

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):

a) Markieren Sie die 4 Aminosäuren, die für die Ausbildung des so genannten Zink-fingers verantwortlich sind, innerhalb der angegebenen Peptidsequenzen mit roter Farbe.

b) 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 LNMFCQLAK	¹⁴⁰ TCPVQLWVDS	¹⁵⁰ TPPPGTRVRA	¹⁶⁰ MAIYKQSQHM
¹⁷⁰ TEVVRRCPHH	¹⁸⁰ ERCSDSDGLA	¹⁹⁰ PPQHLIRVEG	²⁰⁰ NLRVEYLDDR
²¹⁰ NTFRHSVVVP	²²⁰ YEPPEVGSDC	²³⁰ TTIHYNM ^{CN}	²⁴⁰ SSCMGGMNRR
²⁵⁰ PILTIITLED	²⁶⁰ SSGNLLGRNS	²⁷⁰ FEVRVCACPG	²⁸⁰ RDRRTEENL
²⁹⁰ RKKGEPHHEL	³⁰⁰ PPGSTKRALPN	³¹⁰ NT	

Ausschnitt der Aminosäuresequenz einer menschlichen p53-Mutante:

⁹⁴ SSSVPS	¹⁰⁰ QKTYQGSYGF	¹¹⁰ RLGFLHSGTA	¹²⁰ KSVTCTYSPA
¹³⁰ LNL ^L FCQLAK	¹⁴⁰ TCPVQLWVDS	¹⁵⁰ TPPPGTRVRA	¹⁶⁰ MAIYKQSQHM
¹⁷⁰ TEVVRRCPHH	¹⁸⁰ ERCSDSDGLA	¹⁹⁰ PPQHLIRVEG	²⁰⁰ NLR ^A EYLDDR
²¹⁰ NTFRHSVVVP	²²⁰ YEPPEVGSDC	²³⁰ TTIHYNM ^{CY}	²⁴⁰ SSCMGGMNRR ^S
²⁵⁰ PILTIITLED	²⁶⁰ SSGNLLGR ^{DS}	²⁷⁰ FEVRVCACPG	²⁸⁰ RDRRTEENL
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);

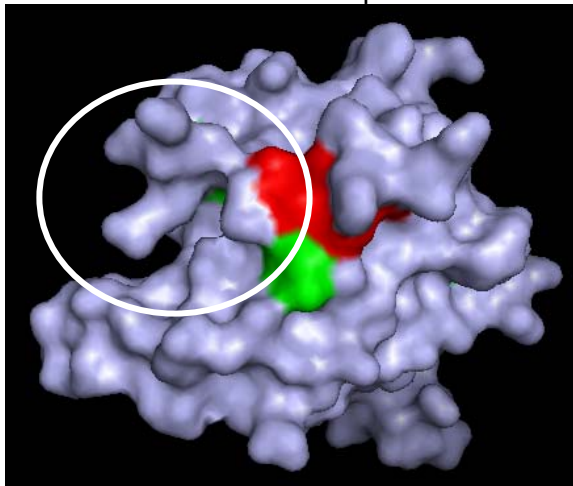
Position 268 von N (Asparagin) zu D (Asparaginsäure)

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

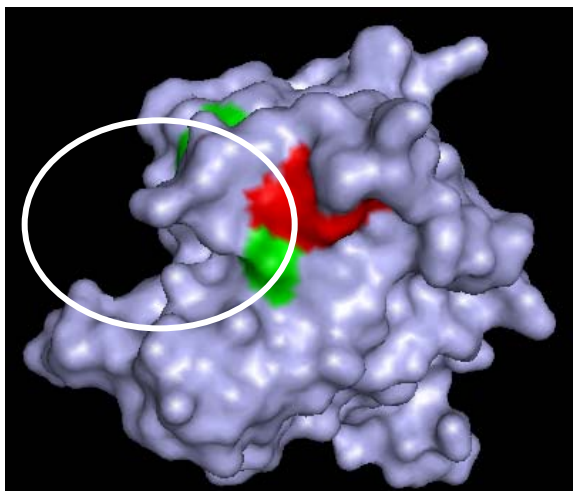
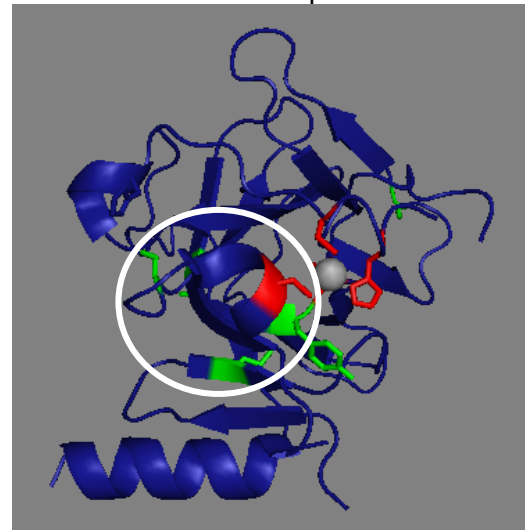
Mögliche Hypothesen:

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.

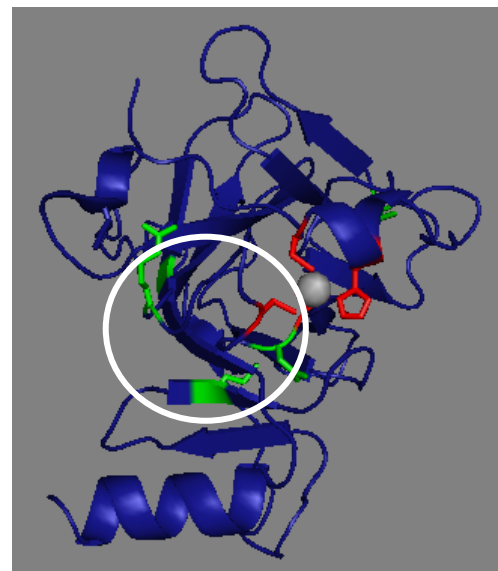
Oberflächenmodell der p53-Mutante



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)

