

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

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

✉ antonenkoimb@gmail.com

АНАЛІЗ КЛІТИННОЇ ЛОКАЛІЗАЦІЇ PH ДОМЕНА Vcr-ABL З БІЛКОМ USP1 ТА РОЗРОБКА ПРОГРАМИ ДЛЯ ОЦІНКИ ЇХ САЙТІВ ФОСФОРИЛЮВАННЯ

Мета. Ця робота присвячена вивченню клітинної локалізації PH домена Vcr-Abl разом із білком USP1 та створенню зручного програмного інструмента для агрегації даних щодо сайтів фосфорилювання білків. **Методи.** Трансфекція клітин ссавців. Підбір праймерів для ПЛР. Флуорисцентна мікроскопія у широкому полі та STED мікроскопія. Базові підходи у створенні програм на Python. **Результати.** Виявлена колокалізація між USP1 та PH доменом білка Vcr-Abl. Підібрані праймери до основних доменів білка USP1. Було створено програмний інструмент phospho-aggregate. Отримано зображення внутрішньоклітинної локалізації PH домена Vcr надвисокої роздільної здатності. **Висновки.** Ядерна локалізація USP1 в клітинах 293T, а також точкові колокалізації USP1 з PH доменом онкобілка Vcr-Abl вказують на сильну асоціацію досліджуваних білків зі специфічними клітинними структурами. Ідентифікація цих клітинних структур може допомогти виявити біологічні функції USP1 за хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ). Програма phospho-aggregate може бути використана для спрощення аналізу та порівняння сайтів фосфорилювання білків. Субдифракційні зображення внутрішньоклітинного розподілу PH домена Vcr показують, що він кластеризується в структурах, які нагадують клатринові везикули.

Ключові слова: Vcr-Abl, USP1, PH домен, кортактин, клітинна локалізація, сайти фосфорилювання.

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) – це мієлопроліферативне захворювання, яке характеризується появою філадельфійської хромосоми (Ph) у канцерних клітинах. Філадельфійська хромосома є результатом транслокації між 9 та 22 хромосомами t(9;22)(q34;q11), що викликає появу гібридного онкобілка Vcr-Abl з тирозинкіназою активністю, який трапляється у трьох

формах – p190, p210 і p230, асоційованих з гострою лімфобластичною лейкемією, хронічною мієлоїдною лейкемією і відносно доброякісною нейрофільною формою мієлоїдної лейкемії відповідно [1–3]. Інгібітори тирозин кінази, які використовуються для лікування хворих на ХМЛ, не завжди дають бажаний результат через появу резистентності у пацієнтів за рахунок точкових мутацій в домені тирозин кінази, тому необхідним є пошук нових механізмів та підходів у боротьбі із ХМЛ. Перспективним є вивчення функціональних особливостей Vcr частини онкобілка, яка на сьогодні залишалася поза увагою. У результаті мас-спектрометричного аналізу було виявлено потенційні білки партнери на взаємодію із PH доменом Vcr частини онкобілка Vcr-Abl, а саме убіквітин специфічна протеаза 1 (USP1) та кортактин [1].

Убіквітин специфічна протеаза (USP1), білок цистеїнової групи протеаз (CA клану, родини С19) [6, 7] кодується 785 амінокислотами, з передбаченою молекулярною масою 88,2 КДа. Ген USP1 локалізований у 1p31.3. Білок USP1 виконує функцію деубіквітинування, тобто руйнування ізоптеридних зв'язків між убіквітином та протеїном, таким чином запобігаючи протеосомній деградації білків [4–6]. Із літературних джерел відомо, що Vcr частина гібридного білка Vcr-Abl містить NH2 сайт убіквітинування. Ми припускаємо, що білок USP1 може деубіквітувати онкобілок, що призводить до його накопичення в клітині та прогресування захворювання.

Білок кортактин кодується геном CTTN, що знаходиться на довгому плечі 11 хромосоми, 34 смуз за G-фарбуванням. Він колокалізується з кортикальним актином, звідки отримав свою назву (кортикальний актин). Кортактин має в своєму складі декілька функціональних доменів: кислий домен, ділянку прямих повторів, домен спіралі, пролін-багату ділянку та SH3 до-

мен. Кислий домен має довжину 21–22 амінокислоти, які зв'язуються з комплексом Arg2/3 через триптофанвмісний мотив. Вищезазваний комплекс необхідний для галуження кортикальних актинових філаментів, що забезпечує адекватні структурні зміни елементів мембрани та цитоскелету. Білок кортактин здійснює динамічну перебудову актинових і тубулінових волокон на стадії формування везикули під час клатрин-опосередкованого ендоцитозу [7, 8]. Раніше було виявлено, що домен РН білка динамін також залучений в ендоцитоз [9], тому важливо виявити, чи відіграє аналогічну роль домен РН білка Vcr.

На сьогодні існує ряд баз даних, що містять інформацію про підтвержені експериментально сайти фосфорилування для різних білків [10–13]. Крім того, існують сервіси та програми, які за допомогою різних підходів та алгоритмів здійснюють передбачення можливих сайтів фосфорилування для конкретних амінокислотних послідовностей, а також кінази, які можуть бути до цього фосфорилування залучені [14, 15]. Весь цей великий спектр інструментів дозволяє провести досить продуктивний попередній аналіз білків, які вивчаються, щоб раціонально продумати майбутні експерименти, пов'язані з фосфорилуванням білків. Проте всі ці ресурси мають свої особливості роботи; часто у випадку необхідності проаналізувати кілька білків одразу необхідно вручну проводити кожен аналіз окремо, отримані з різних ресурсів результати важко зіставити та порівняти. Для полегшення завдань аналізу одного або навіть списку білків щодо наявності відомих та можливих сайтів фосфорилування було вирішено створити програмний інструмент, який би дозволяв напівавтоматично агрегувати та порівнювати дані з різних баз даних, а також різних програм для передбачення.

Матеріали і методи

Клітини 293Т вирощували в 6-лунковому культуральному планшеті до 90 % конфлюєнції в середовищі DMEM за температури +37°C та 5 % CO₂. Для визначення локалізації та колокалізації білків USP1 та РН домену ми трансфікували 3 мкг рЕСFP-C3-USP1 та 3 мкг pmCitrineC1-РН у 293Т клітини. Як контроль використали вектори рЕСFP-C3 та pmCitrineC1. Для визначення локалізації домену РН на субдифракційному рівні ми трансфікувати 2 мкг rGFP-C3-РН у 293Т клітини. ДНК розбавляли у

200 мкл DMEM, додавали PEI (у співвідношенні 3 мкл. PEI до 1 мкг. ДНК), ретельно вортексували та залишали на 20 хв. за кімнатної температури. Трансфекційну суміш додавали до клітин у середовищі DMEM та вирощували протягом 24 годин за температури +37°C та 5 % CO₂.

Перед фіксацією середовище DMEM видаляли та двічі промивали клітини нагрітим до +37°C розчином PBS (140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄), фіксацію здійснювали протягом 20 хвилин у 4 % розчин параформальдегіду в PBS за кімнатної температури. Після фіксації клітини тричі промивали в PBS та інкубували протягом 30 хв. у розчині для усунення автофлюоресценції (10 мМ сульфату міді у 50 мМ ацетату амонію, рН 5,0) та поміщали в середовищі Mowiol (Sigma), 2,5 % DABCO (Sigma). Мікроскопічні дослідження проводилися за допомогою світло мікроскопа Leica DM1000 (Німеччина) та мікроскопа Zeiss LSM 510 (Німеччина). Зображення внутрішньої локалізації домену РН білка Vcr виявлено за допомогою STED мікроскопії на мікроскопі Leica TCS SP8 STED у EMBL центрі, м. Гайдельберг, Німеччина. Аналіз результатів здійснювався за допомогою програми ImageJ.

Серед баз даних, що надають інформацію про експериментально підтвержені сайти фосфорилування білків, було вирішено використовувати найбільш відомі: 1) PhosphoSitePlus® (<https://www.phosphosite.org>) [10]; 2) Phospho.ELM (<http://phospho.elm.eu.org>) [11]; 3) PHOSIDA (<http://141.61.102.18/phosida/index.aspx>) [12, 13].

Для передбачення сайтів фосфорилування для початкового етапу було обрано такі сервіси:

- 1) NetPhorest 2.1 (<http://netphorest.info>) [14];
- 2) GPS 3.0 (<http://gps.biocuckoo.org>) [15].

Всі ці ресурси мають веб-сайти, проте не мають спеціальних програмних інтерфейсів (API), що дозволяли б зручно програмно збирати інформацію, що надається цими сайтами. Тому для збору даних у більшості випадків використовувався підхід так званого «веб-скрепінгу» з використанням Selenium, що означає програмну емуляцію відвідування сайту користувачем та імітацію здійснення необхідних маніпуляцій (внесення за необхідності ідентифікаційного номера білка або його назви, натискання відповідних кнопок, виставлення параметрів тощо).

Робочий прототип програми, що збирає дані з вище згаданих ресурсів, був реалізований із застосуванням мов програмування bash та python і отримав назву phospho-aggregate. Вихідний код доступний на <https://github.com/ikravchuk/phospho-aggregate>.

Результати та обговорення

Відомо, що основним місцем локалізації білка USP1 є ядро; ці дані були підтверджені і в наших дослідженнях (рис. 1), проте наявність сигнальних послідовностей NES говорить про можливість експорту білка в цитоплазму клітини. За допомогою котрансфекції рЕСFPC3-

USP1 та pmCitrineC1-PH у 293Т клітин, ми зафіксували точкові перекриття сигналів ECFP та mCitrine (рис. 2), що свідчить про колокалізацію білків USP1 та PH у клітинах. На відміну від попередніх досліджень [16], де ми фіксували ядерну колокалізацію білків із рівномірним розподілом усім нуклеусом (окрім ядерець), ми виявили точкові перекриття з чітко окресленими межами. Схоже, що такий просторовий розподіл білків USP1 та PH не є випадковим і пов'язаний із локалізацією у компартментах клітини, більш детально ми плануємо вивчити це питання у наступних дослідженнях.

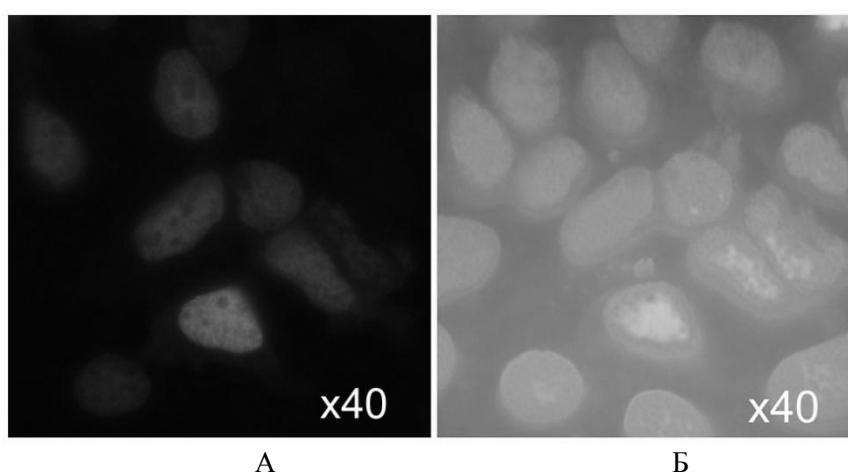


Рис. 1. Експресія рЕСFPC3-USP1 в клітинах 293Т: А – рЕСFPC3-USP1, флуорисценція ECFP (x40); Б – зафарбовування DAPI (x40).

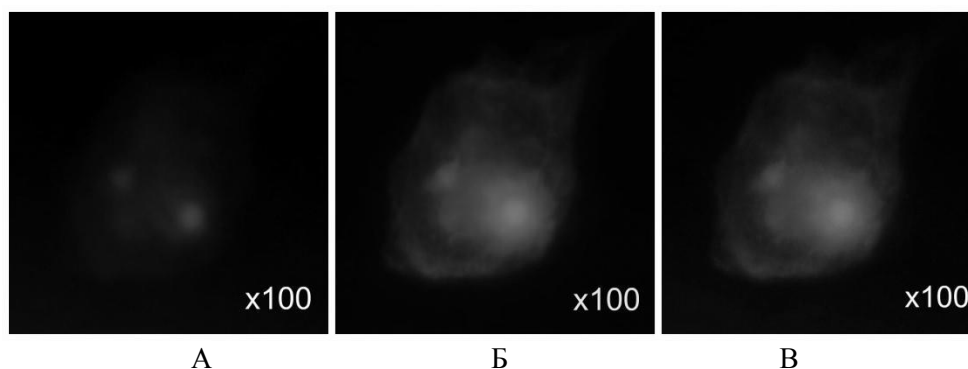


Рис. 2. Коекспресія рЕСFPC3-USP1 і pmCitrineC1-PH у клітинах 293Т: А – рЕСFPC3-USP1, флуорисценція ECFP (x100) (зелене), Б – pmCitrineC1-PH, флуорисценція mCitrine (x100) (червоне); В – співставлені сигнали локалізації рЕСFPC3-USP1 і pmCitrineC1-PH, (x100) (жовте).

Із метою з'ясування, який саме домен білка USP1 є ключовим у його колокалізації із PH доменом онкобілка Bcr-Abl, за допомогою додатка PrimerQuest Tool на веб-ресурсі <https://www.idtdna.com> ми підібрали праймери до послідовностей, які кодують два основні домени

білка USP1: Пептидаза C19(cd02553), (82 → 222 амін.): USP1(cd02553) (F)GACGAGCTGTACAAGTACTCAG, USP1(cd02553) (R):GCTCTAGATGACTGGTGTTCCTTGGATAAT, Пептидаза C19O: (cd02671), (424 → 599 амін.). USP1(cd02671) (F):GAGTCGACCGAAGTTAA-

ACCCATAAACAAAGGTG
 USP1(cd02671) (R):TCAGTTATCTAGATCCGG-
 TGGA.

Ампліфіковані фрагменти будуть використані для створення генетичних конструкцій рЕСФРС3-USP1(cd02553), рЕСФРС3-USP1(cd02671), за допомогою яких ми зможемо перевірити колокалізацію PH домену із різними доменами білка USP1.

Після трансфекції клітин 293Т генетичними конструкціями, що кодують домен PH Vcr частини онкобілка, кортактин та клатрин, за допомогою флуоресцентної мікроскопії було виявлено, що ці білки колокалізуються навколо ядра, що може свідчити про їх участь в утворенні комплексів, необхідних для клатринопосередкованого ендоцитозу. Використовуючи мікроскопію надвисокої роздільної здатності STED було отримано зображення розподілу домену PH в клітині на субдифракційному рівні. Структури, які формують домен PH, за розміром і формою нагадують клатринові везикули, що може підтвердити гіпотезу про роль домену PH у клатринопосередкованому ендоцитозі (рис. 3). Окрім цього, повнорозмірний білок Vcr колокалізується з клатрином у ділянці біля ядра клітини. Це підтверджує те, що домен PH білка Vcr є важливим елементом для закорювання білка Vcr до клатринових везикул і що повнорозмірний білок Vcr бере участь у клатринопосередкованому ендоцитозі.

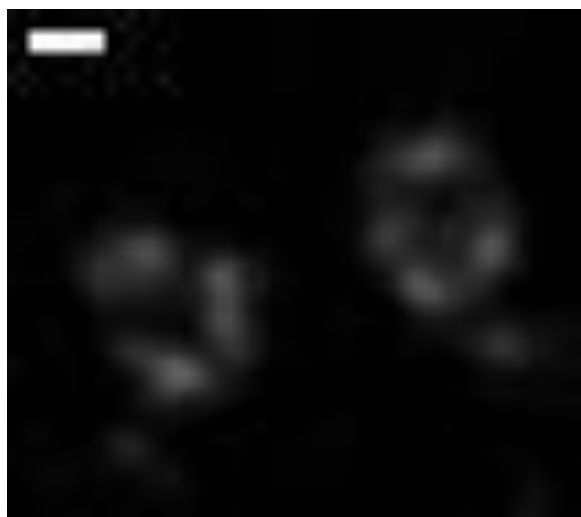


Рис. 3. Внутрішньоклітинна локалізація домену PH білка Vcr, виявлена за допомогою STED мікроскопії. Шкала = 200 нм.

У подальшому планується отримати зображення за допомогою надвисокої роздільної

мікроскопії для визначення локалізації домену PH та клатринових везикул. Окрім цього, ми плануємо перевірити наявність взаємодії між доменом PH Vcr-Abl та кортактином за допомогою FRET, коїмунопреципітації та вестерн-блотінгу, а також визначити, чи колокалізуються повнорозмірні химерні білки з кортактином та клатрином так само, як окремих домен PH білка Vcr.

Загальна схема роботи зводиться до збору інформації (сайти фосфорилування, назви кінази) з усіх вибраних ресурсів для кожного з вказаних у спеціальному файлі білків. Далі з отриманої інформації є можливість виділити, підрахувати та порівняти конкретні відомі або спрогнозовані сайти фосфорилування. Додана можливість для простої візуалізації за допомогою діаграм Венна порівняння результатів із різних ресурсів; скільки всього сайтів отримано; скільки з них співпадають, а скільки представлені лише в одному з ресурсів.

Програму phospho-aggregate протестовано для різних білків. В якості прикладу візуалізації результатів роботи наводимо діаграму Венна для USP1 (рис. 4).

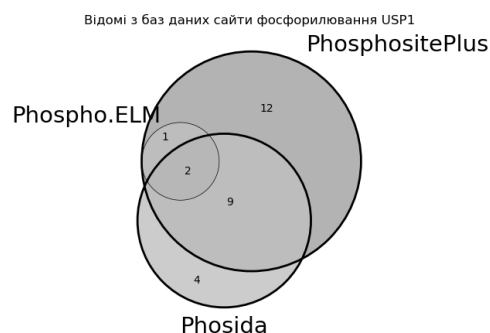


Рис. 4. Порівняння даних щодо сайтів фосфорилування білка USP1, зібраних за допомогою phospho-aggregate з ресурсів PhosphoSitePlus, Phospho.ELM, PHOSIDA.

Висновки

Використовуючи генетичну конструкцію рЕСФРС3-USP1 з флуоресцентною міткою ЕСФР, ми підтвердили ядерну локалізацію білка в клітині, а також зафіксували точкові сигнали колокалізації білка USP1 і PH домену онкобілка Vcr-Abl у клітинах 293Т. Ядерна локалізація USP1 в клітинах 293Т, а також точкові колокалізації USP1 з PH доменом онкобілка Vcr-Abl вказують на потужну асоціацію досліджуваних білків із специфічними клітинними структурами. Ідентифікація цих клітинних структур може

допомогти виявити біологічні функції USP1 за хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ). За допомогою додатка PrimerQuest Tool ми підбрали праймери до послідовностей, які кодують два основні домени білка USP1: пептидаза C19(c102553), пептидаза C19O.

За допомогою мікроскопії надвисокої роздільної здатності отримані зображення розподілу домену PH білка Bcr в клітині. Характер розподілу дозволяє припустити, що домен PH

може зв'язуватися з клатриновими везикулами під час клатрин-опосередкованого ендоцитозу.

Створено програму, яка дозволяє частково спростити збір даних із ряду спеціалізованих ресурсів щодо сайтів фосфорилування білків, які становлять інтерес для дослідника, та кіназ, що можуть фосфорилувати ці білки. Вона потребує вдосконалення в плані реалізації та додавання нових можливостей.

Література

1. 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.
2. Jalkanen S., Lahesmaa-Korpinen A., Heckman C. Phosphoprotein profiling predicts response to tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia patients. *Experimental hematology*. 2012. Vol. 40 (9). P. 705–714. e3.
3. Deininger M.W., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000. Vol. 96. P. 3343–3356.
4. 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. *Molecular Cancer*. 2013. Vol. 12. P. 9. doi: 10.1186/1476-4598-12-913.
5. Fraile J.M., Quesada V., Rodríguez D., Freije J.M., Lopez-Otin C. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene*. 2012. Vol. 31. p. 2373–2388.
6. 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. Vol. 10 (23). P. 4009–4016.
7. Gatesman A.A., Weed S.A. Cortactin Branches Out: Roles in Regulating Protrusive Actin Dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2008. Vol. 65, № 9. P. 687–707.
8. Weed S.A., Parsons J.T. Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly. *Oncogene*. 2001. Vol. 20. P. 6418–6434.
9. Gurianov D.S., Antonenko S.V., Kravchuk I.V., Telegeev G.D. Cellular localization of b-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.
10. Hornbeck P., Zhang B., Murray B., Kornhauser J., Atham V., Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research*. 2015. Vol. 43 (D1). P. D512–D520.
11. Dinkel H., Chica C., Via A., Gould C., Jensen L., Gibson T., Diella F. Phospho.ELM: a database of phosphorylation sites – update 2011. *Nucleic Acids Research*. 2011. Vol. 39 (Database). P. D261–D267.
12. Gnad F., Ren S., Cox J., Olsen J.V., Macek B., Oroschi M., Mann M. PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites. *Genome Biology*. 2007. Vol. 8. P. R250.
13. Gnad F., Gunawardena J., Mann M. PHOSIDA 2011: the posttranslational modification database. *Nucleic Acids Research*. 2011. Vol. 39. P. D253–D260.
14. Horn H., Schoof E.M., Kim J., Robin X., Miller M.L., Diella F., Palma A., Cesareni G., Jensen L.J., Linding R. KinomeXplorer: an integrated platform for kinome biology studies. *Nature Methods*. 2014. Vol. 11 (6). P. 603–604.
15. Xue Y., Ren J., Gao X., Jin C., Wen L., Yao X. GPS 2.0, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy. *Mol Cell Proteomics*. 2008. Vol. 7. P. 1598–1608.
16. Antonenko S.V., Gurianov D.S., Telegeev G.D. Colocalization of USP1 and PH domain of Bcr-Abl oncoprotein in terms of chronic myeloid leukemia cell rearrangements. *Cytology and Genetics*. 2016. Vol. 50, № 4. P. 11–15

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

ANALYSIS OF CELLULAR LOCALIZATION OF PH DOMAIN OF BCR-ABL WITH USP1 PROTEIN AND DEVELOPMENT OF SOFTWARE FOR ESTIMATION OF THEIR PHOSPHORYLATION SITES

Aim. This work was dedicated to investigation of cellular localization PH domain of Bcr-Abl with USP1 protein and to develop useful tool to aggregate information about protein phosphorylation sites. **Methods.** Mammalian cell transfection. Primers design. Widefield and STED fluorescent microscopy. Basic software development in Python. **Results.** Colocalization between USP1 and PH domain of Bcr-Abl has been detected. Primers for main domains of USP1 have been designed. Integration tool phospho-aggregate has been developed. Super-resolution image of intracellular distribution of PH domain of Bcr was obtained. **Conclusions.** Nuclear localization of USP1 in 293T cells and also point colocalizations of USP1 and PH domain of Bcr-Abl oncoprotein show strong association of investigated proteins with

specific cellular structures. Identification of these cellular structures can help to find out biological functions of of USP1 in CML. Tool phospho-aggregate can be used to simplify analysis and comparison of protein phosphorylation sites. Subdiffraction imaging of intracellular distribution of PH domain of Bcr shows that it clusters in structures that resemble shape of clathrin-coated vesicles.

Keywords: Bcr-Abl, USP1, PH domain, cortactin, cellular localization, phosphorylation sites.