

durch Stickstoff koordiniert sind. Da Natriumatome einen größeren Radius aufweisen als Lithiumatome, ist leicht einzusehen, dass sich die Koordinationszahl von Stickstoff von acht in α -Li₃N auf sechs in Na₃N erniedrigt.

Bereits in früheren Arbeiten traf Jansen Vorhersagen für mögliche Strukturen von Alkalimetallnitriden.^[19] Der anti-ReO₃-Typ wurde dabei allerdings nicht in Betracht gezogen, woraus sich entnehmen lässt, dass diese Struktur für Na₃N nicht zu erwarten war. In Einklang mit den präparativen Bedingungen kann davon ausgegangen werden, dass die erhaltene Form von Na₃N metastabil ist. Da Na₃N bislang ausschließlich als Schicht auf einem Saphirsubstrat hergestellt wurde und äußerst hydrolyseempfindlich ist, konnten noch keine weiteren Eigenschaften bestimmt werden. Hier sind sicher weitere interessante Ergebnisse zu erwarten.

Die von Fischer und Jansen vorgestellte Präparationsmethode bietet sich auch für Versuche zur Herstellung von binären Nitriden des Kaliums, Rubidiums und Caesiums an. Die Entwicklung neuer Synthesewege dürfte in näherer Zukunft in weiteren bislang unbekannten Stickstoffverbindungen (insbesondere metastabiler Spezies) mit überraschenden Strukturen und physikalischen Eigenschaften resultieren und der Festkörperchemie neue Impulse geben.

- [1] K. Suzuki, H. Morita, T. Kaneko, H. Yoshida, H. Fujimori, *J. Alloys Compd.* **1993**, 201, 11–16.
 [2] N. Scotti, W. Kockelmann, J. Senker, S. Traßel, H. Jacobs, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1999**, 625, 1435–1439.
 [3] A. Zerr, G. Miehe, G. Serghiou, M. Schwarz, E. Kroke, R. Riedel, H. Fueß, P. Kroll, R. Boehler, *Nature* **1999**, 400, 340–342.

- [4] K. Leinenweber, M. O'Keeffe, M. Somayazulu, H. Hubert, P. F. McMillan, G. H. Wolf, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 3067–3078.
 [5] F. Briegleb, A. Geuther, *Liebigs Ann.* **1862**, 123, 228–241.
 [6] W. Schnick, J. Lücke, F. Krumeich, *Chem. Mater.* **1996**, 8, 281–286.
 [7] K. Landskron, H. Huppertz, J. Senker, W. Schnick, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2713–2716; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2643–2645.
 [8] G. Auffermann, Yu. Prots, R. Kniep, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 565–567; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 547–549.
 [9] G. V. Vajenine, G. Auffermann, Yu. Prots, W. Schnelle, R. K. Kremer, A. Simon, R. Kniep, *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 4866–4870.
 [10] F. Cacace, G. de Petris, A. Troiani, *Science* **2002**, 295, 480–481.
 [11] K. O. Christe, W. Wilson, J. A. Sheehy, J. A. Boatz, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2112–2118; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2004–2009.
 [12] A. Rabenau, *Solid State Ionics* **1982**, 6, 277–293.
 [13] E. Zintl, G. Brauer, *Z. Elektrochem.* **1935**, 41, 102–107; A. Rabenau, H. Schulz, *J. Less-Common Met.* **1976**, 50, 155–159.
 [14] H. J. Beister, S. Haag, R. Kniep, K. Ströbner, K. Syassen, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1116–1118; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 1101–1103.
 [15] H. Davy, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1809**, 40, 150–157; J. L. Gay-Lussac, L.-J. Thénard, *Recherches Physico-Chimiques, Vol. I*, **1811**, S. 337–342.
 [16] L. Zehnder, *Ann. Phys.* **1894**, 52, 56–66.
 [17] F. Fischer, F. Schröter, *Chem. Ber.* **1910**, 43, 1465–1480; R. J. Strutt, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1913**, 88, 539–549; R. Suhrmann, K. Clusius, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1926**, 152, 52–58; W. Moldenhauer, H. Möttig, *Chem. Ber.* **1929**, 62, 1954–1959; H. Wattenberg, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1930**, 63, 1667–1672; E. Tiede, H.-G. Knoblauch, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**, 68, 1149–1154.
 [18] D. Fischer, M. Jansen, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1831–1833; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1755–1756.
 [19] M. Jansen, J. C. Schön, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1998**, 624, 533–540; J. C. Schön, M. A. C. Wevers, M. Jansen, *J. Mater. Chem.* **2001**, 11, 69–77.

Oligomerisierung von p53 nach kooperativer Bindung an DNA: ein Beitrag zum strukturellen Verständnis der Funktion von p53

Patrick Chene und Wolfgang Jahnke*

p53 ist eines der wichtigsten an der Verhinderung von Krebs beteiligten Genprodukte und deshalb eine interessante Zielverbindung in der Krebsforschung.^[1] Trotz seiner pharmazeutischen Bedeutung ist eines der grundlegenden Prinzipien von p53 noch ungeklärt: seine Aktivierung von einem latenten zu einem aktiven und DNA-bindenden Zustand. Eine kürzlich erschienene Arbeit erhellt nun einige strukturelle Aspekte der Aktivierung von p53 und dessen Bindung an DNA.^[2] p53-Protein ist in stressfreien Zellen in latenter Form und in sehr kleiner Konzentration vorhanden. Unter verschiedenen Stress-Bedingungen – z.B. bei geschädigter

DNA, Onkogen-Aktivierung, Sauerstoff- oder Ribonucleotidmangel – wird es jedoch in der Zelle akkumuliert und aktiviert.^[3] Die Aktivierung von p53 führt entweder zum Stillstand des Zellzyklus oder zur Apoptose.^[4] Die Konsequenzen der p53-Aktivierung sind zelltyp- und stressspezifisch. Als Folge wird die Teilung der geschädigten Zellen blockiert: p53 ist ein Tumor-Suppressor-Gen. Verschiedene Befunde zeigen, dass eine Deletion oder Mutation des p53-Gens das Risiko einer Krebsentstehung erhöht: Mäuse mit homozygot inaktiviertem p53-Allel sind sehr tumoranfällig,^[5] p53 ist in etwa 50 % aller menschlichen Tumore mutiert,^[6] und p53-Keimbahn-Mutationen sind mit dem Li-Fraumeni-Syndrom verknüpft.^[7]

Zwar wird ein Teil der Aktivität von p53 durch Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt, doch hängt ein Großteil seiner Aktivität von der Fähigkeit ab, an DNA zu binden und verschiedene Gene zu transkribieren. p53 ist ein Trans-

[*] Dr. W. Jahnke, Dr. P. Chene
 Novartis Pharma AG
 Lichtstrasse, 4002 Basel (Schweiz)
 Fax: (+41) 61-324-2686
 E-mail: wolfgang.jahnke@pharma.novartis.com

kriptionsfaktor und enthält, wie andere Transkriptionsfaktoren, unterschiedliche Domänen: Am N-Terminus sind eine Transaktivierungsdomäne und eine Prolin-reiche Domäne (Reste 1–43 bzw. 61–94). Eine DNA-Bindungsdomäne befindet sich in der Mitte des Proteins (110–286), eine Tetramerisierungsdomäne (326–355) und eine regulatorische Domäne (363–393) sind am C-Terminus des Proteins. Die Struktur von p53 in voller Länge ist noch nicht bekannt, doch wurden die Strukturen von einzelnen Domänen durch Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie bestimmt (Abbildung 1). Insbesondere die Strukturbestimmung eines p53-DNA-Komplexes war ein entscheidender Beitrag zum Verständnis der Wechselwirkung von p53 und DNA.^[8] p53 bindet mit seiner zentralen DNA-Bindungsdomäne an Konsensus-DNA-Sequenzen, die zwei Kopien des 10-Basenpaar-Motivs 5'-Pu·Pu·Pu·C·(A/T)·(T/A)·G·Py·Py·Py-3' (Pu = A/G, Py = T/C) enthalten, die wiederum um bis zu 13 Basen getrennt sein können.^[9] Die interne Symmetrie eines jeden Zehn-Basenpaar-Motivs, das aus zwei entgegengesetzt orientierten Teilstücken besteht, lässt vermuten, dass p53 als Tetramer an DNA bindet – in Lösung liegt p53 in der Tat als Tetramer vor. Die große Mehrheit der p53-Mutationen kommt in der DNA-Bindungsdomäne vor.^[6] Die Kenntnis ihrer 3D-Struktur zumindest in der monomeren Form und die Analyse der thermodynamischen Stabilität verschiedener p53-Mutanten^[10] sind die Basis für das Verständnis der Effekte von p53-Mutationen auf p53-Aktivität. Mutiert sind Reste, die die Struktur der DNA-Bindungsdomäne aufrechterhalten, und/oder Reste im direkten Kontakt mit DNA. Alle diese Mutationen heben die DNA-Bindung auf und inaktivieren dadurch das p53-Protein.

Zwei brennende Fragen verbleiben hinsichtlich des Verständnisses der p53-Funktion auf molekularem Niveau: Wie wird p53 aus dem latenten Zustand aktiviert, und was ist die räumliche Anordnung der einzelnen p53-Untereinheiten und p53-Domänen im Komplex des gesamten tetrameren p53 mit DNA? Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass p53-Protein in einer latenten Konformation existiert, in der es nicht

sequenzspezifisch an DNA bindet, und in einer aktiven Konformation, in der es dies tut.^[11] Die Entdeckung, dass der Übergang zwischen beiden Konformationen durch Aktivatoren vermittelt wird, die entweder am N-Terminus oder am C-Terminus wirken, führte zum Konzept einer allosterischen Regulierung der p53-Aktivität.^[12] Dieses Modell enthält als Hypothese eine Wechselwirkung zwischen der DNA-Bindungsdomäne und einer anderen Region im Protein (höchstwahrscheinlich den 30 Resten am C-Terminus), die in der latenten Konformation DNA-Bindung verhindern würde. Die Entdeckung, dass kleine Peptide, die den C-Terminus von p53 nachahmen, das Wildtyp-Protein und einige mutierte Formen aktivieren, unterstützt dieses Modell und legt nahe, dass allosterische Aktivierung für den Entwurf neuer Antitumor-Wirkstoffe genutzt werden könnte.^[13] Doch in einer neuen NMR-Studie untersuchten Forscher von Novaspin und Roche die Wechselwirkung zwischen der DNA-Bindungsdomäne von p53 und verschiedenen C- und N-terminalen Peptiden mit einer Vielzahl von NMR-Methoden, darunter die Untersuchung der Änderungen der chemischen Verschiebung, Diffusionsmessungen und Sättigungstransfer-Differenzspektroskopie. Dabei wurden keine Wechselwirkungen zwischen diesen Peptiden und der DNA-Bindungsdomäne gefunden.^[2] Diese Ergebnisse zeigen daher, im Einklang mit unabhängigen Arbeiten^[14] und anderen Befunden,^[15] dass das allosterische Modell der p53-Regulierung nicht zutrifft. Nun wird ein kompetitives Bindungsmodell zur Erklärung der experimentellen Daten bevorzugt.^[16] Tatsächlich wurde von einer schwachen (und wahrscheinlich unspezifischen) Wechselwirkung zwischen dem C-terminalen Peptid und DNA berichtet.^[2]

Dass DNA-Bindungsdomänen von p53 in Lösung kooperativ an DNA binden können, wurde schon vor längerem gezeigt.^[17, 18] Ein exaktes Verständnis dieses kooperativen Effekts auf struktureller Basis ist jedoch begrenzt, weil die Struktur von vollständigem (tetrameren) p53 im Komplex mit DNA unbekannt ist. Klein et al.^[2] präsentieren nun weitere NMR-Strukturdaten über den Ursprung der kooperativen Bindung der DNA-Bindungsdomäne an DNA. Indem unmarkierte Konsensus-DNA zu ¹⁵N-isotopenmarkierter DNA-Bindungsdomäne titriert wurde, konnten Änderungen der chemischen Verschiebung in der DNA-Bindungsdomäne selektiv und mit der räumlichen Auflösung von einzelnen Aminosäuren beobachtet werden. Diese Änderungen der chemischen Verschiebung sind auf Veränderungen in der lokalen Umgebung der jeweiligen Aminosäure zurückzuführen, die entweder durch Wechselwirkung mit DNA oder einem anderen p53-Monomer oder aber durch lokale konformative Veränderungen hervorgerufen werden.^[19] Die Änderungen der chemischen Verschiebung sind auf bestimmte Bereiche der DNA-

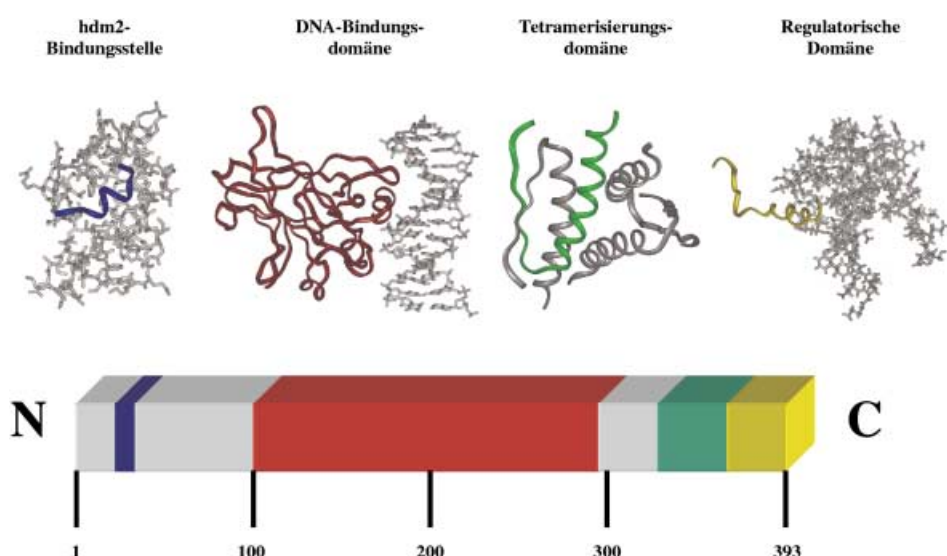


Abbildung 1. Die Domänen von p53 und eine Skizze der vorhandenen experimentell erhaltenen Strukturen für die einzelnen Domänen. Die Strukturen der Bindungspartner sind grau dargestellt.

Bindungsdomäne von p53 beschränkt. Dies zeigt, dass deren Konformation durch die Wechselwirkung mit DNA nicht drastisch verändert wird, und bestätigt den Ort der Wechselwirkung mit DNA.^[8] Vor allem aber definiert es die Region auf der Oberfläche der DNA-Bindungsdomäne, die an Wechselwirkungen zwischen zwei DNA-Bindungsdomänen beteiligt ist. Dies liefert experimentelle Daten für die Erstellung eines Modells des p53-Tetramers im Komplex mit Konsensus-DNA. Wie schon Cho et al. vermuteten,^[8] umfasst die Grenzfläche der Oligomerisierung die kurze Helix H1 zwischen den Resten Prolin-177 und Cystein-182. Interessanterweise sind einige der p53-Mutationen, die in Krebszellen gefunden wurden, in dieser H1-Helix lokalisiert. Dass diese Helix an der Oligomerisierung von p53 beteiligt ist, erklärt das Auftreten dieser „hot spots“ in und bei einer Region von p53, die nicht in direktem Kontakt mit DNA steht. Es wäre sehr interessant zu sehen, ob diese Mutationen tatsächlich die Oligomerisierung der DNA-Bindungsdomäne beeinflussen. Mit anderen Worten, können Punktmutationen in der Helix H1 tatsächlich p53-Oligomerisierung und DNA-Bindung verhindern, so wie manche Mutationen in der Tetramerisierungsdomäne dies tun?^[20]

Wie ist der Komplex zwischen vollständigem, tetramerem p53 und DNA strukturell organisiert? Im „Klammer-Modell“^[21] (Abbildung 2A) ist die Konsensus-DNA von einem p53-Dimer auf jeder Seite umgeben, sodass das Tetramer wie

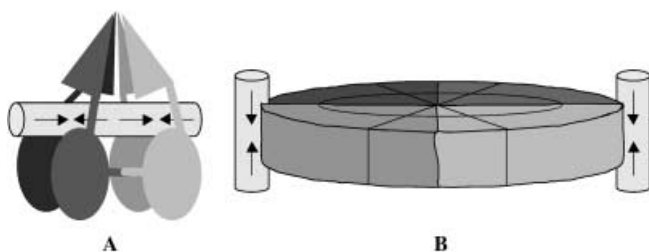


Abbildung 2. Strukturmodelle für den Komplex aus vollständigem, tetramerem p53 und DNA: A) „Klammermodell“,^[21] B) „Sandwich-Modell“ von Klein et al.^[2] Jedes p53-Monomer ist durch eine unterschiedliche Schattierung wiedergegeben. DNA ist als Schlauch dargestellt, und die Orientierung der einzelnen Teilstücke ist durch Pfeile gegeben.

eine Klammer an DNA bindet. Auf der Basis ihrer experimentellen Daten und Symmetrieüberlegungen schlagen Klein et al. nun ein „Sandwich-Modell“ für die p53-DNA-Wechselwirkung vor.^[2] In diesem Modell wird angenommen, dass p53-Tetramere zwei getrennte, benachbarte Konsensus-DNA-Stränge verbrücken (Abbildung 2B). Die Tetramerisierungsdomänen bilden das Innere des scheibenförmigen Tetramers. Die DNA-Bindungsdomänen und Transaktivierungsdomänen befinden sich außen, und die DNA-Bindungsdomänen sind im Kontakt mit Konsensus-DNA. Dieses Modell ist nicht nur mit der D_2 -Symmetrie des Komplexes und einheitlichen Konformationen eines jeden p53-Monomers vereinbar, sondern wird auch durch Elektronenmikroskopie-Studien gestützt, denen zufolge p53 zwei DNA-Stränge verbinden kann.^[22]

Ein anderer Aspekt wird durch die Arbeit von Klein et al. offenkundig: Dynamik spielt für das Verständnis der p53-DNA-Wechselwirkung eine wesentliche Rolle. Die NMR-Signale von bestimmten p53-Resten verbreitern sich nach DNA-Bindung signifikant. Da die Autoren zeigen, dass der Komplex stabil genug ist, um chemischen Austausch als Ursache auszuschließen, wird die beobachtete Linienverbreiterung wahrscheinlich durch konformative Austausch hervorgerufen, d. h. durch konformative Flexibilität von an DNA gebundenen p53-Resten. Dieser konformative Austausch verschlechterte die Qualität der NMR-Spektren und verhinderte eine detaillierte Strukturanalyse mittels NMR-Spektroskopie. Er bietet jedoch auch zusätzliche experimentelle Hinweise darauf, dass molekulare Flexibilität eine treibende Kraft bei Protein-DNA-Wechselwirkungen ist.^[23, 24] Eine thermodynamische Analyse der Komplexbildung zwischen p53 und DNA könnte weitere Einblicke in die Funktion und Aktivierung von p53 geben.

- [1] P. Chene, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2001**, *11*, 923–935.
- [2] C. Klein, E. Planker, T. Diercks, H. Kessler, K. P. Kunkle, K. Lang, S. Hansen, M. Schwaiger, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 49020–49027.
- [3] E. E. Balint, K. H. Vousden, *Br. J. Cancer* **2001**, *85*, 1813–1823.
- [4] K. H. Vousden, *Cell* **2000**, *103*, 691–694.
- [5] L. A. Donehower, M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, J. S. Butel, A. Bradley, *Nature* **1992**, *356*, 215–221.
- [6] T. Soussi, K. Dehouche, C. Beroud, *Hum. Mutat.* **2000**, *15*, 105–113.
- [7] J. M. Varley, D. G. R. Evans, J. M. Birch, *Br. J. Cancer* **1997**, *76*, 1–14.
- [8] Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, N. P. Pavletich, *Science* **1994**, *265*, 346–355.
- [9] W. S. El-Deiry, S. E. Kern, J. A. Pietenpol, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Nat. Genet.* **1992**, *1*, 45–49.
- [10] A. N. Bullock, J. Henckel, B. S. DeDecker, C. M. Jonhson, P. V. Nikolova, M. R. Proctor, D. P. Lane, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 14338–14432.
- [11] T. R. Hupp, D. W. Meek, C. A. Midgley, D. P. Lane, *Cell* **1992**, *71*, 875–886.
- [12] T. R. Hupp, D. P. Lane, *Curr. Biol.* **1994**, *4*, 865–875.
- [13] G. Selivanova, T. Kawasaki, L. Ryabchenko, K. G. Wiman, *Semin. Cancer Biol.* **1998**, *8*, 369–378.
- [14] A. Ayed, F. A. Mulder, G. S. Yi, Y. Lu, L. E. Kay, C. H. Arrowsmith, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 756–760.
- [15] M. D. Kaeser, R. D. Iggo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 95–100.
- [16] M. E. Anderson, B. Woelker, M. Reed, P. Wang, P. Tegtmeyer, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 6255–6264.
- [17] P. Balagurumoorthy, H. Sakamoto, M. S. Lewis, N. Zambrano, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, E. Appella, H. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8591–8595.
- [18] Y. Wang, J. F. Schwedes, D. Parks, K. Mann, P. Tegtmeyer, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 2157–2165.
- [19] M. P. Foster, D. S. Wuttke, K. R. Clemens, W. Jahnke, I. Radhakrishnan, L. Tennant, M. Raymond, J. Chung, P. E. Wright, *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 51–71.
- [20] P. Chene, *Oncogene* **2001**, *20*, 2611–2617.
- [21] K. G. McLure, P. W. K. Lee, *EMBO J.* **1998**, *17*, 3342–3350.
- [22] J. E. Stenger, P. Tegtmeyer, G. A. Mayr, M. Reed, Y. Wang, P. Wang, P. V. Hough, I. A. Mastrangelo, *EMBO J.* **1994**, *13*, 6011–6020.
- [23] N. Pastor, H. Weinstein, *Theor. Comput. Chem.* **2001**, *9*, 377–407.
- [24] P. G. A. van Tilburg, F. A. A. Mulder, M. M. E. de Backer, M. Nair, E. C. van Heerde, G. Folkers, P. T. van der Saag, Y. Karimi-Nejad, R. Boelens, R. Kaptein, *Biochemistry* **1999**, *38*, 1951–1956.