

Bakteriálny *in vivo* systém v službách molekulárnej onkológie: Štúdium transmembránových interakcií RET onko-proteínu pomocou TOXCAT systému

Martina Poturnajová¹, Martin Benej²

¹Ústav experimentálnej onkológie SAV, Vlárská 7, Bratislava, ²Katedra molekulárnej biológie,
Prírodovedecká fakulta UK, Mlynská dolina, Bratislava
martina.poturnajova@savba.sk

Malígnym medulárnym karcinómom štítnej žľazy sa vyskytuje u 25 % pacientov v dedičnej forme (MEN2 syndróm) a je spôsobený zárodočnými bodovými mutáciami v *RET* proto-onkogéne. RET proteín je transmembránový tyrozínkinázový receptor lokalizovaný na povrchu bunky. Vo fyziologických podmienkach dimerizuje a aktivuje sa v prítomnosti ligandu. U nositeľov MEN2 mutácie dochádza k vytvoreniu aktívneho diméru aj v neprítomnosti ligandu, čo vedie k neregulovanej proliferácii a deleniu buniek a rozvoju malignity.

Molekulárny mechanizmus aktivácie RET proteínu je známy u často sa vyskytujúcich mutácií v extracelulárnej a tyrozínkinázovej doméne, avšak u zriedkavých mutácií lokalizovaných v transmembránovej oblasti (TM) nie je objasnený. TM doména RET proteínu je tvorená jednoduchým α -hélixom, ktorý natáča receptor do konformácie vhodnej pre oligomerizáciu a následnú aktiváciu. Vďaka nekovalentným transmembránovým interakciám dvoch susedných hélixov je možné dostať 2 susedné RET receptory do konformácie vhodnej na dimerizáciu a aktiváciu[1].

Pomocou metódy TOXCAT [2] sme sa snažili objasniť zmeny vo fyziologickej funkcii RET TM domény spôsobené mutáciami A641S a S649L, ktoré sa vyskytujú u dvoch slovenských MEN2 rodín. Tri konštrukty nesúce RET transmembránovú doménu (bez mutácií, s A641S alebo S649L) sme vložili do bakteriálneho vektora medzi transkripčný aktivátor CAT proteínu a gén kódujúci MBP proteín zodpovedný za prechod maltózy do bakteriálnej bunky (MBP). Konštrukty sme vložili do kmeňa *E. coli* NT326, ktorý pôvodne nie je schopný v médiu využívať maltózu. Správne umiestnenie chimérneho proteínu v plazmatickej membráne *E. coli* bolo dokázané rastom baktérií na minimálnej pôde obsahujúcej maltózu ako jediný zdroj uhlíka.

Miera transmembránových interakcií medzi RET TM doménami bola úmerná expresii reporterového génu – chloramfenikol acetyltransferázy (CAT), ktorá vytvára rezistenciu baktérií na antibiotikum chloramfenikol (CAM). V nami zavedenom systéme TOXCAT sa ako kvalitatívna analýza CAT expresie používa difúzna disková metóda. Po vysiatí *E. coli* NT326 produkujúcich naše konštrukty na platne s difundovaným CAM sa vytvorila zóna inhibície rastu, ktorá odráža mieru expresie CAT proteínu. Kvantitatívnu mieru expresie CAT proteínu sme zisťovali pomocou QPCR s využitím génu pre bakteriálnu ribozomálnu podjednotku 16S ako internej kontroly.

Na základe expresie CAT proteínu odrážajúcej mieru transmembránových interakcií našich konštruktov sme zistili, že A641S nemá štatisticky významný účinok na RET TM interakcie oproti normálnej sekvencii RETu a na jeho oligomerizačnú schopnosť. Avšak mutácia S649L spôsobila 50 % zníženie vzájomných TM interakcií oproti nemutovanému RET a pravdepodobne postihla aj vytváranie receptorových dimérov. K neoplastickej aktivácii RET proteínu a signalizačných dráh cez mutáciu S649L teda nedochádza dimerizáciou receptora, ale iným, zatiaľ neznámym mechanizmom.

Finančná podpora: VEGA 2/0091/08, Nadácia J. Korca.

[1] Kjaer, *Oncogene*, **2006**, 1–10.

[2] Russ and Engelman, *Biochemistry*. **1999**, 96, 863–868.