Создание тест-систем для поиска ингибиторов Е3 лигаз на основе векторов белка-онкосупрессора р73, слитого с цветными белками (GFP, CFP,YFP,CHERRY)

Полина Курылко, Александра Дакс, Ольга Федорова, Николай Барлев

Creation of test systems for searching inhibitors of E3 ligases, based on vectors of oncosupressor-protein p73 fused to the colored proteins (GFP, CFP, YFP, CHERRY): *This paper justifies the necessarily to develop a test system for searching the inhibitors of E3 ligases, based on the eukaryotic expression vectors p73-GFPN, p73-GFPC, p73-CFP, p73-YFP, p73-Cherry (protein p73, fusion proteins with color GFPN, GFPC, CFP, YFP, Cherry), as well as vector containing the sequence of E3 ligase Mdm2, a fusion protein with a color Cherry. Screening of compounds to be produced in a high-throughput screening system Operetta Company PerkinElmer (USA).*

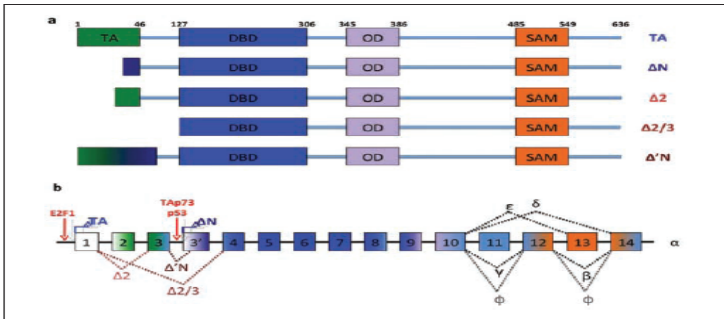
Key words*: protein-onkosupressor p73, E3 ubiquitin ligases.*

ВЪВЕДЕНИЕ

Изучение этиологии раковых заболеваний с каждым годом привлекает внимание все большего числа исследователей. Бесконтрольный рост клеток, который приводит к раковым новообразованиям, часто связан с потерей функции белков-онкосупрессоров. Важнейшими онкосупрессорами человека являются белки семейства р53. Деградация этих белков протекает в основном по убиквитин-зависимому механизму. Ингибиро-вание Е3 убиквитин-лигазы (Mdm2), специфичной к р53, должно приводить к подавлению роста опухолевых клеток.

ИЗЛОЖЕНИЕ

Транскрипционный фактор р73 является членом семейства генов р53, которые могут экспрессироваться по-меньшей мере в 24 различных изоформах с про- и анти-апоптотической активностью. Изоформа ТАр73 экспрессируется с использованием первого промотора (выше по течению) и является онкосупрессорной формой этого белка; она может индуцировать арест клеточного цикла (апоптоз) и защищает геном от нестабильности [1]. С другой стороны, у изоформы ΔNр73 отсутствует N-концевой транскрипционный домен; поэтому данная изоформа не способна индуцировать экспрессию про-апоптотических генов (р21), но она способна олигомеризоваться с изоформой ТАр73 или белком р53 и блокировать из транскрипционную активность [2].



Фиг. 1.Схема структуры гена

а. Различные экзоны в структуре транскрипционного домена.

б. Структура гена. Белки ТАр73 и р53 могут индуцировать экспрессию изоформы ΔN, связываясь со вторым промотером р73 [1].

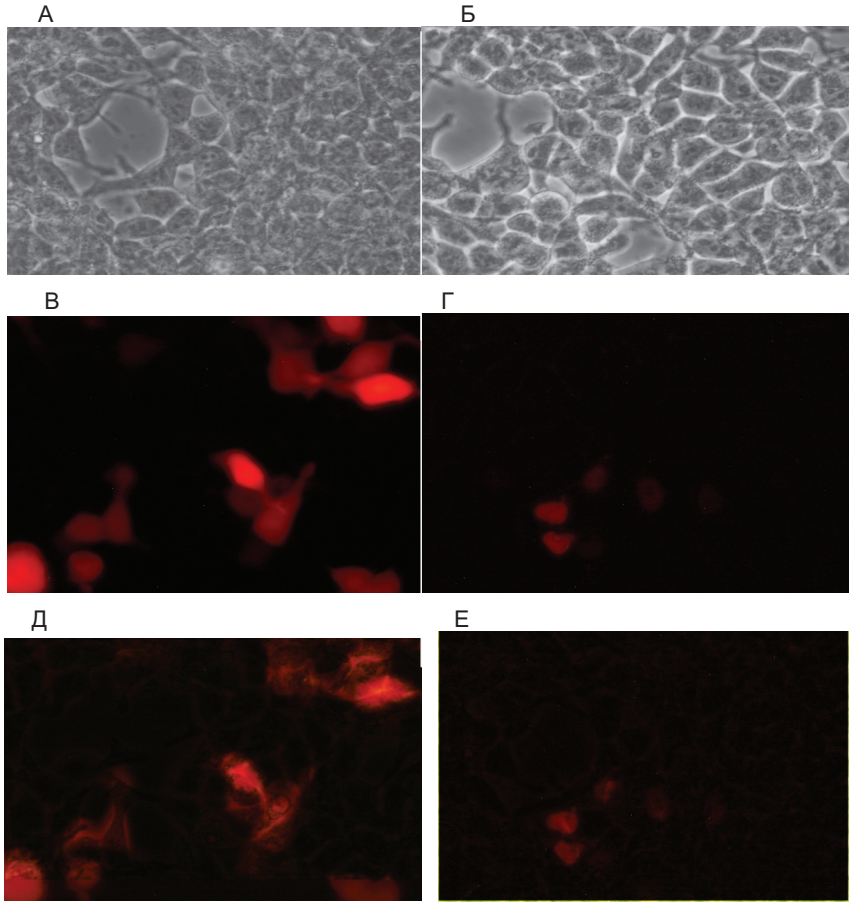
Целью данной исследовательской работы являлось получение экспрессионных эукариотических векторов, содержащих р73 и Е3-лигазу Mdm2,слитых с флуоресцентными белками.

В качестве объектов исследования использовали белок - онкосупрессор p73 и E3-убиквитин зависимую лигазу Mdm2.

Материалами исследования были векторы, содержащие последовательность, кодирующую цветные белки- peGFPC1, peYFPC1, peCherryC1-, а также вектор, содержащий последовательность, кодирующую белок- онкосупрессор (p73pcDNA-TAP73).

В результате данной работы нами были разработаны индикаторные системы для поиска ингибиторов E3 лигаз, на основе векторов белка онкосупрессора p73 и E3-убиквитин лигазы Mdm2 , слитых с флуоресцентными белками.

В качестве примера работы разработанной тест-системы представлена трансфекция вектора, содержащего нуклеотидную последовательность E3-убиквитин лигазы Mdm2, слитую с цветным белком Cherry; и вектора, содержащего, последовательность, кодирующую цветной белок Cherry. Флуоресциенцию детектировали через 24 часа после трансфекции.



Фиг.2. Пример трансфекции клеток линии H1299 векторами peMdm2CherryC1 и peCherryC1

А) Снимок области на чашке с клетками линии H1299 транфецированными вектором peCherryC1 в проходящем свете.

Б) Снимок области на чашке с клетками линии H1299 транфецированными вектором peMdm2CherryC1 в проходящем свете.

В) Снимок области на чашке с клетками линии H1299 транфецированными вектором peCherryC1 в

ультрафиолетовом свете, проходящем через монохромный фильтр (красный).

Г) Снимок области на чашке с клетками линии H1299 транфецированными вектором peMdm2CherryC1 в ультрафиолетовом свете, проходящем через монохромный фильтр (красный).

Д) Снимок области на чашке с клетками линии H1299 транфецированными вектором peCherryC1 в проходящем свете и ультрафиолетовом свете, проходящем через монохромный фильтр (красный).

Е) Снимок области на чашке с клетками линии H1299 транфецированными вектором peMdm2CherryC1 в проходящем свете и ультрафиолетовом свете, проходящем через монохромный фильтр (красный).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная индикаторная система позволит идентифицировать малые молекулы, как потенциальные соединения для разработки лекарств, для анти-раковой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Regulation of p73 activity by post-translational modifications: citation/ F Conforti and al; Cell death and Desease - NY.: Macmillan Publishers, 2012.

[2] Tissue-specific expression of p73 C-terminal isoforms in mice:citation/ Francesca Grespi and al;Cell Cycle – R.: Landes Bioscience,2012.

Для контактов:

Курылко Полина, Фак №2; email: kurylko2007@rambler.ru, гр.295М; первый курс

Дакс Александра, Фак №2; aleksandra.daks@gmail.com, аспирант первого года кафедры технологии микробиологического синтеза

Федорова Ольга, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории Молекулярной Фармакологии; fedorovaolgaand@gmail.com

Барлев Николай, доктор биологических наук, ведуший научный сотрудник лаборатории Молекулярной Фармакологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 11.G34.31.0069 от 21.10.2011, РФФИ (12-04-31686, 12-04-01397), федеральной целевой научно-технической Программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009 - 2013 годы (Соглашение No.8280).

Доклад рецензирован