STRUKTURNÍ ANALÝZA P53-VAZEBNÉ SEKVENCE V SUPERHELIKÁLNÍ A LINEÁRNÍ DNA.

Barbora Chvátalová

Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, Chittussiho 10, 710 00 Ostrava,chvatalova.barbora@gmail.com

Abstrakt

Protein p53 je významný nádorový supresor, který je již od svého objevu intenzivně studován díky jeho schopnosti regulovat buněčný cyklus a opravy DNA. Díky těmto schopnostem p53 zabraňuje vážnému poškození buněk a výskytu rakovinných onemocnění, což dokazuje skutečnost, že mutované formy proteinu p53 jsou nalézány v různých typech nádorových buněk. Aby byl p53 schopen plnit svoji roli transkripčního faktoru, a tím regulovat cílové geny, je nutná jeho interakce s DNA. Toho je schopný v přítomnosti vazebného místa p53CON, jednořetězcových úseků nebo lokálních otevřených struktur. V této práci byly zkoumány sekvence DNA, u kterých by mohlo dojít k vazbě proteinu p53 na otevřené struktury v DNA. K určení takových struktur byla v práci použita enzymatická sonda nukleáza S1 a restrikční endonukleázy (*Sca*I a *Bam*HI).

Klíčová slova: *Protein p53; lokální otevřené struktur; sekvenčně specifická vazba; sekvenčně nespecifická vazba; enzymatické sondy*

Úvod

Poprvé byl protein p53 identifikován v roce 1979 jako buněčný protein, který se hromadí v jádrech buněk nádorového onemocnění. Na počátku roku 1990 byl gen pro protein p53 označen jako gen pro nádorový supresor, jehož mutované formy se nacházejí ve více než 50% případů rakoviny u člověka [1]. Nádorový supresor p53 je schopen vyvolat celou řadu buněčných odpovědí v závislosti na typu poškození DNA. Přechodné pozastavení buněčného cyklu, permanentního zastavení buněčného dělení nebo vyvolání buněčné smrti jsou hlavní odpovědí buňky na poškození DNA [2].

Protein p53 se v buňkách vyskytuje ve formě tetrameru, respektive jako dimeru dimerů. Samotný polypeptidový řetězec je funkčně dělen do tří oblastí [3]. N-koncová doména interaguje s různými proteiny které jsou součástí transkripčních pochodů a tím reguluje expresi genů. C-koncová doména je zodpovědná za sekvenčně nespecifickou vazbu k DNA, kdy rozpoznává například ssDNA. Centrální DNA-vazebná doména je schopná se sekvenčně-specificky vázat na p53CON, tedy sekvenci obsahující dvě kopie motivu 5'PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3', které mohou být od sebe odděleny 0 - 13 nukleotidy [4].

Nadšroubovicové vinutí umožňuje vznik a stabilizaci alternativních strukturálních přechodů v DNA [5]. Triplexy jsou důležité struktury, které mají svou potencionální biologickou roli při genové expresi, replikaci a rekombinaci [6]. Typické pro formy triplexu jsou homopurin-homopyrimidinové sekvence, které jsou zrcadlově symetrické a obsahují střed symetrie[7]. Křížové strukury jsou tvořeny sekvencemi z obrácených repetic - palindromy, jejichž báze jsou stejně vzdálené od středu symetrie. Čtyřřetězcová struktura se ukázala jako DNA, která obsahuje za sebou uspořádané guaniny. Stavebními prvky jsou tedy tetrády guaninů, které jsou stabilizovány kationty, jako jsou třeba sodík nebo draslík [8].

Materiál a metody

Plasmidová DNA byla vyizolována pomocí izolačního kitu firmy Macherey-Nagel, díky kterému je možné získat velmi čistou DNA v krátkém časovém úseku.

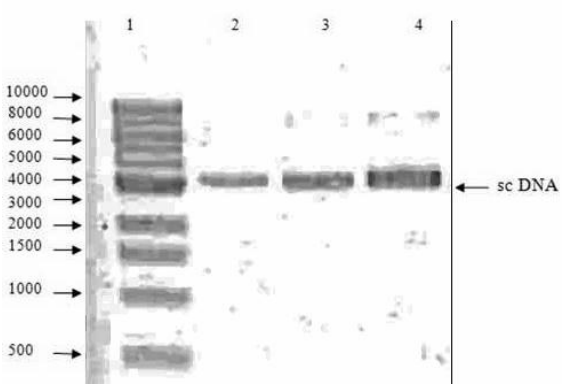
250 ng plasmidové DNA bylo štěpeno 7 U nukleázy S1 a prostředí bylo upraveno pufrem pro příslušný enzym. Vzorky byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 20 minut. Po inkubaci byla ke vzorkům přidána 50 mM EDTA, aby došlo k inaktivaci enzymu. Část vzorků byla nanesena na gel jako kontrola štěpení nukleázy S1. Zbytek ze vzorků byl přesrážen pomocí octanu sodného a ethanolu.

Zlinearizovaný plasmid byl štěpen 2 U restrikčních endonukleáz *Sca*I a *Bam*HI. Vzorky byly upraveny pufrem pro danou restrikční endonukleázu a inkubovaly se 37°C po dobu 60 minut.

V posledním kroku se ke vzorkům přidal nanášecí pufr. Vzorky byly naneseny na 1% agarosový gel. Elektroforéza proběhla při 80 V/45 min. Gel byl následně barven 20 minut ethidiumbromidem a výsledky byly detekovány pod UV světlem.

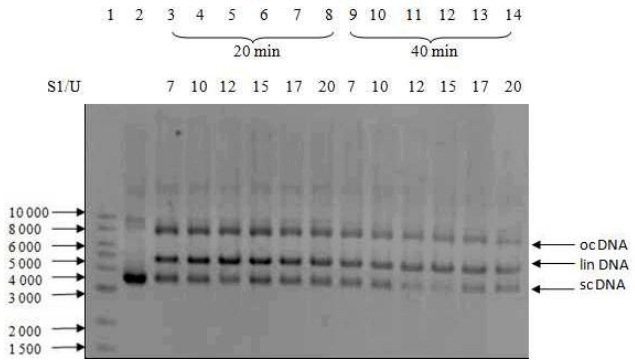
Výsledky a diskuse

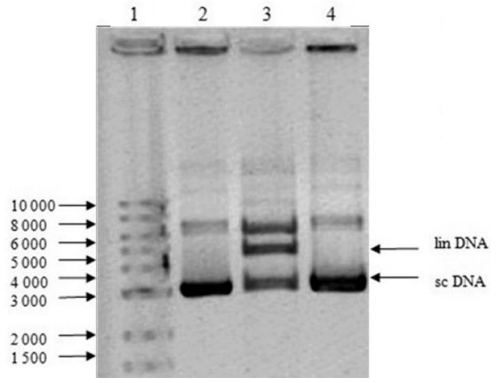
Izolací plasmidové DNA z bakterií byl získán plasmid 90-32. Z obrázku 1 je zřejmé, že plasmidová DNA byla izolována převážně v nadšroubovicové formě.



Obr.1: Izolace plasmidové DNA: 1. 1 kb žebřík, 2. 0,5 µl DNA, 3. 2 µl DNA, 4. 5 µl DNA

Pro štěpení nukleázou S1 byla vytvořena nejprve koncentrační řada, aby byly co nejlépe zvolené jednotky pro štěpení plasmidu. Z obrázku 2 je zřejmé, že na další postupy bude stačit aktivita nukleázy S1 při 7 U a inkubaci pouze 20 min. Na obrázku 3 pozorujeme ve třetí dráze plasmid štěpený nukleázou S1. Díky štěpení nukleázou S1 došlo k převedení plasmidu do stavu lineární DNA. Ve druhé a čtvrté dráze nukleáza S1 přidána nebyla, a proto se DNA pořád vyskytuje v superhelikální formě.

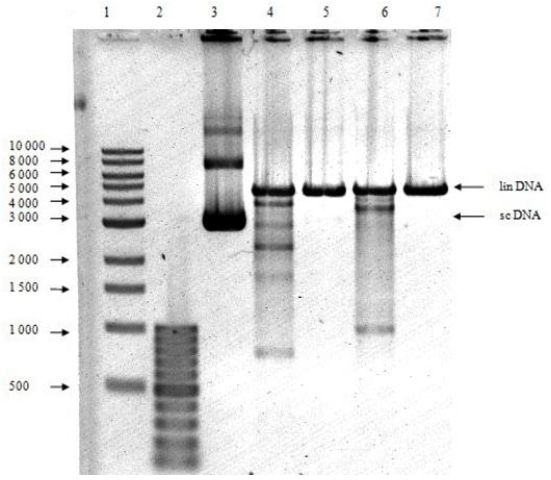




Obr.3: Štěpení endonukleázou S1: 1. 1 kb žebřík, 2. Sc 90-32, 3. 90-32 + S1, 4. 90-32 + pufr pro S1

Obr.2: Koncentrační řada štěpení endonukleázy S1

Posledním krokem bylo štěpení restrikčními endonukleázami, jejichž výhoda spočívá v přesně známé pozici štěpení. Na obrázku 4 vidíme, že restrikční endonukleázy *Sca*I a *Bam*HI vytváří lineární DNA o délce 4586 pb – dráhy 5 a 7. Štěpením nukleázou S1 by mělo docházet k vytvoření dalších fragmentů. Z obrázku je zřejmé, že nukleáza S1 plasmid štěpila. Výsledky u *Bam*HI v dráze šest a sedm naznačují, že štěpení není přesně v daném inzertu, jelikož tomu neodpovídá ani jedna z délek fragmentu, které jsou 1000 pb a 3500 pb. U *Sca*I odpovídá štěpení v inzertu fragment délky 2400 pb, který by odpovídal štěpení inzertu S1 v obou směrech od restrikčního místa.



Obr.4. Plasmid štěpený nukleázou S1 a poté restrikčními endonukleázami *Sca*I a *Bam*HI: 1: 1 kb žebřík, 2. 100 pb žebřík, 3. Sc 90-32, 4. 90-32 + S1 + *Sca*I, 5. 90-32 + *Sca*I, 6. 90-32 + S1 + *Bam*HI, 7. 90-32 + *Bam*HI

Závěr

Na základě experimentů bylo zjištěno, že vložený inzert opravdu vytváří jednořetězcové struktury, na které by se teoreticky mohl protein p53 vázat. Pro přesné ověření štěpení inzertu, určení struktury a uskutečnění vazebných pokusů bude potřeba dalších postupů. Ze štěpení plasmidu mimo inzert vyplývá, že plasmid v daných podmínkách zřejmě vytváří ještě jiné struktury, které štěpí nukleáza S1.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Petru Pečinkovi za jeho rady, čas a odborné vedení práce a také Mgr. Jiřímu Červeňovi za cenné rady v laboratoři, jeho čas a ochotu pomoci při realizaci práce v laboratoři. Dále také Mgr. Pavle Bažantové za přínosné rady při sepisování této práce. 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] Hofseth L. J., Hussain S. P., Harris C. C. P53: 25 years after its discovery. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 2004, roč. 25, č. 4, s. 177-181. DOI: 10.1016/j.tips.2004.02.009

[2] Kim E., Giese A., Deppert W. Wild-type p53 in cancer cells: When a guardian turns into a blackguard. *Biochemical Pharmacology*. 2009, roč. 77, č. 1, s. 11–20. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.08.030

[3] Yakovleva T., Pramanik A., Terenius L., Ekström T. J., Bakalkin G. P53 latency – out of the blind alley. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 2002, roč. 27, č. 12, s. 612–618. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)02209-0

[4] Somasundaram K. a El-deiry W. S. TUMOR SUPPRESSOR P53: REGULATION AND FUNCTION. *Frontiers in Bioscience*. 2000, roč. 5, s. 424-437

[5] Oussatcheva E. A., Pavlicek J., Sankey O. F., Sinden R. R., Lyubchenko Y. L., Potaman V. N. Influence of Global DNA Topology on Cruciform Formation in Supercoiled DNA?. *Journal of Molecular Biology*. 2004, roč. 338, č. 4, s. 735–743. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.02.075

[6] Tiner S. W. J., Potaman V. N., Sinden R. R.,. Lyubchenko Y. L. The structure of intramolecular triplex DNA: atomic force microscopy study. *Journal of Molecular Biology*. 2001, roč. 314, č. 3, s. 353–357. DOI: 10.1006/jmbi.2001.5174

[7] Kato M., Matsunaga K., Shimizu N. A Novel Unusual DNA Structure Formed in an Inverted Repeat Sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998, roč. 246, č. 2, s. 532–534. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8656

[8] Mirkin S. M. Discovery of alternative DNA structures: a heroic decade (1979-1989). *Frontiers in Bioscience*. 2008, roč. 13, s. 1064-1071

Abstract

Protein p53 is a significant tumor suppressor which is, since its discovery, intensively studied for its abilities of cell cycle regulation and DNA correction. Due to these abilities protein p53 prevents from serious cell damage and occurrence of cancers what is proved by the fact that mutated forms of protein p53 are found in different types of cancer cells. To be able to fulfill its role as a transcription factor and thus regulate target genes, its interaction with DNA is necessary. The protein is capable of such role in the presence of the binding sequence p53CON, single-stranded sequences or local opened structures. In the present study were examined DNA sequences, which could lead to binding of p53 to the open structures of the DNA. Enzymatic probe, nuclease S1, and restriction endonucleases (ScaI and BamHI) were used to determine such structures.