

Informationsblatt 7:

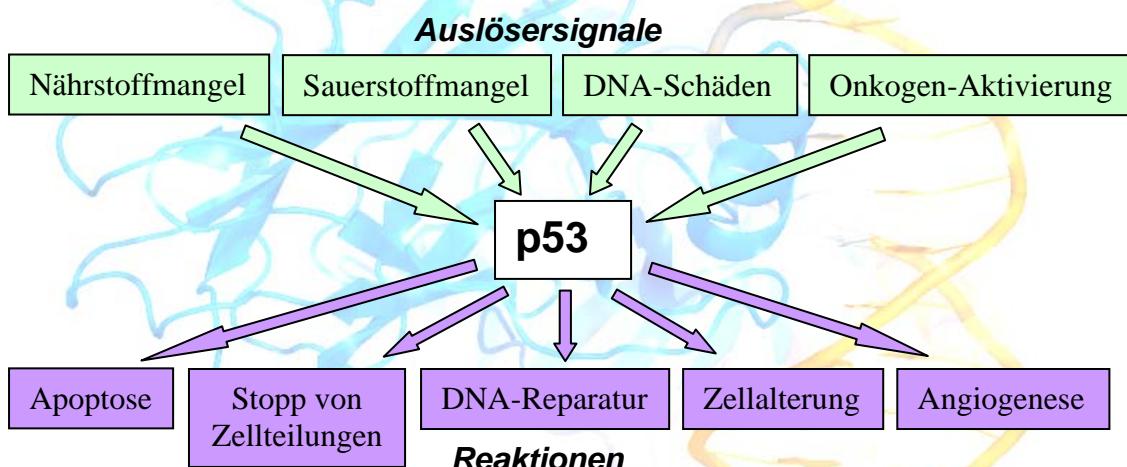
p53 – Schutzengel des Genoms

Das Tumorsuppressor-Protein p53 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Gen beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiert ist. In der Kurzbezeichnung steht der Buchstabe p für Protein und 53 für die Molekülmasse in Kilodalton, wie sie in der Gelelektrophorese ermittelt wurde. Das menschliche p53 ist 393 Aminosäuren lang und besitzt 7 Domänen:



| Domäne | Position | Funktion |
|--------|----------|--|
| AD 1 | 1-42 | Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren (z.B. für Gene von DNA-Reparaturenzymen) |
| AD 2 | 43-63 | |
| PR | 80-94 | Aktivierung der Apoptose |
| DBD | 100-300 | DNA-Bindungsregion |
| OD | 307-355 | Bindungsregion für weitere p53; p53 ist erst nach Zusammenlagerung von 4 p53-Proteinen funktionsfähig (= Tetramerisierung) |
| NLS | 316-325 | Signal für den Transport in den Zellkern |
| DRDB | 356-393 | regelt DNA-Bindung nach unten |

Bereits beim Kapitel über Apoptose wurde erläutert, dass unterschiedliche extra- und intrazelluläre Signale eine Zelle in den programmierten Zellselbstmord treiben können. Das p53 zeigt hinsichtlich seiner Aktivierung ein vergleichbares Spektrum; p53 ist sogar in der Lage auf unterschiedliche Signale verschiedenartige Prozesse zu initiieren. Hier ein Überblick:



Wie kann ein einzelnes Protein so etwas leisten?????????????????????

Glossar:

Dalton (Da): nach dem englischen Naturforscher John Dalton benannte Masseeinheit, die bei Masseangaben von Biomolekülen verwendet wird ($1\text{Da} = 1\text{u} = 1,660 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$; 1 Kilodalton = 1.000 u)

Gelelektrophorese: Methode zur Auftrennung von Gemischen elektrisch geladener hochmolekularer Stoffe (vor allem Proteine, Nukleinsäuren)

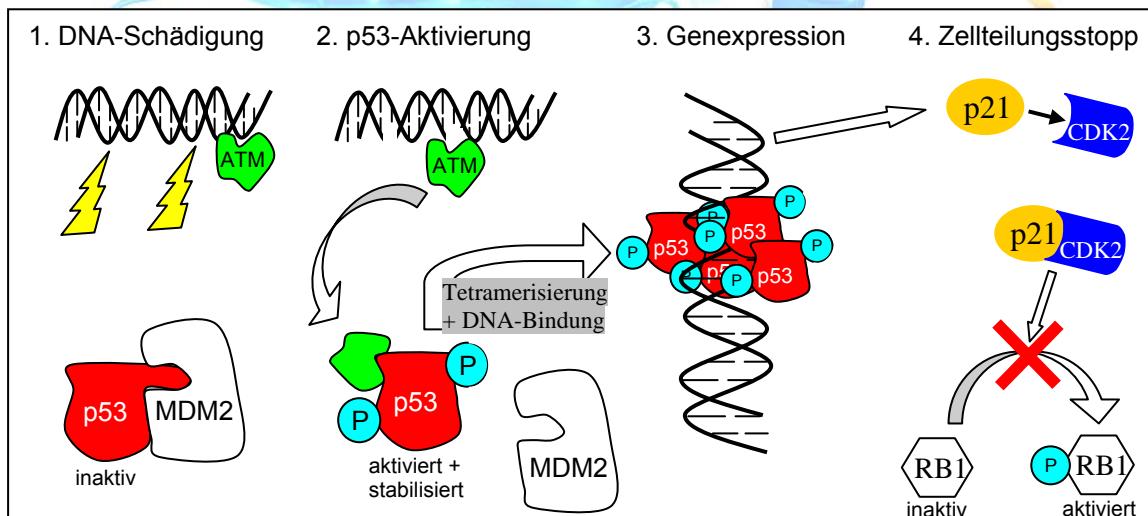
Domäne: Bereich eines Proteins mit definierter Funktion und Konformation innerhalb der Tertiärstruktur

Unter Menschen würde man beispielsweise miteinander reden oder eine Nachricht schreiben. p53 kann zwar einiges, aber weder hören noch lesen. Dennoch werden intrazellulär z.B. von der Zelloberfläche in den Zellkern oder zwischen benachbarten Zellen Informationen versandt. Dies geschieht auf molekularer Ebene immer nach dem gleichen Prinzip: durch eine chemische Reaktion mit einem Enzym oder Zusammenlagerung verschiedener Moleküle wird die dreidimensionale Struktur eines Proteins verändert. Die Variationsbreite solcher so genannter posttranslationaler Modifikationen ist enorm: z.B.

- Phosphorylierung-Dephosphorylierung (Anfügen oder Entfernen einer Phosphat-Gruppe)
- Glykosylierung-Deglykosylierung (Anfügen oder Entfernen versch. Zuckerreste)
- Methylierung-Demethylierung (Anfügen oder Entfernen einer CH_3 -Gruppe)
-u.a.m.

Das p53 ist ein Paradebeispiel, wie unterschiedliche chemische Veränderungen an verschiedenen Stellen im Molekül unterschiedliche Prozesse in Gang setzen können. Beispiel einer Signalkaskade infolge von DNA-Schädigung:

1. p53 ist in normalen Zellen aufgrund der Bindung an das Protein MDM2 inaktiv; p53 kommt nur in geringen Mengen vor, weil MDM2 eine chemische Veränderung bewirkt, wodurch p53 aus dem Zellkern transportiert wird und im Cytoplasma abgebaut wird.
2. DNA-Schäden infolge von Strahlen oder Chemikalien aktivieren bestimmte Enzyme (= Kinasen wie ATM), die an p53 Phosphat-Gruppen binden (= phosphorylieren) → MDM2 kann nicht länger an p53 binden → p53-Moleküle bilden im Kern stabile Vierer-Einheiten (= Tetramere).
3. p53-Tetramere sind Transkriptionsfaktoren: sie binden an bestimmte Stellen der DNA und stimulieren die Bildung weiterer Proteine (z.B. p21) → p21 bindet an bestimmte Enzyme, die den Eintritt in die Zellteilung bewirken (z.B. CDK2), und inaktiviert sie.
4. die Inaktivierung von CDK2 verhindert die Phosphorylierung des Proteins RB1 → Zelle kann die G1-Phase des Zellzyklus nicht verlassen (Stopp jeglicher Zellteilungen).



Solange Kinasen wie ATM infolge von DNA-Schäden aktiviert sind, wird der Zellteilungsstopp aufrechterhalten. Konnten DNA-Reparaturenzyme die Schäden beheben, wird diese Signalkaskade gestoppt und die Zelle kann sich wieder teilen. Für die Auslösung von Prozessen wie Apoptose gibt es vergleichbare Signalkaskaden, die jedoch durch andere Proteine und Enzyme gesteuert werden.

Quellen (Dez. 2008):

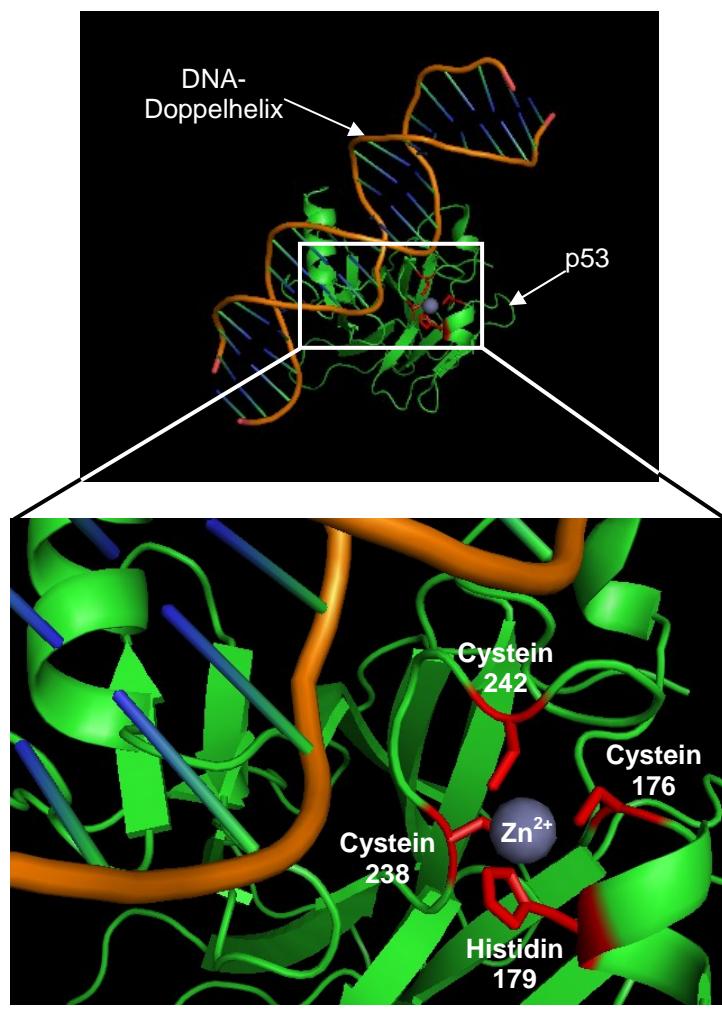
1. <http://en.wikipedia.org/wiki/p53>
2. p53 in health and disease, K. H. Vousden and D. P. Lane, Nature Reviews, 2007, Vol. 8, S. 275 ff
3. <http://p53.free.fr/index.html>

Arbeitsblatt 10:

Wie führt der Flügelschlag eines Schmetterlings zum GAU? – oder: Warum kann ein einzelnes Protein eine Zelle ins Chaos stürzen?

Das Tumorsuppressor-Protein p53 ist ein „Multitasker“, der durch spezifische Bindung an DNA oder andere Proteine Vorgänge wie Apoptose, Zellteilung oder Angiogenese steuert. Wie kann p53 aus einer Vielzahl von Molekülen innerhalb der Zelle genau das Richtige auswählen? 1894 prägte der deutsche Chemiker EMIL FISCHER die Modellvorstellung vom „**Schlüssel-Schloss-Prinzip**“ und umschrieb damit am Beispiel von Enzymen und ihren Substraten Molekülwechselwirkungen, die auf einem exakten ineinander greifen von Oberflächenformen und chemischen Gruppen beruht. Durch technische Neuerungen konnte nicht nur der direkte Beweis für die Richtigkeit von FISCHERS Hypothese beim Enzym-Substrat-Komplex geliefert werden; sie wird mittlerweile auch als Grundprinzip für alle spezifischen Interaktionen auf molekularer Ebene anerkannt (z.B. Antigen-Antikörper, Hormon-Hormonrezeptor, Zell-Zell-Adhäsion, Virusinfektion von Zellen).

Nach Kristallisation der Moleküle können mittels Röntgenstrahlen so genannte Beugungsmuster beobachtet werden, aus denen computergestützt die exakte räumliche Position jedes Atoms im Molekül berechnet werden kann (= Röntgenstrukturanalyse). Neben Sequenzdaten für Nukleinsäuren und Proteine vieler Organismen existieren mittlerweile Abermillionen von 3D-Strukturdaten, die am Computerbildschirm visualisiert werden können.


Bändermodell:

Tumorsuppressorprotein p53 bindet spezifisch an DNA-Sequenz

Ausschnittvergrößerung

hellgrün: Darstellung der Sekundär- und Tertiärstruktur des p53-Moleküls ohne Seitenketten der Aminosäuren

rot: Aminosäuren mit Seitenketten, die den Zinkfinger ausbilden; Zahl gibt die Position der Aminosäure im Protein an

grau: Zink-Ion (stabilisiert Konformation der Proteinregion)

(Zinkfinger: Struktur aus Cystein- und Histidinresten mit einem zentralen Zink-Ion, die Proteinregion stabilisiert und zur spezifischen DNA-Bindung befähigt)

Aufgaben:

- a) Markieren Sie die 4 Aminosäuren, die für die Ausbildung des so genannten Zinkfingers verantwortlich sind, innerhalb der angegebenen Peptidsequenzen mit rot. (im Einbuchstabencode für Aminosäuren: C = Cystein; H = Histidin)

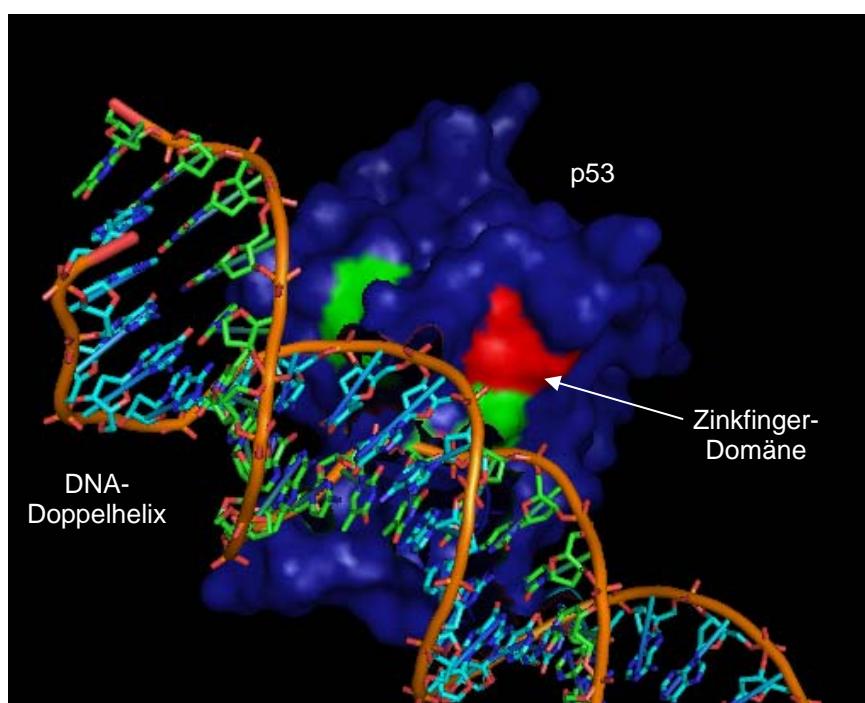
Ausschnitt der Aminosäuresequenz von menschlichem Wildtyp-p53:

| | | | | | | | |
|-----|------------|-----|-------------|-----|------------|-----|-------------|
| 94 | SSSVPS | 100 | QKTYQGSYGF | 110 | RLGFLHSGTA | 120 | KSVTCTYSPA |
| 130 | LNKMFCQLAK | 140 | TCPVQLWVDS | 150 | TPPPGTRVRA | 160 | MAIYKQSQHM |
| 170 | TEVVRRCPHH | 180 | ERCSDSDGLA | 190 | PPQHLIRVEG | 200 | NLRVEYLDDR |
| 210 | NTFRHSVVVP | 220 | YEPPEVGSDC | 230 | TTIHYNYMCN | 240 | SSCMGGMNRR |
| 250 | PILTIITLED | 260 | SSGNLLGRNS | 270 | FEVRVCACPG | 280 | RDRRTEEEENL |
| 290 | RKKGEPHHEL | 300 | PPGSTKRALPN | 310 | NT | | |

Ausschnitt der Aminosäuresequenz einer menschlichen p53-Mutante:

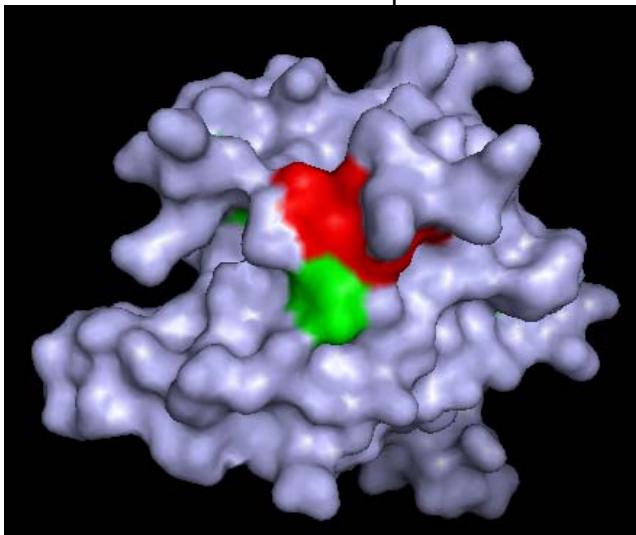
| | | | | | | | |
|-----|------------|-----|-------------|-----|------------|-----|-------------|
| 94 | SSSVPS | 100 | QKTYQGSYGF | 110 | RLGFLHSGTA | 120 | KSVTCTYSPA |
| 130 | LNKLFCQLAK | 140 | TCPVQLWVDS | 150 | TPPPGTRVRA | 160 | MAIYKQSQHM |
| 170 | TEVVRRCPHH | 180 | ERCSDSDGLA | 190 | PPQHLIRVEG | 200 | NLRAEYLDDR |
| 210 | NTFRHSVVVP | 220 | YEPPEVGSDC | 230 | TTIHYNYMCY | 240 | SSCMGGMNRS |
| 250 | PILTIITLED | 260 | SSGNLLGRDS | 270 | FEVRVCACPG | 280 | RDRRTEEEENL |
| 290 | RKKGEPHHEL | 300 | PPGSTKRALPN | 310 | NT | | |

- b) Identifizieren Sie die 5 Aminosäuren, die in der p53-Mutante im Vergleich zu Wildtyp-p53 verändert sind und markieren Sie diese mit grün.
- c) Erstellen Sie eine Hypothese hinsichtlich DNA-Bindungsvermögen dieser p53-Mutante. Belegen Sie Ihre Aussage anhand der vorliegenden Abbildungen. (s. nächste Seite).

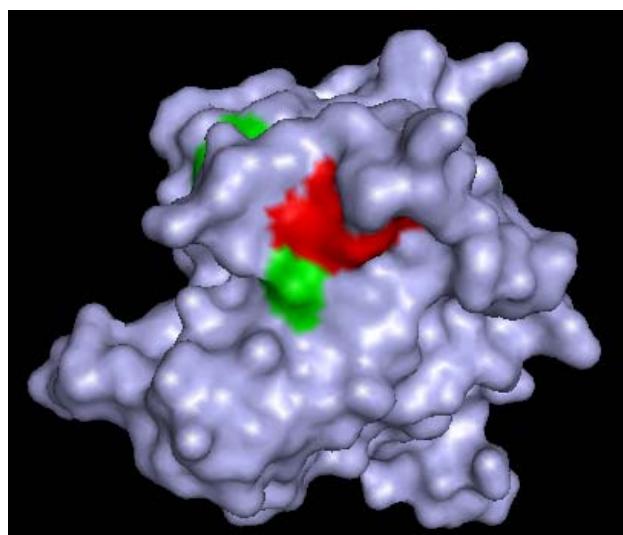
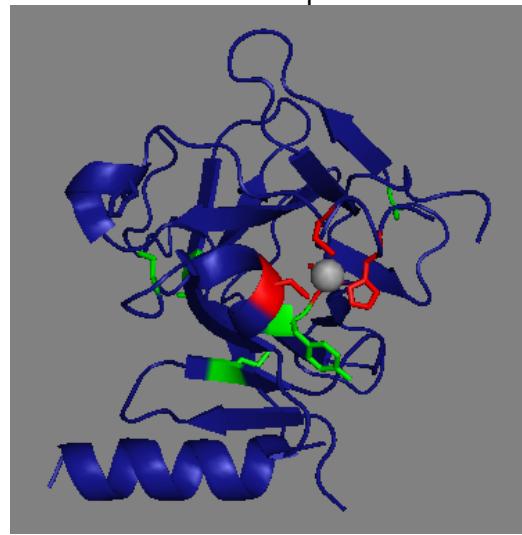


Oberflächenmodell von Wildtyp-p53 (dunkelblau) mit DNA-Doppelhelix in Bindungstasche:
Region des Zinkfingers (rot); Positionen der Aminosäureaustausche (hellgrün)

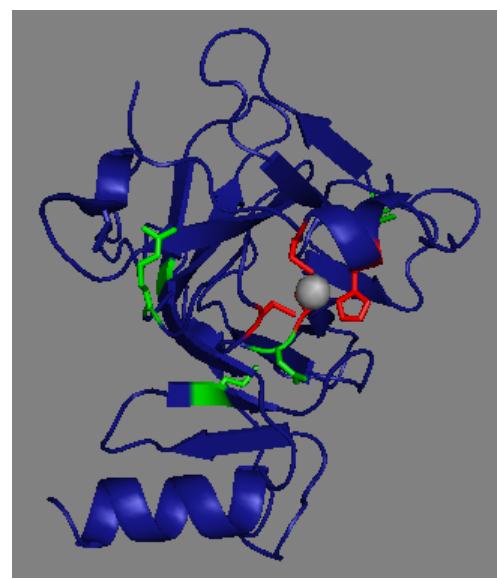
Oberflächenmodell der p53-Mutante



Bändermodell der p53-Mutante



Oberflächenmodell von p53-Wildtyp



Bändermodell von p53-Wildtyp

Weitere Hilfestellung:

Mittels des Programms PyMOL können pdb-Dateien (Original-3D-Moleküldaten aus Röntgenstrukturanalyse; pdb steht für **protein data bank**) geöffnet und Moleküle am Bildschirm auch räumlich visualisiert werden.

- Durch Gedrückthalten der **linken Maustaste** kann das dargestellte Molekül durch Bewegen der Maus im Raum gedreht werden.
- Durch Gedrückthalten der **rechten Maustaste** kann das dargestellte Molekül durch Ziehen der Maus gezoomt werden.

Zusatzaufgabe:

Beschreiben Sie mithilfe der Datei **GFP.pdb** den räumlichen Bau des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und die Lokalisation der Tripeptidsequenz $^{65}\text{Ser}^{66}\text{Tyr}^{67}\text{Gly}$ -, die vermutlich für die Fluoreszenz verantwortlich ist.

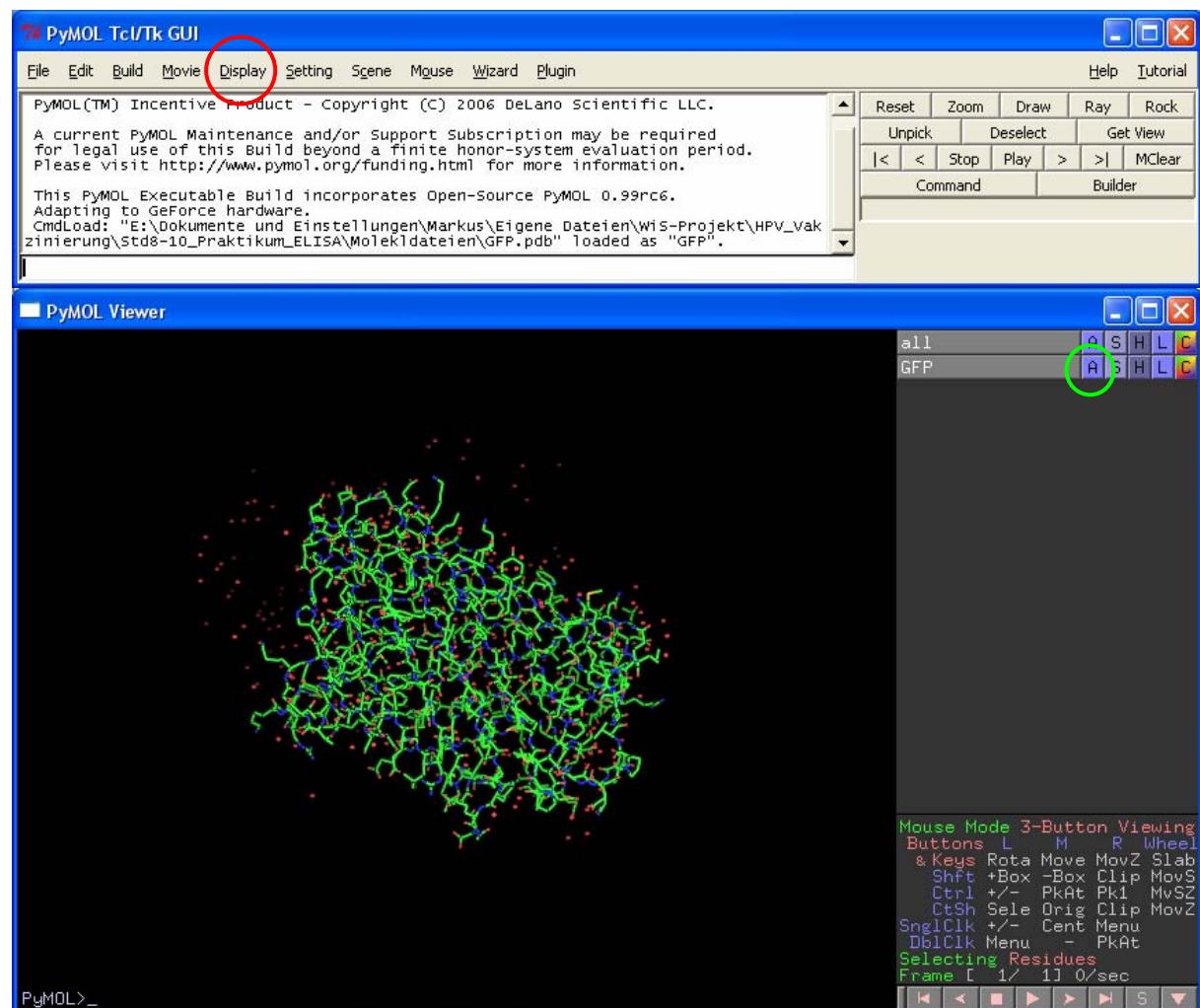
Glossar:

Das **grün fluoreszierende Protein** (Abkürzung **GFP**; engl. *green fluorescent protein*) ist ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Seine unschätzbare Bedeutung in der biologischen Forschung, insbesondere der Zellbiologie, liegt in der Möglichkeit, GFP mit beliebigen anderen Proteinen Gen-spezifisch zu kombinieren. Durch die Fluoreszenz des GFP kann so die räumliche und zeitliche Verteilung des zu untersuchenden Proteins in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen direkt beobachtet werden. Die Bedeutung der GFP-Fluoreszenz für die Qualle ist bis dato unbekannt.

Im Jahr 2008 wurde der **Nobelpreis für Chemie** für die „Entdeckung und Weiterentwicklung des grün fluoreszierenden Proteins“ verliehen.

Anleitung zur Handhabung des Programms PyMOL:

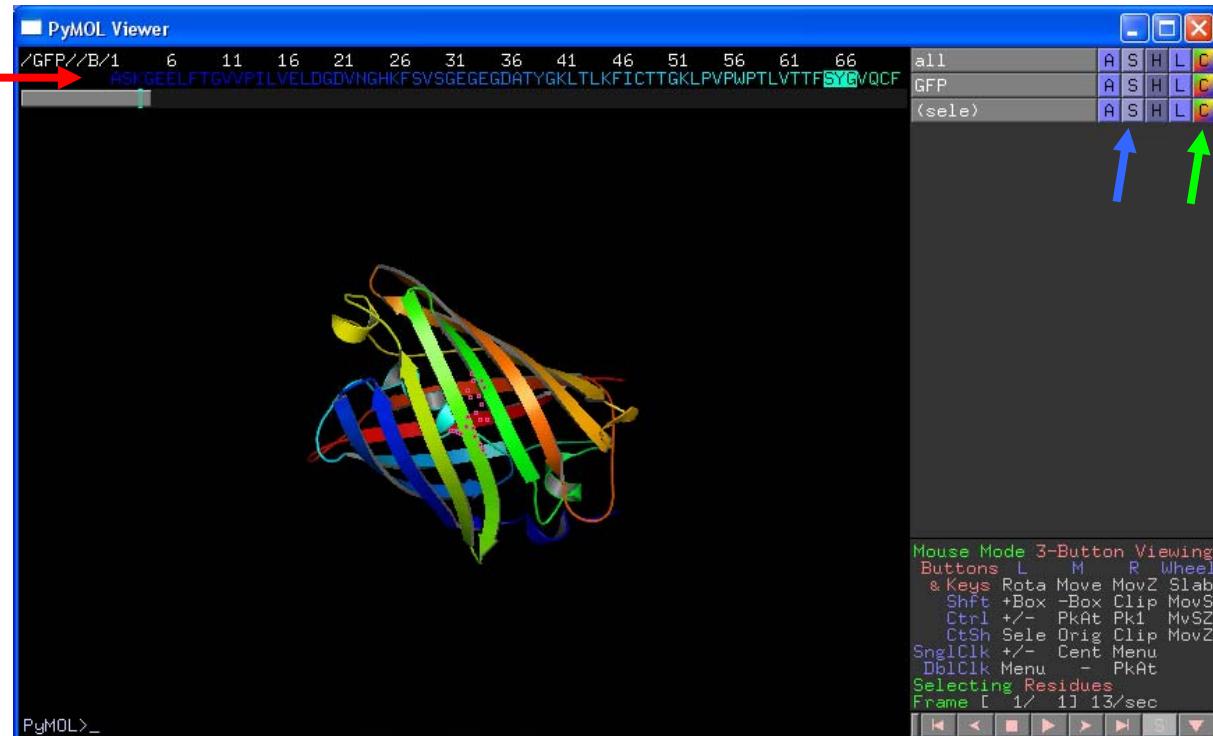
➤ Nach Öffnen der Datei müsste sich folgendes Bild ergeben:



Jetzt bitte schrittweise folgen:

➤ In Menüleiste unter „Display“ → „Sequence“ wählen (s. roter Kreis)

- In der Zeile GFP „A“ anklicken (s. grüner Kreis), aus Liste „preset“ wählen und aus weiterer Liste „publication“ wählen



- Durch Gedrückthalten der **linken Maustaste** kann das visualisierte Molekül durch Bewegen der Maus im Raum gedreht werden.
- Durch Gedrückthalten der **rechten Maustaste** kann das visualisierte Molekül durch Ziehen der Maus gezoomt werden.
- In der dargestellten Aminosäuresequenz (s. roter Pfeil) die 3 Aminosäuren an Position 65-67 durch linken Mausklick markieren
- In der Zeile (sele) „C“ anklicken (s. grüner Pfeil), aus Liste „magentas“ wählen und aus weiterer Liste „magenta“ wählen
- In der Zeile (sele) „S“ anklicken (s. blauer Pfeil), aus Liste „spheres“ wählen
- Um Markierungen zu entfernen noch einmal mit linkem Mausklick auf schwarzen Hintergrund

Lösungshinweise:

Auswertung des p53-ELISAs (Praktikum):

Serum von 2 Patienten zeigt vergleichbare Farbintensität wie Positivkontrolle
 → Nachweis von p53-Antikörpern in Serum dieser Patienten positiv
 → dringender Verdacht einer Krebserkrankung muss durch weitere Untersuchungen erhärtet werden
ABER: Negativergebnis heißt für die anderen Patienten nicht zwangsläufig, dass bei ihnen keine Krebserkrankung vorliegt (denn nur bei 40% aller Krebspatienten sind p53-Antikörper im Serum nachweisbar)

Struktur-Funktionsanalyse von p53 (AB 10):

- Markieren Sie die 4 Aminosäuren, die für die Ausbildung des so genannten Zink-fingers verantwortlich sind, innerhalb der angegebenen Peptidsequenzen mit roter Farbe.
- Identifizieren Sie die 5 Aminosäuren, die in der p53-Mutante im Vergleich zu Wildtyp-p53 verändert sind und markieren Sie diese mit grüner Farbe.

Ausschnitt der Aminosäuresequenz von menschlichem Wildtyp-p53:

| | | | |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| ⁹⁴ SSSVPS | ¹⁰⁰ QKTYQGSYGF | ¹¹⁰ RLGFLHSGTA | ¹²⁰ KSVTCTYSPA |
| ¹³⁰ LNKMFCQLAK | ¹⁴⁰ TCPVQLWVDS | ¹⁵⁰ TPPPGTRVRA | ¹⁶⁰ MAIYKQSQHM |
| ¹⁷⁰ TEVVRR CPH H | ¹⁸⁰ ERCSDSDGLA | ¹⁹⁰ PPQHLIRVEG | ²⁰⁰ NLRVEYLD DR |
| ²¹⁰ NTFRHSVVVP | ²²⁰ YEPPEVGSDC | ²³⁰ TTIHYNYM CN | ²⁴⁰ SS C MGGMNRR |
| ²⁵⁰ PILT IIT LED | ²⁶⁰ SSGNLLGRNS | ²⁷⁰ FEVRVCACPG | ²⁸⁰ RDRRTEEENL |
| ²⁹⁰ RKKGEPHHEL | ³⁰⁰ PPGSTKRALPN | ³¹⁰ NT | |

Ausschnitt der Aminosäuresequenz einer menschlichen p53-Mutante:

| | | | |
|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---|
| ⁹⁴ SSSVPS | ¹⁰⁰ QKTYQGSYGF | ¹¹⁰ RLGFLHSGTA | ¹²⁰ KSVTCTYSPA |
| ¹³⁰ LNK L FCQLAK | ¹⁴⁰ TCPVQLWVDS | ¹⁵⁰ TPPPGTRVRA | ¹⁶⁰ MAIYKQSQHM |
| ¹⁷⁰ TEVVRR CPH H | ¹⁸⁰ ERCSDSDGLA | ¹⁹⁰ PPQHLIRVEG | ²⁰⁰ NLR E YLD DR |
| ²¹⁰ NTFRHSVVVP | ²²⁰ YEPPEVGSDC | ²³⁰ TTIHYNYM CY | ²⁴⁰ SS C MGGMNRS |
| ²⁵⁰ PILT IIT LED | ²⁶⁰ SSGNLLGR D S | ²⁷⁰ FEVRVCACPG | ²⁸⁰ RDRRTEEENL |
| ²⁹⁰ RKKGEPHHEL | ³⁰⁰ PPGSTKRALPN | ³¹⁰ NT | |

Aminosäureaustausche in der p53-Mutante (grün markiert):

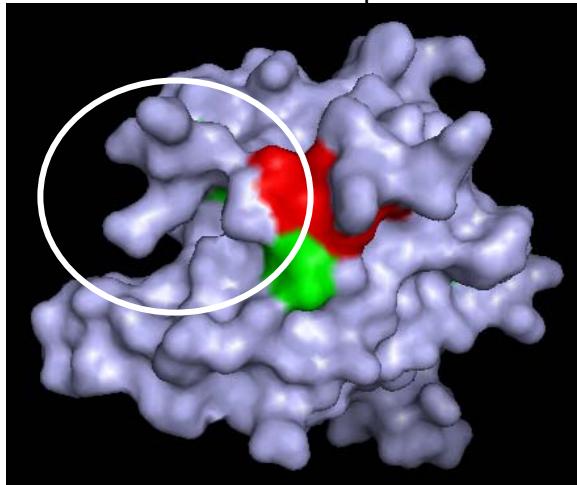
Position 133 von M (Methionin) zu L (Leucin); Position 203 von V (Valin) zu A (Alanin);
 Position 239 von N (Asparagin) zu Y (Tyrosin); Position 249 von R (Arginin) zu S (Serin);
 Position 268 von N (Asparagin) zu D (Asparaginsäure)

c) Erstellen Sie eine Hypothese hinsichtlich dem DNA-Bindungsvermögen dieser p53-Mutante. Begründen Sie Ihre Annahme mithilfe der dargestellten Abbildungen (s. nächste Seite).

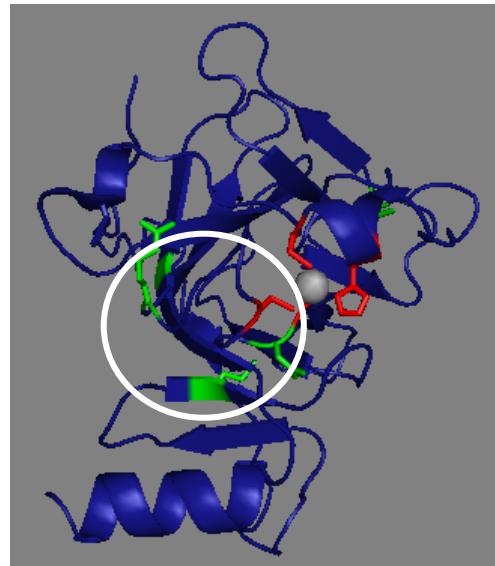
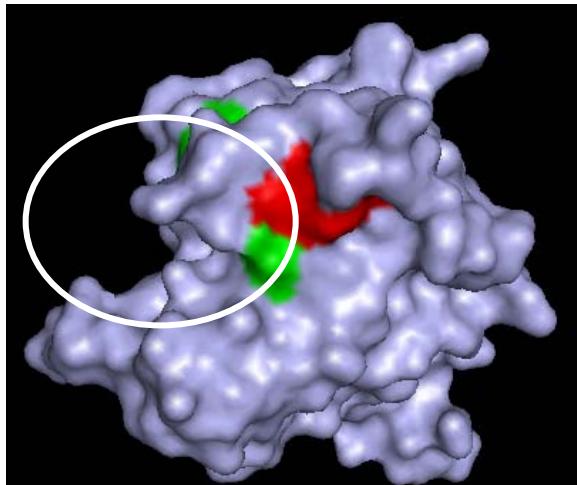
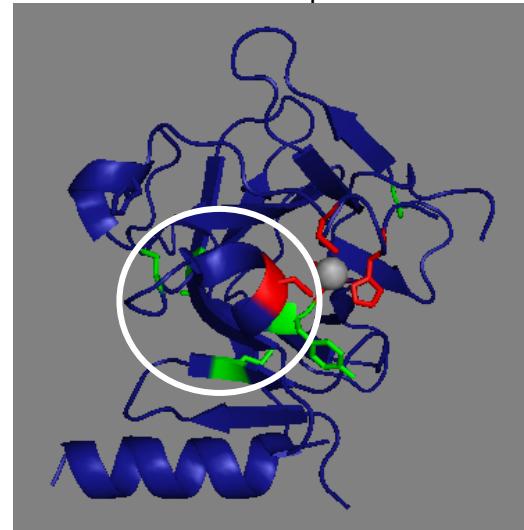
Mögliche Hypothesen:

1. p53-Mutante kann noch an DNA binden, weil Zinkfinger von Aminosäureaustauschen nicht betroffen ist.
2. p53-Mutante kann nicht mehr an DNA binden, weil Aminosäureaustausche Konformation von p53 verändern.

Oberflächenmodell der p53-Mutante



Bändermodell der p53-Mutante



Oberflächenmodell von p53-Wildtyp

Bändermodell von p53-Wildtyp

Auch wenn die Aminosäureaustausche nicht im für die DNA-Bindung wichtigen Zinkfinger-Motiv erfolgt sind (rote Markierung), zeigt die Konformation von p53 u.a. zentral im Kernbereich der Bindungstasche für die DNA-Helix Strukturveränderungen im Vergleich zwischen Wildtyp und Mutante (s. weiße Ringe). Allein aus diesen marginalen Konformationsveränderungen lässt sich noch nicht ableiten, ob diese p53-Mutante noch zur DNA-Bindung fähig ist. Hierzu wären weitere Untersuchungen notwendig.

Weitere Informationen aus dem Original-Artikel:

Structures of p53 cancer mutants and mechanism of rescue by second-site suppressor mutations, Joerger, A.C. et al., Journal of Biological Chemistry, Vol. 280 pp. 16030-7, 2005

"On the basis of this structure, common cancer mutations have been classified as "structural" mutations resulting in structural perturbations of the core domain or "contact" mutations resulting in the loss of a DNA-contacting residue. A more detailed picture has emerged from quantitative stability and DNA binding studies for wild type p53 and several cancer-associated mutants (6, 7). The core domain of human p53 has low intrinsic thermodynamic stability, and its melting temperature is only slightly above body temperature. Hence, even weakly destabilizing mutations can have a detrimental effect and result in a large population of unfolded protein under physiological conditions. On the basis of these studies, cancer-associated mutations in the core domain can be subdivided into three classes: (i) DNA contact mutations, such as R273H, with little effect on the overall stability of the protein but impaired function because of the loss of a residue mediating DNA contacts. (ii) Mutations causing local distortions that destabilize the core domain by <2 kcal/mol. Many mutations in the DNA binding surface such as the hot spot mutations G245S and R249S fall into this category. (iii) Mutations that are highly destabilizing (>3 kcal/mol) and result in global unfolding of the protein at body temperature."

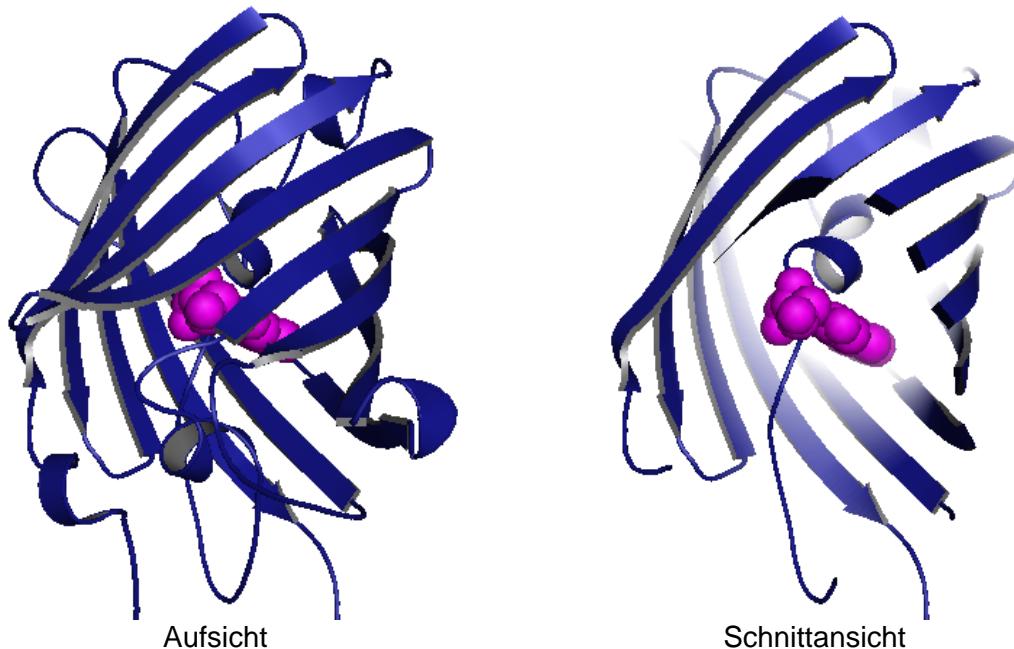
Die dargestellte p53-Mutante ist somit höchstwahrscheinlich im Hinblick auf DNA-Bindung funktionsuntüchtig, da sie den Aminosäureaustausch Arginin zu Serin an Position 249 aufweist.

Zusatzaufgabe:

Beschreiben Sie mithilfe der Datei **GFP.pdb** den räumlichen Bau des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und die Lokalisation der Tripeptidsequenz $-^{65}\text{Ser}^{66}\text{Tyr}^{67}\text{Gly-}$, die offensichtlich für die Fluoreszenz verantwortlich ist.

GFP weist eine Vielzahl von β -Faltblattstrukturen auf, die zylindrisch angeordnet sind. Im Zentrum des Zylinders befindet sich die genannte Tripeptidsequenz.

Bändermodell von GFP (blau) mit Kugelmodell der zentralen Tripeptidsequenz (pink)



Informationsblatt 8:

Abkürzungscodes der 20 proteinogenen Aminosäuren:

| Einbuchstabencode | Dreibuchstabencode | Aminosäure |
|-------------------|--------------------|----------------|
| A | Ala | Alanin |
| C | Cys | Cystein |
| D | Asp | Asparaginsäure |
| E | Glu | Glutaminsäure |
| F | Phe | Phenylalanin |
| G | Gly | Glycin |
| H | His | Histidin |
| I | Ile | Isoleucin |
| K | Lys | Lysin |
| L | Leu | Leucin |
| M | Met | Methionin |
| N | Asn | Asparagin |
| P | Pro | Prolin |
| Q | Gln | Glutamin |
| R | Arg | Arginin |
| S | Ser | Serin |
| T | Thr | Threonin |
| V | Val | Valin |
| W | Trp | Tryptophan |
| Y | Tyr | Tyrosin |

Quelle (Dez. 2008): <http://de.wikipedia.org/wiki/Aminos%C3%A4ure>