

УДК 577.213.32:577.217.5:577.218:577.29:541.515

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА УБИКВИТИНА ЧЕЛОВЕКА, КОНЬЮГИРОВАННОГО С ПЕПТИДОМ АКЦЕПТОРОМ БИОТИНА

Кулыясов А.Т.¹, Жубанова Г.С.¹, Раманкулов Е.М.¹, Огрызько В.В.²

¹ *Национальный центр биотехнологии
Кургальжинское шоссе, 13/5, г. Астана, 010000, Казахстан*

² *Institut Gustave Roussy, CNRSUMR8126
94805, 39 Rue Camilles Desmoulin, Villejuif, France
akulyyasov@gmail.com*

АБСТРАКТ

Разработанный нами метод, названный ProximityUtilizingBiotinylation (PUB) или биотинилирование от сближения (взаимодействия) белков *in vivo*, основан на совместной экспрессии внутри одной клетки рекомбинантных белков – интересующего белка с биотин лигазой BirA и его партнера с пептидом акцептором биотина BAP, что позволяет провести точную количественную оценку степени их взаимодействия.

Целью данной работы является получение плазмидной конструкции, содержащей ген убиквитина человека *UbC*, конъюгированный с пептидом акцептором биотина BAP и его экспрессия в клетках HEK293T.

В экспериментах по экспрессии белков BAP-убиквитин и BirA-HP1 γ (BirA-GFP, контроль) в клетках HEK293T выявлена более высокая специфичность взаимодействия (биотинилирования) в случае белка BirA-HP1 γ в сравнении с контролем BirA-GFP. На примере другой модельной системы обнаружен более высокий уровень белок-белкового взаимодействия BirA-Tip49 с различными убиквитинированными белками в сравнении с BirA-Tap54.

Ключевые слова: белок-белковые взаимодействия, биотинилирование, биотин-лигаза, пептид акцептора биотина, плазмиды, транзientная трансфекция, иммуноблот, убиквитин.

CLONING AND EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEIN OF HUMAN UBIQUITIN, FUSED WITH BIOTIN ACCEPTOR PEPTIDE

Kulyyassov A.T.¹, Zhubanova G.S.¹, Ramanculov E.M.¹, Ogryzko V.V.²

¹ *National Center for Biotechnology
13/5, K orgalzhyn Rd, Astana, 010000, Kazakhstan*

² *Institut Gustave Roussy, CNRS UMR8126
94805, 39 Rue Camilles Desmoulin, Villejuif, France
akulyyasov@gmail.com*

ABSTRACT

The proximity utilizing biotinylation (PUB) method is based on co-expression within a single cell of recombinant proteins. It involves fusion of the protein of interest with biotin ligase BirA and that of its partner with the biotin acceptor peptide (BAP). The method allows an accurate quantitative assessment of the extent of their interaction *in vivo*.

The aim of this study was to construct a new plasmid vector containing human ubiquitin *UbC* fused with a BAP and to evaluate its expression in HEK293T cells.

To test the model system, we evaluated the protein expression of ubiquitin-BAP and BirA-HP1 γ (BirA-GFP, control) in HEK293T cells, and we observed a high specificity interaction (biotinylation) in the case of BirA-HP1 γ versus the control BirA-GFP. In another example of the model system, we observed higher levels of protein-protein interaction of BirA-Tip49 with different ubiquitinated proteins, compared to BirA-Tap54.

Keywords: protein-protein interactions, biotinylation, biotin ligase, biotin acceptor peptide, plasmids, transient transfection, western blot, ubiquitin.

ВВЕДЕНИЕ

Пост-трансляционные модификации (Post-translation modification, PTM) белков убиквитином вовлечены во множество биологических процессов, включая круговорот белков, ДНК-репарацию и репликацию, сигнальные пути, контроль клеточного цикла, эмбриогенез, регуляцию цитоскелета, метаболизм, гомеостаз и РНК-процессинг [1-2].

Присоединение убиквитина к белку является обратимым событием и может осуществляться как в виде мономера, так и в виде различных типов полиубиквитиновых цепей. В результате такой модификации субстратный белок может претерпевать протеолитическую деградацию протеасомами или лизосомами, изменить свою субклеточную локализацию или активность, а также взаимодействие с другими белками [3]. Поскольку убиквитинирование является важным регуляторным механизмом в сигнальных путях внутри клетки, то нарушение процессов, связанных с убиквитинированием, может привести к различным заболеваниям, включая рак [4].

Вследствие огромного значения и разносторонних функций убиквитинирования в процессах передачи сигналов в клетке появилась возможность точного подбора мишеней для новых лекарственных препаратов. Первое в этом ряду – разработанное в США средство «Бортезомиб» является ингибитором протеасомы, компонента убиквитиновой системы, было одобрено FDA в 2003 году [5]. Доходы от продажи этого препарата составляют 1,4 миллиарда долларов США. Сегодня более 30 новых ингибиторов элементов, связанных с убиквитином белками, находятся на различных стадиях клинических испытаний в качестве средств для лечения множественной миеломы, лейкемии, рака печени и легких [4-6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование ДНК. Получение плазмидных конструкций, содержащих ген *UbC*

Для получения гена *UbC* проведен дизайн олигонуклеотидов-праймеров, содержащих сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции *XhoI* и *NotI*, что позволило провести клонирование по этим сайтам в векторную плазмиду pCDNA3.1(+).BAP.

Праймеры (подчеркнуты сайты рестрикции *XhoI* и *NotI*):

Primer 1 *UbC*:

CACACACACTCGAGGGCATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACTGGTAAGACCAT

Primer 2 *UbC* AS:

TGTGTGTGGCCGCCCTACCCACCTCTGAGACGGAGGACCAGGTGCAGGGTGGACTCTT

В качестве матрицы для ПЦР-амплификации гена *UbC* использовали плазмиду pBVH1.UbC. Полученный ампликон гена *UbC* клонировали в вектор pCDNA3.1(+).BAP1070. Условия ПЦР: денатурация 94°C - 15 сек, отжиг 54°C - 30 сек, элонгация 72°C - 1 мин, количество циклов – 20.

Смесь 1. Праймеры (Primer 1 *UbC*, Primer 2 *UbC* AS) – 0,5 мкл, pBVH1.UbC (200 мкг) – 0,5 мкл, H₂O – 18,5 мкл, dNTP (2,5 мМ) – 5,0 мкл. Общий объем – 25,0 мкл.

Смесь 2. Буфер ПЦР с KCl (5x) – 10,0 мкл, MgSO₄ – 10,0 мкл, Pwo ДНК-полимераза (Roche, 11 644 947 001) – 1,0 мкл, H₂O – 4,0 мкл. Общий объем – 25,0 мкл.

Смешали смеси 1 и 2 и загрузили в ПЦР амплификатор. Часть продуктов ПЦР-реакции (10 мкл или 1/5 часть от объема) для визуализации подвергали электрофорезу в 0,8% агарозном геле, затем окрашивали с помощью бромистого этидия. Оставшуюся часть ПЦР-продуктов (40 мкл) поместили в пробирки с фильтрующими элементами из набора для очистки продуктов ПЦР фирмы Millipore (номер по каталогу R36461, Rev.A, 03/05) и добавили 300 мкл воды. Для удаления солей и праймеров откручивали в центрифуге при 1000 g в течение 15 мин. Далее в фильтрующий элемент, содержащий амплифицированную ДНК, добавляли 20 мкл воды, переворачивали, вставляли в новую пробирку из набора и центрифугировали 2 мин при 1000 g.

Векторную ДНК pCDNA3.1(+).BAP.H2Az (1 мкг), а также продукт ПЦР-амплификации гена *UbC* подвергали гидролизу рестриктазами *XhoI* и *NotI* (20 е.а. в 20 мкл реакционной смеси) в соответствующих буферных растворах при 37°C в течение 2 часов. Гидролизат разделяли электрофорезом в 0,8% агарозном геле, затем окрашивали с помощью бромистого этидия [7]. Визуализированные в УФ-свете фрагменты вырезали, помещали кусочки геля в пробирки, из набора для выделения ДНК из агарозного геля фирмы Millipore (номер по каталогу LSKGEL050) и центрифугировали при 5000 g, 10 мин. Лигирование полученных на предыдущей стадии вектора и фрагмента ДНК осуществляли с помощью лигазы фага T4 в течение ночи при 14°C.

После трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма DH5 α , и отбора клонов, несущих рекомбинантные плазмиды со встроенным геном, получали плазмиду pcDNA3.1(+).BAP.UbC. Вектора, не содержащие эндотоксины, нарабатывали с помощью наборов для выделения плазмидной ДНК (Sigma, PLED35-1KT или Qiagen, 12362), согласно протоколам, приведенным в инструкциях или на сайтах компаний-производителей.

Секвенирование ДНК

Первичную структуру ДНК определяли с использованием наборов BigDye v.3.1 (Lifetechnologies, 4337455) на автоматических анализаторах ДНК AB3730xl (AppliedBiosystems) с использованием праймеров pcDNA3.1_FP (5' CTCTGGCTAACTAGAGAAC 3') и primer2EMC (5' AGACGGCAATATGGTGGGA3').

Для проведения реакции использовали 2.5x ReadyReactionpremix (AppliedBiosystems, N4337455), 5xBigDyeSequencingbuffer, FD и RSпраймеры, матрицу и дополнили до 20 мкл водой.

Программа для сиквенс-ПЦР: 1 мин – 96°C, 10 сек – 96°C (денатурация), 5 сек – 50°C (отжиг), 4 мин – 60°C (элонгация), хранение при +10°C. Количество циклов – 25.

Выделение ДНК: Реакционную смесь осадили смесью этанола (90%) и ацетата натрия (3M). Перемешали и открыли при 7000 об., 45 минут при 4°C, удалили супернатант. Промыли 140 мкл 70% этанола, открыли при 7000 об., 15 минут при 4°C, удалили супернатант. Высушили в течение 15 минут (в темноте) при комнатной температуре для удаления этанола и добавили 14 мкл формамида (Hi-Di, AppliedBiosystems, N4311320) в каждую пробирку, выдержали 5-10 минут, денатурировали при 95°C 2-3 минуты. Перенесли на плашку для сиквенса. Провели сиквенс, а полученные хроматограммы анализировали при помощи программы MEGA4.

Транзientная трансфекция клеток HEK293T

Экспрессию рекомбинантных белков из полученных плазмид pcDNA3.1(+).BAP.UbC, pcDNA3.1(+).BirP.NP1 γ и pcDNA3.1(+).BAP.GFP осуществляли в клетках HEK293T (Humanembryonickidneycells) с применением кальций-фосфатного метода [8].

За 1 день до трансфекции посеяли 200000 клеток HEK293T в каждую лунку 6-луночной планшеты в 2 мл среды DMEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 1% смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина. На следующий день за 1 час до трансфекции поменяли среду на свежую 2 мл DMEM. Для проведения трансфекции в расчете на 1 лунку приготовили по две пробирки на 1,5 мл, промаркированные 0A, 0B (1A, 1B или 2A, 2B). В одну пробирку (раствор А) загрузили 220 мкл воды, 31 мкл 2M раствора хлорида кальция и рассчитанное количество плазмидных ДНК. Для трансфекции брали 0,5 мкг плазмид, содержащих последовательность, кодирующую пептид мишень CMV.BAP.UbC и 0,3 мкг плазмид, кодирующих биотин-лигазу, например, CMV.BirA.NP1 γ и CMV.BirA.GFP. Во вторую пробирку (раствор В) загрузили 250 мкл буферного раствора HBS 2x (Состав буферного раствора HBS 2x (200 ml): Hepes 2 г, KCl 0,15 г, Глюкоза 0,4 г, NaCl 3,2 г, Na₂HPO₄ 0,0426 г, pH должно составить 5,9, довели pH до 7,0 добавлением небольшими порциями 1н р-ра NaOH, отфильтровали через стерильный фильтр фирмы Millipore и хранили при 4°C). Затем медленно по каплям добавили раствор А к раствору В, оставили на 15 минут и затем добавили полученную смесь к клеткам HEK293T.

На следующий день поменяли среду на свежую DMEM. Мечение биотином образцов проводили за 30 мин, 1,5 часа, 5 часов и в течение ночи. Для этого поменяли среду на DMEM, приготовленную добавлением 10 мкл раствора биотина (1мг/мл) и 100 мкл 50 мМ HEPES (pH 7,35) к 2 мл среды. После мечения биотином клетки собрали, удалили среду, затем добавили 1 мл раствора PBS, ресуспендировали и перенесли в пробирку на 1,5 мл. Затем пробирки центрифугировали при +4°C, 700rcf, 5 минут, удалили супернатант и добавили к клеткам по 100 мкл раствора буфера CSK, содержащего 0,5% тритона (Состав CSK - 100 мМ NaCl, 300 мМ сахароза, 10 мМ Tris, pH 7,5, 3 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 1,2 мМ PMSF, 10 мМ йодоацетамида, 0,5% TritonX-100), пипетировали несколько раз и центрифугировали при 4000 rpm, 5 минут. Йодоацетамид добавили в буферный раствор для ингибирования ферментов деубиквитиназ [9].

В результате на данном этапе метода были получены ядра клеток HEK293T, которые можно было заморозить до -20°C или сразу добавить 80 мкл буфера CSK без тритона, подвергнуть соникированию (для разрушения геномной ДНК и уменьшения вязкости) и добавить 40 мкл загрузочного буфера 3X (Состав на 10 мл: 2,4мл 1М Tris, pH 6,8, 0,8 г SDS, 4 мл глицерина, 0,01% бромфенолового синего, 1 мл бета-меркаптоэтанола и 2,8 мл воды). Пробирки встряхнули, нагрели при 98°C (5 минут) и открыли на миницентрифуге на максимальной скорости. Анализ лизатов ядер с помощью иммуноблоттинга осуществляли согласно методике из сборника [10].

Подготовка образцов на Вестерн-блот

Для белкового электрофореза использовали готовые кассеты с градиентным полиакриламидным гелем на 10 лунок (Lifetechnologies № NP0321BOX) и на 12 лунок (Lifetechnologies, № NP0322BOX). В качестве загрузочного буфера использовали 4x NUPAGE LDS samplebuffer (Lifetechnologies, №NP0007). Электрофорез проводили с использованием буферного раствора MOPS (Lifetechnologies, №NP0001).

Для обработки мембран после переноса по Вестерну использовали стрептавидин-HRP (Invitrogen, 43-4323) и анти-His-HRP (QiaGen, 34460). Мембраны обрабатывали смесью, состоящей из 500 мкл Luminol/enhancer solution и 500 мкл Stable peroxide buffer (Applichem, A3417,1200). После экспозиции рентгеновской пленки на мембране пленку проявляли на проявочной машине.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для экспериментов по экспрессии и изучения взаимодействий убиквитинированных форм белков *in vivo* мы сконструировали два типа векторов: один для экспрессии BAP-слитых мишеней, а другой для BigA-слитых белков, которые содержат следующие элементы:

- Убиквитин (Ubiquitin) – нуклеотидная последовательность гена *UbC* или любого другого белка, который можно клонировать между сайтами XhoI и NotI с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Рамка считывания (ORF) гена белка регуляторного белка убиквитина человека составляет 240 п.н., а масса белка 8,5 кДа.

- BAP1070 (Biotin Acceptor Peptide) – домен пептида акцептора биотина, который содержит также гептагистидиновый маркер 7His-tag (рисунок 1), для возможности мониторинга или выделения рекомбинантных белков вне зависимости от наличия биотиновой метки [11-22].

- CMV (Cytomegalovirus enhancer-promoter) цитомегаловирусный промотор.

- EMC IRES (Encephalomyocarditis Internal Ribosome Entry Site) – последовательность бицистронного транскрипционного элемента, позволяющего экспрессировать два белка из одного транскрипта.

- IL2R (Interleukin-2 Receptor) – селекционный маркер.

- Amp(R) – селекционный маркер гена устойчивости к ампициллину.

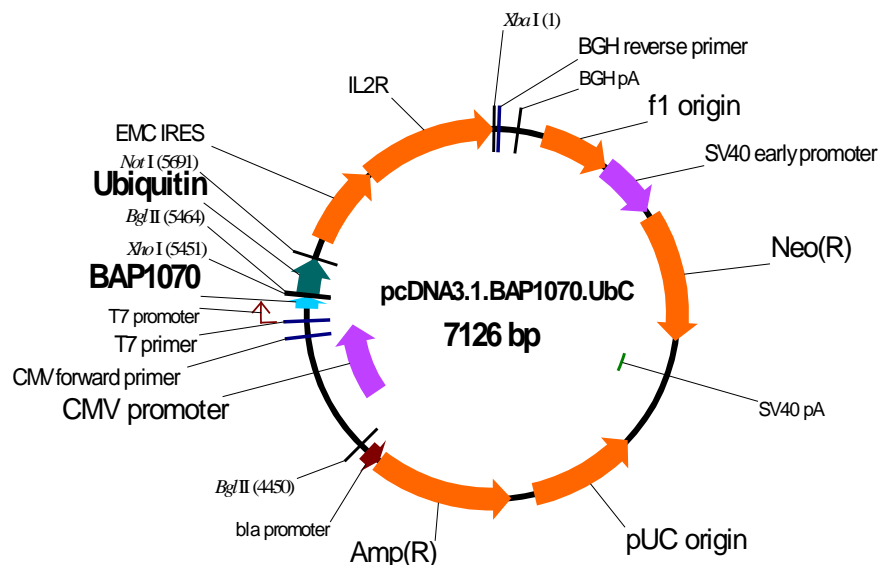
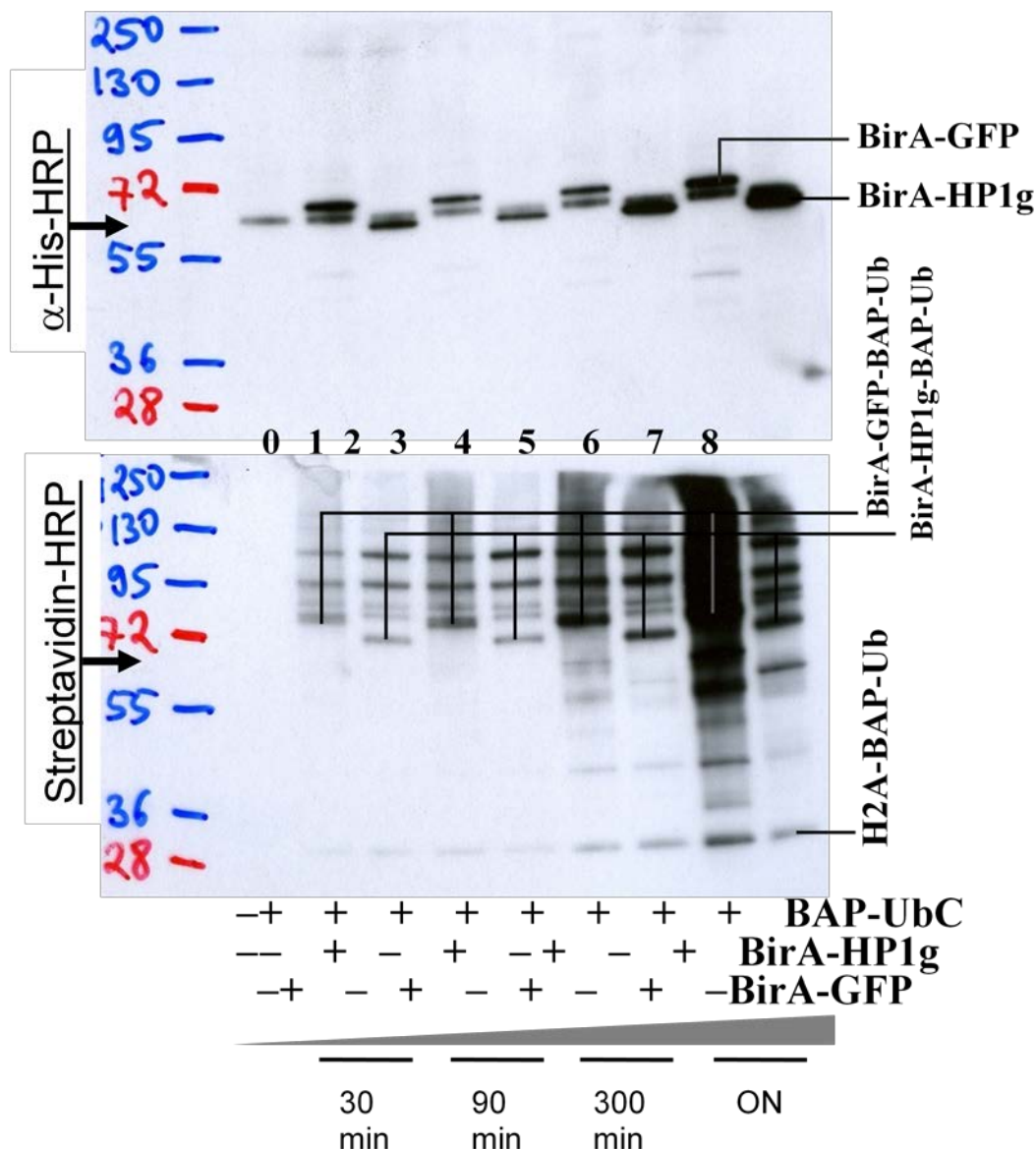


Рис. 1. Дизайн вектора для трансфекции в эукариотических клетках на примере конструкции, содержащей ген *UbC*, слитый с BAP (Конструкция получена на основе стандартной плазмиды pcDNA3.1(+) с CMV промотором)

Fig. 1. Design of vector for transfection in eukaryotic cells on example of vector, containing *UbC* gene, fused with BAP (Construct was obtained on the basis of plasmid pcDNA3.1(+) with CMV promoter)

Для получения плазмид, содержащих *UbC*, и слияния с пептидом акцептором биотина BAP мы спроектировали и заказали соответствующие праймеры, содержащие рестрикционные сайты XhoI с N-конца и NotI с C-конца. Последовательности указанных нуклеотидов выравнивали геном *UbC* с помощью программы MEGA, а отсутствие сайтов XhoI и NotI внутри гена проверяли с помощью программы ChromasPro.

Затем полученные праймеры использовали в ПЦР с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Pwo фирмы Roche для амплифицирования гена *UbC* (рисунок 2а). Амплифицированный фрагмент, а также вектор CMV.BAP обработали рестриктазами XhoI и NotI, прогнали на 0,8% агарозном геле, окрасили



Верхний блот обработан антителами α -His-HRP, нижний антибиотиновый блот обработан конъюгатом стрептавидин-HRP; 0 – контрольный образец, обработанный реагентом для трансфекции (фосфатом кальция) без плазмид. Время мечения биотином от 30 минут до ON (в течение ночи)

Рис. 3. Уровни биотинилирования убиквитинированных белков, взаимодействующих с интересующими нас белками BirA-GFP и BirA-HP1 γ , полученные с помощью иммуноблоттинга

Top blot was treated with α -His-HRP, bottom blot was treated with streptavidin-HRP; 0 – control, calcium phosphate transfection without plasmid. Biotin pulse from 30 min to ON

Fig. 3. Biotinylation levels on Western blot of ubiquitinated proteins, interacting with protein of interest BirA-GFP and BirA-HP1 γ

Использование различных времен мечения биотином позволило выявить неспецифичность биотинилирования в случае BirA-GFP в сравнении с BirA-HP1 γ . Несмотря на меньший уровень экспрессии BirA-GFP чем BirA-HP1 γ , что видно из верхнего блота (дорожки 7 и 8), тем не менее, уровень биотинилирования всех белков BAP-Ubiquitin заметно выше в случае BirA-GFP (дорожка 7 нижний блот) по сравнению с BirA-HP1 γ (дорожка 8 нижний блот). Сравнительный анализ результатов Вестерн-блоттинга образцов позволил также обнаружить присутствие биотинилированных форм убиквитинированных модификации BirA-GFP-BAP-Ub, BirA-HP1 γ -BAP-Ub и гистона H2A-BAP-Ub (указаны линиями на нижнем блоте).

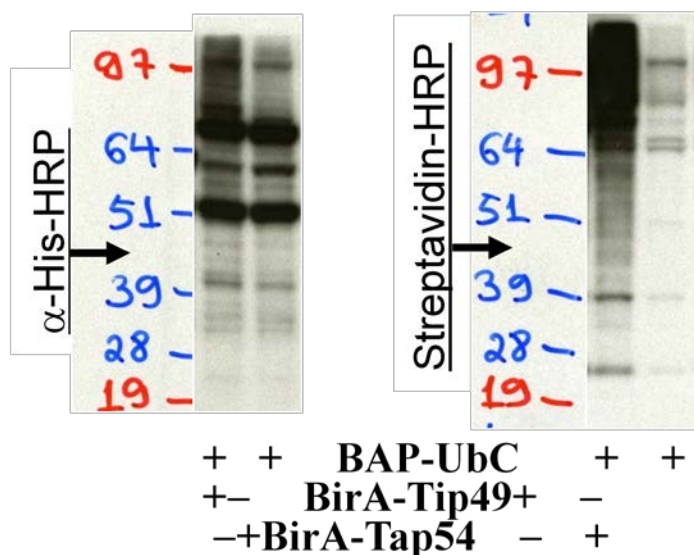
Таким образом, на примере изучения модели белков HP1 γ и GFP взаимодействующих с убиквитинированными формами белков *in vivo* установлена выраженная специфичность BirA.HP1 γ в сравнении с BirA-GFP.

Экспрессия рекомбинантных белков VAP-UbC, BirA-Tip49 и BirA-Tap54 в клетках HEK293T

Экспрессию рекомбинантных белков из полученных плазмид pcDNA3.1(+).VAP.UbC, pcDNA3.1(+).BirA.Tip49 и pcDNA3.1(+).BirA.Tap54 осуществляли в клетках HEK293T (Humanembryonickidneycells) с применением кальций-фосфатного метода [8]. Обработку клеток биотином проводили за 30 минут до сбора клеток.

Белки Tip49 и Tap54 участвуют в ремоделировании хроматина и регуляции транскрипции [23-24], однако в литературе отсутствуют данные, насколько эти белки вовлечены в процессы убиквитинирования *in vivo*.

На рисунке 4 приведены результаты иммуноблоттинга образцов, полученных из ядер клеток HEK293T. В левой части рисунка мембрана показывает уровень экспрессии белков BirA-Tip49 и BirA-Tap54, поскольку мембрана обработана антителами на полигистиридиновый фрагмент, присутствующий также между BirA и рамкой считывания интересующего белка Tip49 и Tap54. В правой части рисунка приведена мембрана, обработанная стрептавидином, конъюгированным пероксидазой HRP. Несмотря на примерно одинаковый уровень экспрессии белков BirA-Tip49 и BirA-Tap54, уровень биотинилирования в первом случае (первая дорожка на правом блоте) выше в сравнении с BirA-Tap54 (вторая дорожка на правом блоте). Это свидетельствует о более высоком уровне белок-белкового взаимодействия BirA-Tip49 с различными убиквитинированными белками в сравнении с BirA-Tap54.



Правый блот обработан антителами α -His-HRP; левый антибиотинный блот обработан конъюгатом стрептавидин-HRP. Время мечения биотином 30 минут

Рис. 4. Уровни биотинилирования убиквитинированных белков, взаимодействующих с интересующими нас белками BirA-Tip49 и BirA-Tap54, полученные с помощью иммуноблоттинга

Blot on the right side was treated with α -His-HRP; blot on the left side was treated with streptavidin-HRP. Biotin pulse – 30 min

Fig. 4. Biotinylation levels on Western blot of ubiquitinated proteins, interacting with protein of interest BirA-Tip49 and BirA-Tap54

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что сконструированная плазмида pcDNA3.1(+).VAP.UbC обеспечивает высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка VAP-Ubiquitin, достаточного для работ, связанных с количественной оценкой его экспрессии в эукариотических клетках и изучения белок-белковых взаимодействий *in vivo*.

ВЫВОДЫ

Таким образом, по результатам проведенных экспериментов получен вектор, содержащий ген убиквитина человека, конъюгированный с пептидом акцептором биотина VAP. На примере изучения модели

белков HP1 γ и GFP, взаимодействующих с убиквитинированными формами белков *in vivo*, установлена выраженная специфичность BirA.HP1 γ в сравнении с BirA-GFP. На модельной системе с участием белков Tip49 и Tap54, участвующих в ремоделировании хроматина и регуляции транскрипции, обнаружен более высокий уровень белок-белкового взаимодействия BirA-Tip49 с различными убиквитинированными белками в сравнении с BirA-Tap54.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта 1804/ГФ4 «Новые подходы для изучения и количественного анализа убиквитинирования *in vivo*, на основе метода биотинилирования от сближения» на 2015-2017 гг. (№ГР0115РК01802).

Благодарность

Авторы выражают признательность сотруднику Национальной научной лаборатории биотехнологии коллективного пользования Шевцову А. за помощь в секвенировании плазмидных конструкций, а также сотрудникам лаборатории органического синтеза Национального центра биотехнологии за синтез олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Grillari J., Grillari-Voglauer R., Jansen-Durr P. Post-translational modification of cellular proteins by ubiquitin and ubiquitin-like molecules: role in cellular senescence and aging // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 694. – P. 172-196.
2. Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins // *Nature.* – 2009. – Vol. 458, №26. – P. 422-429.
3. Welchman R.L., Gordon C. & Mayer R.J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 599-609.
4. Mani A., Gelmann E.P. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer // *Journal of clinical oncology.* – 2005. – Vol. 23, №21. – P. 4776-4789.
5. Cohen Ph., Tcherpakov M. Will the ubiquitin system furnish as many drug targets as protein kinase? // *Cell.* – 2010. – Vol. 143. – P. 686-693.
6. Micel L.N., Tentler P.G., Smith P.G., Eckhardt S.G. Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies // *Journal of clinical oncology.* – 2013. – Vol. 31, №9. – P. 1231-1238.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрун Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
8. Graham F.L., van der Eb A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // *Virology.* – 1973. – Vol. 52, №2. – P. 456-467.
9. Stagg H.R., Thomas M., van den Boomen D., Wiertz E.J.H.J., Drabkin H.A., Gemmill R.M., and Lehner P.J. The TRC8 E3 ligase ubiquitinates MHC class I molecules before dislocation from the ER // *J. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 186, №5. – P. 685-692.
10. Higgins S.J., Hames B.D. Protein Expression. A practical approach. – Oxford University Press, 1999. – 282 p.
11. Kulyyassov A., Shoaib M., Ogryzko V. Use of *in vivo* biotinylation for chromatin immunoprecipitation // *Curr. Protoc. Cell Biol.* – 2011. – Chapter 17, Unit 17.12. – P. 17.12.1-17.12.22.
12. Kulyyassov A., Shoaib M., Pichugin A., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. PUB-MS: a mass spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity *in vivo* // *J. Proteome Res.* – 2011. – Vol. 10, №10. – P. 4416-4427.
13. Shoaib M., Kulyyassov A., Robin C., Winczura K., Tarlykov P., Despas E., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. PUB-NChIP – “*in vivo* biotinylation” approach to study chromatin in proximity to a protein of interest // *Genome Research.* – 2013. – Vol. 23, №2. – P. 331-340.
14. Кульясов А.Т., Жубанова Г.С., Раманкулов Е.М., Огрызко В.В. Метод количественной оценки взаимодействий гетерохроматинового белка HP1 *in vivo* // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2014. – №1. – С. 17-27.
15. Кульясов А.Т., Жубанова Г.С., Раманкулов Е.М., Огрызко В.В. Количественная оценка взаимодействий транскрипционного фактора Kap1 и гетерохроматинового белка HP1 *in vivo* // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2014. – №3. – С. 12-21.
16. Пат. Республики Казахстан на изобретение. 2013/1352.1. Рекombинантная плазмидарс DNA3.1(+)-ВАР-HP1a, кодирующая гетеро-хроматиновый белок человека HP1a и обеспечивающая его экспрессию в клетках HEK293T / Кульясов А.Т., Огрызко В.В. – №30034; заявл. 16.10.2013. – Булл. №6. – 6 с.

17. Пат. Республики Казахстан на изобретение, 2013/1377.1. Рекомбинантная плазмидарсDNA3.1(+)-ВАР-КАР1, кодирующая белок транскрипционного кофактора человека КАР1 и обеспечивающая его экспрессию в клетках НЕК293Т /Кульясов А.Т., Огрызко В.В.– №30035; заявл.17.10.2013.– Бюлл. №6. – бс.

18. Kulyyassov A.T., Robin C., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. Exploring neighborhoods of ubiquitinated proteins with Proximity-Utilizing Biotinylation // Proceedings of 5th International Conference on Proteomics & Bioinformatics, September 01-03, 2015.– Valencia, Spain, 2015. – P.49.

19. Kulyyassov A.T., Shoaib M., Robin C., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. Application of Proximity Utilizing Biotinylation method for identification of posttranslational modification and ubiquitination in UV-induced DNA repair // Proceedings of 5th International Conference on Proteomics & Bioinformatics, September 01-03, 2015.– Valencia, Spain, 2015. – P.98.

20. Kulyyassov A.T., Zhubanova G.S., Ogryzko V.V. Study of the compartmentalization of cell using proximity utilizing enzymatic ligation // Proceedings of 5th International Conference on Proteomics & Bioinformatics, September 01-03, 2015. – Valencia, Spain, 2015. – P.100.

21. Kulyyassov A.T., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. *In vivo* biotinylation based method for study protein-protein proximity in eucaryote cells // Central Asian Journal of Global Health. – 2013. – Vol. 2, Suppl. ISSN 2166-7403.

22. Kulyyassov A.T., Zhubanova G.S., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. Proximity utilizing biotinylation of nuclear proteins *in vivo* // Central Asian Journal of Global Health. – 2014. – Vol. 3, Suppl. ISSN 2166-7403.

23. Frisch S.M. and Mymryk J.S. Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2002. – Vol. 3. – P.441-452.

24. Adhikary S. and Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2005. – Vol. 6. – P.635-645.

REFERENCES

1. Grillari J., Grillari-Voglauer R., Jansen-Durr P. Post-translational modification of cellular proteins by ubiquitin and ubiquitin-like molecules: role in cellular senescence and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010, vol.694, pp.172-196. PMID: 20886764.

2. Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 2009, vol.458, no. 26, pp.422-429. doi: 10.1038/nature07958. PMID: 19325621.

3. Welchman R.L., Gordon C. & Mayer R.J. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, vol.6, pp.599-609. doi:10.1038/nrm1700. PMID: 16064136.

4. Mani A., Gelmann E.P. The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *Journal of clinical oncology*, 2005, vol.23, no.21, pp. 4776-4789. doi: 10.1200/JCO.2005.05.081. PMID: 16034054

5. Cohen Ph., Tcherpakov M. Will the ubiquitin system furnish as many drug targets as protein kinase? *Cell*, 2010, vol. 143, pp. 686-693. doi: 10.1016/j.cell.2010.11.016. PMID: 21111230.

6. Micel L.N., Tentler P.G., Smith P.G., Eckhardt S.G. Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies. *Journal of clinical oncology*, 2013, vol.31, no. 9, pp.1231-1238. doi: 10.1200/JCO.2012.44.0958. PMID: 23358974.

7. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 480p.

8. Graham F.L., van der Eb A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 1973, vol.52, no.2, pp. 456-467. PMID: 4705382.

9. Stagg H.R., Thomas M., van den Boomen D., Wiertz E.J.H.J., Drabkin H.A., Gemmill R.M., Lehner P.J. The TRC8 E3 ligase ubiquitinates MHC class I molecules before dislocation from the ER. *J. Cell Biol.*, 2009, vol. 186, no. 5, pp. 685-692. doi: 10.1083/jcb.200906110. PMID: 19720873.

10. Higgins S.J., Hames B.D. Protein Expression. A practical approach. - Oxford University Press, 1999, 282p.

11. Kulyyassov A., Shoaib M., Ogryzko V. Use of *in vivo* biotinylation for chromatin immunoprecipitation. *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 2011, chapter 17, unit 17.12. - pp.17.12.1-17.12.22. doi: 10.1002/0471143030.cb1712s51.

12. Kulyyassov A., Shoaib M., Pichugin A., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. PUB-MS: a mass spectrometry-based method to monitor protein-protein proximity *in vivo*. *J. Proteome Res.*, 2011, vol. 10, no.10, pp. 4416-4427. doi: 10.1021/pr200189p.

13. Shoaib M., Kulyyassov A., Robin C., Winczura K., Tarlykov P., Despas E., Kannouche P., Ramanculov E., Lipinski M., Ogryzko V. PUB-NChIP – “*in vivo* biotinylation” approach to study chromatin in proximity to a protein of interest. *Genome Research.*, 2013, vol. 23, no.2, pp. 331-340. doi:10.1101/gr.134874.111.

14. Kulyyassov A.T., Zhubanova G.S., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. Method of quantitative evaluation of heterochromatin protein HP1 interactions *in vivo*. *Biotechnology. Theory and practice*, 2014, no.1, pp.17-27. <http://www.biotechlink.org/1-2014/article3>.

15. Kulyyassov A.T., Zhubanova G.S., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. Quantitative evaluation of interactions of transcription factor Kap1 and heterochromatin protein HP1 *in vivo*. *Biotechnology. Theory and practice*, 2014, no.3, pp. 12-21. <http://biotechlink.org/3-2014/article2>.

16. Пат. Республики Казахстан на изобретение. 2013/1352.1. Рекомбинантная плазмидарсDNA3.1(+)-VAR-HP1a, кодирующая гетеро-хроматиновый белок человека HP1a и обеспечивающая его экспрессию в клетках HEK293T /Кульясов А.Т., Огрызко В.В., №30034, заявл. 16.10.2013, бюлл. №6, 6с.

17. Пат. Республики Казахстан на изобретение. 2013/1377.1. Рекомбинантная плазмидарсDNA3.1(+)-VAR-KAP1, кодирующая белок транскрипционного кофактора человека KAP1 и обеспечивающая его экспрессию в клетках HEK293T /Кульясов А.Т., Огрызко В.В., №30035, заявл. 17.10.2013, бюлл. №6, 6с.

18. Kulyyassov A., Robin C., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. Exploring neighborhoods of ubiquitinated proteins with Proximity-Utilizing Biotinylation // Proceedings of 5th International Conf. on Proteomics & Bioinformatics, September 01-03, 2015, Valencia, Spain, pp. 49. <http://dx.doi.org/10.4172/0974-276X.S1.076>.

19. Kulyyassov A., Shoaib M., Robin C., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. Application of Proximity Utilizing Biotinylation method for identification of posttranslational modification and ubiquitination in UV-induced DNA repair // Proceedings of 5th International Conf. on Proteomics & Bioinformatics, September 01-03, 2015, Valencia, Spain, pp. 98. <http://dx.doi.org/10.4172/0974-276X.S1.077>.

20. Kulyyassov A.T., Zhubanova G.S., Ogryzko V.V. Study of the compartmentalization of cell using proximity utilizing enzymatic ligation // Proceedings of 5th International Conf. on Proteomics & Bioinformatics, September 01-03, 2015, Valencia, Spain, pp.100. <http://dx.doi.org/10.4172/0974-276X.S1.077>.

21. Kulyyassov A.T., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. *In vivo* biotinylation based method for study protein-protein proximity in eucaryote cells. *Central Asian Journal of Global Health.*, 2013, vol. 2, suppl. ISSN 2166-7403, DOI 10.5195/cajgh.2013.96.

22. Kulyyassov A.T., Zhubanova G.S., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. Proximity utilizing biotinylation of nuclear proteins *in vivo*. *Central Asian Journal of Global Health.*, 2014, vol. 3, suppl. ISSN 2166-7403, DOI 10.5195/cajgh.2014.165.

23. Frisch S.M. and Mymryk J.S. Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, vol. 3, pp.441-452. doi:10.1038/nrm827.

24. Adhikary S. and Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, vol. 6, pp.635-645. doi:10.1038/nrm1703.

БИОТИН АКЦЕРТОРЫ ПЕПТИДИМЕН КОНЬЮГИРЛЕНГЕН АДАМНЫҢ УБИКВИТИН РЕКОМБИНАНТТЫ АҚУЫЗЫН КЛОНДАУ ЖӘНЕ ЭКСПРЕССИЯЛАУ

Құлыясов А.Т.¹, Жұбанова Г.С.¹, Раманқұлов Е.М.¹, Огрызко В.В.²

¹Ұлттық биотехнология орталығы

Қорғалжын тас жолы 13/5, Астана қ., 010000, Қазақстан

²Institut Gustave Roussy, CNRS UMR8126

94805, 39 Rue Camilles Desmoulin, Villejuif, France

akulyyassov@gmail.com

ТҮЙІН

Proximity Utilizing Biotinylation (PUB), немесе *in vivo* ақуыздардың жақындасудан (өзара әрекеттесу) биотинилденуі деп аталатын біз жасаған әдіс BirAлигаза биотинімен нысанды ақуызның және оның серіктесі VAR биотинінің пептид акцепторының – бір жасушаның ішінде рекомбинанттық ақуыздардың біріге экспрессиялануына негізделген, ол олардың өзара әрекеттесу дәрежесіне нақты сандық бағалау жүргізуге мүмкіндік береді.

Осы жұмыстың мақсаты VAR биотинінің пептид акцепторымен конъюгирленген, UbC адамның убиквитин гені бар плазмидалық конструкция алу және оның HEK293T жасушаларында экспрессиялау болып табылады. HEK293T жасушаларында VAR-убиквитин және BirA-HP1g (BirA-GFP, бақылау) ақуыздарының экспрессиясы бойынша эксперименттерде BirA-HP1g жағдайында BirA-GFP бақылаумен салыстырғанда өзара әрекеттесудің к(биотинилирование) жоғары спецификальылығы анықталды. Басқа үлгілік жүйе мысалында BirA-Tap54 бақылауымен салыстырғанда BirA-Tip49-мен әртүрлі убиквитинді ақуыздардың жоғары дәрежеде ақуыз-ақуыздық өзара байланысы анықталды.

Негізгі сөздер: ақуыз-ақуыздық өзара байланыс, биотинилдену, биотин-лигаза, биотиннің пептид акцепторы, плазмидалар, транзгентті трансфекция, иммуноблот, убиквитин.