

INTERAKCE PROTEINU p73 S LINEÁRNÍ A SUPERHELIKÁLNÍ DNA

Zuzana Staníčková, Pavla Bažantová

*Ostravská univerzita v Ostravě, Přírodovědecká fakulta, Chittussiho 10, 710 00 Slezská Ostrava,
+420 606 372 301, z.stanicova@seznam.cz*

Abstrakt

Protein p73 je členem rodiny nádorových supresorů p53. Jako transkripční faktor je protein p73 schopen regulovat expresi řady cílových genů a tím ovlivňovat vývoj, apoptózu a také nádorové bujení. Pro jeho správnou funkci je rozhodující vlastností vázat se na DNA. Pro vysokou strukturní i sekvenční homologii centrálních DNA-vazebných domén proteinů rodiny p53 je i protein p73 schopen interagovat s konsenzní sekvencí p53CON. V této práci byla použita jako plasmidová DNA se specifickou p53 vazebnou sekvencí, tak i bez ní, a to v lineární a superhelikální formě. Byly studovány základní vazebné schopnosti proteinu p73 (vliv přítomnosti p53CON, superhelicity, iontů, vliv teploty a pH) ve srovnání s proteiny p53 a p63.

Klíčová slova: *protein p73; interakce DNA-protein; protein p53; protein p63*

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]. Všichni členové této rodiny obsahují tři vysoce konzervované domény: transaktivační doménu (TA), DNA-vazebnou doménu (DBD) a oligomerizační doménu (OD). Proteiny p63 a p73 mají navíc na svém C-konci protein-interakční SAM doménu (sterile alpha motif) [3]. Důležitost proteinu p73 jak při neurologickém, tak při celkovém vývoji dokazují experimenty na myších. Jedinci s genotypem p73^{-/-} vykazovali malý a deformovaný vzrůst, trpěli infekty, byla u nich patrná redukce mozkové tkáně, která vedla k obrazu hydrocefalu. Neurologické defekty byly pozorovány v hippocampu, v mozkové kůře a mozečku. Docházelo rovněž ke změnám v sociálním a reprodukčním chování myší, které postrádaly protein p73 [4].

Správná funkčnost proteinů rodiny p53 je tedy významná v prevenci vzniku karcinogeneze a vývojových defektů. Vazebnou aktivitu může ovlivňovat řada faktorů, mezi něž lze zahrnout topologii DNA, přítomnost specifické sekvence, iontů, změna teploty nebo pH.

Tato práce si klade za cíl studium základních vazebných schopností proteinu p73 v závislosti na vnějších podmínkách a porovnat je s vazebnými vlastnostmi proteinu p53, případně p63.

Materiál a metody

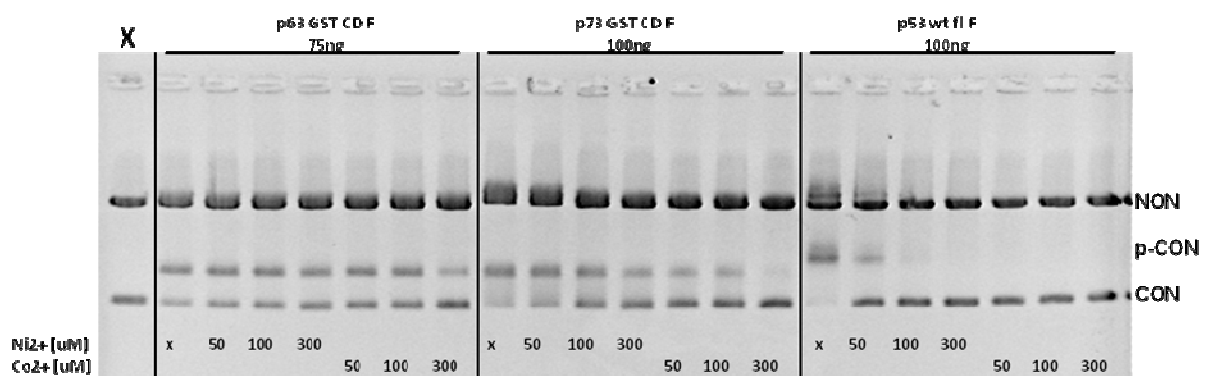
Pro vazebné experimenty byly použity plasmidy pBluescript a pPGM (pBluescript II SK obsahující sekvenci p53CON v klonovacím místě *HindIII*) [6, 12]. Plasmidy byly izolovány z bakteriální kultury *Escherichia coli* pomocí komerčního kitu NucleoBond[®]Xtra Maxi a rozpuštěny v destilované vodě. Fragmenty obsahující p53CON byly z těchto plasmidů získány hodinovou inkubací plasmidu s restriční endonukleázou *PvuII*. Štěpení probíhalo v příslušném pufru jednou jednotkou enzymu na 1 µg plasmidové DNA. Restriční endonukleáza *PvuII* štěpí použité plasmidy na dvou místech a dává vzniknout dvěma lineárními fragmentům. Delší, neobsahující vazebnou sekvenci p53CON, a kratší, který specifickou vazebnou sekvenci p53CON obsahuje. Pro odstranění enzymu a zbytků pufru byla plasmidová DNA přesrážena octanem sodným a ethanolem a rozpuštěna v destilované vodě.

Proteiny použité pro práci byly izolovány metodou FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) na Biofyzikálním ústavu AV ČR, v.v.i. v Brně.

Hlavní používanou metodou byla gelová retardační analýza. Základní vazebné experimenty byly prováděny ve vazebné směsi, která obsahovala DNA a protein v různých molárních poměrech, 5 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 mM EDTA, 0,01% Triton X-100, 50 mM KCl a 0,5 mM DTT. V případě studia vlivu iontů byl vynechán přídavek EDTA. Pro kontrolu byl vždy použit příslušný fragment bez přídavku proteinu. Dále mohlo být použito různých roztoků pro úpravu pH, případně pro obohacení vazebné směsi o dvoumocné kationty. Vzorky byly inkubovány 20 minut v ledové lázni (případně při vyšších teplotách, byl-li studován vliv teploty). Po ukončení inkubace byly vzorky doplněny nanášecím pufrům a naneseny na agarózový gel (1%, 0,33x TBE, 120 V, 1,5 hodiny, 4 °C). Gel byl obarven v roztoku ethidium bromidu (1µg/ml) a dokumentován pod UV světlem.

Výsledky a diskuse

Dosavadní práce byla zaměřena na studium vnějších podmínek na vazbu proteinů p53 a p63 k DNA (výsledky neuvedeny). Z vazebných experimentů bylo zjištěno, které podmínky jsou pro interakci proteinu p63 se sekvenčně specifickou vazebnou sekvencí p53CON nejvhodnější. Nejvyšší vazebnou aktivitu vykazoval protein p63 při hodnotách pH 6.0 - 7.0. Rozmezí teplot vhodných pro interakci bylo 0 – 30 °C, při vyšších teplotách docházelo k postupné inhibici vazby. V naší práci jsme se dále zaměřili na studium vlivu Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} a Ni^{2+} na sekvenčně specifickou vazbu proteinů p53, p63 a p73. Pozorovali jsme inhibici této vazby u centrálních domén proteinů zmíněnými ionty kovů již při mikromolárních koncentracích. Naše experimenty s DNA fragmenty, které obsahovaly sekvence p53CON, potvrzují inhibiční efekt zinečnatých kationtů. Je zajímavé, že Zn^{2+} výrazně méně inhibovali proteiny p63 a p73 ve srovnání s proteinem p53. Zatímco v případě těžkých kovů, jsme pozorovali inhibici při velice podobných koncentracích. Vybraný elektroforetogram (Obrázek 1.) dokumentuje inhibiční vliv nikelnatých a kobaltnatých kationtů v různých koncentracích na vazbu proteinů p53, p63 a p73 na sekvenci p53CON. Protein p73 byl vybranými ionty inhibován méně než protein p53. Naopak ve srovnání s proteinem p63 byla inhibice nepatrně vyšší.



Obrázek 1. Inhibiční vliv nikelnatých a kobaltnatých iontů na vazbu proteinů p53, p63 a p73 na sekvenci p53CON plasmidu pPGM1. Označení NON je použito pro volný fragment bez p53CON; p-CON je označena sekvenčně specifická vazba proteinu s kratším fragmentem plasmidu obsahujícím p53CON; CON je označení pro volný fragment plasmidu nesoucí sekvenci p53CON.

Závěr

Vazebnými pokusy bylo zatím určeno optimální rozmezí teplot a hodnot pH pro vazbu proteinu p63 ke specifické vazebné sekvenci p53CON. Dále byla srovnána senzitivita proteinů p53, p63 a p73 k vlivu dvoumocných kationtů kovů zinku a těžkých kovů. Z dosavadních výsledků lze usoudit, že protein p73 je více odolný k vlivu vnějších podmínek než protein p53. Naopak v porovnání s proteinem p63 je jeho stabilita srovnatelná. Další práce budou zaměřeny na teplotní a pH závislost proteinu p73 při vazbě na DNA. Naše výsledky mohou přispět k základnímu výzkumu, který je s proteiny rodiny p53 intenzivně prováděny.

Poděkování

Poděkování patří doc. 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" a SGS34/PŘF/2014.

Literatura

- [1.] MACHADO-SILVA A., PERRIER S., BOURDON J. *p53 family members in cancer diagnosis and treatment*. Seminars in Cancer Biology, 2010, 20, pp. 57-62.
- [2.] SAYAN E. A., D'ANGELO B., SAYAN B. S., TUCCI P., CIMINI A., CERÈ M. P., KNIGHT R. A., MELINO G. *p73 and p63 regulate the expression of fibroblast growth factor receptor 3*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 394, pp. 824-828.
- [3.] Graziano V., De Laurenzi V. *Role of p63 in cancer development*. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1816, pp. 57-66.
- [4.] Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kanghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, Ch., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F., Caput, D. *p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours*. Nature. 2000, 404: pp. 99-103.

Abstract

Protein p73 is a member of the tumor suppressor p53 family. As a transcription factor protein p73 is capable of regulating the expression of a number of target genes and thus influence the development, apoptosis and tumor growth. For its proper function is critical properties to bind to DNA. For high structural and sequence homology to the central DNA-binding domain of p53 family proteins is the p73 protein capable of interaction with consensus p53CON sequence. In this study was used the plasmid DNA with a specific p53 binding sequences, and without it, in linear and superhelical form. Finally fundamental binding ability of p73 protein (effect of the presence p53CON, superhelicity, ions, the influence of temperature and pH) in comparison with the p53 and p63 proteins.