

# p63 – Ein neuer Wächter für das Genom

## Den Stammzellen auf der Spur

Seit seiner Entdeckung steht das Tumorsuppressorprotein p53 im Mittelpunkt unzähliger klinischer und nicht-klinischer Studien. p53 reguliert die zelluläre Antwort auf Stresssignale, wie zum Beispiel DNA-Schäden und Sauerstoffunterversorgung, auf zwei verschiedene Weisen: durch Stopp der Zellteilung (Zellzyklusarrest) oder programmierten Zelltod (Apoptose). Diese Rolle hat p53 den Spitznamen »Guardian of the Genome« eingebracht. Die große Bedeutung von p53 für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität lässt sich an der Tatsache ablesen, dass p53 in mehr als der Hälfte aller menschlichen Tumore mutiert ist. Darüber hinaus ist p53 ein sehr wichtiges Zielprotein für virale Krebsproteine. So ist zum Beispiel die Entstehung von Gebärmutterhalskrebs auf die Inaktivierung von p53 durch das Papillomavirusprotein E6 zurückzuführen. Schließlich kann p53 auch durch die vermehrte Bildung (Überexpression) seiner natürlichen negativen Inhibitoren wie zum Beispiel MDM2 (Mouse Double Minute 2) inaktiviert werden. Sarkoma-Geschwüre (gehen aus dem Bindegewebe hervor) zeigen beispielsweise oft eine erhöhte zelluläre MDM2-Konzentration.

Trotz der zentralen Rolle, die p53 bei der Regulierung des Zellzyklus spielt, können sich viele menschliche Tumoren auch unter Bedingungen entwickeln, in denen die p53-Aktivität nicht eingeschränkt ist. Diese Erkenntnis hat die Suche nach weiteren Tumorsuppressorproteinen vorangetrieben, die in derartigen Tumoren mit intaktem p53 mutiert sind. Inzwischen wurde ein potenziell neues Tumorsuppressorprotein identifiziert, das p73, das p53 sehr ähnlich ist, also eine hohe Homologie aufweist. Interessanterweise ist p73 auf einem Chromosomenstück lokalisiert, das in Neuroblastomen und anderen menschlichen Tumoren häufig fehlt. Auch das kürzlich entdeckte Protein p63 hat eine hohe Homologie zu p53.

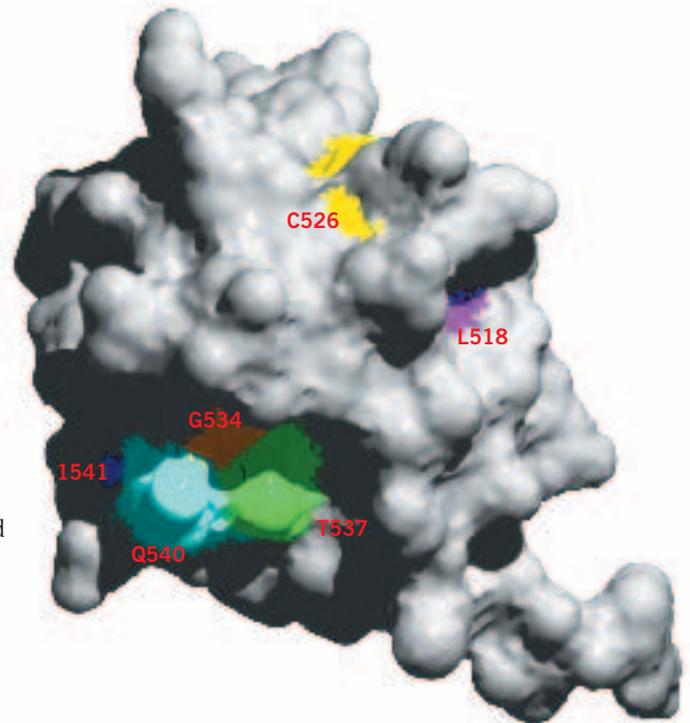
Alle drei Proteine, p53, p73 und p63, weisen eine ähnliche Domä-

nenorganisation auf, die aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne, einer zentralen DNA-Bindungsdomäne und einer C-terminalen Oligomerisierungsdomäne besteht. Im Bereich der DNA-Bindungsdomäne stimmen 65 Prozent der Aminosäuren (Proteinbausteine) mit denen von p53 überein, inklusive aller Aminosäuren, die in Kontakt mit der DNA stehen. Aufgrund dieser großen Ähnlichkeit wurde vorgeschlagen, dass die Überwachung des Zellzyklus nicht nur durch p53 erfolgt, sondern von einem Protein-Netzwerk, bestehend aus p53, p73 und p63, ausgeführt wird. Solche Netzwerke von Proteinen, die alle eine ähnliche Aufgabe haben, sind auch aus anderen Bereichen bekannt.

### Knock-out-Mäuse als Modell

Die biologische Funktion von p63 wurde an Knock-out-Mäusen – diese Mäuse können bestimmte Genprodukte nicht bilden, hier das p63-Protein – untersucht **1**. Während die p53-Knock-out-Maus hauptsächlich dadurch charakterisiert ist, dass sie Tumoren bildet, sonst aber keine weiteren Auffälligkeiten aufweist, zeigen die p63-Knock-out-Mäuse sehr starke Entwicklungsschäden. Sie werden zwar lebend geboren, ihnen fehlen aber große Teile der äußeren Extremitäten. Ihre Haut besteht nur aus einer primitiven, einzellschichtigen Struktur, im Gegensatz zu normaler Haut, die aus mehreren Zellschichten aufgebaut ist. Darüber hinaus fehlen den p63-Knock-out-Mäusen die Zähne, Schurhaare, Augenlider sowie Milch-, Tränen- und Speicheldrüsen.

Die Inaktivierung von p73 sorgte für weitere Überraschungen, denn diese Mäuse zeigen ebenfalls starke entwicklungsbiologische Schäden, die jedoch nicht mit denen der p63-Knock-out-Maus überlappen. So weisen p73-Knock-out-Mäuse Gehirnschäden, Defekte in der Wahrnehmung von Pheromonen und chronische Infektionen auf. Damit wurde deutlich, dass sich die biologische Funktion sowohl von p63 als auch von p73 deutlich von derjenigen des p53 unterscheidet. Inzwi-

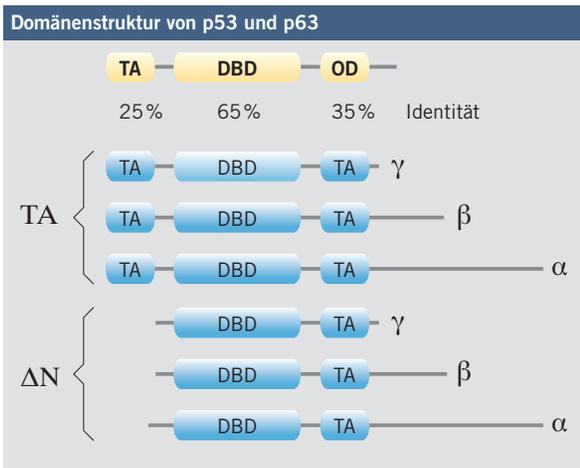


schen ist bekannt, dass p63 einen wesentlichen Faktor für die Regulation von Hautstammzellen darstellt. Ohne p63 existieren diese wichtigen Stammzellen, die für eine kontinuierliche Regeneration der Haut sorgen, nicht. Da auch die Extremitäten aus Strukturen des Epithelgewebes gebildet werden, lassen sich somit auch die Defekte in den Gliedmaßen der Mäuse erklären. Im Falle von p73 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein für die Entwicklung bestimmter Nervenzellen wichtig ist.

### Gleiche Struktur – unterschiedliche Funktion

Eine der zentralen Fragen jedoch bleibt weiterhin unbeantwortet: Wie ist es möglich, dass zwei Proteine wie p53 und p63 einander in Sequenz und Struktur so ähnlich sind, sich in ihrer biologischen Aktivität jedoch so sehr unterscheiden? Der Schlüssel zur Beantwortung dieser Frage findet sich vermutlich in den C-terminalen Enden der Proteine **2**. Während der C-Terminus von p53 eine aus nur 26 Aminosäuren bestehende, unstrukturierte Domäne bildet, existiert der C-Terminus von p63 in drei verschiedenen Variationen. Die kürzeste Form, p63-gamma genannt, ist p53 am ähnlichsten und besitzt ei-

**1** In der Struktur der SAM-Domäne von p63 sind die Aminosäuren bunt eingezeichnet, die bei Patienten mutiert sind. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Volker Dötsch untersucht die Struktur einzelner Domänen des Proteins mit Hilfe der NMR-Spektroskopie.



nen 50 Aminosäuren langen unstrukturierten C-Terminus. Die längste Form hingegen, p63-alpha, hat einen C-Terminus von 245 Aminosäuren, der in drei Domänen unterteilt ist: Eine davon, die so genannte SAM-Domäne (Sterile Alpha Motif), ist strukturiert, während die anderen beiden unstrukturiert sind. Auch der N-Terminus von p63 kommt in zwei

**2** Vergleich der Domänenstruktur von p53 (gelb) mit verschiedenen Isoformen von p63 (blau). Die sechs verschiedenen p63 Isoformen entstehen aus der Kombination von drei verschiedenen C-Termini (alpha, beta, gamma) sowie von zwei verschiedenen N-Termini (TA und Delta).  
TA = Transaktivierungsdomäne  
DBD = DNA-Bindungsdomäne  
OD = Oligomerisierungsdomäne

verschiedenen Variationen vor, einer Variante mit vollständiger und einer Variante mit verkürzter Transaktivierungsdomäne. Durch die Kombination der drei verschiedenen C-Termini mit den beiden N-Termini ergeben sich somit sechs verschiedene Formen des Proteins p63. Im Falle von p73 ist die Formenvielfalt sogar noch ausgeprägter, denn zu den zwei N-Termini kommen sechs verschiedene C-Termini.

**Bedeutung der Proteinenden**

Zellbiologische Untersuchungen der Aktivität der verschiedenen p63 Varianten haben ergeben, dass die N- und C-terminalen Domänen einen großen Einfluss auf die Umschreibung der DNA in RNA, die zur Proteinbiosynthese benötigt wird (transkriptionelle Aktivität), haben. Formen, denen die N-terminale Transaktivierungsdomäne

fehlt, besitzen keine transkriptionelle Aktivität. Überraschend hingegen war das Ergebnis, dass auch p63-alpha-Varianten mit dem langen C-Terminus transkriptionell inaktiv sind. Dies deutet darauf hin, dass sich in dem C-Terminus der alpha-Varianten eine regulatorische Domäne des Proteins befindet.

Durch weitere zellbiologische und biochemische Untersuchungen konnte diese Domäne tatsächlich auch von unserer Arbeitsgruppe identifiziert werden. Interessanterweise wurden gleichzeitig in der Arbeitsgruppe um Hans van Bokhoven am Universitätshospital in Nijmegen, Niederlande, die genetischen Ursachen von Syndromen beim Menschen untersucht, die durch Deformationen der Hände und Füße sowie Entwicklungsstörungen der Haut gekennzeichnet sind **3 4**. Wie sich bereits aufgrund der Ähnlichkeit des Erscheinungsbilds dieser Patienten mit den p63-Knock-out-Mäusen vermuten ließ, wird das EEC (Ectrodactyly, Ectodermal dysplasia, and Cleft lip with or without cleft palate) genannte Syndrom durch Mutationen im menschlichen p63-Gen verursacht. Die meisten Mutationen, die zum EEC-Syndrom führen, sind in der DNA-Bindungsdomäne von p63 lokalisiert und führen zur Inaktivierung aller p63-Isoformen. Gleichzeitig wurden aber Patienten entdeckt, die innerhalb des alpha-C-Terminus eine Verschiebung des DNA-Leserasters aufweisen, was letztendlich die Bildung eines stark verkürzten alpha-C-Terminus zur Konsequenz hat, dem die regulatorische Domäne fehlt. Das Erscheinungsbild der Patienten mit Leserastermutation oder DNA-Bindungsdomänenmutation ist sehr ähnlich; dies unterstreicht die große Bedeutung des alpha-C-Terminus



**3** Patientin mit EEC-Syndrom, verursacht durch den Austausch von Arginin 204 gegen ein Tryptophan. Die typischen Deformationen der Lippen und des Gaumens sowie die geringe Behaarung sind deutlich zu erkennen.

**Literatur:**

Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dötsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. and McKeon, F. (1998), p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Molecular Cell* 2, Seite 305-316.

Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. and McKeon, F. (1999), p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398, Seite 714-718.

Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Osterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F. and Caput, D. (2000), p73-deficient mice have neurological, phenomonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 404, Seite 99-102.

Serber, Z., Lai, H.C., Yang, A., Ou, H.D., Sigal, M.S., Kelly, A.E., Darimont, B.D., Duijff, P.H.G., van Bokhoven, H., McKeon, F. and Dötsch, V. (2002), A C-terminal inhibitory domain controls the activity of p63 by an intramolecular mechanism. *Mol. Cell Biol.* 22, Seite 8601-8611.

McGrath, J. A., Duijff, P., Kelly, A., Dötsch, V., Irvine, A.D., de Waal, R., Vanmolkot, K., Wessagowitz, V., Atherton, D. J., Griffiths, W.A.D., Orlow, S.J., Yang, A., McKeon, F., Bamschad, M. A., Brunner, H. G., Hamel, B. C. J., van Bokhoven, H. (2001), Hay-Wells syndrome is caused by missense mutations in the SAM domain of p63. *Human Molecular Genetics*, 10, Seite 221-229.

Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Cha-

für die Regulation der transkriptionellen Aktivität von p63.

Gegenwärtig versucht unsere Arbeitsgruppe, im Verbund mit unseren Partnerlaboren um Frank McKeon von der Harvard Medical School in Boston, USA, mit Hans van Bokhoven vom Universitäts-hospital in Nijmegen, Niederlande, sowie mit der Arbeitsgruppe von Werner Kühlbrandt vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt und der Arbeitsgruppe um Michael Karas an der Universität Frankfurt, die biologische Funktion von p63 weiter zu untersuchen. Unsere Gruppe konzentriert sich dabei zum einen auf die Untersuchung des regulatorischen Mechanismus mit Hilfe von zellbiologischen und biochemischen Experimenten und zum anderen auf die Untersuchung der Struktur einzelner Domänen von p63 durch NMR-Spektroskopie. Außerdem untersuchen wir die dreidimensionale Form des gesamten Proteins. In die so ermittelte äußere Hülle des Proteins wollen wir dann die von uns ermittelten NMR-Strukturen einbetten, um so ein dreidimensionales Protein-Modell zu erhalten, dessen Struktur die beob-



4 Typische Deformationen der Hände (oben) sowie der Füße (unten) von Patienten mit EEC Syndrom.

achteten regulatorischen Effekte erklärt.

#### Komplexes Proteom

Die Frage, ob p63 neben seiner entwicklungsbiologischen Funktion auch noch eine Rolle zum Beispiel bei der Entstehung von Hautkrebs spielt, lässt sich gegenwärtig noch nicht mit Sicherheit beantworten. Eines hat uns p63 aber bereits jetzt gezeigt: Der Mensch mag zwar »nur« 30 000 bis 40 000 Gene haben, die Komplexität der daraus entstehenden Proteine ist aber sehr viel größer, da in einem Gen mehrere Proteinvarianten mit unterschiedlichen Funktionen kodiert sein können. ♦

Anzeige

#### Der Autor

**Prof. Dr. Volker Dötsch** studierte Chemie an der Universität Göttingen. Seit seiner Doktorarbeit an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich beschäftigt er sich mit strukturellen Untersuchungen von Proteinen mit Hilfe von NMR-Spektroskopie. Nach seiner Promotion 1994 in der Arbeitsgruppe von Kurt Wüthrich wechselte er als Postdoktorand an die Harvard Medical School in Boston, USA, und arbeitete sowohl in der Arbeitsgruppe von Gerhard Wagner als auch in der Arbeitsgruppe von Frank McKeon. 1998 wurde er Assistant Professor an der University of California in San Francisco. Im Jahre 2003 folgte er dem Ruf auf eine Professur am Institut für Biophysikalische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität. Seine Hauptforschungsinteressen konzentrieren sich auf die strukturelle Untersuchung von Regulationsmechanismen der Aktivität von Proteinen, wobei als wesentliche Methode die NMR-Spektroskopie eingesetzt wird.

Ion, P., Lelias, J. M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F. and Caput, D. (1997), Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers, Cell 90, Seite 809–819.

Celli, J., Duijff, P., Hamel, B.C.J., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A.P.T., Newbury-Ecob, R., Hennekam, R.C.M., van Buggenhout, G., van Haeringen, A., Woods, C. G., van Essen, A.J., de Waal, R., Vriend, G., Haber, D.A., Yang, A., McKeon,

F., Brunner, H.G. and van Bokhoven, H. (1999), Heterozygous germ line mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome, Cell 99, Seite 143–153.

**BRUKER**

**NMR** **EPR**

**MRI**

**Bruker BioSpin GmbH**  
**D-76287 Rheinstetten**  
[www.bruker-biospin.de](http://www.bruker-biospin.de)

**BRUKER BIOSPIN**