

Obtaining of recombinant C2 domain of Bcr protein

**Olga Maliuta³, Olga Nezeliuk¹, Dmitro Yefremenko²,
Genadii Telegeiev³, Oleksandr Karpov¹**

¹*National University of food technologies, Kyiv, Ukraine*

²*Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine*

³*Institute of Molecular biology and Genetics, Kyiv, Ukraine*

ABSTRACT

Keywords:

Leukemia
C2 domain
Bcr protein

Bcr-Abl protein is one of the markers of malignant transformation, which has been studied for many years. However, there are a lot of questions connected with this protein that. Moreover, the effect of Bcr in tumor transformation haven't yet studied also. The difference in the clinical picture of patients with various forms of fusion protein suggest important areas that distinguish between these forms. The main difference form p230 Bcr-Abl from others is the existence of the C2 domain of protein Bcr. That's why we studied the structure of this domain. Experiments in cloning and protein expression of C2 domain of Bcr protein was performed. An effective method of purification and renaturation of recombinant C2 domain of Bcr protein in pET-28s / E. coli BL21 (DE3) expression system was developed. It can be used in further structural and functional studies of its role in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. The results can be used for the development of a new specific agents for blocking signal pathways, involving fusion protein Bcr-Abl.

Article history:

Received 12.04.2013

Received in revised form
16.04.2013

Accepted 26.04.2013

Corresponding author:

Olga Nezelyuk
E-mail:
nezeluk_oliga@i.ua

УДК 616-006:577.2.575

Отримання рекомбінантного C2 домену білка Bcr

**Ольга Малюта³, Ольга Незелюк¹, Дмитро Єфременко²,
Генадій Телегєєв³, Олександр Карпов¹**

¹*Національний університет харчових технологій, Київ, Україна*

²*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна*

³*Інститут молекулярної біології та генетики, Київ, Україна*

Вступ

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) займає третє місце серед усіх видів раку крові, на її частку припадає близько 20% випадків. На даний момент в Україні зареєстровано близько 3 тис. хворих на ХМЛ. Проблема лейкозів набула актуального значення в

зв'язку з постійним ростом захворюваності, недостатністю відомостей про етіологію, патогенез і малою ефективністю існуючих методів лікування [1].

Філадельфійська (Ph⁺) хромосома – перший описаний цитогенетичний маркер хронічної мієлоїдної лейкемії, що є результатом реципрокної транслокації між 22 і 9 хромосомами. Внаслідок зазначеної транслокації утворюється гібридний ген *bcr-abl*, продукт якого, як вважають, спричиняє розвиток хвороби [2]. "Філадельфійська хромосома" виявляється при ХМЛ в більш ніж 95% випадках, а також часто спостерігається при гострому лімфобластному лейкозі (ГЛЛ) та деяких лімфомах та мієломах. При транслокації 9 та 22 хромосом розриви в гені *abl* відбуваються таким чином, що майже не змінюють структурну частину гібридного білка, що належить Abl. На відміну від цього, ген *bcr* має три ділянки, в яких розриви відбуваються найчастіше: M-*bcr*, m-*bcr* і μ -*bcr*. В залежності від точки розриву гена *bcr*, можуть утворюватися три форми білка Bcr-Abl: p190, p210 і p230, відповідно. Відомо, що різні по довжині форми білків Bcr-Abl відповідають різним формам захворювання. Так, білок p210 Bcr-Abl виявляється при ХМЛ, p190 Bcr-Abl – при ГЛЛ, а найдовша форма p230 Bcr-Abl – при відносно доброякісній нейтрофільній формі мієлоїдної лейкемії [1, 2]. Механізми переходу хвороби з хронічної стадії в гостру залишаються невідомими. Основна частина досліджень у цій галузі спрямована на вивчення кіназної активності Bcr-Abl. Це дало змогу розробити і впровадити в клінічну практику перший специфічний інгібітор тирозинової кінازی - іматиніб, однак з'являється все більше даних про виникнення мутацій, що перешкоджають дії цього лікарського засобу. Таким чином, виникає проблема розробки нових специфічних агентів, як і нових підходів до блокування сигнальних шляхів, у яких бере участь гібридний білок Bcr-Abl. Всі попередні роботи були спрямовані на вивчення активності тирозинової кінازی Abl-частини. Це дало змогу розробити і впровадити в клінічну практику перший специфічний інгібітор тирозинової кінازی, однак з'являється все більше даних про виникнення мутацій, що перешкоджають дії цього лікарського засобу. Таким чином, виникає проблема розробки нових специфічних агентів, як і нових підходів до блокування сигнальних шляхів, у яких бере участь гібридний білок Bcr-Abl. Детальна характеристика доменів білка Bcr може допомогти як у пошуку нових мішеней для лікарських препаратів, так і в з'ясуванні причин розвитку певного фенотипу захворювання та механізмів його прогресії.

Різниця у клінічній картині хворих з різними формами гібридного білка вказують на важливу роль ділянок, що відрізняють між собою ці форми. Основною відмінністю форми p230 Bcr-Abl від інших є наявність у її складі C2 домену білка Bcr, тому ми зосередились на вивченні структури цього домену.

Перший представник родини C2 доменів був ідентифікований у протеїнкіназі C, активність якої залежала від кальцію. Це невеликі домени, що зазвичай мають у складі приблизно 130 амінокислот та беруть участь в орієнтації білків клітинних мембран [3]. Група C2 доменів має властивість зв'язувати не тільки кальцій, але й широкий спектр лігандів, що включає фосfolіпіди і білки. Існує два типи конформації C2 домену, що мають форму 8-скручених антипаралельних ланцюгів та формують β -сендвіч структуру, але відрізняються направленням β -складок [4].

Хоча багато чого вже дізналися про структуру та функції C2 домену, та кілька фундаментальних питань залишаються без відповіді. Стехіометрія Ca²⁺ зв'язування, характер і особливості координації були лише частково визначені. Дуже мало відомо про механізм Ca²⁺ зв'язування з мембраною [5]. Ліганди для багатьох C2 областей до сих пір не виявлено.

C2 домен знаходиться на C-кінці білка Vcr, до нього належать амінокислоти 870–1002. Відомо, що він може взаємодіяти з білками, що відповідають за ендосомальний сортинг [6], але його роль у патогенезі ХМЛ залишається не відомою.

Методи досліджень

Накопичувальну (нічну) культуру отримували на середовищі Лоурі-Бертрані (LB). Інкубували при 37°C протягом ночі на швидкості перемішування 200 об/хв.

Для приготування компетентних клітин застосовували модифікований метод з використанням хлориду кальцію, що робить клітинні мембрани більш проникними до плазмідної ДНК. Після чого було здійснено трансформацію компетентних клітин *E.coli* плазмідною ДНК. Бактерії культивуються з ДНК, а потім раптово нагріваються (до 42 С протягом 30–60 секунд), що примушує ДНК до проникнення до клітини. Цей метод добре працює для кільцевої ДНК плазмід, але не для лінійних фрагментів хромосомної ДНК. В експериментах використовували плазмиди, які містять ген стійкості до антибіотиків і бактеріальні штами, що не мають стійкості до цього антибіотику. Тому, тільки трансформовані бактерії можуть вижити на селективному середовищі з цим антибіотиком.

Виділення плазмід здійснювали методом лужного лізису. Очищення плазмідної ДНК проводили на мембранних фільтрах.

Розрізання плазмідного вектора проводили за допомогою ендонуклеаз *Bam*HI та *Hind*III. Отриману плазмиду перевіряли на її відповідність очікуваного розміру. Для цього використовували електрофорез в агарозному гелі. Оцінку розмірів ДНК здійснювали, спираючись на дані про розміри рестриктів секвенованих молекул ДНК. Як правило, в якості реперних фрагментів відомої довжини використовують рестрикти ДНК фага λ , для яких виділяють одну з доріжок гелевої пластинки. Вони дозволяють визначати розміри рестриктів ДНК, що вивчається. Виділення ДНК з агарозного гелю після гелелектрофорезу проводили для отримання цільових фрагментів за використання готового набору Silica Bead Gel Extraction Kit (“Fermentas”, Литва). З цією метою під ультрафіолетовим світлом, необхідним для візуалізації, вирізали ділянку гелю, котрий містив необхідний фрагмент. Після цього проводили відмивання ДНК, використовуючи Binding Buffer і Washing Buffer. Процедура повторювалася тричі. Завершальним кроком був відбір супернатанту, який і містив цільову ДНК.

Цільові конструкції було створено шляхом лігування вектора та відповідної вставки. З цією метою збиралася реакційна суміш таким чином, щоб молярне співвідношення вектора до вставки було 1:3, а також у присутності АТФ та ферменту – T4 ДНК лігази.

Секвенування нуклеотидної послідовності створених конструкцій проводилося за використання автоматичного секвенатора 3130 Genetic Analyzer (“Applied Biosystem”, США). Аналіз було зроблено за допомогою програм BlastN и BlastX (National Center for Biotechnology Information, США).

Для експресії цільових нуклеотидних послідовностей у клітинах *E.coli* було проведено трансформацію попередньо приготованих компетентних клітин відповідними конструкціями. Після цього проводився посів трансформованої культури у рідке поживне середовище LB із відповідним антибіотиком. Інкубація тривала до моменту досягнення культурою оптичної щільності OD600, після чого до культури додавалося IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), що відповідало кінцевій концентрації даного індуктора 0,1 мМ. Індукція білків тривала 4 год. Після цього проводилося осадження клітин центрифугуванням на 4000 g протягом 20 хв при температурі +4°C.

Надосадову рідину було відібрано, а осад вміщений на 12 год при температурі -20°C . Лізування клітин проводилося при температурі танення льоду шляхом додавання лізуючого буфера та інкубації протягом 30 хв. Після цього розчин соніцирували ультразвуком на льоду 6 раз по 20 сек з перервою 1 хв і центрифугували 10 хв на 15000 об/хв. Надосад наносили на колонку з 0,5 мл Ni-NTA агарози (Qiagen) і інкубували 1 годину при $+4^{\circ}\text{C}$ з обертаннями 30 об/хв. Колонку промивали відповідним буфером 4 рази. Елюцію білка проводили в 4 етапи з використанням буфера. Концентрацію білка вимірювали за методом Бредфорда. Білки додатково очищали від імідазолу і низькомолекулярних домішок діалізом проти відповідних розчинів.

Результати та обговорення

Ділянку гену *bcr*, що відповідає C2 домену було клоновано в вектор pET-28c, ефективність клонування перевірена методом автоматичного секвенсу, для експресії використано штам-реципієнт *E. coli* BL21(DE3). Електрофоретичний аналіз лізатів *E. coli*, в яких індукували синтез C2 внесенням у середовище IPTG, підтвердив наявність у них білка очікуваної молекулярної маси ($\sim 20,5$ кДа), рівень продукції якого склав більш ніж 20% від загального вмісту білків клітини. Аналіз білків у різних фракціях показав, що під час експресії C2 формуються нерозчинні цитоплазматичні агрегати, відомі як тільця включення *E. coli*, і практично не відбувається секреція і накопичення розчинного C2 у периплазмі. Варіювання умов культивування продуцента (зниження температури і концентрації IPTG) не привело до підвищення ефективності секреції і значного накопичення розчинного білка. Рівень його продукції в тільця включення був досить високим і становив не менш ніж 20 мг рекомбінантного білка, що відповідав C2 домену з 100 мл культури *E. coli* при кінцевому значенні її оптичної густини $\text{OD}_{600} = 12$.

Для очищення рекомбінантного білка було використано колонку з Ni-NTA агарозою в денатуруючі умови в буфері з концентрацією сечовини 8М. Проведено ренатурацію нерозчинного білка діалізним методом зі ступінчастим зниженням концентрації детергенту. Вихід ренатурованого білка склав 0.5 мг з 100 мл культури *E. coli*.

Висновки

1. Заклоновано ділянку гену *bcr*, що відповідає C2 домену в вектор для бактеріальної експресії pET-28c.
2. Розроблено ефективну методику очищення та ренатурації рекомбінантного білка C2 домену, що може бути використаний у подальших структурно-функціональних дослідженнях.
3. Результати даної роботи можуть стати основою для розробки нових специфічних агентів, як і нових підходів до блокування сигнальних шляхів, у яких бере участь гібридний білок Bcr-Abl.

Література

1. Charella A. Chronic Myeloid Leukaemia Biology and Treatment / Martin Dunitz Ltd. – 2001. – Vol. 123, № 29 – P. 528.

— **Biotechnology, Microbiology** —

2. Cortes J., Deininger M. Chronic myeloid leukemia / Informa Healthcare USA, Inc. – 2007. – Vol. 76, № 13 – P. 163.
3. Cho W, Stahelin RV. Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains / Biochim Biophys Acta. – 2006. – Vol.26, №8. – P.838 – 851.
4. Olabisi, O. O., Mahon, G. M., Kostenko, E. V., Liu, Z., Ozer, H. L., and Whitehead, I. P. Ber interacts with components of the endosomal sorting complex required for transport-I and is required for epidermal growth factor receptor turnover / Cancer Res. – 2006 – Vol. 66, №13. – P.6250-6257.
5. Pappa H., Murray-Rust J., Dekker L.V., Parker P.J., McDonald N.Q. Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta / Structure. – 2008. – Vol.6, №7. – P.885 – 894.
6. Luo J.H., Weinstein I.B. Calcium-dependent activation of protein kinase C. The role of the C2 domain in divalent cation selectivity / J. Biol. Chem. – 2003. – Vol.268, №31. – P.23580 – 23584.