

# **DNA-Bindungseigenschaften von Mitgliedern der p53 Familie**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Markus Sauer**

aus Hechingen

Würzburg, Januar 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01. April 2005 bis 31. Dezember 2008 an der Universität Würzburg am Rudolf-Virchow-Zentrum beziehungsweise an der Universität Marburg in der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie / am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung unter der Anleitung von Prof. Dr. Thorsten Stiewe angefertigt.

Eingereicht am: 09. Januar 2009

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

Gutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums: 25. März 2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## **Erklärung**

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg vom 15. März 1999:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Diese Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben und zu erwerben gesucht.

Marburg, 06. Januar 2009

# Inhaltsverzeichnis

## Zusammenfassung

## Summary

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Grundlegendes zur Krebsentstehung.....	1
1.2 Der Tumorsuppressor p53.....	2
1.2.1 Allgemeines zu p53.....	2
1.2.2 Aufbau des TP53 Gens.....	3
1.2.3 Aufbau des p53 Proteins.....	3
1.2.4 Struktur von p53.....	4
1.2.5 DNA-Bindung von p53 über die DNA-Bindungs-Domäne (DBD).....	7
1.2.6 DNA-Bindung von p53 über die Carboxy-terminale Domäne (CTD).....	9
1.2.7 Regulation der Trans-Aktivierung durch p53.....	10
1.2.8 Funktionen von p53.....	11
1.2.9 Regulation der p53 Protein-Spiegel.....	14
1.2.10 Regulation der p53 Aktivität.....	14
1.2.11 Mutationen von p53.....	17
1.3 Die p53 Familie.....	18
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	22
<b>2 Material</b> .....	<b>23</b>
2.1 Organismen.....	23
2.2 Vektoren (Plasmide und Adenoviren).....	23
2.3 Oligonukleotide.....	25
2.4 Antikörper.....	27
2.5 Käufliche Komplettausstattungen.....	27
2.6 Sonstige Artikel.....	28
2.7 Hergestellte Lösungen.....	29

---

<b>3 Methoden</b> .....	<b>32</b>
3.1 Grundlegende DNA-Techniken.....	32
3.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	32
3.3 Adenovirus-Herstellung, Titration und Infektion.....	33
3.4 „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA).....	35
3.5 Mikroskopie.....	37
3.5.1 Fluoreszenz-Mikroskopie und konfokale Mikroskopie.....	37
3.5.2 Immunfluoreszenz-Zytochemie.....	39
3.5.3 „Fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP).....	40
3.6 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	43
3.7 Luziferase-Reporter-Assay.....	45
3.8 Genexpression auf mRNA Ebene.....	47
3.8.1 Isolation von mRNA und Synthese von cDNA.....	47
3.8.2 Quantitative PCR.....	47
3.8.3 Microarray.....	49
3.9 Protein-Analysen.....	49
3.9.1 Bioinformatische Analysen.....	49
3.9.2 Westernblot.....	50
3.10 Durchfluss-Zytometrie.....	51
3.11 Statistik.....	52
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>53</b>
4.1 Der Einfluss des Carboxy-Terminus auf die DNA-Bindungseigenschaften von p53 Familienmitgliedern.....	53
4.1.1 Unterschiede im Carboxy-Terminus beeinflussen die Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 und p73 Isoformen.....	53
4.1.2 Gleiten entlang von DNA kann Unterschiede der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53 Familienmitgliedern erklären.....	55
4.1.3 Die Fähigkeit des Gleitens entlang von DNA korreliert mit der Ladung des Carboxy-Terminus von p53 Familienmitgliedern.....	58
4.1.4 Die Ladung des Carboxy-Terminus beeinflusst die Sequenz-spezifische DNA-Bindung.....	59

---

4.1.5 Die CTD von p53 reduziert <i>in vivo</i> die Mobilität von p53 und p73 $\alpha$ im Nukleus.....	61
4.1.6 Die CTD von p53 inhibiert die Bindung an den p21 Promotor <i>in vivo</i> .....	66
4.1.7 Die CTD von p53 vermindert die transkriptionelle Aktivität von p53 und p73 $\alpha$ .....	68
4.1.8 Die CTD vermindert Zellzyklus-Arrest und Apoptose.....	71
4.2 Einfluss der H1-Helix-Region auf die DNA-Bindungseigenschaft von p53.....	74
4.2.1 Vordaten: Mutationen der H1-Helix verändern die DNA-Bindung von p53 <i>in vitro</i> und das Zellschicksal <i>in vivo</i> .....	74
4.2.2 Die H1-Helix-Interaktion verändert nicht die zelluläre Lokalisation von p53	76
4.2.3 Die H1-Helix-Interaktion bestimmt <i>in vivo</i> die Spezifität der DNA-Bindung von p53.....	77
4.2.4 Phosphorylierung von Serin 183 könnte die H1-Helix-Interaktion regulieren.....	82
4.2.5 Simulierung der Phosphorylierung von Serin 183 vermindert die DNA-Bindung von p53 <i>in vitro</i> .....	83
4.2.6 Simulierung der De-Phosphorylierung von Serin 183 verstärkt die Trans-Aktivierung von pro-apoptischen p53 Zielgenen.....	88
4.2.7 Phosphorylierung von p53 an S183 <i>in vivo</i> .....	91
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>94</b>
5.1 Auswirkung der Carboxy-Termini auf die DNA-Bindung von p53 Familienmitglieder.....	94
5.2 Gleiteigenschaften der Carboxy-Termini.....	94
5.3 Sequenz-unabhängige DNA-Bindung durch die Carboxy-Termini.....	96
5.4 Einfluss der Carboxy-Termini auf die Promotor-Bindung.....	98
5.5 Einfluss der Carboxy-Termini auf die Funktion von p53 und p73 $\alpha$ .....	99
5.6 Modell der Carboxy-Termini bei der DNA-Bindung.....	101
5.7 Bedeutung der Carboxy-Termini für die Funktion von p53 Familienmitgliedern....	103
5.8 Auswirkung der H1-Helix-Interaktion auf die DNA-Bindung von p53.....	104
5.9 Einfluss der H1-Helix-Interaktion auf die Promotor-Bindung.....	105
5.10 Einfluss von Serin 183 auf die DNA-Bindung.....	107

5.11 Einfluss der DNA-Bindung auf die Trans-Aktivierung.....	109
5.12 Bedeutung der H1-Helix-Interaktion bei der Entscheidung des Zellschicksals.....	112
5.13 Funktionelle Bedeutung der DNA-Bindungseigenschaften von p53 Familienmitgliedern.....	113
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>115</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>118</b>

## Zusammenfassung

Ein sehr wichtiger Tumorsuppressor ist der Transkriptionsfaktor p53, der Zellschicksals-Entscheidungen wie Zellzyklus-Arrest und programmierten Zelltod (Apoptose) kontrolliert. Die Wirkung von p53 und von seinen Familienmitgliedern p63 und p73 beruht überwiegend auf der Fähigkeit, als Transkriptionsfaktoren die Genexpression zu regulieren. Die DNA-Bindung an Promotoren von Zielgenen ist dabei von grundlegender Bedeutung und wird durch die hoch konservierte zentrale DNA-Bindungs-Domäne und den Carboxy-Terminus bestimmt.

In dieser Arbeit wurden die DNA-Bindungseigenschaften von p53 und verschiedener Carboxy-terminalen p73 Isoformen untersucht. In „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) Experimenten bildeten p53 und p73 $\gamma$  nur schwache Sequenz-spezifische DNA-Komplexe, wohingegen p73 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  die DNA deutlich stärker banden. Die schwache DNA-Bindung von p53 und p73 $\gamma$  kann durch mehrfach positiv geladene Carboxy-Termini erklärt werden, die über eine Sequenz-unabhängige DNA-Bindung ein Gleiten entlang der DNA ermöglichen. Die Deletion der Carboxy-terminalen Domäne (CTD) von p53 („p53 $\Delta$ 30“) verstärkte dementsprechend die Sequenz-spezifische DNA-Bindung *in vitro* und seine Übertragung auf p73 $\alpha$  („p73 $\alpha$ +30“) schwächte sie ab. Mittels „fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) Experimenten konnte in lebenden Zellen eine Verminderung der intra-nukleären Mobilität von p53 und p73 $\alpha$ +30 durch die CTD gezeigt werden, die aus der Sequenz-unabhängigen DNA-Bindung resultiert. Zusätzlich reduzierte die CTD die Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 an den p21 (CDKN1A) Promotor. Das Spektrum der regulierten Zielgene wurde in einer Genom-weiten Genexpressions-Analyse nicht durch die CTD verändert, sondern maßgeblich durch das Protein-Rückgrat von p53 beziehungsweise p73 bestimmt. Allerdings verminderte die CTD das Ausmaß der Transkriptions-Regulation und hemmte die Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose. Die mehrfach positiv geladene CTD in p53 besitzt demzufolge eine negativ regulatorische Wirkung, die in den wichtigsten p73 Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  fehlt.

Die zentrale DNA-Bindungs-Domäne trägt durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen H1-Helices (Aminosäurereste 177 bis 182) unterschiedlicher p53 Monomere zu kooperativer DNA-Bindung und zu Zellschicksals-Entscheidungen bei. Anhand von Mutanten,

die unterschiedlich starke H1-Helix-Interaktionen ermöglichen, konnte gezeigt werden, dass starke Interaktionen die Bindung an Promotoren von pro-apoptischen Genen verstärkte, wohingegen die Bindung an anti-apoptische und Zellzyklus-blockierende Gene unabhängig von der Interaktions-Stärke war. Diese Unterschiede in der Promotor-Bindung ließen sich nicht auf eine veränderte zelluläre Lokalisation der Mutanten zurückführen, da alle Mutanten überwiegend nukleär lokalisiert waren. Eine an Serin 183 Phosphorylierungs-defekte Mutante von p53 bildete stabile DNA-Komplexe, entsprechend einer Mutante mit starker H1-Helix-Interaktion, und trans-aktivierte pro-apoptische Promotoren stärker als Mutanten, die Phosphorylierung von p53 an Serin 183 simulieren. Da zusätzlich bekannt ist, dass Serin 183 mit der H1-Helix wechselwirkt, könnte diese Phosphorylierung einen physiologischen Mechanismus zur Regulation der H1-Helix-Interaktion und damit des Zellschicksals darstellen.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass sowohl die Interaktions-Stärke zweier DNA-Bindungs-Domänen als auch die elektrische Ladung des Carboxy-Terminus die DNA-Bindungseigenschaften von p53 Familienmitgliedern bestimmen und so Zellschicksals-Entscheidungen der p53 Familie beeinflussen.

## Summary

A very important tumour suppressor is the transcription factor p53 that controls cell fate decisions like cell cycle arrest and programmed cell death (apoptosis). The effects of p53 and its family members p63 and p73 are mainly based on their transcription factor activities to regulate gene expression. The DNA binding to promoters of target genes is of fundamental importance for their functionality and is determined by the highly conserved core DNA binding domain and the carboxy-terminus.

In this thesis the DNA binding properties of p53 and different carboxy-terminal p73 isoforms were examined. In electrophoretic mobility shift assays (EMSA) p53 and p73 $\gamma$  formed only weak sequence-specific protein-DNA-complexes while p73 $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  bound considerably stronger to DNA. A highly positively charged carboxy-terminus can explain the weak DNA binding of p53 and p73 $\gamma$  by enabling sequence-nonspecific DNA binding leading to sliding on DNA. According to this the deletion of the carboxy-terminal domain (CTD) of p53 („p53 $\Delta$ 30“) reinforced DNA binding *in vitro*, and its fusion to p73 $\alpha$  („p73 $\alpha$ +30“) attenuated it. In living cells the CTD reduced intranuclear mobility of p53 and p73 $\alpha$ +30 in fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments by mediating sequence-nonspecific binding to DNA. In addition, the CTD reduced sequence-specific occupancy of the p21 (CDKN1A) promoter by p53 *in vivo*. In an unbiased genome-wide gene expression analysis the spectrum of target genes was not changed by the presence of the CTD, but mainly determined by the p53 and p73 protein backbone, respectively. However, the CTD diminished the level of target gene activation and inhibited the induction of cell cycle arrest and apoptosis. As a result, the highly positively charged carboxy-terminus of p53 exhibits a negative regulatory effect that is missing in the most important p73 isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$ .

The core DNA binding domain adds to cooperative DNA binding and cell fate decisions by electrostatic interactions between H1 helices (residues 177 to 182) of different p53 monomers. Strong H1 helix interactions increased binding to promoters of pro-apoptotic genes, whereas binding to anti-apoptotic and proliferation inhibiting genes was independent of the interaction strength as shown by mutants with different strengths of the H1 helix interactions. These differences in promoter binding were not caused by different cellular localizations of the mutants as they were all predominantly localized to the nucleus. A serine

183 phosphorylation-defective mutant of p53 formed stable protein-DNA-complexes, comparable to a mutant with strong H1 helix interactions, and trans-activated pro-apoptotic promoters stronger than mutants that mimicked p53 phosphorylated on serine 183. Due to the fact that serine 183 interacts with the H1 helix, these data suggest that phosphorylation of serine 183 is a physiological mechanism to regulate H1 helix interactions and thereby cell fate decisions.

In summary, it was shown that both the interaction strength of two DNA binding domains and the electrostatic charge of the CTD define the DNA binding properties of p53 family members and thereby influence cell fate decisions of the p53 family.

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlegendes zur Krebsentstehung

Mehrzellige Organismen entwickeln sich aus einer einzigen Zelle durch Proliferation zu einem Zellverbund. Innerhalb dieses Verbundes übernehmen Zellgruppen spezifische Aufgaben, für die sie speziell in ihrer Morphologie und ihren Bestandteilen ausgestattet werden. Die Aufgabenverteilung ermöglicht eine vielfältige und spezialisierte Aufgabenbewältigung und damit einen Vorteil für den Organismus. Für eine einzelne Zelle stellt die Spezialisierung eine Einschränkung in ihrem Proliferationspotential dar, die jedoch durch das funktionierende Zusammenspiel aller Zellen eines Organismus mehr als ausgleichen wird. Regulation ist erforderlich, um das Funktionieren dieses Zusammenspiels zu gewährleisten, wodurch für ausreichend Nachschub an neuen Zellen gesorgt wird, sie für bestimmte Aufgaben ausgestattet werden und überflüssige Zellen eliminiert werden.

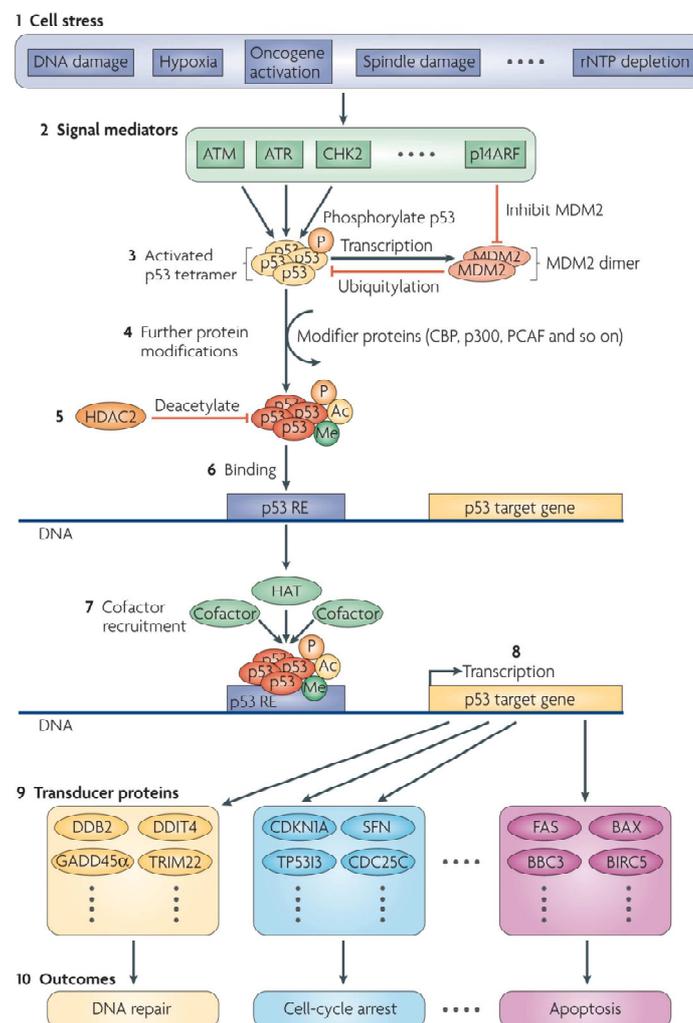
Ein sehr wichtiger Regulationsmechanismus auf molekularer Ebene ist die differentielle Genexpression. Sie wird maßgeblich durch Transkriptionsfaktoren umgesetzt, die im Genom an spezielle DNA-Sequenzen eines Gens binden, die Zugänglichkeit dieses Gens für andere Faktoren erhöhen und dort den Aufbau der Transkriptions-Maschinerie unterstützen. Differentielle Genexpression regelt unzählige Prozesse, angefangen von Zellproliferation über Entwicklung bis hin zu programmiertem Zelltod (Apoptose).

Wie bei jedem Regulationsmechanismus treten auch bei der differentiellen Genexpression immer wieder Störungen auf. Beispielsweise kann es durch Veränderungen im Genom (Mutationen) dazu kommen, dass Komponenten dieses Regulationssystems inaktiv oder hyperaktiv werden. Wenn Proliferations-stimulierende Komponenten hyperaktiv werden, kann dies – soweit andere Bedingungen erfüllt sind – zu unkontrollierter Vermehrung von Zellen und Krebs führen. Entsprechendes kann bei Funktionsverlust von Komponenten, die das Wachstum hemmen, erfolgen. Erstere Komponenten gehören zur Klasse der Onkogene und letztere zu den Tumorsuppressoren. Beide Klassen spielen eine grundlegende Rolle bei der Regulation von Proliferation und der Entstehung von Krebs.

## 1.2 Der Tumorsuppressor p53

### 1.2.1 Allgemeines zu p53

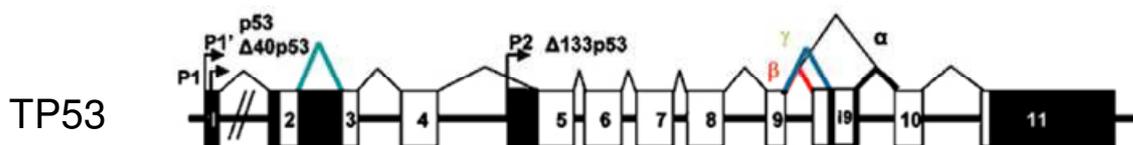
Ein sehr bedeutender Tumorsuppressor ist der Transkriptionsfaktor p53. Vielfältige Stress-Signale werden an p53 übermittelt, das dann Zielgene differentiell reguliert (Abb. 1.1). Die Expression seiner Zielgene trägt über unterschiedliche Mechanismen zur Verhinderung von Tumorentstehung bei. Diese schließen insbesondere die DNA-Reparatur, den Zellzyklus-Arrest, die Differenzierung und die Apoptose ein.



**Abb.1.1:** Der p53 Signalweg. Unterschiedliche Stress-Signale (1) werden über Mediatoren (2) zu p53 geleitet, das stabilisiert und „aktiviert“ (3) wird. Weitere post-translationale Modifikationen (4 und 5) können die DNA-Bindung regulieren. Als Tetramer bindet p53 an Response-Elemente in Promotoren (6), rekrutiert Co-Faktoren (7) und verändert die Transkription seiner Zielgene (8). Zugehörige Genprodukte (9) vermitteln unterschiedliche Schicksale der Zelle (10), die tumorsuppressiv wirken. Aus Riley et al. 2008.

### 1.2.2 Aufbau des TP53 Gens

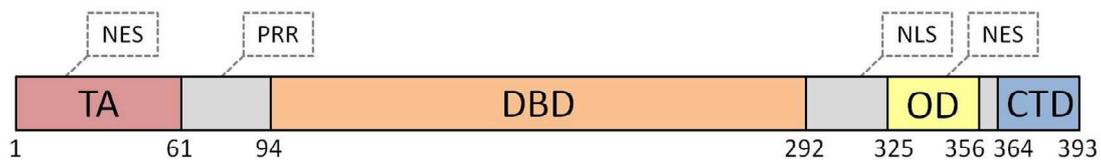
Das zu p53 gehörige humane Gen TP53 besteht aus elf Exonen (Abb. 1.2). Durch die Nutzung der drei Promotoren P1, P1' und P2, sowie durch alternatives Spleißen der mRNA können mindestens neun unterschiedliche p53 Protein-Isoformen gebildet werden (Bourdon et al. 2005, Rohaly et al. 2005). Die vorherrschend exprimierte Isoform ist das Protein voller Länge, das bei Transkription beginnend am P1 Promotor und Spleißen von Exon 9 mit Exon 10 entsteht. Das TP53 Gen wird, abgesehen von einigen Ausnahmen wie der Spermatogenese, nicht differentiell reguliert (Schwartz et al. 1993). Seine Transkription ist konstitutiv, wobei die Nutzung des internen Promotors P2 und das alternative Spleißen Gewebe-spezifisch erfolgen (Bourdon 2007).



**Abb. 1.2:** Schematischer Aufbau des humanen TP53 Gens. Alternative Promotoren P1, P1' und P2, sowie die alternativen Carboxy-terminalen Spleißvarianten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  sind eingezeichnet. Aus Murray-Zmijewski et al. 2006.

### 1.2.3 Aufbau des p53 Proteins

Das p53 Protein voller Länge besteht aus 393 Aminosäureresten und besitzt eine apparente Masse von 53 kDa. Es hat den typischen Aufbau eines Transkriptionsfaktors aus einer Transaktivierungs-Domäne, einer zentralen DNA-Bindungs-Domäne (DBD) und einer Oligomerisierungs-Domäne (Abb. 1.3). Zusätzlich zu der zentralen DBD enthält es eine Carboxy-terminale Domäne (CTD), die ebenfalls DNA binden kann (Foord et al. 1991). Außerdem weist p53 eine Prolin-reiche Region, ein Kernlokalisations-Signal und zwei Kernexport-Signale auf (Harms & Chen 2006).



**Abb. 1.3:** Schematischer Aufbau des humanen p53 Proteins voller Länge. Dargestellt sind die Transaktivierungs-Domäne (TA), die zentrale DNA-Bindungs-Domäne (DBD), die Oligomerisierungs-Domäne (OD) und die Carboxy-terminale Domäne (CTD); jeweils mit Nummerierung der zugehörigen Aminosäurereste. Markiert sind die Prolin-reiche Region (PRR, Aminosäurereste 64 bis 92), die zwei Kernexport-Signale (NES, 11 bis 27 bzw. 340 bis 351) und das Kernlokalisations-Signal (NLS, 305 bis 322). Verändert nach Joerger & Fersht 2008.

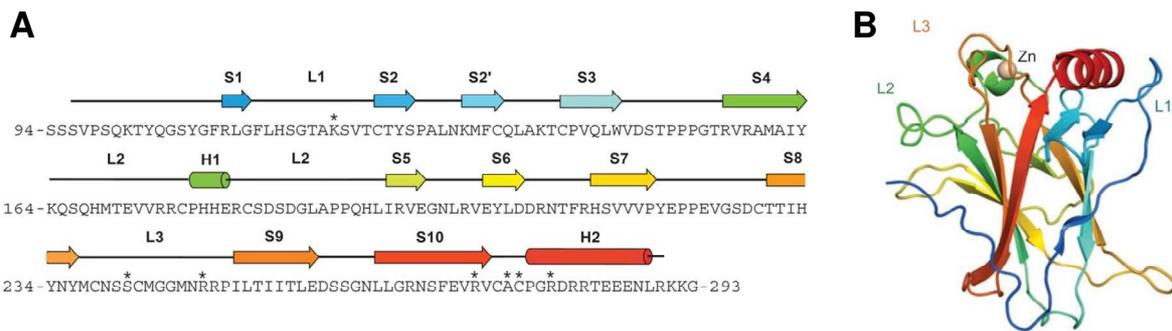
### 1.2.4 Struktur von p53

Das funktionell aktive p53 Protein ist ein aus vier Monomeren bestehendes Homo-Oligomer. Die zentrale DBD ist gefaltet und über eine kurze flexible Aminosäure-Sequenz mit der ebenfalls gefalteten Oligomerisierungs-Domäne verbunden. Sowohl der Amino-Terminus als auch der Carboxy-Terminus ist von sich aus nicht gefaltet. Dies ermöglicht das Einnehmen unterschiedlicher induzierter Strukturen, wodurch eine Vielzahl an spezifischen Protein-Interaktionen ermöglicht wird (Bell et al. 2002, Liu et al. 2006, Dunker et al. 2005). Bisher liegen nur Strukturdaten geringer Auflösung – und somit ohne atomare Details – für das gesamte p53 Protein vor, jedoch detaillierte Strukturdaten für einzelne Domänen (Tidow et al. 2007).

Die Oligomerisierungs-Domäne besteht aus einem kurzen  $\beta$ -Strang (Aminosäurereste 326 bis 333), der über eine scharfe Kehre mit einer  $\alpha$ -Helix (335 bis 355) verbunden ist (Jeffrey et al. 1995). Je zwei Monomere bilden co-translational ein Dimer, in dem sie über ein intermolekulares anti-paralleles  $\beta$ -Faltblatt und ein anti-paralleles Helix-Bündel verbunden sind. Tetramere entstehen post-translational aus zwei Dimeren, indem die vier Helices ein Helix-Bündel bilden und maßgeblich über hydrophobe Interaktionen der Aminosäurereste L344 beziehungsweise L348 stabilisiert sind (Mateu & Fersht 1998).

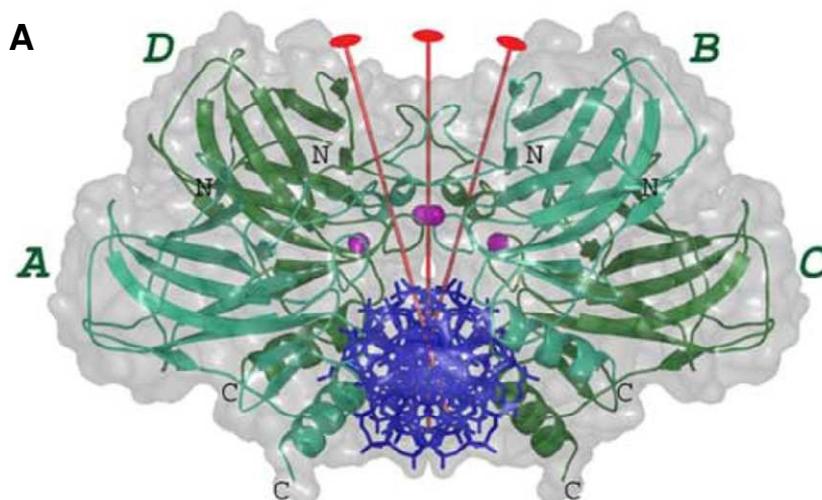
Die zentrale DBD bildet ein Gerüst aus einem  $\beta$ -Sandwich, an dem sich zwei große Schleifen und ein Schleife-Blatt-Helix Motiv befinden (Abb. 1.4)(Cho et al. 1994). Die zwei großen Schleifen L2 und L3 sind über ein koordiniertes Zink-Ion stabilisiert. Der Aminosäurerest

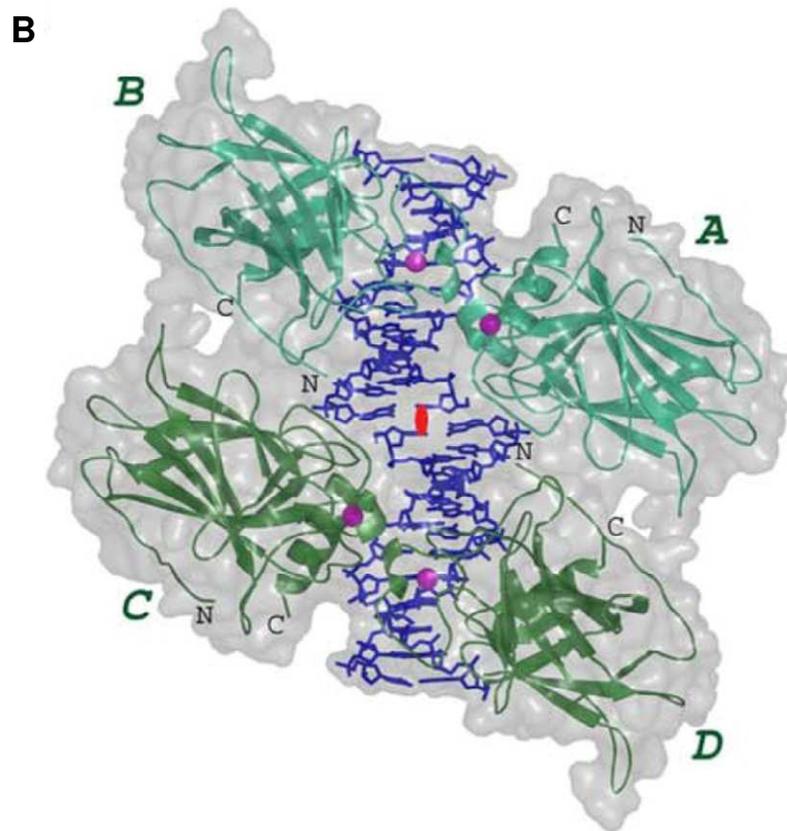
R248 der Schleife L3 bindet an die kleine Furche der DNA-Helix. Das Schleife-Blatt-Helix Motiv besteht aus der Schleife L1, dem  $\beta$ -Strang S2 und S2', einem Teil des  $\beta$ -Strangs S10 und der Helix H2. Es bindet über die Aminosäurereste K120, C277 und R280 an die große Furche der DNA-Helix. Bindung an das Phosphat-Rückgrat der DNA erfolgt über die Aminosäurereste K120, S241, R273, A276 und R283 (Harms & Chen 2006).



**Abb. 1.4:** Struktur der DBD von humanem p53. **A:** Aminosäure-Sequenz mit eingezeichneten Sekundär-Strukturen (Cho et al. 1994). Sternchen markieren Aminosäuren mit direktem DNA-Kontakt (Kitayner et al. 2006). **B:** Bänderdiagramm der Struktur der DBD eines p53 Monomers ohne DNA (Wang et al. 2007, Proteindatenbank-Nummer 2AHI). Die Aminosäuren C176, H179, C238 und C242 koordinieren ein Zink-Ion. Farbliche Markierung wie bei A. H, Helix; L, Schleife; S,  $\beta$ -Strang; Zn, Zink-Ion. Aus Joerger & Fersht 2008.

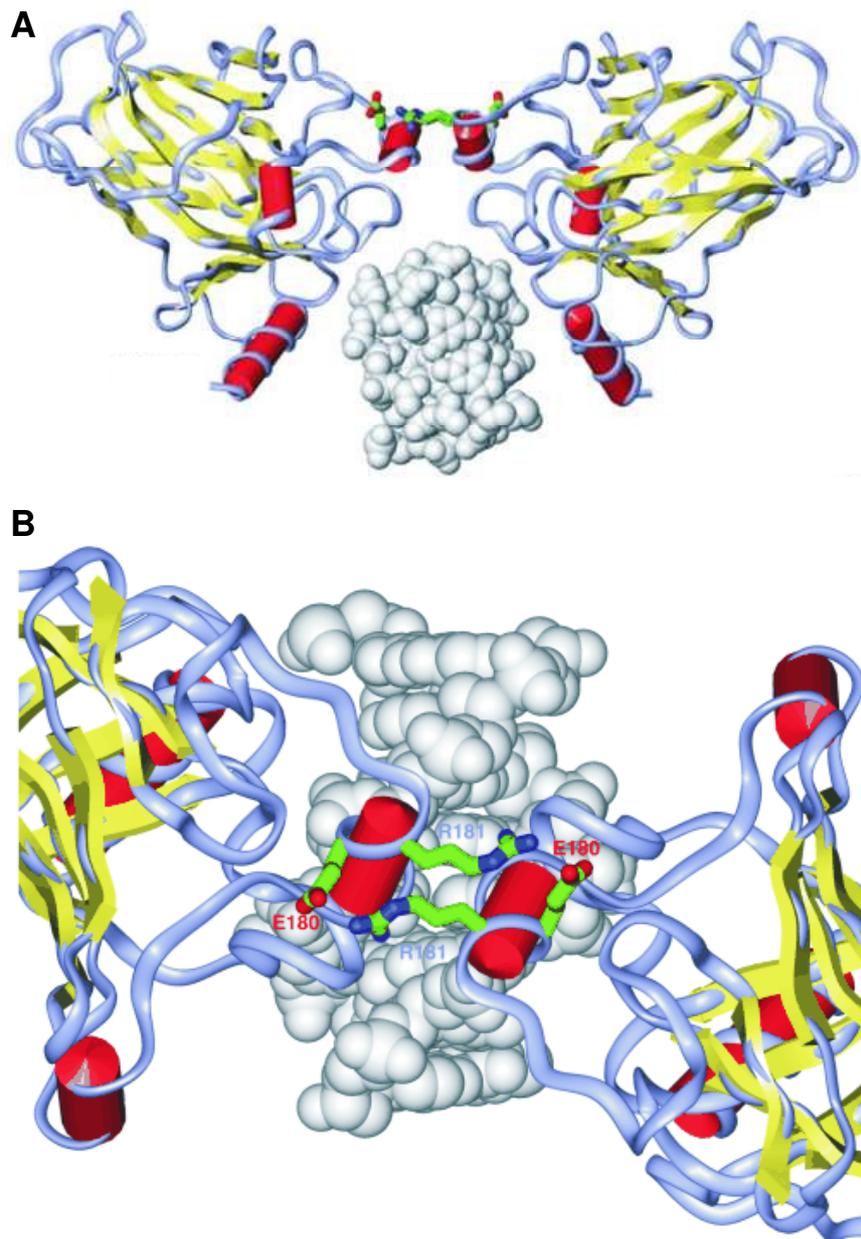
Kristallstruktur-Analysen der humanen p53 DBD zeigen, dass jeweils vier p53 DBD an eine doppelsträngige DNA-Helix binden, die ein vollständiges p53 Response-Element enthält (Abb. 1.5)(Kitayner et al. 2006). Jeweils beide Monomere eines Dimers binden an eine Hälfte eines p53 Response-Elements. Zwei Dimere formen ein Tetramer auf der DNA, das achsensymmetrisch – orthogonal zur DNA-Helix – ist.





**Abb. 1.5:** Struktur eines Tetramers aus humanen p53 DBD gebunden an DNA. **A:** Aufsicht parallel zur Symmetrieachse. **B:** Seitenansicht parallel zur DNA-Helix. Grün: vier DBD (A, B, C und D); blau: doppelsträngige DNA; violett: vier Zink-Ionen; grau: Van-der-Waals-Oberfläche; rot: Symmetrieachsen des Tetramers und der Dimere. Aus Kitayner et al. 2006.

Zusätzlich zu den strukturell bedeutsamen Aminosäureresten, die das Zink-Atom koordinieren, sind auch die an der Proteinoberfläche liegenden Aminosäurereste der H1-Helix (Aminosäurereste 177 bis 182) stark konserviert (Dehner et al. 2005). Übereinstimmend mit diesem Hinweis auf funktionelle Bedeutung wurde gezeigt, dass die H1-Helices intermolekulare Verbindungen der DBD vermitteln und dadurch zu kooperativer und Sequenz-spezifischer DNA-Bindung beitragen, obwohl sie keinen direkten Kontakt mit der DNA haben (Abb. 1.6)(Dehner et al. 2005). Dies erfolgt insbesondere durch elektrostatische Wechselwirkungen („Salzbrücken“) zwischen den negativ und positiv geladenen Aminosäureresten E180 und R181 unterschiedlicher p53 Monomere.

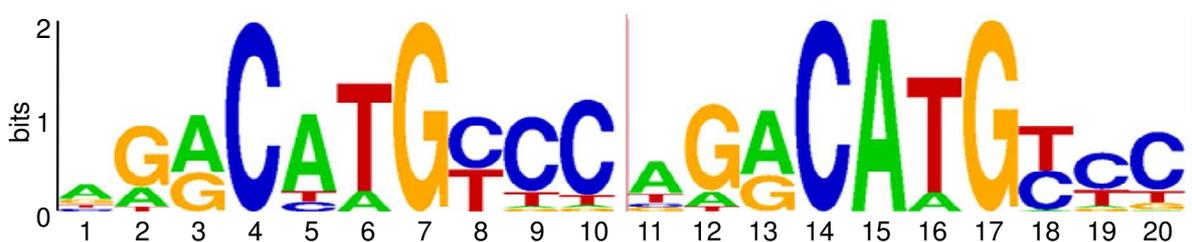


**Abb. 1.6:** Struktur eines Dimers aus humanen p53 DBD gebunden an DNA. **A:** Seitenansicht parallel zur DNA-Helix. Die zwei Monomere sind über die H1-Helices miteinander verbunden. **B:** Vergrößerte Aufsicht parallel zur Symmetrieachse. Die H1-Helices stabilisieren das Dimer über zwei intermolekulare elektrostatische Wechselwirkungen („Salzbrücken“) zwischen jeweils E180 und R181. Bänderdiagramm der DBD; Kalottenmodell der DNA; grün: E180 und R181. Aus Dehner et al. 2005.

### 1.2.5 DNA-Bindung von p53 über die DNA-Bindungs-Domäne (DBD)

Über die zentrale DBD bindet p53 Sequenz-spezifisch an DNA der palindromischen und degenerierten Konsensus-Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3'(R=A/G, W=A/T, Y=C/T)(el-Deiry et al.

1992, Funk et al. 1992). Natürlich vorkommende p53 Response-Elemente setzen sich meist aus zwei solcher als „Halfsite“ bezeichneten Hälften zusammen, die teilweise durch eine bis zu 21 bp lange Sequenz getrennt sind (Abb. 1.7)(Riley et al. 2008). Meistens sind die zwei Halfsites eines Response-Elements nicht getrennt, wobei dieses Merkmal bei reprimierten p53 Zielgenen nicht so stark ausgeprägt ist wie bei aktivierten (Wei et al. 2006, Riley et al. 2008). Befinden sich an Position 5 und 6 beziehungsweise an 15 und 16 ein Adenin und ein Thymin, ist die DNA-Bindung am stärksten, wohingegen sich Abweichungen an diesen Positionen besonders negativ auswirken (Weinberg et al. 2005, Resnick et al. 2005).



**Abb. 1.7:** Sequenz-Logo der p53 Response-Elemente. Dargestellt sind die auftretenden Nukleotidbasen an den verschiedenen Positionen innerhalb der Sequenz, wobei die Höhe den Informationsgehalt widerspiegelt. Die zwei Hälften sind nicht durch zusätzliche Basen getrennt. Die Sequenz ist sowohl innerhalb der zwei Hälften (zwischen zwei „Quartersites“) palindromisch als auch insgesamt (zwischen zwei „Halfsites“). Die Positionen sind in 5'→3' Richtung nummeriert. Aus Wei et al. 2006.

Die Bindung von vier p53 DBD an die DNA erfolgt kooperativ und bewirkt eine Biegung der DNA, wobei Response-Elemente mit einem zentralen CATG Motiv stark gebogen werden, während Response-Elemente mit einem CTTG Motiv nur schwach gebogen werden (Balagurumoorthy et al. 1995 und 2002, Nagaich et al. 1997a). Das Ausmaß der Biegung korreliert direkt mit der Bindungsaffinität der DBD zu dem Response-Element. Starke Biegung der DNA ist eine Notwendigkeit, um eine intermolekulare sterische Überlappung der H1-Helices, insbesondere von R181 und P177, bei DNA-Bindung mehrerer Monomere zu verhindern (Cho et al. 1994, Nagaich et al. 1997b).

Die Bindungsaffinität von p53 für unterschiedliche Response-Elemente variiert über einen großen Bereich. Hohe Affinität scheint mit Response-Elementen proliferationshemmender Gene gekoppelt zu sein, während nieder-affine Elemente gehäuft in pro-apoptotischen Genen auftreten (Inga et al. 2002, Weinberg et al. 2005).

Neuere Untersuchungen mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) gekoppelt an Sequenzierung mittels „paired-end ditag“ (ChIP-PET) zeigten, dass p53 an rund 500

Response-Elemente im humanen Genom bindet, während Hochrechnungen von Analysen mittels CHIP gekoppelt an Microarray (CHIP-on-chip) auf bis zu 4000 Response-Elemente kamen (Wei et al. 2006, Cawley et al. 2004, Kaneshiro et al. 2007). Übertroffen wird diese Anzahl durch bioinformatische Vorhersagen von über 8500 Response-Elementen (Veprintsev & Fersht 2008). Gene, denen diese Response-Elemente anhand ihrer genomischen Lokalisation und ihrer Wirkung auf sie zugeordnet werden, üben ein breites Spektrum an zellulären Funktionen aus.

### **1.2.6 DNA-Bindung von p53 über die Carboxy-terminale Domäne (CTD)**

Die CTD ist eine kleine Domäne, die aus den 30 Aminosäureresten am äußersten Carboxy-Terminus von p53 besteht. Sie ist stark basisch und reich an den Aminosäureresten Serin und Lysin, die post-translational modifiziert werden können (Abb. 1.9). Die CTD reguliert die DNA-Bindung der DBD und ist selbst zu autonomer Sequenz-unabhängiger DNA-Bindung in der Lage (Wang et al. 1993).

*In vitro* Analysen der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53 mittels „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) zeigten, dass p53 nur sehr schwach an DNA bindet, jedoch die Bindung stark ist, wenn die CTD verändert ist (Hupp et al. 1992). So führt die Bindung des Antikörpers PAb421 an die CTD zu starker DNA-Bindung, ebenso wie die Deletion der CTD in p53 $\Delta$ 30 (Hupp et al. 1992). Auch Stress-bedingte post-translationalen Modifikationen (PTM) der CTD, wie Phosphorylierung und Acetylierung, sowie kurze DNA-Fragmente und ein Peptid des p53 Carboxy-Terminus verstärken die Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 (Sakaguchi et al. 1998, Gu & Roeder 1997, Luo et al. 2004, Anderson et al. 1997). Daher wurde vermutet, dass die augenscheinlich inhibitorische Wirkung der CTD durch Stress-induzierte PTM aufgehoben wird, um Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 zu verstärken und so die Aktivierung von Zielgenen zu ermöglichen. Ferner ging man davon aus, dass p53 in einem latenten Status vorliegt, bei dem die CTD an die Aminosäurereste 80 bis 93 gebunden ist, und durch PTM eine allosterische Konformations-Änderung induziert wird, die zu verstärkter DNA-Bindung führt (Hupp et al. 1992, Muller-Tiemann et al. 1998).

Struktur-Analysen ergaben jedoch, dass die Konformation von p53 nicht durch die CTD verändert ist (Ayed et al. 2001). Darüber hinaus wurde *in vivo* gezeigt, dass der Anstieg an Promotor-gebundenem p53 mit dem Anstieg des p53 Protein-Spiegels korreliert und daher nicht das Latenz-Modell unterstützt (Kaeser & Iggo 2002). Ein alternatives Model erklärt die inhibitorische Wirkung der CTD mit sterischer Interferenz zwischen der Sequenz-unabhängigen DNA-Bindung der CTD und der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung der DBD (Anderson et al. 1997).

EMSA-Analysen mit langer DNA und mit in Histonen verpackter DNA widersprechen nicht nur dem inhibitorischen Effekt der CTD, sondern belegen sogar eine positive und teilweise notwendige Rolle der CTD bei der DNA-Bindung (Espinosa & Emerson 2001, McKinney & Prives 2002). Damit übereinstimmend wurde gezeigt, dass p53 entlang von DNA gleiten kann („lineare Diffusion“) und dass dafür die CTD notwendig und ausreichend ist (Jiao et al. 2001, McKinney et al. 2004). Demnach unterstützt die relativ starke Sequenz-unabhängige Bindung der CTD an DNA die Genom-weite Suche von p53 nach Response-Elementen durch kontinuierliches Abtasten der DNA-Sequenz und führt zu schneller Trans-Aktivierung des Zielgens p21 (Wolcke et al. 2003, Liu et al. 2004, von Hippel & Berg 1989).

### **1.2.7 Regulation der Trans-Aktivierung durch p53**

p53 reguliert die Trans-Aktivierung seiner Zielgene über unterschiedliche Mechanismen. Die Zugänglichkeit eines Promotors für allgemeine Transkriptionsfaktoren und für RNA Polymerasen kann p53 mittels Rekrutierung von ATP-abhängigen Faktoren, die das Chromatin umformen, und von Nukleosomen-modifizierenden Enzymkomplexen, wie den Histontransacetylasen p300/CREB und PCAF sowie den Methyltransferasen PRMT1 und CARM1, erleichtern (Bochar et al. 2000, Lee et al. 2002, An et al. 2004). Die Bildung des Transkriptions-Präinitiations-Komplexes unterstützt p53, indem es direkt mit Komponenten des Mediator-Komplexes interagiert (Gu et al. 1999). Außerdem rekrutiert p53 direkt die basalen Transkriptionsfaktoren TFIIA und TFIID an Promotoren (Xing et al. 2001). Darüber hinaus ist p53 im Fall von pausierenden RNA-Polymerasen in der Lage, die Transkriptions-

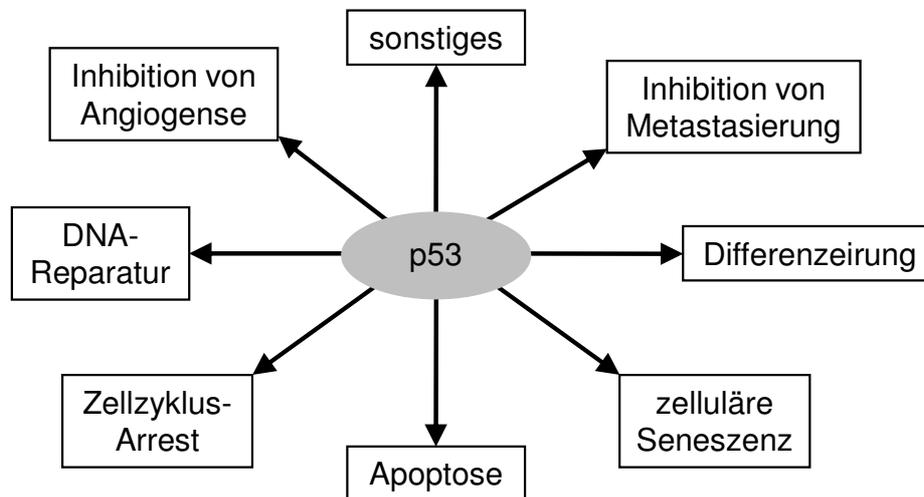
Elongation zu re-initiieren, wie am p21 Gen nach Stress-Induktion gezeigt wurde (Espinosa et al. 2003). Für diese Wirkungen ist jeweils die Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 an Response-Elemente notwendig.

Die Transkription kann durch p53 auch gehemmt werden. Die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen, über direkte Interaktion mit dem Co-Repressor mSin3a, revertiert die aktivierende Wirkung der Histontransacetylasen (Murphy et al. 1999). Ebenso abhängig von Sequenz-spezifischer DNA-Bindung ist die kompetitive Bindung von p53 gegenüber einem stärkeren Trans-Aktivator, wie HNF-3, bei überlappenden Response-Elementen auf der DNA (Lee et al. 1999). Unabhängig von Sequenz-spezifischer DNA-Bindung kann p53 reprimieren, indem es mit Transkriptions-Regulatoren – beispielsweise AP-1 – interagiert, wodurch deren aktivierende Funktion beeinträchtigt wird (Sun et al. 2004). Entsprechend ist die Transkription von TATA-Box enthaltenden Promotoren reprimiert, wenn p53 an das TATA-Bindungsprotein TBP gebunden ist und dadurch die basale Transkriptions-Maschinerie hemmt (Mack et al. 1993). Darüber hinaus kann Repression auch indirekt entstehen. Beispielsweise führt das positiv regulierte p53 Zielgen p21 – über das Retinoblastoma-Protein Rb und E2F Transkriptionsfaktoren – zu verminderter Transkription (Lohr et al. 2003).

### **1.2.8 Funktionen von p53**

Anhand von Keimbahn-Mutationen im TP53 Gen, die ursächlich für das autosomal dominant vererbte Li-Fraumeni Syndrom sind, wurde im Jahr 1990 erkannt, dass p53 ein Tumorsuppressor ist (Srivastava et al. 1990). Auf molekularer Ebene lässt sich die Funktion von p53 als Tumorsuppressor hauptsächlich durch seine Aktivität als Transkriptionsfaktor, aber auch durch Transkriptions-unabhängige Effekte erklären. Durch transienten Zellzyklus-Arrest verbunden mit DNA-Reparatur oder durch dauerhaften Arrest des Zellzyklus, mittels Differenzierung, zellulärer Seneszenz oder besonders mittels Apoptose, verhindert p53 die Entstehung von Tumoren aus potentiell entarteten Zellen (Abb. 1.8)(Helton & Chen 2007, Sengupta & Harris 2005, Lin et al. 2005, Feldser & Greider 2007, Cosme-Blanco et al. 2007,

Deng et al. 2008). Darüber hinaus inhibiert p53 in nachfolgenden Krebsstadien die Bildung von Metastasen und neuer Blutgefäße, wodurch das Tumorwachstum limitiert bleibt (Teodoro et al. 2006, Hendrix 2000, Ravi et al. 2000).



**Abb. 1.8:** Funktionen von p53.

Transienten Zellzyklus-Arrest, beispielsweise bei DNA-Schädigung vermittelt p53 über die direkte Trans-Aktivierung des Gens p21 (= CDKN1A, CIP1 und WAF1)(el-Deiry et al. 1993). Das p21 Protein ist ein Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen (Xiong et al. 1993). Die Hemmung des Komplexes aus Zyklin E und der Zyklin-abhängigen Kinase CDK2 führt zum Zellzyklus-Arrest in der späten G<sub>1</sub>-Phase. Dadurch ist Zeit für DNA-Reparatur vorhanden, wodurch verhindert wird, dass geschädigte DNA in der S-Phase repliziert wird. Nach Behebung der DNA-Schädigung wird der zytostatische Effekt von p53 beendet.

Schutz vor der Entstehung eines Tumors aus einer geschädigten Zelle kann p53 auch durch deren Eliminierung mittels Apoptose bewirken (Lowe et al. 1993). Apoptose ist ein aktiv und reguliert ablaufender Prozess, der zum programmierten Tod der Zelle führt. Apoptose kann über einen extrinsischen Zelloberflächenrezeptor-vermittelten oder einen intrinsischen Mitochondrien-vermittelten Signalweg ablaufen. Es wird davon ausgegangen, dass bei dem intrinsischen Signalweg die Oligomerisierung der pro-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder Bax und Bak zur Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrien-Membran und somit zu deren Permeabilisierung führt (Youle & Strasser 2008). Dadurch wird Cytochrom c aus dem Intermembran-Raum freigesetzt und bewirkt zusammen mit dem p53 Zielgen Apaf-1 die Bildung des sogenannten Apoptosoms, das den Anstoß zu einer Aktivierungskaskade von

Caspasen gibt (Moroni et al. 2001). Letztlich endet dies in den kennzeichnenden apoptotischen Merkmalen inklusive der Fragmentierung genomischer DNA, dem Verlust des asymmetrischen Aufbaus der Plasmamembran und der Ausbildung apoptotischer Vesikel (Krysko et al. 2008).

Normalerweise wird Apoptose durch ein Gleichgewicht der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak und der anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-XL verhindert (Youle & Strasser 2008). Die Bcl-2 Familienmitglieder Puma (= BBC3) und Noxa können an die anti-apoptotischen BH3-Proteine binden und ihnen entgegenwirken. Durch die p53-vermittelte Expression der pro-apoptotischen Proteine Bax, Puma und Noxa kann das Gleichgewicht in Richtung Apoptose verschoben werden (Miyashita & Reed 1995, Nakano & Vousden 2001, Oda et al. 2000a). Über seine nukleare Funktion als Transkriptionsfaktor hinaus, kann p53 direkt an den Mitochondrien Apoptose auslösen (Dumont et al. 2003, Mihara et al. 2003). Im Zusammenhang mit der aktivierenden Wirkung von p53 auf Bax und seiner Inhibition durch Interaktion mit Bcl-XL, wurde nachfolgendes Modell vorgeschlagen (Chipuk et al. 2004). Im Austausch gegen verstärkt exprimiertes Puma wird p53 aus der inhibierenden Interaktion mit Bcl-XL freigesetzt und führt zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-Membran (Chipuk et al. 2005). Alternativ könnte p53 anti-apoptotische BH3-Proteine abfangen und somit die Wirkung von pro-apoptotischen BH3-only Proteinen oder sogar von Bax und Bak selbst ermöglichen (Vousden 2005).

Zunehmend wird auch eine weiter reichende Bedeutung von p53 entdeckt. Beispielsweise ist p53 in Mäusen an der Implantation von Embryonen in die Gebärmutter und in Fröschen an der Festlegung der Keimschichten beteiligt (Hu et al. 2007, Sasai et al. 2008, Cordenonsi et al. 2003). Darüber hinaus spielt p53 eine Rolle bei der Adaptation an den Umweltreiz Sonnenstrahlung, bei der parakrinen Wachstums-Inhibition von umgebenden Zellen, bei der verzögerten Alterung und bei vielen anderen Prozessen (Cui et al. 2007, Komarova et al. 1998, Matheu et al. 2007).

### 1.2.9 Regulation der p53 Protein-Spiegel

Während die Transkription des TP53 Gens nicht bedeutend reguliert wird, sondern p53 konstitutiv schwach exprimiert wird, wird die Degradation und somit die Lebensdauer des p53 Proteins maßgeblich reguliert. Die E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2 bindet p53 an dessen Amino-Terminus (Aminosäurereste 18 bis 23) und bewirkt einerseits eine Inhibition seiner Trans-Aktivierungs-Aktivität und andererseits die Poly-Ubiquitinierung des p53 Carboxy-Terminus (Oliner et al. 1993, Kussie et al. 1996, Momand et al. 1992, Fuchs et al. 1998). Poly-ubiquitiniertes p53 wird im Zytoplasma durch das Proteasom degradiert. Da die Transkription von Mdm2 durch p53 induziert wird, besteht ein negativer Rückkopplungs-Mechanismus (Wu et al. 1993). Dieser bewirkt, dass p53 ein sehr kurzlebiges Protein ist und sein Protein-Spiegel in der Zelle niedrig ist (Kubbutat et al. 1997). Wird die Bindung von Mdm2 an p53 durch PTM oder Mutation unterbunden oder wird die Wirkung von Mdm2 anderweitig abgeschwächt – beispielsweise durch die HAUSP-vermittelte De-Ubiquitinierung – kommt es zur Akkumulation von p53 (Shieh et al. 1997, Li et al. 2002a).

### 1.2.10 Regulation der p53 Aktivität

Allgemein geht man bei der „Aktivierung“ von p53 davon aus, dass bedingt durch ein Stress-Signal p53 von unterschiedlichen Enzymen post-translational modifiziert wird. Diese PTM können sich direkt auf die DNA-Bindungseigenschaften, die Interaktion mit anderen Proteinen und die Degradation von p53 auswirkenden und somit die Aktivität von p53 und damit das Zell-Schicksal maßgeblich bestimmen (Gu & Roeder 1997, Shieh et al. 1997).

PTM von p53 umfassen Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, Neddylisierung, Glykosylierung, Ribosylierung und Konformations-Änderung durch Prolyl-Isomerisierung (Vogelstein et al. 2000, Toledo & Wahl 2006). Viele der beteiligten Enzyme modifizieren mehrere Positionen von p53 und ebenso können einzelne Positionen durch verschiedene Enzyme gleich oder unterschiedlich modifiziert werden (Abb. 1.9). Die bisher bekannten modifizierten Positionen befinden sich überwiegend in der Transaktivierungs-



et al. 2000b). Vereinzelt wurde auch über De-Phosphorylierung von p53 berichtet, beispielsweise an Serin 376 nach Bestrahlung (Li et al. 2007, Waterman et al. 1998).

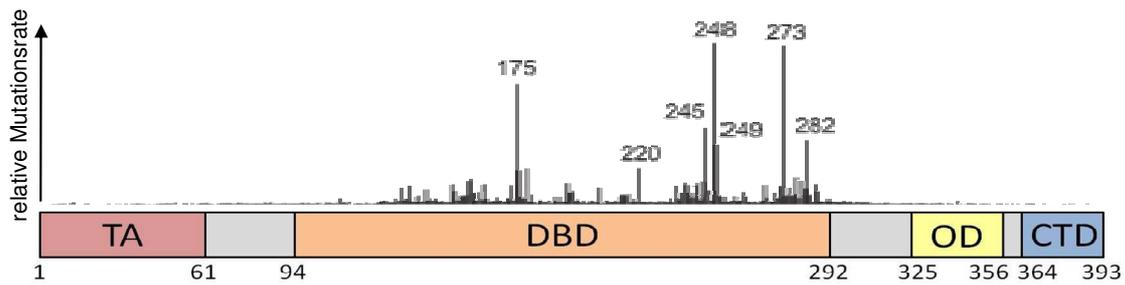
Nach DNA-Schädigung wird p53 an Lysin 320 durch PCAF acetyliert, wodurch die Sequenz-spezifische DNA-Bindung verstärkt wird (Sakaguchi et al. 1998). Diese Acetylierung scheint die Folge der Phosphorylierung von Serin 33 und von Serin 37 und der damit verbundenen besseren Bindung von PCAF an p53 zu sein. Andererseits kann durch Acetylierung von Lysinen im Carboxy-Terminus von p53 deren Ubiquitinierung durch Mdm2 kompetitiv verhindert werden und dadurch die Lebensdauer von p53 erhöht werden (Li et al. 2002b).

Abgesehen von PTM kann p53 durch Interaktion mit anderen Proteinen in seiner Aktivität reguliert werden. An die Schleifen L2 und L3 der DBD von p53 bindet 53BP2, ein Fragment des Proteins ASPP2 (Gorina & Pavletich 1996). ASPP2 und ASPP1 stimulieren p53 spezifisch zur DNA-Bindung und Trans-Aktivierung von pro-apoptotische Genen und führen dadurch zu verstärkter Apoptose (Samuels-Lev et al. 2001). Das anti-apoptotische Protein iASPP bindet p53 insbesondere an der Prolin-reichen Region und inhibiert die Bindung an den Promotor des Bax Gens (Bergamaschi et al. 2003 & 2006). Nach Phosphorylierung von Serin 46 vermittelt die Prolylisomerase Pin1 eine Konformationsänderung von p53, wodurch iASPP dissoziiert und seine inhibitorische Wirkung aufgehoben wird (Mantovani et al. 2007). Auf zweierlei Weise kann p53 durch die Amino-terminal verkürzte Isoform  $\Delta$ Np73 seines Familienmitglieds p73 gehemmt werden. Einerseits kann  $\Delta$ Np73 direkt mit p53 interagieren und andererseits kann  $\Delta$ Np73 mit p53 um die Bindung an Response-Elemente konkurrieren (Zaika et al. 2002, Stiewe et al. 2002).

Die Aktivität von p53 ist auch abhängig von seiner Lokalisation. Im Nukleus kann p53 aktiv als Transkriptionsfaktor sein, wohingegen p53 im Zytoplasma sein muss, um an den Mitochondrien Transkriptions-unabhängig Apoptose zu vermitteln. Der Transport von p53 durch die Kernporen ist abhängig von Kernlokalisations-Signalen, den zwei Kernexport-Signalen und PTM dieser Sequenzen (Shaulsky et al. 1990). Die p53 Polymorphismus-Variante mit Arginin an Position 72 wird stärker aus dem Nukleus exportiert, lokalisiert mehr an die Mitochondrien und führt zu mehr Apoptose als die Variante mit Prolin (Dumont et al. 2003).

### 1.2.11 Mutationen von p53

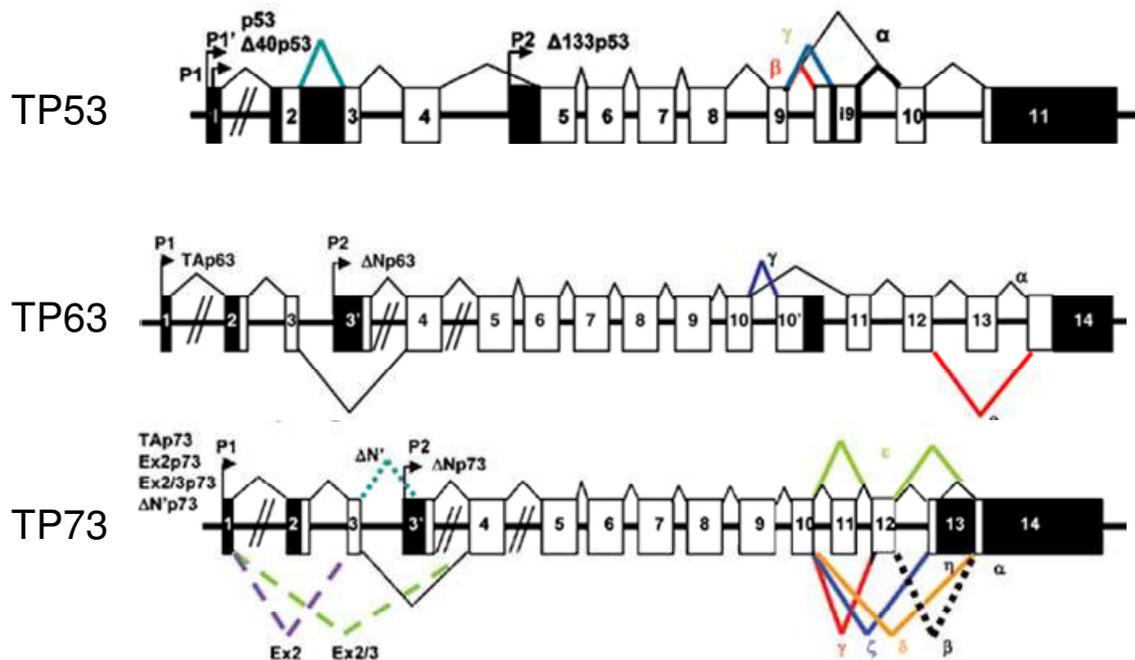
Ein Spektrum aus über 15000 verschiedenen Mutationen führt zur Inaktivierung von p53 in 50% aller Tumore (IARC Mutations-Datenbank, Olivier et al. 2002). Die Inaktivierung von p53 durch Mutationen oder durch einen gestörten p53 Signalweg ist ein wichtiger Schritt bei der Krebsentstehung, wie es sich anhand von Keimbahn-Mutationen beim Li-Fraumeni-Syndrom zeigt. Dieses Syndrom ist durch ein familiär drastisch erhöhtes Auftreten von diversen Tumoren, wie Brustkarzinome, Sarkome und Gehirntumore, bereits vor dem 45. Lebensjahr gekennzeichnet. Tumor-relevante Mutationen führen in 75% zum Austausch eines einzelnen Aminosäurerestes (Missense-Mutation) und sind damit gegenüber anderen Mutationen, wie Deletionen und Nonsense-Mutationen, in p53 stark angehäuft (Robles et al. 2002). Diese Mutationen liegen ihrerseits zu 95% in der DBD, wobei einige Aminosäurereste besonders stark betroffen sind (Abb. 1.10). Man unterscheidet die zwei Klassen DNA-Kontakt- und Struktur-Mutationen (Rolley et al. 1995). Erstere betreffen insbesondere die Aminosäuren 248 und 273, während letztere unter anderem die Aminosäuren 175, 245, 249 und 282 betreffen und zu globalen Strukturveränderungen von p53 führen, die seine DNA-Bindung zerstören. Beide Klassen unterbinden die Funktion von p53, wodurch die Rückkopplung mit Mdm2 unterbunden ist und die Protein-Spiegel von mutiertem p53 stark ansteigen. Die tumorsuppressive Funktion von p53 ist bereits gestört, wenn nur eines der beiden TP53 Allele mutiert ist (Nister et al. 2005). Dieses Verhalten entspricht nicht Knudsons Schema eines Tumorsuppressor, kann aber – wie auch die häufigen Missense-Mutationen – durch einen dominant-negativen Effekt von mutiertem p53 erklärt werden (Knudson 1971, Willis et al. 2004). Denn die Bildung von Tetrameren führt dazu, dass mutiertes p53 nicht nur inaktiv ist, sondern zusätzlich durch Oligomerisierung mit wildtypischem p53 dessen Funktion – zumindest als Transkriptionsfaktor – stört (Heyne et al. 2008).



**Abb. 1.10:** Häufigkeitsverteilung der Missense-Mutationen von p53 in humanen Tumoren. Die relative Mutationsrate jedes Aminosäurerestes ist als schwarzer Balken aufgetragen, wobei besonders häufig veränderte Reste bezeichnet sind (IARC Mutations-Datenbank, Olivier et al. 2002). TA, Transaktivierungs-Domäne; DBD, zentrale DNA-Bindungs-Domäne; OD, Oligomerisierungs-Domäne; CTD, Carboxy-terminale Domäne. Verändert nach Joerger & Fersht 2008.

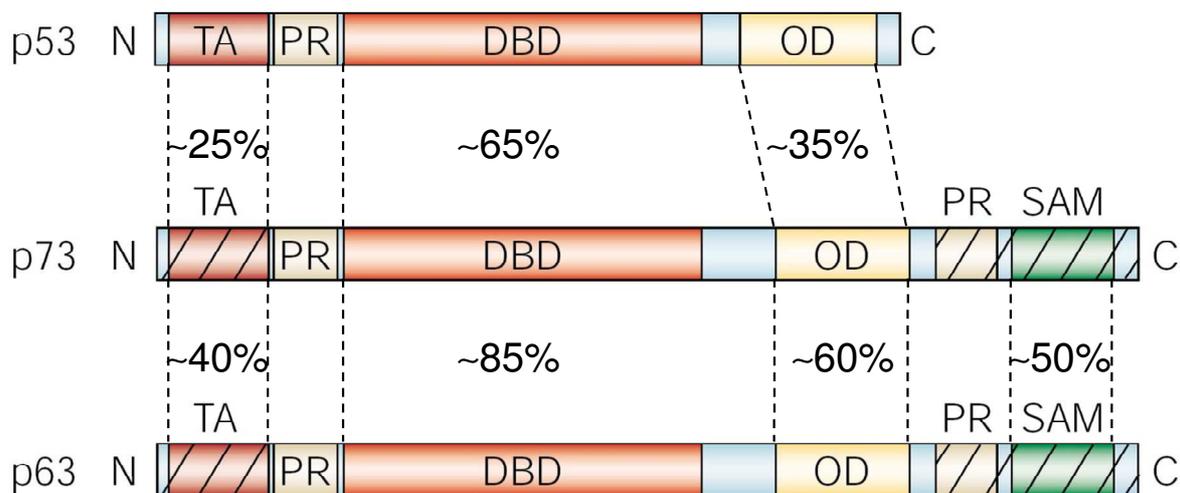
### 1.3 Die p53 Familie

Die p53 Familie umfasst neben TP53 auch dessen paraloge Gene TP63 und TP73 (Abb. 1.11) (Osada et al. 1998, Kaghad et al. 1997, Yang et al. 1998). Das humane TP63 Gen besteht aus 14 Exonen und kann vom Promotor P1 und dem im Intron 3 gelegenen Promotor P2 transkribiert werden. Die Transkripte werden alternativ gespleißt, wodurch sechs unterschiedliche Protein-Isoformen entstehen können. Das ebenfalls aus 14 Exonen bestehende Gen TP73 kann ebenfalls von zwei Promotoren transkribiert werden und wird noch vielfältiger alternativ gespleißt. Der Promotor P1 von TP73 enthält mehrere Response-Elemente des Transkriptionsfaktors E2F-1, durch den er reguliert wird (Irwin et al. 2000, Stiewe & Pützer 2000, Beitzinger et al. 2008). Darüber hinaus wird TP73 durch muskelspezifische Transkriptionsfaktoren wie MyoD, die innerhalb des ersten Introns binden, reguliert (Fontemaggi et al. 2005). Der P2 Promotor von TP73 wird über ein enthaltenes p53 Response-Element direkt durch p53 Familienmitglieder reguliert (Vossio et al. 2002, Kartasheva et al. 2002).



**Abb. 1.11:** Schematischer Aufbau des humanen TP53, des TP63 und des TP73 Gens. Alternative Promotoren beziehungsweise alternative Carboxy-terminale Spleißvarianten sind mit P1, P1' und P2 beziehungsweise alpha, beta, gamma, delta, epsilon, und eta eingezeichnet. Aus Murray-Zmijewski et al. 2006.

Die Proteinstruktur der p53 Familienmitglieder ist konserviert, wobei die größte Identität zwischen den DBD besteht, insbesondere zwischen denen von p63 und p73 (Abb. 1.12). Die Proteine p63 und p73 bestehen wie p53 aus einer Transaktivierungs-Domäne, einer zentralen DBD und einer Oligomerisierungs-Domäne. Die Proteine voller Länge p63alpha und p73alpha sind aus 641 beziehungsweise 636 Aminosäureresten aufgebaut und damit ein ganzes Stück länger als p53. Statt der CTD von p53 enthalten p63alpha und p73alpha am Carboxy-Terminus eine Sterile-alpha-Motiv-Domäne, die möglicherweise Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, und eine Transkriptions-inhibierende Domäne (Chi et al. 1999, Serber et al. 2002, Liu & Chen 2005). Zusätzlich zu den Proteinen voller Länge gibt es bei allen p53 Familienmitgliedern Amino- und Carboxy-terminal verkürzte Isoformen (Murray-Zmijewski et al. 2006). So führt alternatives Spleißen bei p73 zu insgesamt sieben Isoformen mit unterschiedlichen Carboxy-Termini. Nutzung des internen Promotors sowie alternatives Spleißen und Nutzung eines alternativen Translationsstarts führen zu den delta Np73 Isoformen, denen die Transaktivierungs-Domäne fehlt (Grob et al. 2001).



**Abb. 1.12:** Schematischer Aufbau der humanen p53, p63 und p73 Proteine voller Länge. Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenzen unterschiedlicher Bereiche ist angegeben. Unterschiedliche Isoformen von p63 und p73 sind schraffiert und die Proteinlängen verzerrt dargestellt. TA, Transaktivierungs-Domäne; PR, Prolin-reiche Region; OD, Oligomerisierungs-Domäne; SAM, Sterile- $\alpha$ -Motiv-Domäne. Verändert nach Melino et al. 2002 und Yang et al. 2002.

Die p73 Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  sind in zahlreichen Organen exprimiert. Generell ist p73 $\alpha$  die vorherrschend exprimierte Isoform, jedoch ist der Expressionslevel äußerst niedrig (Ikawa et al. 1999). Während in Mäusen bei der Embryogenese  $\Delta$ Np73 Proteine die am stärksten exprimierten p73 Isoformen sind, sind sie in humanen Geweben und Zelllinien nur schwach exprimiert (Yang et al. 2000, Pozniak et al. 2000, Grob et al. 2001).

Wie p53 sind p63 und p73 Transkriptionsfaktoren, die p53 Response-Elemente erkennen und Zellzyklus-Arrest sowie Apoptose induzieren (Smeenk et al. 2008, Kaghad et al. 1997, Jost et al. 1997). Die Aktivität der Trans-Aktivierung unterscheidet sich nicht nur zwischen den Familienmitgliedern sondern auch in Abhängigkeit vom Proteinspiegel, von der Zelllinie, vom untersuchten Zielgen und von der Carboxy-terminalen Isoform, wobei p73 $\beta$  generell aktiver als p73 $\alpha$  ist (De Laurenzi et al. 1998, Ueda et al. 1999, Beitzinger et al. 2008, Lee & Thangue 1999, Momii et al. 2007, Di Como et al. 1999). Trotz der Gemeinsamkeiten von p53, p63 und p73 unterscheiden sich ihre Funktionen (Tab. 1.1). Die p53 Knockout-Mäuse sind lebensfähig, leiden selten unter einem Entwicklungsdefekt des Neuralrohrs oder geringer Fertilität, aber entwickeln spontane Tumore (Donehower et al. 1992). Im Gegensatz dazu haben p73 Knockout-Mäuse massive Entwicklungsstörungen, die sich in neuralen Defekten, Entzündungs-, Infektions- und Geruchsstörungen manifestieren und meist zum Tod

innerhalb der ersten zwei Monate nach der Geburt führen (Yang et al. 2000). Der Knockout von p63 hat die stärksten Entwicklungsdefekte aller p53 Familienmitglieder zur Folge; insbesondere gekennzeichnet durch die fehlende Epithel-Bildung, die zum Tod innerhalb weniger Stunden nach der Geburt führt (Yang et al. 1999, Mills et al. 1999).

	Zellzyklus-Arrest	Apoptose	Entwicklung	Knockout
p53	+++	+++	+	Tumore
p73	++	++	+++	neuronal
$\Delta$ Np73	-	-	+++	
p63	++	+	+++	epithelial
$\Delta$ Np63	-	-	++	

**Tab. 1.1:** Vergleich der Funktion der p53 Familienmitglieder. Verändert nach Ramadan et al. 2005 und Melino et al. 2002.

Entsprechend seiner Funktion als Tumorsuppressor ist p53 in Tumoren in über 50% durch Mutationen inaktiviert (IARC Mutations-Datenbank, Olivier et al. 2002). Hingegen ist p73 selten durch Mutationen inaktiviert, sein Protein-Spiegel ist in vielen Tumorzelllinien erhöht und bei Knockout-Mäusen wurde ursprünglich keine erhöhte Rate an spontanen Tumoren festgestellt (Kaghad et al. 1997, Yang et al. 2000). p63 ist in Tumoren ebenfalls selten mutiert, jedoch ist sein genomischer Bereich häufig amplifiziert (Osada et al. 1998, Yang et al. 1998). Diese Daten sprechen eher für eine onkogene als tumorsuppressive Funktion von p63 und p73, werden aber durch dominant-negative Effekte der Amino-terminal verkürzten Isoformen verursacht. Dem  $\Delta$ Np73 Protein fehlt die Transaktivierungs-Domäne, jedoch kann es über die DBD weiterhin an p53 Response-Elemente binden und inhibiert dadurch kompetitiv andere p53 Familienmitglieder (Stiewe et al. 2002). Darüber hinaus kann  $\Delta$ Np73 direkt andere p73 Isoformen inhibieren, indem es über seine Oligomerisierungs-Domäne mit ihnen Heterooligomere bildet (Nakagawa et al. 2002, Pozniak et al. 2000, Zaika et al. 2002). Somit wirkt  $\Delta$ Np73 als sehr effizienter dominant-negativer Inhibitor von p73 und der ganzen

p53 Familie (Stiewe et al. 2002). Neuere Daten von TP63 und TP73 heterozygoten Mäusen zeigten jedoch tumorsuppressive Funktion von p63 und p73 sowie ihre Kooperation mit p53 (Flores et al. 2005).

#### **1.4 Ziele dieser Arbeit**

Für einen Transkriptionsfaktor stellt die DNA-Bindung eine funktionelle Notwendigkeit dar. Die tumorsuppressive Funktion von p53 ist maßgeblich auf seine Aktivität als Transkriptionsfaktor zurückzuführen. Folglich spielt die DNA-Bindung eine zentrale Rolle für das Verständnis von p53 sowie der anderen p53 Familienmitglieder.

Die DNA-Bindung von p53 wird nicht nur von der zentralen DBD bestimmt, sondern auch durch die CTD, die Sequenz-unabhängige DNA-Bindung vermittelt. Die Carboxy-Termini der p73 Isoformen haben ebenfalls Einfluss auf ihre Trans-Aktivierung. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Carboxy-Termini von p53 und von p73 Isoformen bei der Sequenz-spezifischen und Sequenz-unabhängigen DNA-Bindung sowie bei der Expression von Zielgenen untersucht werden.

Der Tumorsuppressor p53 induziert sowohl Zellzyklus-Arrest als auch Apoptose. Auf welche Weise gezielt eine der beiden Möglichkeiten ausgelöst wird, ist jedoch weitgehend unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass sich die Bindung von p53 an Response-Elemente von pro- und anti-apoptischen Genen unterscheidet. Hierbei könnte die Kooperativität der DNA-Bindung, die durch die H1-Helices vermittelt wird, von zentraler Bedeutung sein. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte daher die Rolle der H1-Helix bei der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53 und bei seiner Entscheidung über das Zellschicksal analysiert werden.

## 2. Material

### 2.1 Organismen

Bakterienstämme:

Name	Verwendung
DH10B	Klonierung
TOP10 F	Klonierung
Mach1	Klonierung
XL10-Gold	Mutagenese
BJ5183	Rekombination mit adenoviralen Vektor

Zelllinien:

Name	Verwendung
H1299 (p53 <sup>-/-</sup> )	Experimente
Saos-2 (p53 <sup>-/-</sup> )	Experimente
Ad293	Herstellung von Adenoviren

### 2.2 Vektoren (Plasmide und Adenoviren)

Anmerkung: Bei den p53 Familienmitgliedern handelt es sich immer um die humanen Varianten.

Name	Verwendung	Ursprung
pENTR/D-TOPO	Klonierung	Invitrogen
pENTR/D-p53	Klonierung	Arbeitsgruppe
pENTR/D-p73a	Klonierung	Arbeitsgruppe
pENTR/D-p53D30	Klonierung	hergestellt
pENTR/D-p73a+30	Klonierung	hergestellt
pENTR/D-p53[S183A]	Klonierung	hergestellt
pENTR/D-p53[S183D]	Klonierung	hergestellt
pENTR/D-p53[S183E]	Klonierung	hergestellt
pEXP1-DEST	Klonierung	Invitrogen
pEXP1-DEST-p53	EMSA	Arbeitsgruppe
pEXP1-DEST-p73 $\alpha$	EMSA	Arbeitsgruppe
pEXP1-DEST-p73 $\beta$	EMSA	Arbeitsgruppe
pEXP1-DEST-p73 $\gamma$	EMSA	Arbeitsgruppe
pEXP1-DEST-p73 $\delta$	EMSA	Arbeitsgruppe
pEXP1-DEST-p53 $\Delta$ 30	EMSA	Arbeitsgruppe

pEXP1-DEST-p73 $\alpha$ +30	EMSA	Arbeitsgruppe
pEXP1-DEST-p53EL	EMSA	Arbeitsgruppe
pEXP1-DEST-p53RE	EMSA	Arbeitsgruppe
pEXP1-DEST-p53[S183A]	EMSA	hergestellt
pEXP1-DEST-p53[S183D]	EMSA	hergestellt
pEXP1-DEST-p53[S183E]	EMSA	hergestellt
pUC19-Sfil-T7	Klonierung, Luziferase-A.	Rob Chapman
pUC19-Sfil-T7-FlagHA-p53-YFP	Klonierung	Sauer 2005 Diplomarbeit
pUC19-Sfil-T7-FlagHA-p53 $\Delta$ 30-YFP	Klonierung	hergestellt
pUC19-Sfil-T7-FlagHA-p73 $\alpha$ -YFP	Klonierung	hergestellt
pUC19-Sfil-T7-FlagHA-p73 $\alpha$ +30-YFP	Klonierung	hergestellt
pRTS-1 ("pEBNA-SVH-NL")	Klonierung	Bornkamm et al. 2005
pRTS-1-T7-FlagHA-p53-YFP	FRAP	Sauer 2005 Diplomarbeit
pRTS-1-T7-FlagHA-p53 $\Delta$ 30-YFP	FRAP	hergestellt
pRTS-1-T7-FlagHA-p73 $\alpha$ -YFP	FRAP	hergestellt
pRTS-1-T7-FlagHA-p73 $\alpha$ +30-YFP	FRAP	hergestellt
pEYFP-N1	FRAP	Clontech
pEYFP-N1-H2B	FRAP	hergestellt
pEYFP-N1-Flag-p53	FRAP	hergestellt
pEYFP-N1-Flag-p53 $\Delta$ 30	FRAP	hergestellt
pAd-Track-CMV-ccdB	Klonierung	Arbeitsgruppe
pAdTrack-CMV-HA-p53	Klonierung	hergestellt
pAdTrack-CMV-HA-p53 $\Delta$ 30	Klonierung	hergestellt
pAdTrack-CMV-HA-p73 $\alpha$	Klonierung	hergestellt
pAdTrack-CMV-HA-p73 $\alpha$ +30	Klonierung	hergestellt
pAdGFP-HA-p53	Klonierung	hergestellt
pAdGFP-HA-p53 $\Delta$ 30	Klonierung	hergestellt
pAdGFP-HA-p73 $\alpha$	Klonierung	hergestellt
pAdGFP-HA-p73 $\alpha$ +30	Klonierung	hergestellt
pCMV-neo-BamHI-ccdB	Klonierung	Arbeitsgruppe
pCMV-neo-BamHI-p53	Luziferase-A.	Arbeitsgruppe
pCMV-neo-BamHI-p53EL	Luziferase-A.	Arbeitsgruppe
pCMV-neo-BamHI-p53RE	Luziferase-A.	Arbeitsgruppe
pCMV-neo-BamHI-p53[S183A]	Luziferase-A.	hergestellt
pCMV-neo-BamHI-p53[S183D]	Luziferase-A.	hergestellt
pCMV-neo-BamHI-p53[S183E]	Luziferase-A.	hergestellt
p21-Luc	Luziferase-A.	el-Deiry et al. 1993
p53AIP1-Luc	Luziferase-A.	Oda et al. 2000b
pBV-Puma(Frag1)-Luc	Luziferase-A.	Yu et al. 2001
BAX-Luc	Luziferase-A.	Miyashita & Reed 1995
pGL3-Mdm2	Luziferase-A.	Arbeitsgruppe
p53cons-Luc	Luziferase-A.	Stiewe & Pützer 2000
AdGFP	ChIP, Genex., FACS	Arbeitsgruppe
AdGFP-HA-p53	ChIP, Genex., FACS	hergestellt
AdGFP-HA-p53 $\Delta$ 30	ChIP, Genex., FACS	hergestellt
AdGFP-HA-p73 $\alpha$	ChIP, Genex., FACS	hergestellt
AdGFP-HA-p73 $\alpha$ +30	ChIP, Genex., FACS	hergestellt

AdGFP-Flag-p53	Immunfluoreszenz	Arbeitsgruppe
AdGFP-Flag-p53EE	Immunfluoreszenz	Arbeitsgruppe
AdGFP-Flag-p53EL	Immunfluoreszenz	Arbeitsgruppe
AdGFP-Flag-p53LR	Immunfluoreszenz	Arbeitsgruppe
AdGFP-Flag-p53RE	Immunfluoreszenz	Arbeitsgruppe
AdGFP-Flag-p53RR	Immunfluoreszenz	Arbeitsgruppe

Abkürzungen: EMSA („electrophoretic mobility shift assay“), Luciferase-A. (Luciferase-Reporter-Assay), ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation), Genex. (Genexpressions-Analysen auf mRNA-Ebene mittels quantitativer PCR bzw. Microarray), FACS (Durchfluß-Zytometrie), FRAP („fluorescence recovery after photobleaching“)

## 2.3 Oligonukleotide

Anmerkung: Analysen wurden immer für das humane Genom beziehungsweise Transkriptom durchgeführt. Oligonukleotide wurden von MWG, Metabion oder Sigma-Aldrich hergestellt. Oligonukleotide für eine Mutagenese waren am 5'-Ende phosphoryliert.

Name	Sequenz	Verwendung
p53-EGFP-S	CAGGTACCATGGAGGAGCCGCGAGTCAGAT	Klonierung
p53-EGFP-AS	CAGGATCCGAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGT	Klonierung
H2B-KpnI-S	CGGGTACCGCCACCATGCCAGAGCCAGCGAAGTC	Klonierung
H2B-BamHI-AS	CGGGATCCTTAGCGCTGGTGTACTTGGTGAC	Klonierung
ENTR-p53-S	CACCATGGAGGAGCCGCGAGTCA	Klonierung
ENTR-p53-R	TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC	Klonierung
ENTR-p73-S	CACCATGGCCCAGTCCACCGCC	Klonierung
ENTR-p73a-AS	TCAGTGGATCTCGGCCTCCGT	Klonierung
p53D30-ENTR-AS	TCACCTGCTCCCCCTGGCTC	Klonierung
p53D30-EGFP-AS	CAGGATCCGACCTGCTCCCCCTGGCTC	Klonierung
p73+30-S	CGAGATCCACGCTCACTCCAGCCACCTGAAG	Klonierung
p73+30-AS	TGGAGTGAGCGTGGATCTCGGCCTCCGTGAA	Klonierung
p53S183Emut-P	P-CCATGAGCGCTGCGAAGATAGCGATGGTCTGGC	Mutagenese
p53S183Dmut-P	P-CCATGAGCGCTGCGATGATAGCGATGGTCTGGC	Mutagenese
p63S183Amut-P	P-CCATGAGCGCTGCGCAGATAGCGATGGTCTGGC	Mutagenese
M13_for	GTAAAACGACGGCCAG	Sequenzierung
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung
EGFP-N1-F	GAGGTCTATATAAGCAGAGC	Sequenzierung
EGFP-C1-R	CACGAACTCCAGCAGGACCATG	Sequenzierung
p53wt-B	GGGTAGACATGCCTAGACATGCCTAAGCTCCC	EMSA

p53wt-A	GGGAGCTTAGGCATGTCTAGGCATGTCTACCC	EMSA
p53scrambled-A	GGGCCAGCTAGCAGGCAGCATCAGTACTTCCC	EMSA
p53scrambled-B	GGGAAGTACTGATGCTGCCTGCTAGCTGGCCC	EMSA
p21-5kurz-S	TCAGGAACATGTCCCAACATGTTGAGCT	EMSA
p21-5kurz-AS	AGCTCAACATGTTGGGACATGTTCTGA	EMSA
p21-5-66bp-S	AGCATTGGCGGGCTGGCCATCAGGAACATGTCCC AACATGTTGAGCTCTGGCATAGAAGAGGCGCT	EMSA
p21-5-66bp-ASu	AGCGCCTCTTCTATGCCAGAGCTCAACATGTTGGG ACATGTTCTGATGGCCAGAAAGCCAATGCT	EMSA
RTGAPDH_for	AATGGAAATCCCATCACCATCT	qPCR
RTGAPDH_rev	CGCCCCACTTGATTTTGG	qPCR
RTp21_for	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	qPCR
RTp21_rev	CCGGCGTTTGGAGTGGTA	qPCR
Hs_TMPO_1_SG	QuantiTectPrimer	qPCR
Hs_S100A2_1_SG	QuantiTectPrimer	qPCR
Hs_BBC3_1_SG	QuantiTectPrimer	qPCR
Hs_FDXR_1_SG	QuantiTectPrimer	qPCR
Hs_JAG2_1_SG	QuantiTectPrimer	qPCR
Hs_GDF15_1_SG	QuantiTectPrimer	qPCR
Hs_CDC2_1_SG	QuantiTectPrimer	qPCR
Hs_MCM4_1_SG	QuantiTectPrimer	qPCR
BaxIntr_ChIP_S3	TCTCTGATCCCCGTGTCCC	ChIP
BaxIntr_ChIP_AS3	GCTTCCGAGATCCCCTGGT	ChIP
p21-5'_ChIP_S	AGCAGGCTGTGGCTCTGATT	ChIP
p21-5'_ChIP_AS	CAAATAGCCACCAGCCTCTTCT	ChIP
p21-3'_ChIP_S	CTGTCCTCCCCGAGGTCA	ChIP
p21-3'_ChIP_AS	ACATCTCAGGCTGCTCAGAGTCT	ChIP
GAPDH_ChIP_for	GTATCCCCCAGGTTTACAT	ChIP
GAPDH_ChIP_rev	TTCTGTCTTCCACTCACTCC	ChIP
ChIP-PUMA-S2	GCGAGACTGTGGCCTTGTGT	ChIP
ChIP-PUMA-AS2	CGTTCCAGGGTCCACAAAGT	ChIP
Mdm2-ChIP-S4	GTTCAAGTGGCAGGTTGAC	ChIP
Mdm2-ChIP-AS4	CAGCTGGAGACAAGTCAGGA	ChIP
Noxa-ChIP-S2	CAGCGTTTGCAGATGGTCAA	ChIP
Noxa-ChIP-AS2	CCCCGAAATTACTTCCTTACAAAA	ChIP
CASP1-ChIP-S1	GGCCTGTACATGTATTGGGAA	ChIP
CASP1-ChIP-AS1	GATCTATCCAAGGGCTGGTG	ChIP
p53AIP1-ChIP-S1	GCTGCCCTCCCTTCTCCTAG	ChIP
p53AIP1-ChIP-AS1	CCCCGACTTTGGAGTAGTCTGA	ChIP

Abkürzungen: EMSA („electrophoretic mobility shift assay“), Luciferase-A. (Luciferase-Reporter-Assay), ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation), qPCR (quantitative PCR) Genexpressions-Analysen auf mRNA-Ebene)

## 2.4 Antikörper

Name	Antigen	Hersteller	Organismus	Klon	Verwendung
HA-probe (Y-11)	HA	Santa Cruz Biotech	Kaninchen	poly	ChIP, WB, EMSA
SV40 T-antigen (Pab101)	largeT	Santa Cruz Biotech	Maus	poly	EMSA, ChIP
DO-1	p53	Dr. B. Vojtesek	Maus	mono	ChIP, WB
PAb421	p53	Calbiochem	Maus	mono	EMSA
$\beta$ -Actin (AC-15)	$\beta$ -Aktin	Abcam	Maus	mono	WB
His-probe	His	Santa Cruz Biotech	Maus	mono	WB
His	His	Qiagen	Maus	mono	WB
ECL Mouse IgG	IgG	GE Healthcare	Schaf	poly	WB
ECL Rabbit IgG	IgG	GE Healthcare	Esel	poly	WB
Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG	IgG	Molecular Probes	Ziege	poly	IF
p53 S183 Phospho-spezifisch	p53	Eurogentic	Kaninchen	poly	IB
p53 S183 nicht Phospho-spezifisch	p53	Eurogentic	Kaninchen	poly	IB

Abkürzungen: ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation), WB (Westernblot), EMSA („electrophoretic mobility shift assay“), IF (Immunfluoreszenz-Zytochemie), IB (Immunblot)

## 2.5 Käufliche Komplettausstattungen

Artikel	Hersteller	Verwendung
NucleoSpin Plasmid & Nucleobond PC100	Macherey-Nagel	Plasmid-Isolierung
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega	Gel-Extraktion / DNA-Aufreinigung
multi-site directed Mutagenesis Set	Stratagene	Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese
pENTR/D-TOPO Cloning Kit	Invitrogen	Topo-Ligation
LR Clonase enzyme mix	Invitrogen	<i>in vitro</i> Rekombination
TNT Quick Coupled Transcription/Translation	Promega	<i>in vitro</i> Translation
Micro Bio-Spin Column in Tris buffer	Bio-Rad	Gelfiltrations-Chromatographie
Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit	Molecular Probes	RNA-Konzentrationsbestimmung
Escort V Transfection Reagent	Sigma-Aldrich	Transfektion
Luciferase Assay System	Promega	Luziferase-Reporter-Assay
RNeasy Mini Kit & QIAshredder Säulen	Qiagen	RNA-Isolierung
RNase-Free DNase Set	Qiagen	RNA-Isolierung

Omniscript RT Kit	Qiagen	reverse Transkription
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen	reverse Transkription
NuPAGE Gelsystem	Invitrogen	SDS-PAGE
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Pierce	verstärkte Chemi-Lumineszenz
Bradford Protein Assay	Bio-Rad	Protein-Konzentrationsbestimmung
SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix	Sigma-Aldrich	quantitative PCR
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen	quantitative PCR

## 2.6 Sonstige Artikel

Einweg-Plastikartikel für alle Arbeiten inklusive Zellkultur wurden von Sarstedt, Greiner Bio-one und Roth bezogen. Chemikalien wurden von Applichem, Roth, Fluka und Sigma-Aldrich bezogen.

Artikel	Hersteller	Verwendung
Restriktions-Endonukleasen (diverse)	New England Biolabs	Klonierung
Restriktions-Endonukleasen (diverse)	Fermentas	Klonierung
alkalische Phosphatase (CIAP)	Fermentas	Klonierung
T4-DNA-Ligase	Fermentas	Klonierung
Pfu Ultra DNA Polymerase	Stratagene	Klonierung
Desoxynukleotitriphosphat-Mix (dNTPs)	Fermentas	Klonierung
DNA-Längenstandard GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas	Klonierung
Elektroporations-Küvette	Eurogentic	Klonierung
Dulbeccos's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich	Zellkultur
fötale Kälber-Serum (FCS)	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Penizillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Ampoterizin B	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Ciprofloxacin	Apotheke Uniklinik Würzburg	Zellkultur
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Elektroporations-Küvette	Eurogentic	Zellkultur
Hygromycin B	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Doxyzyklin	Sigma-Aldrich	Zellkultur
DMEM ohne Phenolrot	PAN Biotch	Zellkultur
T4-Polynukleotidkinase	Fermentas	EMSA
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP (10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l)(10 pmol/ $\mu$ l)	Amersham	EMSA
Protease-Inhibitor-Cocktail Complete ohne EDTA	Roche	EMSA
gescheerte Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich	EMSA
DNA-Ladepuffer (6x)	Fermentas	EMSA

Objektträger	Roth	IF
Deckgläschen	Knittel Gläser	IF
Fluoromount-G	Southernbiotech	IF
Proteinase K	Appllichem	ChIP
Protein G Agarose/Salmon Sperm DNA	Upstate	ChIP
eng-lumige Kanüle	Braun	ChIP
RNase A	Appllichem	ChIP
Glykogen	Fermentas	ChIP
RNAlater	Qiagen	qPCR
Oligonukleotid-Hexameren	Roche	qPCR
GeneChip Human Genome U133a 2.0	Affimetrix	Microarray
p53 Peptid (Reste 178-190)	Eurogentic	WB
p53 Peptid (Reste 178-190), phosphoryliert	Eurogentic	WB
Protein-Standard I	Bio-rad	WB
Protein-Längenstandard PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas	WB
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell	WB
Nitrocellulose-Membran Hybond-ECL	Amersham	WB
X-Ray developer LX 24	Kodak	WB
X-Ray fixer AL4	Kodak	WB
Röntgenfilm Retina	Fotochemische Werke Berlin	WB
Röntgenfilm Biomax MS	Kodak	WB

Abkürzungen: EMSA („electrophoretic mobility shift assay“), IF (Immunfluoreszenz-Zytochemie), ChIP (Chromatin-Immunopräzipitation), qPCR (quantitative PCR), WB (Westernblot)

## 2.7 Hergestellte Lösungen

10% FCS-Medium	
500 ml	DMEM
50 ml	FCS
5 ml	Penizillin/Streptomycin
2 ml	Amphoterin B
ggf. 2 ml	Ciprofloxacin

Hybridisierungs-Puffer	
100 mM	KAc
30 mM	HEPES-KOH pH 7,4
2 mM	MgAc

Cytomix-Lösung	
120 mM	KCl
0,15 mM	CaCl <sub>2</sub>
10 mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,6
25 mM	HEPES pH 7,6
2 mM	EGTA pH 7,6
10%	FCS
0,1 M	ATP
0,25 M	reduziertes Glutathion

EMSA-Puffer (10x)	
200 mM	HEPES pH 7,9
600 mM	KCl
60 mM	MgCl <sub>2</sub>
5 mM	EDTA
0,08%	NP40

LiCl-Puffer	
250,0 mM	LiCl
1,00%	IGEPAL-CA630
1,00%	Deoxycholic Acid
2,0 mM	EDTA
20,0 mM	Tris

TBE-Puffer (10x)	
108 g	Tris
55 g	Borsäure
40 ml	0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0
bis 1l	Wasser

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

SDS-Lysis-Puffer	
1%	SDS
10 mM	EDTA
50 mM	Tris

Elution-Puffer	
1%	SDS
50 mM	NaHCO <sub>3</sub>

Dilution-Puffer	
0,01%	SDS
1,10%	Triton X-100
1,2 mM	EDTA
16,7 mM	Tris
167,0 mM	NaCl

RIPA-Puffer	
50 mM	Tris-HCl pH 7,2
150 mM	NaCl
0,1%	SDS
1%	Natriumdeoxychololat
1%	Triton X-100

Low Salt-Puffer	
0,10%	SDS
1,00%	Triton X-100
2,0 mM	EDTA
20,0 mM	Tris
150,0 mM	NaCl

SDS-Laufpuffer (10x)	
30,24 g	Tris
187,68 g	Glycin
100 g	SDS
bis 1l	Wasser

High Salt-Puffer	
0,10%	SDS
1,00%	Triton X-100
2,0 mM	EDTA
20,0 mM	Tris
500,0 mM	NaCl

Blott-Puffer (1x)	
14,56 g	Glycin
3,03g	Tris
15 ml	Methanol
bis 1l	Wasser

TBS-Puffer	
50 mM	Tris
150 mM	NaCl
pH 7,5	HCl

TBST0,1-Puffer	
50 mM	Tris
150 mM	NaCl
pH 7,5	HCl
0,1%	Tween 20

FACS-Lösung	
	PBS
100 µg/ml	RNase A
10 µg/ml	Propidiumjodid

## 3 Methoden

### 3.1 Grundlegende DNA-Techniken

Manipulation, Vervielfältigung, Überprüfung und Quantifizierung von DNA erfolgte nach Standardmethoden (Sauer 2005 Diplomarbeit) beziehungsweise nach Herstellerangaben bei käuflichen Komplettausstattungen (Abschnitt 2.5). DNA-Sequenzierungen erfolgten durch AGOWA mittels Kettenabbruchreaktion.

### 3.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen wurden bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid in „10% FCS-Medium“ kultiviert. Regelmäßig wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung gelöst und auf eine frische Zellkulturschale gesplittet.

Zur Konservierung wurden Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung gelöst, bei 200 x g sedimentiert, in 20% FCS-Medium mit zusätzlich 10% DMSO resuspendiert, in Kryo-Röhrchen überführt und mit -1 °C/h eingefroren. Anschließend wurden sie zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur stabilen Transfektion wurde die Zellkonzentration mit einer Neubauerkammer bestimmt. Es wurden  $7,5 \cdot 10^6$  Zellen in 250 µl gekühltem Cytomix-Puffer resuspendiert, zu 10 µg DNA gegeben und alles in einer Elektroporations-Küvette 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 250 V und 975 µF mit einem Gene Pulser II von Bio-Rad. Die Zellen wurden, nach Inkubation bei 37 °C für 10 min, in unterschiedlichen Verdünnungen auf mehrere Zellkulturplatten gegeben und mit 10% FCS-Medium kultiviert. Nach 48 h wurde die Selektion mit 400 µg/ml Hygromyzin B begonnen und nach zwei Wochen Zellklone separiert, indem sie mit einer Pipette von der Kulturplatte gelöst und in separate Kulturplatten überführt und kultiviert wurden.

Transiente Transfektionen erfolgten unter anderem mit dem Reagenz Escort V. Dabei wurden 50 µl Escort V Puffer mit 3 µl Escort V gemischt und 1 µg DNA mit Escort V Puffer auf 50 µl aufgefüllt und ebenfalls gemischt. Die beiden Mischungen wurden vereinigt, kurz

vermischt und zentrifugiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung auf adhärente Zellen in 24-Well-Platten gegeben, in denen zuvor das Medium gewechselt wurde. Nach 3-18 Stunden Kultivierung im Inkubator wurde das Medium gewechselt.

### 3.3 Adenovirus-Herstellung, Titration und Infektion

Adenoviren werden als Vektoren verwendet, die eine Alternative zur Transfektion darstellen. Sie ermöglichen mit hoher Effizienz den Gentransfer in ein breites Spektrum an Zelltypen, wobei sie nicht abhängig von aktiver Zellteilung sind. Die rekombinanten Adenoviren wurden mit dem AdEasy-1-System hergestellt, wodurch sowohl GFP als auch die eingebrachte cDNA unter der Kontrolle des stark exprimierenden Cytomegalie-Virus (CMV) Promotors steht (He et al. 1998, Luo et al. 2007). Die Bildung von infektiösen Viren benötigt in diesem System zwei Komponenten. Zum einen den Vektor mit dem Adenovirus-Rückgrat (pAdEasy-GFP), dem die Sequenz für das virale Protein E1 fehlt und daher Replikations-defizient ist, und zum anderen eine sogenannte Verpackungs-Zelllinie (Ad-293, eine besonders adherente Variante der HEK293 Zelllinie), die das E1 Protein bereitstellt und somit die Replikation des Virus ermöglicht.

Zur Herstellung von rekombinanten Adenoviren wurden als erstes die Shuttle-Vektoren pAdTrack-CMV-HA-p53/ p53 $\Delta$ 30/ p73 $\alpha$ / p73 $\alpha$ +30 mittels *in vitro* Rekombination zwischen den entsprechenden pENTR Vektoren und dem an das Gateway-System von Invitrogen angepassten Vektor pAdTrack-CMV-HA-ccdB hergestellt. Die Shuttle-Vektoren wurden mit PmeI (=MssI) linearisiert, wodurch sich an beiden Enden homologe Sequenzen zum Adenovirus-Vektor pAdEasy befanden. Die linearisierten und aufgereinigten Plasmide wurden in den E. coli Stamm BJ5183 transfiziert, in dem die homologe Rekombination mit dem bereits enthaltenen Vektor pAdEasy stattfanden. Transfizierte Bakterien wurden mit Kanamycin (50 mg/l) selektiert und anhand des HindIII-Restriktionsfragment-Musters auf Rekombination untersucht. Korrekt rekombinierte Adenovirus-Vektoren (pAdGFP-HA-p53/ p53 $\Delta$ 30/ p73 $\alpha$ / p73 $\alpha$ +30) wurden in einem Rekombinations-defizienten Bakterienstamm

vervielfältigt. Als zweites wurden die rekombinanten Adenovirus-Plasmide mit PacI hydrolysiert, aufgereinigt und in Zellen der Verpackung-Zelllinie Ad-293 auf 60 mm-Zellkulturschalen transfiziert. Transfizierte Zellen bildeten Viren, die benachbarte Zellen infizierten, was sowohl an der GFP-Fluoreszenz als auch der Plaque-Bildung erkennbar war. Nach 7 bis 10 Tagen wurden alle Zellen abgeschabt und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im 37 °C-Wasserbad wurde die Zellmembran aufgebrochen und die Viren freigesetzt. Zelltrümmer wurden 10 min bei 3220 x g bei 4 °C sedimentiert. Zuletzt wurden die Adenoviren vermehrt, wofür wurden acht 150 mm-Zellkultur-Platten, die 70% konfluent mit Ad-293 Zellen bedeckt waren, mit dem Virus-reichen Überstand infiziert wurden. Hierfür wurde das Medium der Zellen durch je 5 ml 2% FCS-Medium und je 125 µl des Virus-reichen Überstands ersetzt und darin für 60 min bei 37 °C mit regelmäßigem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden jeweils 10 ml 2% FCS-Medium zugegeben und die Zellen ohne Wechsel des Mediums kultiviert. Nach drei Tagen wurden die Zellen geerntet, bei 200 x g sedimentiert und in 5 ml 10% Glycerol in PBS resuspendiert. Die Viren wurden wie oben beschrieben aus den Zellen freigesetzt und der Virus-reiche Überstand aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Zur Titration der Adenoviren wurden Ad-293 Zellen in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/ml in 2% FCS-Medium suspendiert und davon wurden 100 µl (=  $1 \cdot 10^4$  Zellen) mit einer Mehrkanal-Pipette in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte gegeben. Am nächsten Tag wurden je zwei unabhängige Verdünnungsreihen des zu testenden Virus hergestellt. Hierzu wurden 10 µl Virus in 1 ml 2% FCS-Medium verdünnt ( $10^{-3}$ ), davon wurden 100 µl in 900 µl 2% FCS-Medium verdünnt ( $10^{-4}$ ) und so weiter. Von den Zellen wurde das Medium abgesaugt, jeweils 100 µl der Virus-Verdünnungen wurden in fünf Vertiefungen einer Reihe der Platte eingebracht und in eine Vertiefung wurde 2% FCS-Medium als Negativ-Kontrolle eingebracht. Für die andere Plattenhälfte wurde die andere Verdünnungsreihe genutzt. Nach 10 Tagen Kultivierung ohne Wechsel des Mediums wurde jede Vertiefung auf Infektion anhand von Plaques und GFP-Fluoreszenz überprüft. Der Test war brauchbar, wenn einerseits alle Proben der niedrigsten Virus-Verdünnung Infektions-Anzeichen zeigten und andererseits alle Negativ-Kontrollen und alle Proben der höchsten Virus-Verdünnung frei davon waren. Es wurde gemeinsam für beide Verdünnungsreihen für jede Verdünnung das

Verhältnis aus der Anzahl der infizierten Vertiefungen zur Gesamtanzahl gebildet. Die Summe ( $\Sigma$ ) der Verhältnisse aller Verdünnungen beginnend bei  $10^{-1}$  wurde zur Berechnung des Titers genutzt:

$$\text{Titer} = 10^{(1,5+\Sigma)} \text{TCID}_{50}/\text{ml} \quad (\text{TCID}_{50} = \text{tissue culture infectious dose } 50)$$

$$\text{Titer} = 10^{(0,8+\Sigma)} \text{PFU}/\text{ml} \quad (\text{PFU} = \text{plaque forming units})$$

Zur Infektion von H1299 und Saos-2 Zellen wurden diese auf 150 mm-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, 2 ml 2% FCS-Medium und 0,5 bis 15  $\mu\text{l}$  Virus zugegeben, die Lösung mehrfach über die Zellen geschwenkt, im Brutschrank für 30 min unter gelegentlichem Schwenken inkubiert und dann 18 ml 10% FCS-Medium zugegeben. Am Folgetag wurde die Infektions-Effizienz anhand der GFP-Fluoreszenz überprüft und die Zellen für Versuche verwendet.

### 3.4 „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA)

EMSA ist eine *in vitro* Methode, die zur Untersuchung von Protein-DNA-Interaktionen dient. Grundlage ist die reduzierte Wandergeschwindigkeit bei nativer Gelelektrophorese von Protein-DNA-Komplexen im Vergleich zu freier DNA. Hierzu wurden radioaktiv-markierte doppelsträngige Oligonukleotide und *in vitro* translatierte Proteine verwendet.

Zur Herstellung von radioaktiv-markierter DNA wurde nachfolgender Ansatz 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  500 mM EDTA pH 8,0 gestoppt.

2 $\mu\text{l}$	Oligonukleotid (10 $\mu\text{M}$ )
2 $\mu\text{l}$	T4-Polynukleotidkinase Puffer A (10x)
1 $\mu\text{l}$	T4-Polynukleotidkinase
2 $\mu\text{l}$	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ )(10 pmol/ $\mu\text{l}$ )
13 $\mu\text{l}$	Wasser
$\Sigma$ 20 $\mu\text{l}$	

Anschließend wurde der Ansatz mit Wasser auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, das einzelsträngige Oligonukleotid mittels Gelfiltrations-Chromatographie von nicht eingebautem ATP getrennt und in 50  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer eluiert. Um doppelsträngige DNA zu erhalten wurde eine gleiche molare Menge (20 pmol; 2  $\mu\text{l}$  à 10  $\mu\text{M}$ ) des komplementären Oligonukleotids zugegeben, mit

Hybridisierungs-Puffer auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und alles auf 95 °C erhitzt; unter langsamen Abkühlen erfolgte die Hybridisierung. Durch Zugabe von einem gleich großen Volumen Wasser wurde auf 0,1 pmol/ $\mu\text{l}$  verdünnt.

Zur Herstellung von *in vitro* translatierten (IVT) Proteinen wurde das TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems Kit verwendet. Nachfolgender Ansatz wurde für 60 min bei 30 °C inkubiert.

20,0 $\mu\text{l}$	Retikulozyten-Lysat
4,5 $\mu\text{l}$	Expressions-Plasmid (133 ng/ $\mu\text{l}$ )
0,5 $\mu\text{l}$	Methionin (1 mM)
$\Sigma$ 25,0 $\mu\text{l}$	

Die Bildung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte entsprechend dem nachfolgenden Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur.

1,00 $\mu\text{l}$	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -markierte DNA (0,1 pmol/ $\mu\text{l}$ )
2,00 $\mu\text{l}$	EMSA-Puffer (10x)
0,02 $\mu\text{l}$	Dithiothreitol (1 M)
2,00 $\mu\text{l}$	Protease-Inhibitor-Cocktail ohne EDTA (10x)
0,40 $\mu\text{l}$	gescherte Lachsspermien-DNA (300 ng/ $\mu\text{l}$ )
1,00 $\mu\text{l}$	anti-p53 Antikörper PAb421 (100 ng/ $\mu\text{l}$ )
2,00 $\mu\text{l}$	<i>in vitro</i> translatiertes Protein
ggf. 5,00 $\mu\text{l}$	unmarkierte DNA (2,0 pmol/ $\mu\text{l}$ ) als Kompetitor
ggf. 0,50 $\mu\text{l}$	Antikörper (200 ng/ $\mu\text{l}$ ) für „Supershift“
bis 20,00 $\mu\text{l}$	Wasser
$\Sigma$ 20,00 $\mu\text{l}$	

Zum Nachweis eines Proteins mittels „Supershift“ wurde zum einen zusätzlich ein spezifischer und zum anderen ein für dieses Protein nicht-spezifischer Antikörper in je einen Ansatz gegeben. Zur Überprüfung der Spezifität der DNA wurde 100-facher Überschuss an unmarkierter doppelsträngiger DNA mit gleicher beziehungsweise mit willkürlich vertauschter Nukleotid-Sequenz zugefügt. Für Dissoziations-Kinetiken wurde ebenfalls unmarkierte DNA gleicher Sequenz zugegeben und die Proben nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten sofort auf das Gel aufgetragen, das dabei bereits an elektrische Spannung angeschlossen war.

Es wurden 3,5% Acrylamid-Gele in 0,5-fach konzentriertem TBE-Puffer verwendet.

32,5 ml	Wasser
3,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (40%; 37,5:1)
4,0 ml	TBE-Puffer (5x)
50 µl	TEMED
140 µl	APS (30%)

Das Gel wurde bereits vor der Auftrennung der Proben für 30 min bei 150 V angeschlossen. Die Proben wurden mit 4 µl 6-fach konzentriertem DNA-Ladepuffer versehen, auf das Gel aufgetragen und 110 min bei 150 V aufgetrennt. Eine Glasplatte wurde abgenommen und das Gel 5 min in 7% wässriger Essigsäure-Lösung fixiert. Das Gel wurde auf einem Whatman-Papier 60 min bei 80 °C unter Vakuum getrocknet. Die Detektion erfolgte mittels Röntgenfilmen oder Phosphor-Imaging (Fujifilm FLA-3000). Zur Quantifizierung wurden Phosphor-stimulierte-Lumineszenz (PSL) Werte innerhalb gleich großer Arealen bestimmt und zur Korrektur davon der Wert des Hintergrunds abgezogen. Relative Werte wurden als Verhältnis der jeweils korrigierten Werte von Komplex zu freier DNA berechnet.

### 3.5 Mikroskopie

#### 3.5.1 Fluoreszenz-Mikroskopie und konfokale Mikroskopie

Verschiedene Moleküle (Fluorophore, Fluoreszenz-Farbstoffe) besitzen die Eigenschaft zu fluoreszieren; das heißt sie absorbieren kurzwelliges Licht (Anregungs-Licht) und emittieren spontan Licht mit längerer Wellenlänge (Emissions-Licht). Hierbei absorbieren bestimmte Elektronen der Fluorophore Photonen geeigneter Wellenlänge, wodurch sie einen energiereicheren Zustand erlangen. Da der Zustand instabil ist, kehren sie spontan innerhalb von wenigen Nanosekunden in ihren Grundzustand zurück, wobei sie einen Teil der Energie als Photon abgeben. Da nicht die gesamte Energie in die emittierten Photonen übergeht, kommt es zur Rotverschiebung der Wellenlänge. Diese Zunahme der Wellenlänge um einige Nanometer nennt man Stokes-Verschiebung und ermöglicht die Unterscheidung von Anregungs- und Emissions-Licht. Das Anregungs-Licht kann jedoch auch – unter kovalenter Modifikation des Fluorophors – zum Bleichen führen, wodurch die Fluoreszenz des Moleküls

irreversibel zerstört wird. Dieser Prozess wird durch lange und intensive Anregung begünstigt, ist aber auch von der Natur des Moleküls abhängig.

Zur Anregung der Fluoreszenz wird Licht hoher Intensität, beispielsweise einer Quecksilberdampfampe oder eines Lasers, durch das Objektiv auf die Probe gestrahlt. Im Strahlengang eines herkömmlichen Fluoreszenz-Mikroskops befindet sich ein Set an Filtern und Spiegeln, um spezifische Fluoreszenz-Signale zu messen. Die Lichtquelle befindet sich hinter dem Anregungs-Filter, der nur kurzwelliges Licht durchlässt. Dieses Licht trifft auf einen dichromatischen Farbteiler-Spiegel, der das kurzwellige Anregungs-Licht reflektiert in Richtung Objektiv und Präparat. Geeignete Fluorophore werden angeregt und emittieren langwelliges Fluoreszenz-Licht in alle Richtungen. Ein Teil davon gelangt durch das Objektiv auf den Farbteiler-Spiegel und wird aufgrund seiner größeren Wellenlänge durchgelassen. Der Emissions-Filter lässt davon nur eine spektrale Bandbreite zu einem Kamera-Chip, einem Photomultiplier oder ins Auge durch. Dieses System verhindert einerseits, dass kurz- und langwelliges Anregungs-Licht detektiert wird, und ermöglicht andererseits die Detektion von Fluoreszenz-Licht eines bestimmten Wellenlängen-Bereichs. Dies ist wichtig, da auch endogene Bestandteile einer Zelle fluoreszieren können (Autofluoreszenz). Alternativ zu optischen Filtern wird seit Neuem die Spezifität durch akusto-optische Kristalle, deren spektrale Aufspaltung durch Anlegen unterschiedlicher elektrischer Spannung verändert werden kann, erzielt.

Anwendung erlangt die Fluoreszenz unter anderem in der Mikroskopie zur Detektion von Proteinen. Hierfür muss das Protein mit einem Fluorophor markiert werden, was durch Immunreaktion mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern oder nicht-invasiv durch Expression von chimären Fusionsproteinen mit einem fluoreszierenden Protein erreicht wird. Für letzteres eignet sich das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. GFP ist ein 30 kDa großes Protein mit fluoreszierendem Zentrum, das sich autokatalytisch aus dem Tri-Peptid Ser65-Tyr65-Gly67 bildet und von einer Fass-Struktur umgeben ist. Derivate mit erhöhter Fluoreszenz-Intensität, veränderten spektralen Eigenschaften und vermindertem Bleichen wurden durch Mutationen erzielt; beispielsweise „enhanced yellow fluorescent protein“ (eYFP).

Mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM) ist es möglich virtuell optische Schnitte eines Präparats zu erstellen. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, darf hierbei kein Licht von ober- oder unterhalb der Fokusebene detektiert werden. Eine Lochblende („pinhole“) im Strahlengang sorgt dafür, dass das Anregungs-Licht insbesondere auf die konfokale Ebene trifft und dass Licht aus anderen Ebenen nicht auf den Detektor gelangt. Diese Technik ermöglicht scharfe Bilder mit einer axialen Auflösung bis zu 500 nm. Da die enge Lochblende die Menge des einfallenden Lichts reduziert und so zu geringer Signalstärke führen würde, ist zur Anregung ein Laser nötig. Aus gleichem Grund wird die Sensitivität der Detektion durch Nutzen eines Photomultipliers – der sich nicht limitierend auf die Mesdauer auswirkt und ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht – erhöht. Der Laserstrahl rastert in x- und y-Richtung – gesteuert von einem Spiegel an einem Galvanometer – die Probe ab, wobei die Lichtintensität zu jedem Zeitpunkt vom Photomultiplier gemessen wird. Ein Computer berechnet aus den Intensitäten und Zeitpunkten mit zugehörigen Koordinaten ein Gesamtbild. Um unterschiedliche konfokale Ebenen zu messen wird das Präparat mit einem Piezo-Element feinst in z-Richtung justiert.

### 3.5.2 Immunfluoreszenz-Zytochemie

Diese Methode diente zum *in situ* Nachweis eines Proteins innerhalb einer Zelle. Hierfür wurden Deckgläschen in 12-Well-Platten mit 1 mg/ml Gelatine in PBS über Nacht inkubiert, mit PBS gewaschen und Zellen in 10% FCS-Medium zugegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen geeignet behandelt, um das zu untersuchende Protein zu exprimieren. Nach gewünschter Zeitspanne wurden die Zellen zweimal mit 1 ml 37 °C warmem PBS gewaschen und in 1 ml 4% Paraformaldehyd 10 min bei RT fixiert. Nach zweimal 5 min waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 ml 0,2% Triton-X-100 in PBS 10 min bei RT permeabilisiert. Sie wurden dreimal 5 min mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 1 ml 10% FCS in PBS 30 min bei RT geblockt. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden in einer feuchten Kammer mit 200 µl Antikörper-Verdünnung in 10% FCS in PBS 60 min bei RT inkubiert. Nach dreimal 5 min waschen mit PBS wurden die Zellen entsprechend für 45 min mit sekundärem

Antikörper, der an den Fluoreszenz-Farbstoff Alexa 546 gekoppelt ist, inkubiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Zellkerne wurden mit 1 ml 1  $\mu$ M 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) in PBS 5 min bei RT gefärbt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und dann das Deckgläschen kopfüber auf einen Objektträger in einen Tropfen Fluoromount-G gelegt. Alternativ erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1 ml eiskaltem Methanol 20 min bei -20 °C inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und nach dem Blocken wie oben beschrieben fortgesetzt, wobei die Antikörper-Inkubationszeiten auf 2 h beziehungsweise 1 h erhöht wurden. An einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axiovert 200 bzw. Leica TCS SP5) wurden von einem Ausschnitt jeweils DAPI-Fluoreszenz- und Alexa 546-Fluoreszenz- und Phasenkontrast- beziehungsweise Hellfeld-Aufnahmen gemacht.

### 3.5.3 „Fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP)

FRAP ist eine *in vivo* Methode zur Untersuchung der Mobilität von Komponenten in einer Zelle. Das Prinzip besteht darin, zu beobachten wie schnell eine Population einer Komponente eine homogene Verteilung wieder erreicht, nachdem eine heterogene Verteilung erzeugt wurde. Hierfür muss die Komponente fluoreszieren oder an einem Fluorophor gekoppelt sein und die heterogene Verteilung wird durch Bleichen der Fluorophore in einem begrenzten Bereich erzeugt. Die Mobilität eines Proteins hängt von seiner Diffusionsgeschwindigkeit, von seiner Bindung an andere Zellbestandteile und von räumlichen Barrieren, wie der nukleären Membran ab. Die Diffusionsgeschwindigkeit ist wiederum abhängig von der Größe und Form eines Proteins und von der Temperatur. Bindet ein Protein kurzweilig oder permanent an eine immobile Zellkomponente, ist seine Mobilität reduziert.

Um die Bewegung der p53/p73 $\alpha$  Proteine im Nukleus detektieren zu können, wurden diese als Fusionsproteine mit YFP am Amino-Terminus exprimiert. Hierzu wurden H1299 Zellen in einer Zellkulturschale auf Gelatine-beschichteten Deckgläschen kultiviert, mit entsprechenden Expressions-Plasmiden transfiziert und gegebenenfalls gleichzeitig ihre

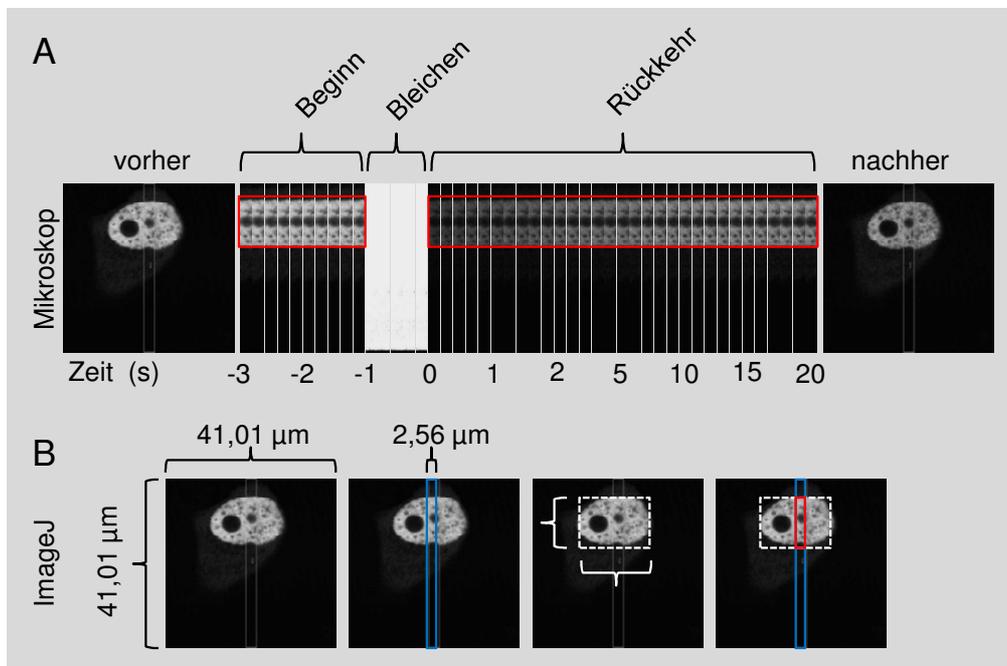
Expression mit 1 µg/ml Doxzyklin induziert. Die Messungen erfolgten 24 h nach Transfektion. Dabei waren die Deckgläschen in einer Halterung und die Zellen waren mit 37 °C warmem DMEM, das kein Phenolrot enthielt – um Autofluoreszenz zu vermeiden – und dem 10 % FCS zugegeben war, überschichtet.

Es wurde ein Leica LSM-Mikroskop TCS SP5, das mit einem 63x Öl-Immersion-Objektiv mit 1,4 Numerischen Apertur ausgestattet war, benutzt und die Leica Software LASAF Frap Wizard verwendet. Die Lochblende wurde auf 1 Airy eingestellt – das heißt es wurde nur eine konfokale Ebene beobachtet. Die Anregung von YFP erfolgte durch die 514 nm Linie eines Argon-Ionen-Lasers und die Detektion erfolgte im Bereich von 518-608 nm. Es wurden 41,01 x 41,01 µm beziehungsweise 41,01 x 2,56 µm große Bilder mit 8 bit Farbtiefe aufgenommen.

Anhand der Morphologie wurden nur Zellen ausgewählt, die vital waren und sich gerade nicht in der Zytokinese befanden. Jede Messung erfolgte an einer noch nichtgeblichenen Zelle. Die Zelle wurde so ausgerichtet, dass sie mittig in der konfokalen Ebene lag und dass der 2,56 µm breite Bleichstreifen orthogonal zur Längsachse des Kerns positioniert war und ihn etwa mittig kreuzte (Abb. 3.1 B blauer Kasten). Der Photomultiplier und der dazugehörige Verstärker wurden vor dem Bleichen so eingestellt, dass die Hintergrund-Fluoreszenz – außerhalb der Zelle – am Minimum des Messbereichs lag und dass die YFP-Fluoreszenz des Nukleus ein sehr starkes Signal ergab, aber dass die Werte von höchstens fünf Pixeln das Maximum erreichten. Hierdurch wurde der dynamische Messbereich maximiert und die Gewinnung von quantitativen Messwerten sichergestellt.

Von jeder untersuchten Zelle wurde vor und nach einer FRAP-Messung eine Übersichtsaufnahme der YFP-Fluoreszenz erstellt, um die Größe und Position des Nukleus und des Bleichbereichs zu bestimmen (Abb. 3.1 B). Eine FRAP-Messung bestand aus drei Teilen (Abb. 3.1 A). Im ersten Teil wurde die YFP-Fluoreszenz des 2,56 µm breiten Streifens 20-mal bei 514 nm Anregung mit 1% der maximalen Laser-Leistung aufgenommen, um die durchschnittliche Fluoreszenz vor dem Bleichen zu bestimmen. Im zweiten Teil wurde der Streifen geblichen, indem er innerhalb einer Sekunde zehnmal mit allen spektralen Linien des Argon-Ionen-Laser mit seiner 100% der Leistung gescannt wurde. Im dritten Teil wurde die YFP-Fluoreszenz des Streifens über einen Zeitraum von 20 s bei 514 nm Anregung mit 1%

der Laser-Leistung aufgezeichnet. Hierbei wurde insgesamt eine Serie aus 62 Bildern aufgenommen, wobei die ersten 20 Bilder jede 100 ms erfolgten, die nächsten 12 Bilder jede 250 ms und die letzten 30 Bilder jede 500 ms.



**Abb. 3.1:** Ablauf und Analyse eines FRAP-Versuchs. **A:** Die YFP-Fluoreszenz wurde vor und nach einem FRAP-Experiment von der gesamten Zelle aufgenommen. Während des Experiments wurde nur ein zentraler Streifen aufgenommen. Zu Beginn wurde seine Ausgangs-Fluoreszenz aufgenommen, dann wurde er gebleicht und die Rückkehr der Fluoreszenz über einen Zeitraum von 20 s aufgenommen. **B:** Für die Analyse wurde die Position des Nukleus (weiß gestrichelter Kasten) bestimmt. In der Schnittfläche (= ROI, roter Kasten), des Streifens (blauer Kasten) und des Nukleus liegt, wurde die Fluoreszenz-Intensität mit der Software ImageJ gemessen.

Mit der Bildanalyse-Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) wurden die Serien-Bilder analysiert. Dazu wurde anhand der Übersichtsaufnahmen die Lage des Nukleus bestimmt. Innerhalb des Nukleus (ROI, region of interest) – eine Fläche zwischen  $16 \times 54$  bis  $16 \times 84$  Pixel<sup>2</sup> – wurde die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität – Werte von 0 bis 255 bei 8 bit Farbtiefe – der Streifen-Bilder zu jedem Zeitpunkt vor und nach dem Bleichen gemessen (Abb. 3.1 B roter Kasten). Ebenfalls zu jedem Zeitpunkt wurde die Intensität des Hintergrundes (ROC, region of control) innerhalb einer entsprechend großen Fläche außerhalb der Zelle gemessen. Mit der Microsoft Software Excel wurde für jeden Zeitpunkt Hintergrund-Korrektur durchgeführt, indem die Differenz von ROI und ROC gebildet wurde. Die erhaltenen Werte wurden jeweils normalisiert auf die durchschnittlichen Werte der 20 Bilder vor dem Bleichen und ihnen wurden die entsprechenden Zeitpunkte von 0 bis 20 s

nach dem Bleichen zugeordnet. Mit der OriginLab Software Origin wurden die Werte durch die exponentielle Funktion  $A(t)=A_1-A_2 \cdot e^{-k \cdot t}$  (A(t), Intensität zum Zeitpunkt t;  $A_1$ , Intensität am Ende;  $A_2$ , rückkehrende Intensität; k, Diffusions-abhängiger Parameter; t, Zeit) angenähert, bei der ein Modell mit einer einheitlichen Population ohne Bindung zugrunde liegt. Zum Vergleich der Kinetiken unterschiedlicher Proteine wurden für jedes Protein die normalisierten Werte von Messungen mehrerer Zellen gemittelt.

Alternativ erfolgte die Auswertung entsprechend den mathematischen Modellen der Publikation von Hinow und Kollegen (Hinow et al. 2006). Das simple Diffusions-Modell geht von einer Population an fluoreszierenden Teilchen aus, in der die Teilchen eine konstante und einheitliche Diffusionsgeschwindigkeit besitzen. Das erweiterte Bindungs-Modell simuliert zusätzlich eine zweite Population, in der die Teilchen an eine immobile Matrix gebunden sind und daher zeitweise immobil sind. Da das erweiterte Modell sich nur durch das Vorhandensein dieser zweiten Population von dem simplen Modell unterscheidet – wobei ein freier Austausch zwischen beiden Populationen stattfinden kann –, gleicht das erweiterte Modell dem simplen für den Fall, dass die zweite Population nicht existiert. Diese Modelle nehmen vereinfachend an, dass der Zellkern – innerhalb dessen die Mobilität untersucht wird – ein zweidimensional rechteckiges abgeschlossenes Kompartiment ist, in dem die Fluorophore mobil und homogen verteilt sind (Abb. 3.1 B weiß gestrichelter Kasten). Mit der MathWorks Software Matlab und einer modifizierten Version des Makros von Hinow und Kollegen wurden die zwei Modelle an die ermittelten Werte (Intensitäten von ROI und ROC, Größe des Nukleus, Position des geblichenen Streifens) in einem Iterationsverfahren angepasst und statistisch bestimmt, inwiefern sie zur Annäherung der Werte geeignet sind.

### 3.6 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Mit ChIP kann man *in vivo* die Interaktion von Proteinen mit dem Genom und die Modifikation von Chromatin-assoziierten Proteinen untersuchen. Hierzu werden bestehende Protein-DNA-Komplexe in einer Zelle durch Quervernetzung fixiert und die Zelle

anschließend lysiert. Mit geeigneten Antikörpern werden Komplexe aus dem Lysat isoliert, die ein spezifisches Protein enthalten. Die Komplexe werden gelöst und die enthaltene DNA isoliert. Mittels PCR, Hybridisierung auf einem Microarray (ChIP-on-chip), und Sequenzierung (ChIP-PET bzw. ChIP-Seq) kann die Qualität und Quantität der gewonnenen DNA analysiert werden, wodurch Rückschlüsse auf die DNA-Bindung des untersuchten Proteins gezogen werden können.

Die Durchführung erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll des EZ ChIP Kit von Upstate. Hierbei wurden Zellen – nach entsprechendem Gentransfer – auf 150 mm-Platten in 20 ml 10% FCS-Medium mit 1 ml frisch angesetzter 18,5% wässriger Formaldehyd-Lösung 10 min bei RT fixiert. Nicht reagiertes Formaldehyd wurde durch 5 min Inkubation mit 2 ml 1,25 M wässriger Glycin-Lösung inaktiviert. Nachfolgende Schritte erfolgten bei 4 °C, um Degradationsreaktionen zu verhindern. Die Zellen wurden zweimal mit je 10 ml kaltem PBS gewaschen, in PBS mit 0,4-fach konzentriertem Protease-Inhibitor von der Platte abgeschabt, bei 700 x g für 5 min sedimentiert und in 1 ml SDS-Lysis-Puffer mit 0,4-fach konzentriertem Protease-Inhibitor resuspendiert.

Eiswasser-gekühlte Zelllysate wurden 3 bis 5 Zyklen bei 30% Amplitude ungepulst für 15 s mit 45 s Pause sonifiziert (Bandelin Sonoplus), um die genomische DNA in 200 bp bis 1000 bp lange Fragmente zu scheren. Unlösliche Zelltrümmer wurden 10 min bei 10.000 x g sedimentiert. Zur Überprüfung der Fragmentlängen wurden 10 µl geschertes Chromatin mit 180 µl Wasser aufgefüllt und durch Inkubation mit 8 µl 5 M NaCl bei 65 °C über Nacht Quervernetzungen aufgehoben. Davon wurden 20 µl mit 3 µl 60% Glycerol versetzt und auf einem TAE-gepufferten 2% Agarosegel aufgetrennt.

Je Ansatz wurde 100 µl geschertes Chromatin zu 900 µl Dilution-Puffer gegeben und mit 40 µl Protein G Agarose Suspension rotierend inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Die Agarose-Kügelchen wurden 1 min bei 3.000 x g sedimentiert. Jeweils 950 µl Überstand wurde mit 1 µg Antikörper über Nacht rotiert. Nach Entnahme von 9,5 µl Input (= 1%) wurden 60 µl Protein G Agarose Suspension zugegeben und 60 min rotiert. Die Agarose-Kügelchen wurden sedimentiert und der Überstand mit einer eng-lumigen Kanüle vollständig abgenommen. Die Kügelchen wurden in 1 ml Low Salt-Puffer 30 min rotiert, dann sedimentiert und erneut der Überstand abgenommen. Es folgten entsprechende

Waschschritte mit High Salt-, LiCl- und zweimalig mit TE-Puffer. Die Kügelchen wurden mit 100 µl Elution-Puffer 15 min bei RT und 800 rpm geschüttelt, dann sedimentiert und 90 µl des Überstands gewonnen. Bei einer zweiten Elution wurden 100 µl Überstand gewonnen. Zum Input wurden ebenfalls insgesamt 200 µl Elution-Puffer gegeben.

Die Quervernetzung zwischen Protein und DNA wurde durch Inkubation mit 8 µl 5 M NaCl bei 65 °C über Nacht aufgehoben. RNA wurde mit 1 µl RNase A (10 µg/µl) 30 min bei 37 °C hydrolysiert. Protein-Hydrolyse erfolgt mit 4 ml 0,5 M EDTA, 8 µl 1 M Tris-HCl pH 6,5 und 1 µl Proteinase K (10 µg/µl) 2 h bei 45 °C. Die Proben wurden mit 200 µl Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol-Mischung kräftig geschüttelt und 30 min bei 800 rpm geschüttelt. Von der oberen Phase wurden 190 µl nach 2 min Trennung bei 16.100 x g mit einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung zweimal ebenso gereinigt. Von dem DNA-enthaltenden Überstand wurden 170 µl mit 1 µl Glykogen (20 µg/µl), 17 µl 3 M Na-Acetat pH 5,0 und 425 µl Ethanol 60 min bei -80 °C gefällt, 60 min bei 16.100 x g sedimentiert, mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut 5 min sedimentiert. Das getrocknete DNA-Sediment wurde in 50 µl Wasser mindestens 30 min bei 37 °C schüttelnd resuspendiert.

Die DNA-Analyse erfolgte mittels quantitativer PCR (Abschnitt 3.8.2). Da die isolierten DNA-Fragmente nicht nur das Response-Element enthalten, sondern auch flankierende Chromosomen-Bereiche, können zu deren Detektion auch Primer-Paare genutzt werden, die etwas entfernt von der zu untersuchenden Bindungsstelle binden. Die Entfernung ist abhängig von der Länge der DNA-Fragmente. Als Negativ-Kontrollen dienten Zellen ohne das zu untersuchende Protein, Antikörper gegen ein anderes Protein, Ansätze ohne Antikörper und Primer-Paare, die eine DNA-Sequenz amplifizieren, welche weiter als die Länge der DNA-Fragmente von dem zugehörigen Response-Element entfernt liegen.

### **3.7 Luziferase-Reporter-Assay**

Diese *in vivo* Methode dient zur Untersuchung der Genexpression und Zellphysiologie von Eukaryoten. Es können beispielsweise cis-aktive DNA-Elemente in Promotoren und Enhancern oder die Transaktivierungs-Aktivität von Transkriptionsfaktoren analysiert

werden. Hierzu werden zwei Plasmide in kultivierte Zellen co-transfiziert. Das Expressions-Plasmid codiert den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor und das Reporter-Plasmid das Reporter-Enzym Luziferase unter der Kontrolle des zu untersuchenden cis-aktiven DNA-Bereichs. Der Transkriptionsfaktor bindet an ein Response-Element im Reporter-Plasmid und reguliert die Transkription des Reporters. Der Reporter Luziferase wird transkribiert, translatiert und kann über seine enzymatische Aktivität mittels Chemilumineszenz quantifiziert werden. Je nach DNA-Bindungseigenschaft und Aktivität des Transkriptionsfaktors und in Abhängigkeit von der Sequenz und Position des Response-Elements ändert sich die Expression des Reporters.

Es wurden in eine 24-Well-Platte je  $5 \cdot 10^4$  H1299 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit insgesamt 1  $\mu\text{g}$  DNA transfiziert. Dazu wurden 10-50 ng Expressions-Plasmid und 200 ng Reporter-Plasmid mit pUC19-Sfil Plasmid auf 1  $\mu\text{g}$  ergänzt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und 48 h nach Transfektion erfolgte die Messung der Chemilumineszenz mit dem Renilla Luciferase Assay System. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in 100  $\mu\text{l}$  einfach konzentriertem Renilla Luciferase Assay Lysis Puffer 20 bis 30 min bei RT durch schütteln bei 300 rpm lysiert. Auf eine weiße 96-Well-Platte mit spitzzulaufenden Vertiefungen wurden 10  $\mu\text{l}$  Lysat (ohne Zelltrümmer) und 50  $\mu\text{l}$  einfach konzentriertem Renilla Luciferase Assay Substrat gegeben. Die Messung erfolgte nach Schütteln der Platte in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Perkin Elmer Victor3V Multilabel Counter).

Es wurden jeweils unabhängige Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Kontrollen dienten nicht transfizierte Zellen und nur mit pUC19-Sfil und Reporter-Plasmid transfizierte Zellen. Zur Auswertung wurden jeweils die arithmetischen Mittel der Duplikate gebildet. Hintergrund-Korrektur erfolgte durch Abzug des Mittels der nicht transfizierten Zellen. Es wurde auf die basale Aktivität des Reporter-Plasmids normalisiert, indem das Verhältnis der Hintergrund-korrigierten Mittel transfizierter Zellen zu ohne Expressions-Plasmid transfizierter Zellen berechnet wurde. Die Standard-Abweichung wurde entsprechend normalisiert.

### 3.8 Genexpression auf mRNA Ebene

#### 3.8.1 Isolation von mRNA und Synthese von cDNA

Kultivierte Zellen wurden abgeschabt, bei 200 x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert, mit PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Die Zellen wurden entweder in RNAlater resuspendiert und gegebenenfalls bei -80 °C gelagert oder direkt zur RNA-Isolierung genutzt. Es wurden QIAshredder Säulen in Kombination mit dem RNeasy Mini Kit verwendet, wobei eine DNA-Hydrolyse mit RNase-Free DNase auf den Säulen erfolgte. Die Qualität der RNA wurde anhand der 18S und 28S rRNA-Banden, nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem 1 % Agarose-Gel, überprüft. RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Ribogreen an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät Optima FLUOstar. Reverse Transkription mit Omniscript RT erfolgte mit 1 µg RNA und einem zufälligen Gemisch aus Oligonukleotid-Hexameren. Alternativ wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit zur Eliminierung genomischer DNA und reversen Transkription verwendet.

#### 3.8.2 Quantitative PCR

Zur Quantifizierung von cDNA und genomischer DNA wurde nachfolgender Master-Mix erstellt, der eine Polymerase enthielt, die bei Raumtemperatur durch einen Antikörper inhibiert war.

1x	8x	
12,50 µl	100 µl	SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (2x)
0,50 µl	4 µl	Oligonukleotid vorwärts (10 µM)
0,50 µl	4 µl	Oligonukleotid rückwärts (10 µM)
0,25 µl	2 µl	ROX (100x)
10,25 µl	82 µl	Wasser
je Ansatz davon 24 µl		
je Ansatz zusätzlich 1 µl		DNA

Es wurden jeweils unabhängige Triplikate auf eine 96-Well-PCR-Platte aufgetragen, die Platte mit transparenter Klebefolie versiegelt, kurz sedimentiert und in einem realtime-PCR-Gerät (Applied Biosystems ABI Prism 7000) mit nachfolgendem Programm analysiert.

1x	2 min	94 °C
40x	15 s	94 °C
40x	30 s	60 °C (ggf. anpassen)
40x	60 s	72 °C
1x		von 60 °C auf 95 °C

Alternativ wurden 384-Well-PCR-Platten und ein entsprechendes Gerät (Applied Biosystems ABI Prism 7900HT) verwendet. Hierzu wurde der PCR-Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 10 µl skaliert, wobei die DNA zehnfach verdünnt in Wasser eingesetzt wurde.

Zur Quantifizierung der Genexpression von CDC2, FDXR, GDF15, JAG2, MCM4, PUMA (= BBC3), p21 (= CDKN1A), S100A2 und TMPO wurde das QuantiTect SYBR Green Reagenz und zugehörige QuantiTect Primer Assay Oligonukleotide, wie nachfolgend aufgeführt ist, verwendet.

1x	8x	
12,5 µl	100 µl	QuantiTect SYBR Green (2x)
2,5 µl	20 µl	QuantiTect Primer Assay
9,0 µl	72 µl	Wasser
je Ansatz davon 24 µl		
je Ansatz zusätzlich 1 µl		cDNA

1x	15 min	95 °C
40x	15 s	94 °C
40x	30 s	55 °C
40x	30 s	72 °C
1x		von 60 °C auf 95 °C

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei beiden Programmen am Ende jeder Synthesephase und während der gesamten Dissoziations-Phase. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde anhand der Schmelztemperatur und der Produktlänge – nach Auftrennung der PCR-Produkte in einem TAE-gepufferten 3% Agarose- oder 12% Acrylamid-Gel – überprüft. Die Auswertung der Dreifachbestimmung erfolgte nach der DeltaDeltaCt-Methode (Livak & Schmittgen 2001), mit Normalisierung auf das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) beziehungsweise auf den Input bei CHIP-Experimenten.

### 3.8.3 Microarray

Jeweils 1 µg Gesamt-RNA aus drei unabhängigen Versuchen wurden vereinigt. Die Genexpression wurde mittels des Affimetrix Microarrays GeneChip Human Genome U133a 2.0 in der Pathologie der Universität Würzburg durch die Arbeitsgruppe Rosenwald untersucht. Die Daten sind öffentlich zugänglich über nachfolgende Homepage und Zugangscode ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/); GSE8660). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Silicon Genetics Software GeneSpring 7.0. Zuerst wurden die Rohwerte einheitlich auf mindestens den Wert 0,01 gesetzt, um irrelevant hohe Expressionsveränderungen zu vermeiden. Danach wurden alle Gene ausgewählt, deren Expression in mindestens einer Probe mehr als 3-fach gegenüber der GFP Probe verändert war. Diese Gene wurden nach Ähnlichkeiten in ihren Expressionsmustern angeordnet. Mit einer Cluster-Analyse wurden die Proben entsprechend der Ähnlichkeit ihrer Expressionsmuster gruppiert.

## 3.9 Protein-Analysen

### 3.9.1 Bioinformatische Analysen

Bestimmung der isoelektrischen Punkte und der elektrischen Ladung von Proteinen und Peptiden erfolgte mit der Invitrogen Software VectorNTI (<http://www.invitrogen.com>)

Die Vorhersage von potentiellen Phosphorylierungs-Stellen erfolgte mit der Software NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)(Blom et al. 1999). Dabei erhält man Bewertungen zwischen 0,000 und 1,000 für die einzelnen Serin-, Tyrosin- und Threonin-Reste, wobei bei Werten über dem Schwellenwert von 0,500 eine Phosphorylierung des zugehörigen Restes als wahrscheinlich angenommen wird.

### 3.9.2 Westernblot

Zur Gewinnung von Zell-Lysaten wurden kultivierte Zellen – nach entsprechender Behandlung – abgeschabt, bei 200 x g für 10 min bei 4 °C sedimentiert, mit PBS gewaschen und erneut sedimentiert. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer inklusive einfach konzentriertem Protease-Inhibitor Cocktail resuspendiert. Gegebenenfalls wurde 20 mM Natriumpyrophosphat zugegeben, um Dephosphorylierung der Proteine zu inhibieren. Die Suspension wurde 30 s gepulst sonifiziert bei 15% Amplitude (Bandelin Sonoplus) und anschließend wurden unlösliche Zellbestandteile bei 16.000 x g sedimentiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch mit einem Bradford-Reagenz. Die Protein-Lösungen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Hierfür wurden 20 µl Ansätze mit gleichen Massen (meist 100 µg) an Protein-Lösung beziehungsweise gleichen Volumina (1-2 µl) an *in vitro* translatierten Proteinen inklusive einfach konzentriertem Protein-Ladepuffer für 5 min auf 95 °C erhitzt und dann auf einem diskontinuierlichen Acrylamid-Gel in SDS-Lauf-Puffer zusammen mit einem gefärbtem Proteingewichtsstandard bei 150 V für 2 h aufgetrennt.

Trenngel		Sammelgel	
2,5 ml	1,5 M Tris pH 6,8	0,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
4,9 ml	Wasser		6,4 ml
2,5 ml	Acrylamid/ Bisacrylamid Mischung (29:1; 40%)		1,0 ml
6 µl	TEMED		11 µl
17 µl	30% (w/v) APS		17 µl

Die aufgetrennten Proteine wurden im semi-dry Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Hierzu wurde von unten nach oben folgender Stapel gebildet: Anodenplatte; drei Lagen in Blott-Puffer getränkte Whatman-Papiere; Membran; Gel; drei Lagen in Blott-Puffer getränkte Whatman-Papiere; Kathodenplatte. Der Transfer erfolgte bei 70 mA je Gel (7,0 cm x 8,5 cm) für 60 min beziehungsweise in Abhängigkeit von der Proteingröße für 1 min/kDa. Alternativ wurde das NuPAGE Gelsystem von Invitrogen mit 4-12% Bis/Tris-Gradienten-Gelen und dem MOPS/SDS-Laufpuffer entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Zur Untersuchung der p53 Peptide H<sub>2</sub>N-HHERCSDSDGLAP-CONH<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>N-

HHERCS(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)DSDGLAP-CONH<sub>2</sub> wurden diese direkt auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht und bei RT getrocknet.

Für den nachfolgenden Immunblot wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit 0,1 g/ml Magermilchpulver in TBS-Puffer beziehungsweise mit 50 mg/ml bovinem Serum-Albumin (BSA) in TBS-Puffer für 60 min bei RT rollend geblockt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in einer Verdünnung des primären Antikörpers in 0,05 g/ml Magermilchpulver in TBST0,1 rollend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST0,1 bei RT folgte die Inkubation mit dem verdünnten sekundären Antikörper für 60 min bei RT und erneut drei Waschschritte mit TBST0,1. Die Detektion der Proteine erfolgte durch die Aktivität der Antikörper-gekoppelten Peroxidase mittels verstärkter Chemi-Lumineszenz (ECL) mit dem Reagenz SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate.

### **3.10 Durchfluss-Zytometrie**

Zur Untersuchung des Zellzyklus und von Apoptose wurde Durchfluss-Zytometrie genutzt. Dabei wurde mittels Propidiumjodid-Fluoreszenz der DNA-Gehalt der Zellen gemessen. Da sich der DNA-Gehalt einer Zelle während des Zellzyklus ändert, wurde er genutzt um Rückschlüsse auf die Zellzyklus-Phase zu ziehen. Ein unter den normalen DNA-Gehalt erniedrigter DNA-Gehalt, wie er bei fortgeschrittener Apoptose – bedingt durch Fragmentierung genomischer DNA mittels Endonukleasen und Verlust dieser Fragmente bei der Zellpermeabilisierung – auftritt, wurde als Anzeichen von Apoptose gewertet.

Adhärente und schwimmende Zellen wurden 24 h nach adenoviralem Gentransfer mit Trypsin/EDTA-Lösung gelöst, bei 200 x g und 4 °C 10 min sedimentiert, und in 500 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden fixiert und permeabilisiert, indem unter Verwirbeln 5 ml - 20 °C kaltes 70% Ethanol zugetropft wurde. Durch zweimaliges Sedimentieren und Resuspendieren in 2 ml PBS wurde das Ethanol von den Zellen entfernt. Sedimentierte Zellen wurden auf Eis gelagert, in FACS-Lösung resuspendiert und der DNA-Gehalt von mindestens 25.000 Zellen an einem BD Biosciences Durchfluss-Zytometer FACScalibur mit der Software Cellquest gemessen.

Anhand der Histogramme des DNA-Gehalts wurden mit der BD Biosciences Software ModFit LT Zellzyklus-Phasen durch Annäherung der Häufigkeits-Profile mit einem Modell quantifiziert. Das Modell beinhaltet zum einen ein Verhältnis des DNA-Gehalts von Zellen der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>- und der G<sub>2</sub>/M-Phase und zum anderen das Vorkommen von apoptotischen Zellen und Zellfragmenten.

### 3.11 Statistik

Mittelwerte und Fehlerbalken sind die arithmetischen Mittel und Standardabweichungen (bei EMSA-Experimenten, quantitativer PCR, Durchfluss-Zytometrie und Luziferase-Reporter-Assay) beziehungsweise Standardfehler (bei FRAP- und ChIP-Experimenten bis auf Abb. 4.9). Zur statistischen Auswertung wurde der ungepaarte zweiseitige T-Test angewendet. Die Ablehnung der Nullhypothese, dass zwei Stichproben den gleichen Mittelwert besitzen, wurde mit einer Wahrscheinlichkeit  $P < 0,05$  als signifikant, mit  $P < 0,01$  als hoch signifikant und mit  $P < 0,001$  als höchst signifikant bezeichnet.

Bei der Auswertung der FRAP-Experimente wurde untersucht, ob das Bindungs-Modell eine bessere Annäherung an die Messwerte als das Diffusions-Modell ergab. Die Signifikanz wurde hierzu als Parameter  $P_3$  entsprechend der Publikation von Hinow und Kollegen mit der MathWorks Software Matlab berechnet (Hinow et al. 2006).

Zum Vergleich eines Mittelwertes mit einem theoretischen Wert wurde  $t_{\text{Vers}} = |\bar{x} - \mu| \cdot n^{1/2} / s$  berechnet ( $\bar{x}$  = Mittelwert der Stichprobe,  $\mu$  = theoretischer Mittelwert,  $n$  = Anzahl der Stichproben,  $s$  = Standardabweichung). Der berechnete Wert  $t_{\text{Vers}}$  wurde mit dem Tabellenwert  $t_{\text{Tab}}$  für die entsprechende Anzahl an Freiheitsgraden ( $FG = n - 1$ ) und für das gewählte Signifikanz-Niveau  $\alpha$  verglichen ( $t_{\text{Tab}} = 3,182$  für  $FG = 3$  und  $\alpha = 0,005$ ). Für  $t_{\text{Vers}} > t_{\text{Tab}}$  unterscheiden sich die zwei Mittelwerte signifikant (Köhler et al. 1996).

## 4 Ergebnisse

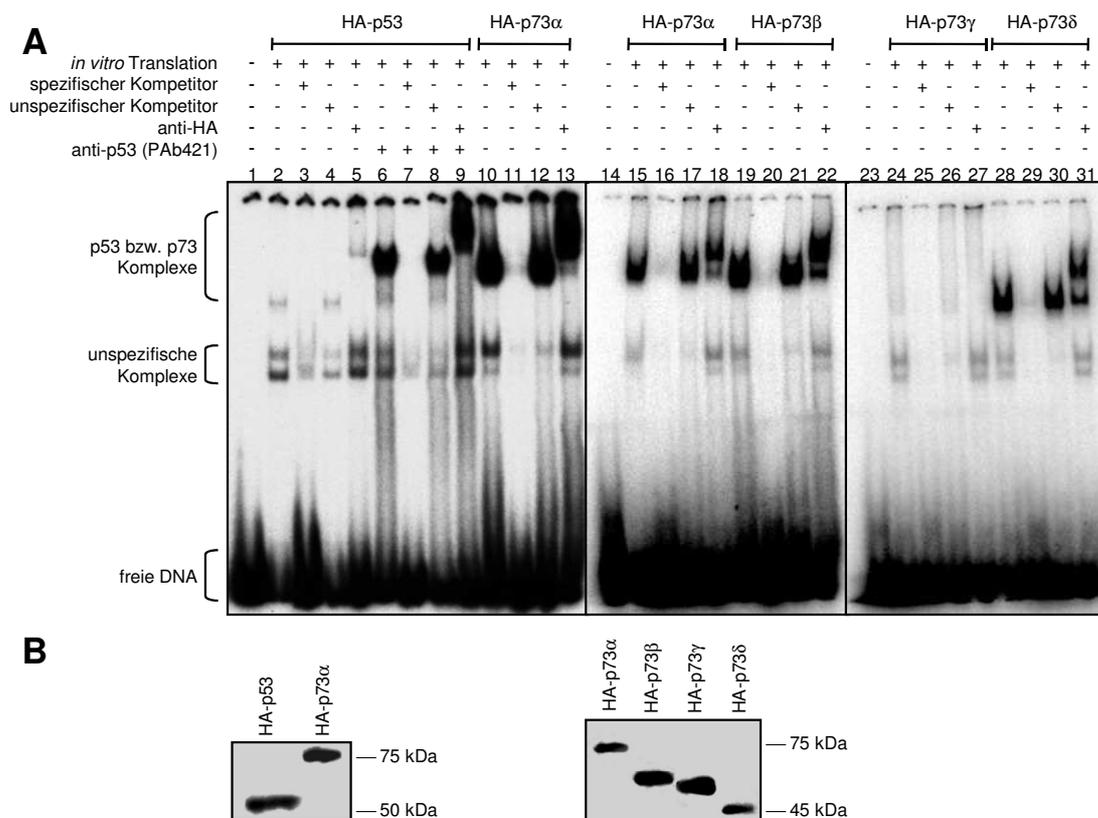
### 4.1 Der Einfluss des Carboxy-Terminus auf die DNA-Bindungseigenschaften von p53 Familienmitgliedern

#### 4.1.1 Unterschiede im Carboxy-Terminus beeinflussen die Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 und p73 Isoformen

Die DNA-Bindungs-Domänen (DBD) von p53 und p73 besitzen etwa 65% Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenz und binden an Response-Elemente gleicher Sequenz (Melino et al. 2002, Yang et al. 2002, Smeenk et al. 2008, el-Deiry et al. 1992, Funk et al. 1992). Nichtsdestotrotz unterscheiden sich die zwei Proteine in ihrer biologischen Funktion (Tab. 1.1). Um zu untersuchen, ob diese Unterschiede schon auf Ebene der DNA-Bindung bestehen, wurden „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) Experimente durchgeführt. Mit EMSA können Sequenz-spezifische Protein-DNA-Interaktionen *in vitro* analysiert werden. Hierzu wird markierte DNA mit dem zu untersuchenden Protein unter geeigneten Bedingungen inkubiert, um eine Komplex-Bildung zu ermöglichen. Diese Komplexe werden auf einem nativen Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei ist die Mobilität von DNA in Komplexen reduziert, wodurch die zugehörige Bande relativ zu freier DNA verschoben wird. Die Abhängigkeit der Komplexbildung von der DNA-Sequenz kann durch Kompetition mit einem Überschuss an unmarkierter DNA mit gleicher beziehungsweise willkürlich vertauschter Sequenz der Nukleotide getestet werden. Die Identität des Proteins kann durch Interaktion mit Antikörpern überprüft werden.

Es wurden EMSA-Experimente mit *in vitro* translatierten p53, p73 $\alpha$ , p73 $\beta$ , p73 $\gamma$  und p73 $\delta$  Proteinen durchgeführt. Auf dem Autoradiogramm sieht man nur im unteren Bereich Signal von freier DNA, die keine Komplexe bildete und daher eine hohe Mobilität hatte (Abb. 4.1 A Spur 1). Zwei zusätzliche Banden stammen von DNA, deren Mobilität durch Bindung an Proteine des *in vitro* Translations-Ansatzes verringert war (Spur 2). Spezifische Kompetition führte zur Reduktion aller Banden, wohingegen unspezifische Kompetition die oberste Bande nicht reduzierte (Spuren 3 und 4). Dies zeigt, dass die oberste Bande von einem Sequenz-spezifischen Komplex stammt. Da die anderen zwei Banden unabhängig von der Sequenz abgeschwächt wurden, stammen sie von Sequenz-unabhängigen DNA-Komplexen.

Die Zugabe des Antikörpers gegen das an p53 angefügte Hämagglutinin-Epitop (HA) vergrößerte den p53-DNA-Komplex, wodurch die Mobilität der DNA zusätzlich verringert wurde, verbunden mit einem weiteren Verschieben („supershift“) der Bande (Spuren 4 und 5). Da die zwei anderen Banden nicht durch den Antikörper verschoben wurden, enthalten die zugehörigen Komplexe nicht p53 (Spuren 4 und 5). Diese Banden werden durch einen Sequenz-unabhängigen DNA-bindenden Bestandteil des *in vitro* Translations-Ansatzes verursacht und daher nicht weiter berücksichtigt.



**Abb. 4.1:** Vergleich der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53 und den p73 Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  *in vitro*. **A:** Autoradiogramm von „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) Experimenten mit *in vitro* translatierten (IVT) Proteinen, die am Amino-Terminus ein Hämagglutinin-Epitop (HA) tragen, und mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP markierter 32 bp langer doppelsträngiger DNA, die ein Response-Element mit der p53 Konsensus-Sequenz enthält (el-Deiry et al. 1992, Funk et al. 1992). Competition erfolgte mit einem 100-fachen molaren Überschuss an unmarkierter DNA mit gleicher (spezifischer) beziehungsweise willkürlich vertauschter (unspezifischer) Nukleotid-Sequenz. Nachweis der p53 Familienmitglieder erfolgte über Zugabe des Antikörpers gegen das HA-Epitop. Der Antikörper PAb421 bindet p53 an den Aminosäureresten 371 bis 380 (Stephen et al. 1995). **B:** Westernblot von gleichen Volumina der in den EMSA-Experimenten benutzten IVT-Ansätze mit einem HA-Antikörper.

Die DNA-Bindung von *in vitro* translatiertem p53 war – in Übereinstimmung mit publizierten Daten – nur gering (Spur 2)(Hupp & Lane 1994a, Delphin et al. 1994). Im Gegensatz dazu

bildete p73 $\alpha$  viel mehr Komplex, obwohl gleiche Mengen der beiden Proteine eingesetzt wurden (Spuren 2 und 10; Abb. 4.1 B links). Die Spezifität der Komplexe konnte jeweils durch Konkurrenz und Antikörper-Zugabe bestätigt werden (Spuren 3-5 und 11-13). Die DNA-Bindung von p53 konnte durch Zugabe des Antikörpers PAb421 jedoch drastisch erhöht werden und erreichte das Niveau von p73 $\alpha$  (Spuren 2, 6 und 10). Dieser Antikörper erkennt ein Epitop im Carboxy-Terminus von p53 und blockiert durch seine Bindung die Carboxy-terminale Domäne (CTD) (Stephen et al. 1995). Diese Tatsache lässt vermuten, dass die unterschiedlichen Carboxy-Termini von p53 und p73 verantwortlich für die beobachteten Mengenunterschiede an gebundener DNA sind.

Um die Rolle des Carboxy-Terminus bei der DNA-Bindung weiter zu untersuchen, wurden EMSA-Experimente mit den p73 Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  durchgeführt. Diese Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen und unterscheiden sich am Carboxy-Terminus (Abb. 4.3). Die Isoformen p73 $\beta$  und p73 $\delta$  sind verkürzt gegenüber der Volllängen-Isoform p73 $\alpha$  und tragen fünf beziehungsweise vier Aminosäuren am Carboxy-Terminus, die sich von p73 $\alpha$  unterscheiden. Ebenfalls verkürzt ist p73 $\gamma$ , jedoch besitzt diese Isoform 76 Aminosäuren, die sich zu p73 $\alpha$  unterscheiden.

Die Mengen an gebundener DNA waren bei p73 $\beta$  und p73 $\delta$  vergleichbar hoch wie bei p73 $\alpha$  (Abb. 4.1 A Spuren 15, 19 und 28). Dies traf jedoch nicht auf p73 $\gamma$  zu, das nur eine sehr geringe DNA-Bindung zeigte, obwohl von allen vier Isoformen gleiche Mengen eingesetzt wurden (Spur 24; Abb. 4.1 A & B rechts). Die Spezifität der Komplexe wurde in allen Fällen durch Konkurrenz und Antikörper-Zugabe bestätigt. Diese Daten zeigen deutliche Unterschiede der verschiedenen p53 Familienmitglieder bei Sequenz-spezifischer DNA-Bindung *in vitro* und deuten auf deren Abhängigkeit vom Carboxy-Terminus hin.

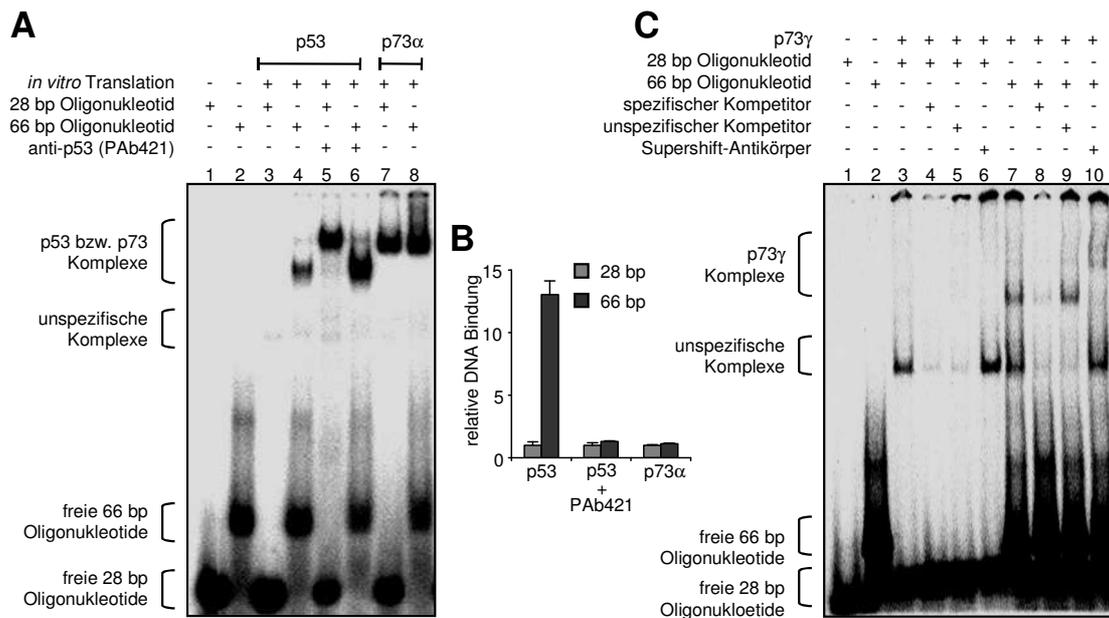
#### **4.1.2 Gleiten entlang von DNA kann Unterschiede der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53 Familienmitgliedern erklären**

Ein inhibitorischer Effekt der CTD von p53 auf Sequenz-spezifische DNA-Bindung wurde vielfach in EMSA-Experimenten beobachtet (Hupp et al. 1992, McKinney et al. 2004, Hupp &

Lane 1994b, Delphin et al. 1994, Jayaraman et al. 1998). Ursächlich hierfür ist Sequenz-unabhängige DNA-Bindung über die CTD, die Gleiten von p53 entlang von DNA („lineare Diffusion“) ermöglicht (McKinney et al. 2004, Liu et al. 2004). Dies bedeutet, dass p53 nicht nur direkt von einem Response-Element dissoziieren kann, an das es Sequenz-spezifisch über seine zentrale DBD gebunden ist, sondern auch die Fähigkeit besitzt, erst entlang der DNA zu gleiten und von dieser dann zu dissoziieren. In solch einem zweistufigen Prozess erfolgt zuerst ein Übergang von Sequenz-spezifischer zu -unabhängiger DNA-Bindung und dann die eigentliche Dissoziation von der DNA. Durch diesen Mechanismus sollte p53 leichter und somit schneller von der DNA dissoziieren, da die energetische Barriere durch die Zweiteilung abgesenkt sein sollte. Nach diesem Model gleitet p53 in EMSA-Experimenten entlang der DNA und fällt an deren Ende von ihr ab (McKinney et al. 2004). Ein Verlängern der DNA verringert die Wahrscheinlichkeit dass p53 das Ende erreicht, wodurch die DNA-Protein-Komplexe stabilisiert werden.

Um zu testen, ob die beobachteten Unterschiede in der DNA-Bindung auf Gleiten entlang der DNA beruhen können, wurden EMSA-Experimente mit kurzer und langer DNA durchgeführt. In beiden Fällen enthielt die DNA das p53 Response-Element aus dem 5'-Bereich des p21 Promotors, ein Response-Element, das sowohl von p53 als auch von p73 gebunden wird (Espinosa & Emerson 2001). Nur mit langer DNA bildete p53 viel Komplex (Abb. 4.2 A Spuren 3 und 4). Im Gegensatz dazu formte p73 $\alpha$  sowohl mit kurzer als auch langer DNA viel Komplex (Spuren 7 und 8). Wurde die CTD von p53 durch Zugabe des Antikörpers PAb421 gehemmt, entstand – wie bei p73 $\alpha$  – viel Komplex mit kurzer und mit langer DNA (Spuren 5 und 6). Dieser Antikörper erhöhte sowohl die Komplexmenge von p53 mit kurzer als auch mit langer DNA (Spuren 3 und 4). Der trimere Komplex aus p53, PAb421 und langer DNA hatte eine höhere Mobilität als der trimere Komplex mit kurzer DNA. Eventuell ist dies ein Effekt unterschiedlichen Biegens der DNA oder wird durch eine andere Stöchiometrie des Komplexes verursacht (Nagaich et al. 1997a). Die Quantifizierung von in Triplikaten durchgeführten EMSA-Experimenten zeigte, dass die Menge des p53 Komplexes ohne Antikörper in relevanter Weise (13-fach) und signifikant ( $P < 0,0001$ ) von der DNA-Länge abhängt, während sowohl p53 Komplexe mit Antikörper als auch Komplexe von p73 $\alpha$  unabhängig von ihr waren (Abb. 4.2 B). Diese Eigenschaft ist ein Indiz dafür, dass die

Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p73 $\alpha$  nicht durch Gleiten entlang der DNA inhibiert wird, während dies bei p53 der Fall ist. Die CTD ist für das Gleiten notwendig, was sich insbesondere darin zeigt, dass der inhibitorische Effekt des Gleitens zwar durch längere DNA abgeschwächt werden kann, jedoch die Blockierung der CTD mit dem Antikörper PAb421 eine weitreichendere Wirkung auf die DNA-Bindung hat.

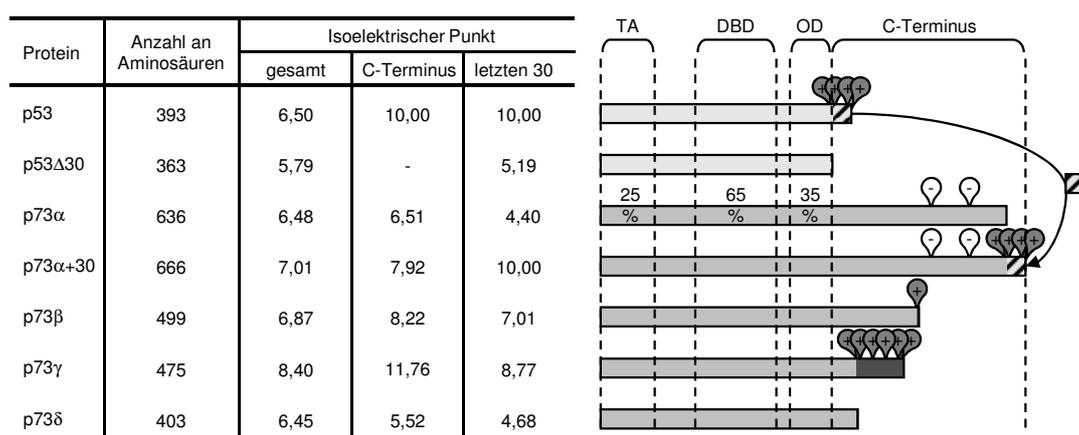


**Abb. 4.2:** Vergleich der Gleiteigenschaften von p53, p73 $\alpha$  und p73 $\gamma$  *in vitro*. **A:** EMSA von p53 und p73 $\alpha$  mit kurzer (28 bp) und langer (66 bp) DNA. Beide Oligonukleotide enthalten das p53 Response-Element vom 5' Bereich des p21 Promotors. **B:** Verstärkung der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung durch lange DNA. Mittels Phospho-Imaging wurden die Komplexmengen von drei unabhängigen EMSA-Experimente quantifiziert und auf die Ansätze mit kurzer DNA normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung. Signifikanz der Unterschiede durch die DNA-Länge wurde mit zweiseitigem T-Test untersucht: p53 ( $P < 0,0001$ ), p53 zusammen mit PAb421 ( $P = 0,0697$ ) und p73 $\alpha$  ( $P = 0,0522$ ). **C:** EMSA von p73 $\gamma$  mit kurzer und langer DNA.

Die p73 Isoform  $\gamma$  zeigte als einzige p73 Isoform schwache DNA-Bindung – vergleichbar mit der von p53. Die Ursache hierfür könnte ebenfalls Gleiten entlang von DNA sein, weshalb p73 $\gamma$  detaillierter in EMSA-Experimenten untersucht wurde. Wie bei p53, war bei p73 $\gamma$  die Komplexbildung nur bei langer DNA sichtbar (Abb. 4.2 C Spuren 3 und 7). Die Spezifität konnte durch Kompetitor und Antikörper-Zugabe bestätigt werden (Spuren 8-10). Diese Abhängigkeit von der DNA-Länge untermauert die Vorhersage der Gleitfähigkeit von p73 $\gamma$ . Insgesamt belegen diese Daten, dass neben p53 auch p73 $\gamma$  zum Gleiten entlang der DNA befähigt ist, während p73 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  dazu nicht in der Lage sind. Diese Eigenschaft erklärt die unterschiedlichen Mengen an DNA-Komplexen der einzelnen p53 Familienmitglieder.

### 4.1.3 Die Fähigkeit des Gleitens entlang von DNA korreliert mit der Ladung des Carboxy-Terminus von p53 Familienmitgliedern

Der Carboxy-Terminus von p53 ist stark positiv geladen und Gleiten auf der DNA wird maßgeblich durch elektrostatische Kräfte zwischen einem positiv geladenen Protein und dem negativ geladenen DNA-Rückgrat vermittelt. Deswegen wurden die isoelektrischen Punkte (pI) der Carboxy-Termini verschiedener p53 Familienmitglieder berechnet (Abb. 4.3). Im Gegensatz zum Carboxy-Terminus von p53 mit einem isoelektrischen Punkt im Basischen (pI=10,0) ist der von p73 $\alpha$  neutral (pI=6,5). Die Isoformen p73 $\beta$  (pI=8,2) und  $\delta$  (pI=5,5) gleichen p73 $\alpha$ , während p73 $\gamma$  eine Ausnahme darstellt. Sowohl bei Betrachtung des gesamten Carboxy-Terminus (pI=11,8) als auch der letzten 30 Aminosäuren (pI 8,8) besitzt p73 $\gamma$  einen basischen isoelektrischen Punkt, wodurch es unter zellulären Bedingungen mehrfach positiv geladen ist. Somit gleicht p73 $\gamma$  in dieser Hinsicht p53 und unterscheidet sich zu p73 $\alpha$ , p73 $\beta$  und p73 $\delta$ , die nicht mehrfach positiv geladen sind. Diese Aufteilung in zwei Gruppen entspricht derjenigen bei der Sequenz-spezifischer DNA-Bindung (Abb. 4.1 A). Die Ladung des Carboxy-Terminus korreliert daher mit den beobachteten DNA-Bindungseigenschaften und kann die Unterschiede von p53 Familienmitgliedern in der Fähigkeit, entlang von DNA zu gleiten, erklären.



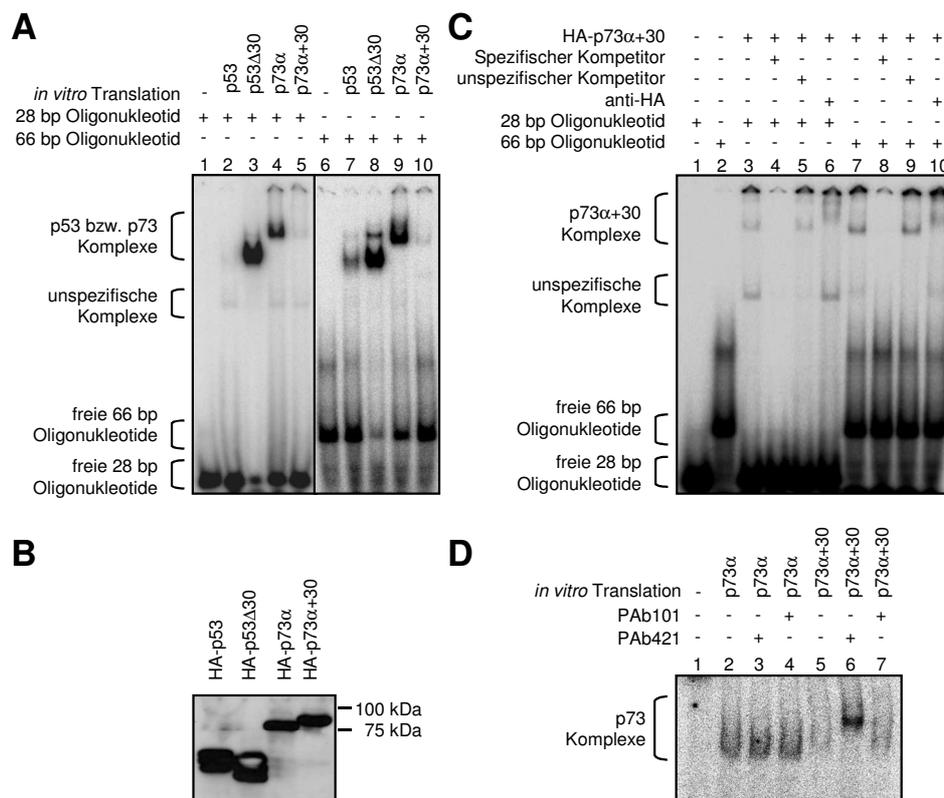
**Abb. 4.3:** Vergleich der elektrischen Ladung von p53 und p73 Proteinen. Die isoelektrischen Punkte der gesamten Proteine, ihrer Carboxy-Termini (Aminosäurereste ab 363 bei p53 bzw. ab 399 bei p73) und ihrer letzten 30 Carboxy-terminaler Aminosäurereste wurden berechnet. Die Domänenstruktur zeigt die Identität der Aminosäure-Sequenzen. Unterschiede der Carboxy-Termini bestehen in der Länge, in der Sequenz

(unterschiedliche Grautöne) und in ihrer elektrischen Ladung (weiße und graue Blasen) und deren Verteilung. TA, Transaktivierungs-Domäne; DBD, DNA-Bindungs-Domäne; OD, Oligomerisierungs-Domäne; +, positive Ladung; -, negative Ladung.

#### **4.1.4 Die Ladung des Carboxy-Terminus beeinflusst die Sequenz-spezifische DNA-Bindung**

Um den kausalen Zusammenhang zwischen der Ladung des Carboxy-Terminus und der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung zu untersuchen, wurde die CTD sowohl von p53 deletiert als auch auf p73 $\alpha$  übertragen. So wurde das chimäre Fusionsprotein p73 $\alpha$ +30, bestehend aus der positiv geladenen CTD von p53 am Carboxy-Terminus von p73 $\alpha$  hergestellt. Als Kontrolle wurde das p53 Deletions-Protein p53 $\Delta$ 30 verwendet, dem die CTD – bestehend aus den 30 Carboxy-terminalen Aminosäuren – und somit deren positive Ladung fehlt (Abb. 4.3)(Hupp et al. 1992). Das Fusions- und das Deletions-Protein erlauben es, Gleitfähigkeit der Carboxy-Termini zu untersuchen und gleichzeitig mögliche Einflüsse unterschiedlicher Protein-Rückgrate auszuschließen.

Die DNA-Bindung von p53 $\Delta$ 30 war viel stärker als von p53 und die von p73 $\alpha$ +30 war schwächer als von p73 $\alpha$ , obwohl paarweise gleiche Protein-Mengen eingesetzt wurden (Abb. 4.4 A Spuren 2-5; Abb. 4.4 B). Dieses Ergebnis untermauert weiter die bisherigen Ergebnisse, wonach ein positiv geladener Carboxy-Terminus die Sequenz-spezifische DNA-Bindung abschwächt.



**Abb. 4.4:** Einfluss der CTD auf die Gleitfähigkeit von p53Δ30 und p73α+30 *in vitro*. **A:** EMSA von p53, p53Δ30, p73α und p73α+30 mit kurzer und langer DNA. **B:** Westernblot von gleichen Volumina der in den EMSA-Experimenten verwendeten IVT Proteine mit einem HA-Antikörper. **C:** EMSA von p73α+30 mit kurzer und langer DNA. Der Nachweis der Spezifität der Komplexe erfolgte durch Konkurrenz und durch Zugabe eines Antikörpers. **D:** EMSA zur Überprüfung der Funktionalität der CTD in p73α+30. Es wurde 32 bp lange doppelsträngige DNA mit der p53 Konsensus-Sequenz, der Antikörper PAb421 – erkennt ein Epitop der CTD –, und der Antikörper PAb101 – erkennt ein Zell-fremdes Epitop – verwendet.

Um einen Zusammenhang zwischen positiver Ladung und Fähigkeit zum Gleiten entlang von DNA zu bestätigen, wurden EMSA-Experimente mit kurzer und langer DNA durchgeführt. Lange DNA konnte die DNA-Bindung von p53 und von p73α+30 verstärken, nicht jedoch von p53Δ30 und p73α (Spuren 2, 5, 7 und 10). Dies kann durch eine partielle Aufhebung des inhibitorischen Effekts der Gleitfähigkeit von p53 und p73α+30 auf die DNA-Bindung erklärt werden. Die verstärkte Bindung von p73α+30 an lange DNA wurde bestätigt und zusätzlich die Spezifität der Komplexe überprüft (Abb. 4.4 C). Um auszuschließen, dass die geringe DNA-Bindung von p73α+30 durch anormale Faltung des Fusionsproteins verursacht wurde, wurde die CTD mit dem Antikörper PAb421 blockiert (Abb. 4.4 D). Die p73α-DNA-Komplexe wurden weder durch Zugabe von PAb421 noch von einem Antikörper gegen ein Zell-fremdes

Epitop beeinflusst (Spuren 2-4). Dagegen wurde der DNA-Komplex von p73 $\alpha$ +30 verschoben („supershift“) und erheblich verstärkt durch Blockieren der CTD, nicht jedoch durch den Kontroll-Antikörper (Spuren 5-7).

Diese Daten belegen, dass die positiv geladene CTD von p53 eine autonome und übertragbare Domäne ist, die Gleiten entlang von DNA ermöglicht. Die CTD wirkt, unabhängig davon, ob sie nativ in p53 vorkommt oder an p73 $\alpha$  fusioniert ist, negativ auf die Sequenz-spezifische DNA-Bindung *in vitro*.

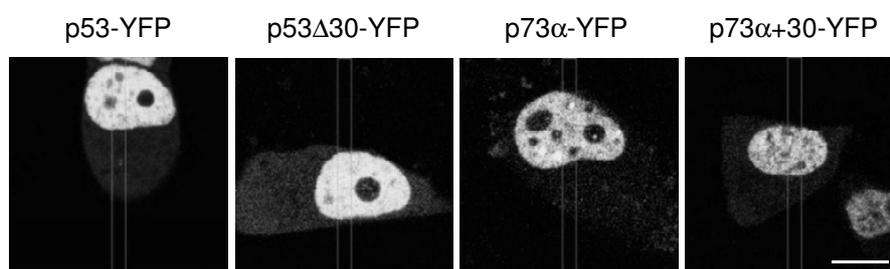
#### 4.1.5 Die CTD von p53 reduziert *in vivo* die Mobilität von p53 und p73 $\alpha$ im Nukleus

Sequenz-unabhängige DNA-Bindung an das Genom und Gleiten entlang der DNA stellen eine Einschränkung in der Bewegungsfreiheit eines Proteins dar. Die Mobilität von p53 im Nukleus sollte daher durch die Sequenz-unabhängige DNA-Bindung der CTD herabgesetzt sein. Die Sequenz-unabhängige DNA-Bindung ist bei p53 die *in vivo* vorherrschende Art der DNA-Bindung, wie mit Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) Experimenten gezeigt wurde, bei denen nur 5% der präzipitierten DNA-Fragmente ein p53 Response-Element mit Konsensus-Sequenz enthielten (Liu et al. 2004, Liu & Kulesz-Martin 2006). Hinow und Kollegen konnten dementsprechend jüngst zeigen, dass die Mobilität von p53 im Nukleus einem Model entspricht, bei dem p53 vorübergehend und unspezifisch an eine immobile Matrix (= genomische DNA) mittels einer Proteinregion abseits der zentralen DBD bindet (Hinow et al. 2006).

Die Bedeutung des Carboxy-Terminus von p53 und p73 $\alpha$  für Sequenz-unabhängige DNA-Bindung wurde daher mittels „fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) Experimenten untersucht. Hierfür wurde das gelb fluoreszierende Protein (YFP) an die Carboxy-Termini der p53/p73 $\alpha$ -Proteine fusioniert. Diese Fusionsproteine wurden in humane Bronchialkarzinom-Zellen der Linie H1299, die kein endogenes p53 besitzen, transfiziert. Die Fusion von YFP beziehungsweise des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) an den Carboxy-Terminus von p53 stört nicht dessen Funktion, was anhand der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung *in vitro*, der Konformation, der Lebensdauer des Proteins, der

Trans-Aktivierung, der Expression des Zielgens p21, der Induktion von Zellzyklus-Arrest, der Suppression von Tumorwachstum und der zellulären Lokalisation nachgewiesen wurde (Sauer 2005 Diplomarbeit, Norris & Haas 1997).

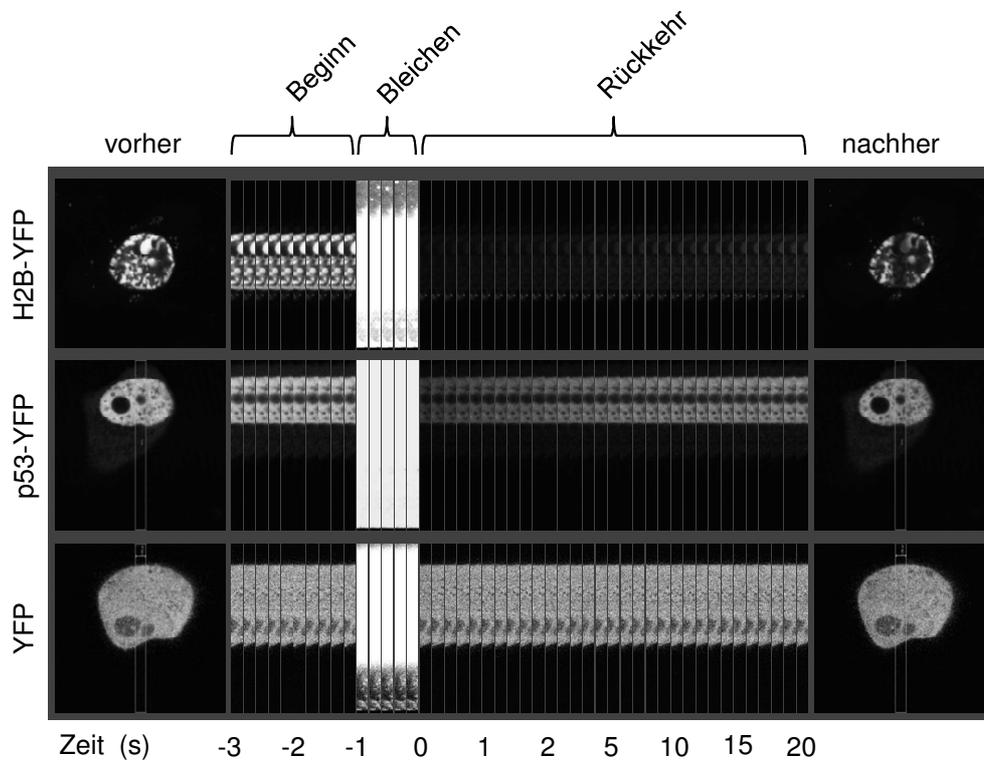
Die Lokalisation der Fusionsproteine wurde durch konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie kontrolliert (Abb. 4.5). Sowohl die p53 Fusionsproteine p53-YFP und p53 $\Delta$ 30-YFP als auch die p73 $\alpha$  Fusionsproteine p73 $\alpha$ -YFP und p73 $\alpha$ +30-YFP befanden sich hauptsächlich im Nukleus und zu einem geringen Anteil im gesamten Zytoplasma und spiegeln somit die Lokalisation von nativem p53 und p73 wider (Shaulski et al. 1990, Grob et al. 2001). Die Verteilung der Fusionsproteine im Nukleus war homogen mit Ausnahme einer geringen Anzahl an Ausschluss-Körpern. Bei diesen Ausschluss-Körpern, die auch bei Immunfluoreszenz-Mikroskopie von p53 ohne YFP-Fusion und bei DAPI-Färbung zu sehen waren, handelt es sich um Nukleoli (Abb. 4.14)(Karni-Schmidt 2007 & 2008). Alle vier Fusionsproteine waren vergleichbar stark exprimiert. Aus diesen Fakten lässt sich schließen, dass die Fusionsproteine zur Untersuchung der Funktion von p53 und p73 $\alpha$  geeignet sind.



**Abb. 4.5:** Zelluläre Lokalisation der p53 und p73 $\alpha$  Fusionsproteine. Fluoreszenz der Fusionsproteinen aus dem gelb fluoreszierenden Protein YFP mit p53, p53 $\Delta$ 30, p73 $\alpha$  beziehungsweise p73 $\alpha$ +30 in H1299 Zellen wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

Die FRAP-Experimente wurden wie bei Hinow und Kollegen beschrieben durchgeführt (Hinow et al. 2006). Die H1299 Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet. Es wurde jeweils die YFP-Fluoreszenz einer gesamten Zelle vor und nach einem FRAP-Experiment aufgenommen (Abb. 4.6). Eine Bilder-Serie eines etwa mittig durch den Nukleus gelegten 2,56  $\mu$ m breiten Streifenbereichs wurde aufgenommen. Dieser Bereich wurde dann durch maximale Bestrahlung gebleicht und anschließend über einen Zeitraum von 20 Sekunden eine Bilder-Serie von ihm aufgenommen. Anhand der Übersichtsaufnahmen wurde die Länge, Breite und Position des

Nukleus bestimmt und innerhalb dieser Region die Fluoreszenz-Intensität in den Bilder-Serien gemessen.

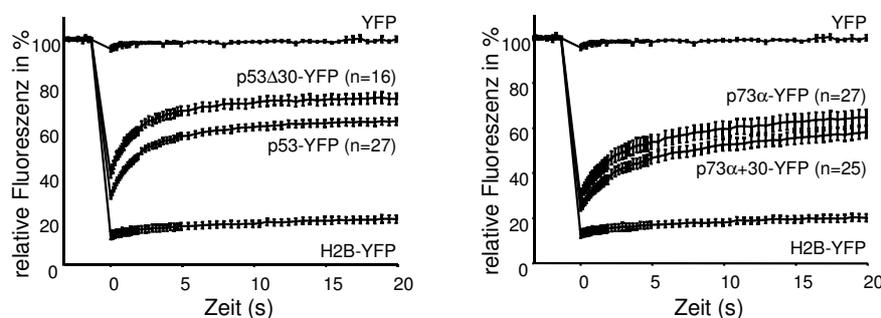


**Abb. 4.6:** Vergleich von FRAP-Aufnahmen unterschiedlich mobiler YFP Fusionsproteine. Die YFP Fluoreszenz einer ganzen Zelle wurde vor und nach einem FRAP Versuch aufgenommen. Während eines Versuchs wurde nur ein  $2,56 \mu\text{m}$  breiter Streifen aufgenommen, darin die Fluoreszenz geblichen und ihre Rückkehr für 20 Sekunden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgezeichnet. Das nukleäre Protein Histon H2B ist immobil, weshalb selbst am Ende des Versuchs die Fluoreszenz in dem Streifen nicht zurückgekehrt war. Das frei diffundierende Protein YFP ist sehr mobil, weshalb die Fluoreszenz bereits direkt nach dem Bleichen zum größten Teil zurückgekehrt war. Das p53 Protein war zwar vollständig mobil, aber die Mobilität war niedriger als von freiem YFP.

Zu Vergleichszwecken wurde die intra-nukleäre Mobilität des Fusionsproteins aus Histon H2B mit YFP sowie von frei diffundierendem YFP untersucht (Abb. 4.6). Die Fluoreszenz von H2B-YFP war vor dem Bleichen hoch, jedoch direkt nach dem Bleichen in dem Streifen komplett ausgelöscht und es fand auch nur sehr geringe Rückkehr im Verlauf des Beobachtungszeitraums statt. Dieses Verhalten ist typisch für ein immobiles Protein, wofür das Histon H2B ein Paradebeispiel ist. Die Immobilität zeigte sich auch darin, dass nach dem Versuch der zuvor geblichene Streifen immer noch deutlich anhand der fehlenden Fluoreszenz zu erkennen war. Anders verhielt es sich für das frei diffundierende YFP. Hier war direkt nach dem Bleichen die Fluoreszenz nur sehr gering reduziert, da dieses Protein so

mobil ist, dass während des Bleichens bereits fast die gesamte Fluoreszenz zurückkehrte. p53 zeigte ein Verhalten, das zwischen diesen beiden Extremen liegt. Die Fluoreszenz von p53-YFP wurde sichtbar geblichen, kehrte jedoch wieder auf ein hohes Niveau zurück. Nach dem Versuch war der zuvor geblichene Streifen nicht von der Umgebung unterscheidbar, wodurch belegt wurde, dass p53 vollständig mobil ist.

Bei p53-YFP (n=27) und bei p73 $\alpha$ -YFP (n=27) war die Bleichtiefe vergleichbar (30% bzw. 29%) und ebenso ihre Fluoreszenz-Rückkehr (64% bzw. 65%) (Abb. 4.7). Unter identischen Versuchsbedingungen wurde p53 $\Delta$ 30-YFP (n=16) weniger geblichen (40%) als p53-YFP und kehrte zu einem höheren Niveau (74%) zurück. Das wenige Bleichen bei p53 $\Delta$ 30-YFP ist, wie bei YFP, ein Zeichen für hohe Mobilität. Gegenteilig verhielt sich p73 $\alpha$ +30-YFP (n=25), das stärker geblichen (25%) wurde und ein niedrigeres Niveau (58%) im Vergleich zu p73 $\alpha$ -YFP erreichte. Die Bleichtiefe gleicht somit tendenziell der von H2B-YFP und spricht für eine geringe Mobilität. Die Proteine p53 und p73 $\alpha$ +30, die beide einen positiv geladenen Carboxy-Terminus besitzen, zeigen eine geringere Mobilität im Vergleich zu den nicht geladenen Proteinen p53 $\Delta$ 30 und p73 $\alpha$ .

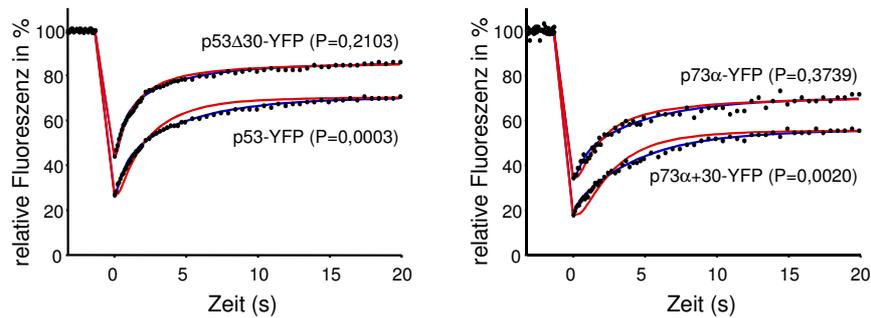


**Abb. 4.7:** Mobilität der p53 und p73 $\alpha$  Fusionsproteinen im Nukleus. Die Fluoreszenz-Intensität innerhalb eines 2,56  $\mu$ m breiten Streifens im Nukleus wurde für jeden Zeitpunkt gemessen, normalisiert auf die mittlere Intensität vor dem Bleichen und anschließend wurde der Mittelwert aller Messungen eines Proteins berechnet. Der Zeitverlauf stellt die Mittelwerte samt Standardfehler der relativen Fluoreszenz-Intensität der verschiedenen Proteine dar.

Zur Bekräftigung dieser Ergebnisse wurde die Kinetik der Fluoreszenz-Rückkehr analysiert, wobei das simple Diffusions-Modell und das erweiterte und mathematisch anspruchsvolle Bindungs-Modell von Hinow und Kollegen Anwendung fanden (Hinow et al. 2006). Das simple Diffusions-Modell geht von einer Population an fluoreszierenden Teilchen aus, in der

die Teilchen eine konstante und einheitliche Diffusionsgeschwindigkeit besitzen, und simuliert deren Verhalten in FRAP-Experimenten durch eine exponentielle Kurve, die durch ihre Halbwertszeit charakterisiert ist. Das erweiterte Bindungs-Modell simuliert zusätzlich eine zweite Population, in der die Teilchen an eine immobile Matrix (= genomische DNA) gebunden sind und daher zeitweise immobil sind; zwischen den beiden Populationen findet ein freier Austausch statt. Da sich die beiden Modelle nur in der Existenz einer zweiten Population unterscheiden, kann statistisch untersucht werden, ob das erweiterte Modell eine Verbesserung gegenüber dem simplen Modell für die gemessene Daten darstellt.

Für die Messdaten jedes einzelnen FRAP-Experiments wurde die Annäherung mit beiden Modellen durchgeführt. Das p53-YFP Fusionsprotein verhielt sich, wie es für das p53-GFP Fusionsprotein beschrieben wurde, und bestätigt somit die Vergleichbarkeit der Experimente. Repräsentative Beispiele zeigen, dass die Kurve des simplen Modells (rote Kurve) die Messwerte im Fall von p53-YFP nur schlecht annähert, aber im Fall von p53 $\Delta$ 30-YFP eine gute Annäherung erzielt (Abb. 4.8). Die Kurve des erweiterten Modells (blaue Kurve) eignet sich jedoch gut zur Annäherung der Messwerte von p53-YFP und p53 $\Delta$ 30-YFP. Das erweiterte Modell stellt für p53-YFP eine höchst signifikante Verbesserung ( $P=0,0003$ ) gegenüber dem simplen Modell dar, nicht jedoch für p53 $\Delta$ 30-YFP ( $P=0,2103$ ). Da die Mobilität von p53 $\Delta$ 30 durch ein Modell ohne Beinhaltung von Bindung beschrieben werden kann und da Sequenz-unabhängige DNA-Bindung die vorherrschende DNA-Bindung von p53 ist, ergibt sich, dass die Mobilität von p53 $\Delta$ 30-YFP nicht durch Sequenz-unabhängige DNA-Bindung beeinflusst wird. Wie für p53-YFP ist das erweiterte Modell nötig, um die Messwerte von p73 $\alpha$ +30-YFP anzunähern ( $P=0,0020$ ), jedoch nicht für die von p73 $\alpha$ -YFP ( $P=0,3739$ ). Auch für p73 $\alpha$  ist bei Abwesenheit der CTD keine Beeinflussung der Mobilität durch Sequenz-unabhängige DNA-Bindung erkennbar.



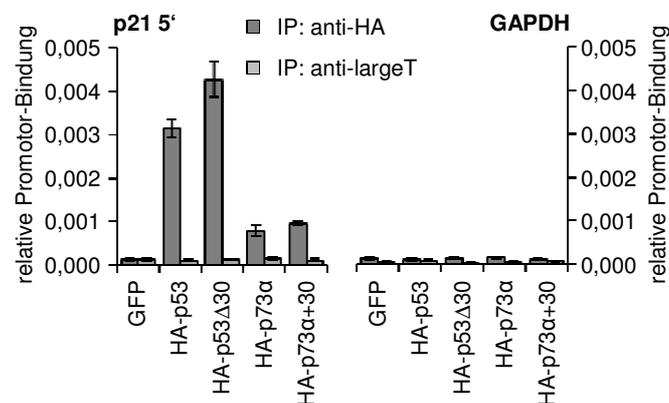
**Abb. 4.8:** Eignung unterschiedlicher Modelle zur Beschreibung der FRAP-Kurven. Es wurde untersucht, ob das simple Diffusions-Modell zur Annäherung der experimentellen FRAP Daten geeignet ist, oder ob das erweiterte Bindungs-Modell hierfür notwendig ist. Dargestellt sind repräsentative FRAP-Daten (schwarze Punkte) mit Annäherung durch das Diffusions-Modell (rote Kurve) und das Bindungs-Modell (blaue Kurve). Die Signifikanz der Verbesserung der Annäherung durch das Bindungs-Modell gegenüber dem Diffusions-Modell wurde wie in der Publikation von Hinow und Kollegen berechnet (Hinow et al. 2006).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der positiv geladene Carboxy-Terminus von p53 die intra-nukleare Mobilität verringert und daher Sequenz-unabhängige DNA-Bindung *in vivo* vermittelt.

#### 4.1.6 Die CTD von p53 inhibiert die Bindung an den p21 Promotor *in vivo*

Für einen Transkriptionsfaktor ist die Unterscheidung von Promotoren eine wichtige Voraussetzung, um differenzielle Genregulation zu erlauben. Hierzu ist Sequenz-spezifische DNA-Bindung *in vivo* notwendig. Daher wurde untersucht, inwiefern sich die beobachteten Unterschiede der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung *in vitro* und der Sequenz-unabhängigen DNA-Bindung *in vivo* auf die Sequenz-spezifische Bindung an Promotoren auswirken. Bisher wurde *in vivo* gezeigt, dass unter exogener Expression von p53 in p53-negativen Zellen, bei der die Menge an p53 limitierend ist, die CTD von p53 ein positiver Regulator der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung ist (McKinney et al. 2004, Liu et al. 2004). Unter diesen Bedingungen wird dem Gleiten eine Funktion des Abtastens und Absuchens der DNA und damit einem verbessertem Auffinden von Response-Elementen im komplexen Genom zugeschrieben. Jedoch wurde auch beschrieben, dass sich p53 in p53-positiven Zellen bereits auf Promotoren seiner Zielgene befindet – sowohl unter normalen

Bedingungen als auch unter Stress (Kaeser & Iggo 2002, Espinosa et al. 2003). Dies deutet darauf hin, dass die Suche nach Response-Elementen nicht limitierend bei der Stress-Antwort von p53 ist (Espinosa et al. 2003). Daher wurde in dieser Arbeit der Gleichgewichtszustand, bei dem p53/p73 $\alpha$  Proteine nicht limitierend sind, sondern bereits Promotoren binden, durch ihre Über-Expression simuliert. Hierzu wurden p53/p73 $\alpha$  Proteine, die am Amino-Terminus mit einem HA-Epitop einheitlich markiert waren, mittels Adenoviren in H1299 Zellen transient exprimiert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden analysiert, da zu diesem Zeitpunkt ein hoher Protein-Spiegel von p53 und p73 $\alpha$  erreicht war und somit der Gleichgewichtszustand in Bezug auf die DNA-Bindung erreicht sein sollte.



**Abb. 4.9:** Promotor-Bindung von p53, p53 $\Delta$ 30, p73 $\alpha$  und p73 $\alpha$ +30 am p21 Gen. Chromatin-Immunopräzipitation von H1299 Zellen 24 Stunden nach adenoviralem Gentransfer des grün fluoreszierenden Proteins GFP oder der p53/p73 $\alpha$  Proteine. Die Präzipitation erfolgte mit einem Antikörpern gegen das HA-Epitop der p53/p73 $\alpha$  Protein oder gegen das Zell-fremde Protein largeT. Die DNA wurde mittels quantitativer PCR auf das p53 Response-Element im 5' des p21 Promotors und auf eine Promotor-Sequenz des Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) analysiert. Dargestellt ist die relative Promotor-Bindung bezogen auf die eingesetzte DNA-Menge als Mittelwerte und Standardabweichung der PCR.

Die ChIP-Analysen zeigten Bindung jedes der vier Proteine an das 5' Response-Elements im Promotor des gemeinsamen Zielgens p21 (Abb. 4.9). Die Spezifität der DNA-Bindung wurde belegt durch fehlende Bindung, wenn kein p53 beziehungsweise p73 $\alpha$  Protein exprimiert wurde (GFP), wenn ein Antikörper gegen ein nicht vorhandenes Epitop benutzt wurde (anti-largeT) oder wenn ein Kontroll-Gen ohne p53 Response-Element untersucht wurde (GAPDH). Sowohl p53 (0,31%) als auch p53 $\Delta$ 30 (0,43%) waren auf dem p21 Promotor mit Abstand stärker angereichert als p73 $\alpha$  (0,08%) und p73 $\alpha$ +30 (0,10%). Dies spiegelt die Unterschiede

in der mRNA Induktion von p21 wider (Abb. 4.10 C). Die Menge an Promotor-gebundenem Protein war von p53 ohne die CTD deutlich erhöht gegenüber p53 mit ihr, jedoch war sie bei p73 $\alpha$  unabhängig von der CTD.

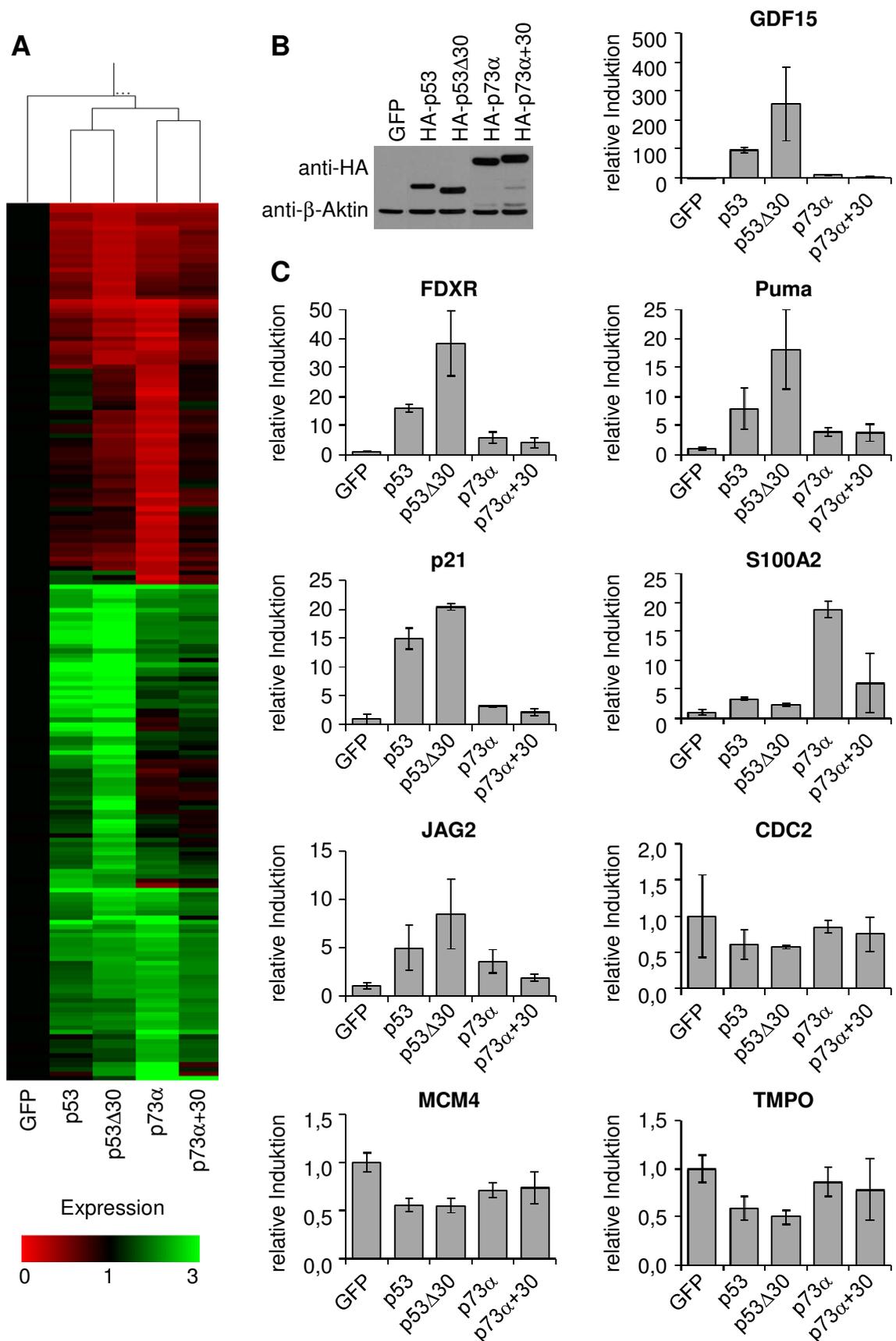
Hieraus ergibt sich für die Promotorbindung primär eine Abhängigkeit vom Protein-Rückgrat und sekundär eine inhibierende Wirkung durch die CTD von p53. Dies belegt auch *in vivo*, bei nicht limitierenden Protein-Mengen, den negativ regulatorischen Effekt eines positiv geladenen Carboxy-Terminus auf Sequenz-spezifische DNA-Bindung.

#### 4.1.7 Die CTD von p53 vermindert die transkriptionelle Aktivität von p53 und p73 $\alpha$

Da die DNA-Bindung eines Transkriptionsfaktors nur eine Voraussetzung für Trans-Aktivierung ist, wurde der Einfluss der p53 und p73 $\alpha$  Proteine auf die Genexpression untersucht. Hierzu wurden objektiv Genom-weite Genexpressions-Profile mittels Oligonukleotid-Microarrays erstellt. H1299 Zellen wurden so mit p53 und p73 $\alpha$  Adenoviren infiziert, dass paarweise gleiche Mengen an p53 und p53 $\Delta$ 30 beziehungsweise an p73 $\alpha$  und p73 $\alpha$ +30 Proteinen exprimiert waren (Abb. 4.10 B). Die gesamte zelluläre mRNA wurde 24 Stunden nach Infektion isoliert und von drei unabhängigen Infektionen in gleichen Masse-Verhältnissen gemischt, um die Verlässlichkeit der Ergebnisse nachfolgender Expressions-Untersuchungen zu erhöhen.

---

**Abb. 4.10:** Effekte von p53, p53 $\Delta$ 30, p73 $\alpha$  und p73 $\alpha$ +30 auf die Genexpression. **A:** Genom-weite Genexpressions-Profile. Aus H1299 Zellen wurde 24 Stunden nach adenoviralem Gentransfer der p53/p73 $\alpha$  Proteine oder von GFP die gesamte mRNA extrahiert, von drei unabhängigen Ansätzen in gleichen Masse-Verhältnissen vereint und mittels Microarrays analysiert. Bei insgesamt 191 Genen war die Expression zumindest bei einer der vier p53/p73 $\alpha$  Ansätze mehr als dreifach verändert gegenüber der GFP Probe. Die Genexpressions-Profile dieser Gene wurden normalisiert auf den GFP Ansatz und sind in der Heatmap entsprechend ihrer Ähnlichkeit bei der Cluster-Analyse angeordnet. **B:** Westernblot auf das HA-Epitop der p53/p73 $\alpha$  Proteine und auf  $\beta$ -Aktin von H1299 Zellen nach Gentransfer entsprechend wie bei A. **C:** Quantitative Expressions-Profile einzelner Gene. Vereinte mRNA der Ansätze von A wurden mittels quantitativer RT-PCR in Bezug auf einzelne Gene quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der dreifach durchgeführten PCR normalisiert auf den GFP Wert.



Insgesamt waren bei 191 Genen mehr als dreifache Expressions-Unterschiede, positiver oder negativer Art, in mindestens einer der p53 oder p73 $\alpha$  Proben im Vergleich zur Kontrollinfizierten Probe (GFP) vorhanden (Abb. 4.10 A). Unter diesen Genen befanden sich bekannte p53 und p73 Zielgene mit einem breiten Spektrum an Funktionen, angefangen bei der Zellzyklus-Regulation (p21) über Differenzierung und Entwicklung (S100A2, GDF15, JAG2) bis hin zu Apoptose (FDXR, PUMA)(el-Deiry et al. 1993, Tan et al. 1999, Tan et al. 2000, Sasaki et al. 2002, Liu & Chen 2002, Nakano & Vousden 2001).

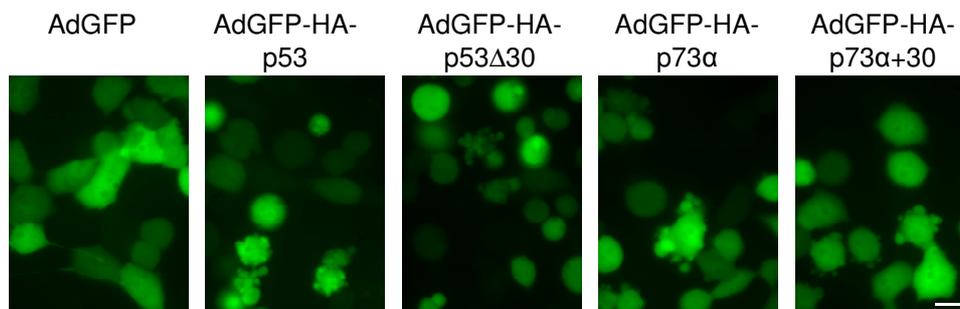
Der Vergleich der Expressions-Profile durch Cluster-Analyse ergab eine größere Ähnlichkeit innerhalb der p53 beziehungsweise p73 Proben als zwischen ihnen und somit eine maßgebliche Abhängigkeit vom Protein-Rückgrat. Beide Gruppen zeigten jedoch überlappende Regulation von Zielgenen (Abb. 4.10 A). Das Vorhandensein der CTD von p53 änderte nicht das Spektrum an Zielgenen, jedoch verminderte sie den Effekt auf die Expression. So hatte p53 einen schwächeren Einfluss auf die Transkription als p53 $\Delta$ 30 und entsprechend war p73 mit CTD weniger aktiv als ohne.

Zur Validierung der Microarray-Daten wurden die Expressions-Profile exemplarisch an einer Reihe von Genen mittels quantitativer RT-PCR bestätigt (Abb. 4.10 C). Die primär p53 regulierten Gene GDF15, JAG2, FDXR, p21 und PUMA wurden alle durch p53 $\Delta$ 30 stärker aktiviert als durch p53. Entsprechend stärker aktiv war p73 $\alpha$ , das ebenfalls keine CTD von p53 hat, bei der Induktion des primär p73 regulierten Gens S100A2. Zusätzlich wurden die reprimierten Zellzyklus-relevanten Gene MCM4, TMPO und CDC2 untersucht, die jedoch nicht direkt durch p53 gebunden werden (Yun et al. 1999). Bei ihnen wurden zum einen keine dreifachen Änderungen gegenüber der Kontroll-Probe festgestellt und zum anderen waren zwar Unterschiede in Abhängigkeit vom Protein-Rückgrat festzustellen, jedoch nicht in Abhängigkeit von der CTD.

Die Genexpressions-Profile zeigen, dass die Abwesenheit eines positiv geladenen Carboxy-Terminus nicht nur Promotor-Bindung *in vitro* und *in vivo* verstärkt, sondern auch die Trans-Aktivierung von aktivierten Zielgenen steigert. Diese Ergebnisse untermauern weiter die negativ regulatorische Rolle eines positiv geladenen Carboxy-Terminus.

#### 4.1.8 Die CTD vermindert Zellzyklus-Arrest und Apoptose

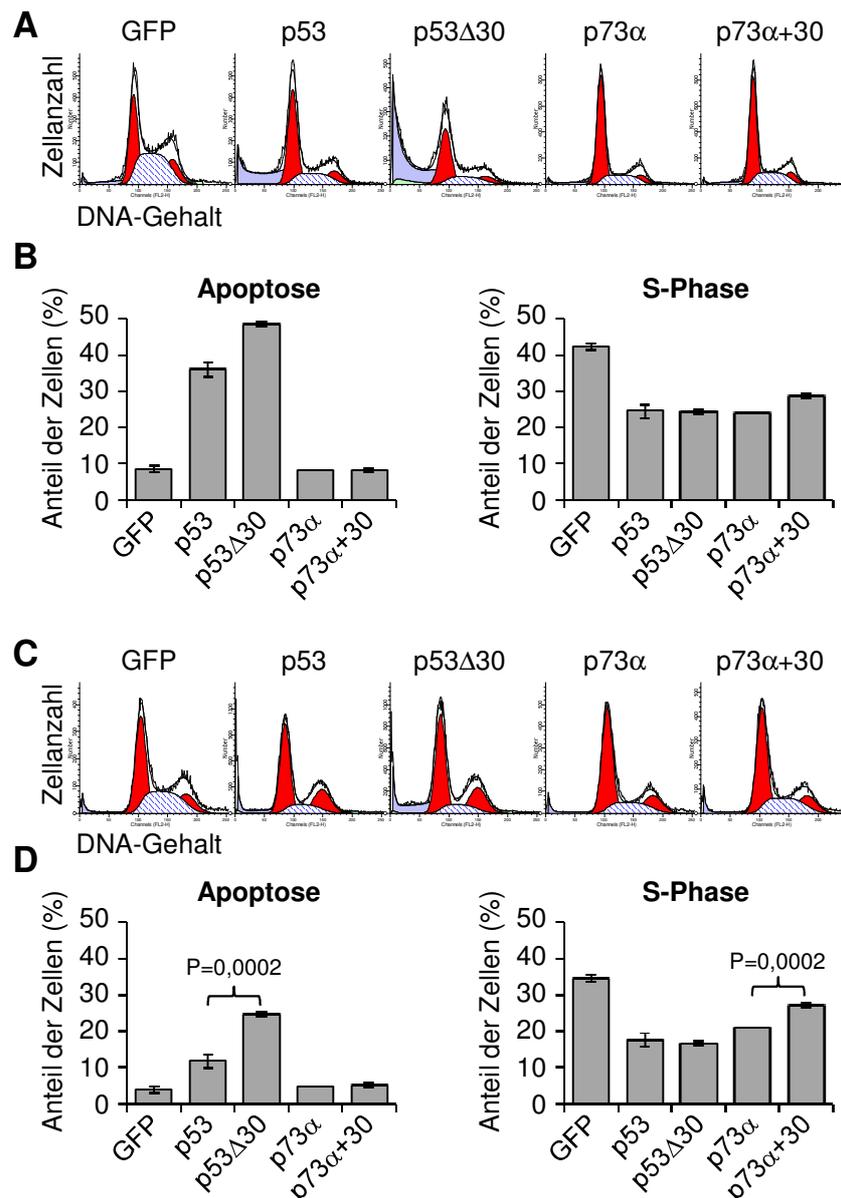
Die Auswirkung der CTD auf das Schicksal einer Zelle und somit die biologische Relevanz der beobachteten Unterschiede der DNA-Bindung und der Genexpression wurden anhand der Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose erforscht. Hierzu wurden p53 und p73 $\alpha$  Proteine mittels Adenoviren in H1299 Zellen exprimiert. Die Infektionen wurden anhand der Fluoreszenz von GFP, das von all diesen Viren co-exprimiert wurde, überprüft (Abb. 4.11). Bereits hierbei waren bei allen p53 und p73 $\alpha$  Ansätzen, nicht jedoch bei dem Kontroll-Ansatz, Zellen mit deutlichen Apoptose-Anzeichen vorhanden. Diese Zellen waren abgerundet, hatten apoptotische Vesikel gebildet und waren vom Untergrund losgelöst.



**Abb. 4.11:** Zellmorphologie bei Expression von GFP, p53, p53 $\Delta$ 30, p73 $\alpha$  oder p73 $\alpha$ +30. Die GFP Fluoreszenz von H1299 Zellen wurde 24 Stunden nach Infektion mit Adenoviren, die zur Expression von GFP alleine oder zusätzlich von p53/p73 $\alpha$  Proteinen führen, mittels Fluoreszenz-Mikroskopie aufgenommen. Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

Der DNA-Gehalt der Zellen wurde 24 Stunden nach Infektion mittels Durchfluss-Zytometrie bestimmt und daraus eine Zellzyklus-Verteilung berechnet. Kontroll-infizierte Zellen (GFP) hatten einen DNA-Gehalt, der dem einfachen diploiden ( $G_0/G_1$ ) bis zu doppelten diploiden ( $G_2/M$ ) Chromosomen-Satz einer Zelle entspricht (Abb. 4.12 A). Viele p53 und p53 $\Delta$ 30 infizierte Zellen hatten einen geringeren DNA-Gehalt als den einfachen (sub- $G_1$ ), was charakteristisch ist für apoptotische Zellen, in denen genomische DNA fragmentiert wird. Der Anteil an apoptotischen Zellen war bei p53 $\Delta$ 30 (48,38%) höher als bei p53 (35,98%) (Abb. 4.12 B). Im Gegensatz zu p53 und p53 $\Delta$ 30 wirkten sich p73 $\alpha$  und p73 $\alpha$ +30 in dieser Zelllinie nicht messbar auf Apoptose aus. Dies könnte, wie die Unterschiede bei der Genexpression, eine Folge der verschiedenen Protein-Rückgrate sein.

Neben Apoptose können p53 und p73 den Zellzyklus regulieren, wobei sie via p21 einen Arrest in der G<sub>1</sub>-Phase vermitteln (el-Deiry et al. 1993, Kaghad et al. 1997). In H1299 Zellen waren p53 (24,52%) und p53Δ30 (24,37%) gleichermaßen in der Lage die S-Phase zu reduzieren, was eine Folge eines G<sub>1</sub>-Arrests ist (Abb. 4.12 B). In gleichem Maße reduzierte p73α (23,98%) die S-Phase, während die Reduktion durch p73α+30 (28,60%) etwas geringer war.



**Abb. 4.12:** Effekte von p53, p53Δ30, p73α und p73α+30 auf Apoptose und Zellzyklus-Arrest. Der zelluläre DNA-Gehalt wurde 24 Stunden nach adenoviralem Gentransfer anhand der Propidiumjodid Fluoreszenz mittels Durchfluss-Zytometrie bestimmt. **A:** Histogramm der Häufigkeitsverteilung des DNA-Gehalts von H1299 Zellen. Zellzyklus-Phasen wurden durch Annäherung der Profile mit einem Modell quantifiziert. Rot: G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>- beziehungsweise G<sub>2</sub>-Phase; blau schraffiert: S-Phase; violett: apoptotische Zellen; grün: Zellfragmente. **B:** Induktion von Apoptose und Reduktion der S-Phase in H1299 Zellen. Balkendiagramm der Mittelwerte und

Standardabweichungen von je zwei unabhängigen Zellzyklus-Profilen. **C:** Zellzyklus-Profile von Saos-2 Zellen. Durchführung entsprechend zu A. **D:** Induktion von Apoptose und Reduktion der S-Phase in Saos-2 Zellen. Balkendiagramm von je drei unabhängigen Zellzyklus-Profilen. Signifikanzen der Unterschiede im zweiseitigen T-Test sind angegeben.

Der negativ regulatorische Einfluss der positiv geladenen CTD von p53 auf die Fähigkeit von p53 und p73 $\alpha$  den Zellzyklus zu regulieren und Apoptose zu initiieren, wurde zusätzlich in der humanen p53-negativen Osteosarcom-Zelllinie Saos-2 bestätigt (Abb. 4.12 C). In diesen Zellen wurde Induktion von Apoptose durch p53 $\Delta$ 30 höchst signifikant stärker als durch p53 ausgelöst (P=0,0002). Ebenfalls höchst signifikant stärker war die Reduktion der S-Phase durch p73 $\alpha$  als durch p73 $\alpha$ +30 (P=0,0002)(Abb. 4.12 D).

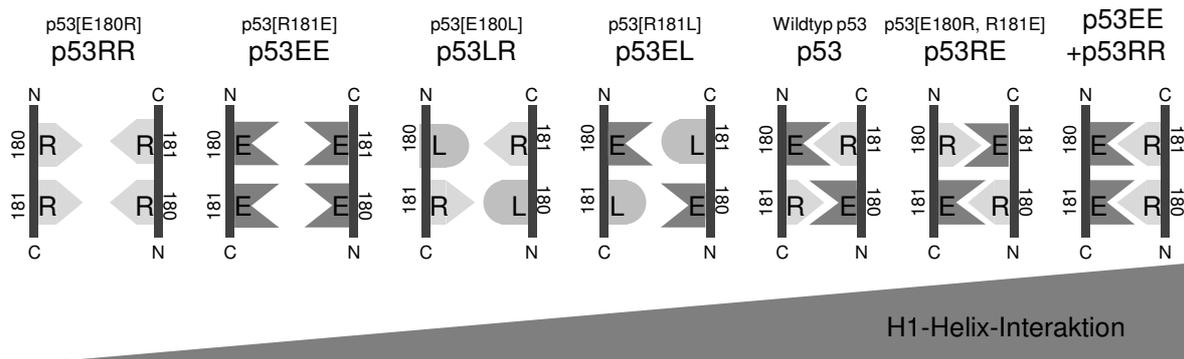
Aus diesen *in vivo* Daten ergibt sich, dass ein positiv geladener Carboxy-Terminus die Fähigkeit von p53 Familienmitgliedern, Proliferation zeitweise oder permanent zu hemmen, vermindert und somit entscheidenden Einfluss auf das Schicksal einer Zelle hat.

## 4.2 Einfluss der H1-Helix-Region auf die DNA-Bindungseigenschaft von p53

### 4.2.1 Vordaten: Mutationen der H1-Helix verändern die DNA-Bindung von p53 *in vitro* und das Zellschicksal *in vivo*

Die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor ist abhängig von seiner Fähigkeit, DNA Sequenz-spezifisch zu binden. Dabei wird die Protein-DNA-Interaktion einerseits durch die DNA-Sequenz und andererseits durch die Aminosäure-Sequenz und Struktur von p53 bestimmt. Neuere Strukturdaten zeigen, dass die zentrale DNA-Bindungs-Domäne von p53 auf der DNA Tetramere bildet, die durch Protein-Protein-Interaktionen der H1-Helices stabilisiert sind (Kitayner et al. 2006). Hierbei sind insbesondere elektrostatische Wechselwirkungen („Salzbrücken“) zwischen den negativ und positiv geladenen Aminosäureresten Glutamat 180 (E180) und Arginin 181 (R181) unterschiedlicher Monomere beteiligt (Abb. 1.6). Die Bedeutung dieser Aminosäurereste wird unterstrichen durch das Vorkommen von E180 und R181 Mutationen in Tumorpatienten und Familien mit Li-Fraumeni Syndrom (Varley et al. 2003, Olivier et al. 2002). Diese Mutationen fallen nicht in eine der beiden bislang beschriebenen Klassen von p53 Mutationen, da sie weder am direktem Kontakt mit der DNA beteiligt sind, noch die globale Struktur von p53 verändern (Dehner et al. 2005).

Um die Funktion dieser Interaktions-Region besser zu verstehen, wurden Mutanten dieser Region untersucht. Der Austausch der Aminosäurereste E180 und R181 durch anders geladene Aminosäurereste wurde genutzt, um die Interaktion zwischen diesen Aminosäureresten abzuschwächen oder zu verstärken (Abb. 4.13). Diese p53 Mutanten werden im Folgenden als p53EE, p53EL, p53LR, p53RR und p53RE bezeichnet, wobei die Buchstaben für die Aminosäurereste an den Positionen 180 und 181 stehen. Diese Mutanten führen in Dimeren zu elektrostatisch abstoßenden Kräften im Fall von doppelt negativ geladenem p53EE oder doppelt positiv geladenem p53RR, zu fehlender Anziehung im Fall von einfach geladenem p53EL oder p53LR und zu Anziehung – vergleichbar zu Wildtyp p53 – von entgegengesetzt geladenem p53RE. Die Kombination aus einem p53EE und einem p53RR Monomer innerhalb eines Dimers ermöglicht durch Komplementation ebenfalls Anziehung der zwei Mutanten.



**Abb. 4.13:** H1-Helix-Interaktion von p53 Mutanten. Schematisch dargestellt ist die Interaktion der Aminosäurereste 180 und 181 von zwei Monomeren in gegenläufiger Primärstruktur. C, Carboxy; N, Amino; E, Glutamat (negativ geladen); R, Arginin (positiv geladen); L, Leucin (neutral).

In der Arbeitsgruppe Stiewe konnte gezeigt werden, dass alle diese Mutanten Tetramere bilden (unveröffentlichte Daten). Weiter zeigte sich, dass die Sequenz-spezifische DNA-Bindung *in vitro* mit zunehmender Interaktion der Monomere anstieg; p53EL zeigte lediglich schwache DNA-Bindung, während die DNA-Bindung durch p53RE sehr stark ausgeprägt war (unveröffentlichte Daten, Abb. 4.20 & 4.21). Darüber hinaus unterschieden sich die Mutanten auch in ihrer Wirkung auf das Schicksal der Zelle. So führte schwache Interaktion, beispielsweise von p53EL, zu Zellzyklus-Arrest, während starke Interaktion, beispielsweise von p53RE, Apoptose auslöste (unveröffentlichte Daten, Crook et al. 1994, Ludwig et al. 1996). Es wurde Komplementation von p53EE und p53RR bei der DNA-Bindung *in vitro* und bei der Trans-Aktivierung festgestellt (Dehner et al. 2005, unveröffentlichte Daten). Dies demonstriert, dass die beobachteten Effekte der Mutanten aus der veränderten Interaktion zwischen Monomeren resultieren und belegt damit die Bedeutung der H1-Helix-Interaktion bei kooperativer DNA-Bindung.

Aus diesen beobachteten Unterschieden bei der DNA-Bindung und bei dem ausgelösten Zellschicksal ergeben sich neue Möglichkeiten zur Beantwortung interessanter Fragestellungen. Zum einem kann an diesen Mutanten die DNA-Bindung in Bezug auf Stärke, Sequenz-Spezifität und Regulation erforscht werden. Zum anderen ist bisher unverstanden, wie p53 zwischen Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose unterscheidet, und ob die Ursache hierfür auf Ebene der DNA-Bindung liegt. Die Mutanten können als Werkzeuge dienen, die sich in einzelnen Merkmalen – DNA-Bindung beziehungsweise induziertes

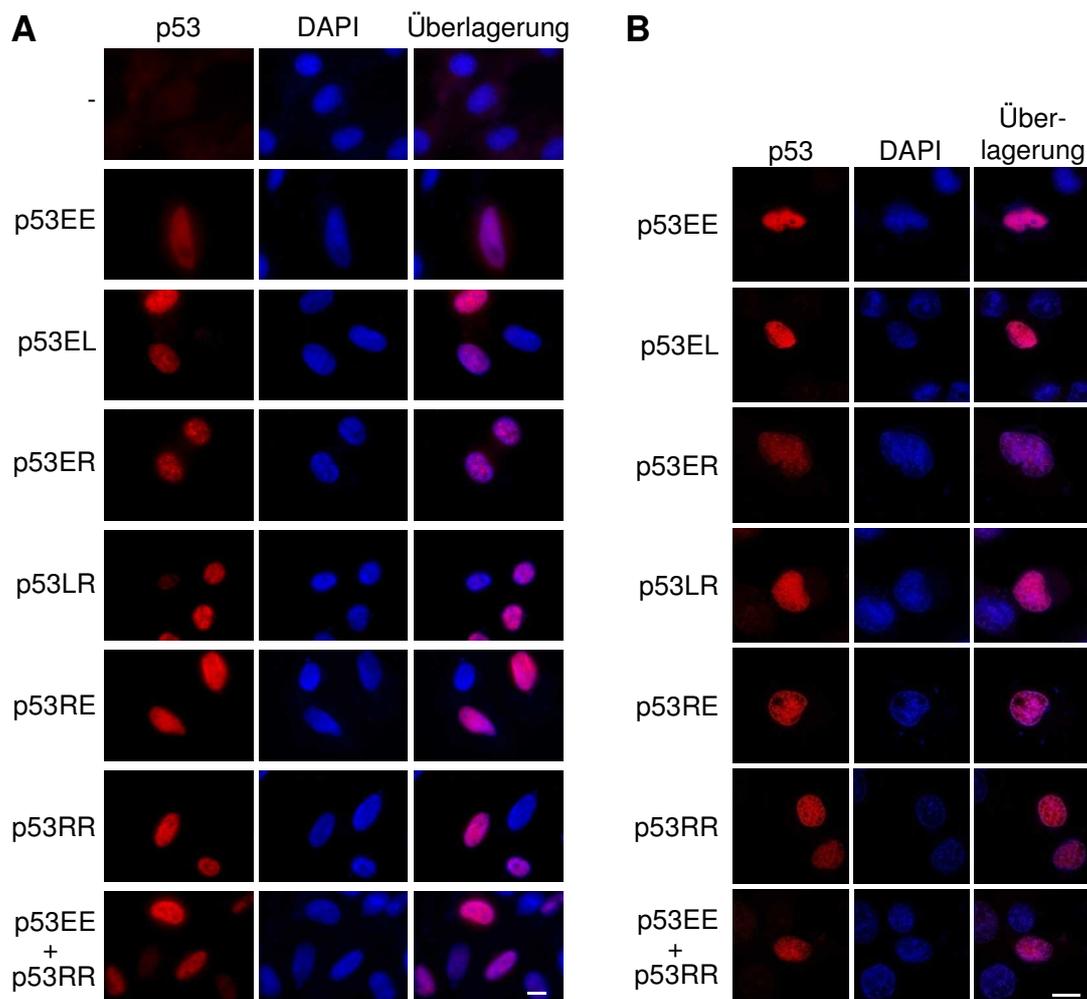
Zellschicksal – unterscheiden und dadurch gezielt deren Erforschung ermöglichen. Starke DNA-Bindung und Apoptose-Induktion wird insbesondere durch p53RE repräsentiert, während schwache DNA-Bindung und Induktion von Zellzyklus-Arrest charakteristisch für p53EL sind. Es ist somit möglich, durch einzelne Punktmutationen die wichtigsten Funktionen von p53 genetisch zu separieren und zu studieren.

#### **4.2.2 Die H1-Helix-Interaktion verändert nicht die zelluläre Lokalisation von p53**

Die Mutanten der H1-Helix unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit Apoptose und Zellzyklus-Arrest zu induzieren. Die von p53 vermittelte Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose basiert hauptsächlich auf seiner Fähigkeit die Trans-Aktivierung zu regulieren. Dies setzt voraus, dass sich p53 im Nukleus befindet. Um auszuschließen, dass die beobachteten verschiedenen Wirkungen der H1-Helix-Mutanten auf das Zellschicksal durch unterschiedliche zelluläre Lokalisation verursacht werden, wurde die zelluläre Lokalisation der H1-Helix-Mutanten untersucht.

Hierzu wurden H1299 Zellen 24 Stunden nach transienter Transfektion unterschiedlicher p53 codierender Plasmide mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert (Abb. 4.14 A). In nicht transfizierten Zellen konnte, wie erwartet, kein p53 Protein nachgewiesen werden. Wildtypisches p53 und alle Mutanten waren vorwiegend im Nukleus lokalisiert, der mit DAPI gefärbt war. Zusätzlich wurde die Lokalisation in Saos-2 Zellen 24 Stunden nach Infektion mit entsprechenden Adenoviren validiert (Abb. 4.14 B). Auch hier zeigte sich einheitlich die vorwiegend nukleäre Lokalisation von wildtypischem p53 und aller Mutanten.

Die Lokalisation der verschiedenen H1-Helix-Mutanten unterscheiden sich nicht untereinander und auch nicht zu wildtypischem p53. Die Lokalisation der verschiedenen p53 Mutanten kann daher die unterschiedlichen Wirkungen der Mutanten auf das Zellschicksal nicht erklären.



**Abb. 4.14:** Zelluläre Lokalisation der p53 H1-Helix-Mutanten. **A:** Immunfluoreszenz von H1299 Zellen 24 Stunden nach transients Transfektion unterschiedlicher p53 codierender Plasmide und zur Kontrolle von nicht transfizierten Zellen. **B:** Immunfluoreszenz von Saos-2 Zellen 24 Stunden nach Infektion mit unterschiedlichen p53 codierenden Adenoviren. Mit dem Antikörper DO-1 wurde p53 nachgewiesen und mit DAPI Nuklei gefärbt. Der Balken entspricht jeweils 10 µm.

#### 4.2.3 Die H1-Helix-Interaktion bestimmt *in vivo* die Spezifität der DNA-Bindung von p53

Unterschiede der H1-Helix-Mutanten bei der Apoptose-Induktion können auch durch die differentielle Transkription von Zielgenen verursacht werden, was den primären Wirkmechanismus von p53 darstellt. Damit in Übereinstimmung wurde in umfangreichen Studien der Genexpression auf mRNA- und Protein-Ebene und der Trans-Aktivierung gezeigt, dass p53EL maßgeblich Zellzyklus-Arrest relevante Gene induziert, hingegen proapoptische Gene durch p53RE induziert werden (unveröffentlichte Daten, Abb. 4.23). Eine

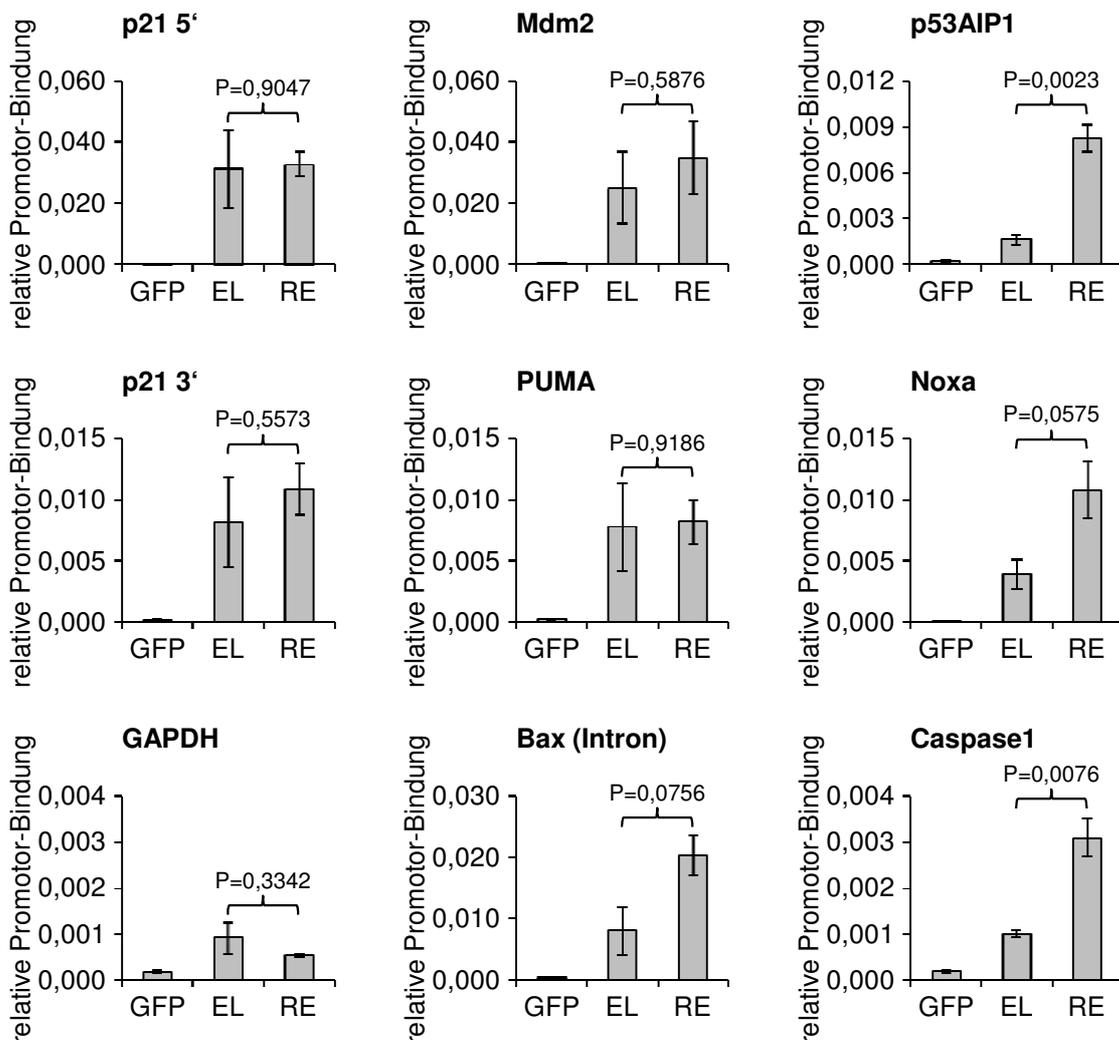
Ursache für diese Differenzen in der Genexpression und im zellulären Phänotyp kann differentielle DNA-Bindung von p53 an Promotoren sein.

Daher wurde mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) untersucht, ob *in vivo* bereits auf Ebene der DNA-Bindung Unterschiede zwischen den Mutanten bestehen. Hierzu wurde in je drei Ansätzen von Saos-2 Zellen 18 Stunden nach Infektion mit Adenoviren, die nur GFP oder gemeinsam mit p53EL oder mit p53RE codierten, quantifiziert, wieviel p53 an Promotor-Bereiche entsprechender p53 Zielgene gebunden war. (Abb. 4.15).

Die Mutanten p53EL und p53RE banden beide an Promotoren einer Reihe bekannter direkter p53 Zielgene. Die Spezifität der Promotor-Bindung zeigte sich einerseits in der fehlenden Bindung der Kontroll-infizierten Proben (GFP) und andererseits in den äußerst geringen Werten bei dem als Kontrolle dienenden Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), das kein p53 Zielgen ist. Bei GAPDH glichen die Werte von p53EL und p53RE dem Hintergrund (GFP) und können daher als fehlende Bindung gewertet werden. Die Quantität der Promotor-Bindung unterschied sich erheblich zwischen den untersuchten Genen und reichte von minimal 0,1% (bei Caspase1) bis maximal 3,5% (bei Mdm2). Bei einzelnen Genen (p53AIP1 und Caspase1) war eine stärkere Bindung von p53RE gegenüber p53EL offensichtlich.

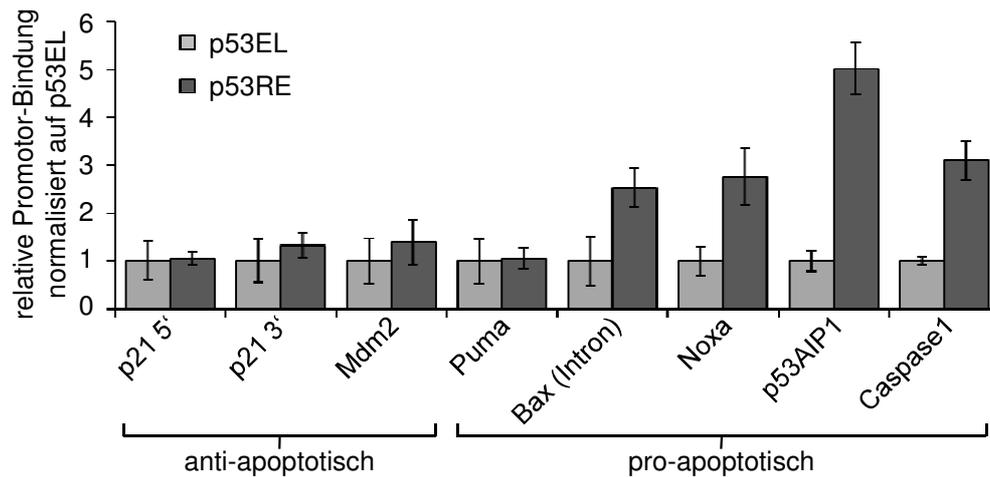
Das Zellzyklus-relevante Gen des Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21 enthält zwei funktionelle p53 Response-Elemente (p21 5' und p21 3'), die sich etwa 2300 bp und 1400 bp stromaufwärts vom Transkriptions-Start befinden (Espinosa & Emerson 2001). Sowohl die Bindung von p53EL ( $3,2\% \pm 1,6\%$ ) und p53RE ( $3,3\% \pm 0,4\%$ ) an das 5'-Element ( $P=0,9047$ ) als auch an das 3'-Element (p53EL:  $0,8\% \pm 0,4\%$ ; p53RE:  $1,1\% \pm 0,2\%$ ;  $P=0,5573$ ) unterschieden sich nicht. Das Mdm2 Gen, das eine auf p53 negativ regulatorisch wirkende E3-Ubiquitin-Ligase codiert, wurde von den Mutanten p53EL ( $2,5\% \pm 1,2\%$ ) und p53RE ( $3,5\% \pm 1,2\%$ ) vergleichbar stark gebunden ( $P=0,5876$ ). Der Promotor des pro-apoptotischen Gens PUMA zeigte auch keine Unterschiede ( $P=0,9186$ ) in der Bindung von p53EL ( $0,8\% \pm 0,4\%$ ) und p53RE ( $0,8\% \pm 0,2\%$ ). Die Bindung von p53RE war höher als von p53EL an den Promotoren der pro-apoptotischen Gene Bax ( $2,0\% \pm 0,3\%$  bzw.  $0,8\% \pm 0,4\%$ ) und Noxa ( $1,1\% \pm 0,2\%$  bzw.  $0,4\% \pm 0,1\%$ ), jedoch wurde die Signifikanz-Schwelle verfehlt ( $P=0,0756$  bzw.  $P=0,0575$ ). Der Promotor des pro-apoptotischen Gens p53AIP1 war hoch signifikant ( $P=0,0023$ ) mehr durch

p53RE ( $0,8\% \pm 0,1\%$ ) als durch p53EL ( $0,2\% \pm 0,1\%$ ) gebunden. Ebenfalls hoch signifikante ( $P=0,0076$ ) Unterschiede gab es bei dem pro-apoptotischen Gen Caspase1, das zwar insgesamt nur gering gebunden war, jedoch mit Abstand mehr von p53RE ( $0,3\% \pm 0,1\%$ ) als von p53EL ( $0,1\% \pm 0,0\%$ ) (Miura et al. 1993, Gupta et al. 2001).



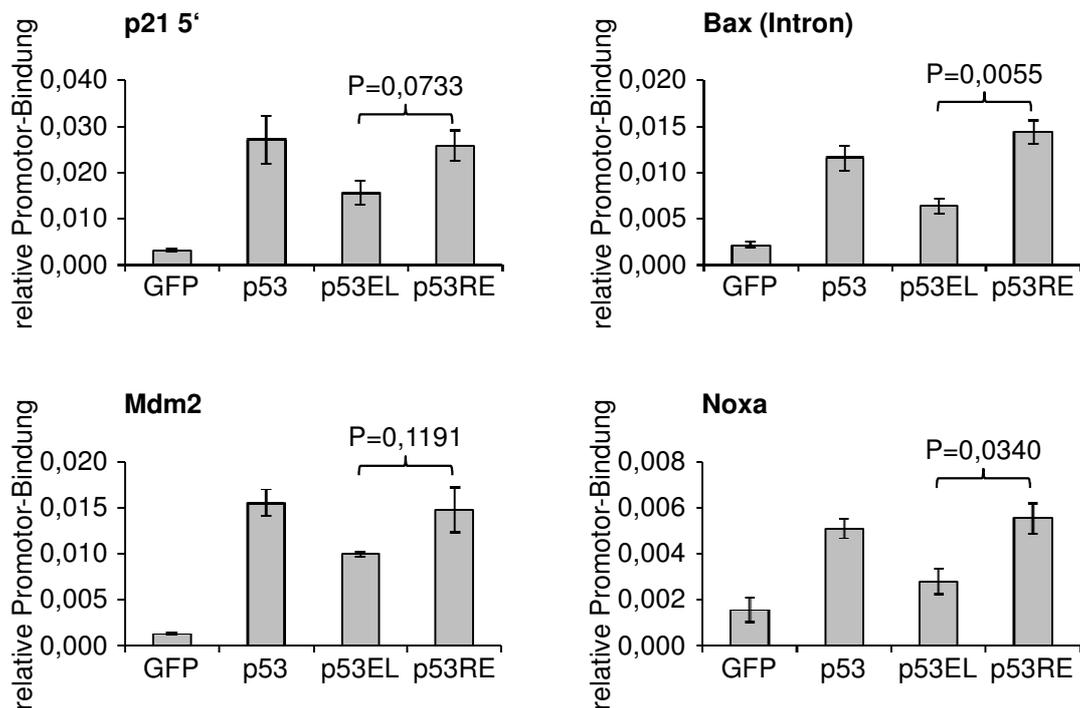
**Abb. 4.15:** Promotor-Bindung unterschiedlicher p53 H1-Helix-Mutanten. Chromatin-Immunopräzipitation von Saos-2 Zellen 18 Stunden nach Infektion mit Adenoviren, die p53EL beziehungsweise p53RE codierten. Die Präzipitation erfolgte mit dem p53 Antikörper DO-1. Als Negativ-Kontrolle dienten Zellen nach Infektion mit Adenoviren, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) codierten. Die Promotor-Bindung wurde jeweils in drei unabhängigen Replikaten untersucht. Die Quantifizierung erfolgte dreifach mittels quantitativer PCR. Es wurden Promotor-Bereiche der entsprechenden direkten p53 Zielgene untersucht, die ein bekanntes p53 Response-Element enthalten. Das Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist kein p53 Zielgen und diente als Negativ-Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der relativen Promotor-Bindung bezogen auf die eingesetzte DNA-Menge von jeweils drei unabhängigen Proben. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen p53EL und p53RE im zweiseitigen T-Test ist angegeben.

Der Vergleich der Promotor-Bindung der untersuchten Gene ergab, dass p53RE und p53EL etwa gleich stark an die anti-apoptotischen Gene p21 (5' und 3') und Mdm2 banden (Abb. 4.16). Entsprechendes gilt für das Gen Puma. Dagegen band p53RE stärker als p53EL an die pro-apoptotischen Gene Bax, Noxa, p53AIP1 und Caspase1. Diese vier pro-apoptotischen Gene wurden mindestens doppelt so stark von p53RE als von p53EL gebunden.



**Abb. 4.16:** Vergleich der Promotor-Bindung zwischen p53EL und p53RE bei pro- und anti-apoptotischen Zielgenen. ChIP-Daten von Abb. 4.15 wurden normalisiert auf p53EL. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardfehler der jeweiligen drei unabhängigen Proben.

Diese Ergebnisse wurden für die Gene p21 (5') ( $P=0,0733$ ), Mdm2 ( $P=0,1191$ ), Bax ( $P=0,0055$ ) und Noxa ( $P=0,0340$ ) an drei unabhängigen Proben bestätigt und zusätzlich mit wildtypischem p53 verglichen. Die Promotor-Bindung von p53EL war bei diesen vier Genen jeweils geringer als von wildtypischem p53, während die Promotor-Bindung von p53RE an den pro-apoptotischen Genen Bax und Noxa höher als von wildtypischem p53 war (Abb. 4.17).



**Abb. 4.17:** Promotor-Bindung von wildtypischem p53 und unterschiedlichen H1-Helix-Mutanten. Chromatin-Immunopräzipitation von Saos-2 Zellen 18 Stunden nach adenoviralem Gentransfer. Die Präzipitation erfolgte mit dem p53 Antikörper DO-1. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler der relativen Promotor-Bindung bezogen auf die eingesetzte DNA-Menge von jeweils drei unabhängigen Proben. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen p53EL und p53RE im zweiseitigen T-Test ist angegeben.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich die p53 H1-Helix-Mutanten nicht nur bei der DNA-Bindung *in vitro* unterscheiden, sondern auch *in vivo*. Mit Ausnahme von Puma werden pro-apoptische Gene stärker von p53RE als von p53EL gebunden, während anti-apoptische Gene von beiden Mutanten gleichermaßen gebunden werden. Die vermehrte Bindung der pro-apoptischen Gene durch p53RE kann somit die Ursache für die stärkere Apoptose-Induktion und die unterschiedliche Wirkung der beiden p53 Mutanten auf das zelluläre Schicksal sein. Dies zeigt, dass Modulation der H1-Helix-Interaktion die Promotor-Bindung an pro-apoptischen Genen verändert und somit eine Möglichkeit bietet, Transkriptions-abhängig zwischen Zellzyklus-Arrest und Apoptose zu entscheiden.

#### 4.2.4 Phosphorylierung von Serin 183 könnte die H1-Helix-Interaktion regulieren

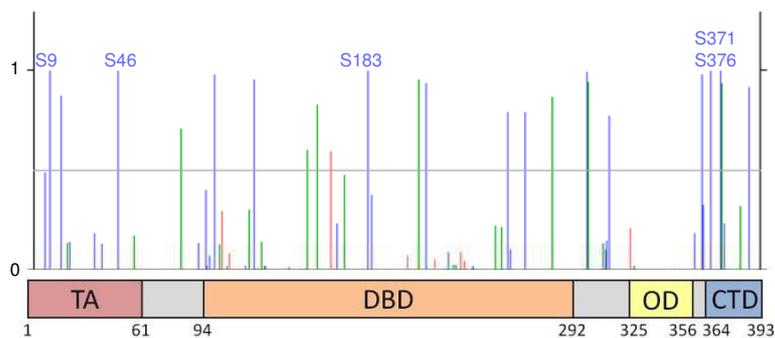
Die H1-Helix-Interaktion kann auf die Wirkung von p53 einen Einfluss haben, wie sich anhand der Mutanten zeigte. Ob die H1-Helix-Interaktion *in vivo* reguliert wird, ist unbekannt, da bisher keine geeigneten Methoden zur Verfügung stehen, um die H1-Helix-Interaktion *in vivo* zu messen.

Abgesehen von den in Tumoren vorkommenden Mutationen der H1-Helix, stellt sich die Frage nach einem physiologischen Mechanismus, um die H1-Helix-Interaktion und somit die Wirkung von p53 zu regulieren. Vorstellbar sind post-translationale Modifikationen (PTM) sowie die Bindung von Co-Faktoren. Eine PTM im Bereich der H1-Helix könnte direkt die H1-Helix-Interaktion verändern und somit die DNA-Bindung regulieren. Alternativ könnte eine PTM – unabhängig von ihrer Position – eine Bindungsstelle für einen Co-Faktor schaffen oder zerstören, wodurch direkt oder indirekt die H1-Helix-Interaktion verändert werden könnte.

Auf der Suche nach einem Regulations-Mechanismus der H1-Helix-Interaktion wurde p53 auf mögliche PTM analysiert. Mit Hilfe der bioinformatischen Software NetPhos (Blom et al. 1999) wurde eine Vorhersage auf potentielle Phosphorylierungs-Stellen in p53 durchgeführt, da Phosphorylierung eine sehr häufige PTM von p53 darstellt. Die erhaltene Vorhersage listet mehrere bekannte Phosphorylierungs-Stellen von p53 auf, beispielsweise das Apoptose-relevante Serin 46 (Oda et al. 2000b)(Tab. 4.1). Bisher sind keine experimentell validierten PTM in der Nähe der H1-Helix bekannt, jedoch sagt der NetPhos Algorithmus Serin 183 (S183) und Serin 185 (S185) als mögliche Phosphorylierungs-Stellen vorher (Abb. 4.18). Die Bewertung 0,993 für S183 ist sehr hoch und wird nur von denen für die bekannten Phosphorylierungs-Stellen Serin 46, 371 und 376 übertroffen. Hingegen ist Phosphorylierung von S185 mit der Bewertung 0,375 unwahrscheinlich. Die Phosphorylierung von S183 stellt somit die wahrscheinlichste PTM innerhalb der H1-Helix-Region dar, die über Modulation der H1-Helix-Interaktion die DNA-Bindungseigenschaften von p53 verändern könnte.

Position	Kontext	Bewertung	Vorhersage	Position	Kontext	Bewertung	Vorhersage
46	DLMLSPDDI	0,996	+	166	IYKQSQHMT	0,234	-
371	SHLKSCKGQ	0,995	+	378	GQSTSRHKK	0,232	-
376	KKGQTSRH	0,995	+	33	NNVLSPLPS	0,186	-
9	QSDPSVEPP	0,993	+	362	EPGGSRAHS	0,185	-
183	HERCSDSDG	0,993	+	314	NNTSSSPQP	0,149	-
303	LPPGSTKRA	0,987	+	20	QETFSDLWK	0,142	-
366	SRAHSSHLK	0,975	+	90	APAPSWPLS	0,134	-
99	SSVPSQKTY	0,972	+	37	SPLPSQAMD	0,131	-
121	GTAHSVVTCT	0,949	+	313	PNNTSSSPQ	0,098	-
215	TFRHSVVVP	0,933	+	261	LEDSSGNLL	0,096	-
392	EGPDS---	0,914	+	227	PEVGDCTT	0,088	-
15	EPPLSQETF	0,870	+	96	PLSSSVPSQ	0,066	-
269	LGRNSFEVR	0,790	+	106	TYQGSYGFR	0,018	-
260	TLEDSSGNL	0,789	+	127	TCTYSPALN	0,018	-
315	NTSSSPQPK	0,775	+	116	GFLHSGTAK	0,017	-
6	EEPQSDPSV	0,489	-	95	WPLSSSVPS	0,016	-
94	SWPLSSSVP	0,401	-	241	MCNSSCMGG	0,016	-
185	RCSDSDGLA	0,375	-	149	LWVDSTPPP	0,009	-
367	RAHSSHLKS	0,328	-	240	YMCNSSCMG	0,007	-

**Tab. 4.1:** Auflistung aller Serin-Reste in humanem p53 in der Reihenfolge der Vorhersagewahrscheinlichkeit der Phosphorylierungs-Stellen anhand der Software NetPhos mit einem Schwellenwert von 0,5.

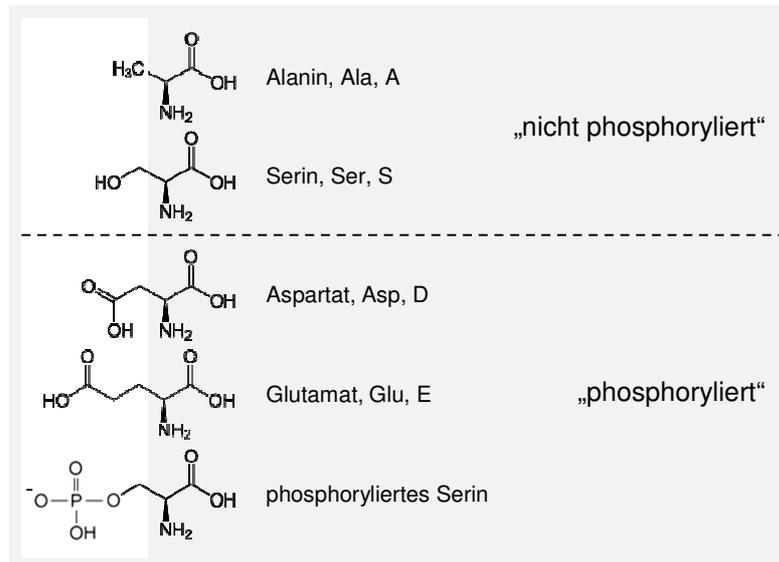


**Abb. 4.18:** Position und Bewertung (von 0 bis 1) potentieller Phosphorylierungs-Stellen in humanem p53 anhand der Software NetPhos. Die fünf wahrscheinlichsten Phosphorylierungs-Stellen sind bezeichnet. Die Position der Aminosäurereste ist anhand der Domänenstruktur von p53 dargestellt. Violett: Serin; grün: Threonin; rot: Tyrosin; grau: Schwellenwert (0,5).

#### 4.2.5 Simulierung der Phosphorylierung von Serin 183 vermindert die DNA-Bindung von p53 *in vitro*

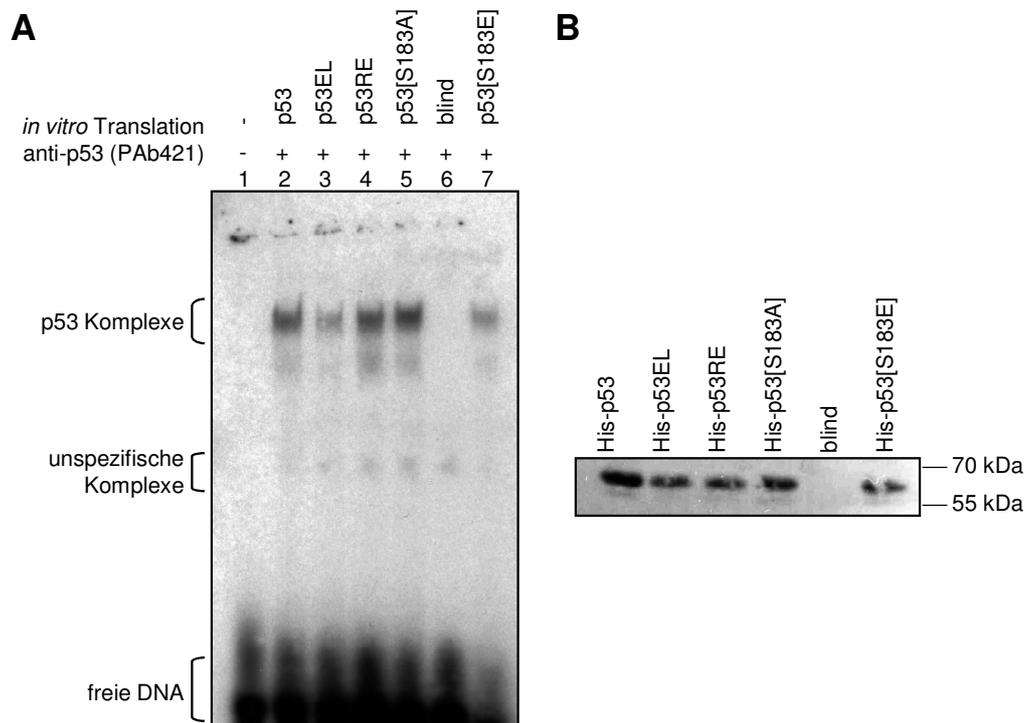
Phosphorylierung von S183, als möglicher Mechanismus der Regulation der H1-Helix-Interaktion von p53, wurde anhand unterschiedlicher Punktmutationen von S183 untersucht (Abb. 4.19). Die Substitution von Serin durch Alanin (S183A) führt zu einer p53 Variante, die an Position 183 nicht phosphoryliert werden kann. Der Austausch durch die Aminosäuren Aspartat (S183D) beziehungsweise Glutamat (S183E), die beide eine negativ geladene

Carboxy-Gruppe tragen und raumausfüllender als Serin sind, soll phosphoryliertes S183 simulieren.



**Abb. 4.19:** Vergleich der Aminosäurereste an Position 183 von wildtypischem und mutiertem p53. Dargestellt sind die Strukturformel der unterschiedlichen Aminosäuren angeordnet nach Größe und Ladung der Seitenkette. Oben ist Serin und die Phosphorylierungs-defekte Aminosäure Alanin abgebildet und unten die Phosphorylierungs-simulierenden Aminosäuren Aspartat und Glutamat und phosphoryliertes Serin.

Ob die DNA-Bindung durch diese Simulation unterschiedlicher Phosphorylierungs-Zustände verändert ist, wurde *in vitro* mittels EMSA-Experimenten analysiert (Abb. 4.20 A). Hierbei wurde die Bindung von *in vitro* translatierten p53 Proteinen an ein doppelsträngiges Oligonukleotid mit einem Konsensus p53 Response-Element analysiert. Wie bereits in der Arbeitsgruppe bekannt, ist die Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53EL schwächer und von p53RE stärker als von wildtypischem p53. Die Phosphorylierungs-defekte Mutante p53[S183A] band DNA stark, während die Phosphorylierungs-simulierende Mutante p53[S183E] schwach band. Diese Unterschiede in der DNA-Bindung waren reproduzierbar, obwohl vergleichbare Mengen an Proteinen eingesetzt wurden (Abb. 4.20 B). Die Spezifität der Komplexe wurde mittels Konkurrenz und Zugabe eines spezifischen Antikörpers („supershift“) bestätigt (Daten nicht gezeigt). Da die Phosphorylierungs-defekte Mutante starke DNA-Bindung zeigte und das Entgegengesetzte für die Phosphorylierungs-simulierende Mutante gilt, deutet dies darauf hin, dass De-Phosphorylierung von S183 die DNA-Bindung von p53 verstärken könnte.

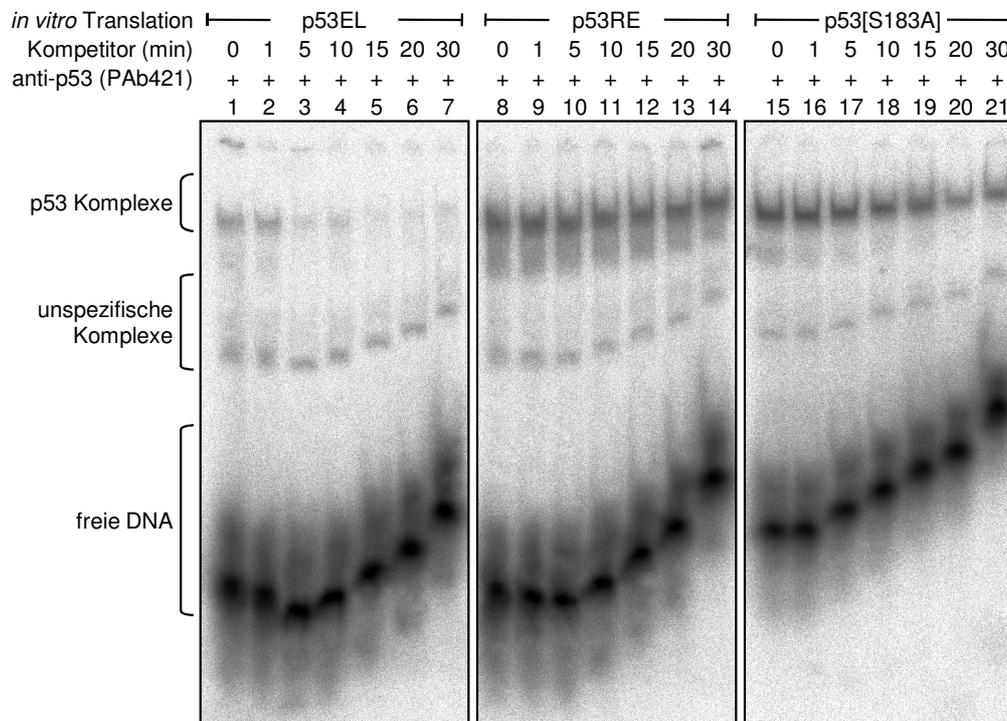


**Abb. 4.20:** Vergleich der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung von wildtypischem und mutiertem p53 *in vitro*. **A:** Autoradiogramm eines „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) Experiments mit *in vitro* translatierten (IVT) Proteinen und mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP markierter doppelsträngiger DNA, die ein Response-Element mit der p53 Konsensus-Sequenz enthält (el-Deiry et al. 1992, Funk et al. 1992). **B:** Westernblot von gleichen Volumina der im EMSA-Experiment benutzten IVT-Ansätze.

Die Stabilität der Protein-DNA-Komplexe lässt sich durch Untersuchung der Dissoziations-Kinetik bestimmen. Hierzu wurden EMSA-Experimente durchgeführt, bei denen – nach vorheriger Inkubation der p53 Proteine mit der Konsensus-DNA – die gebildeten Komplexe durch einen 100-fachen Überschuss an unmarkierter Konsensus-DNA für unterschiedlich lange Zeitspannen kompetitiert wurden.

Bei p53EL war bei kurzzeitiger Kompetition Komplex vorhanden, jedoch fiel seine Menge im Zeitverlauf sehr schnell ab, so dass bereits nach 5 Minuten fast kein Komplex mehr vorhanden war (Abb. 4.21). Im Gegensatz dazu war bei p53RE – auch bei langer Kompletions-Dauer (30 Minuten) – viel Komplex vorhanden, was ein Zeichen geringer Dissoziation und damit hoher Komplex-Stabilität ist. Bei p53[S183A], das unphosphoryliertes p53 simuliert, war die Menge an Komplex über einen längeren Zeitraum relativ konstant und fiel erst mit längerer Kompletions-Dauer sichtbar ab. Da die DNA-

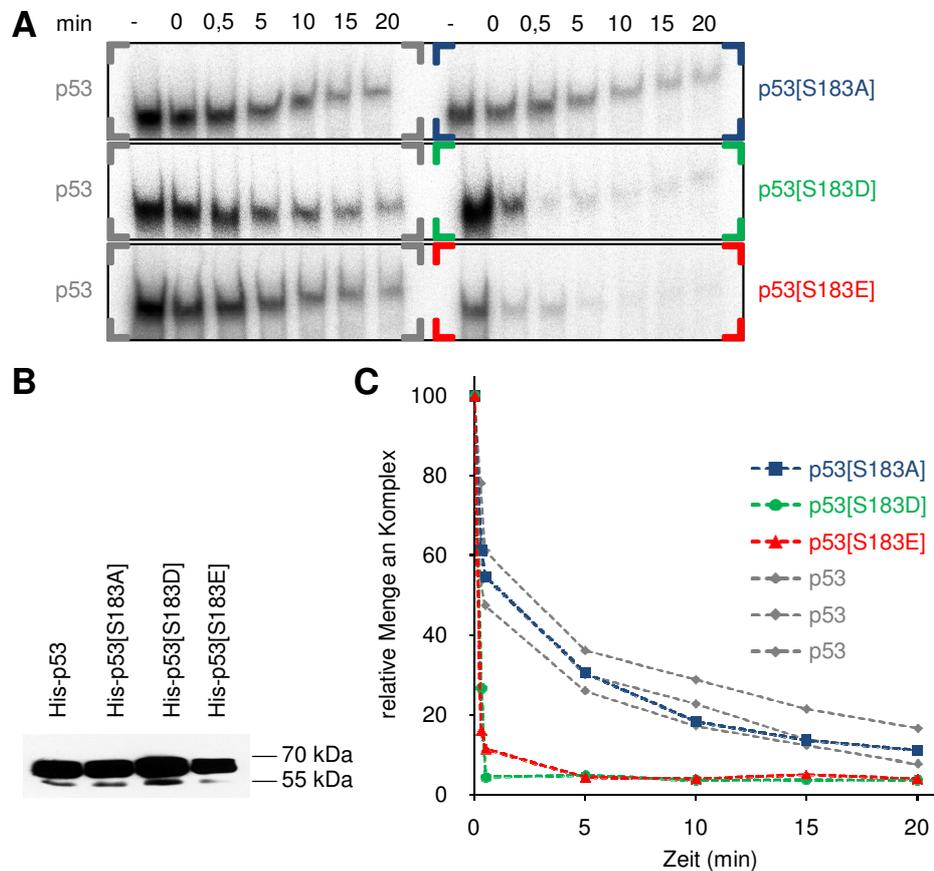
Komplexe von p53[S183A] nur sehr langsam dissoziierten, spricht dies für eine hohe Komplex-Stabilität, wie sie auch für p53RE beobachtet wurde.



**Abb. 4.21:** Stabilität der DNA-Komplexe von p53EL, p53RE und p53[S183A] *in vitro*. Die Kinetik der Dissoziation von p53-DNA-Komplexen wurde nach unterschiedlich langer Inkubationszeit mit einem 100-fachen molaren Überschuss an unmarkierter DNA mit gleicher Nukleotid-Sequenz als Kompetitor mittels EMSA analysiert. Da die Ansätze nach unterschiedlich langen Kompetitions-Zeitspannen sofort aufgetrennt wurden, war die Auftrennung mit zunehmender Kompetitions-Zeitspanne geringer.

Zum Vergleich der unterschiedlichen S183 Mutanten wurden ihre Dissoziations-Kinetiken quantifiziert. Hierzu wurden jeweils zeitliche Kompetitions-Ansätze des Wildtyps und einer Mutante auf einem Gel gemeinsam aufgetrennt, anschließend mittels Phospho-Imaging detektiert und die Komplex-Mengen quantifiziert. Ohne Kompetitor war Komplex bei den Ansätzen der drei Mutanten und des Wildtyps vorhanden (Abb. 4.22 A). Unterschiede in den Komplex-Mengen der Ansätze ohne Kompetitor resultieren teilweise aus den eingesetzten Protein-Mengen (Abb. 4.22 B). Sie wirken sich jedoch nicht auf den Vergleich aus, da nur relative Werte aus Kompetitions-Reihen, die von einem gemeinsamen Ansatz abstammten, miteinander verglichen wurden. Es bestätigte sich die bereits qualitativ beobachtete langsame Dissoziation der p53[S183A] Komplexe. Die beiden Phosphorylierungs-imitierenden Mutanten p53[S183D] und p53[S183E] bildeten Komplexe, die größtenteils

innerhalb von 30 Sekunden dissoziierten, und unterschieden sich somit deutlich von p53[S183A] und wildtypischem p53.



**Abb. 4.22:** Stabilität der DNA-Komplexe von p53 mit Mutationen an S183 *in vitro*. **A:** Kinetik der Dissoziation von DNA-Komplexen von Wildtyp p53 und der Mutanten p53[S183A], p53[S183D] und p53[S183E] in EMSA-Experimenten. Zusammen auf einem Gel wurden Ansätze von Wildtyp p53 und einer Mutante jeweils ohne Kompetitor (-) und nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit Kompetitor (0 bis 20 Minuten) aufgetrennt. **B:** Westernblot von gleichen Volumina der in den EMSA-Experimenten benutzten IVT-Ansätze mit dem Antikörper DO-1. **C:** Quantifizierung der Dissoziationskinetik. Die Komplexmengen der EMSA-Experimente von A wurden mittels Phospho-Imaging quantifiziert und sind normalisiert auf die Komplexmengen der Ansätze ohne Kompetitor dargestellt.

Das Diagramm der Dissoziations-Kinetik veranschaulicht durch die Einheitlichkeit der Kurven von wildtypischem p53 bei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, die Reproduzierbarkeit der Versuche und somit ihre Vergleichbarkeit (Abb. 4.22 C). Die Dissoziations-Kurve von p53[S183A] lag innerhalb des Bereichs der Kurven des Wildtyps und sank innerhalb von 5 Minuten auf etwa 30% der anfänglichen Komplex-Menge ab. Die Kurven der Mutanten p53[S183D] und p53[S183E] zeichneten sich durch einen drastischen Abfall innerhalb der ersten 30 Sekunden aus, sanken dabei deutlich unter 10% innerhalb von

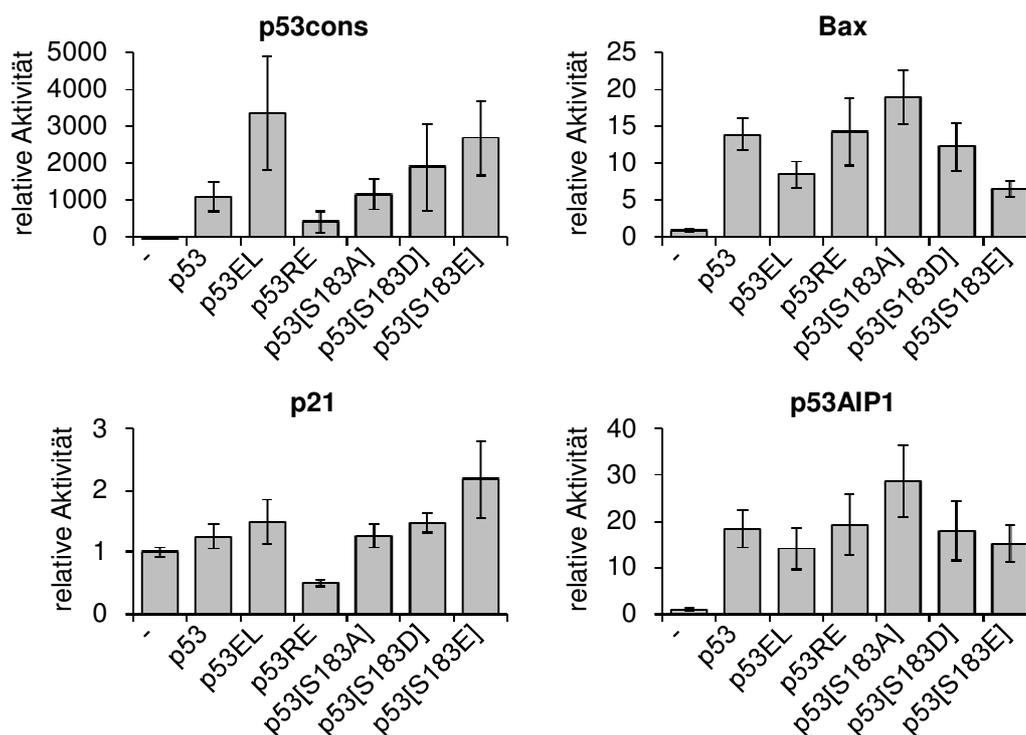
5 Minuten und überlappten nicht mit den Kurven des Wildtyps. Anhand der Stabilität sind die Mutanten in zwei Gruppen einteilbar; einerseits Wildtyp p53 und p53[S183A] – mit stabilen Komplexen – und andererseits p53[S183D] und p53[S183E] – mit labilen Komplexen. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Phosphorylierungs-defekte Mutante p53[S183A], wie Wildtyp p53, stabile DNA-Komplexe bildete, während die Phosphorylierungs-imitierenden Mutanten p53[S183D] und p53[S183E] labile DNA-Komplexe bildeten. Diese Ergebnisse deuten einerseits darauf hin, dass *in vitro* translatiertes Wildtyp p53 vermutlich nicht an S183 phosphoryliert ist, da es sich wie die Phosphorylierungs-defekte Mutante p53[S183A] verhält. Andererseits lässt die starke DNA-Bindung der Phosphorylierungs-defekten Mutante und die schwache Bindung der Phosphorylierungs-simulierenden Mutanten darauf schließen, dass p53 DNA stark bindet, wenn es an S183 nicht phosphoryliert ist. Somit stellt Phosphorylierung und De-Phosphorylierung von S183 einen möglichen Mechanismus dar, um die DNA-Bindung von p53 über die H1-Helix-Region zu regulieren.

#### **4.2.6 Simulierung der De-Phosphorylierung von Serin 183 verstärkt die Trans-Aktivierung von pro-apoptischen p53 Zielgenen**

Die Auswirkung der beobachteten DNA-Bindungs-Unterschiede der Phosphorylierungs-Mutanten auf die Trans-Aktivierung von Zielgenen wurde mittels Luciferase-Reporter-Assay untersucht. Hierfür wurden H1299 Zellen mit Reporter-Plasmid und Expressions-Plasmid co-transfiziert. Die Reporter-Plasmide codierten das Enzym Luciferase unter der Kontrolle von Promotoren verschiedener p53 Zielgene in cis, während die Expressions-Plasmide verschiedene p53 Mutanten codierten, deren Aktivität an diesen Promotoren in trans gemessen wurde. Die Quantifizierung der Trans-Aktivierung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion.

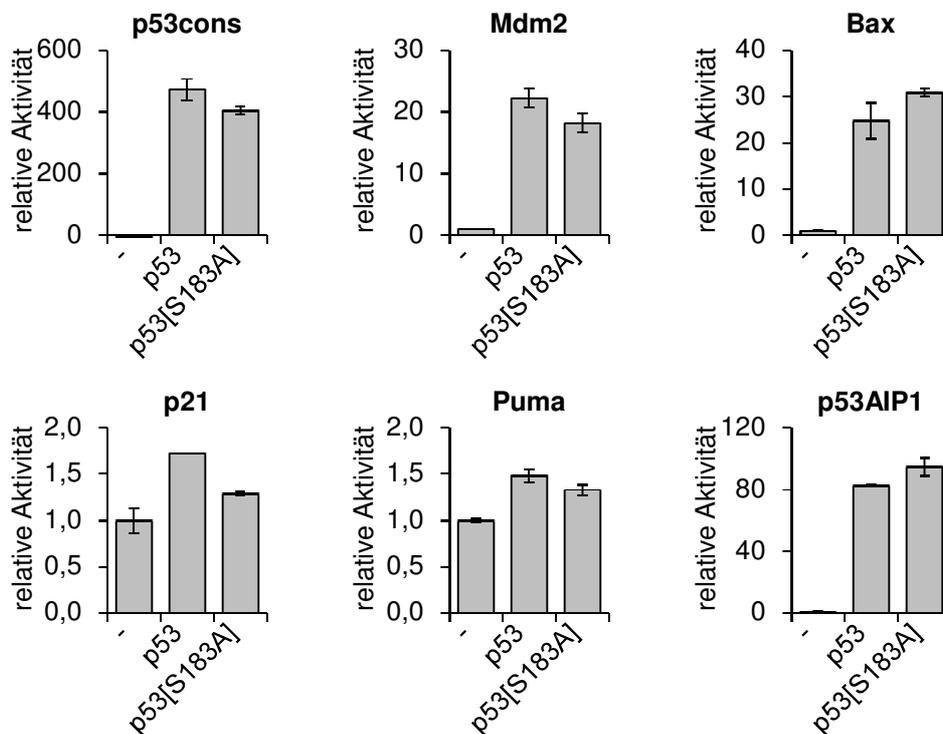
Das synthetische Promotor-Konstrukt (p53cons), das sechs p53 Konsensus Response-Elemente enthält, wurde von p53EL stärker und von p53RE schwächer trans-aktiviert als von Wildtyp p53 (Abb. 4.23). Der p21 Promotor wurde ebenfalls ansteigend von p53RE über

Wildtyp p53 zu p53EL aktiviert, wobei p53RE nicht nur die schwächste Aktivierung zeigte, sondern sogar deutlich reprimierte. Anders verhielt es sich bei den Promotoren von Bax und p53AIP1, die durch p53EL schwächer als durch Wildtyp p53 oder p53RE aktiviert wurden. Diese Ergebnisse stimmen mit unabhängig durchgeführten Versuchen innerhalb der Arbeitsgruppe überein, die zeigten, dass p53RE stärker die Gruppe der pro-apoptotischen Gene (Bax und p53AIP1) als die der anti-apoptotischen (p53cons und p21) aktivierte (unveröffentlichte Daten). Interessanterweise besteht eine Diskrepanz zwischen der generell stärkeren DNA-Bindung von p53RE gegenüber p53EL *in vitro*, und seiner schwächeren Trans-Aktivierung im Fall von p21 und von p53cons. Das bedeutet, dass eine stärkere DNA-Bindung nicht zwangsläufig mit einer stärkeren Trans-Aktivierung korreliert ist und deutet stattdessen auf eine inhibierende Wirkung sehr starker DNA-Bindung hin.



**Abb. 4.23:** Trans-Aktivierung durch p53 und durch p53 mit Mutationen in der H1-Helix-Region. Die Transaktivierung unterschiedlicher Promotor-Konstrukte wurde mittels Luciferase-Reporter-Assay 48 Stunden nach Co-Transfektion von Expressions- und Reporter-Plasmiden in H1299 Zellen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte samt Standardabweichung der relativen Aktivität von drei unabhängigen Versuchsdurchführungen. Hierzu wurde von der gemessenen Aktivität zuerst die Aktivität von untransfizierten Zellen subtrahiert und anschließend auf die Aktivität von nur mit Reporter-Plasmid transfizierten Zellen normalisiert.

Die Aktivität der Mutanten p53[S183A], p53[S183D] und p53[S183E] war in dieser Reihenfolge ansteigend bei dem Promotor von p21 und bei dem Konsensus-Promotor, während sie bei den Promotoren von p53AIP1 und Bax abfallend war (Abb. 4.23). Die Mutante p53[S183A] trans-aktivierte den p21 und Konsensus-Promotor vergleichbar stark wie Wildtyp p53, jedoch deutlich stärker die Promotoren der pro-apoptotischen Gene Bax und p53AIP1. Die Mutanten p53[S183D] und p53[S183E] hingegen trans-aktivierten stärker als Wildtyp p53 den p21 und den Konsensus-Promotor, jedoch schwächer die Promotoren der beiden pro-apoptotischen Gene. Somit trans-aktiviert p53[S183A], wie p53RE, stärker die Promotoren der pro-apoptotischen Gene Bax und p53AIP1 als es p53[S183D], p53[S183E], p53EL und Wildtyp p53 tun.



**Abb. 4.24:** Trans-Aktivierung durch p53 und durch die Phosphorylierungs-defekte Mutante p53[S183A]. Dargestellt sind die Mittelwerte samt Standardabweichung der relativen Aktivität von zwei unabhängigen Versuchsdurchführungen. Hierzu wurde von der gemessenen Aktivität zuerst die Aktivität von untransfizierten Zellen subtrahiert und anschließend auf die Aktivität von nur mit Reporter-Plasmid transfizierten Zellen normalisiert.

Diese Daten wurden bei zwei unabhängigen Doppelbestimmungen bestätigt und für zusätzliche Promotor-Konstrukte erweitert (Abb. 4.24). Der Mdm2 Promotor wurde signifikant ( $P < 0,05$ ;  $n = 4$ ) leicht schwächer (0,85-fach  $\pm 0,08$ ) durch p53[S183A] als durch

Wildtyp p53 aktiviert. Beim Puma Promotor waren keine Unterschiede vorhanden ( $P > 0,05$ ;  $n=4$ ; 0,91-fach  $\pm 0,10$ ), wobei die Steigerung der Trans-Aktivierung durch Wildtyp p53 und p53[S183A] gegenüber Zellen ohne Expressions-Plasmid insgesamt sehr niedrig war. Bei insgesamt sieben unabhängigen Proben aktivierte p53[S183A] jeweils stärker den p53AIP1 und Bax Promotor als Wildtyp p53, wohingegen es keine reproduzierbaren Unterschiede für den p21 und den Konsensus-Promotor gab (Daten nicht gezeigt).

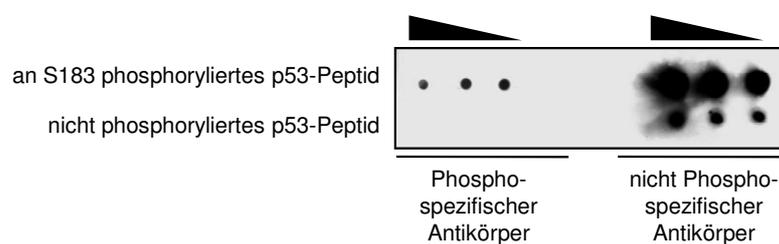
Zusammenfassend waren alle Mutanten zur Trans-Aktivierung fähig. Die Mutanten lassen sich nicht generell in aktivere und weniger aktive Varianten unterteilen, sondern ihre Aktivität unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Promotor. Erneut lassen sich die untersuchten Promotoren anhand ihres Verhaltens in die zwei Gruppen, die sich aus den Daten der Promotor-Bindung für p53EL und p53RE ergeben hatten, unterteilen. Die Gruppe der pro-apoptischen Gene Bax und p53AIP1 wurde durch p53[S183A] verstärkt aktiviert, wohingegen die Gruppe der anti-apoptischen Gene p21, Mdm2 und dem Konsensus-Konstrukt von p53[S183A] und Wildtyp p53 einheitlich stark aktiviert wurde. Puma stellte hier erneut eine Ausnahme von dieser Gruppierung dar. Diese Trans-Aktivierungsdaten unterstreichen die pro-apoptische Wirkung der Phosphorylierungs-defekten Mutante p53[S183A]. Sie zeigen, dass die Modulation der H1-Helix-Interaktion nicht nur die DNA-Bindung *in vitro* beeinflusst, sondern sich auch auf die Trans-Aktivierung auswirkt. Somit könnte Phosphorylierung und De-Phosphorylierung von S183 eine Möglichkeit darstellen, gezielt die p53-vermittelte differentielle Genexpression zu regulieren, um das Zellschicksal zu bestimmen. Durch die Phosphorylierung von S183 sollte p53 verstärkt pro-apoptische Gene binden und trans-aktivieren – und dadurch Apoptose induzieren –, jedoch sollte die Induktion von Zellzyklus-relevanten Genen unverändert bleiben.

#### **4.2.7 Phosphorylierung von p53 an S183 *in vivo***

Die Simulation unterschiedlicher Phosphorylierungs-Zustände demonstrierte erfolgreich, dass die Phosphorylierung von p53 an S183 die Regulation seiner Sequenz-spezifischen DNA-Bindung *in vitro* und seiner Trans-Aktivierung von Reporter-Konstrukten ermöglichen

könnte. In wieweit die beobachteten Effekte der Simulierung unterschiedlicher Phosphorylierung-Zustände von S183 relevant für die Funktion von p53 sind, hängt davon ab, ob p53 *in vivo* tatsächlich an S183 phosphoryliert wird.

Um dies untersuchen zu können wurde ein polyklonaler Antikörper gegen ein p53 Peptid, das an S183 phosphoryliert war, generiert. Der Teil der Antikörper-Mischung, der das Peptid auch im nicht phosphorylierten Zustand band, wurde abgetrennt und ist der polyklonale nicht Phospho-spezifische Antikörper.



**Abb. 4.25:** Spezifität und Sensitivität der polyklonalen Antikörper gegen S183. Für die Immunblots wurden jeweils von dem an S183 phosphorylierten p53 Peptid  $\text{H}_2\text{N-HHERCS}(\text{PO}_3\text{H}_2)\text{DSDGLAP-CONH}_2$  (molekulare Masse 1503,5) 53  $\mu\text{g}$ , 26  $\mu\text{g}$  und 13  $\mu\text{g}$  und von dem nicht phosphorylierten p53 Peptid  $\text{H}_2\text{N-HHERCS}(\text{DSDGLAP-CONH}_2$  (molekulare Masse 1423,5) 32  $\mu\text{g}$ , 16  $\mu\text{g}$  und 8  $\mu\text{g}$  direkt auf eine Nitrocellulose-Membran aufgebracht. Die Detektion der Peptide erfolgte durch den Phospho-spezifischen und den nicht Phospho-spezifischen Antikörper.

Um zu untersuchen, ob die erworbenen Antikörper fähig sind, das p53 Epitop nachzuweisen, wurde versucht das phosphorylierte und das nicht phosphorylierte p53 Peptid in einem Immunblot mit den beiden generierten Antikörpern nachzuweisen. Der Phospho-spezifische Antikörper erkannte das phosphorylierte Peptid, nicht aber das nicht phosphorylierte Peptid (Abb. 4.25). Dies zeigt, dass dieser Antikörper das p53 Peptid nachweisen kann und dass der Antikörper Phospho-spezifisch ist. Der nicht Phospho-spezifische Antikörper konnte herstellungsbedingt das phosphorylierte p53 Peptid nachweisen, aber zusätzlich das nicht phosphorylierte p53 Peptid. Die Sensitivität des nicht Phospho-spezifischen Antikörpers ist jedoch um ein Vielfaches höher als die des Phospho-spezifischen Antikörpers. Dieser Versuch belegt die Spezifität des Phospho-spezifischen Antikörpers, zeigt aber auch, dass er nur geringe Sensitivität besitzt. Unabhängig davon, ob p53 *in vivo* durch Phosphorylierung an S183 reguliert wird, hat die H1-Helix-Interaktion eine einflussreiche Wirkung auf die

differentielle Genexpression – auch wenn über den zugrundeliegenden Mechanismus bisher nur spekuliert werden kann.

## 5 Diskussion

### 5.1 Auswirkung der Carboxy-Termini auf die DNA-Bindung von p53 Familienmitglieder

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Carboxy-Termini von p53 und von p73 Isoformen bei der DNA-Bindung und bei der Expression von Zielgenen untersucht. Dabei wurde in EMSA-Experimenten eine schwache Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 und p73 $\gamma$  festgestellt, wohingegen die p73 Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  stark banden. Anhand von EMSA-Experimenten mit kurzen und langen Oligonukleotiden konnte gezeigt werden, dass p53 und p73 $\gamma$  entlang von DNA gleiten können, nicht jedoch p73 $\alpha$ . Die Fähigkeit zu gleiten korreliert mit den elektrostatischen Ladungen der Carboxy-Termini. So sind p53 und p73 $\gamma$  mehrfach positiv geladen, während p73 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  nur schwach geladen sind. Anhand eines Fusionsproteins aus p73 $\alpha$  und der CTD von p53 sowie einer p53 Deletions-Mutante wurde *in vitro* gezeigt, dass die Ladung des Carboxy-Terminus die Sequenz-spezifische DNA-Bindung beeinflusst und dass die CTD von p53 eine autonome und übertragbare Domäne mit Gleitfähigkeit ist. Mittels FRAP-Analysen wurde festgestellt, dass die Anwesenheit der CTD von p53 die nukleare Mobilität von p53 und p73 $\alpha$  verringert und daher Sequenz-unabhängige DNA-Bindung *in vivo* vermittelt. Die CTD verminderte die Promotor-Bindung von p53, jedoch beeinflusste sie die von p73 $\alpha$  nicht. In Genom-weiten Genexpressions-Studien wirkte sich die CTD negativ auf die transkriptionelle Aktivität aus, wohingegen das Spektrum der Zielgene maßgeblich durch das Proteinerückgrat bestimmt wurde. Durchflusszytometrische Messungen des zellulären DNA-Gehalts ergaben, dass ein positiv geladener Carboxy-Terminus der p53 Familienmitglieder zu verminderter Induktion von Apoptose und Zellzyklus-Arrest führt.

### 5.2 Gleiteigenschaften der Carboxy-Termini

Die DNA-Bindungsstärke von p53 und den p73 Isoformen *in vitro* entsprechen publizierten Ergebnissen, die zum einen zeigen, dass p73 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  stärker als p53 Sequenz-spezifisch an DNA binden und zum anderen, dass p73 $\gamma$  überhaupt nicht bindet (Marin et al. 1998, Momii

et al. 2007). Im Gegensatz dazu stellten Lokshin und Kollegen keine Unterschiede zwischen p53 und p73 $\beta$  fest (Lokshin et al. 2007). Dieses abweichende Ergebnis kann durch die in Lokshins Publikation verwendeten kurzen Oligonukleotide als Kompetitor oder durch die verwendeten rekombinanten Proteine, die in Insekten-Zellen exprimiert wurden und daher andere post-translationale Modifikationen als *in vitro* translatierte Proteine aufweisen können, erklärt werden (Warnock et al. 2005).

Die allgemein geringe DNA-Bindung von p53 lässt sich durch die von der CTD vermittelten Gleitfähigkeit entlang von DNA erklären (McKinney et al. 2004). Wird die CTD deletiert oder durch Antikörper blockiert, geht die Gleitfähigkeit von p53 verloren und die DNA-Bindung ist vergleichbar stark zu p73 $\alpha$  (Abb. 4.2 A, B & 4.4 A). Die geringe DNA-Bindung von p73 $\gamma$  kann ebenfalls durch Gleitfähigkeit erklärt werden. Die Gleitfähigkeit ist eine autonome Eigenschaft der CTD von p53, die sich mit der CTD modulartig übertragen lässt, wie sich bei dem Fusionsprotein p73 $\alpha$ +30 zeigte. Die Gleitfähigkeit von p53 entlang der DNA wurde kürzlich anhand der Bewegung einzelner p53 Moleküle mit „total internal reflection fluorescence“ (TIRF) Mikroskopie-Technik direkt beobachtet (Tafvizi et al. 2008).

Die Gleiteigenschaften von p53 und p73 $\gamma$  korrelieren mit ihren mehrfach positiv geladenen Carboxy-Termini, die – zumindest im Fall von p53 – Sequenz-unabhängige DNA-Bindung durch Wechselwirkung der positiven Ladung mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA vermitteln. Basische Domänen, die Sequenz-unabhängig DNA binden und sich negativ regulatorisch auswirken, kommen auch in anderen Transkriptionsfaktoren vor und sind von ihrer positiven Ladung funktionell abhängig (Chang et al. 2008). Die positive Ladung der CTD von p53 resultiert hauptsächlich von sechs Lysin-Resten, und kann durch deren Acetylierung neutralisiert werden. Ein Verlust der positiven Ladung durch vollständige Acetylierung der CTD und damit der Verlust der Gleitfähigkeit von p53, führt zu verstärkter DNA-Bindung bei kurzen als auch bei langen Oligonukleotiden (Espinosa & Emerson 2001, Luo et al. 2004). Ebenso bewirken Mutationen der Lysin-Reste zu ungeladenen Glutamin-Resten („p53K-Q“) starke DNA-Bindung *in vitro* – unabhängig von der Länge der verwendeten Oligonukleotide (Luo et al. 2004). Im Gegensatz zu p53 muss p73 $\alpha$  nicht acetyliert sein, um DNA des p21 Promotors zu binden (Costanzo et al. 2002). Im Einklang mit seiner beobachteten Gleitfähigkeit bindet p73 $\gamma$  DNA nach Acetylierung durch PCAF verstärkt (Momii et al. 2007).

Somit stellt der positiv geladene Carboxy-Terminus von p53 und p73 $\gamma$  eine Möglichkeit dar, die Sequenz-spezifische DNA-Bindung in Abhängigkeit von posttranslationalen Modifikationen zu regulieren.

Neben p53 und p73 gibt es noch das dritte Familienmitglied p63, das ebenfalls vielfältig alternativ gespleißt wird. Anhand des isoelektrischen Punkts des Carboxy-Terminus (ab Aminosäurerest 450) von p63 $\alpha$  im Neutralen (pI = 6,40) und des von p63 $\gamma$  im Basischen (pI = 9,77), kann man schlussfolgern, dass p63 $\gamma$ , nicht jedoch p63 $\alpha$ , ebenfalls Gleitfähigkeit besitzt. Diese theoretische Analyse ist bisher nicht durch publizierte experimentelle Daten belegt.

### 5.3 Sequenz-unabhängige DNA-Bindung durch die Carboxy-Termini

Die Sequenz-unabhängige DNA-Bindung von p53 und p73 $\alpha$ +30, die sich in EMSA-Experimenten durch die Gleitfähigkeit zeigte, wurde auch in FRAP-Experimenten bestätigt. Die Untersuchungen mittels FRAP an einzelnen lebenden Zellen ergaben Aufschluss über die Bedeutung der CTD unter Berücksichtigung der komplexen zellulären Bedingungen, die in EMSA-Versuchen nicht realisiert werden können.

Die beobachteten Differenzen in der Mobilität von p53 und p53 $\Delta$ 30 beziehungsweise p73 $\alpha$  und p73 $\alpha$ +30 stammen nicht von Unterschieden in Sequenz-spezifischer DNA-Bindung, sondern – als Schlussfolgerung nachfolgender Gründe – von Sequenz-unabhängiger DNA-Bindung. Zum einen berechneten Hinow und Kollegen mit dem erweiterten Bindungsmodell die Reaktions-Konstanten für Bindung und Dissoziation von p53-GFP an eine immobile Matrix (= DNA). Die berechneten Werte ( $k_1=0,31\pm 0,22^{-5}$  bzw.  $k_2=0,40\pm 0,13^{-5}$ ) liegen im Bereich für unspezifische Bindung (Sprague et al. 2004). Zum anderen zerstörten Hinow und Kollegen die Sequenz-spezifische DNA-Bindung der DBD durch die Mutation R175H beziehungsweise R273H. Wäre Sequenz-spezifische DNA-Bindung verantwortlich für die Bindung an eine immobile Matrix, würde man Unterschiede zwischen wildtypischem und mutiertem p53 erwarten, was jedoch nicht festgestellt wurde (Hinow et al. 2006). Darüber hinaus sind die in dieser Arbeit beobachteten – nur wenige Sekunden dauernden –

Zeitspannen für die Rückkehr der Fluoreszenz bei p53, p53Δ30, p73α und p73α+30 ein Indiz für unspezifische Bindung, während Zeitspannen von wenigen Minuten als Indiz spezifischer Bindung beurteilt werden (Mueller et al. 2008, Karpova et al. 2008).

Die Ergebnisse der FRAP-Versuche spiegeln Unterschiede in der Sequenz-unabhängigen DNA-Bindung einerseits zwischen p53 und p53Δ30 und andererseits zwischen p73α und p73α+30 wider. Die Mobilitätsunterschiede korrelieren zwar mit Unterschieden der Masse von p53-YFP und p53Δ30-YFP beziehungsweise von p73α-YFP und p73α+30-YFP, jedoch sind sie nicht durch diese erklärbar. Dies liegt daran, dass die räumliche Größe der CTD vernachlässigbar ist, bezogen auf die Größe des gesamten p53 Proteins – wie sie mittels Röntgenstruktur-Analyse bestimmt wurde – und insbesondere in Bezug auf die Größe des Fusionsprotein mit YFP (Tidow et al. 2007). Da sich die Massen  $m$  zweier globulärer Proteine und somit ihre Größen zu ihrer freien Mobilität  $D$  verhalten wie  $D_1/D_2=(m_2/m_1)^{1/3}$ , sind auch Unterschiede der Mobilität von p53 und p53Δ30, die aus den Unterschieden der Masse resultieren, vernachlässigbar ( $D$ =Diffusionskoeffizient,  $m$ =molekulare Masse)(Hinow et al. 2006). Entsprechendes trifft für p73α-YFP und p73α+30-YFP zu.

Ein weiteres Indiz für verschiedene Bindungseigenschaften als Ursache für die beobachteten Mobilitäts-Unterschiede ist die Existenz einer zweiten Population an Teilchen im Modell, wenn die CTD vorhanden ist. So ist zur Beschreibung der Mobilität von p53 und p73α+30 nur das Modell geeignet, das neben der Population an frei diffundierbaren Teilchen (p53 bzw. p73α+30), eine zweite Population an Teilchen (p53 bzw. p73α+30 gebunden an DNA) einbezieht, in der die Teilchen vorübergehend an eine immobile Matrix gebunden sind. Da nur bei Vorhandensein der CTD Bindung auftritt, ist zu schließen, dass die CTD die Bindung vermittelt.

Die gemessenen Unterschiede der Mobilität können durch Gleiten entlang von DNA, das durch Sequenz-unabhängige DNA-Bindung der CTD vermittelt wird, erklärt werden. Diese FRAP-Experimente belegen zum ersten Mal, dass die CTD nicht nur *in vitro* durch Sequenz-unabhängige DNA-Bindung die Sequenz-spezifische DNA-Bindung beeinflusst, sondern auch *in vivo* Sequenz-unabhängige DNA-Bindung vermittelt und dadurch die intra-nukleäre Mobilität vermindert. Sequenz-unabhängige Bindung an Chromatin ist nicht beschränkt auf

p53 und p73 $\alpha$ +30, sondern tritt auch bei anderen Transkriptionsfaktoren, wie Max und dem Glukocorticoid-Rezeptor, auf (Mueller et al. 2008).

#### 5.4 Einfluss der Carboxy-Termini auf die Promotor-Bindung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Promotor-Bindung des p21 Gens durch die CTD im Fall von p53 verringert wurde und belegt damit deren abschwächende Wirkung auf die Sequenz-spezifische DNA-Bindung *in vivo*. Diese Daten stehen in scheinbarem Widerspruch zu Daten, bei denen der Carboxy-Terminus die Bindung an den p21 Promotor verstärkt (Liu et al. 2004, McKinney et al. 2004). In beiden Publikationen wurde semi-quantitativ die Bindung an den p21 Promotor in p53 negativen Zellen untersucht. In der einen Publikation war p53 bereits zehn Stunden nach adenoviralem Gentransfer gebunden und stieg weiter an, wohingegen ein p53 Protein mit verändertem Carboxy-Terminus, das Ähnlichkeit mit p53 $\Delta$ 30 hat, erst nach 24 Stunden gleich stark oder sogar stärker als p53 gebunden war (Liu et al. 2004). In der anderen Publikation, in der p53 mit Hilfe eines Tetrazyklin-regulierten Systems auf niedrigem Niveau exprimiert wurde, war p53 stärker als p53 $\Delta$ 30 gebunden (McKinney et al. 2004). Erklärt werden können die Unterschiede dadurch, dass zu frühen Zeitpunkten oder bei geringem Expressionslevel die Menge an p53 limitierend ist, wodurch ein positiver Effekt der CTD-vermittelten Gleitfähigkeit beim Auffinden von Promotoren im komplexen Genom überwiegt. Ist p53 bereits an Promotoren gebunden und dadurch seine Menge nicht mehr limitierend, wird der – in unseren Untersuchungen beobachtete – negative Effekt der CTD bemerkbar, bei dem die Gleitfähigkeit zu verstärktem Dissoziieren der Sequenz-spezifischen DNA-Komplexe führt. Dieser zweite Prozess kann physiologisch der bedeutsamere sein, da gezeigt wurde, dass p53 bereits vor dem Eintreten eines Stress-Stimulus an Promotoren gebunden vorliegt (Kaeser & Iggo 2002, Espinosa et al. 2003).

Im Gegensatz zu EMSA-Experimenten bindet *in vivo* – zumindest an den p21 Promotor – p53 stärker als p73 $\alpha$ . Eine Ursache hierfür könnte sein, dass bei EMSA-Experimenten die zellulären Bedingungen nur teilweise wiedergegeben werden können. Beispielsweise ist die genomische DNA in einer Zelle modifiziert und mit Histonen verpackt, vielfältige post-

translationale Modifikationen von p53/p73 $\alpha$  Proteinen finden statt und zahllose Ko-Faktoren sind vorhanden. Bei p73 $\alpha$  zeigte die CTD keinen Effekt auf die Promotor-Bindung. Dies kann daran liegen, dass auch in EMSA- und FRAP-Experimenten geringere Unterschiede zwischen p73 $\alpha$  und p73 $\alpha$ +30 als zwischen p53 und p53 $\Delta$ 30 bestanden, und sie bei diesem primären p53 Zielgen *in vivo* nicht mehr erkennbar waren. Um ein umfassenderes Bild der Promotor-Bindung zu bekommen, wäre es sinnvoll ein breites Spektrum an unterschiedlichen p53 und p73 Zielgenen zu untersuchen.

### 5.5 Einfluss der Carboxy-Termini auf die Funktion von p53 und p73 $\alpha$

Die Sequenz-unabhängige DNA-Bindung der CTD wirkte sich auch auf die globalen Genexpressions-Profile aus. Das Spektrum der Zielgene war hauptsächlich durch das Proteinrückgrat bestimmt, während sich die CTD auf die Aktivität auswirkte. Dies passt zu dem Gleitmodell, bei dem die CTD Gleiten vermittelt und somit die Quantität aber nicht die Qualität der Interaktion zwischen der DBD und Response-Elementen in der DNA beeinflusst. Die CTD ist somit eine funktionell autonome Domäne, die nicht die Zielgen-Spezifität von p53 und p73 $\alpha$  verändert, jedoch ihre Aktivität reduziert.

Die Bedeutung der CTD wird durch die physiologisch in der Maus auftretende p53 Isoform p53AS, die einen veränderten Carboxy-Terminus besitzt, unterstrichen (Han & Kulesz-Martin 1992). Diese Isoform entsteht durch alternatives Spleißen des Introns 10 und ist vergleichbar zu p53 $\Delta$ 30, da die – Lysin- und Arginin-reiche – Sequenz der letzten 26 Carboxy-terminalen Aminosäuren durch eine – Lysin- und Arginin-arme – ansonsten nicht in p53 vorkommende Sequenz aus 17 Aminosäuren ersetzt ist und dadurch die starke positive Ladung fehlt (Arai et al. 1986). Entsprechend der beobachteten starken DNA-Bindung von p53 $\Delta$ 30, führt auch bei p53AS das Fehlen der CTD zu starker DNA-Bindung im Vergleich zu regulär gespleißtem p53 (Wu et al. 1994). Diese Isoform bindet dieselbe DNA-Konsensus-Sequenz wie p53 und transaktiviert Zielgene teilweise stärker als p53 (Miner & Kulesz-Martin 1997, Cordenosi et al. 2003). Das Verhältnis der Expression der zwei unterschiedlichen Isoformen könnte die

Funktion von p53 regulieren. Dies könnte Zellzyklus-abhängig erfolgen, da p53AS besonders hoch in der G<sub>2</sub>-Phase exprimiert wird (Kulesz-Martin et al. 1994).

Bei der globalen Genexpressions-Analyse waren neben den aktivierten Genen auch viele reprimierte Gene. Die Abhängigkeit der Repression vom Proteinerückgrat ließ sich bei den Genen MCM4, CDC2 und TMPO bestätigen. Die Repression dieser drei Gene war stärker durch p53 und p53 $\Delta$ 30 als durch p73 $\alpha$  und p73 $\alpha$ +30. Das Vorhandensein der CTD führte bei der Validierung dieser Gene zu geringen Unterschieden in der Repression, wobei die CTD die Repression einerseits von p53 bei allen drei Genen abschwächte, aber andererseits zu verstärkter Repression von p73 $\alpha$  bei zwei der drei Gene führte. Auf eine allgemein gültige Abhängigkeit der Repression vom Vorhandensein der CTD kann daher nicht geschlossen werden. Besonders wenig Repression erfolgte durch p73 $\alpha$ +30 gegenüber p73 $\alpha$  bei Genomweiter Untersuchung. Dies kann durch die inhibitorische Wirkung der CTD auf die DNA-Bindung verursacht sein, jedoch ist dieser Effekt deutlich größer als es bei p53 gegenüber p53 $\Delta$ 30 ist, sodass auch andere Ursachen für diese geringe Repression mitverantwortlich sein könnten. Eine mögliche Ursache wäre, dass durch die Fusion der CTD an den Carboxy-Terminus von p73 $\alpha$ , eine dort vorhandene Domäne, die die Trans-Aktivierung hemmt, in ihrer Wirkung abgeschwächt ist (Liu & Chen 2005). Allgemein erfolgt die Repression durch unterschiedliche Mechanismen, die teilweise unabhängig von Sequenz-spezifischer DNA-Bindung sind (Scian et al. 2008). Aus diesem Grund sind Aussagen zur Bedeutung der CTD bei der Repression von Zielgenen unter dem Aspekt zu betrachten, dass nicht zwischen direkten – von Sequenz-spezifischer DNA-Bindung abhängigen – und indirekten Effekten unterschieden werden kann.

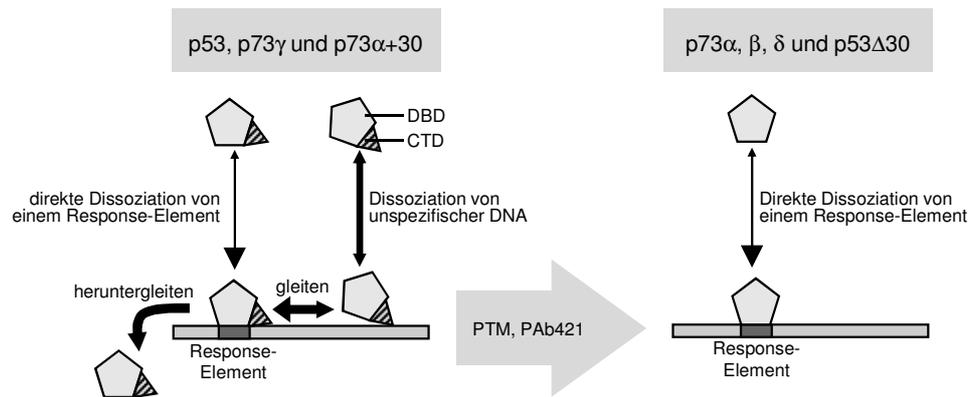
Da die CTD nicht nur Gleitfähigkeit vermittelt, sondern gleichzeitig Angriffspunkt unter anderem für Ubiquitinierung durch Mdm2 ist, könnte die Deletion der CTD von p53 beziehungsweise ihre Fusion an p73 $\alpha$  die Degradation dieser Proteine verändern und dadurch zu Unterschieden in der Genexpression führen. Hinweise auf eine veränderte Protein-Stabilität wurden jedoch nicht beobachtet und bei der Kontrolle der Proteinspiegel wurden keine Unterschiede festgestellt.

Das Vorhandensein der CTD reduzierte die Aktivität von p53 und p73 $\alpha$  bei den untersuchten Eigenschaften DNA-Bindung und Genexpression, die bedeutsam für Transkriptionsfaktoren sind. Dies verminderte die Induktion der p53 vermittelten Apoptose und des p73 $\alpha$  vermittelten Zellzyklus-Arrests. Daher ist die CTD geeignet die anti-proliferative Wirkung von p53 und p73 $\alpha$  zu reduzieren und dadurch die tumorsuppressive Funktion dieser Proteine zu begrenzen.

### 5.6 Modell der Carboxy-Termini bei der DNA-Bindung

Diese Ergebnisse können in einem Modell zusammengefasst werden (Abb. 5.1). Die Proteine p53, p73 $\gamma$  und p73 $\alpha$ +30 besitzen neben ihrer zentralen DBD einen positiv geladenen Carboxy-Terminus über den sie Sequenz-unabhängig an DNA binden und an ihr entlang gleiten können. Im Gegensatz zu diesen Proteinen tragen p73 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  und p53 $\Delta$ 30 keine positive Ladung am Carboxy-Terminus und sind nicht zum Gleiten in der Lage.

In EMSA-Experimenten bilden – aufgrund der hohen Konzentration an Response-Elementen – p53 und p73 Proteine Sequenz-spezifische Komplexe mit der DNA. Diese Komplexe sind jedoch metastabil. Die CTD beschleunigt die Dissoziation, indem sie eine Dissoziation in zwei Stufen ermöglicht. Die erste Stufe ist der Übergang von Sequenz-spezifischer DNA-Bindung der DBD zu Sequenz-unabhängiger DNA-Bindung der CTD. Die zweite Stufe erfolgt dann durch Gleiten entlang der DNA bis die CTD das Ende des Oligonukleotids erreicht hat und von ihm abfällt. Wird ein längeres Oligonukleotid verwendet, ist das Erreichen des Endes verzögert, wodurch die Dissoziation der Komplexe verlangsamt wird und die Komplexe stabilisiert werden. Entsprechend führt die Blockade der CTD von p53 und p73 $\alpha$ +30 mit dem Antikörper PAb421 oder das Fehlen eines positiv geladenen Carboxy-Terminus, wie im Fall von p73 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  und p53 $\Delta$ 30, zu reduzierter Dissoziation und somit stabileren Komplexen.



**Abb. 5.1:** Modell der Sequenz-spezifischen und -unabhängigen DNA-Bindung. **Linke Seite:** Die Proteine p53, p73 $\gamma$  und p73 $\alpha$ +30 besitzen eine CTD. In einem zweistufigen Prozess wird die DNA-Bindung aufgehoben. Das CTD-vermittelte Gleiten entlang der DNA erleichtert die Aufhebung Sequenz-spezifischer DNA-Bindung von einem Response-Element. In EMSA-Experimenten gleitet das Protein („nach links“) bis zu einem Ende der kurzen DNA, von dem es herunterfällt. In der Zelle gleitet das Protein („nach rechts“) vom Response-Element weg und dissoziiert dann von unspezifischer DNA. Direkte Dissoziation von einem Response-Element ist selten. Durch Hemmung der CTD mittels post-translationaler Modifikationen oder Interaktion mit dem Antikörper PAb421 wird die Gleitfähigkeit aufgehoben. **Rechte Seite:** Die Proteine p73 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  und p53 $\Delta$ 30 besitzen keine CTD. Sie können die DNA-Bindung nur durch den einstufigen Prozess der direkten Dissoziation aufgehoben. Die Dicke der Pfeile symbolisiert die Häufigkeit der Prozesse. DBD, DNA-Bindungs-Domäne; CTD, Carboxy-terminale Domäne; PAb421, Antikörper gegen CTD; PTM, post-translationale Modifikation(en).

In der Zelle ist die Situation anders, da das Genom aus sehr langen DNA Strängen besteht, und daher nur wenige Response-Elemente – im Vergleich zu den EMSA-Experimenten – vorhanden sind (Abb. 5.1). Hier kann die CTD auch Bedeutung beim Auffinden der Response-Elemente haben. Das kontinuierliche Gleiten entlang der DNA ermöglicht ein effizientes Abtasten der DNA-Sequenz, was durch punktuelles Zusammentreffen mit der DNA nicht ermöglicht wird (von Hippel & Berg 1989). Im Gegensatz zu dieser unterstützenden Wirkung, hat die Gleitfähigkeit eine negative Wirkung auf die Stabilität der entstandenen Komplexe, wie sich beispielsweise in unseren Versuchen zur Bindung an den p21 Promotor zeigte. Bedingt durch die Länge der chromosomalen DNA erfolgt die Dissoziation der Komplexe in der zweiten Stufe des Prozesses nicht durch Erreichen eines Endes der DNA, sondern durch Dissoziation von unspezifischer DNA. Dies erfolgt ebenfalls leichter als Dissoziation von spezifischer DNA, da bei der Dissoziation von unspezifischer DNA insbesondere elektrostatische Wechselwirkungen gelöst werden müssen, die insgesamt schwächer als die multiplen an der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung kooperierenden Wasserstoffbrücken-

Bindungen und hydrophoben Interaktionen sind (Kitayner et al. 2006, Joerger & Fersht 2008).

Die Bindung an unspezifische DNA konnte durch die FRAP-Experimente für p53 und p73 $\alpha$ +30 gezeigt werden. Wird die positive Ladung, die die Sequenz-unabhängige DNA-Bindung der CTD bewirkt, durch post-translationale Modifikationen – wie Acetylierung – eliminiert, kann die DNA-Bindung verstärkt werden (Espinosa & Emerson 2001, Luo et al. 2004, Momii et al. 2007).

### **5.7 Bedeutung der Carboxy-Termini für die Funktion von p53 Familienmitgliedern**

Die Bedeutung einer Protein-Domäne wird oft anhand ihrer evolutionären Konservierung und, im Fall der DBD von p53, anhand der Häufigkeit ihrer Inaktivierung durch Mutationen in Tumoren belegt. Die Aminosäure-Sequenzen der CTD (Aminosäurereste 364 bis 293) von Mensch und Maus sind zu 80% identisch und damit annähernd so hoch konserviert wie die DBD (Aminosäurereste 94 bis 292) mit 87%. Diese Konservierung ist ein Beleg für die Bedeutung der CTD. Jedoch treten in Tumoren Aminosäure-Substitutions-Mutationen in der CTD, im Gegensatz zur DBD, nur äußerst selten auf (Abb. 1.10). Einerseits kann dies dadurch bedingt sein, dass eine einzelne Aminosäure-Substitution nicht die positive Ladung der CTD und damit ihre Funktionalität zerstören kann, da die Ladung durch mehrere Aminosäurereste bedingt ist und Strukturveränderungen aufgrund des ungefalteten Zustands der CTD wirkungslos sein könnten (McKinney et al. 2004, Bell et al. 2002). Andererseits wird durch den Verlust der CTD – wie in dieser Arbeit gezeigt wurde – die Aktivität von p53 erhöht und nicht erniedrigt, wie dies bei Mutationen der DBD der Fall ist. Daher sollte der Verlust der Funktion der CTD nicht die Tumorentstehung fördern. Es ist viel mehr so, dass der Expressions-Verlust von p53AS – der alternativ gespleißten p53 Isoform der Maus, die Ähnlichkeit mit p53 $\Delta$ 30 hat – mit der Entwicklung bösartiger Tumorstadien korreliert. So ist der Übergang von einem soliden Tumor zu einem malignen Aszites – einem fortgeschrittenen und besonders bedrohlichen Krebsstadium – mit starker Selektion gegen die Expression von p53AS verbunden (Magnusson et al. 1998).

Der evolutive Zugewinn der CTD und somit die Fähigkeit, die DNA-Bindung zu regulieren, könnte in Zusammenhang mit der Funktion von p53 als Tumorsuppressor stehen. Die CTD reguliert die Aktivität von p53 und kann selbst durch post-translationale Modifikationen reguliert werden. Post-translationale Modifikationen der CTD stellen eine sehr schnelle Regulationsmöglichkeit der Aktivität von p53 dar und basieren nicht auf der relativ langsam erfolgenden Neusynthese des Proteins. Eine schnelle Aktivierung kann entscheidend für die Funktion eines Tumorsuppressors sein, um bereits zu wirken, bevor eine Zelle proliferiert. Jedoch muss die Aktivität von p53 auch limitiert werden, da bei zu starker Inhibition der Proliferation der Organismus unter einem Mangel des Nachschubs von neugebildeten Zellen leidet, wie dies bei Strahlenkrankheit und als unerwünschte Wirkung von Tumorbehandlungen auftritt (Gudkov & Komarova 2003). Im Gegensatz zu p53 hat p73, abgesehen von p73 $\gamma$  – über dessen Expressionsmuster und physiologische Rolle sehr wenig bekannt ist –, keine CTD und wird hauptsächlich auf Ebene der Transkription reguliert (De Laurenzi et al. 1998). Diese Regulation ermöglicht die Steuerung von langsamen Vorgängen, wie der Entwicklung und der Differenzierung, bei denen p73 eine wichtige Rolle spielt (Yang et al. 2000). Das Familienmitglied p53 stammt evolutiv von p63 und p73 ab, hat die SAM-Domäne verloren und die CTD dazugewonnen, die keine Homologie zu p63, p73 oder anderen bekannten Proteinen hat (Yang et al. 2002). Somit kann der Zugewinn der CTD eine zusätzliche und schnelle Regulationsmöglichkeit der Aktivität bieten, die entscheidend für die Funktion von p53 als Tumorsuppressor ist.

### **5.8 Auswirkung der H1-Helix-Interaktion auf die DNA-Bindung von p53**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der H1-Helix bei der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53, insbesondere unter dem Aspekt der Induktion unterschiedlicher Zellschicksale, untersucht. Die Mutanten (Positionen 180 und 181) der H1-Helix, die zu unterschiedlich starker kooperativer Interaktion fähig sind, dienten als Werkzeuge zur Untersuchung der Bedeutung der H1-Helix bei der DNA-Bindung. Die zelluläre Lokalisation der Mutanten war überwiegend nukleär und entsprach der von wildtypischem p53. An

Promotoren von pro-apoptischen Genen – abgesehen von Puma – war p53RE stärker als p53EL gebunden, während keine Unterschiede bei anti-apoptischen Genen bestanden. Die Phosphorylierung von Serin 183 wurde als eine wahrscheinliche post-translationale Modifikation in der H1-Helix Region vorhergesagt und könnte die kooperative DNA-Bindung regulieren. Simulation dieser Phosphorylierung verminderte die DNA-Bindung in EMSA-Experimenten gegenüber Wildtyp p53 und Phosphorylierungs-defektem p53. Simulation der unterschiedlichen Phosphorylierungs-Zustände hatte inverse Effekte auf die Trans-Aktivierung von pro- und anti-apoptischen Promotoren, wobei p53[S183A] stärker als Wildtyp p53 den p53AIP1 und den Bax Promotor trans-aktivierte. Zur Untersuchung, ob p53 *in vivo* an S183 phosphoryliert ist, wurde ein Antikörper generiert, der zwar Phospho-spezifisch, jedoch nur wenig sensitiv ist.

### **5.9 Einfluss der H1-Helix-Interaktion auf die Promotor-Bindung**

Mutations- und Kristallstruktur-Analysen unterstützen ein Strukturmodell, in dem die kooperative DNA-Bindung in einem p53 Dimer durch zwei Salzbrücken zwischen H1-Helices vermittelt wird (Dehner et al. 2005, Kitayner et al. 2006). Eine neue Simulation der Struktur von p53 in einem Modell – das mit Strukturdaten aus cryo-elektronenmikroskopischen Untersuchungen von p53-DNA-Komplexen übereinstimmt – zeigt, dass vier Paar ringförmig angeordneter Salzbrücken in H1-Helices zur Tetramerisierung von p53 DBD und zur Biegung der DNA beitragen (Ma & Levine 2007, Tidow et al. 2007). In beiden Fällen ist die Interaktion von H1-Helices auf unterschiedliche Weise an der Oligomerisierung von p53 Monomeren und an der DNA-Bindung beteiligt. Die H1-Helix-Interaktion hat somit funktionelle Bedeutung für die DNA-Bindung von p53, unabhängig davon, welches der alternativen Strukturmodelle zutreffend ist.

Die H1-Helix-Mutanten unterschieden sich bei der Promotor-Bindung. Da die H1-Helix-Mutanten, wie wildtypisches p53, überwiegend nukleär lokalisiert sind, kann die zelluläre Lokalisation nicht die Unterschiede der Mutanten bei der Promotor-Bindung verursachen.

Die H1-Helix-Mutanten p53EL und p53RE könnten sich einerseits in der Stärke der DNA-Bindung unterscheiden, wodurch hoch-affine Response-Elemente – Response-Elemente mit hoher Übereinstimmung zur Konsensus-Sequenz – von allen Mutanten gebunden werden können, nieder-affine jedoch nur von Mutanten mit starker H1-Helix-Interaktion. Entsprechend wurde gezeigt, dass die Stärke der DNA-Bindung von wildtypischem p53 bei unterschiedlichen Response-Elementen stark variiert, wobei nieder-affine Response-Elemente insbesondere in Apoptose-relevanten Genen zu finden sind (Inga et al. 2002, Weinberg et al. 2005). Andererseits könnten sich die Mutanten in ihrer Sequenz-Spezifität der DNA-Bindung unterscheiden, wodurch die Mutanten unterschiedliche – wenn auch überlappende – Spektren an Zielgenen binden.

Für die erste Möglichkeit – mit unterschiedlich starker DNA-Bindung der Mutanten – spricht, dass in Zellzyklus-relevanten Genen häufiger hoch-affine p53 Response-Elemente enthalten sind, als es in pro-apoptischen Genen der Fall ist (Weinberg et al. 2005). Diese hoch-affinen Response-Elemente enthalten eine mittige CATG Sequenz. Das Vorhandensein einer CATG-Sequenz erleichtert das Biegen der DNA, was förderlich für die DNA-Bindung von p53 Tetrameren an ein Response-Element ist (Nagaich et al. 1994 & 1997a, Pan & Nussinov 2008). Die Kraft zur Biegung der DNA muss durch p53 insbesondere durch Interaktionen der p53 Monomere aufgebracht werden. Diese Kraft ist bei Response-Elementen mit der leicht zu biegenden CATG Sequenz gering, so dass schwache Interaktionen der p53 Monomere ausreichen, um sie aufzubringen. Für nieder-affine Response-Elemente mit erschwert zu biegenden CTTG, CTAG und CAAG Sequenzen, muss eine stärkere Kraft durch p53 aufgebracht werden. Dies scheint bei p53RE durch die starke H1-Helix-Interaktion gegeben zu sein, so dass p53RE nieder-affine Response-Elemente von pro-apoptischen Genen binden kann, während p53EL dazu nur bedingt in der Lage ist. EMSA-Experimente bei denen p53EL schwächer an CTTG, CTAG und CAAG als an CATG Sequenzen band, wohingegen p53RE alle Sequenzen stark band, unterstützen ebenfalls diese Theorie, wonach p53RE allgemein stärker DNA binden kann als p53EL (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

Gegen die zweite Möglichkeit – mit unterschiedlicher Sequenz-Spezifität der Mutanten – spricht, dass die Promotor-Bindung von p53EL bei allen untersuchten Genen vergleichbar oder niedriger als von p53RE war, jedoch niemals höher. So wurden die anti-apoptischen

Gene p21 und Mdm2 sowohl durch p53EL als auch durch p53RE gebunden, während die pro-apoptischen Gene Noxa, p53AIP1 und Caspase1 vor allem durch p53RE gebunden wurden. Allerdings gibt es keine p53EL spezifischen Gene, die man bei unterschiedlichen Sequenz-Spezifitäten erwarten würde (auch nicht bei ChIP-on-chip-Analysen innerhalb der Arbeitsgruppe). Darüber hinaus würde man bei unterschiedlicher Sequenz-Spezifität der H1-Helix-Mutanten davon ausgehen, dass verschiedene Zellschicksale ausgelöst werden könnten, indem unterschiedliche Gruppen von Zielgenen reguliert würden. Dafür sollten p53 Zielgene, die beispielsweise relevant für Apoptose sind, eine Sequenz-Ähnlichkeit ihrer Response-Elemente aufweisen. Da die p53 Response-Elemente von Apoptose-relevanten Genen sich aber eher durch Diversität als durch evolutive Konservierung auszeichnen, spricht dies ebenfalls gegen Unterschiede in der Sequenz-Spezifität der H1-Helix-Mutanten (Horvath et al. 2007). Diese Daten belegen daher, dass die pro-apoptische Wirkung von p53RE auf der zusätzlichen Bindung an Promotoren mit nieder-affinen Response-Elementen beruht und somit einen Zugewinn gegenüber p53EL darstellt.

### **5.10 Einfluss von Serin 183 auf die DNA-Bindung**

Die Simulierung unterschiedlicher potentieller Regulations-Zustände der H1-Helix-Interaktion durch Mutationen von Serin 183 wirkte sich auf die DNA-Bindung und Trans-Aktivierung aus. Simulierung von unphosphoryliertem Serin 183 führte zu starker DNA-Bindung und zu stärkerer Trans-Aktivierung der pro-apoptischen Gene Bax und p53AIP1 als durch Wildtyp p53.

Daraus kann man nachfolgende Hypothese über die Entscheidung zwischen Induktion von Zellzyklus und Apoptose aufstellen. Anti-apoptische Gene könnten durch p53, unabhängig vom Phosphorylierungs-Status von Serin 183, gebunden und trans-aktiviert werden. Zur Induktion pro-apoptischer Gene müsste p53 an Serin 183 unphosphoryliert vorliegen, wodurch die DNA-Bindung verstärkt wäre und dadurch zusätzlich Gene mit nieder-affinen p53 Response-Elementen gebunden und trans-aktiviert werden könnten. Diese Hypothese impliziert, dass es eine Kinase geben muss, die p53 an Serin 183 phosphoryliert, und dass ein

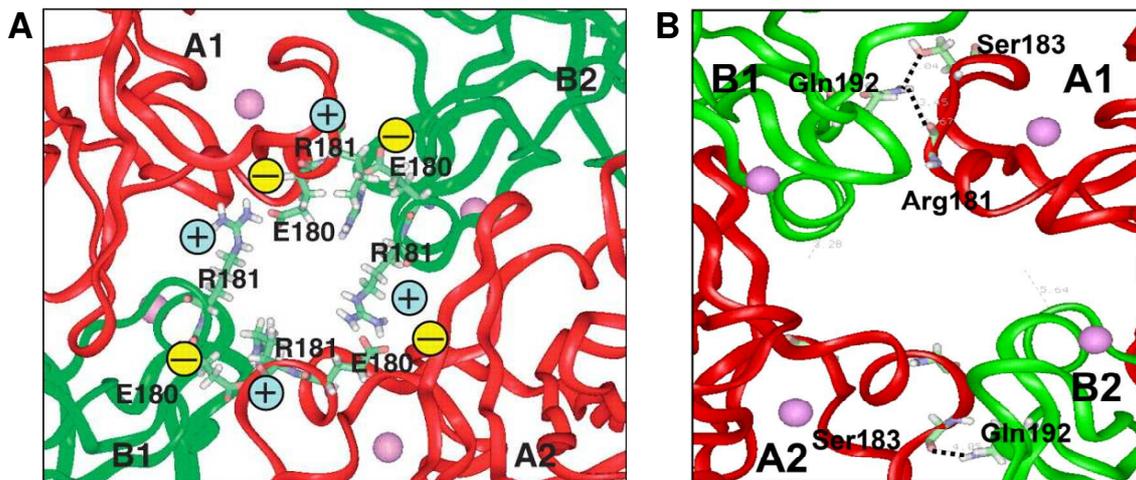
pro-apoptotisches Signal zur De-Phosphorylierung von p53 führt, wofür eine Phosphatase oder die Neusynthese von p53 notwendig ist. Diese De-Phosphorylierung wäre ein seltenes Beispiel, bei dem die Entfernung einer post-translationalen Modifikation funktionelle Bedeutung für p53 hätte (Luo et al. 2000). Wäre die Neusynthese von p53 notwendig, verzögerte dies die Auslösung von Apoptose. Dies könnte eine Möglichkeit bieten, primär Zellzyklus-Arrest – verbunden mit Reparatur von Zellschäden – zu vermitteln und zeitlich verzögert Apoptose, falls die Schädigung der Zelle noch nicht behoben wäre.

Bisher ist weder geklärt, ob p53 an Serin 183 *in vivo* phosphoryliert wird, noch welche Kinase und Phosphatase diese Position modifizieren könnte. Der Nachweis von phosphoryliertem p53 kann durch Westernblot von p53 exprimierenden Zellen vor und nach Stress-Signalen – beispielsweise ausgelöst durch Doxorubizin – erfolgen. Der Nachteil eines Nachweises mittels eines Phospho-spezifischen Antikörpers ist, dass prinzipiell nur das Vorhandensein einer Phosphorylierung nachgewiesen werden kann, jedoch nicht die Abwesenheit bewiesen werden kann. Der Grund hierfür ist, dass nicht unterschieden werden kann, ob das Protein nicht phosphoryliert ist oder ob der Nachweis nicht funktioniert. Alternativ zur Westernblot-Analyse kann Phosphorylierung von Serin 183 direkt durch Massenspektrometrie untersucht werden. Auch hier müssten die zellulären Bedingungen ausgetestet werden, bei denen diese Phosphorylierung tatsächlich stattfindet. Ob dies Stress-spezifisch, Gewebe-spezifisch oder zeitlich verändert stattfindet, ist allerdings unbekannt.

Der Einfluss dieser post-translationalen Modifikation auf das Zellschicksal kann anhand der Wirkung von Mutanten abgeschätzt werden. Hierfür wurden adenovirale Vektoren der p53 Mutanten mit Substitution von Serin 183 durch Alanin, Cystein, Aspartat beziehungsweise Glutamat generiert. Vorläufige Zellzyklus-Analysen von Saos-2 Zellen nach adenoviralem Gentransfer weisen jedoch nicht auf verstärkte Apoptose-Induktion durch die Phosphorylierungs-defekten Mutanten p53[S183A] und p53[S183C] gegenüber Wildtyp p53 hin. Dagegen scheint die Apoptose-Induktion bei den Phosphorylierungs-simulierenden Mutanten p53[S183D] und p53[S183E] gegenüber Wildtyp p53 abgeschwächt zu sein (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Apoptose-Induktion von p53 durch Phosphorylierung abgeschwächt werden kann, jedoch nicht durch De-Phosphorylierung gesteigert wird.

### 5.11 Einfluss der DNA-Bindung auf die Trans-Aktivierung

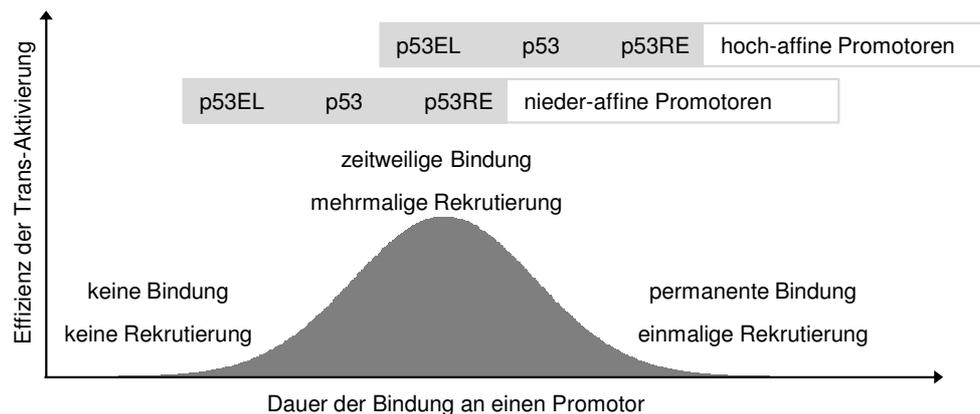
Obwohl bisher nicht geklärt ist, ob Phosphorylierung von S183 stattfindet, unterscheiden sich die Mutanten bei der Trans-Aktivierung. Diese Unterschiede könnten auch auf lokalen Strukturveränderungen in p53, bedingt durch die unterschiedlichen Aminosäure-Seitenketten der Mutanten, beruhen und unabhängig von einer möglichen Phosphorylierung sein. Unterstützt wird diese Möglichkeit durch die Tatsache, dass die Trans-Aktivierung proapoptotischer Gene eine inverse Abhängigkeit von der Größe der Aminosäure an Position 183 zeigte. So nimmt von Alanin über Aspartat zu Glutamat die Größe der Aminosäure-Seitenkette zu, dagegen nahm die Trans-Aktivierung durch die zugehörigen Mutanten ab (Abb. 4.19 & 4.23). Mittels Moleküldynamik – eine Computersimulation, die zur Strukturbestimmung auf atomarer Ebene eingesetzt wird – wurde gezeigt, dass es unterschiedliche Bindungsmodi geben kann, wie tetrameres p53 an ein Response-Element bindet (Ma & Levine 2007). Beim klassischen Modus bindet p53 an alle vier „Quartersites“ eines Response-Elements und die DNA ist nicht gebogen (Ma & Levine 2007). Der neue alternative Modus „H14“ bei dem an „Quartersite“ 1 und 4 des Response-Elements jeweils ein Monomer des p53 Tetramers gebunden ist, scheint biologisch relevant zu sein, da er die Erkennung von Sequenz-Informationen ermöglicht und – die experimentell beobachtete – DNA-Biegung erfordert (Balagurumoorthy et al. 1995, Ma & Levine 2007). Bei diesem „H14“ Modus sind die p53 Monomere durch ringförmig angeordnete Salzbrücken zwischen den Aminosäureresten Glutamat 180 und Arginin 181 der H1-Helix verbunden, wobei das Rückgrat von Arginin 181 über eine Wasserstoff-Brückenbindung mit Glutamin 192 verbunden ist (Abb. 5.2 A). Bei diesem Modus bildet Glutamin 192 auch eine Wasserstoff-Brückenbindung mit der Seitenkette von Serin 183 (Abb. 5.2 B). Daher könnten große Seitenketten an Position 183 – wie im Fall von p53[S183D] und p53[S183E] – die H1-Helix-Interaktion vermindern und dadurch die geringere DNA-Bindung von p53[S183D] und p53[S183E] in EMSA-Experimenten erklären.



**Abb. 5.2:** Bedeutung der H1-Helix-Region beim „H14“ Bindungsmodus. **A:** Ringförmig angeordnete Interaktionen der H1-Helices. Die H1-Helices in einem p53 Tetramer bilden ein Bündel, das durch Salzbrücken zwischen den Aminosäuren Glutamat 180 und Arginin 181 unterschiedlicher p53 Monomere (rot bzw. grün) stabilisiert wird. **B:** Räumliche Position von Serin 183 und Arginin 181. Glutamin 192 eines p53 Monomers (grün) bildet Wasserstoff-Brückenbindungen mit Serin 183 und Arginin 181 eines zweiten p53 Monomers (rot). Aus Ma & Levine 2007.

Interessanterweise korreliert die Stabilität der DNA-Bindung von p53EL und p53RE nicht bei allen Genen mit der Stärke der Trans-Aktivierung (Abb. 4.21 & 4.23). So besteht eine positive Korrelation bei den Genen Bax und Noxa, jedoch eine negative Korrelation bei p21. Zum Verständnis dieser Beobachtung sei gesagt, dass einige Transkriptions-Faktoren hoch mobil sind und die Bindung und Dissoziation von ihren Response-Elementen innerhalb von Sekunden erfolgt (McNally et al. 2000, Phair et al. 2004). Ferner konnte kürzlich in Hefe mittels FRAP-Analysen gezeigt werden, dass der schnelle Austausch eines gebundenen Transkriptions-Faktors entscheidend für die Initiation der Transkription ist und nicht seine langfristige Bindung (Karpova et al. 2008). Dies kann im Zusammenhang mit der notwendigen Rekrutierung unterschiedlicher Transkriptions-fördernder Faktoren – wie Histonacetyltransferasen, Chromatin-remodellierenden Faktoren und basalen Transkriptionsfaktoren – stehen, wie dies auch für p53 gilt. Der Transkriptionsfaktor würde demnach als Transporter fungieren, der mit einem Faktor beladen ist und diesen zu einem Promotor rekrutiert, wo dieser – falls es der passende Zeitpunkt ist – seine Funktion ausführt. Bei Inhibition der Dissoziation des Transkriptionsfaktors wären weitere Schritte blockiert. Daher ist zu erwarten, dass es ein Optimum der Bindungsdauer eines Transkriptionsfaktors gibt (Abb. 5.3). Findet keine Bindung statt, können keine Faktoren

rekrutiert werden, während bei permanenter Bindung, zwar ein Faktor rekrutiert werden kann, jedoch die Rekrutierung weiterer Faktoren blockiert ist. Zwischen diesen Extremen liegt das Optimum, bei dem der Transkriptionsfaktor ausreichend lange bindet, um die Funktion des rekrutierten Faktors zu ermöglichen, dann aber dissoziiert, um die Rekrutierung weiterer Faktoren zu ermöglichen.



**Abb. 5.3:** Effizienz der Trans-Aktivierung eines Transkriptionsfaktors in Abhängigkeit von der Dauer seiner Bindung an einen Promotor. Die Stabilität der DNA-Bindung nimmt mit stärker werdender H1-Helix-Interaktion von p53EL über Wildtyp p53 bis p53RE zu – unabhängig vom Promotor. An nieder-affinen Promotoren von pro-apoptotischen Genen ist die Dauer der DNA-Bindung von p53EL zu gering um effizient Transkriptions-fördernde Faktoren zu rekrutieren, während sie im Fall von wildtypischem p53 und p53RE dazu in der Lage ist. An hoch-affinen Promotoren von Zellzyklus-relevanten Genen ist die Stabilität der DNA-Bindung insgesamt höher, sodass die optimale Dauer der DNA-Bindung hin zu geringerer Stabilität der DNA-Bindung verschoben ist. Daher trans-aktiviert p53EL an diesen Promotoren sehr effizient, wohingegen die langandauernde DNA-Bindung von Wildtyp p53 und p53RE das Optimum überschritten haben und inhibierend wirken.

Nach diesem Modell wäre das Optimum der Bindungsdauer bei den „starken“ Promotoren der Zellzyklus-relevanten Gene von Wildtyp p53 und insbesondere von p53RE überschritten, wodurch die Trans-Aktivierung reduziert wäre. Die Mutante p53EL, die eine drastisch geringere DNA-Bindungsdauer bei diesen Genen als p53RE hat, läge näher am Optimum und führte daher zu einer höheren Trans-Aktivierung. Bei den nieder-affinen Promotoren der pro-apoptotischen Gene müsste – vermittelt durch die H1-Helix-Interaktion – die Stabilität der DNA-Bindung jedoch höher sein, um das Optimum zu erreichen, sodass p53RE hier zu stärkerer Trans-Aktivierung als p53EL führen würde.

### 5.12 Bedeutung der H1-Helix-Interaktion bei der Entscheidung des Zellschicksals

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die H1-Helix-Interaktion die differentielle Genexpression beeinflusst und so zur Entscheidung zwischen Zellzyklus-Arrest und Apoptose beiträgt. Die Stärke der H1-Helix-Interaktion könnte sowohl Auslöser als auch Ergebnis eines apoptotischen Signals sein. Ein möglicher Auslöser verstärkter H1-Helix-Interaktion könnte Phosphorylierung von Serin 46 sein. Diese Phosphorylierung durch DYRK2 oder HIPK2 ist mit verstärkter Expression von Bax und Puma und somit verstärkter Apoptose verbunden (Taira et al. 2007, Hofmann et al. 2002, D’Orazi et al. 2002). Diese post-translationale Modifikation bewirkt eine Pin1-abhängige Dissoziation des anti-apoptotischen Faktors iASPP von p53 und verändert die Promotor-Selektivität von p53, wodurch p53AIP1 verstärkt und p21 vermindert exprimiert wird (Mantovani et al. 2007, Oda et al. 2000b). Ein molekularer Mechanismus, der den kausalen Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und veränderter Promotor-Selektivität erklären könnte, ist nicht bekannt. Vorstellbar wäre, dass iASPP die Interaktion zwischen p53 Monomeren stört oder die Bindung von Faktoren hemmt, die die H1-Helix-Interaktion verstärken. Wäre Phosphorylierung von Serin 46 ein Auslöser verstärkter H1-Helix-Interaktion, würde man erwarten, dass die apoptotische Funktion von p53RE nicht durch die Phosphorylierungs-defekte Mutation von Serin 46 zu Alanin beeinflusst wird.

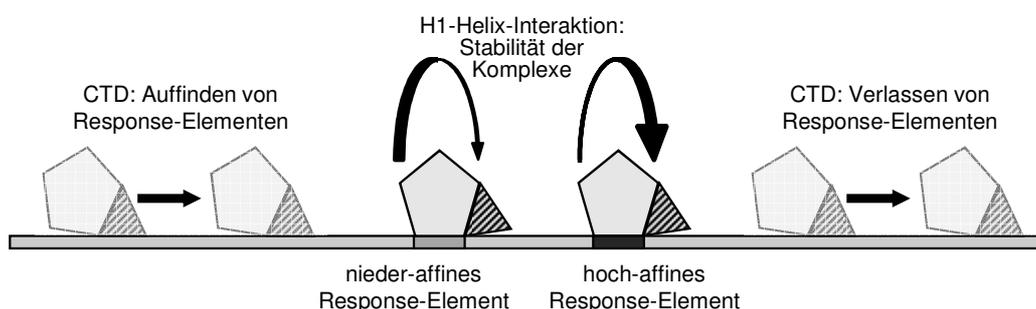
Weitere Faktoren die Einfluss auf die Promotor-Selektivität von p53 haben sind ASPP1 und ASPP2, PML3, Hzf, JMY, p300, PCAF, hMOF, Tip60 und die p53 Familienmitglieder p63 und p73 (Murray-Zmijewski et al. 2008, Tang et al. 2006, Sykes et al. 2006, Flores et al. 2002).

Die H1-Helix-Interaktion könnte dazu genutzt werden, das Gleichgewicht des Zellschicksal bei Krebstherapien von Zellzyklus-Arrest hin zu Apoptose zu verschieben und umgekehrt, indem – über die Stabilität der DNA-Bindung – die Bindungsdauer zum Optimum für die Trans-Aktivierung der pro- oder anti-apoptotischen Gene verschoben wird. Einerseits könnte in Tumorzellen gezielt Apoptose ausgelöst werden, um diese dauerhaft aus dem Pool der proliferierenden Zellen zu entfernen. Andererseits könnte Apoptose in Zellen, die nicht zum Tumor gehören, verhindert werden. Dies ermöglicht es, eine Krebstherapie in ihrer Wirkung

und räumlichen Ausdehnung zu beeinflussen, um damit spezifisch Apoptose in Tumorzellen zu induzieren. Darüber hinaus stellt die Verstärkung der kooperativen DNA-Bindung einen Ansatzpunkt zur Krebsprävention dar, der auf der Erhöhung der tumorsuppressiven Wirkung von p53 beruht.

### 5.13 Funktionelle Bedeutung der DNA-Bindungseigenschaften von p53 Familienmitgliedern

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindungseigenschaften eines Transkriptionsfaktors auf unterschiedliche Weise seine Funktion bestimmen können. Im Fall von p53 ist die H1-Helix wichtig für die kooperative DNA-Bindung an Response-Elemente, indem sie über elektrostatische Wechselwirkungen („Salzbrücken“) die Interaktion zwischen p53 Monomeren verstärkt. Bei starker H1-Helix-Interaktion kann p53, zusätzlich zu hoch-affinen Response-Elementen, auch an nieder-affine Response-Elemente binden (Abb. 5.4). Dadurch wird das Trans-Aktivierungs-Spektrum von anti- zu pro-apoptotischen Genen verschoben. Dies kann die verschiedenen ausgelösten Zellschicksale der H1-Helix-Mutanten erklären und unterstreicht die Bedeutung der H1-Helix-Interaktion für die tumorsuppressive Funktion von p53. Diese Interaktions-Fläche existiert weder in p63 noch in p73 und kann deswegen ursächlich für funktionelle Unterschiede zwischen den p53 Familienmitgliedern sein (Klein et al. 2001, Ho et al. 2006, Patel et al. 2008).



**Abb. 5.4:** Die CTD und die H1-Helix-Interaktion wirken sich auf die Promotor-Bindung von p53 aus. Die CTD vermittelt Sequenz-unabhängige DNA-Bindung, die durch Gleiten entlang der DNA das Auffinden (links) und das Verlassen (rechts) von Response-Elementen fördert. Die Interaktion von H1-Helices erhöht die Stabilität von Sequenz-spezifischen p53-DNA-Komplexen (mittig), wodurch zusätzlich zu hoch-affinen auch nieder-affine Response-Elemente gebunden werden können.

Die DNA-Bindungseigenschaften von p53 Familienmitgliedern werden nicht nur durch die DBD bestimmt, sondern auch durch den Carboxy-Terminus. Die CTD von p53 – und von p73 $\gamma$  – ist mehrfach positiv geladen und geht elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der DNA ein. Dadurch ist p53 fähig, DNA Sequenz-unabhängig zu binden, wodurch p53 an ihr entlang gleiten kann. Dies kann eine duale Wirkung haben: einerseits kann p53 durch die CTD beim Auffinden von Response-Elementen im Genom unterstützt werden, andererseits kann die CTD auch p53 bei deren Verlassen begünstigen (Abb. 5.4). Das Spektrum der Zielgene wird durch die CTD nicht verändert, dagegen wird das Ausmaß der Trans-Aktivierungs-Regulation durch die CTD reduziert, wodurch die Induktion von Zellzyklus-Arrest und Apoptose herunter reguliert wird.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die H1-Helix-Interaktion und die CTD relevant für die DNA-Bindungseigenschaften von p53 Familienmitgliedern sind und dass sowohl Sequenz-spezifische als auch Sequenz-unabhängige DNA-Bindung die tumorsuppressive Funktion von p53 bestimmt.

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serum-Albumin
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
ChIP-on-chip	ChIP gekoppelt an Microarray(s)
CTD	Carboxy-terminale Domäne
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindungs-Domäne
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemi-Lumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
FACS	Durchfluß-Zytometrie
FCS	fötale Kälber-Serum
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
g (x g)	(x-fache) Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
M	molar
min	Minute(n)

---

H2B	Histon 2B
H2B-YFP	Fusionsprotein aus H2B und YFP
HA	Hämagglutinin-Epitop
IARC	International Agency for Research on Cancer
IVT	<i>in vitro</i> Translation/ translatiert
n	Stichprobenanzahl
OD	optische Dichte
P	statistische Wahrscheinlichkeit
p21 3'	p53 Response-Element im 3' Bereich des p21 Promotors
p21 5'	p53 Response-Element im 5' Bereich des p21 Promotors
p53AS	alternativ gespleißtes p53 der Maus
p53cons	synthetischer Promotor mit p53 Konsensus Response-Elementen
p53 $\Delta$ 30	p53 mit Deletion der CTD
p53EE	p53[R181E]
p53EL	p53[R181L]
p53ER	wildtyp p53, p53[E180,R181]
p53LR	p53[E180L]
p53RE	p53[E180R,R181E]
p53RR	p53[E180R]
p53-YFP	Fusionsprotein aus p53 und YFP
p53 $\Delta$ 30-YFP	Fusionsprotein aus p53 $\Delta$ 30 und YFP
p73 $\alpha$ -YFP	Fusionsprotein aus p73 $\alpha$ und YFP
p73 $\alpha$ +30	Fusionsprotein aus p73 $\alpha$ und der CTD von p53
p73 $\alpha$ +30-YFP	Fusionsprotein aus p73 $\alpha$ +30 und YFP
PAb421	Antikörper gegen die CTD von p53
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PTM	post-translationalen Modifikation(en)
RNase	Ribonuklease

ROC	region of control
ROI	region of interest
ROX	(ein) Referenz-Farbstoff(e)
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	(x-fache) Erdbeschleunigung
YFP	gelb fluoreszierendes Protein

## Literaturverzeichnis

- An W, Kim J, Roeder RG (2004). Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* 117: 735-48.
- Anderson ME, Woelker B, Reed M, Wang P, 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.
- Arai N, Nomura D, Yokota K, Wolf D, Brill E, Shohat O et al (1986). Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 6: 3232-9.
- Ayed A, Mulder FA, Yi GS, Lu Y, Kay LE, Arrowsmith CH (2001). Latent and active p53 are identical in conformation. *Nat Struct Biol* 8: 756-60.
- Balagurumoorthy P, Lindsay SM, Harrington RE (2002). Atomic force microscopy reveals kinks in the p53 response element DNA. *Biophys Chem* 101-102: 611-23.
- Balagurumoorthy P, Sakamoto H, Lewis MS, Zambrano N, Clore GM, Gronenborn AM et al (1995). Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8591-5.
- Beitzinger M, Hofmann L, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Griesmann H et al (2008). p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. *EMBO J* 27: 792-803.
- Bell S, Klein C, Muller L, Hansen S, Buchner J (2002). p53 contains large unstructured regions in its native state. *J Mol Biol* 322: 917-27.
- Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, Trigiante G, Crook T, Hsieh JK et al (2003). iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet* 33: 162-7.
- Bergamaschi D, Samuels Y, Sullivan A, Zvelebil M, Breysens H, Bisso A et al (2006). iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. *Nat Genet* 38: 1133-41.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294: 1351-62.
- Bochar DA, Wang L, Beniya H, Kinev A, Xue Y, Lane WS et al (2000). BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 102: 257-65.
- Bornkamm GW, Berens C, Kuklik-Roos C, Bechet JM, Laux G, Bachl J et al (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33: e137.
- Bourdon JC (2007). p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* 97: 277-82.
- Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP et al (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 19: 2122-37.
- Cawley S, Bekiranov S, Ng HH, Kapranov P, Sekinger EA, Kampa D et al (2004). Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116: 499-509.
- Chang PJ, Shedd D, Miller G (2008). A mobile functional region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF50 protein independently regulates DNA binding and protein abundance. *J Virol* 82: 9700-16.

- Chi SW, Ayed A, Arrowsmith CH (1999). Solution structure of a conserved C-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *EMBO J* 18: 4438-45.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 309: 1732-5.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M et al (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303: 1010-4.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-55.
- Cordenonsi M, Dupont S, Maretto S, Insinga A, Imbriano C, Piccolo S (2003). Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. *Cell* 113: 301-14.
- Cosme-Blanco W, Shen MF, Lazar AJ, Pathak S, Lozano G, Multani AS et al (2007). Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Rep* 8: 497-503.
- Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA et al (2002). DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell* 9: 175-86.
- Crook T, Marston NJ, Sara EA, Vousden KH (1994). Transcriptional activation by p53 correlates with suppression of growth but not transformation. *Cell* 79: 817-27.
- Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE et al (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128: 853-64.
- D'Orazi G, Cecchinelli B, Bruno T, Manni I, Higashimoto Y, Saito S et al (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 4: 11-9.
- De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M et al (1998). Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med* 188: 1763-8.
- Dehner A, Klein C, Hansen S, Muller L, Buchner J, Schwaiger M et al (2005). Cooperative binding of p53 to DNA: regulation by protein-protein interactions through a double salt bridge. *Angew Chem Int Ed Engl* 44: 5247-51.
- Delphin C, Cahen P, Lawrence JJ, Baudier J (1994). Characterization of baculovirus recombinant wild-type p53. Dimerization of p53 is required for high-affinity DNA binding and cysteine oxidation inhibits p53 DNA binding. *Eur J Biochem* 223: 683-92.
- Deng Y, Chan SS, Chang S (2008). Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 8: 450-8.
- Di Como CJ, Gaiddon C, Prives C (1999). p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 19: 1438-49.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS et al (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-21.
- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL, Murphy M (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33: 357-65.

- Dunker AK, Cortese MS, Romero P, Iakoucheva LM, Uversky VN (2005). Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J* 272: 5129-48.
- el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1: 45-9.
- el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM et al (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-25.
- Espinosa JM, 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, 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.
- Feldser DM, Greider CW (2007). Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell* 11: 461-9.
- Flores ER, Sengupta S, Miller JB, Newman JJ, Bronson R, Crowley D et al (2005). Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* 7: 363-73.
- Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F et al (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 416: 560-4.
- Fontemaggi G, Gurtner A, Damalas A, Costanzo A, Higashi Y, Sacchi A et al (2005). deltaEF1 repressor controls selectively p53 family members during differentiation. *Oncogene* 24: 7273-80.
- Foord OS, Bhattacharya P, Reich Z, Rotter V (1991). A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. *Nucleic Acids Res* 19: 5191-8.
- Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Wu X, Ronai Z (1998). Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17: 2543-7.
- Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wright WE, Shay JW (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol* 12: 2866-71.
- Gorina S, Pavletich NP (1996). Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science* 274: 1001-5.
- Grob TJ, Novak U, Maise C, Barcaroli D, Luthi AU, Pirnia F et al (2001). Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell Death Differ* 8: 1213-23.
- Gu W, Malik S, Ito M, Yuan CX, Fondell JD, Zhang X et al (1999). A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Mol Cell* 3: 97-108.
- Gu W, Roeder RG (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90: 595-606.
- Gudkov AV, Komarova EA (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 3: 117-29.
- Gupta S, Radha V, Furukawa Y, Swarup G (2001). Direct transcriptional activation of human caspase-1 by tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 276: 10585-8.
- Han KA, Kulesz-Martin MF (1992). Alternatively spliced p53 RNA in transformed and normal cells of different tissue types. *Nucleic Acids Res* 20: 1979-81.
- Harms KL, Chen X (2006). The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death Differ* 13: 890-7.

- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2509-14.
- Helton ES, Chen X (2007). p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* 100: 883-96.
- Hendrix MJ (2000). De-mystifying the mechanism(s) of maspin. *Nat Med* 6: 374-6.
- Heyne K, Schmitt K, Mueller D, Armbruester V, Mestres P, Roemer K (2008). Resistance of mitochondrial p53 to dominant inhibition. *Mol Cancer* 7: 54.
- Hinow P, Rogers CE, Barbieri CE, Pietenpol JA, Kenworthy AK, DiBenedetto E (2006). The DNA binding activity of p53 displays reaction-diffusion kinetics. *Biophys J* 91: 330-42.
- Ho WC, Fitzgerald MX, Marmorstein R (2006). Structure of the p53 core domain dimer bound to DNA. *J Biol Chem* 281: 20494-502.
- Hofmann TG, Moller A, Sirma H, Zentgraf H, Taya Y, Droge W et al (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol* 4: 1-10.
- Horvath MM, Wang X, Resnick MA, Bell DA (2007). Divergent evolution of human p53 binding sites: cell cycle versus apoptosis. *PLoS Genet* 3: e127.
- Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ (2007). p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature* 450: 721-4.
- Hupp TR, Lane DP (1994a). Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol* 4: 865-75.
- Hupp TR, Lane DP (1994b). Regulation of the cryptic sequence-specific DNA-binding function of p53 by protein kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59: 195-206.
- Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71: 875-86.
- Ikawa S, Nakagawara A, Ikawa Y (1999). p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ* 6: 1154-61.
- Inga A, Storici F, Darden TA, 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.
- Irwin M, Marin MC, Phillips AC, Seelan RS, Smith DI, Liu W et al (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 407: 645-8.
- Jayaraman L, Moorthy NC, Murthy KG, Manley JL, Bustin M, 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, Pavletich NP (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267: 1498-502.
- Jiao Y, Cherny DI, Heim G, Jovin TM, Schaffer TE (2001). Dynamic interactions of p53 with DNA in solution by time-lapse atomic force microscopy. *J Mol Biol* 314: 233-43.
- Joerger AC, Fersht AR (2008). Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* 77: 557-82.
- Jost CA, Marin MC, Kaelin WG, Jr. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389: 191-4.
- Kaesler MD, 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 U S A* 99: 95-100.

- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A et al (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90: 809-19.
- Kaneshiro K, Tsutsumi S, Tsuji S, Shirahige K, Aburatani H (2007). An integrated map of p53-binding sites and histone modification in the human ENCODE regions. *Genomics* 89: 178-88.
- Karni-Schmidt O, Friedler A, Zupnick A, McKinney K, Mattia M, Beckerman R et al (2007). Energy-dependent nucleolar localization of p53 in vitro requires two discrete regions within the p53 carboxyl terminus. *Oncogene* 26: 3878-91.
- Karni-Schmidt O, Zupnick A, Castillo M, Ahmed A, Matos T, Bouvet P et al (2008). p53 is localized to a sub-nucleolar compartment after proteasomal inhibition in an energy-dependent manner. *J Cell Sci* 121: 4098-105.
- Karpova TS, Kim MJ, Spriet C, Nalley K, Stasevich TJ, Kherrouche Z et al (2008). Concurrent fast and slow cycling of a transcriptional activator at an endogenous promoter. *Science* 319: 466-9.
- Kartasheva NN, Contente A, Lenz-Stoppler C, Roth J, Dobbelstein M (2002). p53 induces the expression of its antagonist p73 Delta N, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene* 21: 4715-27.
- Kitayner M, Rozenberg H, Kessler N, Rabinovich D, Shaulov L, Haran TE et al (2006). Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Mol Cell* 22: 741-53.
- Klein C, Georges G, Kunkele KP, Huber R, Engh RA, Hansen S (2001). High thermostability and lack of cooperative DNA binding distinguish the p63 core domain from the homologous tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 276: 37390-401.
- Knudson AG, Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820-3.
- Köhler W, Schachtel G, Voleske P (1996). *Biostatistik: Einführung in die Biometrie für Biologen und Agrarwissenschaftler*. 2. Auflage. Springer-Verlag ISBN 3-540-59252-0
- Komarova EA, Diatchenko L, Rokhlin OW, Hill JE, Wang ZJ, Krivokrysenko VI et al (1998). Stress-induced secretion of growth inhibitors: a novel tumor suppressor function of p53. *Oncogene* 17: 1089-96.
- Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 44: 205-21.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387: 299-303.
- Kulesz-Martin MF, Lisafeld B, Huang H, Kisiel ND, Lee L (1994). Endogenous p53 protein generated from wild-type alternatively spliced p53 RNA in mouse epidermal cells. *Mol Cell Biol* 14: 1698-708.
- Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ et al (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274: 948-53.
- Lee CW, La Thangue NB (1999). Promoter specificity and stability control of the p53-related protein p73. *Oncogene* 18: 4171-81.
- Lee D, Kim JW, Seo T, Hwang SG, Choi EJ, 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 KC, Crowe AJ, Barton MC (1999). p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding. *Mol Cell Biol* 19: 1279-88.
- Li HH, Cai X, Shouse GP, Piluso LG, Liu X (2007). A specific PP2A regulatory subunit, B56gamma, mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *EMBO J* 26: 402-11.
- Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J et al (2002a). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416: 648-53.
- Li M, Luo J, Brooks CL, Gu W (2002b). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* 277: 50607-11.
- Lin T, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E et al (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 7: 165-71.
- Liu G, Chen X (2002). The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene* 21: 7195-204.
- Liu G, Chen X (2005). The C-terminal sterile alpha motif and the extreme C terminus regulate the transcriptional activity of the alpha isoform of p73. *J Biol Chem* 280: 20111-9.
- Liu J, Perumal NB, Oldfield CJ, Su EW, Uversky VN, Dunker AK (2006). Intrinsic disorder in transcription factors. *Biochemistry* 45: 6873-88.
- Liu Y, Kulesz-Martin MF (2006). Sliding into home: facilitated p53 search for targets by the basic DNA binding domain. *Cell Death Differ* 13: 881-4.
- Liu Y, Lagowski JP, Vanderbeek GE, Kulesz-Martin MF (2004). Facilitated search for specific genomic targets by p53 C-terminal basic DNA binding domain. *Cancer Biol Ther* 3: 1102-8.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-8.
- Lohr K, Moritz C, Contente A, Dobbstein M (2003). p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem* 278: 32507-16.
- Lokshin M, Li Y, Gaiddon C, Prives C (2007). p53 and p73 display common and distinct requirements for sequence specific binding to DNA. *Nucleic Acids Res* 35: 340-52.
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362: 847-9.
- Ludwig RL, Bates S, Vousden KH (1996). Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol Cell Biol* 16: 4952-60.
- Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J et al (2007). A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* 2: 1236-47.
- Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG, Gu W (2004). Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2259-64.
- Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W (2000). Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature* 408: 377-81.
- Ma B, Levine AJ (2007). Probing potential binding modes of the p53 tetramer to DNA based on the symmetries encoded in p53 response elements. *Nucleic Acids Res* 35: 7733-47.
- Mack DH, Vartikar J, Pipas JM, Laimins LA (1993). Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53. *Nature* 363: 281-3.

- Magnusson KP, Satalino R, Qian W, Klein G, Wiman KG (1998). Is conversion of solid into more anoxic ascites tumors associated with p53 inactivation? *Oncogene* 17: 2333-7.
- Mantovani F, Tocco F, Girardini J, Smith P, Gasco M, Lu X et al (2007). The prolyl isomerase Pin1 orchestrates p53 acetylation and dissociation from the apoptosis inhibitor iASPP. *Nat Struct Mol Biol* 14: 912-20.
- Marin MC, Jost CA, Irwin MS, DeCaprio JA, Caput D, Kaelin WG, Jr. (1998). Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73. *Mol Cell Biol* 18: 6316-24.
- Mateu MG, Fersht AR (1998). Nine hydrophobic side chains are key determinants of the thermodynamic stability and oligomerization status of tumour suppressor p53 tetramerization domain. *EMBO J* 17: 2748-58.
- Matheu A, Maraver A, Klatt P, Flores I, Garcia-Cao I, Borrás C et al (2007). Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 448: 375-9.
- McKinney K, Mattia M, Gottifredi V, Prives C (2004). p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Mol Cell* 16: 413-24.
- McKinney K, Prives C (2002). Efficient specific DNA binding by p53 requires both its central and C-terminal domains as revealed by studies with high-mobility group 1 protein. *Mol Cell Biol* 22: 6797-808.
- McNally JG, Muller WG, Walker D, Wolford R, Hager GL (2000). The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* 287: 1262-5.
- Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH (2002). p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2: 605-15.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P et al (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11: 577-90.
- Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398: 708-13.
- Miner Z, Kulesz-Martin M (1997). DNA binding specificity of proteins derived from alternatively spliced mouse p53 mRNAs. *Nucleic Acids Res* 25: 1319-26.
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75: 653-60.
- Miyashita T, Reed JC (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene. *Cell* 80: 293-9.
- Momii Y, Izumi H, Shiota M, Onitsuka T, Abe T, Kobayashi H et al (2007). p73gamma transactivates the p21 promoter through preferential interaction with the p300/CBP-associated factor in human prostate cancer cells. *Oncol Rep* 18: 411-6.
- Moroni MC, Hickman ES, Lazzerini Denchi E, Caprara G, Colli E, Cecconi F et al (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3: 552-8.
- Mueller F, Wach P, McNally JG (2008). Evidence for a common mode of transcription factor interaction with chromatin as revealed by improved quantitative fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* 94: 3323-39.
- Muller-Tiemann BF, Halazonetis TD, Elting JJ (1998). Identification of an additional negative regulatory region for p53 sequence-specific DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6079-84.

- Murphy M, Ahn J, Walker KK, Hoffman WH, Evans RM, Levine AJ et al (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* 13: 2490-501.
- Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 13: 962-72.
- Murray-Zmijewski F, Slee EA, Lu X (2008). A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 702-12.
- Nagaich AK, Appella E, 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, Bhattacharyya D, Brahmachari SK, Bansal M (1994). CA/TG sequence at the 5' end of oligo(A)-tracts strongly modulates DNA curvature. *J Biol Chem* 269: 7824-33.
- Nagaich AK, Zhurkin VB, Sakamoto H, Gorin AA, Clore GM, Gronenborn AM et al (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.
- Nakagawa T, Takahashi M, Ozaki T, Watanabe Ki K, Todo S, Mizuguchi H et al (2002). Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol Cell Biol* 22: 2575-85.
- Nakano K, Vousden KH (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7: 683-94.
- Nister M, Tang M, Zhang XQ, Yin C, Beeche M, Hu X et al (2005). p53 must be competent for transcriptional regulation to suppress tumor formation. *Oncogene* 24: 3563-73.
- Norris PS, Haas M (1997). A fluorescent p53GFP fusion protein facilitates its detection in mammalian cells while retaining the properties of wild-type p53. *Oncogene* 15: 2241-7.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T et al (2000a). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288: 1053-8.
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T et al (2000b). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102: 849-62.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 19: 607-14.
- Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I et al (1998). Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* 4: 839-43.
- Pan Y, Nussinov R (2008). p53-Induced DNA bending: the interplay between p53-DNA and p53-p53 interactions. *J Phys Chem B* 112: 6716-24.
- Patel S, Bui TT, Drake AF, Fraternali F, Nikolova PV (2008). The p73 DNA binding domain displays enhanced stability relative to its homologue, the tumor suppressor p53, and exhibits cooperative DNA binding. *Biochemistry* 47: 3235-44.

- Phair RD, Scaffidi P, Elbi C, Vecerova J, Dey A, Ozato K et al (2004). Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Mol Cell Biol* 24: 6393-402.
- Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR, Miller FD (2000). An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 289: 304-6.
- Ramadan S, Terrinoni A, Catani MV, Sayan AE, Knight RA, Mueller M et al (2005). p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 713-7.
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q et al (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14: 34-44.
- Resnick MA, Tomso D, Inga A, Menendez D, Bell D (2005). Functional diversity in the gene network controlled by the master regulator p53 in humans. *Cell Cycle* 4: 1026-9.
- Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 402-12.
- Robles AI, Linke SP, Harris CC (2002). The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene* 21: 6898-907.
- Rohaly G, Chemnitz J, Dehde S, Nunez AM, Heukeshoven J, Deppert W et al (2005). A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* 122: 21-32.
- Rolley N, Butcher S, Milner J (1995). Specific DNA binding by different classes of human p53 mutants. *Oncogene* 11: 763-70.
- Sakaguchi K, Herrera JE, Saito S, Miki T, Bustin M, Vassilev A et al (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12: 2831-41.
- Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S et al (2001). ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8: 781-94.
- Sasai N, Yakura R, Kamiya D, Nakazawa Y, Sasai Y (2008). Ectodermal factor restricts mesoderm differentiation by inhibiting p53. *Cell* 133: 878-90.
- Sasaki Y, Ishida S, Morimoto I, Yamashita T, Kojima T, Kihara C et al (2002). The p53 family member genes are involved in the Notch signal pathway. *J Biol Chem* 277: 719-24.
- Sauer M (2005). Diplomarbeit. Funktionelle Analyse des Tumorsuppressors p53 mittels Fluoreszenzmikroskopie. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Schwartz D, Goldfinger N, Rotter V (1993). Expression of p53 protein in spermatogenesis is confined to the tetraploid pachytene primary spermatocytes. *Oncogene* 8: 1487-94.
- Scian MJ, Carchman EH, Mohanraj L, Stagliano KE, Anderson MA, Deb D et al (2008). Wild-type p53 and p73 negatively regulate expression of proliferation related genes. *Oncogene* 27: 2583-93.
- Sengupta S, Harris CC (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 44-55.
- Serber Z, Lai HC, Yang A, Ou HD, Sigal MS, Kelly AE et al (2002). A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism. *Mol Cell Biol* 22: 8601-11.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A, Rotter V (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 10: 6565-77.

- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91: 325-34.
- Smeenk L, van Heeringen SJ, Koeppeel M, van Driel MA, Bartels SJ, Akkers RC et al (2008). Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response. *Nucleic Acids Res* 36: 3639-54.
- Sprague BL, Pego RL, Stavreva DA, McNally JG (2004). Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* 86: 3473-95.
- Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348: 747-9.
- Stephen CW, Helminen P, Lane DP (1995). Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol* 248: 58-78.
- Stiewe T, Putzer BM (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* 26: 464-9.
- Stiewe T, Theseling CC, Putzer BM (2002). Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem* 277: 14177-85.
- Sun Y, Zeng XR, Wenger L, Firestein GS, Cheung HS (2004). P53 down-regulates matrix metalloproteinase-1 by targeting the communications between AP-1 and the basal transcription complex. *J Cell Biochem* 92: 258-69.
- Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS et al (2006). Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* 24: 841-51.
- Tafvizi A, Huang F, Leith JS, Fersht AR, Mirny LA, van Oijen AM (2008). Tumor suppressor p53 slides on DNA with low friction and high stability. *Biophys J* 95: L01-3.
- Taira N, Nihira K, Yamaguchi T, Miki Y, Yoshida K (2007). DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell* 25: 725-38.
- Tan M, Heizmann CW, Guan K, Schafer BW, Sun Y (1999). Transcriptional activation of the human S100A2 promoter by wild-type p53. *FEBS Lett* 445: 265-8.
- Tan M, Wang Y, Guan K, Sun Y (2000). PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumor cell growth via TGF-beta signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 109-14.
- Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W (2006). Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* 24: 827-39.
- Teodoro JG, Parker AE, Zhu X, Green MR (2006). p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. *Science* 313: 968-71.
- Tidow H, Melero R, Mylonas E, Freund SM, Grossmann JG, Carazo JM et al (2007). Quaternary structures of tumor suppressor p53 and a specific p53 DNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12324-9.
- Toledo F, Wahl GM (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6: 909-23.
- Ueda Y, Hijikata M, Takagi S, Chiba T, Shimotohno K (1999). New p73 variants with altered C-terminal structures have varied transcriptional activities. *Oncogene* 18: 4993-8.

- Varley JM (2003). Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 21: 313-20.
- Veprintsev DB, Fersht AR (2008). Algorithm for prediction of tumour suppressor p53 affinity for binding sites in DNA. *Nucleic Acids Res* 36: 1589-98.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-10.
- von Hippel PH, Berg OG (1989). Facilitated target location in biological systems. *J Biol Chem* 264: 675-8.
- Vossio S, Palescandolo E, Pediconi N, Moretti F, Balsano C, Levrero M et al (2002). DN-p73 is activated after DNA damage in a p53-dependent manner to regulate p53-induced cell cycle arrest. *Oncogene* 21: 3796-803.
- Vousden KH (2005). Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science* 309: 1685-6.
- Wang Y, Reed M, Wang P, Stenger JE, Mayr G, Anderson ME et al (1993). p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev* 7: 2575-86.
- Warnock LJ, Raines SA, Mee TR, Milner J (2005). Role of phosphorylation in p53 acetylation and PAb421 epitope recognition in baculoviral and mammalian expressed proteins. *FEBS J* 272: 1669-75.
- Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD (1998). ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* 19: 175-8.
- Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T et al (2006). A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124: 207-19.
- Weinberg RL, Veprintsev DB, Bycroft M, Fersht AR (2005). Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *J Mol Biol* 348: 589-96.
- Willis A, Jung EJ, Wakefield T, 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, 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.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7: 1126-32.
- Xing J, Sheppard HM, Corneillie SI, Liu X (2001). p53 Stimulates TFIID-TFIIA-promoter complex assembly, and p53-T antigen complex inhibits TATA binding protein-TATA interaction. *Mol Cell Biol* 21: 3652-61.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366: 701-4.
- Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F (2002). On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* 18: 90-5.
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V et al (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2: 305-16.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT et al (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398: 714-8.

- Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J et al (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404: 99-103.
- Youle RJ, Strasser A (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47-59.
- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7: 673-82.
- Yun J, Chae HD, Choy HE, Chung J, Yoo HS, Han MH et al (1999). p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor. *J Biol Chem* 274: 29677-82.
- Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M et al (2002). DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med* 196: 765-80.

## Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Stiewe bedanke ich mich für die freundliche und kompetente Betreuung dieser Arbeit und für sein Interesse und seine Offenheit.

Herrn Prof. Dr. Erich Buchner danke ich für die Übernahme des Gutachtens.

Für die praktische Kooperation bei den EMSA-Analysen der Carboxy-Termini von p53 und p73 Isoformen danke ich Anne Catherine Bretz.

Bei allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Stiewe (Anna, Anna-Maria, Anne Catherine, Claudia D., Claudia K., Elisabeth, Hakan, Heidi, Jan, Katharina, Katrin, Lars, Marie, Michaela, Nadja, Nicole, Rasa, Simone, Stefanie, Stefano, Tanja und Torsten) bedanke ich mich für ihre Unterstützung, den hilfreichen Meinungs austausch und für die schöne Zeit zusammen.

Herrn Prof. Dr. Gregory Harms und seinen Arbeitsgruppenmitgliedern, insbesondere Geoffrey und Mike, danke ich für ihre Hilfe bei FRAP-Versuchen.

Außerdem bedanke ich mich bei den Kollegen des Rudolf-Virchow-Zentrums, des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung und weiterer nicht genannter Institute der Universität Würzburg und Marburg für die Nutzung von Geräten/ Materialien und für ihre hilfsbereite Unterstützung.

Der praktische Teil der Analyse von mRNA Proben mittels Microarray wurde im Institut für Pathologie der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Rosenwald, insbesondere durch Christof Burek, durchgeführt. Für diese Kooperation danke ich vielmals.

Evelyn, Freunden und meiner Familie danke ich, dass sie mich während dieser Zeit so gut begleitet haben.