

АНТОНЕНКО С.В.[✉], КРАВЧУК І.В., ГУР'ЯНОВ Д.С., ТЕЛЕГЄСВ Г.Д.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: antonenkoimbg@gmail.com

[✉] antonenkoimbg@gmail.com

БІЛКИ-ПАРТНЕРИ РН ДОМЕНУ ПРОТЕЇНУ ВСР-ABL: СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ КОНСТРУКЦІЙ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ РОЗВИТКУ ХМЛ

Онкобілок Vcr-Abl у 95 % випадків викликає розвиток хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ). На сьогодні при терапії ХМЛ основна увага приділяється Abl частині онкобілка, зокрема її кіназній активності, в той час як Vcr частина залишається поза увагою. У попередніх дослідженнях за допомогою мас-спектрометричного аналізу було визначено ряд білків, які є кандидатами на взаємодію із РН доменом Vcr-Abl онкобілка [1]. Серед них білки різних функціональних груп, зокрема такі, як USP1, Hsp27, кортактин.

Білок убіквітин специфічна протеаза 1 (USP1) належить до цистеїнової групи протеаз [2]. Основна функція полягає у деубіквітуванні білків, тобто руйнуванні ізопептидних зв'язків між білком-субстратом та убіквітином, який був приєднаний до нього за допомогою убіквітин-лігази E3 [3]. Ми вважаємо, що саме завдяки цій властивості білок USP1 може запобігати протеосомному руйнуванню онкобілка Vcr-Abl, що й призводить до прогресування захворювання. Відомо, що інтенсивна експресія білка USP1 починається у S-стадії інтерфази і знижується під кінець мітозу. Фосфорилування білка USP1 сайтом S313 циклін – залежними кіназами запобігає його передчасному руйнуванню у клітинному циклі [4]. Білок USP1 належить до ядерних білків, у той же час наявність сигнальної послідовності NES говорить про можливість експорту білка в цитоплазму клітини. В попередніх дослідженнях ми виявили ядерну колокалізацію білка USP1 і РН домену Vcr-Abl білка [5], але питання можливої колокалізації білка USP1 із повнорозмірним онкобілком Vcr-Abl залишається відкритим. Важливим є вивчення просторово-часового розподілу білків у клітині, тому ми працюємо над створенням генетичних конструкцій на основі векторів pFastFT-N1, pMediumFT-N1, pSlowFT-N1, які мають флуоресцентні таймери.

Білок кортактин кодується геном *CTTN*, що знаходиться на довгому плечі 11 хромосоми, 34 смузї за G-фарбуванням. Він колокалізується з кортикальним актином, звідки отримав свою назву (кортикальний актин). Його основною функцією є ремодельовання актинового цитоскелету у відповідь на зовнішньоклітинні сигнали, передача яких забезпечується рецепторними тирозинкіназами [6]. Кортактин має в своєму складі декілька функціональних доменів: кислий домен, ділянку прямих повторів, домен спіралі, пролін-багату ділянку та SH3 домен. Кислий домен має довжину 21–22 амінокислоти, які зв'язуються з комплексом Agr2/3 через триптофанвмісний мотив. Вищеназаний комплекс необхідний для галуження кортикальних актинових філаментів, що забезпечує адекватні структурні зміни елементів мембрани та цитоскелету [7]. Попередні дослідження показали наявність статистично-достовірної колокалізації між кортактином та доменом РН BCR, а також колокалізацію кортактину, домену РН BCR та клатрину у навколоядерній ділянці [8]. Це свідчить про роль домену РН та кортактину у клатрин-опосередкованому ендоцитозі. Оскільки колокалізація була зосереджена в певних ділянках клітини, доцільно застосувати метод флуоресцентної мікроскопії з надвисокою роздільною здатністю для отримання зображень цільових білків з роздільною здатністю близько 20 нм. Для цього ми плануємо використати PALM (Photoactivation localization microscopy) мікроскопію. Принцип PALM мікроскопії полягає в тому, що флуорофори багаторазово переходять із вимкненого у ввімкнений стан і це фіксується CCD камерою з високою частотою кадрів [9]. Після цього зображення проходять обробку та за допомогою певного алгоритму отримується зображення з роздільною здатністю 20–50 нм. Для вирішення цього завдання ми плануємо створити генетичні конструкції з вставками кортактину на основі

© АНТОНЕНКО С.В., КРАВЧУК І.В., ГУР'ЯНОВ Д.С., ТЕЛЕГЄСВ Г.Д.

векторів pRATagRFP-N1 та prsTagRFP-N1, а також визначити просторово-часовий розподіл кортактину у клітині за допомогою вище згаданих векторів із флюоресцентними таймерами.

Внутрішньоклітинний Hsp27 відіграє антиапоптичну роль, а в якості шаперона – захищає від агрегації неправильно сформовані білки. Такі ефекти можуть мати важливе значення у розвитку низки патологій. Для багатьох онкологічних захворювань гіперекспресія Hsp27 є негативним прогностичним фактором (рак яєчника, простати та молочної залози) [10]. Зафіксовано випадки, коли у пацієнтів з ХМЛ, нечутливих до традиційної терапії, було виявлено дуже активний фосфорильований Hsp27 [11]. Відомо, що Vcr-Abl активує ряд сигнальних шляхів, серед яких PI3K-NFκB-шлях [12]. Є багато свідчень про те, що Hsp27 може брати участь у регуляції активації NFκB [13, 14]. Hsp27 може формувати олігомерні структури до 800 кДа, причому зміщення в сторону менших олігомерів відбувається за рахунок фосфорильовання білка сериновими залишками.

Матеріали і методи

Ампліфікація цільових послідовностей генів USP1, CTTN, Hsp27. Для ампліфікації кодуєчої послідовності гена *USP1* були підібрані праймери USP1(N-fus) Fwd – AATGCCTGGTGCATACCTAGTG та USP1(N-fus) Rev – AGCAAGTAAGGAGTAGAAGTAG GA. В свою чергу для отримання цільової послідовності гена кортактину ми використали CTTN прямий (5'- ATGTGGAAAGCTTCAGCA GG) та CTTN зворотний (5'- AGCTCCACATA GTTGGCTGG) праймери. Для ампліфікації фрагмента, що кодує Hsp27 з сайтами для ендонуклеаз рестрикції BamHI та EcoRI підібрали праймери H27Nf 5'-TATAGGATC CGAGTCAGCCAGCATGACC-3', H27Nr 5'-TATAGAATTCTTACTTGGCGGCAGTCTC-3'.

Підбір праймерів проводили за допомогою програми PerlPrimer. Матрицею для підбору праймерів та ПЛР служили генетичні конструкції pCMV-NA-USP1, pOTV7-CTTN та pOTV7-Hsp27, що містять кДНК цільових послідовностей. ПЛР проводили за допомогою ПЛР-ампліфікатора Eppendorf MasterCycler Personal (США). Компоненти ПЛР відповідали умовам виробника (Thermo Scientific) з використанням високоточної Pfu полімерази.

Успішність ампліфікації оцінювали за допомогою електрофорезу в агарозному гелі за стандартних умов.

Отримання генетичних конструкцій. Створення генетичних конструкцій для експресії цільових послідовностей та рестрикційний аналіз були змодельовані програмою Serial Cloner 2.6.1. Для клонування кодуєчих послідовностей *USP1* та *CTTN* був обраний вектор pBluescriptSKII(+), який у кількості 2 мкг обробляли однією одиницею активності ендонуклеази рестрикції EcoRV в буфері R (Thermo Scientific) протягом 4 годин при 37°C. Після цього проводили термальну інактивацію ферментів на водяній бані при 80°C протягом 20 хв. До реакційної суміші додавали 2 одиниці активності FastAP термочутливої лужної фосфатази, інкубували протягом 30 хв. при 37°C, інактивували реакцію нагріванням на водяній бані при 65°C протягом 10 хв. Ампліфіковані фрагменти ДНК послідовності *USP1* та кортактину переосаджували, а концентрацію визначали спектрофотометрично. Брало 1 мкг ампліфікованого фрагменту та обробляли 5 одиницями активності T4 полінуклеотидкінази, інкубували протягом години при 37°C та інактивували нагріванням на водяній бані при 75°C протягом 20 хвилин. Для реакції лігування *USP1* брали оброблені ДНК фрагменти вектора pBluescriptSKII(+) та *USP1* у кількості 35 нг та 65 нг відповідно, 2 одиниці активності T4 ДНК лігази, 0,5 мМ АТФ та буфер для T4 ДНК лігази (Thermo Scientific). Для реакції лігування кортактину брали оброблені ДНК фрагменти вектора pBluescriptSKII(+) та кортактину у кількості 50 нг та 40 нг відповідно, 2 одиниці активності T4 ДНК лігази, 0,5 мМ АТФ та буфер для T4 ДНК лігази (Thermo Scientific). Контрольну реакцію проводили з тими ж компонентами, окрім вставки. Лігування проводили протягом 3 годин при кімнатній температурі, після чого лігасну суміш трансформували у компетентні клітини NEB Turbo та висіювали на чашки з LB агаром з 50 мкг/мл ампіциліну, 0,1 мМ IPTG та 0,003 % X-gal. Колонії білого кольору, що виростили з трансформованих клітин після лігування, висіювали в рідке середовище LB з 100 мкг/мл ампіциліну та нарощували протягом 18 годин. Плазмиди з рідкого середовища виділяли методом лізису неіонними детергентами. Попередній аналіз наявності вставок цільових послідовностей у вектор перевіряли за

допомогою аналітичного розрізання ендонуклеазами рестрикції. Для перевірки наявності вставки USP1 у рBluescriptSKII(+) вико ристовували ендонуклеази рестрикції XhoI та Eco321 (4700 + 600). Для перевірки наявності вставки кортактину у рBluescriptSKII(+) використовували ендонуклеази рестрикції XhoI (3300 + 1150). Після підтвердження відповідності конструкцій рBluescriptSKII(+)-CTTN очікуваним розмірам та послідовності фрагмент, відповідний послідовності кодуєчої ділянки кортактину, було вирізано за сайтами BamHI – SalI. Фрагмент було розділено за допомогою агарозного гелю електрофорезу та виділено з гелю на колонках за умовами виробника (Thermo Scientific). Кількість та чистоту виділеної ДНК було визначено спектрофотометрично за допомогою спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Для подальшого використання у мікроскопії надвисокої роздільної здатності вектори рPATagRFP-N1 та prsTagRFP-N1 у кількості 500 нг кожен були розрізані ендонуклеазами рестрикції SalI та BamHI у подвійному буфері Tango (Thermo Scientific) протягом 2 годин при 37°C. Для визначення часового розподілу у клітині вектори, що містять послідовності флуоресцентних таймерів (pSlowFT-N1, pMedium-FT-N1, pFast-FT-N1), були розрізані ендонуклеазами рестрикції SalI та BamHI за тими ж умовами, що описані вище. Для лігування фрагмента кодуєчої ділянки фрагменту кортактину в описані вище вектори проводили реакцію лігування за такими умовами: до реакційної суміші, що містила буфер для T4 ДНК лігази (Thermo Scientific), 0,5 мМ АТФ та 2 одиниці активності T4 ДНК лігази (Thermo Scientific), додали 115 нг вставки та 85 нг вектора. Контрольну реакцію проводили з тими ж компонентами, окрім вставки. Реакційну суміш інкубували при кімнатній температурі протягом 4 годин, після чого лігазну суміш трансформували у компетентні клітини NEB Turbo та висіювали на чашки з LB агаром з 50 мкг/мл канаміцину. Колонії білого кольору, що виростили з трансформованих клітин після лігування, висіювали в рідке середовище LB з 100 мкг/мл ампіциліну та нарощували протягом 18 годин. Плазмиди з рідкого середовища виділяли методом лізису неіонними детергентами. Попередній аналіз наявності вставок цільових послідовностей у векторі перевіряли за

допомогою аналітичного розрізання ендонуклеазою рестрикції XhoI за умовами виробника (Thermo Scientific), окрім конструкцій на основі рPATagRFP-N1, що розрізалися двома ендонуклеазами рестрикції – BamHI та XhoI.

Ампліфіковану послідовність гена *Hsp27* клонували у вектор рЕТ42а, його було обрано оскільки він кодує в собі послідовність глутатіон-S-трансферази (відомої також як GST-ter). Це дозволяє отримати після бактеріальної експресії рекомбінантний цільовий білок, зшитий з цією глутатіон-S-трансферазою, що сприятиме його майбутньому виділенню, очищенню та детектуванню в експерименті з виявлення взаємодії з РН доменом білка Bcr. Вектор рЕТ42а (у кількості 1 мкг) окремо розщеплювали ендонуклеазами рестрикції BamHI та EcoRI (у кількості, що відповідала 1 одиниці активності) в 20 мкл суміші з використанням буфера, рекомендованого виробником. Реакційну суміш інкубували при 37°C протягом 1–2 год. Після завершення рестрикції ендонуклеази BamHI та EcoRI інактивували за допомогою інкубації за 80°C протягом 20 хв. Фрагменти, отримані після всіх описаних рестрикцій, очищали шляхом проведення електрофорезу в агарозному гелі за стандартних умов, з якого потім вирізали потрібні фрагменти та екстрагували. У реакції лігування застосовували молярне співвідношення між вектором і вставкою 1:3 (вектора брали 50 нг на реакцію). Реакцію проводили за кімнатної температури в буфері, що містив 30 мМ трис-НCl рН 7, 8, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT, 1 мМ АТФ, у присутності 1 одиниці активності T4 ДНК-лігази. Після інкубації протягом 1 год 10 мкл реакційної суміші використовували для трансформації клітин *E. coli* штаму XL-10 Gold. Селекція клонів, що містять вектори зі вставкою проводили шляхом ПЛР зі специфічними праймерами H27N-f та H27N-g, згаданими вище. Також отримана генетична конструкція була секвенована.

Аналітична експресія генетичної конструкції рЕТ42а-hsp27. Попередню оцінку синтезу білка проводили шляхом трансформації створеної конструкції рЕТ42а-hsp27 у штам *E. coli*, штам Rosetta та наступною індукцією експресії за допомогою IPTG у невеликому об'ємі (10 мл) культури цих бактерій. Після додавання IPTG культивували бактерії протягом 4 годин. Із культури бактерій *E. coli*,

трансформованих рЕТ42а-hsp27, відбиралися зразки об'ємом 1 мл, які відповідали культурі без індукції експресії, з індукцією експресії. Зразки аналізувалися за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі (12 %).

Результати та обговорення

За результатами ПЛР реакції ми отримали цільові послідовності генів *USP1*, *CTTN*, *Hsp27* з очікуваними для них розмірами 2300 п. н., 1600 п. н. та 650 п. н. відповідно (рис. 1 А, Б). За допомогою реакції лігування ми створили рBluescriptSKII(+)-*USP1*, рBluescriptSKII(+)-*CTTN* та рЕТ42а-hsp27 генетичні конструкції. Рекombінантні генетичні конструкції з необхідною вставкою були успішно ідентифіковані за допомогою реакції рестрикції. Так, після розрізання виділених плазмід рBluescriptSKII(+), що імовірно містили вставки цільових фрагментів, ми отримали фрагменти очікуваного розміру: 4700 п. н. та 600 п. н. для конструкції з *USP1* та 3300 п. н. і 1150 п. н. для конструкції з кортактином (рис. 1 В, Г). Відсутність мутацій та правильність рамки зчитування було підтверджено за допомогою секвенування. Після розрізання ендонуклеазами рестрикції конструкцій для мікроскопії надвисокої роздільної здатності та часового розподілу було отримано фрагменти

очікуваного розміру (5800 та 400 п. н. для рРАTagRFP-N1 і 5100 п. н. та 1200 п. н. для решти конструкцій) та підтверджено створення конструкцій на основі векторів рSlowFT-N1, рMedium-FT-N1, рFast-FT-N1, рРАTagRFP-N1 та прsTagRFP-N1, що містять послідовність кортактину. В подальшому ми плануємо створити конструкції, що містять послідовність *USP1* та домену РН BCR, які можуть бути використані для мікроскопії надвисокої роздільної здатності та визначення просторово-часового розподілу цільових білків у клітині.

За допомогою створеної генетичної конструкції рЕТ42а-hsp27 отримали експресію білка *Hsp27* у бактеріальній системі. За допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі підтверджено, що розмір експресованого білка відповідає очікуваним результатам, становить близько 55 кДа (рис. 2). В подальшому ми плануємо встановити, де знаходиться білок у розчинній чи нерозчинній фракції, виділити та очистити його у достатній кількості. Це дозволить перевірити чи взаємодіє *Hsp27* з РН доменом білка Vcr-Abl за допомогою методу far-Western.

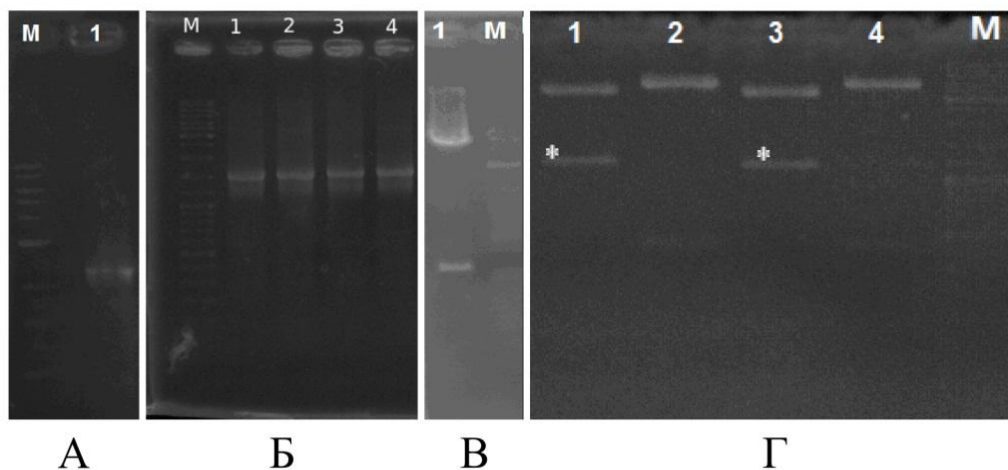


Рис. 1. А – ампліфікати цільових послідовностей, результати ПЛР: М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler, 1 – *USP1* (2300 п. н.); Б – ампліфікати цільових послідовностей, результати ПЛР: М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler, 1–4 – *CTTN* (1600 п. н.); В – рестрикційний аналіз отриманих генетичних конструкцій: 1 – рBluescriptSKII(+)+*USP1* (XhoI, Eco321), М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler; Г – рестрикційний аналіз отриманих генетичних конструкцій: 1,3 – рBluescriptSKII(+)+*CTTN* (XhoI), 3,4 – рBluescriptSKII(+), М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler.

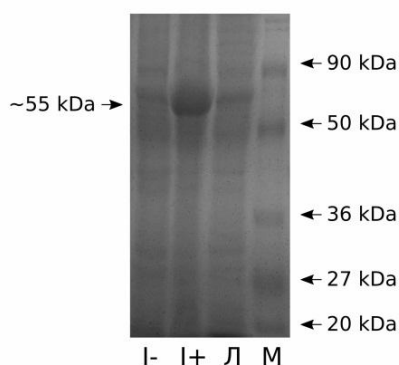


Рис. 2. Електрофореграма результатів аналітичної бактеріальної експресії генетичної конструкції рЕТ42а-hsp27 в *E. coli*, штам Rosetta (12 % поліакриламідний гель). I- – зразок без індукції експресії, I+ – зразок після індукції експресії за допомогою IPTG, Л – зразок просвітленого лізату, М – маркер молекулярної ваги (Prestained Protein Molecular Weight Marker, #SM0441, Fermentas).

Висновки

Вивчення особливостей функціонування Bcr частини онкобілка Bcr-Abl, зокрема його PH

домену, відкриває нові можливості у терапії хронічної мієлоїдної лейкемії. Білок USP1 є потенційним партнером на взаємодію із PH доменом, ми отримали рBluescriptSKII(+)+USP1, що стане основою для створення генетичних конструкцій на основі векторів із флюоресцентними таймерами. Це дозволить вивчити просторово-часовий розподіл білка USP1 у клітині та встановити особливості його колокалізації із PH домену онкобілка Bcr-Abl протягом клітинного циклу. Шляхом субклонування гена кортактину із рBluescriptSKII(+)+CTTN у вектори рFastFT-N1, рMediumFT-N1, рSlowFT-N1 із флюоресцентними таймерами ми отримали генетичні конструкції для просторово-часового вивчення розподілу кортактину в клітині. Також ми створили генетичну конструкцію рЕТ42а-hsp27, за допомогою якої експресували білок Hsp27 у бактеріальній системі. Виділений та очищений білок Hsp27 буде використаний для встановлення його взаємодії із PH доменом онкобілка Bcr-Abl за допомогою методу far-Western.

Література

1. Miroshnychenko D., Dubrovska A., Maliuta S., Telegееv G., Aspenström P. Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein-protein and protein-lipid interactions // *Exp Cell Res.* – 2010. – V. 316, № 4. – P. 530–542.
2. García-Santisteban I., Peters G.J., Giovannetti E., Rodríguez J.A. USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy // *Mol Cancer.* – 2013. – V. 12. – P. 91. doi: 10.1186/1476-4598-12-91.
3. Fraile J.M., Quesada V., Rodriguez D., Freije J.M., Lopez-Otin C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options // *Oncogene.* – 2012. – 31. – p. 2373–2388.
4. Cotto-Rios X.M., Jones M.J.K., Huang T.T. Insights into phosphorylation-dependent mechanisms regulating USP1 protein stability during the cell cycle // *Cell Cycle.* – 2011. – V. 10. No. 23. – P. 4009–4016.
5. Antonenko S.V., Gurianov D.S., Telegееv G.D. Colocalization of USP1 and PH domain of Bcr-Abl oncoprotein in terms of chronic myeloid leukemia cell rearrangements // *Цитология и генетика.* – 2016. – Т. 50, № 4. – С. 11–15.
6. Gatesman A.A., Weed S.A. Cortactin Branches Out: Roles in Regulating Protrusive Actin Dynamics // *Cell Motil Cytoskeleton.* – 2008. – V. 65, № 9. – P. 687–707.
7. Weed S.A., Parsons J.T. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly // *Oncogene.* – 2001. – V. 20. – P. 6418–6434.
8. Gurianov D.S., Antonenko S.V., Kravchuk I.V., Telegееv G.D. Cellular localization of β -tubulin, cortactin and PH domain of BCR, and their potential role in signalling pathways and clathrin-mediated endocytosis // *12th International Congress of Cell Biology. Abstract Book.* – 2016. – P. 154.
9. Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution // *Science.* – 2006. – V. 313, I. 5793. – P.1642–1645.
10. Seigneuric R., Mjahed H., Gobbo J., Joly A.L., Berthenet K., Shirley S., Garrido C. Heat shock proteins as danger signals for cancer detection // *Frontiers in oncology.* – 2011. – V. 1. – P. 37.
11. Jalkanen S., Lahesmaa-Korpinen A., Heckman C. Phosphoprotein profiling predicts response to tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia patients // *Exp. hematology.* – 2012. – V. 40. – P.705–714.
12. Deininger M.W., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia // *Blood.* – 2000. – V. 96. – P. 3343–3356.
13. Park K., Gaynor R., Kwak Y. Heat shock protein 27 association with the I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 35272–35278.

14. Bhattacharyya S., Dudeja P., Tobacman J. ROS, Hsp27, and IKKbeta mediate dextran sodium sulfate (DSS) activation of IкappaBa, NFkappaB, and IL-8 // Inflammatory bowel diseases. – 2009. – V. 15. – P. 673–683.

ANTONENKO S.V., KRAVCHUK I.V., GURIANOV D.S., TELEGEEV G.D.

*Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150, e-mail: antonenkoimbg@gmail.com*

PROTEINS-PARTNERS OF PH DOMAIN OF BCR-ABL PROTEIN: CREATION OF DNA CONSTRUCTS TO UNCOVER MOLECULAR CHARACTERISTICS OF CML DEVELOPMENT

Aim. Impact of domains of Bcr in oncogenic effect associated with Bcr-Abl remains unclear. Investigation of protein-protein interactions can be one of the effective ways to reveal those molecular events that alter normal cellular processes and cause malignant transformation. Previous research showed that USP1, Cortactin and Hsp27 may interact with PH domain. To confirm interactions and to study their biological consequences, genetic constructs for expression and microscopy should be created. **Methods.** Various standard molecular cloning techniques and expression in *E. coli* strain Rosetta. **Results.** Several DNA constructs have been created (pBluescriptSKII(+)+USP1, pFastFT-N1-CTTN, pMediumFT-N1-CTTN, pSlowFT-N1-CTTN and pET42a-hsp27). Effective bacterial expression of Hsp27 has been performed. **Conclusions.** All DNA constructs can be effective instruments to study biological role of interactions between PH domain of Bcr and USP1, Cortactin, Hsp27.

Keywords: PH domain, Bcr-Abl, USP1, Cortactin, Hsp27.