

ТЮТЮННИКОВА А.П., КРАВЧУК І.В., МАЛЮТА О.В., ДИБКОВ М.В.,
МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЄЄВ Г.Д.

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

Україна, 03680, Київ, вулю Заболотного, 150; e-mail: g.d.telegeev@imbg.org.ua

РОЛЬ Vcr ТА АСОЦІЙОВАНИХ ІЗ НИМ БІЛКІВ У РОЗВИТКУ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Vcr-Abl – гібридний білок, який є продуктом транслокації t(9;22), вважається ключовим фактором злоякісної трансформації у випадку Ph-позитивних лейкемій. Існування резистентності до традиційних лікарських засобів створює необхідність розробки нових підходів для терапії. Потенційною мішенню для таких розробок може слугувати Vcr фрагмент у складі Vcr-Abl. У нашому дослідженні ми зосередили увагу на PH домені вищезгаданого білка.

Вторинна та третинна структури PH домена білка Vcr на даний момент невідомі. Їхнє вивчення не тільки має фундаментальне значення, але і може служити підґрунтям для розробки нових стратегій терапії Ph-позитивних лейкемій. Функція білка часто реалізується через взаємодію з іншими білками. Попередньо нами було виявлено ряд білків, потенційних кандидатів по зв'язуванню з PH доменом білка Vcr (серед них кортактин та FBP17), проте факт взаємодії потребує ґрунтовнішого експериментального підтвердження. Для фосфоліпази Cε (PLCε) ця взаємодія була показана [1]. Крім того, було доведено, що коекспресія в культурі клітин білків Vcr/Abl та PLCε веде до зниження рівня останнього. Відомо, що PLCε є одночасно і мішенню, і регулятором малих ГТФаз родини Ras – білків, що є одними із ключових у розвитку Vcr/Abl-залежного лейкемогенезу, а клітини, трансформовані Vcr/Abl, мають надзвичайно високий рівень активної форми Ras [2]. Однак сигнальні механізми всіх цих процесів залишаються невідомими і потребують вивчення.

Метою роботи є: встановлення взаємодії PH домена білка Vcr з кортактином та FBP17, аналіз кореляції між експресією фосфоліпази Cε (PLCε) та наявністю і типом перебудови Vcr/Abl у пацієнтів з мієлопроліферативними захворюваннями (МПЗ), експресія рекомбінантного білка, що відповідає ділянці доменів RA1 та RA2 білка PLCε, а також визначення співвідношення елементів вторинної структури в рекомбінантному білку PH домена.

Матеріали і методи

Рекомбінантний білок PH-домена білка VCR отримували в системі експресії pQE30-PH/E.coli TG1. Генетична конструкція містить фрагмент ДНК, що відповідає повнорозмірному PH домену, який експресується з мінімальною кількістю векторних амінокислот. Проводили афінну очистку білка на Ni-NTA агарозі (Quiagen) в денатуруючих умовах в присутності 8М сечовини. Ренатурацію білка з фракцій елюції проводили діалізом протягом 24 годин проти розчинів (50 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl, 10% глі-

цери́на, рН 7,0) у співвідношенні об'ємів 1:100 з ступінчатим зниженням концентрації сечовини 6М-4М-2М-1М-0М.

Для визначення співвідношення елементів вторинної структури в рекомбінантному білку РН домену спектри кругового дихроїзму вимірювали на дихрографі Aviv Circular Dichroism Spectrometer, Model 202 (Aviv, Lake-Wood N.J., США) в 50 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 7,0; 100 мМ NaCl; при температурі 25 °С в УФ-діапазоні від 200 до 240 нм. Товщина кювети становила 0,1 см. Концентрація білку становила 0,3 мг/мл. Для проведення аналізу отриманих даних використали програму K2d (<http://www.embl.de/~andrade/k2d/>), яка дає можливість визначати вміст трьох основних типів вторинної структури – а-спіралей, b-тяжів і нерегулярної конформації.

Отримання рекомбінантного білка, що відповідає RA1 та RA2 доменам PLCε. кДНК отримували за стандартним протоколом на матриці тотальної РНК, виділеної з лейкоцитів периферійної крові хворих на різні МПЗ. Рекомбінантну конструкцію створювали за допомогою методів генетичної інженерії (дизайн специфічних олігонуклеотидних праймерів, ПЛР, клонування ампліфікованого фрагмента в вектор експресії, перевірка отриманих конструкцій за допомогою автоматичного секвенсу). Оптимізація експресії рекомбінантного білка здійснювалась шляхом підбору найефективнішої системи для експресії та умов культивування бактерій. Очищення білків здійснювалось на GST сефарозі.

Експресія PLCε визначалась за допомогою олігонуклеотидних праймерів, специфічних до регіону, що кодує RA1 та RA2 (Ras/Rap associating) домену, наявність яких відрізняє PLCε від усіх інших фосфоліпаз родини C. Наявність і тип транскрипта Vcr/Abl визначали за допомогою геноспецифічних праймерів.

Трансфекцію клітин еукаріотів проводили згідно [3]. Для експресії білка кортактина використовували ДНК-конструкцію на основі вектора pRK5muc, для білка FBP17 – на основі вектора pJ3H, а ДНК-послідовність, яка кодує РН домен білка Vcr, була заклонована у плазмиду pEGFP-C3. Коімунопреципітацію проводили за стандартним протоколом [4].

Результати та обговорення

Вимірювання спектру кругового дихроїзму рекомбінантного білка РН-домена білка VCR. Отриманий спектр (Рис.1.) характеризується мінімумом в області 208 нм. Теоретично така форма спектру характеризує білки класу β, які переважно представлені β-тяжами. Розрахований вміст b-тяжів у структурі ренатурованого рекомбінантного РН-домена становить 39,0 %, вміст а-спіралей – 10,0 %, а вміст нерегулярних конформацій – 51,0%. Для аналізу отриманих результатів ми порівнювали вміст а-спіралей і b-тяжів у білків з визначеною структурою. За допомогою біологічних баз даних UniProt та PDB були відібрані білки, що містять РН домену, а також отримані дані про їх вторинну структуру. За даними рентгеноструктурного або ЯМР аналізу РН домену середній вміст а-спіралей дорівнює 10%, а b-тяжів-

приблизно 37%. Таким чином, дані для РН домену Vcr корелюють з літературними даними для інших РН доменів, структура яких була визначена. Це свідчить про те, що отриманий нами білок має нативну конформацію, що дозволяє використовувати його для подальших експериментів на визначення функціональної активності та досліджень структури.

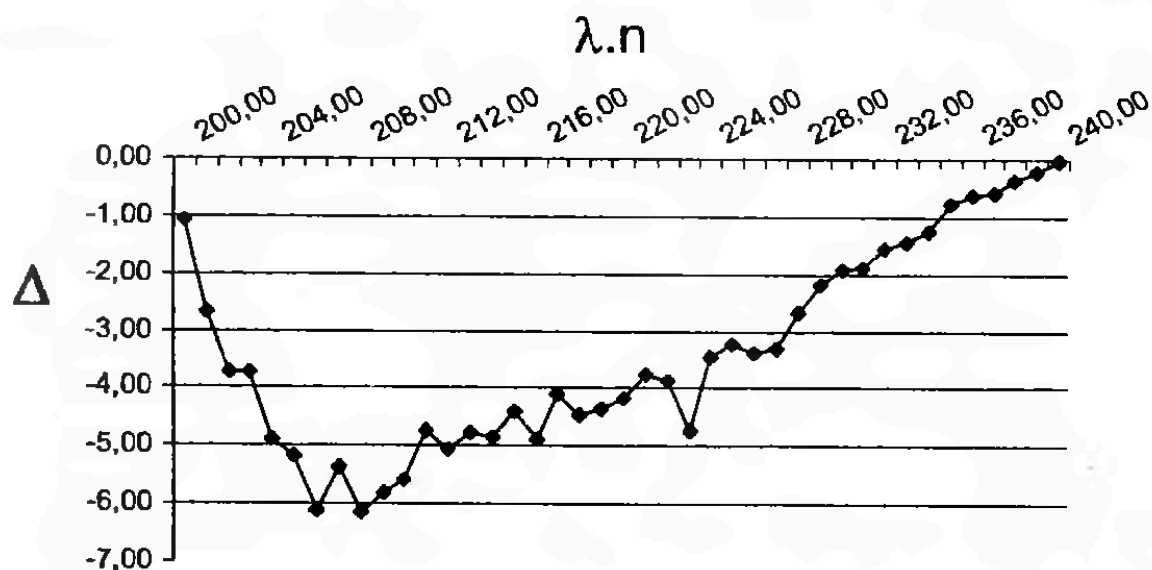


Рис. 1. Спектр кругового дихроїзму РН-домена білка VCR, скорегований відносно буфера.

Аналіз кореляції між експресією фосфоліпази Cε (PLCε) та наявністю і типом перебудови Vcr/Abl у пацієнтів з МПЗ. Було проаналізовано 12 пацієнтів із різними МПЗ. Результати досліджень показали, що у всіх пацієнтів із проаналізованої групи спостерігалась експресія PLCε (Рис.2а), в той час як наявність p210 Vcr/Abl спостерігалась у 9 пацієнтів. Експресія PLCε в лейкоцитах периферійної крові хворих на МПЗ може бути маркером онкогенної трансформації в процесі розвитку хронічного мієлолейкозу. Подальший аналіз механізмів сигналіngu, до якого залучені як PLCε, так і Vcr/Abl, може стати в нагоді при розробці нових методів лікування Ph-позитивних лейкозів.

На основі вектора pGEX-6P-1 було створено генетичну конструкцію, що несе нуклеотидну послідовність, яка відповідає ділянці RA1 та RA2 доменів білка PLCε. Було проведено експресію та очищення білка – доменів RA, здійснено підбір умов для оптимізації цього процесу (Рис.2б). Отриманий рекомбінантний білок можна використовувати для вивчення його взаємодії із РН доменом білка Vcr/Abl.

Дослідження взаємодії білків кортактина та FBP17 з РН доменом білка Vcr за допомогою котрансфекції з подальшою коїмунопреципітацією. Коїмунопреципітація кортактина та FBP17 з РН доменом не дала підтвердження взаємодії, (Рис.3), проте цей результат не варто вважати остаточною. У майбутньому планується оцінка взаємодії за допомогою метода far-Western.

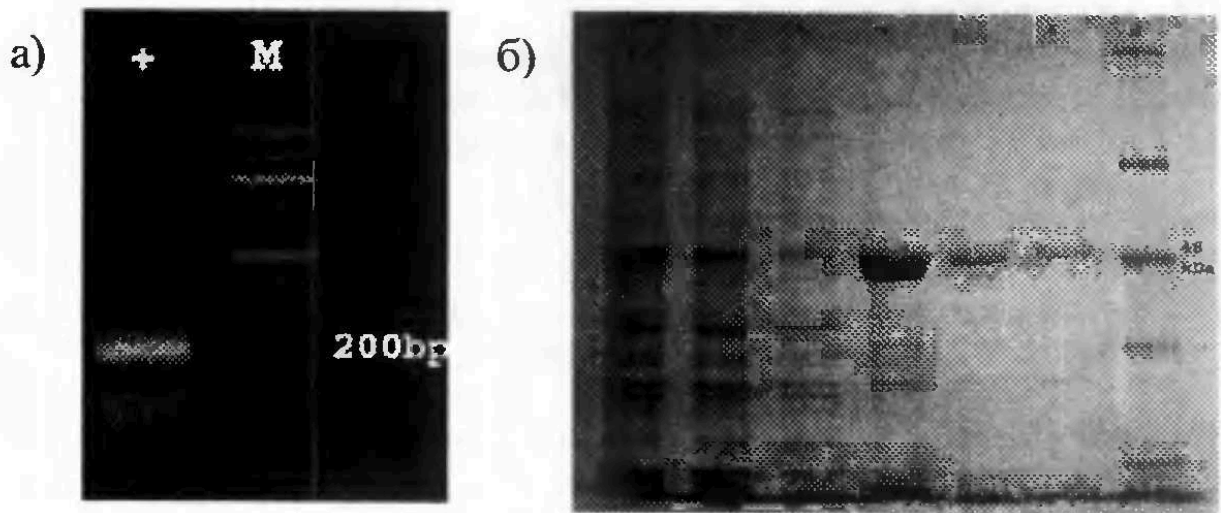


Рис. 2. а) Експресія PLCε (розмір продукту – 174 п.н.) у зразку периферійної крові хворого на МПЗ: + - PLCε, М – ДНК-маркер молекулярної маси; б) Очищення рекомбінантного білка, що відповідає RA1 та RA2 доменам фосфоліпази Сε: 1 – розчинна фракція до очищення, 2 – розчинна фракція після зв’язування з GST сефарозою, 3 – фракція промивки, 4-6 – фракції елюції, М – маркерна суміш.

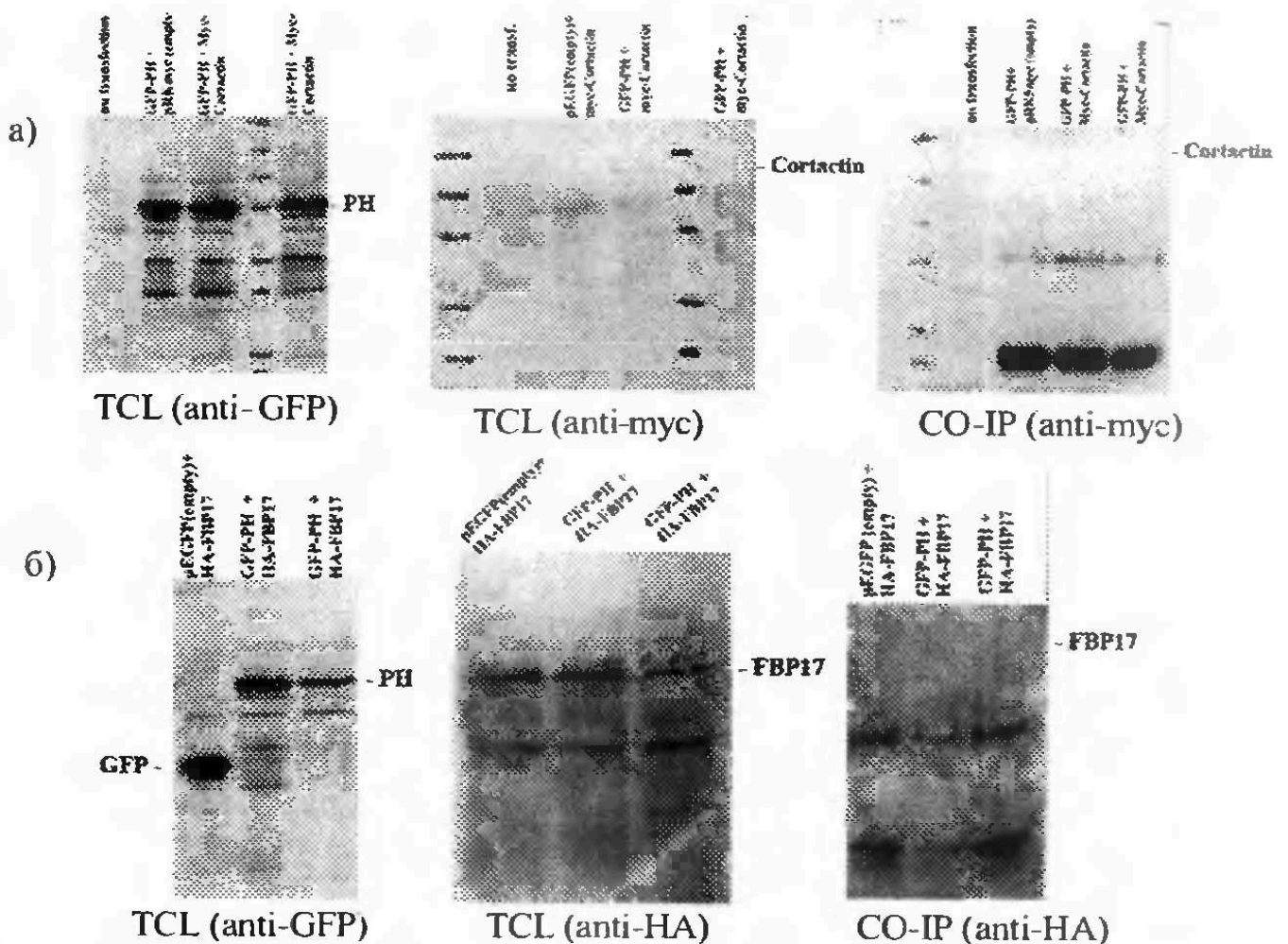


Рис.3. а) Коімунопреципітація білка кортактина з PH доменом Src. б) Коімунопреципітація білка FBP17 з PH доменом Src. TCL – загальний лізат клітин, CO-IP – коімунопреципітація.

Література

1. *Miroshnychenko D., Dubrovskaya A., Maliuta S., Telegeev G., and Aspenström P.* Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein-protein and protein-lipid interactions // *Exp Cell Res.* – 2010. – V.316. – N4. – P.530-542.
2. *Raeppe D., von Lintig F., Zemojtel T., Duchniewicz M., Jung A., Lübbert M., Boss G. R. and Scheele J. S.* Determination of Ras-GTP and Ras-GDP in patients with acute myelogenous leukemia (AML), myeloproliferative syndrome (MPS), juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), acute lymphocytic leukemia (ALL) and malignant lymphoma: assessment of mutational and indirect activation // *Ann Hematol.* – 2008. – 88. – N4. – P. 319-324.
3. *Chen C., Okayama H.* High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA // *Mol. Cell. Biol.* – 1987. – V.7. – P.2745-2752.
4. *Elion E.A.* Detection of Protein-Protein Interactions by Coprecipitation / *Current Protocols in Protein Science.* – Unit 19.4.

Резюме

Вивчалась структура PH домена білка Bcr методом кругового дихроїзму, а також функція цього домена за допомогою встановлення зв'язування з іншими білками та з'ясування ролі цієї взаємодії у розвитку мієлопроліферативних захворювань.

Изучалась структура PH домена белка Bcr методом кругового дихроизма, а также функция этого домена с помощью установления связывания с другими белками и определение роли этого взаимодействия в развитии миелопролиферативных заболеваний.

We studied the structure of PH domain of Bcr protein with circular dichroism method, and also the function of this domain via identification of binding to other proteins and verification of role of this interaction in development of myeloproliferative disorders.

Національна академія наук України
Національна академія аграрних наук України
Національна академія медичних наук України
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ

TOPICS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS

Збірник наукових праць

ТОМ 11

***Присвячено:
90-річчю від дня народження Р.Г. Бутенко***

Київ
ЛОГОС — 2011