

Визначення специфічності білково-ліпідних і білково-білкових взаємодій PH-домену білка Bcr, пов'язаного з хронічною мієлоїдною лейкемією

Д. О. Мірошніченко, А. М. Дубровська, Г. Д. Телегєєв, С. С. Малюта

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

d.o.miroshnychenko@imbg.org.ua

Білок Bcr є партнером Abl за реципрокною транслокацією t(9;22), що призводить до утворення філадельфійської хромосоми. Проаналізовано функції PH-домену Bcr. Визначено ліпідні, з якими зв'язується PH-домен in vitro. Розроблено підхід до виявлення білково-білкових взаємодій PH-домену методами мас-спектрометрії. Підтверджено зв'язування PH-домену з білками SMC1, -тубуліном, zizimin1, PLC in vitro та in vivo.

Ключові слова: Bcr-Abl, PH-домен, мас-спектрометрія.

Вступ. Ph'-лейкемії – це група лейкемій, що характеризуються наявністю філадельфійської (Ph') хромосоми, яку вперше виявлено у хворих на хронічну мієлогенну лейкемію (ХМЛ) [1]. Ph'-хромосома – продукт реципрокної транслокації t(9;22)(q34;q11) [2], внаслідок якої утворюється гібридний ген *bcr-abl*, що обумовлює розвиток пухлинного фенотипу [3]. Розриви в гені *bcr* відбуваються переважно в трьох ділянках – *M-bcr*, *m-bcr* і *-bcr* [4]. Утворення гібридного гена *bcr-abl* при цьому зумовлює картину перебігу мієлоїдного та лімфоїдного типів лейкозу. Залежно від точки розриву гена *bcr* експресуються три форми білка Bcr-Abl: p190, p210 і p230 відповідно. Відомо, що різні за довжиною форми білка Bcr-Abl p190 і p210 обумовлюють різні форми захворювання.

Ми вивчали ділянку білка Bcr, яка знаходиться між двома точками розриву *M-bcr* і *m-bcr* і містить два домени: DH і PH (рис. 1). PH-домен виконує

ліпідзв'язувальну функцію, крім того, у деяких білках він бере участь і в білково-білкових взаємодіях. У даній роботі клоновано PH-ділянку гена *bcr*, отримано рекомбінантний білок і проаналізовано спектр ліпідів і білків, що зв'язуються з PH доменом *in vitro*. Підтверджено зв'язування декількох з визначених білків в експериментах *in vivo*.

Матеріали і методи. Отримання ДНК-конструкцій. PH-ділянку *bcr* виявлено методом ЗТ-ПЛР. Для бактеріальної експресії білка PH фрагмент розміром 648 п. н. клоновано у вектор *pET32a* в рамці з 6 His послідовністю [5]. ДН- і ДНPH-фрагменти синтезовано методом ПЛР з використанням конструкції p210 Bcr-Abl, люб'язно наданої Норою Хейстеркамп (Дитячий госпіталь, США) як матриці. Фрагменти розміром 685 і 1169 п. н. відповідно клонували у вектор *pRK5-тус*. Усі конструкції перевірено автоматичним секвенуванням.

Виділення білків, що зв'язуються з PH-доменом Bcr, методом афінної хроматографії. Білок PH

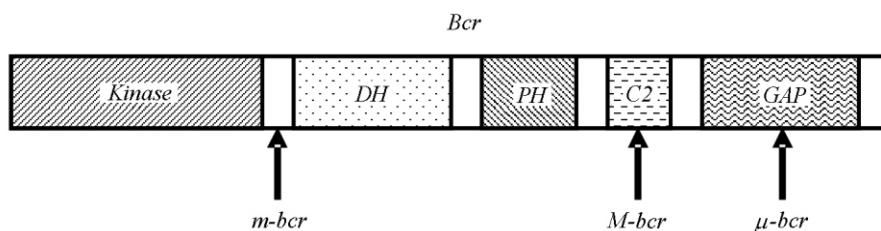


Рис. 1. Доменна організація білка Bcr. Позначення: DH – Dbl-гомологічний домен; PH – pleckstrin-гомологічний домен; C2 – кальцій-зв’язувальний домен; GAP – GAP-домен

експресували в клітинах *Escherichia coli* лінії BL21 DE3 і виділяли на колонці Ni-NTA («Qiagen», США) згідно з протоколом виробника. Для аналізу білково-білкових взаємодій PH-домену використано колонку Ni-NTA зі зв’язаним білком, а щоб проаналізувати ліпід-білкові взаємодії білок елюювали, і його кінцева концентрація складала 1,6 мг/мл. Лізат клітин K562, мічених [³⁵S]-метіоніном, готували згідно з [6]. На колонку зі зв’язаним білком PH наносили 0,5 мл лізату клітин K562 із загальною концентрацією білка 1 мг/мл і інкубували протягом 12 год при температурі 4 °C. Після інкубації і промивання зразки аналізували методом двовимірного електрофорезу. Контролем слугував білок, експресований з «порожнього» вектора *pET32a*.

Аналіз білків, преципітованих PH-доменом. Білки розділяли методом двовимірного електрофорезу з градієнтом величини рН 3–10. Радіоактивно мічені білки клітин K562 детектували на сканері Fuji X2000, використовуючи програмне забезпечення AIDA («IMG GmbH», ФРН). Зразки вирізали з гелю, обробляли трипсином і аналізували методом мас-спектрометрії MALDI TOF MS на спектрометрі Bruker Biflex («Bruker Daltonics», ФРН). Для ідентифікації пептидних спектрів застосовано програму ProFound.

Імунопреципітація білків, що зв’язуються з PH-доменом Bcr. Для аналізу використано клітини HEK293T, трансфіковані конструкціями, що експресують білки DH або DHPH і відповідний білок-мішень (zizimin1 або PLC). Вектор *pCMV*, який експресує PLC з flag послідовністю, отримано від М. Джозефа («ICR», Велика Британія). Конструкцію *pEF4-NA* з клонованим геном *zizimin1* одержано від Л. МакНамари (Університет штату Вірджинія, США). Як негативний контроль вико-

ристано конструкцію DH, яка не містила PH-домєну. Білки DH і DHPH мали епітоп *тус* на N-кінці, zizimin1 – HA-фрагмент, PLC – flag-фрагмент для полегшення їхньої детекції. Імунопреципітацію проводили з анти-*тус* антитілами згідно з [5].

Аналіз зв’язування білка PH з ліпідами. Для визначення ліпідів, з якими зв’язується білок PH, використано гідрофобну мембрану PIP Strips™ з іммобілізованими ліпідами («Echelon», США). Мембрану блокували розчином TBS з 0,1 % твіну-20, 3 % БСА, вільного від жирних кислот, і інкубували з 0,5 мкг/мл білка PH упродовж 12 год при температурі 4 °C. Реконбінантний білок PH детектували за допомогою анти-His антитіл (1:3000, «Clontech», США) і вторинних антимишачих антитіл IgG (1:10000), кон’югованих з пероксидазою хрому.

Результати і обговорення. **Виявлення ліпідної специфічності PH-домену Bcr.** Для визначення ліпідів, що зв’язуються з PH-доменом Bcr, використано мембрану з нанесеними 15 ліпідами, які зустрічаються у людини. Щоб виключити зв’язування білка з послідовностями, які належать вектору (наприклад, полярними полігістидиновими послідовностями), за контроль взято білок, експресований з «порожнього» вектора. Експериментальні дані свідчать про те, що PH-домен Bcr зв’язується з фосфатидилінозитол-монофосфатами, а саме – PI(3)P, PI(4)P і PI(5)P (рис. 2).

Визначення білків клітин K562, що зв’язуються з PH-доменом Bcr in vitro. Клітини K562 вирощували у середовищі з [³⁵S]-метіоніном. Таким чином, усі білки K562 мали радіоактивний сигнал. Це давало змогу відрізнити їх від бактеріальних, присутніх у препараті білка PH, зв’язаного з колонкою Ni-NTA. Зразки, отримані після порівняння двох

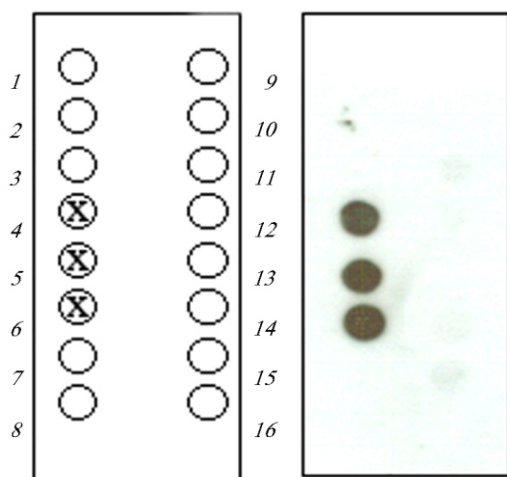


Рис. 2. Аналіз ліпідів, що зв'язуються з PH-доменом *Vsr*: 1 – лізофосфатидна кислота (LPA); 2 – лізофосфохолін (LPC); 3 – PI; 4 – PI(3)P; 5 – PI(4)P; 6 – PI(5)P; 7 – фосфатидилетаноламін (PE); 8 – фосфатидилхолін (PC); 9 – сфінгозин-1-фосфат (S1P); 10 – PI(3,4)P₂; 11 – PI(3,5)P₂; 12 – PI(4,5)P₂; 13 – PI(3,4,5)P₃; 14 – фосфатидна кислота (PA); 15 – фосфатидилсерин (PS); 16 – порожня лунка

Аналіз зв'язування PH-домену *Vsr* з білками *SMC1* і γ -тубуліном *in vitro*. Для перевірки зв'язування PH-домену з γ -тубуліном і *SMC1* застосовано колонки Ni-NTA з рекомбінантним білком PH. Після інкубації лізату клітин K562 зі зв'язаним білком PH та промивання колонки зразки розділяли в акриламідному гелі і переносили на мембрану. Ендогенні білки детектували специфічними антитілами з титром 1:150 для *SMC1* і 1:200 для γ -тубуліну. В обох випадках було підтверджено зв'язування досліджуваних білків з PH-доменом (рис. 4). Контролем слугувала колонка Ni-NTA з білком, експресованим з «порожнього» вектора.

Імунопреципітація PH-домену *Vsr* з білками *zizimin1* і *PLC* *in vivo*. Для аналізу взаємодії PH-домену з *zizimin1* і *PLC* використано конструкцію DPH, що містить обидва домени PH і DH, і як контроль – конструкцію DH, яка не включає PH-домену. Білки у клітинах HEK293T експресували за до-

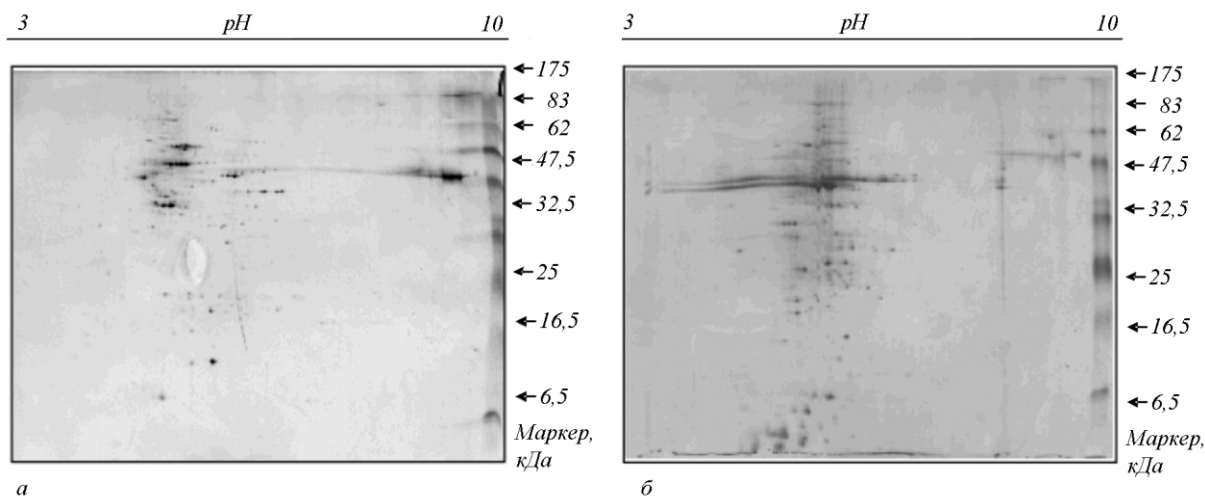


Рис. 3. Двовимірний гель-електрофорез білків, преципітованих на колонці Ni-NTA зі зв'язаним рекомбінантний білком: а – експресованим з «порожнього» вектора *pET32a* (контроль); б – PH-доменом *Vsr*

гелів (рис. 3), обробляли трипсином і аналізували. В результаті ідентифіковано 23 білки, що потенційно можуть зв'язуватися з PH-доменом *Vsr*. Для підтвердження такої можливості кожен з детектованих білків необхідно було перевірити в окремих експериментах з визначення білково-білкових взаємодій *in vitro* або *in vivo*. Для подальшого вивчення відібрали білки *SMC1* (structure maintenance of chromosomes), γ -тубулін, *zizimin1* і *PLC*.

помогою вектора *pRK5-myc*, що містить *myc*-епітоп. Клітини трансфікували двома векторами: *pEF4-zizimin1* (або *pCMV-PLC*) і *pRK5-myc* з відповідною вставкою (DH або DPH). Через 36 год після трансфекції лізат клітин аналізували методом імунопреципітації. Таким чином, підтверджено зв'язування PH-домену *Vsr* з обома білками (рис. 5). *PLC* належить до родини фосфоліпаз і каталізує розщеплення фосфатидилінозитол-4,5-

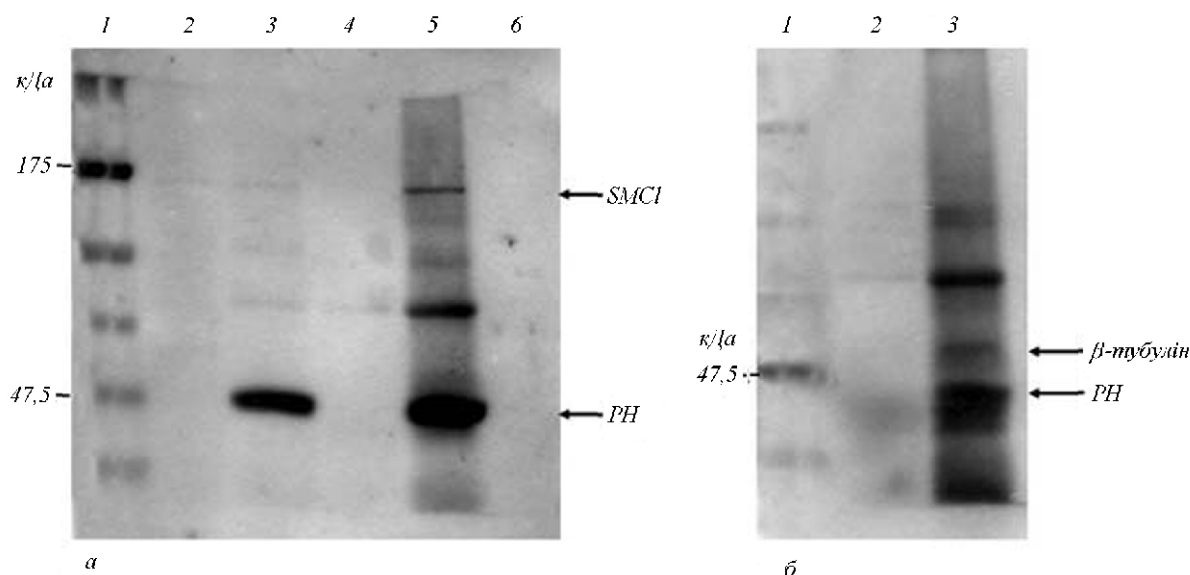


Рис. 4. Зв'язування PH-домену Vsg з білками SMC1 (а) і β -тубуліном (б) *in vitro* (а: 1 – маркер молекулярної маси; 2 – лізат клітин K562; 3, 5 – білки, преципітовані PH-доменом; 4, 6 – контроль (імуноблот: анти-SMC1 1:150, анти-гістидин 1:3000, вторинні антимішачі антитіла 1:10000); б: 1 – маркер молекулярної маси; 2 – контроль; 3 – білки, преципітовані PH-доменом (імуноблот: анти- β -тубулін 1:200, вторинні антимішачі антитіла 1:10000))

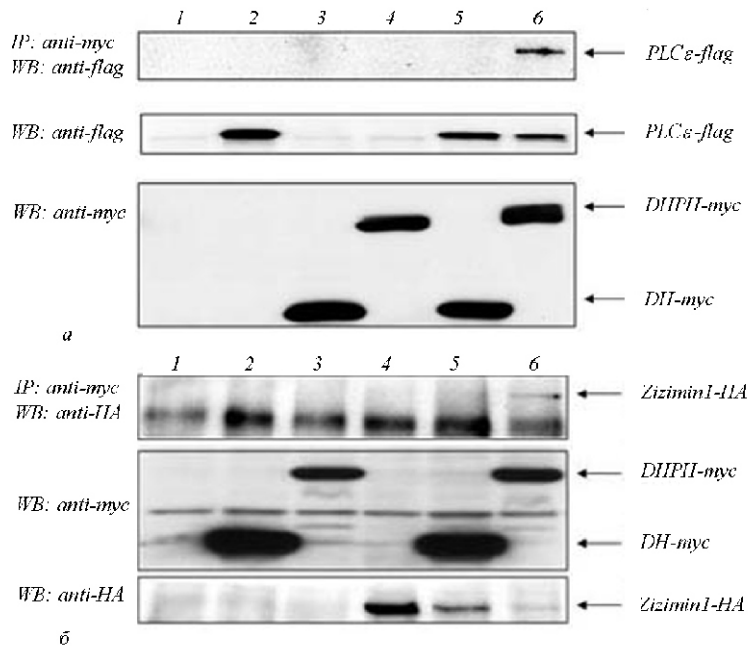


Рис. 5. Зв'язування PH-домену Vsg з білками zizimin1 (а) і PLC (б) *in vivo* (а: 1 – лізат клітин 293Т (контроль); 2 – PLC -flag; 3 – DH-myc; 4 – DHPH-myc; 5 – DH-myc + PLC -flag; 6 – DHPH-myc + PLC -flag; б: 1 – лізат клітин 293Т (контроль); 2 – DH-myc; 3 – DHPH-myc; 4 – zizimin1-HA; 5 – DH-myc + zizimin1-HA; 6 – DHPH-myc + zizimin1-HA)

біфосфату на діацилгліцерол і інозитол-1,4,5-трифосфат, який є вторинним месенджером у клітині [7]. Zizimin1 належить до родини DOCK180 і має GEF (guanine nucleotide exchange factor) активність відносно Cdc42 завдяки наявності домену DHR-2 (DOCK homology region-2), який за своєю третинною структурою нагадує тандем DHPH [8]. Цікавим є факт наявності PH-доменів у складі обох зазначе-

них білків. Відомо, що деякі PH-домени здатні олігомеризуватися, отже, взаємодія zizimin1 або PLC з PH-доменом Vsg потенційно може бути обумовлена зв'язуванням двох PH-доменів, хоча це потребує подальшого визначення.

Родина PH-доменів широко представлена у білках людини. Близько 10 % доменів PH мають високу афінність взаємодії з фосфатидилінозітолами.

Відомо, що останні в клітині розподілені нерівномірно, різні мембранні структури мають свій набір відповідних ліпідів, які зв'язуються зі специфічними ефекторами і, таким чином, відбувається залучення потрібних сигнальних білків. PI(4)P є основним компонентом мембран комплексу Гольджі, PI(3)P – компонент мембран ранніх ендосом, а PI(5)P детектують у нуклеоплазмі [9]. Отже, взаємодія PH доменів з компонентами мембран цих органел забезпечує локалізацію білка в різних компартментах клітини, що може впливати на його функції.

Мало відомо про білково-білкові взаємодії PH-доменів. Використання зв'язування білків із лізату клітин іммобілізованим рекомбінантним білком і подальший їхній аналіз методами протеоміки є дієвим і зручним механізмом визначення білків, що асоціюють з PH-доменом. Показано, що PH-домен Bcr зв'язує білки, які відіграють значну роль у життєдіяльності клітини (зокрема PLC). Таким чином, Bcr або p210 Bcr-Abl можуть брати участь у різноманітних шляхах передачі сигналу в клітині.

Висновки. Визначено ліпідів, з якими зв'язується PH-домен, а саме – PI(3)P, PI(4)P і PI(5)P. Висока афінність взаємодії PH-домену з фосфатидилінозитолами може впливати на локалізацію білків Bcr і p210 Bcr-Abl, до складу яких він входить. Вперше детектовано взаємодію PH-домену Bcr з білками. Подальше вивчення впливу PH-домену на функції Bcr і p210 Bcr-Abl розширить наші знання про сигнальні шляхи зазначених білків, дасть можливість пояснити вплив різних форм гібридного білка Bcr-Abl на диференціювання гемопоетичних стовбурових клітин та перебіг Ph'-позитивних лейкемій.

*D. O. Miroshnychenko, A. M. Dubrovska, G. D. Teleguev,
S. S. Maliuta*

Protein-lipid and protein-protein interactions of Bcr PH domain

Summary

Bcr is a partner of Abl in reciprocal translocation t(9;22) which leads to Philadelphia chromosome formation. In the present study we analyzed Bcr PH domain functions and determined lipid specificity of PH domain in vitro. The technical approach for determining PH domain protein-protein interactions using mass-spectrometry was developed. Interactions with SMCI, α -tubulin, zizimin1 and PLC ϵ were confirmed in vitro and in vivo.

Key words: Bcr-Abl, PH domain, mass spectrometry.

*Д. А. Мирошниченко, А. Н. Дубровская, Г. Д. Телегеев,
С. С. Малиута*

Определение специфичности белково-липидных и белково-белковых взаимодействий PH-домена белка Bcr, связанного с хронической миелоидной лейкемией

Резюме

Белок Bcr является партнером Abl по реципрокной транслокации t(9;22), приводящей к образованию филадельфийской хромосомы. Проанализированы функции PH-домена Bcr. Определены липиды, с которыми связывается PH домен in vitro. Разработан подход к выявлению белково-белковых взаимодействий PH-домена методами масс-спектрометрии. Подтверждено связывание PH-домена с белками SMCI, α -тубулином, zizimin1, PLC ϵ in vitro и in vivo.

Ключевые слова: Bcr-Abl, PH-домен, масс-спектрометрия.

PERELIK LITERATURY

1. Nowell P. C., Hungerford D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // *Science*.—1960.—**132**.—P. 1497–1499.
2. Rowley J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining // *Nature*.—1973.—**243**.—P. 290–293.
3. Bartram C. R., de Klein A., Hagemeijer A., van Agthoven T., Geurts V. K., Bootsma D., Grosveld G., Ferguson-Smith M. A., Davies T., Stone M. Translocation of *c-Abl* oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia // *Nature*.—1983.—**306**.—P. 277–280.
4. Телегеев Г. Д., Дубровская А. Н., Дыбков М. В. Роль белка BCR/ABL в лейкозогенезе // *Эксперим. онкология*.—1999.—**21**, № 3–4.—С. 182–194.
5. Мирошниченко Д. О., Малиута О. В., Ложко Д. М., Телегеев Г. Д., Малиута С. С. Аналіз первинної і вторинної структури PH домену білка Bcr // *Доп. НАН України*.—2007.—№ 7.—С. 176–180.
6. Grimsby S., Jaenssob H., Dubrovska A., Lomnytska M., Hellman U., Souchelnytskyi S. Proteomics-based identification of proteins interacting with Smad3: SREBP-2 forms a complex with Smad3 and inhibits its transcriptional activity // *FEBS Lett*.—2004.—**5**.—P. 93–100.
7. Bunney T. D., Katan M. Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases // *Trends Cell Biol*.—2006.—**16**.—P. 640–648.
8. Cote J. F., Vuori K. Identification of an evolutionary conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity // *J. Cell Sci*.—2002.—**115**.—P. 4901–4913.
9. Rusten T. E., Stenmark H. Analyzing phosphoinositides and their interacting proteins // *Nat. Meth*.—2006.—**3**.—P. 251–258.

УДК 616-006:577.2.:575
Надійшла до редакції 02.07.07