INTERAKCE PROTEINŮ RODINY p53 SE SEKVENCEMI ODLIŠNÝMI OD B-DNA

Pavla Bažantová, Jiří Červeň, Petr Pečinka
Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Chittussiho 10, 710 00 Slezská Ostrava, +420 724 820 084, p.bazantova@email.cz

Abstrakt

Protein p53 je nádorový supresor, který je schopen v odpovědi na poškození DNA indukovat zastavení buněčného cyklu a apoptozu. Pro jeho správnou funkci je rozhodující vlastností vázat se na DNA: sekvenčně-specifická vazba na p53CON a sekvenčně-nespecifická vazba na vyšší struktury DNA. V této práci byla použita DNA získaná chromatinovou imunoprecipitací z oblastí, na něž se vázal protein p53 a jež neobsahovaly p53CON. Pomocí PCR byly amplifikovány různé části imunoprecipitované DNA a metodou EMSA bylo sledováno, na které fragmenty se p53 váže s vyšší afinitou. Nejsilnější preference p53 byla pozorována v oblasti, která obsahuje sekvence s potenciální možností tvořit zakřivení DNA a intramolekulární triplexy.

Klíčová slova: *nádorový supresor p53; mutp53; wtp53; interakce DNA-protein*

Úvod

Proteinová rodina p53 zahrnuje tři strukturní homology, a to proteiny p53, p63 a p73, které hrají významnou roli při prevenci vzniku nádorů a během vývoje tkání [1, 2]. Rozhodující vlastností pro správnou funkci těchto proteinů jako transkripčních faktrorů je jejich schopnost interakce s DNA [3]. Za sekvenčně specifickou vazbu je zodpovědná centrální DNA-vazebná doména [4]. Doména v C-koncové oblasti je zodpovědná za vazbu sekvenčně nespecifickou a je jí připisována schopnost interagovat se strukturami DNA, které jsou stabilizovány nadšroubovicovým vinutím [5, 6].

Protein $p53^{R273H}$ obsahující mutaci ve své DNA-vazebné doméně ztrácí schopnost sekvenčně specificky vázat DNA, má však zachovanou schopnost strukturně-selektivní vazby se strukturami odlišnými od B-DNA a může tak plnit roli regulátoru transkripce. Pomocí chromatinové imunoprecipitace byla z glioblastomových buněk získána knihovna genomových sekvencí, se kterými $p53^{R273H}$ interaguje. Pro další možnosti studií byly tyto sekvence vloženy do plasmidu pCR®II [7].

Cílem této studie bylo zjistit schopnost proteinu wtp53 (wild type p53) interagovat s vybranými sekvencemi získanými výše uvedeným způsobem a toto místo blíže sekvenčně i strukturně charakterizovat.

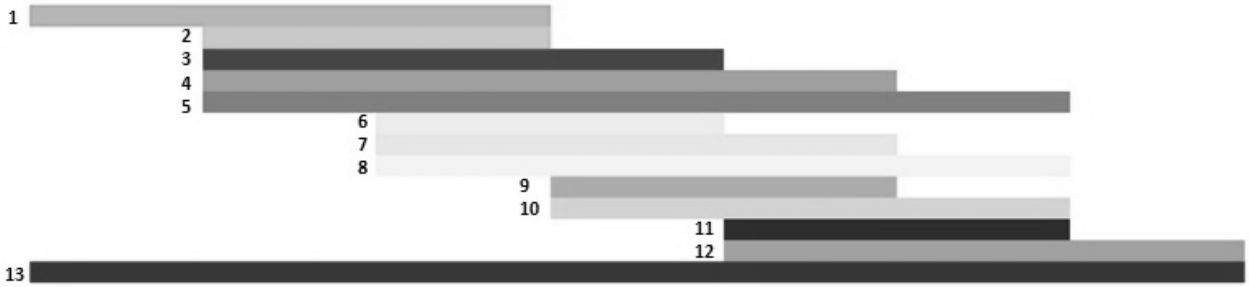
Materiál a metody

Pro experimenty byl použit plasmid U251AB2, který byl připraven vnesením sekvence rozpoznávané proteinem $p53^{R273H}$ do vektoru pCR®II. Pomocí metody PCR a sady několika primerů bylo připraveno 13 fragmentů obsahujících různé části sekvence rozpoznávané $p53^{R273H}$ (obrázek 1.), přičemž fragment 13 obsahuje tuto sekvenci celou. PCR reakce probíhaly v celkovém objemu 50 µl v prostředí upraveném pufrem pro *Taq* DNA polymerázu. Směs obsahovala 200 µM dNTPs, 0,2 µM primery/ů, 8 ng templátové DNA (plasmid U251AB2) a 1,25 U *Taq* DNA polymerázy.

Protein použitý pro práci byl izolován metodou FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) na Biofyzikálním ústavu AV ČR, v.v.i. v Brně. Byl použit protein wtp53FL (Full Length).

Vazebné experimenty byly prováděny ve vazebné směsi, která obsahovala DNA a protein p53 v různých molárních poměrech, 5 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 mM EDTA, 0,01% Triton X-100, 50 mM KCl a 1 mM DTT. Pro kontrolu byl vždy použit příslušný fragment bez přídavku proteinu. Vzorky byly inkubovány 20 minut v ledové lázni. Po ukončení inkubace byly vzorky doplněny nanášecím pufrem a naneseny na agarózový gel (1,2 %, 0,33x TBE, 120 V, 4 hodiny, 4 °C). Gel byl obarven v roztoku ethidium bromidu (1µg/ml) a dokumentován pod UV světlem.

Fotografie elektroforetických gelů byly semikvantitativně vyhodnoceny programem ImageJ, jehož pomocí byly zjištěny intenzity elektroforetických signálů.

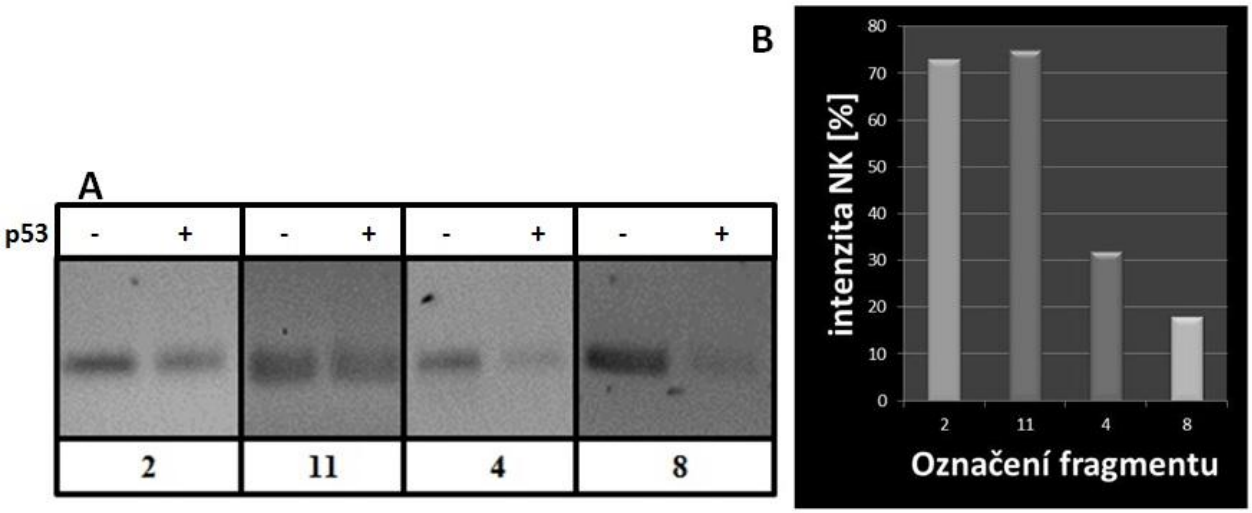


Obrázek 1. Fragmenty vymezující různé části sekvence rozpoznávané proteinem $p53^{R273H}$.

Výsledky a diskuse

Vybrané výsledky vazebných pokusů jsou na obrázku 2. Záznam elektroforetického gelu (A) dokumentuje schopnost proteinu wtp53FL interagovat s vybranými fragmenty. Snížení intenzity elektroforetického signálu v přítomnosti proteinu p53 (p53 +) dokazuje vznik komplexu DNA-protein, jež má nižší elektroforetickou mobilitu ve srovnání s DNA bez navázaného proteinu (p53 -). Z obrázku 2A je tedy patrné, že v případě fragmentů 2 a 11 byla schopnost proteinu wtp53FL interagovat s vybranou sekvencí DNA nižší než v případě fragmentů 4 a 8, u nichž je úbytek intenzity v přítomnosti proteinu výraznější. Obrázek 2B je grafickým znázorněním elektroforetického gelu z obrázku 2A, kde je vynesena v procentech intenzita elektroforetického signálu v přítomnosti proteinu (p53 +) proti intenzitě signálu negativní kontroly (NK, p53 -).

Fragment, který byl proteinem p53 nejsilněji preferován, obsahuje sekvenci bohatou na krátké oblasti 3 – 4 T a krátké polyPu.polyPy sekvence. Z dosavadních studií je známo, že dAn:dTn oblasti mohou způsobovat zakřivení DNA a polyPu.polyPy sekvence jsou schopny tvořit intramolekulární triplexy [8]. Je tedy možné, že právě některou z těchto struktur je protein p53 schopen v těchto místech rozpoznat i bez přítomnosti jeho consensní vazebné sekvence p53CON.



Obrázek 2. Vazba proteinu wtp53FL na vybrané fragmenty sekvence rozpoznávané proteinem $p53^{R273H}$. **(A)** Elektroforetický gel dokumentující úbytek intenzity signálu ve spojitosti se vznikem komplexu DNA-protein v reakcích s přídavkem proteinu p53 (+) ve srovnání se vzorky bez přidaného proteinu (-). **(B)** Grafické znázornění měření intenzity elelktroforetických signálů programem ImageJ. U každého z vybraných fragmentů je v procentech vyjádřen úbytek intenzity signálu v přítomnosti proteinu p53 proti intenzitě fragmentu bez p53.

Závěr

Vazebnými pokusy s různými fragmenty sekvence rozpoznávané proteinem $p53^{R273H}$ byla identifikována oblast, k níž se protein wtp53FL vážně s vyšší preferencí. V této oblasti se nacházejí sekvence, které jsou potenciálně schopné tvořit vyšší struktury DNA (zakřivení, triplex). Protein p53 tedy pravděpodobně v této oblasti rozeznává příslušné struktury, je schopen s nimi interagovat a následně plnit tak funkci transkripčního faktoru.

Poděkování

Práce byla realizována v rámci projektu Institut environmentálních technologií, reg. č. CZ.1.05/2.1.00/03.0100 podporovaného Operačním programem Výzkum a vývoj pro Inovace, financovaného ze strukturálních fondů EU a ze státního rozpočtu ČR a Grantovou agenturou ČR (13-36108S).

Literatura

[1.] MACHADO-SILVA A., PERRIER S., BOURDON J. *p53 family members in cancer diagnosis and teatrament.* Seminars in Cancer Biology, 20, 57-62 (2010)

[2.] SAYAN E. A., D´ANGELO B., SAYAN B. S., TUCCI P., CIMINI A., CEREÙ M. P., KNIGHT R. A., MELINO G. *p73 and p63 regulate the expression of fibroblast growth factor receptor 3.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 394, 824-828 (2010)

[3.] KIM E., GIESE A., DEPPERT W. *Wild-type p53 in cancer cells: When a guardian turns into a blackguard.* Biochemical Pharmacology, 77, 11-20 (2009)

[4.] PAVLETICH N. P., CHAMBERS K. A., PABO C.O. *The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots.* Genes & development, 7 (12B), 2556-2564 (1993)

[5.] WANG Y., REED M., WANG P., STENGER J. E., MAYR G., ANDERSON M. E., SCHWEDES J. F., TEGTMEYER P. *p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions.* Genes & development, 7, 2575-2586 (1993)

[6.] WALTER, K., WARNECKE, G., BOWATER, R., DEPPERT, W. AND KIM, E. *Tumor Suppressor p53 Binds with High Affinity to CTG·CAG Trinucleotide Repeats and Induces Topological Alterations in Mismatched Duplexes.* Journal of Biological Chemistry, 280, 42497-42507 (2005)

[7]. BRÁZDOVÁ M., QUANTE T., TÖGEL L., WALTER K., LOSCHER C., TICHÝ V., ČINČÁROVÁ L., DEPPERT W., TOLSTONOG G. V. Modulation of gene expression in U251 glioblastoma cells by binding of mutant p53 R273H to intronic and intergenic sequences. Nucleic Acids Research, 37 (5), 1486 – 1500 (2009)

[8]. BROOKS, T. A., KENDRICK, S., AND HURLEY, L. Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters, *FEBS J* 277, 3459-69 (2010)

Abstract

Protein p53 is a tumor suppressor that induces cell cycle arrest and apoptosis in response to DNA damage and cancerogenesis. Its ability to bind DNA and thus play its biological role is possible in two manners. Sequence specific binding to its consensus sequence (p53CON) and sequence non-specific binding, which occures preferably to higher DNA structures. In this study it was tested human DNA cloned into plasmid vectores. The DNAs were obtained by chromatin immunoprecipitation of regions which were bound by p53 with high affinity although they don't contain p53CON. Because of we were unable to detect the exact location of p53 binding with sufficient resolution by standard methods different parts of immunoprecipitated DNAs were amplified by PCR and found using EMSA to what part of the insert p53 binds with the highest affinity. The strongest preference p53 was found for the region which contains repeated short tracts of 3-4 Ts and a short polypu.polypy sequence.

Key words: *tumor suppressor p53; mutp53; wtp53; DNA-protein interaction*