

**Proteinstrukturen**

DOI: 10.1002/ange.200501887

**Kooperative Bindung von p53 an DNA: Regulation durch Protein-Protein-Wechselwirkung unter Bildung einer doppelten Salzbrücke\*\***

*Alexander Dehner, Christian Klein, Silke Hansen,  
Lin Müller, Johannes Buchner, Manfred Schwaiger und  
Horst Kessler\**

Das Protein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der viele zelluläre Prozesse reguliert und der als wichtiger Tumorsuppressor fungiert.<sup>[1–5]</sup> Es ist in 50 % aller menschlichen Tumoren unter Verlust seiner Funktionen mutiert; die meisten dieser Mutationen finden sich in der DNA-Bindungsdomäne (DBD).<sup>[6,7]</sup> Bisher konnte man zwei Hauptklassen von Mutationen mit einer Funktion korrelieren: 1) Mutationen, die in einen direkten Kontakt mit der DNA involviert sind, und 2) Mutationen, die eine strukturelle Instabilität von p53 zur Folge haben (R249S, G245S, R175H, C242S, V143A).<sup>[8,9]</sup> Beide verursachen das Li-Fraumeni-Syndrom (LFS), das auf erblichen genetischen Mutationen in p53 beruht. LFS ist eine familiär dominant vererbliche Krebserkrankung, die durch eine Reihe von Neoplasmen bei Kindern und jungen Er-

wachsenen charakterisiert ist.<sup>[10]</sup> Einige Mutationen des Li-Fraumeni-Syndroms wie E180X, die in der vorgeschlagenen Dimerisierungsstelle der H1-helicalen Region lokalisiert sind, fallen in keine dieser Kategorien. Der Grund für die beobachteten phänotypischen Krebserkrankungen war bisher unbekannt.<sup>[11]</sup> Hier stellen wir eine Mutationsstudie der solventorientierten Reste in dieser Region vor, die experimentell die Existenz zweier intermolekularer Salzbrücken belegt, die für die kooperative Bindung an DNA essenziell sind. Darüber hinaus lässt sich nun die beobachtete<sup>[12]</sup> fehlende Kooperativität der zur p53-Familie gehörenden Proteine<sup>[13]</sup> p63DBD und p73DBD auf struktureller Basis verstehen.

Das vollständige Protein p53 besteht aus 393 Aminosäuren. Es bindet als Tetramer, Octamer oder höheres Oligomer an DNA, wobei es eine Konsensus-Sequenz von Promotor-DNA erkennt. Derzeit gibt es weder eine Struktur des gesamten p53-Proteins noch eine Struktur des bei der Bindung an die DNA gebildeten p53-Tetramers. Allerdings wird in mehreren Arbeiten die Interdomänen-Kontaktstelle von p53<sup>[8,14–18]</sup> auf der Basis der individuellen Strukturen von p53DBD<sup>[14,17]</sup> und der Tetramerisierungsdomäne<sup>[19–21]</sup> modellhaft diskutiert. Wir konnten zeigen,<sup>[22,23]</sup> dass die DBD kooperativ an kleine ( $2 \times 16$  Nucleotide enthaltende) DNA-Sequenzen als Dimer bindet. NMR-Titrationsexperimente dieser Oligonucleotide mit  $^{15}\text{N}$ -markierter p53DBD ermöglichen es uns, die Protein-Protein-Wechselwirkung zu lokalisieren und eine essenzielle Rolle der kurzen H1-Helix (P177–C182) für die intermolekulare p53DBD-Dimerisierung zu postulieren. Außerdem schlugen wir aufgrund von Symmetrieargumenten ein Modell vor, in dem zwei antiparallele DNA-Stränge im Tetramer gebunden sind, wobei sich die Tetramerisierungsdomäne im C-terminalen Fragment von p53 im Zentrum des Modellkomplexes befindet.<sup>[22]</sup> Allerdings wurde bisher kein experimenteller Nachweis für die Beteiligung der H1-Helix an der Protein-Protein-Wechselwirkung bei der Bindung an die DNA erbracht.

Wir haben nun die mögliche Rolle dieser Reste durch zielgerichtete Mutagenese untersucht und die Fähigkeit der p53DBD-Mutanten, an p53-Konsensus-DNA zu binden, mithilfe von EMSA (electrophoretic mobility shift assay), durch NMR-spektroskopische Diffusionsmessungen und durch Fluoreszenzanisotropie-Messungen analysiert. Folgende „Dimerisierungsmutationen“ wurden durch zielgerichtete Mutagenese eingeführt: H178A, R181A, C182A, E180R, R181E; sowie die doppelte Mutation: E180R/R181E. Darüber hinaus wurden die drei Alanin-Mutationen H178A, R181A und C182A sowie die R181E-Mutation in ein Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionsplasmid eingeführt und die Fusionsproteine aus GST und den p53DBD-Mutanten erhalten. Da GST als künstliche Dimerisierungsdomäne wirkt, kann man annehmen, dass eine verstärkte kooperative DNA-Bindung erfolgt, wie sie bereits bei der p63DBD beobachtet wurde.<sup>[12]</sup>

Neben den strukturell wichtigen, Zink bindenden Resten wie H179<sup>[14]</sup> sind auch diese, zum Lösungsmittel exponierten Reste hoch konserviert und bei unterschiedlichen Spezies meist identisch, wie ein Sequenzvergleich dieser H1-Helix-Region zeigt (Abbildung 1). Eine Überlagerung der  $^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren aller sechs diskutierten Mutanten mit

[\*] Dr. A. Dehner, Dr. L. Müller, Prof. Dr. J. Buchner,  
Prof. Dr. Dr. H. Kessler

Department Chemie  
Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4  
85747 Garching (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-289-13210  
E-mail: Horst.Kessler@ch.tum.de

Dr. C. Klein, Dr. S. Hansen, Dr. M. Schwaiger  
Roche Diagnostics GmbH  
Pharma Research  
Nonnenwald 2  
82372 Penzberg (Deutschland)

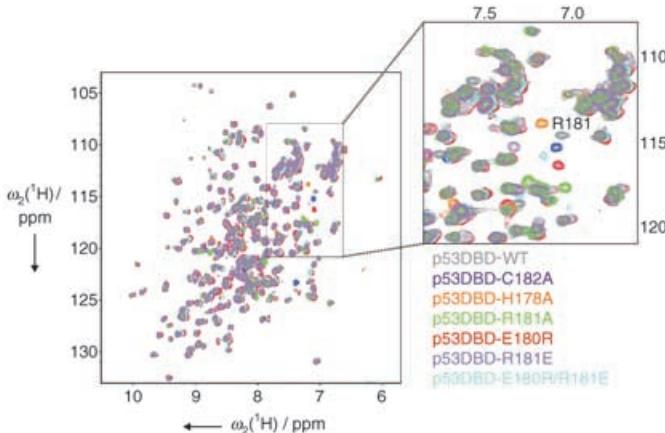
[\*\*] Wir danken K. Bauer, R.-M. Busl-Schuller und R. Schmitt (alle Roche Diagnostics GmbH) und G. Gemmecker (TUM) für Diskussionen sowie A. Mertens, J. P. Hoelck und M. Weidner (alle Roche Diagnostics GmbH) für ihre Unterstützung. Für finanzielle Unterstützung danken wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

H1-Helix	
p53 Mensch	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDS-DGL-AP
p53 Rhesusaffe	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDS-DGL-AP
p53 Makake	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDS-DGL-AP
p53 Gelbgrüne Meerkatze	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDS-DGL-AP
p53 Murmeltier	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDS-DGL-AP
p53 Kaninchen	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDS-DGL-AP
p53 Meerschweinchen	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDS-DGL-AP
p53 Beechey-Erdhörnchen	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDS-DGL-AP
p53 Esel	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDSSDGL-AP
p53 Pferd	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDSSDGL-AP
p53 Hund	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDSSDGL-AP
p53 Katze	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDSSDGL-AP
p53 Maus	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDG-DGL-AP
p53 Ratte	VRRCPHH <sub>H</sub> ERCSDG-DGL-AP
p53 Schwein	VRRCPHH <sub>H</sub> ERSDYS-DGL-AP
p53 Schaf	VRRCPHH <sub>H</sub> ERSDYS-DGL-AP
p53 Rind	VRRCPHH <sub>H</sub> ERSDYS-DGL-AP
p53 Goldhamster	VRRCPHH <sub>H</sub> ERSSEG-DGL-AP
p53 Chinesischer Hamster	VRRCPHH <sub>H</sub> ERSSEG-DGL-AP
p53 Barbe	VRRCPHH <sub>H</sub> ERTPAG-DGL-AP
p53 Huhn	VRRCPHH <sub>H</sub> ERGGGT-DGL-AP
p53 Getüpfelter Gabelwels	VRRCPHH <sub>H</sub> ERSNDSSDGP-AP
p53 Kongo-Kugelfisch	VRRCPHH <sub>H</sub> QNE-DSAEH---
p53 Spiegelkäpfpling	VKRCPHH <sub>H</sub> QSE-TLSN---
p53 Regenbogenforelle	VRRCPHH <sub>H</sub> QSTENNEGP-AP
p53 Afrikanischer Krallenfrosch	VKRCPHH <sub>H</sub> RSVEPGEDA-AP
p73 Mensch	VKRCPHN <sub>H</sub> ELGRIFNEGQSAF
p73 Gelbgrüne Meerkatze	VKRCPHN <sub>H</sub> ELGRIFNEGQSAF
p63 Mensch	VKRCPHN <sub>H</sub> ELSREFNEGQIAF
p63 Maus	VKRCPHN <sub>H</sub> ELSREFNEGQIAF

**Abbildung 1.** Sequenzvergleich der H1-helicalen Region von p53DBD und den H1-helicalen Regionen der homologen p63- und p73DBDs. Aminosäuren, die mit denen von humanem p53 identisch oder ihnen zumindest ähnlich sind, sind grau hinterlegt.

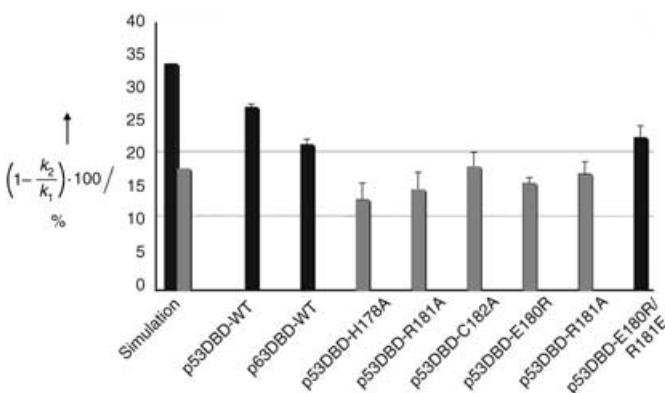
dem Spektrum der p53DBD des Wildtyps (WT) ist in Abbildung 2 zu sehen. Größere Unterschiede findet man lediglich für Signale von Resten in der H1-Helix oder nahe den spezifisch mutierten Resten. Weiter entfernte Reste werden durch die Mutationen kaum oder gar nicht beeinflusst, woraus sich schließen lässt, dass alle „Dimerisierungs-mutanten“ nativ gefaltet sind. Eine Zugabe von 0.5 Äquivalenten des decameren Konsensus-DNA-Oligonucleotids



**Abbildung 2.** Überlagerung eines  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrums von p53DBD-WT (grau) mit den Spektren von sechs mutierten p53DBDs. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt Rest R181 innerhalb der H1-Helix

(CON2x5: 5'-CCTAGACATGCCTAAT-3', durch drei Basen an jeder Seite verlängert) zu U- $^{15}\text{N}$ -markierten p53DBD-„Dimerisierungs-mutanten“ resultierte in veränderten chemischen Verschiebungen und starker Linienverbreiterung im  $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -Korrelationsspektrum. Dies wird durch langsame Austauschprozesse in der Mikro- bis Millisekunden-Zeitskala verursacht, so wie es bereits für den p53DBD-WT-DNA-Komplex beobachtet wurde.<sup>[22,23]</sup> Zugabe von DNase II zu den DNA-Komplexen der p53DBD-„Dimerisierungs-mutanten“ stellte das ursprüngliche p53DBD-Spektrum der entsprechenden Mutante wieder her, was einen Proteinabbau ausschließt.

Der translatorische Diffusionskoeffizient eines Moleküls ist proportional zu seinem effektiven Molekulargewicht und seiner Gestalt<sup>[24]</sup> und ist deshalb ein empfindliches Maß für Änderungen im Gesamt molekül. Die Messung von Diffusionsgeschwindigkeiten bietet daher eine unabhängige Möglichkeit zur Bestimmung intermolekularer Wechselwirkungen.<sup>[25-28]</sup> Wir haben die hydrodynamischen Eigenschaften der p53DBD-„Dimerisierungs-mutanten“ sowie ihre Bindung an DNA durch NMR-Diffusionsexperimente mittels gepulster Feldgradienten untersucht.<sup>[29]</sup> Bei Zugabe des Konsensus-Oligonucleotids zu p53DBD-WT reduziert sich der Diffusionskoeffizient um 27.1% (Abbildung 3). Dies wird durch



**Abbildung 3.** Verringerung der Diffusionskoeffizienten  $k_1$  von p53DBD, p63DBD und den p53DBD-„Dimerisierungs-mutanten“ durch Komplexbildung ( $k_2$ ) mit Konsensus-DNA (CON2x5), bestimmt durch NMR-Diffusionsexperimente mittels gepulster Feldgradienten; schwarz: kooperative DNA-Bindung, grau: unspezifische DNA-Bindung. Eine Simulation der hydrodynamischen Eigenschaften mit einem kooperativen Modellkomplex mit p53DBD:DNA = 2:1 ergibt eine theoretische Verringerung um 33%, während eine einfache Bindung von DNA (PDB-Code: 1TSR, Kette B, inklusive der DNA) zu einer Verringerung von 18% führt.

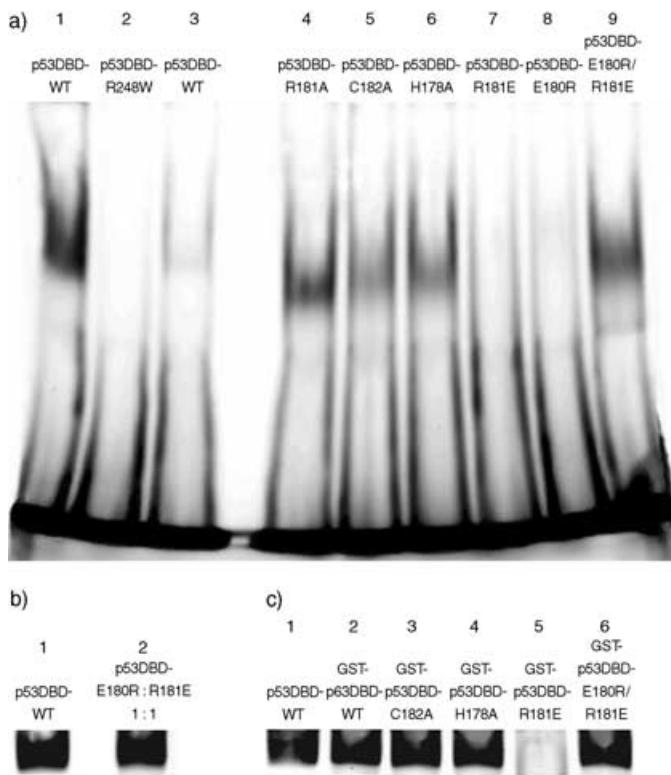
eine kooperative Bindung von zwei p53DBDs an eine decamere Halbseite des Oligonucleotids verursacht. Die experimentell ermittelten Werte sind gut in Einklang mit hydrodynamischen Rechnungen unter Verwendung des Shell-Modells von HYDRONMR<sup>[30]</sup> für einen dimeren p53DBD-DNA-Modellkomplex, wie er von Klein et al.<sup>[22]</sup> beschrieben wurde. Diese resultieren in einer theoretischen Reduktion des Diffusionskoeffizienten um etwa 33%. Es wurden auch hydrodynamische Rechnungen für den monomeren

p53DBD-DNA-Komplex (PDB-Code: 1TSR; Kette B, inklusive der DNA) durchgeführt, die eine Verringerung um 18% durch die Bindung von DNA ergaben. Daher repräsentieren diese beiden theoretischen Werte einen Erwartungsbereich für ein Gleichgewicht zwischen einfacher und vollständig kooperativer DNA-Bindung. Abweichungen von den theoretischen Werten spiegeln eine Ausmittelung höherer und niedriger Oligomere wider.

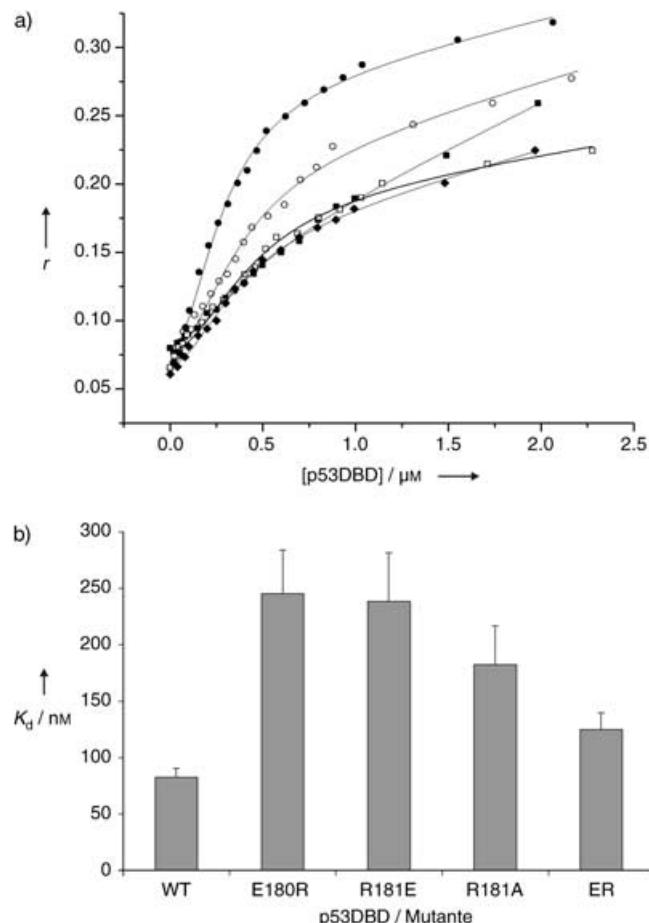
Abbildung 3 zeigt eine Verringerung des Diffusionskoeffizienten durch Zugabe von 0.6 Äquivalenten CON2x5-Oligonucleotid in einem stöchiometrischen Verhältnis von DNA:p53DBD = 1:2 der WT-DBDs von p53, p63 sowie der p53DBD-„Dimerisierungsmutanten“. Wie bereits durch die  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Titration angedeutet, binden alle Mutanten an DNA, was sich in einer Reduktion der Diffusionsgeschwindigkeit um mindestens 13% bemerkbar macht. Allerdings wurden die NMR-Experimente ohne unspezifische Kompetitor-DNA durchgeführt, sodass offen bleibt, ob die Gesamtverringerung der Diffusionskoeffizienten durch unspezifische oder spezifisch kooperative DNA-Bindung verursacht wird. Unter Berücksichtigung der experimentellen Fehlertoleranz können allerdings zwei Klassen unterschieden werden: p53DBD-WT und die p53DBD-E180R/R181E-Doppelmutante zeichnen sich durch eine signifikant höhere Population an oligomeren Zuständen durch Bindung an DNA aus als alle anderen p53DBD-„Dimerisierungsmutanten“ (Abbildung 3). Somit kann man folgern, dass p53DBD-WT und die Doppel-

mutante p53DBD-E180R/R181E eine ähnlich hohe Tendenz zu kooperativer DNA-Bindung aufweisen, eine niedrigere dagegen die Mutanten p53DBD-H178A, p53DBD-R181A, p53DBD-C182A sowie p53DBD-E180R, p53DBD-R181E.

Zur Klärung der Frage nach einer spezifischen oder unspezifischen DNA-Bindung der „Dimerisierungsmutanten“ wurden EMSAs durchgeführt. Nach Inkubation eines fluoreszenzmarkierten, doppelsträngigen Konsensus-Oligonucleotids (CON4x5: 5'-CCTAGACATGCCTAGACAT-GCCTAAAT-3') in Gegenwart von unspezifischer und unmarkierter Kompetitor-DNA bindet p53DBD-WT als Dimer spezifisch an die markierte Konsensus-DNA (Abbildung 4a, Spalte 1). Als Negativkontrolle wurde die p53DBD-Mutante p53DBD-R248W analysiert. p53DBD-R248W ist daher nicht mehr zum Binden von DNA in der Lage,<sup>[9]</sup> was in Abbildung 4a in der zweiten Spalte zu sehen ist. p63DBD kann ebenfalls nicht in signifikantem Ausmaß an markierte Konsensus-DNA binden (Abbildung 4a, Spalte 3); eine konstriuierte Dimerisierung durch ein GST-p63DBD-Fusionspro-



**Abbildung 4.** a) EMSAs von p53DBD-WT, p53DBD-R248W, p63DBD-WT und p53DBD-„Dimerisierungsmutanten“ in Gegenwart einer unspezifischen und unmarkierten pBluescriptII-SK<sup>+</sup>-Kompetitor-DNA. b) 1:1-Mischung von p53DBD-E180R und p53DBD-R181E. c) EMSAs von p53DBD-WT und den GST-Fusionsproteinen.



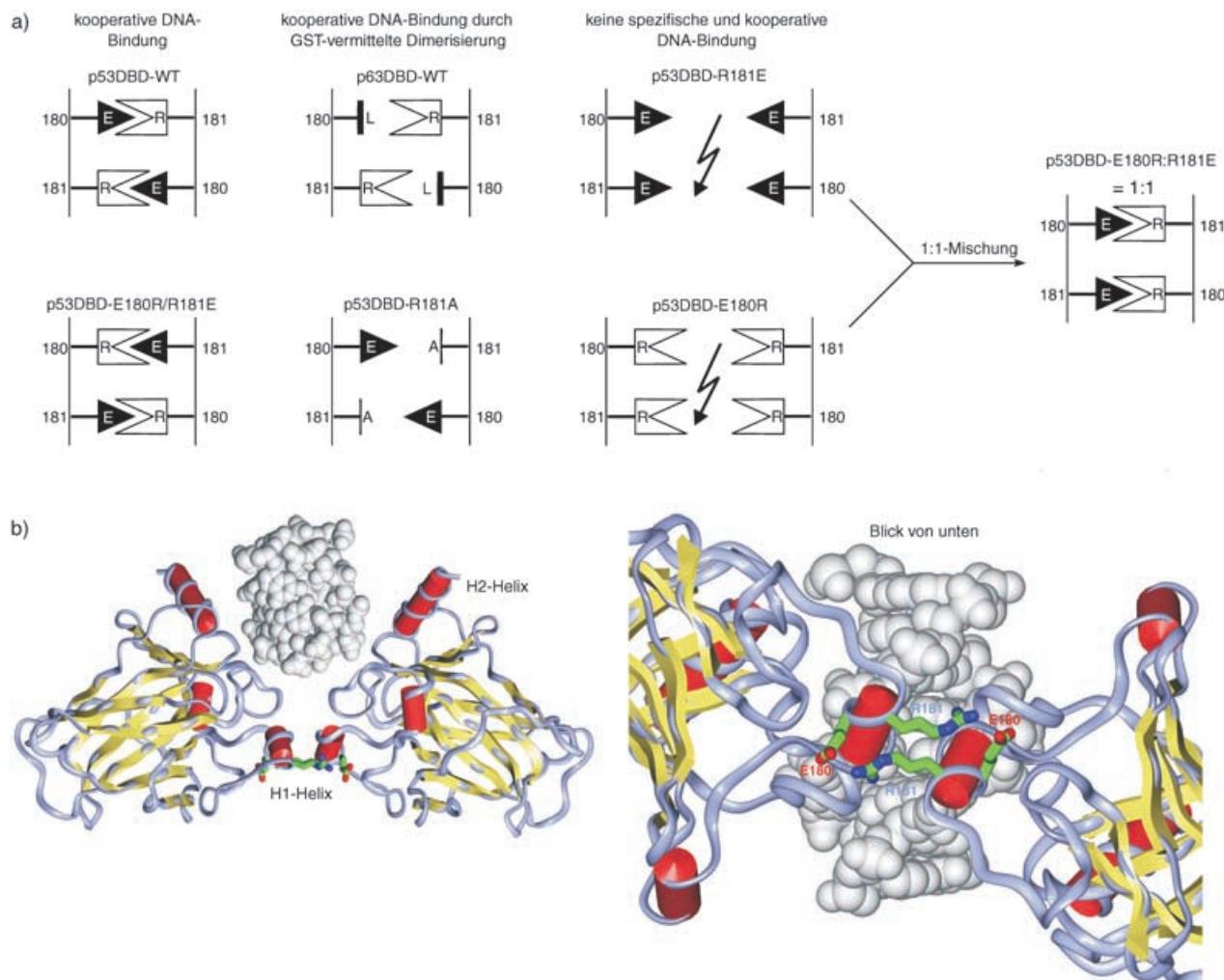
**Abbildung 5.** a) Bindung von doppelsträngiger CON4x5-DNA an p53DBD-WT und die „Dimerisierungsmutanten“, bestimmt über die Fluoreszenzanisotropie  $r$ : ● p53DBD-WT, ○ p53DBD-R181A, □ p53DBD-R181E, ■ p53DBD-E180R, ◆ p53DBD-E180R/R181E. Zur Anpassung an die Daten diente ein kooperatives Modell. b) Dissoziationskonstanten  $K_d$  von p53DBD und den „Dimerisierungsmutanten“, bestimmt aus den Fluoreszenzanisotropie-Daten. ER = p53DBD-E180R/R181E.

tein weist dagegen eine zu p53DBD vergleichbare DNA-Bindungsaffinität auf (Abbildung 4c, Spalte 2).<sup>[12]</sup> Die drei folgenden Spalten (Abbildung 4a, Spalten 4–6) belegen eine gegenüber jener von p53DBD-WT reduzierte DNA-Bindungsaffinität der Alanin-Mutanten p53DBD-R181A, p53DBD-C182A und p53DBD-H178A.

Die einfachen Mutanten p53DBD-R181E und p53DBD-E180R, in denen zwei Arg- bzw. zwei Glu-Reste aufeinander folgen, binden DNA nicht (Abbildung 4a, Spalten 7, 8); ein Austausch der Positionen dieser beiden Reste durch die Doppelmutation E180R/R181E ergibt allerdings wieder eine vergleichbare DNA-Bindungsaffinität wie für p53DBD-WT (Abbildung 4a, Spalte 9). Als Gegenprobe, ob eine Nachbarschaft zweier identisch geladener Aminosäuren in den Mutanten p53DBD-E180R und p53DBD-R181E einen Einfluss auf die strukturelle Integrität der H1-Helix hat und deshalb eine DNA-Bindung verhindert, wurden die beiden Mutanten sowie Konsensus- und Kompetitor-DNA coinkubiert, was die

DNA-Bindungsaffinität durch Heterodimerisierung wieder herstellte (Abbildung 4b). Sowohl der p53DBD-WT als auch die p53DBD-E180R/R181E-Doppelmutanten binden in Gegenwart von Kompetitor-DNA spezifisch und kooperativ an fluoreszenzmarkierte Konsensus-DNA. Daher bestätigen die EMSA-Ergebnisse die NMR-Diffusionsexperimente. Im Unterschied dazu zeigen die einfachen Mutanten p53DBD-E180R und p53DBD-R181E, die jeweils zwei gleichgeladene aufeinander folgende Reste innerhalb des Dimerisierungsbereichs aufweisen, keine spezifische Bindung an Konsensus-DNA (Abbildung 4a, Spalten 7 und 8).

Unter den gleichen Bedingungen wurden zusätzlich EMSAs mit einer Auswahl von GST-p53DBD-Mutanten durchgeführt: Die Alanin-Mutanten p53DBD-H178A, p53DBD-R181A und p53DBD-C182A sowie p53DBD-R181E, in der zwei negativ geladene Reste (E180 und R181E) aufeinander folgen. GST fungiert dabei als künstliche Dimerisierungsdomäne – analog zur Tetramerisierungsdomä-



**Abbildung 6.** a) Schematische Darstellung des Dimerisierungsmusters: Eine kooperative Bindung an DNA wird erhalten bei p53DBD-WT, der Doppelmutante p53DBD-E180R/R181E sowie der 1:1-Mischung von p53DBD-E180R und p53DBD-R181E. Kooperative DNA-Bindung kann bei p53DBD-WT und den Alanin-„Dimerisierungsmutanten“ von p53DBD durch GST-vermittelte Dimerisierung verstärkt werden. Abstoßende Ladungswechselwirkungen verhindern eine kooperative DNA-Bindung bei p53DBD-E180R- und p53DBD-R181E-Mutanten. b) C<sub>2</sub>-symmetrischer Modellkomplex für den identifizierten Dimerisierungsbereich von p53DBD nach kooperativer DNA-Bindung. Der Dimerisierungsbereich ist durch eine doppelte intermolekulare Salzbrücke zwischen den Aminosäuren E180 und R181 eines jeden Monomers stabilisiert.

ne im p53-WT-Gesamtprotein –, was zu einer verstärkten kooperativen und spezifischen DNA-Bindung führt. Als Positivkontrolle wurden in den Spalten 1 und 2 in Abbildung 4c p53DBD und GST-p63DBD aufgetragen, die beide mit ähnlicher Affinität an Konsensus-DNA binden, wohingegen in der freien p63DBD – ohne GST – diese Kooperativität fehlt (Abbildung 4a, Spalte 2).<sup>[12]</sup> Analog zur p63DBD zeigen die drei Ala-Mutanten eine verstärkte kooperative DNA-Bindung durch die dimere GST-Fusionsdomäne, die vergleichbar mit jener des p53DBD-WT ist. Daher lässt sich schließen, dass die Alanin-Mutanten p53DBD-H178A, p53DBD-R181A und p53DBD-C182A eine mögliche Dimerisierung bei der DNA-Bindung nicht aktiv verhindern, was 1) durch eine verbleibende DNA-Bindung gezeigt wird und 2) dadurch, dass diese DNA-Bindung durch GST-vermittelte Dimerisierung verstärkt werden kann. Die GST-p53DBD-R181E-Mutante zeigt jedoch keinerlei spezifische DNA-Bindung; daher kann gefolgert werden, dass der durch die künstliche GST-Dimerisierungsdomäne induzierte kooperative Effekt nicht stark genug ist, um die abstoßenden Ladungswchselwirkungen im Dimerisierungsbereich zu überstreichen. Des Weiteren folgt, dass es keinen anderen Dimerisierungsbereich in der p53DBD gibt, der die intermolekulare E180-R181-Salzbrückenbildung ersetzen könnte.

Für p63DBD wurde die GST-vermittelte Verstärkung der kooperativen DNA-Bindung bereits beobachtet.<sup>[12]</sup> Es wurde allerdings angenommen, dass konformative Unterschiede innerhalb der H1-Helix für das unterschiedliche Dimerisierungsverhalten verantwortlich sind. Mit unseren Ergebnissen lässt sich nun sagen, dass das aliphatische Leucin, das an dem homologen p53DBD-Kodon 180 positioniert ist (Abbildung 1), nicht zum Aufbau einer intermolekularen Salzbrücke in der Lage ist, was das beobachtete Fehlen selektiver und kooperativer DNA-Bindung von freiem p63DBD erklärt (siehe Abbildung 6a).<sup>[12]</sup>

Die Ergebnisse werden durch Fluoreszenzanisotropie-Messungen bestätigt.<sup>[31]</sup> Aus Abbildung 5a ergibt sich die spezifische Affinität von p53DBD-WT und den „Dimerisierungsmutanten“ zu Konsensus-DNA. Eine steigende Konzentration von p53DBD-WT oder den Mutanten wurde zu einem 25 nm fluoreszenzmarkierten CON4x5-Oligonukleotid in 50 nm Kaliumphosphat, 50 mM KCl und 5 mM Dithiothreitol (DTT) gegeben. Für niedrige Konzentrationen von p53DBD oder den Mutanten kann eine einfache kooperative Bindung an CON4x5 angenommen werden (Abbildung 5a). Details zur Kurvenanpassung sind in den Hintergrundinformationen zu finden. Für den p53DBD-WT erhält man eine Dissoziationskonstante von  $K_d = (82 \pm 8)$  nm, die Bindungsaffinität der p53DBD-Mutanten p53DBD-E180R und p53DBD-R181E beträgt mit  $K_d = (245 \pm 38)$  nm bzw.  $(238 \pm 43)$  nm etwa ein Drittel dieses Werts. Die Alanin-Mutante p53DBD-R181A befindet sich mit  $K_d = (182 \pm 34)$  nm auf „halbem Weg“ zwischen dem p53DBD-WT und den p53DBD-E180R- und p53DBD-R181E-Mutanten, was die etwas höhere Bindungsaffinität verständlich macht, die in den EMSAs beobachtet wird. Die Doppelmutante p53DBD-E180R/R181E mit  $K_d = (124 \pm 15)$  nm weist wiederum eine verringerte Dissoziationskonstante auf (Abbildung 5b), ähnlich der des Wildtyps.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass die vorgeschlagene Dimerisierung, durch die eine selektive DNA-Bindung stabilisiert wird, im Wesentlichen durch die Bildung zweier intermolekularer Glu180-Arg181-Salzbrücken verursacht wird (Abbildung 6a). Diese Salzbrücken sind in Einklang mit einem  $C_2$ -symmetrischen Modellkomplex (Abbildung 6b), wie er von Lebrun, Klein et al. vorgeschlagen wurde,<sup>[15,22]</sup> und erklären zugleich das unterschiedliche DNA-Bindungsverhalten von p53DBD und p63DBD. Darüber hinaus machen unsere Ergebnisse die onkogenen Mutationen E180X und R181X des Li-Fraumeni-Syndroms verständlich: Die DNA-Bindung dieser Mutanten ist wegen reduzierter Kooperativität gehindert.

Eingegangen am 31. Mai 2005

Online veröffentlicht am 20. Juli 2005

**Stichwörter:** DNA · Mutagenese · NMR-Spektroskopie · p53 · Proteinstrukturen

- [1] A. J. Levine, *Cell* **1997**, 88, 323.
- [2] P. May, E. May, *Oncogene* **1999**, 18, 7621.
- [3] B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine, *Nature* **2000**, 408, 307.
- [4] K. Vousden, *Br. J. Cancer* **2003**, 88, S7.
- [5] K. H. Vousden, *Cell* **2000**, 103, 691.
- [6] M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, C. C. Harris, *Science* **1991**, 253, 49.
- [7] D. R. Walker, J. P. Bond, R. E. Tarone, C. C. Harris, W. Makowski, M. S. Boguski, M. S. Greenblatt, *Oncogene* **1999**, 18, 211.
- [8] C. H. Arrowsmith, P. Morin, *Oncogene* **1996**, 12, 1379.
- [9] A. N. Bullock, A. R. Fersht, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, 1, 68.
- [10] A. Chompret, *Biochimie* **2002**, 84, 75.
- [11] J. M. Varley, *Hum. Mutat.* **2003**, 21, 313.
- [12] C. Klein, G. Georges, A. P. Künkele, R. Huber, R. A. Engh, S. Hansen, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 37390.
- [13] C. Maisse, P. Guerrieri, G. Melino, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 66, 1555.
- [14] Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, N. P. Pavletich, *Science* **1994**, 265, 346.
- [15] A. Lebrun, R. Lavery, H. Weinstein, *Protein Eng.* **2001**, 14, 233.
- [16] C. Prives, *Cell* **1994**, 78, 543.
- [17] K. H. Zhao, X. M. Chai, K. Johnston, A. Clements, R. Marmorstein, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 12120.
- [18] A. K. Nagaich, V. B. Zhurkin, S. R. Durell, R. L. Jernigan, E. Appella, R. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1875.
- [19] W. T. Lee, T. S. Harvey, Y. Yin, P. Yau, D. Litchfield, C. H. Arrowsmith, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 877.
- [20] P. D. Jeffrey, S. Gorina, N. P. Pavletich, *Science* **1995**, 267, 1498.
- [21] G. M. Clore, J. Ernst, R. Clubb, J. G. Omichinski, W. M. Kennedy, K. Sakaguchi, E. Appella, A. M. Gronenborn, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 321.
- [22] C. Klein, E. Planker, T. Diercks, H. Kessler, K. P. Künkele, K. Lang, S. Hansen, M. Schwaiger, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 49020.
- [23] T. M. Rippin, S. M. V. Freund, D. B. Veprinsev, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **2002**, 319, 351.
- [24] C. R. Cantor, P. R. Schimmel in *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function, Vol. II* (Hrsg.: W. H. Freeman), Freeman, New York, **1980**, S. 570; Y. Cohen, L. Avram, L. Frish, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 524; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 520.
- [25] A. Dehner, E. Planker, G. Gemmecker, Q. B. Broxterman, W. Bisson, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6678.

- [26] T. S. Derrick, E. F. McCord, C. K. Larive, *J. Magn. Reson.* **2002**, *155*, 217.
- [27] A. J. Dingley, J. P. Mackay, B. E. Chapman, M. B. Morris, P. W. Kuchel, B. D. Hambly, G. F. King, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 321.
- [28] A. Dehner, H. Kessler, *ChemBioChem* **2005**, im Druck.
- [29] W. S. Price, *Concepts Magn. Reson.* **1997**, *9*, 299.
- [30] J. Garcia de la Torre, M. L. Huertas, B. Carrasco, *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 138.
- [31] V. LeTilly, C. A. Royer, *Biochemistry* **1993**, *32*, 7753.