

Д. О. Мірошніченко, О. В. Малюта, Д. М. Ложко, Г. Д. Телегеев,
член-кореспондент НАН України С. С. Малюта

Аналіз первинної і вторинної структури PH домену білка Bcr

The primary structure of Bcr PH domain is analyzed by using biological databank. To obtain the experimental secondary structure content of the recombinant PH protein, CD spectra were measured at 200–240 nm. The data observed correlate to ones for PH domains with determined structure.

Філадельфійська хромосома (Ph[']) була першою визначеною хромосомною аномалією, пов'язаною з пухлинним захворюванням, а саме хронічною мієлоїдною лейкемією (ХМЛ) [1]. Пізніше вона була охарактеризована як продукт реципрокної транслокації t(9; 22)(q34; q11) [2], внаслідок якої утворюються два гібридних гени — ген *bcr/abl* на 22q⁻ (Ph[']) хромосомі та ген *abl/bcr* на 9q⁺ хромосомі. Як показали численні експерименти саме продукт гена *bcr/abl* обумовлює розвиток пухлинного фенотипу [3–5]. Філадельфійська хромосома виявляється при ХМЛ в більш ніж 95% випадків, а також при гострому лімфобластному лейкозі і в деяких випадках лімфом та мієлом [4].

Розриви в гені *bcr* відбуваються переважно в трьох ділянках: M-bcr, m-bcr і μ -bcr (рис. 1) [4, 5]. 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 відповідають різним формам захворювання. Так, білок p210 виявляється при хронічній стадії захворювання, а p190 — при гострій лімфобластній лейкемії. Механізми переходу хвороби від хронічної стадії до гострої залишаються невідомими.

Аналізуючи доменний склад білка Bcr, ми зосередились на вивченні функцій двох доменів, що знаходяться між ділянками M-bcr і m-bcr. Це DH домен, що вважається GEF-фактором для Rho-родини ГТФаз, і PH домен, який є ліпідзв'язуючим доменом. Нами було клоновано PH-ділянку гена *bcr*, отримано рекомбінантний білок і проаналізовано структуру даного PH домену.

Матеріали і методи дослідження. Для отримання ДНК-конструкцій PH ділянку гена *bcr* виділяли із зразків крові хворих на ХМЛ методом зворотної ПЛР за допомогою специфічних праймерів. Фрагмент розміром 648 п. о. (2563–3211 п. о.) клонували у вектор pUC19 по сайтах рестрикції PstI-HindIII. Після цього PH ділянка була субклонована у вектор pET32a (рестрикція по BamHI-HindIII) для подальшої експресії білка PH. Первинна структура PH ділянки гена перевірена за допомогою автоматичного сиквенсу.

PH білок отримано в клітинах BL21 на мінімальному живильному середовищі згідно з [6, 7]. Виділення білка здійснювалось за допомогою Ni-NTA агарози в нативних умовах (30 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl, 250 мМ імідазол, рН 8,0). Додатково білок було очищено діалізом (30 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl, 1 мМ β -меркаптоетанол, рН 8,0). Концентрація білка становила 0,5 мг/мл.

Спектри кругового дихроїзму рекомбінантного білка PH вимірювали на дихрографі Aviv Circular Dichroism Spectrometer, Model 202 (Aviv, LakeWood N. J., США) в 30 мМ

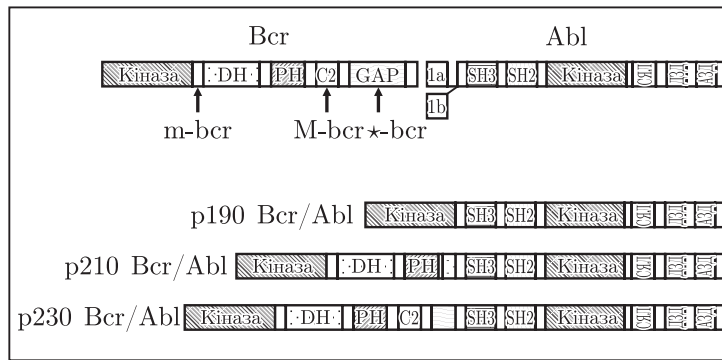


Рис. 1. Доменна структура білків Bcr, Abl та різних форм білка Bcr-Abl:

СЯЛ — сигнали ядерної локалізації; ДЗД — ДНК-зв'язуючий домен; АЗД — актинзв'язуючий домен; SH3/SH2 — Src-гомологічні домени; GAP — ГТФаз-активуючий домен; C2 — кальційзв'язуючий домен; DH — Dbl-гомологічний домен; PH — pleckstrin-гомологічний домен; 1a/1b — альтернативні екзони

натрій-фосфатному буфері, рН 8,0; 100 мМ NaCl; 1 мМ β -меркаптоетанол при 25 °С в УФ діапазоні від 200 до 240 нм. Товщина кювети становила 0,1 см. Для проведення аналізу отриманих даних використано програму K2d [8, 9], яка дає можливість визначати вміст трьох основних типів вторинної структури — α -спіралей, β -тяжів і нерегулярної конформації.

Результати дослідження і їх обговорення. Родина PH доменів є однією з найпоширеніших із представлених у білках людини. Після отримання перших даних за проектом “Геном людини” було виявлено 252 білка в протеомі людини, що мають один чи декілька PH доменів. Більшість з цих білків потребує мембранної локалізації для реалізації своїх функцій, і визначальну роль у цьому відіграє зв'язування PH доменів з фосфатнозитидами мембран, причому специфічність зв'язування 10% з них є дуже високою ($K_d \sim 10$ нМ). У багатьох білках PH домен знаходиться в тандемі з DH доменом, і разом вони складають мінімальну структурну функціональну одиницю. PH домен також може брати участь у білок-білкових взаємодіях [9, 10], у деяких білках PH може впливати на функції DH домену [11].

Незважаючи на низьку гомологію серед PH доменів (10–30%), його структура є консервативною. Вже отримані ЯМР або рентгенівські структури близько 30 PH доменів. Відомо, що PH домен являє собою β -сендвіч, що складений із семи β -тяжів, на С-кінці якого знаходиться α -спіраль. Крім того, наявні три варіабельні петлі, які, як вважають, відповідають за зв'язування з фосфатнозитидами. Ми проаналізували первинну послідовність PH домену білка Bcr за допомогою програми ClustalW [http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/clustalw] (рис. 2). Для порівняння використано послідовності PH доменів тих білків, третинна структура яких вже отримана. У даному випадку гомологія не перевищує 10%, але можна виділити три консервативні ділянки білка, які містять амінокислоти, що потрібні для формування β -сендвіча.

Відомо, що приблизно 20% PH доменів між першим і другим β -стрендами мають мотив, що визначає зв'язування з продуктами РІЗ-кінази (а саме РІ(1,3,4,5)P₄, РІ(3,4,5)P₃, РІ(3,4)P₂). Цей мотив представлено послідовністю амінокислот:

$$\Phi x_1 K_i x_2 [G/A/S/P] x_3^* [K/R]_{ii}^* x_4 [R/K]_{iii} x_5 R_{iv} x_6 [F/L],$$

де Φ — гідрофобна амінокислота, x — будь-яка амінокислота, * — будь-яка кількість амінокислот; усі індекси нумерують положення амінокислоти в даному мотиві, викорис-

PH-BCR	HRQLLKDSFMVELVEGARKLR---HVFLEFDLLCTKLKKQSGGKTQQYDCKWYIPLTD 56
DAPP1	--LGTKEGYLTK--QGGLVKT--WTRWFTLHRNELKYFKDQMSP----EPIRILDLTE 49
SOS1	---FIMEGTLTR--VCAKHER---HIFLFDGLMICCKSNHGQPRLPASNAEYRLKEK 50
dynamин	--LVIRKGLTINNIIMKGG--SKEYWVLTAEENLSWYKDDEEK---EKKYMLSVDN 51
PLC-delta	--ALLKGSQLLKVKSSWRRE-----RFYKLQEDCKTIWQESRKVMR-SPESQLFSIED 51
FGD3	--PSLLCCPLRLSESGETWSE-----VWVAIPMSDPQVLHLQGGSQD-GRLPRTIPLPS 51
TAPP1	--AVIKAGYCVK--QGAVMKN--WRRYFQLDENTIGYFKSELEK----EPLRVIPLKE 49
Btk	-AAVILESIFLKRSQLKKKTSPLNFKRLFLLTVHKLSYIEYDFERGRRSKKGSIDVEK 59
Grp1	-MNPDRREGWLLK--LGRVKT--WRRWFILTDNCLYFEYTTDK----EPRGIIPLEN 50
PH-BCR	LSFQMVDELEAVPNIPLVPDEELDAIKIKISQIKSDIQR-----EKRANKGSKATERL 109
DAPP1	CSAVQFDYSQE-----RVNCFCLVFPFRT-----FYLC 77
SOS1	FFMRKVQINDKDDTN-----EYKHAPEIILKDENS-----VIF 84
dynamин	LKLRDVEKGFMS-----SKHIFALFNTEQRN-----VYKDYRQLELA 88
PLC-delta	IQEVRMGHRTEGLEKFAFDIPEDRCFSIVFKDQRN-----TLDLI 91
FGD3	CKLSVPDPPEERLDS-----GHWVKIQWAKQS-----WYLS 81
TAPP1	VHKVQ-ECKQSDIM-----MRDNLFEVTTTSRT-----FYVQ 80
Btk	ITCVETVVPKNNP-----PERQIPRRGEESEMEQISIPIERFPYPFQVVYDEGPLYVF 113
Grp1	LSIREVE DPRK-----PNCFEIYNPSHKGQVIKACKTEADGRVVEGNHVYRIS 99
PH-BCR	KKKLSQESLLMLSPSMAFRVHRSNGKSYTFLISSDYERAEWRENIREQQKCK--163
DAPP1	AKTGVAEDEVKILRWKLS-----96
SOS1	AKSAEEKNNMAALISLQYRS-----105
dynamин	CEIQEEVDSVKASFLRAGV-----107
PLC-delta	APSPADAQHVVQGLRKIIH-----110
FGD3	ASSAELQQQMETLSTAAH-----100
TAPP1	ADSPPEEMHSHVKAIVSGAIV-----99
Btk	SPTEEIRKRWHLKNVIRYNSDLVQKYHPCFWIDGQYLCCSQTAKNAMGCQILEN 169
Grp1	APSPPEEKKEVWKSISKASISRDPFYDMLATR-----129

Рис. 2. Гомологія PH домену білка *Ves* відносно різних білків людини з визначеною структурою PH домену. Підкреслено амінокислоти в PH домені *Ves*, що належать до мотиву, який відповідає за зв'язування з фосфатінозилами

тано номенклатурні позначення амінокислот [12]. Також деякі білки можуть мати варіації цього мотиву і, таким чином, зв'язуватись з іншими фосфатінозидами. Наприклад, у PH домені білка *FAPP1* в позиції $[K/R]_{ii}$ стоїть глутамін, що визначає його зв'язування з PI_4 ; білок *PEPP1*, маючи аспартат замість $[G/A/S/P]$ амінокислоти, специфічний до PI_3 ; PH домен білка *centaurin- β 2*, що має аспарагін у положенні $[K/R]_{ii}$, зв'язується з $PI(3,5)P_2$. У PH домені *Ves* також наявна варіація вищезазначеного мотиву — $L_{709}LKDSF_{714} = \Phi x_1 K_i x_2 [G/A/S/P] x_3$, $R_{723}KLRHVF_{729}$ — відповідає $*[K/R]_{ii}^* x_4 [R/K]_{iii} x_5 R_{iv} x_6 [F/L]$, але x_4 пропущено, а замість x_6 стоять дві амінокислоти. Таким чином, аналізуючи амінокислотний склад PH домену білка *Ves*, ми можемо визначити амінокислоти, важливі для зв'язування з фосфатінозидами (див. рис. 2). Крім того, в експериментах на визначення специфічності, саме ці амінокислоти можуть бути замінені для перевірки їх впливу на зв'язування PH домену.

На сьогодні розроблено ряд методів для аналізу конформації білків за даними КД спектрів і отримано числові значення вмісту різних типів вторинної структури білків [13, 14]. Для аналізу вторинної структури PH домену *Ves* експресовано та очищено рекомбінантний білок масою 47,5 кДа. Для експериментального визначення вмісту основних типів вторинної структури нами проаналізовано КД спектри досліджуваного білка в діапазоні 200–240 нм (табл. 1). Отриманий спектр характеризується чітким мінімумом в області 209 нм (рис. 3). Теоретично така форма спектра характеризує білки класу β , які переважно представлені

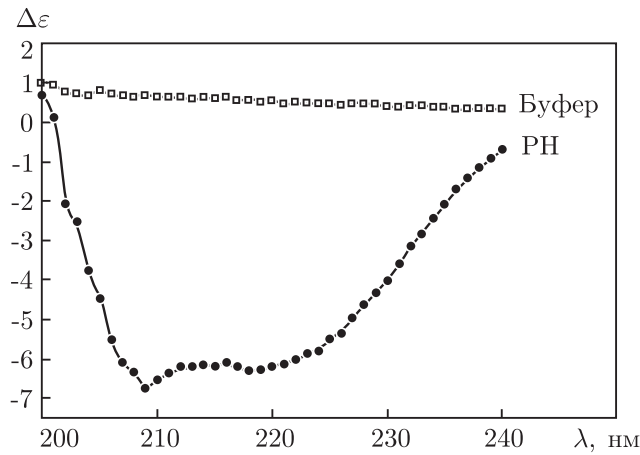


Рис. 3. Спектри КД білка РН та буфера. Концентрація білка 19 мкМ

β -тяжами. Розрахований за даними програми K2d вміст β -тяжів у структурі рекомбінантного РН домену становить 47,0%, вміст α -спіралей — 5,0%, а вміст нерегулярних конформацій — 48,0%. Для аналізу отриманих результатів ми порівнювали вміст α -спіралей і β -тяжів у білках з визначеною структурою. За допомогою біологічних баз даних UniProt та PDB були відібрані білки, що містять РН домени, а також отримані дані про їх вторинну структуру. За даними рентгеноструктурного або ЯМР аналізу РН домену середній вміст α -спіралей дорівнює 10%, а β -тяжів — приблизно 37% [13, 14]. Таким чином, дані для РН

Таблиця. 1. Результати розрахунку вмісту основних елементів вторинної структури в рекомбінантному білку РН домену, отримані з КД спектра з використанням програми K2d

Довжина хвилі, нм	$\Delta\varepsilon$		Довжина хвилі, нм	$\Delta\varepsilon$	
	Експериментальні	Скореговані		Експериментальні	Скореговані
200	0,315	0,085	221	-4,079	-1,096
201	-0,545	-0,146	222	-4,016	-1,08
202	-1,531	-0,411	223	-3,973	-1,068
203	-2,206	-0,593	224	-3,735	-1
204	-2,515	-0,676	225	-3,675	-0,988
205	-3,463	-0,931	226	-3,499	-0,94
206	-3,922	-1,054	227	-3,348	-0,9
207	-4,237	-1,139	228	-3,147	-0,846
208	-4,297	-1,155	229	-2,921	-0,785
209	-4,367	-1,174	230	-2,622	-0,705
210	-4,205	-1,13	231	-2,466	-0,663
211	-4,238	-1,139	232	-2,181	-0,586
212	-4,171	-1,121	233	-1,969	-0,529
213	-4,049	-1,088	234	-1,772	-0,476
214	-4,11	-1,104	235	-1,531	-0,411
215	-3,973	-1,068	236	-1,302	-0,35
216	-4,12	-1,107	237	-1,157	-0,311
217	-4,077	-1,096	238	-0,898	-0,241
218	-4,122	-1,108	239	-0,9	-0,242
219	-4,112	-1,105	240	-0,757	-0,203
220	-4,064	-1,092			

домену Vcr корелюють з літературними даними для інших PH 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.

1. Nowell P. C., Hungerford D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // *Science*. – 1960. – **132**. – P. 1497–1499.
2. Телегеев Г. Д., Дубровская А. Н., Дыбков М. В. Роль белка BCR/ABL в лейкогенезе // *Эксперим. онкология*. – 1999. – **21**, № 3–4. – С. 182–194.
3. Малюта С. С., Телегеев Г. Д., Дыбков М. В., Мірошниченко Д. О., Єльська Г. В. Розробка тест-систем для діагностики Ph' лейкемій за допомогою полімеразної ланцюгової реакції // *Наука та інновації*. – 2005. – № 3. – С. 70–75.
4. Малюта С. С., Телегеев Г. Д., Дубровська Г. М., Дыбков М. В., Мірошниченко Д. О. Вплив додаткових мутацій bcr/abl гена на перебіг Ph' лейкемій та їх використання як прогностичної ознаки // *Фундаментальні орієнтири науки (Біологія та науки про Землю і навколишнє середовище)*. – Київ: ВД “Академперіодика”, 2005. – С. 48–68.
5. Telegееv G. D., Dubrovskaya A. N., Dybkov M. V., Maliuta S. S. Influence of BCR/ABL fusion protein on the course of Ph leukemias // *Acta biochim. pol.* – 2004. – **51**, No 3. – P. 845–849.
6. Johnson W. C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures // *Proteins*. – 1999. – **35**, No 3. – P. 307–312.
7. King S. M., Johnson W. C. Assigning secondary structure from protein coordinate data // *Proteins: Structure, Function and Genetics*. – 1999. – **35**, No 3. – P. 313–320.
8. Pancoska P., Janota V., Kiederling T. A. Novel matrix descriptor for secondary structure segments in proteins: Demonstration of prediction from circular dichroism spectra // *Anal. Biochem.* – 1999. – **267**, No 1. – P. 72–83.
9. Andrade M. A., Chacon P., Merelo J. J., Moran F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism using an unsupervised learning neural network // *Prot. Eng.* – 1993. – **6**, No 4. – P. 383–390.
10. Tsukada S., Simon M., Witte O., Katz A. Binding of the $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G-proteins to the PH domain of Bruton's tyrosine kinase // *PNAS*. – 1994. – **91**. – P. 11256–11260.
11. Cheng L., Gwendolin M. M., Kostenko E. V., Whitehead I. P. Pleckstrin homology domain-mediated activation of the Rho-specific guanine nucleotide exchange factor Dbs by Rac1 // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **279**, No 13. – P. 12784–12793.
12. Lemmon M. A., Ferguson K. M. Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides // *Biochem. Soc. Trans.* – 2001. – **29**. – P. 377–384.
13. Worthylake D. K., Rossmann K. L., Sondek J. Crystal structure of the DH/PH fragment of Dbs without bound GTPase // *Structure*. – 2004. – **12**. – P. 1079–1086.
14. Liu X., Wang H., Eberstadt M. et al. NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio // *Cell*. – 1998. – **95**. – P. 269–277.

*Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 02.02.2007