

УДК 577.2.575

УБІКВІТИН СПЕЦИФІЧНА ПРОТЕАЗА 1 (USP1) – ПОТЕНЦІЙНИЙ ПАРТНЕР Vcr-ABL ОНКОБІЛКА: БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ТА ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ КОНСТРУКЦІЙ

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

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
 Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
 e-mail: s.antonenko999@yandex.ua

Мета. Результатом реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами є гібридний онкобілок Vcr-Abl, який спричиняє розвиток хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ). За результатами мас-спектрометричного аналізу білок USP1 був визначений як потенційний кандидат на взаємодію з онкобілком Vcr-Abl. Метою даної роботи був біоінформатичний аналіз білка USP1, як потенційного партнера білка Vcr-Abl, та створення генетичних конструкцій, необхідних для визначення локалізації білка USP1 в клітині, перевірки білок-білкових взаємодій білка USP1 та деубіквітинування онкобілка Vcr-Abl. **Методи.** Біоінформатичний аналіз за допомогою веб-серверів Estimation of protein Expression and Solubility, NetPhos2.0 Server, Disphos and KinasePhos, ПЛР, лігування, рестрикція, методи виділення та очищення ДНК. **Результати.** Передбачили загальний відсоток розчинності білка USP1, який складає близько 68 %, консервативні та невпорядковані області білка USP, його вторинну структуру. Спрогнозували Ser, Thr, Tyr сайти фосфорилування білка USP1. Отримали генетичні конструкції pUC18-USP1, pECFP-C3-USP1, pCMV-HA-USP1. **Висновки.** Розчинність білка у 68 % є хорошим прогностичним результатом для роботи з ним. Наявність сайтів фосфорилування (Ser, Thr, Tyr) підтверджує можливість зміни активності білка USP1 за рахунок онкобілка Vcr-Abl. Генетична конструкторія pECFP-C3-USP1 дає можливість визначити локалізацію білка USP1 в еукаріотичній клітині. Вектор pCMV-HA-USP1 є базою для встановлення білок-білкових взаємодій USP1 та Vcr-Abl, перевірки деубіквітинування онкобілка Vcr-Abl.

Ключові слова: хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ), філадельфійська хромосома, білок Vcr-Abl, білок USP1, деубіквітинування, фосфорилування.

Вступ. Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – клональне захворювання з характерною проліферацією гранулоцитарного паростка кровотворної системи, у 95 % випадків захворювання супроводжується появою Філадельфійської хромосоми (Ph+), яка є результатом реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами [1, 2]. Продуктом даної мутації є гібридний білок Vcr-Abl, який відомий у трьох формах – p190, p210 і p230, асоційованих з гострою лімфобластичною лейкемією, хронічною мієлоїдною лейкемією і відносно доброякісною нейрофільною формою мієлоїдної лейкемії відповідно [2, 3]. Основною відмінністю даних форм є наявність PH і DN доменів у p210 та p230, роль яких на сьогодні достовірно не відома [4]. За попередніми результатами мас-спектрометричного аналізу, який був проведений у відділі молекулярної генетики ІМБіГ,

© С. В. АНТОНЕНКО, І. В. КРАВЧУК, Д. С. ГУР'ЯНОВ, Г. Д. ТЕЛЕГЄЄВ, 2014

було визначено 23 білки – потенційні кандидати на взаємодію із РН доменом Vcr частини онкобілка Vcr-Abl [5]. Одним із таких білків є убіквітин специфічна протеаза 1 (USP1), білок цистеїнової групи протеаз (CA клану, родини С19) [6, 7], який деубіквітинуює білки в клітині, чим рятує їх від протеосомної деградації [8]. Ген *USP1* локалізований у 1р31.3. Білок USP1 кодується 785 амінокислотами, з передбаченою молекулярною масою 88,2 КДа, складається з трьох консервативних доменів, два з яких – це внутрішньоклітинні пептидази та домен – убіквітин карбоксил-термінальна гідролаза [7, 9, 10]. Наявність NH2 сайту убіквітинуювання на Vcr частині онкобілка Vcr-Abl свідчить про убіквітинуювання білка Vcr-Abl [11, 12, 13, 14]. Ми припускаємо, що білок USP1 може деубіквітинувати білок Vcr-Abl, що призводить до його накопичення в клітині та прогресування захворювання. Також ми не виключаємо й того, що завдяки кіназній активності Abl частини [15] онкобілок Vcr-Abl може фосфорилувати білок USP1, чим змінювати його активність та викликати порушення білок-білкових взаємодій у клітині. У даній роботі шляхом біоінформатичного аналізу ми передбачили розчинність білка USP1, оцінили консервативні домени, невпорядковані ділянки, спрогнозували вторинну структуру білка USP1, передбачили його сайти фосфорилування. Створили низку генетичних конструкцій, які слугують базою для експериментальної перевірки білок-білкової взаємодії USP1 і Vcr-Abl та деубіквітинуювання онкобілка білком USP1.

Матеріали і методи

Аналіз розчинності білка USP1, визначення його консервативних доменів, невпорядкованих ділянок та передбачення вторинної структури білка було здійснено за допомогою веб-сервера Estimation of protein Expression and Solubility. За допомогою веб-серверів NetPhos2.0 Server,

Disphos та KinasePhos були визначені сайти фосфорилування, розташовані на білку USP1.

Послідовність гена USP1 ампліфікували за допомогою праймерів USP1 fwd (AATTGCCTGGTGTACATACCTAGTG) та USP1 rev (GAGAGACCAATAATATCCAGTAGC), в якості матриці використали генетичну конструкцію із банку плазмід відділу молекулярної генетики Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ (pCMV-XL5-USP1). Підбір праймерів проводили за допомогою програми PerlPrimer. Компоненти ПЛР відповідали умовам виробника (Thermo Scientific) для використання високоспецифічної Pfu полімерази. Для моделювання генетичних конструкцій застосували програму Serial Cloner 2.6.1. Для клонування ампліфіковані послідовності USP1 лігували у вектор pUC18 по сайтах *Sma*1, послідовність USP1 вирізали з новоствореної генетичної конструкції pUC18-USP1 по сайтах *Kpn*1 і *Sal*1 та субклонували у вектор pCMV-NA, вектор для еукаріотичної експресії білка, а також у еукаріотичний вектор pEGFP-C3, який несе флюоресцентну мітку та дає можливість визначити локалізацію білка USP1 у клітині.

Перевірку на наявність та орієнтацію вставки здійснено методом рестрикції та ПЛР. З метою перевірки рамки зчитування та уникнення мутацій генетичні конструкції були додатково просиквензовані.

Результати та обговорення

Біоінформатичний аналіз білка USP1

Розчинність білка є однією з головних характеристик, що визначає можливість роботи з ним *in vitro*. За допомогою веб-сервера Estimation of protein Expression and Solubility ми передбачили розчинні та нерозчинні регіони білка USP1 та встановили, що загальний відсоток розчинності біл-

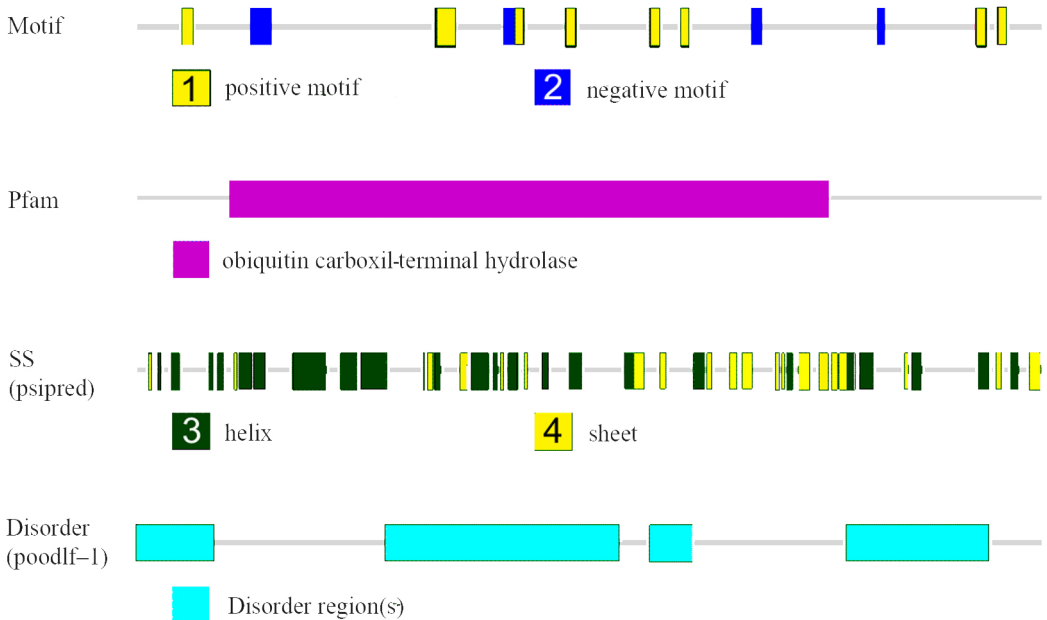


Рис. 1. Результати аналізу білка USP1 за допомогою веб-сервера Estimation of protein Expression and Solubility: Motif – розташування розчинних (1) та нерозчинних (2) ділянок білка USP1; Pfam – консервативний регіон, визначений за пріоритетом; SS – вторинна структура білка USP1, розташування β -спіралей (3) та α -листів (4); Disorder – невпорядковані області білка USP1

ка складає близько 68 %, що є хорошим прогностичним показником для подальшої роботи з ним. За допомогою функції пошуку PFAM-бази даних з hmmscan веб-сервера Estimation of protein Expression and Solubility (<http://mbs.cbrc.jp/ESPRESSO/Submission.php>) ми спрогнозували консервативні ділянки білка USP1, які становлять близько 65 % та локалізовані в його центральній ділянці в межах домена убіквітин карбоксил-термінальної гідралази. За допомогою функції Disorder (POODLE-L) ми виявили чотири невпорядковані області білка USP1, які в загальному займають близько 55 %, дві з яких локалізовані в центральній частині білка та дві – на його периферії. Невпорядковані ділянки білка є необхідними для розуміння проходження різних біологічних процесів, зокрема таких, як клітинна сигналізація, транскрипція, регуляція, трансляція, протеосомна деграда-

ція білків [16]. Завдяки функції SS (PSIPRED), PHD спрогнозовано вторинну структуру білка USP1, а саме розташування його β -спіралей та α -листів (див. рис. 1). Результати, отримані за допомогою біоінформатичного аналізу, є необхідними для подальшого планування експериментів та інтерпретації отриманих результатів.

Фосфорилування білка USP1

З літературних джерел відомо, що на білкові USP1 знаходиться сайт Серин 313 (S313), фосфорилування якого здатне стимулювати активність деубіквітинуючого білка [17, 18]. За допомогою веб-серверів NetPhos2.0 Server, Disphos та KinasePhos на білкові USP1 нам вдалося передбачити ще ряд сайтів фосфорилування за серином (Ser), треоніном (Thr) і тирозином (Tyr). Серед Ser найбільшу здатність до фосфорилування мають сайти: S16, S253,

Табл. 1. Аналіз сайтів фосфорилування білка USP1

Сайти фосфорилування	Використані веб-сервери		
	NetPhos2.0 Server	Disphos	KinasePhos
Серин (Ser)	47	32	22
Треонін (Thr)	13	14	12
Тирозин (Tyr)	8	1	4

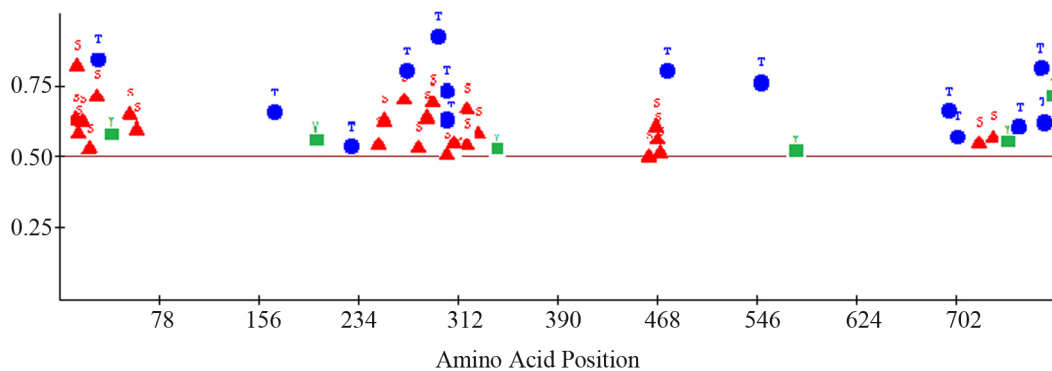


Рис. 2. Зведені результати розташування сайтів фосфорилування на білкові USP1 за даними NetPhos2.0 Server, Disphos та KinasePhos веб-сервера: Δ – сайти фосфорилування за серином (Ser); \circ – сайти фосфорилування за треоніном (Thr); \square – сайти фосфорилування за тирозином (Tyr)

S257, S273, S331, S471, S472 (див. табл. 1). Серед сайтів Thr слід відмітити: T33, T300, T307, T480, T774 сайти. Для Tyr — Y52, Y778 сайти. Таким чином, ми припускаємо, що фосфорилування білка USP1 може відбуватися за трьома видами сайтів: серином, сайти якого є найчисленнішими (22–47), також за сайтами треоніну (12–14) та тирозину (1–8) (рис. 2). Це підтверджує можливість фосфорилування білка USP1 онкобілком Vcr-Abl і як наслідок порушення білок-білкових взаємодій у клітині за рахунок зміни активності білка USP1.

Створення генетичних конструкцій рUC18-USP1, рCMV-HA-USP1 та рECFP-C3-USP1

За допомогою програми PerlPrimer ми підібрали праймери USP1 fwd (AATTGCC TGGTGTACATACCTAGTG) та USP1 rev (GAG AGACCAATAATATCCAGTAGC), які дозво-

ляють ампліфікувати повномірну послідовність гена USP1. Генетичні конструкції змоделивали з використанням програми Serial Cloner 2.6.1. За результатами ПЛР ми отримали послідовність гена USP1 з очікуваними для нього розмірами – 2343 п.н. (рис. 3). Нам вдалося створити рекомбінантну конструкцію рUC18-USP1, що містила послідовність гена USP1, на базі вектора рUC18. Ми провели субклонування послідовності гена USP1 і створили генетичні конструкції для еукаріотичної експресії білка – рCMV-HA-USP1 і рECFP-C3-USP1. Підтвердженням успішного клонування стали результати ПЛР та рестрикції. Відсутність мутацій та правильність рамки зчитування підтверджено сиквенуванням.

Завдяки наявності флуоресцентної мітки ECFP у векторі рECFP-C3, плазміда рECFP-C3-USP1 дає можливість ідентифі-

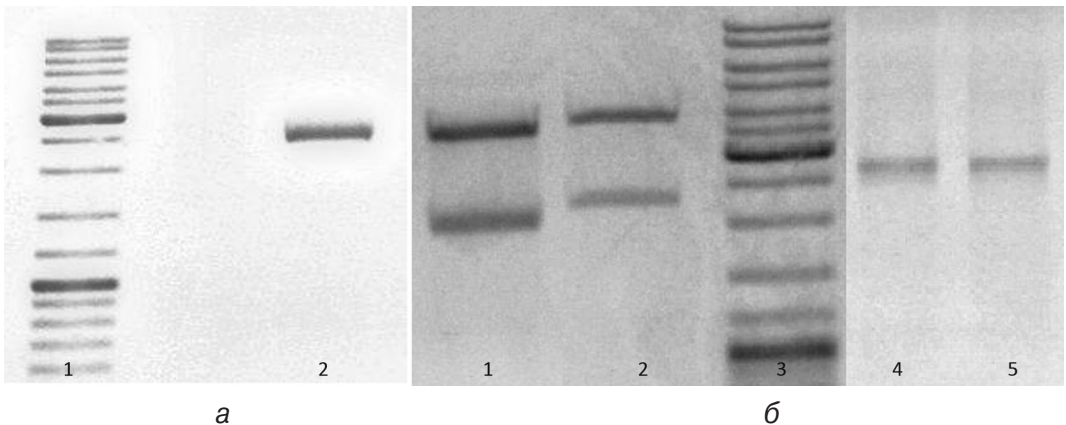


Рис. 3. а – ампліфікати цільових послідовностей, результати ПЛР: 1 – маркер молекулярної маси Gene Ruler; 2 – послідовність гена USP1 (2343 п.н.); б – рестрикційний аналіз отриманих генетичних конструкцій та результати ПЛР: 1 – рCMV-HA-USP1 (EcorI); 2 – рECFP-C3-USP1 (EcorI); 3 – маркер молекулярної маси Gene Ruler; 4 – послідовність гена USP1, як матриця для ПЛР використана генетична конструкція рCMV-HA-USP1; 5 – послідовність гена USP1, як матриця для ПЛР використана генетична конструкція рECFP-C3-USP1

кувати локалізацію білка USP1 в клітині. Літературні дані з цього приводу неоднозначні, а інколи і протилежні. Крім того, особливо цікавими є дані про місце локалізації білка USP1 в клітинах з генетичними порушеннями, зокрема такими, як ХМЛ.

Генетична конструкція рCMV-HA-USP1 є базою для перевірки білок-білкової взаємодії USP1 та Bcr-Abl, а також може стати ключовою у перевірці деубіквітинування Bcr-Abl. Важливість таких досліджень полягає в тому, що підтвердження факту взаємодії PH-домени гібридного білка Bcr-Abl із білком USP1 відкриє нові можливості в діагностиці та лікуванні пухлинних захворювань, зокрема хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) та гострої лімфобластичної лейкемії (ГЛЛ).

Висновки

Шляхом біоінформатичного аналізу (веб-сервер Estimation of protein Expression and Solubility) передбачено загальний відсоток розчинності білка USP1, який складає близько 68 %, що є хорошим прогностичним результатом для роботи з ним. Спрогнозували консервативні та невпо-

рядковані ділянки білка USP1, його вторинну структуру. Передбачили сайти фосфорилування серину, треоніну та тирозину на білкові USP1, що свідчить про можливість зміни активності деубіквітинуючого білка шляхом його фосфорилування онкобілком Bcr-Abl. Отримали плазмідну рECFP-C3-USP1, яка завдяки вбудованій у вектор флуоресцентній мітці ECFP дає можливість визначити локалізацію білка USP1 в еукаріотичній клітині. Створили генетичну конструкцію рCMV-HA-USP1 для еукаріотичної експресії білка USP1, що є необхідним для встановлення білок-білкових взаємодій USP1 та Bcr-Abl, перевірки деубіквітинування онкобілка Bcr-Abl.

Перелік літератури

1. *Fausel C.* Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure // *Manag. Care Pharm.* – 2007. – Vol. 13, № 8, Suppl A. – P. 8–12.
2. *Telegeev G., Dybkov M., Dubrovskaya A., Miroshnichenko D., Tyutyunnykova A., Maliuta S.* Development of molecular oncology in Ukraine // *Biopolym. Cell.* – 2013. – Vol. 29, № 4. – P. 277–282.
3. *Zhao X., Ghaffari S., Lodish H., Malashkevich M., Kim P.* Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligo-

- merization domain // Nature Structural Biology. – 2002. – Vol. 9, № 117. – P. 120–127.
4. Järås M., Johnels P., Agerstam H., Lassen C., Rissler M., Edén P. Expression of P190 and P210 BCR/ABL1 in normal human CD34(+) cells induces similar gene expression profiles and results in a STAT5-dependent expansion of the erythroid lineage // Experimental hematology. – 2009. – Vol. 37, № 3. – P. 367–375.
 5. Miroshnychenko D., Dubrovska A., Maliuta S., Telegeev 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. – Vol. 316, № 4. – P. 530–542.
 6. Nijman S., Huang T., Dirac A., Brummelkamp T., Kerkhoven R., D'Andrea A., Bernards R. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway // Mol. Cell. – 2007. – Vol. 17. – P. 331–339.
 7. Reyes-Turcu F., Ventii K., Wilkinson K. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes // Annu. Rev. Biochem. – 2009. – Vol. 78. – P. 363–397.
 8. Nijman S., Luna-Vargas M., Velds A., Brummelkamp T., Dirac A., Sixma T., Bernards R. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes // Cell. – 2005. – Vol. 123. – P. 773–786.
 9. Cotto-Rios X., Jones M., Busino L., Pagano M., Huang T. APC/CCdh1-dependent proteolysis of USP1 regulates the response to UV-mediated DNA damage // Cell Biol. – 2011. – Vol. 25, № 194 (2). – P. 177–186.
 10. Williams S., Maecker H., French D., Liu J., Gregg A., Silverstein L., Cao T., Carano R., Dixit V. USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma // Cell. – 2011. – Vol. 16, № 146 (6). – P. 918–930.
 11. Jadhav T., Wooten M. Defining an embedded code for protein ubiquitination // Proteomics Bioinform. – 2009. – Vol. 2. – P. 316–333.
 12. Petrucelli L., Dickson D., Kehoe K., Taylor J., Snyder H. CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation // Hum. Mol. Genet. – 2004. – Vol. 13. – P. 703–714.
 13. Hanshi S., Vaibhav K., Luke F., Dexing F., Bornmann W., Geoffrey B., Talpaz M., Donato N. Bcr-Abl ubiquitination and Usp9x inhibition block kinase signaling and promote CML cell apoptosis // Blood. – 2011. – Vol. 117, № 11. – P. 3151–3162.
 14. Hunter T. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond // Mol. Cell. – 2007. – Vol. 28. – P. 730–738.
 15. Colicelli J. ABL tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity // Sci. Signal. – 2010. – Vol. 14; № 3. – P. 139–141.
 16. Hirose S., Shimizu K., Kanai S., Kuroda Y., Noguchi T. POODLE-L: a two-level SVM prediction system for reliably predicting long disordered regions // Bioinformatics. – 2007. – Vol. 15, № 23 (16). – P. 2046–2053.
 17. Cotto-Rios X., Jones M., Huang T. Insights into phosphorylation-dependent mechanisms regulating USP1 protein stability during the cell cycle // Cell. – 2011. – Vol. 10. – P. 4009–4016.
 18. Villamil M., Liang Q., Chen J., Choi Y., Hou S., Lee S., Zhuang Z. Serine phosphorylation is critical for the activation of ubiquitin-specific protease 1 and its interaction with WD40-repeat protein UAF1 // Biochemistry. – 2012. – Vol. 51, № 45. – P. 9112–9123.

Представлено О.І. Корнелюком
Надійшла 14.11.2014

УБИКВИТИН СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОТЕАЗА 1 (USP1) – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ПАРТНЕР ВСР-АВЛ ОНКОБЕЛКА: БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

С.В. Антоненко, И.В. Кравчук, Д.С. Гурьянов, Г.Д. Телегеев

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150

e-mail: s.antonenko999@yandex.ua

Цель. Результатом реципрокной транслокации между 9 и 22 хромосомами является гибридный онкобелок Bcr-Abl, который вызывает развитие хронической миелоидной лейкемии (ХМЛ). По результатам масс-спектрометрического анализа белок USP1 был определен как потенциальный кандидат на взаимодействие с онкобелком Bcr-Abl. Целью данной работы был биоинформатический анализ белка USP1, как потенциального партнера белка Bcr-Abl, и создание генетических конструкций, которые необходимы для определения локализации белка USP1, проверки белок-белковых взаимодействий белка USP1 и Bcr-Abl и деубиквитинирования онкобелка Bcr-Abl. **Методы.** Биоинформатический анализ с помощью веб-серверов Estimation of protein Expression and Solubility, NetPhos2.0 Server, Disphos and KinasePhos, ПЦР, лигирование, рестрикция, методы выделения и очистки ДНК. **Результаты.** Спрогно-

зировали общий процент растворимости белка USP1, который составляет около 68 %, консервативные и неупорядоченные области белка USP1, вторичную структуру. Предусмотрели Ser, Thr, Tyr сайты фосфорелирования белка USP1. Получили генетические конструкции pUC18-USP1, pEGFP-C3-USP1, pCMV-HA-USP1. **Выводы.** Растворимость белка в 68 % является хорошим прогностическим результатом для работы с ним. Наличие сайтов фосфорелирования (Ser, Thr, Tyr) подтверждает возможность изменения активности белка USP1 за счет онкобелка Bcr-Abl. Генетическая конструкция pEGFP-C3-USP1 дает возможность определить локализацию белка USP1 в эукариотической клетке. Вектор pCMV-HA-USP1 является базой для установления белок-белковых взаимодействий USP1 и Bcr-Abl, проверки деубиквитинирования онкобелка Bcr-Abl.

Ключевые слова: хроническая миелоидная лейкемия (ХМЛ), филадельфийская хромосома, белок Bcr-Abl, белок USP1, деубиквитинирование, фосфорелирование.

UBIQUITIN SPECIFIC PROTEASES 1 (USP1) – POTENTIAL PARTNER OF BCR-ABL ONCOPROTEIN: BIOINFORMATIC ANALYSIS AND RECOMBINANT CONSTRUCTS CREATION

S.V. Antonenko, I.V. Kravchuk, D.S. Gurianov, G.D. Telegeev

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150
e-mail: s.antonenko999@yandex.ua

Aims. The result of translocation between chromosomes 9 and 22 is Bcr-Ab oncoprotein

which causes the development of chronic myeloid leukemia (CML). According to preliminary research with the use of mass-spectrometry USP1 protein was identified as potential candidate for interaction with Bcr-Abl oncoprotein. The aim of this work is bioinformatic analysis of USP1 protein as a potential partner of Bcr-Abl; development of plasmid constructs for studying of protein-protein interactions between USP1 and Bcr-Abl proteins, Bcr-Abl deubiquitination and USP1 localization. **Methods.** Bioinformatic analysis (using programs Estimation of protein Expression and Solubility, NetPhos2.0 Server, Disphos and KinasePhos), PCR, ligation, restriction, isolation and purification of DNA. **Results.** The total percentage of protein solubility of USP1 was determined that consisted about 68%. Conserved and disordered region were identified, secondary structure of protein was predicted. We found that phosphorylation of USP1 protein may occur at Ser, Thr, Tyr residues. We got the genetic structures pUC18-USP, pEGFP-C3-USP1 and pCMV-HA-USP1. **Conclusions.** The 68 % solubility of the protein is a good prediction of outcome for further experiments. Availability of phosphorylation sites (Ser, Thr, Tyr) may confirm the hypothesis of activation of USP1 by Bcr-Abl. pEGFP-C3-USP1 construct will be used for detection of USP1 in mammalian cells. Moreover, pCMV-HA-USP1 construct was developed for detection of protein-protein interactions between USP1 and Bcr-Abl and for estimation of deubiquitination state of Bcr-Abl oncoprotein.

Keywords: chronic myeloid leukemia (CML), Bcr-Abl protein, USP1 protein, deubiquitination phosphorylation.