

# VLIV STRUKTURY PŘIROZENĚ SE VYSKYTUJÍCÍ SEKVENCE DNA NA INTERAKCI S PROTEINEM P53

**Barbora Chvátalová**

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

## **Abstrakt**

Od roku 1979, kdy byl protein p53 objeven, je neustále podrobněji zkoumán. Jeho hlavní funkcí je kontrola buněčného cyklu a ochrana buňky před stresovými situacemi. K tomu aby mohl protein regulovat buněčný cyklus, musí se vázat na DNA. Protein vyžaduje pro svou vazbu k DNA buď přítomnost specifické sekvence, nebo strukturu, které zvyšují jeho afinitu díky vyššímu nadšroubovicovým vinutím.

V této práci byl zkoumán vznik struktur, které neobsahují vazebnou sekvenci pro protein, ale vyznačují se právě vyšším negativním vinutím. Práce se zaměřuje na podmínky vzniku těchto struktur a jejich stabilitu. Pro jejich identifikaci byly využity chemické a enzymatické strukturní sondy, které umožňují lokalizaci struktur.

***Klíčová slova:*** Protein p53; lokální otevřené struktury; vazba p53-DNA, enzymatické sondy, chemické strukturní sondy

## **Úvod**

Transkripční faktor P53 je biologicky aktivní jako homotetramer, jehož jedna podjednotka se skládá ze 393 aminokyselin [1], které se dělí na několik domén - N-transaktivační, DNA sekvencně specifickou vazebnou, oligomerizační a základní regulační C-koncovou doménu [2]. Nejčastěji se p53 váže jako tetramer sekvencně specificky na DNA. C-konec obsahuje také vazebnou doménu, která se váže strukturně specifickým způsobem. Topologie DNA je tedy důležitá pro vazbu proteinu na DNA [3].

Jednu z takových struktur je levotočivá Z-DNA, která je oproti B-DNA protáhlá a má svou roli v metabolických procesech genomu [4]. Od B-DNA se liší další struktury jako je třeba křížová struktura, která se vytváří pouze v palindromických sekvencích. U těchto struktur byla prokázána významná role při iniciaci replikace i regulaci transkripce [5]. Další lokální struktura - triplex vzniká vazbou jednořetězcového úseku DNA do velkého žlábků dvouřetězcové DNA [6]. Triplexy bývají rozpoznávány specifickými proteiny, které tyto struktury stabilizují, a hrají tak roli při regulaci genů [7]. Čtyřřetězcové struktury, které jsou bohaté na guanin, se vyznačují strukturální topologií a jsou označovány jako kvadruplexy [8]. Tvorba kvadruplexů v telomerických sekvencích inhibuje telomerázu, jejíž zvýšená aktivita byla nalezena v buňkách některých nádorů [8].

## **Materiál a metody**

Používaná plasmidová DNA byla vyizolována pomocí izolačního kitu firmy Macherey-Nagel.

200 ng plasmidové DNA bylo namodifikováno pomocí chemických strukturních sond DEPC a komplexu OsO<sub>4</sub> s 2,2' bipyridinem, v prostředí pH5 a pH8. Vzorky byly na 15 minut inkubovány při teplotě 37°C. Poté se vzorky přesrážely pomocí octanu sodného a ethanolu.

V dalším kroku byla namodifikovaná DNA štěpená restriční endonukleázou EcoRV a HindIII a opět proběhla inkubace 60 min/37°C, po které následovalo přesrážení.

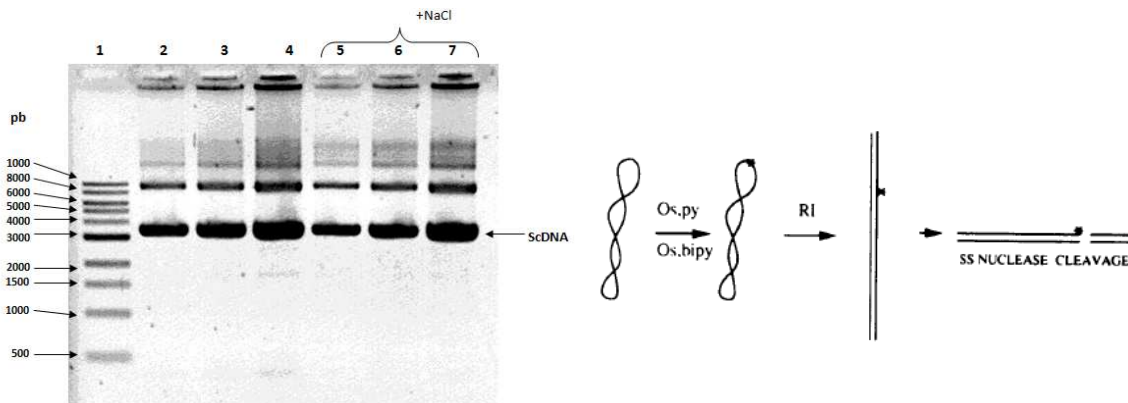
V posledním kroku se vzorky naštěpily nukleázou S1 při aktivitě 7U po dobu 20 min/37°C. Po této inkubaci byla přidána 50 mM EDTA, aby se zastavila reakce enzymu.

Vzorky byly naneseny na 1% agarózový gel, který byl zalit puřem 1xTAE. Elektroforéza proběhla při 120V/90 minut. Gel byl barven ethidiumbromidem 20 minut a stejnou dobu byl odbarvován v destilované vodě a detekován pod UV světlem

Ke 200 ng naštěpené DNA restriktázou *EcoRI* a *PstI*, byla přidána různá koncentrace zásobního proteinu p53 a vše se doplnilo 1 x TETKD puřem ( 50 mM KCl, 2,5 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA a 0,005% Triton X-100) na 10  $\mu$ l. Vzorky byly inkubovány 20 min na v ledové lázni. Po inkubaci byly naneseny na 1,5% agarózový gel, který byl zalit puřem 0,33xTBE. Elektroforéza probíhala 4 hodiny při 120V a 4°C. Následně byl gel opět barven ethidiumbromidem.

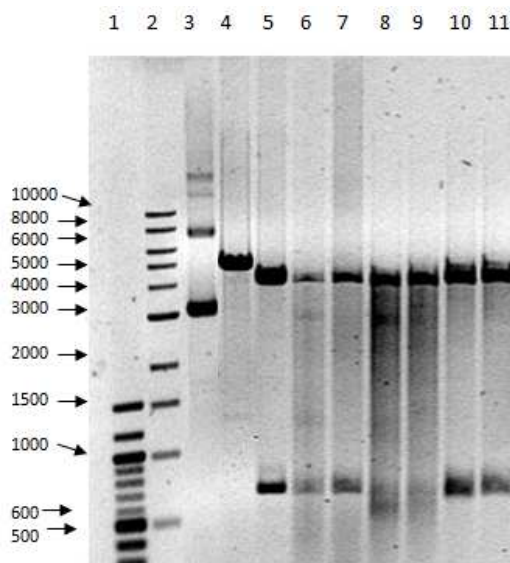
## Výsledky a diskuse

Izolací plasmidové DNA z bakterií byl získán plasmid 90-32, obsahující sekvence schopné tvořit lokální struktury. Plasmid byl izolován z kultury pěstované za standardních podmínek a za podmínek se zvýšenou koncentrací NaCl. Přidané NaCl v kultivačním médiu zvyšuje negativní superhelikální hustotu plasmidu. Plasmid byl vyizolován v koncentracích 1578 ng/  $\mu$ l bez NaCl a 2120 ng/  $\mu$ l s NaCl



**Obr.1:** Izolace plasmidové DNA: 1. 1 kb žebřík, 2. 0,5  $\mu$ l DNA, 3. 1  $\mu$ l DNA, 4. 2  $\mu$ l DNA, 5. 0,5  $\mu$ l DNA, 6. 1  $\mu$ l DNA, 7. 2  $\mu$ l DNA

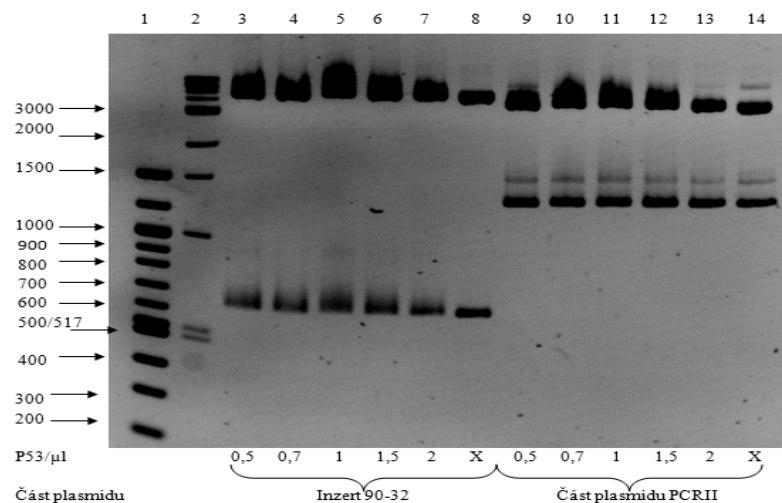
**Obr.2:** Schématické znázornění značení chemickou sondou Os,bipy a štěpení nukleázou S1. Sonda se naváže na jednořetězcovou strukturu a v místě jejím navázání je poté štěpena nukleázou S1. Díky tomu můžeme zlokalizovat přítomnost struktur (upraveno podle [9]).



**Obr.3:** Modifikovaný plasmid 90-32, štěpený *EcoRV* a *HindIII* a poté nukleázou S1: 1.100 pb žebřík, 2.1 kb žebřík 3. scDNA 90-32, 4. 90-32/ *EcoRV*, 5. 90-32/ *EcoRV* + *HindIII*, 6. 90-32/ *EcoRV* + *HindIII*/ S1, 7. 90-32/ *EcoRV* + *HindIII*/ S1, 8. 90-32/ *EcoRV* + *HindIII*/ S1, 9. 90-32/ *EcoRV* + *HindIII*/ S1, 10. 90-32/ *EcoRV* + *HindIII*/ S1, 11. 90-32/ *EcoRV* + *HindIII*/ S1

Pro detekci lokálních struktur molekule plasmidu byly použity dvě chemické strukturní sondy – diethylpyrokarbonát (DEPC) a komplex oxidu osmičelého s 2,2'-bipyridinem (Os, bipy). Výsledky modifikace a její detekce pomocí nukleázy S1 jsou zobrazeny na obr. č.3. Vzorky byly modifikovány při dvou hodnotách pH: 8 a 5. Zvolené hodnoty byly vybrány na základě výskytu sekvenčních motivů, které by měly vytvářet lokální struktury právě v blízkosti těchto hodnot pH. Restrikční endonukleázy *EcoRV* a *HindIII* u plasmidu 90-32 vytváří fragment dlouhý 692 párů bází. Teoretický odhad struktur ukázal možnou strukturu  $\pm 100$  pb od místa, kde štěpí *HindIII*. Z obrázku je patrné, že při pH 5 a modifikací kombinací sond a při pH 8 a modifikací komplexem Os, bipy došlo ke štěpení nukleázou S1, což v daném místě indikuje tvorbu struktury s jednořetězcovými úseky.

Posledním krokem byly vazebné pokusy proteinu p53 na daný 90-32. Jako negativní kontrola byl použit vektor pCR II, od něhož byl plasmid 90-32 odvozen. Vazba proteinu p53 je ukázána na obrázku 4. Ve startech 3-8 je vyštěpený inzert plasmidu 90-32 restrikční endonukleázou *EcoRI*. Tento fragment je dlouhý 615 pb a byl na něm prokázán v předchozích pokusech výskyt jednořetězcových struktur. Na obrázku můžeme vidět, že protein se na tento fragment ochotně vázal. Starty 9-14 obsahují část plasmidu pCR II, kde je výskyt struktur nepravděpodobná, což je potvrzeno i tím, že protein se na tuto část plasmidu nevázal. Tento fragment byl vyštěpen restrikční endonukleázou *PstI* a je dlouhý 1190 pb.



**Obr. 4:** Vazba proteinu p53 na plasmid p90-32 na fragment s inzertem 90-32 a fragment plasmidu pCRII. 1. 100 pb žebřík, 2. 1 kb žebřík, 3. 90-32/*EcoRI* + p53, 4. 90-32/*EcoRI* + p53, 5. 90-32/*EcoRI* + p53, 6. 90-32/*EcoRI* + p53, 7. 90-32/*EcoRI* + p53, 8. 90-32/*EcoRI*, 9. 90-32/*PstI* + p53, 10. 90-32/*PstI* + p53, 11. 90-32/*PstI* + p53, 12. 90-32/*PstI* + p53, 13. 90-32/*PstI* + p53, 14. 90-32/*PstI*

### Závěr

Cílem práce bylo charakterizovat struktury, které se vyskytují v inzertu na plasmidu 90-32. Vložený inzert se běžně vyskytuje na lidském chromozomu 8. Sekvence inzertu naznačuje, že je vhodná pro vytvoření struktur a to převážně pro intramolekulární triplex nebo bublinu. Díky experimentům byla tedy tvorba struktur na vloženém inzertu potvrzena. Přítomnost struktur naznačuje i vazba proteinu p53 na vyštěpený úsek.

## Poděkování

Poděkování patří doc. RNDr. Petru Pečinkovi za odborné vedení diplomové práce a jeho cenné rady. Také bych ráda poděkovala Mgr. Jiřímu Červeňovi za pomoc při realizaci experimentální části. Práce vznikla za finančního příspěví Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy v rámci účelové podpory programu "Národní program udržitelnosti I", projekt LO1208 "Teoretické aspekty energetického zpracování odpadů a ochrany prostředí před negativními dopady".

## Literatura

- [1.] JOERGER, A. C., & FERSHT, A.R. *The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2010, p. 20
- [2.] SUAD, O., ROZENBERG, H., BROSH, R., DISKIN-POSNER, Y., KESSLER, N., LINDA SHIMON, L.J.W., FROLOW, F., LIRAN, A., ROTTER V. & SHAKED Z. *Structural Basis of Restoring Sequence-Specific DNA Binding and Transactivation to Mutant p53 by Suppressor Mutations*. Journal of Molecular Biology. 2009, roč. 385, 1, pp. 249-265.
- [3.] BRÁZDA, V., BRÁZDOVÁ JAGELSKÁ, E., FOJTA, M. & PALEČEK, E. *Searching for target sequences by p53 protein is influenced by DNA length*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006, roč. 341, 2, pp. 470-477.
- [4.] KHA,, D. T., WANG, G., NATRAJAN, N., HARRISON, L. *Pathways for Double-strand Break Repair in Genetically Unstable Z-DNA-forming Sequences*. Journal of Molecular Biology. 2010, 398, 4, pp. 471-480.
- [5.] SHLYAKTHENKO, L. S., POTAMAN, V. N., SINDEN, R.R., LYUBCHENKO, Y, L, & VASQUEZ, K. M. *Structure and dynamics of supercoil-stabilized DNA cruciforms*. Journal of Molecular Biology. 1998, 280, 1, pp. 61-72.
- [6.] VASQUEZ, K. M., and WANG, G. *The yin and yang of repair mechanisms in DNA structure-induced genetic instability*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2013, 743, pp. 118-131.
- [7.] GUIEYSSE, A-L., PRASEUTH, D., and HÉLENÉ, C. *Identification of a triplex DNA-binding protein from human cells*. Journal of molecular biology, 1997, 267, 2, pp. 289-298.
- [8.] BALKWILL, G. D., GARNER, T. P., WILLIAMS, H.E.L. & SEARLE, M. S. *Folding Topology of a Bimolecular DNA Quadruplex Containing a Stable Mini-hairpin Motif within the Diagonal Loop*. Journal of Molecular Biology. 2009, 385, 5, pp. 1600-1615.
- [9.] PALEČEK, E. *Local Supercoil-Stabilized DNA Structure*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 1991, 26, 2, pp. 151-226.

## Abstract

Protein p53 has been deeply studied since its discovery in 1979. Its main function is cell cycle control and also to protect cell from stress situations. Protein has to be bound to DNA to be able of cell cycle regulation. P53 requires for its binding to DNA either specific sequences or structures that increase its affinity due to higher supercoiling.

In present study, formations of structures which don't contain binding sequence for protein, but are characterized by higher negative winding, were studied . This study is focused on conditions for formation of such structures and its stability. Chemical and enzymatic structural probes, which allow structure localization were used for their identification.