

МАТВЄЄНКО А. С.^{1, 2✉}, АНТОНЕНКО С. В.¹, ГУР'ЯНОВ Д. С.¹, ТЕЛЕГЕСЬВ Г. Д.¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, ORCID: 0000-0003-0212-3779, 0000-0003-0594-2286, 0000-0003-0270-4397

² Київський національний університет технологій та дизайну,

Україна, 01011, м. Київ, вул. Мала Шиянівська, 2

✉ matvieienkoayastasia@gmail.com, 0509352861

СТВОРЕННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ КОНСТРУКЦІЙ рЕСCFP-C3-USP1-DOMAIN-1 ТА рЕСCFP-C3-USP1-DOMAIN-2 ЯК КЛЮЧОВИХ ІНСТРУМЕНТІВ ВИВЧЕННЯ ДОМЕННОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ БІЛКА USP1 ТА ЇХ РОЛІ У ВЗАЄМОДІЇ З ОНКОБІЛКОМ BCR-ABL

Мета. Створення рекомбінантних конструкцій рЕСCFP-C3-USP1-domain-1 та рЕСCFP-C3-USP1-domain-2, необхідних для вивчення особливостей доменної організації білка USP1, визначення їх ролі у функціонуванні USP1 та взаємодії із онкобілком Bcr-Abl. **Методи.** У дослідженні використовувались стандартні методи молекулярного клонування, включаючи зокрема ПЛР, лігування, рестрикція, методи виділення та очищення ДНК. **Результати.** Були змодельовані та успішно отримані генетичні конструкції рЕСCFP-C3-USP1-domain-1 та рЕСCFP-C3-USP1-domain-2, що кодують ключові домени білка USP1. **Висновки.** Отримані генетичні конструкції рЕСCFP-C3-USP1-domain-1 та рЕСCFP-C3-USP1-domain-2, будуть використані для вивчення ролі доменів у функціонуванні білка USP1, його субклітинної локалізації та особливостей утворення білкового комплексу Bcr-Abl/USP1, що сприятиме кращому розумінню його ролі у клітинних процесах та розвитку нових терапевтичних підходів у лікуванні ХМЛ.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), онкобілок Bcr-Abl, убіквітин-специфічних протеаз (USPs), USP1, домени USP1.

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) це клональне мієлопроліферативне захворювання, що характеризується реципрокною транслокацією t(9;22), яка виникає у гемопоетичних стовбурових клітинах [1]. Ця транслокація спричиняє злиття гена Абельсона (ABL1) з хромосоми 9q34 та гена кластерної області точки розриву (BCR) на хромосомі 22q11.2, що призводить до утворення так званої філадельфійської (Ph) хромосоми [2]. Молекулярним наслідком цієї транслокації є формування злитого онкогену Bcr-Abl, який кодує конститутивно активну тирозинкіна-

зу. Аномальна конститутивна активність цієї тирозинкінази визначає патогенез ХМЛ [3].

USP1 є членом родини убіквітин-специфічних протеаз (USPs). USPs беруть участь у багатьох ключових клітинних процесах, зокрема, відповіді на пошкодження ДНК, апоптозі, передачі сигналів, стійкості до лікарських засобів [4]. Дисфункція USPs асоціюється з розвитком ряду захворювань, включаючи онкопатології. Відомо, що ракові клітини з високим рівнем білкового обміну є більш чутливими до інгібіторів протеасом та деубіквітиназ. Це підкреслює важливість USPs у патогенезі та терапевтичному підході до лікування онкологічних захворювань [5]. Розробка та впровадження інгібіторів USPs відкриває нові можливості у лікуванні раку та інших захворювань, пов'язаних із порушеннями білкової деградації [4, 5]. USP1 є одним із найкраще вивчених деубіквітинуючих ферментів (DUB). Відомо, що підвищена експресія USP1 спостерігається при різних видах раку, включаючи гліому, остеосаркому, лейкемію, рак шлунка, молочної залози, яєчників, простати та інші форми онкопатологій [6]. Це корелює з агресивністю пухлин і зниженими показниками виживаності пацієнтів [7]. USP1 бере участь у регуляції ключових клітинних процесів, таких як: метаболізм, проліферація, апоптоз. Основна роль USP1 полягає у підтриманні балансу між убіквітуванням та деубіквітуванням, що важливо для функціонування сигнальних мереж і клітинного гомеостазу. Порушення цього балансу сприяє онкогенезу. USP1 також модулює стабільність онкобілків і білків-супресорів пухлин, що робить його важливим діагностичним маркером і перспективною терапевтичною мішенню для боротьби з раком [7].

У результаті попередніх досліджень ми виявили новий білковий комплекс Bcr-Abl/USP1

© МАТВЄЄНКО А. С., АНТОНЕНКО С. В., ГУР'ЯНОВ Д. С., ТЕЛЕГЕСЬВ Г. Д.

та продемонстрували, що USP1 модулює рівень онкобілка в клітинах ХМЛ, що робить його багатообіцяючою терапевтичною мішенню для лікування ХМЛ [8]. Однак механізм, що лежить в основі взаємодії між онкобілком Bcr-Abl і деубіквітиназою USP1, залишається невідомим. У цій роботі ми змоделювати та створили генетичні конструкції з різними доменами USP1, що дозволить не лише встановити їхню роль у функціонуванні деубіквітинази, а й детально вивчити механізми утворення білкового комплексу Bcr-Abl/USP1, що є важливою умовою для розуміння патогенезу ХМЛ та розробки нової стратегії терапії захворювання.

Матеріали і методи

Ампліфікація цільових послідовностей доменів гена USP1. Для ампліфікації кодуючих послідовностей доменів гена USP1 були підібрані праймери, послідовності яких вказані в таблиці. Підбір праймерів проводили за допомогою програми Serial Cloner 2.6.1.

Матрицею для підбору праймерів та ПЛР слугувала генетична конструкція pECFP-C3-USP1, що містить кДНК цільових послідовностей. ПЛР проводили за допомогою ПЛР-ампліфікатора Eppendorf Master Cycler Personal (США). Компоненти ПЛР відповідали умовам виробника (Thermo Scientific) з використанням високоточної Pfu-полімерази. ПЛР проводили за наступних умов: початкову денатурацію ДНК – 5 хв при 95°C. Денатурація ДНК – 30 с при 95°C. Відпал праймерів – 30 с при 60°C. Елонгація тривала 1 хв при 72°C. Для напрацювання ДНК в необхідній кількості стадії 2–4 повторювали 29 разів. Кінцева елонгація проводилась 5 хв при 72°C. Успішність ампліфікації оцінювали за допомогою електрофорезу в агарозному гелі за стандартних умов.

Виділення ампліфікованих фрагментів ДНК із агарозного геля. Виконали електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот в агарозному гелі визначили розміри і розташування фрагментів ДНК та вирізали з гелю смужку, яка несе бажаний фрагмент. Гель з фрагментом ДНК зважували та додали трикратний об'єм (3X) адсорбційного буфера. Інкубували 10 хв при 50°C. Отриману суспензію вносили до колонки Whatman GF/C зі скловолоконними фільтрами з діаметром пор 1.2 μm та центрифугували при 8 000 g 2 хв. Отриманий осад промивали буферами та розчинили в потрібному об'ємі дисти-

льованої води. Виміряли концентрацію ДНК на спектрофотометрі.

Отримання генетичних конструкцій. Створення генетичних конструкцій для експресії цільових послідовностей та рестрикційний аналіз були змодельовані програмою Serial Cloner 2.6.1. Для клонування кодуючих послідовностей доменів USP1 був використаний pECFP-C3, який у кількості 5 мкг обробляли однією одиницею по 0,3 мкл (3 U) відповідних рестриктаз. Ампліфіковану кодуючу послідовність USP1-domain-1 інкубували з ендонуклеазами BamHI та SalI. Після цього вставку USP1-domain-1 лігували у вектор pECFP-C3, який попередньо був порізаний за сайтами рестрикції SalI та BglI. Для створення генетичної конструкції pECFP-C3-USP1-domain-2 вектор pECFP-C3 обробили ендонуклеазами рестрикції BamHI та SalI. Ампліфіковану кодуючу послідовність USP1-domain-2 інкубували із ендонуклеазами BamHI та SalI. За допомогою інструменту Double Digest Calculator визначили оптимальні умови проведення реакції рестрикції та підбрали буферні розчини. Рестрикційна суміш інкубувалась впродовж години при 37°C з подальшою термоінактивацією при 80°C протягом 20 хвилин. Для проведення лігування було взято молекулярне співвідношення вектора до вставки 1:3. До складу реакційної суміші було внесено: 200 ng плазмідної ДНК, 600 ng USP1-domain-1 та USP1-domain-2 відповідно, 5 U T4-ДНК-лігази (Thermo Scientific), 0,5 мМ АТФ, однократний (1X) лігазний буфер. Реакцію проводили впродовж 24 годин при 20°C з наступною 20-хвилинною інактивацією при 75°C, додаванням ферменту-кілера EcoRI до суміші, де це необхідно, інкубацією 30 хвилин при 37°C з наступною 20-хвилинною інактивацією при 65°C. Для проведення контролю була проведена та сама реакція лігування, але без вставки доменів у вектор.

Трансформація. Лігазну суміш трансформували у компетентні клітини *E. coli* TOP10 висівали на чашки з LB агаром з 100 мкг/мл канаміцину та інкубували при 37°C протягом доби. Отримані колонії висівали в рідке середовище LB з 100 мкг/мл канаміцину та нарощували протягом 18 годин. Плазмідні з рідкого середовища виділяли методом лізису неіонними детергентами.

Таблиця. Праймери використані для ампліфікації цільових послідовностей гена *USP1*

Цільові послідовності гена <i>USP1</i>	Праймери
USP1- domainain-1:	Fwd – GACGAGCTGTACAAGTACTCAG Rev – attagtcgacATGACTGGTGTTCCTTGGATAAT
USP1- domainain-2:	Fwd – gagtcgaccGAAGTTAAACCCATAAACAAAGGTG Rev – TCAGTTATCTAGATCCGGTGGA

Виділення плазмід методом лізису неіонними детергентами (NID). Культуру клітин центрифугували протягом при 7 000 g протягом 1 хв. Надосад видаляли, а до осаду, який становили бактеріальні клітини додавали неіонний детергент (ND), ретельно перемішували за допомогою вортекс та залишали на 5 хв. на водяній бані з температурою +65°C. Отриману суспензію процентрифугували 40 хв при 13 000 g до утворення щільного бактеріального осаду. Видалили бактеріальний осад. До супернатанту додали 600 мкл ізопропанолу та процентрифугували 20 хв при 13 000 g при кімнатній температурі. Супернатант видаляли та промивали за допомогою 1 мл 70 % етанолу впродовж 5 хв при 13 000 g. Після видалення етанолу осад сушили при кімнатній температурі та розчиняли в потрібному об'ємі дистильованої води.

Рестрикційний аналіз генетичних конструкцій pECFP-C3-USP1- domain-1 та

pECFP-C3-USP1-domain-2. Перевірку на наявність вставки у векторі було виконано методом аналітичного розрізання ендонуклеазами рестрикції за умовами виробника. Аналіз pECFP-C3-USP1-domain-1 здійснили за допомогою ендонуклеаз рестрикції *Sall* та *PstI*. Генетичну конструкцію pECFP-C3-USP1 domain-2 вивчали за допомогою – *EcoR1*.

Результати та обговорення

За результатами ПЛР реакції ми отримали цільові послідовності двох доменів гена *USP1*, з очікуваними для них розмірами. Розмір USP1-domain-1 становить 874 п.н., а USP1-domain-2 – 1251 п.н. За допомогою реакції лігування ми створили генетичні конструкції pECFP-C3-USP1-domain-1 (рис. 1) та pECFP-C3-USP1-domain-2 (рис. 2).

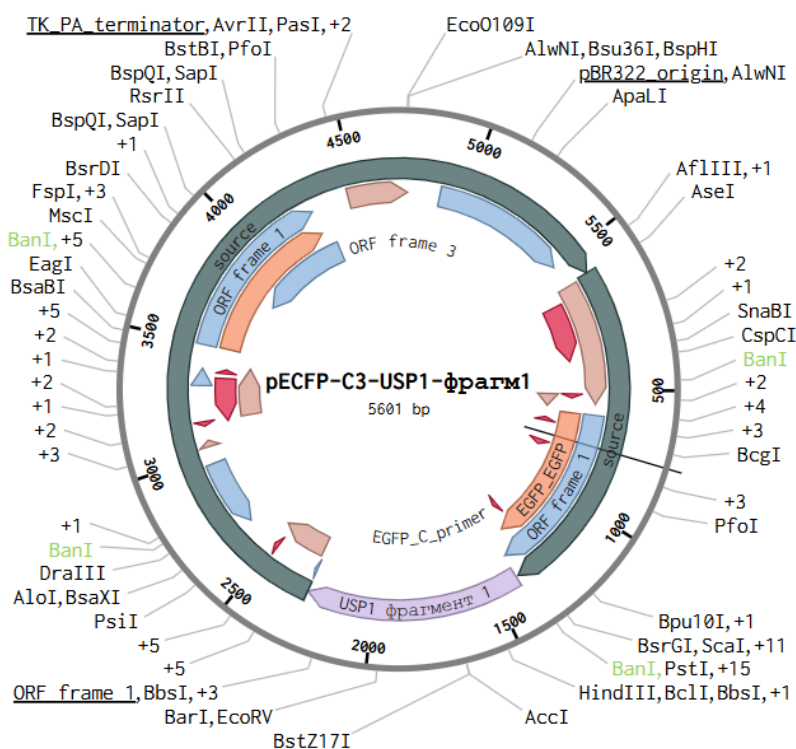


Рис. 1. Схема будови генетичної конструкції pECFP-C3-USP1- domain-1.

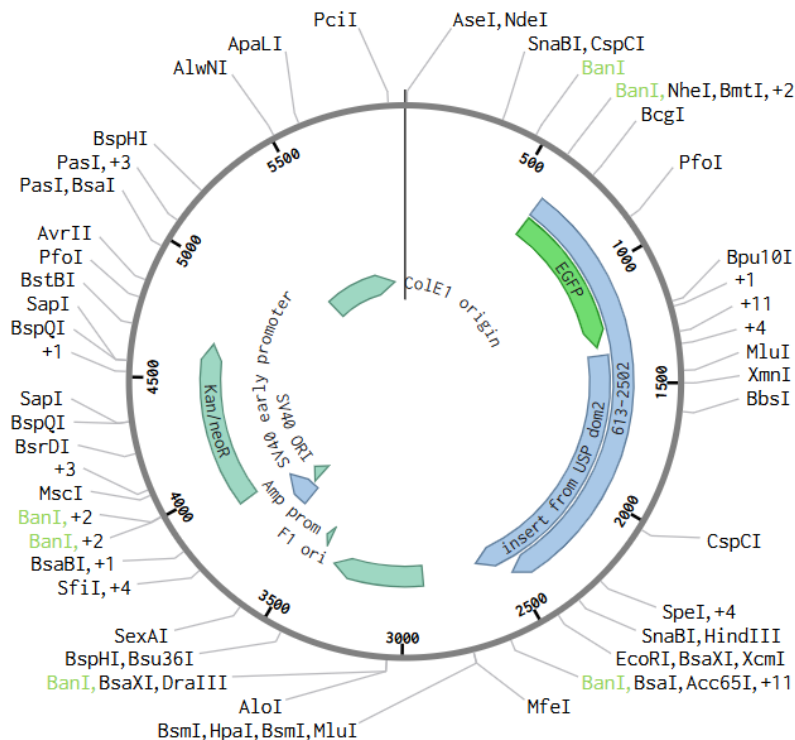


Рис. 2. Схема будови генетичної конструкції рECFP-C3-USP1- domain-2.

Генетичні конструкції рECFP-C3-USP1-domain-1 та рECFP-C3-USP1-domain-2 були успішно ідентифіковані шляхом картування за відповідними сайтами рестрикції. Так, після розрізання виділених плазмід рECFP-C3-USP1-domain-1 та рECFP-C3-USP1-domain-2, які, містили вставки цільових генів, ми виявили фрагменти різних розмірів методом електрофорезу. Для рECFP-C3-USP1-domain-1 ці фрагменти становили: 5 п.н., 215 п.н., 5381 п.н., а для рECFP-C3-USP1-domain-2 1081 п.н, 4897 п.н. (рис. 3). Правильність рамки зчитування підтверджено шляхом секвенування.

Вивчення структурної будови гена та білка USP1 є ключовим фактором для розуміння його функцій, властивостей, можливості взаємодії із онкобілком Bcr-Abl та впливом на патогенез ХМЛ. Білок USP1 кодується 785 амінокислотами з передбаченою молекулярною масою 88,2 кДа [9]. Структурна організація білка USP1 складається з декількох функціональних частин. Основний каталітичний домен USP1 включає: C90 – каталітичний залишок С-боксу, H593 і D751 – залишки His-боксу [5]. Ці каталітичні залишки утворюють ферментативне ядро активності DUB. Також каталітичний домен USP1 містить додаткові вставки, які моделюють його

активність і регуляцію. Перша вставка (L1) кодується 618 п.н, складається з 206 амінокислот та локалізується в межах 227–433 амінокислотних залишків. L1 посилює активність USP1 шляхом зв'язування з ДНК і алостеричної активації при взаємодії з кофактором UAF1, а також бере участь у фосфорилуванні, містить NLS та деградууючий мотив. Друга вставка (L2) закодована в гені USP1 426 п.н та складається з 142 амінокислот що охоплюють залишки 602–744. L2 містить сайт авторозщеплення, який регулює функцію USP1 [10]. Третя найменша вставка L3 розташована між 465–483 амінокислотними залишками. Вважається, що інсерції L1 і L3 разом здатні викликати аутоінгібування, яке може бути скасовано шляхом зв'язування з кофактором UAF1. Спільна делеція L1 і L3 призводить до гіперактивації USP1, тоді як видалення вставки L2 або L3 не впливає на його ферментативну активність [11]. Скоординована взаємодія між цими вставками, зокрема L1 і L3, керує аутоінгібуванням і активацією USP1, при цьому мутації в цих областях впливають на ферментативну активність. Ці три домени називають каталітичною тріадою USP1, вони є основою для його деубіквітинуючої активності [5].

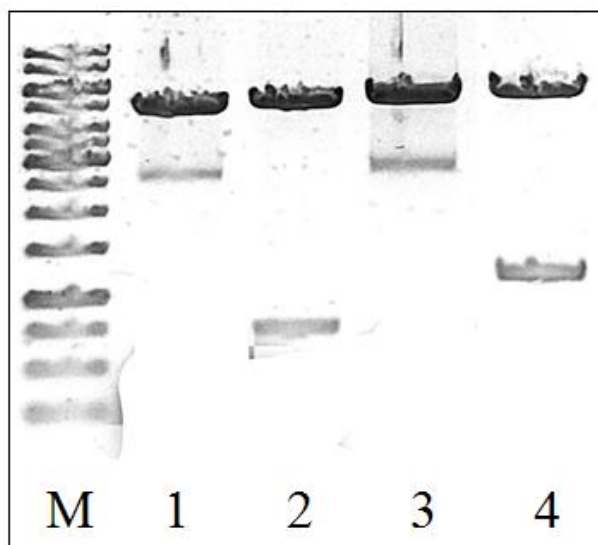


Рис. 3. Електрофореграма, скринінг цільових рекомбінантів: 1 – вектор рЕСFP-C3, результати рестрикційного картування за сайтами *SalI*, *PstI*; 2 – результати реакції лігування кодуючої послідовності домена 1 гена USP1 у плазмідний вектор рЕСFP-C3, результати рестрикційного картування рЕСFP-C3- USP1 за сайтами *SalI*, *PstI*; 3 – вектор рЕСFP-C3, результати рестрикційного картування за сайтами *EcoRI*; 4 – результати реакції лігування кодуючої послідовності домена 2 гена USP1 у плазмідний вектор рЕСFP-C3, результати рестрикційного картування рЕСFP-C3- USP1 за сайтами *EcoRI*. М – маркер молекулярних мас GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

У ході експерименту була створена генетична конструкція USP1-domain-1, яка має цільову послідовність фрагменту гена USP1, що кодує 294 амінокислотних залишків. Конструкція USP1-domain-2 несе кодуючу послідовність домену 2, що має 379 амінокислотних залишки. Структурний склад USP1-domain-1 включає два сайти ядерної локалізації, сигнал ядерного експорту, вставку L1, деградуєчий мотив, а також ділянку, відповідальну за взаємодію з UAF1. У свою чергу, USP1-domain-2 містить два сайти His-боксу (H593 і D751), сайт автокаталітичного розщеплення G670/G671, вставку L2 та аналогічну ділянку, що забезпечує взаємодію з UAF1.

USP1 має ключову роль у регуляції різноманітних клітинних процесів, зокрема, бере участь у підтриманні генетичної стабільності, репарації ДНК, контролює подвоєння центросом, забезпеченні балансу між процесами убіквітування і деубіквітування білків. Порушення у функціонування деубіквітинази USP1 може бути однією із причин розвитку та прогресування злоякісних новоутворень [10]. Попередні наші дослідження виявили взаємодію USP1 із онкобілком Bcr-Abl у клітинах ХМЛ. Зокрема показано, що USP1 взаємодіє з Bcr-Abl через дві свої ізоформи, тоді як третя ізоформа до взаємодії не залучена. Також було встановлено здатність впливати на рівень онкобілка Bcr-Abl шля-

хом інгібування рівня деубіквітинуючої активності USP1, що створює передумови для розробки нової стратегії терапії захворювання [8], яка буде не чутлива до мутаційної активності кіназного домену та завдяки високій селективності сприятиме протеолізу онкобілка у клітинах ХМЛ.

Розуміння функціональних особливостей доменної організації білка USP1 має важливе значення для визначення їх ролі у локалізації білка, його каталітичній активності та розумінні механізмів утворення білкового комплексу Bcr-Abl/USP1, який на сьогодні детально не вивчений. Ми вважаємо, що в результаті утворення даного білкового комплексу відбувається деубіквітування онкобілка Bcr-Abl за рахунок каталітичної активності USP1, що порушує протеоліз Bcr-Abl, призводить до його накопичення та прогресування захворювання. Таким чином, з'ясування механізмів білкової взаємодії Bcr-Abl і USP1 відкриває нові можливості для моделювання рівня онкобілка за допомогою протеосомної системи деградації та розробки альтернативної стратегії терапії ХМЛ.

Висновки

У результаті проведеного дослідження було змодельовано та успішно створено генетичні конструкції рЕСFP-C3-USP1-domain-1 та

pECFP-C3-USP1-domain-2, які кодують ключові домени деубіквітінази USP1. Отриманні вектори будуть використані для вивчення функціональних особливостей доменів білка USP1, їх ролі у локалізації білка та взаємодії із онкобілком Bcr-Abl. Ми вважаємо, що одним із головних наслідків утворення білкового комплексу Bcr-Abl/USP1 є порушення процесу убіквітинуювання онкобілка за рахунок деубіквітинуючої активно-

сті USP1, що призводить до його накопичення в клітині та прогресування захворювання. Таким чином, зв'язування механізмів білкової взаємодії Bcr-Abl і USP1 є важливим для розуміння патогенезу захворювання та розробки нової стратегії терапії ХМЛ, яка сприятиме селективному зниженню рівню онкобілка шляхом інгібування деубіквітинуючої активності USP1.

References

1. Chereda B., Melo J. V. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol.* 2015. Vol. 94. P. 107–121. <https://doi.org/10.1007/s00277-015-2325-z>.
2. Kang Z., Liu Y., Xu L., Long Z., Huang D., Yang Y. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin Journal of Cancer.* 2016. <https://doi.org/10.1186/s40880-016-0108-0>.
3. Jabbour E., Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology.* 2020. Vol. 95. P. 691–709. <https://doi.org/10.1002/ajh.25792>.
4. Bakkar M., Khalil S., Komal B., Kushwaha N. Ubiquitin-Specific Protease Inhibitors for Cancer Therapy: Recent Advances and Future Prospects. *Biomolecules.* 2025. Vol. 15 (2). P. 240. <https://doi.org/10.3390/biom15020240>.
5. Nishchenko D., Antonenko S., Guryanov D., Telegeev G. Features of expression and localization of USP1 in different types of malignant neoplasms. *Experimental factors of organism evolution.* 2024. Vol. 34. P. 88–94. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v34.1622>. [in Ukrainian]
6. Xia Zhang, Peng Peng, Li-Wei Bao Ubiquitin-Specific Protease 1 Promotes Bladder Cancer Progression by Stabilizing c-MYC. *Cells.* 2024. Vol. 13. P. 1798. <https://doi.org/10.3390/cells13211798>.
7. Boyko S. The Role of Deubiquitinating Enzymes in Chromatin Regulation. *FEBS Lett.* 2010. Vol. 585. P. 216–2023. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.042>.
8. Antonenko S., Telegeev G. Inhibition of USP1, a new partner of Bcr-Abl, results in decrease of Bcr-Abl level in K562 cells. *Experimental Oncology.* 2023. Vol. 42 (2). P. 109–114. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-2.14533>.
9. UniProt. Retrieved from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/O94782/entry#sequences>.
10. Antonenko S., Zavelevich M., Telegeev G. The role of USP1 deubiquitinase in the pathogenesis and therapy of cancer. *Acta Biochimica Polonica.* 2023. Vol. 70 (2). P. 219–231. https://doi.org/10.18388/abp.2020_6636.
11. Dharadhar S., Dijk W. J., Scheffers S., Fish A., Sixma T. K. Insert L1 is a central hub for allosteric regulation of USP1 activity. *EMBO reports.* 2021. Vol. 22 (4). <https://doi.org/10.15252/embr.202051749>.
12. Liang X.-W., Wang S.-Z., Liu B. A review of deubiquitinases and their roles in tumorigenesis and development. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023. Vol. 11. P. 88–94. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1204472>.

MATVIEIENKO A. S.^{1,2}, ANTONENKO S. V.¹, GUR'YANOV D. S.¹, TELEGEEV G. D.¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150

² Kyiv National University of Technologies and Design, Ukraine, 01011, Kyiv, Mala Shiyanova str., 2

GENERATION OF RECOMBINANT CONSTRUCTS pECFP-C3-USP1-DOMAIN-1 AND pECFP-C3-USP1-DOMAIN-2 AS KEY TOOLS FOR STUDYING THE DOMAIN ORGANIZATION OF USP1 AND ITS INTERACTION WITH THE ONCOPROTEIN BCR-ABL

Aim. The aim of this study is to generate recombinant constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2, essential for investigating the domain organization of the USP1 protein, determining their role in USP1 function, and analyzing their interaction with the oncoprotein Bcr-Abl. **Methods.** Standard molecular cloning techniques were employed, including polymerase chain reaction (PCR), ligation, restriction enzyme digestion, as well as DNA extraction and purification methods. **Results.** The genetic constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2, encoding key domains of the USP1 protein, were successfully designed and obtained. **Conclusions.** The generated genetic constructs pECFP-C3-USP1-domain-1 and pECFP-C3-USP1-domain-2 will be utilized to study the role of these domains in USP1 function, its subcellular localization, and the formation of the Bcr-Abl/USP1 protein complex. These findings will contribute to a better understanding of the role of USP1 in cellular processes and facilitate the development of novel therapeutic approaches for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML).

Keywords: chronic myeloid leukemia (CML), Bcr-Abl oncoprotein, ubiquitin-specific proteases (USPs), USP1, USP1 domains.