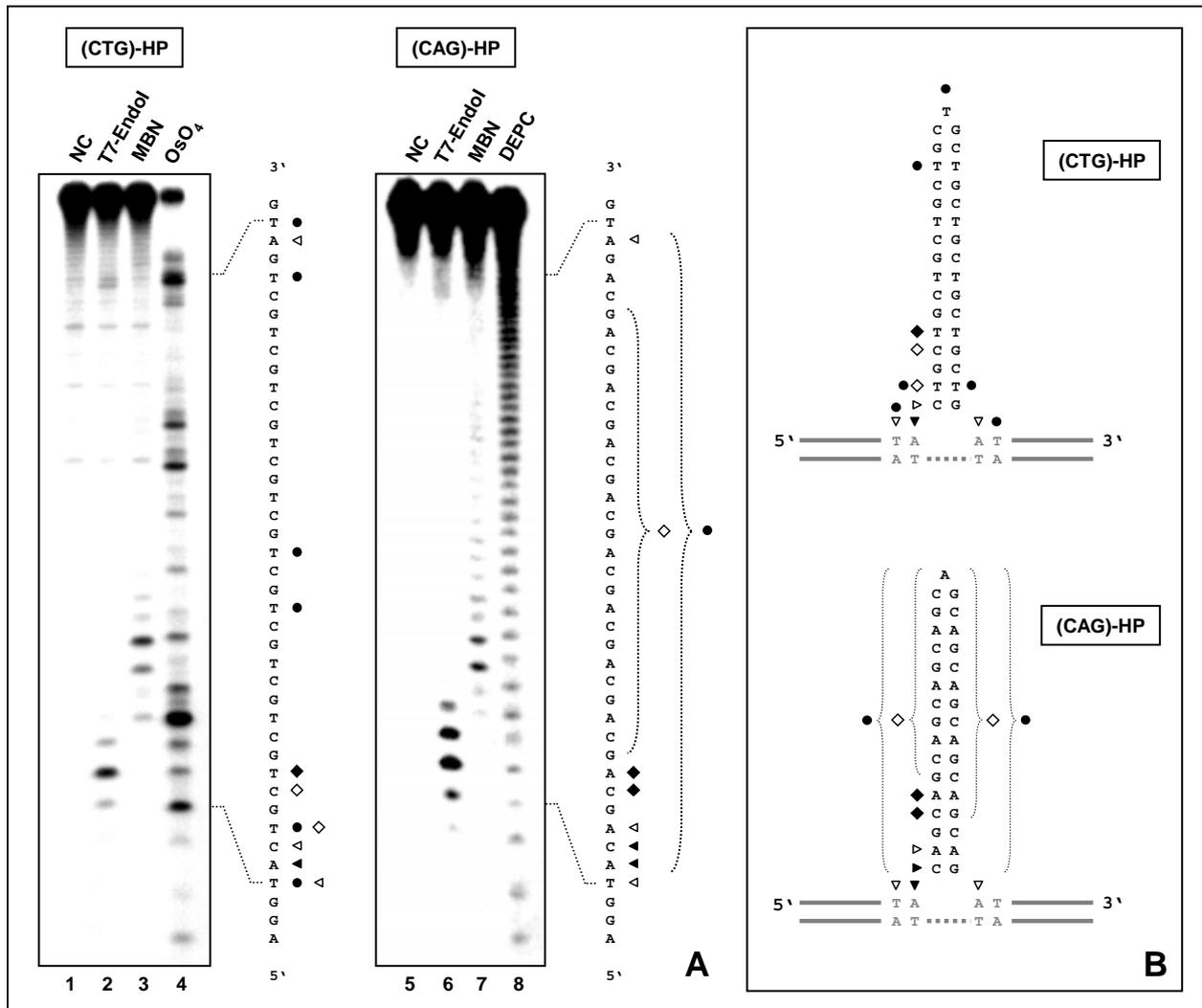


Abb. 11 Chemische und enzymatische Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur strukturierter TNR-Substrate.

(A) Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur strukturierter (CTG)-HP (Bahn 1 - 4) und (CAG)-HP (Bahn 5 - 8) TNR-Substrate in Abwesenheit (Bahn 1 und 5) und in Gegenwart von T7-EndoI (Bahn 2 und 6), MBN (3 und 7) und OsO₄ (Bahn 4) bzw. DEPC (Bahn 8). Nukleotide mit stark erhöhter (schwarz) bzw. leicht erhöhter Sensitivität (weiß) gegenüber T7-EndoI (▶), MBN (◇) und OsO₄ bzw. DEPC (●) sind neben der Oligonukleotid-Sequenz entsprechend markiert. (B) Die Resultate sind schematisch für TNR-Substrate in der theoretischen DNA-Hairpin-Konformation dargestellt.

Das (CTG)-HP TNR-Substrat wurde durch T7-EndoI an den DNA-Hairpin Junctions hydrolysiert (Abb. 11 A, Bahn 2). Darüber hinaus bestätigte das Spaltungsmuster der chemisch modifizierten Thymin-Basen die DNA-Hairpin-Struktur des (CTG)-HP TNR-Substrats. Dabei wiesen ungepaarte Thymin-Basen im Bereich der DNA-Hairpin Junctions und des Loops aufgrund des einzelsträngigen Charakters dieser Bereiche im Gegensatz zu den fehlgepaarten Basen im Stem eine erhöhte Reaktivität gegenüber der Modifizierung durch Osmiumtetroxid

auf (Abb. 11 A, Bahn 4). Die Hydrolyse durch MBN erfolgte nicht innerhalb des DNA-*Hairpin Loops*, sondern am 5'-Ende des DNA-*Hairpin Stems* (Abb. 11 A, Bahn 3). Da dieser Bereich auch die höchste Reaktivität gegenüber der Modifizierung durch Osmiumtetroxid zeigte, ist dies ein Hinweis dafür, dass dieser Bereich einen stark erhöhten DNA-Einzelstrangcharakter aufweist.

Die enzymatischen Hydrolyse des (CAG)-HP TNR-Substrats durch T7-EndoI erfolgte innerhalb der DNA-*Hairpin Junctions* (Abb. 11 A, Bahn 6). Daneben wies (CAG)-HP ebenso wie (CTG)-HP am 5'-Ende des DNA-*Hairpin Stems* im Bereich der *Junctions* einen sensitiven Bereich gegenüber MBN auf (Abb. 11 A, Bahn 7). Im Gegensatz zum (CTG)-HP TNR-Substrat zeigte jedoch das gesamte TNR-Motiv von (CAG)-HP eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber der Hydrolyse durch MBN. Aufgrund dieser Beobachtung kann davon ausgegangen werden, dass (CAG)-HP über das gesamte TNR-Motiv einzelsträngige Bereiche aufweist, ohne eine fixierte DNA-*Hairpin*-Struktur auszubilden (*Random Coil*). Das Vorliegen einer *Random Coil*-DNA-Konformation zeigte sich darüber hinaus in dem äquivalenten Spaltungsmuster nach Modifizierung durch DEPC (Abb. 11 A, Bahn 8).

5.1.5 Charakterisierung der DNA-Bindung von wt und mutp53 R273H an TNRs

Nach der Charakterisierung der DNA-Sekundärstrukturen sollte die Bindung von wtp53 und der DNA-Kontaktmutante R273H mit Hilfe von DNase I-Protektionsexperimenten (4.2.3) genauer analysiert und Protein-DNA-Kontaktstellen innerhalb der TNR-Substrate identifiziert werden.

Die DNA-Kontaktmutante R273H ist trotz der nahezu identischen thermodynamischen Stabilität im Vergleich zu wtp53 nicht in der Lage, sequenz-spezifisch an DNA zu binden (Bullock *et al.*, 2000). Allerdings konnte gezeigt werden, dass R273H trotz des Verlustes der sequenz-spezifischen DNA-Bindungseigenschaft spezifisch mit MAR/SAR-DNA-Elementen interagiert (Will *et al.*, 1998a, 1998b). Da mit Hilfe von Bandshift-Analysen eine schwache Interaktion zwischen R273H und TNR-Substraten detektiert werden konnte (5.1.3.3), wurde sowohl die DNA-Bindung von wtp53 als auch die der DNA-Kontaktmutante expliziter untersucht.

Ebenso wie bei der Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur wurden die DNase I-Protektionsexperimente unter Bedingungen der *Single-Hit*-Kinetik durchgeführt. Die Bindung von p53 an die verschiedenen TNR-Substrate erfolgte im selben physiologischen DNA-

Bindungspuffer wie die zuvor durchgeführten Bandshift-Analysen (5.1.2 und 5.1.3) und die Experimente zur Aufklärung der DNA-Sekundärstrukturen (5.1.4).

Bandshift-Analysen zeigten, dass die Interaktion zwischen p53 und TNR-Substraten in Abhängigkeit der Mg^{2+} -Konzentration inhibiert wird (Resultate nicht dargestellt). Da DNase I für die DNA-Hydrolyse Mg^{2+} -Ionen benötigt, wurden in den DNase I-Protektionsexperimenten relativ hohe p53-Konzentrationen eingesetzt.

Die TNR-Substrate wurden nach Maxam-Gilbert sequenziert (4.1.4) und für die eindeutige Zuordnung protektierter DNA-Bereiche als Referenz eingesetzt.

5.1.5.1 Charakterisierung der DNA-Bindung von wtp53 an lineare TNR-Substrate

Mit Hilfe von DNase I-Protektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Bindung von wtp53 lineare TNR-Substrate vor der Hydrolyse durch DNase I schützt. Wie erwartet, war die DNA-Bindung abhängig von der wtp53-Konzentration. Lineare TNR-Substrate ohne Basenfehlpaarungen zeigten generell ein unterschiedliches Bindungsmuster im Vergleich zu linearen TNR-Substraten mit (T·T)- bzw. (A·A)-Basenfehlpaarungen (Abb. 12, Bahn 4 - 8 und Bahn 10 - 14 bzw. Bahn 19 - 23).

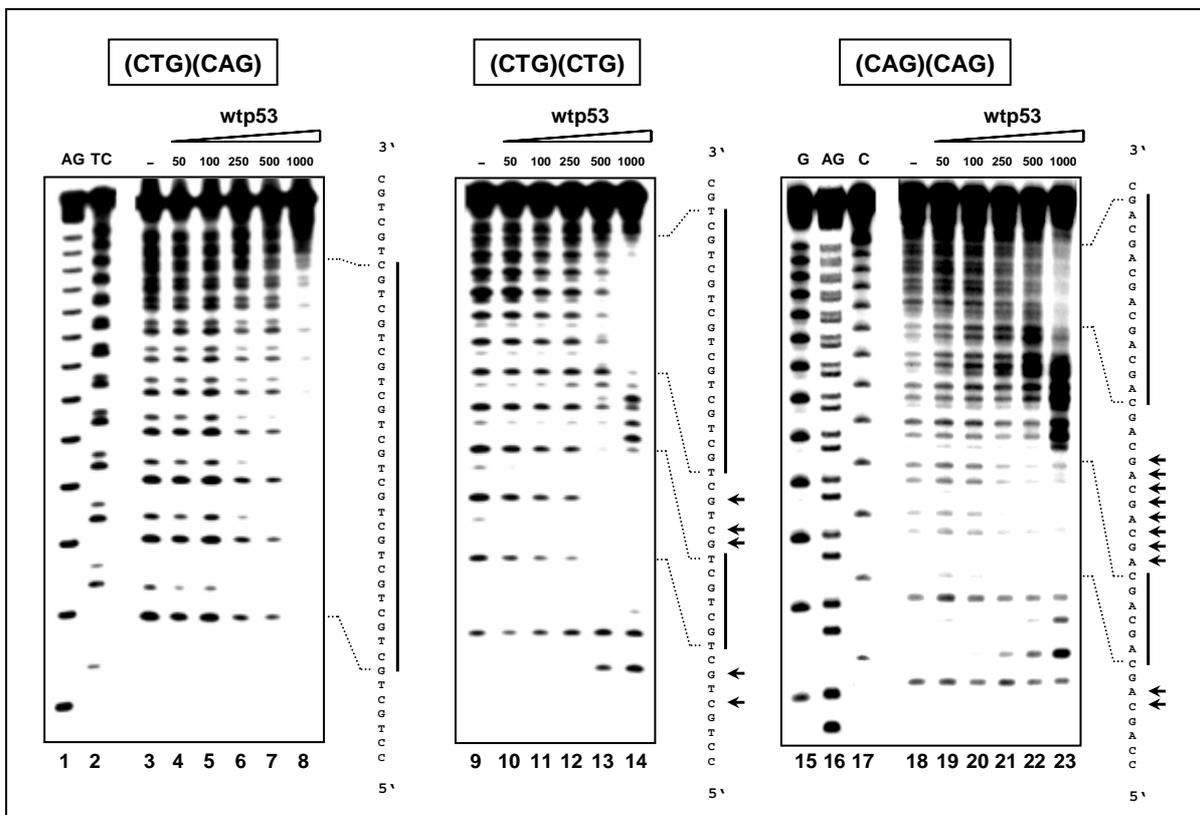


Abb. 12 Charakterisierung der DNA-Bindung von wtp53 an lineare TNR-Substrate.

Hydrolyse linearer (CTG)(CAG), (CTG)(CTG) und (CAG)(CAG) TNR-Substrate durch DNase I in Abwesenheit (Bahn 3, 9 und 18) und Gegenwart steigender wtp53-Mengen (Bahn 4, 10 und 19: 50 ng, Bahn 5, 11 und 20: 100 ng, Bahn 6, 12 und 21: 250 ng, Bahn 7, 13 und 22: 500 ng und Bahn 8, 14 und 23: 1000 ng). Protektierte DNA-Bereiche sind neben der Oligonukleotid-Sequenz durch vertikale Balken, hypersensitive DNase I-Bereiche durch Pfeile markiert. Maxam-Gilbert-Sequenzierung von (CTG)-SENSE (Bahn 1: AG-Reaktion und Bahn 2: TC-Reaktion) und (CAG)-SENSE (Bahn 15: G-Reaktion, Bahn 16: AG-Reaktion und Bahn 17: C-Reaktion).

Wtp53 band das lineare (CTG)(CAG) TNR-Substrate ohne Basenfehlpaarungen über nahezu das gesamte TNR-Motiv (Abb. 12, Bahn 6 - 8).

Die Bindung von wtp53 an das lineare (CTG)(CTG) TNR-Substrat mit (T·T)-Basenfehlpaarungen erfolgte hingegen spezifisch am 5'- und 3'-Ende des TNR-Motivs. Auffällig war jedoch, dass keine definierten Bereiche von wtp53 gebunden wurden, und dass sich das Bindungsmuster in Abhängigkeit von der wtp53-Konzentration änderte. Bei einer moderaten Konzentration wurden vier (CTG)-Repeats am 5'- und sechs (CTG)-Repeats am 3'-Ende gebunden (Abb. 12, Bahn 13). Durch Erhöhung der wtp53-Konzentration wurde der geschützte Bereich am 5'- und 3'-Ende um ein (CTG)-Repeat verkürzt bzw. verlängert (Abb. 12, Bahn 14). Darüber hinaus wiesen die Nukleotide in dem Bereich, der von den beiden Bindungsstellen flankiert wurde, eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Hydrolyse durch DNase I auf.

Die Interaktion zwischen wtp53 und dem linearen (CAG)(CAG) TNR-Substrat mit (A·A)-Basenfehlpaarungen erfolgte ebenfalls am 5'- und 3'-Ende des TNR-Motivs. Im Gegensatz zum (CTG)(CTG) TNR-Substrat wurden durch die Erhöhung der wtp53-Konzentration vier bzw. drei (CAG)-Repeats am 5'-Ende und vier bzw. fünf (CAG)-Repeats am 3'-Ende vor der Hydrolyse durch DNase I geschützt (Abb. 12, Bahn 22 bzw. 23). Infolge der Bindung von wtp53 wurde auch in diesem Fall zwischen den beiden Bindungsstellen ein hypersensitiver DNase I-Bereich generiert.

Die Bildung hypersensitiver DNase I-Bereiche ist allgemein ein Hinweis dafür, dass durch Protein-DNA-Interaktionen die Konformation der DNA verändert wird und sich dadurch die Reaktivität der Nuklease für die betroffenen Regionen erhöht. Die Hypersensitivität gegenüber DNase I kommt dadurch zustande, dass infolge der Protein-DNA-Interaktion die DNA gekrümmt wird und dies zu einer Stauchung bzw. Aufweitung der kleinen Furche auf der Innen- bzw. Außenseite der DNA-Krümmung führt. Dabei ist die DNA auf der Außenseite für DNase I effektiver zugänglich als die DNA auf der Innenseite (Hochschild, 1991; Kyogoku *et al.*, 1995).

Interessanterweise betrug die Distanz zwischen den beiden geschützten Bereichen im Falle des linearen TNR-Substrats mit (A·A)-Basenfehlpaarungen konstant 10 bp mit erhöhter Hyper-

sensitivität gegenüber DNase I. Dies entspricht etwa einer Helix-Windung normaler B-DNA (10.5 bp pro Windung) und weist darauf hin, dass p53 auf der gleichen Seite der DNA bindet. Im Falle des linearen TNR-Substrats mit (T·T)-Basenfehlpaarungen betrug die Distanz konstant 5 bp. Dies entspricht etwa einer halben Helix-Windung und weist darauf hin, dass die Bindung an den entgegengesetzten Seiten der DNA erfolgt.

5.1.5.2 Charakterisierung der DNA-Bindung von wtp53 an strukturierte TNR-Substrate

Mittels DNase I-Protektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass wtp53 mit strukturierten TNR-Substraten interagiert.

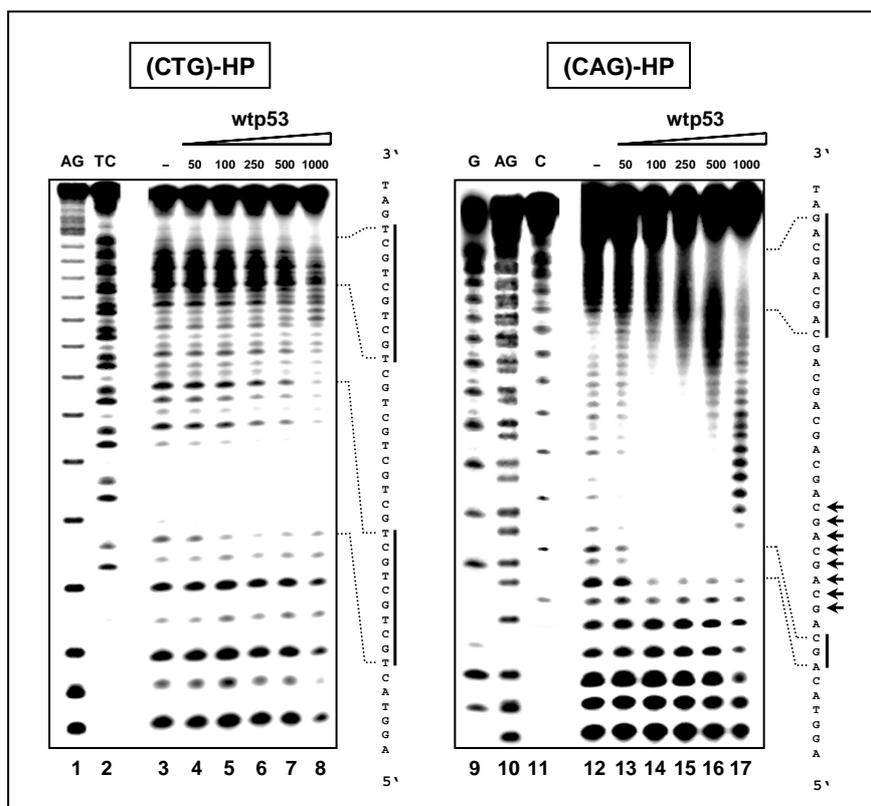


Abb. 13 Charakterisierung der DNA-Bindung von wtp53 an strukturierte TNR-Substrate.

Hydrolyse strukturierter (CTG)-HP und (CAG)-HP TNR-Substrate durch DNase I in Abwesenheit (Bahn 3 und 12) und Gegenwart steigender wtp53-Mengen (Bahn 4 und 13: 50 ng, Bahn 5 und 14: 100 ng, Bahn 6 und 15: 250 ng, Bahn 7 und 16: 500 ng und Bahn 8 und 17: 1000 ng). Protektierte DNA-Bereiche sind neben der Oligonukleotid-Sequenz durch vertikale Balken, hypersensitive DNase I-Bereiche durch Pfeile markiert. Maxam-Gilbert-Sequenzierung von (CTG)-LOOP (Bahn 1: AG-Reaktion und Bahn 2: TC-Reaktion) und (CAG)-LOOP (Bahn 9: G-Reaktion, Bahn 10: AG-Reaktion und Bahn 11: C-Reaktion).

Die Bindung von wtp53 an (CTG)-HP erfolgte konzentrationsabhängig am DNA-*Hairpin Stem* in der Nähe der *Junctions* (Abb.13, Bahn 6 - 8). Im Falle von (CAG)-HP erfolgte die Bindung

von wtp53 ebenfalls in der Nähe der *Junctions*. Darüber hinaus führte die Bindung von wtp53 zur Generierung eines hypersensitiven DNase I-Bereichs, der sich in Abhängigkeit von der wtp53-Konzentration vom 3'-Ende zum 5'-Ende des Substrats verschob (Abb. 13, Bahn 14 -17). Da die Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur zeigte, dass (CAG)-HP in einer *Random Coil*-DNA-Konformation vorliegt (5.1.4) und durch die Bindung von wtp53 hypersensitive DNase I-Bereiche gebildet wurden, ist dies ein Hinweis dafür, dass die Bindung von wtp53 an (CAG)-HP die DNA-Konformation beeinflusst.

Interessanterweise erfolgte die Bindung von wtp53 an (CTG)-HP und (CAG)-HP in einem Bereich des DNA-*Hairpin Stems*, für den infolge der Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur ein erhöhter DNA-Einzelstrangcharakter nachgewiesen werden konnte (5.1.4). Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, dass ungepaarte DNA-Bereiche bei der nicht-sequenz-spezifischen Bindung von wtp53 an strukturierte DNA als Erkennungsmotive fungieren.

5.1.5.3 Charakterisierung der DNA-Bindung von mutp53 R273H an lineare TNR-Substrate

Bandshift-Analysen zeigten, dass die DNA-Kontaktmutante R273H in der Lage ist, TNR-Substrate mit sehr geringer Affinität zu binden (5.1.3.3). Mittels DNase I-Protektionsexperimenten sollte nun ermittelt werden, ob TNR-Substrate von R273H spezifisch gebunden und vor der Hydrolyse durch DNase I geschützt werden.

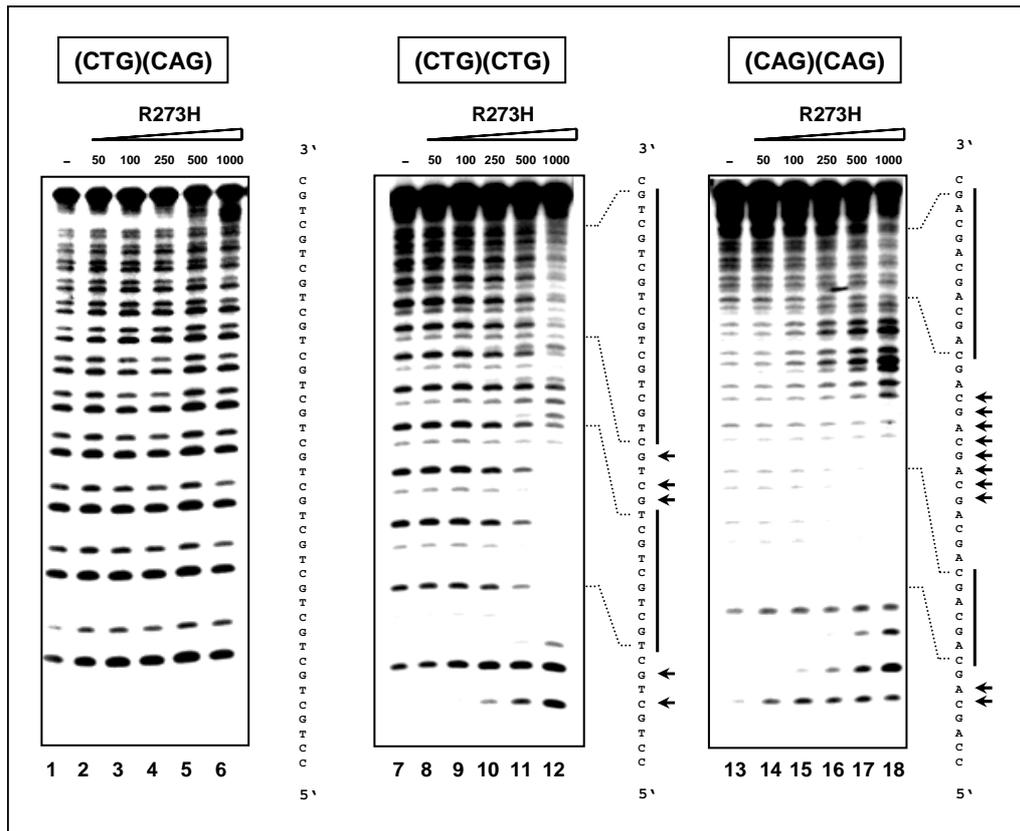


Abb. 14 Charakterisierung der DNA-Bindung von mutp53 R273H an lineare TNR-Substrate.

Hydrolyse linearer (CTG)(CAG), (CTG)(CTG) und (CAG)(CAG) TNR-Substrate durch DNase I in Abwesenheit (Bahn 1, 7 und 13) und Gegenwart steigender R273H-Mengen (Bahn 2, 8 und 14: 50 ng, Bahn 3, 9 und 15: 100 ng, Bahn 4, 10 und 16: 250 ng, Bahn 5, 11 und 17: 500 ng und Bahn 6, 12 und 18: 1000 ng). Protektierte DNA-Bereiche sind neben der Oligonukleotid-Sequenz durch vertikale Balken, hypersensitive DNase I-Bereiche durch Pfeile markiert.

Die DNase I-Protektionsexperimente zeigten, dass die Kontaktmutante R273H im Gegensatz zu wtp53 selbst bei hohen Konzentrationen nicht in der Lage war, das lineare TNR-Substrat ohne Basenfehlpaarungen zu binden (Abb. 14, Bahn 2 - 6). Lineare TNR-Substrate mit (T·T)- und (A·A)-Basenfehlpaarungen wurden jedoch in Abhängigkeit der R273H-Konzentration effektiv gebunden und die Bindung generierte hypersensitive DNase I-Bereiche (Abb. 14, Bahn 8 - 12 und Bahn 14 - 18). Interessanterweise entsprachen die Bindungsmuster mit der höchsten R273H-Konzentration (Abb. 14, Bahn 12 und 18) den Bindungsmustern von wtp53 bei einer moderaten Protein-Konzentration (Abb. 12, Bahn 13 und 22).

Somit konnte gezeigt werden, dass die DNA-Kontaktmutante R273H trotz geringer Affinität spezifisch mit linearen TNR-Substraten mit (T·T)- und (A·A)-Basenfehlpaarungen interagiert. Allerdings konnte eine spezifische Interaktion mit dem linearen TNR-Substrat ohne Basenfehlpaarung nicht beobachtet werden.

5.1.5.4 Charakterisierung der DNA-Bindung von mutp53 R273H an strukturierte TNR-Substrate

Darüber hinaus war mutp53 R273H in der Lage, strukturierte TNR-Substrate zu binden. Dabei wies R273H bei hohen Konzentrationen gegenüber den strukturierten (CTG)-HP und (CAG)-HP TNR-Substraten die gleichen Bindungsmuster wie wtp53 bei moderaten Konzentrationen auf (Abb. 15, Bahn 6 und 12; Abb. 13, Bahn 7 und 16).

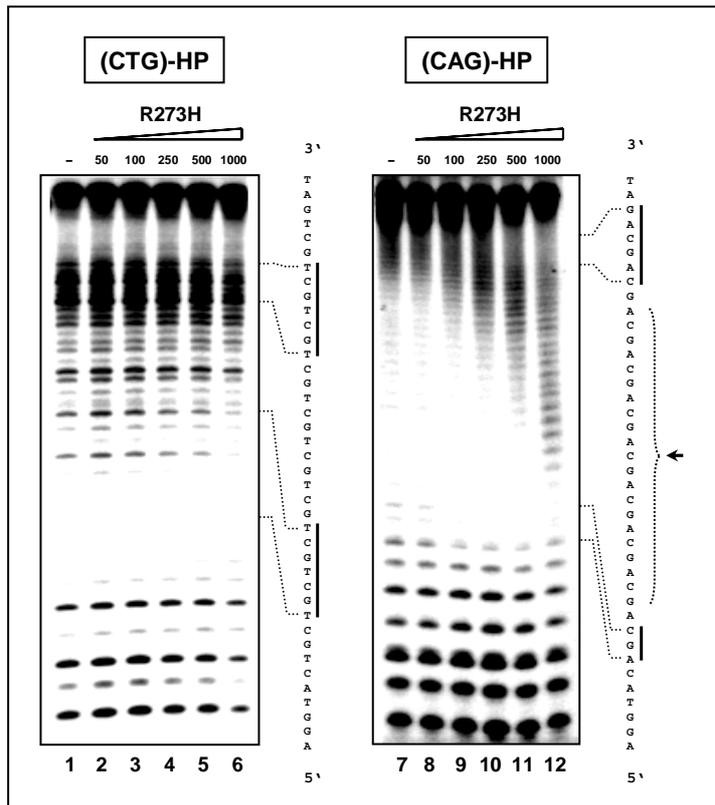


Abb. 15 Charakterisierung der DNA-Bindung von mutp53 R273H an strukturierte TNR-Substrate.

Hydrolyse strukturierter (CTG)-HP und (CAG)-HP TNR-Substrate durch DNase I in Abwesenheit (Bahn 1 und 7) und Gegenwart steigender R273H-Mengen (Bahn 2 und 8: 50 ng, Bahn 3 und 9: 100 ng, Bahn 4 und 10: 250 ng, Bahn 5 und 11: 500 ng und Bahn 6 und 12: 1000 ng). Protektierte DNA-Bereiche sind neben der Oligonukleotid-Sequenz durch vertikale Balken, hypersensitive DNase I-Bereiche durch Pfeile markiert.

Somit konnte bestätigt werden, dass die DNA-Kontaktmutante R273H mit geringer Affinität spezifisch mit strukturierten TNR-Substraten interagiert.

5.1.6 Interaktion von wtp53 und mutp53 R273H mit TNRs *in vivo*

Mittels Bandshift-Analysen (5.1.2.1 und 5.1.3.3) und DNase I-Protektionsexperimenten (5.1.5) konnte gezeigt werden, dass sowohl wtp53 und als auch die DNA-Kontaktmutante R273H *in vitro* mit TNRs interagieren. Da R273H jedoch lediglich mit linearen und strukturierten TNR-Substraten mit (T·T)- und (A·A)-Basenfehlpaarungen interagiert, sollte mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) das Bindungsverhalten von wtp53 und mutp53 R273H gegenüber TNRs *in vivo* untersucht werden.

Dazu wurde zunächst der TNR-tragende Vektor pEYFP-106/5 konstruiert (4.5.1) und stabil in das Genom der humanen p53-defizienten Zelllinie Saos-2 integriert (4.7.7). Der TNR-tragende Vektor pEYFP-106/5 leitet sich vom Vektor pEYFP-C1 ab (Abb. 16). Neben dem Neomycin-Resistenzgen, dessen Expression die Selektion stabil transfizierter Zellen ermöglicht, codiert der Vektor für EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) unter Kontrolle des CMV-Promotors (humaner Cytomegalusvirus). Durch die konstitutive Expression von EYFP war es möglich, Zell-Klone mit vergleichbarer EYFP-Expression auszuwählen. Die TNR-Sequenz wurde in die *Afl* II-Restriktionsschnittstelle kloniert, da dieser Bereich keine aktiven oder regulatorischen DNA-Elemente enthält und dadurch eine höhere Stabilität der insertierten TNR-Sequenz gewährleistet werden sollte.

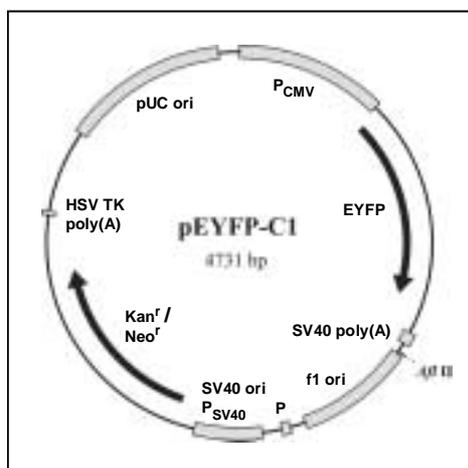


Abb. 16 Schematische Darstellung des pEYFP-C1-Vektors.

Die beiden rekombinanten Zelllinien NC (Vektor-2) (enthält den Ausgangsvektor pEYFP-C1 als Negativkontrolle) und TNR (106/5-21) (enthält den TNR-tragenden Vektor pEYFP-106/5) wurden mit den eukaryotischen Expressionsvektoren pCMV-wtp53 bzw. pCMV-Tag-R273H und pUC18 als Negativkontrolle (Mock) mittels EffecteneTM transient transfiziert (4.7.6). Die Zellen wurden zum Protein-DNA-Quervernetzen mit Formaldehyd behandelt, die p53-DNA-

Immunkomplexe isoliert (4.2.4), die p53-gebundene DNA mittels PCR amplifiziert (4.4.5.4) und die PCR-Produkte analysiert.

Als Positivkontrolle für die DNA-Bindung von wtp53 fungierte der endogene *mdm2*-Promotor. Die MDM2-spezifischen Primer (Tab. 1) hybridisieren innerhalb der p53-abhängigen Promotor-Region in Intron 1 des Gens und generieren ein PCR-Produkt mit einer Länge von 117 bp (Kaeser und Iggo, 2002). GAPDH diente als Negativkontrolle, da die amplifizierte GAPDH-Region keine p53-Bindungsstelle aufweist. Die GAPDH-spezifischen Primer (Tab. 1) hybridisieren in Exon 4 des Gens und generieren ein PCR-Produkt mit einer Länge von 136 bp (Kaeser und Iggo, 2002). Die Vektor-spezifischen Primer EGFP-C und EYFP-Rev (Tab. 1) wurden für die Amplifikation der im Genom der Zelle stabil integrierten Vektor-DNA eingesetzt und generieren ein 520 bp (ohne TNR-Insert) bzw. 628 bp (mit TNR-Insert) langes PCR-Produkt.

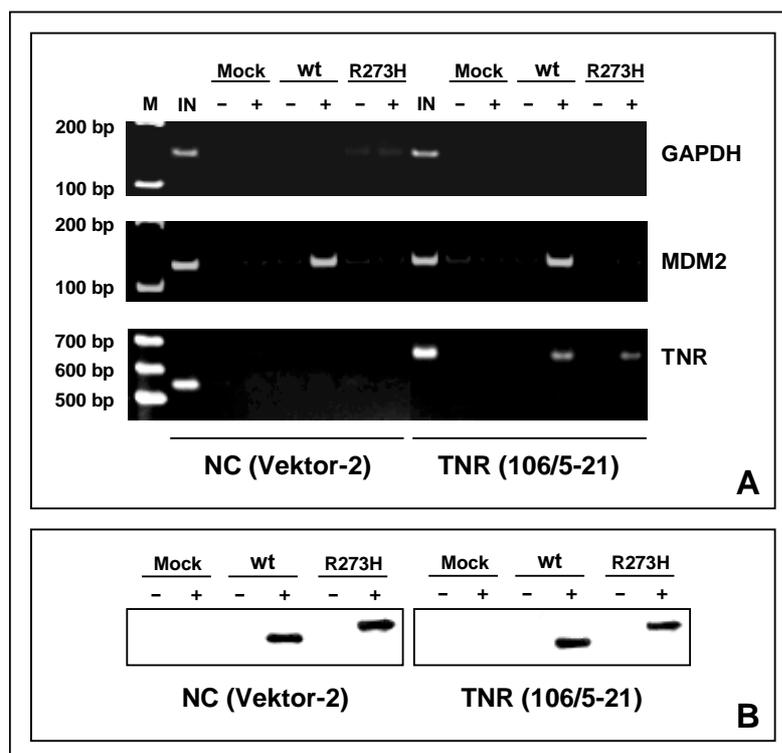


Abb. 17 Chromatin-Immünpräzipitation von wtp53 und mutp53 R273H.

(A) Die immunpräzipitierte genomische DNA (4.2.4) aus NC- und TNR-Zellen wurde mittels PCR (4.4.5.4) amplifiziert und die PCR-Produkte durch native 8 %-ige Polyacrylamid- (GAPDH und MDM2) bzw. 2 %-ige Agarose-Gelelektrophorese (TNR) getrennt (4.4.2.2 bzw. 4.4.2.1). Die IP erfolgte mit Hilfe des polyklonalen Antikörpers p53(FL-393) (+) bzw. als IP-Negativkontrolle ohne Antikörper (-). IN: DNA-Kontrolle, M: DNA-Marker (100 bp DNA-Leiter). Die PCR von GAPDH fungierte als Negativkontrolle, die von MDM2 als Positivkontrolle. (B) Die Expression von exogenem wtp53 und mutp53 R273H wurde im Western Blot (4.6.4) nach Trennung der

IP-Kontrollen mittels 10 %-iger SDS-PAGE (4.6.2) nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers DO1.

Zunächst wurde die Spezifität des für die Immunpräzipitation (IP) verwendeten anti-p53 polyklonalen Antikörpers p53(FL-393) überprüft. Anhand von Mock-Experimenten konnte eindeutig gezeigt werden, dass in Gegenwart des Antikörpers und Abwesenheit von p53 kein PCR-Produkt amplifiziert wurde (Abb. 17 A). Darüber hinaus wurden wtp53 und mutp53 R273H in beiden Zelllinien expremiert und gleiche Protein-Mengen immunpräzipitiert. Da R273H als Fusionsprotein (Flag-Tag) expremiert wurde, erklärt sich das unterschiedliche Migrationsverhalten von wtp53 und mutp53 (Abb. 17 B).

Die Spezifität des ChIP-Experiments wurde durch die Bindung von wtp53 an den endogenen *mdm2*-Promotor überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass wtp53 sowohl in der NC- als auch in der TNR-Zelllinie mit dem p53-abhängigen *mdm2*-Promotor interagiert. Die DNA-Interaktion war spezifisch, da eine sequenz-unspezifische Bindung an GAPDH als Negativkontrolle nicht beobachtet werden konnte. Darüber hinaus interagiert die DNA-Kontaktmutante R273H nicht mit dem humanen *mdm2*-Promotor (Abb. 17 A).

Schließlich konnte gezeigt werden, dass sowohl wtp53 als auch mutp53 R273H *in vivo* mit TNRs interagieren. Diese Interaktion war spezifisch, da entsprechende PCR-Signale im Falle der TNR-defizienten Zelllinie NC nicht zu detektieren waren (Abb. 17 A).

5.2 Die sequenz-spezifische Interaktion von wtp53 mit dem humanen *mdm2*-Promotor

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die sequenz-spezifische Interaktion von wtp53 mit dem humanen *mdm2*-Promotor (P2) in Abhängigkeit von der DNA-Konformation charakterisiert werden.

Dazu wurden die sequenz-spezifischen DNA-Bindungseigenschaften von wtp53 gegenüber den isolierten p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors in Abhängigkeit der DNA-Konformation *in vitro* charakterisiert und der Einfluss der beiden p53-Bindungsstellen auf die wtp53-abhängige Transkription *in vivo* untersucht.

5.2.1 Der humane *mdm2*-Promotor

Die beiden p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors weisen interne Symmetrieelemente auf, welche theoretisch die Ausbildung nicht-linearer DNA-Strukturen infolge intramolekularer Basenpaarung komplementärer Bereiche ermöglichen (Kim *et al.*, 1997, 1999).

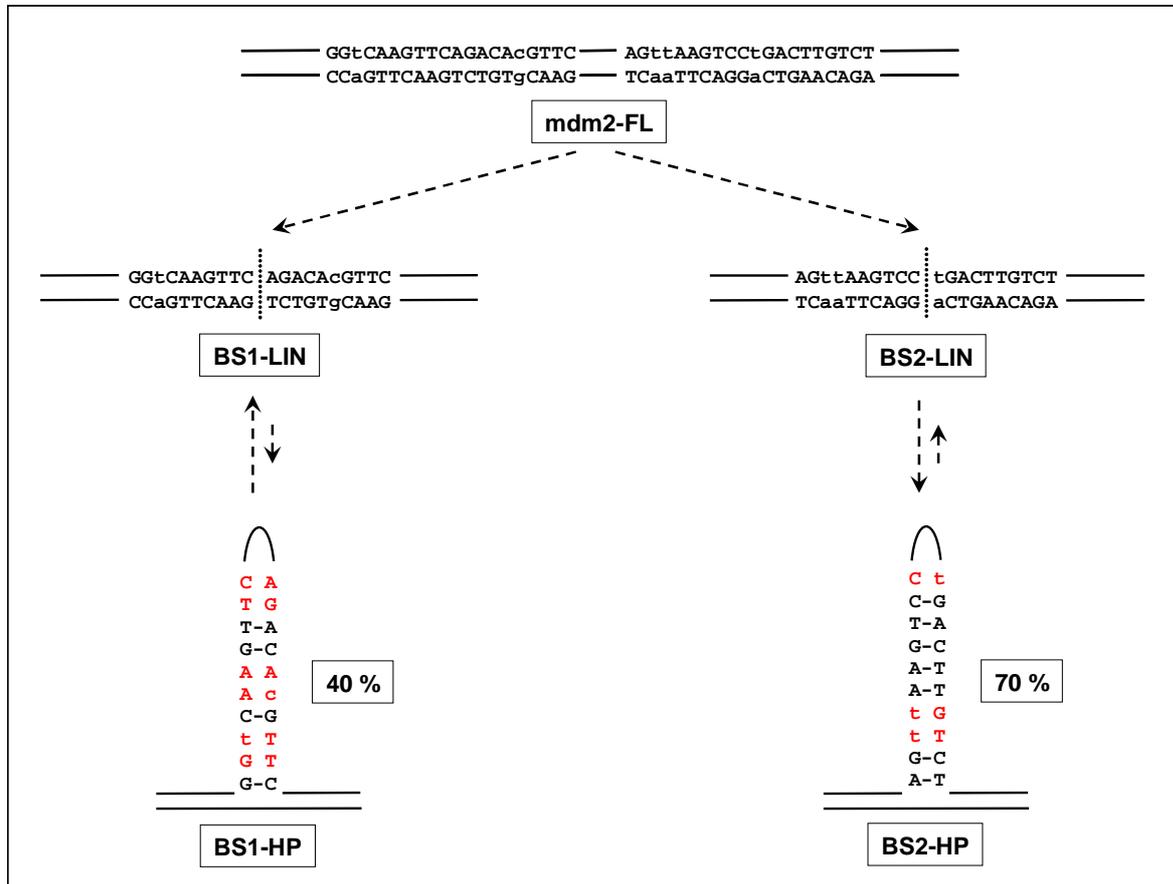


Abb. 18 Schematische Darstellung der *mdm2*-DNA-Substrate.

Die gestrichelte Linie innerhalb der linearen Modellsubstrate mit einer p53-Bindungsstelle (BS1-LIN bzw. BS2-LIN) markiert die interne Symmetrie, welche theoretisch die Ausbildung von DNA-Strukturen ermöglicht. Der prozentuale Anteil von Basen, die durch intramolekulare Watson-Crick-Basenpaarungen innerhalb der DNA-Hairpin-Modellsubstrate einer p53-Bindungsstelle (BS1-HP bzw. BS2-HP) miteinander interagieren, ist jeweils angegeben, wobei rot unterlegte Nukleotide fehlgepaarte Basen darstellen. Basen, die nicht der p53-Konsensussequenz entsprechen, sind klein geschrieben.

Als Modellsubstrate für DNA-Bindungsstudien des humanen *mdm2*-Promotors wurden synthetisch-hergestellte Oligonukleotide eingesetzt (Tab. 3). Neben dem *mdm2*-Promotorelement mit beiden p53-Bindungsstellen (mdm2-FL) dienten die beiden isolierten p53-Bindungsstellen in linearer (BS1-LIN und BS2-LIN) bzw. strukturierter Konformation (BS1-HP und BS2-HP) als DNA-Substrate (Abb. 18). Die verwendeten linearen und strukturierten *mdm2*-

Promotor DNA-Substrate weisen die gleichen flankierenden Sequenzen zur Stabilisierung auf, wie die zuvor charakterisierten TNR-Substrate und wurden, wie unter 4.1.2 beschrieben, dargestellt.

5.2.2 DNA-Bindung von wtp53 an die isolierten p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors

Im Folgenden wurde das sequenz-spezifische DNA-Bindungsverhalten von wtp53 gegenüber den isolierten p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors mit Hilfe von Bandshift-Analysen (4.2.1) untersucht.

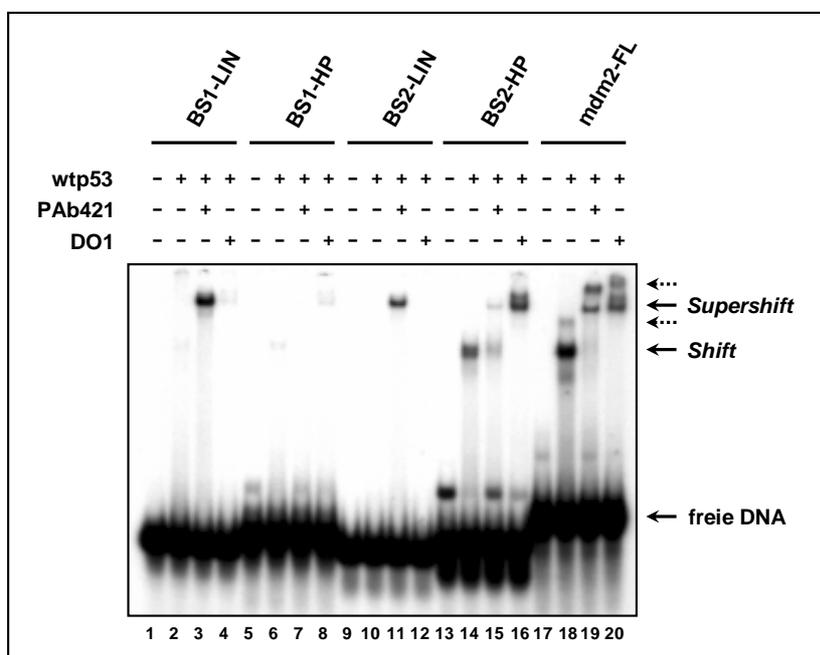


Abb. 19 DNA-Bindung von wtp53 an die isolierten p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors.

Bandshift-Analysen isolierter p53-Bindungsstellen in linearer und strukturierter Konformation und *mdm2*-FL ohne (Bahn 1, 5, 9, 13 und 17) und mit konstanten wtp53-Mengen (Bahn 2, 6, 10, 14 und 18) in Gegenwart des C-terminalen Antikörpers PAb421 (Bahn 3, 7, 11, 15 und 19) bzw. des N-terminalen Antikörpers DO1 (Bahn 4, 8, 12, 16 und 20). Ungebundene TNR-Substrate sowie p53/DNA- bzw. p53/DNA/Ab-Komplexe sind entsprechend durch Pfeile markiert.

Wie erwartet, verhielt sich wtp53 gegenüber den isolierten linearen p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors als latentes DNA-bindendes Protein (Hupp und Lane, 1994) und band erst nach Aktivierung durch den C-terminalen Antikörper PAb421 (Abb. 19, Bahn 2 und 3, Bahn 10 und 11). Dabei wies wtp53 gegenüber den beiden p53-Bindungsstellen BS1-LIN und

BS2-LIN nach C-terminaler Aktivierung unterschiedliche Affinitäten auf, wobei die erste Bindungsstelle stärker gebunden wurde als die zweite. Lagen die beiden p53-Bindungsstellen jedoch strukturiert vor, änderte sich das Bindungsverhalten, und wtp53 band ohne C-terminale Aktivierung mit geringer Affinität an BS1-HP und mit hoher Affinität an BS2-HP (Abb. 19, Bahn 6 und 14). Im Unterschied zu den linearen Substraten führte die Modifizierung durch PAb421 zu einer Inhibierung der DNA-Bindung (Abb. 19, Bahn 7 und 15). Durch Zugabe des N-terminalen Antikörpers DO1 wurde die Bindung nicht beeinflusst (Abb. 19, Bahn 8 und 16).

Im Gegensatz zur Bindung an die isolierten linearen p53-Bindungsstellen war wtp53 in der Lage, ohne Aktivierung an das lineare mdm2-FL-Fragment zu binden. Die Bindung wurde aber sowohl durch den C- als auch durch den N-terminalen Antikörper beeinflusst (Abb. 19, Bahn 18 - 20). Darüber hinaus zeigte sich, dass zwei retardierte p53-DNA-Komplexe mit unterschiedlichen Bandenintensitäten gebildet wurden (Abb. 19, Bahn 18). Beide p53-DNA-Komplexe wurden vom C-terminalen Antikörper PAb421 erkannt und wiesen infolgedessen ein verzögertes Migrationsverhalten auf. Dabei wurde der schnell migrierende Komplex durch die Bindung von PAb421 inhibiert, der langsam migrierende Komplex hingegen aktiviert (Abb. 19, Bahn 19). Die beiden p53-DNA-Komplexe repräsentieren wahrscheinlich den unterschiedlichen Belegungsgrad der beiden Bindungsstellen mit wtp53 (Kim *et al.*, 1999). Zusammen mit den Bindungsdaten der isolierten p53-Bindungsstellen liegt die Vermutung nahe, dass die beiden p53-DNA-Komplexe das Resultat der sequenz-spezifischen DNA-Bindung in Abhängigkeit der C-terminal regulierten struktur-spezifischen Interaktion von wtp53 mit mdm2-FL in unterschiedlichen DNA-Konformationen darstellen.

5.2.3 Spezifität der DNA-Bindung von wtp53 an die isolierten p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors

Die Spezifität der Interaktion zwischen wtp53 und den isolierten p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors wurde mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten (4.2.2) untersucht. Dabei erfolgte die Bindung von wtp53 an das radioaktiv markierte mdm2-FL in Gegenwart unterschiedlicher Mengen der nicht-radioaktiv markierten isolierten p53-Bindungsstellen in linearer bzw. strukturierter Konformation.

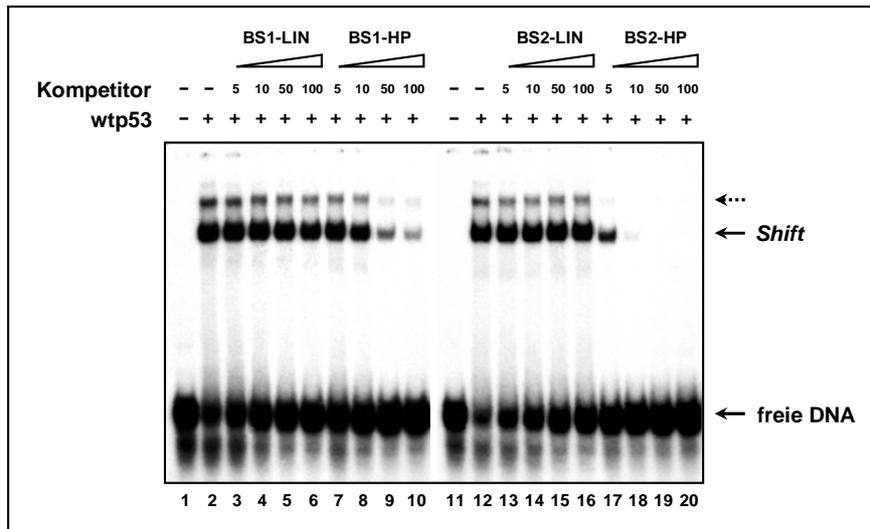


Abb. 20 DNA-Kompetition von mdm2-FL mit den isolierten p53-Bindungsstellen in linearer und strukturierter Konformation.

Die Kompetition konstanter Mengen von radioaktiv-markiertem mdm2-FL ohne (Bahn 1 und 11) bzw. mit wtp53 (Bahn 2 -10 und 12 - 20) erfolgte in Gegenwart steigender Mengen nicht-markierter isolierter p53-Bindungsstellen in linearer und strukturierter Konformation (Bahn 3, 7, 13 und 17: 5-facher, Bahn 4, 8, 14 und 18: 10-facher, Bahn 5, 9, 15 und 19: 50-facher und Bahn 6, 10, 16 und 20: 100-facher molarer Überschuss) als Kompetitor-DNA.

In Abwesenheit des C-terminalen Antikörpers PAb421 waren die isolierten linearen p53-Bindungsstellen BS1-LIN und BS2-LIN nicht in der Lage, die Bindung von wtp53 an mdm2-FL zu kompetitieren (Abb. 20, Bahn 3 - 6 und Bahn 13 - 16). Im Gegensatz dazu kompetitierten die isolierten strukturierten p53-Bindungsstellen die Bindung überaus effektiv. BS2-HP reduzierte die Bindung von wtp53 an mdm2-FL bei einem 5-fachen molaren Überschuss um etwa 50 % und ab einem 10-fachen molaren Überschuss nahezu vollständig (Abb. 20, Bahn 17 - 20). BS1-HP hingegen bewirkte bei gleicher Molarität keine Kompetition der DNA-Bindung. Eine effektive Kompetition erfolgte erst bei einem 50-fachen molaren Überschuss (Abb. 20, Bahn 7 - 10).

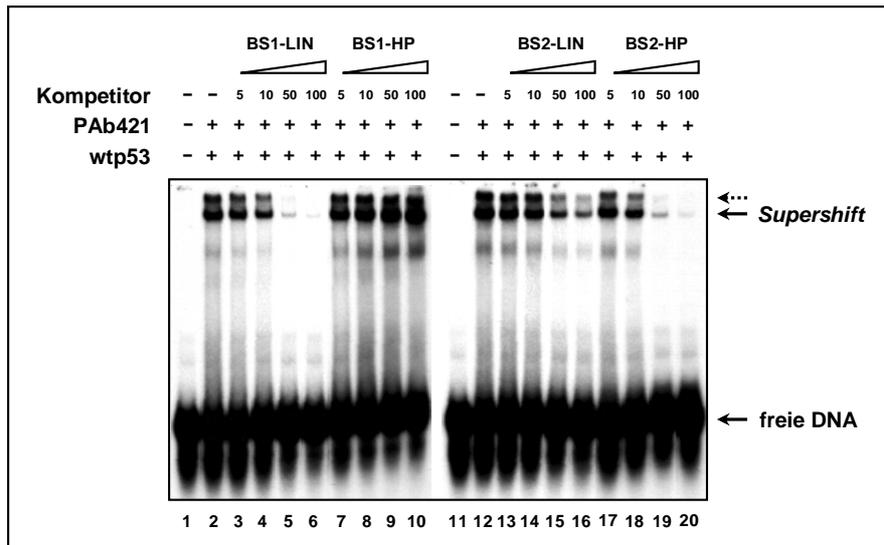


Abb. 21 DNA-Kompetition von mdm2-FL mit den isolierten p53-Bindungsstellen in linearer und strukturierter Konformation in Gegenwart des C-terminalen Antikörpers PAb421.

Die Kompetition konstanter Mengen von radioaktiv-markiertem mdm2-FL ohne (Bahn 1 und 11) bzw. mit wtp53 und PAb421 (Bahn 2 - 10 und 12 - 20) erfolgte in Gegenwart steigender Mengen nicht-markierter isolierter p53-Bindungsstellen in linearer und strukturierter Konformation (Bahn 3, 7, 13 und 17: 5-facher, Bahn 4, 8, 14 und 18: 10-facher, Bahn 5, 9, 15 und 19: 50-facher und Bahn 6, 10, 16 und 20: 100-facher molaren Überschuss) als Kompetitor-DNA. Das DNA-Kompetitionsexperiment wurde zur Reduzierung unspezifischer DNA-Bindung in Gegenwart von 50 ng Poly(dIdC) × poly(dIdC) durchgeführt.

Wie erwartet, kompetitierten die isolierten linearen p53-Bindungsstellen die Bindung von wtp53 an mdm2-FL erst in Gegenwart des C-terminalen Antikörpers PAb421. Dieser Kompetitionseffekt war bei BS1-LIN stärker ausgeprägt als bei BS2-LIN. Ab einem 50-fachen molaren Überschuss von BS1-LIN war die Bindung von wtp53 an mdm2-FL um mehr als 95 % reduziert (Abb. 21, Bahn 3 - 6). Unter gleichen Bedingungen wurden in Gegenwart von BS2-LIN hingegen noch 50 bzw. 25 % des Substrats gebunden (Abb. 21, Bahn 13 - 16). Im Gegensatz zu den linearen p53-Bindungsstellen verhielten sich die isolierten strukturierten p53-Bindungsstellen in Bezug auf die Fähigkeit, die DNA-Bindung von C-terminal modifiziertem wtp53 an mdm2-FL zu kompetitieren unterschiedlich. Trotz des zuvor beobachteten inhibierenden Effekts des C-terminalen Antikörpers (5.2.2) kompetitierte BS2-HP die DNA-Bindung von wtp53 an mdm2-FL in Gegenwart von PAb421 mit vergleichbarer Effektivität wie BS1-LIN (Abb. 21, Bahn 17 - 20). Dagegen wurde die Bindung von wtp53 an mdm2-FL durch BS1-HP nicht reduziert sondern bei einem hohen molaren Überschuss sogar leicht verstärkt (Abb. 21, Bahn 7 - 10).

Die Kompetitionsexperimente bestätigen die Annahme, dass wtp53 mit mdm2-FL sowohl in linearer als auch in strukturierter Konformation interagiert (vgl. 5.2.2), da die resultierenden

Protein-DNA-Komplexe durch die isolierten p53-Bindungsstellen in Abhängigkeit der DNA-Konformation unterschiedlich kompetitiert werden.

5.2.4 Charakterisierung der DNA-Bindung von wtp53 an die isolierte zweite p53-Bindungsstelle des humanen *mdm2*-Promotors

Aufgrund des Bindungsverhaltens wurde im Folgenden die DNA-Bindung von wtp53 an die isolierte zweite p53-Bindungsstelle des humanen *mdm2*-Promotors in linearer und strukturierter Konformation mit Hilfe von DNase I-Protektionsexperimenten (4.2.3) genauer analysiert. Darüber hinaus wurde die DNA-Sekundärstruktur von BS2-HP durch die Hydrolyse mit den beiden struktur-spezifischen Endonukleasen T7-EndoI und MBN charakterisiert (4.3.1).

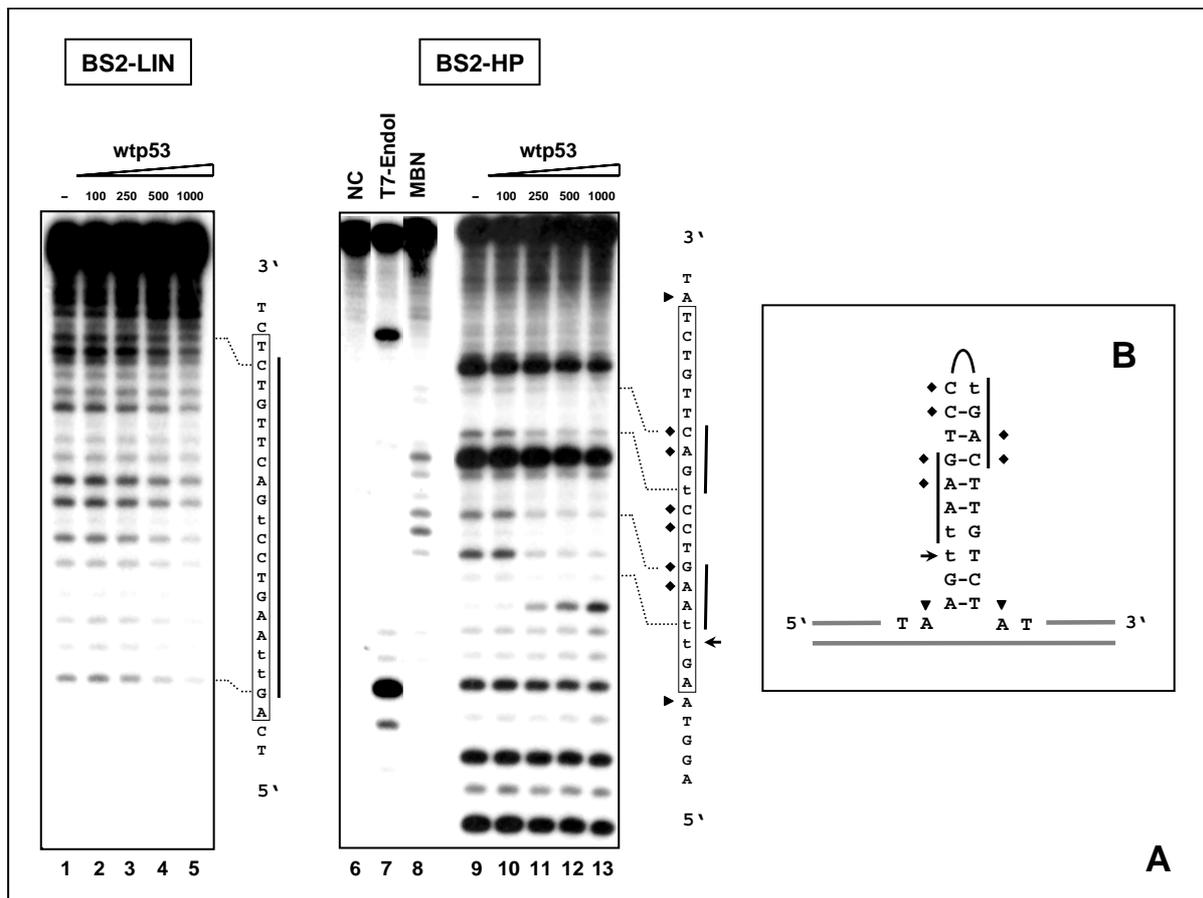


Abb.22 Charakterisierung der DNA-Bindung von wtp53 an die isolierte zweite p53-Bindungsstelle des humanen *mdm2*-Promotors in linearer und strukturierter Konformation.

(A) Hydrolyse von BS2-LIN und BS2-HP durch DNase I in Abwesenheit (Bahn 1 und 9) und Gegenwart steigender wtp53-Mengen (Bahn 2 und 10: 100 ng, Bahn 2 und 11: 250 ng, Bahn 3 und 12: 500 ng und Bahn 4 und 13: 1000 ng). Geschützte DNA-Bereiche innerhalb der eingerahmten p53-Konsensus-Sequenz sind durch vertikale Balken, hypersensitive DNase I-Bereiche durch Pfeile markiert. Die Charakterisierung der DNA-Struktur von BS2-

HP erfolgte in Abwesenheit (Bahn 6) und Anwesenheit der struktur-spezifischen Endonukleasen T7-EndoI (Bahn 7) und MBN (Bahn 8). T7-EndoI-sensitive Bereiche sind durch Dreiecke (►), MBN-sensitive Bereiche durch Rechtecke (◆) markiert. (B) Die Resultate sind schematisch für BS2-HP in der theoretischen DNA-*Hairpin*-Konformation dargestellt.

Das DNase I-Protektionsexperiment zeigte, dass wtp53 an die isolierte lineare zweite p53-Bindungsstelle des humanen *mdm2*-Promotors bindet und spezifisch die p53-Konsensus-Sequenz vor der Hydrolyse durch DNase I schützt (Abb. 22, Bahn 2 - 5). Mittels Bandshift-Analysen konnte zuvor gezeigt werden, dass wtp53 nur nach C-terminaler Aktivierung durch PAb421 in der Lage war, effektiv mit BS2-LIN zu interagieren (5.2.2). Da die Protektion des DNA-Substrats auch in Abwesenheit von PAb421 spezifisch an der p53-Konsensus-Sequenz erfolgte und strukturelle DNA-Bindungsdeterminanten nicht nachgewiesen werden konnten (Resultate nicht dargestellt), zeigt das DNase I-Protektionsexperiment, dass für die sequenz-spezifische Bindung von wtp53 an die isolierte lineare zweite p53-Bindungsstelle die Modifizierung des C-Terminus nicht essenziell ist.

Das DNase I-Protektionsexperiment zeigte weiterhin, dass wtp53 an die isolierte strukturierte zweite p53-Bindungsstelle des humanen *mdm2*-Promotors bindet (Abb. 22, Bahn 10 - 13). Zur Charakterisierung der struktur-spezifischen Interaktion von wtp53 wurde das DNA-Substrat zusätzlich durch die struktur-spezifischen Endonukleasen T7-EndoI und MBN hydrolysiert (Abb. 22, Bahn 7 und 8). Interessanterweise erfolgte die Bindung von wtp53 nicht wie beim entsprechenden linearen DNA-Substrat über die gesamte p53-Konsensus-Sequenz, sondern in Bereichen des DNA-*Hairpins*, die gegenüber der Hydrolyse durch MBN eine erhöhte Sensitivität aufwiesen. Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, dass neben der DNA-Sequenz einzelsträngige Bereiche, die durch Basenfehlpaarungen gebildet werden, die sequenz-spezifische Bindung von wtp53 an strukturierte DNA beeinflussen.

Der Vergleich der DNase I-Protektionsexperimente zeigte auch, dass wtp53 eine erhöhte Affinität gegenüber BS2-HP aufweist, da schon bei einer Proteinmenge von 250 ng ein effektiver Schutz auftrat, wohingegen BS2-LIN erst ab einer Proteinmenge von 500 bis 1000 ng effektiv gegenüber der Hydrolyse durch DNase I geschützt wurde.

5.2.5 Einfluss des C-Terminus auf die DNA-Bindung von p53 an die isolierten p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors

Da die C-terminale Modifizierung durch PAb421 die DNA-Bindung von wtp53 an die isolierten p53-Bindungsstellen des *mdm2*-Promotors und *mdm2*-FL regulierte (5.2.2 und 5.2.3), wurde der Einfluss der REG durch Deletion der letzten 30 C-terminalen Aminosäuren von wtp53 (p53 Δ 30) in Bandshift-Analysen (4.2.1) untersucht.

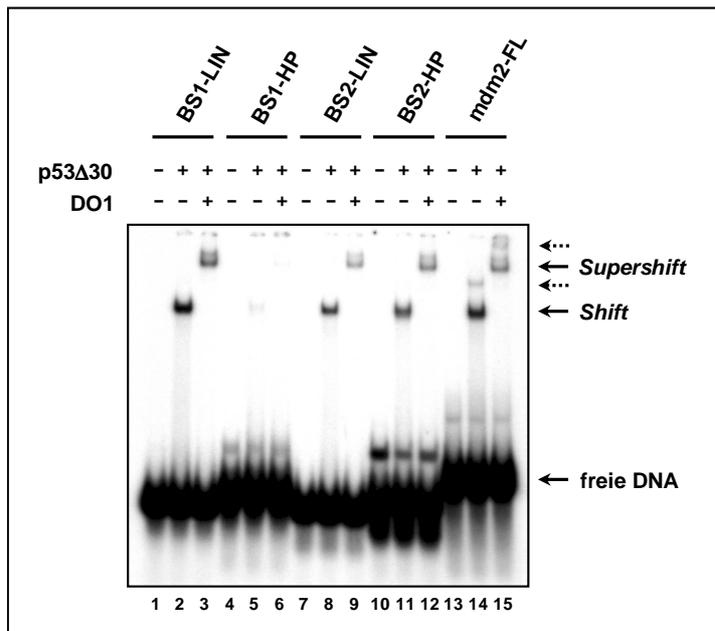


Abb. 23 DNA-Bindung von p53 Δ 30 an die isolierten p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors.

Bandshift-Analysen isolierter p53-Bindungsstellen in linearer und strukturierter Konformation und *mdm2*-FL ohne (Bahn 1, 4, 7, 10 und 13) und mit konstanten p53 Δ 30-Mengen (Bahn 2, 5, 8, 11 und 14) in Gegenwart des N-terminalen Antikörpers DO1 (Bahn 3, 6, 9, 12 und 15). Ungebundene TNR-Substrate sowie p53/DNA- bzw. p53/DNA/Ab-Komplexe sind entsprechend durch Pfeile markiert.

Durch Deletion der REG war p53 in der Lage, an lineare DNA-Substrate zu binden und wies - wie zuvor das C-terminal modifizierte wtp53-Protein - unterschiedliche Affinitäten gegenüber den beiden linearen DNA-Substraten auf, wobei die erste p53-Bindungsstelle stärker gebunden wurde als die zweite (Abb. 23, Bahn 2 und 8). Im Gegensatz zu FL-wtp53 bewirkte der N-terminale Antikörper DO1 eine leichte Inhibierung der Bindung (Abb. 23, Bahn 3 und 9). Interessanterweise war p53 Δ 30 in der Lage, mit nahezu gleicher Affinität an die strukturierte zweite p53-Bindungsstelle des *mdm2*-Promotors zu binden wie FL-wtp53, obwohl die Bindung von C-terminal modifiziertem wtp53 nahezu vollständig inhibiert wurde (Abb. 23, Bahn 11). Dabei wurde die Bindung durch den N-terminalen Antikörper kaum beeinflusst (Abb. 23,

Bahn 12). Die erste p53-Bindungsstelle in strukturierter Konformation wurde dagegen überaus schwach von p53 Δ 30 gebunden (Abb. 23, Bahn 5). Bei der Bindung von p53 Δ 30 an mdm2-FL wurden - wie zuvor bei der Bindung von FL-wtp53 - zwei p53-DNA-Komplexe mit unterschiedlichem Migrationsverhalten gebildet (Abb. 23, Bahn 14). Die Gegenwart von DOI bewirkte auch in diesem Fall eine leichte Inhibierung der Bindung (Abb. 23, Bahn 15).

5.2.6 Funktionelle Analyse des humanen *mdm2*-Promotors *in vivo*

Nach der Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften von wtp53 gegenüber mdm2-FL und den isolierten p53-Bindungsstellen in Abhängigkeit der DNA-Konformation *in vitro* erfolgte die funktionelle Analyse des humanen *mdm2*-Promotors *in vivo*. Dazu wurde der Vektor pGL3-mdm2-APP (4.5.2) verwendet, bei dem die beiden p53-Bindungsstellen durch Restriktionsschnittstellen flankiert werden (Abb. 24). Dadurch konnten einzelne Bindungsstellen deletiert (4.5.2.1) und der Einfluss auf die wtp53-abhängige Transaktivierung des Promotors *in vivo* analysiert werden.

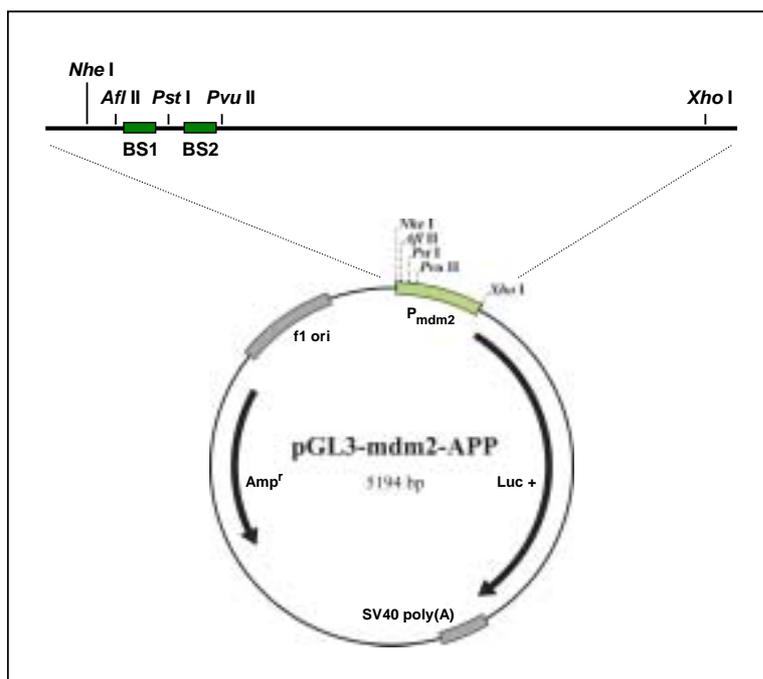


Abb. 24 Schematische Darstellung des pGL3-mdm2-APP-Vektors.

Bei der maßstabgetreuen Darstellung der humanen *mdm2*-Promotor-Sequenz des pGL3-mdm2-APP-Vektors sind die beiden p53-Bindungsstellen (BS1 und BS2) als grüne Boxen und die Positionen der DNA-Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen durch vertikale Balken dargestellt.

Mit Hilfe von Bandshift-Analysen (5.2.2) und durch Konkurrenzexperimente (5.2.3) konnte gezeigt werden, dass *wtp53 in vitro* in Abhängigkeit von der DNA-Struktur mit unterschiedlicher Affinität an die isolierten p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors bindet. Im Folgenden wurde untersucht, ob die unterschiedlichen Affinitäten einen Einfluss auf die p53-abhängige Transaktivierung des humanen *mdm2*-Promotors *in vivo* haben. Dazu wurden in einem Luziferase-Reporter-Aktivitätstest die Promotoraktivitäten von *mdm2*-Reporter-Konstrukten mit deletierten p53-Bindungsstellen untersucht.

LN-Z308-Zellen wurden mittels Nukleofektion (4.7.5) mit den entsprechenden superhelikalen Reporter-Konstrukten transient transfiziert und nach Induktion von *wtp53* die Promotoraktivitäten analysiert (4.2.5). Die Luziferase-Reporter-Aktivität wurde aus dem Mittelwert von je drei parallel durchgeführten Transfektionsansätzen bestimmt und der Quotient aus den Mittelwerten mit und ohne Induktion von *wtp53* in Bezug auf die Proteinmenge gebildet. Zum Vergleich verschiedener Experimente sind die Resultate nicht als Absolutwerte, sondern als Aktivitäten, d. h. als prozentuale Differenz der zuvor ermittelten Quotienten mit pGL3-*mdm2*-APP als Positivkontrolle (100 %) dargestellt.

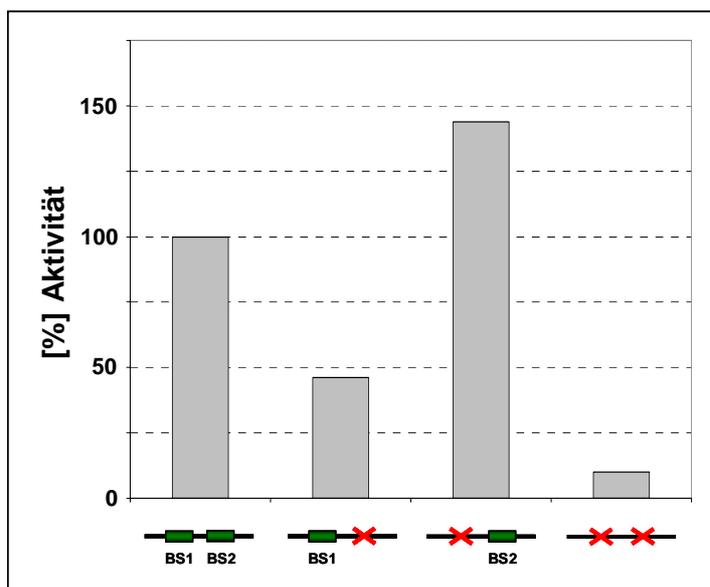


Abb. 25 Einfluss einzelner p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors auf die *wtp53*-abhängige Transkription.

Die beiden p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors (BS1 und BS2) sind schematisch als grüne Boxen, deletierte p53-Bindungsstellen als rote Kreuze dargestellt.

Die Deletion der ersten p53-Bindungsstelle innerhalb des humanen *mdm2*-Promotors führte zu einer etwa 50 %-igen Erhöhung, wohingegen die Deletion der zweiten p53-Bindungsstelle zu

einer etwa 50 %-igen Erniedrigung der Transkription führte. Durch die Deletion beider p53-Bindungsstellen war eine überaus geringe Promotoraktivität zu beobachten, die nur geringfügig über der basalen Transaktivierung des Luziferase-Reportergens lag (Abb. 25).

Damit konnte gezeigt werden, dass die beiden p53-Bindungsstellen nicht nur unterschiedliche DNA-Bindungsaffinitäten gegenüber wtp53 aufweisen, sondern auch die wtp53-abhängige Transkription unterschiedlich beeinflussen: Die erste Bindungsstelle des humanen *mdm2*-Promotors inhibiert die zweite Bindungsstelle.

5.3 Der Einfluss von TNRs auf die wtp53-abhängige Transkription

Nach der Charakterisierung der DNA-Bindungseigenschaften von wtp53 gegenüber TNRs *in vitro* sollte im dritten Teil dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob TNRs einen Einfluss auf die wtp53-abhängige Transkription *in vivo* haben können. Dieser Einfluss könnte zum einen direkt durch die Bindung von wtp53 an TNRs erfolgen, zum anderen indirekt dadurch, dass TNRs die Konformation von wtp53-regulierten Promotoren beeinflussen. Da p53-regulierte TNR-assoziierte Promotoren bis dato nicht bekannt sind, erfolgte die Untersuchung mit Hilfe des zuvor charakterisierten humanen *mdm2*-Promotors als Modellpromotor.

5.3.1 Spezifität der DNA-Bindung von wtp53 an TNRs

Zunächst wurde die Spezifität und relative Affinität der p53-TNR-Interaktion durch Konkurrenzexperimente (4.2.2) in Gegenwart von *mdm2*-FL analysiert, da dieses DNA-Substrat von wtp53 ohne C-terminale Aktivierung gebunden (5.2.2) und diese Bindung in vorangegangenen Konkurrenzexperimenten mit den sequenz-spezifischen isolierten p53-Bindungsstellen in linearer und strukturierter Konformation charakterisiert wurde (5.2.3). Verschiedene TNR-Substrate dienten als DNA-Kompetitoren.

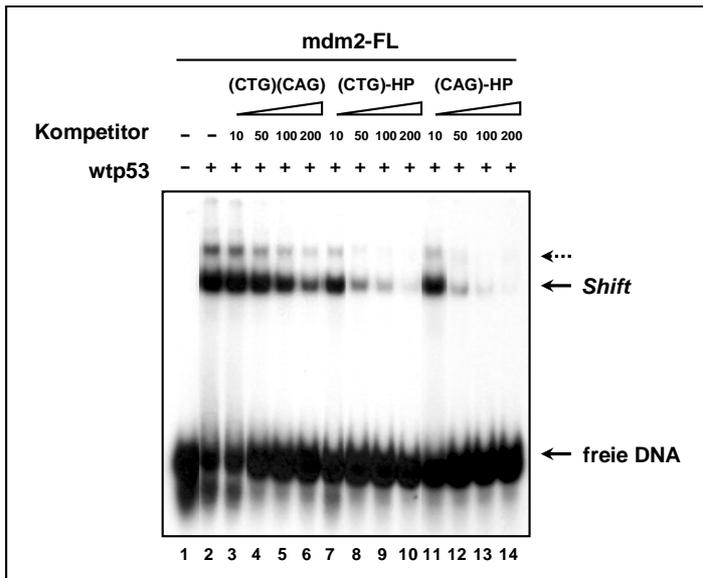


Abb. 26 DNA-Kompetition von mdm2-FL mit linearen und strukturierten TNR-Substraten.

Die Kompetition konstanter Mengen von radioaktiv-markiertem mdm2-FL ohne (Bahn 1) bzw. mit wtp53 (Bahn 2 - 14) erfolgte in Gegenwart steigender Mengen nicht-markierter TNR-Substrate in linearer und strukturierter Konformation (Bahn 3, 7 und 11: 10-facher, Bahn 4, 8 und 12: 50-facher, Bahn 5, 9 und 13: 100-facher und Bahn 6, 10 und 14: 200-facher molarer Überschuss) als Kompetitor-DNA.

Das lineare (CTG)(CAG) TNR-Substrat führte erst bei einem 200-fachen molaren Überschuss zu einer Kompetition der Bindung von wtp53 an mdm2-FL um etwa 50 % (Abb. 26, Bahn 3 - 6). Dagegen waren die strukturierten (CTG)-HP und (CAG)-HP TNR-Substrate in der Lage, die Bindung bereits ab einem 50-fachen molaren Überschuss fast vollständig zu kompetitieren (Abb. 26, Bahn 7 - 10 und Bahn 11 - 14).

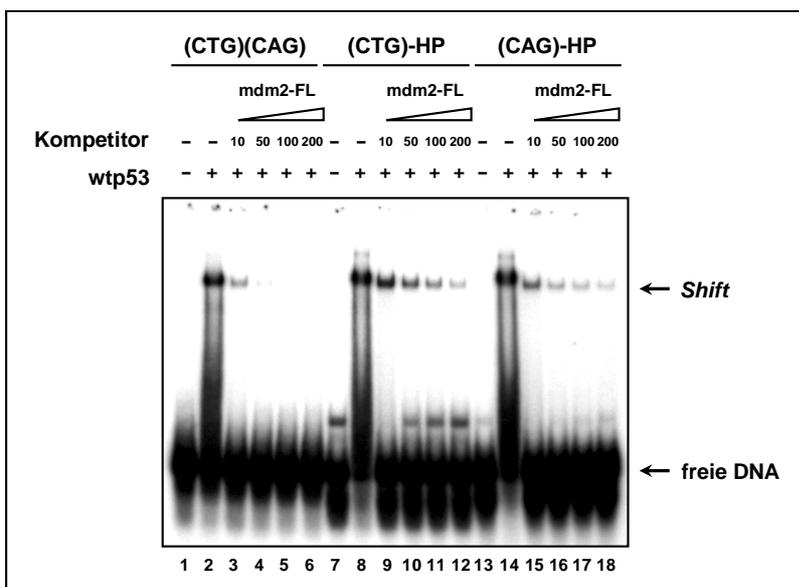


Abb. 27 DNA-Kompetition von linearen und strukturierten TNR-Substraten mit mdm2-FL.

Die Kompetition konstanter Mengen radioaktiv-markierter linearer (CTG)(CAG) (Bahn 1 - 6) und strukturierter (CTG)-HP (Bahn 7 - 12) und (CAG)-HP (Bahn 13 - 18) TNR-Substrate ohne (Bahn 1, 7 und 13) bzw. mit wtp53 (Bahn 2 - 6, 8 - 12 und 14 - 18) erfolgte in Gegenwart steigender Mengen von nicht-markiertem mdm2-FL (Bahn 3, 9 und 15: 10-facher, Bahn 4, 10 und 16: 50-facher, Bahn 5, 11 und 17: 100-facher und Bahn 6, 12 und 18: 200-facher molarer Überschuss) als Kompetitor-DNA.

Der reziproke Versuchsansatz zeigte, dass mdm2-FL bei einem 10-fachen molaren Überschuss die Bindung von wtp53 an das lineare (CTG)(CAG) TNR-Substrat zu mehr als 90 % und ab einem 50-fachen molaren Überschuss vollständig kompetitiert (Abb. 27, Bahn 3 - 6). Im Gegensatz dazu wurde die Bindung von wtp53 an strukturierte (CTG)-HP bzw. (CAG)-HP TNR-Substrate bei einem 10-fachen molaren Überschuss von mdm2-FL um etwa 50 % bzw. 75 % reduziert und selbst bei einem 200-fachen molaren Überschuss nicht vollständig kompetitiert (Abb. 27, Bahn 9 - 13 und Bahn 15 - 18).

Darüber hinaus bestätigte das Kompetitionsexperiment, dass wtp53 gegenüber strukturierten (CTG)-HP TNR-Substraten eine höhere Affinität aufweist als gegenüber strukturierten (CAG)-HP TNR-Substraten (5.1.2.1), da die Bindung von wtp53 an (CTG)-HP durch den sequenz-spezifischen Kompetitor schwächer kompetitiert wurde.

Die Kompetitionsexperimente zeigen, dass die „authentische“ *mdm2*-Promotor-DNA von wtp53 signifikant besser gebunden wurde als die TNR-Substrate. Daraus kann man folgern, dass die Anwesenheit von TNRs in der Nähe eines wtp53-spezifischen Promotor-Elements nicht zu einer direkten Kompetition um die p53-Bindung führen wird. Eventuelle Veränderungen der p53-Antwort wären demnach nicht auf die direkte Bindung von wtp53 an promotor-benachbarte TNRs zurückzuführen, sondern eher auf eine Beeinflussung der Promotor-Struktur.

5.3.2 Einfluss der TNR-Orientierung und -Position auf die wtp53-abhängige Transkription

Im Folgenden wurde der Einfluss von TNR-Sequenzen auf die wtp53-abhängige Transkription mit Hilfe artifiziell generierter Luziferase-Reportergen-Konstrukte *in vivo* untersucht. Dazu wurden TNRs in (CAG)·(CTG)- und (CTG)·(CAG)-Orientierung in den Kontext des humanen *mdm2*-Promotors kloniert (Abb.24). Da beim pGL3-*mdm2*-APP-Vektor die beiden p53-Bindungsstellen durch Restriktionsschnittstellen flankiert werden, konnten TNRs entsprechend inseriert (4.5.2.2) und der Einfluss auf die wtp53-abhängige Transaktivierung des Promotors *in vivo* analysiert werden.

LN-Z308-Zellen wurden mittels Nukleofektion (4.7.5) mit den entsprechenden superhelikalen Reporter-Gen-Konstrukten transient transfiziert und nach Induktion von wtp53 die Promotoraktivitäten analysiert (4.2.5).

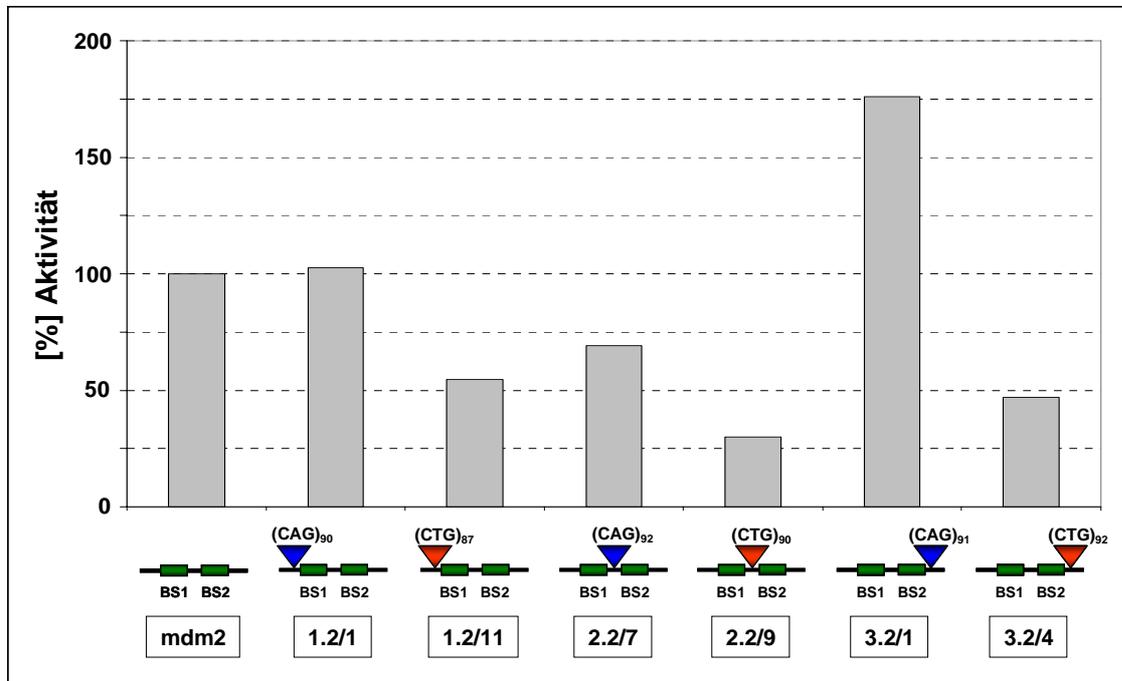


Abb. 28 Einfluss von TNRs unterschiedlicher Orientierung und Position innerhalb des humanen *mdm2*-Promotors auf die wtp53-abhängige Transkription.

Die beiden p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors (BS1 und BS2) sind schematisch als grüne Boxen, die Positionen insertierter TNR-Sequenzen relativ zu den beiden p53-Bindungsstellen als blaue ((CAG)-(CTC)-Orientierung) bzw. rote Dreiecke ((CTG)-(CAG)-Orientierung) dargestellt.

TNRs beeinflussten die Transaktivierung des humanen *mdm2*-Promotors in Abhängigkeit von der relativen Position in Bezug auf die p53-Bindungsstellen. *Upstream* der beiden p53-Bindungsstellen führten lediglich TNRs in (CTG)-(CAG)-Orientierung (pGL3-*mdm2*-1.2/11) zu einer etwa 50 %-igen Erniedrigung der Transkription. TNRs in (CAG)-(CTG)-Orientierung (pGL3-*mdm2*-1.2/1) beeinflussten hingegen die Transkription nicht. Die Insertion von TNRs *downstream* der ersten p53-Bindungsstelle führte pauschal zu einer Verminderung der Transkription, wobei der Effekt für TNRs in (CTG)-(CAG)-Orientierung (pGL3-*mdm2*-2.2/9) (30 %) im Vergleich zu TNRs in (CAG)-(CTG)-Orientierung (pGL3-*mdm2*-2.2/7) (70 %) größer war. *Downstream* der beiden p53-Bindungsstellen führte die Insertion von TNRs zu einem grundsätzlich unterschiedlichen Resultat in Bezug auf die wtp53-abhängige Transaktivierung des humanen *mdm2*-Promotors. Wie zuvor führten TNRs in (CTG)-(CAG)-Orientierung

(pGL3-mdm2-3.2/4) zu einer Verringerung (50 %) der Luziferase-Reporter-Aktivität. Dagegen steigerten TNRs in (CAG)-(CTG)-Orientierung (pGL3-mdm2-3.2/1) die Transkription des Reportergens um etwa 75 % (Abb. 28).

5.3.3 Einfluss der TNR-Länge auf die wtp53-abhängige Transkription

Da die Insertion von TNRs *downstream* der beiden p53-Bindungsstellen innerhalb des humanen *mdm2*-Promotors in Abhängigkeit von der Orientierung zur Aktivierung bzw. Repression der wtp53-abhängigen Transkription führte, wurde der Einfluss der *Repeat*-Länge untersucht.

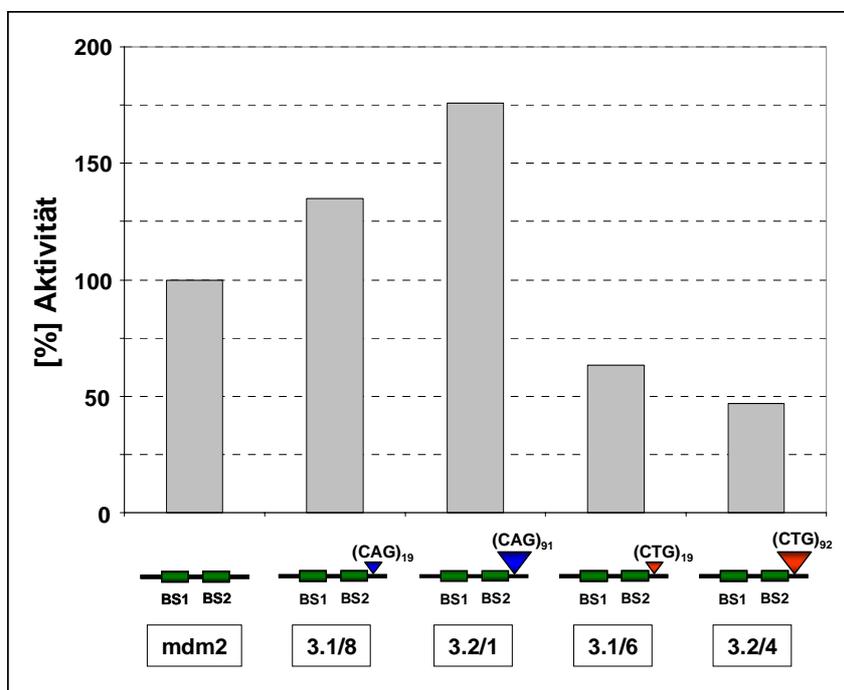


Abb. 29 Einfluss von TNRs unterschiedlicher Orientierung und Länge innerhalb des humanen *mdm2*-Promotors auf die wtp53-abhängige Transkription.

Der Effekt von TNRs, die wtp53-abhängige Transaktivierung des humanen *mdm2*-Promotors in Abhängigkeit von der Orientierung zu aktivieren bzw. inhibieren, war bei TNRs mit etwa 90 *Repeats* (pGL3-mdm2-3.2/1 und pGL3-mdm2-3.2/4) stärker ausgeprägt als bei TNRs mit nur etwa 20 *Repeats* (pGL3-mdm2-3.1/8 und pGL3-mdm2-3.1/6) (Abb. 29).

5.3.4 Einfluss der TNR-Struktur auf die wtp53-abhängige Transkription

Aufgrund der Beobachtung, dass TNRs die p53-abhängige Transkription in Abhängigkeit der *Repeat-Länge in vivo* beeinflussen und dieser Effekt bei langen TNRs stärker ausgeprägt war als bei kurzen TNRs (5.3.3), wurde postuliert, dass lange TNRs infolge der Torsionsspannung superhelikaler Plasmid-DNA dazu in der Lage sind, DNA-Strukturen auszubilden und dadurch die Transaktivierung des Reporters zu beeinflussen. Daher sollte ermittelt werden, ob die Bildung von DNA-Strukturen innerhalb TNR-tragender Plasmid-DNA für diesen Effekt verantwortlich ist.

5.3.4.1 Bildung von DNA-Strukturen innerhalb TNR-tragender Plasmid-DNA

Mit Hilfe der 2D-Agarosegelelektrophorese sollte zunächst gezeigt werden, dass lange TNRs unter superhelikalem Stress DNA-Strukturen ausbilden. Dazu wurden die drei Reporter-Konstrukte pGL3-mdm2-APP, pGL3-mdm2-3.1/6 (enthält 19 *Repeats*) und pGL3-mdm2-3.2/4 (enthält 92 *Repeats*) ausgewählt und wie unter 4.3.3 beschrieben untersucht.

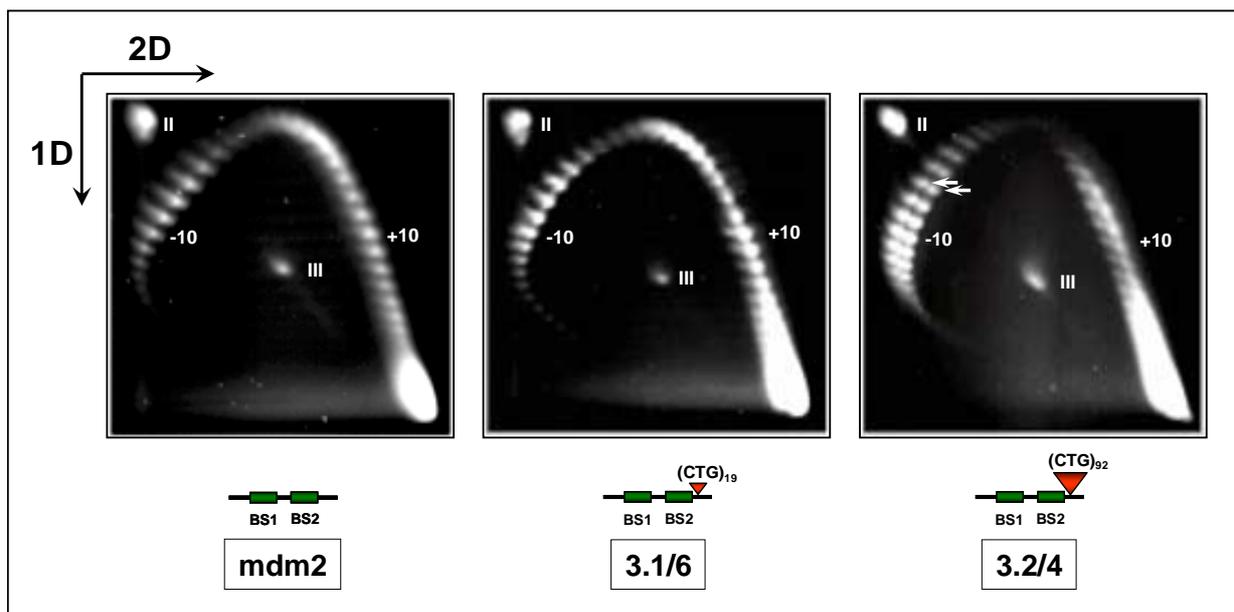


Abb. 30 2D-Agarosegelelektrophorese verschiedener Reporter-Konstrukte.

Strukturelle Transitionen innerhalb der drei Reporter-Konstrukte pGL3-mdm2-APP (mdm2), pGL3-mdm2-3.1/6 (3.1/6) und pGL3-mdm2-3.2/4 (3.2/4) wurden mit Hilfe der 2D-Agarosegelelektrophorese, wie unter 4.3.3 beschrieben, ermittelt. Die DNA-Konformationsisomere II (open circle) und III (linear) sowie die Windungszahlen bestimmter DNA-Topoisomere sind angegeben. Im Falle von pGL3-mdm2-3.2/4 sind die beiden diskreten Bögen durch Pfeile markiert.

Eine optimale Verteilung von DNA-Topoisomeren (4.3.3.1) wurde in Gegenwart einer geringen Menge von Chloroquin als DNA-Interkalator in der ersten Dimension und nach Erhöhung der Chloroquin-Konzentration in der zweiten Dimension gelelektrophoretisch getrennt (4.3.3.2).

Die Resultate der 2D-Agarosegelelektrophorese mit den zuvor erwähnten Reporter-gen-Konstrukten sind in Abb. 30 dargestellt. Interessanterweise zeigten die Topoisomere des 3.2/4-Vektors im Gegensatz zum pGL3-mdm2-APP- und 3.1/6-Vektor unter identischen Bedingungen ein „anomales“ Migrationsverhalten und wurden in zwei leicht versetzte diskrete Bögen (*arcs*) aufgetrennt, die unabhängig vom Grad der DNA-Superspiralisierung auftraten. Da sich normalerweise ein struktureller Übergang von B- in non-B-DNA als „Sprung“ (*jump*) innerhalb des Bogens manifestiert (Bowater *et al.*, 1992), weist das Ergebnis darauf hin, dass lange TNRs einen kontinuierlichen und nicht wie sonst üblich einen diskontinuierlichen strukturellen Übergang zeigen. Bisher wurde in der Literatur der strukturelle Übergang von [(CTG)-(CAG)]_n-Plasmid-DNA von B- in non-B-DNA nicht beschrieben. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Laboratorien erzielt (persönliche Kommunikation mit Prof. Dr. R. Wells und Dr. R. Bowater). Da die strukturelle Transition unabhängig von der DNA-Superspiralisierung erfolgte, scheint die Gegenwart von Chloroquin in der ersten Dimension für die Trennung der Topoisomere mit 92 *Repeats* in zwei diskrete Bögen verantwortlich zu sein. Vorexperimente konnten zeigen, dass in Abwesenheit von Chloroquin ein für Plasmid-DNA mit 92 *Repeats* charakteristischer zweiter Bogen auftrat. Allerdings wies der zusätzliche Bogen eine überaus schwache Intensität auf und zeigte keine Auflösung der Topoisomere in diskrete Banden (Resultate nicht dargestellt). Daher liegt die Vermutung nahe, dass ein geringer Prozentsatz von Plasmid-DNA mit langen *Repeats* generell strukturiert vorliegt und für den Übergang zwischen B- und non-B-DNA wenig Energie benötigt wird. Infolgedessen befindet sich die Plasmid-DNA in einem dynamischen Konformationsgleichgewicht. Durch die lokale Entwindung in Gegenwart von Chloroquin (Induktion positiver DNA-Superspiralisierung) wird das dynamische Gleichgewicht zwischen strukturierter und nicht-strukturierter Plasmid-DNA zu Gunsten der strukturierten Konformation verschoben.

Da durch die Propagierung TNR-tragender Plasmid-DNA in *E. coli* infolge der erhöhten Instabilität von TNRs sowohl Deletionen als auch Insertionen resultieren können (Bowater *et al.*, 1996), bestand jedoch die Möglichkeit, dass der Doppelbogen aufgrund der Präsenz zweier Plasmid-DNA-Subpopulationen mit verschiedener Größe gebildet wurde. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die Größe und damit die Integrität der Plasmid- und Insert-DNA bestimmt.

Die Integrität der Plasmid-DNA wurde durch die Analyse der drei DNA-Formen überprüft. Dazu wurden zunächst Form II (oc, *open circle* oder *nicked*) durch die partielle Hydrolyse mit DNase I und Form II (lin, *linear*) durch die vollständige Hydrolyse mit *Hind* III generiert (4.4.4.1).

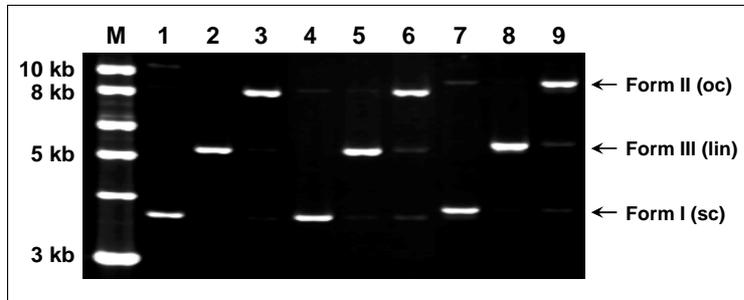


Abb. 31 Integrität verschiedener Reporter-gen-Konstrukte.

Die Plasmid-DNA-Konformationsisomere (Form I: supercoiled, Form II: open circle und Form III: linear) der drei Reporter-gen-Konstrukte pGL3-mdm2-APP (Bahn 1 - 3), pGL3-mdm2-3.1/6 (Bahn 4 - 6) und pGL3-mdm2-3.2/4 (Bahn 7 - 9) wurden mit Hilfe eines 0.7 %-igen Agarosegels in $0.5 \times \text{TBE}$ für 18 h bei 4°C und einer Spannung von $2.5 \text{ V} \times \text{cm}^{-1}$ getrennt. M: 1 kb DNA-Leiter.

Nach der gelelektrophoretischen Trennung konnte für jedes untersuchte Reporter-gen-Konstrukt eine diskrete Bande der entsprechenden DNA-Form detektiert werden (Abb. 31, Bahn 1 - 9). Daher kann davon ausgegangen werden, dass im Falle von pGL3-mdm2-3.2/4 keine zwei DNA-Plasmid-Subpopulationen mit verschiedener Größe in der DNA-Präparation existierten.

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurden die DNA-Inserts nach der Hydrolyse der Reporter-gen-Konstrukte pGL3-mdm2-APP, pGL3-mdm2-3.1/6 und pGL3-mdm2-3.2/4 mit den Restriktionsendonukleasen *Kpn* I und *Hind* III gelelektrophoretisch getrennt und die Integrität der DNA-Inserts überprüft.

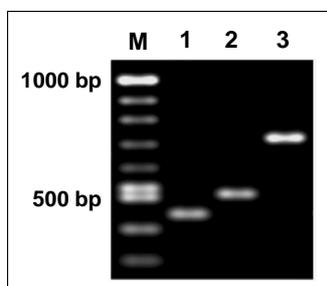


Abb. 32 Integrität der DNA-Inserts verschiedener Reporter-gen-Konstrukte

Die DNA-Inserts der drei Reporter-gen-Konstrukte pGL3-mdm2-APP (Bahn 1), pGL3-mdm2-3.1/6 (Bahn 2) und pGL3-mdm2-3.2/4 (Bahn 3) wurden mit Hilfe eines 2 %-igen Agarosegels in $0.5 \times \text{TBE}$ für 18 h bei 4°C und einer Spannung von $2.5 \text{ V} \times \text{cm}^{-1}$ getrennt. M: 100 bp DNA-Leiter.

Nach der gelelektrophoretischen Trennung der DNA-Inserts konnte jeweils nur eine diskrete Bande mit der entsprechend korrekten Größe nachgewiesen werden (Abb. 32, Bahn 1 - 3). Infolgedessen kann ausgeschlossen werden, dass der bei der 2D-Agarosegelelektrophorese gebildete Doppelbogen das Resultat von zwei verschieden großen Plasmid-DNA-Subpopulationen innerhalb der pGL3-mdm2-3.2/4-Präparation darstellt.

5.3.4.2 Einfluss der Plasmid-DNA-Topologie auf die wtp53-abhängige Transkription

Da für lange TNRs mittels 2D-Agarosegelelektrophorese ein struktureller Übergang von B- in non-B-DNA beobachtet werden konnte, sollte der Einfluss der Plasmid-DNA-Topologie von TNR-tragenden Reporter-gen-Konstrukten auf die wtp53-abhängige Transkription untersucht werden.

Dazu wurden Saos-2-Zellen mittels Effectene™ (4.7.6) mit pCMV-wtp53 und den entsprechenden superhelikalen bzw. durch Topoisomerase I relaxierten Reporter-gen-Konstrukten (4.3.3.1) co-transfiziert und die Luziferase-Aktivität ermittelt (4.2.5). Die in Abb. 33 dargestellten Resultate zeigen den prozentualen Unterschied der Luziferase-Aktivität von relaxierten (rDNA) und superhelikalen (scDNA) Reporter-gen-Konstrukten. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass die wtp53-abhängige Transaktivierung des humanen *mdm2*- und *p21*-Promotors von der DNA-Topologie der untersuchten Reporter-gen-Konstrukte abhängt. Dabei wird der *mdm2*-Promotor durch negative DNA-Superspiralisierung inhibiert, der *p21*-Promotor hingegen aktiviert (Kim *et al.*, 1999). Deshalb wurde der humane *p21*-Promotor als interne Kontrolle bei der Untersuchung des Einflusses der DNA-Topologie von TNR-tragenden Reporter-gen-Konstrukten auf die wtp53-abhängige Transkription eingesetzt.

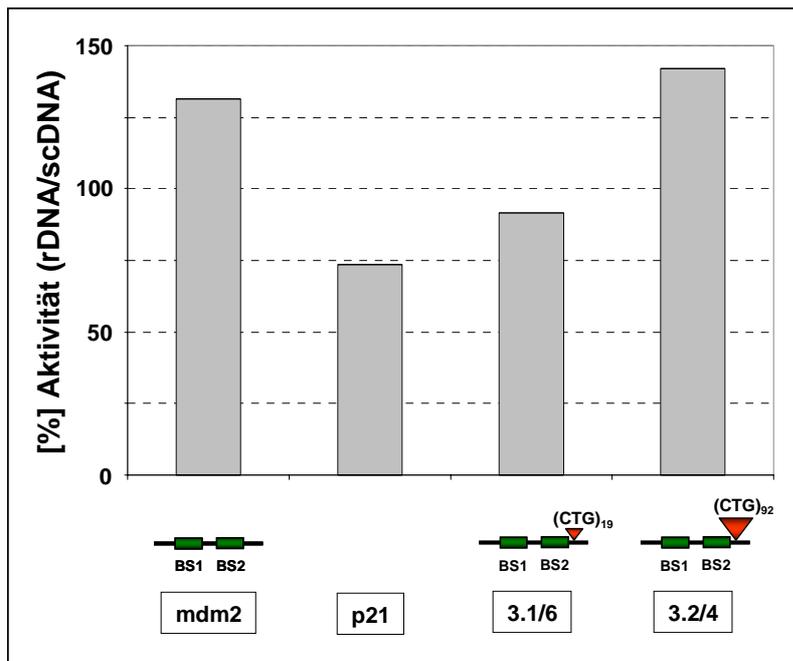


Abb. 33 Einfluss der DNA-Topologie auf die p53-abhängige Transkription.

Infolge der Relaxierung des Reporter-gen-Konstrukts unter der Kontrolle des humanen *mdm2*-Promotors wurde die wtp53-abhängige Transkription um etwa 30 % gesteigert. Im Gegensatz dazu führte die Relaxierung des Reporter-gen-Konstrukts unter Kontrolle des humanen *p21*-Promotors zu einer etwa 25 %-igen Inhibierung (Abb. 33).

Interessanterweise führte die Relaxierung der Plasmid-DNA mit 92 *Repeats* in (CTG)-(CAG)-Orientierung (pGL3-*mdm2*-3.2/4) zu einer mehr als 40 %-igen Erhöhung der Transkription. Dagegen beeinflusste die DNA-Topologie des entsprechenden Reporter-gen-Konstrukts mit nur 19 *Repeats* (pGL3-*mdm2*-3.1/6) die wtp53-abhängige Transaktivierung des humanen *mdm2*-Promotors nur geringfügig (Abb. 33).

Die Luziferase-Reporter-Aktivitätstests zeigten somit, dass lange TNRs *downstream* der beiden p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors durch die Ausbildung von DNA-Strukturen die wtp53-abhängige Transkription negativ beeinflussen, da durch Relaxierung der Plasmid-DNA die Bildung von non-B-DNA infolge fehlender Torsionsspannung verhindert und dadurch die Transkription erhöht wurde.

6. DISKUSSION

6.1 Interaktion von p53 mit TNRs

Bis dato ist wenig über den molekularen Mechanismus und die Funktion der hoch-affinen nicht-sequenz-spezifischen Bindung von p53 an strukturell flexible repetitive DNA-Sequenzen bekannt. Zur Untersuchung dieser Bindung wurden in dieser Arbeit die Interaktionen von wt und mutp53 mit TNRs analysiert, da die strukturellen Eigenschaften von TNRs sehr gut charakterisiert sind. TNRs sind aufgrund ihrer hohen biologisch-medizinischen Bedeutung von Interesse und könnten auch ein *in vivo* DNA-Substrate von p53 sein. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass p53 mit TNRs in Abhängigkeit der DNA-Konformation interagiert und dass die Ausbildung von DNA-Strukturen die Transkriptionsaktivität von wtp53 moduliert.

6.1.1 DNA-Bindung von wtp53 an lineare TNRs

Wtp53 bindet an lineare TNRs und weist gegenüber linearen TNRs ohne Basenfehlpaarungen eine höhere Affinität auf als gegenüber TNRs mit Basenfehlpaarungen. Darüber hinaus wird durch die Interaktion mit fehlgepaarten TNRs eine DNA-Konformationsänderung induziert.

Bandshift-Analysen zeigten, dass wtp53 das lineare TNR-Substrat ohne Basenfehlpaarungen bindet, und dass die Bindung durch den C-terminalen Antikörper PAb421 inhibiert wird. Diese Beobachtung steht zunächst im Einklang mit der Beobachtung, dass die hoch-affine nicht-sequenz-spezifische Bindung von wtp53 an lineare DNA durch C-terminale Modifikation inhibiert wird (Wölcke *et al.*, 2003). Mit Hilfe von DNase I-Protektionsexperimenten konnte aber nachgewiesen werden, dass wtp53 nur die TNR-Sequenz nicht aber die flankierenden Sequenzen des Substrats vor der Hydrolyse durch DNase I schützt. Da die Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur ergab, dass das TNR-Substrat als klassische B-DNA vorliegt, kann eine struktur-spezifische DNA-Bindung ausgeschlossen werden. Infolgedessen ist die Bindung nicht sequenz-unspezifisch sondern TNR-spezifisch, obwohl TNRs nicht der p53-Konsensus-Sequenz entsprechen.

Die spezifische Bindung von wtp53 an TNRs in B-DNA-Konformation wirft die Frage nach dem Bindungsmechanismus auf. Bei der sequenz-spezifischen Bindung interagiert die DBD von p53 sowohl mit der großen als auch mit der kleinen Furche der DNA. Von entscheidender Bedeutung ist dabei die Interaktion des L1-Loops und der H2-Helix von p53 mit der großen Furche der DNA für die sequenz-spezifische Bindung, da hierbei Kontakte mit den Basen der

Konsensus-Sequenz ausgebildet werden. Der L3-Loop von p53 interagiert mit der kleinen Furche der DNA und ist für die DNA-Bindung allgemein von Bedeutung, da DNA-Konformationsänderungen durch Stauchung der kleinen Furche kompensiert werden können (Cho et al., 1994; Nagaich *et al.*, 1997b). Im Gegensatz zu den Kontakten mit der großen Furche spielt die Interaktion mit der kleinen Furche vor allem bei der nicht-sequenz-spezifischen Bindung von p53 eine wichtige Rolle (Cho *et al.*, 1994). Proteine wie z. B. HMG (*high mobility group*) und die HMG-Box enthaltenden Proteine SRY (*sex-determining region Y*) und LEF-1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*), die nicht-sequenz-spezifisch an die kleine Furche der DNA binden, induzieren infolge dieser Interaktion DNA-Konformationsänderungen (Bewley *et al.*, 1998). Daher wird postuliert, dass bei der nicht-sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53 die Induktion einer DNA-Konformationsänderung eine wichtige Rolle spielt. Da die Effektivität der DNA-Konformationsänderung direkt mit der Flexibilität der DNA korreliert und die DNA-Doppelhelix von TNRs im Gegensatz zu randomisierten DNA-Sequenzen eine stark erhöhte Flexibilität aufweist (Bacolla *et al.*, 1997), stellen TNRs effektive DNA-Substrate für diesen DNA-Bindungsmechanismus dar. Aufgrund der Beobachtung, dass C-terminal deletiertes p53 im Gegensatz zu C-terminal modifizierten wtp53 in der Lage ist, das lineare TNR-Substrat zu binden, kann man annehmen, dass der Antikörper die Bindung sterisch blockiert und der C-Terminus nur einen geringen Einfluss auf die Bindung ausübt. Die Bindung von wtp53 an TNRs unterscheidet sich somit sowohl von der hoch-affinen nicht-sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53 an randomisierte B-DNA, die sowohl durch die DBD als auch durch die REG vermittelt wird, als auch von der sequenz-spezifischen Bindung an lineare DNA, die zwar ebenfalls ausschließlich über die DBD vermittelt wird, vorher aber durch C-terminale Modifikation von p53 „aktiviert“ werden muss. Diese Daten unterstreichen die Komplexität der möglichen Interaktionen von p53 mit DNA, in denen einerseits die Konformation der DNA und die der DBD wichtige Determinanten darstellen, andererseits der Bindung der REG an DNA eine wichtige modulatorische Rolle zukommt.

Im Gegensatz zur Bindung an lineare TNRs ohne Basenfehlpaarungen band wtp53 lineare TNRs mit Basenfehlpaarungen überaus schwach, wies aber eine leicht erhöhte Affinität gegenüber (T·T)-Basenfehlpaarungen auf. Bindungsstudien in anderen Labors ergaben ebenfalls, dass p53 eine höhere Affinität gegenüber (T·T)- als gegenüber (A·A)-Basenfehlpaarungen aufweist (Degtyareva *et al.*, 2001). Wie die Charakterisierung der DNA-Sekundärstrukturen zeigte, weisen lineare TNRs mit (A·A)-Basenfehlpaarungen infolge der leicht erhöhten Sensitivität gegenüber MBN über die gesamte TNR-Sequenz einen erhöhten DNA-

Einzelstrangcharakter und damit eine erhöhte Flexibilität auf. Der erhöhte Einzelstrangcharakter führt darüber hinaus zu einem reduzierten Migrationsverhalten linearer TNRs mit (A·A)-Basenfehlpaarungen in nativen Polyacrylamidgelen. Die Eigenschaft von p53, durch DNA-Bindung eine DNA-Konformationsänderung zu induzieren, zeigte sich vor allem bei der Bindung an lineare TNRs mit Basenfehlpaarungen. Da DNA mit Basenfehlpaarungen eine weitaus höhere Flexibilität aufweist, als die entsprechende DNA ohne Basenfehlpaarungen (Marathias *et al.*, 1999), ist dies ein weiterer wichtiger Hinweis für den zuvor postulierten Mechanismus der Bindung von wtp53 an lineare TNRs ohne Basenfehlpaarungen.

Mittels DNase I-Protektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass wtp53 am 5'- und 3'-Ende der TNR-Sequenzen mit Basenfehlpaarungen bindet und die Nukleotide zwischen den gebundenen Regionen eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNase I aufweisen. Die Generierung hypersensitiver DNase I-Stellen ist ein eindeutiger Hinweis dafür, dass durch die Bindung von p53 die DNA-Konformation des Substrats verändert wird (Hochschild, 1991; Kyogoku *et al.*, 1995). Die geschützten Regionen werden in Abhängigkeit der wtp53-Konzentration jeweils um ein Triplet verschoben, wodurch die Anzahl der Nukleotide mit erhöhter Sensitivität gegenüber DNase I konstant bleibt. Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, dass wtp53 dynamisch mit der DNA interagiert. Darüber hinaus entsprechen die konstanten Distanzen zwischen den geschützten Bereichen einer ganzen bzw. einer halben helikalen DNA-Windung und weisen somit darauf hin, dass wtp53 das lineare (CAG)(CAG) TNR-Substrat auf der gleichen Seite, das lineare (CTG)(CTG) TNR-Substrat hingegen auf der gegenüberliegenden Seite der DNA bindet. Daher wird angenommen, dass durch die unterschiedliche räumliche Anordnung der wtp53-Moleküle unterschiedliche DNA-Konformationsänderungen induziert werden.

Protein-induzierte DNA-Konformationsänderungen stellen wichtige regulatorische Mechanismen bei der Transkription, Replikation, Rekombination und Reparatur dar (Stein *et al.*, 2003). Es wird postuliert, dass wtp53 *in vivo* durch die Interaktion mit TNRs eine DNA-Konformationsänderung induziert, zelluläre Faktoren rekrutiert und wieder von der DNA dissoziiert. Ein ähnlicher Mechanismus wird für MutS aus *E. coli* (homolog zum humanen MSH2), das für die Erkennung und Initiierung der Reparatur von DNA-Basenfehlpaarungen verantwortlich ist, diskutiert. MutS ist in der Lage, durch Regulation der DNA-Krümmung die Reparatur von Basenfehlpaarungen durch Rekrutierung von Komponenten des MMR-Systems zu initiieren (Wang *et al.*, 2003).

6.1.2 DNA-Bindung von wtp53 an strukturierte TNRs

Wtp53 weist gegenüber strukturierten TNRs eine höhere Affinität auf als gegenüber linearen TNRs. Die struktur-spezifische Bindung ist abhängig von der TNR-Sequenz, wird durch die DBD vermittelt und durch die REG unterschiedlich reguliert: Die Bindung an (CTG)-HP weist eine hohe Affinität auf und wird durch die REG positiv beeinflusst, wohingegen die Affinität an (CAG)-HP leicht erniedrigt ist, und die REG nur einen geringen Einfluss auf die Bindung ausübt.

Der Unterschied im struktur-spezifischen Bindungsverhalten von wtp53 kann auf verschiedene DNA-Sekundärstrukturen der beiden TNR-Substrate zurückgeführt werden. Das (CTG)-HP TNR-Substrat ist in der Lage, eine definierte DNA-*Hairpin*-Struktur auszubilden, da die (T·T)-Basenfehlpaarungen durch Basen-Stapelung und durch die Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisiert werden können (Zhen *et al.*, 1996; Mariappan *et al.*, 1996). Die Bindung von wtp53 an (CTG)-*Hairpins* erfolgt am DNA-*Hairpin Stem* in der Nähe der *Junctions*. Die Charakterisierung der DNA-Sekundärstruktur zeigte, dass die Bindung in einem Bereich erfolgt, der einen erhöhten Einzelstrangcharakter aufweist. Bandshift-Analysen zeigten, dass die DBD von wtp53 mit dem strukturierten TNR-Substrat interagiert und dass die Bindung durch die REG stabilisiert wird. Der DNA-*Hairpin Stem* weist fehlgepaarte Basen auf, die als Erkennungsmotiv für die REG fungieren (Göhler *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zum (CTG)-HP weist das (CAG)-HP TNR-Substrat eine *Random Coil*-DNA-Konformation mit stark erhöhtem DNA-Einzelstrangcharakter auf, da (A·A)-Basenfehlpaarungen aufgrund fehlender Wechselwirkungen zu einer Destabilisierung der DNA-Struktur führen (Zhen *et al.*, 1996). DNase I-Protektionsexperimente zeigten, dass der Modus, mit dem wtp53 an das strukturierte (CAG)-HP TNR-Substrat bindet, der Bindung an das lineare TNR-Substrat mit (A·A)-Basenfehlpaarungen ähnelt. Dabei erfolgt die Bindung am 5'- bzw. 3'-Ende und generiert DNase I-hypersensitive Bereiche innerhalb der Sequenz. Man kann deshalb annehmen, dass auch in diesem Fall durch die Bindung von wtp53 eine Änderung der DNA-Konformation induziert wird. Die Bindung von wtp53 an (CAG)-HP wird durch die C-terminale Modifikation durch PAb421, nicht jedoch durch Deletion der REG inhibiert. DNA-Bindungsstudien von wtp53 mit DNA-Wölbungen und internen einzelsträngigen DNA-Bereichen zeigten, dass für diese Art der Interaktion die REG nicht benötigt wird (Selivanova *et al.*, 1996; Szak *et al.*, 1999). Daher ist der negative Einfluss des C-terminalen Antikörpers wahrscheinlich auf eine sterische Behinderung zurückzuführen.

6.1.3 DNA-Bindung von mutp53 an TNRs

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Konformationsmutante G245S und die beiden DNA-Kontaktmutanten R248P und R273H unterschiedlich mit TNRs interagieren.

Die DBD der Konformationsmutante G245S weist im Vergleich zu wtp53 eine leicht erniedrigte Stabilität und eine geringere sequenz-spezifische DNA-Bindungsaffinität auf (Bullock *et al.*, 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass G245S, wie wtp53, ebenfalls mit TNRs interagiert. Im Gegensatz zu wtp53 bewirkte die C-terminale Modifikation durch PAb421 jedoch keine Inhibierung sondern eine Aktivierung der Bindung an lineare TNRs. Dieser DNA-Bindungsmodus entspricht der sequenz-spezifischen DNA-Bindung von wtp53, wie sie hier auch bei der Bindung von wtp53 an die isolierten linearen Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors beobachtet wurde. Wir gehen deshalb davon aus, dass G245S zwar die sequenz-spezifischen DNA-Bindungseigenschaften von wtp53 verloren hat, die nicht-sequenz-spezifische Bindung jedoch nach wie vor durch die REG reguliert wird. NMR-Studien haben gezeigt, dass die Mutation G245S eine Veränderung der Protein-Konformation zur Folge hat, die für die sequenz-spezifische DNA-Bindung von entscheidender Bedeutung ist (Wong *et al.*, 1999).

Die DNA-Kontaktmutante R248P weist im Gegensatz zu wtp53 eine geringere Affinität gegenüber TNRs auf. Dabei wird weder die Bindung an lineare noch an strukturierte TNRs durch die REG beeinflusst. Die Kristallstruktur der DBD von wtp53 im Komplex mit DNA zeigt, dass R248 direkten Kontakt mit der kleinen Furche ausbildet. Daher wurde diese Mutante als DNA-Kontaktmutante klassifiziert (Cho *et al.*, 1994). Da keine strukturellen Informationen über die Mutante R248P vorliegen, kann lediglich vermutet werden, dass durch die Substitution des basischen Arginin-Restes gegen den hydrophoben Prolin-Rest die Interaktion mit der kleinen Furche negativ beeinflusst wird. NMR-Studien konnten jedoch zeigen, dass R248 auch eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Struktur innerhalb der L3-Loop-Region spielt und Mutationen die Protein-Konformation verändern. Infolgedessen weist die Mutante sowohl die Charakteristika einer DNA-Kontaktmutante als auch die einer Konformationsmutante auf (Wong *et al.*, 1999).

Die DBD von R273H weist eine ähnliche Stabilität wie wtp53 auf, ist jedoch nicht in der Lage, sequenz-spezifisch zu binden (Bullock *et al.*, 2000). Mit dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass R273H *in vivo* nicht in der Lage ist, sequenz-spezifisch an den humanen *mdm2*-Promotor zu binden. NMR-Studien mit der isolierten DBD von R273H zeigten, dass der Verlust der sequenz-spezifischen Bindung auf den Verlust der Interaktion von K120 des L1-Loops sowie der Amino-

säurereste C277 und R280 der H2-Helix mit den Basen der großen Furche zurückzuführen ist. Der Verlust dieser Interaktionen kann jedoch durch eine DNA-Konformationsänderung und eine erhöhte Bindung zwischen R248 und den Phosphat-Gruppen des DNA-Rückgrats der kleinen Furche kompensiert werden (Wong *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 2002). Dies könnte erklären, warum R273H trotz des Verlustes der sequenz-spezifischen DNA-Bindungseigenschaft spezifisch mit TNRs *in vivo* interagiert. DNase I-Protektionsexperimente zeigten, dass durch die Bindung von R273H an lineare TNRs mit Basenfehlpaarungen eine Änderung der DNA-Konformation induziert wurde, wie sie auch bei wtp53 beobachtet werden konnte. Dieses Ergebnis unterstützt zusammen mit den NMR-Strukturdaten von R273H die zuvor aufgestellte Vermutung, dass für die nicht-sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 die Interaktion des L3-Loops mit der kleinen Furche und der damit verbundenen DNA-Konformationsänderung von TNRs eine wichtige Rolle spielt, ohne dass die Basen der großen Furche sequenz-spezifisch gebunden werden müssen. Trotz der überaus schwachen Bindung von R273H an TNRs in Bandshift-Analysen konnte beobachtet werden, dass die C-terminale Modifizierung durch PAb421 die Bindung inhibiert. Dieser inhibitorische Effekt wurde auch bei der Bindung von wtp53 an TNRs beobachtet.

Die untersuchten *Hot-Spot*-Mutanten G245S, R248P und R273H weisen Mutationen auf, die direkt im L3-Loop lokalisiert sind und/oder eine Konformationsänderung dieser Region bewirken und dadurch die Interaktion mit der kleinen Furche der DNA beeinflussen. Die strukturelle Integrität des L3-Loops wird zusammen mit dem L2-Loop und der H1-Helix durch die Koordination von Zink erreicht (Cho *et al.*, 1994). Die Bedeutung des L3-Loops für die sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 wird durch die Entfernung von Zink deutlich, wodurch p53 die sequenz-spezifischen nicht aber die nicht-sequenz-spezifischen DNA-Bindungseigenschaften verliert (Butler und Loh, 2003). Zusammengenommen unterstützen die hier gezeigten DNA-Bindungsdaten die Annahme, dass die Bindung von p53 an TNRs primär über eine Interaktion zwischen dem L3-Loop und der kleinen Furche der TNRs erfolgt. Die Bindungsdaten von G245S und R248P weisen jedoch auch darauf hin, dass die Bindung durch Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren des L1-Loops und der H2-Helix und dem Phosphat-Zucker-Rückgrat der großen DNA-Furche stabilisiert wird.

6.1.4 Einfluss von TNRs auf die wtp53-abhängige Transkription

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TNRs in Abhängigkeit von ihrer Länge und Orientierung die wtp53-abhängige Transaktivierung des humanen *mdm2*-Promotors beeinflussen. Dabei wurde beobachtet, dass TNRs in (CTG) \cdot (CAG)-Orientierung *downstream* der beiden p53-Bindungsstellen die Transkription inhibieren, wohingegen TNRs in (CAG) \cdot (CTG)-Orientierung die Transkription stimulieren. Dabei ist der Effekt langer TNRs stärker ausgeprägt als der kurzer. Der Einfluss von TNRs auf die Transkription ist strikt wtp53-abhängig, da die Transkription weder in Abwesenheit von wtp53 noch in Abwesenheit der p53-Bindungsstellen beeinflusst wird (Ori *et al.*, 1998). Durch Relaxierung der Plasmid-DNA wurde der inhibitorische Einfluss für lange TNRs aufgehoben. Da die 2D-Agarosegelelektrophorese lediglich bei Plasmid-DNA mit langen TNRs einen kontinuierlichen strukturellen Übergang von B- in non-B-DNA aufzeigte und weiterhin Kompetitionsexperimente zeigten, dass TNRs unter physiologischen Bedingungen nicht um die Bindung von wtp53 an mdm2-FL konkurrieren, wird postuliert, dass die Ausbildung einer non-B-DNA-Struktur für die unterschiedliche Transkriptionsaktivität verantwortlich ist.

Der genaue molekulare Mechanismus der Modulation der wtp53-abhängigen Transkription durch TNRs ist nicht bekannt und ähnliche Phänomene sind in der Literatur noch nicht beschrieben. Folgende mögliche Mechanismen können diskutiert werden:

- (1) Die Modulation der wtp53-abhängigen Transkription durch TNRs könnte auf eine Interaktion von wtp53 mit anderen Transkriptionsfaktoren zurückgeführt werden. Potentielle Interaktionspartner stellen Proteine der Y-Box Familie dar, die durch Interaktion mit einzelsträngigen DNA-Bereichen die Aktivität von Promotoren regulieren (Swamynathan *et al.*, 1998). p53 interagiert mit YB-1 (*Y-box binding protein 1*), einem Transkriptionsfaktor der Y-Box Familie mit multifunktionellen Eigenschaften (Kohno *et al.*, 2003; Gaudreault *et al.*, 2004), über den C-Terminus und reguliert die Transkription bestimmter Gene (Okamoto *et al.*, 2000; Mertens *et al.*, 2002).
- (2) Ebenso besteht die Möglichkeit, dass zelluläre Faktoren die DNA-Bindungseigenschaften und dadurch die Funktion von wtp53 regulieren. HMGB1 stimuliert als DNA-Chaperon die sequenz-spezifische Bindung und Transkriptionsaktivität von p53 (Jayaraman *et al.*, 1998; McKinney und Prives, 2002). Obwohl p53 über den C-Terminus mit HMGB1 interagiert (Imamura *et al.*, 2001), konnte die Bildung eines ternären Komplexes nicht beobachtet werden (Jayaraman *et al.*, 1998; McKinney und Prives, 2002). Im Gegensatz dazu wird in Gegenwart von HMGB1 bei der nicht-sequenz-spezifischen Bindung von p53 an eine repetitive Dinukleotid-Mikrosatelliten Sequenz ein ternärer Komplex gebildet, für dessen Bildung der

C-Terminus benötigt wird (Stros *et al.*, 2004). Dagegen hat HMGB1 keinen Einfluss auf die nicht-sequenz-spezifische Bindung von p53 an DNA-Wölbungen und Holliday Junctions (Subramanian und Griffith, 2002). Damit steht der C-Terminus in Abhängigkeit des DNA-Substrats für zusätzliche Protein-Protein-Interaktionen zur Verfügung, was wiederum unterschiedliche Konsequenzen für die Transkription zur Folge hätte (siehe Punkt 1).

(3) Die Modulation der wtp53-abhängigen Transkription durch TNRs könnte jedoch auch allgemein auf unterschiedliche topologische Eigenschaften der Plasmid-DNA zurückgeführt werden. So besteht die Möglichkeit, dass sich DNA-Bereiche durch die Bildung von *inter-wound supercoils* proximal zueinander orientieren (Oussatcheva *et al.*, 2004) oder die DNA-Trajektorie die Transkription beeinflusst (Nishikawa *et al.*, 2003).

6.1.5 Mögliche biologische Relevanz der p53-TNR-Interaktion

Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet TNR-assoziiierter humaner Erkrankungen ist bis dato wenig über den genauen molekularen Mechanismus bekannt, der für die genomische Instabilität von TNRs verantwortlich ist. Da TNRs infolge der erhöhten Flexibilität der DNA-Doppelhelix in der Lage sind, während zellulärer Prozesse wie z. B. Replikation, Rekombination und Reparatur durch intramolekulare Basenpaarung DNA-*Hairpins* mit ungepaarten Nukleotiden auszubilden, wird in der Literatur diskutiert, ob Komponenten des MMR (*mismatch repair*) für die Instabilität verantwortlich sind (Cleary und Pearson, 2003).

Die Erkennung und Eliminierung von Basenfehlpaarungen und DNA-Wölbungen (IDL; *insertion-deletion loops*), die als Fehler während der DNA-Replikation oder der homologen Rekombination auftreten können, stellt die primäre Funktion des MMR dar. MSH2 (*MutS homolog 2*), eine Komponente des MMR, weist ebenso wie p53 eine hohe Affinität gegenüber DNA-Läsionen wie DNA-Basenfehlpaarungen und DNA-Wölbungen auf (Fishel *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Alani *et al.*, 1997; Degtyareva *et al.*, 2001). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Heterodimer MSH2-MSH6 die Bindung von p53 an DNA-Wölbungen stimuliert (Subramanian und Griffith, 2002).

In vitro bindet MSH2 präferentiell an (CAG)-DNA-Strukturen (Pearson *et al.*, 1997), und die direkte Beteiligung von MSH2 an der Kontrolle der TNR-Integrität konnte mit Hilfe MSH2-defizienter DM1-(*myotonic dystrophy 1*) transgener Mäuse *in vivo* nachgewiesen werden (Savouret *et al.*, 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass wtp53 *in vitro* mit höherer Affinität an (CTG)-Strukturen bindet. Die Untersuchung SV40-transformierter Hirnzellen HD-

(*Huntington's disease*) transgener Mäuse, bei denen eine erhöhte TNR-Instabilität nachgewiesen werden konnte, weist auf einen Zusammenhang zwischen p53 und der Stabilität von TNRs *in vivo* hin (Manley *et al.*, 1999). Da das große SV40 Tumorantigen (SV40 T-Antigen) die Aktivität von p53 inhibiert (Lane und Crawford, 1979), ist die beobachtete Instabilität in diesen Zellen möglicherweise auf die Inaktivierung von p53 zurückzuführen. Darüber hinaus konnten TNR-Expansionen ausschließlich im Tumorgewebe, nicht jedoch im angrenzenden Normalgewebe von DM1-Patienten beobachtet werden (Kinoshita *et al.*, 2002). Da p53 bei 50 % aller Tumore mutiert ist, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass p53 für den Phänotyp verantwortlich ist. Für einen funktionellen Zusammenhang zwischen p53 und MSH2 *in vivo* sprechen Erkenntnisse, die mit Hilfe von Mausmodellen gewonnen werden konnten. Sowohl p53- als auch MSH2-defiziente Mäuse weisen erhöhte genomische Instabilitäten auf, wobei MSH2 (-/-)-Mäuse Mikrosatelliten-Instabilitäten (MSI) und p53 (-/-)-Mäuse Aneuploidie zeigen. Heterozygote p53-Mäuse, bei denen MSH2 ausgeschaltet wurde, weisen jedoch anstelle der charakteristischen Aneuploidie eine erhöhte Mikrosatelliten Instabilität auf (Toft *et al.*, 2002).

Die Reparatur komplexer DNA-Schäden und DNA-Doppelstrangbrüche (DSB; *double-strand breaks*) durch homologe Rekombination (HR) spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. p53, MSH2 und das Heterodimer MSH2-MSH6 sind in der Lage, an Holliday Junctions (HJ), den Rekombinationsintermediaten der HR, zu binden (Lee *et al.*, 1997; Alani *et al.*, 1997; Marsischky *et al.*, 1999). Außerdem stimuliert das Heterodimer MSH2-MSH6 die Interaktion zwischen p53 und HJ (Subramanian und Griffith, 2002). Um Fehler bei der Rekombination homologer Sequenzen zu vermeiden, wird die HR durch die anti-rekombinatorische Aktivität der MMR-Faktoren reguliert (Evans und Alani, 2000). Dabei konnte gezeigt werden, dass p53 durch Protein-Protein-Interaktion mit BLM und RAD51 die homologe Rekombination reguliert (Buchhop *et al.*, 1997; Yang *et al.* 2002; Linke *et al.*, 2003). Die Regulation der BLM-Aktivität konnte auch für das Heterodimer MSH2-MSH6 *in vitro* gezeigt werden. Darüber hinaus konnte durch Co-Immünpräzipitation eine Interaktion von MSH2 und MSH6 mit BLM, p53 und Rad51 nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2004).

Damit weisen p53 und MSH2 nicht nur gegenüber DNA-Läsionen und DNA-Rekombinationsintermediaten ähnliche DNA-Bindungseigenschaften auf, sondern interagieren auch mit denselben Komponenten der HR. Daher wird postuliert, dass p53 synergistisch mit MSH2 für die Integrität von TNRs durch MMR und HR verantwortlich ist.

6.2 Interaktion von wtp53 mit dem humanen *mdm2*-Promotor

Sowohl die DNA-Bindungseigenschaften als auch die Transkriptionsaktivität von wtp53 gegenüber dem humanen *mdm2*-Promotor hängen entscheidend von der DNA-Konformation ab.

6.2.1 Sequenz-spezifische Bindung von wtp53 an lineare DNA

Gegenüber den isolierten *mdm2*-Bindungsstellen in linearer Konformation verhält sich wtp53 als latentes DNA-bindendes Protein (Hupp und Lane, 1994) und bindet erst nach Aktivierung durch den C-terminalen Antikörper PAb421 bzw. durch Deletion der REG. Bandshift-Analysen und Konkurrenzexperimente zeigten, dass wtp53 gegenüber der ersten p53-Bindungsstelle eine höhere Affinität aufweist als gegenüber der zweiten Bindungsstelle. Dabei zeigt der Vergleich der invarianten Basen in Position 4 und 7 der p53-Konsensus-Sequenz [RRRC₄WWG₇YYY] (el-Deiry *et al.*, 1992), dass das erste Dekamer der zweiten p53-Bindungsstelle an Position 4 eine Pyrimidin-Substitution von Cytosin nach Thymin aufweist. Der Guanin-Rest in Position 4' des Gegenstranges interagiert direkt mit dem Aminosäurerest R280 von p53 und ist für die sequenz-spezifische Bindung essenziell (Cho *et al.*, 1994; Nagaich *et al.*, 1997b, 1999; Yakovleva *et al.*, 2001). Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, dass die geringere Affinität von p53 gegenüber der zweiten Bindungsstelle auf das degenerierte Tetranukleotid-Motiv [TAAG] zurückzuführen ist (vgl. Abb. 18).

Obwohl C-terminal unmodifiziertes wtp53 in Bandshift-Analysen nicht an die isolierten p53-Bindungsstellen in linearer Konformation bindet, konnte mit Hilfe von DNase I- Protektionsexperimenten gezeigt werden, dass unmodifiziertes wtp53 in der Lage ist, die zweite p53-Bindungsstelle in linearer Konformation zu binden. Die Bindung ist sequenz-spezifisch, da flankierende Sequenzen nicht vor der Hydrolyse durch DNase I geschützt wurden. Die Beobachtung korreliert mit DNA-Bindungsstudien von p53, die zeigen konnten, dass p53 ohne C-terminale Aktivierung sowohl *in vitro* (Cain *et al.*, 2000; Espinosa und Emerson, 2001) als auch *in vivo* (Kaeser und Iggo, 2002; Espinosa *et al.*, 2003) sequenz-spezifisch mit dem *p21*-Promotor interagiert. Daher stellt sich generell die Frage, ob es sich bei wtp53 tatsächlich um ein latentes DNA-bindendes Protein handelt. Die Stimulierung der DNA-Bindung durch den C-terminalen Antikörper PAb421 in Bandshift-Analysen reflektiert nach unserer Auffassung keine „Aktivierung“, sondern ist auf den so genannten *Caging*-Effekt zurückzuführen (Carey, 1991). Dieser Effekt verursacht während der gelelektrophoretischen Trennung des DNA/Protein/Antikörper-Komplexes in Bandshift-Analysen eine Erhöhung der effektiven Konzentration der interagierenden Komponenten, die zu einer allgemeinen Reduzierung der

Dissoziation und zu einer Steigerung der Re-Assoziation führt. DNase I-Protektionsexperimente stellen hingegen eine Momentaufnahme der p53-DNA-Interaktion dar und reflektieren somit den Gleichgewichtszustand zwischen Assoziation und Dissoziation. Da relativ hohe wtp53-Konzentrationen benötigt wurden, um die p53-Bindungsstelle vor der Hydrolyse durch DNase I zu schützen, liegt die Vermutung nahe, dass die Bindung infolge einer erhöhten Dissoziationsrate instabil ist. Dabei besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen der Flexibilität der DNA und der Stabilität der sequenz-spezifischen Bindung von p53: Die Stabilität des p53-DNA-Komplexes wird durch die p53-induzierte DNA-Krümmung erhöht (Nagaich *et al.*, 1997a, 1997b; Balagurumoorthy *et al.*, 2002). Da die DNA-Flexibilität sowohl von der Sequenz als auch von der Länge der DNA abhängt (Noy *et al.*, 2004), erklärt dies die Beobachtung, dass das längere (flexible) mdm2-FL DNA-Substrat im Gegensatz zu den kurzen (rigiden) Bindungsstellen BS1-LIN und BS2-LIN effektiv von wtp53 gebunden wird.

Folgende Argumente unterstützen die Aussage, dass die sequenz-spezifische Bindung von wtp53 direkt mit der DNA-Flexibilität korreliert: (1) Durch die intrinsische Eigenschaft von p53 die DNA zu krümmen, wird zum einen die sterische Behinderung der p53-Monomere aufgehoben und zum anderen die Konformation der DNA derart verändert, dass der Aminosäurerest R280 der H2-Helix effektiver mit der entsprechenden Base interagieren kann (Nagaich *et al.*, 1997b; Yakovleva *et al.*, 2001). Daher weist die Bindung von wtp53 an Oligonukleotide mit geringer Flexibilität eine erhöhte Instabilität auf. (2) Durch Modifikation oder Deletion der REG ist der Aminosäurerest R280 von p53 in der Lage, sequenz-spezifisch an die DNA zu binden, ohne dass eine starke DNA-Krümmung induziert werden muss (Nagaich *et al.*, 1997b; Yakovleva *et al.*, 2001). Folglich ist die Bindung von p53 Δ 30 nahezu unabhängig von der Flexibilität des DNA-Substrats.

6.2.2 Sequenz-spezifische DNA-Bindung von wtp53 an strukturierte DNA

Die beiden p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors weisen interne Symmetrieelemente auf. Ein Charakteristikum von DNA-Sequenzen mit interner Symmetrie ist die Fähigkeit, DNA-Strukturen auszubilden. Daher fungiert für wtp53 bei der sequenz-spezifischen Bindung neben der DNA-Sequenz auch die DNA-Konformation als Erkennungsmotiv (Kim *et al.*, 1997; Göhler *et al.*, 2002).

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass C-terminal modifiziertes wtp53 die erste p53-Bindungsstelle in linearer Konformation mit höherer Affinität bindet als die zweite p53-

Bindungsstelle. Liegen die beiden isolierten p53-Bindungsstellen jedoch in strukturierter Konformation vor, weist wtp53 veränderte DNA-Bindungseigenschaften auf und zeigt eine deutlich höhere Affinität gegenüber der zweiten p53-Bindungsstelle. Die Analyse der DNA-Sekundärstruktur der zweiten p53-Bindungsstelle mittels MBN zeigte, dass die Substitution der invarianten Base in Position 4 des ersten Dekamers Auswirkungen auf die DNA-Struktur hat. Die Substitution hat eine (T·G)-Basenfehlpaarung zur Folge und generiert zusammen mit einer benachbarten (T·T)-Basenfehlpaarung eine Region mit erhöhtem DNA-Einzelstrangcharakter innerhalb des DNA-*Hairpin Stems*. Mit Hilfe von DNase I-Protektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass diese Region als Erkennungsmotiv fungiert und wtp53 direkt mit dem degenerierten Tetranukleotid-Motiv [TAAG] interagiert. Eine weitere Interaktion erfolgt am 3'-Ende des DNA-*Hairpin Loops*, der ebenfalls einen erhöhten DNA-Einzelstrangcharakter aufweist. Da weder durch Bandshift-Analysen noch durch DNase I-Protektionsexperimente eine Interaktion zwischen wtp53 und der ersten p53-Bindungsstelle detektiert werden konnte, und diese Bindungsstelle aufgrund des erhöhten Anteils fehlgepaarter Basen über nahezu die gesamte DNA-Sequenz einen stark erhöhten Einzelstrangcharakter aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass einzelsträngige DNA per se für die Interaktion nicht verantwortlich ist.

Dabei ergaben Bandshift-Analysen, dass die Interaktion zwischen wtp53 und der strukturierten zweiten p53-Bindungsstelle durch PAb421 nicht vollständig inhibiert wird. Zusätzlich zeigten Konkurrenzexperimente in Gegenwart des C-terminalen Antikörpers, dass die zweite p53-Bindungsstelle in strukturierter Konformation die Bindung von wtp53 an mdm2-FL effektiver kompetitiert als die gleiche Bindungsstelle in linearer Konformation. Da auch das C-terminal deletierte p53-Protein p53 Δ 30 in der Lage ist, mit der zweiten Bindungsstelle zu interagieren, kann man annehmen, dass vor allem die DBD von wtp53 für die Bindung verantwortlich ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass neben der Tetranukleotid-Sequenz [TAAG] keine weiteren Bereiche mit Basenfehlpaarungen in der DNA-*Hairpin*-Struktur auftreten, die von der REG gebunden werden könnten (Göhler *et al.*, 2002). Die Inhibierung der DNA-Bindung durch den C-terminalen Antikörper PAb421 ist somit wahrscheinlich auf eine sterische Behinderung der Bindung zurückzuführen.

Aufgrund der beschränkten Anzahl an Basen, die bei der DNA-*Hairpin*-Struktur im Gegensatz zur linearen DNA für die Interaktion mit wtp53 zur Verfügung stehen, besteht rein rechnerisch nur für zwei p53-Monomere bzw. ein p53-Dimer die Möglichkeit, an die DNA-*Hairpin*-Struktur zu binden. Untersuchungen der DNA-Bindung von wtp53 an die p53-Bindungsstelle des *p21*-Promotors in einer DNA-*Hairpin*-Konformation konnten jedoch eindeutig zeigen, dass wtp53 als

Tetramer bindet, und dass die Interaktion sowohl durch C-terminale Modifizierung als auch durch Deletion der REG inhibiert wird (Göhler *et al.*, 2002). Infolgedessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass wtp53 als Tetramer nicht mit einem, sondern mit zwei strukturierten DNA-Molekülen interagiert und einen Sandwich-ähnlichen Komplex bildet. Durch *Molecular-Modeling* konnte für das „Sandwich“- Bindungsmodell gezeigt werden, dass die C-Termini zum Zentrum und sowohl die N-Termini als auch die DBDs zur Peripherie orientiert sind (Klein *et al.*, 2001). Folglich würde die Bindung des sterisch anspruchsvollen C-terminalen Antikörpers die Interaktion zwischen zwei p53-Dimeren verhindern und dadurch die Stabilität der DNA-Bindung von tetramerem p53 reduzieren. Dieser DNA-Bindungsmechanismus konnte bei der p53-abhängigen Transaktivierung von Genen, deren Promotoren proximale und distale p53-Bindungsstellen bzw. regulatorische Elemente enthalten, durch *DNA-Looping* beobachtet werden (Stenger *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 1998).

Die Präzision und Komplexität der Transkriptions-Regulation, die für eine zelluläre Antwort infolge von DNA-Schäden benötigt wird, hängt von der kontrollierten Expression der jeweils benötigten Gene ab. Die Daten zeigen, dass alternative DNA-Konformationen es einer kurzen DNA-Sequenz erlauben, von einer Bindungsstelle mit geringer Affinität zu einer hoch-affinen Bindungsstelle zu werden. Auch wenn bisher nicht bewiesen werden konnte, dass die sequenz-spezifische Bindung von wtp53 an *DNA-Hairpins* oder *DNA-Cruciforms* die Transkriptionsaktivität *in vivo* beeinflusst, gibt es Hinweise, dass durch Bildung von *DNA-Hairpins* bzw. *DNA-Cruciforms* die Expression bestimmter Gene reguliert wird (Kaushik *et al.*, 2003). So konnte gezeigt werden, dass CREB (*cAMP response element binding protein*) die Transaktivierung des Enkephalin-Gens durch Bindung an ein Enhancer-Element in Abhängigkeit der DNA-Struktur beeinflusst (Spiro *et al.*, 1997).

6.2.3 Einfluss der DNA-Konformation des humanen *mdm2*-Promotors auf die wtp53-abhängige Transkription

Aus thermodynamischer Sicht ist der Übergang von B-DNA in non-B-DNA und damit die Bildung von DNA-Sekundärstrukturen energetisch ungünstig und tritt daher lediglich während zellulärer Prozesse auf, die eine DNA-Strangseparierung zur Folge haben.

Mit Hilfe von Luziferase-Reporter-Aktivitätstests konnte gezeigt werden, dass die beiden p53-Bindungsstellen des humanen *mdm2*-Promotors die wtp53-abhängige Transkription unterschiedlich beeinflussen. Dabei führt die Deletion der zweiten Bindungsstelle zu einer

Inhibierung, wohingegen die Deletion der ersten Bindungsstelle die Aktivierung des Reporters zur Folge hat. Zusammen mit den *in vitro* Resultaten kann davon ausgegangen werden, dass die erste p53-Bindungsstelle in strukturierter Konformation die wtp53-abhängige Transkription negativ beeinflusst. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass durch Relaxierung der transfizierten Plasmid-DNA die Transkription verstärkt wird. Da durch die Torsionsspannung negativ superspiralierter Plasmid-DNA innerhalb des humanen *mdm2*-Promotors DNA-Strukturen ausgebildet werden, liegen beide Bindungsstellen nach Relaxierung unstrukturiert als B-DNA vor (Kim *et al.*, 1999), und folglich verliert die erste Bindungsstelle ihren inhibitorischen Einfluss auf die wtp53-abhängige Transkription.

Die Regulation der DNA-Topologie des humanen *mdm2*-Promotors stellt somit einen wichtigen Kontrollmechanismus für die p53-abhängige Expression von MDM2 und damit für die autoregulatorische Rückkopplungsschleife dar.

6.3 Komplexität der p53-DNA-Interaktion

Die im Rahmen dieser Arbeit sowohl für die sequenz-spezifische als auch für die nicht-sequenz-spezifische DNA-Bindung erzielten Resultate vermitteln einen Überblick über die Komplexität der DNA-Bindungseigenschaften von p53. Allgemein kann festgehalten werden, dass die DBD von p53 sowohl sequenz-spezifisch als auch nicht-sequenz-spezifisch mit DNA interagiert und die REG die Bindung reguliert. Die DNA-Bindungsmodelle beschreiben zwar die sequenz-spezifische Interaktion von p53 mit der Konsensus-Sequenz (s. 1.2.3), berücksichtigen jedoch nicht die hohe DNA-Substratvariabilität der nicht-sequenz-spezifischen Bindung.

Die DNA im Chromatin-Kontext der Zelle liegt nicht als lineares Molekül vor, sondern kann infolge strikt kontrollierter Veränderung der Chromatin-Struktur durch regulatorische Prozesse eine Vielzahl von unterschiedlichen Konformationen annehmen. Daher wird postuliert, dass die Interaktion zwischen p53 und DNA nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ erfolgt. Danach ergibt sich die Spezifität von p53 (Schlüssel) für sein DNA-Substrat (Schloss) aus der geometrischen und physikalischen Komplementarität beider Interaktionspartner. Dabei kann die DNA in Übereinstimmung mit der Schlüssel-Schloss-Hypothese in Abwesenheit von p53 bereits vorgeformt vorliegen oder sich nach der Hypothese der induzierten Anpassung (*induced fit*) erst ausbilden, wenn p53 an das DNA-Substrat bindet. Die nicht-sequenz-spezifische Bindung erfolgt durch Wechselwirkungen zwischen der DBD von p53 und dem Phosphat-Zucker-Rückgrat der

DNA, die sequenz-spezifische Bindung zusätzlich durch die Interaktion der DBD mit spezifischen Basen der DNA.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die nicht-sequenz-spezifischen DNA-Bindungseigenschaften des Tumorsuppressor-Proteins p53 zu charakterisieren und den Einfluss von strukturierter DNA auf die wtp53-abhängige Transkription zu untersuchen. Als Modellsubstrate für die nicht-sequenz-spezifischen DNA-Bindung dienten *Trinucleotide Repeats* (TNRs). TNRs entsprechen nicht der p53-Konsensus-Sequenz und sind aufgrund der quasi-palindromen repetitiven DNA-Sequenz in der Lage, durch intramolekulare Basenpaarung DNA-*Hairpins* mit fehlgepaarten Nukleotiden auszubilden.

Zunächst wurden die nicht-sequenz-spezifischen DNA-Bindungseigenschaften von wt und mutp53 gegenüber TNRs in Abhängigkeit von der DNA-Konformation *in vitro* mit Hilfe von Bandshift-Analysen bestimmt und der Einfluss des C-Terminus auf die Interaktion ermittelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die nicht-sequenz-spezifische DNA-Bindung sowohl von der DNA-Konformation als auch von der Konformation der DNA-Bindungsdomäne von p53 abhängt, und die Bindung durch den C-Terminus reguliert wird. Die Charakterisierung der TNR-Sekundärstrukturen und DNase I-Protektionsexperimente mit wtp53 und der DNA-Kontaktmutante R273H ergaben, dass einzelsträngige DNA-Bereiche wichtige Erkennungsmotive für die Bindung darstellen. Darüber hinaus konnte die Bindung von wtp53 und mutp53 R273H an TNRs *in vivo* durch Chromatin-Immunpräzipitation bestätigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Abhängigkeit der wtp53-vermittelten Transkription des *mdm2*-Promotors von der DNA-Konformation *in vivo* untersucht. Dazu wurden TNRs in den Kontext des wtp53-spezifischen humanen *mdm2*-Promotors (P2) kloniert und der Einfluss von TNRs auf die Promotoraktivität analysiert. Da der humane *mdm2*-Promotor in Abhängigkeit der DNA-Topologie reguliert wird, wurden zunächst die sequenz-spezifischen DNA-Bindungseigenschaften von wtp53 gegenüber den beiden p53-Bindungsstellen mittels Bandshift-Analysen und DNase I-Protektionsexperimente *in vitro* charakterisiert. Dabei weist wtp53 gegenüber den beiden Bindungsstellen in linearer bzw. strukturierter DNA-Konformation unterschiedliche Bindungsaffinitäten auf. *In vivo* moduliert die erste Bindungsstelle in Abhängigkeit der DNA-Topologie die Transaktivierung des Promotors. Schließlich konnte durch Kompetitionsexperimente und 2D-Agarosegelelektrophorese gezeigt werden, dass TNRs spezifisch die wtp53-abhängige Transkription durch die Ausbildung von DNA-Strukturen *in vivo* beeinflussen.

8. SUMMARY

The aim of the thesis was to characterize the non-sequence-specific DNA-binding properties of the tumor suppressor protein p53 and to determine the influence of structured DNA on wtp53-mediated transcription. Trinucleotide repeats (TNRs) served as model-substrates to study non-sequence-specific DNA-binding, because they do not match the p53-consensus-sequence, and because their quasi-palindrome repetitive DNA-sequence enables them to form DNA-hairpins through intramolecular base pairing with mismatched nucleotides.

In a first step I determined the non-sequence-specific DNA-binding properties of wt and mutp53 with TNRs depending on the DNA-structure *in vitro* by EMSA, and the influence of the C-terminus on this interaction. I could show that non-sequence-specific DNA-binding depends on DNA-conformation as well as on conformation of the DNA-binding domain of p53, and that the binding is regulated by the C-terminus. Characterization of the secondary structure of TNRs and DNase I footprinting with wtp53 and the DNA-contact mutant R273H revealed that single-stranded DNA regions represent important targets for the binding. Binding of wtp53 and mutp53 R273H to TNRs was also confirmed by chromatin-immunoprecipitation *in vivo*.

In a second step the impact of DNA-conformation on wtp53-mediated transcription of the *mdm2*-promoter was analyzed *in vivo*. Therefore TNRs were cloned within the context of the wtp53-specific human *mdm2*-promoter (P2), and the influence of TNRs on the activity of the promoter was determined. Because regulation of the human *mdm2*-promoter depends on DNA-topology, I first characterized the sequence-specific DNA-binding properties of wtp53 to the two p53-binding-sites within this promoter by EMSA and DNase I footprinting *in vitro*. Wtp53 exhibited different affinities to the binding-sites in linear and structured conformation. *In vivo*, the first binding-site modulates transactivation of the promoter by DNA-topology. Finally I could show by competition experiments and 2D-agarose gel electrophoresis that TNRs influence the wtp53-mediated transcription by forming DNA-structures *in vivo*.

9. LITERATUR

Akyuz N, Boehden GS, Susse S, Rimek A, Preuss U, Scheidtmann KH and Wiesmuller L (2002). DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **22**, 6306-17.

Alani E, Lee S, Kane MF, Griffith J and Kolodner RD (1997). *Saccharomyces cerevisiae* MSH2, a mismatched base recognition protein, also recognizes Holliday junctions in DNA. *J Mol Biol* **265**, 289-301.

Albertoni M, Shaw PH, Nozaki M, Godard S, Tenan M, Hamou MF, Fairlie DW, Breit SN, Paralkar VM, de Tribolet N, Van Meir EG and Hegi ME (2002). Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene* **21**, 4212-9.

Albor A, Kaku S and Kulesz-Martin M (1998). Wild-type and mutant forms of p53 activate human topoisomerase I: a possible mechanism for gain of function in mutants. *Cancer Res* **58**, 2091-4.

Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmuller L and Deppert W (1999). Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* **18**, 7706-17. (Review)

Anderson ME, Woelker B, Reed M, Wang P and Tegtmeyer P (1997). Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation. *Mol Cell Biol* **17**, 6255-64.

Appella E and Anderson CW (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* **268**, 2764-72. (Review)

Aurelio ON, Kong XT, Gupta S and Stanbridge EJ (2000). p53 mutants have selective dominant-negative effects on apoptosis but not growth arrest in human cancer cell lines. *Mol Cell Biol* **20**, 770-8.

Ayed A, Mulder FA, Yi GS, Lu Y, Kay LE and Arrowsmith CH (2001). Latent and active p53 are identical in conformation. *Nat Struct Biol* **8**, 756-60.

Bacolla A, Gellibolian R, Shimizu M, Amirhaeri S, Kang S, Ohshima K, Larson JE, Harvey SC, Stollar BD and Wells RD (1997). Flexible DNA: genetically unstable (CTG)ⁿ(CAG)ⁿ and (CGG)ⁿ(CCG)ⁿ from human hereditary neuromuscular disease genes. *J Biol Chem* **272**, 16783-92.

Bakalkin G, Selivanova G, Yakovleva T, Kiseleva E, Kashuba E, Magnusson KP, Szekely L, Klein G, Terenius L and Wiman KG (1995). p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res* **23**, 362-9.

Bakalkin G, Yakovleva T, Selivanova G, Magnusson KP, Szekely L, Kiseleva E, Klein G, Terenius L and Wiman KG (1994). p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 413-7.

Balagurumoorthy P, Lindsay SM and Harrington RE (2002). Atomic force microscopy reveals kinks in the p53 response element DNA. *Biophys Chem* **101-102**, 611-23.

Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C and Dubiel W (2001). COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J* **20**, 1630-9.

Bessard AC, Garay E, Lacronique V, Legros Y, Demarquay C, Houque A, Portefaix JM, Granier C and Soussi T (1998). Regulation of the specific DNA binding activity of *Xenopus laevis* p53: evidence for conserved regulation through the carboxy-terminus of the protein. *Oncogene* **16**, 883-90.

Bewley CA, Gronenborn AM and Clore GM (1998). Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**, 105-31. (Review)

- Blandino G, Levine AJ and Oren M** (1999). Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene* **18**, 477-85.
- Boehden GS, Akyuz N, Roemer K and Wiesmuller L** (2003). p53 mutated in the transactivation domain retains regulatory functions in homology-directed double-strand break repair. *Oncogene* **22**, 4111-7.
- Bowater R, Aboul-Ela F and Lilley DM** (1992). Two-dimensional gel electrophoresis of circular DNA topoisomers. *Methods Enzymol* **212**, 105-20.
- Bowater RP, Rosche WA, Jaworski A, Sinden RR and Wells RD** (1996). Relationship between Escherichia coli growth and deletions of CTG.CAG triplet repeats in plasmids. *J Mol Biol* **264**, 82-96.
- Braastad CD, Han Z and Hendrickson EA** (2003). Constitutive DNase I hypersensitivity of p53-regulated promoters. *J Biol Chem* **278**, 8261-8.
- Buchhop S, Gibson MK, Wang XW, Wagner P, Sturzbecher HW and Harris CC** (1997). Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Res* **25**, 3868-74.
- Bullock AN, Henckel J and Fersht AR** (2000). Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene* **19**, 1245-56.
- Butler JS and Loh SN** (2003). Structure, function, and aggregation of the zinc-free form of the p53 DNA binding domain. *Biochemistry* **42**, 2396-403.
- Cain C, Miller S, Ahn J and Prives C** (2000). The N terminus of p53 regulates its dissociation from DNA. *J Biol Chem* **275**, 39944-53.
- Campomenosi P, Monti P, Aprile A, Abbondandolo A, Frebourg T, Gold B, Crook T, Inga A, Resnick MA, Iggo R and Fronza G** (2001). p53 mutants can often transactivate promoters containing a p21 but not Bax or PIG3 responsive elements. *Oncogene* **20**, 3573-9.
- Cao Y, Gao Q, Wazer DE and Band V** (1997). Abrogation of wild-type p53-mediated transactivation is insufficient for mutant p53-induced immortalization of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **57**, 5584-9.
- Carey J** (1991). Gel retardation. *Methods Enzymol* **208**, 103-17.
- Cehab NH, Malikzay A, Stavridi ES and Halazonetis TD** (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13777-82.
- Chen D, Li M, Luo J and Gu W** (2003). Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J Biol Chem* **278**, 13595-8.
- Chene P** (1998). In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. *J Mol Biol* **281**, 205-9.
- Chene P and Bechter E** (1999). p53 mutants without a functional tetramerisation domain are not oncogenic. *J Mol Biol* **286**, 1269-74.
- Chernov MV, Bean LJ, Lerner N and Stark GR** (2001). Regulation of ubiquitination and degradation of p53 in unstressed cells through C-terminal phosphorylation. *J Biol Chem* **276**, 31819-24.
- Chin KV, Ueda K, Pastan I and Gottesman MM** (1992). Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* **255**, 459-62.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD and Pavletich NP** (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**, 346-55.
- Cleary JD and Pearson CE** (2003). The contribution of cis-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence. *Cytogenet Genome Res* **100**, 25-55. (Review)

- Clore GM, Ernst J, Clubb R, Omichinski JG, Kennedy WM, Sakaguchi K, Appella E and Gronenborn AM** (1995). Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53. *Nat Struct Biol* **2**, 321-33.
- Dang CV and Lee WM** (1989). Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. *J Biol Chem* **264**, 18019-23.
- Dawson R, Muller L, Dehner A, Klein C, Kessler H and Buchner J** (2003). The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J Mol Biol* **332**, 1131-41.
- de Vries A, Flores ER, Miranda B, Hsieh HM, van Oostrom CT, Sage J and Jacks T** (2002). Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 2948-53.
- Degtyareva N, Subramanian D and Griffith JD** (2001). Analysis of the binding of p53 to DNAs containing mismatched and bulged bases. *J Biol Chem* **276**, 8778-84.
- Deppert W** (1996). Binding of MAR-DNA elements by mutant p53: possible implications for its oncogenic functions. *J Cell Biochem* **62**, 172-80. (Review)
- Deppert W, Gohler T, Koga H and Kim E** (2000). Mutant p53: "gain of function" through perturbation of nuclear structure and function? *J Cell Biochem Suppl* **35**, 115-22. (Review)
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C and Levine AJ** (1993). Gain of function mutations in p53. *Nat Genet* **4**, 42-6.
- Dornan D, Shimizu H, Burch L, Smith AJ and Hupp TR** (2003). The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol* **23**, 8846-61.
- Dudenhoffer C, Kurth M, Janus F, Deppert W and Wiesmuller L** (1999). Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of P53. *Oncogene* **18**, 5773-84.
- el-Deiry WS** (1998). p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol* **227**, 121-37. (Review)
- el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW and Vogelstein B** (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**, 45-9.
- El-Hizawi S, Lagowski JP, Kulesz-Martin M and Albor A** (2002). Induction of gene amplification as a gain-of-function phenotype of mutant p53 proteins. *Cancer Res* **62**, 3264-70.
- Espinosa JM and Emerson BM** (2001). Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* **8**, 57-69.
- Espinosa JM, Verdun RE and Emerson BM** (2003). p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell* **12**, 1015-27.
- Evans E and Alani E** (2000). Roles for mismatch repair factors in regulating genetic recombination. *Mol Cell Biol* **20**, 7839-44. (Review)
- Ey PL, Prowse SJ and Jenkin CR** (1978). Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* **15**, 429-36.
- Fields S and Jang SK** (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* **249**, 1046-9.
- Finlay CA, Hinds PW and Levine AJ** (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083-93.

- Fishel R, Ewel A and Lescoe MK** (1994). Purified human MSH2 protein binds to DNA containing mismatched nucleotides. *Cancer Res* **54**, 5539-42.
- Frazier MW, He X, Wang J, Gu Z, Cleveland JL and Zambetti GP** (1998). Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Mol Cell Biol* **18**, 3735-43.
- Fridman JS and Lowe SW** (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030-40. (Review)
- Friedlander P, Haupt Y, Prives C and Oren M** (1996). A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol* **16**, 4961-71.
- Friedman PN, Chen X, Bargonetti J and Prives C** (1993). The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 3319-23. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 5878.
- Galas DJ and Schmitz A** (1978). DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* **5**, 3157-70.
- Gaudreault I, Guay D and Lebel M** (2004). YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins. *Nucleic Acids Res* **32**, 316-27.
- Gobert C, Skladanowski A and Larsen AK** (1999). The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 10355-60.
- Gohler T, Jager S, Warnecke G, Kim E and Deppert W** (2004). Mutant p53 proteins bind DNA in a DNA structure selective mode. submitted
- Gohler T, Reimann M, Cherny D, Walter K, Warnecke G, Kim E and Deppert W** (2002). Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain. *J Biol Chem* **277**, 41192-203.
- Gualberto A, Aldape K, Kozakiewicz K and Tlsty TD** (1998). An oncogenic form of p53 confers a dominant, gain-of-function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5166-71.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z and Haupt Y** (2003). Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* **116**, 4077-85. (Review)
- Hochschild A** (1991). Detecting cooperative protein-DNA interactions and DNA loop formation by footprinting. *Methods Enzymol* **208**, 343-61.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B and Harris CC** (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53. (Review)
- Hupp TR and Lane DP** (1994). Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol* **4**, 865-75.
- Hupp TR, Meek DW, Midgley CA and Lane DP** (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* **71**, 875-86.
- Hwang BJ, Ford JM, Hanawalt PC and Chu G** (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 424-8.
- Imamura T, Izumi H, Nagatani G, Ise T, Nomoto M, Iwamoto Y and Kohno K** (2001). Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein. *J Biol Chem* **276**, 7534-40.
- Inga A, Storici F, Darden TA and Resnick MA** (2002). Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol Cell Biol* **22**, 8612-25.
- Iwamoto KS, Mizuno T, Ito T, Tsuyama N, Kyoizumi S and Seyama T** (1996). Gain-of-function p53 mutations enhance alteration of the T-cell receptor following X-irradiation, independently of the cell cycle and cell survival. *Cancer Res* **56**, 3862-5.

- Jackson MW and Berberich SJ** (2000). MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **20**, 1001-7.
- Jackson P, Mastrangelo I, Reed M, Tegtmeyer P, Yardley G and Barrett J** (1998). Synergistic transcriptional activation of the MCK promoter by p53: tetramers link separated DNA response elements by DNA looping. *Oncogene* **16**, 283-92.
- Janus F, Albrechtsen N, Dornreiter I, Wiesmuller L, Grosse F and Deppert W** (1999a). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* **55**, 12-27. (Review)
- Janus F, Albrechtsen N, Knippschild U, Wiesmuller L, Grosse F and Deppert W** (1999b). Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* **19**, 2155-68.
- Jayaraman J and Prives C** (1995). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus. *Cell* **81**, 1021-9.
- Jayaraman L, Moorthy NC, Murthy KG, Manley JL, Bustin M and Prives C** (1998). High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Genes Dev* **12**, 462-72.
- Jeffrey PD, Gorina S and Pavletich NP** (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* **267**, 1498-502.
- Johnson RA, Ince TA and Scotto KW** (2001). Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element. *J Biol Chem* **276**, 27716-20.
- Kaesler MD and Iggo RD** (2002). Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 95-100.
- Kaesler MD and Iggo RD** (2004). Promoter-specific p53-dependent histone acetylation following DNA damage. *Oncogene* **23**, 4007-13.
- Kaushik M, Kukreti R, Grover D, Brahmachari SK and Kukreti S** (2003). Hairpin-duplex equilibrium reflected in the A --> B transition in an undecamer quasi-palindrome present in the locus control region of the human beta-globin gene cluster. *Nucleic Acids Res* **31**, 6904-15.
- Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C and Vogelstein B** (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* **252**, 1708-11.
- Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marme D and Kolch W** (1994). Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* **9**, 963-9.
- Kim E and Deppert W** (2003). The complex interactions of p53 with target DNA: we learn as we go. *Biochem Cell Biol* **81**, 141-50. (Review)
- Kim E, Albrechtsen N and Deppert W** (1997). DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene* **15**, 857-69.
- Kim E, Rohaly G, Heinrichs S, Gimmopoulos D, Meissner H and Deppert W** (1999). Influence of promoter DNA topology on sequence-specific DNA binding and transactivation by tumor suppressor p53. *Oncogene* **18**, 7310-8.
- Kinoshita M, Osanai R, Kikkawa M, Adachi A, Ohtake T, Komori T, Hashimoto K, Itoyama S, Mitarai T and Hirose K** (2002). A patient with myotonic dystrophy type 1 (DM 1) accompanied by laryngeal and renal cell carcinomas had a small CTG triplet repeat expansion but no somatic instability in normal tissues. *Intern Med* **41**, 312-8.
- Klein C, Planker E, Diercks T, Kessler H, Kunkele KP, Lang K, Hansen S and Schwaiger M** (2001). NMR spectroscopy reveals the solution dimerization interface of p53 core domains bound to their consensus DNA. *J Biol Chem* **276**, 49020-7.

- Koga H and Deppert W** (2000). Identification of genomic DNA sequences bound by mutant p53 protein (Gly245 --> Ser) in vivo. *Oncogene* **19**, 4178-83.
- Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, Ashizuka M and Kuwano M** (2003). The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* **25**, 691-8. (Review)
- Kohwi-Shigematsu T and Kohwi Y** (1992). Detection of non-B-DNA structures at specific sites in supercoiled plasmid DNA and chromatin with haloacetaldehyde and diethyl pyrocarbonate. *Methods Enzymol* **212**, 155-80.
- Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ and Pavletich NP** (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**, 948-53.
- Kyogoku Y, Kojima C, Lee SJ, Tochio H, Suzuki N, Matsuo H and Shirakawa M** (1995). Induced structural changes in protein-DNA complexes. *Methods Enzymol* **261**, 524-41.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lane DP** (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-6.
- Lane DP and Crawford LV** (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-3.
- Lanyi A, Deb D, Seymour RC, Ludes-Meyers JH, Subler MA and Deb S** (1998). 'Gain of function' phenotype of tumor-derived mutant p53 requires the oligomerization/nonsequence-specific nucleic acid-binding domain. *Oncogene* **16**, 3169-76.
- Lee D, Kim JW, Seo T, Hwang SG, Choi EJ and Choe J** (2002). SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J Biol Chem* **277**, 22330-7.
- Lee H, Mok KH, Muhandiram R, Park KH, Suk JE, Kim DH, Chang J, Sung YC, Choi KY and Han KH** (2000). Local structural elements in the mostly unstructured transcriptional activation domain of human p53. *J Biol Chem* **275**, 29426-32.
- Lee S, Cavallo L and Griffith J** (1997). Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage. *J Biol Chem* **272**, 7532-9.
- Lee S, Elenbaas B, Levine A and Griffith J** (1995). p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* **81**, 1013-20.
- Lee YI, Lee S, Das GC, Park US, Park SM and Lee YI** (2000). Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **19**, 3717-26.
- Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R and Gu W** (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* **302**, 1972-5.
- Lin J, Teresky AK and Levine AJ** (1995). Two critical hydrophobic amino acids in the N-terminal domain of the p53 protein are required for the gain of function phenotypes of human p53 mutants. *Oncogene* **10**, 2387-90.
- Linke SP, Sengupta S, Khabie N, Jeffries BA, Buchhop S, Miska S, Henning W, Pedoux R, Wang XW, Hofseth LJ, Yang Q, Garfield SH, Sturzbecher HW and Harris CC** (2003). p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res* **63**, 2596-605.
- Linzer DI and Levine AJ** (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43-52.
- Liu G, McDonnell TJ, Montes de Oca Luna R, Kapoor M, Mims B, El-Naggar AK and Lozano G** (2000). High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 4174-9.

- Lu H and Levine AJ** (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 5154-8.
- Ludes-Meyers JH, Subler MA, Shivakumar CV, Munoz RM, Jiang P, Bigger JE, Brown DR, Deb SP and Deb S** (1996). Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol Cell Biol* **16**, 6009-19.
- Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG and Gu W** (2004). Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 2259-64.
- Maki CG** (1999). Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *J Biol Chem* **274**, 16531-5.
- Manley K, Pugh J and Messer A** (1999). Instability of the CAG repeat in immortalized fibroblast cell cultures from Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res* **835**, 74-9.
- Marathias VM, Jerkovic B and Bolton PH** (1999). Damage increases the flexibility of duplex DNA. *Nucleic Acids Res* **27**, 1854-8.
- Mariappan SV, Garcoa AE and Gupta G** (1996). Structure and dynamics of the DNA hairpins formed by tandemly repeated CTG triplets associated with myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* **24**, 775-83.
- Marsischky GT, Lee S, Griffith J and Kolodner RD** (1999). Saccharomyces cerevisiae MSH2/6 complex interacts with Holliday junctions and facilitates their cleavage by phage resolution enzymes. *J Biol Chem* **274**, 7200-6.
- Martin AC, Facchiano AM, Cuff AL, Hernandez-Boussard T, Olivier M, Hainaut P and Thornton JM** (2002). Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Hum Mutat* **19**, 149-64.
- Maxam AM and Gilbert W** (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 560-4.
- May P and May E** (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621-36. (Review)
- McKinney K and Prives C** (2002). Efficient specific DNA binding by p53 requires both its central and C-terminal domains as revealed by studies with high-mobility group 1 protein. *Mol Cell Biol* **22**, 6797-808.
- McLure KG and Lee PW** (1998). How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J* **17**, 3342-50.
- McLure KG and Lee PW** (1999). p53 DNA binding can be modulated by factors that alter the conformational equilibrium. *EMBO J* **18**, 763-70.
- Meek DW and Knippschild U** (2003). Posttranslational modification of MDM2. *Mol Cancer Res* **1**, 1017-26. (Review)
- Mertens PR, Steinmann K, Alfonso-Jaume MA, En-Nia A, Sun Y and Lovett DH** (2002). Combinatorial interactions of p53, activating protein-2, and YB-1 with a single enhancer element regulate gelatinase A expression in neoplastic cells. *J Biol Chem* **277**, 24875-82.
- Milner J and Medcalf EA** (1991). Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* **65**, 765-74.
- Milner J, Medcalf EA and Cook AC** (1991). Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol* **11**, 12-9.
- Milyavsky M, Mimran A, Senderovich S, Zurer I, Erez N, Shats I, Goldfinger N, Cohen I and Rotter V** (2001). Activation of p53 protein by telomeric (TTAGGG)_n repeats. *Nucleic Acids Res* **29**, 5207-15.
- Mitas M, Yu A, Dill J, Kamp TJ, Chambers EJ and Haworth IS** (1995). Hairpin properties of single-stranded DNA containing a GC-rich triplet repeat: (CTG)₁₅. *Nucleic Acids Res* **23**, 1050-9.

- Monti P, Campomenosi P, Ciribilli Y, Iannone R, Inga A, Abbondandolo A, Resnick MA and Fronza G** (2002). Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53. *Oncogene* **21**, 1641-8.
- Muller BF, Paulsen D and Deppert W** (1996). Specific binding of MAR/SAR DNA-elements by mutant p53. *Oncogene* **12**, 1941-52.
- Mummenbrauer T, Janus F, Muller B, Wiesmuller L, Deppert W and Grosse F** (1996). p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* **85**, 1089-99.
- Murphy KL, Dennis AP and Rosen JM** (2000). A gain of function p53 mutant promotes both genomic instability and cell survival in a novel p53-null mammary epithelial cell model. *FASEB J* **14**, 2291-302.
- Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ and George DL** (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* **13**, 2490-501.
- Nagaich AK, Appella E and Harrington RE** (1997a). DNA bending is essential for the site-specific recognition of DNA response elements by the DNA binding domain of the tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem* **272**, 14842-9.
- Nagaich AK, Zhurkin VB, Durell SR, Jernigan RL, Appella E and Harrington RE** (1999). p53-induced DNA bending and twisting: p53 tetramer binds on the outer side of a DNA loop and increases DNA twisting. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 1875-80.
- Nagaich AK, Zhurkin VB, Sakamoto H, Gorin AA, Clore GM, Gronenborn AM, Appella E and Harrington RE** (1997b). Architectural accommodation in the complex of four p53 DNA binding domain peptides with the p21/waf1/cip1 DNA response element. *J Biol Chem* **272**, 14830-41.
- Nagata T, Gupta V, Sorce D, Kim WY, Sali A, Chait BT, Shigesada K, Ito Y and Werner MH** (1999). Immunoglobulin motif DNA recognition and heterodimerization of the PEBP2/CBF Runt domain. *Nat Struct Biol* **6**, 615-9.
- Nakamura S, Roth JA and Mukhopadhyay T** (2000). Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol Cell Biol* **20**, 9391-8.
- Nicholls CD, McLure KG, Shields MA and Lee PW** (2002). Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect. *J Biol Chem* **277**, 12937-45.
- Nishikawa J, Amano M, Fukue Y, Tanaka S, Kishi H, Hirota Y, Yoda K and Ohyama T** (2003). Left-handedly curved DNA regulates accessibility to cis-DNA elements in chromatin. *Nucleic Acids Res* **31**, 6651-62.
- Noy A, Perez A, Lankas F, Javier Luque F and Orozco M** (2004). Relative flexibility of DNA and RNA: a molecular dynamics study. *J Mol Biol* **343**, 627-38.
- Okamoto T, Izumi H, Imamura T, Takano H, Ise T, Uchiumi T, Kuwano M and Kohno K** (2000). Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* **19**, 6194-202.
- Ori A, Zauberman A, Doitsh G, Paran N, Oren M and Shaul Y** (1998). p53 binds and represses the HBV enhancer: an adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53. *EMBO J* **17**, 544-53.
- Orlando V, Strutt H and Paro R** (1997). Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**, 205-14.
- Oussatcheva EA, Pavlicek J, Sankey OF, Sinden RR, Lyubchenko YL and Potaman VN** (2004). Influence of global DNA topology on cruciform formation in supercoiled DNA. *J Mol Biol* **338**, 735-43.
- Palecek E** (1992). Probing DNA structure with osmium tetroxide complexes in vitro. *Methods Enzymol* **212**, 139-55.

- Palecek E, Brazda V, Jagelska E, Pecinka P, Karlovska L and Brazdova M** (2004). Enhancement of p53 sequence-specific binding by DNA supercoiling. *Oncogene* **23**, 2119-27.
- Palecek E, Brazdova M, Brazda V, Palecek J, Billova S, Subramaniam V and Jovin TM** (2001). Binding of p53 and its core domain to supercoiled DNA. *Eur J Biochem* **268**, 573-81.
- Palecek E, Vlk D, Stankova V, Brazda V, Vojtesek B, Hupp TR, Schaper A and Jovin TM** (1997). Tumor suppressor protein p53 binds preferentially to supercoiled DNA. *Oncogene* **15**, 2201-9.
- Pavletich NP, Chambers KA and Pabo CO** (1993). The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* **7**, 2556-64.
- Pearson CE, Ewel A, Acharya S, Fishel RA and Sinden RR** (1997). Human MSH2 binds to trinucleotide repeat DNA structures associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* **6**, 1117-23.
- Pearson CE, Tam M, Wang YH, Montgomery SE, Dar AC, Cleary JD and Nichol K** (2002). Slipped-strand DNAs formed by long (CAG)ⁿ(CTG)^m repeats: slipped-out repeats and slip-out junctions. *Nucleic Acids Res* **30**, 4534-47.
- Pugacheva EN, Ivanov AV, Kravchenko JE, Kopnin BP, Levine AJ and Chumakov PM** (2002). Novel gain of function activity of p53 mutants: activation of the dUTPase gene expression leading to resistance to 5-fluorouracil. *Oncogene* **21**, 4595-600.
- Qian H, Wang T, Naumovski L, Lopez CD and Brachmann RK** (2002). Groups of p53 target genes involved in specific p53 downstream effects cluster into different classes of DNA binding sites. *Oncogene* **21**, 7901-11.
- Raj K, Ogston P and Beard P** (2001). Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. *Nature* **412**, 914-7. Erratum in: *Nature* 2002 Mar 14;416(6877):202.
- Reed M, Woelker B, Wang P, Wang Y, Anderson ME and Tegtmeier P** (1995). The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 9455-9.
- Resnick MA and Inga A** (2003). Functional mutants of the sequence-specific transcription factor p53 and implications for master genes of diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 9934-9.
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Lane DP and Hay RT** (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **20**, 8458-67.
- Roemer K** (1999). Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem* **380**, 879-87. (Review)
- Rowan S, Ludwig RL, Haupt Y, Bates S, Lu X, Oren M and Vousden KH** (1996). Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO J* **15**, 827-38.
- Rubbi CP and Milner J** (2003). p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* **22**, 975-86.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sakamuro D, Sabbatini P, White E and Prendergast GC** (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* **15**, 887-98.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampath J, Sun D, Kidd VJ, Grenet J, Gandhi A, Shapiro LH, Wang Q, Zambetti GP and Schuetz JD** (2001). Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *J Biol Chem* **276**, 39359-67.

- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-7.
- Savouret C, Brisson E, Essers J, Kanaar R, Pastink A, te Riele H, Junien C and Gourdon G** (2003). CTG repeat instability and size variation timing in DNA repair-deficient mice. *EMBO J* **22**, 2264-73.
- Scian MJ, Stagliano KE, Deb D, Ellis MA, Carchman EH, Das A, Valerie K, Deb SP and Deb S** (2004). Tumor-derived p53 mutants induce oncogenesis by transactivating growth-promoting genes. *Oncogene* **23**, 4430-43.
- Selivanova G, Iotsova V, Kiseleva E, Strom M, Bakalkin G, Grafstrom RC and Wiman KG** (1996). The single-stranded DNA end binding site of p53 coincides with the C-terminal regulatory region. *Nucleic Acids Res* **24**, 3560-7.
- Seto E, Usheva A, Zambetti GP, Momand J, Horikoshi N, Weinmann R, Levine AJ and Shenk T** (1992). Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 12028-32.
- Sharp DA, Kratowicz SA, Sank MJ and George DL** (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J Biol Chem* **274**, 38189-96.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A and Rotter V** (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **10**, 6565-77.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y and Prives C** (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**, 325-34.
- Shivakumar CV, Brown DR, Deb S and Deb SP** (1995). Wild-type human p53 transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *Mol Cell Biol* **15**, 6785-93.
- Shmueli A and Oren M** (2004). Regulation of p53 by Mdm2: fate is in the numbers. *Mol Cell* **13**, 4-5.
- Sieber OM, Heinemann K and Tomlinson IP** (2003). Genomic instability - the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer* **3**, 701-8. (Review)
- Soussi T and Beroud C** (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **1**, 233-40. (Review)
- Soussi T and May P** (1996). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol* **260**, 623-37. (Review)
- Spiro C and McMurray CT** (1997). Switching of DNA secondary structure in proenkephalin transcriptional regulation. *J Biol Chem* **272**, 33145-52.
- Stansel RM, Subramanian D and Griffith JD** (2002). p53 binds telomeric single strand overhangs and t-loop junctions in vitro. *J Biol Chem* **277**, 11625-8.
- Stein GS, Zaidi SK, Braastad CD, Montecino M, van Wijnen AJ, Choi JY, Stein JL, Lian JB and Javed A** (2003). Functional architecture of the nucleus: organizing the regulatory machinery for gene expression, replication and repair. *Trends Cell Biol* **13**, 584-92. (Review)
- Stenger JE, Tegtmeyer P, Mayr GA, Reed M, Wang Y, Wang P, Hough PV and Mastrangelo IA** (1994). p53 oligomerization and DNA looping are linked with transcriptional activation. *EMBO J* **13**, 6011-20.
- Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ and Wahl GM** (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* **18**, 1660-72.
- Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH and Peters G** (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* **17**, 5001-14.

- Stros M, Muselikova-Polanska E, Pospisilova S and Strauss F** (2004). High-affinity binding of tumor-suppressor protein p53 and HMGB1 to hemicatenated DNA loops. *Biochemistry* **43**, 7215-25.
- Subramanian D and Griffith JD** (2002). Interactions between p53, hMSH2-hMSH6 and HMG I(Y) on Holliday junctions and bulged bases. *Nucleic Acids Res* **30**, 2427-34.
- Swamynathan SK, Nambiar A and Guntaka RV** (1998). Role of single-stranded DNA regions and Y-box proteins in transcriptional regulation of viral and cellular genes. *FASEB J* **12**, 515-22. (Review)
- Szak ST and Pietenpol JA** (1999). High affinity insertion/deletion lesion binding by p53. Evidence for a role of the p53 central domain. *J Biol Chem* **274**, 3904-9.
- Tanaka H, Arakawa H, Yamaguchi T, Shiraishi K, Fukuda S, Matsui K, Takei Y and Nakamura Y** (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**, 42-9.
- Taylor WR and Stark GR** (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**, 1803-15. (Review)
- Toft NJ, Curtis LJ, Sansom OJ, Leitch AL, Wyllie AH, te Riele H, Arends MJ and Clarke AR** (2002). Heterozygosity for p53 promotes microsatellite instability and tumorigenesis on a Msh2 deficient background. *Oncogene* **21**, 6299-306.
- Tokino T, Thiagalingam S, el-Deiry WS, Waldman T, Kinzler KW and Vogelstein B** (1994). p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum Mol Genet* **3**, 1537-42.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4.
- Triezenberg SJ** (1995) Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 190-6. (Review)
- Ueba T, Nosaka T, Takahashi JA, Shibata F, Florkiewicz RZ, Vogelstein B, Oda Y, Kikuchi H and Hatanaka M** (1994). Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene by p53 in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 9009-13.
- Vaughn JL, Goodwin RH, Tompkins GJ and McCawley P** (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **13**, 213-7.
- Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L and Weinberg RA** (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**, 149-59.
- Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L and Debussche L** (1998). The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO J* **17**, 4668-79.
- Vojtesek B, Bartek J, Midgley CA and Lane DP** (1992). An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* **151**, 237-44.
- Wade-Evans A and Jenkins JR** (1985). Precise epitope mapping of the murine transformation-associated protein, p53. *EMBO J* **4**, 699-706.
- Walker KK and Levine AJ** (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 15335-40.
- Wang H, Yang Y, Schofield MJ, Du C, Fridman Y, Lee SD, Larson ED, Drummond JT, Alani E, Hsieh P and Erie DA** (2003). DNA bending and unbending by MutS govern mismatch recognition and specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 14822-7.

- Wang X, Taplick J, Geva N and Oren M** (2004). Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation. *FEBS Lett* **561**, 195-201.
- Wang Y, Schwedes JF, Parks D, Mann K and Tegtmeyer P** (1995). Interaction of p53 with its consensus DNA-binding site. *Mol Cell Biol* **15**, 2157-65.
- Warnick CT, Dabbas B, Ford CD and Strait KA** (2001). Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells. *J Biol Chem* **276**, 27363-70.
- Waterman JL, Shenk JL and Halazonetis TD** (1995). The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *EMBO J* **14**, 512-9.
- Watson JD and Crick FH** (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-8.
- Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ and LeRoith D** (1996). Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8318-23.
- Wickham TJ, Davis T, Granados RR, Shuler ML and Wood HA** (1992). Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog* **8**, 391-6.
- Will K, Warnecke G, Albrechtsen N, Boulikas T and Deppert W** (1998a). High affinity MAR-DNA binding is a common property of murine and human mutant p53. *J Cell Biochem* **69**, 260-70.
- Will K, Warnecke G, Wiesmuller L and Deppert W** (1998b). Specific interaction of mutant p53 with regions of matrix attachment region DNA elements (MARs) with a high potential for base-unpairing. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13681-6.
- Willis A, Jung EJ, Wakefield T and Chen X** (2004). Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* **23**, 2330-8.
- Wolcke J, Reimann M, Klumpp M, Gohler T, Kim E and Deppert W** (2003). Analysis of p53 "latency" and "activation" by fluorescence correlation spectroscopy. Evidence for different modes of high affinity DNA binding. *J Biol Chem* **278**, 32587-95.
- Wong KB, DeDecker BS, Freund SM, Proctor MR, Bycroft M and Fersht AR** (1999). Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8438-42.
- Wright JD, Noskov SY and Lim C** (2002). Factors governing loss and rescue of DNA binding upon single and double mutations in the p53 core domain. *Nucleic Acids Res* **30**, 1563-74.
- Wu X, Bayle JH, Olson D and Levine AJ** (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**, 1126-32.
- Xiao G, White D and Bargonetti J** (1998). p53 binds to a constitutively nucleosome free region of the mdm2 gene. *Oncogene* **16**, 1171-81.
- Yakovleva T, Pramanik A, Kawasaki T, Tan-No K, Gileva I, Lindegren H, Langel U, Ekstrom TJ, Rigler R, Terenius L and Bakalkin G** (2001). p53 Latency. C-terminal domain prevents binding of p53 core to target but not to nonspecific DNA sequences. *J Biol Chem* **276**, 15650-8.
- Yakovleva T, Pramanik A, Terenius L, Ekstrom TJ and Bakalkin G** (2002). p53 latency - out of the blind alley. *Trends Biochem Sci* **27**, 612-8.
- Yang Q, Zhang R, Wang XW, Spillare EA, Linke SP, Subramanian D, Griffith JD, Li JL, Hickson ID, Shen JC, Loeb LA, Mazur SJ, Appella E, Brosh RM Jr, Karmakar P, Bohr VA and Harris CC** (2002). The processing of Holliday junctions by BLM and WRN helicases is regulated by p53. *J Biol Chem* **277**, 31980-7.

- Yang Q, Zhang R, Wang XW, Linke SP, Sengupta S, Hickson ID, Pedrazzi G, Perrera C, Stagljar I, Littman SJ, Modrich P and Harris CC** (2004). The mismatch DNA repair heterodimer, hMSH2/6, regulates BLM helicase. *Oncogene* **23**, 3749-56.
- Yang X, Pater A and Tang SC** (1999). Cloning and characterization of the human BAG-1 gene promoter: upregulation by tumor-derived p53 mutants. *Oncogene* **18**, 4546-53.
- Yu A, Dill J and Mitas M** (1995). The purine-rich trinucleotide repeat sequences d(CAG)₁₅ and d(GAC)₁₅ form hairpins. *Nucleic Acids Res* **23**, 4055-7.
- Zalcenstein A, Stambolsky P, Weisz L, Muller M, Wallach D, Goncharov TM, Krammer PH, Rotter V and Oren M** (2003). Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants. *Oncogene* **22**, 5667-76.
- Zauberman A, Flusberg D, Haupt Y, Barak Y and Oren M** (1995). A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Res* **23**, 2584-92.
- Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH and Levine AJ** (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* **14**, 981-93.
- Zheng M, Huang X, Smith GK, Yang X and Gao X** (1996). Genetically unstable CXG repeats are structurally dynamic and have a high propensity for folding. An NMR and UV spectroscopic study. *J Mol Biol* **264**, 323-36.
- Zhou J, Ahn J, Wilson SH and Prives C** (2001). A role for p53 in base excision repair. *EMBO J* **20**, 914-23.
- Zilfou JT, Hoffman WH, Sank M, George DL and Murphy M** (2001). The corepressor mSin3a interacts with the proline-rich domain of p53 and protects p53 from proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **21**, 3974-85.
- Zotchev SB, Protopopova M and Selivanova G** (2000). p53 C-terminal interaction with DNA ends and gaps has opposing effect on specific DNA binding by the core. *Nucleic Acids Res* **28**, 4005-12.
- Zurer I, Hofseth LJ, Cohen Y, Xu-Welliver M, Hussain SP, Harris CC and Rotter V** (2004). The role of p53 in base excision repair following genotoxic stress. *Carcinogenesis* **25**, 11-9.

LEBENS LAUF

Name, Vorname: Walter, Korden Martin

Geburtsdatum: 06.09.1972 in Hamburg

Anschrift: Eidelstedter Weg 99
20255 Hamburg

Familienstand: verheiratet

1979 - 1983 Grundschole Henstedt-Rhen

1983 - 1992 Gymnasium Henstedt-Ulzburg

1992 - 1993 Zivildienst

1993 - 2000 Studiengang Chemie an der Universität Hamburg

Dez. 1995 Vordiplom

März 1999 Diplomprüfung

April 1999 - Jan. 2000 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Zellbiologie (UKE) der Universität Hamburg, Abteilung Molekularbiologie, Prof. Dr. Joachim Kruppa

„Signale für den Kerntransport und die Nukleolus-Akkumulation im ribosomalen Protein S10 aus Saccharomyces cerevisiae“

April - Okt. 2000 Wissenschaftlicher Angestellter am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin der Universität Hamburg, Abteilung Virologie, Prof. Dr. Herbert Schmitz

„Generierung einer HIV V3-Loop-Genbank“

Nov. 2000 - Sept. 2004 Doktorarbeit am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie der Universität Hamburg, Abteilung Tumorstudiologie, Prof. Dr. Wolfgang Deppert

„Trinucleotide Repeats (TNRs): DNA-Bindungssubstrate für Wildtyp und mutiertes p53 und Modulatoren der p53-abhängigen Transkription“

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich, Korden Martin Walter, an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel

Trinucleotide Repeats (TNRs): DNA-Bindungssubstrate für Wildtyp und mutiertes p53 und Modulatoren der p53-abhängigen Transkription

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Hamburg, den

ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE PROMOTIONSVERSUCHE

Hiermit erkläre ich, Korden Martin Walter, dass von mir vor dieser Promotion keine weiteren Promotionsversuche unternommen worden sind.

Hamburg, den