

Technische Universität München
Max Planck Institut für Biochemie
Abteilung Strukturbiologie
Biologische NMR Arbeitsgruppe

**Untersuchung
von Protein-Protein Wechselwirkungen von
Zellzyklusproteinen und deren Störung mittels kleiner
organischer Inhibitoren**

Ulli Rothweiler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. Michael Groll

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Luis Moroder
2. Univ.-Prof. Dr. Michael Sattler

Die Dissertation wurde am 13.09.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 05.11.2007 angenommen.

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei
15.02.1564 - 08.01.1642
italienischer Physiker und Astronom

- meiner Familie -

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	7
Danksagung	8
1. EINLEITUNG	9
1.1 Der Zellzyklus	9
1.2. Der Zellzyklus der Eucaryonten	10
1.3. Retinoblastoma Protein	13
1.3.1. Weitere Pocket Proteine	15
1.4. E2F	16
1.5. p53	20
1.6. MDM2	24
1.6.1. Wechselwirkung zwischen MDM2 und p53	24
1.6.2. p53-unabhängige Funktionen	24
1.7. Entwicklung neuer Medikamente	27
1.8. Inhibitoren der MDM2-p53 Interaktion	29
Ziel der Arbeit	34
2. MATERIALIEN	35
2.1. Chemikalien	35
2.2. Enzyme	35
2.3. Protein und DNA Marker	35
2.4. Kits	36
2.5. Bakterien-Stämme	36
2.6. Plasmide	37
2.7. Geräte	37
2.8. Chromatographie	38
2.9. Bakterien-Kultur-Medium	38
2.10. Lösungen	39
2.11. Puffer	40

3. METHODEN	44
3.1. Gentechnische Methoden	44
3.1.1. Plasmidpräparation	44
3.1.2. Ethanolfällung	44
3.1.3. Agarosegelelektrophorese	45
3.1.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen	46
3.1.5. Konzentrationsbestimmung von DNA	46
3.1.6. Klonierung	46
3.1.7. Klonierung mit LIC	47
3.1.8. Polymerase-Kettenreaktion	48
3.1.9. Entwurf der Primer	49
3.1.10. Mutagenese	50
3.1.11. Sequenzierung	52
3.2. Proteinpräparation	53
3.2.1. Kompetente Bakterien	53
3.2.2. Transformation	53
3.2.3. Bakterienkultivierung	53
3.2.4. Zellaufschluss	54
3.2.5. Affinitäts-Chromatographie	54
3.2.5.1. Glutathion Sepharose FF	54
3.2.5.2. Ni-NTA	55
3.2.5.3. Heparin Säule	55
3.2.6. Gelpermeations-Chromatographie	56
3.2.7. Hydrophobe Interaktions Chromatographie	56
3.2.8. Konzentrierung der Proteinlösungen	57
3.3. Analytik	58
3.3.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	58
3.3.2. SDS Gelelektrophorese	58
3.3.3. NMR Spektroskopie	59
3.3.3.1. 1D-Experiment	59
3.3.3.2. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie; das HSQC-Experiment	60
3.3.3.3. Bindungsstudien mit HSQC Experimenten	61

3.3.4. Isothermale Titrations Calorimetrie (ITC)	63
3.3.4.1. Aufbau der Messung	63
3.3.5. Edman - Abbau	64
3.3.6. Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie	65
4. ERGEBNISSE	66
4.1. Proteinexpression	66
4.1.1. E2F1	67
4.1.2. DP1	70
4.1.3. SKP2	71
4.1.4. pRB	72
4.1.4.1 pRB-E2F1 Fusionskonstrukt	74
4.1.5. p53	76
4.1.6. MDM2	80
4.1.7. MDMX	82
4.1.8. p27 ^{KIP1}	83
4.1.9. CDK2/Cyclin A	85
4.1.10. Nucleostemin	86
4.2. Interaktionsstudien	87
4.2.1. E2F1 und pRB	87
4.2.2. E2F1 und p53	87
4.2.3. CDK2/Cyclin A mit pRB und p27	88
4.2.4. p53 und MDM2	93
4.2.4.1. ITC-Experimente	93
4.2.4.2. Gelfiltrations-Experimente	95
4.2.4.3. NMR-Experimente	98
4.2.4.4. ITC-Experimente mit Inhibitoren	110
4.2.5. 1D NMR Titration mit MDM2 Tryptophan-Mutanten	112
4.2.6. 1D NMR Titration mit CDK2 Tryptophan-Mutanten	117
4.2.7. p53 und MDMX	119

4.3. Kristallisation	123
4.3.1. E2F1-DP1-DNA	123
4.3.2. MDM2 mit NXN-6/ MDM2 mit NXN-7	123
4.3.3. Kristallstruktur von Zebrafisch MDMX mit humanen p53 Peptid	123
5. DISKUSSION	127
6. ZUSAMMENFASSUNG	134
7. LITERATUR	137
Abkürzungsverzeichnis	152
Glossar	153
Aminosäuresequenzen	154
Sequenzalignment	157
Primersequenzen	158

PUBLIKATIONEN

D'Silva L, Ozdowy P, Krajewski M, **Rothweiler U**, Singh M, Holak TA (2005) Monitoring the effects of antagonists on protein-protein interactions with NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13220-132206.

Krajewski M, Ozdowy P, D'Silva L, **Rothweiler U**, Holak TA (2005) NMR indicates that the small molecule RITA does not block p53-MDM2 binding in vitro. *Nature Med.* **11**, 1135-1136.

Krajewski M, **Rothweiler U**, Majumdar S, D'Silva L, Klein C, Holak TA (2007) An NMR-based antagonist induced dissociation assay for targeting the ligand-protein and protein-protein interactions in competition binding experiments. *J. Med. Chem.* **50**, 4382-4387.

Popowicz G, Czarna A, **Rothweiler U**, Krajewski M, Holak, TA (2007) Molecular basis for the inhibition of p53 by Mdmx. *Cell Cycle* **6**, 2386-2392.

Rothweiler U, Czarna A., Popowicz G, Weber L, Holak, TA (2007) NMR Screening for lead compounds using tryptophan-mutated proteins. (submitted).

Rothweiler U, Krajewski M, Weber L, Holak, TA (2007) NMR characterisation of the new class of isochinoline based inhibitors of the MDM2-p53 interaction. (manuscript in preparation).

DANKE!

Die Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in der Abteilung für Strukturforschung bei Prof. Dr. Robert Huber angefertigt. Ich möchte mich ganz herzlich bei ihm für die Möglichkeit bedanken, in seiner Abteilung die Doktorarbeit schreiben zu dürfen.

Ich möchte mich besonders bei Dr. Tad Holak bedanken für das anspruchsvolle und herausfordernde Thema der Arbeit und die fruchtbaren Diskussionen in den letzten drei Jahren.

Bedanken möchte ich mich auch ganz besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Luis Moroder.

Des Weiteren gilt mein Dank den Kollegen und Freunden aus Indien und aus Polen: Mahavir Singh, Ania Czarna, Loyola D'Silva, Joma Joy, Marcin Krajewski, Sudipta Majumdar, Aleksandra Mikołajka, Przemyslaw Ozdowy, Grzegorz Popowicz, Tomasz Sitar, Kinga Brongel, Madhumita Ghosh, Aleksandra Szwagierczak, Anna Ducka und meinen Sokrates Studentinnen Jolanta Ciombor und Julia Kowal für die schöne und interessante Arbeitszeit im Labor.

Besonderer Dank gilt Dr. Mahavir Singh, Jolanta Ciombor und Ania Czarna für die kollegiale Atmosphäre und für die ertragreichen Diskussion bei einer Tasse Kaffee.

Ich möchte mich auch bei Frau Elisabeth Weyher-Stingl (Lissy) bedanken für die Durchführung der vielen Massenspektrometrie Experimente sowie für Rat und Hilfe bei den ITC Experimenten.

Am meisten möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützten und mir mein Studium erst ermöglichten. Dies gilt besonders für meine Mutter, die leider zu früh verstorben ist und die Beendigung der Doktorarbeit nicht mehr erleben durfte.

1. EINLEITUNG

1.1. Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist die Basis allen Lebens. Entstanden vor Milliarden von Jahren ist er die Grundlage für die Weitergabe der genetischen Information an nachfolgende Generationen. Alle Zellen vermehren sich durch Zellteilung, deren Prozess durch den Zellzyklus reguliert wird. Zu Beginn der Forschung über den Zellzyklus beschränkte sich die Beobachtung auf die im Lichtmikroskop sichtbaren Ereignisse der Mitose. Mit dem Fortschreiten der Erkenntnisse über die Zellteilung wurde die Interphase immer wichtiger. In ihr laufen die wesentlichen Prozesse ab, die für eine erfolgreiche Zellteilung unerlässlich sind. Ereignisse wie die Replikation und Aufteilung der Chromosomen sind für alle Zellen, Prokaryonten wie Eukaryonten, identisch und gehen der Zellteilung voraus. Da eine neue Zelle, mit wenigen Ausnahmen, ein komplettes Genom zum Überleben erhalten muss, ist eine präzise Verdopplung entscheidend für die Integrität des Genoms. Mit der Aufklärung der Struktur der DNA durch Watson und Crick im Jahre 1953 konnte das Problem der präzisen Verdopplung der DNA beantwortet werden. Zur gleichen Zeit konnte durch Autoradiographie (Howard und Pelc, 1953) und Microspektrophotometrie (Swift, 1950) gezeigt werden, dass die Replikation der DNA in einem Zeitabschnitt der Interphase stattfindet, der S-Phase (S = Synthese) genannt wurde. Diese Erkenntnisse führten zu der heutigen Einteilung des Zellzyklus in eine S- und M- (Mitose) Phase mit einer Lücke (Gap) vor der S-Phase G1 und nach der S-Phase G2 (Mitchison, 1971). In einigen schnellwachsenden Prokaryonten kann die Duplikation und die Trennung der Chromosomen zeitlich überlappen. Die Entdeckung der S-Phase führte zu zwei wichtigen Fragen des Zellzyklus: Wie funktioniert die DNA-Replikations-Maschinerie, und wie wird der Beginn der S-Phase während des Zellzyklus gesteuert? Kontrollmechanismen steuern während des Zellzyklus die korrekte Abfolge von Ereignissen, die Abstimmung auf das Zellwachstum und die Korrektur von Fehlern während des Zellzyklus. Spätere Prozesse sind oft abhängig von einem vollständigen Abschluss früherer Prozesse, zum Beispiel über sequenziellen Substrat-Produkt-Beziehungen wie sie in Stoffwechselwegen gefunden werden, die eine wichtige Rolle bei gezielten molekularen Interaktionen wie der Bildung des DNA Replikations Komplexes spielen. Fehler in diesem Prozess führen dazu, dass das Produkt fehlt, welches als Substrat im nächsten Schritt benötigt wird. Eine Abhängigkeit kann ebenso über eine Signal abhängige Kontrolle erfolgen, damit können Ereignisse nicht nur zeitlich sondern auch räumlich aufeinander abgestimmt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Beobachtung, dass durch die Verringerung der Nucleotid

Konzentration in der S-Phase die zeitlich spätere und von der Replikation unabhängige Mitose blockiert wird. Für die Blockade sind Proteine verantwortlich, die über Signal-Transduktionswege den Effektoren der Mitose mitteilen, dass die S-Phase noch nicht abgeschlossen ist. Diese Idee führte später zu dem Konzept der Checkpoint Kontrolle (Pardee 1974, 1989; Hartwell und Weinert, 1989). An bestimmten Punkten, den Checkpoints, überprüft die Zelle, ob frühere Ereignisse wie zum Beispiel die S-Phase abgeschlossen sind, bevor mit späteren Prozessen wie zum Beispiel der Mitose vorangegangen wird. Das Checkpoint Konzept erklärt auch die Tatsache, dass die Mitose bei DNA Schäden solange blockiert wird, bis die Zelle die Schäden repariert hat. Dies ist notwendig um die Weitergabe von Fehlern oder unvollständiger DNA an die nächste Generation zu verhindern (Lehrbücher: Knippers 2001, Alberts et al. 2004).

1.2. Der Zellzyklus der Eucaryonten

Der Zellzyklus der Wirbeltiere wird wie bereits oben erwähnt in vier Phasen eingeteilt: G1, S, G2 und M. Die beiden Lücken G1 und G2 gehen der DNA-Synthese und Replikation (S-Phase) beziehungsweise der Zellteilung Mitose voraus. In der späten G1-Phase durchläuft die Zelle einen sogenannten Restriktions Punkt. Dies ist der Punkt, an dem Zellen in die S-Phase eintreten und einen kompletten Zellzyklus vollenden. Zellen, die den Restriktionspunkt überwunden haben, müssen den Zellzyklus beenden oder alternativ einen programmierten Zelltod erleiden. Davor kann der Zellzyklus jederzeit abgebrochen werden und die Zelle in eine sogenannte G0-Phase übergehen. Die Bedeutung des Restriktionspunktes zeigt sich auch dadurch, dass die weiteren Ereignisse der Zelle unabhängig von äußeren Signalen und Wachstumsfaktoren werden. Der Durchgang durch den Restriktionspunkt wird durch die sequenzielle Aktivierung und Inaktivierung von G1-Cyclin-abhängigen-Kinasen (CDK = *cycline dependent kinase*) koordiniert. Die Aktivität der CDKs wird durch die zeitabhängige Synthese und Bindung von spezifischen Untereinheiten den Cyclinen, durch die Assoziation und Dissoziation von CDK-Inhibitoren (CKI) und eine Reihe von aktivierenden und reprimierenden Phosphorylierungen gesteuert (Bild 1).

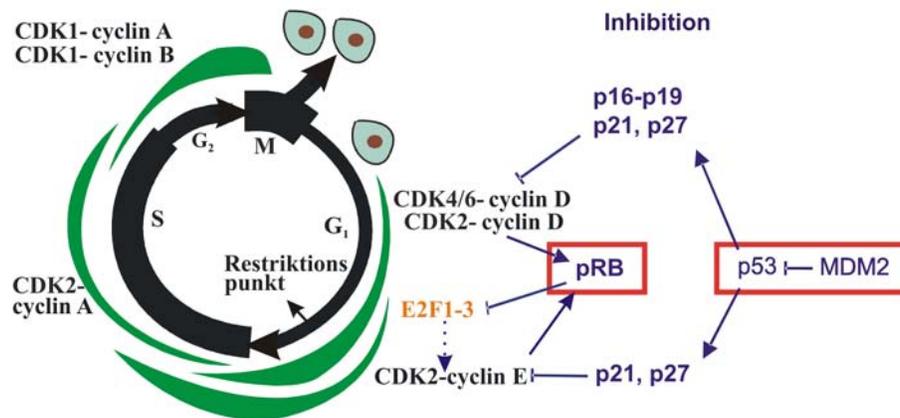


Bild 1 Schematische Darstellung des Zellzyklus. Die verschiedenen CDKs and Cycline werden zeitlich gesteuert exprimiert und bewirken somit ein Voranschreiten des Zellzyklus. pRB ist ein zentraler Regulator für die Überwindung des Restriktionspunktes in der späten G1 Phase. Durch die Hyperphosphorylierung von pRB durch CDK4/6 Cyclin D und CDK2/Cyclin D wird die Inhibition der aktivierenden E2Fs (1-3) aufgehoben und die Synthese von Proteinen für die DNA Replikation eingeleitet. Zusätzlich aktiviert E2F(1-3) auch die Transkription von Cyclin E, wodurch ein *feedback loop* entsteht, welcher die Phosphorylierung von pRB und damit die Freisetzung von E2F(1-3) beschleunigt. p53 wirkt als „Wächter des Genoms“ und reagiert auf zelluläre Stressfaktoren. Dadurch wird die Expression von CDK Inhibitoren (p21, p27 etc.) induziert, die den Fortgang des Zellzyklus unterbrechen. p53 wird negativ durch MDM2 reguliert. pRB, p53 und MDM2 werden im Text weiter unten genauer beschrieben.

Die CDKs sind Phosphoproteine mit einer Größe von ca. 34-40 kDa und gehören zur Familie der Serin/Threonin Kinasen. Für ihre biologische Funktion müssen CDKs mit ihren zugehörigen Cyclinen assoziiert sein, die auch für die Spezifität mitverantwortlich sind. Neben der Steuerung des Zellzyklus in der G1 Phase spielen die CDKs und die zugehörigen Cycline eine entscheidende Rolle während des gesamten Zellzyklus

Tabelle 1 Funktionen der verschiedenen CDK/Cyclin Komplexe (Singh, 2006)

CDK	Cyclin	Funktion
CDK1,CDK2	A	Übergang in die S-Phase
CDK1	B1,B2	G2 Ausgang und Mitose
CDK8	C	transcriptionelle Regulation, G0-S Phase Übergang
CDK4,CDK6	D1,D2,D3	G0-S Phase Übergang
CDK2	E	G1-S Phase Übergang
unbekannt	F	G2-M Phase Übergang
CDK5	G1,G2	Antwort auf DNA Schäden
CDK7	H	CDK Aktivierung, transcriptionelle Regulation, DNA Reperatur
unbekannt	I	unbekannt
unbekannt	K	CDK Aktivierung, transcriptionelle Regulation
CDK9	T1,T2	transcriptionelle Regulation

Eine wichtige Kontrolle der Aktivität der CDKs ist neben der zeitlich gesteuerten Transkription die Inhibition der CDKs durch CDK Inhibitoren (CKI). CKI sind wichtige Ausgangspunkte, die den Stop des Zellzyklus zum Ziel haben. Die CKI sind Proteine, die reversibel an CDK oder CDK/Cyclin Komplexe binden und dadurch die Aktivität der CDKs unterbinden. Die CKIs werden je nach Spezifität und Zeitpunkt ihres Wirkens in zwei Familien unterteilt: INK4 und Kip/Cip.

Die INK4 Proteine (inhibiert CDK4) gehören zu einer Familie von Inhibitoren, die speziell Cyclin D abhängige CDKs inhibieren. Sie binden bevorzugt an CDK4 und CDK6 und verhindern dadurch dass diese CDKs durch die G1 Phasen Cycline D1-D3 aktiviert werden. Bisher sind vier Mitglieder dieser Familie bekannt: p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, und p19INK4d (Sherr et al., 1995; Ruas et al., 1998). Als gemeinsames Strukturmotiv haben diese Proteine wiederholende Ankyrin-Motive.

Zur Kip/Cip Familie gehören die Proteine p21Cip1, p27Kip1 und p57Kip2 (el-Deiry et al., 1993; Harper 1993; Polyak et al., 1994; Toyoshima et al., 1994; Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995). Die Proteine dieser Familie binden an verschiedene Cyclin-beladene CDKs und unterbinden die katalytische Aktivität der Kinase. Die Wechselwirkung findet sowohl mit der Kinase als auch mit dem gebundenen Cyclin statt. Die Proteine sind sich in der N-terminalen Domäne sehr ähnlich (44% Identität) und diese Domäne ist ausreichend für eine Inhibierung der CDK/Cyclin Aktivität.

Neben den CDKs und Cyclinen, die wie ein Uhrwerk den Durchgang der Zelle durch den Zellzyklus steuern, gibt es weitere Proteine, die auf innere oder äußere Faktoren reagieren und auf diese Weise Einfluss auf den Fortgang des Zellzyklus haben. Die wichtigsten und am intensivsten untersuchten Proteine sind das Retinoblastoma-Protein (pRB) und der Transkriptionsfaktor p53. pRB verknüpft den Zellzyklus mit der Transkription der für den Zellzyklus erforderlichen Proteine und spielt eine entscheidende Rolle bei der Überwindung des Restriktionspunktes in der späten G1-Phase. p53 reagiert dagegen auf Schäden in der DNA und unterbricht den Zellzyklus für eine Reparatur oder veranlasst den programmierten Zelltod, die Apoptose. Störungen im Ablauf eines oder beider Kontrollmechanismen sind verantwortlich für nahezu alle menschlichen Tumore. (Review: Sherr, 1996; Sherr, 2000-2001; Sandal, 2002; Vogelstein und Kinzler, 2004). Wegen ihre Aufgabe, die Weitergabe von Beschädigter DNA in die nächste Generation von Zellen zu verhindern, werden diese Proteine auch als Tumorsupressor Proteine bezeichnet.

1.3. Retinoblastoma Protein

Das Retinoblastoma-Gen war der erste Tumorsuppressor der kloniert wurde (Friends et al., 1986). Das Protein pRB ist ein 928 Aminosäuren großes Protein, das an vielen zellularen Prozessen beteiligt ist, unter anderem der Regulation des Zellzyklus, der zellularen Antwort auf DNA-Schäden, DNA-Reparatur, Schutz gegen Apoptose und Differenzierung. All diese Prozesse tragen zu seiner Funktion als Tumorsuppressor-Protein bei (Knudsen et al., 1998; Wang et al., 1994).

pRB und die beiden verwandten Proteine: p107, und p130, die zusammen die Familie der *pocket*-Proteine bilden, sind zentrale Spieler im Genregulations Netzwerk. Sie reagieren auf antimitotische Signale und die Deregulation dieser Proteine ist ein zentrales Ereignis in der Entstehung von Krebs (Hanahan und Weinberg, 2000; Cobrinik, 2005). Der Mechanismus wie pRB als Tumorsuppressor-Protein agiert, ist noch nicht vollständig verstanden aber pRB kontrolliert und steuert den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus. pRB ist zudem Angriffsziel vieler viraler Onkoproteine, die von DNA-Tumor-Viren exprimiert werden, was nahe legt, dass das Protein wichtig für die Zellproliferation ist. Die Entdeckung, dass Zellen mit einer Überexpression von pRB in der G1-Phase arretiert werden und dass Zellen mit einem Defizit an pRB einen beschleunigten G1-S Übergang haben, ist ein weiterer Hinweis für die Funktion von pRB als ein Zellproliferations-Inhibitor.

Die Idee des G1-S *checkpoints* wurde erstmals von A. Pardee (1974,1989) formuliert und bezeichnet einen Restriktionspunkt in der späten G1 Phase, ab der die Zellen, unabhängig von äußeren Wachstumssignalen, in die S-Phase übergehen müssen (Herwig und Strauss, 1997; Weinberg, 1995). Eine aktive hypophosphorylierte Form von pRB arretiert die Zellen in einer frühen G1 Phase, wohingegen die inaktive Form, eine hyperphosphorylierte Form von pRB, der Zelle erlaubt, den G1-S Restriktionspunkt zu passieren. Es zeigte sich, dass für diesen Schritt, D-Typ-Cycline, die zugehörigen Kinasen CDK4/CDK6 sowie einige CKI eine Schlüsselstellung einnehmen. Der Fortgang der G1 Phase benötigt die Expression von Cyclin D, die durch mitotische Signale voran getrieben wird. Werden die mitotischen Signale entfernt, fällt auch die Konzentration an Cyclin D in der Zelle rapide ab und es kommt zu einer Arretierung der Zelle in der G1-Phase. Daneben kann auch durch die INK4a Inhibitor Familie eine Arretierung in der G1-Phase ausgelöst werden. Das entscheidende Substrat für CDK4/CDK6 Cyclin D ist das Protein pRB, welches eine Schlüsselstellung einnimmt. (Goodrich und Lee, 1993; Hatakeyama et al., 1994; Lukas et al., 1994; Mittnacht et al., 1994; Sherr, 1994). pRB inaktiviert eine Reihe von regulatorischen Proteinen, die die Zellteilung

vorantreiben (Weinberg, 1995), darunter die weiter unten beschriebene Familie der E2Fs. Die Zellteilungshemmende Wirkung hat pRB in seiner hypophosphorylierten Form, in der pRB während der G0- und frühen G1-Phase vorliegt. In dieser Form bindet pRB an E2F und inhibiert dadurch den Transkriptionsfaktor. Während des Voranschreitens des Zellzyklus kommt es zu einer Phosphorylierung von pRB durch CDK4/6 Cyclin D. Die hyperphosphorylierte Form von pRB kann die E2Fs nicht länger binden (Buchkovich et al., 1989; Chen et al., 1989; DeCaprio et al., 1989; Ludlow et al., 1990; Mihara et al., 1989) und die E2Fs sorgen für die Transkription von Proteinen, die unter anderem für die DNA Synthese benötigt werden. Daneben sorgt E2F auch für die Transkription von Cyclin E. Die Expression von Cyclin E führt zu einem positiven *feedback loop* der pRB Phosphorylierung. Cyclin E aktiviert CDK2 und der CDK2/Cyclin E Komplex fährt mit der Phosphorylierung von pRB fort, was zu einem irreversiblen Übergang in die S-Phase des Zellzyklus führt, auch wenn mitogene Signale bereits abgeschaltet worden sein sollten.

Eine weiterer Mechanismus zur Aktivierung von CDK2 führt über den CDK4/6 Cyclin D Komplex. Dieser kann an WAF1/KIP Inhibitoren binden ohne dass die Kinaseaktivität verloren geht. Dadurch werden diese Inhibitoren abgefangen und können den CDK2/Cyclin E Komplex nicht länger inhibieren. Kip1 wird sogar von CDK2 und weiteren bisher unbekannt Kinasen phosphoryliert und dadurch für den Abbau im Proteasom markiert. Die Aktivität von CDK2 während des G1-S Übergangs wird hauptsächlich durch die An- und Abwesenheit von Cyclin E beeinflusst und es gibt eine spezifische Ubiquitin Ligase für Cyclin E (Malumbres und Barbacid, 2001).

Die Repressorfunktion von pRB beruht auf zwei Mechanismen. Zum einen bindet pRB im hypophosphorylierten Zustand direkt an die Transaktivierungsdomäne von E2F und blockiert dadurch, wie bereits oben beschrieben, die Aktivität von E2F. Zum zweiten kann pRB auch aktiv die Transkription reprimieren durch die Rekrutierung von Chromatin modifizierenden Enzymen, darunter die HDACs (Histon Deacetylasen) und SWI/SNF Komplex. Diese Enzyme führen zu einer Kondensation des Chromatins und als Folge zu einer Inhibierung der Transkription (Harbour und Dean, 2000; Muchardt und Yaniv, 1999; Muchardt und Yaniv, 2001). Ob die Rekrutierung direkt oder indirekt durch pRB erfolgt, ist noch nicht abschließend geklärt.

Das klassische Modell des Eintritts, Durchgangs und Ausgangs aus der G1 Phase im Säugetier-Zellzyklus ist eine Antwort auf extrazelluläre mitotische Signale und wird durch CDKs und D-Typ und E-Typ Cycline, wie oben beschrieben, reguliert. Seit Jahrzehnten haben Forschungen diese Sichtweise untermauert und gezeigt, dass die CDK/Cyclin

Komplexe wichtig, sogar essentiell für diesen Prozess sind. Neue Studien mit zerstörten Genen aller drei D-Typ Cycline, den zwei E-Typ Cyclinen, sowie der Cyclin D abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 oder der Cyclin E abhängigen Kinase CDK2 in der Keimbahn der Maus zeigten, dass die Entwicklung des Fötus annähernd normal abläuft, was bedeutet, dass keines der Gene limitierend für den Zellzyklus ist. Inwieweit das bestehende Dogma überarbeitet werden muss, und wie die neuen Forschungsergebnisse die Arbeiten der vergangenen Jahre neu zubeurteilen, wird sich zeigen (Review: Sherr und Roberts, 2004).

Retinoblastoma ist eine Krebserkrankung des Auges von Kindern, die zuerst 1951 beschrieben wurde. Es trat sporadisch bei einigen Patienten auf, bei anderen wurde sie vererbt. (Neel und Falls, 1951). Später erkannte man, dass pRB in vielen Krebsarten mutiert vorlag, darunter beim *small-cell* Lungen-Carcinom und Osteosarcoma, *Cervical* Carcinom, Prostata-Carcinom, Brust-Carcinom, und einige Formen von Leukemie (Horowitz et al., 1989; Onadim, 1992; Sellers und Kaelin, 1997; Yandell, 1989). Man nimmt heute an, dass der pRB Stoffwechselweg zusammen mit dem p53 Tumorsupressor in fast allen Krebsarten inaktiviert ist. Zudem sind auch viele der Regulatoren des pRB Stoffwechselweges in Krebszellen mutiert und gestört, darunter zum Beispiel eine Überexpression von Cyclinen (besonders D und E1), den CDKs (besonders CDK4 und CDK6), sowie ein Funktionsverlust von CDK Inhibitoren. Der häufige Verlust der G1-Regulation in Krebszellen hat die Anstrengung beflügelt, spezifische Medikamente zu entwickeln, die den Restriktionspunkt wieder reaktivieren und es den Zellen erlaubt, in eine G0-Phase überzugehen. Viele dieser Medikamente zielten auf eine Inhibierung von CDKs ab. Welches die beste Strategie sein wird und wie das Ziel der Rückgewinnung der G1 Kontrolle erreicht werden kann bedarf noch weiterer Forschungen. (Malumbres und Barbacid, 2001).

1.3.1. Weitere *Pocket* Proteine

Neben pRB gibt es noch zwei weitere Mitglieder der *Pocket* Protein Familie: p107 und p130. Sie spielen alle eine wichtige Rolle in der Regulation der E2F abhängigen Transkription und beim G1-S Übergang. Das pRB-Gen ist auf Chromosom 13q14, die Gene für p107 und p130 auf Chromosom 20q11.2 bzw. 16q12.2 lokalisiert. (Baldi et al., 1996; Claudio et al., 2002; Classon und Dyson, 2001; Ewen et al., 1991; Hong et al., 1989). Die primäre Aminosäuresequenz ist auch außerhalb der *Pocket*-Domäne sehr homolog, jedoch sind die Ähnlichkeiten zwischen p107 und p130 größer. Zudem haben p107 und p130 eine Cyclin A/E Bindungsstelle in der Linker-Region zwischen der A- und B- Domäne. Alle drei Proteine

können mit viralen Onkoproteinen wie HPV E/ SV 40 *large* T-Antigen oder dem Adenovirusprotein E1A interagieren. Die Bindung erfolgt an die B-Domäne der *Pocket* Proteine und wird von einem LXCXE Motiv in den viralen Proteinen vermittelt. Interessanterweise sind die Proteine p107 und p130 seltener in Tumoren mutiert.

1.4. E2F

Der E2F Transkriptionsfaktor wurde zuerst aufgrund seiner Eigenschaft, an den adenoviralen E2A Promotor zu binden, entdeckt (Kovesdi et al., 1986). Daher der Name E2F *early gene 2 factor*. Die Konsensus Bindungsstelle für E2F ist „TTTCGCGC“. Diese kommt neben dem E2A Promotor des Adenovirus in vielen Promotoren der zellulären Gene vor, die für die Zellteilung aber auch für die Apoptose benötigt werden. Anfängliche Experimente zeigten, dass das virale Protein E1A die Fähigkeit besitzt E2F, aus seinem natürlichen Komplex mit dem Retinoblastoma-Protein pRB zu verdrängen (Bagchi et al., 1990). Das Gleiche gilt für das E7 Onkoprotein des Papillomavirus und das *large* T Onkoprotein des SV40 Virus (Whyte et al., 1988; Munger et al., 1989; Dyson et al., 1989; DeCaprio et al., 1988) E2F kontrolliert eine Reihe von Proteinen, die allesamt mit dem Zellzyklus und dem seinem Fortschreiten in Zusammenhang stehen wie z.B. Cyclin E, Dihydrofolat Reduktase (DHFR) (benötigt für die DNA Synthese) oder Cdc6, ein Bestandteil des Prereplikations-Komplexes (Lavia et al., 1999). Zudem werden auch eine Reihe von Genen kontrolliert, die für die Apoptose verantwortlich sind, darunter *Protease activating factor 1* (Apaf1), p73 und ARF.

Die E2F Familie umfasst eine Reihe von eng verwandten Mitgliedern. Darunter sind acht E2F Mitglieder (E2F1-E2F8), die mit zwei Bindungspartnern DP1 und DP2 einen heterodimeren Komplex bilden. DP3 ist eine Splice-Variante von DP2 (Ormondroyd et al., 1995). Die Komplexität der E2F Aktivität wird durch die Bildung verschiedener heterodimerer Komplexe erreicht, wobei die einzelnen Mitglieder verschiedene Aufgaben beim zellulären Wachstum haben. *In vivo* existieren alle möglichen Kombinationen von E2F(1-6) mit DP1 bzw. DP2. Die ersten sechs E2F Mitglieder haben konservierte DNA Bindungsdomänen, Dimerisierungsdomänen und bis auf E2F6 eine C-terminale Sequenz für die Transaktivierung und pRB Bindung. E2F6 fehlt diese C-terminale Domäne und scheint ein negativer Regulator für E2F abhängige Transkription zu sein. E2F7 und E2F8 haben mit den anderen Mitgliedern nur die DNA Bindungsdomäne gemein.

Die Familie der E2F teilt sich in drei verschiedenen Gruppen auf. E2F1, E2F2 und E2F3 sind starke transkriptionelle Aktivatoren. E2F4 und E2F5 sind in erster Line für eine aktive Repression der Transkription zuständig. Schließlich E2F6, das als ein *Pocket* Protein unabhängiger Repressor fungiert (Review: Trimarchi und Lees, 2002). E2F7 und E2F8 wurden erst kürzlich beschrieben und deren Eigenschaften müssen noch genauer untersucht werden (de Bruin et al., 2003; Maiti et al., 2005; Logan et al., 2005).

In der Gruppe der „aktivierenden“ E2Fs wurde E2F1 als erstes aufgrund seiner Eigenschaft an pRB zu binden untersucht. Zusammen mit DP1 bildet es einen heterodimeren Komplex auf der DNA und agiert als starker Transkriptionsfaktor für die nachgeschalteten Gene (Bandara et al., 1993; Helin et al., 1993). In der Folge wurden die Gene für E2F2 und E2F3 gefunden, die eine sehr hohe Homologie zu E2F1 besonders im Bereich der DNA-Bindungsdomäne, Dimerisierungsdomäne und pRB Bindungsdomäne besitzen (Lees et al., 1993; Ivey-Hoyle et al., 1993). E2F2 und E2F3 zeigen ein ähnliches Verhalten in der DNA-Bindung und Transaktivierung wie E2F1. E2F1, E2F2 und E2F3 können bei Überexpression Zellen in der G0-Phase wieder in die G1-Phase und damit in den Zellzyklus zurückführen. Dazu muss die DNA-Bindungs- bzw. die Transaktivierungsfunktion intakt sein (Johnson et al., 1993). In einigen Beispielen konnten die „aktivierenden“ E2Fs auch eine Vielzahl von wachstumsstoppenden Signalen überwinden, darunter TGF- β und die CDK Inhibitoren (CKIs) p16, p21 und p27. Die endogenen „aktivierenden“ E2Fs sind extrem wichtig für die Zellteilung. Die Microinjektion von anti-E2F3 Antikörpern verursacht einen Zellzyklusstop in *Primary cells* (Leone et al., 1998) und die Mutation von E2F1, E2F2 und E2F3 führt zu einem vollständigen Zellteilungsstop (Wu et al., 2001). Dieser Befund legt nahe, dass die drei E2Fs überlappende Funktionen bei der Auslösung des Zellzyklus haben. Zusätzlich zur ihrer Fähigkeit die Zellteilung voranzutreiben, können deregulierte E2Fs auch die Apoptose auslösen (Review: Dyson, 1998). Experimente mit Überexpression und Mausmodelle mit Mutanten zeigen, dass der programmierte Zelltod sowohl über einen p53 abhängigen als auch einen p53 unabhängigen Mechanismus ausgelöst werden kann (Quin et al., 1994; Wu und Levine, 1994). Für die Apoptose wird, wie für den Eintritt in die S-Phase, die transkriptionelle Aktivität von E2F benötigt. Die Identität der E2Fs, die die Apoptose auslösen, ist nicht abschließend geklärt. Einige Studien zeigten, dass nur E2F1 die Apoptose auslösen kann. Andere Forschungsgruppen vermuten, dass auch E2F2 und E2F3 auf ähnliche Weise den Zelltod auslösen können (Kowalik et al., 1998; Leone et al., 2001; Vigo et al., 1999).

Die „aktivierenden“ E2Fs werden durch das *Pocket*-Protein pRB, jedoch nicht durch die nahverwandten Proteine p107 und p130, reguliert. Die Bindung der E2Fs an pRB wird durch

dessen Phosphorylierung in der späten G1-Phase gelöst. Dadurch können die E2F abhängigen Gene transkribiert werden. Die Inaktivierung von pRB führt zu dem gleichen Phänotyp wie die Überexpression der E2Fs: einer unkontrollierten Proliferation sowie p53 abhängiger und unabhängiger Apoptose (Review: Mulligan und Jacks, 1998).

Die zweite Unterklasse der E2Fs umfasst E2F4 und E2F5. Sie wurden durch ihre Bindung an p107 und p130 gefunden (Dyson et al., 1993; Beijersbergen et al., 1994; Vario et al., 1995). Die beiden Proteine unterscheiden sich besonders im N-terminalen Bereich von den „aktivierenden“ Familienmitgliedern. E2F4 und E2F5 werden daher auch anders reguliert als die „aktivierenden“ E2Fs. E2F4 und E2F5 werden in Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, nachgewiesen, die „aktivierenden“ E2Fs dagegen sind in sich teilenden Zellen exprimiert. Des Weiteren binden E2F4 und E2F5 auch an andere *Pocket* Proteine, nämlich p107 und p130, wohingegen die „aktivierenden“ E2Fs spezifisch durch pRB reguliert werden. E2F4 und E2F5 sind sehr schlechte Transkriptionsfaktoren und sie können auch bei Überexpression Zellen in der G0-Phase nicht wieder in den Zellzyklus eintreten lassen (Muller et al., 1997; Verona et al., 1997). Die unterschiedliche Aktivität ist hauptsächlich auf die verschiedene Lokalisation der E2Fs zurückzuführen. Die „aktivierenden“ E2Fs befinden sich hauptsächlich im Zellkern, E2F4 und E2F5 befinden sich vorwiegend im Zytoplasma. Durch die Bindung an pRB oder p130 kann der Transport in den Zellkern veranlasst werden (Verona et al., 1997) und *in vivo* bestehen die meisten DP(1/2)/E2F Komplexe in G0/G1 Zellen aus E2F4 und E2F5. Diese DP/E2F/*Pocket*-Protein Komplexe sind mit HDACs *in vivo* assoziiert und E2F4 und E2F5 sorgen dadurch für eine Repression der E2F-abhängigen Gene. Während des Fortschreitens des Zellzyklus nehmen die Mengen an DP/E2F/*Pocket*-Protein Komplexen mit „repressiven“ E2Fs, die an den E2F Promotoren gebunden sind kontinuierlich ab und werden durch die „aktivierenden“ E2Fs ersetzt. Der DP/E2F4/*Pocket*-Protein Komplex fällt auseinander und DP/E2F4 wird aus dem Zellkern exportiert. Der Verlust der „repressiven“ DP/E2F/*Pocket*-Protein Komplexe beeinträchtigt die Repression von E2F abhängigen Genen und damit auch die Möglichkeit der Zellen den Zellzyklus zu verlassen (Gaubatz et al., 2000; Lindeman et al., 1998; Rempel et al., 2000). Eine weitere wichtige Funktion der „repressiven“ E2Fs ist ihre Bedeutung in der Regulierung der Differenzierung (Persengiev et al., 1999).

Tabelle 2 Knockout Studien zu den verschiedenen E2Fs und deren Phänotyp (Attwooll et al., 2004)

Knockout	Phänotyp	Spezifische Funktion	Geteilte Funktion	Referenz
E2F1 ^{-/-}	Neigung zur Krebsentstehung, Erhöhtes Wachstum des Thymus (wegen Defekte der Apoptose)	Apoptose	Proliferation (Mit E2F2 & E2F3)	Yamasaki et al., 1996; Field et al., 1996; Zhu et al., 1999; Garcia et al., 2000
E2F2 ^{-/-}	Gesteigerte Vermehrung der haematopoietischen Zellen, Entwickeln oft Autoimmunkrankheiten und Tumore		Proliferation (Mit E2F1 & E2F3)	Murga et al., 2001; Zhu et al., 2001
E2F3 ^{-/-}	Teilweise lethal im Embryonalstadium	Reprimiert den ARF Promotor	Proliferation (Mit E2F1 & E2F2)	Humbert et al., 2000b; Wu et al., 2001; Ziebold et al., 2003; Aslanian et al., 2004
E2F1 ^{-/-} , E2F2 ^{-/-} , E2F3 ^{-/-} .	Letal			Wu et al., 2001
E2F4 ^{-/-}	Sterben früh aufgrund einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen. Keine nachweisbaren Effekte auf Zell Zyklus Arrest oder Vermehrung	Erytroid Reifung		Humbert et al., 2000a; Rempel et al., 2000
E2F5 ^{-/-}	Entwickeln Hydrocephalus nach der Geburt (Fehler in Differenzierung, nicht in der Proliferation)	Entwicklung des Gehirns		Lindeman et al., 1998
E2F4 ^{-/-} , E2F5 ^{-/-} .	Nicht bekannt		Reagieren nicht auf Zell Zyklus Arrest Signale durch p16INK4A Redundante Funktion bei der Maus Entwicklung	Gaubatz et al., 2000
E2F6 ^{-/-}	Zeigt schwache homeotische Transformation des Axialen Skeletts			Storre et al., 2002
DP1 ^{-/-}	Letal im frühen Embryo			Kohn et al., 2003

1.5. p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 wurde erstmals 1979 entdeckt (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Aufgrund der aus Tumorzell-Linien isolierten mutierten cDNA hielt man es ursprünglich für ein Onkogen. Seine eigentliche Funktion als Tumorsuppressor wurde erst zehn Jahre später entdeckt (Baker et al., 1989; Finlay et al., 1989; Hinds et al., 1989). p53 ist in nahezu 50% aller menschlichen Tumoren mutiert. Aufgrund seiner Aufgaben bei der Überwachung der Integrität des Genoms wird p53 als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992).

p53 hat zwei nahe verwandte Proteine: p63 und p73. Zwischen den drei Proteinen besteht eine 60% Identität mit der DNA-Bindungs-Domäne. Trotz der Ähnlichkeit und der Tatsache, dass p53 sehr häufig in Krebszellen, ungefähr 50% aller menschlicher Tumore haben eine Mutation im p53 Gen, mutiert ist, sind Mutationen in p63 und p73 selten in menschlichen Tumoren. Mutationen in p53 gehen normalerweise mit einer schlechten Heilungschance einher.

Das humane p53 ist ein nukleares Phosphoprotein mit einer Länge von 393 Aminosäuren. Im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern gibt es von p53 keine Splicevarianten (Moll und Zaika 2001). p53 ist aus mehreren Domänen aufgebaut. Einer N-terminalen transaktivierungs Domäne (1-70), einer Prolin-reichen Domäne mit fünf Kopien der Sequenz PXXP (60-97), einer hochkonservierten hydrophoben DNA-Bindungs-Domäne (100-300), einer Tetramerisierungs-Domäne (320-360) und einer C-terminalen Domäne (360-393). p53 bindet sequenzspezifisch als Tetramer an zwei 10er-Repeats von 5'-PuPuPu-C(A7T)(T/A)GPyPyPy (Pu = Purin, Py= Pyrimidin) oder an ein Palindrom bestehend aus einem vier-fünf Basenpaaren invertiertem Repeat mit einer ähnlichen Sequenz (El-Deiry, et al., 1992, Funk, et al., 1992). Das *full length* Protein von p53 ist inaktiv für eine spezifische Bindung an DNA. Aktivierung kann über kovalente und nicht kovalente Modifikation des C-Terminus erreicht werden (Jayaraman und Prives, 1999) und p53-Konstrukte ohne die C-terminale Domäne haben eine erhöhte Bindungsaffinität zur DNA (Hupp et al., 1992).

Die Menge an p53 ist unter normalen Bedingungen sehr gering, steigt aber in der Zelle nach Stress, wie ionisierende Strahlung, UV und zytotoxischen Stoffen stark an (Vogelstein et al., 2000; Vousden und Lu, 2002), was hauptsächlich auf eine erhöhte Stabilität von p53 zurückzuführen ist. p53 moduliert die Transkription von Genen der DNA-Synthese, DNA-Reparatur, Zellzyklus Arretierung, *Senescence* und Apoptose. Die Transaktivierung von Zielgenen von p53 führt entweder, abhängig von der auslösenden Ursache, zu einem Stop des

Zellzyklus in der G1-Phase oder zur Apoptose. p53 verhindert damit, dass DNA Schäden und daraus resultierend Mutationen in die nächste Generation der Zellen weitergegeben werden können. Für die zentrale Rolle als Tumorsuppressor ist die Fähigkeit die Apoptose einzuleiten wichtiger als der Zellzyklus Stop (Bild 2).

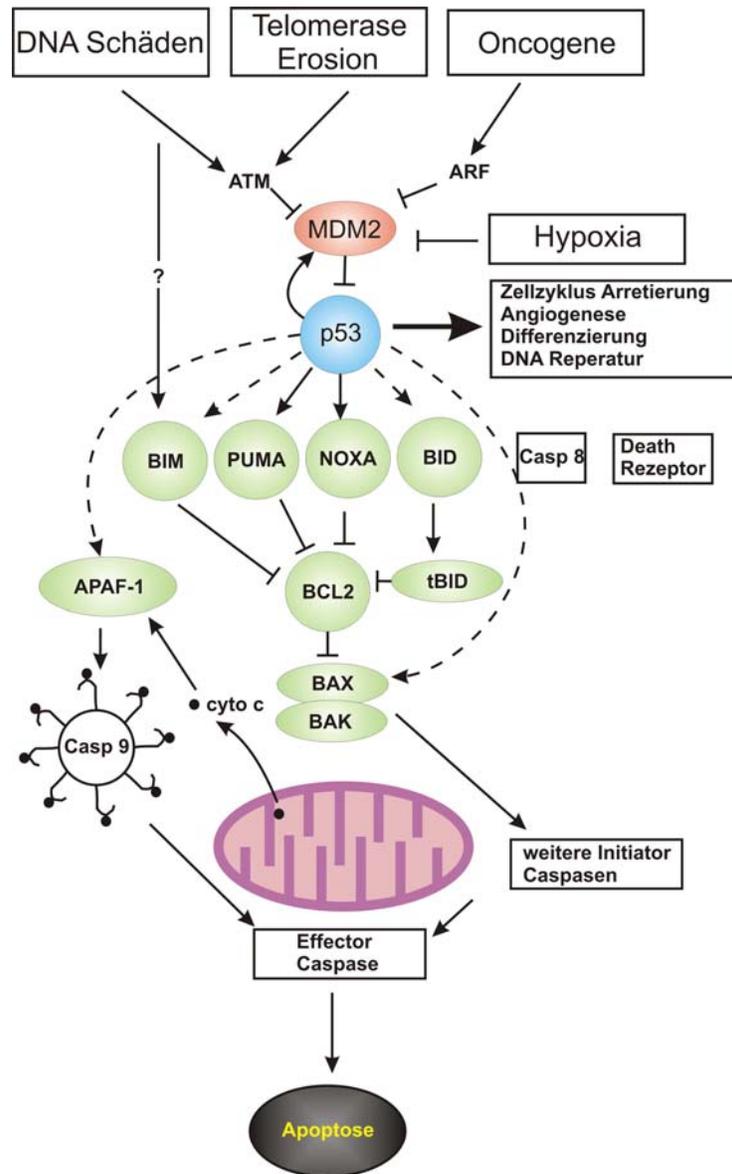


Bild 2 Apoptose Signalweg nach Aktivierung von p53. Aktiviertes p53 induziert die Expression einer Anzahl von downstream Zielgenen, die an der Apoptose beteiligt sind. Darunter Mitglieder der BCL-2 Proteinfamilie. Pro-apoptotische Proteine wie BIM, PUMA und NOXA können an die anti-apoptotischen BCL-2 Familienmitglieder binden und dadurch deren Überlebensfunktion unterbinden. Aktivierung von BAX/BAK veranlasst die Freisetzung von mitochondrialen Cytochrom C, welches wiederum die APAF-1 gesteuerte Aktivierung der Caspase 9 auslöst, die wiederum Effektor Caspasen (Caspase 3,6 und 7) aktiviert (Michalak et al., 2005).

Die wichtigen Modifikationen, die aufgrund von Stressfaktoren an p53 vorgenommen werden, sind am N-Terminus, der Region, die für die Transaktivierungs-Eigenschaften von p53 verantwortlich ist und die mit MDM2 wechselwirken kann und in der C-terminalen regulatorischen Domäne (Lakin und Jackson, 1999). Diese posttranslationalen Modifikationen umfassen Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen, Ubiquitinylierungen und Sumolylierungen und betreffen bis zu 24 verschiedene Aminosäureerster auf p53 (Harris und Levine 2005).

Einige der Modifikationen im N-Terminus zielen direkt auf die Interaktion zwischen MDM2 und p53 ab, den wichtigsten Faktor bei der Stabilität von p53. Phosphorylierungen kommen am häufigsten vor und werden durch verschiedenen Kinasen, die durch Stressfaktoren aktiviert werden, ausgelöst, darunter ATM (*mutated in ataxia-telangiectasia*), ATR (*A-T and Rad3-related*) und weitere. Eine der am häufigsten beschriebenen Phosphorylierungen wird am Ser15 durchgeführt. Diese Phosphorylierung ist eine schnelle Antwort auf DNA Doppelstrang Brüche und wird von ATM durchgeführt (Banin et al., 1998). Einige Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich werden aber auch kontinuierlich phosphoryliert und werden nach Strahlenschäden dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung von Ser376 führt zu einer Bindung von 14-3-3 Protein und erhöht die sequenzspezifische Bindung an DNA (Waterman et al., 1998).

Histon-Acetylasen der p300/CBP Familie binden an p53 und p300 acetyliert p53, wodurch die transcriptionelle Aktivität von p53 gesteigert wird (Gu und Roeder, 1997) Allerdings zeigten neuere Studien, dass Acetylierung für die Bindung an den p21-Promoter nicht nötig ist (Espinosa und Emerson 2001) und wahrscheinlich ist die Acetylierung eher für eine Feinabstimmung auf Stresssignale als für die Stabilität oder transkriptionelle Aktivität von p53 verantwortlich (Krummel et al., 2005).

Der wichtigste Mechanismus für die Kontrolle der Stabilität von p53 und dessen Aktivierung ist die Interaktion mit und die Ubiquitinierung durch MDM2 vor der Degradierung durch das Proteasom (Harris und Levine 2005). Daneben gibt es aber eine Vielzahl von Proteinen, die ebenfalls die Stabilität von p53 beeinflussen (Bild 3). Darunter befinden sich Proteine, die die Stabilität erhöhen oder verringern, Proteine, die p53 modifizieren und solche, die die Modifikationen wieder rückgängig machen.

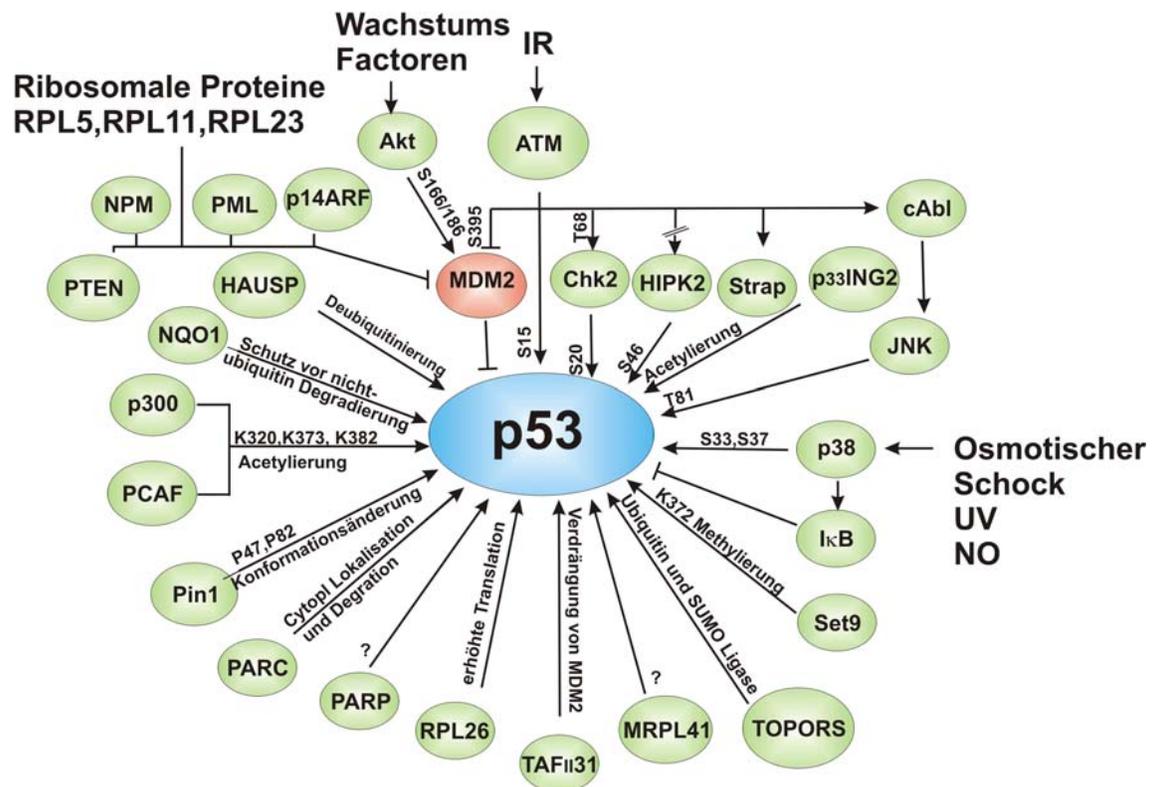


Bild 3 Proteine, die die Stabilität und Aktivierung von p53 beeinflussen. Zusätzlich zu MDM2 sind eine Vielzahl weiterer Proteine für die Stabilität von p53 verantwortlich, einige werden kontinuierlich exprimiert, andere werden nach Aussetzung der Zelle von verschiedenen Stressfaktoren exprimiert. Darunter befinden sich Proteinkinasen, Proteine, die p53 auf andereweise modifizieren, Proteine, die die subzelluläre Lokalisation verändern und Proteine, die die Interaktion zwischen MDM2/p53 beeinflussen (Lavin und Gueven, 2006).

1.6. MDM2

MDM2 ist der wichtigste Regulator von p53. Es wurde zusammen mit den Genen *mdm1*, *mdm2* und *mdm3* als amplifizierte Sequenzen in einer Mauszelllinie (3T3DM) entdeckt (Cahilly-Snyder et al., 1987). Sie lagen hier in mehreren Kopien gepaarter, azentrischer Chromatinkörperchen, sogenannter „*double minutes*“ vor. MDM2 (*murine double minute Gen 2*) zeigte als einzige der isolierten Sequenzen onkogene Eigenschaften in transformierten NIH3T3 Zellen (Fakharzadeh et al., 1991).

Das humane MDM2 (HDM2) ist auf dem Chromosom 12q14.3-15 lokalisiert und in über einem Drittel von 47 humanen Sarcomas war der Locus von MDM2 amplifiziert (Oliner et al., 1992). Die Transkription erfolgt über zwei unterschiedliche Promotoren (P1: p53-unabhängig, im Exon 1 lokalisiert; P2: p53-abhängig, im Intron 1 lokalisiert). Der P2-Promoter ist transkriptionell etwa 6-8 mal effizienter als der P1-Promoter. Beide Transkripte kodieren jedoch für das gleiche Protein, da sich das Startcodon in Exon 3 befindet. Unterschiedlich ist nur die 5'-untranslatierte Region der MDM2-mRNA.

Das humane MDM2 ist ein 55 kDa großes Protein (491 Aminosäuren) und aus mehreren Domänen aufgebaut. Im N-terminalen Bereich befindet sich die p53-Bindungsdomäne (AS 19-102) (Chen et al., 1993; Oliner et al., 1993). Des Weiteren hat MDM2 eine saure Domäne (AS 223- 274), eine Zink-Finger-Domäne (AS 305-322) und am C-Terminus eine RING-Finger-Domäne, die eine Ubiquitinligase-Aktivität besitzt (Honda et al., 1997). MDM2 hat eine Kernlokalisierungs-Domäne und eine Kern-Export-Sequenz. Mit der Ligasefunktion kann MDM2 p53 ubiquitinylieren. Zwischen der Zink- und RING-Finger-Domäne befindet sich eine Caspase-Schnittstelle (AS 361-362), über die das Protein während der p53-vermittelten Apoptose gespalten wird. Die besondere Bedeutung von MDM2 zeigte sich in der Beobachtung, dass seine Überexprimierung zu einer Inhibierung der p53-abhängigen Transaktivierung führt (Momand et al., 1992). MDM2 ist somit ein Proto-Onkogen, das in vielen Tumoren amplifiziert ist.

1.6.1. Wechselwirkung zwischen MDM2 und p53

Die gegenseitige Wechselwirkung zwischen p53 und MDM2 wird als autoregulatorischer „*feedback loop*“ bezeichnet (siehe unten). MDM2 kontrolliert die Aktivität von p53 über eine selbstregulierende Rückkopplung. (Oliner et al., 1992; Oliner et al., 1993, Wu et al., 1993; Picksley et al., 1993; Ashcroft et al., 1999). p53 aktiviert die Expression von MDM2, welches wiederum die Transaktivierungsaktivität von p53 hemmt, indem es spezifisch an die

Transaktivierungsdomäne bindet. Zum Zweiten fördert MDM2 den Export des Proteinkomplexes aus dem Nucleus und über die Ubiquitin-Ligase-Aktivität die Degradierung von p53 über den Proteasomstoffwechselweg (Michael und Oren, 2003). Dadurch sinkt die Konzentration von p53 in der Zelle, wodurch in Folge auch die MDM2 Konzentration abnimmt (Bild 4).

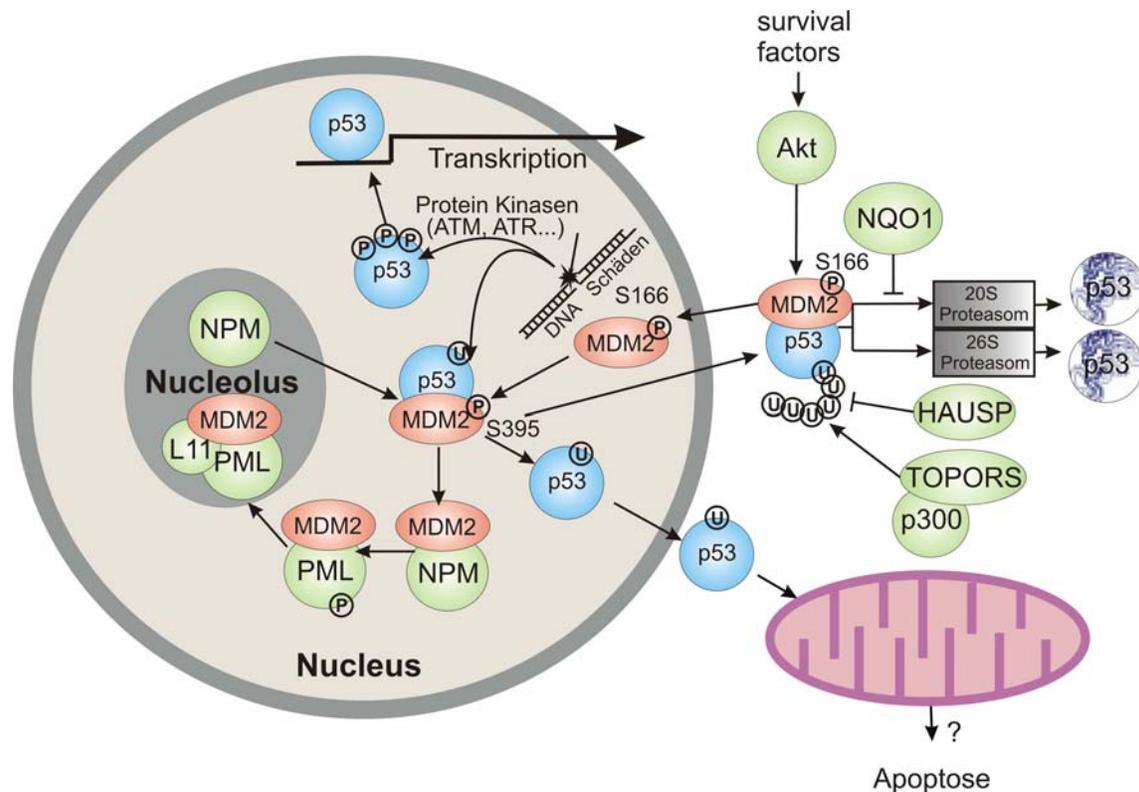


Bild 4 Steuerung der p53 Stabilisierung durch MDM2. Unter normalen Bedingungen bindet MDM2 an p53 und monoubiquitiniert p53, bevor es aus dem Zellkern exportiert wird. Im Zytoplasma wird p53 polyubiquitiniert. Akt-abhängige Phosphorylierung von MDM2 am Serin 166 erleichtert den Export. Topors oder p300 sind an der Polyubiquitinulierung von p53 beteiligt. Nachdem es polyubiquitiniert wurde, wird p53 im 20S Proteasom abgebaut. NAD(P)H Quinon Oxidoreduktase (NQO1) fungiert als ein „Torwächter“ in diesem Prozess und schützt p53 vor der Degradierung im 20S Proteasom. Werden Zellen DNA Schäden oder anderen Stressfaktoren ausgesetzt, werden PI3 Kinasen, wie ATM und ATR aktiviert, die p53 dadurch stabilisieren, dass sie die Interaktion zwischen MDM2 und p53 reduzieren. Der Nucleolus ist ebenfalls an der Reaktion auf Stressfaktoren beteiligt und setzt Nucleophosphin frei, das als negativer Regulator auf die MDM2-p53 Wechselwirkung einwirkt. *Promyelocytic leukaemia* (PML) wirkt sich ebenfalls positiv auf die Stabilität von p53 aus, in dem es MDM2 in den Nucleolus importiert. Sobald p53 stabilisiert ist, kann es Zellzyklus Checkpoints oder die Apoptose aktivieren (Lavin und Gueven, 2006).

Durch die enge Wechselwirkung mit MDM2 ist die Halbwertszeit von p53 unter normalen Bedingungen sehr gering. Unter Stress-Bedingungen wird die Inhibierung von p53 durch MDM2 aufgehoben, was unter anderem durch Phosphorylierung von p53 erreicht wird. Dadurch wird p53 aktiv und kann in der Zelle eine Zellzyklusarretierung oder Apoptose einleiten. MDM2 ist eine E3-Ubiquitin-Ligase die sich auch selbst ubiquitinulieren kann (Fang et al., 2001). Werden Zellen erhöhtem Stress ausgesetzt, kommt es zu einer Reduzierung der Sumoylierung und einer erhöhten Selbstubiquitinulierung und Degradierung von MDM2, was wiederum die Stabilität von p53 begünstigt (Alarcon-Vargas und Ronai, 2002).

In vielen Tumoren ist das MDM2 Gen amplifiziert oder es wird überexprimiert. Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass die Inhibierung von MDM2 über verschiedene makromolekulare Ansätze oder durch Unterdrückung der Expression von MDM2 der p53-Stoffwechselweg aktiviert werden konnte und das Tumorwachstum gehemmt wurde (Chen, 1998; Tortora, 2000). Die Aktivierung des p53-Stoffwechselwegs über die Inaktivierung von MDM2 stellt daher eine neue therapeutische Strategie zur Behandlung von Krebs dar (Lane, 1999; Chene, 2003).

1.6.2. p53-unabhängige Funktionen

Außer mit p53 kann MDM2 mit einer Reihe anderer Proteine und Nukleinsäuren interagieren. Diese p53 unabhängigen Funktionen scheinen allerdings nicht lebensnotwendig für die Zelle zu sein. MDM2 kann mit dem ribosomalen Protein L5 Komplexe bilden, die in der Lage sind, spezifisch die 5sRNA zu binden. Dies weist auf eine mögliche transkriptionsregulatorische Funktion von MDM2 hin. Das RB-Genprodukt ist in der Lage an MDM2 zu binden und wird hierdurch inaktiviert. Eine Wechselwirkung von MDM2 mit dem Transkriptionsfaktor E2F1/DP1 aktiviert Gene der Zellzyklusprogression durch Stimulation der E2F Promotoren. Weitere Proteine mit denen MDM2 interagiert sind Numb, p73, ARF und MDMX. MDMX ist dem MDM2 strukturell ähnlich ohne dabei ein Zielgen von p53 zu sein. Es kann die Transaktivierungsfunktion von p53 hemmen ohne es für den Abbau im Proteasom zu markieren. (Ganguli und Wasylyk, 2003, Zhang et al., 2005)

1.7. Entwicklung neuer Medikamente

Kleine organische Moleküle, die als Inhibitoren verwendet werden, müssen eine Vielzahl von Eigenschaften ausweisen, um als Medikamente eingesetzt werden zu können. Darunter sind zwei besonders entscheidende Faktoren. Die Selektivität für das gewünschte Ziel und die Affinität. Erstere ist für eine Minimierung von Nebenwirkungen unerlässlich, zweitere ist ein Maß für die Effizienz des Moleküls.

Um die Interaktionen zwischen zwei Proteinen zu inhibieren, müssen vor allem die Kontaktflächen der beiden Proteinen eine, für die Inhibierung mit kleinen Molekülen, geeignete Oberfläche haben. In den Fällen, in denen die Proteine über weit verteilte Kontakte miteinander wechselwirken und die Affinität über die Summe der einzelnen Kontakte erreicht wird, gibt es in der Regel zuwenig spezifische Kontakte, um einen effektiven niedermolekularen Inhibitor zu entwickeln, denn kleine Moleküle können nur an einer beschränkten Anzahl von Wechselwirkungen teilnehmen (Fry und Vassilev, 2005). Oberflächen, die über tiefe Taschen verfügen und in denen sich die spezifischen Protein-Protein Wechselwirkungen auf einen kleinen Bereich beschränken, eignen sich besser zur Entwicklung von spezifischen Inhibitoren.

1997 veröffentlichte Lipinski Regeln für organische Moleküle, die als Medikamente in Frage kommen könnten. Um die Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme zu gewährleisten, sollten niedermolekulare Verbindungen folgende Eigenschaften haben: Nicht mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donatoren (OH und NH), nicht mehr als 10 Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (O und N), ein Molekulargewicht von unter 500 Da und einen Partitionskoeffizienten (Maß für die Löslichkeit) $\log P$ kleiner als fünf (Lipinski et al., 1997).

Um eine schnelle und effiziente Suche nach neuen Wirkstoffen durchführen zu können, gibt es verschiedene Verfahren. Das klassische Verfahren, ganze Bibliotheken mit niedermolekularen Verbindungen zu durchsuchen, um mögliche Kandidaten für Medikamente zu finden, lieferte im Falle von Protein-Protein Wechselwirkungen nur geringe bis gar keine Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde die Suche auf Fragmente von Molekülen beschränkt (Diercks et al., 2001; Coles et al., 2003; Schade und Oschkinat, 2005, Klages et al., 2007). Die Vorteile dieses Verfahrens sind in Bild 5 dargestellt.

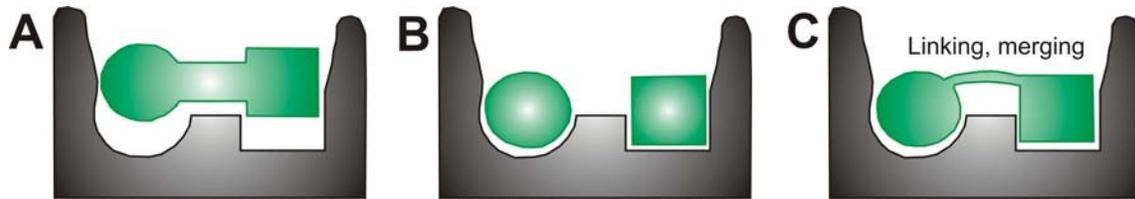


Bild 5 Suchverfahren nach niedermolekularen Inhibitoren. A: Treffer nach einem klassischen Suchverfahren über eine Bibliothek mit niedermolekularen Verbindungen. Die starre Bindung zwischen dem Kreis und dem Rechteck verhindert jedoch eine optimale Bindung. B: Suchergebnis nach einer Fragment Suche. Die beiden Fragmente passen optimal in die Bindungstasche, die einzelnen Wechselwirkungen sind aufgrund der kleinen Kontaktfläche sehr schwach. C: Inhibitor durch Verbinden der beiden Fragmente. Durch die Verbindung der beiden Fragmente addieren sich die Freie Energie der einzelnen Fragmente und es entsteht ein hochaffiner, spezifischer Inhibitor.

Nachteile der Fragmentsuche sind jedoch offensichtlich. Die einzelnen Fragmente binden wegen der kleineren Größe nur mit einer sehr niedrigen Affinität an die Proteinoberfläche. Es mussten daher Verfahren entwickelt werden, die in der Lage sind, gerade auch sehr schwache Wechselwirkungen zu entdecken. Mehrere verschiedene Techniken finden hierbei Anwendung: NMR, Röntgenstrahlung und Massenspektrometrie. Im Falle der NMR werden vor allem vier Methoden angewendet:

Chemischen Verschiebung von Proteinen

Diese Methode liefert die meiste Strukturinformation über die Bindung des Liganden an das Protein. Wenn ein Fragment oder eine niedermolekulare Verbindung an ein Ziel bindet, dann wird dadurch die chemische Umgebung verändert, was sich wiederum in einer Änderung der chemischen Verschiebung der Bindungsstelle zeigt. Die Methode wird bei dem *structure-activity relationship* (SAR)-by NMR Ansatz verwendet (Shuker et al., 1996)

Detektion des Liganden

Bei dieser Methode wird die Magnetisierung unterschiedlich auf gebundene und ungebundene Fragmente übertragen. Die Detektion erfolgt über ein 1D-¹H NMR Spektrum des freien Liganden. Die Methode findet als WaterLOGSY und *saturation transfer differerenc* (STD) ihre Anwendung (Dalvit et al., 2001; Mayer und Peters, 2003).

Detektion inter-Liganden NOEs

Die Methode beruht auf der Detektion des inter-Liganden *Nuclear Overhauser Enhancement* (NOE). Diese Methode ist unabhängig von der Größe oder einer Isotopenmarkierung. Wenn zwei Fragmente an benachbarte Stellen binden, dann kann ein übertragener NOE-Effekt zwischen den Wasserstoffatomen mit 2D-NMR Spektroskopie detektiert werden, sofern der Abstand geringer als 5-6 Å ist (Becattini et al., 2004).

Detektion der *spin label perturbations*

Diese Methode detektiert die *spin label perturbation* (SLP), die von einem bekannten, bindungsstellenspezifischen Liganden, der mit einer paramagnetische Probe markiert ist, auf ein unbekanntens Bindungsfragment ausgeübt wird. Der paramagnetische Spin quentscht selektiv das NMR Signal in einem Bereich bis 20 Å, wohingegen freie Fragmente nicht betroffen sind (Jahnke et al., 2000).

1.8. Inhibitoren der MDM2-p53 Interaktion

Die Kristallstruktur von MDM2 mit einem gebundenen p53-Peptid wurde 1996 von der Gruppe um Nikola Pavletich gelöst (Bild 6) (Kussie et al., 1996). Die MDM2 Bindungstasche für p53 ist von 14 konservierten hydrophoben und aromatischen Aminosäuren flankiert, die multiple van der Waals Kontakte zu dem p53-Peptid herstellen.

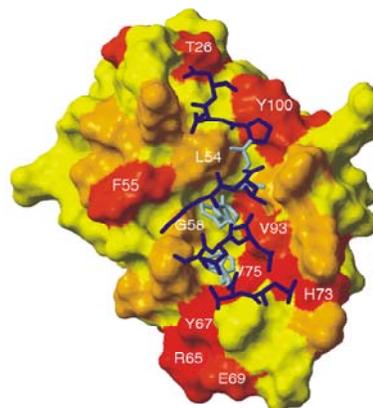


Bild 6 Bindung eines p53-Peptides an MDM2.

Das p53-Peptid nimmt eine α -helicale Konformation ein und die Position des p53-Peptids ist derart ausgelegt, dass die Aminosäuren Phe19, Trp23 und Leu26 tief in die MDM2 Bindungstasche hineinreichen können und die meisten van der Waals Kontakte mit MDM2 gehen über diese drei Aminosäuren. Die Oberfläche der MDM2 p53 Interaktion beträgt 1498 Å und ist mit Ausnahme von zwei Wasserstoffbrücken weitestgehend hydrophob.

Ziel für mögliche Kandidaten für eine Inhibition der MDM2 Wechselwirkung sind die einzelnen *Pockets* in der MDM2 Bindungstasche. Das Prinzip der Wirkung von Medikamenten gegen die MDM2/p53 Wechselwirkung ist im Bild 7 dargestellt.

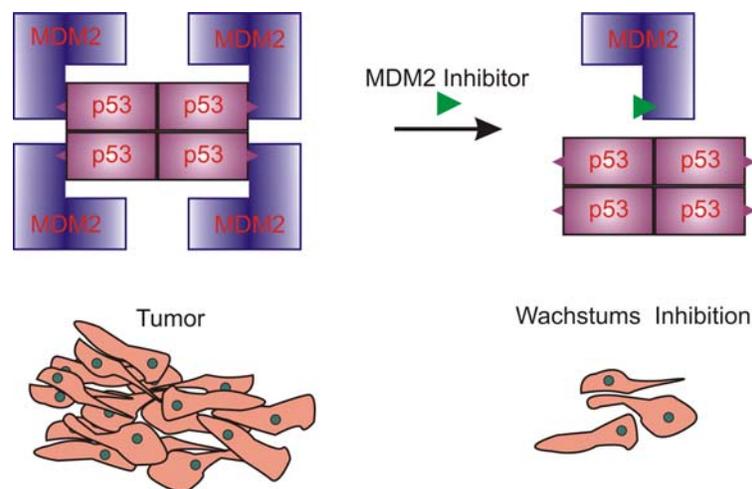
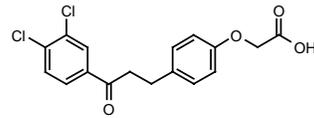


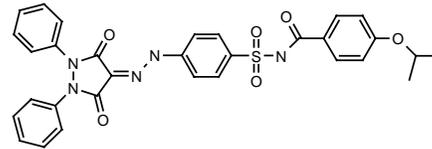
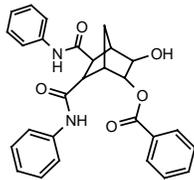
Bild 7 p53 liegt in Zellen als Tetramer vor und an dessen Transaktivierungsdomäne ist MDM2 gebunden. In Tumorzellen, die über funktionales wt-p53 verfügen und dessen p53 Aktivität durch eine Überdosis von MDM2 gestört ist (dies kann entweder durch eine Überexpression von MDM2 oder durch ein mutiertes funktionsloses Allel von p53, welches MDM2 nicht mehr bindet und dadurch für das funktionale wt-p53 im Verhältnis mehr MDM2 zu Verfügung steht, ausgelöst sein), kann durch Zugabe eines Inhibitors die Menge an freiem funktionalem p53 erhöht werden. Dadurch kann p53 seiner Aufgabe nachgehen, die Schäden in der DNA zu reparieren oder die Apoptose einleiten.

Bisher sind eine Vielzahl von möglichen Kandidaten für eine Störung der Wechselwirkung publiziert worden. Eine kleine Auswahl wird weiter unten beschrieben. Neben den Inhibitoren, die auf dem p53 Peptid basierten, waren die ersten organischen Verbindungen Phenoxyessigsäure und Phenoxyethyltetrazol Derivate, die auch als Chalcone bekannt sind.



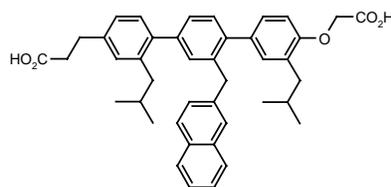
Diese Verbindungen konnten die Bindung von MDM2 an p53 inhibieren, jedoch mit einer sehr geringen Effektivität (Stoll et al., 2001). Modifizierte Chalcone, sogenannte Boronic Chalcone, konnten das Wachstum von kultivierten Tumorzellen stoppen, jedoch ist nicht klar, ob dieser Effekt tatsächlich wegen der Störung der Wechselwirkung zwischen MDM2 und p53 hervorgerufen wurde (Kumar et al., 2003).

Zwei weitere Verbindungen wurden mit Hilfe von der Strukturdaten des MDM2 Kristalls entworfen.



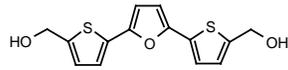
Die Erstere konnte zwar p53 in Tumorzellen anreichern, jedoch stimmte die Zytotoxizität stimmte nicht mit dem von wt-p53 überein. die Zweite zeigte eine dosisabhängige aber schwache Inhibierung von MDM2-p53, was sich in einer schwachen Steigerung der transkriptionellen Aktivität von p53 zeigte (Zhao et al., 2002, Galatin et al., 2004).

Yin und Hamilton stellten 2004 einen Inhibitor vor, der auf einem Terphenylgrundgerüst basiert.



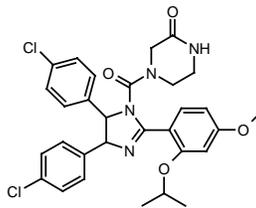
Dieser Inhibitor blockiert die Interaktion zwischen MDM2 und p53 im submicromolaren Bereich (Yin und Hamilton, 2004).

RITA gehört zu einer neuen Klasse von Inhibitoren, da diese Verbindung nicht an MDM2 sondern an p53 binden soll.



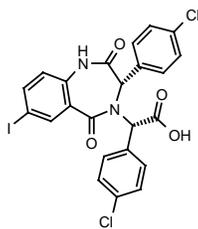
RITA stabilisiert dabei, nach Meinung der Autoren, p53 in einer anderen Konformation, die dann nicht mehr in der Lage ist, MDM2 zu binden. Wie und ob RITA dies erreicht ist bisher aber nicht geklärt (Issaeva et al., 2004).

Die ersten wirklich effektiven Inhibitoren wurden 2004 vorgestellt (Vassilev et al., 2004).



Nutlins gehören zur Klasse von cis-Imidazolin Derivaten und konnten an MDM2 mit einer K_D von 100-300 nM binden. Der Unterschied in der K_D zwischen den jeweiligen Enantiomeren beträgt das 150-200fache! Nutlins inhibieren die MDM2-p53 Wechselwirkung, in dem sie die drei kritischen Aminosäuren von p53 nachahmen und in die entsprechenden hydrophoben Bindungstaschen auf MDM2 binden. Nutlins induzieren die Apoptose in p53 Wildtyp Zellen und sind *in vivo* wirksam in Maus Xenograft Modellen.

Eine weitere Klasse von Inhibitoren wurden 2005 publiziert (Grasberger et al., 2005).



Die Autoren stellten einen Benzodiazepinedione (BDP) Inhibitor vor, der zusammen mit MDM2 kokristallisiert wurde und in die MDM2 Bindungstasche bindet. Die K_D für den besten BDP Inhibitor betrug 80 nM. Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Enantiomeren.

Auch wenn es bis jetzt einige vielversprechende Verbindungen gibt, die die Wechselwirkung von MDM2 mit p53 erfolgreich stören, so ist der Schritt bis zum fertigen Medikament, das in der Krebstherapie eingesetzt werden kann, noch sehr weit. Es müssen noch viele Tests durchgeführt werden, um Nebenwirkungen, Toxizität und Effektivität *in vivo*

zu ermitteln, bevor eine Verbindung als Medikament zugelassen werden kann und die Möglichkeit, dass eine Verbindung bei den verschiedenen vorklinischen oder klinischen Studien durchfällt, ist relativ groß. Es ist daher notwendig, bereits am Anfang viele verschiedene Verbindungen zu identifizieren, die die Wechselwirkung zwischen MDM2 und p53 erfolgreich stören, um auf diese Weise die Chancen auf eine erfolgreiche Entwicklung von Medikamenten zu erhöhen. Bis jetzt wurden jedoch noch keine klinischen Untersuchungen für Verbindungen für die MDM2/p53 Interaktion beschrieben, was die Möglichkeit eröffnet als Klassenerster („first in class“) MDM2 Antagonisten zu finden.

ZIEL DER ARBEIT

Das gegenseitige Wechselspiel der Proteine untereinander ist von großer Wichtigkeit für das Verständnis der Biologie der Zelle. In allen Prozessen des Zellzyklus kommt es zu den verschiedensten Interaktionen zwischen Proteinen, sei es zur posttranslationalen Modifikation wie im Beispiel der Phosphorylierung von pRB durch CDKs, die Modulierung der Aktivität, wie im Beispiel der Cyclins und ihrer zugehörigen Kinasen (CDK) oder die Inhibierung der Funktion eines Proteins durch nichtkovalente Wechselwirkung, wie im Beispiel der Interaktion zwischen MDM2 und p53.

Das Ziel der Forschung der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen verschiedenen Proteinen des Zellzyklus, darunter die Wechselwirkung zwischen den Proteinen: Retinoblastoma Protein pRB, Transkriptionsfaktor E2F1/DP1, dem Komplex CDK2/CyclinA, SKP2, p27, Tumorsupressorprotein p53 und MDM2. In einem weiteren Schritt soll die Störung dieser Interaktionen mit kleinen organischen Verbindungen untersucht werden. Diese organischen Verbindungen können dann als Ausgangsverbindungen für die Entwicklung von neuen Therapien in der Behandlung von Krebs dienen.

2. MATERIALIEN

2.1. Chemikalien

Chemikalien wurden falls nicht anders angegeben im Reinheitsgrad pA. verwendet. Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Roth, Sigma, Fluka, Merck Biosciences.

2.2. Enzyme

Restriktionsenzyme	(New England BioLabs)
DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	(New England BioLabs)
Mungbohnen-(5'-3')-Exonuklease	(New England BioLabs)
Alkalische Kälberdarmphosphatase	(New England BioLabs)
T7-Polynukleotidkinase	(New England BioLabs)
T4-DNA-Ligase	(New England BioLabs)
Vent TM -DNA-Polymerase	(New England BioLabs)
Pre-scission Protease	(Amersham Pharmacia)
Faktor Xa	(Novagen)
Enterokinase	(Novagen)
Trombin	(Sigma)

2.3. Protein und DNA Marker

Prestained Protein Marker	(New England BioLabs)
100 bp DNA Marker	(New England BioLabs)
1Kb DNA Marker	(New England BioLabs)

2.4. Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	(Qiagen)
QIAquick PCR Purification Kit	(Qiagen)
QIAquick Gel Extraction Kit	(Qiagen)
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	(Stratagene)
Pre-Crystallization Test (PCT)	(Hampton Research)
pET LIC cloning Kits	(Novagen)
Complete Protease Inhibitor Cocktail	(Roche)
Kristallisationskits	(Hampton Research)

2.5. Bakterien Stämme

Name	Genotyp	Verwendung	Hersteller
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal (DE3)</i>	Expression	Stratagen
BL21	<i>F⁻ ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal</i>	Expression	Stratagen
BL21(RIL)	<i>F⁻ ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte[argU ileY leuW Cam^r]</i>	Expression	Stratagen
BL21(RP)	<i>F⁻ ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endA Hte[argU proLCam^r]</i>	Expression	Stratagen
XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 nsupE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Klonierung	Stratagen
XL10 GOLD	<i>Tet^r Δ (mcrA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^q ZAM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]</i>	Klonierung	Stratagen
one shotTOP10	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr⁻hsdRMS⁻mcrBC) φ80lacZAM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Klonierung	Invitrogen
NovaBlue	<i>endA1 hsdR17(r_{k12}⁻m_{k12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' pro A⁺B⁺ lac^qZ ΔM15::Tn10 (^{TcR})]</i>	Klonierung	Novagen

2.6. Plasmide

Name	Antibiotika ^R	Affinitäts TAG	Protease Schnittstelle	Hersteller
pET30 LIC/Xa	Kanamycin	6xHIS	Factor Xa	Novagen
pET41 LIC/EK	Ampicillin	GST	Enterocinase	Novagen
pET46 LIC/EK	Ampicillin	6xHIS	Enterocinase	Novagen
pET 28	Kanamycin	6xHIS	Trombin	Novagen
pGEX6P	Ampicillin	GST	Prescission Protease	Amersham-P.
pGEX4P	Ampicillin	GST	Trombin	Amersham-P
pETDUET	Ampicillin	6xHIS	-	Novagen
pACYC	Cloramphenicol	6xHIS	-	Novagen

2.7. Geräte

Bakterienschüttler	(Heraeus)
Bohemian Wheel	(PSI-Laborgeräte)
Corex-Zentrifugenröhrchen	(Corex)
Falcon-Röhrchen	(Falcon)
Feinwaagen	(Mettler)
Gel-Dokumentationsanlage Eagle Eye	(Stratagene)
Gelelektrophoresekammern	(BioRad)
Geltrockner	(BioRad)
Heizblock Termomixer	(Eppendorf)
Kernspinresonanzspektrometer 600 MHz	(Bruker)
Magnetrührer	(Ikamag)
Microwelle	(Siemens)
Parafilm	(American National Can)
PCR-Gerät Mastercycler personal	(Eppendorf)
pH-Meter pH 211	(Hanna Instruments)
Photometer Ultrospec 3100 pro	(Amersham Pharmacia)
Röntgenquellen	(DESY, Hamburg)
Spannungsquellen	(Pharmacia)

Ultraschall Branson sonifier 250	(Branson)
Vortex Genie II	(Scientific Industries)
Zentrifugen	(Eppendorf Tischzentrifugen) (3K15, Sigma), (J-6M/E Beckmann), (Avanti J-30I Beckmann)

2.8. Chromatographie

ÄKTA Explorer 10	(Amersham Pharmacia)
Fraktion Kollektor RediFrac	(Amersham Pharmacia)
BioLogic LP System	(Biorad)
HiLoad 26/60 Superdex S75pg	(Amersham Pharmacia)
HiLoad 16/60 Superdex S75pg	(Amersham Pharmacia)
HiLoad 16/60 Superdex S200pg	(Amersham Pharmacia)
Superdex 10/300 S75analytic	(Amersham Pharmacia)
HiPrep 16/10 Heparin FF	(Amersham Pharmacia)
GST Sepharose FF	(Amersham Pharmacia)
Buthyl Separose FF	(Amersham Pharmacia)
MonoQ	(Amersham Pharmacia)
MonoS	(Amersham Pharmacia)
Ni-NTA-Agarose	(Qiagen)

2.9. Bakterien Kultur Medium

Luria Bertani (LB)	5 g/l Hefe Extrakt	pH 7.0
	10 g/l Trypton	
	10 g/l NaCl	
2YT	10 g/l Hefe Extrakt	pH 7.0
	16 g/l Trypton	
	5 g/l NaCl	

Minimal Medium	0.5 g/l NaCl 1.3 ml/l Spurenelemente Lsg., 1 g/l Zitronensäuremonohydrat 36 mg/l Eisencitrat 4.02 g/l KH_2PO_4 7.82 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ 1 ml/l Zn-EDTA Lsg. 1 g/l $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ oder 1 g/l $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$	pH 7.0
Selektiv markiertes Minimal Medium	400 mg Ala, Gln, Glu, Arg, Gly 255 mg Asp, Met 125 mg Cytosine, Guanosine, Uracil 100 mg Asn, Leu, His, Lys, Pro, Thr, 100 mg Try 400 mg Ile, Val 50 mg Phe, Thymine, Thymidine 1.6 g Ser 0.5 g/l NaCl 1.3 ml/l Spurenelemente Lsg., 1 g/l Zitronensäuremonohydrat 36 mg/l Eisencitrat 4.02 g/l KH_2PO_4 7.82 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ 1 ml/l Zn-EDTA Lsg.	pH 7.0

2.10. Lösungen

MgSO ₄	1 M in ddH ₂ O (sterilfiltriert)
Zn-EDTA Lsg.	5 mg/ml EDTA 8.4 mg/ml Zn(Ac) ₂
Spurenelemente Lsg.	2.5 g/l H ₃ BO ₃ 2.0 g/l CoCl ₂ xH ₂ O

	1.13 g/l $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	9.8 g/l $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	2.0 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Thianmin	1% (w/v) in ddH ₂ O (sterilfiltriert)
Glukose	20% (w/v) in ddH ₂ O (autoklaviert)
Ampicilin	100 mg/ml in ddH ₂ O (sterilfiltriert)
Chloramphenicol	36 mg/ml in Ethanol (sterilfiltriert)
Kanamycin	100 mg/ml in ddH ₂ O (sterilfiltriert)
IPTG	1 M in ddH ₂ O (sterilfiltriert)

2.11. Puffer

PBS	140 mM NaCl	pH 7.3
	2.7 mM KCl	
	10 mM Na_2HPO_4	
	1.8 mM NaH_2PO_4	
GST-TAG Reinigung		
Elutionspuffer	50 mM Tris HCl	pH 8.0
	10 mM Glutathion (reduziert)	
PrecisionProtease-Puffer	50 mM Tris HCl	pH 7.0
	150 mM NaCl	
	1 mM EDTA	
	1 mM DTT	

HIS-TAG Reinigung

Lysis-Puffer (Ni-NTA)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM β-ME	pH 8.0
Wasch-Puffer (Ni-NTA)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM β-ME 10 mM Imidazol	pH 8.0
Elutions-Puffer (Ni-NTA)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM β-ME 250 mM Imidazol	pH 8.0
Lysis-Puffer (Ni-NTA) (Denaturierend)	6 M Guanidinium HCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris HCl 10 mM β-ME	pH 8.0
Wasch-Puffer (Ni-NTA) (Denaturierend)	6 M Guanidinium HCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris HCl 10 mM β-ME	pH 6.3
Elutions-Puffer (Ni-NTA) (Denaturierend)	6 M Guanidinium HCl 100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris HCl 10 mM β-ME	pH 4.5

MDM2 Puffer

Solubilisierungs Puffer	6 M Guanidinium HCl	pH 8.0
	100 mM Tris HCl	
	1 mM EDTA	
	10 mM DTT	

Dialyse Puffer	4 M Guanidinium HCl	pH 3.5
	10 mM DTT	

Faltungs Puffer	10 mM Tris HCl	pH 7.0
	1 mM EDTA	
	10 mM DTT	

Buthysepahrose Bindungs Puffer	10 mM Tris HCl	pH 7.0
	1 mM EDTA	
	10 mM DTT	
	1.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	

Elutions Puffer	100 mM Tris HCl	pH 7.2
	5 mM DTT	

Gelfiltrations Puffer	50 mM KH ₂ PO ₄	pH 7.4
	50 mM Na ₂ HPO ₄	
	150 mM NaCl	
	5 mM DTT	

SDS-PAGE

SDS-Ladepuffer	200 mM Tris-HCl	pH 6.8
	8% (w/v) SDS	
	40% (w/v) Glycerin	
	0.4% Bromophenol blau	

SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl 250 mM Glycin 0.1% (w/v) SDS	
SDS-Sammelgelpuffer	0.5 M Tris/HCl	pH 6.8
SDS-Trenngelpuffer	1.5 M Tris/HCl	pH 8.8
Färberlösung	45% Ethanol 10% Essigsäure 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue	
Entfärberlösung	5% Ethanol 10% Essigsäure	
DNA Reinigung		
50xTAE-Puffer	2 M Tris/HCl 1 M Essigsäure 0.1 M EDTA	pH 8.1
Ethidiumbromid-Lsg.	TAE Puffer mit Ethidiumbromid 1 mg/ml	

3. METHODEN

3.1. Gentechnische Methoden

3.1.1. Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation wurde mit den Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Für die Analyse von Klonen und für kleinere Plasmidmengen wurden Zellsuspensionen von ca. 2-5 ml einer Übernachtskultur verwendet. Für größere Mengen an DNA wurde das Volumen entsprechend angepasst. Der Zellaufschluß erfolgt durch alkalische Lyse mit Natronlauge und SDS (Birnboim & Doly, 1979). Bei diesen Bedingungen werden Proteine, chromosomale und plasmidische DNA denaturiert. RNA wird durch Zusatz von RNase A verdaut. Nach der alkalischen Lyse wird die Lösung neutralisiert und auf eine hohe Ionenstärke eingestellt. Durch die Salzkonzentration werden denaturierte Proteine, chromosomale DNA, Zelltrümmer und SDS gefällt, während die kleinere Plasmid-DNA in Lösung verbleibt. Der Niederschlag wird durch Zentrifugation abgetrennt. Der klare Überstand mit der löslichen Plasmid-DNA wird auf Silikagel Säulen aufgetragen. Bei hohen Salzkonzentrationen bindet das Plasmid an das Silikagel (Sambrook et al., 1989). Nichtgebundene Bestandteile werden in Waschschritten entfernt und das Plasmid mit 30-50 µl Wasser eluiert (Bild 8).

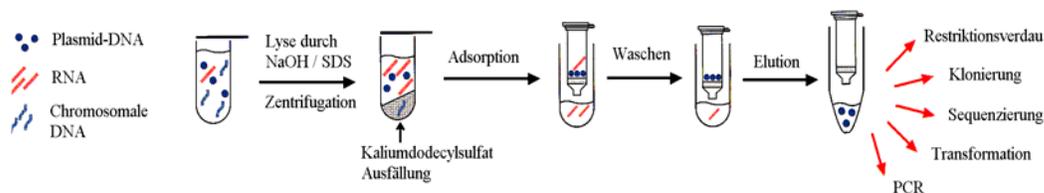


Bild 8 Schema der Plasmidreinigung

3.1.2. Ethanolfällung

Um eine höhere Reinheit der Plasmide zu erreichen oder doppelsträngige Oligos von einzelsträngigen abzutrennen, wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurde der Plasmidlösung mit 1/50 des Volumens mit 3 M NaAc pH 5.2 und mit dem 2.5fachen Volumen mit Ethanol versetzt. Die Proben wurden bei -80°C mindestens 1 h gelagert, wobei die DNA gemeinsam mit den Natriumionen gefällt wurde (Geckeler, 1998; Sambrook et al., 1989). Die DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert ($14000 \times g$, 4°C) und

mit 70% Ethanol (-20°C) vorsichtig gewaschen. Die Proben wurden ein zweites Mal zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Plasmid im Vakuum unter Rotation getrocknet. Die trockene DNA wurde in 20 µl deionisiertem H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert

3.1.3. Agarosegelelektrophorese

Agarose ist ein lineares Polysaccharid aus alternierenden 1,3- verknüpften β-D-Galactopyranose und 1,4- verknüpften 3,6-Anhydro-α-L-galactopyranose Resten. Agarose löst sich beim Erhitzen in Wasser und bildet beim Abkühlen ein dreidimensionales Netzwerk mit je nach Agarosekonzentration unterschiedlich großen Poren. Der mittlere Durchmesser der Poren beträgt bei einem 1 % Gel ca. 150 nm. Üblicherweise werden Gele von 0.3 – 3 % Agarose verwendet. Die Trennung von hochmolekularen Nukleinsäuren erfolgt nach dem Prinzip der kontinuierlichen Zonenelektrophorese in horizontalen Flachbettgelen. Über einen weiten Bereich besteht eine umgekehrte Proportionalität zwischen dem Logarithmus der Molekularmasse und der elektrophoretischen Mobilität. Die Größe eines Fragments kann somit im Vergleich mit *BstE* II verdauter λ-Phagen DNA bzw. einem synthetischen Kilobasen-Standard bestimmt werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass ringförmig entspannte (*open circular*) eine geringere und ringförmig überspiralisierte (*supercoiled*) DNA eine größere elektrophoretische Mobilität als lineare DNA aufweisen (Pingoud und Urbanke, 1997).

Für die Gele wurde die Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und vollständig gelöst. Das verfestigte Agarosegel wurde in eine Flachbett-Elektrophoreseapparatur gelegt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit mindestens 50% (v/v) Probenpuffer vereinigt und in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese lief ca. 45 min bei einer konstanten Stromstärke von 120 mA. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt. Aufgrund der planaren Struktur kann Ethidiumbromid in die DNA interkalieren. Der interkalierte Farbstoff kann durch UV-Licht (254-366 nm) angeregt werden und emittiert im orange-rotem Bereich (590 nm) (Sharp et al., 1973). Aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten des Standards mit den Proben kann die ungefähre Konzentration der Proben abgeschätzt werden. Die Gele wurden auf einer Geldokumentationsanlage bei 312 nm belichtet und mit einer digitalen Videokamera photographiert.

3.1.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus TAE-Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Gelextraktions-Kit der Firma Qiagen. Aus dem Agarosegel ausgeschnittene, die gewünschten DNA-Fragmente enthaltenden Gelstücke, wurden dazu im 3-4 fachen Volumen einer 6 M NaI-Lösung bei 55° C aufgelöst und die gelösten DNA Stücke an die Säulen gebunden, gewaschen und die DNA mit Wasser oder Elutionspuffer eluiert.

3.1.5. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration der DNA wurde mittels der Absorption bei 260 nm abgeschätzt.

3.1.6. Klonierung

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die in der Lage sind, doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungsstellen zu binden und zu spalten. Man unterscheidet drei Typen von Restriktionsenzymen. Die in der Analytik verwendeten Restriktionsenzyme gehören in der Regel dem Typ II an. Im Gegensatz zu Typ I und Typ III spalten sie die DNA innerhalb ihrer definierten Erkennungssequenz. Es entstehen DNA-Fragmente mit definierten Enden. Die Erkennungssequenzen sind zwischen 4-8 Nukleotide lang und meist palindromisch aufgebaut. Bei der Spaltung der DNA können entweder stumpfe Enden (*blunt ends*) oder kohäsive Enden (*sticky ends*) entstehen, bei denen entweder das 5'- oder das 3'-Ende der Fragmente überstehen kann.

Für analytische Restriktionsverdau wurden ca. 0.2 – 0.5 µg Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen im vom Hersteller empfohlenen Puffer 1 h lang bei 37°C inkubiert. (Einzelne Restriktionsendonukleasen erforderten eine Inkubation bei anderen Temperaturen. Bei Restriktionsschnittstellen an den Enden von PCR-Fragmenten erfolgte der Verdau über Nacht). Pro mg Plasmid-DNA und pro Schnittstelle im Plasmid wurden ca. 3 Units der Restriktionsendonuklease verwendet. Die Restriktionsverdau wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Die Religation von Vektor-DNA, die zuvor mit Restriktionsendonukleasen geschnitten wurde, kann durch Entfernung der 5'-Phosphatgruppen an den freien DNA-Enden verhindert werden (Sambrook et al., 1989). Hierzu wurde die geschnittene Vektor-DNA mit ca. 5 Units Kälberdarmphosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*, CIAP) pro mg DNA 1 h lang bei

37° C im mitgelieferten Puffer inkubiert. Danach wurde die geschnittene und dephosphorylierte Vektor-DNA durch einen *GeneClean*-Schritt gereinigt.

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase (Sambrook et al., 1989). DNA-Ligase katalysiert unter Verwendung von doppelsträngiger DNA als Templat und unter Verbrauch von ATP die Synthese von 5'-3'-Phosphodiesterbindungen. Geschnittene vektorielle DNA (Vektorfragmente) und zu klonierende cDNA-Fragmente (Inserts) wurden in einem molaren Verhältnis von ca. 1:3 gemischt und in T4-DNA-Ligasepuffer mit T4-DNA-Ligase 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Ligation von doppelsträngigen, phosphorylierten Oligonukleotiden wurde je nach später gewünschter Kopienzahl im Vektor ein 3- bis 12-facher molarer Überschuss des Oligonukleotids gegenüber dem Vektor eingesetzt. Ein typischer Ligationsansatz hatte folgende Zusammensetzung (Tabelle 3):

Tabelle 3 Ligationsansatz

Reagenz	Menge
geschnittenes Vektorfragment	ca. 50 ng
geschnittenes Insert oder doppelsträngiges Oligonukleotid	ca. 3-facher molarer Überschuss ca. 3- bis 12-facher molarer Überschuss
T4-DNA-Ligasepuffer (10x)	2 µl
T4-DNA-Ligase (2 U/ml)	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

3.1.7. Klonierung mit LIC

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Expressionsolasmiden mit dem gewünschten Insert war über die LIC-Methode (*Ligase independent cloning*) der Firma Novagen. Die Methode beruht auf einer zielgerichteten Klonierung von PCR Produkten ohne der Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligasen. Die LIC Methode verwendet die 3'→5' Exonuclease Aktivität der T4-DNA Polymerase um sehr spezifische 12- bis 15- Basen-Einzelstrang-Überhänge im Vektor zu erschaffen. PCR Produkte mit komplementären Überhängen werden durch das Anhängen von passenden Überhängen in den Primern erzeugt. Die gereinigten PCR Produkte werden mit T4 Polymerase in Anwesenheit von dATP bzw. dGTP behandelt, um die entsprechenden Überhänge zu erzeugen. Nach dem Annealing wird der Vektor mit dem Insert direkt in Bakterien transformiert. Die kovalente Verknüpfung findet in den Bakterien statt. Tabelle 4 und 5 zeigt den Ansatz für die Polymerase Reaktion

sowie für die Annealing Reaktion. (Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in den Protokollen der Firma Novagen.)

Tabelle 4 T4 Polymerase Reaktion

Reagenz	Menge
PCR Produkt	ca. 0.2 pmol
10x T4 DNA Polymerase Puffer	2 µl
25 mM dGTP oder dATP	2 µl
100 mM DTT	1 µl
2.5 U/µl T4 DNA Polymerase	0.4 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl
30 min 22°C, 20 min 75° C	

Tabelle 5 Annealing Reaktion

Reagenz	Menge
LIC-Vektor	1 µl
T4 Polymerase behandeltes Insert	2 µl
5 min 22° C	
25 mM EDTA	1 µl
5 min 22° C	

3.1.8. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1988; Sambrook *et al.*, 1989). Über die PCR-Primer können dabei neue Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in das amplifizierte DNA-Fragment eingeführt werden, die der Subklonierung des PCR-Produkts dienen (PCR-Klonierung). PCR kann auch zur Einführung von Mutationen in DNA-Sequenzen eingesetzt werden. Eine typische PCR zur Amplifikation von cDNA-Sequenzen hatte folgende Zusammensetzung (Tabelle 6):

Tabelle 6 PCR Ansatz

Reagenz	Menge
Templat-DNA (1 ng/ μ l)	1 μ l
Primer 1 (20 pmol/ml)	1 μ l
Primer 2 (20 pmol/ml)	1 μ l
dNTPs (je 10 mM)	1 μ l
Vent-Polymerase-Puffer (10x)	2 μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l
Vent TM -Polymerase (2 U/ μ l)	1 μ l

Das PCR-Protokoll richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden cDNA-Abschnitts und den Annealingtemperaturen der verwendeten PCR-Primer. Die jeweilige Annealingtemperatur (T_a) wurde nach der Formel $T_a = \text{Anzahl(G/C)} \times 4^\circ\text{C} + \text{Anzahl(A/T)} \times 2^\circ\text{C}$ abgeschätzt. Eine typische PCR hatte folgendes Verlaufsprotokoll (Tabelle 7):

Tabelle 7 Verlaufsprotokoll

Zyklus	Funktion	Temperatur	Zeit
1 Zyklus:	Denaturierung	94° C	3 min
25 Zyklen	Denaturierung	94° C	1 min
	Annealing	60°- 74° C	1 min
	Extension	72° C	1 min pro kb DNA
1 Zyklus:	Extension	72° C	6-10 min
Kühlung auf 4° C			

3.1.9. Entwurf der *Primer*

Die Primer für die verschiedenen Konstrukte wurden so gestaltet, dass sie eine Annealingtemperatur von ca. 65-70°C hatten. Entsprechend der Methode der später verwendeten Klonierung wurden Überhänge für Restriktionsenzyme oder Überhänge für die LIC-Methode angehängt.

Die *Primer* für die QuikChangeTM-Methode sollten nach Angaben der Firma Stratagene zwischen 25-45 Basen lang sein und einen GC Gehalt von mindestens 40 % aufweisen. Die Mutation sollte etwa in der Mitte liegen, damit zu beiden Enden 10-15 korrekt gepaarte Basen vorhanden sind und idealerweise auf ein oder mehrere Guanine oder Cytosine enden. Die Schmelztemperatur T_m , sollte größer oder gleich 78°C sein.

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\% GC) - \frac{675}{N} - [\% Fehler]$$

N = Anzahl der Basen; % Fehler = Anteil der fehlgepaarten Basen

Für die Mutagenese sind notwendigerweise zwei *Primer*, einer für den Codierenden- und einer für den Matrizenstrang, nötig. Die *Primer* sind im Kernbereich komplementär, können jedoch überhängende Enden oder eine unterschiedliche Länge aufweisen.

Für die Sequenzierung wird nur ein *Primer* benötigt. Dieser sollte zwischen 15-20 Basen lang sein und der Schmelzpunkt sollte zwischen 50°-60°C liegen. Die Bindungsstelle des Sequenzprimers sollte ungefähr 60-100 Basen vom 5'-Ende der zu untersuchenden Stelle entfernt sein. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) hergestellt.

3.1.10. Mutagenese

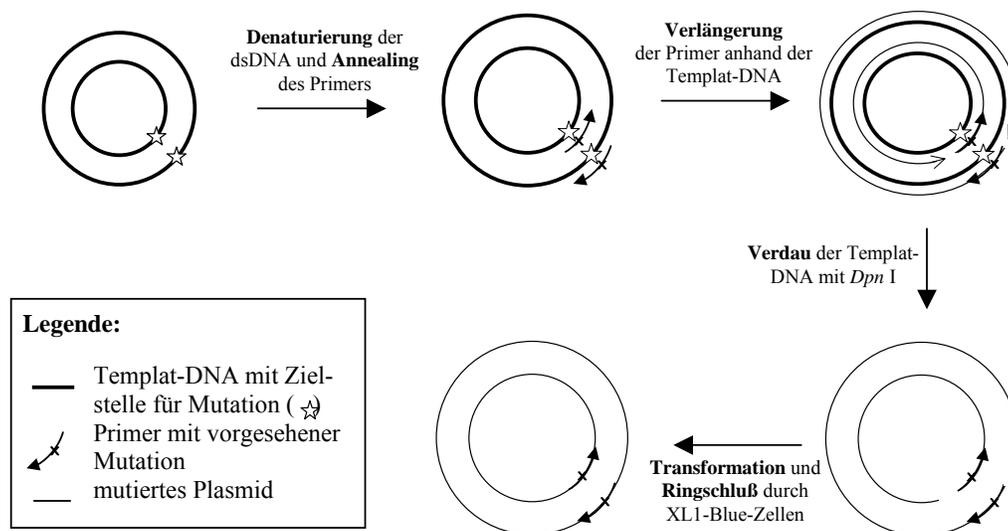
Mit der ortsgerichteten Mutagenese können gezielt einzelne oder mehrere Nukleotide innerhalb eines DNA Strangs verändert werden. Die verwendete Methode (QuikChange™, Fa. Stratagene) ist in Bild 9 schematisch dargestellt. Im ersten Schritt wird die dsDNA in ssDNA bei 95°C aufgeschmolzen. Im zweiten Schritt kommt es bei einer niedrigeren Temperatur zum *annealing* der *Primer* mit der gewünschten Mutation an die elterliche ssDNA. Von diesem *Primer* wird, in einem dritten Schritt, durch eine thermostabile DNA-Polymerase, die Matrize repliziert. Der zweite Zyklus beginnt wieder mit Schritt eins. Um eine Amplifizierung der neu gebildeten DNA zu erreichen werden mehrere Zyklen hintereinander durchlaufen. Im letzten Schritt wird die *templat* DNA, die teilweise methylierte Nukleotide besitzt, mit *Dpn* I verdaut. *Dpn* I schneidet nur methylierte DNA. Die neu hergestellte DNA ist nicht methyliert und wird daher nicht hydrolysiert. Zuletzt wird die DNA transformiert und in den Zellen zum zirkulären Plasmid ligiert. Die benötigten Lösungen und Enzyme wurden nach den Angaben der Firma Stratagene in dünnwandige 200 µl PCR-Reaktionsgefäße pipettiert (Tabelle 8). Das Temperaturprogramm wurde ebenfalls unverändert übernommen (Tabelle 9).

Tabelle 8 Mutageneseansatz nach QuikChange™

Reagenz	Menge
10x Reaktionspuffer	5 µl
dsDNA Templat	0.5-1 µl
Primer 1 125 ng/µl	1 µl
Primer 2 125 ng/µl	1 µl
dNTP	1 µl
ddH ₂ O	41-41.5 µl
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase	1 µl

Tabelle 9 Temperaturprogramm nach QuikCange™

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95° C	30 s
2	12-18	95° C	30 s
		55° C	60 s
		68° C	120 s pro kb des Plasmids

**Bild 9** Ortsgerichtete Mutagenese nach der QuikChange™-Methode (Stratagene)

Nach dem *Dpn* I Verdau wurde der Erfolg der PCR mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft und das PCR-Produkt in superkompetente *Escherichia coli*® XL1-blue Zellen nach dem Protokoll der Firma Stratagene transformiert und auf LB-Agar Platten mit dem

entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Von den über Nacht gewachsenen Kolonien wurden drei bis fünf für eine Plasmidpräparation gepickt.

3.1.11. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der Firma Medigenomix und der CoreFacility des Max-Planck Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

3.2. Proteinpräparation

3.2.1. Kompetente Bakterien

Kompetente *E. coli* wurden nach dem folgendem Protokoll hergestellt: 150 ml LB-Medium wurden mit 1.5 ml einer *E. coli* –Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von etwa 0.6 inkubiert. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt und anschließend 10 min bei 4°C zentrifugiert (4000 rpm). Das Pellet wurde in 15 ml eisgekühltem TSB Medium resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden in Aliquots zu 50-100 µl bei -80°C eingefroren.

3.2.2. Transformation

Mit der Transformation können Plasmide in kompetente, prokaryotische Zellen eingebracht werden. Zur Transformation durch Hitzeschock wurden 50 µl der kompetenten Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1-2 µl Plasmidlösung oder 10 µl Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 90 s einen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, 2 min auf Eis gestellt und auf LB-Platten ausgestrichen.

3.2.3. Bakterienkultivierung

Zur Bakterienkultivierung wurde eine 10-20 ml LB-Vorkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum in einem 50 mL Kulturröhrchen unter sterilen Bedingungen mit einer Einzelkolonie beimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37° C und 150-200 rpm im Brutschrank inkubiert. Je 5 bis 10 ml der Zelllösung wurde in 1000 ml LB-Medium (bzw. 2YT-Medium) in 3 l Erlenmeyerkolben unter sterilen Bedingungen überführt. Die Kulturen wurden im Luftschüttler bei 37°C und 150-200 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{600nm} von 0,8 AU wurden die Bakterien mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Die Induktionszeit richtete sich nach den unterschiedlichen Proteinen und Konstrukten und variierte daher von 18° C über Nacht bis 37° C für 3 Stunden. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation. Bei der Aufzucht von Bakterien in Minimal Medium wurde eine 10-20 ml über Tag LB-Vorkultur angezogen. Ca. 100 µl der LB-Kultur wurden in 100 ml Minimal Medium für eine Über-Nacht Kultur übertragen. Die Über-Nacht Kultur wurde auf 1000 ml Minimal Medium ergänzt und die Kultur wie oben beschrieben weiterbehandelt.

3.2.4. Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Dabei wird das elektrische Signal eines Hochfrequenzgenerators auf einen Metallstab übertragen, der in mechanische Schwingungen versetzt wird. Die dadurch erzeugten Schwingungen im Ultraschallbereich führen zum Aufbrechen der Bakterienzellen. Für einen besseren Abbau der Zellwand wurde der Bakteriensuspension Lysozym und gegen Proteasen PMSF (Sigma) bzw. *Complete Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) zugesetzt. Die resuspendierte Bakterienlösung wurde dabei in speziellen Glasrosetten auf Eis gehalten, um die beim Ultraschall entstehende Wärmeenergie abführen zu können. Der Resuspensionspuffer richtete sich nach der jeweils folgenden Weiterverarbeitung des Bakterienlysates. Die Beschalldauer betrug sechs Zyklen mit jeweils einer Minute Ultraschall und zwei Minuten Pause, um eine Überhitzung der Probe zu verhindern. Bei Proteinen, die als *inclusion bodies* exprimiert wurden, wurden teilweise längere Beschalldauern gewählt, da die Gefahr einer Denaturierung nicht gegeben war.

3.2.5. Affinitäts-Chromatographie

Die meisten Proteinkonstrukte hatten einen Affinitäts-TAG und wurden daher zur ersten Reinigung über die Affinitäts-Chromatographie Säulen gereinigt. Affinitäts-TAGs haben den Vorteil, dass in nur einem einzigen Reinigungsschritt der größte Teil an Verunreinigungen abgetrennt werden kann. Die verwendeten Vektoren zur Expression von Fusionsproteinen hatten eine Protease-Schnittstelle, mit der es möglich war, bei Bedarf den TAG abzuspalten. Es wurden drei unterschiedliche Affinitäts-Chromatographie Verfahren verwendet.

3.2.5.1. Glutathion Sepharose FF

Glutathion S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* ist ein 26 kDa Protein, das in *E. coli* mit hoher Effizienz exprimiert werden kann. Fusionsproteine, die die komplette Aminosäuresequenz von GST haben, zeigen ebenfalls die enzymatische Aktivität von GST und neigen ebenso zur Dimerisierung. GST-Fusionsproteine werden von Bakterienlysate mit Affinitäts-Chromatographie über immobilisiertes Glutathion gereinigt. Die GST-Fusionsproteine binden an das Medium und Verunreinigungen werden im Waschschrift entfernt. Die Elution erfolgt über milde, nicht denaturierende Bedingungen mit reduziertem Glutathion. (*GST Fusion System*, Amersham Biosciences)

Die GST-Fusionsproteine wurden über GST-Sepharose FF (Amersham Pharmacia) gereinigt. Als Chromatographie System wurde das *BioLogic LB* System von Biorad verwendet.

3.2.5.2. Ni-NTA (*Nitrilotriacetic acid*)

Bei der immobilisierten Metalchelate Affinitäts Chromatographie (*immobilized-metal affinity chromatography* IMAC) ist eine metallchelatierende Gruppe am Säulenmaterial gebunden. An diese Gruppen wird ein Übergangsmetallion so gebunden, dass ein bis zwei Koordinationsstellen zur Bindung von basischen Gruppen von Proteinen frei bleiben. Aminosäurereste an der Oberfläche von Proteinen, vor allem Histidine, binden an die freien Koordinationsplätze. (F.Lottspeich, JW. Engels, Bioanalytik 2006). Für die Reinigung von Proteinen mit IMAC wurden 6xHIS TAG Fusionsproteine exprimiert. Durch die sechs Histidine wird eine hohe Affinität zum Säulenmaterial erreicht. Als Säulenmaterial wurde Ni-NTA (Nitrilotriessigsäure, *Nitrilotriacetic acid*) der Firma Qiagen verwendet. NTA besetzt vier der sechs Koordinationsstellen eines Nickelions. Die Elution erfolgt in Anwesenheit hoher Konzentrationen an Imidazol, das mit dem Protein um die Koordinationsplätze am Nickelion konkurriert. Als Chromatographie System wurde das *BioLogic LB* System von Biorad verwendet.

3.2.5.3. Heparin Säule

Die Reinigung von Proteinen über Heparin ist im Prinzip ebenfalls ein Chromatographie-Verfahren, das auf Affinität beruht. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen wurde hier kein Fusionsprotein benötigt. Heparin ist ein hoch sulfatiertes Glycosaminoglycan, das eine breite Spezifität für DNA bindende Biomoleküle wie DNA-Ligasen, Initiations- und Elongationsfaktoren, DNA- und RNA-Polymerasen sowie einigen weiteren Biomolekülen wie Hormonrezeptoren und Wachstumsfaktoren. Heparin kann auf zweierlei Art mit Proteinen wechselwirken. Bei der Interaktion mit DNA bindenden Proteinen ahmt Heparin die polyanionische Struktur der Nucleinsäure nach. Im zweiten Fall, der Interaktion mit Coagulations Faktoren wie z.B. Antithrombin III fungiert Heparin als ein Affinitätsligand. In beiden Fällen kann durch Erhöhung der Ionenstärke die Wechselwirkung zwischen Heparin-Matrix und Protein geschwächt werden (*Affinity Chromatography, Principles and Methods*, Amersham Biosciences). Die Heparinsäule (HiPrep 16/10 Heparin FF, Amersham Pharmacia) wurde zur Reinigung von p53 mit funktionaler DBD eingesetzt.

3.2.6. Gelpermeations-Chromatographie

Bei der Gelfiltration werden Moleküle in Lösung nach ihrer Größe getrennt. Das Chromatographiemedium ist ein Gel, d.h. ein Zwei-Phasen System aus einer flüssigen, in der Regel wässrigen, Phase und einer festen Phase, der Gel-Matrix. Gele für Gelfiltration haben einen definierten Porengrößen-Bereich, sind gegenüber physikalischen Einflüssen sehr stabil und chemisch inert. Die Gele werden durch Quervernetzung von Polymeren hergestellt. Die Poren in der Gelmatrix, die mit der flüssigen Phase gefüllt sind, sind in Größe vergleichbar mit den zu trennenden Proteinen. Kleine Moleküle können in die Poren eindiffundieren, während größere Moleküle nicht im gleichen Umfang in die Poren eindringen können und daher weniger stark retardiert werden. Genügend große Moleküle können schließlich nicht mehr in das Gel eindiffundieren und sind auf die umgebende Lösung beschränkt. Die verwendeten Säulen sowie ihre Spezifikation sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10 Gelpermeations-Chromatographie

	S75 (26/60)	S75 (16/60)	S75 (Analytic)	S200(16/60)
Säulenmaterial	Superdex 75 prep grade	Superdex 75 prep grade	Superdex 75 prep grade	Superdex 200 prep grade
optimaler Trennbereich	10-70 kDa	10-70 kDa	10-70 kDa	10-600 kDa
Säulendurchmesser	26 mm	16 mm	10 mm	16 mm
Säulenhöhe	60 cm	60 cm	30 cm	60 cm
Gelvolumen	320 ml	120 ml	24	120 ml
Auftragsvolumen	1-10 ml	1-8 ml	100-500 µl	1-8 ml
Äquilibrium	1.2 Vt	1.2 Vt	1.2 Vt	1.2 Vt
Fluß	1 ml/min	1 ml/min	1 ml/min	1 ml/min
Elutionsvolumen	1.5 Vt	1.5 Vt	1.5 Vt	1.5 Vt
Fraktionsvolumen	1-2 ml	1-2 ml	100-250 µl	1-2 ml
Detektion	280 nm	280 nm	280 nm	280 nm

3.2.7 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

In hohen Salzkonzentrationen binden die unpolaren Oberflächen eines Proteins an die schwach hydrophoben Liganden einer stationären Phase. Dabei wird die Eigenschaft ausgenutzt, dass Proteine in einer nicht denaturierenden Salzkonzentration zu Aggregaten neigen und es neben Protein-Protein Kontakten zu Protein-Matrix Kontakten kommt. Die hohe Salzkonzentration bewirkt eine erhöhte Oberflächenspannung, wodurch die Wasserhülle

um die Proteine verringert wird und hydrophobe Bereiche auf der Proteinoberfläche aneinander kleben können. Das für die hydrophobe Interaktions-Chromatographie verwendete Salz richtet sich nach der Hofmeister-Serie. Die Elution erfolgt durch Verringerung der Salzkonzentration (Lottspeich und Engels, 2006). Als stationäre Phase wurde Butyl-Sepharose FF (Amersham Pharmacia) und zum Binden der Proteine 1-1.5 M Ammoniumsulfat verwendet.

3.2.8. Konzentrierung der Proteinlösungen

Zur Konzentrierung der Proteinlösungen wurden Konzentratoren (Vivaspin) der Firma Vivascience verwendet. Die Proteinlösungen wurden bei 3000*g durch eine feinporige Membran filtert (Ultrafiltration), die nur Moleküle durchlässt, die kleiner als 3 kDa bzw. 10 kDa sind. Größere Volumina wurden über Stickstoffdruck in Amiconzellen konzentriert. Hier wird die Proteinlösung über Stickstoffdruck in Rührzellen durch 3 kDa oder 10 kDa Membranen gedrückt.

3.3. Analytik

3.3.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration einer gereinigten, homogenen Proteinlösung lässt sich über die Messung der Absorption des Proteins bei 280 nm bestimmen. Wenn die Aminosäuresequenz bekannt ist, kann unter Zugrundelegung der durchschnittlichen molaren Extinktionskoeffizienten für Tryptophan, Tyrosin, und Cystin der ϵ_{280} nach folgender Formel berechnet werden (Gill und von Hippel, 1989).

$$\epsilon_{280} [M^{-1}cm^{-1}] = n_{Trp} \cdot \epsilon_{Trp} + n_{Tyr} \cdot \epsilon_{Tyr} + n_{Cystine} \cdot \epsilon_{Cystine}$$

n_{AS} = Anzahl der AS bzw. Disulfidbrücken im Protein

$$\epsilon_{Trp} = 5500 M^{-1}cm^{-1}, \epsilon_{Tyr} = 1490 M^{-1}cm^{-1}, \epsilon_{Cystine} = 125 M^{-1}cm^{-1}$$

Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich für die Konzentration:

$$c \left[\frac{mg}{ml} \right] = \frac{A_{280} \cdot M_r}{\epsilon_{280} \cdot d}$$

d = Schichtdicke (1cm)

Zum Abschätzen der Proteinkonzentration und für Proteinkonstrukte ohne Tryptophane und Tyrosine wurde das Reagenz BIO-RAD Protein Assay der Firma BIO-RAD verwendet. Die beim Mischen der Proteinlösung mit dem Reagenz entstehende Blaufärbung wurde gegen eine Standardkurve mit bekannten Proteinkonzentration verglichen und daraus die Konzentration ermittelt.

3.3.2. SDS Gelelektrophorese

In einem Polyacrylamidgel können Proteine durch Elektrophorese nach Größe und Ladung getrennt werden. Ein Polyacrylamidgel läßt sich durch Reaktion von Acrylamid ($H_2C=CH-CONH_2$) und N,N'-Methylenbisacrylamid ($H_2C=CH-CONH-CH_2-NHCO-CH=CH_2$) mit dem Katalysator Tetramethylethylendiamin ($(H_3C)_2N-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$) und dem Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat in wässriger Lösung herstellen. Durch Variation des

Mengenverhältnisses von Acrylamid zu Bisacrylamid kann der Vernetzungsgrad des Gels beeinflusst werden.

Die Proteine binden SDS (Natriumdodecylsulfat $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{-O-SO}_3^-\text{Na}^+$) in einem Massenverhältnis von 1 zu 1,4. Dadurch wird die eigene Ladung der Proteine maskiert und die Trennung erfolgt ausschließlich nach Größe. Ein Nachteil der Methode ist, dass durch SDS die Proteine denaturiert werden, Proteinkomplexe zerfallen in ihre Untereinheiten. Durch die Verwendung eines großporigen 6 % Sammelgels bei pH 6,8, wird eine Fokussierung der Proteinbanden erreicht und die Trennleistung verbessert (Righetti et al., 1990).

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine empfindliche Methode, mit der weniger als $1 \mu\text{g}$ Protein nachgewiesen werden kann. Der Nachweis der Proteine im SDS-Gel geschieht durch Anfärben mit *Coomassie Brilliant Blue*-Lösung. Der Farbstoff lagert sich ähnlich wie SDS an die Proteine an, wodurch diese blaugefärbt werden. Die Gele werden im Entfärber bis zum gutem Kontrast unter Schütteln entfärbt, zur Dokumentation photographiert und zwischen zwei Cellophanfolien an der Luft in einem Trockengestell getrocknet.

3.3.3. NMR Spektroskopie

Die kernmagnetischen Resonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR) nutzt die Tatsache aus, dass sich in einem homogenen Magnetfeld die Energieniveaus der Kernspins in mehrere Zustände aufspalten. Übergänge zwischen den Zuständen können durch die Einstrahlung einer elektromagnetischen Welle induziert werden. Die elektromagnetische Welle muss dabei die gleiche Energie besitzen, die dem Energieabstand der Spinzustände entspricht. Die Wechselwirkung findet dabei, im Gegensatz zu anderen spektroskopischen Methoden, mit der magnetischen Komponente der elektromagnetischen Welle statt.

3.3.3.1. 1D-Experiment

Jedes 1D-NMR-Experiment besteht aus zwei Phasen. In der ersten Phase, der Präparation wird das Spinsystem in einen definierten Zustand gebracht, in der zweiten Phase, der Detektion wird die „Antwort“ registriert. Die Präparation eines Spinsystems besteht im einfachsten Fall aus einem kurzen, starken Anregungspuls auf die Gleichgewichtsmagnetisierung M_z (ca. $10 \mu\text{s}$) aus der x-Richtung. Bei geeigneter Wahl der Pulsdauer wird die Magnetisierung von ihrer ursprünglichen Orientierung entlang der z-Achse vollständig zur y-Achse hin geklappt. Nach diesem 90° -Puls präzedieren die verschiedenen Kerne mit ihren unterschiedlichen Larmor-Frequenzen um die z-Achse und induzieren in

einer Empfängerspule eine Spannung, die registriert und abgespeichert wird. Die Spannung nimmt aufgrund der T_2 -Relaxation (Relaxation der relativen Phasen der Spins der Probe) ab und die aufgezeichneten Daten werden daher als FID (*free induction decay*, freier Induktionszerfall) bezeichnet. Nach einer kurzen Wartezeit kehrt das System wieder in den Grundzustand zurück und das Experiment kann wiederholt werden. Eine Pulssequenz für 1D Spektren ist in Bild 10 dargestellt. Durch Aufaddition der Experimente wird das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert. Eine Fourier-Transformation erzeugt aus der FID (Zeitdomäne) das Spektrum (Frequenzdomäne).

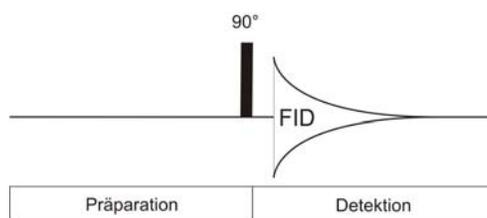


Bild 10 Pulssequenz für ein 1D Spektrum

3.3.3.2. Zweidimensionale NMR-Spektroskopie; das HSQC-Experiment

Die Interpretation eines 1D-Spektrums ist bei komplexeren Molekülen aufgrund der Überlappung der Signale unmöglich. Durch Einführung von weiteren spektralen Dimensionen können diese Überlappungen aufgelöst werden. Auf diese Weise kommt man zu 2D- und mehrdimensionalen Spektren.

Ein 2D-NMR-Experiment hat neben der Präparations- und Detektions-Phase noch zwei weitere Komponenten: Eine Evolutionszeit und eine Mischsequenz. Die Spins können nach der Präparation während einer festen Zeit t_1 frei präzedieren. Die Magnetisierung wird in dieser Zeit gleichsam mit der chemischen Verschiebung des ersten Kerns markiert. Durch die Mischsequenz wird anschließend zum einen der Zustand der Magnetisierung am Ende von t_1 abgefragt und zum anderen Magnetisierung vom ersten Kern auf einen anderen übertragen. Es gibt verschiedenen Mechanismen zur Übertragung der Magnetisierung: Die skalare Kopplung oder die dipolare Wechselwirkung. Den Abschluss des Experiments bildet die Datenaquisition, in der die Magnetisierung mit der chemischen Verschiebung des zweiten Kerns markiert wird. Nach der Fourier-Transformation erhält man ein gewöhnliches 1D-Spektrum, das eine Momentaufnahme bei gegebener Zeit t_1 darstellt. Die Einzelexperimente unterscheiden sich jeweils um einen Betrag Δt_1 . Durch eine weitere Fourier-Transformation entlang der t_1 Richtung entsteht das endgültige 2D-Spektrum. Neben den homonuklearen 2D-

NMR Experimenten kann die Magnetisierung auch auf einen Heterokern übertragen werden. Neben Wasserstoff enthalten Proteine auch noch ^{13}C und ^{15}N als magnetisch aktive Kerne. Die natürliche Häufigkeit dieser Kerne ist jedoch sehr gering und das gyromagnetische Verhältnis wesentlich kleiner als bei Wasserstoff. Daher werden, um die Empfindlichkeit zu steigern, isotopenangereicherte Proteine verwendet.

Das HSQC-Experiment (*heteronuclear single quantum coherence*) ist das wichtigste Experiment für den Übertrag von Magnetisierung von einem Proton auf ein Heteroatomkern und wieder zurück. In einem 2D-HSQC-Spektrum wird die Stickstofffrequenz (ω_1) mit der Frequenz des gebundenen Amidprotons (ω_2) innerhalb einer ^{15}NH -Gruppe verknüpft. Die Signale im Spektrum repräsentieren somit ein an ein ^{15}N -Atom gebundenes Proton, d.h. das Spektrum besteht im Wesentlichen aus den Signalen der H^{N} -Protonen des Proteinerückgrats und zusätzlich aus den Signalen der NH-Gruppen der Seitenketten der Aminosäuren Arginin, Glutamin, Histidin und Tryptophan. Prolin wird aufgrund des Fehlens eines HN-Protons als einzige Aminosäure nicht detektiert. Überlappende Amidprotonenresonanzen können durch die Entzerrung des Spektrums in die Stickstoffdimension deutlich getrennt dargestellt werden. Analoge Experimente lassen sich für ^{13}C und ^1H durchführen (Lottspeich und Engels, 2006). Das Pulsprogramm für ein ^1H - ^{15}N -HSQC Experiment ist in Bild 11 dargestellt.

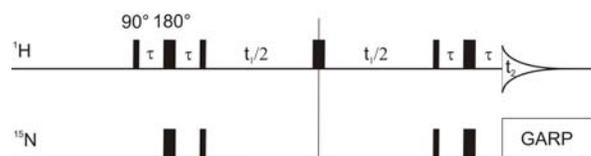


Bild 11 Pulssequenz für ein ^1H - ^{15}N HSQC Spektrum

3.3.3.3. Bindungsstudien mit HSQC Experimenten

Mit Hilfe des HSQC Experiments können Bindungsstudien betrieben werden. Dazu muss eine Komponente ^{15}N markiert sein. Diese wird in Titrationsexperimenten mit einer unmarkierten Probe gemischt. Falls die beiden Komponenten miteinander interagieren kommt es zu einer lokalen chemischen Verschiebung der bei der Bindung beteiligten Gruppen, was in einer Verschiebung des Peaks im HSQC Experiments sichtbar wird. Im Falle von ^{15}N markierten Proteinproben stammen die Peaks von den Aminosäuren und eine Verschiebung der Peaks zeigt direkt die Beteiligung der einzelnen Aminosäuren an der Bindung an. Sind die Peaks einzelnen Aminosäuren der Primärsequenz des Proteins

zugeordnet, kann auf diese Weise die Bindungsstelle im Protein exakt bestimmt werden. Bei der Bindung kann es prinzipiell zu zwei verschiedenen Bindungstypen kommen. Ist der Austausch zwischen Ligand und Protein sehr langsam, liegt eine starke Bindung vor. Bei der Titration des Liganden zur Proteinelösung liegen daher freies Protein und Protein/Ligand Komplex zusammen in der Lösung vor. Im HSQC Spektrum zeigt sich dies durch das Splitten der Peaks, d.h. es tritt neben dem ursprünglichen Peak ein zweiter an der Stelle des Komplexes auf. Die Intensität der zwei Peaks hängt daher von der Konzentration von freiem Protein und Protein/Ligand Komplex ab. Ist der Austausch zwischen Protein und Ligand sehr schnell, dann liegt eine schwache Bindung vor. Während des NMR-Experiments können die zwei Zustände, freies Protein und Protein/Ligand Komplex, nicht getrennt aufgelöst werden. Es kommt daher zu einem Wandern des Peaks vom Ausgangspunkt zum Endpunkt. Die Intensität ändert sich dabei nicht (Bild 12).

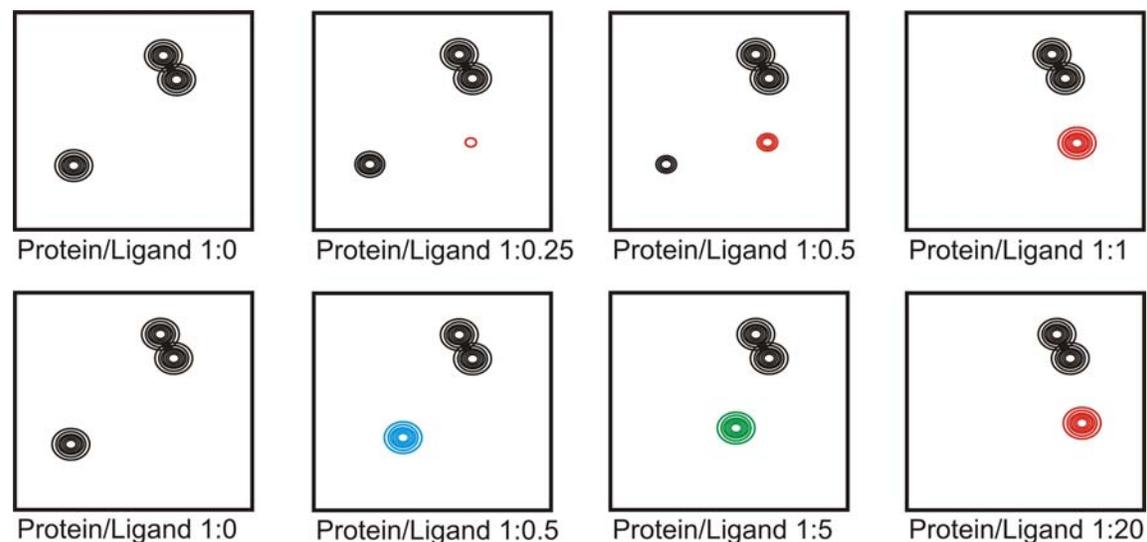


Bild 12 Schematische Darstellung eines HSQC Experiments. Obere Zeile: Titration mit einem starken Liganden. Der Peak in der unteren linken Ecke ist an der Bindung beteiligt und wird durch die Bindung des Liganden in zwei Signale aufgespalten. Bei einer Konzentration von 1:1 liegt ausschließlich der Protein/Ligand Komplex vor, freies Protein ist nicht mehr zu beobachten. Untere Zeile: Titration mit einem schwachen Liganden. Der Peak wandert bei Zugabe des Liganden von der Ausgangsposition zur Endposition. Je nach Verhältnis zwischen freien und gebundenen Protein ist der Peak näher am Ausgangspunkt oder am Endpunkt. Der Endpunkt wird, in diesem Beispiel, erst nach Zugabe eines 20 molaren Überschusses an Liganden erreicht. Die beiden Aminosäuren in der oberen rechten Ecke nehmen nicht an der Bindung teil und deren chemische Umgebung wird daher nicht verändert.

3.3.4. Isothermale Titrations Calorimetrie (ITC)

Isotherme Titrations-Kalorimetrie (ITC) beruht auf dem Effekt aller Wechselwirkungen, dass sie entweder Wärmeenergie verbrauchen oder erzeugen. Damit kann die Wechselwirkung von Protein bzw. Protein-Liganden experimentell untersucht werden. Die direkte Messgröße bei der ITC ist die Wärmemenge, die bei Zugabe einer Lösung eines Liganden zu einer Lösung eines Bindungspartners verbraucht bzw. erzeugt wird. Aus Ihr lässt sich unter anderem die Bindungsenthalpie, Stöchiometrie des gebildeten Komplexes sowie die Dissoziationskonstanten berechnen.

3.3.4.1. Aufbau der Messung

Das ITC Instrument ist aus zwei Zellen aufgebaut, einer Probenzelle, mit der zu untersuchenden Lösung und einer Referenzzelle (Bild 13). Die Temperatur beider Zellen wird während des Experiments konstant gehalten und die dafür benötigte Heizleistung stetig gemessen und aufgezeichnet. Durch Zugabe einer kleinen Menge einer Ligandenlösung zur Probenzelle wird durch die Bindungsenthalpie Wärmemenge verbraucht oder erzeugt, wodurch sich die Heizleistung, die die Probenzelle thermostatisiert, erhöht bzw. vermindert. Nach einiger Zeit ist die Wärmemenge ausgeglichen und die Heizleistung geht auf den Ausgangswert zurück. Danach kann eine erneute Injektion von Ligandenlösung zur Probenzelle gegeben werden und eine erneute Änderung der Heizleistung beobachtet werden.

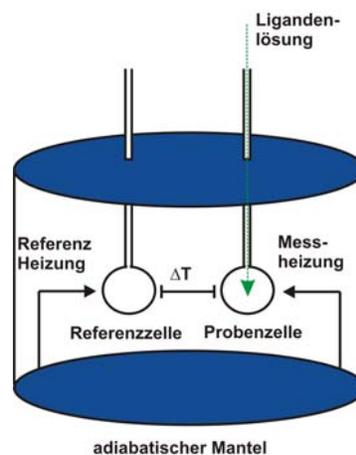


Bild 13 Schematische Aufbau einer ITC Messzelle

Idealerweise wird das Experiment so lange wiederholt, bis die Änderung der Heizleistung nur noch von der Verdünnungsenthalpie abhängt und kein Beitrag mehr von der Bindungsenthalpie beobachtbar ist. Wird am Ende des Experiments die Differenz der Heizleistung der beiden Zellen gegen die Zeit aufgetragen, ergibt sich ein typisches Signalmuster. Aus der Integration der Fläche der Signale kann die Wärmemenge bestimmt werden, die während der Zugabe der Ligandenlösung verbraucht oder erzeugt wurde. Daraus lassen sich weitere thermodynamische Parameter berechnen. Den Beitrag der Verdünnungsenthalpie erhält man durch Titration des Liganden zu einer Lösung ohne Bindungspartner. Ein typisches Experiment war wie folgt aufgebaut (Tabelle 11):

Tabelle 11 ITC-Experiment

Parameter	
Ligandenkonzentration	200-400 μM
Volumen der Ligandenlösung	400-600 μl
Bindungspartnerkonzentration	20-40 μM
Volumen der Bindungspartnerlösung	1430 μl
Temperatur	4°-20° C
Volumen der Injektion	5-15 μl
Anzahl der Injektionen	30-55
Zeit pro Injektion	10-12 s
Initiale Verzögerung	600 s

Die Messungen wurden am VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCal, Northampton, MA) ausgeführt. Alle Lösungen wurden vor Verwendung entgast. Die Datenauswertung wurde mit der vom Hersteller bereitgestellten ORIGIN(V5.0) Software durchgeführt.

3.3.5. Edman -Abbau

Der Edman Abbau ist eine Methode zur N-terminalen Sequenzierung von Proteinen und Peptiden. Die Reaktion besteht aus drei Teilschritten. Im ersten Schritt, der Kupplung, wird an die Aminogruppe am freien N-terminalen Ende der Peptidkette Phenylisothiocyanat (PITC) gebunden, wodurch ein Thioharnstoffderivat (Phenylthiocarbamoylpeptid, PTC-Peptid) entsteht. Im nächsten Schritt, der Spaltung, wird das PTC-Peptid mit wasserfreier Säure behandelt. Dabei wird die erste Aminosäure als heterozyklisches Derivat einer Anilinthiazolinon-(ATZ-)Aminosäure abgespalten. Im letzten Schritt wird die instabile ATZ-Aminosäure in der Konvertierungsreaktion zu dem stabilen Derivat, der Phenylthiohydantoin-

(PTH-)Aminosäure umgesetzt. Die PTH-Aminosäuren werden chromatographisch im Vergleich zu den Retentionszeiten einer Referenzprobe identifiziert (F.Lottspeich und JW. Engels, Bioanalytik 2006).

3.3.6. Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie

Mit der Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) können empfindliche Substanzen massenspektrometrisch untersucht werden. Die flüssige Probe wird unter Normaldruck in einem Zerstäuber in kleine Tröpfchen zerteilt. Durch eine Kapillare tritt das Aerosol in die Ionen-Fokussierungs-Region ein. In dieser Kammer herrscht ein Druck von 10^{-4} Torr. Hier liegt ebenfalls ein starkes elektrisches Feld (2 bis 7 kV) an. Durch den Unterdruck und das elektrische Feld werden die positiv geladenen Tropfen weiter zerteilt bis nur noch einzelne mehrfach geladene Ionen übrig bleiben. Dieser Prozess erfolgt aufgrund von Verdunstung des Lösungsmittels und durch die Abstoßung der eigenen Oberflächenladungen. Die so entstandenen mehrfach geladenen Ionen werden in einem Quadrupol Analysator über ihr Ladung/Masse Verhältnis (m/z) bei einem Druck von 10^{-8} Torr getrennt. Über das so erhaltene charakteristische Spektrum kann auf die Molekularmasse des Moleküls zurück geschlossen werden (Banks und Whitehouse, 1996).

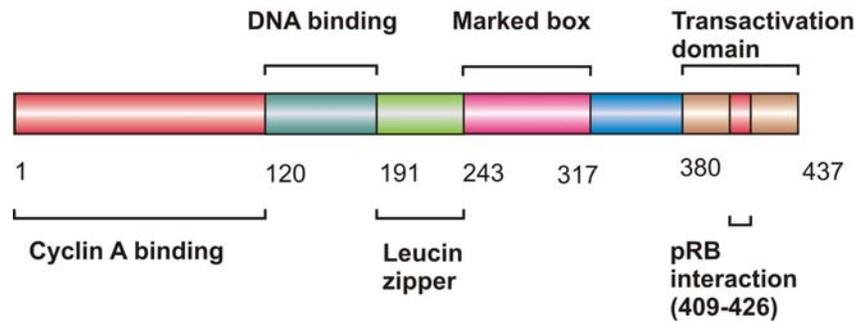
Die Massenspektrometrie wurde an einem ESI-MS API 165 Perkin-Elmer Sciex (Langen) verknüpft mit einer HPLC (column: Macherey-Nagel EC 125/2 Nucleosil 300-5 C4 MPN; Pumpen System: Microgradient System 140B/C Perkin Elmer (Lösungsmittel A: Wasser, 0.05 % TFA, B: MeCN, 0.05% TFA; Gradient 10-95% B); Photodioden array Agilent HP1100PDA; Software: Masschrom, Biomultiview) durchgeführt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Proteinexpression

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden verschiedene Proteine der Zellzykluskontrolle und Regulation kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Die verschiedenen Konstrukte der einzelnen Proteine werden auf den folgenden Seiten genauer beschrieben. Eine theoretische Behandlung der angewandten Methoden zur Proteinexpression und Reinigung findet sich im Methodenteil (Abschnitt 3).

4.1.1. E2F1



Schema 1 Domänenstruktur von E2F1

Es wurden verschiedene Konstrukte des Proteins E2F1 angefertigt. Tabelle 12 zeigt die einzelnen Konstrukte sowie ihre Überexpression/Ausbeute und ihr Verhalten in NMR. Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pGEX 6P von Pharmacia sowie die pET46 Ek/LIC Plasmide von Novagen verwendet. Für das Konstrukt E2F1 (243-437) wurde auch der Vektor pMAL C2X und P2X von NEB benutzt. Die Expression in pMAL C2X war deutlich höher als im pGEX Plasmid, das Protein konnte aber nicht aufgereinigt werden.

Tabelle 12 Proteinexpression verschiedener E2F1 Konstrukte

	Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A	pGEX6P	E2F1 (243-437)	0.3 mg/L	ja	nein
B	pGEX6P	E2F1 (243-317)	1 mg/L	ja	nein
C	pMALC2X	E2F1 (243-437)	hohe Expression	-	-
D	pMALP2X	E2F1 (243-437)	-	-	-
E	pACYC	E2F1 (243-437)	-	-	-
F	pACYC	E2F1 (120-437)	-	-	-
G	pGEX6P	E2F1 (120-437)	hohe Expression	unlöslich	Nicht getestet
H	pGEX6P	E2F1 (380-437)	keine Expression	-	-
I	pGEX6P	E2F1 (284-437)	keine Expression	-	-
J	pGEX6P	E2F1 (284-380)	geringe Expression	ja	Nicht getestet
K	pET46 Ek/LIC	E2F1 (1-108)	hohe Expression	ja	nein
L	pET46 Ek/LIC	E2F1 (68-108)	hohe Expression	ja	nein
M	pET46 Ek/LIC	E2F1 (120-243)	geringe Expression	ja	teilweise
N	Baculovirus	E2F1 full length	-	-	-

Die pGEX 6P Konstrukte wurden in BL21 RIL bei einer OD_{600nm} von 0.7-0.8 mit 1 mM IPTG für 3 h bei 37°C induziert. Die Aufreinigung erfolgte über GST-Sepharose FF (Pharmacia). Die Bindung der GST-Fusionsproteine erfolgte über Nacht in PBS. Nach einem Waschschrift wurden die Beads in Prescission-Protease Puffer resuspendiert und das GST-Fusionsprotein mit Prescission-Protease (Pharmacia) proteolytischen verdaut. Dadurch wurde der GST-TAG entfernt, der an den Beads gebunden blieb. Das nun ungebundene Protein wurde im Prescission-Protease Puffer eluiert und anschließend über eine Gelfiltration (Bild 14) weiter aufgereinigt.

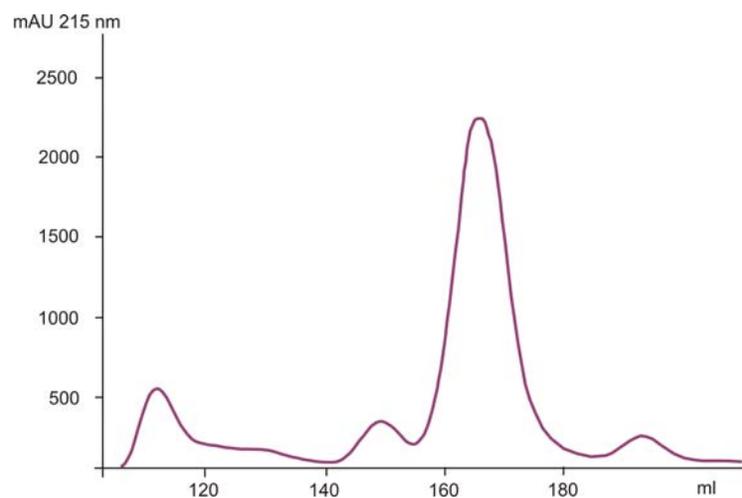


Bild 14 Chromatogramm der Gelfiltration von E2F1(243-317) (*marked box*). Da die *marked box* von E2F keine Tryptophane enthält absorbiert das Protein nur sehr schwach bei 280 nm. Daher wurde zur Detektion die Wellenlänge 215 nm verwendet.

Zur Überprüfung der Reinheit wurde ein SDS-Gel gefahren. Bild 15 zeigt das SDS-Gel der Reinigung von E2F1(243-317) nach der Gelfiltration. Das Protein lag zu >95% rein vor.

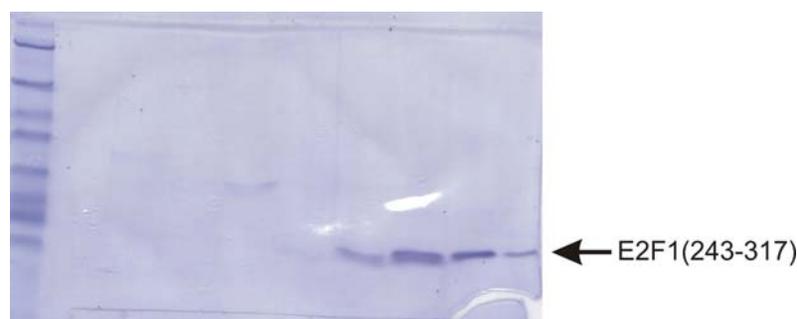


Bild 15 SDS Page von E2F1 (243-317) nach der Reinigung über die Gelfiltration

Das Konstrukt E2F1 (1-108) und (69-108) im pET46 Vektor wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.7-0.8 mit 1 mM IPTG für 3 h bei 37° C induziert nach dem Aufschluss über eine Nickel-NTA Säule und anschließend über eine Gelfiltration gereinigt.

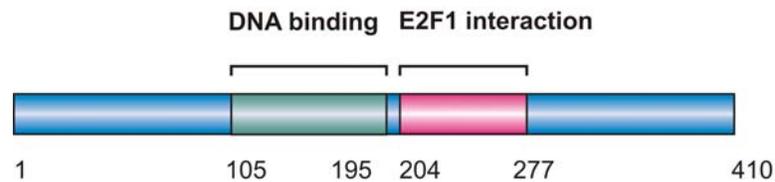
Das Konstrukt E2F1 (120-243) im pET46 Vektor wurde bei einer OD_{600nm} von 0.7-0.8 mit 1 mM IPTG über Nacht bei 18° C induziert. Nach dem Aufschluss erst über eine Nickel-NTA Säule und anschließend über eine Gelfiltration gereinigt.

Die Identität der gereinigten Proteine wurde mit Massenspektroskopie und zum Teil mit Edmanabbau bestätigt. Tabelle 13 zeigt die theoretischen Massen und die tatsächlich gemessenen einiger der exprimierten Konstrukte.

Tabelle 13 Massenspektrometrie und Edmannabbau von E2F1 Konstrukten

	Konstrukt	theoretische Masse	gemessene Masse	Sequenz laut Edmannabbau
A	E2F1 (243-437)	21565.9Da	21596.0 Da	GPLGSLAY...
B	E2F1 (243-317)	8474.6 Da	8475.0 Da	GPLGSLAY...
J	E2F1 (284-380)	10567.7 Da	10569.0 Da	(g) PLG

4.1.2. DP1



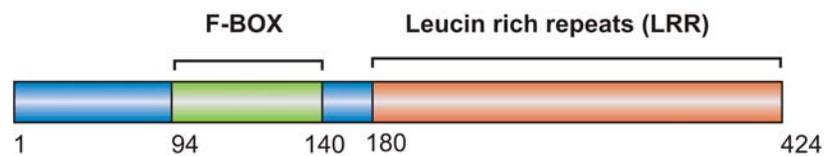
Schema 2 Domänenstruktur von DP1

Von DP1 wurde ein Konstrukt in pET46 Ek/LIC exprimiert (Tabelle 14). Das Konstrukt DP1 (105-246) wurde bei OD_{600nm} von 0.7-0.8 mit 1 mM IPTG für 3 h bei 37°C induziert. Es lag ausschließlich als unlösliche *inclusion bodies* vor. Die gereinigten *inclusion bodies* wurden in 6 M GdHCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0 aufgelöst und gegen 50 mM $Na_5P_3O_{10}$, 1 M Arginin, 10 mM β -ME, 100 μ M $ZnCl_2$, pH 8.0 rückgefaltet und über eine Gelfiltration aufgereinigt. Die NMR Messung ergab, dass das Protein teilweise gefaltet vorlag. Zusammen mit dem E2F1 Konstrukt I (120-243) und dem Promoter (DNA Sequenz: TTT CGC GCC AAA), wurde das Konstrukt zu Kristallisationsversuchen verwendet.

Tabelle 14 Proteinexpression verschiedener DP1 Konstrukte

	Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A	pET46 Ek/LIC	DP1 (105-246)	50 mg/l	unlöslich	teils
B	pGEX	DP1 full length	-	-	-
C	pGEX6P	DP1 (105-327)	-	-	-

4.1.3. SKP2



Schema 3 Domänenstruktur von SKP2

Die Expression von SKP2 erfolgte bei 37°C für 3 h mit 1 mM IPTG. Das Protein lag in allen Fällen als unlösliche *inclusion bodies* vor. Die *inclusion bodies* wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 6 M Guaninium HCl, 100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT pH 8.0 aufgelöst. Es wurde versucht die Proteine zurückzufalten aber keines der durchgeführten Protokolle war erfolgreich (Tabelle 15).

Tabelle 15 Proteinexpression verschiedener SKP2 Konstrukte

	Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A	pCDNA3	full length	-	-	-
B	pET30 Xa/LIC	full length	-	-	-
C	pET46 Ek/LIC	60-151	hohe Expression	nein	-
D	pET46 Ek/LIC	1-151	hohe Expression	nein	-
E	pET41 Ek/LIC	61-424	hohe Expression	nein	-
F	pGEX6P	60-151	hohe Expression	nein	-

4.1.4. pRB



Schema 4 Domänenstruktur von pRB

Von pRB wurde eine Reihe von Konstrukten angefertigt. Besonders von der C-Domäne wurden viele verschiedene Konstrukte kloniert. Tabelle 16 zeigt die Konstrukte von pRB, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Konstrukt D war ein Klonierungsintermediat, und wurde nicht für Expressionsexperimente verwendet.

Tabelle 16 Proteinexpression verschiedener pRB Konstrukte

	Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A	pET30 Xa/LIC	pRBABC short linker	hohe Expression	ja	teils
B	pET30 Xa/LIC	pRBABC-64 short linker	keine Expression	-	-
C	pETDuet	pRBABC	-	-	-
D	pET30 Xa/LIC	pRBABCfürE2F1	-	-	-
E	pET46 Ek/LIC	pRB (790-928)	hohe Expression	ja	nein
F	pET46 Ek/LIC	pRB (790-861)	hohe Expression	ja	nein
G	pET46 Ek/LIC	pRB (790-890)	-	-	-
H	pET46 Ek/LIC	pRB (790-914)	-	-	-
I	pET46 Ek/LIC	pRB (801-890)	hohe Expression	ja	nein
J	pET46 Ek/LIC	pRB (801-914)	-	-	-
K	pET46 Ek/LIC	pRB (825-890)	hohe Expression	ja	nein
L	pET46 Ek/LIC	pRB (825-914)	hohe Expression	ja	nein
M	pET46 Ek/LIC	pRB (825-928)	hohe Expression	ja	nein
N	pET46 Ek/LIC	pRB (867-928)	hohe Expression	ja	nein
O	pET30 Ek/LIC	pRB (867-928)	hohe Expression	ja	nein
P	pET 30 Xa/LIC	pRB AB	hohe Expression	ja	ja

Mit Ausnahme von pRB-C(825-890), welches nach der Induktion bei OD_{600nm} von 0.7-0.8 mit 1 mM IPTG bei 37°C für 3h exprimiert wurde, wurden alle anderen Konstrukte bei 18°C über Nacht exprimiert. Die Konstrukte waren nach dem Aufschluss im löslichen Überstand und wurden über eine Ni-NTA Säule mit anschließender Gelfiltration gereinigt (Bild 16, Beispiel der Reinigung von pRB(801-890)). Da die C-Domäne von pRB nicht gefaltet war,

waren die exprimierten Proteine instabil und neigten teilweise zur Degradation innerhalb weniger Tage.

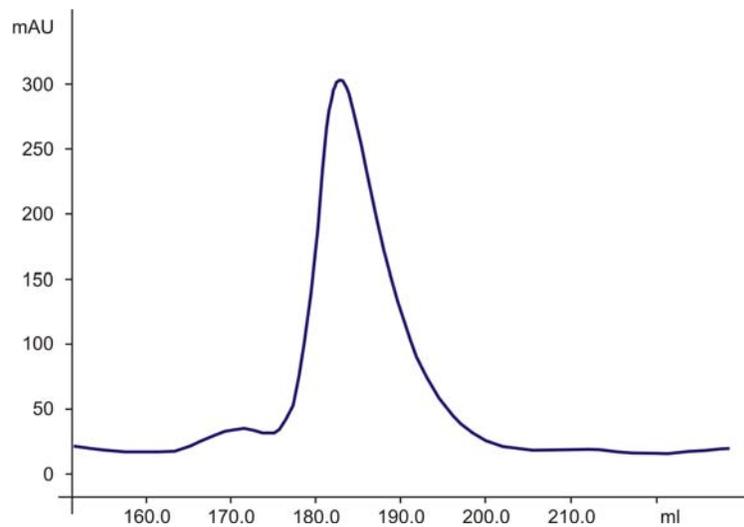


Bild 16 Chromatogramm von pRB (801-890)

Das Proteinkonstrukt pRB(801-890) wurde in sehr großer Menge exprimiert und konnte in einer Reinheit von über 99% gewonnen werden. Bild 16 zeigt die Gelfiltration von pRB(801-890) und Bild 17 das zugehörige SDS-Gel.

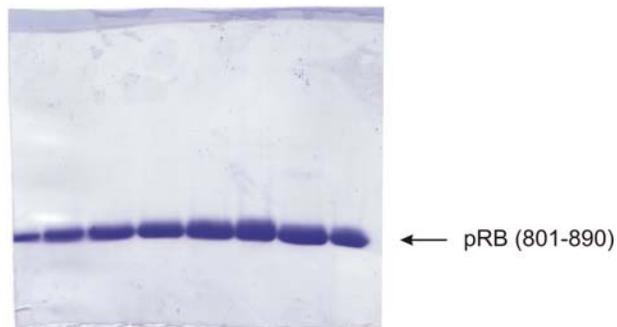


Bild 17 SDS Page von pRB (801-890)

pRB-ABC wurde ebenfalls in hohen Mengen exprimiert und konnte über Ni-NTA und anschließende Gelfiltration gereinigt werden (Bild 18 und 19). Aufgrund der Instabilität der C-Domäne von pRB war das gereinigte Protein nicht sehr rein und neigte stark zur Degradation.

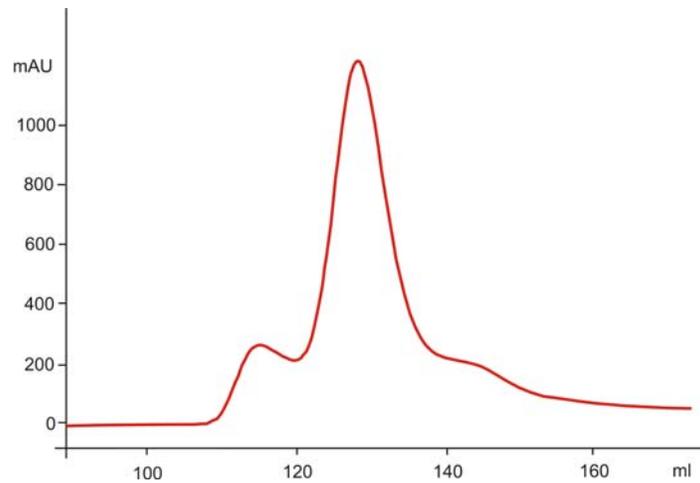


Bild 18 Chromatogramm der Gelfiltration von pRB ABC

Die SDS-Page nach der Gelfiltration zeigt, dass das Konstrukt pRB-ABC zwar sehr gut angereichert wurde, jedoch noch weitere Proteinbanden vorliegen (Bild 19). Die Reinheit lag bei ca. 80%.

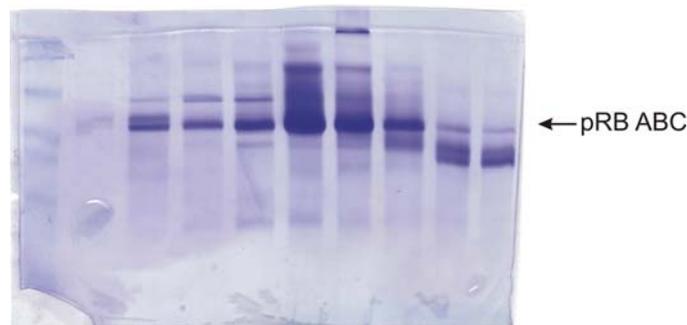


Bild 19 SDS Page von pRB ABC

4.1.4.1. pRB-E2F1 Fusionskonstrukt

Für die Coexpression von pRB und E2F1 wurden Fusionsproteine aus den ABC-Domänen von pRB und der C-terminalen Hälfte von E2F1 (AA243-437) hergestellt (Tabelle 17). Die Expression von Konstrukt A konnte bei 20°C für 3 h durchgeführt werden. Die Temperatur des LB-Mediums musste aber bereits 1 h vor Induktion mit 1 mM IPTG bei OD_{600nm} auf 20°C abgekühlt werden. Höhere Temperaturen bei der Induktion oder längere Expressionszeiten lieferten schlechtere bis keine Ausbeuten.

Tabelle 17 Proteinexpression verschiedener pRB-E2F1 Fusions- Konstrukte

	Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A	pET30 Xa/LIC	pRB ABC- E2F1(243-437)	mäßige Expression	ja	nicht bestimmbar
B	pET30 Xa/LIC	pRB ABC-L-E2F1(243-437)	keine Expression	-	-

Die Reinigung von pRB ABC-E2F(243-437) erfolgte über Ni-NTA. Bild 20 zeigt das Elutionsschema der Nickelreinigung.

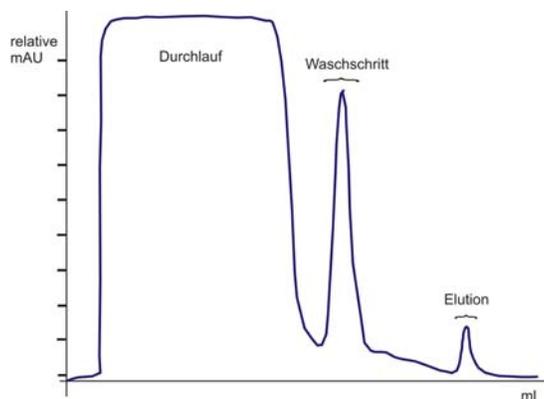


Bild 20 Chromatogramm der Elution von der Ni-NTA Affinitätssäule. Der Elutionspeak enthielt neben dem Fusionsprotein noch weitere erheblicher Verunreinigungen.

Die Reinheit von pRB ABC-E2F(243-437) war aber nach nur einem Reinigungsschritt sehr gering und die Menge an exprimierten Protein zu klein um über eine Gelfiltration oder eine andere Methode eine höhere Reinheit zu erzielen (Bild 21).

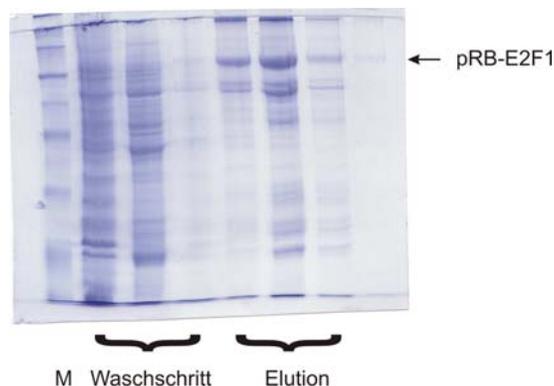
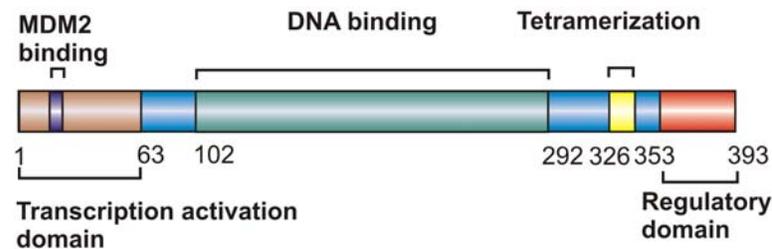


Bild 21 SDS-PAGE der Ni-NTA Reinigung des pRB ABC-E2F1 Fusionsproteins

Die Identität von pRBABC-E2F1(243-437) wurde in einem tryptischen Verdau mit anschließender Massenspektrometrie bestätigt. Konstrukt B konnte ebenso wie pRBABC-64 *short linker* nicht exprimiert werden.

4.1.5. p53



Schema 5 Domänenstruktur von p53

Von p53 wurden fünf verschiedene Konstrukte kloniert und gereinigt (Tabelle 18), Konstrukt E wurde von Dr. Galina Selivanova aus Schweden zur Verfügung gestellt. Konstrukt F wurde nicht exprimiert und diente als Templat für die Klonierung.

Tabelle 18 Proteinexpression verschiedener p53 Konstrukte

	Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A	pET46 Ek/LIC	p53 (325-370)	hohe Expression	ja	-
B	pET46 Ek/LIC	p53 (1-310)	hohe Expression	nein	teils
C	pET46 Ek/LIC	p53 (1-393) <i>full length</i>	hohe Expression	nein	-
D	pGEX4T	p53 (1-73)	hohe Expression	ja	teils
E	pGEX2TK	p53 (1-100)	mäßige Expression	ja	teils
F	pGEX	GST-p53 <i>full length</i>	-	-	-

Die Expression von p53 (325-370) wurde bei 37°C für 3 h mit 1 mM IPTG exprimiert und über einen Ni-NTA und Gelfiltration gereinigt.

Die Konstrukte p53 (1-310) und p53 (1-393) wurden als *inclusion bodies* exprimiert. p53 (1-310) wurde bei 37°C über Nacht exprimiert. Das Protein wurde unter denaturierenden Bedingungen über eine Ni-NTA Säule, und nach der Rückfaltung (Verdünnen gegen 100 mM TrisHCl, 1M Arginin, 10% Glycerin, 5mM DTT pH 8.0), über die Heparinsäule (Elution mit linearen KCl Gradienten) (Bild 22) und anschließender Gelfiltration gereinigt.

In einem zweiten Reinigungsprotokoll wurde p53 (1-393) nach der Reinigung der *inclusion bodies* und Auflösen in 6 M Guanidinium HCl, 100 mM TrisHCl, 5 mM DTT durch Verdünnung (1:50-1:100) gegen 50 mM Pentanatriumtriphosphat, 1 M Arginin 10 mM β -ME 100 μ M ZnCl₂ und equimolarer Menge an MDM2(1-118) zurückgefaltet. Ohne MDM2 wurde zwar auch lösliches Protein erhalten und es konnte über die Heparinsäule und anschließender Gelfiltration aufgereinigt werden, jedoch lag das Protein nach der Gelfiltration

in verschiedenen oligomeren Formen vor. Durch die Zugabe von MDM2 während der Rückfaltung wurde nach der Gelfiltration das Tetramer klar von höheren Oligomeren, die kein MDM2 gebunden hatten, getrennt. Dadurch war p53(1-393) in seiner nativen tetrameren Form nur im Komplex mit MDM2 aufzureinigen.

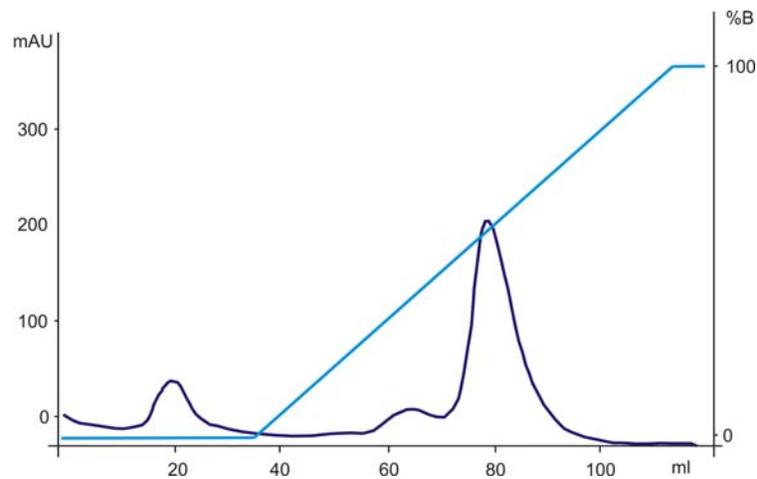


Bild 22 Chromatogramm der Heparinsäule von p53 (1-393)

Die GST-Konstrukte von p53 wurden löslich exprimiert. Nach dem Aufschluss in PBS wurde das Zelllysate über Nacht an GST-Sepharose FF (Amersham Pharmacia) gebunden und nach einem Waschschritt mit PBS mit 10 mM Glutathion (red.) eluiert. Zum Schluss wurde das Protein über eine Gelfiltration gereinigt (Bild 23, Beispiel der Reinigung von GST-p53(1-73)).

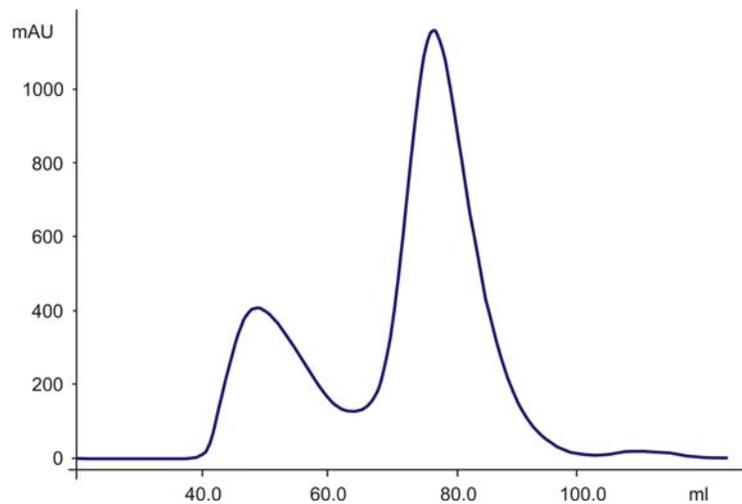


Bild 23 Chromatogramm der Gelfiltration von GST-p53 (1-73)

Die Reinheit von GST-p53 (1-73) war bei über 90%. Das Protein war aber nicht stabil und degradierte innerhalb weniger Tage. Bild 24 zeigt das SDS-Gel der Gelfiltration von GST-p53 (1-73). Neben der Hauptbande bei ca. 35 kDa reichert sich mit der Zeit eine Bande bei ca. 26 kDa an die von GST alleine herrührt. Die Reinheit von GST-p53 (1-73) war mehr als ausreichend für die NMR und ITC Experimente.

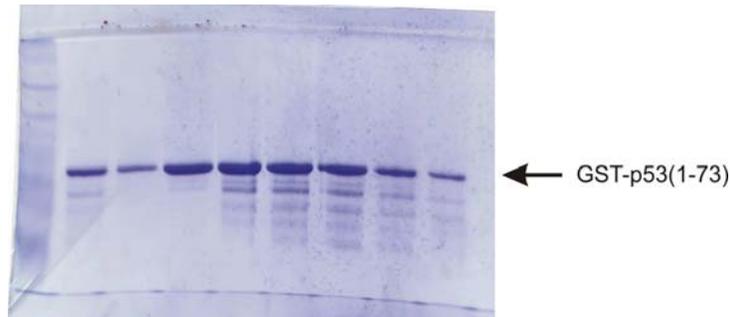


Bild 24 SDS-PAGE von GST-p53 (1-73)

Die NMR Messungen von GST-p53 (1-73) (Bild 25) und p53 (1-310) (Bild 26) zeigen, dass die beiden Proteine nur teilweise gefaltet vorlagen. Im Falle des GST-p53 (1-73) ist es hauptsächlich der GST-Tag, für p53 (1-310) die DNA-Bindungsdomäne. Der N-terminale Teil ist ungefaltet (Dawson et al., 2003). Für die Interaktionsstudien sind hauptsächlich die beiden Tryptophane W23 und W53 in GST-p53 (1-73) (Bild 25, oberer Ausschnitt) und für p53 (1-310) W23, W53 und W91 (Bild 26) (W91 liegt nahe an der DNA-Bindungsdomäne und ist daher weniger flexibel und liefert ein breiteres Signal im NMR Spektrum) bei 10.0 ppm interessant. Mit ihnen lässt sich die Bindung an MDM2 oder MDMX auf einfache Weise nachweisen (Abschnitt 4.2.4.).

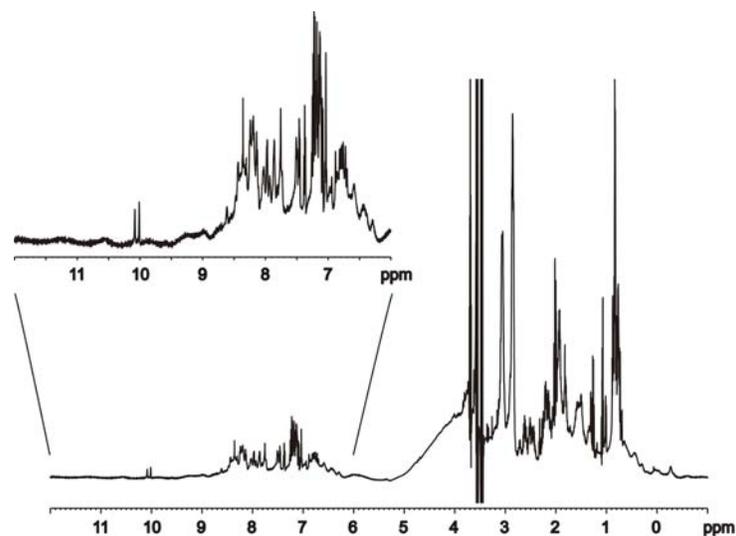


Bild 25 1D ¹H NMR Spektrum von GST-p53(1-73)

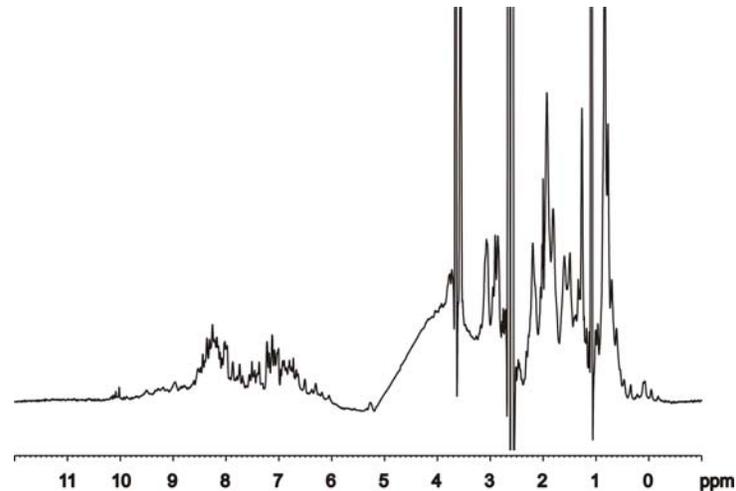
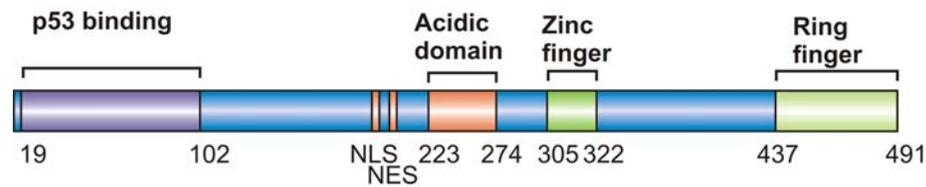


Bild 26 1D ^1H NMR Spektrum von p53 (1-310)

Kommt es zu einer Komplexbildung mit MDM2 oder MDMX, so bindet p53 mit dem W23 in die MDM2 bzw. MDMX Bindungstasche. Die Flexibilität wird dadurch eingeschränkt, was zu einer schnelleren Relaxation und einem Verschwinden des W23 Signal führt. Da W53 nicht an der Bindung beteiligt ist, bleibt die Signalintensität unverändert. Diese Tatsache wurde insbesondere in der 1D Variante der *antagonist induced dissociation assay* (1D-AIDA) ausgenutzt die im Abschnitt 4.2.4.3. und folgenden zur Anwendung kommt. Im ungebundenen Zustand sind beide Tryptophane in GST-p53(1-73) im flexiblen Teil des Proteins und geben im 1D NMR Spektrum Signale gleicher Intensität. Ist GST-p53 zu 100% im Komplex mit MDM2 oder MDMX, so ist nur das W53 sichtbar. Aus dem Verhältnis der Intensitäten von W23 und W53 lässt sich der Grad der Komplexierung abschätzen, sowie auf die relative Bindungsstärke von Antagonisten rückschließen aufgrund des Anteils an p53 der durch die Zugabe freigesetzt wird. Bei p53(1-310) sind die Intensitäten der, in diesem Fall drei Tryptophane, im ungebundenen Zustand nicht gleich groß. Es eignet sich daher weniger gut für die 1D AIDA Experimente.

4.1.6. MDM2



Schema 6 Domänenstruktur von MDM2

Von MDM2 wurden die folgenden Konstrukte kloniert und exprimiert (Tabelle 19).

Tabelle 19 Proteinexpression verschiedener MDM2 Konstrukte

Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A pQE-40	MDM2 (1-118)	hohe Expression	unlöslich	ja
B pET46 Ek/LIC	MDM2 (1-118)	hohe Expression	unlöslich	ja
C pET46 Ek/LIC	MDM2 (23-109)	hohe Expression	unlöslich	ja
D pET46 Ek/LIC	MDM2 (412-437)	-	-	-
E -	MDM2 full length	-	-	-
F P1140119	MDM2 (1-118)	-	-	-
G pET46 Ek/LIC	F55W	normal	löslich	ja
H pET46 Ek/LIC	E59W	gering	Aggregat	teilweise
I pET46 Ek/LIC	T101W	gering	löslich	ja
J pET46 Ek/LIC	T63W	normal	löslich	ja
K pET46 Ek/LIC	T47W	normal	löslich	ja
L pET46 Ek/LIC	K98W	normal	löslich	ja
M Johnson & Johnson	hMDM2 (1-125)	hohe Expression	unlöslich	ja
N Johnson & Johnson	hMDM2(1-206)	gering	unlöslich	nur N-term .Teil
O Johnson & Johnson	hMDM2(100-206)	gering		nein
P pET46 Ek/LIC	L34F			
Q pET46 Ek/LIC	L37F			
R pET46 Ek/LIC	L82F			
S pET46 Ek/LIC	L85F			
T pET46 Ek/LIC	M102F			

Bei den drei Konstrukten von MDM2 (A-C, M, N), die exprimiert wurden, erfolgte die Expression für 3 h bei 37°C. Die Ausbeute war grundsätzlich sehr gut, jedoch wurde MDM2 in unlöslichen *inclusion bodies* exprimiert. Nach dem Zellaufschluss in PBS wurden die *inclusion bodies* mit PBS und Triton X-100 (0,1%) gewaschen und bei 12 000*g für 1 h

pelletiert. Der zweite Waschschrift erfolgte nur mit PBS. Die gereinigten *inclusion bodies* wurden in MDM2-Solubilisierungs Puffer aufgenommen und zum Abtrennen von unlöslichen Bestandteilen bei 40000*g für 1 h pelletiert. Der Überstand wurde gegen MDM2-Dialyse Puffer über Nacht dialysiert. Die Rückfaltung erfolgte durch tropfenweise Verdünnung (1:50-1:100) der MDM2 Lösung in MDM2 Faltungs-Puffer. Durch Zugabe von Ammoniumsulfat (Endkonzentration 1.5 M) und Butyl-Sepharose FF (5-10 ml *bed volume*) wurde MDM2 an die Butyl-Sepharose FF gebunden. Nach dem Abtrennen der Beads durch Filtration über eine Glasfritte wurde MDM2 mit dem MDM2-Elutions-Puffer eluiert, konzentriert und über eine Gelfiltration abschließend gereinigt (Bild 27 GPC und Bild 28 SDS-Page. Die Reinheit war >95%). Das Konstrukt N wurde nach der Butyl-Sepharose zusätzlich gegen Ni-NTA Puffer dialysiert und vor der Gelfiltration über Ni-NTA gereinigt. Alle Konstrukte wurden in NMR gemessen und lagen im Allgemeinen gefaltet vor (Bild 29). Beim Konstrukt N war nur der N-terminale Teil gefaltet und Konstrukt O war gänzlich ungefaltet. Die Identität der einzelnen Konstrukte wurde massenspektrometrisch bestätigt. Die Mutanten wurden teilweise bei 20°C über Nacht exprimiert und über Ni-NTA und Gelfiltration gereinigt.

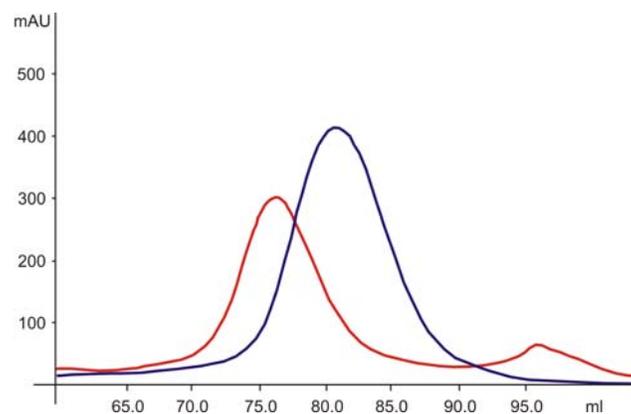


Bild 27 Vergleichendes Chromatogramm der Reinigung von MDM2 (Roche) blaues Diagramm und HIS-MDM2 (1-118) rotes Diagramm.

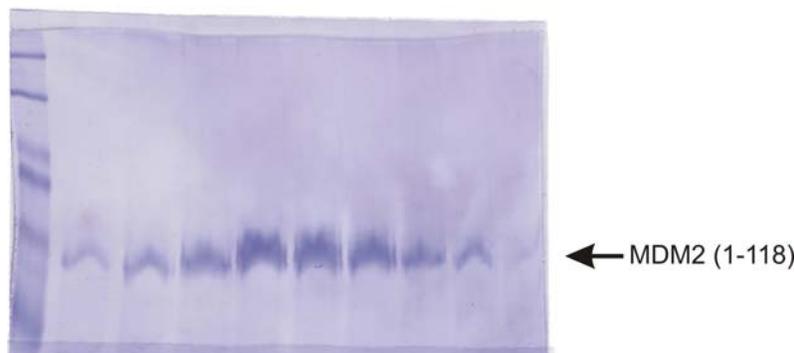


Bild 28 SDS-PAGE von gereinigtem MDM2 nach der Gelfiltration

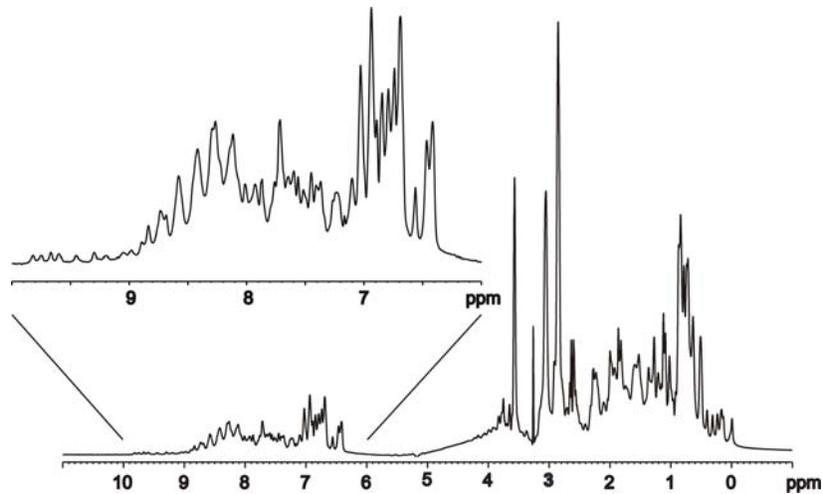
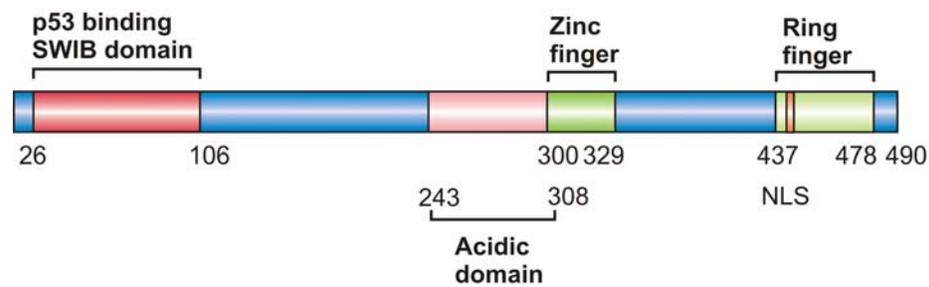


Bild 29 1D NMR Spektrum von ^{15}N markierten HIS MDM2(1-118)

4.1.7. MDMX



Schema 7 Domänenstruktur von MDMX

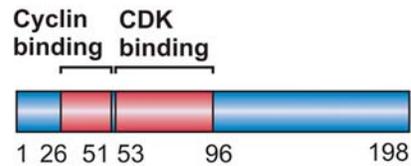
In der Arbeit wurde ein Konstrukt von MDMX exprimiert und gereinigt (Tabelle 20).

Tabelle 20 Proteinexpression von MDMX

Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A pET 46 Ek/LIC	MDMX LM (1-134)	hohe Expression	unlöslich	ja

Die Reinigung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie für MDM2 (1-118).

4.1.8. p27^{KIP1}



Schema 8 Domänenstruktur von p27KIP1

Von p27 wurde nur ein Konstrukt exprimiert (Tabelle 21). Die DNA wurde von Dr. Ludger Hengst zur Verfügung gestellt.

Tabelle 21 Proteinexpression von p27

Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A pET28a	p27(1-96)	hohe Expression	ja	nein

Die Expression erfolgte für 3 h bei 37° C. Nach dem Zellaufschluss wurde das Protein über Ni-NTA und anschließender Gelfiltration gereinigt (Bild 30). Das Protein wurde in großen Mengen exprimiert und war außerordentlich stabil und konnte mit einer sehr großen Reinheit erhalten werden (Bild 31) Es neigt jedoch bei höherer Konzentration und Temperaturen um den Gefrierpunkt stark zur Präzipitation. Dieser Prozess ist jedoch reversibel. p27 alleine ist nicht gefaltet. Durch seine Bindung an CDK2/ Cyclin A nimmt p27 jedoch eine stabile Konformation an.

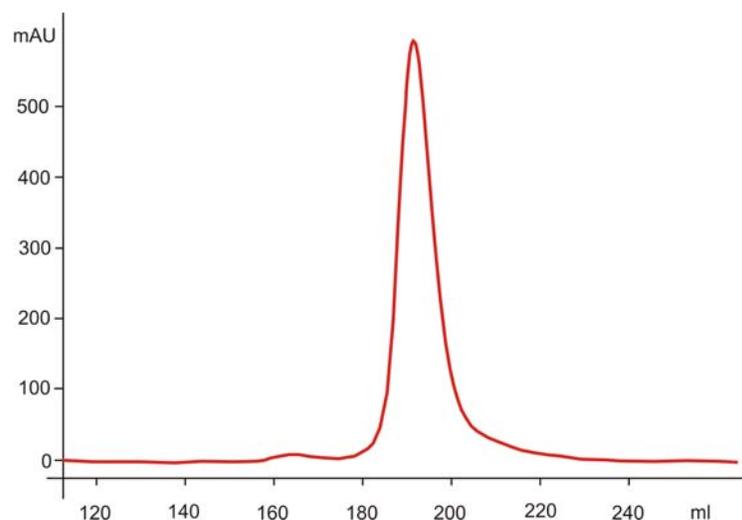


Bild 30 Chromatogramm der Reinigung von p27. Gelfiltration S75pg

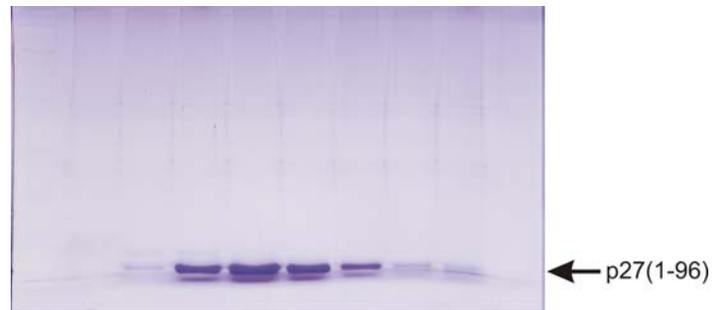


Bild 31 SDS Page des Elutionspeaks von p27. Das Protein lag nach der abschleißenden Reinigung über die Gelfiltration zu 99% Reinheit vor.

p27 ist laut NMR ein ungefaltetes Protein. Das 1D ^1H NMR Spektrum von p27(1-96) (Bild 32) zeigt ein Protein, das als ein völlig flexibles Polypeptid vorliegt.

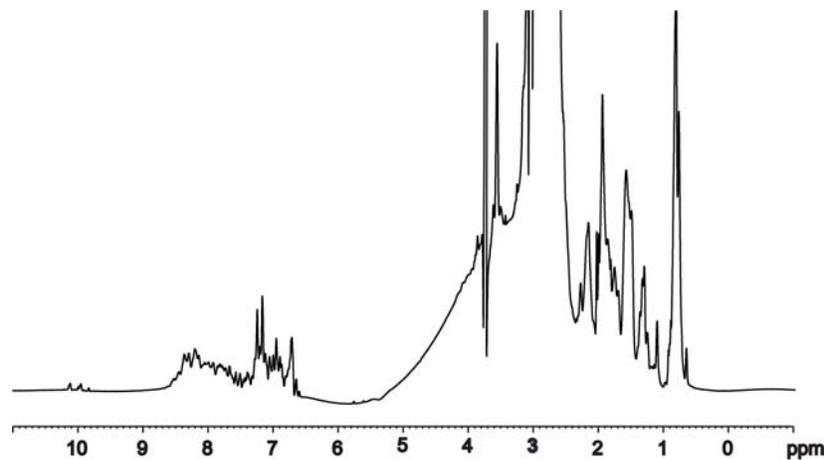
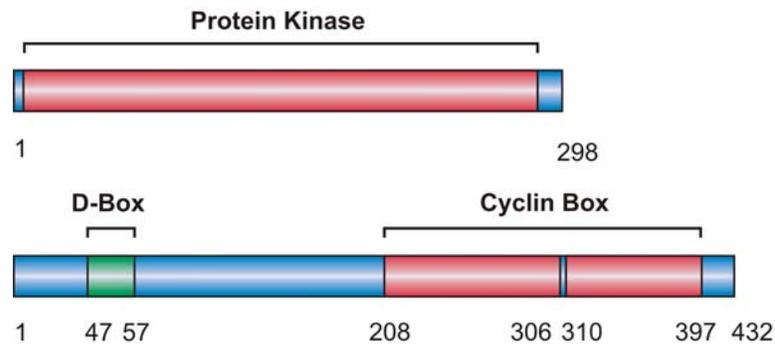


Bild 32 NMR Spektrum von ^{15}N p27. In Lösung liegt p27 als ein ungefaltetes Protein vor. Erst durch die Bindung an CDK2/Cyclin A bekommt p27 eine definierte Struktur.

4.1.9. CDK2/Cyclin A



Schema 9 Domänenstruktur von CDK2 (oben) und Cyclin A (unten)

In dieser Arbeit wurden eine Reihe von CDK2 Konstrukten exprimiert und gereinigt (Tabelle 22).

Tabelle 22 Proteinexpression von CDK2 und Cyclin A

	Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A	pET 46 Ek/LIC	CDK2	normale Expression	ja	ja
B	pET28	Cyclin A (173-432)	normale Expression	ja	ja
C	pET 28	CDK2 WT	hohe Expression	ja	ja
D	pET 28	CDK2 V7W	hohe Expression	ja	ja
E	pET 28	CDK2 S53W	hohe Expression	ja	ja
F	pET 28	CDK2 H84W	hohe Expression	ja	ja
G	pET 28	CDK2 A93W	normale Expression	ja	ja

Die Reinigung von CDK2 sowie der CDK2 Mutanten erfolgte nach einer Expression über Nacht bei 20°C über eine Ni-NTA Säule und einer abschließenden Reinigung über eine Gelfiltration in PBS Puffer. Die CDK2 Konstrukte waren laut NMR gefaltet und relativ stabil.

4.1.10. Nucleostemin



Schema 10 Domänenstruktur von Nucleostemin

Von Nucleostemin wurden 8 Konstrukte angefertigt (Tabelle 23), jedoch konnte keines in ausreichender Menge exprimiert werden. Ein einziges Konstrukt (B2) konnte überhaupt gereinigt werden (Bild 33), jedoch war die Menge zu gering und der pH Wert, bei der das Protein löslich vorlag (pH 10), zu hoch, um eine NMR Messung vornehmen zu können. Zudem lag das Protein in der Gelfiltration als ein Aggregat vor (Bild 34).

Tabelle 23 Proteinexpression verschiedener Nucleostemin Konstrukte

	Vektor	Konstrukt	Ausbeute/Liter Bakterienkultur	Löslichkeit	Faltung laut NMR
A1	pET46 Ek/LIC	1-144	keine Expression	-	-
A2	pET46 Ek/LIC	1-408	keine Expression	-	-
A3	pET46 Ek/LIC	1-521	keine Expression	-	-
B1	pET46 Ek/LIC	48-144	keine Expression	-	-
B2	pET46 Ek/LIC	48-408	gering	Aggregat	-
B3	pET46 Ek/LIC	48-521	keine Expression	-	-
C2	pET46 Ek/LIC	123-408	keine Expression	-	-
C3	pET46 Ek/LIC	123-521	keine Expression	-	-

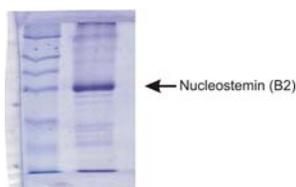


Bild 33 SDS-PAGE von Nucleostemin B2 (Auftrag auf die Gelfiltrations-Chromatographie S75 analytik)

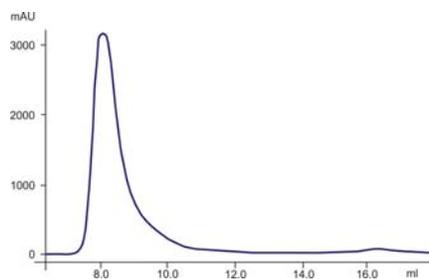


Bild 34 Chromatogramm von Nucleostemin B2. Das gesamte Protein lag als Aggregat vor.

4.2. Interaktionsstudien

4.2.1. E2F1 und pRB

Die E2F1 Konstrukte E2F1 (243-437) und E2F1 (243-317) wurden auf ihr Verhalten bei der Bindung an pRB getestet. Dazu wurden verschiedene Techniken angewandt. In der Gelpermeations-Chromatographie konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von E2F1 (243-437) der Peak von pRB AB um ca. 20 kDa nach oben verschoben wurde. Dies zeigt eine direkte Bindung der beiden Proteine (Bild 35). Dieses Ergebnis entspricht der Literatur. Die Kristallstruktur von pRB AB mit einem E2F1 Peptid zeigt die Bindung an einen Bereich zwischen die A- und B-Domäne (Xiao et al., 2003). Es wurde vermutet, dass noch weitere Bereiche von E2F1 mit pRB AB Wechselwirken könnten. Die *marked box* von E2F1(243-317) interagiert jedoch nicht mit der pRB AB Domäne. In Gelfiltrations- und NMR-Experimenten konnte eine Interaktion nicht nachgewiesen werden.

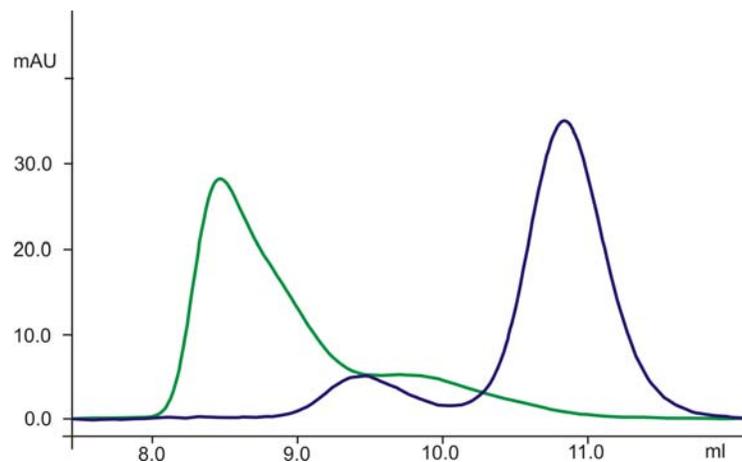


Bild 35 Chromatogramm des Komplexes zwischen pRB AB und E2F1(243-437). Das blaue Diagramm ist pRB AB alleine, das grüne ist der Komplex mit E2F1. Die Gelfiltration wurde mit der s75 analytik durchgeführt.

4.2.2. E2F und p53

J. Hsieh et al. (2002) berichteten, dass es eine Interaktion zwischen der Cyclin bindenden Domäne von E2F1 und p53 gibt. Drei Jahre später veröffentlichte die selbe Gruppe, dass die Interaktion mit der Tetramerisierungsdomäne von p53 stattfindet. Die verschiedenen Konstrukte von E2F1(1-108 und 68-108) und p53 wurden exprimiert und gereinigt. Die Interaktion sollte über eine Gelfiltration nachgewiesen werden. Wie aus Bild 36 hervorgeht

konnte eine Interaktion zwischen E2F1(1-108) und p53 (325-370) jedoch nicht nachgewiesen werden. *In vitro* interagiert der N-terminale Teil von E2F1 daher nicht mit der Tetramerisierungsdomäne von p53 (Bild 36).

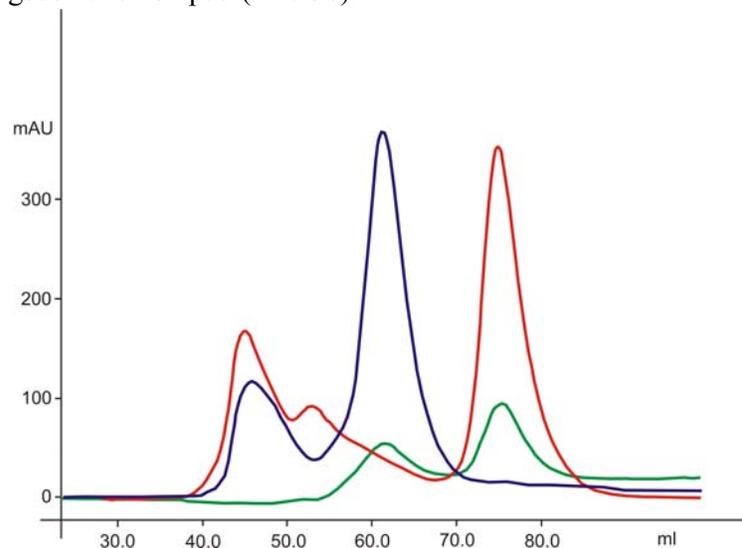


Bild 36 Chromatogramm des Komplexes zwischen p53 (325-370) (blau) und E2F1(1-108) (rot). Beim Mischen der beiden Proteine (grünes Diagramm) zeigt sich, dass die beiden Proteine in der Mischung an den selben Positionen eluieren, wie die einzelnen Proteine. Eine direkte Wechselwirkung ist somit nicht feststellbar. p53 (325-370) beinhaltet die Tetramerisierungsdomäne. p53 wird daher als Tetramer eluiert.

4.2.3. CDK2/Cyclin A mit pRB und p27

Ein weiterer Teil der Doktorarbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen pRB und CDK2/Cyclin A. Während des Zellzyklus wird pRB von CDK2/Cyclin A hauptsächlich in der C-terminalen Domäne phosphoryliert. Diese Phosphorylierung bewirkt eine Aufhebung der Blockade von pRB und damit ein Fortschreiten im Zellzyklus. p27 ist ein Inhibitor von CDK2/Cyclin A. Durch die Bindung von p27 an CDK2/Cyclin A wird die enzymatische Funktion unterbunden und es kommt zu einer Arretierung im Zellzyklus. p27 wurde als Positivkontrolle für die Bindungsstudien zwischen pRB und CDK2/Cyclin A eingesetzt.

Als erstes wurden Experimente mit p27 und CDK2/Cyclin A durchgeführt. In Gelfiltrationen konnte gezeigt werden, dass sich *in vitro* ein ternärer Komplex bildet. Es kommt zu einer deutlichen Verschiebung der Peaks im Elutionsdiagramm.

Ein weiteres Experiment beinhaltete die Untersuchung in ITC Experimenten (Bild 37). Eine Lösung von p27 wurde zu einer CDK2 Lösung titriert. Die Dissoziationskonstante war nur 3.6 μM , die Bindung war allerdings nur zu CDK2 und nicht zum Komplex

CDK2/Cyclin A, und die Bindungsstellen N bei 0.4. Die niedrige Zahl der Bindungsstellen legt nahe, dass ein Teil von CDK2 inaktiv war und daher weniger für die Bindung von p27 zur Verfügung stand.

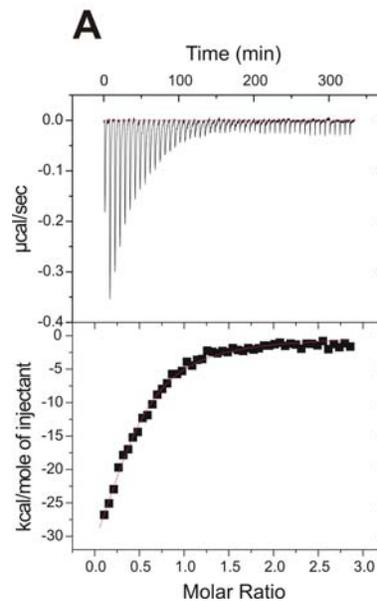


Bild 37 Titration von p27 gegen CDK2. Die errechnete Dissoziationskonstante K_D beträgt $3.6 \mu\text{M}$. Die Zahl der Bindungsstellen N war aber nur 0.4 was vermuten lässt, dass ein Teil von CDK2 inaktiv war.

Um die optimale Bindung der C-terminale Domäne von pRB mit dem Komplex CDK2/Cyclin A zu testen, wurden eine Reihe von pRB-C Konstrukten angefertigt (Tabelle 24 und Bild 38). Aus der Literatur war bekannt, dass ein pRB über ein sogenanntes RXL bzw. KXL Motiv an Cyclin A bindet und ein pRB Peptid mit der Sequenz: $^{868}\text{PPKPLKCLRFD}^{878}$ bindet an Cyclin A und konnte kristallisiert werden (Lowe et al., 2002). Die Interaktion von anderen Resten außerhalb dieser Sequenz sowie die Bindung an CDK2 waren bisher unbekannt.

Tabelle 24: Verschiedene pRB-C Konstrukte die für die Interaktion mit CDK2/Cyclin A getestet wurden.

pRB Konstrukte:	GPC	NMR
pRB (790-928)	+	-/+
pRB (790-861)		-/+
pRB (801-890)	+++	+
pRB (825-890)		
pRB (825-914)	-	
pRB (825-928)	+	
pRB (867-928)	-	

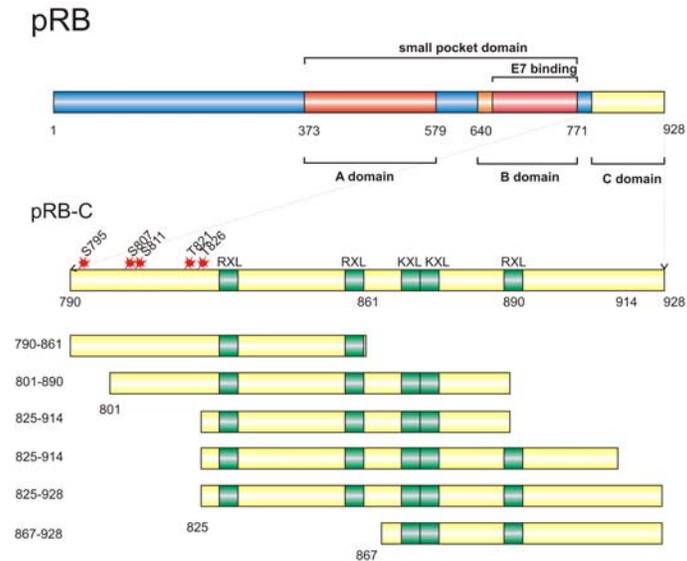


Bild 38 Graphische Darstellung der verschiedenen pRB-C Konstrukte. Die RXL und KXL Motive sind in grün markiert. Die Phosphorylierungsstellen werden durch rote Sterne angezeigt.

Wie zu erwarten konnte in Gelfiltrationsexperimenten nachgewiesen werden, dass die gesamte C-terminale Domäne pRB(790-928) an den Komplex bindet (Bild 39, 40 und 41). Leider entpuppte sich pRB-C als recht instabil, wodurch eine Titration mit CDK2/Cyclin A und Aufnahme eines HSQC Spektrums von ^{15}N markiertem pRB(790-928) mit NMR nicht möglich war. Die C-Domäne von pRB liegt in Lösung ungefaltet vor und degradiert sehr schnell.

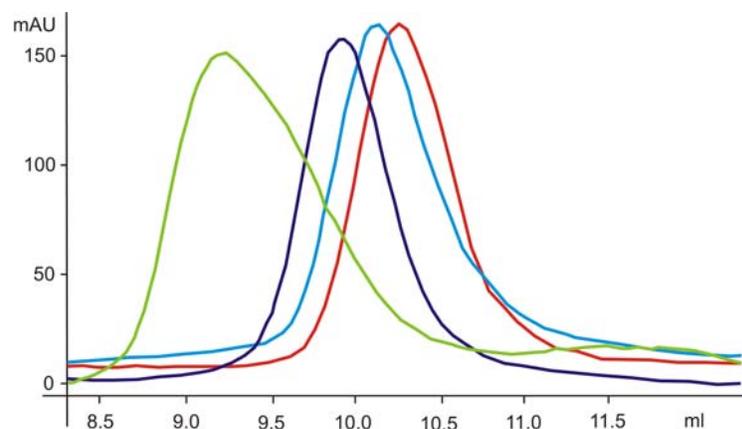


Bild 39 Chromatogramm der Gelfiltration mit CDK2/Cyclin A Komplex sowie zwei verschiedenen pRB-C Konstrukten und p27. Das rote Diagramm zeigt den Komplex CDK2/Cyclin A alleine, das grüne nach Bindung von p27. pRB(790-928) (dunkel blau) und pRB(801-890) (hellblau) binden schwächer an CDK2/Cyclin A, was sich auch an der geringern Verschiebung im Chromatogramm zeigt, obwohl die Konstrukte eine ähnliche Masse wie p27 aufweisen und somit der trimere Komplex ähnliches Laufverhalten zeigen sollte. Die Gelfiltration wurde mit der S75 Analytik durchgeführt.

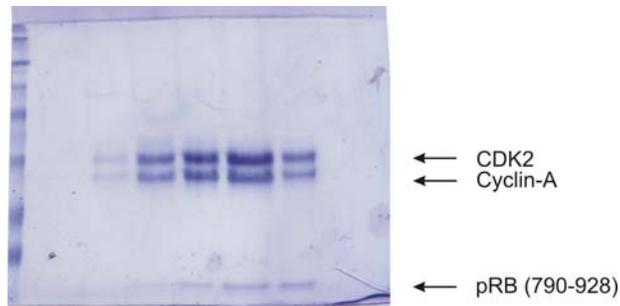


Bild 40 SDS-Page der analytischen Gelfiltration mit CDK2, Cyclin A und pRB(790-928). Alle drei Proteine eluieren in einem Peak.

Ausgehend von dem veröffentlichten Peptid (Lowe et al., 2002) wurden die Konstrukte pRB(801-890) und pRB(867-928) entworfen. Beide beinhalten die Peptidsequenz, erstes am C-Terminus, letzteres am N-Terminus. In Gelfiltrationsexperimenten bindet pRB(801-890) an CDK2/Cyclin A, was in einem, auf Grund der geringen Größe von pRB(801-890), kleinen *shift* des Elutionspeaks von CDK2/Cyclin A sichtbar wird (Bild 41 und 42). Zudem ist auf der SDS-PAGE im Bereich von CDK2/Cyclin A eine zusätzliche Bande von pRB(801-890) sichtbar. Der zweite Peak im Chromatogramm stammt ausschließlich von pRB(801-890) und kommt an der erwarteten Masse für das Monomer von pRB(801-890).

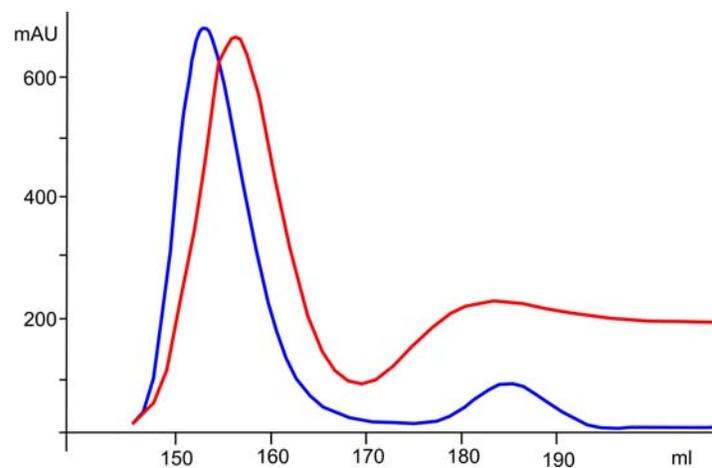


Bild 41 Chromatogramm der Gelfiltration mit CDK2/Cyclin A Komplex mit pRB(801-890). Die Diagramme zeigen den Komplex CDK2/Cyclin A alleine (rot) und im Komplex mit pRB(801-890) (blau). Die Gelfiltration wurde mit der S75 26/60 pg durchgeführt.

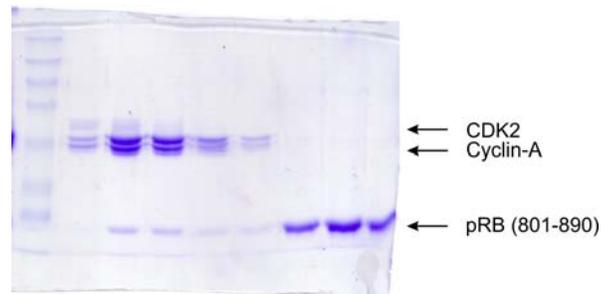


Bild 40 SDS-Page der Gelfiltration mit CDK2, Cyclin A und pRB(801-890). Alle drei Proteine eluieren in einem Peak bei ca. 150-160 ml (Bahn 2-6). Bei 180-190 ml (Bahn 7-10) kommt der Überschuss an pRB(801-890). (Bahn 1: Proteinmarker).

Die Titration von pRB(801-890) mit CDK2/Cyclin A und der Aufnahme eines HSQC Spektrums von ^{15}N pRB(801-890) zeigt, dass mindestens 10-12 Aminosäurereste in die Bindung involviert sind. Trotz der geringen Größe von pRB(801-890) verschwinden nicht alle Signale, was auf einen hohen Anteil von flexiblen Resten schließen lässt. Eine Zugabe von ATP (ATP ist ein Substrat für CDK2, welches für die Übertragung der Phosphatgruppe auf das Protein verwendet wird) zum Komplex hat die Bindung nicht beeinflusst. Durch Zugabe von p27 wird der Komplex zerstört und freies, ungebundenes pRB(801-890) ist durch das Auftauchen der zuvor verschwundenen bzw. die Rückversetzung der verschobenen Peaks wieder sichtbar (Bild 43).

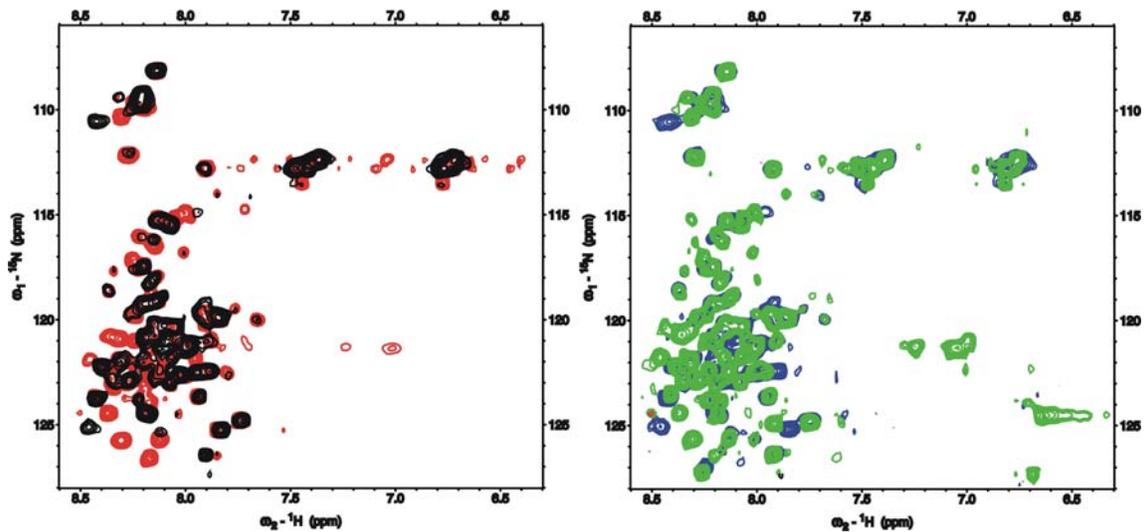


Bild 43 HSQC Spektren von pRB(801-890). Rotes Spektrum: pRB(801-890) alleine, schwarzes und blaues Spektrum: Nach Zugabe von CDK2/Cyclin A. Grünes Spektrum: Nach Zugabe von p27. Das ursprüngliche Spektrum von pRB(801-890) wird wieder hergestellt, d.h. p27 verdrängt pRB(801-890) vollständig aus dem Komplex mit CDK/Cyclin A.

Die Titration von pRB (867-928) mit CDK2/Cyclin A zeigt ebenfalls eine Bindung von pRB (867-928) an CDK2/Cyclin A. Allerdings sind deutlich weniger Peaks betroffen als im Fall mit pRB(801-890). Dies lässt vermuten, dass ein Teil der veränderten Peaks von Signalen herrühren, die nicht zu der veröffentlichten Peptidsequenz gehören und vielleicht mit der Bindung von pRB an CDK2 in Zusammenhang stehen. Allerdings zeigte das HSQC Spektrum von pRB (790-861) (in diesem Konstrukt fehlt die Cyclin A Bindestelle 868-878) eine sehr schwache Bindung. Es sind nur wenige Peaks betroffen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Erkennung von pRB-C zur Phosphorylierung im Wesentlichen durch Cyclin A determiniert ist und die N-Terminale Phosphorylierungsstellen als Substrate nur schwach mit CDK2 interagieren.

4.2.4. p53 und MDM2

In dieser Arbeit wurden verschieden Techniken zur Untersuchung des p53 MDM2 Komplexes und insbesondere dessen Störung mit kleinen Inhibitoren angewendet.

4.2.4.1. ITC-Experimente

Als erstes wurde die Fähigkeit der exprimierten Proteine p53 und MDM2 auf ihre Fähigkeit zur gegenseitigen Bindung hin untersucht. Die ITC Experimente (Bild 44) zeigten, dass die Bindung zwischen MDM2 (1-118) und GST-p53 (1-73) im micromolaren Bereich lag. Die Inhibitoren, die für die Störung des Komplexes benötigt werden, müssten daher mit einer stärkeren Bindungskonstante K_D an MDM2 binden als die ca. 0.6 μ M starke K_D von p53 oder in entsprechenden höheren Konzentrationen vorliegen.

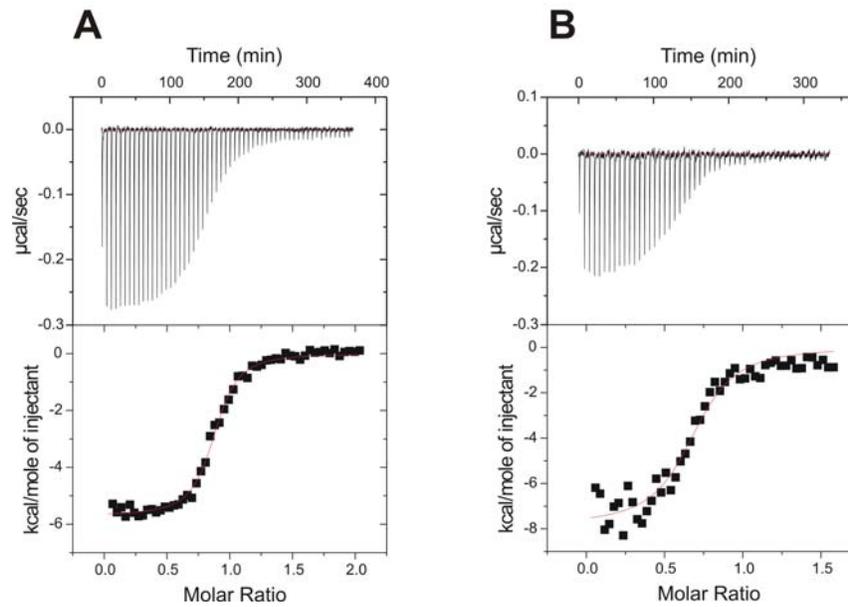


Bild 44 ITC von MDM2 (1-118) gegen GST-p53(1-73) (A) und GST-p53(1-73) gegen MDM2 (1-118) (B)

Ein zweites Konstrukt p53 (1-310) wurde ebenfalls auf dessen Bindung an MDM2(1-118) mit ITC getestet (Bild 45). Die Messung fand in Gegenwart von DMSO statt.

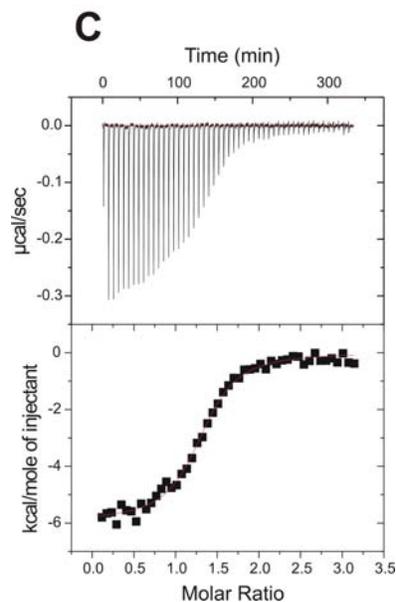


Bild 45 ITC von MDM2 (1-118) gegen p53(1-310) (C)

In der Tabelle 25 sind die Werte für die gemessenen K_D zusammengefasst. Der Durchschnittswert betrug: 622 ± 70 nM.

Tabelle 25 Ergebnisse der ITC Bindungsstudien

Experiment	Probe	Ligand	K_D
A	GST-p53 (1-73)	MDM2 (1-118)	426 nM \pm 40 nM
B	MDM2 (1-118)	GST-p53	673 nM \pm 70 nM
C	p53 (1-310)	MDM2 (1-118)	769 nM \pm 70 nM
\emptyset			622 nM \pm 70 nM

4.2.4.2 Gelfiltrations-Experimente

Interaktion von p53 und MDM2 wurde auch in Gelfiltrationsexperimenten bestätigt. Die Interaktion zeigte sich in einem Shift der Peaks zu höheren Massen Bild 46 und 47 zeigen die Ergebnisse für die Interaktion zwischen MDM2 (1-118) und p53 (1-310).

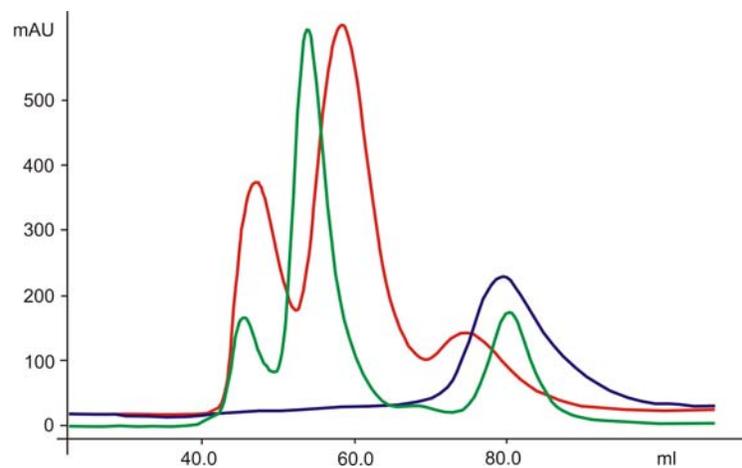


Bild 46 Chromatogramm von p53 (1-310) und MDM2(1-118). Die blaue Linie zeigt MDM2 alleine, die rote stammt von p53(1-310). Werden beide Proteine gemischt, kann der Komplex gereinigt werden, was sich an der Verschiebung des p53 (1-310) Peaks bei 60 ml auf ca. 55 ml zeigt (grüne Linie). Der kleine Peak bei ca. 45 ml stammt vom aggregierten p53 (rote+grüne Linie), der kleine Peak bei 80 ml im grünen Diagramm ist überschüssiges MDM2. Die Gelfiltration wurde mit der HiLoad S75pg Säule durchgeführt.

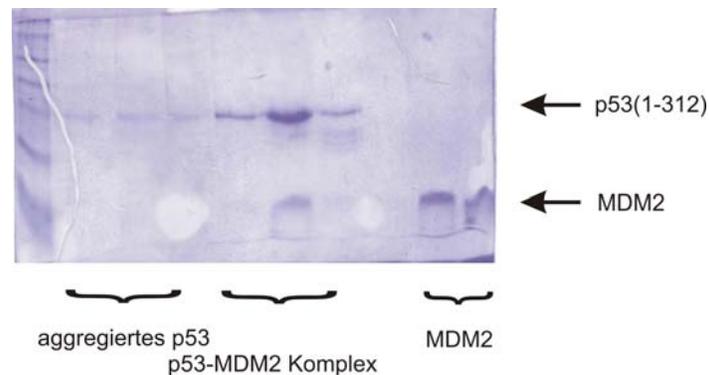


Bild 47 SDS Page der Komplexreinigung p53 (1-310) + MDM2. Bahn 1: Marker, Bahn 2+3 erster Peak mit aggregierten p53 (1-310) Bahn 4-8: Zweiter Peak mit dem p53/MDM2 Komplex. Im SDS Gel sind beide Proteine zu erkennen. Bahn 9+10: MDM2 Peak.

Die selben Ergebnisse wurden auch mit MDM2 und GST-p53(1-73) erzielt (Bild 48 und 49). Der Komplex war stabil genug um ihn in Gegenwart eines Überschuss an MDM2 über die Gelfiltration zu reinigen. Er konnte so direkt in den NMR Experimenten eingesetzt werden wodurch, im Vergleich zu einem Mischen der beiden Proteine, ein molares Verhältnis von 1:1 gewährleistet werden konnte. Dies ist besonders wichtig für die weiter unten beschriebenen *antagonist induced dissociation assay* (AIDA) Experimente. Ein Überschuss von MDM2 oder p53 in diesen Tests würde sonst zu falschen Interpretationen der Bindungsstärke der Antagonisten führen. Durch die Verwendung von, über Gelfiltration gereinigten, MDM2/p53 Komplexen kann dies vermieden werden.

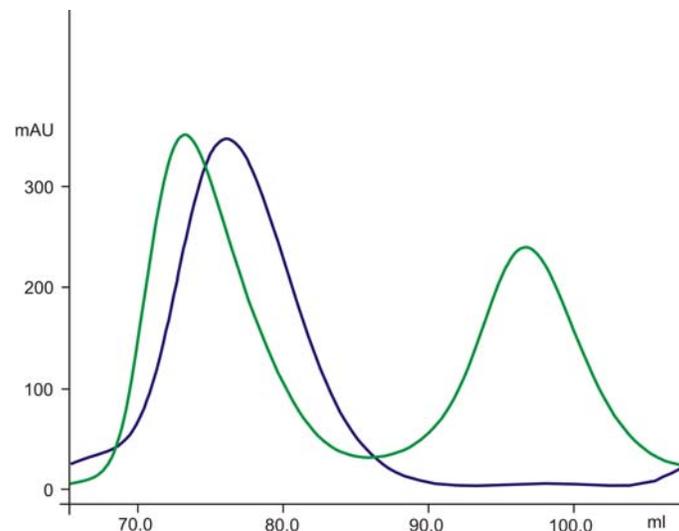


Bild 48 Chromatogramm von GST-p53 (1-73) und MDM2(1-118). Die blaue Linie zeigt GST-p53(1-73) alleine, der Komplex ist im grünen Diagramm dargestellt. Die Gelfiltration wurde mit der HiLoad S200pg durchgeführt.

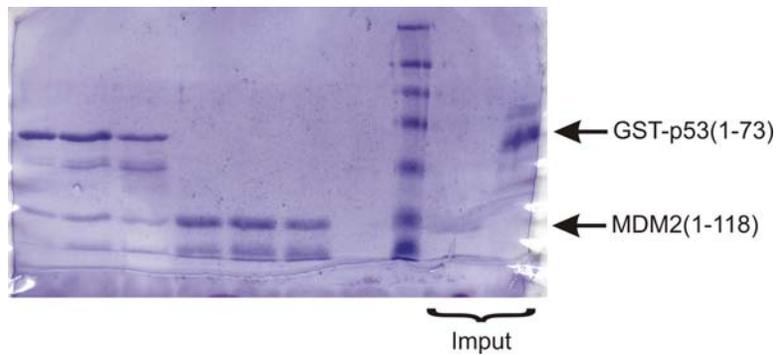


Bild 49 SDS Page des Komplexes zwischen GST-p53(1-73) und MDM2. Im Elutionspeak von GST-p53(1-73) sind beide Proteine vorhanden, im Elutionspeak von MDM2 kommt MDM2 alleine vor. Die übrigen Banden sind Abbauprodukte von p53 und eventuell MDM2. Sie sind bereits im Input enthalten.

Full length p53 bindet ebenfalls in Gelfiltrationen MDM2 (Bild 50 und 51) der Komplex wurde, wie im Abschnitt 4.1.5. beschreiben hergestellt. Der gereinigte Komplex wurde für Kristallisationsexperimente herangezogen, es wurden jedoch keine Kristalle erhalten.

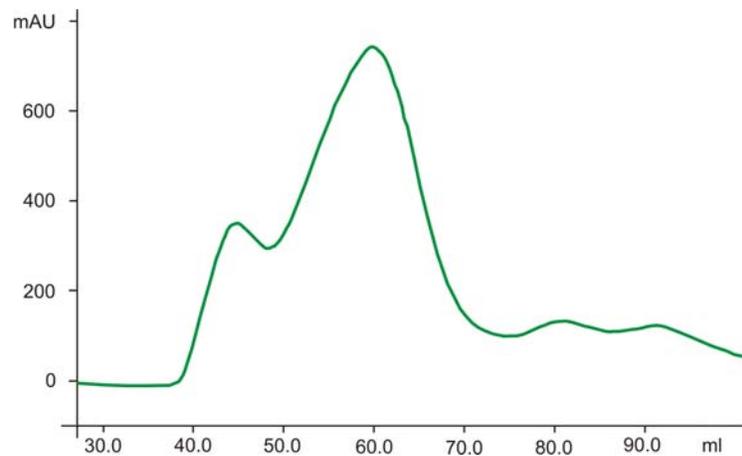


Bild 50 Chromatogramm von *full length* p53 und MDM2(1-118). Die Gelfiltration wurde mit der HiLoad S200pg durchgeführt.

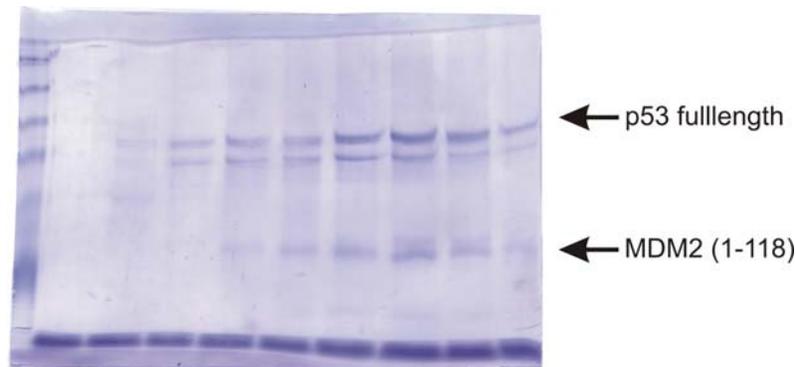


Bild 51 SDS Page der Gelfiltration mit *full length* p53 und MDM2(1-118). Im Elutionspeak sind beide Proteine vertreten, was zeigt, dass sich der Komplex zwischen p53 und MDM2 gebildet hat.

4.2.4.3. NMR-Experimente

Die wichtigste Untersuchung der Interaktion erfolgte mit NMR. Es wurden zu diesem Zweck ^{15}N markierte Proben von MDM2 verwendet. Im Bild 52 ist das ^1H - ^{15}N HSQC Spektrum von MDM2 abgebildet. MDM2 liegt als gefaltetes Protein vor, was sehr gut an der aufgefächerten Verteilung der HN Signale sichtbar ist.

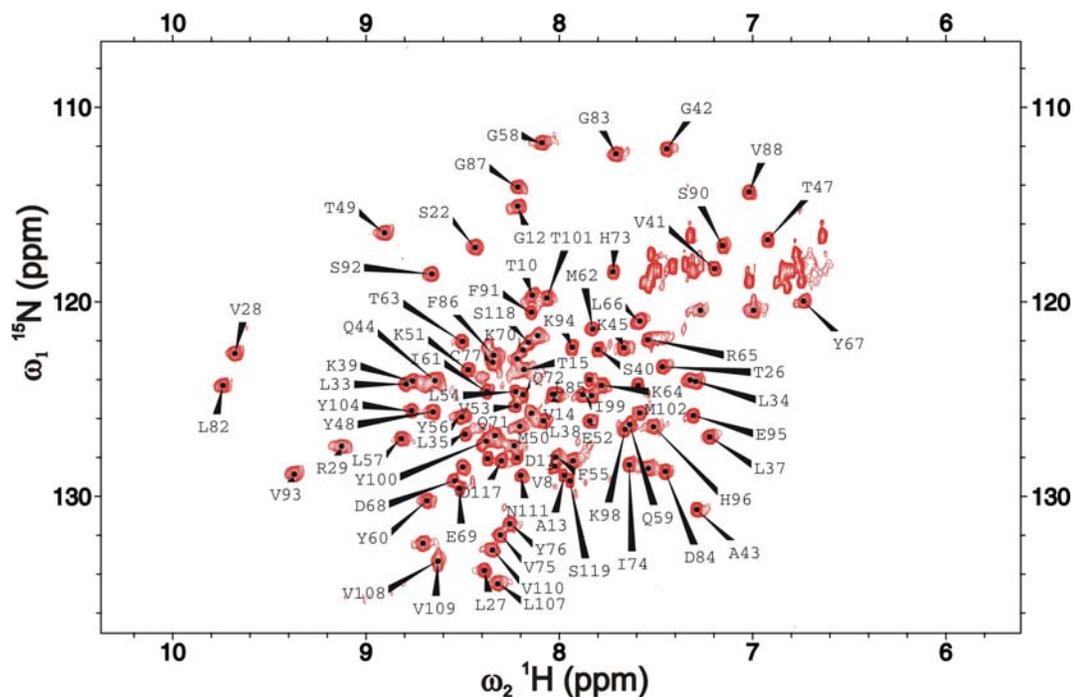


Bild 52 ^1H - ^{15}N HSQC Spektrum von MDM2 (1-118).

Für die Entwicklung neuer Medikamente im Kampf gegen Krebs wurde in der Doktorarbeit eine Vielzahl von möglichen Kandidaten als Inhibitoren der MDM2-p53

Wechselwirkung getestet. Viele der Substanzen wurden zuvor in der Literatur als Inhibitoren beschrieben, doch die verwendeten Methoden sind zum Teil zu ungenau, um eine exakte Aussage über die tatsächliche Beteiligung von MDM2 und p53 zu geben. Durch die Verwendung von rekombinanten Proteinen kann *in vitro* der Einfluss der Inhibitoren auf MDM2 und p53 direkt gemessen werden, ohne störende Nebenwirkungen, wie sie *in vivo* vorkommen.

Ziel war es eine robuste Methode zu entwickeln, die es erlaubt, schnell und zuverlässig eine große Anzahl von Inhibitoren zu testen und mögliche Kandidaten für weitere Optimierungen herauszufinden ohne falsch positive Ergebnisse aufgrund von Nebenreaktionen in *in vivo* Experimenten. Hierzu wurde eine Eigenschaft der NMR Messtechnik ausgenutzt. Um ein qualitativ hochwertiges HSQC Spektrum zu erhalten, sollte das ¹⁵N markierte Protein ein Molekulargewicht von unter 15 kDa haben. Bindet an dieses Protein ein zweites, sodass die Masse des Proteinkomplexes über 40 kDa ist, steigt die beobachtete transversale Relaxationsrate $1/T_2$ stark an, was zu einer Verbreiterung der NMR Resonanz Signale führt. Diese Verbreiterung führt dazu, dass im HSQC Spektrum die meisten Signale der *Cross-peaks* verschwinden. Nur Aminosäuren in flexiblen Regionen sind weiterhin sichtbar.

Ein Inhibitor, der mit einer höheren Affinität an eines der beiden Proteine bindet als das gebundene Partnerprotein, zerstört den Protein-Protein Komplex und das ursprüngliche HSQC Spektrum, mit Ausnahme der durch die Bindung des Inhibitors verschobenen *Cross-peaks*, wird wieder hergestellt. Ist der Inhibitor zu schwach, um den Komplex zu zerstören, wird das HSQC Spektrum nur teilweise oder überhaupt nicht sichtbar. Mit dieser Methode lässt sich auch nachweisen, ob das aus dem Komplex freigelassene Protein im nativen Zustand vorliegt oder ob durch die Zugabe des Inhibitors das Protein denaturiert wurde und dadurch der Proteinkomplex zerstört wurde (Bild 53). Die Methode wurde *antagonist induced dissociation assay* (AIDA) genannt.

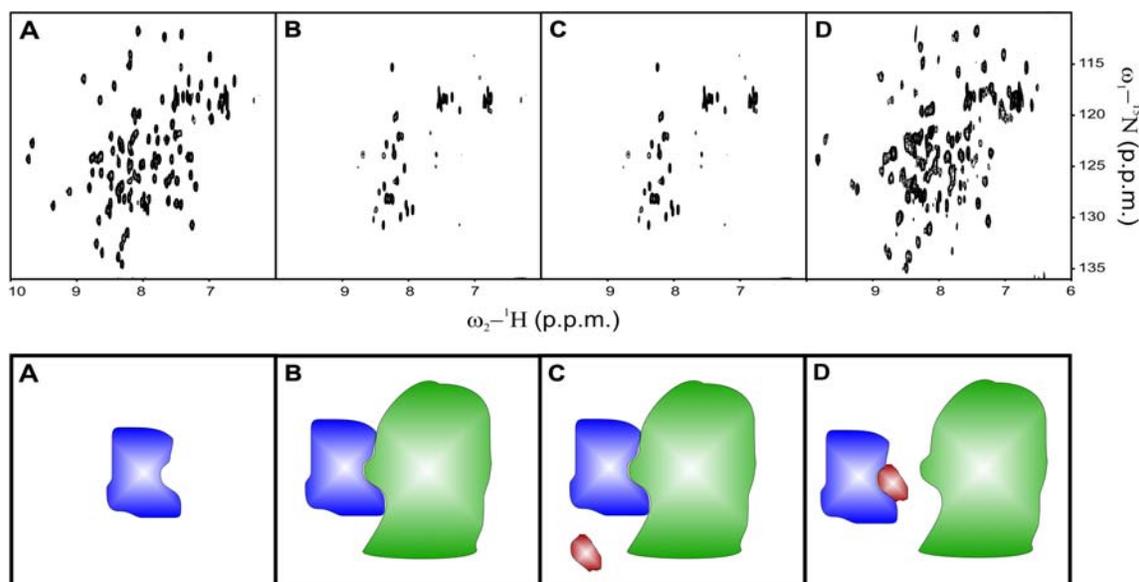


Bild 53 antagonist induced dissociation assay (AIDA). **A:** ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum des kleineren Bindungspartners. **B:** Nach Zugabe des größeren Bindungspartners verschwinden die meisten der *Cross-peaks*. **C:** Nach Zugabe eines Inhibitors der mit geringere Affinität bindet. Der Komplex bleibt bestehen und das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum zeigt weiterhin nur die flexiblen Reste. **D:** Nach Zugabe eines Inhibitors der mit hoher Affinität bindet. Der Komplex wird zerstört und das ursprüngliche ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum wird wieder sichtbar.

Gezeigt ist das ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektrum von MDM2, Bindungspartner ist p53(1-310). Der nichtbindende Inhibitor in **C** ist RITA, der bindende in **D** ist Nutlin-3.

Die Methode wurde hauptsächlich für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Inhibitoren und dem MDM2/p53 Komplex verwendet. Doch auch zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen pRB/CDK2/Cyclin A und dem Inhibitor p27 wurde die Methode erfolgreich eingesetzt. Im weiteren Teil der Arbeit wird auch eine 1D Variante dieser Methode vorgestellt, die ohne ^{15}N markierte Proben auskommt. Diese 1D Variante von AIDA nutzt zur Beobachtung der Komplexbildung und die erfolgreiche Störung mit Inhibitoren die Tryptophane W23 und W53 von p53.

Die MDM2/p53 Wechselwirkung beschränkt sich auf einen ca. 100 Aminosäuren großen Abschnitt des N-Terminus von MDM2 und dem kleinen Bereich der Aminosäuren 18-26 auf p53. Für die Experimente wurde MDM2(1-118) und p53(1-310) verwendet. Der Komplex hat eine Gesamtmasse von ca. 45 kDa.

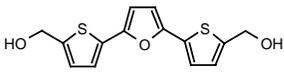
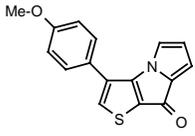
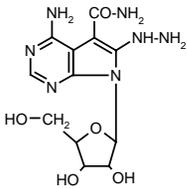
Im ersten Schritt des Experiments wurde das ^{15}N markierte MDM2 mit p53 titriert und der gebildete Komplex konnte aus dem Verschwinden der meisten MDM2 Peaks im HSQC Spektrum beobachtet werden. Die Peaks, die von der $\text{C}\alpha$ Kette von gefalteten Bereichen

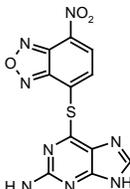
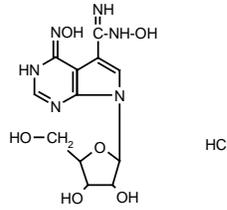
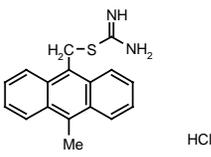
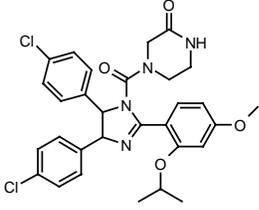
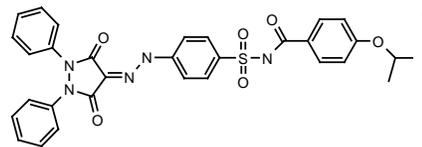
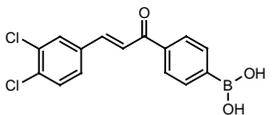
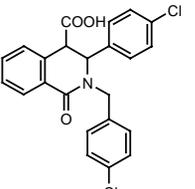
herrühren, werden verbreitert und/oder verschwinden. Übrig bleiben die Peaks der flexiblen Reste in ungefalteten Regionen und von ungebundenen MDM2. Bei einer Konzentration von 0.1 mM und einer K_D von 0.7 μ M sind bei einem 1:1 Verhältnis von MDM2 zu p53 ca. 8% der Proteine im freien ungebundenen Zustand. Die meisten der übriggebliebenen Peaks sind im Spektrum im Bereich von 8.3 ppm zu finden, welcher typisch ist für NH Amid Signale in ungefalteten Proteinen. Zudem gibt es Peaks im Bereich von 7 und 7.5 ppm, die von den flexiblen Seitenketten hervorgerufen werden (Bild 53 B). Aufgrund der Möglichkeit die MDM2/p53 Komplexe über Gelfiltration zu reinigen, und da auf diese Weise ein molares Verhältnis von 1:1 gewährleistet werden konnte, wurden in den späteren AIDA Experimenten ausschließlich Komplexe der Gelfiltration verwendet und MDM2 nicht mehr mit p53 titriert.

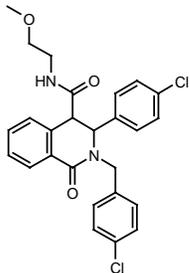
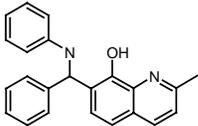
Im zweiten Schritt erfolgt die Zugabe des Inhibitors. Sollte er stark genug sein, wird das MDM2 Spektrum wieder hergestellt, wenn er zu schwach ist oder keinen Effekt auf den MDM2/p53 Komplex hat, werden die Peaks auch nach Zugabe des Inhibitors aufgrund des Weiterbestehens des MDM2/p53 Komplexes verschwunden bleiben.

Mit dieser Methode wurde eine Vielzahl von Inhibitoren getestet. Eine kleine Auswahl der getesteten Inhibitoren sowie deren Quelle ist in Tabelle 26 aufgelistet.

Tabelle 26 Verschiedene MDM2 Inhibitoren

	Struktur	M_R	Name	Literatur
A			RITA	Issaeva et al., 2004
B		281 g/mol	8H-Thieno[2,3-b]pyrrolizin-8-one,3-(4-methoxyphenyl)	Berkso et al., 2005
C		339 g/mol	7H-Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carboxamide,4-amino-6-hydrazino-7-.beta.-D-ribofuranosyl	Berkso et al., 2005

D		331 g/mol	4-[(2-aminopurin-6-yl)thio]-1-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazole	Berkso et al., 2005
E		376 g/mol	7H-Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-5-carboxamidoxime-4-(hydroxyamino)-7-.beta.-D-ribofuranosyl, monohydrochloride	Berkso et al., 2005
F		316 g/mol	Pseudourea,2-[(10-methyl-9-anthryl)methyl]-2-thio-, monohydrochloride	Berkso et al., 2005
G	n.b.	328.4 g/mol	A	Pharmazeutische Industrie
H	n.b.	580.5 g/mol	B	Pharmazeutische Industrie
I		581.5 g/mol	Nutlin-3	Roche Diagnostics
J		597.65 g/mol	Sulfonamid	Galatin et al., 2004
K		320.97 g/mol	Boronic-Chalcone 3b	Kumar et al., 2003
L		426.3 g/mol	NXN 6	Nexus pharma

M		483.4 g/mol	NXN 7	Nexus pharma
N	n.b.	410.3 g/mol	NXN 11	Nexus pharma
O	n.b.	590.6 g/mol	NXNY	Nexus pharma
P		340.4 g/mol		Lu et al., 2006

Nutlins gehören zur Klasse der cis-Imidazol Verbindungen, von denen berichtet wurde, dass sie die MDM2/p53 Wechselwirkung inhibieren können. Nutlin-3 (I) ist der effektivste in dieser Reihe und hat einen IC_{50} von $0.09 \mu\text{M}$ (Vassilev et al., 2005). Eine schrittweise Zugabe von Nutlin-3 zu dem Komplex aus MDM2/p53 stellt das HSQC Spektrum von MDM2 wieder vollständig her (Bild 53 D). Die Aminosäurereste von MDM2, die an der Bindung von Nutlin-3 beteiligt sind, sind durch die verschobenen Peaks im wiederhergestellten Spektrum sichtbar. Das freigesetzte p53 bleibt im nativen Zustand und auch der MDM2/Nutlin-3 Komplex ist löslich und stabil.

Vom Sulfonamid (J) wurde berichtet, dass er die Interaktion zwischen MDM2 und p53 mit einem IC_{50} von $32 \mu\text{M}$ inhibiert (Galatin et al., 2004). Eine schrittweise Zugabe von Sulfonamid zu dem MDM2/p53 Komplex führt zur Freisetzung von p53. Eine Interaktion zwischen MDM2 und Sulfonamid konnte aber nicht nachgewiesen werden. Vielmehr kommt es durch Zugabe von Sulfonamid zu einer Präzipitation von MDM2 (D`Silva et al., 2005).

RITA ist ein Inhibitor, der anders als die anderen getesteten Inhibitoren p53 binden soll und dadurch p53 aus dem Komplex mit MDM2 freisetzen kann. Die Experimente mit ^{15}N markierten MDM2 und p53(1-310) konnten aber eine Freisetzung von p53 durch RITA nicht nachweisen (Bild 53C). Auch die Verwendung weiterer p53 Konstrukte (GST-p53(1-73) und GST-p53(1-100), das zweite wurde von der Gruppe Dr. Galina Selivanova aus Schweden zur Verfügung gestellt, die auch die Interaktion von RITA mit diesem p53 Konstrukt nachgewiesen hatte) konnte keine Freisetzung von p53 durch RITA aus dem MDM2/p53 Komplex zeigen. Auch eine Bindung von RITA an ^{15}N markiertes p53 konnte nicht

nachgewiesen werden. RITA kann möglicherweise *in vivo* einen Einfluss auf den MDM2/p53 Komplex haben, *in vitro* konnte aber ein Einfluss von RITA auf die MDM2/p53 Wechselwirkung mit unserer Methode nicht nachgewiesen werden (Bild 53 C).

Die Inhibitoren B-G und P zeigten, ebenso wie RITA überhaupt keinen Effekt auf die Dissoziation des MDM2-p53 Komplexes.

NXN6 (L) und NXN7 (M) gehören zu einer Klasse von 1-Hydroxyisochinolin Derivaten mit Substitutionen in der 2,3 und 4 Position. Die Verbindungen wurden von einer Pharmafirma zu Testzwecken bereitgestellt. NXN-6 ist einigermaßen wasserlöslich, wohingegen NXN-7 in höheren Konzentrationen aus wässrigen Lösungen ausfällt. Beide Verbindungen wurden auf ihre Bindung zu MDM2 hin getestet (Bild 54 und 55). NXN-6 bindet mit einer K_D von $13 \pm 5 \mu\text{M}$, NXN-7 bindet mit einer K_D von $\sim 5 \mu\text{M}$ etwas stärker. Die K_D von NXN-6 wurde auch über die Titration mit MDM2 T101W bestimmt. Der dabei berechnete Wert ergab eine K_D von $3 \mu\text{M}$ (Abschnitt 4.2.5.)

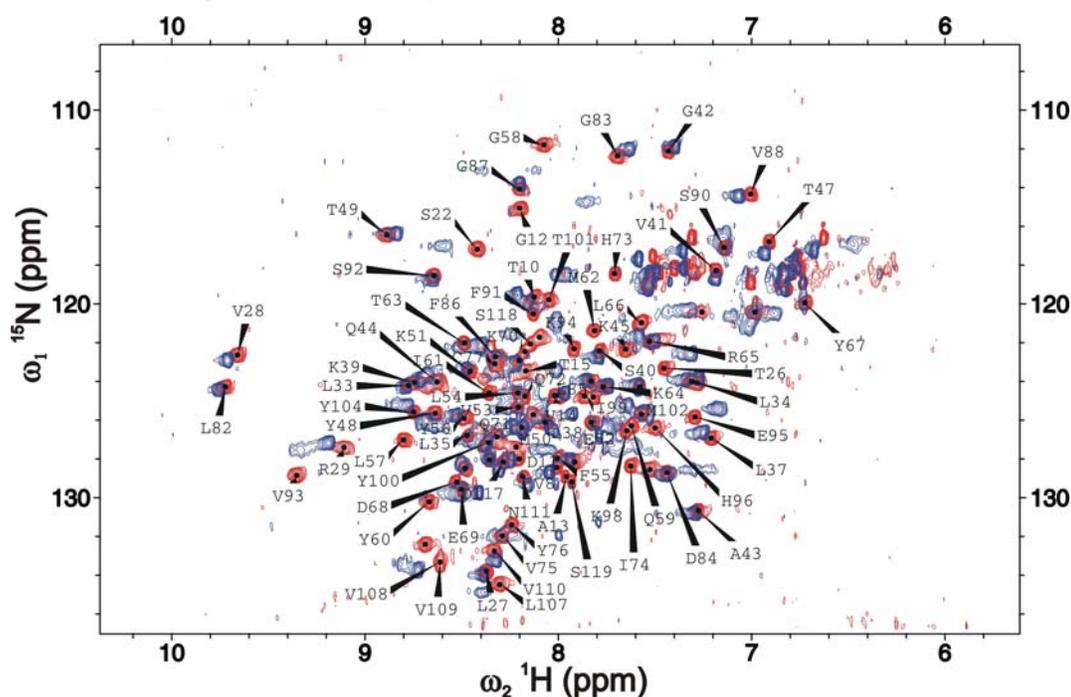


Bild 54 Bindung von NXN-6 an ^{15}N MDM2. Rot: Referenz, Blau: nach Zugabe des Inhibitors.

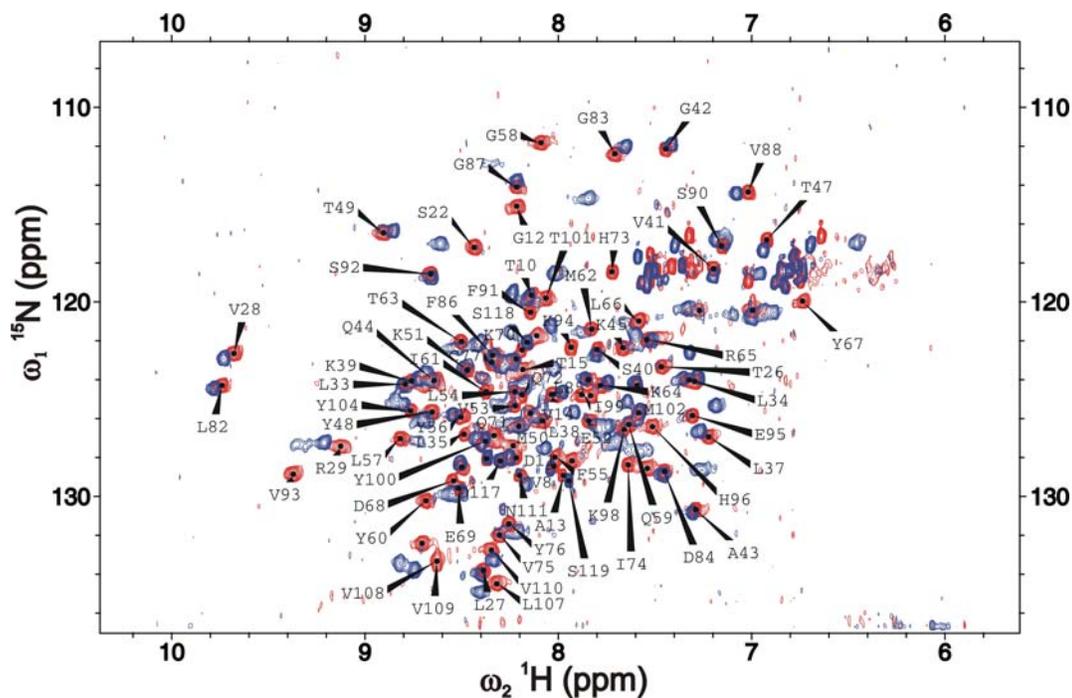


Bild 55 Bindung von NXN-7 an ^{15}N MDM2. Rot: Referenz, Blau: nach Zugabe des Inhibitors.

Die Verbindungen sind jedoch in ihrer Affinität zu MDM2 schwächer als p53 (K_D 0.6 μM). Trotz der schlechteren Dissoziationskonstante konnten beide Verbindungen den Komplex zwischen MDM2 und p53 erfolgreich stören. Ungeachtet der besseren Dissoziationskonstante von NXN-7 zu NXN-6 sind beide Substanzen ungefähr gleichwertig in ihrer Fähigkeit, den Komplex zu stören, vermutlich gleicht die bessere Wasserlöslichkeit von NXN-6 den Nachteil der schlechteren Dissoziationskonstante aus. Beim Mischen des Inhibitors mit dem Proteinkomplex stehen daher mehr Moleküle des Inhibitors für eine Bindung an MDM2 zur Verfügung als im Falle von NXN-7. Bild 56 zeigt die Oberflächendarstellung von MDM2. Die Farben zeigen die Stärke der chemischen Verschiebung an. Bei NXN-11 sind nur wenige Reste betroffen und die Bindungstasche wird weniger gut abgedeckt (Bild 56C)

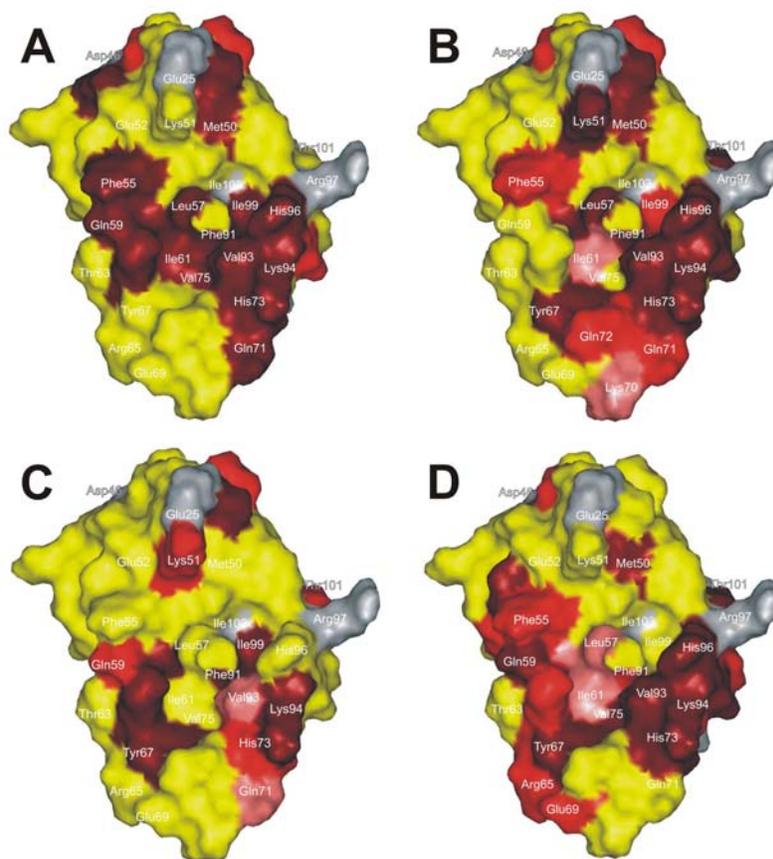


Bild 56 Oberflächendarstellung von MDM2. Die roteingefärbten Bereiche zeigen die Aminosäuren, die bei der Bindung des Inhibitors beteiligt sind. Je tiefer die Rotfärbung, desto größer ist die chemische Verschiebung durch die Bindung des Inhibitors. Die grauen Flächen zeigen Aminosäuren, die im HSQC Spektrum nicht zugeordnet sind. (Die Farben beruhen auf dem „closest neighbour assignment“) (A: NXN-6, B: NXN-7, C: NXN-11 und D: Nutlin-3)

Mit NXN-6 wurde ein Dissoziationstest des Komplexes zwischen MDM2 und GST-p53 (1-73) durchgeführt (AIDA). Bild 57 zeigt das Ergebnis dieses Experiments. Bei der Zugabe von GST-p53(1-73) verschwinden die meisten Peaks im HSQC Spektrum (Bild 57 rotes Spektrum)

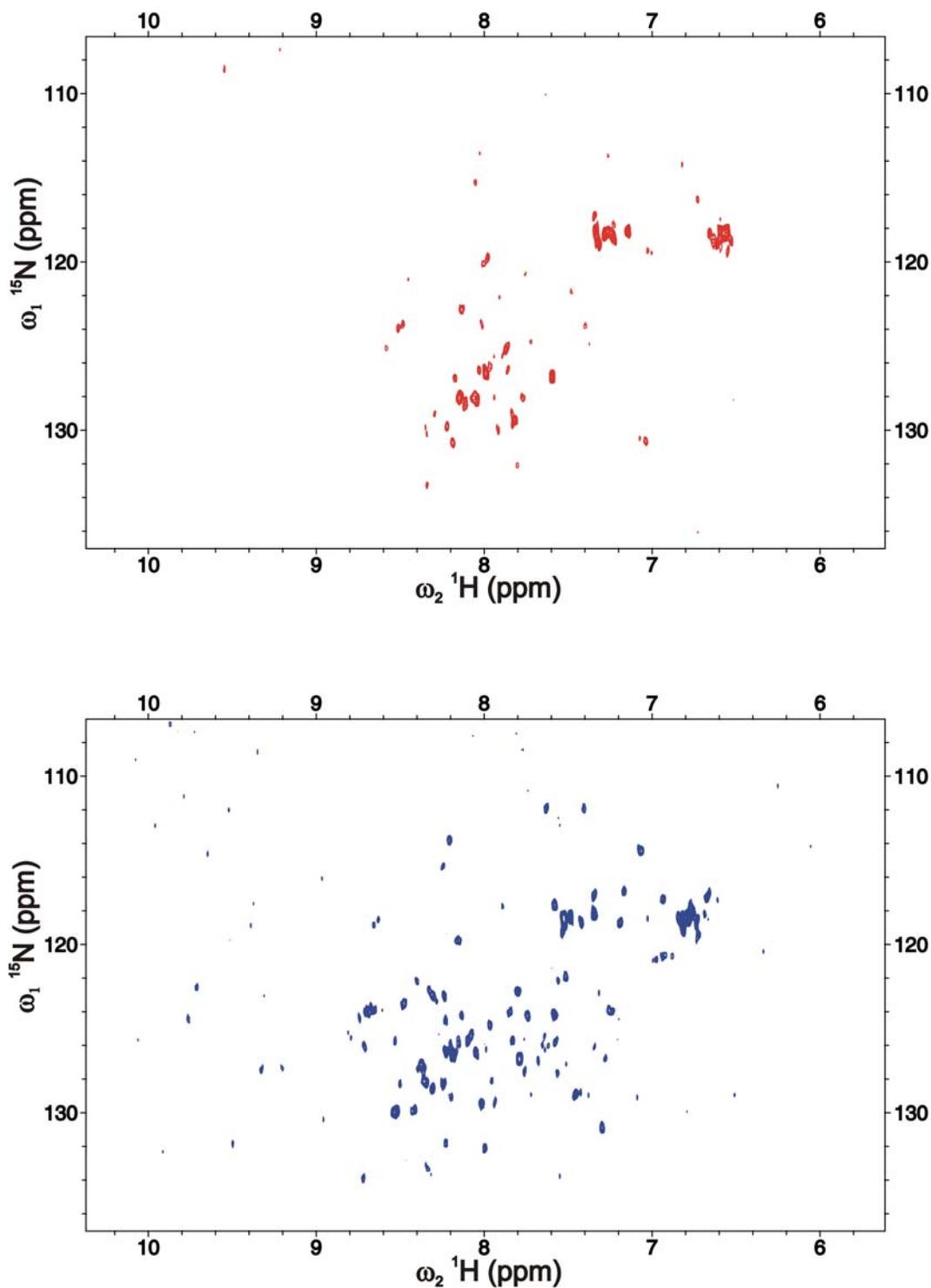


Bild 57 Komplex GST-p53(1-73) ^{15}N MDM2 (rot) und nach Zugabe des Inhibitors NXN-6 (blau). Das Spektrum wird wieder vollständig hergestellt. Die Probe war sehr verdünnt, was zu einem, im Vergleich zu den restlichen HSQC Spektren, schlechteren Signal/Rausch Verhältnis führt.

NXN-6 ist in der Lage bei molaren Überschuss p53 vollständig aus dem Komplex mit MDM2 zu verdrängen (Bild 57 blaues Spektrum). Die K_D von NXN-6 ist zwar ca. 20 mal

schlechter als die von Nutlin-3, dennoch reicht bereits ein zweifacher molarer Überschuss an Inhibitor aus, um p53 freizusetzen. Dies zeigt sich auch in 1D *Antagonist induced dissociation assay* (1D-AIDA). Bild 58 zeigt die 1D NMR Spektren von GST-p53 (A und D) den Komplex mit MDM2 (B und E) und nach Zugabe von Nutlin-3 (C) bzw. NXN-6 (D). GST-p53 hat zwei Tryptophane im flexiblen N-terminalen Teil von p53 (W23 und W53). Die Tryptophane im GST-Tag sind nicht flexibel und aufgrund der Linienverbreiterung sind sie nicht detektierbar. Bei der Komplexbildung mit MDM2 bindet W23 von p53 in die Bindungstasche. Die Flexibilität der Aminosäure wird dadurch eingeschränkt und die resultierende Linienverbreiterung sorgt für ein Verschwinden des Signals von W23. Die Flexibilität des zweiten Tryptophans wird nicht beeinflusst und bleibt unverändert. Die Zugabe des Inhibitors setzt GST-p53 aus dem Komplex mit MDM2 frei was aus der Wiederherstellung des ursprünglichen GST-p53 Spektrums ersichtlich ist. Dasselbe Ergebnis erhält man mit hMDM2(1-125) und p53 (1-310) (Bild 59).

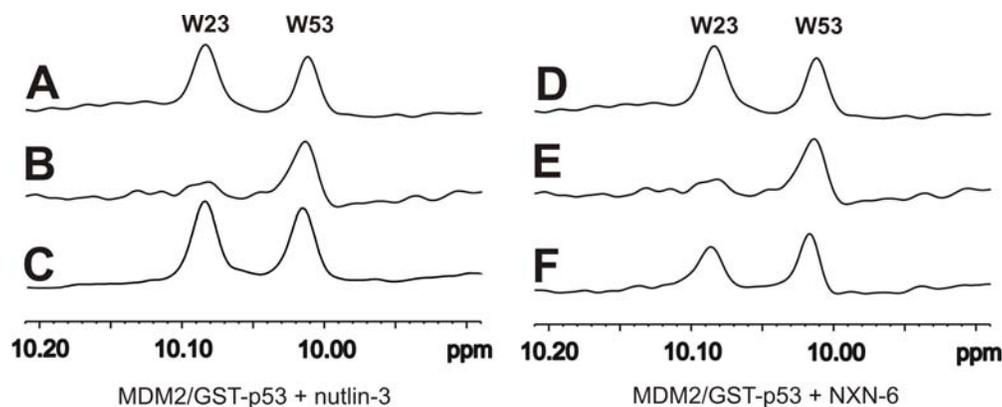


Bild 58 NMR Verdrängungs-Experiment (1D-AIDA). (A, D) 1D Protonenspektrum der Seitenketten von Tryptophan von ungebundenen p53 (GST-p53(1-73)): W23, W53. (B, E) Bei der Bildung des Komplexes mit MDM2 verschwindet das Signal des Tryptophans W23. (C, F) Nach Zugabe von Nutlin-3 wird das Spektrum wieder hergestellt (C) als eine Folge der vollständigen Dissoziation von MDM2 und p53. NXN-6 ist ebenfalls in der Lage GST-p53 aus dem Komplex mit MDM2 zu verdrängen (F).

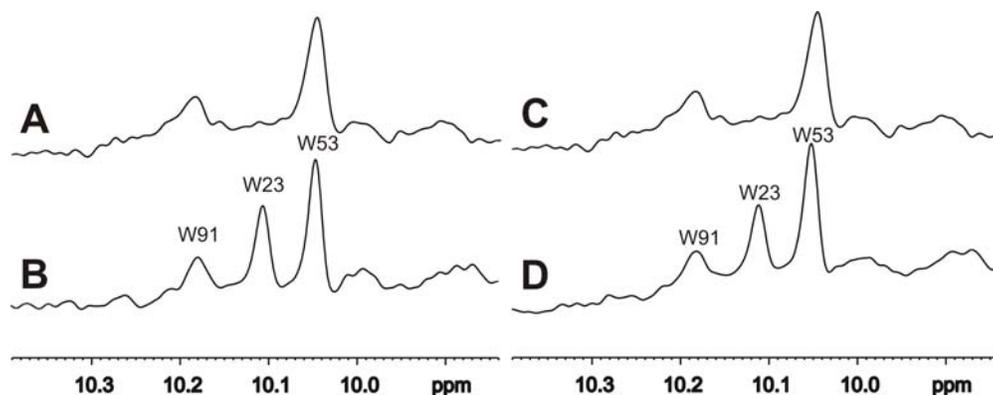


Bild 59 NMR Verdrängungs-Experiment (1D AIDA). (A,C) 1D Protonenspektrum der Seitenketten von Tryptophan von p53 (1-310): W91 W53 in Komplex mit hMDM2(1-125). Bei der Bildung des Komplexes mit MDM2 verschwindet das Signal des Tryptophans W23. (B, D) Nach Zugabe von Nutlin-3 wird das Spektrum wieder hergestellt (B) als eine Folge der vollständigen Dissoziation von MDM2 und p53. NXN-6 ist ebenfalls in der Lage, p53 (1-310) aus dem Komplex mit MDM2 zu verdrängen (D), allerdings etwas schlechter.

Trotz der Tatsache, dass NXN-6 mit einer ungefähr 20fach schlechteren K_D an MDM2 bindet, reicht auch für p53 (1-310) bereits ein 2facher molarer Überschuss an Inhibitor aus, p53 (1-310) aus dem Komplex mit MDM2 zu (60%-80%) freizusetzen.

Von NXNY (O) standen die Enantiomere 676186 und 676187 zur Verfügung. Die Mischung bindet ähnlich wie NXN-6 und NXN-7 an MDM2, die beiden Enantiomere zeigen jedoch deutliche Unterschiede zueinander (Bild 60 und Bild 61).

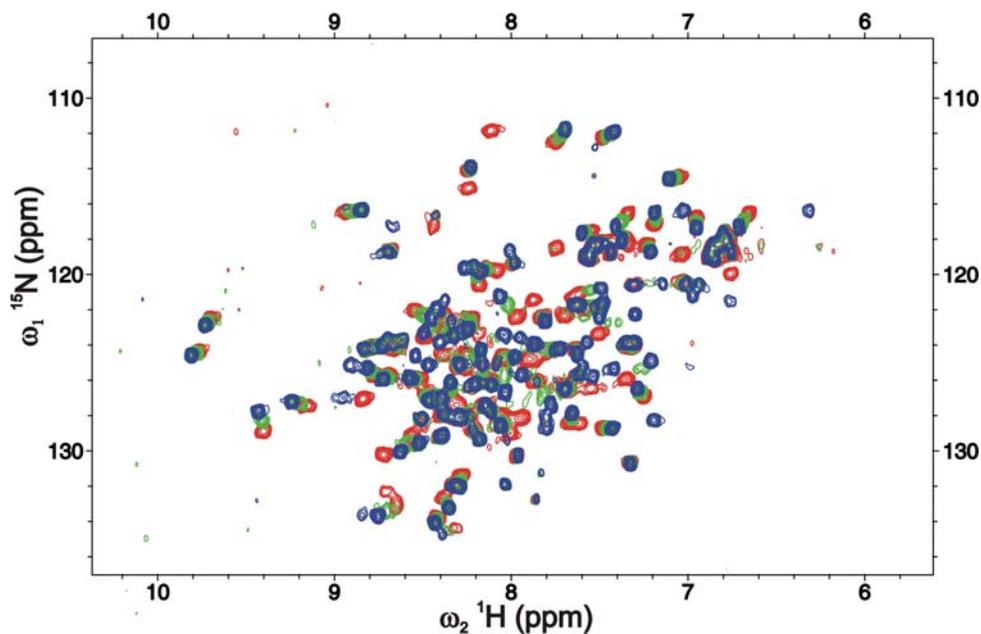


Bild 60 Bindung von NXNY an ^{15}N MDM2 (1-125) Titration mit dem Enantiomer 676186. Rot: Referenz, Grün und blau: nach Zugabe des Inhibitors.

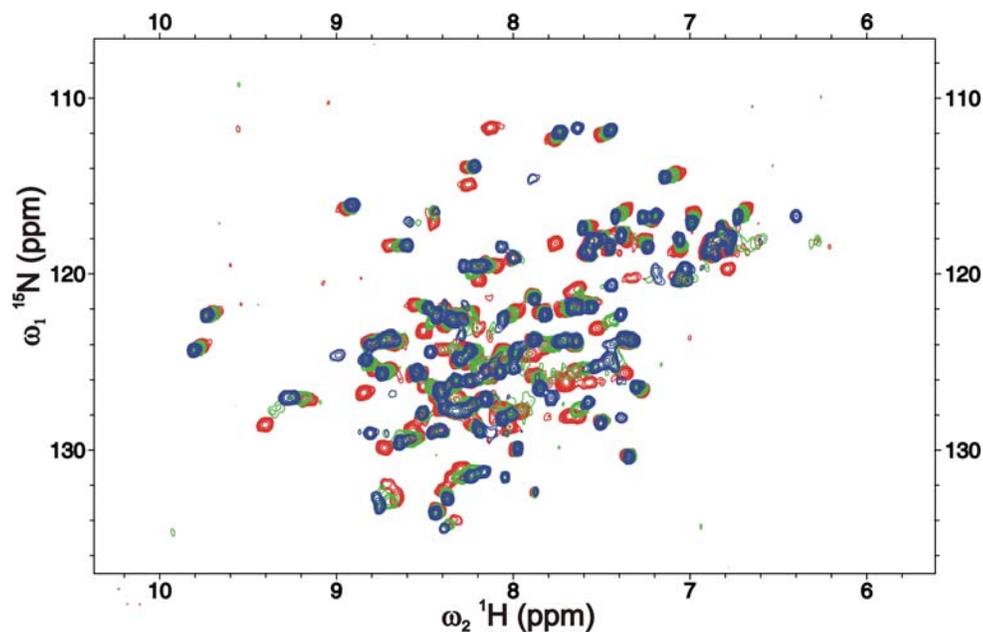


Bild 61 Bindung von NXNY an ^{15}N MDM2 (1-125) Titration mit dem Enantiomer 676187. Rot: Referenz, Grün und blau: nach Zugabe des Inhibitors.

Die Unterschiede werden noch deutlicher in der Oberflächendarstellung (Bild 62)

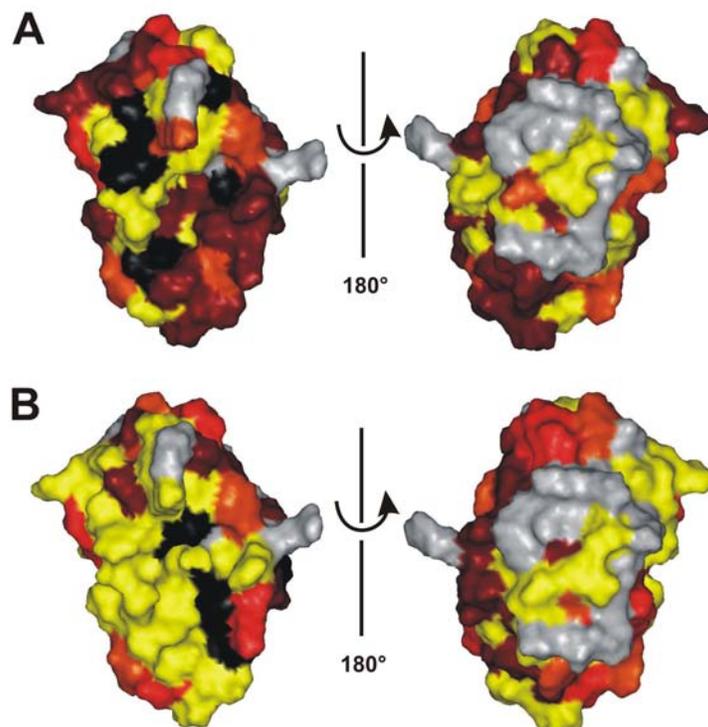


Bild 62 Oberflächendarstellung von MDM2 nach Titration mit NXNY. **A:** Enantiomer 676186. **B:** Enantiomer 676187. Je tiefer die Rotfärbung, desto größer ist die chemische Verschiebung durch die Bindung des Inhibitors. Die grauen Flächen zeigen Aminosäuren, die im HSQC Spektrum nicht zugeordnet sind. Die schwarzgefärbten Reste zeigen die größte chemische Verschiebung. Gelb: keine oder geringe chemische Verschiebung. (Die Farben beruhen auf dem „closest neighbour assignment“ sofern eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war.)

Bei der Bestimmung der K_D zeigte sich, dass beide Enantiomere mit ungefähr derselben K_D an MDM2 (1-125) binden. Aus der Oberflächendarstellung lässt sich jedoch ablesen, dass 676186 die Bindungstasche besser abdeckt als 676187. Beide Enantiomere erzeugen bei Aminosäuren in der Bindungstasche die größten chemischen Verschiebungen, allerdings bei unterschiedlichen Resten. 676186 beeinflusst am stärksten die Reste E52, F55, Y67 und I99 während bei 676186 vornehmlich die Reste L54, Q60, D68, H73, I74, V93 und K98 die größte chemische Verschiebung zeigen. Die Unterschiede in der Bindung werden offensichtlich durch die Chiralität von NXNY ausgelöst. In wieweit die Enantiomere sich in AIDA Experimenten unterscheiden, muss noch getestet werden.

4.2.4.4. ITC-Experimente mit Inhibitoren

Die Eigenschaften einiger Inhibitoren wurden auch mit ITC überprüft. Dazu wurde zum normalen ITC Experiment equimolare Mengen des Inhibitors zur Proben- und Ligandenlösung gegeben (Bild 63). Die ITC zeigt, dass nach der Zugabe von equimolaren Mengen an Nutlin-3 zur MDM2 Ligandenlösung keine Bindung mehr zwischen MDM2 und GST-p53 zu beobachten ist.

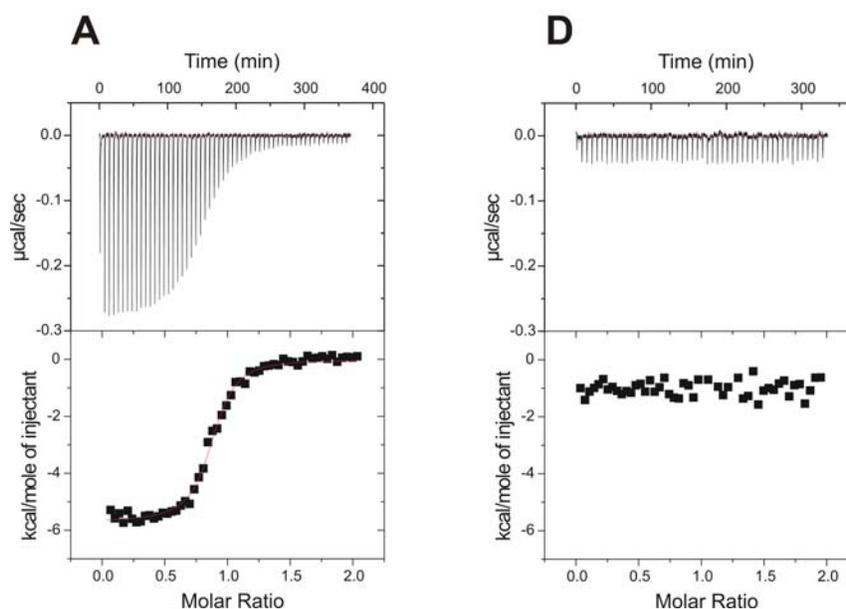


Bild 63 ITC Experiment von MDM2 gegen GST-p53 in Anwesenheit von Inhibitoren. **A:** Referenz, **D:** ITC mit Nutlin-3

Ein ähnliches Experiment mit RITA, ein Inhibitor der an p53 binden sollte und dadurch den Komplex zwischen p53 und MDM2 zerstören könnte, zeigte, dass die Dissoziationskonstante um den Faktor 3 schwächer wurde, jedoch noch weiterhin MDM2 an p53 binden konnte (Bild 64).

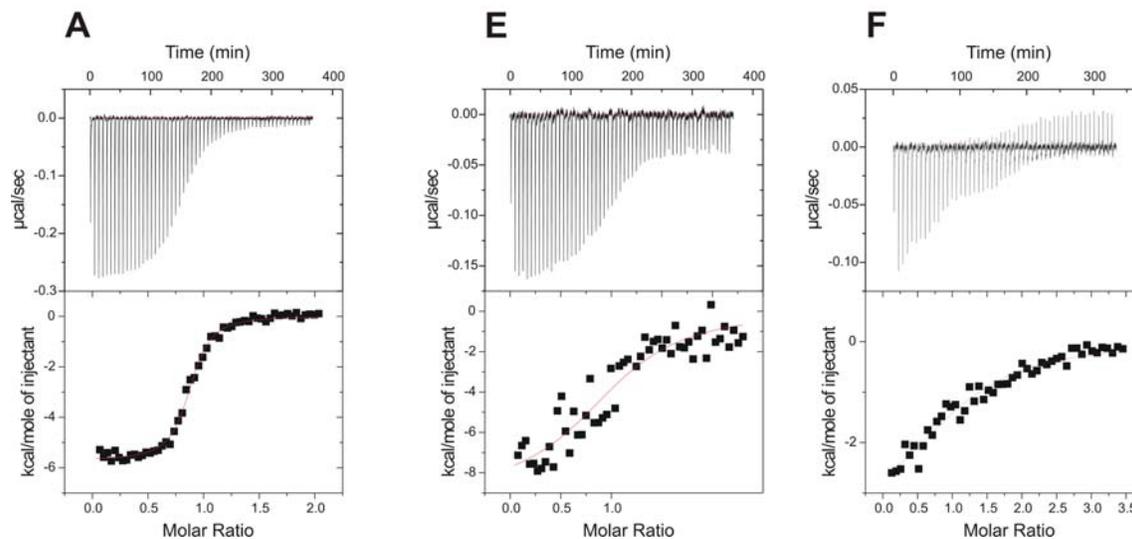


Bild 64 ITC Experiment von MDM2 gegen GST-p53 in Anwesenheit von Inhibitoren. **A:** Referenz, **E:** ITC mit RITA, **F:** ITC mit Roscovitin

Um zu überprüfen, ob dies ein Effekt von RITA oder durch das Lösungsmittel DMSO, welches zur Solubilisierung von RITA dem Experiment zugegeben wurde, war, wurde das Experiment mit Roscovitin, einer niedermolekularen Verbindung, die weder an MDM2 noch an p53 bindet, wiederholt. Das Ergebnis war ähnlich zu der Titration mit RITA, die Dissoziationskonstante wurde um den Faktor 3-4 schwächer. Es ist daher davon auszugehen, dass der beobachtete Effekt durch DMSO hervorgerufen wurde (Bild 64 F). RITA konnte schon im AIDA Experiment den Komplex nicht erfolgreich stören. Um eine zweite Technik zu verwenden wurden die ITC von MDM2 mit GST-p53 in Gegenwart des Inhibitors durchgeführt. Da auch dieses Experiment zeigte, dass RITA keinen Einfluss auf die Interaktion nimmt, ist davon auszugehen, dass der von Issaeva et al., 2004 beobachtete Effekt nicht von einer Interaktion von RITA mit p53 *in vitro* herrühren kann.

4.2.5. 1D NMR Titration mit MDM2 Tryptophan-Mutanten

Zur Beschleunigung der Messzeit wurden einige Mutanten von MDM2 hergestellt, die ein Tryptophan in der Primärsequenz enthielten. Da die Wildtyp Form von MDM2 kein Tryptophan in den ersten 118 Aminosäuren enthält, kann das Tryptophan sehr leicht in 1D Spektren identifiziert werden. Da zudem die chemische Verschiebung von ungefähr 10 ppm spezifisch für das Ne Proton von Tryptophan ist und keine andere Aminosäure ein Signal bei dieser chemischen Verschiebung zeigt, ist das Tryptophan Signal sehr gut separiert vom Rest der Protonen. Die Einzelnen Punktmutanten sind in Bild 65 (Oberflächenmodell) und Bild 66 (Bändermodell) dargestellt.

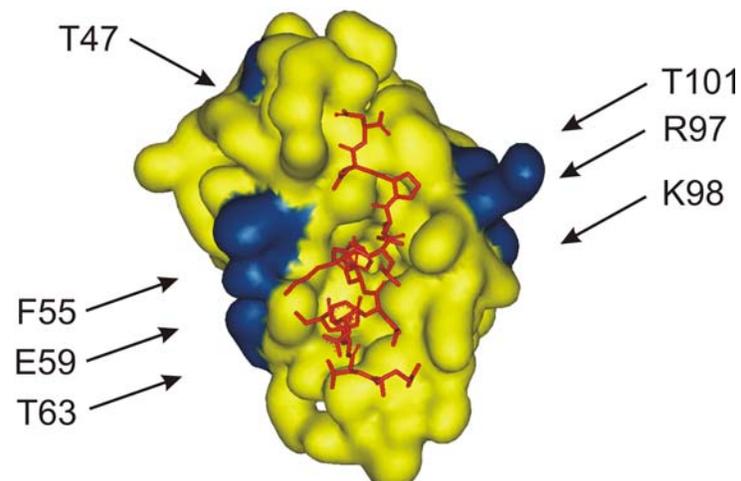


Bild 65 Oberflächendarstellung von MDM2. In rot ist das gebundene p53 Peptid gezeigt, die Mutationen sind in blau markiert (Kussie et al., 1996).

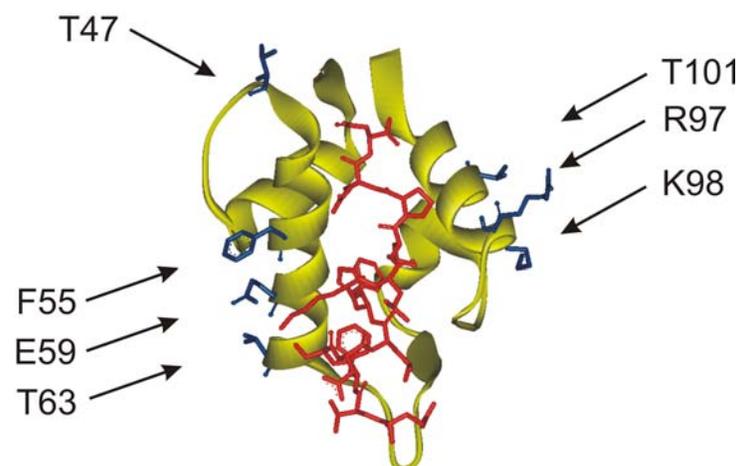


Bild 66 Bändermodell von MDM2 mit dem p53 Peptid und den Mutanten (Kussie et al., 1996).

Von den untersuchten Mutanten zeigten die folgende eine Verschiebung des Tryptophansignals nach Zugabe von Nutlin3: T47W, T63W, K98W, T101W. Die Mutante F55W zeigte keine chemische Verschiebung nach Zugabe von Nutlin-3, sie war jedoch sensitiv bei der Zugabe von NXN-6 und bei der Bildung des Komplexes aus MDM2 und GST-p53 und die Mutante E59W zeigte erhöhte Tendenz zur Aggregation und konnte nicht untersucht werden. R97W konnte nicht exprimiert werden.

T101W wurde zur genaueren Untersuchung mit Nutlin-3 sowie mit NXN-6 titriert. Bild 67 und Bild 68 zeigt das Ergebnis dieser Titrations. Bei Zugabe von Nutlin-3 kommt es zu einem Aufsplitten des Tryptophansignals, was zeigt, dass sowohl das freie MDM2 als auch der Komplex mit Nutlin-3 in Lösung vorliegen.

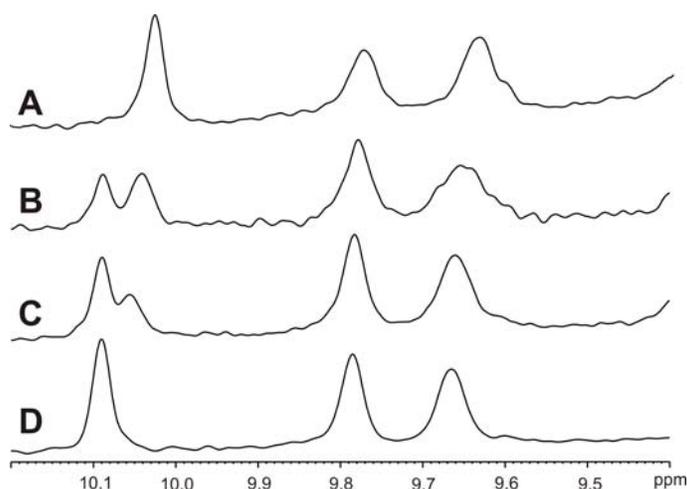


Bild 67 Titration von MDM2 T101W mit Nutlin-3

Bei der Titration mit NXN-6 kommt es lediglich zu einer Verschiebung des Signals, d.h. NXN-6 ist ein schwacher Inhibitor, der in einem schnellen Austausch mit Wasser um die Bindungstasche konkurriert.

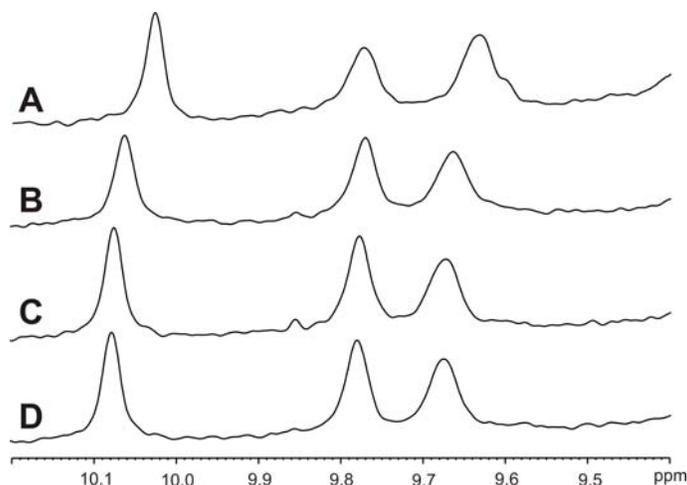


Bild 68 Titration von MDM2 T101W mit NXN6

Da es sich bei NXN-6 um einen schwachen Inhibitor handelte, kann aus einem Auftrag der Konzentration gegen die chemische Verschiebung die Dissoziationskonstante K_D bestimmt werden. Aus der Kurve (Bild 69) ergibt sich, dass die Konzentration von NXN-6, bei der die Hälfte der chemischen Verschiebung erreicht ist, bei 0.028 mM liegt. Bei einer Proteinkonzentration von 0.05 ergibt sich daraus eine K_D von 3 μM .

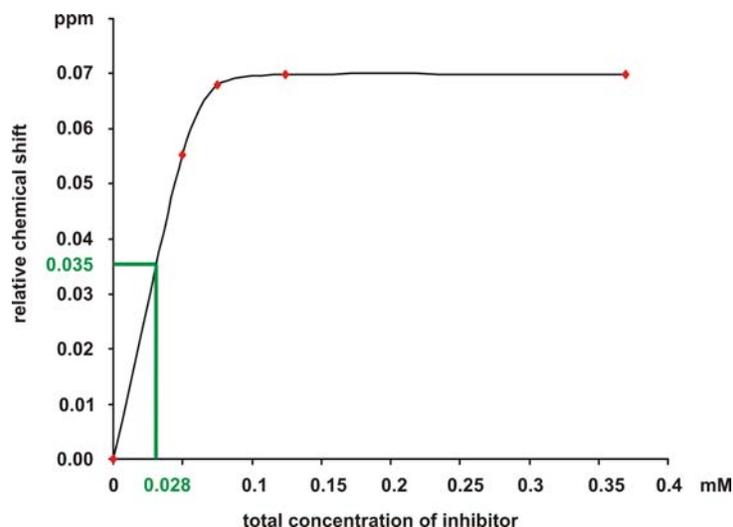


Bild 69 Berechnung der Bindungskonstante für die Interaktion zwischen MDM2 T101W und NXN-6. Bei einer Proteinkonzentration ca. 0.05 mM ergibt sich eine Bindungskonstante von: $K_D = 3 \mu\text{M}$.

Die Mutante T101W wurde für 1D-AIDA Experimente herangezogen. Bild 70 zeigt das Ergebnis der Titration des T101W-MDM2/GST-p53 Komplex mit Nutlin-3. Bei der Komplexbildung kommt es zu einer Verschiebung von $101\text{W}^{\text{MDM2}}$ und W53^{p53} , wobei $101\text{W}^{\text{MDM2}}$ *upfield* verschoben ist, wie bei der Titration mit Nutlin und W53^{p53} *downfield* verschoben wird. W53^{p53} ist normalerweise nicht sensitiv bei der Bindung von p53 an MDM2. die chemische Verschiebung bei der Bindung an T101W kann die Folge der stärkeren Bindung im Vergleich zu wtMDM2 sein.

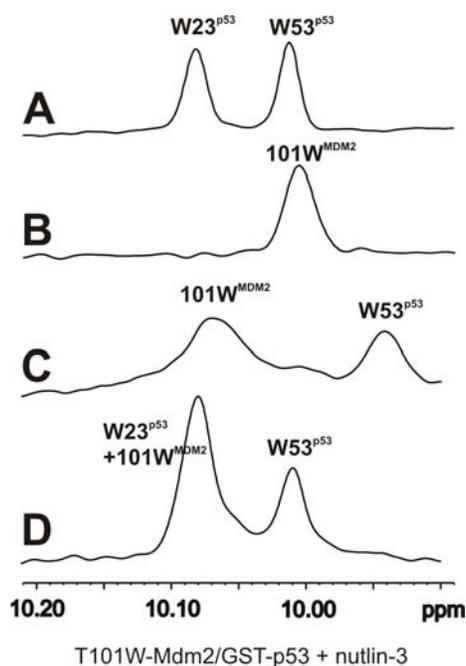


Bild 70 Interaktion von MDM2 T101W mit GST-p53. **A:** Referenz GST-p53, **B:** Referenz MDM2 T101W, **C:** Komplex GST-p53 mit MDM2 T101W, **D:** Nach Zugabe von Nutlin-3. W23^{p53} und 101W^{MDM2} haben dieselbe chemische Verschiebung und summieren sich als Peak bei 10.15 ppm.

Die Mutanten F55W und T47W wurden ebenfalls im Komplex mit GST-p53 über Gelfiltration gereinigt. Obwohl die Mutante F55W nicht sensitiv war bei der Zugabe von Nutlin-3, zeigte sich eine chemische Verschiebung des Tryptophan Signals im Komplex mit GST-p53 (Bild 71). Die Position im Komplex fällt mit der Position des W23 Signals von p53 zusammen, sodass nach der Komplexbildung weiterhin zwei Signale sichtbar sind, von denen das Signal bei 10.1 ppm aber von 55W von MDM2 herrührt. Dass der Komplex dennoch erfolgreich gebildet wurde, zeigte sich nach Zugabe von NXN-6 oder Nutlin-3. Bei der Zugabe von NXN-6 verdoppelt sich die Signalintensität des Peaks bei 10.1 ppm, was durch die Summation von W23 von ungebundenem p53 und dem W55 von NXN-6 gebundenem MDM2 zustande kommt (Bild 71B). Bei der Zugabe von Nutlin-3 dagegen steigt die Intensität des Peaks bei 10.05 ppm an, was eine Summation von W53 von p53 und Nutlin-3 gebundenem T55W entspricht (Bild 71C).

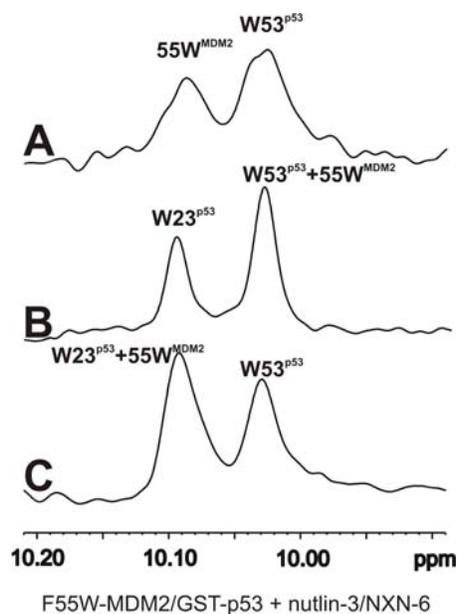


Bild 71 Interaktion von MDM2 F55W mit GST-p53. **A:** Komplex aus MDM2F55W/GST-p53, **B:** nach Zugabe von Nutlin-3. **C:** Nach Zugabe von NXN-6.

Die Mutante T47W hatte als einzige der getesteten Mutanten keine Überlappung des Tryptophan Signals mit W23 oder W53 von p53. Im Komplex mit GST-p53 sind zwei Signale zu sehen (Bild 72). Das Signal bei 10.05 ppm stammt von W53 von p53 und das Signal bei 10.15 ppm stammt von 47W von MDM2 und ist leicht verbreitert. Das Signal von W23, welches bei 10.1 ppm erscheinen sollte, fehlt, was die erfolgreiche Komplexbildung anzeigt. Durch Zugabe von Nutlin-3 wird der Komplex erfolgreich gestört und es zeigen sich drei scharfe Signale von 47W MDM2, W23 und W53 von p53. Mit dieser Mutante ist es erstmals möglich nicht nur die Freisetzung von p53 sondern auch die Freisetzung von MDM2 auf einfache Weise in 1D NMR Spektren nachzuweisen. (Bild 72)

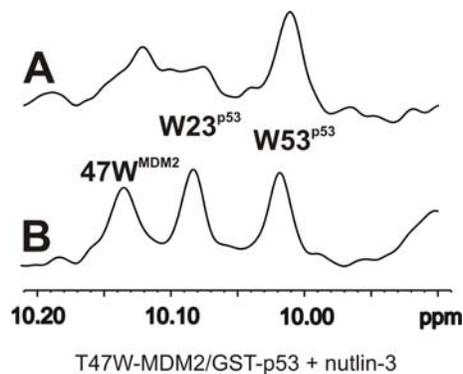


Bild 72 Titration des Komplexes T47W MDM2/GST-p53 mit Nutlin-3. **A:** Komplex, **B:** Nach Zugabe von Nutlin-3.

4.2.6. 1D NMR Titration mit CDK2 Tryptophan-Mutanten

Die Methode der Einführung von Tryptophanmutanten wurde neben MDM2 auch für CDK2 getestet. Dazu wurden vier Tryptophanmutanten nach den selben Überlegungen wie bei MDM2 angefertigt. CDK2 ist ein ca. 35 KDa großes Protein und damit drei mal größer als die N-terminale Domäne von MDM2 zudem hat CDK2 im Gegensatz zu MDM2 bereits vier Tryptophane in der Aminosäuresequenz. Alle vier Tryptophane sind jedoch im Innern des Proteins und haben keinen Kontakt zur Oberfläche des Moleküls. Zum Zweiten sind die natürlich vorkommenden Tryptophane deutlich entfernt von der ATP Bindungstasche. Die vier neuen Tryptophanmutanten, die getestet wurden sind: V7W, S53W, H84W und A93W (Bild 73).

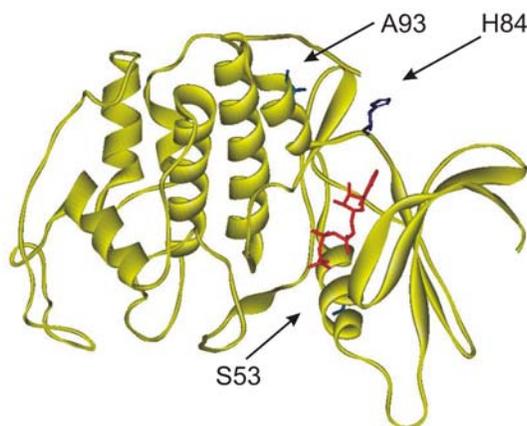


Bild 73 Bändermodell von CDK2 mit ATP (rot) und den Mutanten (blau) (Jeffrey et al., 1995). Die V7W Mutante ist nicht gezeigt.

Mit Ausnahme von V7W, welches keine extra Signal im 1D ^1H NMR Spektrum zeigte, hatten die restlichen drei ein extra Signal bei $\sim 10.1 - 10.15$ ppm. Im Falle von S53W war diese jedoch verbreitert und nicht ganz so scharf. Die Mutanten A93W und H84W wurden mit Roscovitin titriert. Roscovitin ist ein stark bindender Inhibitor mit einer Bindungskonstante K_D von unter $1 \mu\text{M}$. Bild 74 zeigt die Titration von A93W mit Roscovitin. Die Zugabe bewirkt ein Splitten des NMR Signals.

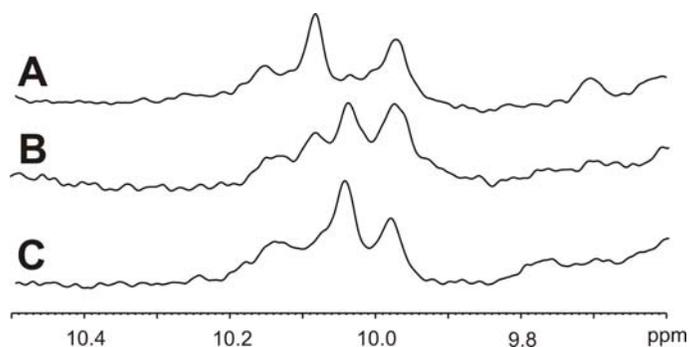


Bild 74 Titration von CDK2-A93W mit Roscovitin. **A:** Referenzspektrum, **B:** Nach Zugabe von Roscovitin (ca.60%), **C:** Nach Übertitration mit Roscovitin

Ähnliche Ergebnisse konnten mit der H84W Mutante erzielt werden. Bei der H84W Mutante kommt es jedoch zu einer Überlappung des 84W Signals mit dem natürlich vorkommenden Tryptophan Signals bei 10.15 ppm (Bild 75).

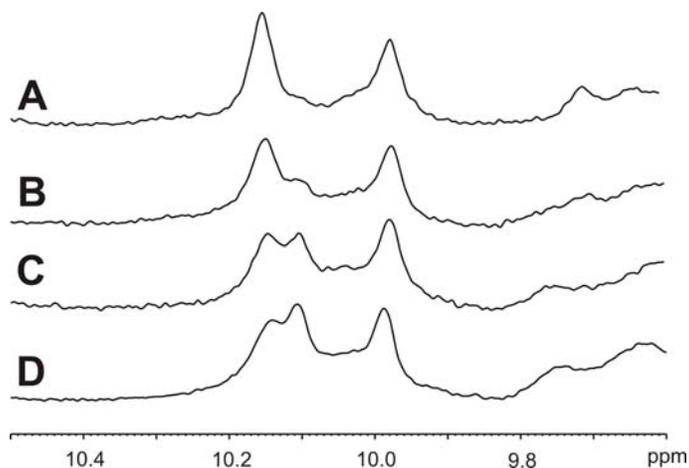


Bild 75 Titration von CDK2-H84W mit Roscovitin. **A:** Referenzspektrum, **B:** Nach Zugabe von Roscovitin (ca.30%), **C:** Nach Zugabe von Roscovitin (ca. 80%), **D:** Nach Übertitration mit Roscovitin

Die Mutante A93W wurde auch mit einem schwachen Inhibitor titriert. Butein ist ein Chalcon-Derivat, das mit geringere Bindungskonstante K_D an CDK2 bindet. Wie zu erwarten kommt es bei der schrittweisen Zugabe von Butein zu der A93W Mutante von CDK2 nicht zu einem Splitten des Tryptophansignals sondern zu einer Verschiebung (Bild 76).

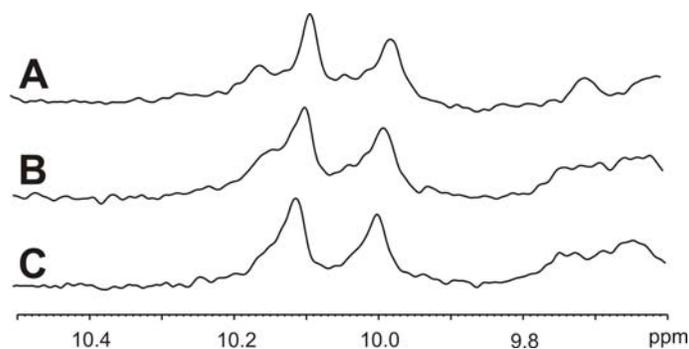


Bild 76 Titration von CDK2-A93W mit Butein. **A**: Referenzspektrum, **B**: Nach Zugabe von Butein (ca. 1:2 (Protein/Inhibitor), **C**: Nach Zugabe von Butein (ca.1:5)).

4.2.7. p53 und MDMX

Die Untersuchung der Interaktion von MDMX und p53 erfolgte durch ITC und Gelfiltrationsexperimente. Bild 77 zeigt die Titration von MDMX gegen GST-p53(1-73) (A) und GST-p53(1-73) gegen MDMX (B). Die K_D Werte sind $110 \text{ nM} \pm 30 \text{ nM}$ bzw. $150 \text{ nM} \pm 40 \text{ nM}$. Die Bindung zwischen MDMX und p53 ist ähnlich aber etwas stärker als die Interaktion zwischen MDM2 und p53.

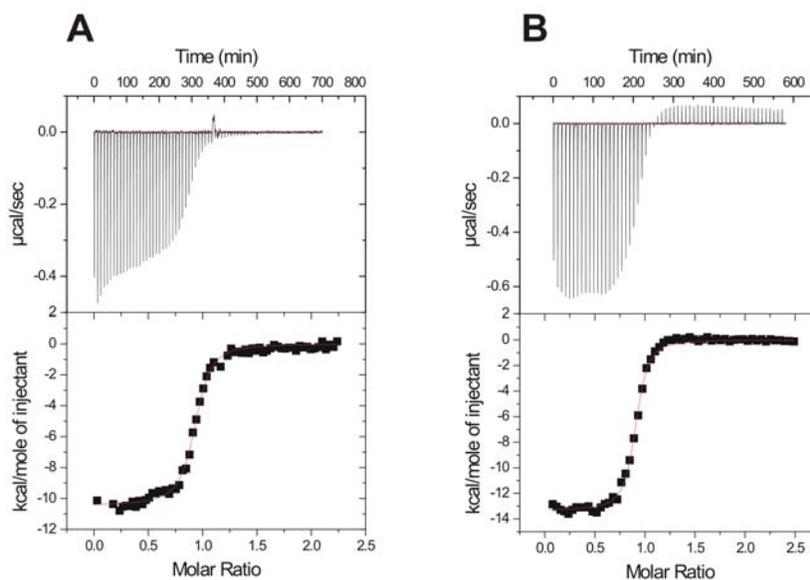


Bild 77 ITC von MDMX (1-134) gegen GST-p53(1-73) (A) und GST-p53(1-73) gegen MDMX (1-134) (B)

Neben der in Bild 77 gezeigten ITC wurden weitere, mit verschiedenen MDMX Konstrukten und p53 Peptiden durchgeführt. Tabelle 27 zeigt die Ergebnisse dieser ITC-

Experimente. Zum Vergleich sind auch die Ergebnisse der ITC-Experimente mit MDM2 widergegeben.

Tabelle 27 ITC mit MDM2(1-118) oder MDMX (1-134) und Bindungspartnern

Bindungspartner	MDM2	MDMX	Zebrafisch MDMX	Human mimic MDMX
p53 (res. 1-310)	0.77 $\mu\text{M} \pm 0.7 \mu\text{M}$	0.48 $\mu\text{M} \pm 0.05 \mu\text{M}$	0.35 $\mu\text{M} \pm 0.03 \mu\text{M}$	0.45 $\mu\text{M} \pm 0.04 \mu\text{M}$
p53 (res. 1-310)	0.39 $\mu\text{M} \pm 0.20^{\text{a}}$			
GST-p53 (res. 1-73)	0.67 $\mu\text{M} \pm 0.7 \mu\text{M}$	0.13 $\mu\text{M} \pm 0.03 \mu\text{M}^{\text{b}}$	0.40 $\mu\text{M} \pm 0.06 \mu\text{M}$	
GST-p53 (res. 1-73)		0.10 $\mu\text{M} \pm 0.01 \mu\text{M}^{\text{c}}$		
GST-p53 (res. 1-73)		0.29 $\mu\text{M} \pm 0.05 \mu\text{M}^{\text{d}}$		
GST-p53 (res. 1-73)		1.51 $\mu\text{M} \pm 0.3 \mu\text{M}^{\text{e}}$		
p53 Peptid 1	0.60 $\mu\text{M} \pm 0.07 \mu\text{M}$	0.21 $\mu\text{M} \pm 0.05 \mu\text{M}$	2.20 $\mu\text{M} \pm 0.30 \mu\text{M}$	2.40 $\mu\text{M} \pm 0.40 \mu\text{M}$
p53 Peptid 2	0.45 $\mu\text{M} \pm 0.05 \mu\text{M}$	35 $\mu\text{M} \pm 20 \mu\text{M}$	40 $\mu\text{M} \pm 30 \mu\text{M}$	
p53 Peptid Z	1.22 $\mu\text{M} \pm 0.2 \mu\text{M}$	3.6 $\mu\text{M} \pm 0.4 \mu\text{M}$	0.67 $\mu\text{M} \pm 0.05 \mu\text{M}$	1.33 $\mu\text{M} \pm 0.2 \mu\text{M}$
Nutlin-3	0.70 $\mu\text{M} \pm 0.08 \mu\text{M}$	25 $\mu\text{M} \pm 18 \mu\text{M}$	28 $\mu\text{M} \pm 20 \mu\text{M}$	25 $\mu\text{M} \pm 20 \mu\text{M}$
Nutlin-3		5 $\mu\text{M} \pm 2 \mu\text{M}^{\text{e}}$		
Nutlin-3		150 $\mu\text{M} \pm 20 \mu\text{M}^{\text{d}}$		
NXN-6	3 $\mu\text{M} \pm 1 \mu\text{M}$	600 $\mu\text{M} \pm 120 \mu\text{M}$		
NXN-7	4 $\mu\text{M} \pm 2 \mu\text{M}$			

K_{D} Werte wurden für schwache Binder mit NMR bestimmt (K_{D} 's > 8 μM). Peptid 1: human p53 Sequenz S₁₅QETFSDLWKLLPEN₂₉; Peptid 2: RFMDYWEGL (Haupt et al.; 1997; Voudsen et al. 2007); Zebrafisch p53 Peptid Z, Sequenz: D₅SQEFAELWEKNLIQ₂₀; ^aMDM2(1-125); ^bDurchschnittswert aus ITC Bild 77; ^cMDMX(1-112); ^dMDMX(M53V); ^eMDMX(Y99T); Zebrafisch MDMX(15-129); Human mimic MDMX (15-129 Mutation L46V und V95L)

Die Affinitäten für MDM2 und MDMX zu p53 sind sehr ähnlich zueinander. Die Bindung zu MDMX ist aber für die meisten p53 Fragmente etwas stärker. Dies kann zum Einen an dem längeren Fragment von MDMX (Aminosäurereste 1-134) im Vergleich zu MDM2 (1-118) liegen. Dies würde auch die Tatsache erklären, warum das MDM2 Konstrukt (1-125) besser an p53 (1-310) als das MDM2 Konstrukt (1-118) bindet. Die Unterschiede sind jedoch minimal und im Bereich der Fehlertoleranz. Deutliche Unterschiede gibt es in dem für MDM2 optimierten p53 Peptid. Peptid 2 mit der Sequenz RFMDYWEGL bindet deutlich besser (um den Faktor 100) an MDM2 als an MDMX. Das Gleiche gilt auch für die für MDM2 entwickelten Inhibitoren: Nutlin-3, NXN-6 und NXN-7. Die schlechtere Affinität dieser Inhibitoren macht sich besonders deutlich in den weiter unten beschriebenen 1D-AIDA Experimenten.

Die Proteine MDMX(1-134) und p53 *full length* binden auch in der Gelfiltration aneinander. Auf diese Weise konnte, ähnlich wie mit MDM2, ein tetramerer Komplex mit p53 gereinigt werden (Bild 78 und 79). Ein Unterschied zu MDM2 war jedoch, dass auch im aggregierten Teil (Peak bei ca. 50 ml) MDMX gebunden an p53 vorlag. Im Falle von MDM2 erfolgte die Interaktion nicht mit dem p53 Aggregat.

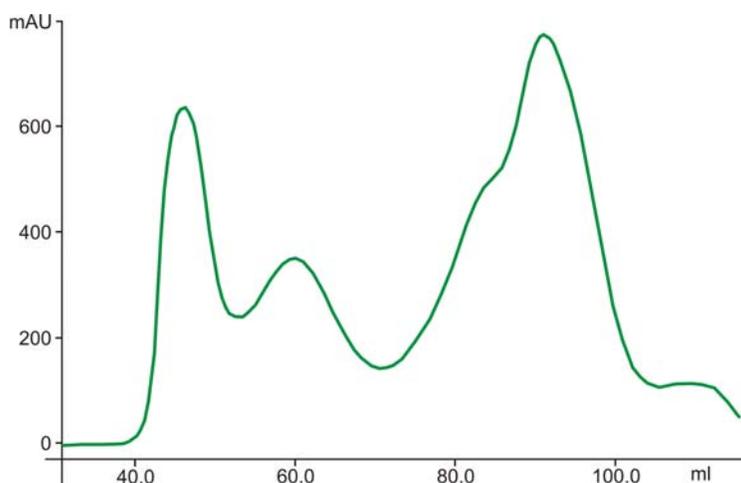


Bild 78 Chromatogramm von p53 *full length* in Komplex mit MDMX. Der Peak bei ca. 50 ml stammt von aggregierten p53, der Peak bei 60 ml ist der tetramere Komplex aus p53 mit MDMX, der Peak bei ca. 95 ml stammt von freien monomeren MDMX.

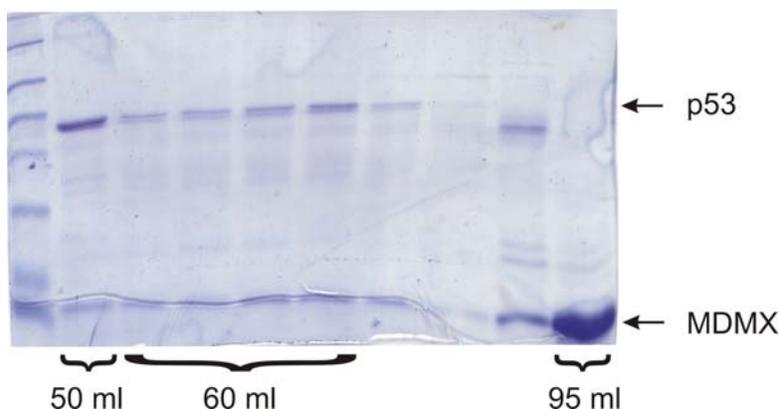


Bild 79 SDS-Page des Chromatogramms von p53 *full length* in Komplex mit MDMX. Der Peak bei ca. 50 ml stammt von aggregierten p53, der Peak bei 60 ml ist der tetramere Komplex aus p53 mit MDMX, der Peak bei ca. 95 ml stammt von freien monomeren MDMX.

Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen MDM2 und MDMX ist deren Affinität zu Nutlin-3 und den andern für MDM2 entwickelten Inhibitoren. Wie bereits bei den ITC-

Experimenten beschrieben MDM2 bindet sehr stark an Nutlin-3 und Nutlin-3 ist daher in der Lage den Komplex zwischen MDM2 und p53 zu stören. Anders ist dies der Fall bei MDMX. Die Bindungskonstante ist deutlich schlechter und Nutlin-3 war nicht in der Lage, selbst bei hohen Konzentrationen, GST-p53 aus dem Komplex mit MDMX vollständig freizusetzen (Bild 80).

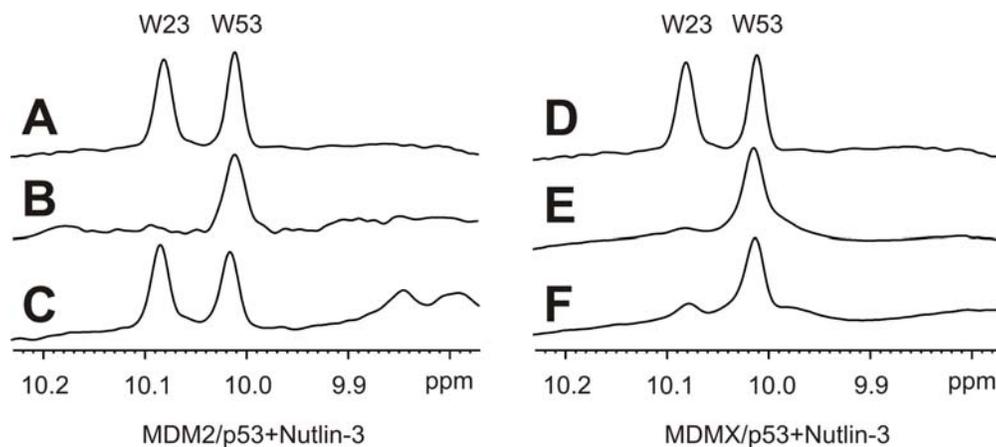


Bild 80 NMR Verdrängungs-Experiment (AIDA). (**A, D**) 1D Protonenspektrum der Seitenketten von Tryptophan von ungebundenen p53 (GST-p53(1-73)): W23, W53. (**B, E**) Bei der Bildung des Komplexes mit MDM2 (B) oder MDMX (E) verschwindet das Signal des Tryptophans W23. (**C, F**) Nach Zugabe von Nutlin-3 wird das Spektrum als eine Folge der vollständigen Dissoziation von MDM2 und p53 wieder hergestellt (C). Im Falle von MDMX ist die Rückgewinnung von p53 nur ungefähr 20 % (F).

4.3. Kristallisation

4.3.1. E2F1-DP1-DNA

Die Konstrukte E2F1 120-243 und Dp1 (105-246) wurden zusammen mit der Promotorsequenz 5'-TTTCGCGCCAAA-3' kristallisiert. Es konnten Bedingungen gefunden werden, in der kleine sphärische Kristalle wuchsen. Leider waren die Kristalle zu klein und durch das sphärische Wachstum nicht homogen. Sie wurden dennoch am DESY in Hamburg vermessen. Die meisten Kristalle gaben einen Beugungsring um 20 Å, einige zeigten jedoch auch eine Streuung mit einzelnen Peaks zwischen 15-20 Å.

4.3.2. MDM2 mit NXN6 und MDM2 mit NXN7

Das MDM2 Konstrukt MDM2(23-109) wurde zusammen mit dem Inhibitor NXN-6 kristallisiert. NXN-6 wurde ausgewählt, weil der Inhibitor relativ gut löslich in wässrigen Lösungen ist und somit die Menge an DMSO geringgehalten werden konnte. Es konnte eine Bedingung gefunden werden, in der igelförmige Kristalle wuchsen. Durch Mikroseeding mit diesen Kristallen konnten sogar kleine Einkristalle erhalten werden. In einer anderen Bedingung konnten Kristalle als kleine Oktaeder gezüchtete werden. Dieselbe Bedingung erlaubt auch das Wachstum von Kristallen mit MDM2 (23-109) und NXN-7. Die Röntgenstreuexperimente am DESY in Hamburg ergaben aber, dass es sich bei diesen Kristallen ausschließlich um den kristallinen Inhibitor handelte.

4.3.3. Kristallstruktur von Zebrafisch MDMX mit humanen p53 Peptid

Die Kristallstruktur von Zebrafisch MDMX(15-129) mit human p53 Peptid (15-29) wurde von uns bis zu einer Auflösung von 2.3 Å gelöst. Die Struktur ist sehr ähnlich zu MDM2 was es erlaubte die Phasen durch molekularen Ersatz zu bestimmen. Ein Sequenzvergleich zeigte, dass das Zebrafisch MDMX sehr homolog sowohl zu humanen MDMX (48.8% Identität für das gesamte Protein und 66% Identität bzw. 85% Similarität innerhalb der 95 Aminosäurereste der Kristallstruktur) als auch zu humanen MDM2 (33.5% Identität für das gesamte Protein und 50% Identität bzw. 74% Similarität innerhalb der 95 Aminosäurereste der Kristallstruktur) ist. Betrachtet man nur die Reste, die für die p53 Bindung in Frage kommen, so ist das Zebrafisch MDMX deutlich ähnlicher zu humanen MDMX als zu

humanen MDM2. In der Tat unterscheiden sich die beiden MDMX Proteinen nur in zwei Aminosäureresten Leu46 und Val95 in Zebrafisch, die zu Val46 und Leu95 in human mimic MDMX zu den entsprechenden humanen MDMX Resten mutiert wurden.

Der größte Unterschied zwischen der Aminosäuresequenz der ersten 100 Reste von MDMX und MDM2 ist eine Ausdehnung der MDM2 Reste H96-R97-K98-I99, die durch P95-S96-P97-L98 und P92-S93-P94-V95 in humanen MDMX bzw. Zebrafisch MDMX ersetzt wurde. Da die Affinitäten für größere p53 Fragmente und für Nutlin-3 ähnlich in beiden MDMX Proteinen ist, eignet sich das Zebrafischprotein als ein gutes Model für das humane Gegenstück.

Die Gesamtstruktur des Zebrafisch MDMX ist ähnlich zu MDM2 (RMSD der Reste 25-106 von MDM2 und 20-106 von Zebrafisch MDMX beträgt 1.28 Å, Bild 81). Die wichtigsten Strukturelemente von MDM2, wie die strukturelle Wiederholung von zwei ca. 40 Reste langen Teilen, $\beta 1\alpha 1\beta 2\alpha 2$ und $\beta 1'\alpha 1'\beta 2'\alpha 2'$ sind, konserviert.

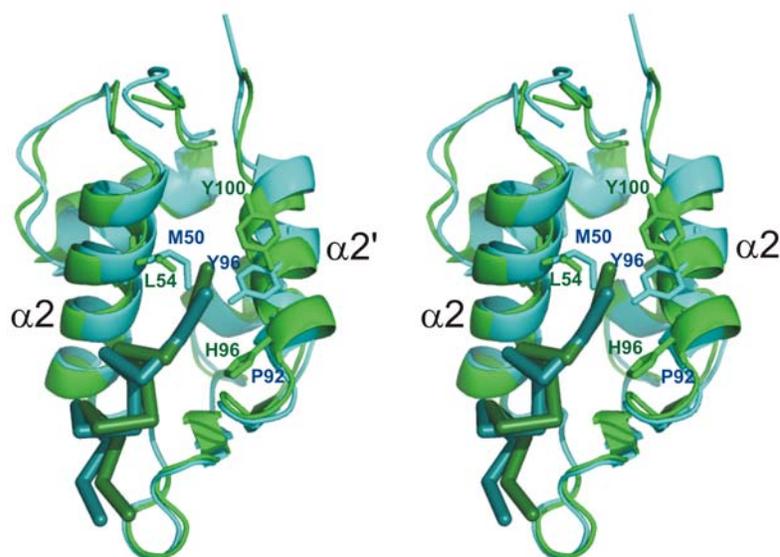


Bild 81 Strukturen der Zebrafisch MDMX/p53 und MDM2/p53 Komplexe. Stereobild einer Überlagerung von MDMX (blau) mit MDM2 (grün). Die gezeigten Reste, M50, P92 und Y96 für Zebrafisch MDMX und L54, H96 und Y100 für MDM2 sind wichtig für die Bindung an p53. Die zugehörigen p53 Peptide sind als Stabmodell mit den korrespondierenden Farben abgebildet.

Der Hauptunterschied besteht in der Helix $\alpha 2'$. Diese Helix ist in der Zebrafischstruktur um 2.5 Å, im Vergleich zu MDM2, zum C-Terminus hin verschoben. Sie fängt auch, wegen der P92-S93-P94 Sequenz etwas später an, der Unterschied der Helix beginnt aber schon mit der Aminosäure N91 in Zebrafisch MDMX (E95 in MDM2) und die $\alpha 2'$ Helices von Zebrafisch MDMX und MDM2 laufen skzessive bis zur Aminosäure L103 (L107 in MDM2)

auseinander, ohne jedoch größere Unterschiede in einzelnen ϕ, ψ Winkeln aufzuweisen (Bild 82).

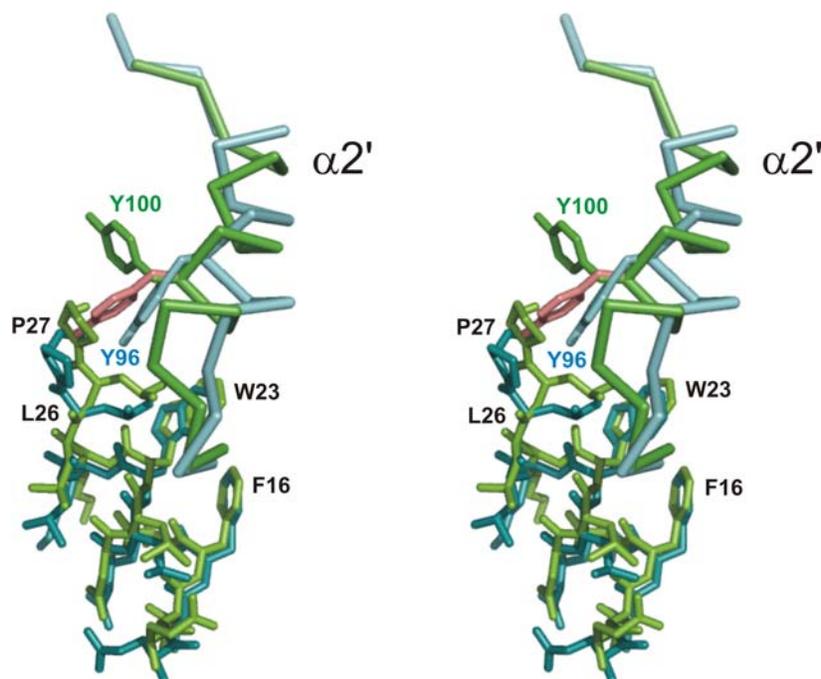


Bild 82 Interaktion des p53 Peptides mit der $\alpha 2'$ Helix von MDMX (blau) und MDM2 (grün). Y100 von MDM2 aus der Struktur im Komplex mit Nutlin-3 ist in rot dargestellt.

Die Bindungstasche in Zebrafisch MDMX ist kleiner als im Vergleich zu MDM2. Dies liegt besonders an Y96, das in die Bindungstasche hereinragt und sie flacher macht (Bild 83). Die entsprechende Aminosäure in MDM2, Y100, ist dagegen Teil einer Kante um die p53 Bindungstasche der im Wesentlichen durch die Seitenkette H96 in MDM2 gegeben ist. Zebrafisch MDMX hat an dieser Stelle P92 (P97 in humanen MDMX). Die Kante fehlt daher gewissermaßen in der MDMX Struktur was die Bindungstasche flacher von der $\alpha 2'$ Seite her macht. Die p53-Bindungstasche ist weiterhin von der anderen Seite durch M50 der Helix $\alpha 2$ von Zebrafisch MDMX (M53 in humanen MDMX) blockiert. Die M50 Seitenkette zeigt in die p53 Bindungstasche und macht sie kleiner als bei MDM2 (Die entsprechende Seitenkette von L46 von MDM2 hat zwar die gleiche Orientierung, ist aber wesentlich kleiner). Kleinere Unterschiede betreffen die Aminosäurereste 86 und 104 in MDM2. Zebrafisch MDMX hat ein L82 (L85 in Hdmx) anstelle von F86 am unteren Ende der Bindungstasche und Anstelle des Y104 ist in der Zebrafisch Struktur ein K100 (R103 in Hdmx). Der Einfluss dieser Aminosäuren auf die p53 Bindungstasche ist jedoch eher geringer.

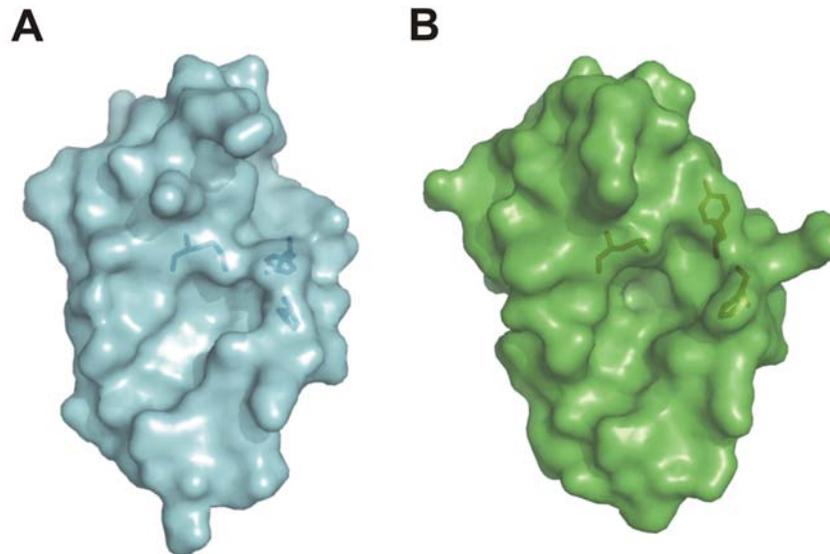


Bild 83 Oberflächendarstellung von MDMX (**A**) und MDM2 (**B**) Hervorgehoben sind die Reste M50, Y96 und P92 in MDMX, und L54, H96 und Y100 in MDM2 (siehe Text).

Die bestimmenden Faktoren für die Bindung von p53 an MDM2 die in der MDM2-p53 Struktur gefunden wurden bleiben weitestgehend die Selben in der MDMX-p53 Interaktion. Die primären Kontakte zu MDMX werden durch die hydrophoben Reste F19, W23 und L26 des humanen p53 gegeben, die zusammen eine komplementäre Kontaktfläche bilden, die die hydrophobe Tasche des Zebrafisch MDMX ausfüllt. Die Seitenkettenreste F19 und W23 des p53 Peptid haben in MDM2 und Zebrafisch MDMX die selbe Position, von L25 aufwärts sind die Reste L25-L26-P27 jedoch um ca. 1.7 Å nach außen verschoben (Bild 81, 82).

5. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden Interaktionen zwischen Zellzyklusproteinen und ihrer Inhibitoren untersucht. Es zeigte sich, dass einige der Interaktionen in der Literatur nicht bestätigt werden konnten (Issaeva et al., 2004; Galatin et al., 2004; Hsieh et al., 2002). Durch die Verwendung von rekombinaten Proteinen und der Isolierung der einzelnen Proteine konnten die Interaktionen ohne mögliche Nebeneffekte studiert werden. Dies mag unter anderem der Grund dafür sein, dass Interaktionen, die zum Beispiel in Immunpräzipitationen gefunden wurden, nicht in NMR bestätigt werden konnten. Proteine des Zellzyklus spielen eine entscheidende Rolle beim Verständnis der Krebsentstehung und der Entwicklung neuer Medikamente. Da Proteine in der Zelle niemals alleine auftreten, sondern ihre Aufgaben in Komplexen aus mehreren Proteinen ausüben ist das genaue Verständnis der Dynamik von Protein-Protein Wechselwirkungen von entscheidender Bedeutung.

Das Retinoblastoma Tumor-Suppressor-Protein (pRB) ist ein negativer Schlüsselregulator der Zellproliferation, der häufig in menschlichen Tumoren dereguliert ist. Er ist mit E2F1 und DP1 *in vivo* assoziiert und verhindert dadurch die Transkription von E2F1/DP1 abhängigen Genen, die für das Fortschreiten des Zellzyklus benötigt werden (Trimarchi und Lees, 2002). Durch CDKs wird pRB hyperphosphoryliert und es kommt zu einer Dissoziation des pRB-E2F1/DP1 Komplexes. Der freie E2F1/DP1 Komplex kann dadurch im Zellkern die Transkription von Proteinen, die für die S-Phase des Zellzyklus benötigt werden, einleiten. p27 ist ein CKI der Kip/Cip Familie, der die Aktivität von CDK2/Cyclin A inhibiert und dadurch eine Hypophosphorylierung von pRB verhindert (Polyak et al., 1994; Toyoshima et al., 1994).

Die pRB-C Domäne hat sehr viele Phosphorylierungsstellen und somit viele mögliche Bindungsstellen für Cyclin abhängige Kinasen. CDK2/Cyclin A bindet über ein K/R-X-L Motiv in der C-terminalen Domäne von pRB an pRB (Lowe et al., 2002). Die Interaktion zwischen pRB-C und dem CDK2/Cyclin A Komplex sollte ähnlich sein, wie die Interaktion zwischen p27 und CDK2/Cyclin A, jedoch mit einer schwächeren Affinität. p27 ist im Gegensatz zu pRB kein Substrat für die Phosphorylierung sondern ein Inhibitor. Die NMR Messungen zeigen, dass die Konstrukte mit der Cyclin A Bindungsstelle am C-terminalen Ende deutlich stärker an den CDK2/Cyclin A Komplex binden als Konstrukte mit der Cyclin A Bindungsstelle an N-terminaler Position. Dies steht im Gegensatz zu der Interaktion von p27 mit CDK2/Cyclin A, bei der die Interaktion mit CDK2 C-terminal von der Cyclin A

Bindungsstelle stattfindet (Russo et al., 1996). Es lässt sich daraus ableiten, dass pRB anders als p27 an CDK2/Cyclin A binden muss.

Ein wichtiger Abschnitt dieser Arbeit ist die Untersuchung von Inhibitoren die die Interaktion zwischen MDM2 und p53 stören. Beide Proteine sind Ziel intensiver Forschung (Romer et al., 2006) und ebenso die Entwicklung von Inhibitoren, die diese Interaktion unterbinden können (Stoll et al., 2001; Kumar et al., 2003; Zhao et al., 2002; Galatin et al., 2004; Yin und Hamilton, 2004; Issaeva et al., 2004; Vassilev et al., 2004; Grasberger et al., 2005; Lu et al., 2006) Viele der dazu verwendeten Methoden sind jedoch sehr ungenau, und führen leicht zu falsch positiven Ergebnissen. Zudem bringt das Auffinden eines wirksamen Inhibitors eine Menge Prestige mit sich, was leicht zu einer vorschnellen Interpretation von Experimenten führen kann. Die in dieser Arbeit mitentwickelte Methode beruht der transversalen Relaxationsrate $1/T_2$. In großen Proteinkomplexen steigt die transversale Relaxationsrate $1/T_2$ und es kommt zu einer Linienverbreiterung im NMR Spektrum, welche im Extremfall so breit wird, dass das Signal im Hintergrundrauschen verloren geht. Eine Zerstörung des Proteinkomplexes führt zu kleineren Fragmenten und daraus folgend wieder zum Abfallen der transversale Relaxationsrate $1/T_2$ und die Signale im NMR Spektrum werden wieder sichtbar. Die ersten Experimente, die dieses Phänomen ausnutzen, wurden mit MDM2(1-118) und p53(1-310) durchgeführt. Es zeigte sich, dass ^{15}N markiertes MDM2 (1-118) gerade eine optimale Größe hatte, um im 2D HSQC Spektrum ein gutes Signal zu liefern (D'Silva et al., 2005). Ein weiterer Vorteil ist, dass MDM2 (1-118) gefaltet vorliegt und nur wenige flexible Bereiche aufweist. Flexible Bereiche werden durch die Komplexbildung weniger stark in ihrer transversalen Relaxationszeit beeinträchtigt und liefern auch in größeren Proteinkomplexen Signale im 2D HSQC Spektrum.

Die Bindung von unmarkiertem p53(1-310) an ^{15}N MDM2(1-118) bewirkt, dass der entstandene Komplex zu groß wird und, mit Ausnahme der flexiblen Reste, die Signale im 2D HSQC verschwinden. p53 bindet im N-terminalen Bereich mit einem kurzen 15 Aminosäurereste Bereich (p53 13-29) an MDM2. Dies legte den Versuch nahe, den C-terminalen Bereich von p53 durch ein anderes Protein zu ersetzen und damit ein Hybridprotein zu verwenden. Das Konstrukt p53 (1-73) beinhaltet zwar noch die Fähigkeit an MDM2 zu binden, ist an sich aber zu klein, um durch die Bindung an ^{15}N -MDM2 (1-118) das 2D HSQC Spektrum verschwinden zu lassen. Durch die Verwendung eines GST-TAGs am N-Terminus von p53 (1-73) wird die Masse von p53 soweit erhöht, dass durch die Bindung das HSQC Spektrum wieder verschwindet. Durch die Verwendung des GST-p53 Konstrukts konnte zweierlei gezeigt werden: 1. Es ist für das Experiment ausreichend, nur die

Interaktionsdomänen der Proteine zu verwenden und 2. Es spielt keine Rolle, zumindest bei p53, ob der Protein-TAG am C-terminalen oder N-terminalen Bereich angehängt bzw. ersetzt wird. Dies erlaubt es nun auch Interaktionsstudien mit kleineren Proteinen zu betreiben, bei denen die Masse des Komplexes nicht über 40 kDa steigt, indem an den nichtmarkierten Bindungspartnern ein größeres Protein, z.B. GST fusioniert wird. Des Weiteren können auch Interaktionen zwischen Proteinen untersucht werden, von denen eines als *full length* Protein schlecht zu exprimieren ist oder unlöslich vorliegt. Es genügt in diesem Fall nur die Interaktionsdomäne zu exprimieren und ein Protein-TAG anzufügen, der die Löslichkeit steigert (Krajewski et al., 2007). Eine 1D-AIDA Variante wurde für die Interaktion von p53 mit MDM2 oder MDMX eingesetzt. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass der N-terminale Bereich von p53 in Lösung flexibel ist (Dawson et al., 2003). Kommt es zu einer Komplexbildung mit MDM2 oder MDMX, so bindet p53 mit dem W23 in die MDM2 bzw. MDMX Bindungstasche. Die Flexibilität wird dadurch eingeschränkt, was zu einer schnelleren Relaxation und einem Verschwinden des W23 Signal führt. Da W53 nicht an der Bindung beteiligt ist, bleibt die Signalintensität unverändert. Diese Tatsache nutzt die 1D Variante des *antagonist induced dissociation assay* (1D-AIDA). Im ungebundenen Zustand sind beide Tryptophane in GST-p53(1-73) im flexiblen Teil des Proteins und geben im 1D NMR Spektrum Signale gleicher Intensität. Ist GST-p53 zu 100% im Komplex mit MDM2 oder MDMX, so ist nur das W53 sichtbar. Aus dem Verhältnis der Intensitäten von W23 und W53 lässt sich der Grad der Komplexierung abschätzen, sowie auf die relative Bindungsstärke von Antagonisten, aufgrund des Anteils an p53 der durch die Zugabe freigesetzt wird, rückschließen.

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von verschiedenen Inhibitoren mit der oben beschriebenen AIDA Methode getestet. Eine kleine Auswahl ist in Tabelle 25 Abschnitt 4.2.4.3. aufgeführt. Die Entwicklung neuer Medikamente ist ein sehr zeitintensiver und kostspieliger Prozess. Es ist daher wichtig, schon am Anfang der Forschung, durch ein schnelles und robustes Verfahren die Zahl der möglichen Kandidaten einzuschränken. Falsch positive Treffer führen sonst zu einem unnötigen Verlust an Zeit und Geld. Viele der untersuchten Inhibitoren der MDM2/p53 Wechselwirkung haben sich als falsch positive entpuppt (Issaeva et al., 2004; D'Silva et al., 2005; Krajewski et al., 2005; Lu et al., 2006). Dies mag zum einem an den verwendeten Techniken liegen, die z.B. nicht zwischen löslichem und präzipitiertem Protein unterscheiden können oder wie bei Zellkulturexperimenten, bei denen sehr viele Nebenreaktionen möglich sind, sodass ein positiver Effekt durch einen anderen Stoffwechselweg als der von MDM2/p53 hervorgerufen sein könnte. Viel der Verbindungen

waren in wässrigen Lösungen auch so schlecht löslich, dass die Menge an gelösten Molekülen, bei geringer K_D , nicht ausreicht um einen nachweisbaren Effekt in den NMR AIDA-Experimenten zu haben. Nutlin-3 bildete dabei eine Ausnahme. Die K_D ist groß genug, dass, trotz der schlechten Wasserlöslichkeit, der Zusatz von Nutlin-3 Pulver in AIDA-Experimenten zur Dissoziation von MDM2 und p53 führt.

Neben der Anwendung bei der Suche nach niedermolekularen Inhibitoren kann das Verfahren auch bei der Verdrängung eines Proteins durch ein anderes in einem Proteinkomplex Anwendung finden. Im Beispiel der Bindung von pRB an CDK2/Cyclin A wird pRB durch die Zugabe von p27 verdrängt. Die C-terminale Domäne pRB ist im Gegensatz zu MDM2 nicht gefaltet und durch die Bindung an CDK2/Cyclin A kommt es daher nicht zu einem vollständigen Verschwinden des Spektrums durch Linienverbreiterung sondern vielmehr zu einer Verschiebung der Signale der an der Bindung beteiligten Aminosäuren. Die Zugabe von p27, ein Inhibitor von CDK2/Cyclin A verdrängt vollständig pRB aus dem Komplex, was sich an der Rückgewinnung des ursprünglichen HSQC Spektrums von pRB zeigt. Es ist daher möglich *in vitro* Bindungsstellen von Proteinen in Proteinkomplexen zu bestimmen, die Stärke der Dissoziationskonstanten K_D sowie bei multimeren Proteinkomplexen Bindungsstellen zu finden, die von mehr als einem Protein genutzt werden (Krajewski et al., 2007).

Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist die Entwicklung von MDM2 Tryptophan Mutanten, die es erlauben auf einfache und schnelle Weise mit der Hilfe von 1D NMR Spektren nach potenziellen Inhibitoren für MDM2 zu suchen. Die Tryptophan Mutanten wurden dabei so ausgewählt, dass eine Störung der Bindung mit p53 nicht vorlag. Am Beispiel von T101W, bei der das Tryptophan in der $\alpha 2'$ Helix von MDM2 liegt, zeigt das Tryptophan nach außen zum Solvent. Die chemische Verschiebung, die auf das Tryptophan bei der Bindung von Nutlin-3 oder NXN-6 einwirkt ist, somit ausschließlich auf eine kleine Reorientierung der Helix zurückzuführen. T101W ist dabei sensibel genug, um zwischen starken und schwachen Inhibitoren zu unterscheiden. Im Falle von schwachen Inhibitoren kann die chemische Verschiebung von T101W zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D herangezogen werden. Die gleiche Methode eignet sich auch für die Suchen nach Inhibitoren für CDK2. Hier zeigte die Mutante A93W die besten Ergebnisse. CDK2 hat im Gegensatz zu der N-terminale Domäne von MDM2 vier natürlich vorkommende Tryptophane. Diese sind jedoch weit von der ATP-Bindungstasche entfernt und nehmen nicht an dessen Bindung Teil. Von den neueingeführten Tryptophanen waren H84W und A93W sensibel auf die Bindung von CDK2 Inhibitoren. Roscovitin, ein starker spezifischer Inhibitor

für CDK2, führte zu einem Aufsplitten des neuen Tryptohansignals (McClue et al., 2002), Butein, ein schwach bindendes Molekül, zu einer Verschiebung. Da die A93W ein extra Tryptophansignal lieferte, welches nicht mit einem natürlich vorkommenden überlappte, lieferte es die besten Ergebnisse. Die 1D NMR Titrations mit Tryptophan Mutanten sind eine schnelle und einfache Alternative zu den aufwendigeren HSQC Experimenten. Sie kann auch dann angewendet werden, wenn das zu testende Protein bereits mehrere natürlichvorkommende Tryptophane hat. Es ist dabei günstig, wenn ein neu eingeführtes Tryptohan eine chemische Verschiebung aufweist, die mit keinem natürlich vorkommenden übereinstimmt, aber selbst bei einer Überlappung ist die Titration, wie am Beispiel der H84W Mutante von CDK2, möglich.

Im Vergleich zu der Überprüfung mit ^{15}N markierten MDM2 und der Aufnahme von 2D HSQC Spektren ist das Verfahren mit 1D NMR Spektren um ein Vielfaches schneller. Die Methode kann für viele Proteine angewandt werden, Information über deren Struktur ist dabei vorausgesetzt. Sie ersetzt jedoch nicht die konventionelle SAR-by-NMR Methode, da die Informationen für die Bestimmung der Bindungsstelle in Proteinen am Besten über 2D HSQC Experimente möglich ist, was eine Markierung der Proteine mit ^{15}N oder ^{13}C nötig macht. Die SAR-by-NMR Methode benötigt mehrer Stunden um ein 2D ^1H - ^{15}N HSQC Spektrum aufzunehmen. Mit der oben beschriebenen Methode der Einführung von Tryptophan Mutanten kann die Messzeit auf wenige Minuten verkürzt werden. Für ein 1D Experiment mit einem akzeptablen Signal/Rauschverhältnis werden ca. 128 scans benötigt, was einer Messzeit von unter 8 Minuten entspricht. Eine vierstufige Titration kann in ungefähr einer halben Stunde aufgenommen werden. Zum Vergleich benötigt man für ein durchschnittliches ^1H - ^{15}N HSQC Experiment ca. 5h (128 scans, 96 increments) bei gleicher Proteinkonzentration. Die Methode eignet sich daher besonders für einen schnelle Durchsatz von Inhibitoren in *Screening*-Pipelines oder für Proteine, die nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden können, wie Proteine aus zellfreien Expressionssystemen oder aus eucaryotischen Expressionssystemen. Zudem kann auf eine schnelle Art durch Bestimmung der K_{d} s eine Quantifizierung der Inhibitoren vorgenommen werden und sie erlaubt Aussagen über den Prozentsatz der freigesetzten Proteine aus ihren natürlichen Bindungspartnern.

MDMX ist ein homologes Protein, das ebenfalls bei der Regulation von p53 eine entscheidende Rolle spielt (Toledo und Wahl, 2006; Marine et. al., 2007). Trotz der hohen Homologie zwischen MDM2 und MDMX (33.2% bzw. 44.0% zwischen den ersten 150 Aminosäuren, Sequenzalignment im Anhang) regulieren beide Proteine p53 auf unterschiedliche Weise. MDMX besitzt keine Ubiquitin Ligase Fähigkeit (Shvarts et al.,

1996) und die Expression von MDMX ist nicht p53 gekoppelt. MDM2 und MDMX können über die RING-Finger-Domäne Heterodimere bilden (Stad et al., 2000). Einige Forschergruppen zeigten, dass MDMX die transkriptionelle Aktivität von p53 stärker inhibiert als MDM2 (Toledo und Wahl, 2006; Marine et al., 2006; Francoz et al., 2006; Toledo et al., 2006; Marine et al., 2007) und beide Proteine kooperieren bei der Inhibierung (Gu et al. 2002). Der genaue Mechanismus der Regulation von p53 durch MDM2/MDMX, insbesondere welchen Anteil jedes einzelne Protein an der Stabilität und der Aktivität von p53 hat, ist nicht bekannt.

Die Struktur des Zebrafisch MDMX (Bild 81, 82 und 83) und die zugehörigen ITC (Bild 77 und Tabelle 27) verdeutlichen den Mechanismus der p53 Inhibition durch MDMX und erklären warum spezifische Inhibitoren für MDM2 mit nur geringer Affinität an MDMX binden.

Verdeutlich ist das am Beispiel des Inhibitors Nutlin-3. Der Chlorophenylring von Nutlin-3 kann keine stabile hydrophobe Interaktion mit MDMX ausbilden. Der für die Interaktion verantwortliche Teil in der MDMX Tasche ist schmaler als bei MDM2. Zwei Aminosäurereste von MDMX, Met50 und Tyr96, sind verantwortlich für die Verkleinerung der Tasche (Bild 84). Das Chloridatom von Nutlin-3 hätte nur einen Abstand von 1.6 Å von der OH Gruppe von Tyr96 in MDMX. Ein Umklappen des Aromaten Tyr96 weg von der p53 Bindungstasche würde zwar diese Behinderung aufheben aber die Hydrophobizität der Bindungstasche wäre geringer. Zudem würde Tyr96 mit Glu20 kollidieren.

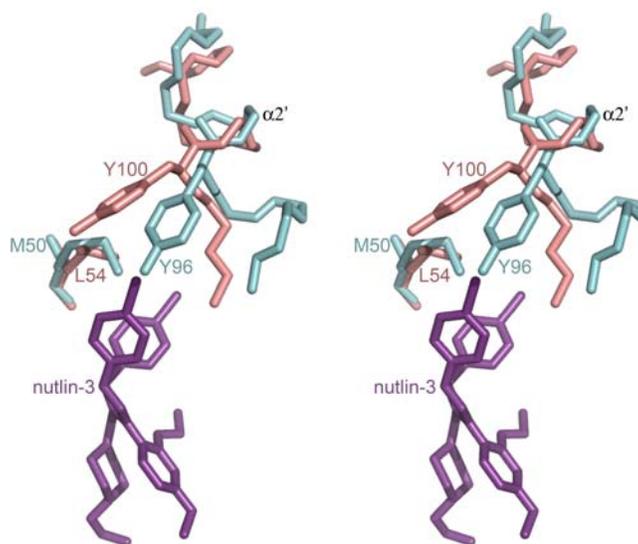


Bild 84 Interaktion von Nutlin-3 mit einem Abschnitt der $\alpha 2'$ Helix von MDMX (blau) und MDM2 (rot). Gezeigt ist das Y100 und L54 von MDM2 in der Struktur des Nutlin/MDM2 Komplexes zusammen mit dem Y96 und M50 des MDMX/p53 Komplexes.

Die NMR und ITC Daten zusammen mit der Struktur von Zebrafisch MDMX zeigen deutlich, dass MDM2/p53 Antagonisten nicht effektiv für die Inhibierung von MDMX/p53 sind.

Die Struktur von MDMX/p53 legt nahe, dass, obwohl MDM2 und MDMX das gleiche Bindungsmotiv und viele gleiche Aminosäuren zur Bindung von p53 benutzen, sich die Bindung im Detail signifikant unterscheidet. Für die Entwicklung von spezifischen MDMX Inhibitoren müssen die strukturellen Besonderheiten von MDMX in Betracht gezogen werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass in einer Krebstherapie die auf der Freisetzung von p53 aus der Inhibierung von MDM2/MDMX sowohl selektive MDM2 als auch selektive MDMX Inhibitoren verwendet werden müssen (Popowicz et al., 2007).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Interaktionen zwischen Proteinen des Zellzyklus und deren Inhibitoren untersucht. Neben dem Hauptteil der Arbeit, der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen p53 und MDM2 und deren Störung mit niedermolekularen Antagonisten wurden zusätzlich weitere Protein-Protein Wechselwirkungen untersucht, darunter E2F1/DP1, pRB/E2F1, E2F1/p53, CDK2/Cyclin A-p27/pRB, etc.

Das Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein (pRB) ist ein negativer Schlüsselregulator der Zellproliferation, der häufig in menschlichen Tumoren dereguliert ist. Er ist mit E2F1 und DP1 *in vivo* assoziiert und verhindert dadurch die Transkription von E2F1/DP1 abhängigen Genen, die für das Fortschreiten des Zellzyklus benötigt werden. Durch CDKs wird pRB hyperphosphoryliert und es kommt zu einer Dissoziation des pRB-E2F1/DP1 Komplexes. Der freie E2F1/DP1 Komplex kann dadurch im Zellkern die Transkription von Proteinen, die für die S-Phase des Zellzyklus benötigt werden, einleiten. p27 ist ein CKI, der die Aktivität von CDK2/Cyclin A inhibiert und dadurch eine Hypophosphorylierung von pRB verhindert. Das Wechselspiel dieser Proteine ist extrem wichtig für das Verständnis des Zellzyklus und der Entstehung von Krebs.

Da die pRB-C Domäne sehr viele Phosphorylierungsstellen hat und CDK2/Cyclin A an ein K/R-X-L Motiv an pRB bindet, wurden die Interaktion zwischen pRB-C und dem CDK2/Cyclin A Komplex untersucht. Es wurde vermutet, dass pRB ähnlich wie p27 an CDK2/Cyclin A bindet, jedoch mit einer schwächeren Affinität als p27. Die NMR Messungen zeigten allerdings, dass die Konstrukte mit der Cyclin A Bindungsstelle am C-terminalen Ende deutlich stärker an den CDK2/Cyclin A Komplex binden als Konstrukte mit der Cyclin A Bindungsstelle an N-terminaler Position. Es lässt sich dadurch ableiten, dass pRB anders als p27 an CDK2/Cyclin A binden muss. Die schwächere Interaktion (pRB ist ein Substrat für CDK2/Cyclin A, wohingegen p27 ein Inhibitor für CDK2/Cyclin A ist) ließ eine Strukturbestimmung nicht zu.

p53 ist ein zentraler „Wächter“ für die Integrität des Genoms und wird durch Stressfaktoren wie UV, DNA Schäden etc. aktiviert. MDM2 (*murine double minute clone 2 protein*) als sein natürlicher Gegenspieler bindet an die Transaktivierungsdomäne von p53 und inhibiert dessen Funktion. Es wird dadurch eine Arretierung in der G1 Phase des Zellzyklus verhindert und die durch p53 vermittelte Apoptose unterbunden. Die Deregulation von MDM2 wurde in vielen Tumoren beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung der p53-MDM2 Interaktion mit kleinen organischen Inhibitoren in Tumoren, die

über funktionales Wildtyp p53 verfügen, Wildtyp p53 in der Zelle stabilisieren. Dies eröffnet einen neuen therapeutischen Ansatz für die Behandlung von Krebs. In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von möglichen Inhibitoren getestet. Dazu wurde ein neues *Screening*-Verfahren mit NMR eingesetzt, welches auf der transversalen Relaxationsrate $1/T_2$ beruht. In großen Proteinkomplexen steigt die transversale Relaxationsrate $1/T_2$ und es kommt zu einer Linienverbreiterung im NMR Spektrum, welche im Extremfall so breit wird, dass das Signal im Hintergrundrauschen verloren geht. Eine Zerstörung des Proteinkomplexes führt zu kleineren Fragmenten und daraus folgend wieder zum Abfallen der transversalen Relaxationsrate $1/T_2$ und die Signale im NMR Spektrum werden wieder sichtbar. Die meisten der Inhibitoren zeigten *in vitro* keinen Effekt auf die Dissoziation von MDM2 und p53. Neben dem bekannten Inhibitor Nutlin-3 wurden jedoch auch weitere Inhibitoren gefunden, die den MDM2/p53 Komplex erfolgreich stören konnten. NXN-6 und NXN-7 gehören zu einer Klasse von Isochinolin Derivaten. Ihre Bindungskonstante lag bei $\sim 10 \mu\text{M}$. Die NXN Verbindungen sind zwar schlechtere Inhibitoren als Nutlin-3, NXN-6 ist aber besser wasserlöslich, wodurch höhere Konzentrationen möglich sind. Mit Hilfe von Tryptophan Mutanten von MDM2 konnte das *Screening* nach Inhibitoren für MDM2 deutlich beschleunigt werden, da die Aufnahme von zeitaufwendigen 2D HSQC Spektren wegfällt.

Neben der Untersuchung der Inhibitoren für die MDM2/p53 Wechselwirkung wurden drei weitere Erkenntnisse aus der Anwendung der NMR *Screening*-Methode gewonnen, die es erlauben, die Methode auf andere Systeme zu übertragen:

1. Die Verwendung eines GST-p53 Konstruktes zeigte, dass Teile der Proteinsequenz durch lösliche Fragmente ausgetauscht werden können und das GST-p53(1-73) die gleichen Ergebnisse liefert wie p53(1-310).

2. Die Methode funktioniert auch mit Proteinen als Inhibitoren. So konnte mit der NMR Methode gezeigt werden, dass p27 pRB-C aus dem Komplex mit CDK2/Cyclin A verdrängt. Dies eröffnet neue Wege zur Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen und deren Dynamik in großen Proteinkomplexen.

3. Im Vergleich zu der Überprüfung mit ^{15}N markierten MDM2 und der Aufnahme von 2D HSQC Spektren ist ein *Screening*-Verfahren mit 1D NMR Spektren um ein Vielfaches schneller. Die entwickelte Methode mit den Tryptophan Mutanten kann prinzipiell für viele Proteine angewandt werden und verkürzt die Messzeit auf wenige Minuten im Vergleich zu einem ^1H - ^{15}N HSQC Experiment. Sie wurde in dieser Arbeit erfolgreich für die Proteine MDM2 und CDK2 eingesetzt und erlaubte die Unterscheidung zwischen starken und schwachen Inhibitoren. Die Methode eignet sich besonders für einen schnelle Durchsatz von

Inhibitoren in *Screening*-Pipelines oder für Proteine, die nur in sehr geringen Mengen exprimiert werden.

7. LITERATUR

A

Alarcon-Vargas D, Ronai Z (2002) p53-Mdm2-the affair that never ends. *Carcinogenesis*. **23**, 541-547.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004) Molekularbiologie der Zelle, *WILEY-VCH*.

Ashcroft M, Vousden KH (1999) Regulation of p53 stability. *Oncogene* **18**, 7637-7643.

Aslanian A, Iaquina PJ, Verona R, Lees JA (2004) Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes Dev.* **18**, 1413-1422.

Attwooll C, Lazzerini Denchi E, Helin K. (2004) The E2F family: specific functions and overlapping interests. *EMBO J.* **23**, 4709-4716.

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**, 756-760.

B

Bagchi S, Raychaudhuri P, Nevins JR (1990) Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* **62**, 659-669.

Baker JS, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**, 217-221.

Baldi A, Boccia V, Claudio PP, De Luca A, and Giordano A (1996) Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4629-4632.

Bandara LR, Buck VM, Zamanian M, Johnston LH, La Thangue NB (1993) Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J.* **12**, 4317-4324.

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**, 1674-1677.

Becattini B, Sareth S, Zhai D, Crowell KJ, Leone M, Reed JC, Pellicchia M (2004) Targeting apoptosis via chemical design: inhibition of bid-induced cell death by small organic molecules. *Chem. Biol.* **11**, 1107-1117.

Beijersbergen RL, Kerkhoven RM, Zhu L, Carlee L, Voorhoeve PM, Bernards R (1994) E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 in vivo. *Genes Dev.* **8**, 2680-2690.

Buchkovich K., Duffy LA, Harlow E (1989) The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* **58**, 1097-1105.

C

Cahilly-Snyder L, Yang-Feng T, Francke U, George DL (1987) Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **13**, 235-244.

Chen J, Marechal V, Levine AJ (1993) Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4107-4114.

Chen L, Agrawal S, Zhou W, Zhang R, Chen J (1998) Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 195-200.

Chen PL, Scully P, Shew JY, Wang JY, and Lee WH (1989) Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* **58**, 1193-1198.

Chene P (2003) Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 102-109.

Chene P (2004) Inhibition of the p53-hdm2 interaction with low molecular weight compounds. *Cell Cycle* **3**, 460-461.

Chene P (2004) Inhibition of the p53-MDM2 interaction: targeting a protein-protein interface. *Mol. Cancer Res.* **2**, 20-28.

Classon M, Dyson N (2001) p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell. Res.* **264**, 135-147.

Claudio PP, Tonini T, Giordano A (2002) The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome Biol.* **3**, 3012.

Cobrinik, D (2005) Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* **24**, 2796-2809.

Coles M, Heller M, Kessler H (2003) NMR-based screening technologies. *Drug Discov. Today* **8**, 803-810.

D

Dalvit C, Fogliatto G, Stewart A, Veronesi M, Stockman B (2001) WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability. *J. Biomol. NMR.* **21**, 349-359.

Dawson R, Muller L, Dehner A, Klein C, Kessler H, Buchner J(2003) The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J. Mol. Biol.* **332**, 1131-1141.

DeBruin A, Maiti B, Jakoi L, Timmers C, Buerki R, Leone G (2003) Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* **278**, 42041-42049.

DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* **54**, 275-283.

DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furukawa Y, Griffin J, Piwnica-Worms H, Huang CM, Livingston DM (1989) The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cellcycle regulatory element. *Cell* **58**, 1085-1095.

Diercks T, Coles M, Kessler H (2001). Applications of NMR in drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 285-291.

D'Silva L, Ozdowy P, Krajewski M, Rothweiler U, Singh M, Holak TA (2005) Monitoring the effects of antagonists on protein-protein interactions with NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13220-132206.

Dyson N, Dembski M, Fattaey A, Ngwu C, Ewen M, Helin K (1993) Analysis of p107-associated proteins: p107 associates with a form of E2F that differs from pRB-associated E2F-1. *J. Virol.* **67**, 7641-7647.

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E (1989) The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**, 934-937

Dyson N (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* **12**, 2245-2262.

E

El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1**, 45-49.

El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer E, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.

Espinosa JM, Emerson BM (2001) Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol. Cell.* **8**, 57-69

Ewen ME, Xing YG, Lawrence JB, Livingston DM (1991) Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* **66**, 1155-1164.

F

Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL (1991) Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.* **10**, 1565-1569.

Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* **275**, 8945-8951.

Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG Jr, Livingston DM, Orkin SH, Greenberg ME (1996) E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* **85**, 549-561.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083-1093.

Fogal V, Hsieh JK, Royer C, Zhong S, Lu X (2005) Cell cycle-dependent nuclear retention of p53 by E2F1 requires phosphorylation of p53 at Ser315. *EMBO J.* **24**, 2768-2782.

Francoz S, Froment P, Bogaerts S, De Clercq S, Maetens M, Doumont G, Bellefroid E, Marine JC (2006) Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3232-3237.

Freedman DA, Wu L, Levine AJ (1999) Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 96-107.

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**, 643-646.

Fry DC, Graves B, Vassilev LT (2005) Development of E3-Substrate (MDM2-p53)-Binding Inhibitors: Structural Aspects. *Meth. Enzymol.* **399**, 622-633.

Fry DC, Vassilev LT (2005) Targeting protein-protein interactions for cancer therapy. *J. Mol. Med.* **83**, 955-963.

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**, 2866-2871.

G

Galatin PS, Abraham DJ (2004) A nonpeptidic sulfonamide inhibits the p53-mdm2 interaction and activates p53-dependent transcription in mdm2-overexpressing cells. *J. Med. Chem.* **47**, 4163-4165.

Ganguli G, Wasylyk B (2003) p53-independent functions of MDM2. *Mol Cancer Res.* **1**, 1027-1035.

Garcia I, Murga M, Vicario A, Field SJ, Zubiaga AM (2000) A role for E2F1 in the induction of apoptosis during thymic negative selection. *Cell Growth Differ.* **11**, 91-98.

Gaubatz S, Lindeman GJ, Ishida S, Jakoi L, Nevins JR, Livingston DM, Rempel RE (2000) E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol. Cell.* **6**, 729-735.

Goodrich DW, Lee WH (1993) Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1155**, 43-61.

Grasberger BL, Lu T, Schubert C, Parks DJ, Carver TE, Koblisch HK, Cummings MD, LaFrance LV, Milkiewicz KL, Calvo RR, Maguire D, Lattanze J, Franks CF, Zhao S, Ramachandren K, Bylebyl GR, Zhang M, Manthey CL, Petrella EC, Pantoliano MW, Deckman IC, Spurlino JC, Maroney AC, Tomczuk BE, Molloy CJ, Bone RF (2005) Discovery and cocrystal structure of benzodiazepinedione HDM2 antagonists that activate p53 in cells. *J. Med. Chem.* **48**, 909-912.

Gu W, Roeder RG (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606.

Gu J, Kawai H, Nie L, Kitao H, Wiederschain D, Jochemsen AG, Parant J, Lozano G, Yuan ZM (2002) Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *J. Biol. Chem.* **277**, 19251-19254

Gudkov AV, Komarova EA (2005) Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 726-736.

H

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.

Harbour JW, Dean DC (2000) Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat. Cell. Biol.* **2**, E65-67.

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 CDK-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.

Harris SL, Levine AJ (2005) The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**, 2899-2908.

Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-634.

Hatakeyama M, Brill JA, Fink GR, Weinberg RA (1994) Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* **8**, 1759-1771.

Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299.

Helin K, Wu CL, Fattaey AR, Lees JA, Dynlacht BD, Ngwu C, Harlow E (1993) Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev.* **7**, 1850-1861.

Herwig S, Strauss M (1997) The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* **246**, 581-601.

Hinds P, Finlay C, Levine AJ (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.* **63**, 739-746.

Hong FD, Huang HJ, To H, Young LJ, Oro A, Bookstein R, Lee EY, Lee WH (1989) Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5502-5506.

Howard A, Pelc SR (1953) Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* **6**, 261-273.

Horowitz JM, Yandell DW, Park SH, Canning S, Whyte P, Buchkovich K, Harlow E, Weinberg RA, Dryja TP (1989) Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* **243**, 937-940.

Hsieh JK, Yap D, O'Connor DJ, Fogal V, Fallis L, Chan F, Zhong S, Lu X (2002) Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 78-93.

Humbert PO, Verona R, Trimarchi JM, Rogers C, Dandapani S, Lees JA (2000a) E2F3 is critical for normal cellular proliferation. *Genes Dev.* **14**, 690-703

Humbert PO, Rogers C, Ganiatsas S, Landsberg RL, Trimarchi JM, Dandapani S, Brugnara C, Erdman S, Schrenzel M, Bronson RT, Lees JA (2000b) E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol. Cell.* **6**, 281-291.

Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP (1992) Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* **71**, 875-886.

I

Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef LG, Masucci M, Pramanik A, Selivanova G (2004) Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat. Med.* **10**, 1321-1328.

Ivey-Hoyle M, Conroy R, Huber HE, Goodhart PJ, Oliff A, Heimbrook DC (1993) Cloning and characterization of E2F-2, a novel protein with the biochemical properties of transcription factor E2F. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7802-7812.

J

Jahnke W, Perez LB, Paris CG, Strauss A, Fendrich G, Nalin CM (2000) Second-Site NMR Screening with a Spin-Labeled First Ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 7394-7395.

Jayaraman L, Prives C (1999) Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 76-87.

Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-320.

Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**, 349-352.

Welburn JP, Endicott JA (2005) Inhibition of the cell cycle with chemical inhibitors: A targeted approach. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 369-381.

K

Klages J, Coles M, Kessler H (2007) NMR-based screening: a powerful tool in fragment-based drug discovery. *Analyst* **132**, 693-705.

Knippers R (2001) *Molekulare Genetik*. Thieme.

Knudsen ES, Buckmaster C, Chen TT, Feramisco JR, Wang JY (1998) Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1/S transition and S-phase Progression. *Genes Dev.* **12**, 2278-2292.

Kohn MJ, Bronson RT, Harlow E, Dyson NJ, Yamasaki L (2003) Dp1 is required for extra-embryonic development. *Development* **130**, 1295-1305.

Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR (1986) Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* **45**, 219-228.

Kowalik TF, DeGregori J, Leone G, Jakoi L, Nevins JR (1998) E2F1-specific induction of apoptosis and p53 accumulation, which is blocked by Mdm2. *Cell Growth Differ.* **9**, 113-118.

Krajewski M, Ozdowy P, D'Silva L, Rothweiler U, Holak TA (2005) NMR indicates that the small molecule RITA does not block p53-MDM2 binding in vitro. *Nat. Med.* **11**, 1135-1136.

Krajewski M, Rothweiler U, Majumdar S, D'Silva L, Klein C, Holak TA (2007) An NMR-based antagonist induced dissociation assay for targeting the ligand-protein and protein-protein interactions in competition binding experiments. *J. Med. Chem.* **50**, 4382-4387.

Krummel KA, Lee CJ, Toledo F, Wahl GM (2005) The C-terminal lysines fine-tune p53 stress responses in a mouse model but are not required for stability control or transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 10188-10193.

Kumar SK, Hager E, Pettit C, Gurulingappa H, Davidson NE, Khan SR (2003) Design, synthesis, and evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agents. *J. Med. Chem.* **46**, 2813-2815.

L

Lakin ND, Jackson SP (1999) Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* **18**, 7644-7655.

Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16.

Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-263.

Lane DP (1999) Exploiting the p53 pathway for cancer diagnosis and therapy. *Br. J. Cancer* **80**, 1-5.

Lavia P, Jansen-Durr P (1999) E2F target genes and cell-cycle checkpoint control. *Bioessays.* **21**, 221-230.

Lavin MF, Gueven N (2006) The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ.* **13**, 941-950.

Lee MH, Reynisdottir I, Massague J (1995) Cloning of p57Kip2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* **9**, 639-649.

Lees JA, Saito M, Vidal M, Valentine M, Look T, Harlow E, Dyson N, Helin K (1993) The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7813-7825.

Leone G, DeGregori J, Yan Z, Jakoi L, Ishida S, Williams RS, Nevins JR (1998) E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev.* **12**, 2120-2130.

Leone G, Sears R, Huang E, Rempel R, Nuckolls F, Park CH, Giangrande P, Wu L, Saavedra HI, Field SJ, Thompson MA, Yang H, Fujiwara Y, Greenberg ME, Orkin S, Smith C, Nevins JR (2001) Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. *Mol. Cell* **8**, 105-113.

Lindeman GJ, Dagnino L, Gaubatz S, Xu Y, Bronson RT, Warren HB, Livingston DM (1998) A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes Dev.* **12**, 1092-1098.

Linzer DI, Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43-52.

Logan N, Graham A, Zhao X, Fisher R, Maiti B, Leone G, La Thangue NB (2005) E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene* **24**, 5000-5004.

Lowe ED, Tews I, Cheng KY, Brown NR, Gul S, Noble ME, Gamblin SJ, Johnson LN (2002) Specificity determinants of recruitment peptides bound to phospho-CDK2/cyclin A. *Biochemistry* **41**, 15625-15634.

Lu Y, Nikolovska-Coleska Z, Fang X, Gao W, Shangary S, Qiu S, Qin D, Wang S (2006) Discovery of a nanomolar inhibitor of the human murine double minute 2 (MDM2)-p53 interaction through an integrated, virtual database screening strategy. *J. Med. Chem.* **49**, 3759-3762.

Ludlow JW, Shon J, Pipas JM, Livingston DM, DeCaprio JA (1990) The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell* **60**, 387-396.

Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G, Bartek J (1994) Cyclin D1 protein oscillates and is essential for cell cycle progression in human tumour cell lines. *Oncogene* **9**, 707-718.

M

Maiti B, Li J, de Bruin A, Gordon F, Timmers C, Opavsky R, Patil K, Tuttle J, Cleghorn W, Leone G (2005) Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.* **280**, 18211-18220.

Malumbres M, Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 222-231.

Marine JCW, Dyer MA, Jochemsen AG (2007) MDMX: from bench to bedside. *J. Cell Sci.* **120**, 371-378

Marine JC, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, Lozano G (2006) Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ.* **13**, 927-934.

Matsuoka S, Edwards M, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ (1995) p57^{Kip2}, a structurally distinct member of the p21CIP1 CDK inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* **9**, 650-662.

McClue SJ, Blake D, Clarke R, Cowan A, Cummings L, Fischer PM, MacKenzie M, Melville J, Stewart K, Wang S, Zhelev N, Zheleva D, Lane DP (2002) In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine). *Int. J. Cancer* **102**, 463-468.

Meyer B, Peters T (2003) NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 864-890.

Michael D, Oren M (2003) The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 49-58.

Michalak E, Villunger A, Erlacher M, Strasser A (2005) Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 786-798.

Mihara K, Cao XR, Yen A, Chandler S, Driscoll B, Murphree AL, T'Ang A, Fung YK (1989) Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* **246**, 1300-1303.

Mills AA (2005) p53: link to the past, bridge to the future. *Genes Dev.* **19**, 2091-2099.

Mittnacht S, Lees JA, Desai D, Harlow E, Morgan DO, Weinberg RA (1994) Distinct subpopulations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation. *EMBO J.* **13**, 118-127.

Mitchison JM (1971) The biology of the cell cycle. *Cambridge University Press* **1**, 313.

Moll UM, Zaika A (2001) Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett.* **493**, 65-69.

Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J (1998) The MDM2 gene amplification database. *Nucl. Acids Res.* **26**, 3453-3459.

Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69** 1237-1245.

Muchardt C, Yaniv M (1999) The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**, 189-195.

Muchardt C, Yaniv M (2001) When the SWI/SNF complex remodels the cell cycle. *Oncogene* **20**, 3067-3075.

Mühlhardt C (2002) Molekularbiologie/Genomics *Spektrum*.

Muller H, Moroni MC, Vigo E, Petersen BO, Bartek J, Helin K (1997) Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5508-5520.

Mulligan G, Jacks T (1998) The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet.* **14**, 223-229.

Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM (1989) Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* **8**, 4099-4105.

Murga M, Fernandez-Capetillo O, Field SJ, Moreno B, Borlado LR, Fujiwara Y, Balomenos D, Vicario A, Carrera AC, Orkin SH, Greenberg ME, Zubiaga AM (2001) Mutation of E2F2 in mice causes enhanced T lymphocyte proliferation, leading to the development of autoimmunity. *Immunity* **15**, 959-970.

N

Neel JV, Falls HF (1951) The rate of mutation of the gene responsible for retinoblastoma in man. *Science* **114**, 419-422.

Niida H, Nakanishi M (2006) DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* **21**, 3-9.

O

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B (1992) Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* **358**, 80-83.

Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* **362**, 857-860.

Onadim Z, Hogg A, Baird PN, Cowell JK (1992) Oncogenic point mutations in exon 20 of the RB1 gene in families showing incomplete penetrance and mild expression of the retinoblastoma phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6177-6181.

Ormondroyd E, de la Luna S, La Thangue NB (1995) A new member of the DP family, DP-3, with distinct protein products suggests a regulatory role for alternative splicing in the cell cycle transcription factor DRTF1/E2F. *Oncogene* **11**, 1437-1446.

P

Pardee AB (1974) A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1286-1290.

Pardee AB (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**, 603-608.

Persengiev SP, Kondova II, Kilpatrick DL. (1999). E2F4 actively promotes the initiation and maintenance of nerve growth factor-induced cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6048-6056.

Picksley SM, Lane DP (1993) The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays*. **15**, 689-690.

Prives C, Hall PA (1999) The p53 pathway. *J. Pathol.* **187**, 112-126.

Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A (1994) p27^{Kip1}, a cyclin-CDK inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**, 9-22.

Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J (1994) Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimutagenic signals. *Cell* **78**, 59-66.

Popowicz G, Czarna A, Rothweiler U, Krajewski M, Holak, TA (2007) Molecular basis for the inhibition of p53 by Mdmx. *Cell Cycle* (in press).

Q

Qin XQ, Livingston DM, Kaelin WG Jr, Adams PD (1994) Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10918-10922.

R

Rempel RE, Saenz-Robles MT, Storms R, Morham S, Ishida S, Engel A, Jakoi L, Melhem MF, Pipas JM, Smith C, Nevins JR (2000) Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol. Cell.* **6**, 293-306.

Ruas M, Peters G (1998) The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim. Biophys. Acta* **1378**, F115-177.

Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, Massague J, Pavletich NP (1996) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**, 325-331.

Romer L, Klein C, Dehner A, Kessler H, Buchner J (2006) p53-a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 6440-6460.

S

Sandal T (2002) Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist* **7**, 73-81.

Sellers WR, Kaelin WG Jr (1997) Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.* **15**, 3301-3312.

Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**, 1149-1163.

Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-1677.

Sherr CJ (2000-2001) Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect.* **96**, 73-92.

Sherr CJ (2004) Principles of tumor suppression. *Cell* **116**, 235-246.

Sherr CJ, Roberts JM (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **18**, 2699-2711.

Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW (1996) Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science.* **274**, 1531-1534.

Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N, van Laar T, Dekker P, Bazuine M, van Ham RC, van der Houven van Oordt W, Hateboer G, van der Eb AJ, Jochemsen AG (1996) MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. *EMBO J.* **15**, 5349-5357.

Singh M (2006) Biochemical and structural investigations of the retinoblastoma protein, its binding partners, and the BRG1 protein - a subunit of human SWI/SNF remodeling complexes, TU München.

Soussi T, Dehouche K, Beroud C (2000) p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat.* **15**, 105-113.

Stad R, Ramos YF, Little N, Grivell S, Attema J, van der Eb, AJ, Jochemsen AG (2000) Hdmx stabilizes Mdm2 and p53. *J. Biol. Chem.* **275**, 28039-28044.

Stoll R, Renner C, Hansen S, Palme S, Klein C, Belling A, Zeslawski W, Kamionka M, Rehm T, Muhlhahn P, Schumacher R, Hesse F, Kaluza B, Voelter W, Engh RA, Holak TA (2001) Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53. *Biochemistry* **40**, 336-344.

Storre J, Elsasser HP, Fuchs M, Ullmann D, Livingston DM, Gaubatz S (2002) Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2f6. *EMBO Rep.* **3**, 695-700.

Swift H (1950) The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **36**, 643-654.

T

Toledo F, Wahl M (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat. Rev. Canc.* **6**, 909-923.

Toledo F, Krummel KA, Lee CJ, Liu CW, Rodewald LW, Tang M, Wahl GM (2006) A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. *Cancer Cell* **9**, 273-285.

Tortora G, Caputo R, Damiano V, Bianco R, Chen J, Agrawal S, Bianco AR, Ciardiello F (2000) A novel MDM2 anti-sense oligonucleotide has anti-tumor activity and potentiates cytotoxic drugs acting by different mechanisms in human colon cancer. *Int. J. Cancer* **88**, 804-809.

Toyoshima H, Hunter T (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin/CDK protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74.

Trimarchi JM, Lees JA (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 11-20.

V

Vairo G, Livingston DM, Ginsberg D (1995) Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev.* **9**, 869-881.

Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844-848.

Vassilev LT (2005) p53 Activation by small molecules: application in oncology. *J. Med. Chem.* **48**, 4491-4499.

Verona R, Moberg K, Estes S, Starz M, Vernon JP, Lees JA. (1997) E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 7268-7282.

Vigo E, Muller H, Prosperini E, Hateboer G, Cartwright P, Moroni MC, Helin K (1997) CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6379-6395.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.

Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789-799.

Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 594-604.

Vousden KH, Prives C (2005) P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell* **120**, 7-10.

Vousden KH, Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 275-283.

W

Wang JY, Knudsen ES, Welch PJ (1994) The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv. Cancer Res.* **64**, 25-85.

Wasylyk C, Salvi R, Argentini M, Dureuil C, Delumeau I, Abecassis J, Debussche L, Wasylyk B (1999) p53 mediated death of cells overexpressing MDM2 by an inhibitor of MDM2 interaction with p53. *Oncogene* **18**, 1921-1934.

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**, 175-178.

Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738.

Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.

Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**, 124-129.

Woods DB, Vousden KH (2001) Regulation of p53 function. *Exp. Cell. Res.* **264**, 56-66

Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, Nuckolls F, Giangrande P, Wright FA, Field SJ, Greenberg ME, Orkin S, Nevins JR, Robinson ML, Leone G (2001) The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**, 457-462.

Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* **7**, 1126-1132.

Wu X, Levine AJ (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3602-3606.

X

Xiao B, Spencer J, Clements A, Ali-Khan N, Mittnacht S, Broceño C, Burghammer M, Perrakis A, Marmorstein R, Gamblin SJ (2003) Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2363-23638.

Y

Yamasaki L, Jacks T, Bronson R, Goillot E, Harlow E, Dyson NJ (1996) Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* **85**, 537-548.

Yandell DW, Campbell TA, Dayton SH, Petersen R, Walton D, Little JB, McConkie-Rosell, A, Buckley EG, Dryja TP (1989) Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling. *N. Engl. J. Med.* **321**, 1689-1695.

Yang Y, Li CC, Weissman AM (2004) Regulating the p53 system through ubiquitination. *Oncogene* **23**, 2096-2106.

Yin H, Lee GI, Park HS, Payne GA, Rodriguez JM, Sebti SM, Hamilton AD (2005) Terphenyl-based helical mimetics that disrupt the p53/HDM2 interaction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 2704-2707.

Z

Zhang Z, Li M, Wang H, Agrawal S, Zhang R (2003) Antisense therapy targeting MDM2 oncogene in prostate cancer: Effects on proliferation, apoptosis, multiple gene expression, and chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 11636-11641.

Zhang Z, Wang H, Li M, Rayburn E, Agrawal S, Zhang R (2005) Novel MDM2 p53-independent functions identified through RNA silencing technologies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1058**, 205-214.

Zhao J, Wang M, Chen J, Luo A, Wang X, Wu M, Yin D, Liu Z (2002) The initial evaluation of non-peptidic small-molecule HDM2 inhibitors based on p53-HDM2 complex structure. *Cancer Lett.* **183**, 69-77.

Zhu JW, DeRyckere D, Li FX, Wan YY, DeGregori J (1999) A role for E2F1 in the induction of ARF, p53, and apoptosis during thymic negative selection. *Cell Growth Differ.* **10**, 829-838.

Zhu JW, Field SJ, Gore L, Thompson M, Yang H, Fujiwara Y, Cardiff RD, Greenberg M, Orkin SH, DeGregori J (2001) E2F1 and E2F2 determine thresholds for antigen-induced T-cell proliferation and suppress tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8547-8564.

Ziebold U, Lee EY, Bronson RT, Lees JA (2003) E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6542-6552.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A ₂₈₀	Absorption bei der Wellenlänge $\lambda=280$ nm
AIDA	antagonist induced dissociation assay
AS	Aminosäure
AKF	Autokorrelationsfunktion
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphat
<i>Dpn</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
DTT	Dithiotreitol
GPC	Gelpermeations-Chromatographie
HSQC	heteronuclear singel quantum coherence
IEC	Ionenaustausch-Chromatographie (<i>ion exchange chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isotermale Titrations Calorimetrie
LMW	Niedrige Molekularmassen (<i>low molecular weight</i>)
MDM2	murine double minute Gen 2
MWCO	Ausschlussgrenze für Molekularmassen (<i>molecular weight cut of</i>)
NMR	nuclear magnetic resonance
OD ₆₀₀	optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda=600$ nm
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pET	Plasmidcodiertes Expressionssystem, das den λ 7-Promotor verwendet
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
V _E	Elutionsvolumen
V _t	Säulenvolumen
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
w/w	Massenanteil (<i>weight per weight</i>)

GLOSSAR

<i>Alignment</i>	Lineare Anpassung, z.B. von Sequenzen
<i>Annealing</i>	Tempern, spezifische Anlagerung komplementärer DNA
<i>Blunt end</i>	„stumpfe“ DNA-Enden, ohne überhängende 3'-oder 5'-Enden
<i>Frame shift</i>	Verschiebung des Leserasters
<i>full length</i>	Gesamtlänge des Proteins
<i>Interface</i>	Kontaktfläche
<i>Loop</i>	Schleife
<i>open circular</i>	ringförmig entspannt
<i>Peak</i>	lokales Maximum
<i>Pellet</i>	sedimentierter Bodensatz
<i>Primer</i>	Oligonukleotid am Synthesebeginn eines komplementären Stranges von DNA
<i>Screening</i>	Reihenexperiment, hier bei Kristallisation
<i>Sticky end</i>	dsDNA-Enden mit überhängenden ungepaarten Basen
<i>Supercoiled</i>	ringförmig überspiralisiert
<i>Templat</i>	Matrize

AMINOSÄURESEQUENZEN

E2F1

MALAGAPAGG PCAPALEALL GAGALRL LDS SQIVIISAAQ DASAPPAPTG PAAPAAGPCD
 PDLLL FATPQ APRPTPSAPR PALGRPPVKR RLDLETDHQY LAESSGPARG RGRHPGKGVK
 SPGEKSRYET SLNLTTRKFL ELLSHSADGV VDLNWAAEVL KVQKRRIYDI TNVLEGIQLI
 AKKSKNHIQW LGSHTTVGVG GRLEGLTQDL RQLQESEQQL DHLMNICTTQ LRLLEDSDTS
 QRLAYVTCQD LRSIADPAEQ MVMVIKAPPE TQLQAVDSSE NFQISLKSQ GPIDVFLCPE
 ETVGGISPGK TPSQEV TSEE ENRATDSATI VSPPPSSPPS SLTTDPSQSL LSLEQEPLLS
 RMGSLRAPVD EDRLSPLVAA DLSLEHVRED FSGLLPEEFI SLSPPEALD YHFGLEEGER
 IRDLDFDCDFG DLTP LDF

DP1

MAKDAGLIEA NGELKVFIDQ NLSPGKGVVS LVAVHPSTVN PLGKQLLPKT FGQSNVNIAQ
 QVVIGTPQRP AASNTLVVGS PHTPSTHFAS QNQPSDSSPW SAGKRNRKGE KNGKGLRHFS
 MKVCEKVQRK GTTSYNEVAD ELVAEFSAAD NHILPNESAY DQKNIRRRVY DALNVLMMAN
 IISKEKKEIK WIGLPTNSAQ ECQNLEVERQ RRLERIKQKQ SQLQELILQQ IAFKNLVQRN
 RHAEQQASRP PPPNSVIHLP FIIIVNTSKKT VIDCSISNDK FEYLFNFDNT FEIHDDIEVL
 KRMGMACGLE SGSCSAEDLK MARSLVPKAL EPYVTEMAQG TVGGVFITTA GSTSNGTRFS
 ASDLTNGADG MLATSSNGSQ YSGSRVETPV SYVGEDDEED DDFNENDEDD

pRB

MPPKTPRKTA ATAAAAAEP PAPP P P P P P P P P E EDPEQDSGPE DLPLVRLEFE ETEEPDF TAL
 CQKLIKIPDHV RERAWLTWEK VSSVDGVLGG YIQKKKELWG ICIFIARVDL DEMSFTLLSY
 RKTYEISVHK FFNLLKEIDT STKVDNAMSR LLKKYDVLFA LFSKLER TCE LIYLTQPSSS
 ISTEINSALV LKVSWITFLL AKGEVLQMED DLVISFQLML CVLDYFIKLS PPMLLKEPYK
 TAVIPINGSP RTPRRGQNRS ARIAKQLEND TRIIEVLCKE HECNIDEVKN VYFKNFIPFM
 NSLGLVTSNG LPEVENLSKR YEEIYLKNKD LDRRLFLDHD KTLQTD SIDS FETQRTPRKS
 NLDEEVNIIP PHTPVRTVMN TIQQLMMILN SASDQPS ENL ISYFNNCTVN PKESILKRVK
 DIGYIFKEKF AKAVGQGCVE IGSQRYKLG V RLYYRVMESM LKSEERLSI QNFSKLLNDN
 IFHMSLLACA LEVVMATYSR STSQNLDSGT DLSFPWILNV LNLKAFDFYK VIESFIKAE G
 NLTREMIKHL ERCEHRIMES LAWLSDSPLF DLIKQSKDRE GPTDHLESAC PLNLPLQNNH
 TAADMYLSPV RSPKKKGSTT RVNSTANAET QATSAFQTQK PLKSTSLSLF YKKVYRLAYL
 RLNTLCERLL SEHPELEHII WTLFQHTLQN EYELMRDRHL DQIMMCSMYG ICKVKNIDLK
 FKIIIVTAYKD LPHAVQETFK RVLIKEEYD SIIIVFYNSVF MQRKTNILQ YASTRPPTLS
 PIPHIPRSPY KFPSSPLRIP GGNIYISPLK SPYKISEGLP TPTKMTPRSR ILV SIGESFG
 TSEKFQKINQ MVCNSDRVLK RSAEGSNPPK PLKCLRFDIE GSDEADGSKH LPGESKFQQK
 LAEMTSTRTR MQKQKMND SM DTSNKEEK

SKP2

MHRKHLQEIP DLSSNVATSF TWGWDSSKTS ELLSGMGVSA LEKEEPDSEN IPQELLSNLG
 HPESPPrKRL KSKGSDKDFV IVRRPKLNRE NFPGVSWDSL PDELLLGIFS CLCLPELLKV
 SGVCKRWYRL ASDESLWQTL DLTGKNLHPD VTGRLLSQGV IAFRCPRFSM DQPLAEHFSP
 FRVQHMDLSN SVIEVSTLHG ILSQCCKLQN LSLEGLRLSD PIVNTLAKNS NLVRLNLSGC
 SGFSEFALQT LLSSCSRLDE LNLSWCFDFT EKHVQVAVAH VSETITQLNL SGYRKNLQKS
 DLSTLVRRCF NLVHLDLSDS VMLKNDCFQE FFQLNYLQHL SLSRCYDIIP ETLLELGEIP
 TLKTLQVFGI VPDGTLQLLK EALPHLQINC SHFTTIARPT IGKKNQEIW GIKCRLTLQK
 PSC

p27

MSNVRVSNGS PSLEMRDARQ AEHPKPSACR NLFPGVDHEE LTRDLEKHCR DMEEASQRKW
 NFDQFNHKLK EGYEWQVEE KGSLPEFYR PPRPPKGACK VPAQESQDVS GSRPAAPLIG
 APANSEDTLH VDPKTDPSDS QTGLAEQCAG IRKRPTDSDS STQNKRRANRT EENVSDGSPN
 AGSVEQTPKK PGLRRRQT

CDK2

MENFQKVEKI GEGTYGVVYK ARNKLTGEV ALKKIRLDTE TEGVPSTAIR EISLLKELNH
 PNIVKLLDVI HTENKLYLVF EFLHQDLKKF MDASALTGIP LPLIKSYLFQ LLQGLAFCHS
 HRVLHRDLKP QNLLINTEGA IKLADFGLAR AFGVPVRTYT HEVVTWLYRA PEILLGCKYY
 STAVDIWSLG CIFAEMVTRR ALFPGDSEID QLFRIFRITLG TPDEVVWPGV TSMPDYKPSF
 PKWARQDFSK VVPLDEDGR SLLSQMLHYD PNKRISAKAA LAHPFFQDVT KPVPHLRL

Cyclin A

MLGNSAPGPA TREAGSALLA LQQTALQEDQ ENINPEKAAP VQQRTRAAL AVLKSGNPRG
 LAQQORPKTR RVAPLKDLPV NDEHVTVPW KANSKQPAFT IHVDEAEKEA QKKPAESQKI
 EREDALAFNS AISLPGPRKP LVPLDYPMDG SFESPHTMDM SIVLEDEKPV SVNEVPDYHE
 DIHTYLREME VKCKPKVGYM KKQPDITNSM RAILVDWLVE VGEEYKLQNE TLHLAVNYID
 RFLSSMSVLR GKLQLVGTAA MLLASKFEEI YPPEVAEFVY ITDDTYTKKQ VLRMEHLVLK
 VLTFDLAAPT VNQFLTQYFL HQQPANCKVE SLAMFLGELS LIDADPYLKY LPSVIAGAAF
 HLALYTVTQ SWPESLIRKT GYTLESKPC LMDLHQTYLK APQHAQQSIR EKYKNSKYHG
 VSLLNPPETL NL

MDM2

MCNTNMSVPT DGAVTTSQIP ASEQETLVRP KPLLLKLLKS VQAQKDTYTM KEVLFYLGQY
 IMTKRLYDEK QQHIVYCSND LLGDLFGVPS FSVKEHRKIY TMIYRNLVVV NQCESSDST
 SVSENRCHE GGSQDKDLVQ ELQEEKPSSS HLVSRLPSTSS RRAISETEE NSDELSEGRQ
 RKRKHSKSDS LSFDESALC VIREICCERS SSSESTGTPS NPDLDAVSE HSGDWLDQDS
 VSDQFSVEFE VESLSEEDYS LSEEGQELSD EDDEVYQVTV YQAGESDTS FEEDPEISLA
 DYWKCTSCNE MNPPLPSHCN RCWALRENWL PEDKGKDKGE ISEKAKLENS TQAEFGDVP
 DCKKTIVNDS RESCVEEND KITQASQSQE SEDYSQPSTS SSIIYSSQED VKEFEREETQ
 DKEESVSSL PLNAIEPCVI CQGRPKNGCI VHGTGHLMA CFTCAKLLK RNKPCPVCRCQ
 PIQMIVLTYF P

p53

MEEPQSDPSV EPPLSQETFS DLWKLLPENN VLSPLPSQAM DDLMLSPDDI EQWFTEDPGP
 DEAPRMPEAA PPVAPAPAAP TPAAPAPAPS WPLSSSVPSQ KTYQGSYGFR LGFLHSGTAK
 SVTCTYSPAL NKMFCQLAKT CPVQLWVDST PPPGTRVRAM AIYKQSQHMT EVVRRCPHHE
 RCSDSGLAP PQHLIRVEGN LRVEYLDDRN TFRHSVVVPY EPPEVGSCT TIHYNMCNS
 SCMGGMNRRP ILTIITLED SGNLLGRNSF EVRVCACPGR DRRTEENLR KKGEPHHELP
 PGSTKRALPN NTSSSPQPK KPLDGEYFTL QIRGRERFEM FRELNEALEL KDAQAGKEPG
 GSAHSSHLK SKKGQSTSRH KKLMEFKTEGP DSD

MDMX

MTSFSTSAQC STSDSACRIS PGQINQVRPK LPLLKILHAA GAQGEMFTVK EVMHYLGQYI
 MVKQLYDQQE QHMYVCGGDL LGELLGRQSF SVKDPSPLYD MLRKNLVTLA TATTDAAQTL
 ALAQDHSMDI PSQDQLKQSA EESSTSRKRT TEDDIPTLPT SEHKCIHSRE DEDLIENLAQ
 DETSRLDLGF EEWDVAGLPW WFLGNLRSNY TPRSNGSTDL QTNQDVGTAI VSDTTDDLWF
 LNESVSEQLG VGIKVEAADT EQTSEEVGK SDKKVIEVGK NDDLEDKSL SDDTDVEVTS
 EDEWQCTECK KFNSPSKRYC FRCWALRKDW YSDCSKLTHS LSTSDITAIP EKENEGNDVP
 DCRRTISAPV VRPKDAYIKK ENSKLFDPEN SVEFLDLAHS SESQETISSM GEQLDNLSEQ
 RTDTENMEDC QNLLKPCSLC EKRPRDGNII HGRTGHLVTC FHCARRLKKA GASCPICKKE
 IQLVIKVFIA

Nucleostemin

MKRPKLKKAS KRMTCHKRYK IQKKVREHHR KLRKEAKKQG HKKPRKDPGV PNSAPFKEAL
 LREAELRKQR LEELKQQQKL DRQKELEKKR KLETNPDIKP SNVEPMEKEF GLCKTENKAK
 SGKQNSKKLY CQELKKVIEA SDVVLEVLD RDPGLGCRCPQ VEEAIVQSGQ KKLVLILNKS
 DLVPKENLES WLNYLKKELP TVVFRASKP KDKGKITKRV KAKKNAAPFR SEVCFGKEGL
 WKLLGGFQET CSKAIRVGI GFNPNVGKSSI INSLKQEQMC NVGVSMLTR SMQVVPLDKQ
 ITIIDSPSFI VSPLNSSSAL ALRSPASIEV VKPMEAASAI LSQADARQVV LKYTVPGYRN
 SLEFFFTMLAQ RRGMHQKGGI PNVEGAAKLL WSEWTGASLA YYCHPPTSWT PPPYFNESIV
 VDMKSGFNLE ELEKNAQSI RAIKGPHLAN SILFQSSGLT NGIIEEKDIH EELPKRKERK
 QEEREDDKDS DQETVDEEVD ENSSGMFAAE ETGEALSEET TAGEQSTRSF ILDKIIEEDD
 AYDFSTDYV

SEQUENZALIGNMENT

```

MDM2 human      MCNTNMSVPTDGAVTTS---QIPASEQETLVRPKPLLLKLLKSVGAQKDTYTMKEVLFYL 57
MDM2 mouse      MCNTNMSVSTEGAASTS---QIPASEQETLVRPKPLLLKLLKSVGAQNDTYTMKEIIFYI 57
MDM2 hamster    -----STDGAEGTS---QIPASEQETLVRPKPLFLKLLKSVGAQKDTYTMKEIILSW 49
MDM2 cat        MCNTNMSVSTDGAVSTS---QMPASEQETLVRPKPLLLKLLKSVGAQKDTYTMKEVIFYL 57
MDM2 dog        MCNTNMSVSTGGAVSTS---QIPASEQETLVRPKPLLLKLLKSVGAQKDTYTMKEVIFYL 57
MDM2 frog       M----NLTSTNCLENN---HISTSDQEKLVQPTPLLLSLLKSAGAQKETFTMKEVIYHL 53
MDM2 zebrafish  M-----ATESCLSSS---QISKVDNEKLVVRPKVQLKSLLLEDAGADKDVFTMKEVMFYL 50

MDMX human      M----TSFSTSAQCSTSDSACRISPGQINQVRPKLPLLKILHAAGAQQEMFTVKEVMHYL 56
MDMX mouse      M----TSHSTSAQCSASDSACRISSEQISQVRPKLQLLKILHAAGAQQEVFTMKEVMHYL 56
MDMX zebrafish  M----TSLASSQLPGS---CRTLPGEGTQVHPRAPLLQILKVAGAQQEEVFTLKEVMHYL 53
                .:          .          : . **      : .:* . ** : :***:

MDM2 human      GQYIMTKRLYDEKQQHIVYCSNDLLGDLFGVPSFSVKEHRKIYTMIRNLVVVNQQESSD 117
MDM2 mouse      GQYIMTKRLYDEKQQHIVYCSNDLLGDVFGVPSFSVKEHRKIYAMIYRNLVAVSQQ---D 114
MDM2 hamster    -QYIMTKRLYDEKQQHIVYCSNDLLGDLFGVPSFSVKDHRKIHIMIYRNLVVVSQQETLQ 108
MDM2 cat        GQYIMTKRLYDEKQQHIVYCSNDLLGDLFGVPSFSVKEHRKIYTMIRNLVVVNQHEPSD 117
MDM2 dog        GQYIMTKRLYDEKQQHIVYCSNDLLGDLFGVPSFSVKEHRKIYTMIRNLVVVNQHEPSD 117
MDM2 frog       GQYIMAKQLYDEKQQHIVHCSNDPLGELFGVQEFVKEPRRLYAMISRNLVSANVKES-- 111
MDM2 zebrafish  GKYIMSKELYDKQQHIVHCGEDPLGAVLGVKFSVKEPRALFALINRNLVTVKNPE--- 107

MDMX human      GQYIMVKQLYDQQEQHMVYCGGDLLGELLGRQSFVSKDPSPLYDMLRKNLVTLATATT-D 115
MDMX mouse      GQYIMVKQLYDQQEQHMVYCGGDLLGDLLGCQSFVSKDPSPLYDMLRKNLVTSASNNT-D 115
MDMX zebrafish  GQYIMMKQLYDKQRQHIVHCHDDPLGELLEVGGSFVKNPSPVYEMLRKNLVILNNS---D 110
                :*** *.***:.***:* * ** :. .****: .: .: :***

MDM2 human      SGTSVSENRG-HLEGGSDQ----KDLVQELQEEKPSSSHLVSRLPSTSS---RRRAISET 169
MDM2 mouse      SGTSLSESRR-QPEGGSDL----KDPLQAPPEEKPSDDLISRLSTSS---RRRSISET 166
MDM2 hamster    SGTSVSESRC-QPEGGSEQ----KDPVQEPQEEK-SSSDSVSRPSTSS---RRRTISET 159
MDM2 cat        SGTSVSENRG-HLEGGSDQ----KDPVQELQEEKPSSDLVSRPSTSS---RRRTISET 169
MDM2 dog        SGTSVSENSC-HREGGSDQ----KDPVQELQEEKPSSDLISRLPSTSS---RRRTISET 169
MDM2 frog       SEDIFGNVCC-FPDKQSSQ----KEKLQELPKLIAPASD-SKPCNLS---QRKSSNET 163
MDM2 zebrafish  SQSTFSEPRS-----QSEFDRGPGDTSDSRSSTSQQRRRRRSSDPE 150

MDMX human      AAQTLALAQDHSMDIPSQD--QLKQSAEESSTSRKRTTEDDIPTLPTS---EHKCIHSRE 170
MDMX mouse      AAQTLALAQDHTMDFPSQD--RLKHGATEYSNPRKRTEEDTHLPTS---RHKCRDSRA 170
MDMX zebrafish  AAKNLSVGKD-SNESPSEDPGQVSSGSINSAQPLIAGSSSTGTTQSCS---QRRPRDP-- 164
                : ..          .          .:

```

PRIMERSEQUENZEN

NAME SEQUENZ

PRIMER FÜR E2F1

UR 1	CGC GGA TCC CTG GCC TAC GTG ACG TGT CAG G	BamH1	243	→
UR 2	CCG GAA TTC TCA GAA ATC CAG GGG GGT GAG G	EcoR1	437	←
UR 3	CCG GAA TTC CTA AGT GAC CTC CTG GGA TGG GCT C	EcoR1	317	←
UR 4	CCG GAA TTC CTA GGC CGC CAC CAG CGG GGA	EcoR1	380	←
UR 5	CGC GGA TCC CCG GGG GAG AAG TCA CGC	BamH1	120	→
UR 8	CGC GGA TCC ATC TCC CTT AAG AGC AAA CAA GGC C	BamH1	284	→
UR 9	CCG GGA TCC TCA GAA ATC CAG GGG GGT GAG G	BamH1	437	←
UR 10	CCG GGA TCC CTA AGT GAC CTC CTG GGA TGG GGT C	BamH1	317	←
UR 13	CGC CC ATG GGC CTG GCC TAC GTG ACG TGT CAG G	Nco1	243	→
UR 14	CGC CC ATG GCC CCG GGG GAG AAG TCA CGC	Nco1	120	→
UR 39	CCG GAA TTC CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG C (+PRESCISSIIONPROTEASE)	EcoR1	243	→
UR 40	CCG GTC GAC TCA GAA ATC CAG GGG GGT GAG G	Sall	437	←
UR 84	CGC GGA TCC GGC GGA CGG CTT GAG GGG TTG ACC	BamH1	200	→
UR 90	AAA AAA GTC GAC TCA GAA ATC CAG GGG GGT GAG G	Sall	437	←

LIC PRIMER FÜR E2F1

UR 62	GAC GAC GAC AAG ATG ATG GCT CTG GCT GGA GCT CC	1	→
UR 63	GAC GAC GAC AAG ATG ACT CCT CAG GCT CCA AGA CC	68	→
UR 64	GAG GAG AAG CCC GGT TCA AGC TGG CCC ACT GCT CTC G	108	←
UR 86	GAC GAC GAC AAG ATG CCG GGG GAG AAG TCA CGC	120	→
UR 87	GAG GAG AAG CCC GGT TCA CAG GCG CTG GCT GTC AGT GTC C	243	←

PRIMER FÜR DP1

UR 6	CGC GGA TCC CGC AAC AGG AAA GGA GAG AAG AAT G	BamH1	105	→
UR 7	CCG GAA TTC TCA AGC CTT GGG GAC CAG ACT TCT GG	EcoR1	329	←
UR 15	ATG GCA GAT CTG CGC AAC AGG AAA GGA GAG AAG AAT G	BglIII	105	→
UR 16	CCG CTC GAG TCA AGC CTT GGG GAC CAG ACT TCT GG	Xho1	329	←
UR 82	CGC GGA TCC GCT CAG GAA TGT CAG AAC TTA GAG G	BamH1	198	→
UR 83	CCG GTC GAC CTA TGC CGT CGT GAT GAA CAC GCC	Sall	350	←
UR 91	AAA AAA GTC GAC CTA TGC CGT CGT GAT GAA CAC GCC	Sall	350	←

LIC PRIMER FÜR DP1

UR 88	GAC GAC GAC AAG ATG CGC AAC AGG AAA GGA GAG AAG AAT G	105	→
UR 89	GAG GAG AAG CCC GGT TCA CTG CTG CTC CGC ATG CCG G	246	←

PRIMER FÜR NUCLEOSTEMIN

UR 17	GGAATTC CAT ATG AAA CAG AAT TCA AAG AAG CTG TAC TGC C	Nde1	123	→
UR 18	CG GGA TCC TCA AGA TGT AGG GGG ATG GCA ATA GTA AGC	BamH1	408	←
UR 19	CG GGA TCC AAA CAG AAT TCA AAG AAG CTG TAC TGC C	BamH1	123	→
UR 20	CCG CTC GAG TCA AGA TGT AGG GGG ATG GCA ATA GTA AGC	Xho1	408	←
UR 21	GGAATTC CAT ATG CCA GGA GTT CCA AAC AGT GCT CCC	Nde1	48	→
UR 22	CG GGA TCC CCA GGA GTT CCA AAC AGT GCT CCC	BamH1	48	→
UR 23	CG GGA TCC CTA TGT AGT CTC CTC AGA CAG TGC CTC CC	BamH1	521	←
UR 24	CCG CTC GAG CTA TGT AGT CTC CTC AGA CAG TGC CTC CC	Xho1	521	←
UR 25	CG GGA TCC ATG AAA AGG CCT AAG TTA AAG AAA GC	BamH1	1	→
UR 26	CCG CTC GAG CTA GAC AAC ATC GGA GGC TTC ATT CAC C	Xho1	144	←
UR 27	GGAATTC CAT ATG AAA AGG CCT AAG TTA AAG AAA GC	Nde1	1	→
UR 28	CG GGA TCC CTA GAC AAC ATC GGA GGC TTC ATT CAC C	BamH1	144	←

LIC PRIMER FÜR NUCLEOSTEMIN

UR 29	GGT ATT GAG GGT CGC AAA CAG AAT TCA AAG AAG CTG TAC TGC C	123	→
UR 30	AGA GGA GAG TTA GAG CC TCA AGA TGT AGG GGG ATG GCA ATA GTA AGC	408	←
UR 31	GGT ATT GAG GGT CGC ATG AAA AGG CCT AAG TTA AAG AAA GC	1	→
UR 32	GGT ATT GAG GGT CGC CCA GGA GTT CCA AAC AGT GCT CCC	48	→
UR 33	AGA GGA GAG TTA GAG CC CTA GAC AAC ATC GGA GGC TTC ATT CAC C	144	←
UR 34	AGA GGA GAG TTA GAG CC CTA TGT AGT CTC CTC AGA CAG TGC CTC CC	521	←

PRIMER FÜR RB

UR 43	GGAATTC CAT ATG ACT CCA AGA TCA AGA ATC TTA G	NdeI	825	→
UR 44	CG GGA TCC CTA CTG CTT TTG CAT TCG TGT TCG	BamHI	914	←

LIC PRIMER FÜR RB

UR 35	GGT ATT GAG GGT CGC CCT CCT AAA CCA CTG AAA AAA CTA CG		867	→
UR 36	AGA GGA GAG TTA GAG CC TCA TTT CTC TTC CTT GTT TGA GGT ATC		928	←
UR 37	GGT ATT GAG GGT CGC ATG AAC ACT ATC CAA CAA TTA ATG ATG		379	→
UR 38	AGA GGA GAG TTA GAG CC GAA TTC TTT CTC TTC CTT GTT TGA GGT ATC	EcoRI	928	←
UR 45	GAC GAC GAC AAG ATG ACT CCA AGA TCA AGA ATC TTA G		825	→
UR 46	GAG GAG AAG CCC GGT CTA CTG CTT TTG CAT TCG TGT TCG		914	←
UR 50	GAC GAC GAC AAG ATG CCT CCT AAA CCA CTG AAA AAA CTA CG		867	→
UR 51	GAG GAG AAG CCC GGT TCA TTT CTC TTC CTT GTT TGA GGT ATC		928	←
UR 53	GAC GAC GAC AAG ATG GGA GGG AAC ATC TAT ATT TCA C		801	→
UR 54	GAG GAG AAG CCC GGT TCA ATG TTT ACT TCC ATC TGC TCC		890	←
UR 55	GAC GAC GAC AAG ATG TAC AAG TTT CCT AGT TCA CCC		790	→
UR 56	GAG GAG AAG CCC GGT TCA TCT TTT GAG CAC ACG GTC GC		861	←

PRIMER FÜR SKP2

UR 57	AAA GGA TCC CAC CCG GAG AGC CCC CCA C	BamHI	61	→
UR 58	AAA GAA TTC CTA CAC ATC CGG GTG CAG AT	EcoRI	151	←

LIC PRIMER FÜR SKP2

UR 41	GGT ATT GAG GGT CGC ATG CAC AGG AAG CAC CTC CAG		1	→
UR 42	AGA GGA GAG TTA GAG CC TCA TAG ACA ACT GGG CTT TTG C		424	←
UR 47	GAC GAC GAC AAG ATG CAC AGG AAG CAC CTC CAG		1	→
UR 48	GAG GAG AAG CCC GGT CAC ATC CGG GTG CAG AT		151	←
UR 49	GAG GAG AAG CCC GGT CTA CAC ATC CGG GTG CAG AT		151	←
UR 52	GAC GAC GAC AAG ATG CAC CCG GAG AGC CCC CCA C		61	→
UR 60	GAG GAG AAG CCC GGT TCA TAG ACA ACT GGG CTT TTG C		424	←

PRIMER FÜR P53**LIC PRIMER FÜR P53**

UR 65	GAC GAC GAC AAG ATG GGA GAA TAT TTC ACC CTT CAG ATC CG		325	→
UR 66	GAG GAG AAG CCC GGT TCA CTT CAG GTG GCT GGA GTG AGC		370	←
UR 69	GAC GAC GAC AAG ATG GAG GAG CCG CAG TCA GAT CC		1	→
UR 70	GAG GAG AAG CCC GGT TCA GTT GGG CAG TGC TCG CTT AGT GC		310	←
UR 85	GAG GAG AAG CCC GGT CTA GTC TGA GTC AGG CCC TTC		393	←
UR 94	GAG GAG AAG CCC GGT TCA CAC GGG GGG AGC AGC CTC TG		73	←
UR 129	GAC GAC GAC AAG ATG AGTCAGGAAACATTTTCAGACCTATGGAACTACTTCC		15	→
UR 130	GAG GAG AAG CCC GGT CTA TTTCTTCTTTGGCTGGGGAGAGGAGCTGGTGTGTTGGGC		321	←

MUTATIONSPRIMER FÜR P53

UR 67	C GAG ATG TTC CGA GAG GCG AAT GAG GCC TTG G	L344A		→
UR 68	C CAA GGC CTC ATT CGC CTC TCG GAA CAT CTC G	L344A		←

PRIMER FÜR MDM2

UR 79	AAA ACC ATG G GAA CAA GAG ACC CTG GTT AGA CC	NcoI	23	→
UR 80	A AAA GGA TCC TCA ATT GAC TAC TAC CAA GTT CCT GTA GAT CAT GG	BamHI	111	←
UR 81	AAA ACC ATG GAA CAA GAG ACC CTG GTT AGA CC	NcoI	23	→
UR 92	GAC TCT TGC TGA CTT ACA GCC ACT AAA TTT C			←
UR 93	CTC CGA CTC TGG CAC ATC GCT GAG TGA GAG			→
UR 126	AG GCA TTC CAT ATG TGC AAT ACC AAC ATG TCT G	NdeI	1	→
UR 127	AG GCA TTC CAT ATG CAG ATT CCA GCT TCG GAA C	NdeI	17	→
UR 128	CAT GGA TCC CTA GTT CTC ACT CAC AGA TGT ACC TG	BamHI	125	←

LIC PRIMER FÜR MDM2

UR 71	GAC GAC GAC AAG ATG TGC AAT ACC AAC ATG TCT GTA CC	1	→
UR 72	GAG GAG AAG CCC GGT TCA TGA GTC CGA TGA TTC CTG CTG	118	←
UR 73	GAC GAC GAC AAG ATG GAA CAA GAG ACC CTG GTT AGA CC	23	→
UR 74	GAG GAG AAG CCC GGT TCA TAC TAC CAA GTT CCT GTA GAT CAT GG	109	←
UR 77	GAC GAC GAC AAG ATG AAA GAG TTT GAA AGG GAA GAA ACC	412	→
UR 78	GAG GAG AAG CCC GGT TCA AGG TTC AAT GGC ATT AAG GGG C	437	←
UR 115	GAG GAG AAG CCC GGT CTA GGG GAA ATA AGT TAG CAC AAT CAT TTG AAT TGG	491	←
UR 103	GAC GAC GAC AAG ATG TCA CAG ATT CCA GCT TCG GAA C	17	→
UR 104	GAG GAG AAG CCC GGT TCA GTT CTC ACT CAC AGA TGT ACC TG	125	←
UR 105	GAC GAC GAC AAG ATG TCA CAG ATT CCA GCT TCG G	J&J 17	→
UR 106	GAG GAG AAG CCC GGT TTA GTT CTC ACT CAC CGA TGT GC	J&J 125	←

MUTATIONSPRIMER FÜR MDM2

UR 95	GGCTGTAAGTCAGCAA GAG TCC TCC GACTCTGGCACATCGCTGAGTGAGAGC	LOOP ESS	→
UR 96	GCGATGTGCCAGAGTC GGA GGA CTC TTGCTGACTTACAGCCACTAAATTTCTGTAG	LOOP ESS	←
UR 97	GAC TCT GGC ACA TCG GTG AGT GAG AAC TAA GGA TCC G	L→V S→N	→
UR 98	C GGA TCC TTA GTT CTC ACT CAC CGA TGT GCC AGA GTC	L→V S→N	←
UR 99	G AAA GAG GTT CTT TGG TAT CTT GGC CAG TAT ATT ATG	F55W	→
UR 100	G GCC AAG ATA CCA AAG AAC CTC TTT CAT AGT ATA AGT GTC	F55W	←
UR 107	GGC CAG TAT ATT ATG TGG AAA CGA TTA TAT GAT GAG AAG C	T63W	→
UR 108	G CTT CTC ATC ATA TAA TCG TTT CCA CAT AAT ATA CTG GCC	T63W	←
UR 109	CTGTTGGTGCA CAA AAA GAC TGG TAT ACT ATG AAA GAG GTT CTT TTT TAT CTT GG	T47W	→
UR 110	CCAAGATAAAA AAG AAC CTC TTT CAT AGT ATA CCA GTC TTT TTG TGC ACC AAC AG	T47W	←
UR 111	CTTC TCT GTG AAA GAG CAC AGG TGG ATA TAT ACC ATG ATC TAC AGG AAC TTG G	K98W	→
UR 112	CCAA GTT CCT GTA GAT CAT GGT ATA TAT CCA CCT GTG CTC TTT CAC AGA GAA G	K98W	←
UR 116	CC CTG GTT AGA CCA AAG CCA TTG TTT TTG AAG TTA TTA AAG TCT GTT GGT GC	L34F	→
UR 117	GC ACC AAC AGA CTT TAA TAA CTT CAA AAA CAA TGG CTT TGG TCT AAC CAG GG	L34F	←
UR 118	GGTTAGACCAAAGCCATTGCTTTTGAAGTTT TTA AAG TCT GTT GGT GCA CAA AAA GAC AC	L37F	→
UR 119	GTGTCTTTTGTGTCACCAACAGACTTTAAAAA CTT CAA AAG CAA TGG TCT TGG TCT AAC C	L37F	←
UR 120	CAT ATT GTA TAT TGT TCA AAT GAT CTT TTT GGAGATTTGTTGGCGTGCCAAGC	L82F	→
UR 121	GCTTGG CAC GCC AAA CAA ATC TCC AAA AAG ATC ATT TGA ACA ATA TAC AAT ATG	L82F	←
UR 122	GTTCAAATGATCTTCTAGGA GAT TTT TTT GGC GTG CCA AGC TTC TCT GTG AAA GAG C	L85F	→
UR 123	GCTCTTTCACAGAGAAGCT TGG CAC GCC AAA AAA ATC TCC TAG AAG ATC ATT TGA AC	L85F	←
UR 124	AAAAGAGCACAGGAAA ATA TAT ACC TTT ATC TAG AGG AAC TTG GTA GTC AAT C	M102F	→
UR 125	GATTGACTACTACCAA GTT CCT GTA GAT AAA GGT ATA TAT TTT CCT GTG CTC TTT C	M102F	←

ENTFERNUNG DES HIS-TAGS VON pET46 MDM2

UR 75	ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACC ATG GAA CAA GAG ACC CTG GTT AGA CC	23	→
UR 76	GG TCT AAC CAG GGT CTC TTG TTC CAT GGT ATA TCT CCT TCT TAA AGT		←
UR 101	ACTTTAAGAAGGAGATATACCATG GAA CAA GAG ACC CTG GTT AGA CCA AAG CCA TTG C	23	→
UR 102	GGCTTTGGTCTAACCAGGGTCTCT TGT TCC ATG GTA TAT CTC CTT CTT AAA GTT AAA C		←
	CCC CTC TAG AAA TAA TTT TGT TTA ACT TTA AGA AGG AGA TAT ACC ATG TCA		
UR 113	CAG ATT CCA GCT TCG GAA CAA GAG ACC C	17	→
	G GGT CTC TTG TTC CGA AGC TGG AAT CTG TGA CAT GGT ATA TCT CCT TCT TAA		
UR 114	AGT TAA ACA AAA TTA TTT CTA GAG GGG	17	←

PRIMER FÜR CDK2

MUTATIONSPRIMER CDK2

UR 131	ATG GAG AAC TTC CAA AAG TGG GAA AAG ATC GGA GAG GGC ACG TAC G	V7W	→
UR 132	C GTA CGT GCC CTC TCC GAT CTT TTC CCA CTT TTG GAA GTT CTC CAT	V7W	←
UR 133	GCCAGTACTGCCATCCGAGAGATC TGG CTG CTT AAG GAG CTT AAC CAT CC	S53W	→
UR 134	GGATGGTTAAGCTCCTTAAGCAG CCA GAT CTC TCG GAT GGC AGT ACT GGG C	S53W	←
UR 135	CCTGGTT TTT GAA TTT CTG TGG CAA GAT CTC AAG AAA TTC ATG GAT GCC	H84W	→
UR 136	GGCATCCAT GAA TTT CTT GAG ATC TTG CCA CAG AAA TTC AAA AAC CAG G	H84W	←
UR 137	C CAA GAT CTC AAG AAA TTC ATG GAT TGG TCT GCT CTC ACT GGC ATT CC	A93W	→
UR 138	GG AAT GCC AGT GAG AGC AGA CCA ATC CAT GAA TTT CTT GAG ATC TTG G	A93W	←
UR 139	CCAAAAGGTGAAAAGATCGGATGGGGCACGTACGGAGTTGTGTACAAAAGCC	E12W	→
UR 140	GGCTTTGTACACAACCTCCGTACGGTACCCCATCCGATCTTTTCCACCTTTTGG	E12W	←
UR 141	CGGAGAGGGCACGTACGGATGGGTGTACAAAAGCCAGAAAACAGTTGACGGG	V17W	→
UR 142	CCCCTCAACTTGTCTGGCTTTGTACACCCATCCGTACGTGCCCTCTCCG	V17W	←
UR 143	GGAGCTTAACCATCCTAATATTGTCTGGCTGCTGGATGTCATTACACAG	K65W	→
UR 144	CTGTGTGAATGACATCCAGCAGCCAGACAATATTAGGATGGTTAAGCTCC	K65W	←
UR 145	CAGAAAATAAATCTACCTGGTTTGGGAATTTTGCACCAAGATCTCAAGAAATTCATGG	F80W	→
UR 146	CCATGAATTTCTTGAGATCTGGTGCAGAAATTCCAAACCAGGTAGAGTTTATTTTCTG	F80W	←
UR 147	CAGAAAATAAATCTACCTGGTTTGTGAATGGTGCACCAAGATCTCAAGAAATTCATGG	F82W	→

UR 148 CCATGAATTTCTTGAGATCTTGGTGCAGCCATTCAAAAACCAGGTAGAGTTTATTTCTG F82W ←

SONSTIGE OLIGOS

UR 11 TTT CGC GCC AAA E2F Promotor ←
UR 12 TTT GGC GCG AAA E2F Promotor →
UR 59 GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG GST FORWARD PRIMER →
UR 61 TGA CAA GAG AAA TGA TAA AAC RB SEQUENZIER PRIMER 542 →
