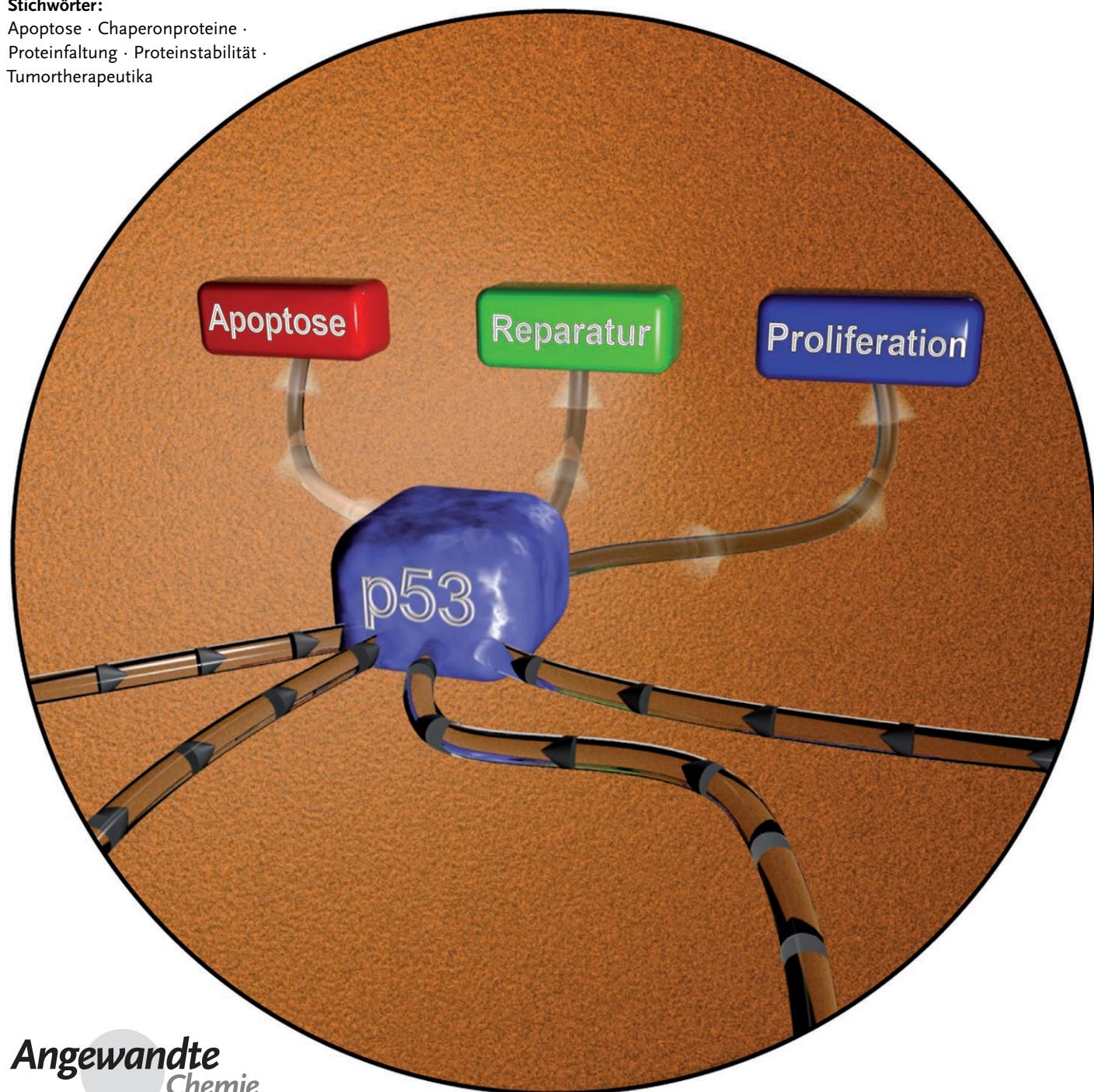


p53 – ein natürlicher Krebskiller: Einsichten in die Struktur und Therapiekonzepte

Lin Römer, Christian Klein, Alexander Dehner, Horst Kessler* und Johannes Buchner*

Stichwörter:

Apoptose · Chaperonproteine ·
Proteinfaltung · Proteinstabilität ·
Tumorthapeutika



Jeden Tag mutiert die DNA einer jeden Zelle im menschlichen Körper – sogar in Abwesenheit von Onkogenen oder extremer Strahlung – tausende Male. Viele dieser Mutationen würden zu Krebs und schließlich zum Tod führen. Um dem entgegenzuwirken, haben vielzellige Organismen ein effizientes Kontrollsyste mit dem Tumorsuppressorprotein p53 als dem zentralen Element entwickelt. Ein intaktes p53-Netzwerk gewährleistet, dass DNA-Schäden frühzeitig entdeckt und repariert werden. Die Bedeutung von p53 für die Prävention von Krebs wird dadurch deutlich, dass p53 in mehr als 50 % aller menschlichen Tumoren inaktiviert vorliegt. Aus diesem Grund ist p53 eines der am intensivsten untersuchten Proteine. Trotz der großen Anstrengungen, die unternommen wurden, um dieses Protein zu charakterisieren, sind seine Struktureigenschaften und komplexen Funktionen bisher nur teilweise aufgeklärt. Dieser Aufsatz behandelt vorrangig grundlegende Konzepte und jüngste Fortschritte für das Verständnis der Struktur und Regulierung von p53, unter besonderer Berücksichtigung neuer Therapieansätze.

1. Das Tumorsuppressorprotein p53

Das Protein p53 ist das Haupttumorsuppressorprotein des menschlichen Körpers. Es wurde ursprünglich als ein Onkogen entdeckt, das für verschiedene Arten von Krebs verantwortlich ist.^[1–3] Während der folgenden Jahre wurde allerdings klar, dass natürliches p53 als Tumorsuppressor wirkt und dass inaktives p53 für die schädlichen Effekte verantwortlich ist.^[4,5] Seitdem sind die bedeutende Rolle von p53 bei der Verhinderung von Krebs und die zugrunde liegenden Funktionsprinzipien weiter aufgeklärt worden. Trotz einer enormen Zahl von Publikationen beginnt man gerade erst, die komplexen Funktionen und die Struktureigenschaften von p53 als dem „Wächter des Genoms“ zu verstehen.^[6,7]

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulierung des Zellzyklus, der Einleitung des apoptotischen Zelltods und der DNA-Reparatur beteiligt ist. Die Inaktivierung von p53 resultiert hauptsächlich aus Mutationen, die auf unterschiedliche Weise die DNA-Bindung des Proteins beeinträchtigen.^[8,9] Mutiertes oder auf andere Weise inaktiviertes p53 wird in der Mehrzahl menschlicher Tumoren beobachtet.^[4,5] p53 steht im Zentrum eines riesigen Netzwerks von Proteinen, das es ermöglicht, eine Vielzahl von Signalen zu integrieren.^[10,11] Zellulärer Stress, wie DNA-Schäden oder das Vorhandensein von Onkogenen, bewirkt die Aktivierung dieses Netzwerks. Nach Aktivierung bindet p53 an spezifische DNA-Konsensussequenzen der Promotorregionen und regt die Transkription der entsprechenden Zielgene an. Die Produkte dieser Gene sind für die Einleitung der DNA-Reparaturmechanismen verantwortlich – oder, falls diese nicht ausreichen, für die Einleitung des programmierten Zelltodes (Abbildung 1). Die Aufgabe von p53 ist jedoch nicht nur die Wechselwirkung mit der DNA – es ist auch im Zytosol an der Einleitung der Apoptose beteiligt (siehe Abschnitt 6.3).

Aus dem Inhalt

1. Das Tumorsuppressorprotein p53	6591
2. Struktur und Stabilität von p53	6591
3. DNA-Bindung von p53	6594
4. Regulierung von p53	6596
5. Wechselwirkung mit Chaperonen	6600
6. Funktionen von p53	6601
7. p53 und Krebstherapie	6602
8. Perspektive	6606

Das p53-Protein ist das zentrale Signalsystem, über das Dutzende (oder vielleicht Hunderte) von Proteinen miteinander verbunden sind. Ein Signal wird oft über eine Kaskade von drei oder mehr Proteinen an p53 weitergeleitet, was die direkte In-vitro-Analyse von p53 und (aktivierenden) Partnerproteinen oft erschwert. Zusätzlich verschieben sich die Knoten und die Verbindungen zwischen diesen Knoten des Netzwerkes bei mehreren Formen von zellulären Schäden. Deshalb ist eine direkte Verbindung zwischen p53 und einem bestimmten Signal nicht einfach zu ermitteln.

2. Struktur und Stabilität von p53

Wie für ein Schlüsselprotein der Regulierung zu erwarten, ist die normale Konzentration von p53 sehr niedrig und wird von mehreren unabhängigen Mechanismen reguliert (siehe Abschnitt 4).^[12] Zusätzlich zur Regulation von p53 durch

[*] Dr. L. Römer, Prof. Dr. H. Kessler, Prof. Dr. J. Buchner
 Department Chemie
 Technische Universität München
 Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
 Fax: (+49) 89-289-13345 (Buchner)
 Fax: (+49) 89-289-13210 (Kessler)
 E-Mail: kessler@ch.tum.de
 johannes.buchner@ch.tum.de
 Dr. C. Klein
 Roche Diagnostics GmbH
 Pharma Research
 Molecular Biology
 Nonnenwald 2, 82372 Penzberg (Deutschland)
 Dr. A. Dehner
 Tripos GmbH
 Martin-Kollar-Straße 17, 81829 München (Deutschland)

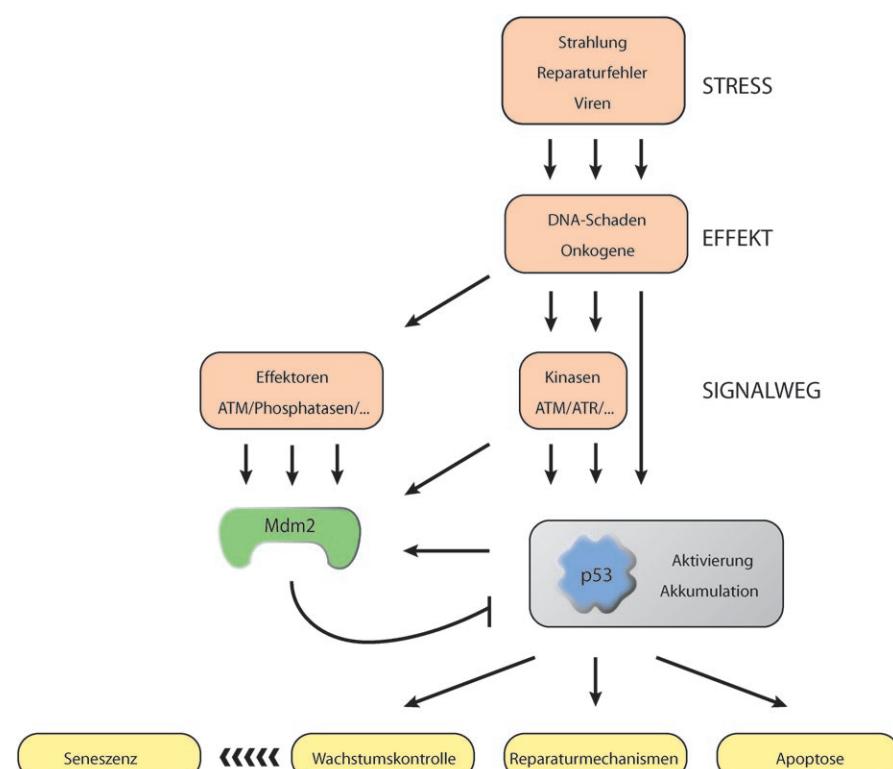


Abbildung 1. Vereinfachte Darstellung des p53-Pfades. p53 nimmt eine Reihe von Signalen auf, die den Status der Zelle widerspiegeln. Am wichtigsten ist dabei die Erkennung von DNA-Schäden. p53 induziert nach Aktivierung je nach eingehendem Signal verschiedene Gene mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Zelle. Mdm2 ist ein negativer Regulator von p53 (siehe Abschnitt 4.3.1).

andere Proteine ist die strukturelle Stabilität von p53 selbst von großer Bedeutung für seine Funktion. Interessanterweise zeigte sich, dass p53 ein labiles Protein mit einer kurzen Halbwertszeit ist.

2.1. Die Domänenstruktur von p53

Das humane p53-Gen^[13–15] kodiert für ein Protein von 393 Aminosäuren, die in einer modularen Struktur aus vier funktionellen Domänen angeordnet sind (Abbildung 2 A).



Johannes Buchner hat den Lehrstuhl für Biotechnologie an der Technischen Universität München inne. Er studierte Biologie und Biochemie an der Universität Regensburg und promovierte bei R. Rudolph und R. Jaenicke über die Mechanismen von Chaperonen. Nach einem Postdoktorandenaufenthalt bei I. Pastan am National Cancer Institute in Bethesda (USA) wurde er zunächst unabhängiger Gruppenleiter in Regensburg und schließlich 1998 Professor in München. Er ist Mitglied der Leopoldina. Buchner erforscht Chaperone sowie Grundlagen und Anwendungen der Proteinfaltung.



Horst Kessler, geboren 1940 in Suhl, Thüringen, studierte Chemie in Leipzig und Tübingen, wo er 1966 bei E. Müller promovierte und sich 1969 habilitierte. 1971 wurde er Professor für organische Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main und wechselte 1989 an die Technische Universität München. Er ist Mitglied der Leopoldina, der Bayerischen Akademie der Wissenschaften sowie des Kuratoriums der Angewandten Chemie, dem er von 2001 bis 2005 vorstand. Zu seinen Forschungsinteressen zählen die Entwicklung und Anwendung von NMR-Methoden zur Untersuchung von Biomolekülen, Wirkstoff-Design und Anwendungen von Integrin-Liganden.

Regulatoren von p53 wie Mdm2 (siehe Abschnitt 4.3), das Hepatitis-B-Virus-X-Protein Hbx^[25] oder das Adenovirus-E1B-Protein binden an dieselbe Stelle in der NTD.^[26–29] Die Wechselwirkung mit Proteinen, die die Transkriptionsaktivität und die Halbwertszeit von p53 regulieren, scheint durch post-transkriptionale Modifizierungen wie Phosphorylierung der aminoterminalen Domäne beeinflusst zu werden (siehe Abschnitt 4.1).^[30,31]

Die aminotermrale Domäne von p53 ist unstrukturiert.^[32–34] Auf der Ebene der Primärstruktur zeigt die NTD die typische Aminosäurezusammensetzung von „nativ entfalteten Proteinen“ oder „intrinsisch unstrukturierten Proteinen“ (IUP).^[33] In IUPs wird die Bildung von Sekundärstrukturelementen und hydrophoben Kernbereichen durch die Aminosäurezusammensetzung verhindert.^[35,36] Unstrukturierte Bereiche sind ein gemeinsames Motiv vieler Transkriptionsfaktoren.^[37] Es wurde gezeigt, dass die Wechselwirkung zwischen Transkriptionsfaktor und Zielprotein in einem kleinen Aminosäurebereich der unstrukturierten Region Konformationsänderungen hervorruft, die zu einer erhöhten Bindung und einer breiten Spezifität für Zielmoleküle führen.^[38] Dieses Konzept scheint auch für die eingebaute Transkriptionsfaktordomäne von p53 zuzutreffen, und es wurde gefolgert, dass in p53 strukturierte und unstrukturierte Teile synergistisch zusammenarbeiten.^[33] Des Weiteren wurde angenommen, dass (abhängig von den Partnerproteinen) mehrere unterschiedliche kurze Aminosäureabschnitte lokale Substrukturen bilden können, wenn sie mit Partnerproteinen wechselwirken, und auf diese Weise eine Vielzahl unterschiedlicher Bindemotive erzeugen. Kürzlich wurde der nativ unstrukturierte Teil von p53 für neuartige Biosensoren genutzt. Die Insertion von Zufallspeptiden erzeugte Varianten, die durch neue Effektoren spezifisch um das Hundertfache aktiviert wurden. Dies lässt darauf schließen, dass das molekulare Erkennungsmuster von IUPs relativ leicht manipuliert und in molekularen Biosensoren genutzt werden kann.^[39]

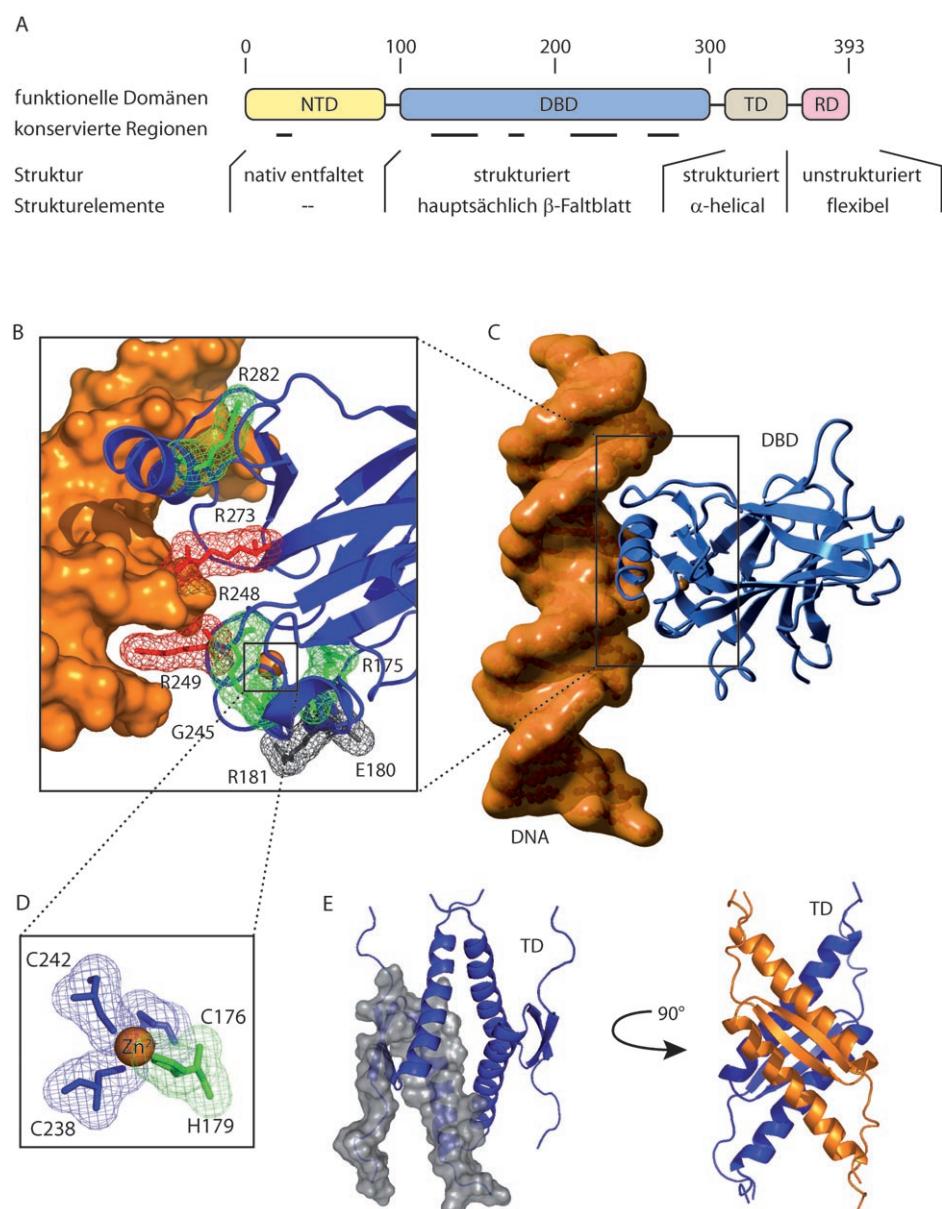


Abbildung 2. A) Die Organisation der p53-Domänen: Die aminotermrale Transaktivierungsdomäne (NTD) ist nativ entfaltet und wechselt mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie; sie enthält auch die Mdm2-Bindestelle. In der zentralen DNA-Bindedomäne (DBD oder Core-Domäne) findet man 95.1% aller Krebs-assoziierten Mutationen. Die carboxyterminale Region von p53 enthält eine Tetramerisierungsdomäne (TD) und eine Regulationsdomäne (RD). B) Hot-Spot-Mutationen in der DBD. DNA-Kontakt-Mutanten sind in Rot dargestellt, strukturelle Mutationen in Grün. Die Aminosäuren, die für die kooperative Bindung an DNA verantwortlich sind, werden in Grau gezeigt. Durch die Gitterdarstellung wird die räumliche Anordnung verdeutlicht. PDB-Code: 1TSR. C) Die Kristallstruktur der DBD. Die DNA-bindende Domäne von p53 (blau) ist an die Kon sensus-DNA-Sequenz (orange) gebunden. PDB-Code: 1TSR. D) Koordination des Zink-Atoms. Das wichtige Zn²⁺-Ion (orange) ist zwischen einem Histidinrest (grün) und drei Cysteinresten (blau) gebunden. E) Die Tetramerisierungsdomäne von p53. Vier TDs bilden ein Dimer von Dimeren (orange/blau). PDB-Code: 1OLG.

2.1.2. Die DNA-Bindedomäne (DBD)

Die zentrale „Kernregion“ von p53, die sequenzspezifische DNA-Bindedomäne (DBD; Aminosäuren 102–292), ist von entscheidender Bedeutung für die DNA-Bindung des gesamten Proteins. Über 90% aller tumorigen Mutationen finden sich in diesem Teil des Proteins (siehe Box 2). Die DBD ist äußerst resistent gegen proteolytischen Verdau und

eine der stabilsten Regionen in p53.^[40,41] Eine ausführlichere Betrachtung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Domäne wird in Abschnitt 3 gegeben.

2.1.3. Die Tetramerisierungsdomäne (TD)

Die Quartärstruktur von p53 wird durch eine definierte Tetramerisierungsdomäne vermittelt.^[42,43] Der tetramere Zustand ist für die DNA-Bindung und für die Affinität von p53 für spezifische Konsensus-DNA von Bedeutung.^[44] Die isolierte Tetramerisierungsdomäne ist, verglichen mit dem Rest des Proteins, bemerkenswert stabil (siehe Abschnitt 2.2).^[45–47]

Die Analyse der NMR- und Kristallstrukturen der isolierten Tetramerisierungsdomäne (Abbildung 2E) zeigt, dass sich das Tetramer aus einem Dimer von Dimeren zusammensetzt.^[48–50] Die isolierte TD von p53 dimerisiert über einen Übergangszustand, in dem die primären Dimere vollständig gefaltet sind, die Wechselwirkung zwischen den Dimeren aber nur partiell ausgebildet ist.^[47]

Es scheint ein Gleichgewicht zwischen Dimeren und Tetrameren in Lösung zu geben, wobei die Gegenwart von spezifischer p53-DNA-Bindesequenz die Tetramerisierung von p53 sehr stark begünstigt.^[51] Umgekehrt ist die Fähigkeit der DBD, bei DNA-Bindung Dimere zu bilden, wichtig für die Funktion von p53 (siehe Abschnitt 3). Eine künstliche Variante von p53 mit speziellen Punktmutationen in der TD bildet keine Tetramere mehr. Stattdessen kommt diese Mutante als Dimer vor, das etwa die Hälfte der DNA-Bindeaktivität des Wildtypproteins aufweist.^[52] Der Kooperativität bei der DNA-Bindung der DBD (siehe Abschnitt 3) folgt also eine zweite Kooperativität bei der Bildung tetramerer Komplexe durch die TD.

2.1.4. Die regulatorische Domäne (RD)

Die carboxyterminale regulatorische Domäne (RD) ist mit der Tetramerisierungsdomäne über eine basische Linker-Region verbunden. Dieser Linker enthält die Kernlokalisierungssequenz von p53.^[53] Aufgabe der RD ist, wie schon der Name impliziert, die Regulierung des Proteins.^[54] Diese kurze Domäne scheint einen negativen Einfluss auf die spezifische DNA-Bindung des Gesamtproteins zu haben; allerdings konnte durch NMR-Titrationsexperimente keine direkte Bindung zwischen der carboxyterminalen Region und der DBD nachgewiesen werden.^[55] So ist der Effekt der RD auf die sequenzspezifische DNA-Bindungsfähigkeit von p53 immer noch rätselhaft.

Zusätzlich kann die carboxyterminale Regulationsdomäne auch selbst unspezifisch an DNA binden. Posttranskriptionale Modifizierung wie Phosphorylierung und Acetylierung in dieser Domäne stabilisieren und aktivieren p53.^[56,57] Ähnliche Effekte erzielte man durch die Bindung von anderen Proteinen wie spezifischen Antikörpern oder durch die Bindung von unspezifischer cDNA an die RD.^[58,59] Man glaubt, dass diese Wechselwirkungen oder Modifizierungen Konformationsänderungen bewirken, die die sequenzspezifische Bindung an Konsensus-DNA beeinflussen.^[60,61] Dieser Aspekt wird in Abschnitt 4.2 genauer erörtert.

2.2. Die Stabilität von p53

p53 hat eine sehr hohe Umsatzrate (die Halbwertszeit beträgt weniger als 20 min), weshalb es in der Zelle nur geringe Mengen an aktivem Protein gibt (siehe Abschnitt 4.3.1).^[62] Mehrere Mechanismen kontrollieren den Spiegel an p53 und halten ihn aufrecht. Speziell die Wechselwirkungen mit Kinasen (siehe Abschnitt 4.1), Chaperonen (siehe Abschnitt 5) und dem Antagonisten Mdm2 (siehe Abschnitt 4.3) sind von Bedeutung. Außer der Wechselwirkung mit regulatorischen Proteinen sind auch die intrinsischen Struktureigenschaften von p53 entscheidend für die Stabilität und Aktivität des Proteins.^[32,33] Isoliertes, tetrameres p53 ist ein fragiles Protein, das sehr empfindlich gegen thermische Denaturierung ist. In vitro entfaltet sich das Protein spontan bereits bei physiologischen Temperaturen,^[63,64] und es aggregiert schnell bei Temperaturen über 40 °C.^[65]

Der Verlust an Tertiär- und Sekundärstruktur wird von dem Verlust an DNA-Bindeaktivität begleitet.^[63,65,66] Überraschenderweise unterscheiden sich die Stabilitäten der einzelnen Domänen stark von der des gesamten Proteins. Sowohl die isolierte DBD als auch die TD sind stabiler als das Volllängenprotein.^[32] Wie kürzlich gezeigt wurde, kann die NTD von p53 als ein intrinsisch unstrukturiertes Protein klassifiziert werden.^[33] Dementsprechend hat diese Domäne nur geringen Einfluss auf die Stabilität des Gesamtproteins.^[32] Bis heute gibt es nur wenige Informationen über die Struktureigenschaften der RD (siehe Abschnitt 2.1.4). Diese Domäne scheint, sofern sie nicht modifiziert ist, weitgehend unstrukturiert zu sein. Phosphorylierung und/oder Mutationen in diesem Bereich erhöhen die Stabilität des Volllängenproteins.^[67–69] Als Antwort auf DNA-Schäden erhöht z.B. Phosphorylierung von Serin 392 die Stabilität des Proteins und aktiviert p53 (siehe Abschnitt 4.1).

Somit ist offensichtlich, dass in p53 unstrukturierte und strukturierte Teile synergistisch zusammenwirken und so die Aktivität des gesamten Proteins beeinflussen. Da das isolierte unmodifizierte Protein nicht in der Lage ist, seine strukturelle Integrität bei physiologischen Temperaturen aufrecht zu erhalten,^[32,65] stellt sich die Frage, wie p53 in vivo aktiv sein kann. Es ist wahrscheinlich, dass Wechselwirkungen mit anderen Proteinen wesentlich für das Überleben von p53 sind. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich gezeigt, dass das Chaperon Hsp90 (siehe Abschnitt 5.3) von großer Bedeutung für die Stabilität und Integrität von p53 in vitro^[65,66,70] und in vivo^[66,71,72] ist. Die aktuelle Sichtweise ist, dass p53 sich als extrem labiles Protein entwickelt hat, damit seine Aktivität und Menge in der Zelle streng reguliert werden können.

3. DNA-Bindung von p53

Ein grundsätzliches Verständnis der DNA-Bindeeigenschaften von p53 lässt sich aus der Kristallstruktur DNA gebundener DBD und durch NMR-spektroskopische Studien der DNA-Wechselwirkung (Abbildung 2C) gewinnen. Allerdings bindet in der Kristallstruktur nur eine der drei DBDs in der asymmetrischen Einheit an DNA,^[96] während für die

Funktion von p53 die Dimerisierung und Tetramerisierung benötigt wird. Die DBD besteht aus einem viersträngigen und einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt und einem Schleife-Faltblatt-Helix-Motiv, das eine Schleife (Reste 113–123), ein dreisträngiges Faltblatt und eine α -Helix (Reste 278–286) umfasst. Eine zweite Schleife (Reste 164–194), die von einer kurzen Helix unterbrochen wird, sowie eine dritte Schleife (Reste 237–250) werden durch ein Zinkion stabilisiert,^[96,97] das durch drei Cysteinreste und einen Histidinrest koordiniert ist (Abbildung 2D).

Mehr als 500 DNA-Bindeloci wurden bisher für p53 zuverlässig identifiziert.^[98] p53 bindet spezifisch an eine palindrome, doppelsträngige DNA-Promotor-Konsensus-Sequenz, die durch bis zu 13 Basenpaare von einer zweiten Kopie getrennt sein kann (Abbildung 3). Ein stabiler p53-DNA-Komplex enthält ein Tetramer p53, das an ein vollständiges Erkennungselement bindet. Die Bindung von p53 verursacht eine Biegung und Drehung der gebundenen DNA.^[99,100] Es wurde gezeigt, dass die C_2 -Symmetrie der spezifischen DNA-Bindung des Dimers und die D_2 -Symmetrie der TD ohne Bruch der Symmetrie nur durch die Bindung des Tetramers an zwei Stränge in gegensätzlicher Richtung erklärt werden kann.^[55] Da das Erkennungselement in der DNA paläomatisch vorliegt, scheint die Bindung nicht konsekutiv entlang der Sequenz (wie meist angenommen), sondern eher an zwei entgegengesetzte Stränge eines einzelnen DNA-Moleküls, das seine Richtung geändert hat, zu erfolgen. Interessanterweise bindet p53 mit höherer Affinität an die Erkennungselemente von Genen, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, als an Gene, die an der Apoptose beteiligt sind. Dies lässt vermuten, dass die Regulation der Transkriptionsaktivität auf Basis der Erkennungselemente der p53-Zielgene erfolgt.^[101] Eine kürzlich veröffentlichte NMR-spektroskopische und Mutationsstudie des gesamten p53-Proteins lässt darauf schließen, dass es eine bislang uncharakterisierte Wechselwirkung zwischen den DBDs im tetrameren Komplex gibt.^[102] Es wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem das ligandenfreie Tetramer eine offene Bindestelle aufweist als die DNA-gebundene Form, da die Bindung von DNA eine Drehung um 70° notwendig macht, um die bekannte Protein-Protein-Kontaktfläche zu bilden. Gegenwärtig gibt es jedoch keine Kristallstruktur von tetramerem, an DNA gebundenem Vollängen-p53 – möglicherweise wegen der großen Flexibilität des Proteins.

In Lösung ist die DNA-Bindung der DBD hoch kooperativ,^[55,99,103–105] sogar wenn ein Überschuss an DNA vorhanden ist.^[106] Mehrere Berichte diskutieren Interdomänenkontakte in p53.^[96,107–111] Die Wechselwirkungen, die in den Kristallstrukturen der p53-DBD beobachtet wurden, sind

Box 1: p53-Familienmitglieder: p63, p73

20 Jahre nach der Entdeckung des p53-Tumorsuppressorgens haben Kaghad und Mitarbeiter von der Existenz eines weiteren Familienmitglieds im Menschen, genannt p73, berichtet,^[73] und ein Jahr später wurde mit p63 ein weiteres Homologes identifiziert.^[74] Alle Mitglieder der p53-Familie haben die gleiche modulare Architektur mit einer aminalterminalen Transaktivierungsdomäne, einer DNA-Bindedomäne, gefolgt von einer Tetramerisierungsdomäne und einer regulatorischen carboxyterminalen Domäne.^[75,76]

Während p53 nur einen einzigen Promotor aufweist, haben p63 und p73 je zwei Promotoren, woraus verschiedene Isoformen und Spleißvarianten resultieren.^[77,78] Mehrere Isoformen von p63 und p73 haben eine konservierte carboxyterminale Domäne von mehr als 100 Resten, die es in p53 nicht gibt. Einige dieser Isoformen enthalten so genannte SAM-Domänen in dieser Region.^[79–81] „Sterile alpha motif“(SAM)-Domänen sind dafür bekannt, mit anderen SAM-Domänen Oligomere zu bilden. Daher können durch SAM-Wechselwirkungen große Protein-Komplexe in Zellen gebildet werden. Darüber hinaus kann die SAM-Domäne von p73 an Lipidmembranen binden.^[82]

Ein anderer bemerkenswerter Unterschied zwischen p53 und seinen Homologen betrifft ihren Abbau, der durch Mdm2 induziert wird (siehe Abschnitt 4.3). Im Unterschied zu dem kurzebigen p53-Protein, das durch Mdm2-vermittelte Ubiquitinierung und Abbau durch das Proteasom reguliert wird, führt die Wechselwirkung zwischen p73 mit Mdm2 zur Inaktivierung und zur Apoptose, aber nicht zum Abbau von p73 durch das Proteasom.^[83,84] Überraschenderweise bindet Mdm2 nicht an p63.^[85]

p63 und p73 funktionieren bei der Aktivierung der Transkription wie p53. NMR-Untersuchungen der DBD von p63 ergaben eine Faltung ähnlich der von p53 in dieser Region.^[86] Wegen der strukturellen Ähnlichkeit wurde erwartet, dass die Funktionen von p63 und p73 hinsichtlich der Unterdrückung von Tumoren, Induktion der Apoptose und Kontrolle des Zellzyklus auch vergleichbar zu jener von p53 sind.^[87,88] Anders als p53-k.o.-Mäuse entwickeln p63- und p73-k.o.-Mäuse keine spontanen Tumoren.^[89] p53 benötigt allerdings bei der Antwort auf verschiedene Stressoren (Wirkstoffe, γ -Bestrahlung) p73 genauso wie p63, um die Apoptose einzuleiten.^[90] Homologe von p53 wurden in allen bislang untersuchten vielzelligen Organismen gefunden, einschließlich *C. elegans* und *D. melanogaster*.^[91–95] Dies beweist, dass eine effiziente Tumorsuppression in allen vielzelligen Organismen essenziell ist.

p53-Konsensus-Sequenz

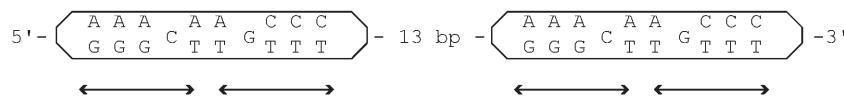


Abbildung 3. Die DNA-Konsensus-Sequenz von p53. p53 bindet spezifisch an zwei Kopien einer doppelsträngigen DNA-Promotor-Konsensus-Sequenz, die bis zu 13 Basenpaare von einander entfernt sein können.

höchstwahrscheinlich Packungsartefakte, die mit der kooperativen DNA-Bindung, wie sie im nativen p53-DNA-Komplex vorkommt, nicht vereinbar sind.^[112] Mit NMR-Experimenten wurde eine Dimerisierungsstelle in der DBD in Gegenwart von DNA ausgemacht.^[55,106] Es war schon früher gezeigt worden, dass die DBD des homologen p63 (siehe Box 1) nicht kooperativ an die Konsensus-DNA bindet,^[105] obwohl p53 und p63 eine ähnliche Tetramerisierungsdomäne enthalten (siehe Abschnitt 2.1.3).^[48–50] Tetramere bilden und spezifisch an DNA binden.^[113]

In p53 wird die Dimerisierung durch eine doppelte Salzbrücke innerhalb der DBD stabilisiert (Abbildung 4).^[108] In der p63- und p73-DBD gibt es diese nicht, und es fehlt die beschriebene Kooperativität bei der DNA-Bindung. Diese Dimerisierung ist unabhängig von der Tetramerisierung von Vollängen-p53.^[103] Einer Mutationsanalyse der Dimerkontakte zufolge sind die Reste E180 und R181 von p53

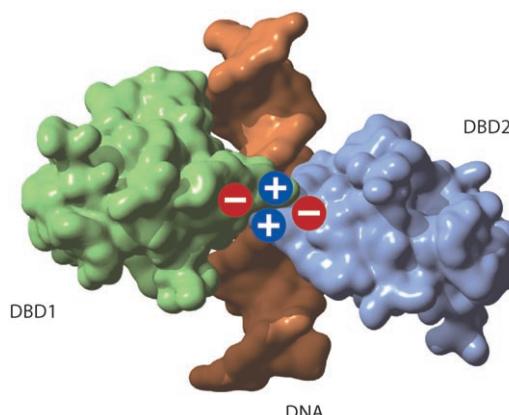


Abbildung 4. Die Berührungsfläche („Interphase“) der Protein-Dimerisierung. Modell des für die kooperative Bindung wichtigen Teils, der durch eine doppelte intermolekulare Salzbrücke zwischen E180 (–) und R181 (+) stabilisiert wird. Die Abbildung ist angelehnt an die Struktur mit dem PDB-Code 1TSR (nach Klein et al.).^[55]

für die Kooperativität verantwortlich.^[108] Im homologen p63 ist die in p53 hochkonservierte Aminosäure R181 durch einen Leucinrest ersetzt, was wahrscheinlich der Grund für das beobachtete Ausbleiben von selektiver und kooperativer DNA-Bindung der isolierten p63-DBD ist.^[55] Diese Befunde stützen die Idee, dass die zusätzliche Dimerisierungskontaktfläche der DBD hauptsächlich aus zwei intermolekularen E180-R181-Salzbrücken zwischen den beiden Monomeren besteht (Abbildung 4), in Übereinstimmung mit einem C_2 -symmetrischen Modellkomplex, wie von Lebrun et al.^[111] und Klein et al.^[55,108] vorgeschlagen.

Kürzlich wurde die Kristallstruktur des an DNA gebundenen DBD-Dimers publiziert.^[114] Die mögliche Rolle der identifizierten Dimerkontakteflächen für die Funktion von p53 wird auch durch die natürlich vorkommenden E180K-^[115,116] und R181X-Mutationen^[117] unterstrichen, die mit dem Li-Fraumeni-Syndrom, einer seltenen, autosomal dominanten Erbkrankheit, die zu frühzeitiger Krebserkrankung führt, assoziiert sind.^[116,118] Diese Art von onkogenen Mutationen kann nicht den bislang identifizierten großen Klassen von p53-Mutanten zugeordnet werden (siehe Abschnitt 3).^[97] Sie stellt eine neue Klasse von p53-Mutationen dar, bei der die p53-Aktivität wegen einer reduzierten Kooperativität der DNA-Bindung unterdrückt wird.^[108] Es ist interessant, dass dieselbe Bindestelle der DBD, die für die Bindung an DNA verantwortlich ist, auch für die Bindung an Bcl2 im mitochondrialen Apoptoseweg (siehe Abschnitt 6.3) genutzt wird.^[119]

Die meisten an Krebs beteiligten p53-Mutationen und nahezu alle Hot-Spot-Mutationen (siehe Box 2) finden sich in der DBD.^[120–122] Dies belegt die Bedeutung von korrekter DNA-Erkennung und -Bindung für die transkriptionale Aktivierung von Zielgenen.^[7,123] Die Hot-Spot-Aminosäuren R273 und R248 kontaktieren direkt die große und die kleine Furche gebundener DNA (Abbildung 2B), und die verbleibenden vier Hot-Spot-Mutationen sind an der Stabilisierung der umgebenden Struktur über ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken beteiligt. Es gibt also drei Klassen von Mutationen, die die Bindung an DNA verhindern: 1) Mutationen,

die an direkten DNA-Kontakten beteiligt sind, 2) Mutationen, die die strukturelle Integrität der DNA-Binderegion destabilisieren und/oder die globale Entfaltung der DBD verursachen – beide resultieren im Verlust der DNA-Bindeaffinität^[97] – und 3) Mutationen in der Helixregion, die die kooperative Bindung verhindern.^[108]

Kürzlich wurde vorgeschlagen, dass einige p53-Mutanten, z.B. R175H, nicht nur ihre ursprüngliche Fähigkeit der sequenzspezifischen DNA-Bindung verlieren, sondern auch die Fähigkeit erlangen, andere Gene als das Wildtypprotein zu induzieren oder zu reprimieren.^[124] Die molekulare Basis für die transkriptionale Modulation durch mutiertes p53 ist nicht vollständig verstanden, aber es mehren sich die Hinweise sowohl *in vivo*^[125] als auch *in vitro*,^[126] dass spezifische Wechselwirkungen von mutiertem p53 mit DNA eine wichtige Rolle spielen. Zudem wurde gefunden, dass mutiertes p53 Nicht-B-DNA auf eine strukturselektive Weise bindet. Diese Bindung scheint die Basis für die selektive Transkriptionsaktivität zu sein.^[126]

Während die Spezifität der DBD für Promotoren von p53-Zielgenen belegt ist, bindet die RD mit hoher Affinität an eine große Vielzahl von DNA-Strukturen, einschließlich kurzer Einzelstränge und bestrahlter DNA.^[127,128] Diese Eigenschaft der RD wird im Abschnitt 4.2 näher ausgeführt.

4. Regulierung von p53

4.1. Posttranskriptionale Modifikationen

Wegen seiner möglichen Toxizität für nicht-tumorigene Zellen wird die Aktivität von p53 unter physiologischen Bedingungen streng kontrolliert. Erst auf zelluläre Stresssignale hin wird p53 aktiviert und akkumuliert in seiner aktiven Form. Die Regulierung und Aktivierung von p53 erfolgt mittels verschiedener Partnerproteine und mehrerer posttranskriptionaler Mechanismen.^[132–134]

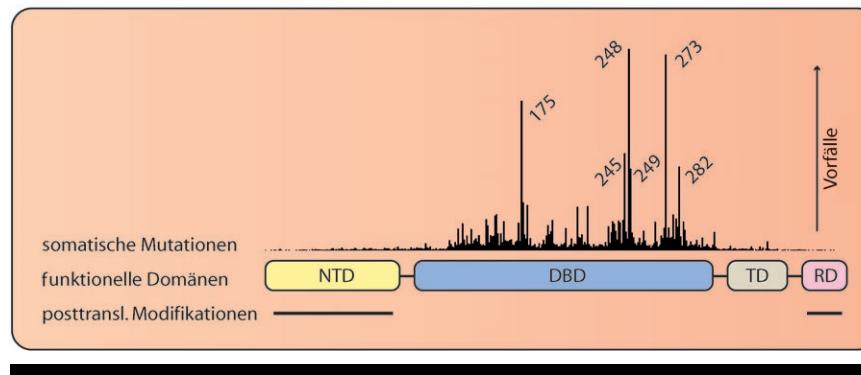
4.1.1. Phosphorylierung

p53 enthält 17 Serin- und Threoninreste als mögliche Phosphorylierungsstellen. Diese befinden sich in der amino-terminalen Domäne, der carboxyterminalen Domäne und der DBD. Dabei scheint keiner der Tyrosinreste phosphoryliert zu werden.^[133,135] Die wichtigsten Signaltransduktionswege werden durch die ATM- und ATR-Kinasen vermittelt. Die ATM-Kinase (ATM = Ataxia-telangiectasia-mutiertes Genprodukt), die durch DNA-Schäden und ionisierende Strahlung induziert wird, aktiviert die nachfolgende Kinase Chk2.^[136] ATM selbst phosphoryliert p53 an Serin 15, während Chk2 Serin 20 phosphoryliert. Beide Modifizierungen sind nicht nur notwendig, um den Umsatz von p53 herabzusetzen, sie erhöhen auch seine Affinität für spezifische Promotorsequenzen.^[137] ATR (ATM- und Rad3-verwandte Proteinkinase) phosphoryliert p53, zusammen mit der nachgeschalteten Kinase Chk1, an verschiedenen Stellen als Antwort auf UV-induzierte Schäden.^[138]

Generell wird die Phosphorylierung von p53 in der amino- und der carboxyterminalen Domäne als Folge von zellulärem

Box 2: Mutationen in p53

Intaktes p53 ist von zentraler Bedeutung für die Einleitung von Antworten auf zellulären Stress in vielzelligen Organismen, weshalb Mutationen in p53 oft schädlich für die Zelle sind. Wenn eine bestimmte p53-Mutation die Aktivität von p53 aus dem Gleichgewicht bringt, kann die Zelle nicht mehr auf zellulären Stress reagieren, und die Tumorbildung wird gefördert. Heute sind mehr als 20000 verschiedene Mutationen von p53 bekannt.^[116] Die meisten dieser Mutationen (> 95%) sind in der DBD von p53 lokalisiert. Von speziellem Interesse sind die am häufigsten vorkommenden Hot-Spot-Mutationen R175, G245, R248, R249, R273 und R282 (siehe Abschnitt 3), die ungefähr ein Viertel aller analysierten p53-Mutationen ausmachen. Der Datensatz^[116] enthält somatische Mutationen, die durch Sequenzierung identifiziert wurden. Dies umfasst sowohl Mutationen in menschlichen Tumorproben als auch in menschlichen Zelllinien. Zusätzlich zu den somatischen Mutationen findet man im Li-Fraumeni-Syndrom, einer seltenen Krankheit, bei der die Hälfte der Betroffenen vor dem dreißigsten Lebensjahr Krebs bekommen wird, vererbliche Mutationen.^[116, 118]

**Box 3: „Mutante p53“**

Der Ausdruck „mutante p53“ verweist oft auf die funktionelle Konformation des Proteins. Mutante p53 kann nicht an seine Konsensus-DNA binden und ist deshalb inaktiv. Ursprünglich wurde der Begriff geprägt, weil Antikörper gefunden wurden, die zwischen der aktiven und der „mutanten“ Konformation, unabhängig von der Primärstruktur von p53, unterscheiden konnten.^[129] Später stellte sich heraus, dass die meisten Punktmutationen zur thermodynamischen Destabilisierung der DBD führen. Abgesehen von den DNA-Kontaktmutanten, die sich direkt auf die DNA-Bindung auswirken, verändern die meisten anderen Mutationen die allgemeine Konformation der DBD^[130] und inaktivieren dadurch das gesamte Protein. Von einigen dieser inaktiven p53-Mutanten nimmt man an, dass sie unter bestimmten Bedingungen zumindest einen Teil der Aktivität wiedererlangen können, wobei sie eine nativähnliche aktive Konformation einnehmen.^[131] Der Wechsel zwischen einer aktiven Wildtypkonformation und einer inaktiven mutante Konformation kann durch bestimmte Moleküle (siehe Abschnitt 7.1), Temperatur und Chaperone (siehe Abschnitt 5) reguliert werden.

Stress induziert, z. B. bei DNA-Schäden oder der Aktivierung von Onkogenen. Sie führt oft zur Stabilisierung (thermodynamische Stabilisierung von p53 und verringerte Abbaurate) und der Aktivierung von p53.^[133, 135] Es gibt jedoch auch Berichte, dass die Phosphorylierung von p53 nicht für dessen Aktivierung erforderlich ist.^[139, 140]

4.1.2. Acetylierung

Diese Modifizierung stellt einen weiteren wichtigen Mechanismus für die Regulierung und Aktivierung von p53 dar und betrifft verschiedene Lysinreste in der carboxyterminalen Domäne.^[133, 141–143] DNA-Schäden und Phosphorylierung können eine Kaskade von Acetylierungsereignissen induzieren, wodurch Histon-Acetyl-Transferasen die Transkripti-

onsaktivität von p53 regulieren.^[144, 145] Die Desacytylierung von p53 wird durch Histon-Desacetylases vermittelt.^[146–148]

4.1.3. Ubiquitinierung

Die Halbwertszeit von p53 wird durch Ubiquitinmodifizierung von p53 an Lysinresten der carboxyterminalen Region und nachfolgenden Abbau über den Proteasomweg reguliert.^[149] Die Hauptkomponente für die Ubiquitinierung von p53 ist sein Antagonist Mdm2, der zugleich E3-Ligase und Onkoprotein ist.^[150] Diese Wechselwirkung resultiert in einer negativen Rückkopplungsschleife zwischen p53 und Mdm2 (siehe Abschnitt 4.3).^[151–153] Es wurde vorgeschlagen, dass niedrige Konzentrationen an Mdm2 Monoubiquitinierung induzieren und Kernexport von p53 bewirken, wogegen hohe Konzentrationen an Mdm2 die Polyubiquitierung von p53 und dessen Abbau im Kern fördern (siehe Abschnitt 4.3).^[154] Ubiquitiertes p53 kann direkt durch die Herpesvirus-assoziierte Ubiquitin-spezifische Protease desubiquitiniert werden.^[155, 156] Kürzlich wurden zusätzliche p53-spezifische Ubiquitinligasen identifiziert.^[157–160] Dies legt nahe, dass die Regulation des Abbaus von p53 weitaus komplizierter als bisher angenommen ist.

4.1.4. Sumoylierung

Außer durch Ubiquitinierung kann p53 auch durch die Modifizierung von Lysinresten in der carboxyterminalen Domäne mit dem „small ubiquitin-related modifier 1“ (SUMO1)^[161–163] und durch NEDD8 reguliert werden.^[164, 165]

Die Modifizierungen, die bisher diskutiert wurden, scheinen allerdings noch nicht das vollständige Bild wiedergeben. So wurden mehrere neue Modifizierungen, wie Glycosylierung^[166] und ADP-Ribosylierung^[167] gefunden. Es sind jedoch noch weitere Analysen notwendig, um ihre Bedeutung für die Regulierung von p53 aufzuklären.

4.2. Funktionen der regulatorischen Domäne

Erste Untersuchungen ergaben, dass die basische, 30 Aminosäuren lange Region am carboxyterminalen Ende von p53 einen starken regulierenden Einfluss auf die Fähigkeit der DBD hat, spezifisch an ihre Konsensus-DNA zu binden.^[42] Es gibt mehrere Möglichkeiten, den negativen

Effekt der RD auf die DNA-Bindung aufzuheben: Die Bindung eines monoklonalen Antikörpers (PAb421) an diese carboxyterminalen Reste, Phosphorylierung von Serinresten (S392) oder die Deletion der gesamten Region bewirken eine Stimulierung der DNA-Bindungsaktivität der DBD.^[42, 56] Acetylierung von verschiedenen Resten in der carboxyterminalen Region führt zu einer stark erhöhten spezifischen DNA-Bindung der DBD in vitro^[68, 145] und in vivo.^[168, 169] Zusätzlich wurde vor kurzem gezeigt, dass die Acetylierung spezifischer Reste in der carboxyterminalen Domäne die unspezifische DNA-Bindung um den Faktor 2–3 abschwächt. Phosphorylierung von Serin 392 beeinflusste die unspezifische DNA-Bindung von p53 hingegen nicht.

Der genaue Mechanismus der Aktivierung von latenter p53 durch posttranskriptionale Modifizierung wird noch kontrovers diskutiert: Nach dem allosterischen Modell von Hupp et al. beeinflusst die carboxyterminale Region die p53-Konformation so, dass sich das aktive tetramere p53 bildet.^[56] Im Sinne einer negativen Regulierung wurde vorgeschlagen, dass die RD die DBD in einer inaktiven/latenten Konformation hält, bis aktivierende Modifizierungen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Bindung eines monoklonalen Antikörpers oder die komplette Entfernung der carboxyterminalen Domäne zu einem Aufbrechen der Wechselwirkung zwischen diesen beiden Domänen führen und es der DBD ermöglichen, eine aktive Konformation einzunehmen. Eine Neuinterpretation der experimentellen Daten hat nun ein zweites Modell etabliert, in dem unspezifische DNA-Bindung mit der spezifischen DNA-Bindung der DBD konkurriert.^[58,60]

4.3. Der Antagonist Mdm2

Das zelluläre Onkoprotein Mdm2 (mouse double minute 2; beim Menschen auch Hdm2 genannt)^[5] wirkt als Hauptregulator des p53-Tumorsuppressorproteins.^[5,7,170] Mdm2 wird in menschlichen Tumoren und Tumorzelllinien hochreguliert.^[171] Es wurde ursprünglich als ein Onkoprotein identifiziert, das an p53 bindet und p53-vermittelte Transaktivierung inhibiert.^[172] Die Multidomänenstruktur von Mdm2 (Abbildung 5A) ermöglicht die weitere Regulierung durch eine Reihe von Effektorproteinen, die an verschiedene Teile von Mdm2 binden.

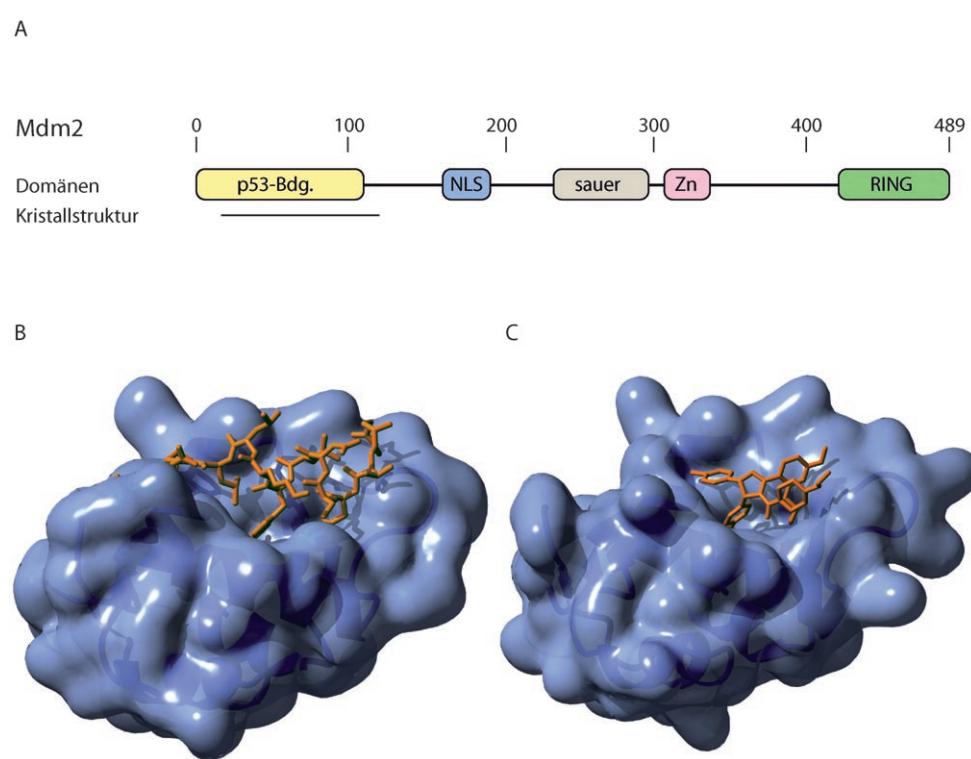


Abbildung 5. A) Die Domänenstruktur von Mdm2. p53-Bdg.: p53-Bindestelle, NLS: Kernlokalisationsignal, Zn: Zink-Fingerdomäne, RING: Ringfingerdomäne (Zink-bindendes Motiv). B) Kristallstruktur von Mdm2 im Komplex mit einem p53-Peptid. PDB-Code: 1YCR. C) Kristallstruktur von Mdm2 im Komplex mit dem Inhibitor Nutlin. Die Struktur von Mdm2 ist leicht verändert gegenüber derjenigen der Apoform. PDB-Code: 1RV1.

4.3.1. Mdm2 und die p53-Mdm2-Rückkopplungsschleife (negative feedback loop)

Mdm2 blockiert die Aktivierung von p53 auf der einen Seite durch physische Wechselwirkung und auf der anderen Seite dadurch, dass es p53 für den Abbau durch Ubiquitierung mithilfe seiner E3-Ligase-Funktion markiert. Als Konsequenz hat p53 eine kurze Halbwertszeit, und die Konzentration an aktivem p53 wird auf einem niedrigen Niveau gehalten (Abbildung 6). Darüber hinaus wird, da das Mdm2-Gen selbst zwei p53-responsive Elemente in seiner Promotorregion enthält, die Mdm2-Transkription induziert, wenn p53 aktiviert wurde. Diese Kopplung ist die Basis für eine negative regulatorische Rückkopplungsschleife, die die Konzentration von p53 und Mdm2 in Zellen streng reguliert.^[173, 174] In Tumoren, die Mdm2 überexprimieren, ist diese Rückkopplungsschleife fehlreguliert, sodass sogar bei Aktivierung die Menge an p53 nicht länger ausreicht, um die Tumorsuppression auszuüben. Von Antagonisten der p53-Mdm2-Wechselwirkung wird erwartet, dass sie die onkogenen Konsequenzen der Mdm2-Überexpression überwinden und p53 stabilisieren (siehe Abschnitt 7.3).

[*] Der Begriff Mdm2 wird in diesem Aufsatz ungeachtet des Organismus, aus dem das Protein stammt, verwendet.

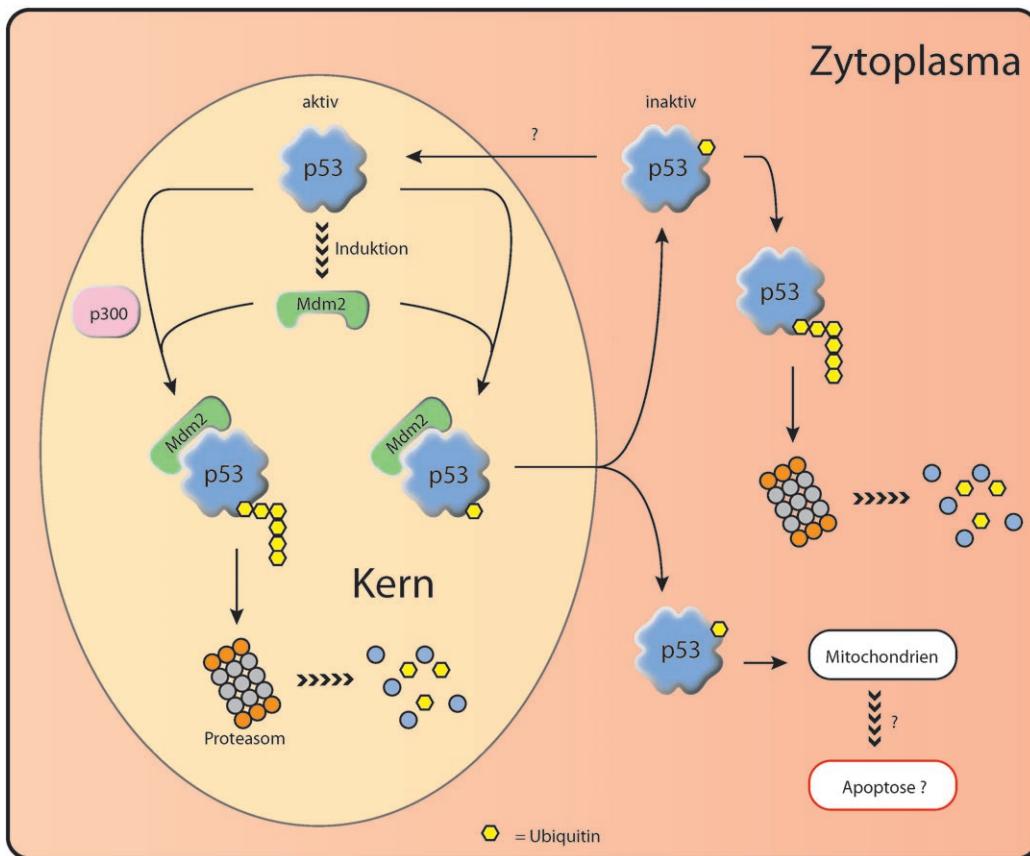


Abbildung 6. Mdm2-p53-Wechselwirkungen. Aktives p53 induziert das Regulatorprotein Mdm2. Einmalige Ubiquitinierung führt zum Export von p53 in das Zytoskop, wogegen mehrfache Ubiquitinierung (die E4-ähnliche Histon-Acetyl-Transferase p300 kann einen einfachen Ubiquitinrest in einen Poly-Ubiquitin-Baum überführen)^[324] das p53 zum Proteasom dirigiert.^[325] Zytoskopisches, einfach ubiquitiertes p53 kann wieder zurück in den Kern transportiert werden, jedoch wird der größte Teil des Proteins im Proteasom abgebaut. Aktuelle Studien zeigen, dass p53 an Mitochondrien die Freisetzung von Cytochrome c induziert, was letztlich zur Apoptose führt.

4.3.2. Die p53-Mdm2-Wechselwirkung

Genetische und biochemische Studien grenzten die p53-Mdm2-Wechselwirkung auf die aminotermrale Domäne von Mdm2 und den aminotermralen Teil der Transaktivierungsdomäne von p53 (Reste 15–29) ein.^[167–169,174–176] Eine Kristallstruktur der aminotermralen Domäne von Mdm2 im Komplex mit kurzen Peptiden, die aus der aminotermralen Domäne von p53 stammen (Abbildung 5B), offenbarte die strukturelle Basis der Wechselwirkung zwischen p53 und Mdm2:^[26] Bei der Bindung an Mdm2 bildet ein Abschnitt aus acht Aminosäuren innerhalb der unstrukturierten NTD von p53^[33,34] eine amphiphile α -Helix, deren hydrophobe Reste in eine tiefe hydrophobe Bindetasche von Mdm2 hineinragen.^[26] Die Bindung von Mdm2 inhibiert die Transkriptionsaktivität von p53, weil die Mdm2-Bindestelle von p53 auch für die Wechselwirkung mit Faktoren der Transkriptionsmaschinerie verantwortlich ist.^[177]

Die p53 bindende Domäne von Mdm2 zeigt bei Ligandenbindung signifikante Veränderungen in ihrer Dynamik.^[178,179] NMR-spektroskopische Studien der p53-Bindedomäne des humanen Mdm2 (Apo-Mdm2) ergaben, dass die Reste 16–24 in Mdm2 einen Verschluss bilden, der sich über die p53-Bindetasche schließt und vermutlich hilft, Apo-

Mdm2 zu stabilisieren.^[180] Posttranskriptionale Modifikationen, z.B. Phosphorylierung am Mdm2-Verschluss, können die p53-Mdm2-Wechselwirkung stören und zur Stabilisierung von p53 führen.^[180] Darüber hinaus könnte der Mdm2-Verschluss helfen zu klären, wie Mdm2 von seinem engen Homologen Mdm4 (MdmX) unterschieden werden kann. Mdm4 bindet p53 und inhibiert dessen transkriptionale Aktivität und wirkt so als ein entscheidender Regulator von p53 *in vivo*.^[180] Anders als Mdm2 verursacht Mdm4 jedoch keinen Kernexport oder Ubiquitinierung und Abbau von p53.^[181–184] Die Sequenzähnlichkeit von Mdm2 und Mdm4 ist am höchsten in der p53-Bindestelle;^[27] nicht konserviert ist hingegen der Mdm2-Verschluss, was vermuten lässt, dass die Veränderungen am Verschluss verantwortlich für die Unterschiede in der Bindung von Mdm2 und Mdm4 an p53 sind.^[180]

Kürzlich wurde die Struktur des humanen Apo-Mdm2 durch NMR-Spektroskopie gelöst.^[185] Der Vergleich der Apo-Mdm2-Struktur mit der von Mdm2 im Komplex mit einem p53-Peptid bestätigte, dass die Bindung des Peptids mit der Verdrängung des flexiblen Verschlusses und einer Veränderung der Sekundärstruktur einhergeht. Darüber hinaus wird humanes Mdm2 rigider und stabiler bei der Bindung von p53.

Überraschenderweise ist die Oberfläche der Bindestelle in der Apoform flach und damit für das Design von niedermolekularen Liganden kaum geeignet. Der Vergleich der Apo-Mdm2-Struktur mit der von Mdm2 im Komplex mit einem p53-Peptid^[26] oder mit nichtpeptidischen kleinen Liganden^[186,187] bestätigte aber, dass die Bindung eines Liganden mit einer erheblichen Veränderung der Sekundärstruktur^[185] einhergeht. Daher sollte man für ein rationales Design neuer Liganden generell die Strukturen des Protein-Ligand-Komplexes als Templat verwenden.

5. Wechselwirkung mit Chaperonen

5.1. Überblick

In den letzten Jahren wurde über eine spezifische Wechselwirkung zwischen p53 und den Chaperonen Hsp 70 und Hsp 90 berichtet. Zusammen mit dem Befund, dass p53 ein bemerkenswert instabiles und konformativ flexibles Protein ist (siehe Abschnitt 2.2), weist dies darauf hin, dass Chaperone (siehe Box 4) ein wichtiges Element für die Regulierung und Aufrechterhaltung des Pools an aktivem p53 sind.

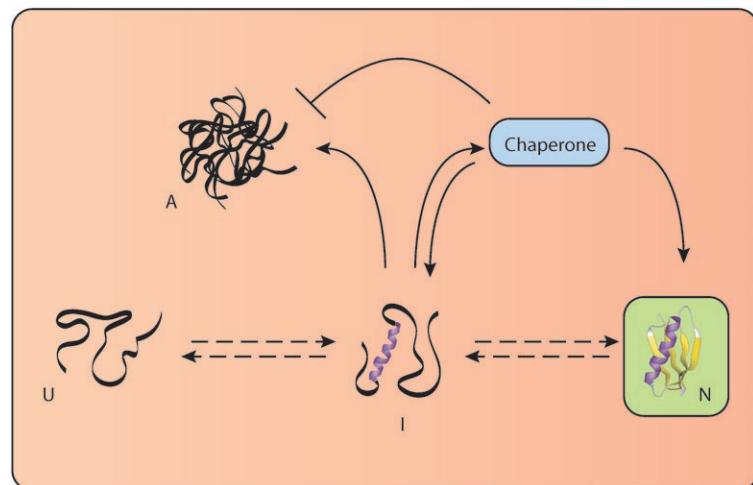
5.2. Hsp40/Hsp70

Die Hsp70-Hitzeschockproteine sind eine Familie von ubiquitär exprimierten Proteinen. Sie sind ein wichtiger Teil der zellulären Maschinerie der Proteininfaltung^[191] und bestehen aus einer Protein bindenden und einer ATPase-Domäne, die einander beeinflussen.^[192] Hsp70 bindet promiskuitiv an eine Vielzahl von neu synthetisierten oder entfalteten Proteinen.^[193–196] Die Bindung erfolgt, ungeachtet der Sekundär- und Tertiärstruktur, durch Erkennung von hydrophoben Sequenzen.^[197] ATP-Bindung und Hydrolyse durch Hsp70 sind wichtig, um die Aktivität für Substratproteine zu regulieren.

Das Chaperon Hsp70 wurde im Komplex mit mutiertem, nicht aber mit Wildtyp-p53 gefunden.^[198] Weitere Komponenten dieses Komplexes sind das Chaperon Hsp90 (siehe Abschnitt 5.3) und das Hsp70-Cochaperon Hsp40.^[199,200] Die Hauptaufgabe von Hsp70 in diesem Zusammenhang scheint die Regulierung der Translokation von p53 in den Kern und aus dem Kern zu sein.^[201] Nur im Komplex mit mutiertem p53 maskiert Hsp70 die Kernlokalisierungssequenz des Tumorsuppressorproteins und inhibiert dadurch dessen Import in den Kern.^[202] Das unmaskierte Wildtyp-p53 dagegen ist immer noch in der Lage, in den Kern zu gelangen und seine Zielgene zu induzieren oder herunterzuregulieren. Darüber hinaus fördert Hsp70 die Akkumulation von zytosolischem p53 in bestimmten Tumorzellen.^[203] Da zytosolisches p53 dadurch nicht mehr für die Proteolyse durch Mdm2 markiert

Box 4: Chaperone

Chaperone unterstützen andere Proteine dabei, ihre native und aktive Konformation zu erreichen und aufrecht zu erhalten.^[188,189] Partiell entfaltete oder fehlgefaltete Proteine sind oft anfällig für eine unspezifische Aggregation. Die Wechselwirkung dieser Proteine mit Chaperonen führt zur Unterdrückung von Aggregation, und die Proteine werden in ihren nativen/aktiven Zustand geleitet. Ein konserviertes Merkmal der Chaperone ist der Wechsel zwischen hochaffinen und niedrigaffinen Zuständen für die Bindung von Proteinen. In vielen Fällen wird dieser Wechsel durch ATP-Bindung und Hydrolyse bewirkt. Fast alle Chaperone zeigen erhöhte Expressionsraten unter nichtphysiologischen Bedingungen, wie hohen Temperaturen oder zellulärem Stress. Deshalb gehören sie zu der Klasse der Hitzeschockproteine (Hsp).^[190] Es gibt mehrere allgemeine Klassen von Chaperonen. Sie haben verwandte Funktionen, zeigen aber wenig Homologie in Sequenz und Struktur. Chaperone erkennen eine große Vielzahl von Proteinen in nichtnativen Zuständen. Dieses promiskuitive Verhalten zusammen mit der Kooperation verschiedener Chaperone gewährleistet die Proteinhomöostase unter Stressbedingungen. Neben den generellen Haushaltfunktionen scheinen Chaperone auch für eine zusätzliche Ebene der Regulation einer Reihe von Signalproteinen verantwortlich zu sein.



Funktionen von Chaperonen. Neu synthetisierte oder ungefaltete Proteine (U) müssen entlang eines bestimmten Weges ihren natürlichen gefalteten Zustand (N) erreichen. Das geschieht oft über spezifische Faltungsintermediate (I). Ohne die Hilfe von Chaperonen würden die partiell gefalteten Proteine meist zur Aggregation (A) führen. Die wesentliche Aufgabe der Chaperone besteht in der Verhinderung der Aggregation, wodurch das Protein seinen Weg zum natürlich gefalteten, aktiven Zustand nehmen kann.

und abgebaut wird, aggregiert es im Zytosol.^[204] Dies hat einen negativen Einfluss auf die zelluläre Kontrolle von DNA-Schäden in diesen Tumorzellen.^[205]

Während Hsp70 für die Translokation und Akkumulation von p53 verantwortlich zu sein scheint, erfolgt die Stabilisierung und Aktivierung von p53 durch ein anderes Chaperon (siehe Abschnitt 5.3).

5.3. Hsp90

Das Chaperon Hsp90 ist verantwortlich für die späte Faltung von fragilen Substratproteinen wie Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren.^[197] Hsp90 ist eines der häufigsten Proteine in Eukaryoten (1–2 % des gesamten zellulären Proteins).^[206,207] Es hat eine niedrige ATPase-Aktivität^[208]

und besteht aus drei funktionellen Domänen.^[197] Verschiedene niedermolekulare, an Hsp90 bindende Substanzen sind als mögliche Tumortherapeutika ausgemacht worden. Diese Substanzen ändern indirekt die Aktivität zahlreicher Kinasen und Transkriptionsfaktoren, von denen bekannt ist, dass sie an der Onkogenese beteiligt sind.^[209]

Vor einigen Jahren wurde Hsp90 im Komplex mit mutiertem p53 in Tumorzellen identifiziert.^[210-213] Hsp90 scheint irreversibel an mutiertes oder auf andere Weise inaktiviertes p53 zu binden, wie mithilfe von In-vitro-Translationsexperimenten und durch Immunpräzipitationen aus humanen Tumorzelllinien gezeigt wurde.^[71] Die Behandlung dieser Zellen mit dem Hsp90-Inhibitor Geldanamycin führt zum Abbau von p53.^[71] Geldanamycin löst Hsp90 vom Mdm2-p53-Komplex, worauf p53 ubiquitiniert und vom Proteasom abgebaut wird. Hsp90 stabilisiert deshalb p53 indirekt. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass Hsp90 auch Wildtyp-p53 in vivo und in vitro stabilisiert.^[65,66] Die Bindung an das Wildtypprotein scheint schwächer als die an das mutante Protein zu sein. In vitro bindet Hsp90 an die native Form von p53 mit mikromolarer Affinität.^[65] Die Wechselwirkung der beiden Proteine findet zwischen der DBD von p53 und der Mitteldomäne von Hsp90 statt.^[65,70] Diese Wechselwirkung erhält die DNA-Bindeaktivität von p53 und verhindert dessen Aggregation (Abbildung 7).^[65,66] Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte man auch in vivo.^[66,72] Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass Hsp90 für die Funktionalität von Wildtyp-p53 unter physiologischen und Hitzeschocktemperaturen benötigt wird.

Seit den frühen neunziger Jahren ist bekannt, dass die Zielgene von p53 den Zellzyklusarrest und DNA-Reparaturmechanismen unterstützen.^[214-216] In einer vereinfachten Sichtweise resultiert die Aktivierung von p53-regulierten Genen durch DNA-Schäden entweder in einem Zellzyklusarrest, der die DNA-Reparatur ermöglicht, oder im apoptotischen Zelltod, wenn die DNA-Schäden so schwerwiegend sind, dass sie nicht mehr repariert werden können.^[170,217] Ein relativ neuer Aspekt ist die Einbeziehung von p53 in replikative Seneszenz (die Tatsache, dass somatische Zellen nur eine begrenzte Zahl von Zellteilungen durchlaufen) und das Altern.^[218] Es gibt zudem Hinweise, dass p53 transkriptionsunabhängige Reaktionen ausführen kann, wie die direkte Induktion von Apoptose (Abbildung 8).^[219] Ungeachtet seiner zentralen Funktion bei der Unterdrückung von Tumoren ist p53 nicht essenziell, und p53-defizierte Mäuse zeigen eine normale embryonale Entwicklung,^[220,221] entwickeln allerdings bereits frühzeitig verschiedene Tumoren. Transgene Mäuse mit erhöhter p53-Aktivität zeigen hingegen Resistenz gegen spontane Tumoren – aber auch ein frühzeitiges Auftreten von Phänotypen, die mit Seneszenz assoziiert sind (siehe Abschnitt 6.2).^[222,223]

6. Funktionen von p53

Seit den frühen neunziger Jahren ist bekannt, dass die Zielgene von p53 den Zellzyklusarrest und DNA-Reparaturmechanismen unterstützen.^[214-216] In einer vereinfachten Sichtweise resultiert die Aktivierung von p53-regulierten Genen durch DNA-Schäden entweder in einem Zellzyklusarrest, der die DNA-Reparatur ermöglicht, oder im apoptotischen Zelltod, wenn die DNA-Schäden so schwerwiegend sind, dass sie nicht mehr repariert werden können.^[170,217] Ein relativ neuer Aspekt ist die Einbeziehung von p53 in replikative Seneszenz (die Tatsache, dass somatische Zellen nur eine begrenzte Zahl von Zellteilungen durchlaufen) und das Altern.^[218] Es gibt zudem Hinweise, dass p53 transkriptionsunabhängige Reaktionen ausführen kann, wie die direkte Induktion von Apoptose (Abbildung 8).^[219] Ungeachtet seiner zentralen Funktion bei der Unterdrückung von Tumoren ist p53 nicht essenziell, und p53-defizierte Mäuse zeigen eine normale embryonale Entwicklung,^[220,221] entwickeln allerdings bereits frühzeitig verschiedene Tumoren. Transgene Mäuse mit erhöhter p53-Aktivität zeigen hingegen Resistenz gegen spontane Tumoren – aber auch ein frühzeitiges Auftreten von Phänotypen, die mit Seneszenz assoziiert sind (siehe Abschnitt 6.2).^[222,223]

6.1. Apoptose

Eine der wichtigsten Funktionen von p53 ist seine Fähigkeit, Apoptose direkt (über die Wechselwirkung der DBD mit BclX)^[224] oder indirekt (über die Transkription von Genen, die an der Apoptose beteiligt sind) einzuleiten. Während der zweite Weg seit langer Zeit bekannt ist,^[170] wurde die direkte Beeinflussung des BclX/Bax-Systems erst kürzlich entdeckt (siehe Abschnitt 6.3). Apoptose wird aktiviert, sobald die Zelle und/oder DNA schwer geschädigt sind und die Reparaturmechanismen der Zelle nicht in der Lage sind, Gegenmaßnahmen einzuleiten. Der programmierte Zelltod verläuft über einen komplizierten Mechanismus, an dem eine Vielzahl von Proteinen beteiligt ist.^[225] Wenn die apoptotischen Funktionen von Zellen inhibiert werden, können sich diese unendlich teilen und Tumoren hervorrufen,

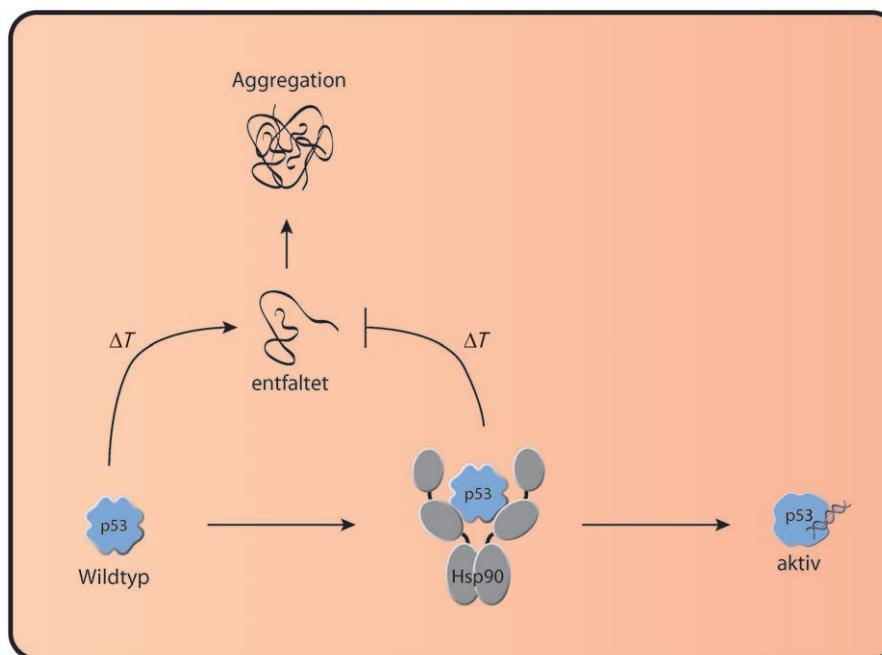


Abbildung 7. Vereinfachtes Bild des Einflusses von Hsp90 auf die Stabilität und Aktivität von p53. Wildtyp-p53 wechselt reversibel mit Hsp90. Bei höheren Temperaturen würde isoliertes p53 de-naturieren und schließlich irreversibel aggregieren. Hsp90 schützt das Protein vor thermischer Entfaltung und verhindert so die Aggregation und Inaktivierung. Anschließend wird p53 durch post-transkriptionale Modifizierung, wie Phosphorylierung, aktiviert und startet seine Transkriptionsaktivität.

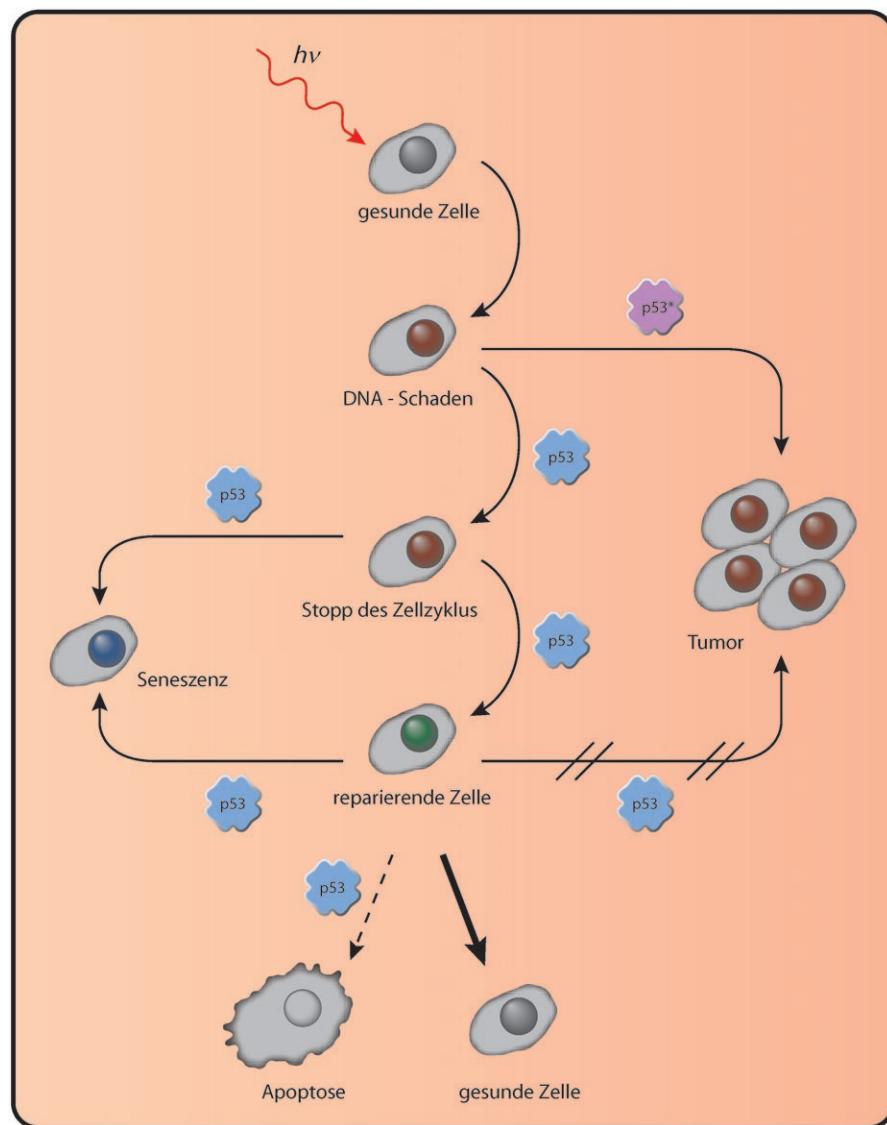


Abbildung 8. p53 und seine Rolle bei DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz. Einfluss von aktivem Wildtyp-p53 (blau) und mutiertem p53 (violett) auf geschädigte eukaryotische Zellen.

oder sie werden in einem seneszenten Zustand verharren, wenn der Zellzyklus auch blockiert ist (siehe Abschnitt 6.2)

6.2. p53-beeinflusste Seneszenz und Altern

Vor einigen Jahren wurde in mehreren unabhängigen Studien beschrieben, dass die Überexpression oder die Hyperaktivität von p53 in Mäusen zu einer ansteigenden Resistenz gegen Tumorwachstum führt.^[222,226] Dies ist in Einklang mit der Rolle von p53 als Tumorsuppressorprotein in vielzelligen Organismen. Überraschenderweise war die Lebensspanne dieser modifizierten Mäuse aber signifikant kürzer als die von normalen, krebsanfälligen Tieren. Darüber hinaus zeigten Mäuse mit erhöhtem p53-Spiegel Anzeichen frühzeitigen Alters.^[227]

Es ist bereits seit vielen Jahren bekannt, dass p53 in der Lage ist, einen transienten Zellzyklusarrest zu induzieren.^[228]

Seitdem mehrten sich die Hinweise dafür, dass p53 auch für einen irreversiblen Zellzyklusarrest verantwortlich ist, der für einen seneszenten Zellphänotyp charakteristisch ist.^[229,230] Demnach scheint p53 für die Entscheidung verantwortlich zu sein, ob Apoptose oder zelluläre Seneszenz eingeleitet wird.^[227]

Zelluläre Seneszenz mag das Auftreten von Krebs während der reproduktiven Jahre des menschlichen Lebens unterdrücken – dafür werden Krebs und Altern gefördert, wenn der Organismus das Ende seines Lebens erreicht.^[218,231]

6.3. Transkriptionsunabhängige Funktionen von p53

Da eine der Hauptfunktionen von p53 die Regulierung der Transkription ist, spielt seine Lokalisierung im Kern eine bedeutende Rolle. Der aktive Transport von p53 zum Kern hin durch Dynein und das Mikrotubulin-Netzwerk wurde beschrieben.^[232–235] Umgekehrt enthält das p53-Protein zwei Kernexportsequenzen, eine in der carboxyterminalen TD^[236] und die andere in der aminoterminalen Mdm2-Binderegion.^[237] Die Fähigkeit von p53, aus dem Kern exportiert zu werden, wird durch Mdm2 stark unterstützt, hängt jedoch nicht völlig von der Gegenwart von Mdm2 ab.^[238] Der Kernexport ist nicht nur notwendig für den Abbau von p53, sondern auch für transkriptionsunabhängige Aspekte der Apoptose-Antwort.^[219] Mutationen, die die transaktivierende Funktion von p53 aufheben oder die Kernlokalisierung verhindern, unterdrücken nicht sein apoptogenes Potenzial. Darüber hinaus kann p53 den Zelltod fördern, sogar in der Gegenwart von Transkriptions- oder Translationsinhibitoren. Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle bei apoptotischen Ereignissen, z.B. durch die Freisetzung von proapoptotischen Faktoren wie Cytochrom c. Kürzlich wurde gezeigt, dass p53 an Mitochondrien lokalisiert sein kann und direkt mit den antiapoptotischen BclX- und Bcl2-Proteinen wechselt, was schließlich zur Freisetzung von Cytochrom c führt.^[239] Neue NMR-Experimente mit der DBD und dem BclX-Protein liefern zusätzliche Hinweise für die Wechselwirkung dieser Proteinfamilie mit p53.^[240] Interessanterweise bindet Bcl2 direkt an die DNA-Bindestelle von p53.^[119]

7. p53 und Krebstherapie

Seit Jahrzehnten versuchen Wissenschaftler, Krebs zu heilen oder zu vermeiden, indem sie die Aktivität von p53 verändern. Dabei wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Ein

wichtiger Aspekt ist in diesem Zusammenhang die Reaktivierung von mutantem oder inaktivem p53. Dies kann durch kleine Moleküle, Enzyme oder Gentherapie erreicht werden (siehe Abschnitt 7.1). In einigen Fällen ist es sogar notwendig, die Funktion von p53 zu inhibieren (siehe Abschnitt 7.2). Ein sehr erfolgversprechender Ansatz ist die Fokussierung auf die Wechselwirkung zwischen p53 und Partnerproteinen. Erst kürzlich wurden kleine Proteine als Inhibitoren identifiziert, die die Wechselwirkung zwischen Mdm2 und p53 blockieren (siehe 7.3.1). Dabei steigt die Konzentration an aktivem p53 im Kern, was zu einem erhöhten Schutz gegen Krebs führt. Jedoch wird nur eine kleine Zahl von Patienten mit einem aus dem Gleichgewicht geratenen p53/Mdm2-Verhältnis von diesem Fortschritt profitieren.

7.1. Reaktivierung von mutantem p53 in Tumoren

Einer der offensichtlich attraktivsten Ansätze in der Krebstherapie ist die Wiederherstellung der Wildtypfunktion von p53 in Tumoren, die ihre p53-Aktivität durch Mutation verloren haben. Eine Strategie ist es, Wildtyp-p53 in Tumoren mit mutiertem p53 durch Gentherapie einzuführen. Im Jahr 2003 wurde Gentherapie für die Behandlung von bestimmten Karzinomen in China zugelassen. Damit basiert die erste Gentherapie überhaupt, die für die Anwendung beim Menschen zugelassen wurde, auf p53, und weitere p53-basierte Gentherapien sind gegenwärtig in klinischen Studien der Phasen II und III.^[241,242] Die Zukunft wird weisen, ob p53-Gentherapien Erfolg haben werden.

Ein konventionellerer Ansatz ist die Identifizierung kleiner Moleküle als Medikamente, die p53 in menschlichen Tumoren aktivieren können. Basierend auf einer detaillierten thermodynamischen und biophysikalischen Analyse von p53-Mutanten, wurden drei Phänotypen unterschieden: 1) DNA-Kontaktmutanten, die wenig oder keine Auswirkung auf die Faltung haben; 2) Mutationen, die lokale Strukturen zerstören und 3) Mutationen, die die kooperative Bindung an DNA verhindern (siehe Abschnitt 3). Die Einteilung dieser Phänotypen in solche, bei denen eine DNA-Bindung möglich ist, und solche, bei denen dies nicht möglich ist, definiert bestimmte Klassen von p53-Mutationen.^[97,108,130,243] Es gibt zwei prinzipielle Mechanismen, wie man die Aktivierung von p53 durch kleine Moleküle erreichen kann: Der größte Anteil von p53-Strukturmutanten kann sowohl mutante als auch Wildtypkonformation annehmen (siehe Box 3). Die mutante Konformation ist durch eine verringerte oder vollständig verlorene DNA-Bindeaktivität charakterisiert. Wann immer mutantes p53 prinzipiell in der Lage ist, die Wildtypkonformation anzunehmen, wäre es möglich, seine Funktionalität durch kleine Moleküle wiederherzustellen, die an die Wildtypkonformation binden und diese stabilisieren, wodurch das Gleichgewicht zugunsten dieser Konformation verschoben wird. Für einen kleinen Teil der DNA-Kontaktmutanten oder stärker destabilisierten p53-Varianten könnten kleine Moleküle erforderlich sein, die eine spezifische mutante Konformation erkennen und eine Wildtypkonformation induzieren, z.B. durch die Bildung zusätzlicher stabilisierender Wechselwirkungen.^[97]

Das Wiederherstellen der Wildtypkonformation und -funktion von mutantem p53 mithilfe kleiner Moleküle ist technisch überaus anspruchsvoll. Frühe Machbarkeitsstudien haben allerdings gezeigt, dass die Wildtypkonformation von p53 auf verschiedene Weise wiederhergestellt werden kann. So wurden basische Reste in die DBD eingeführt, um neue Kontakte zwischen p53 und dem DNA-Phosphatrückgrat zu erzeugen. Bei drei der sieben häufigsten p53-Mutanten stärkte der Ersatz von Thr284 durch Arg die DNA-Bindeaffinität signifikant und stellte die Transaktivierungs- und Tumorsuppressorfunktion wieder her.^[244] Second-Site-Suppressor-Mutanten, die in der Lage waren, die negativen Wirkungen häufig vorkommender p53-Krebsmutationen in menschlichen Zellen zu kompensieren, wurden identifiziert^[8] und ihre Mechanismen analysiert. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Funktion von p53-Mutanten analog durch kleine Moleküle wiederhergestellt werden könnte, die an die native Struktur binden und sie dadurch stabilisieren.^[245] Schließlich wurde eine superstable Vierfachmutante der p53-DBD kreiert.^[246] Diese Mutante enthält die Second-Site-Suppressoren N239Y und N268D, die spezifisch Aktivität und Stabilität in mehreren onkogenen Mutanten wiederherstellen. Die Kristallstruktur dieser Mutante zeigt, wie eine Zunahme der Rigidität zu erhöhter Thermostabilität führt^[247] und dass Konsensus-DNA sowie Heparin eine thermodynamische Stabilisierung der p53-DBD ergeben.^[246,248] Zusätzlich zur intrinsischen Stabilisierung durch Mutation können Lösungsmittelzusätze wie Glycerin, Trimethylamin-N-oxid (TMAO) oder das Aminothiol WR1065 die aktive Wildtypkonformation von temperatursensitiven p53-Mutanten in vivo stabilisieren.^[249–254] Eine spezifische Stabilisierung durch Peptide und kleine Moleküle sollte deshalb möglich sein.^[255]

Beim Screening einer großen Substanzbibliothek nach kleinen Molekülen, die Wildtyp-p53 gegen thermische Denaturierung schützen, wurden mehrere Liganden identifiziert, von denen CP-31398 (Abbildung 9) der potenteste war.^[256] Er war in Zell-Assays aktiv und zeigte Antitumorwirkung in Heterotransplantat-Modellen. Darüber hinaus induzierte CP-31398 eine für p53 spezifische Antwort und Apoptose in Tumorzellen.^[257–262] Allerdings wurden seit seiner Entdeckung keine Daten zur direkten Wechselwirkung mit p53 veröffentlicht.^[263] Im Gegenteil wurde beschrieben, dass CP-31398 p53 nicht thermodynamisch stabilisiert, sondern in die DNA intercaliert. Die Substanz war auch nicht in der Lage, mutantes p53-Protein zu reaktivieren,^[264] allerdings wurde natives p53 in Zellen induziert, die auch mutantes p53 exprimieren. Deshalb könnte es sein, dass CP-31398 ausschließlich mit neu synthetisiertem p53 wechselwirkt. Dies würde auch erklären, warum keine direkte Wechselwirkung mit gereinigten p53-Domänen nachzuweisen ist. Es lässt sich festhalten, dass die Funktionsweise von CP-31398 kontrovers bleibt und dass weitere Studien zu ihrer Aufklärung notwendig sind.

Eine weitere vielversprechende Substanz ist Prima-1 (**p53 reactivation and induction of massive apoptosis**) (Abbildung 9). Sie inhibiert mehrere Tumorzelllinien mit unterschiedlichem p53-Status dadurch, dass sie p53-abhängige Apoptose^[265] und DNA-Bindeaktivität wiederherstellt und Antitumoraktivität in Heterotransplantat-Modellen ausübt.^[266] Anders als im Fall von CP-31398 wurde auch be-

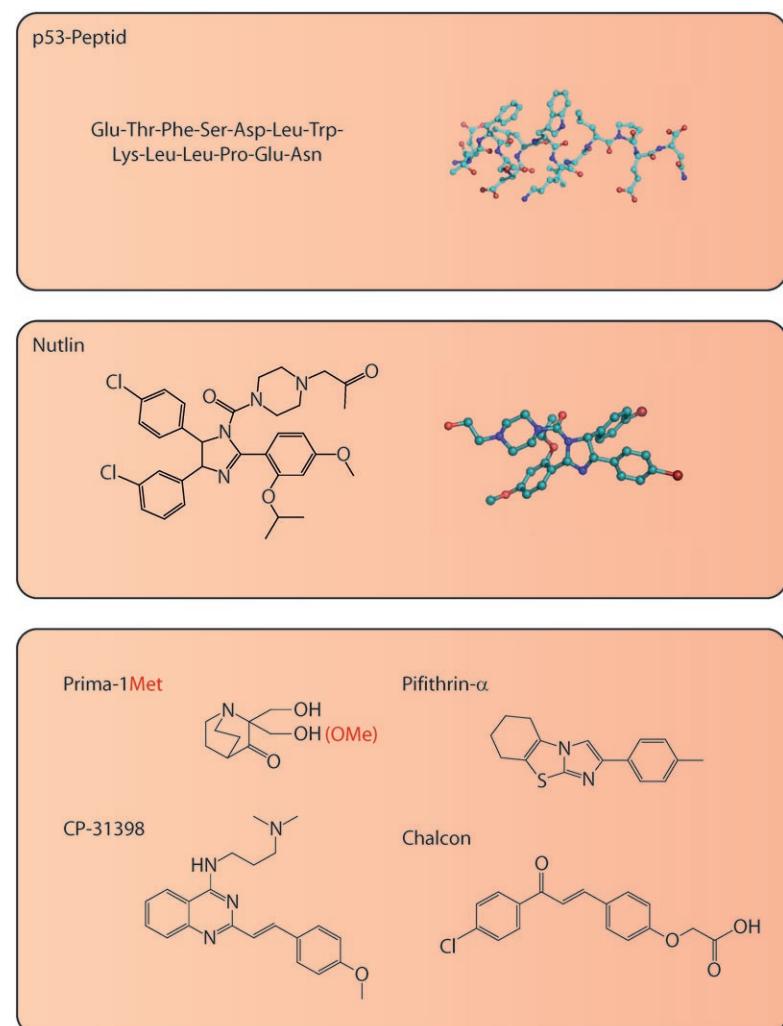


Abbildung 9. Mdm2 und Inhibitoren von p53. Die Konformationen des p53-Peptides und von Nutlin wurden aus ihren Kristallstrukturen im Komplex mit Mdm2 genommen; PDB-Codes: 1YCR und 1RV1. O rot, N blau, C grün, Cl dunkelrot.

richtet, dass Prima-1 die Wildtypkonformation sowohl von DNA-Kontaktmutanten als auch von Strukturmutanten *in vitro* und *in vivo* wiederherstellen kann. Es wurde gezeigt, dass Prima-1 selektiv Zellen mit mutantem p53 eliminiert. Eine methylierte Form, Prima-1MET, ist noch aktiver als Prima-1 und wirkt synergistisch mit chemotherapeutischen Agentien wie *cis*-Platin.^[267] Kürzlich wurde eine Familie von p53-Reaktivatoren beschrieben, die vom Prima-1-Rückgrat abgeleitet ist.^[268]

Ein Maleimid-Analogon mit vergleichbarer Aktivität, das in derselben Screening-Kampagne identifiziert und MIRA-1 (**m**utant p53-**d**ependent **i**nduction of **r**apid **a**poptosis) genannt wurde, kann die DNA-Bindeaktivität von p53 wiederherstellen und die aktive Konformation und Transkription von mutantem p53 *in vitro* und in lebenden Zellen erhalten.^[269] Allerdings wurde keine Wiederherstellung der Wildtypkonformation *in vitro* detektiert. Wie im Fall von CP-31398 muss der Wirkmodus von Prima-1 und seinen Derivaten noch geklärt werden.

Die ersten biochemischen und biophysikalischen Machbarkeitsstudien für die direkte Rettung von p53-Mutationen

wurden mit dem neun Reste langen Peptid CDB3 (RE-DEDEIEW) durchgeführt.^[270] CDB3 bindet spezifisch an die DBD und stabilisiert sie gegen thermische Entfaltung.^[271] NMR-spektroskopischen Untersuchungen zu folge überführt CDB3 die Hot-Spot-Mutante R249S in ihre Wildtypkonformation.^[272] CDB3 induziert auch die aktive Wildtypkonformation der Hot-Spot-Mutanten His175 und His173 *in vivo*. Dies resultierte in der Expression von p53-Zielgenen, begleitet von der teilweisen Wiederherstellung der p53-abhängigen Apoptose.^[273] Basierend auf diesen Experimenten schlossen die Autoren, dass mögliche Medikamente mit einem CDB3-ähnlichen Wirkmechanismus während oder unmittelbar bei der Biosynthese wirken müssen, um die Konformation instabiler p53-Mutanten wiederherstellen zu können.^[274]

Zusammengekommen zeigen die oben beschriebenen Studien, dass die Wiederherstellung der Wildtyp-p53-Funktion in Tumoren mit mutantem p53 im Prinzip möglich ist. Allerdings weisen alle bis dato beschriebenen Moleküle nur eine niedrige bis moderate Effektivität und unpassende physikochemische Eigenschaften auf. Aus diesem Grund werden sie sich sicher so nicht als Therapeutika eignen. Ein Schwerpunkt bei der künftigen Suche nach p53-Reaktivatoren muss die Aufklärung der Wirkweise und des Mechanismus sein, der zur Rettung von p53-Mutanten führt.

7.2. Inhibierung der p53-Aktivität in Nicht-Tumorgewebe nach genotoxischem Stress

Es mag überraschend klingen, dass die Inhibierung von p53 eine weitere Therapiestrategie darstellt. Dies kann aber unter Bedingungen nützlich sein, unter denen p53 akkumuliert und in Nicht-Tumorgeweben aktiviert wird, wie bei einer Hypoxie als Folge eines Schlaganfalls^[275] oder von konventionellen chemotherapeutischen Substanzen (z.B. von DNA-schädigenden Agentien, Anti-Metaboliten oder Proteasominhibitoren) oder von Radiotherapie. Die Induktion von Apoptose nach Aktivierung von p53 in normalem Gewebe ist einer der Gründe für Neurodegenerierung oder für die schweren Nebenwirkungen, die bei der konventionellen Breitband-Tumortherapie beobachtet werden.^[276] Daher könnte die Inhibierung der Aktivität von p53 durch zytoprotektive Substanzen eine interessante Möglichkeit sein, um normales Gewebe vor den schädlichen Konsequenzen des Schlaganfalls oder der Krebsbehandlung zu schützen.^[277]

Die Suche nach Substanzen, die die transkriptionale Aktivität von p53 inhibieren, führte zu Pifithrin- α (für **p**-**f**ifty **t**hree **i**nhibitor).^[278] Pifithrin- α kann die Nebenwirkungen der Chemo- oder Radiotherapie *in vivo* verringern, ohne die Effizienz der Therapie von Tumoren mit mutantem p53 zu gefährden und ohne die Bildung von Tumoren kurzfristig zu fördern.^[278–281] Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, dass die Inhibierung der p53-Aktivität im normalen Gewebe nach der Behandlung mit Pifithrin- α langfristig zu erhöhtem Auftreten von Tumoren führt.^[282] Interessanterweise scheint p53 selbst nicht das Ziel von Pifithrin zu sein, und der Wirkme-

chanismus bleibt entsprechend rätselhaft.^[283] Die Inhibierung der Aktivität von p53 könnte auch für mehrere andere pathologische Zustände wie Schlaganfall, schwere Verbrennungen, Herzinfarkt und Wundheilung nützlich sein.^[283,284]

7.3. Mdm2 und Krebstherapie

Wegen der Bedeutung von Mdm2 als negativer Regulator von p53 und wegen des Vorhandenseins einer definierten hydrophoben Bindetasche von Mdm2 gab es großes Interesse, diese Wechselwirkung für die therapeutische Intervention zu nutzen.^[38,97,285–292,326,327] In den vergangenen Jahren hat sich Mdm2 als wertvolles Ziel der Wirkstoff-Forschung gezeigt.^[285–291] Die Deletion des Mdm2-Gens in Mäusen führt zu embryonaler Lethalität. Diese kann durch den gleichzeitigen Verlust von p53 aufgehoben werden, was die Bedeutung der negativen Regulierung von p53 durch Mdm2 unterstreicht.^[293,294] Selbst die teilweise Inhibition von Mdm2 reicht aus, um p53 *in vivo* zu aktivieren.^[295]

Ein alternativer Weg für die Inhibition von Mdm2 könnte auf der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Mdm2 basieren.^[296,297] Ihre Inhibition sollte in einer geringeren Degradation von p53 und einem erhöhten p53-Spiegel resultieren. Erst kürzlich wurden die ersten selektiven Antagonisten von p53 mit In-vitro- und In-vivo-Potenzial beschrieben.^[186]

7.3.1. Beeinflussung der p53-Mdm2-Wechselwirkung mit Peptiden und kleinen Molekülen als Antagonisten

Die Affinität des originalen Peptidsegments für Mdm2 konnte durch das Einfügen von hydrophoben Resten verstärkt werden.^[298] Durch einen Vergleich verbesserter Peptidsequenzen wurde die Sequenz PxFxDYWxxL als Konsensussequenz für die Bindung an Mdm2 identifiziert (wobei an der Stelle x jede Aminosäure auftreten kann).^[298,299] Durch semi-rationales Design in Verbindung mit NMR-Spektroskopie wurden potente Derivate dieses Motivs hergestellt.^[300] Künstliche Aminosäuren wurden eingefügt, die die helicale Konformation des Peptids entropisch stabilisieren und zusätzliche polare und hydrophobe Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Mdm2 bilden. Diese Optimierung verstärkte die Affinität des Peptids fast 2000fach gegenüber denjenigen des Originalpeptids.^[300]

Mögliche niedermolekulare Antagonisten der p53-Mdm2-Wechselwirkung wurden in verschiedenen Substanzklassen identifiziert.^[301–304] Die ersten nichtpeptidischen niedermolekularen Mdm2-Antagonisten waren Derivate von Phenoxyessigsäure und Phenoxymethyltetrazol sowie Chalcone (Abbildung 9).^[305] Diese Moleküle sind allerdings nur mäßig wirksam und inhibieren zudem die Glutathion-S-Transferase-Aktivität.^[305] Kürzlich wurden neue Boron-Chalcon-Derivate als potenzielle Mdm2-Antagonisten mit geringeren Nebenreaktionen beschrieben.^[306] Andere Ansätze zur therapeutischen Beeinflussung der Mdm2-p53-Wechselwirkung stehen noch ganz am Anfang: Mithilfe von Computer-gestütztem Design wurden nichtpeptidische Mdm2-Antagonisten synthetisiert. Diese Inhibitoren schei-

nen eine moderate Affinität für Mdm2 zu haben und den p53-Signalweg in Tumorzelllinien einzuleiten.^[307] Mittels Protein-Grafting (einer Strategie, bei der ein funktionelles Erkennungsepitop aus seinem helicalen oder Polyprolin-type-II-(PPII)-helicalen Kontext herausgelöst wird und auf einem kleinen, aber strukturierten Proteingerüst präsentiert wird) wurden Mdm2-Liganden hergestellt, die hohe Affinitäten und wahrscheinlich inhibitorische Aktivität aufweisen.^[308] Diese Liganden können einfach synthetisiert und modifiziert werden. Eine andere erfolgversprechende Verbindung ist die aus Pilzen isolierte cyclische Substanz Chlorofusin. Sie wurde durch das Screening einer Bibliothek mikrobieller Extrakte als Inhibitor der p53-Mdm2-Wechselwirkung identifiziert.^[309]

Kürzlich wurde eine Reihe von *cis*-Imidazolinen, die Nutline, als potente und selektive niedermolekulare Antagonisten von Mdm2 ausgemacht.^[186] Die Leitsubstanzen wurden durch Optimierung unterschiedlicher Parameter wie Bindungsaffinität, Löslichkeit, Reaktivität und pharmakokinetische Eigenschaften sowie strukturbasiertes Design verbessert. Wechselwirkungsstudien und die erste Kristallstruktur von Mdm2 im Komplex mit einem niedermolekularen Antagonisten bestätigten, dass diese Substanzen Mdm2 in der p53-Bindetasche mit sub-μM Affinität binden (Abbildung 5C). Die Analyse der Zellen ergab, dass Nutline in Wildtyp-p53-Krebszellen, aber nicht in Krebszellen mit mutantem p53 den p53-Signalweg aktivieren und Apoptose induzieren, was darauf hinweist, dass speziell Krebs, der durch überhöhte Mdm2-Aktivität verursacht wird, durch dieses Medikament behandelt werden könnte. Darüber hinaus zeigen diese Substanzen Antitumoraktivität in Heterotransplantat-Modellen, ohne dass dabei übermäßige toxische Nebeneffekte auftreten.^[186]

Zusammengenommen wurde mit diesen Studien prinzipiell bewiesen, dass die p53-Mdm2-Wechselwirkung in der Tat durch niedermolekulare Substanzen inhibiert werden kann und dass die Auflösung der p53-Mdm2-Wechselwirkung den Phänotyp induziert, den man von Mdm2-Antagonisten erwartet.^[310] Nach der richtungweisenden Veröffentlichung von Vassilev et al. (2004)^[186] wurden mehrere Berichte über peptidbasierte und niedermolekulare Antagonisten von Mdm2 veröffentlicht, die *in vitro* und teilweise auch in Zellen aktiv sind.^[311] Zudem wurde die strukturbasierte Optimierung einer neuen Serie von Benzodiazepindion-Antagonisten der Mdm2-p53-Wechselwirkung beschrieben. Diese 1,4-Benzodiazepin-2,5-dione bewirken eine Stabilisierung von p53 in Zellen und die nachfolgende Transkription von p53-Zielgenen; außerdem inhibieren sie die Proliferation von Tumorzellen.^[312–314] Zusätzlich gibt es eine wachsende Zahl von erfolgversprechenden peptidischen und nichtpeptidischen Inhibitoren der p53-Mdm2-Wechselwirkung, für die bisher jedoch hauptsächlich biochemische und nur eine begrenzte Zahl von Daten in zellulären Systemen erhalten wurden. Zu diesen zählen z.B. Spiro(oxindol-3-3'-pyrrolidin)-Derivate,^[315] Isoindolinon-Derivate,^[316] Terphenyl-basierte α-helicale Mimetika,^[157,317] β-Hairpin-Peptidmimetika^[318–320] und retroinverse p53-Peptide.^[321] Darüber hinaus gibt es auch ein 2,5-Bis(5-hydroxymethyl-2-thienyl)furan-Derivat, genannt RITA, von dem angenommen wurde, dass es die p53-Mdm2-Wechselwirkung blockiert, indem es an p53 bindet.^[273] Ak-

tuellen NMR-Daten zufolge entfaltet RITA seine Wirkung allerdings über einen anderen Mechanismus.^[322]

Angesichts der großen Menge an Daten, die für das Therapiekonzept der p53-Aktivierung durch Mdm2-Antagonisten sprechen, besteht eine realistische Chance, dass Mdm2-Antagonisten in naher Zukunft in der Klinik validiert werden.

7.3.2. Inhibierung der p53-Ubiquitinierung durch Mdm2

Eine alternative Möglichkeit zur Aktivierung von p53 durch Inhibierung von Mdm2 besteht darin, die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Mdm2 zu blockieren.^[296,323] Die Inhibierung der E3-Ligase-Aktivität führt zu einem verringerten Abbau von p53 durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg, was zu einer Aktivierung von p53 in Tumorzellen führen sollte. Es ist noch zu zeigen, ob Inhibitoren der Mdm2-E3-Ligase eine Wirksamkeit entfalten können, die derjenigen der direkten Inhibierung der p53-Mdm2-Wechselwirkung entspricht. Da darüber hinaus Ubiquitinligasen eine Vielzahl von zellulären Proteinen beeinflussen, könnte es möglicherweise schwieriger sein, selektive enzymatische Inhibitoren der Mdm2-E3-Ligase-Funktion zu finden, als die einzigartige p53-Bindetasche in Mdm2 zu beeinflussen. Andererseits kann man argumentieren, dass es bereits gut beschriebene Wege für die klinische Entwicklung von Enzyminhibitoren gibt, wohingegen die Entwicklung von Inhibitoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen ein neues Konzept ist. Die biochemische Machbarkeit einer Blockierung der Mdm2-vermittelten Ubiquitinierung von p53 mit niedermolekularen Inhibitoren wurde bereits nachgewiesen, es gibt allerdings noch keine Daten zur zellulären oder pharmakologischen Wirksamkeit dieser Verbindungen.^[296]

8. Perspektive

Mehr als 25 Jahre nach der Entdeckung von p53 und trotz bemerkenswerter Fortschritte ist unser Wissen über seine Struktur, Dynamik und Wechselwirkung mit DNA oder mit einer Vielzahl von zellulären Wechselwirkungspartnern immer noch sehr eingeschränkt. So wurde erst vor kurzem entdeckt, dass ein großer Teil des Proteins nativ entfaltet ist. Diese Region scheint erst dann eine Struktur anzunehmen, wenn sie an Partnerproteine gebunden ist. Bis jetzt wurde nur der Einfluss einiger weniger Wechselwirkungspartner dieser Region analysiert.

Erstaunlichweise sind sogar die Details der Beteiligung von p53 an der Erkennung von DNA-Schäden noch nicht völlig verstanden, und eine umfassende Analyse der Gene, die durch p53 reguliert werden, steht noch aus. In ähnlicher Weise muß die Regulierung von p53, sowohl durch Bindung unspezifischer DNA als auch durch Modifizierungen wie Phosphorylierung und Acetylierung, noch im Detail aufgeklärt werden. Schließlich bedarf das Netzwerk der Wechselwirkungen von p53 im Kern und im Zytosol zusammen mit der Regulierung des Transports zwischen den Kompartimenten einer weiteren Analyse. Dies erfordert unter anderem auch weitere Strukturinformationen; so wäre eine

Struktur von tetramerem Vollängen-p53 im Komplex mit DNA wünschenswert.

Diese kurze Aufzählung zeigt exemplarisch, dass zentrale Aspekte der p53-Maschinerie immer noch unbekannt sind. Je mehr wir über die grundlegenden Aspekte durch eine Kombination von In-vivo- und In-vitro-Techniken lernen, desto einfacher wird es sein, neue Therapeutika zu entwickeln. Ohne Zweifel wird die Zukunft in diesem Feld aufregend.

Abkürzungen

DBD	zentrale DNA-bindende Core-Domäne von p53
Hsp	Hitzeschockprotein
IUP	intrinsisch unstrukturiertes Protein
Mdm2	mouse double minute 2 – Mdm2 wird im Text unabhängig vom Herkunftsorganismus des Proteins verwendet, also auch für die humane Variante Hdm2
NTD	aminoterminale Transaktivierungsdomäne von p53
RD	carboxyterminale Regulierungsdomäne von p53
TD	Tetramerisierungsdomäne von p53

J.B. und H.K. danken der DFG und dem Fonds der chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung. Wir danken Marco Retzlaff und Titus Franzmann für wichtige Anregungen und entschuldigen uns bei allen Autoren, deren Arbeiten wir aufgrund von Platzmangel nicht zitieren konnten.

Eingegangen am 15. Februar 2006

Online veröffentlicht am 19. September 2006

- [1] C. Chang, D. T. Simmons, M. A. Martin, P. T. Mora, *J. Virol.* **1979**, *31*, 463–471.
- [2] D. P. Lane, L. V. Crawford, *Nature* **1979**, *278*, 261–263.
- [3] D. I. Linzer, A. J. Levine, *Cell* **1979**, *17*, 43–52.
- [4] T. Soussi, Y. Legros, R. Lubin, K. Ory, B. Schlichtholz, *Int. J. Cancer* **1994**, *57*, 1–9.
- [5] B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine, *Nature* **2000**, *408*, 307–310.
- [6] D. P. Lane, *Nature* **1992**, *358*, 15–16.
- [7] A. J. Levine, *Cell* **1997**, *88*, 323–331.
- [8] R. K. Brachmann, K. Yu, Y. Eby, N. P. Pavletich, J. D. Boeke, *EMBO J.* **1998**, *17*, 1847–1859.
- [9] T. Hernandez-Boussard, P. Rodriguez-Tome, R. Montesano, P. Hainaut, *Hum. Mutat.* **1999**, *14*, 1–8.
- [10] S. Jin, A. J. Levine, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 4139–4140.
- [11] G. I. Evan, K. H. Vousden, *Nature* **2001**, *411*, 342–348.
- [12] W. Maltzman, L. Czyzyk, *Mol. Cell. Biol.* **1984**, *4*, 1689–1694.
- [13] S. Benchimol, P. Lamb, L. V. Crawford, D. Sheer, T. B. Shows, G. A. Bruns, J. Peacock, *Somatic Cell Mol. Genet.* **1985**, *11*, 505–510.
- [14] C. Miller, T. Mohandas, D. Wolf, M. Prokocimer, V. Rotter, H. P. Koefller, *Nature* **1986**, *319*, 783–784.
- [15] D. Reisman, M. Greenberg, V. Rotter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 5146–5150.
- [16] T. Soussi, C. Caron de Fromental, P. May, *Oncogene* **1990**, *5*, 945–952.
- [17] T. Soussi, P. May, *J. Mol. Biol.* **1996**, *260*, 623–637.

- [18] B. J. Mayer, R. Gupta, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1998**, 228, 1–22.
- [19] D. Sakamuro, P. Sabbatini, E. White, G. C. Prendergast, *Oncogene* **1997**, 15, 887–898.
- [20] K. K. Walker, A. J. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 15335–15340.
- [21] C. Venot, M. Maratrat, C. Dureuil, E. Conseiller, L. Bracco, L. Debussche, *EMBO J.* **1998**, 17, 4668–4679.
- [22] S. Fields, S. K. Jang, *Science* **1990**, 249, 1046–1049.
- [23] H. Lu, A. J. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 5154–5158.
- [24] C. J. Thut, J. L. Chen, R. Klemm, R. Tjian, *Science* **1995**, 267, 100–104.
- [25] S. G. Lee, H. M. Rho, *Oncogene* **2000**, 19, 468–471.
- [26] P. H. Kussie, S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine, N. P. Pavletich, *Science* **1996**, 274, 948–953.
- [27] V. Bottger, A. Bottger, C. Garcia-Echeverria, Y. F. Ramos, A. J. van der Eb, A. G. Jochemsen, D. P. Lane, *Oncogene* **1999**, 18, 189–199.
- [28] M. Uesugi, G. L. Verdine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 14801–14806.
- [29] R. Truant, J. Antunovic, J. Greenblatt, C. Prives, J. A. Cromlish, *J. Virol.* **1995**, 69, 1851–1859.
- [30] S. Baniin, L. Moyal, S. Shieh, Y. Taya, C. W. Anderson, L. Chessa, N. I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh, Y. Ziv, *Science* **1998**, 281, 1674–1677.
- [31] W. L. Liu, C. Midgley, C. Stephen, M. Saville, D. P. Lane, *J. Mol. Biol.* **2001**, 313, 711–731.
- [32] S. Bell, C. Klein, L. Muller, S. Hansen, J. Buchner, *J. Mol. Biol.* **2002**, 322, 917–927.
- [33] R. Dawson, L. Muller, A. Dehner, C. Klein, H. Kessler, J. Buchner, *J. Mol. Biol.* **2003**, 332, 1131–1141.
- [34] H. Lee, K. H. Mok, R. Muhandiram, K. H. Park, J. E. Suk, D. H. Kim, J. Chang, Y. C. Sung, K. Y. Choi, K. H. Han, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 29426–29432.
- [35] A. K. Dunker, J. D. Lawson, C. J. Brown, R. M. Williams, P. Romero, J. S. Oh, C. J. Oldfield, A. M. Campen, C. M. Ratliff, K. W. Hipps, J. Ausio, M. S. Nissen, R. Reeves, C. Kang, C. R. Kissinger, R. W. Bailey, M. D. Griswold, W. Chiu, E. C. Garner, Z. Obradovic, *J. Mol. Graphics Modell.* **2001**, 19, 26–59.
- [36] V. N. Uversky, J. R. Gillespie, A. L. Fink, *Proteins* **2000**, 41, 415–427.
- [37] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 54–60.
- [38] P. Chene, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 102–109.
- [39] M. L. Geddie, T. L. O'Loughlin, K. K. Woods, I. Matsumura, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 35641–35646.
- [40] J. Bargonetti, J. J. Manfredi, X. Chen, D. R. Marshak, C. Prives, *Genes Dev.* **1993**, 7, 2565–2574.
- [41] N. P. Pavletich, K. A. Chambers, C. O. Pabo, *Genes Dev.* **1993**, 7, 2556–2564.
- [42] T. R. Hupp, D. W. Meek, C. A. Midgley, D. P. Lane, *Cell* **1992**, 71, 875–886.
- [43] P. Wang, M. Reed, Y. Wang, G. Mayr, J. E. Stenger, M. E. Anderson, J. F. Schwedes, P. Tegtmeyer, *Mol. Cell. Biol.* **1994**, 14, 5182–5191.
- [44] P. Hainaut, A. Hall, J. Milner, *Oncogene* **1994**, 9, 299–303.
- [45] C. R. Johnson, P. E. Morin, C. H. Arrowsmith, E. Freire, *Biochemistry* **1995**, 34, 5309–5316.
- [46] M. G. Mateu, A. R. Fersht, *EMBO J.* **1998**, 17, 2748–2758.
- [47] M. G. Mateu, M. M. Sanchez Del Pino, A. R. Fersht, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 191–198.
- [48] G. M. Clore, J. Ernst, R. Clubb, J. G. Omichinski, W. M. Kennedy, K. Sakaguchi, E. Appella, A. M. Gronenborn, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 321–333.
- [49] W. Lee, T. S. Harvey, Y. Yin, P. Yau, D. Litchfield, C. H. Arrowsmith, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, 1, 877–890.
- [50] P. D. Jeffrey, S. Gorina, N. P. Pavletich, *Science* **1995**, 267, 1498–1502.
- [51] R. L. Weinberg, D. B. Veprintsev, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **2004**, 341, 1145–1159.
- [52] T. S. Davison, X. Nie, W. Ma, Y. Lin, C. Kay, S. Benchimol, C. H. Arrowsmith, *J. Mol. Biol.* **2001**, 307, 605–617.
- [53] G. Shaulsky, N. Goldfinger, A. Ben Ze'ev, V. Rotter, *Mol. Cell. Biol.* **1990**, 10, 6565–6577.
- [54] J. Ahn, C. Prives, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 730–732.
- [55] C. Klein, E. Planker, T. Diercks, H. Kessler, K. P. Kunkele, K. Lang, S. Hansen, M. Schwaiger, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 49020–49027.
- [56] T. R. Hupp, D. P. Lane, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1994**, 59, 195–206.
- [57] T. R. Hupp, A. Sparks, D. P. Lane, *Cell* **1995**, 83, 237–245.
- [58] M. E. Anderson, B. Woelker, M. Reed, P. Wang, P. Tegtmeyer, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 6255–6264.
- [59] R. L. Weinberg, S. M. Freund, D. B. Veprintsev, M. Bycroft, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **2004**, 342, 801–811.
- [60] P. May, E. May, *Oncogene* **1999**, 18, 7621–7636.
- [61] A. Friedler, D. B. Veprintsev, S. M. Freund, K. I. von Glos, A. R. Fersht, *Structure* **2005**, 13, 629–636.
- [62] W. Maltzman, L. Czyzyk, *Mol. Cell. Biol.* **1984**, 4, 1689–1694.
- [63] S. Hansen, T. R. Hupp, D. P. Lane, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 3917–3924.
- [64] S. Hansen, D. P. Lane, C. A. Midgley, *J. Mol. Biol.* **1998**, 275, 575–588.
- [65] L. Muller, A. Schaupp, D. Walerych, H. Wegele, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 48846–48854.
- [66] D. Walerych, G. Kudla, M. Gutkowska, B. Wawrzynow, L. Muller, F. W. King, A. Helwak, J. Boros, A. Zylicz, M. Zylicz, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 48836–48845.
- [67] N. M. Nichols, K. S. Matthews, *Biochemistry* **2002**, 41, 170–178.
- [68] K. Sakaguchi, H. Sakamoto, M. S. Lewis, C. W. Anderson, J. W. Erickson, E. Appella, D. Xie, *Biochemistry* **1997**, 36, 10117–10124.
- [69] Y. Y. Kim, B. J. Park, D. J. Kim, W. H. Kim, S. Kim, K. S. Oh, J. Y. Lim, J. Kim, C. Park, S. I. Park, *FEBS Lett.* **2004**, 572, 92–98.
- [70] S. Rudiger, S. M. Freund, D. B. Veprintsev, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 11085–11090.
- [71] Y. Peng, L. Chen, C. Li, W. Lu, J. Chen, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 40583–40590.
- [72] C. Wang, J. Chen, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 2066–2071.
- [73] M. Kaghad, H. Bonnet, A. Yang, L. Creancier, J. C. Biscan, A. Valent, A. Minty, P. Chalon, J. M. Lelias, X. Dumont, P. Ferrara, F. McKeon, D. Caput, *Cell* **1997**, 90, 809–819.
- [74] A. Yang, M. Kaghad, Y. Wang, E. Gillett, M. D. Fleming, V. Dotsch, N. C. Andrews, D. Caput, F. McKeon, *Mol. Cell* **1998**, 2, 305–316.
- [75] U. M. Moll, N. Slade, *Mol. Cancer Res.* **2004**, 2, 371–386.
- [76] G. Melino, X. Lu, M. Gasco, T. Crook, R. A. Knight, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, 28, 663–670.
- [77] B. Trink, K. Okami, L. Wu, V. Sriuranpong, J. Jen, D. Sidransky, *Nat. Med.* **1998**, 4, 747–748.
- [78] A. Yang, M. Kaghad, D. Caput, F. McKeon, *Trends Genet.* **2002**, 18, 90–95.
- [79] S. W. Chi, A. Ayed, C. H. Arrowsmith, *EMBO J.* **1999**, 18, 4438–4445.
- [80] W. K. Wang, M. Bycroft, N. W. Foster, A. M. Buckle, A. R. Fersht, Y. W. Chen, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2001**, 57, 545–551.
- [81] J. Schultz, C. P. Ponting, K. Hofmann, P. Bork, *Protein Sci.* **1997**, 6, 249–253.
- [82] F. N. Barrera, J. A. Poveda, J. M. Gonzalez-Ros, J. L. Neira, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 46878–46885.
- [83] E. Balint, S. Bates, K. H. Vousden, *Oncogene* **1999**, 18, 3923–3929.

- [84] H. Lu, X. Zeng, L. Chen, C. A. Jost, R. Maya, D. Keller, X. Wang, W. G. Kaelin, M. Oren, J. Chen, *FASEB J.* **1999**, *13*, A1538.
- [85] M. Dohn, S. Z. Zhang, X. B. Chen, *Oncogene* **2001**, *20*, 3193–3205.
- [86] J. Furrer, A. Enthart, A. Kühlewein, A. Dehner, C. Klein, S. Hansen, M. Schwaiger, H. Kessler, G. Gemmecker, *J. Biomol. NMR* **2003**, *26*, 377–378.
- [87] C. Maisse, P. Guerrieri, G. Melino, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1555–1561.
- [88] N. Mondal, J. D. Parvin, *Cancer Biol. Ther.* **2005**, *4*, 414–418.
- [89] E. R. Flores, S. Sengupta, J. B. Miller, J. J. Newman, R. Bronson, D. Crowley, A. Yang, F. McKeon, T. Jacks, *Cancer Cell* **2005**, *7*, 363–373.
- [90] E. R. Flores, K. Y. Tsai, D. Crowley, S. Sengupta, A. Yang, F. McKeon, T. Jacks, *Nature* **2002**, *416*, 560–564.
- [91] M. H. Brodsky, W. Nordstrom, G. Tsang, E. Kwan, G. M. Rubin, J. M. Abrams, *Cell* **2000**, *101*, 103–113.
- [92] W. B. Derry, A. P. Putzke, J. H. Rothman, *Science* **2001**, *294*, 591–595.
- [93] S. Jin, S. Martinek, W. S. Joo, J. R. Wortman, N. Mirkovic, A. Sali, M. D. Yandell, N. P. Pavletich, M. W. Young, A. J. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7301–7306.
- [94] M. Ollmann, L. M. Young, C. J. Di Como, F. Karim, M. Belvin, S. Robertson, K. Whittaker, M. Demsky, W. W. Fisher, A. Buchman, G. Duyk, L. Friedman, C. Prives, C. Kopczynski, *Cell* **2000**, *101*, 91–101.
- [95] B. Schumacher, K. Hofmann, S. Boulton, A. Gartner, *Curr. Biol.* **2001**, *11*, 1722–1727.
- [96] Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, N. P. Pavletich, *Science* **1994**, *265*, 346–355.
- [97] A. Bullock, A. Fersht, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 68–76.
- [98] C. L. Wei, Q. Wu, V. B. Vega, K. P. Chiu, P. Ng, T. Zhang, A. Shahab, H. C. Yong, Y. Fu, Z. Weng, J. Liu, X. D. Zhao, J. L. Chew, Y. L. Lee, V. A. Kuznetsov, W. K. Sung, L. D. Miller, B. Lim, E. T. Liu, Q. Yu, H. H. Ng, Y. Ruan, *Cell* **2006**, *124*, 207–219.
- [99] A. K. Nagaich, V. B. Zhurkin, S. R. Durell, R. L. Jernigan, E. Appella, R. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1875–1880.
- [100] P. Balagurumoorthy, H. Sakamoto, M. S. Lewis, N. Zambrano, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, E. Appella, R. E. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8591–8595.
- [101] R. L. Weinberg, D. B. Veprinsev, M. Bycroft, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 589–596.
- [102] D. B. Veprinsev, S. M. Freund, A. Andreeva, S. E. Rutledge, H. Tidow, J. M. Canadillas, C. M. Blair, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2115–2119.
- [103] K. G. McLure, P. W. K. Lee, *EMBO J.* **1998**, *17*, 3342–3350.
- [104] K. G. McLure, P. W. K. Lee, *EMBO J.* **1999**, *18*, 763–770.
- [105] C. Klein, G. Georges, A. P. Künkele, R. Huber, R. A. Engh, S. Hansen, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 37390–37401.
- [106] T. M. Rippin, S. M. V. Freund, D. B. Veprinsev, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 351–358.
- [107] K. Zhao, X. Chai, K. Johnston, A. Clements, R. Marmorstein, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 12120–12127.
- [108] A. Dehner, C. Klein, S. Hansen, L. Muller, J. Buchner, M. Schwaiger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5381–5386; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5247–5251.
- [109] C. Prives, J. Bargonetti, G. Farmer, E. Ferrari, P. Friedlander, Y. Wang, L. Jayaraman, N. Pavletich, U. Hubscher, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1994**, *59*, 207–213.
- [110] C. H. Arrowsmith, P. Morin, *Oncogene* **1996**, *12*, 1379.
- [111] A. Lebrun, R. Lavery, H. Weinstein, *Protein Eng.* **2001**, *14*, 233–243.
- [112] B. Ma, Y. Pan, K. Gunasekaran, R. B. Venkataraghavan, A. J. Levine, R. Nussinov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3988–3993.
- [113] P. N. Friedman, X. Chen, J. Bargonetti, C. Prives, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3319–3323.
- [114] W. C. Ho, M. X. Fitzgerald, R. Marmorstein, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 20494–20502.
- [115] X. Wang, D. C. Christiani, J. K. Wiencke, M. Fischbein, X. Xu, T. J. Cheng, E. Mark, J. C. Wain, K. T. Kelsey, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1995**, *4*, 543–548.
- [116] M. Olivier, R. Eeles, M. Hollstein, M. A. Khan, C. C. Harris, P. Hainaut, *Hum. Mutat.* **2002**, *19*, 607–614.
- [117] J. M. Varley, *Hum. Mutat.* **2003**, *21*, 313–320.
- [118] P. Campomenosi, P. Monti, A. Aprile, A. Abbondandolo, T. Frebourg, B. Gold, T. Crook, A. Inga, M. A. Resnick, R. Iggo, G. Fronza, *Oncogene* **2001**, *20*, 3573–3579.
- [119] Y. Tomita, N. Marchenko, S. Erster, A. Nemajerova, A. Dehner, C. Klein, H. Pan, H. Kessler, P. Pancoska, U. M. Moll, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8600–8606.
- [120] M. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, C. C. Harris, *Science* **1991**, *253*, 49–53.
- [121] M. Hollstein, K. Rice, M. S. Greenblatt, T. Soussi, R. Fuchs, T. Sorlie, E. Hovig, B. Smith-Sorensen, R. Montesano, C. C. Harris, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3551–3555.
- [122] P. Hainaut, T. Soussi, B. Shomer, M. Hollstein, M. Greenblatt, E. Hovig, C. C. Harris, R. Montesano, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 151–157.
- [123] W. D. Funk, D. T. Pak, R. H. Karas, W. E. Wright, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 2866–2871.
- [124] A. Sigal, V. Rotter, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6788–6793.
- [125] G. A. Lang, T. Iwakuma, Y. A. Suh, G. Liu, V. A. Rao, J. M. Parant, Y. A. Valentini-Vega, T. Terzian, L. C. Caldwell, L. C. Strong, A. K. El Naggar, G. Lozano, *Cell* **2004**, *119*, 861–872.
- [126] T. Gohler, S. Jager, G. Warnecke, H. Yasuda, E. Kim, W. Deppert, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 1087–1100.
- [127] L. Jayaraman, C. Prives, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *55*, 76–87.
- [128] J. H. Bayle, B. Elenbaas, A. J. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5729–5733.
- [129] J. Milner, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 49.
- [130] A. N. Bullock, J. Henckel, A. R. Fersht, *Oncogene* **2000**, *19*, 1245–1256.
- [131] C. J. Di Como, C. Prives, *Oncogene* **1998**, *16*, 2527–2539.
- [132] C. L. Brooks, W. Gu, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 164–171.
- [133] A. M. Bode, Z. Dong, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 793–805.
- [134] E. Appella, C. W. Anderson, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2764–2772.
- [135] W. T. Steegenga, A. J. van der Eb, A. G. Jochemsen, *J. Mol. Biol.* **1996**, *263*, 103–113.
- [136] C. E. Helt, W. Wang, P. C. Keng, R. A. Bambara, *Cell Cycle* **2005**, *4*, 529–532.
- [137] T. Caspari, *Curr. Biol.* **2000**, *10*, R315–R317.
- [138] S. Y. Shieh, M. Ikeda, Y. Taya, C. Prives, *Cell* **1997**, *91*, 325–334.
- [139] C. Blattner, E. Tobiasch, M. Liften, H. J. Rahmsdorf, P. Herrlich, *Oncogene* **1999**, *18*, 1723–1732.
- [140] T. Thompson, C. Tovar, H. Yang, D. Carvajal, B. T. Vu, Q. Xu, G. M. Wahl, D. C. Heimbrook, L. T. Vassilev, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 53015–53022.
- [141] W. Gu, X. L. Shi, R. G. Roeder, *Nature* **1997**, *387*, 819–823.
- [142] W. Gu, R. G. Roeder, *Cell* **1997**, *90*, 595–606.
- [143] S. R. Grossman, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2773–2778.
- [144] N. A. Barlev, L. Liu, N. H. Chehab, K. Mansfield, K. G. Harris, T. D. Halazonetis, S. L. Berger, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 1243–1254.
- [145] C. Prives, J. L. Manley, *Cell* **2001**, *107*, 815–818.
- [146] J. Luo, A. Y. Nikolaev, S. Imai, D. Chen, F. Su, A. Shiloh, L. Guarente, W. Gu, *Cell* **2001**, *107*, 137–148.
- [147] H. Vaziri, S. K. Dessain, E. E. Ng, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente, R. A. Weinberg, *Cell* **2001**, *107*, 149–159.

- [148] W. Gu, J. Luo, C. L. Brooks, A. Y. Nikolaev, M. Li, *Novartis Found. Symp.* **2004**, 259, 197–205.
- [149] V. Jesenberger, S. Jentsch, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 112–121.
- [150] S. Fang, J. P. Jensen, R. L. Ludwig, K. H. Vousden, A. M. Weissman, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 8945–8951.
- [151] C. J. Sherr, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, 2, 731–737.
- [152] M. H. Kubbutat, K. H. Vousden, *Mol. Med. Today* **1998**, 4, 250–256.
- [153] S. L. Harris, A. J. Levine, *Oncogene* **2005**, 24, 2899–2908.
- [154] M. Li, C. L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer, W. Gu, *Science* **2003**, 302, 1972–1975.
- [155] M. Li, D. Chen, A. Shiloh, J. Luo, A. Y. Nikolaev, J. Qin, W. Gu, *Nature* **2002**, 416, 648–653.
- [156] M. Li, C. L. Brooks, N. Kon, W. Gu, *Mol. Cell* **2004**, 13, 879–886.
- [157] D. Chen, N. Kon, M. Li, W. Zhang, J. Qin, W. Gu, *Cell* **2005**, 121, 1071–1083.
- [158] D. Dornan, I. Wertz, H. Shimizu, D. Arnott, G. D. Frantz, P. Dowd, O. R. K. H. Koeppen, V. M. Dixit, *Nature* **2004**, 429, 86–92.
- [159] R. P. Leng, Y. Lin, W. Ma, H. Wu, B. Lemmers, S. Chung, J. M. Parant, G. Lozano, R. Hakem, S. Benchimol, *Cell* **2003**, 112, 779–791.
- [160] A. Shmueli, M. Oren, *Cell* **2005**, 121, 963–965.
- [161] M. S. Rodriguez, J. M. Desterro, S. Lain, C. A. Midgley, D. P. Lane, R. T. Hay, *EMBO J.* **1999**, 18, 6455–6461.
- [162] M. Gostissa, A. Hengstermann, V. Fogal, P. Sandy, S. E. Schwarz, M. Scheffner, G. Del Sal, *EMBO J.* **1999**, 18, 6462–6471.
- [163] F. Melchior, L. Hengst, *Cell Cycle* **2002**, 1, 245–249.
- [164] J. W. Harper, *Cell* **2004**, 118, 2–4.
- [165] D. P. Xirodimas, M. K. Saville, J. C. Bourdon, R. T. Hay, D. P. Lane, *Cell* **2004**, 118, 83–97.
- [166] P. Shaw, J. Freeman, R. Bovey, R. Iggo, *Oncogene* **1996**, 12, 921–930.
- [167] J. Wesierska-Gadek, A. Bugajska-Schretter, C. Cerni, *J. Cell. Biochem.* **1996**, 62, 90–101.
- [168] K. Sakaguchi, J. E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, C. W. Andersen, E. Appella, *Genes Dev.* **1998**, 12, 2831–2841.
- [169] J. Luo, M. Li, Y. Tang, M. Laszkowska, R. G. Roeder, W. Gu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 2259–2264.
- [170] K. H. Vousden, X. Lu, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 594–604.
- [171] J. Momand, D. Jung, S. Wilczynski, J. Niland, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3453–3459.
- [172] J. Momand, H. H. Wu, G. Dasgupta, *Gene* **2000**, 242, 15–29.
- [173] T. Juven-Gershon, M. Oren, *Mol. Med.* **1999**, 5, 71–83.
- [174] D. A. Freedman, C. B. Epstein, J. C. Roth, A. J. Levine, *Mol. Med.* **1997**, 3, 248–259.
- [175] S. M. Picksley, B. Vojtesek, A. Sparks, D. P. Lane, *Oncogene* **1994**, 9, 2523–2529.
- [176] J. Chen, V. Marechal, A. J. Levine, *Mol. Cell. Biol.* **1993**, 13, 4107–4114.
- [177] M. Uesugi, G. L. Verdine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 14801–14806.
- [178] O. Schon, A. Friedler, M. Bycroft, S. M. Freund, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **2002**, 323, 491–501.
- [179] O. Schon, A. Friedler, S. Freund, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **2004**, 336, 197–202.
- [180] M. A. McCoy, J. J. Gesell, M. M. Senior, D. F. Wyss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1645–1648.
- [181] M. W. Jackson, S. J. Berberich, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, 20, 1001–1007.
- [182] R. Stad, N. A. Little, D. P. Xirodimas, R. Frenk, A. J. van der Eb, D. P. Lane, M. K. Saville, A. G. Jochemsen, *EMBO Rep.* **2001**, 2, 1029–1034.
- [183] J. Parant, A. Chavez-Reyes, N. A. Little, W. Yan, V. Reinke, A. G. Jochemsen, G. Lozano, *Nat. Genet.* **2001**, 29, 92–95.
- [184] J. C. Marine, A. G. Jochemsen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 331, 750–760.
- [185] S. Uhrinova, D. Uhrin, H. Powers, K. Watt, D. Zheleva, P. Fischer, C. McInnes, P. N. Barlow, *J. Mol. Biol.* **2005**, 350, 587–598.
- [186] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. A. Liu, *Science* **2004**, 303, 844–848.
- [187] D. C. Fry, S. D. Emerson, S. Palme, B. T. Vu, C. M. Liu, F. Podlaski, *J. Biomol. NMR* **2004**, 30, 163–173.
- [188] J. Buchner, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 1587–1588.
- [189] S. Walter, J. Buchner, *Angew. Chem. **2002***, 114, 1142–1158; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1098–1113.
- [190] C. Georgopoulos, W. J. Welch, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1993**, 9, 601–634.
- [191] B. Bukau, A. L. Horwich, *Cell* **1998**, 92, 351–366.
- [192] J. Jiang, K. Prasad, E. M. Lafer, R. Sousa, *Mol. Cell* **2005**, 20, 513–524.
- [193] R. P. Beckmann, L. E. Mizzen, W. J. Welch, *Science* **1990**, 248, 850–854.
- [194] J. Frydman, E. Nimmessern, K. Ohtsuka, F. U. Hartl, *Nature* **1994**, 370, 111–117.
- [195] J. P. Hendrick, F. U. Hartl, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 349–384.
- [196] A. Mogk, T. Tomoyasu, P. Goloubinoff, S. Rudiger, D. Roder, H. Langen, B. Bukau, *EMBO J.* **1999**, 18, 6934–6949.
- [197] H. Wegele, L. Muller, J. Buchner, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2004**, 151, 1–44.
- [198] T. R. Hupp, D. P. Lane, K. L. Ball, *Biochem. J.* **2000**, 352 Pt 1, 1–17.
- [199] F. W. King, A. Wawrzynow, J. Hohfeld, M. Zylicz, *EMBO J.* **2001**, 20, 6297–6305.
- [200] K. Sugito, M. Yamane, H. Hattori, Y. Hayashi, I. Tohnai, M. Ueda, N. Tsuchida, K. Ohtsuka, *FEBS Lett.* **1995**, 358, 161–164.
- [201] M. Zylicz, F. W. King, A. Wawrzynow, *EMBO J.* **2001**, 20, 4634–4638.
- [202] S. Akakura, M. Yoshida, Y. Yoneda, S. Horinouchi, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 14649–14657.
- [203] K. Helmbrecht, E. Zeise, L. Rensing, *Cell Proliferation* **2000**, 33, 341–365.
- [204] A. Zaika, N. Marchenko, U. M. Moll, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 27474–27480.
- [205] U. M. Moll, A. G. Ostermeyer, R. Haladay, B. Winkfield, M. Frazier, G. Zambetti, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 1126–1137.
- [206] B. T. Lai, N. W. Chin, A. E. Stanek, W. Keh, K. W. Lanks, *Mol. Cell. Biol.* **1984**, 4, 2802–2810.
- [207] W. J. Welch, J. R. Feramisco, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 14949–14959.
- [208] T. Scheibel, S. Neuhofer, T. Weikl, C. Mayr, J. Reinstein, P. D. Vogel, J. Buchner, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 18608–18613.
- [209] L. Whitesell, S. L. Lindquist, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 761–772.
- [210] M. V. Blagosklonny, J. Toretsky, S. Bohen, L. Neckers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 8379–8383.
- [211] B. Sepehrnia, I. B. Paz, G. Dasgupta, J. Momand, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 15084–15090.
- [212] L. Whitesell, P. D. Sutphin, E. J. Pulcini, J. D. Martinez, P. H. Cook, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, 18, 1517–1524.
- [213] Y. Nagata, T. Anan, T. Yoshida, T. Mizukami, Y. Taya, T. Fujiwara, H. Kato, H. Saya, M. Nakao, *Oncogene* **1999**, 18, 6037–6049.
- [214] S. Adimoolam, J. M. Ford, *DNA Repair* **2003**, 2, 947–954.
- [215] H. Offer, R. Wolkowicz, D. Matas, S. Blumenstein, Z. Livneh, V. Rotter, *FEBS Lett.* **1999**, 450, 197–204.

- [216] J. Zhou, J. Ahn, S. H. Wilson, C. Prives, *EMBO J.* **2001**, *20*, 914–923.
- [217] S. A. Amundson, T. G. Myers, A. J. Fornace, Jr., *Oncogene* **1998**, *17*, 3287–3299.
- [218] L. A. Donehower, *J. Cell. Physiol.* **2002**, *192*, 23–33.
- [219] N. D. Marchenko, A. Zaika, U. M. Moll, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16202–16212.
- [220] G. Lozano, G. P. Zambetti, *J. Pathol.* **2005**, *205*, 206–220.
- [221] L. D. Attardi, L. A. Donehower, *Mutat. Res.* **2005**, *576*, 4–21.
- [222] S. D. Tyner, S. Venkatachalam, J. Choi, S. Jones, N. Ghebranious, H. Igelmann, X. Lu, G. Soron, B. Cooper, C. Brayton, P. S. Hee, T. Thompson, G. Karsenty, A. Bradley, L. A. Donehower, *Nature* **2002**, *415*, 45–53.
- [223] I. Varela, J. Cadinanos, A. M. Pendas, A. Gutierrez-Fernandez, A. R. Folgueras, L. M. Sanchez, Z. Zhou, F. J. Rodriguez, C. L. Stewart, J. A. Vega, K. Tryggvason, J. M. Freije, C. Lopez-Otin, *Nature* **2005**, *437*, 564–568.
- [224] U. M. Moll, S. Wolff, D. Speidel, W. Deppert, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17*, 631–636.
- [225] L. J. Hofseth, A. I. Robles, Q. Yang, X. W. Wang, S. P. Hussain, C. Harris, *Chest* **2004**, *125*, 83S–85S.
- [226] I. Garcia-Cao, M. Garcia-Cao, J. Martin-Caballero, L. M. Criado, P. Klatt, J. M. Flores, J. C. Weill, M. A. Blasco, M. Serrano, *EMBO J.* **2002**, *21*, 6225–6235.
- [227] J. Campisi, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 339–349.
- [228] M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, R. W. Craig, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 6304–6311.
- [229] A. Di Leonardo, S. P. Linke, K. Clarkin, G. M. Wahl, *Genes Dev.* **1994**, *8*, 2540–2551.
- [230] S. P. Linke, K. C. Clarkin, G. M. Wahl, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1171–1179.
- [231] N. F. Mathon, A. C. Lloyd, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 203–213.
- [232] P. Giannakakou, D. L. Sackett, Y. Ward, K. R. Webster, M. V. Blagosklonny, T. Fojo, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 709–717.
- [233] R. M. Buey, J. F. Diaz, J. M. Andreu, A. O'Brate, P. Giannakakou, K. C. Nicolaou, P. K. Sasman, A. Ritzen, K. Namoto, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 225–236.
- [234] P. Giannakakou, M. Nakano, K. C. Nicolaou, A. O'Brate, I. Yu, M. V. Blagosklonny, U. F. Greber, T. Fojo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10855.
- [235] A. O'Brate, P. Giannakakou, *Drug Resist. Updates* **2003**, *6*, 313–322.
- [236] J. M. Stommel, N. D. Marchenko, G. S. Jimenez, U. M. Moll, T. J. Hope, G. M. Wahl, *EMBO J.* **1999**, *18*, 1660–1672.
- [237] Y. P. Zhang, Y. Xiong, *Science* **2001**, *292*, 1910–1915.
- [238] D. A. Freedman, A. J. Levine, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1–7.
- [239] M. Mihara, U. M. Moll, *Methods Mol. Biol.* **2003**, *234*, 203–209.
- [240] A. M. Petros, A. Gunasekera, N. Xu, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, *FEBS Lett.* **2004**, *559*, 171–174.
- [241] J. Edelman, J. Nemunaitis, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2003**, *5*, 611–617.
- [242] A. G. Zeimet, K. Riha, J. Berger, M. Widschwendter, M. Hermann, G. Daxenbichler, C. Marth, *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1153–1163.
- [243] A. C. Joerger, H. C. Ang, D. B. Veprintsev, C. M. Blair, A. R. Fersht, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16030–16037.
- [244] A. M. Wieczorek, J. L. Waterman, M. J. Waterman, T. D. Hazzonetis, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 1143–1146.
- [245] P. V. Nikolova, K. B. Wong, B. DeDecker, J. Henckel, A. R. Fersht, *EMBO J.* **2000**, *19*, 370–378.
- [246] P. V. Nikolova, J. Henckel, D. P. Lane, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 14675–14680.
- [247] A. C. Joerger, M. D. Allen, A. R. Fersht, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 1291–1296.
- [248] A. N. Bullock, J. Henckel, B. S. DeDecker, C. M. Johnson, P. V. Nikolova, M. R. Proctor, D. P. Lane, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 14338–14342.
- [249] C. R. Brown, L. Q. Hong-Brown, W. J. Welch, *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 1432–1444.
- [250] D. Maurici, P. Monti, P. Campomenosi, S. North, T. Frebourg, G. Fronza, P. Hainaut, *Oncogene* **2001**, *20*, 3533–3540.
- [251] S. North, O. Pluquet, D. Maurici, F. El Ghissassi, P. Hainaut, *Mol. Carcinog.* **2002**, *33*, 181–188.
- [252] K. Ohnishi, I. Ota, A. Takahashi, T. Ohnishi, *Br. J. Cancer* **2000**, *83*, 1735–1739.
- [253] T. Ohnishi, K. Ohnishi, X. Wang, A. Takahashi, K. Okaichi, *Radiat. Res.* **1999**, *151*, 498–500.
- [254] T. Ohnishi, H. Matsumoto, X. Wang, A. Takahashi, T. Tamamoto, K. Ohnishi, *Int. J. Radiat. Biol.* **1999**, *75*, 1095–1098.
- [255] V. J. Bykov, G. Selivanova, K. G. Wiman, *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 1828–1834.
- [256] B. A. Foster, H. A. Coffey, M. J. Morin, F. Rastinejad, *Science* **1999**, *286*, 2507–2510.
- [257] M. L. Smith, A. J. Fornace, *Cancer Biol. Ther.* **2002**, *47*–55.
- [258] Y. Luu, G. Li, *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *119*, 1207–1209.
- [259] Y. Luu, J. Bush, K. J. Cheung, Jr., G. Li, *Exp. Cell Res.* **2002**, *276*, 214–222.
- [260] R. Takimoto, W. Wang, D. T. Dicker, F. Rastinejad, J. Lyssikatos, W. S. El-Deiry, *Cancer Biol. Ther.* **2002**, *47*–55.
- [261] M. J. Demma, S. Wong, E. Maxwell, B. Dasmahapatra, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 45887–45896.
- [262] J. Wischhusen, U. Naumann, H. Ohgaki, F. Rastinejad, M. Weller, *Oncogene* **2003**, *22*, 8233–8245.
- [263] T. M. Rippin, V. J. Bykov, S. M. Freund, G. Selivanova, K. G. Wiman, A. R. Fersht, *Oncogene* **2002**, *21*, 2119–2129.
- [264] S. Tanner, A. Barberis, *J. Negat. Results Biomed.* **2004**, *3*, 5.
- [265] Y. Li, Y. Mao, P. W. Brandt-Rauf, A. C. Williams, R. L. Fine, *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 901–909.
- [266] V. J. Bykov, N. Issaeva, G. Selivanova, K. G. Wiman, *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 2011–2018.
- [267] V. J. Bykov, N. Zache, H. Stridh, J. Westman, J. Bergman, G. Selivanova, K. G. Wiman, *Oncogene* **2005**, *24*, 3484–3491.
- [268] M. C. Myers, J. Wang, J. A. Iera, J. K. Bang, T. Hara, S. Saito, G. P. Zambetti, D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6152–6153.
- [269] V. J. Bykov, N. Issaeva, N. Zache, A. Shilov, M. Hultcrantz, J. Bergman, G. Selivanova, K. G. Wiman, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 30384–30391.
- [270] S. Gorina, N. P. Pavletich, *Science* **1996**, *274*, 1001–1005.
- [271] A. Friedler, L. O. Hansson, D. B. Veprintsev, S. M. Freund, T. M. Rippin, P. V. Nikolova, M. R. Proctor, S. Rudiger, A. R. Fersht, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 937–942.
- [272] A. Friedler, B. S. DeDecker, S. M. Freund, C. Blair, S. Rudiger, A. R. Fersht, *J. Mol. Biol.* **2004**, *336*, 187–196.
- [273] N. Issaeva, A. Friedler, P. Bozko, K. G. Wiman, A. R. Fersht, G. Selivanova, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13303–13307.
- [274] A. Friedler, D. B. Veprintsev, L. O. Hansson, A. R. Fersht, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24108–24112.
- [275] A. Lakkaraju, J. M. Dubinsky, W. C. Low, Y. E. Rahman, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32000–32007.
- [276] M. V. Blagosklonny, *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 161–166.
- [277] E. A. Komarova, A. V. Gudkov, *Semin. Cancer Biol.* **1998**, *8*, 389–400.
- [278] P. G. Komarov, E. A. Komarova, R. V. Kondratov, K. Christov-Tselkov, J. S. Coon, M. V. Chernov, A. V. Gudkov, *Science* **1999**, *285*, 1733–1737.
- [279] E. A. Komarova, A. V. Gudkov, *Biochemistry* **2000**, *65*, 41–48.
- [280] C. Culmsee, X. Zhu, Q. S. Yu, S. L. Chan, S. Camandola, Z. Guo, N. H. Greig, M. P. Mattson, *J. Neurochem.* **2001**, *77*, 220–228.
- [281] A. Gudkov, P. Komarov, E. Komarova, *Patentschrift* **2000**, 00-02104.

- [282] L. Bassi, M. Carloni, E. Fonti, N. Palma de la Pena, R. Meschini, F. Palitti, *Mutat. Res.* **2002**, *499*, 163–176.
- [283] A. V. Gudkov, E. A. Komarova, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 726–736.
- [284] E. A. Komarova, A. V. Gudkov, *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 657–667.
- [285] J. P. Blaydes, V. Gire, J. M. Rowson, D. Wynford-Thomas, *Oncogene* **1997**, *14*, 1859–1868.
- [286] A. Bottger, V. Bottger, A. Sparks, W. L. Liu, S. F. Howard, D. P. Lane, *Curr Biol* **1997**, *7*, 860–869.
- [287] L. Chen, W. Lu, S. Agrawal, W. Zhou, R. Zhang, J. Chen, *Mol. Med.* **1999**, *5*, 21–34.
- [288] T. Geiger, D. Husken, J. Weiler, F. Natt, K. A. Woods-Cook, J. Hall, D. Fabbro, *Anti-Cancer Drug Des.* **2000**, *15*, 423–430.
- [289] H. Wang, X. Zeng, P. Oliver, L. P. Le, J. Chen, L. Chen, W. Zhou, S. Agrawal, R. Zhang, *Int. J. Oncol.* **1999**, *15*, 653–660.
- [290] H. Wang, L. Nan, D. Yu, S. Agrawal, R. Zhang, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 3613–3624.
- [291] Z. Zhang, M. Li, H. Wang, S. Agrawal, R. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11636–11641.
- [292] U. M. Moll, O. Petrenko, *Mol. Cancer Res.* **2003**, *1*, 1001–1008.
- [293] R. Montes de Oca Luna, D. S. Wagner, G. Lozano, *Nature* **1995**, *378*, 203–206.
- [294] S. N. Jones, A. E. Roe, L. A. Donehower, A. Bradley, *Nature* **1995**, *378*, 206–208.
- [295] S. M. Mendrysa, M. K. McElwee, J. Michalowski, K. A. O’Leary, K. M. Young, M. E. Perry, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 462–472.
- [296] Z. Lai, K. V. Ferry, M. A. Diamond, K. E. Wee, Y. B. Kim, J. Ma, T. Yang, P. A. Benfield, R. A. Copeland, K. R. Auger, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31357–31367.
- [297] I. V. Davydov, D. Woods, Y. J. Safiran, P. Oberoi, H. O. Fearnhead, S. Fang, J. P. Jensen, A. M. Weissman, J. H. Kenten, K. H. Vousden, *J. Biomol. Screening* **2004**, *9*, 695–703.
- [298] V. Bottger, A. Bottger, S. F. Howard, S. M. Picksley, P. Chene, C. Garcia-Echeverria, H. K. Hochkeppel, D. P. Lane, *Oncogene* **1996**, *13*, 2141–2147.
- [299] A. Bottger, V. Bottger, C. Garcia-Echeverria, P. Chene, H. K. Hochkeppel, W. Sampson, K. Ang, S. F. Howard, S. M. Picksley, D. P. Lane, *J. Mol. Biol.* **1997**, *269*, 744–756.
- [300] C. Garcia-Echeverria, P. Chene, M. J. Blommers, P. Furet, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3205–3208.
- [301] M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 301–317.
- [302] P. L. Toogood, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1543–1558.
- [303] A. G. Cochran, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 85–94.
- [304] H. Yin, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4200–4235; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4130–4163.
- [305] R. Stoll, C. Renner, S. Hansen, S. Palme, C. Klein, A. Belling, W. Zeslawski, M. Kamionka, T. Rehm, P. Muhlmann, R. Schumacher, F. Hesse, B. Kaluza, W. Voelter, R. A. Engh, T. A. Holak, *Biochemistry* **2001**, *40*, 336–344.
- [306] S. K. Kumar, E. Hager, C. Pettit, H. Gurulingappa, N. E. Davidson, S. R. Khan, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2813–2815.
- [307] J. Zhao, M. Wang, J. Chen, A. Luo, X. Wang, M. Wu, D. Yin, Z. Liu, *Cancer Lett.* **2002**, *183*, 69–77.
- [308] J. A. Kritzer, R. Zutshi, M. Cheah, F. A. Ran, R. Webman, T. M. Wongjirad, A. Schepartz, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 29–31.
- [309] S. J. Duncan, M. A. Cooper, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **2003**, *316*–317.
- [310] D. P. Lane, P. M. Fischer, *Nature* **2004**, *427*, 789–790.
- [311] N. Fotouhi, B. Graves, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 159–165.
- [312] P. Raboisson, J. J. Marugan, C. Schubert, H. K. Koblish, T. Lu, S. Zhao, M. R. Player, A. C. Maroney, R. L. Reed, N. D. Huebert, J. Lattanzio, D. J. Parks, M. D. Cummings, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1857–1861.
- [313] B. L. Grasberger, T. Lu, C. Schubert, D. J. Parks, T. E. Carver, H. K. Koblish, M. D. Cummings, L. V. LaFrance, K. L. Milkiewicz, R. R. Calvo, D. Maguire, J. Lattanzio, C. F. Franks, S. Zhao, K. Ramachandren, G. R. Bylebyl, M. Zhang, C. L. Manthey, E. C. Petrella, M. W. Pantoliano, I. C. Deckman, J. C. Spurlino, A. C. Maroney, B. E. Tomczuk, C. J. Molloy, R. F. Bone, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 909–912.
- [314] D. J. Parks, L. V. LaFrance, R. R. Calvo, K. L. Milkiewicz, V. Gupta, J. Lattanzio, K. Ramachandren, T. E. Carver, E. C. Petrella, M. D. Cummings, D. Maguire, B. L. Grasberger, T. Lu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 765–770.
- [315] K. Ding, Y. Lu, Z. Nikolovska-Coleska, S. Qiu, Y. Ding, W. Gao, J. Stuckey, K. Krajewski, P. P. Roller, Y. Tomita, D. A. Parrish, J. R. Deschamps, S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10130–10131.
- [316] I. R. Hardcastle, S. U. Ahmed, H. Atkins, A. H. Calvert, N. J. Curtin, G. Farnie, B. T. Golding, R. J. Griffin, S. Guyenne, C. Hutton, P. Kallblad, S. J. Kemp, M. S. Kitching, D. R. Newell, S. Norbedo, J. S. Northen, R. J. Reid, K. Saravanan, H. M. Willems, J. Lunec, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1515–1520.
- [317] H. Yin, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4200–4235; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4130–4163.
- [318] R. Fasan, R. L. Dias, K. Moehle, O. Zerbe, J. W. Vrijbloed, D. Obrecht, J. A. Robinson, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2161–2164; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2109–2112.
- [319] J. A. Kritzer, J. D. Lear, M. E. Hodsdon, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9468–9469.
- [320] J. A. Kritzer, M. E. Hodsdon, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4118–4119.
- [321] K. Sakurai, H. S. Chung, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16288–16289.
- [322] M. Krajewski, P. Ozdowy, L. D’Silva, U. Rothweiler, T. A. Holak, *Nat. Med.* **2005**, *11*, 1135–1136.
- [323] Y. Yang, R. L. Ludwig, J. P. Jensen, S. A. Pierre, M. V. Medaglia, I. V. Davydov, Y. J. Safiran, P. Oberoi, J. H. Kenten, A. C. Phillips, A. M. Weissman, K. H. Vousden, *Cancer Cell* **2005**, *7*, 547–559.
- [324] S. R. Grossman, M. E. Deato, C. Brignone, H. M. Chan, A. L. Kung, H. Tagami, Y. Nakatani, D. M. Livingston, *Science* **2003**, *300*, 342–344.
- [325] A. Shmueli, M. Oren, *Mol. Cell* **2004**, *13*, 4–5.
- [326] D. P. Lane, T. R. Hupp, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 347–55.
- [327] D. Lane, *Carcinogenesis* **2004**, *25*, 1077–1081.