

INTERAKCE PROTEINU p63 S p53 VAZEBNOU SEKVENCÍ

Pavla Bažantová, Jiří Červeň, Petr Pečinka

*Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě,
Chittussiho 10, 710 00 Ostrava, p.bazantova@email.cz*

Abstrakt

Protein p53 je významným transkripčním faktorem, který je nezbytný v prevenci vzniku nádorových buněk. Od svého objevu v roce 1979 byl protein p53 cílem řady studií, které přinesly bližší pohled na jeho strukturu i funkci. O téměř dvacet let později byl objeven jeho strukturní homolog p63. Oba tyto proteiny obsahují tři základní domény, přičemž za specifickou interakci s DNA je odpovědná centrální DNA-vazebná doména. Jako sekvenčně specifické místo pro vazbu proteinu p53 (p53CON) byla identifikována sekvence obsahující dvě kopie motivu 5'PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3', oddělených 0-13 páry bází. Vysoká sekvenční i strukturní homologie DBD obou proteinů umožňuje proteinu p63 vázat se na p53CON in vitro i in vivo. V této práci byl studován vliv některých faktorů na interakci p63 s p53CON. Vhodné pH pro interakci se ukázalo být 6.0 – 8.0, vhodné rozmezí teplot 0 – 30 °C. Byl prokázán inhibiční vliv některých dvoumocných iontů na vazbu p63-p53CON.

Klíčová slova: *nádorový supresor p53; protein p63; p53CON; interakce DNA-protein*

Úvod

Členové proteinové rodiny p53 – p53, p63 a p73 – hrají významnou roli při vzniku nádorů a během vývoje tkání [1]. 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*) [2]. TP53 je klasickým nádorovým supresorem, který hraje klíčovou úlohu při odpovědi buňky na poškození DNA. Regulací exprese řady cílových genů se podílí na řízení buněčného cyklu, buněčné senescenci nebo apoptoze [3]. V lidských nádorových buňkách/útvarech jsou nejčastěji identifikovány mutace právě v genu *p53*. Inaktivace proteinu p53 nemusí přímo souviset s mutací v genu *p53*, ale postačí přerušení některé z regulačních cest, které jeho aktivitu řídí [4]. Protein p63 byl objeven jako sekvenční i strukturní homolog p53, tudíž se předpokládalo, že bude mít take stejnou a redundantní funkci. Během řady studií bylo potvrzeno, že tyto proteiny sdílejí některé základní funkce, avšak bylo také dokázáno, že p63 vykazuje značnou funkční divergenci [2, 5]. DNA-vazebná doména proteinu p63 si zachovává homologii jako u p53 a protein p63 se může na p53 consensní sekvenci vázat in vitro i in vivo. Nicméně rozdílné biologické úlohy obou genů naznačují, že regulují odlišné skupiny cílových genů. Toto lze částečně vysvětlit existencí jiné specifické vazebné sekvence proteinu p63, na níž se p63 váže přednostně [5].

Nejvyšší exprese p63 je zaznamenávána v bazálních vrstvách vrstevnatých epitelárních struktur. Významný pohled na úlohu proteinu p63 v živém organismu přinesly studie na myších modelech. Jedinci s absencí genu *p63* vykazovali markantní vývojové vady. Mutace lidského genu p63 jsou spojovány s řadou vývojových syndromů [5].

Materiál a metody

Pro vazebné experimenty byly použity plasmidy pPGM2 (pBluescript II SK obsahující sekvenci p53CON [5'-AAGCTTAGACATGCCTAGGCATGTCTAAGCTT-3'] v klonovacím

místě *Hind*III) [6]. Plasmidy byly izolovány z bakteriální kultury *Escherichia coli* pomocí komerčního kitu NucleoBond[®]Xtra Maxi a rozpuštěny v TE pufru pH 8.0. Fragmenty obsahující p53CON byly z těchto plasmidů získány tříhodinovou inkubací plasmidu s restrikční endonukleázou *Pvu*II. Štěpení probíhalo v příslušném pufru dvěma jednotkami enzymu na 1 µg plasmidové DNA. Restrikční endonukleáza *Pvu*II štěpí použité plasmidy na dvou místech a dává vzniknout dvěma lineárním fragmentům. Delší, neobsahující vazebnou sekvenci p53CON o délce 2513 bp, a kratší, který specifickou vazebnou sekvenci p53CON obsahuje, a jeho celková délka je 474 bp. Pro odstranění enzymu a zbytků pufru byla plasmidová DNA přesrážena octanem sodným a ethanolem a rozpuštěna v TE pufru pH 8.0.

Proteiny použité pro práci byly izolovány metodou FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) na Biofyzikálním ústavu AV ČR, v.v.i. v Brně. Byly použity následující proteiny: wtp53FL frakce E8 o koncentraci 300 ng/µl a protein GSTp63CD frakce S2 o koncentraci 190 ng/µl.

Pro studium vlivu pH na interakci DNA byla použita řada roztoků pro úpravu pH vazebné směsi. Pro roztoky o pH 5.0 a 5.5 byly použity octanové pufrы. Pro pH 6.0 - 7.0 směs triethanolamin hydrochloridu a hydroxidu sodného a pro pH 7.5 - 9.0 Tris-HCl. Všechny zásobní roztoky byly namíchaný v koncentraci 0,5 M a ve vazebné směsi byla jejich koncentrace 10 mM. Sada roztoků pro sledování vlivu různých dvojmocných iontů na interakci proteinu p63 na p53CON byla připravena ve formě chloridů (hořečnatý, zinečnatý, vápenatý, manganatý, kobaltnatý, rtuťnatý a kademnatý). Zásobní roztoky byly namíchaný v koncentraci 20 mM. Ve vazebné směsi byla výsledná koncentrace iontů 1 mM.

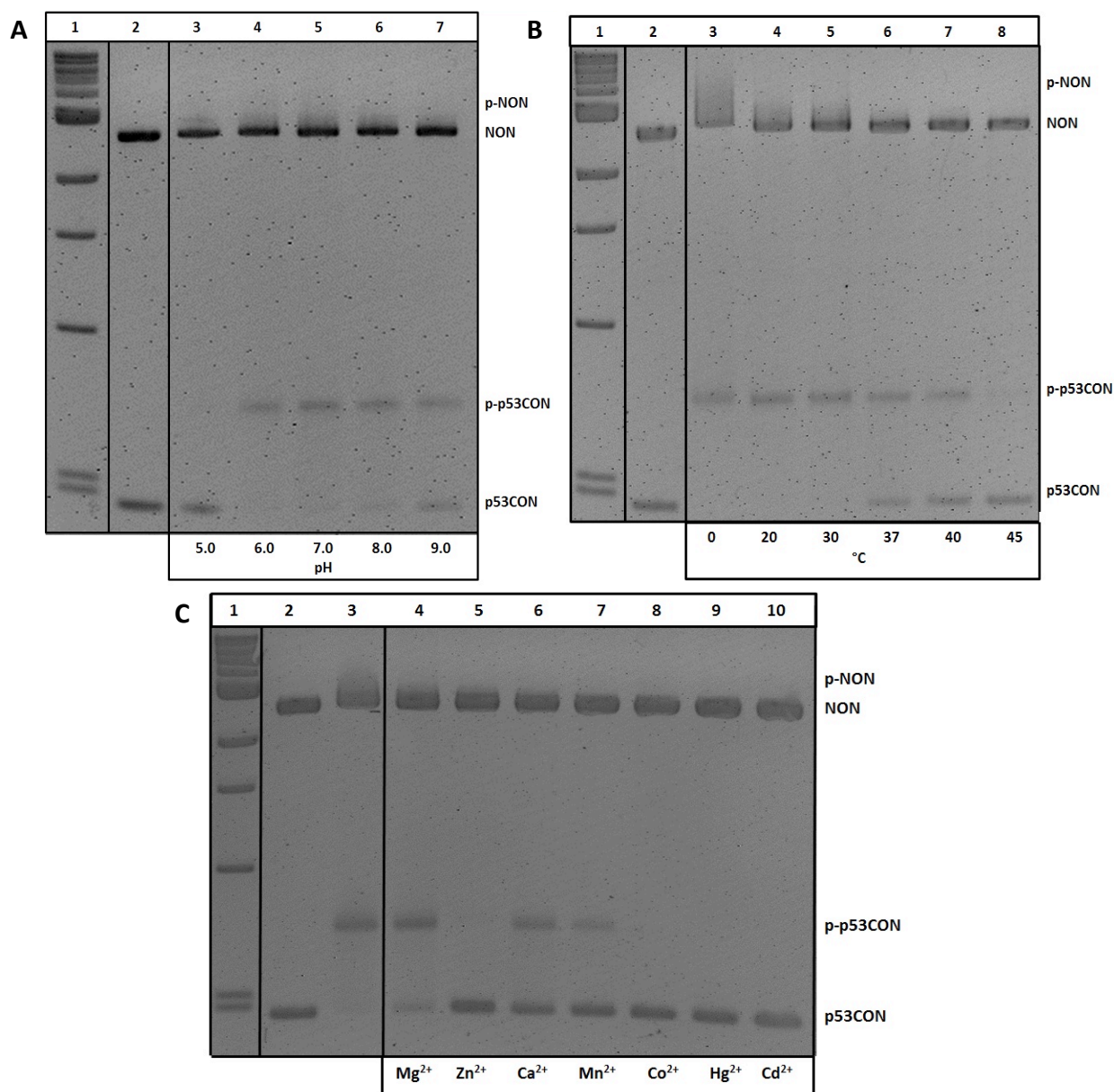
Vazebné experimenty byly prováděny v 10 µl vazebné směsi, která obsahovala 0,2 µg plasmidové DNA, 0,1 µg p63, 50 mM KCl, 2,5 mM Tris-HCl; 0,005% (v/v) Triton X-100 a 0,5 mM EDTA. Při sledování vlivu pH a dvoumocných iontů na vazbu p63-p53CON obsahovala vazebná směs 10 mM pufr o příslušném pH, případně 1mM roztok chloridů bez EDTA. Manipulace s proteinem byla prováděna v komorové lednici při teplotě 4 °C. Při sledování vlivu teploty na interakci proteinu s plasmidovou DNA byla inkubace prováděna v termostatech při teplotách 0, 20, 30, 37, 40 a 45 °C. V ostatních případech byla inkubace prováděna v ledové lázni. Doba inkubace činila 20 minut.

Po ukončení inkubace byly vzorky doplněny 2 µl 6x nanášecího pufru a naneseny na agarozový gel a byla provedena elektroforéza. (1,2%, 0,33 x pufr TBE, 4 hodiny, 120 V, 4 °C). Gel byl obarven v roztoku ethidium bromidu (1µg/ml) a vyfotografován pod UV světlem.

Výsledky a diskuse

Výsledky elektroforetických gelů jsou zobrazeny na obrázku 1. Vliv pH na vazbu proteinu na p53CON byl sledován při různém pH (A). Při hodnotě pH 5.0 k sekvenčně specifické vazbě nedochází, což je patrné z absence zpomaleného elektroforetického signálu v dráze č. 3 v oblasti p-p53CON. Hodnoty pH 6.0 a 7.0 jsou pro sekvenčně specifickou vazbu výhodné. Na veškerý úsek s p53CON se protein navázal, což se projevilo absencí elektroforetického signálu v místě p53CON. Při hodnotách pH 8.0 a 9.0 došlo k navázání proteinu na část plasmidové DNA, což se projevilo přítomností elektroforetického signálu v místě p-p53CON a zároveň v místě p53CON. Sledování vlivu různé teploty na vazbu p63-p53CON (B) odhalilo následující: při teplotách 0, 20 a 30 °C došlo k navázání proteinu na veškerý fragment pPGM2 s p53CON a zároveň lze pozorovat sekvenčně nespecifickou vazbu na delší fragment pPGM2, který sekvenci p53CON neobsahuje; při teplotách 37 a 40 °C došlo k navázání pouze na část plasmidové DNA; při teplotě 45 °C byla vazba zcela inhibována. Vliv zinečnatých, kobaltnatých, rtuťnatých a kademnatých iontů je jednoznačně inhibiční (C). V případě hořečnatých, vápenatých a manganatých iontů

k navázání p63 částečně došlo. V porovnání s pozitivní kontrolou, která dvoumocné ionty neobsahovala, je ovšem tato vazba slabší.



Obrázek 1. Vazba proteinu p63 na sekvenci p53CON plasmidu pPGM2. Označení p-NON je použito pro komplex delšího fragmentu plasmidové DNA s nespecificky vázaným proteinem; NON označuje volný fragement bez p53CON; p-p53CON je označena sekvenčně specifická vazba proteinu s kratším fragmentem plasmidu obsahujícím p53CON; p53CON je označení pro volný fragment plasmidu nesoucí sekvenci p53CON. **(A)** Vliv změny pH na inetarkci p63-p53CON. Start č.: 1. 1 kb standard; 2. pPGM2; 3-7. pPGM2 + p63 v závislosti na pH. **(B)** Vliv změny teploty na inetarkci p63-p53CON. Start č.: 1. 1 kb standard; 2. pPGM2; 3.-8. pPGM2 + p63 v závislosti na teplotě. **(C)** Vliv dvoumocných iontů na inetarkci p63-p53CON. Start č.: 1. 1 kb standard; 2. pPGM2; 3. pPGM2 + p63; 4-7. pPGM2 + p63 v závislosti na přítomnosti dvoumocných iontů.

Závěr

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 přítomnosti některých iontů byla pozorována inhibice vazby proteinu p63 na konsensní sekvenci p53CON. Zvláště výrazný inhibiční efekt vykazovaly zinečnaté, kobaltnaté, kademnaté a rtuťnaté ionty.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Dr. Marii Brázdové z Biofyzikálního ústavu AV ČR, v.v.i. v Brně za poskytnutí proteinů pro realizaci experimentů. 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.

Literatura

- [1.] 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, 2010, 394, 824-828
- [2.] Graziano V., De Laurenzi V. *Role of p63 in cancer development*. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1816, 57-66
- [3.] Dötsh V., Bernassola F., Coutandin D., Candi E., Melino G. *p63 and p73, the Ancestors of p53*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010, 2, 9
- [4.] Machado-Silva A., Perrier S., Bourdon J. *p53 family members in cancer diagnosis and treatment*. Seminars in Cancer Biology, 2010, 20, 57-62
- [5.] Barbieri C. E., Pietenpol J. A. *p63 and epithelial biology*. Experimental Cell Research, 2006, 312, 695-706
- [6.] Paleček E., Vlk D., Staňková V., Brázda V., Vojtěšek B., Hupp T. R., Schaper A., Jovin T. M. *Tumor supresor protein p53 binds preferentially to supercoiled DNA*. Oncogene, 1997, 15, 2201-2209

Abstract

Protein p53 is an important transcription factor which plays a significant role in the prevention of the development of tumor cells. Since its discovery in 1979 protein p53 has been a target of many studies which brought a more detailed view on its structure and function. The structure homolog of p53, protein p63 has been discovered nearly 20 years later. Both p53 and p63 contain three basic domains. The central DNA-binding domain is responsible for sequence-specific interaction with DNA. The sequence containing two copies of 5'-RRRC(A/T)(T/A)GYYY-3' motif separated by 0-13 base pairs was identified as a sequence-specific site for p53 binding to DNA. Significant both structural and function homology of DNA-binding domains of both proteins allows binding of p63 to p53CON sequence *in vitro* as well as *in vivo*. The influence of some factors on the interaction p63 with p53CON was studied. The strong p63-p53CON interaction was observed in the range of pH 6.0-8.0, at temperatures between 0-30°C. Some ions showed to have the inhibition effect to p63-p53CON interaction.

Key words: tumor suppressor p53; protein p63; p53CON; DNA-protein interaction