

УДК 577.2.575

doi: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1214

ФОСФОРИЛЮВАННЯ САЙТІВ TYR БІЛКА USP1 У КЛІТИНАХ K562 ЯК ФАКТОР ПРОГРЕСІЇ ХРОНІЧНОЇ МІЄЛОЇДНОЇ ЛЕЙКЕМІЇ

С. В. АНТОНЕНКО, Ю. Л. ПОЛІЩУК, Г. Д. ТЕЛЕГЄЄВ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: antonenkoimbg@gmail.com

Мета. Вивчити особливості фосфорилювання білка USP1 за Tyr у клітинах K562. **Методи.** Біоінформатичний аналіз сайтів фосфорилювання білка USP1 за допомогою програмного забезпечення KinasePhos. Коїмунопреципітація, Western blot аналіз. Імунофлюорисцентний аналіз та конфокальна мікроскопія. **Результати.** Передбачено потенційні сайти фосфорилювання білка USP1 за Tyr. Виявлено фосфорильовану форму білка USP1 за сайтами тирозину у клітинах K562. За допомогою імунофлюорисцентного аналізу та конфокальної мікроскопії встановлено, що фосфорилювана за Tyr форма білка USP1 локалізується у ядрі клітини. **Висновки.** Ми вважаємо, що фосфорилювання білка USP1 за Tyr, є наслідком взаємодії із онкобілком Vcr-Abl, який має високу кіназну активність. Фосфорилювання білка USP1 може підвищувати деубіквітинуючу активність білка, таким чином запобігати протеосомній деградації онкобілка Vcr-Abl в клітині та сприяти прогресуванню захворювання.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія, Vcr-Abl, USP1, Tyr сайт фосфорилювання.

Вступ. Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) — це мієлопроліферативне захворювання, яке у 95 % випадків характеризується наявністю Філадельфійської хромосоми (Ph+) (Kang et al., 2016; Jalkanen, et al., 2012). Дана аномалія утворюється в результаті реципрокної транслокації t(9;22)(q34;q11), де ген Abl 9 хромосоми об'єднується з геном Vcr 22 хромосоми (Kang et al., 2016; Miroshnychenko et al., 2010; Jalkanen, et al., 2012; Deininger et al., 2000). В залежності від центру розривів у межах гена bcr продукт транскрипції гена bcr/abl може мати молекулярну масу 190, 210 або 230 кДа. До білкових доменів, які суттєво впливають на пухлиногенний потенціал Vcr-Abl, відносять Dbf-гомологічний (DH) та плекстрин-гомологічний (PH) домени, які представлені лише в р210, але не в р190 формі білка Vcr-Abl (Miroshnychenko et al., 2010). Різні форми онкобілка Vcr-Abl асоційовані з різними формами мієлопроліферативного захворювання, так форма р190 білка Vcr-Abl характерна для гострої лімфобластичної лейкемії, р210 — хронічної мієлоїдної лейкемії і р230 для відносно доброякісної нейрофільної форми мієлоїдної лейкемії (Miroshnychenko et al., 2010; Deininger et al., 2000). У результаті масс спектрометричного аналізу було виявлено потенційні білки партнери на взаємодію із PH доменом Vcr частини онкобілка Vcr-Abl, серед яких білок убіквітин специфічна протеаза 1 (USP1) (Miroshnychenko et al., 2010). Білок USP1 належить до цистеїнової групи протеаз (CA клану, родини C19), кодується 785 амінокислотами, з передбаченою молекулярною масою 88,2 кДа. Ген USP1 локалізований у 1p31.3 (Deininger et al., 2000; Iraia García-Santisteban et al., 2013; Fraile et al., 2012). Аналіз білків родини USP, таких як USP7 показав, що каталітичний домен цих ферментів нагадує відкрити праву руку з трьома суб-доменами: Fingers, Palm і Thumb.

Аналіз методом вирівнювання послідовностей показав, що каталітичний домен USP-ядра може поділятися на шість консервативних блоків, і що деякі з цих ферментів, включаючи USP1 можуть містити додаткові неконсервативні домени у якості вставок між блоками, що, ймовірно, є регуляторними. USP1 несе один з найбільших каталітичних доменів у родині USP, який включає два вставні домени між блоками 2 і 3, і між блоками 5 та 6 (Fraile et al., 2012). Білок USP1 виконує функцію деубіквітування, тобто руйнування ізоптидних зв'язків між убіквітином та протеїном, таким чином запобігаючи протеосомній деградації білків (Iraia Garcia-Santisteban et al., 2013, Antonenko et al., 2016). Рівні USP1, його локалізація і активність модулюються за допомогою білково-білкових взаємодій, фосфорилування, протеолізу тощо (Fraile et al., 2012.; Olazabal-Herrero et al., 2015; Xiomaris et al., 2011). З літературних джерел відомо, що Vcr частина гібридного білка Vcr-Abl містить сайти убіквітування (Zhongxia et al., 2017), ми припускаємо, що білок USP1 може деубіквітувати онкобілок, що призводить до його накопичення в клітині та прогресування захворювання.

Матеріали і методи

Біоінформатичний аналіз. Аналіз сайтів фосфорилування білка USP1 здійснили за допомогою веб-серверу KinasePhos (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw>).

Культура клітин. Клітини K562 (банк клітин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України) — клітинна лінія мієлогенної лейкемії людини, з експресією онкобілка Vcr-Abl. Клітини K562 культивували в середовищі RPMI 1640 medium (Thermo scientific, США), з додаванням 10 % FBS, 100 U/mL пеніциліну і 100 мг/мл стрептоміцину (Arterium, Україна). Клітини культивували при температурі +37 °C і 5 % CO₂.

Лізис клітин. Клітин K562 інкубували з лізис буфером NP40 (150 mM NaCl, 1,0 % Triton X100, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM PMSF для першого варіанту та з додаванням 2mM NaVO₃ для другого варіанту), протягом 20 хв на льодові. Зразки центрифугували, відібрали верхню фракцію у нову пробірку та додали SDS-буфер для нанесення з b-MeEtOH (200 mM Tris-HCl, pH 6,8, 400 mM b-MeEtOH, 4 % SDS, 0,01 % Bromphenol blue, 40 % Glycerol) та інкубували протягом 5 хв. на водяній бані за температури +99 °C / +100 °C.

Western blot аналіз. Аналіз білкових препаратів, проводили на приладі Bio-Rad Laboratories (США) на пластині для вертикального електрофорезу. Використовували 12 % SDS-поліакриламідний гель за Лемлі. Перенесення білків із гелю на нітроцелюлозну мембрану (18186, Amersham Hybond-C, General Electric, США) здійснили шляхом електроблотингу. Мембрану протягом 2 год інкубували в 0,2 % розчині BSA (A3059 Sigma, США). Після цього мембрану протягом 1 год. інкубували з anti-USP1 антитілами (1:1000, ThermoFisher Scientific, США) та вторинними anti-rabbit (1:10000, ThermoFisher Scientific, США) антитілами. Мембрану аналізували за допомогою за допомогою хемілюмінесцентної детекції (Chemidoc, Bio-Rad Laboratories, США) з використанням ECL-буфера (1,5M Tris-HCl pH 8,8, coumaris acid (14 мг / мл DMSO), Luminol (44 мг / мл DMSO), 30 % H₂O₂).

Коїмунопреципітація. Сефароза G (Sigma, США) попередньо врівноважена в лізис буфері NP40 (150mM NaCl, 1.0 % Triton X100, 50 mM Tris-HCl pH 8.0). Для виявлення фосфорильованих форм білка USP1 сефароза G інкубувалась зі 3 мкл моноклональних антитіл anti-Phosphotyrosine антитілом (1: 5000, ThermoFisher Scientific, США) у 100 мкл лізис буферу NP40. Після у розчин додавали лізати клітин K562. Лізати клітин K562 отримувались за допомогою лізис буфера NP40 з додаванням PMSF та NaVO₃ (150mM NaCl, 1.0 % Triton X100, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM PMSF, 2mM NaVO₃). В контрольному зразку лізат клітин додався до сефарози G без антитіл. Потім часточки сефарози разом з білками, що зв'язались із нею, відмивались тричі лізис буфером NP40. Буфер для нанесення з b-меркаптоетанолом (200 mM Tris-HCl, pH6,8, 400 mM b-меркаптоетанол, 4 % SDS, 0,01 % бромфеноловий синій, 40 % гліцерин) додавався до зразків та прогрівався протягом 5 хвилин водяній бані, що кипить. Отримані зразки вивчали за допомогою Western blot аналізу.

Імунофлуоресцентний аналіз та конфокальна мікроскопія. Клітини K562 протягом 20 хв інкубували у розчині для фіксації (4 % параформальдегід, 0,2 % тритон X-100) та тричі промили в PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄). Після клітини протягом однієї години інкубували у 2,5 % BSA розчині в PBS. Клітини K562 інкубували з anti-USP1 антитілом (1:200, ThermoFisher

Scientific, США) і anti-Phosphotyrosine антитілом (1:5000, ThermoFisher Scientific, США) протягом однієї години, промивали в PBS та ще протягом однієї години інкубували з anti-Rabbit, DyLight550 (1:200, ThermoFisher Scientific, USA) та anti-mouse, DyLight488 (1:200, ThermoFisher Scientific, USA) антитілами. Ядра клітин визначали шляхом фарбування DAPI протягом 2 хв. Зразки промивали та заключали в Citifluor AF1 буфері. Мікропрепарати вивчали за допомогою конфокального мікроскопа Zeiss LSM 510 (Німеччина).

Візуальні та кількісні аналізи. Аналіз результатів здійснили за допомогою програмного забезпечення Zeiss LSM Image Browser та Fiji додаток JACoP, з урахуванням показників коефіцієнта кореляції Пірсона (PCC) та коефіцієнта колокалізації Мандерса (MCC).

Результати та обговорення

За допомогою веб-серверу KinasePhos ми спрогнозували три потенційні сайти фосфорилування за Tyr, а саме такі як Y504, Y678, Y681 (рис. 1).



Рис.1. Схема розташування потенційних сайтів фосфорилування за Tyr на білку USP1 (дані отримані за допомогою веб-серверу KinasePhos).

Відомо три ізоформи білка USP1, вони по різному можуть зустрічатися у клітинних лініях, від однієї до трьох ізоформ. Ми встановили, що для клітин K562 характерна наявність трьох ізоформ білка USP1. Результати були отримані шляхом аналізу лізатів клітин K562 за допомогою методу Western blot з використанням anti-USP1 (ThermoFisher Scientific, США) та anti-Rabbit (ThermoFisher Scientific, USA) антитіл. Лізати отримували з додаванням 2mM NaVO₃ до NP40 лізис буферу. Ортованадат натрію (NaVO₃) є інгібітором для фосфотирозинфосфатаз, а тому ми використали його для збереження фосфорилуваних форм білка по Tyr сайтах. Фосфорильовані форми білка USP1 клітини K562 виявляли за допомогою методу коімунопреципітації з використанням сефарози G та anti-Phosphotyrosine антитіл (1:5000, ThermoFisher Scientific, США). Отримані результати аналізували за допомогою Western blot аналізу (рис. 2).

Таким чином, ми виявили, що для білка USP1 характерне фосфорилування за сайтами тирозину. Крім того, фосфорилувані за Tyr сайтами можуть бути всі три форми білка USP1. Ми вважаємо, що фосфорилування білка USP1 за Tyr є наслідком взаємодії із онкобілком Bcr-Abl, який має високу кіназну активність та неконтрольовано фосфорилує білкові комплекси, так Bcr-частина має серин-треонінову активність та тирозинова активність — Abl-частини. Відомо, що фосфорилування білка USP1 впливає на його деубіквітинуючу активність, наприклад, фосфорилування білка USP1 за S313 сприяє його об'єднанню з кофактором — USP1 асоційованим фактором 1 (UAF1), що підвищує його активність.

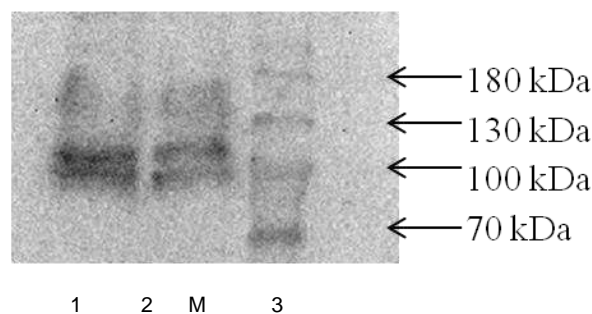


Рис. 2. Western blot аналіз, результати коімунопреципітації: 1 — експресія білка USP1 у клітинах K562, 2 — білок USP1, результати коімунопреципітації, M — маркер молекулярної маси Plus Prestained 10-250kDa Protein Ladder (Thermo Scientific), 3 — негативний контроль.

За допомогою імунофлюорисцентного аналізу з використанням anti-USP1 (ThermoFisher Scientific, США), anti-Phosphotyrosine (ThermoFisher Scientific, США), anti-Rabbit, DyLight550 (ThermoFisher Scientific, USA) anti-mouse, DyLight488 (ThermoFisher Scientific, USA) антитіл та конфокальної мікроскопії ми виявили фосфорилування білка за Tyr у клітинах K562 (рис. 3). У нашому дослідженні локалізації білка USP1 є переважно ядерною, що відповідає попередньо встановленим даним (Sun et al., 2011). Сигнал Tyr зустрічається по всій клітині, хоча найбільше його скупчення біля мембрани клітини, що можливо пов'язано із локалізацією онкобілка Bcr-Abl, який має підвищену фосфотирозинуву активність.

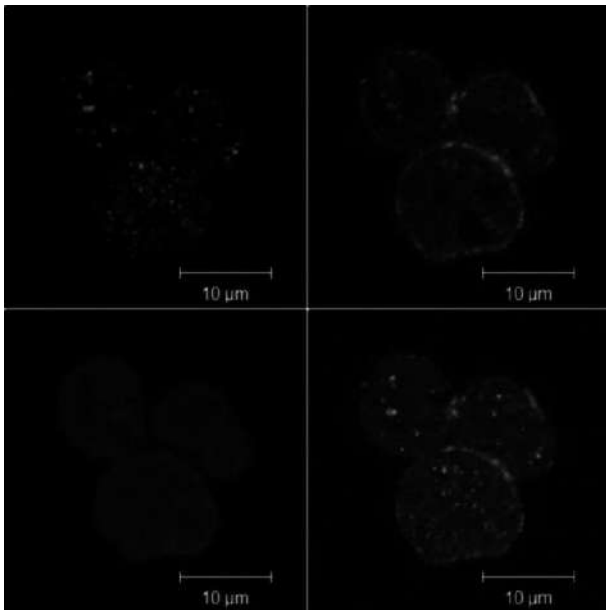


Рис. 3. Результати імунофлуоресцентного аналізу: А — локалізація білка USP1, Б — локалізація фосфорильованих білків за Туг, В — DAPI флуоресценція, Д — перекриття сигналів локалізації.

Перекриття сигналів локалізації («точка злиття») білка USP1 і Phosphotyrosine аналізували шляхом накладання двох зображень за допомогою програмного забезпечення Zeiss LSM Image Browser. Графічний аналіз проводили за допомогою (Fiji software JACoP plugin), він відображає інтенсивність досліджуваних каналів (рис. 4).

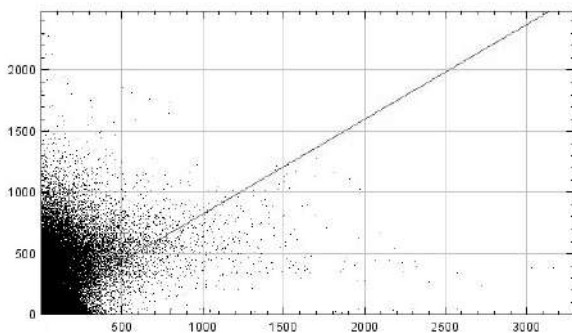


Рис. 4. Цитофлюорограма результатів кількісного аналізу локалізації білка USP1 і сигналу локалізації фосфорильованих білків за тирозином у клітинах K562.

Кількісний аналіз результатів включає дані за коефіцієнтом кореляції Пірсона та коефіцієнт колокалізації Мандерса. Аналіз здійснили за допомогою програмного забезпечення Fijі дода-

ток JACoP. Коефіцієнт кореляції Пірсона (ККП) є коефіцієнтом лінійної кореляції, він вимірюється в діапазоні від -1 до 1, де -1 — лінійно пов'язаний, 0 — часткова кореляція, -1 — абсолютна різниця. У нашому дослідженні ККП становить 0,238–0,334. Враховуючи, що спільна локалізація не обов'язково означає пропорційний розподіл, для достовірності результатів ми використали коефіцієнт колокалізації Мандерса (ККМ), оскільки він більше підходить для аналізу біологічних систем. ККМ відображає два показники: перекриття сигналу А із сигналом В (M1) та перекриття сигналу В з сигналом А (M2), що важливо для аналізу біологічної системи. ККМ визначається в діапазоні від 0 до 1, де 0 — відсутність колокалізації і 1 — повне перекриття сигналів локалізації білків. ККМ для білка USP1 та фосфотирозину у клітинах K562 складає: M1 — 0,677, M2 — 0,165, що є показником високого рівня колокалізації білка USP1 з фосфотирозином.

Висновки

Білок USP1 належить до цистеїнової групи протеаз, активність якого контролюється різноманітними механізмами клітини, серед яких фосфорильовання, взаємодія з кофактором тощо. Ми виявили фосфорильовання білка USP1 за Туг у клітинах K562. Результати імунофлуоресцентного аналізу показали, що фосфорильований по Туг білок USP1 характерний для ядра клітини. Ми вважаємо, що фосфорильовання білка USP1, може бути наслідком взаємодії із онкобілком Bcr-Abl, який має високу кіназну активність. Фосфорильовання білка USP1 може підвищувати деубіквітинуючу активність білка, і таким чином запобігати протеосомній деградації онкобілка Bcr-Abl в клітині та сприяти прогресуванню захворювання.

References

1. Antonenko S. V., Gurianov D. S., Telegeev G. D. Colocalization of USP1 and PH domain of BcrAbl oncoprotein in terms of chronic myeloid leukemia cell rearrangements. *Cytology and genetics*. 2016 Jul-Aug;50(4). P: 11–5. doi: 10.3103/S009545271605029.
2. Deininger M. W., Goldman J. M., Melo J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000. V. 96. P: 3343–3356.
3. Fraile J. M., Quesada V., Rodriguez D., Freije J. M., Lopez-Otin C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene*. 2012. V. 31. P. 2373–2388. doi: 10.1038/onc.2011.443.

4. *Iraia García-Santisteban, Godefridus J. Peters, Elisa Giovannetti, Jose Antonio Rodriguez* USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy. *Molecular Cancer*. 2013. V. 12. P. 9. doi: 10.1186/1476-4598-12-91.
5. *Jalkanen S., Lahesmaa-Korpinen A., Heckman C.* Phosphoprotein profiling predicts response to tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia patients. *Experimental hematology*. 2012. V: 40 (9) P: 705–714. e3. doi: 10.1016/j.exphem.2012.05.010.
6. *Kang Z. J., Liu Y. F., Xu L. Z., Long Z. J., Huang D., Yang Y., Liu B., Feng J. X., Pan Y. J., Yan J. S., Liu Q.* The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. 2016 May 27;35:48. doi: 10.1186/s40880-016-0108-0. doi: 10.1186/s40880-016-0108-0.
7. *Miroshnychenko D., Dubrovska A., Maliuta S., Telegiev 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. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.11.014.
8. *Olazabal-Herrero A., García-Santisteban I., Rodríguez J. A.* Structure-function analysis of USP1: insights into the role of Ser313 phosphorylation site and the effect of cancer-associated mutations on autocleavage. *Mol. Cancer*. 2015 Feb 6; 14. P. 33. doi: 10.1186/s12943-015-0311-7. doi: 10.1186/s12943-015-0311-7.
9. *Sun H., Kapuria V., Peterson L. F., Fang D., Bornmann W. G., Bartholomeusz G., Talpaz M., Donato N. J.* Bcr-Abl ubiquitination and Usp9x inhibition block kinase signaling and promote CML cell apoptosis. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11). P: 3151–62. doi: 10.1182/blood-2010-03-276477.
10. *Xiomaris M. Cotto-Rios, Mathew J. K. Jones, Tony T. Huang.* Insights into phosphorylation-dependent mechanisms regulating USP1 protein stability during the cell cycle. *Cell Cycle*. 10:23. P: 4009–4016. December 1, 2011. Landes Bioscience. doi: 10.4161/cc.10.23.18501.
11. *Zhongxia Yu, Hui Song, Mutian Jia, Jintao Zhang, Wenwen Wang, Qi Li, Lining Zhang, Wei Zhao* USP1-UAF1 deubiquitinase complex stabilizes TBK1 and enhances antiviral responses. *JEM*. 2017, doi: 10.1084/jem.20170180.

PHOSPHORYLATION OF TYR SITES OF USP1 PROTEIN IN K562 CELL AS A PROGRESSION FACTOR OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

S. V. Antonenko, Yu. L. Polishchuk, G. D. Telegiev

Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150
e-mail: antonenkoimbg@gmail.com

Aim. To study the properties of Tyr phosphorylation of USP1 protein in K562 cells. **Methods.** The bioinformatics analysis of the USP1 protein sites of phosphorylation using the Phosphosite software. Coimmunoprecipitation, Western blot. Immunofluorescence analysis and confocal microscopy. **Results.** Potential phosphorylation sites for USP1 protein for Tyr are provided. Phosphorylated form of USP1 protein detected in K562 cells. Using immunofluorescence analysis and confocal microscopy, we found that Tyr phosphorylated forms of USP1 protein are localized in the nucleus. **Conclusions.** We deem that Tyr phosphorylation of USP1 protein is the consequence of its interaction with Bcr-Abl oncoprotein, which has high kinase activity. USP1 phosphorylation can raise deubiquitinating activity of this protein, and as a result, avert the proteosomal degradation of Bcr-Abl in cell and facilitate the progress of the disease.

Keywords: chronic myeloid leukemia, Bcr-Abl, USP1, Tyr site of phosphorylation.