

УДК 577.213.32:577.217.5:577.218:577.29: 541.515

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА KAP1 И ГЕТЕРОХРОМАТИНОВОГО БЕЛКА HP1 *IN VIVO*

А.Т. Кулыясов¹, Г.С. Жубанова¹, Е.М. Раманкулов¹, В.В. Огрызко²

¹РГП «Национальный центр биотехнологии», Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, ул. Ш. Валиханова, 13/1, Астана, 010000, Казахстан
akulyyasov@gmail.com

²Институт Густава Роси, CNRS UMR8126, 94805, Вильджуиф, Франция, ул. Камиля Демульяна, 39

АБСТРАКТ

Белок-белковые взаимодействия (*Protein-protein interactions*, PPI) играют ключевую роль во многих процессах внутри клетки, и их аффинность и специфичность точно отрегулирована по отношению к функциям, которые они выполняют. Нарушения в работе сигнальных путей, связанных с PPI, приводят к развитию и прогрессированию рака. Исследования белок-белковых взаимодействий позволяют не только понять механизм происходящих процессов внутри клетки, но помочь в создании низкомолекулярных модуляторов PPI для лечения различных видов опухоли.

Разработанный нами метод, названный *Proximity Utilizing Biotinylation* (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 VAP, что позволяет провести точную количественную оценку степени их взаимодействия.

Целью данной работы является разработка метода количественной оценки взаимодействий *in vivo* белков-онкомаркеров HP1 α и транскрипционного фактора KAP1.

В экспериментах по экспрессии белков HP1 α и KAP1 слитых с VAP и BirA в клетках HEK293T обнаружено повышение уровня биотинилирования, обусловленное *in vivo* взаимодействием белков VAP-HP1 α и BirA-wtKAP1. Отношение между биотинилированием VAP-HP1 α в образцах с BirA-mutKap1 и BirA-wtKap1 составило 0,43 \pm 0,086.

В экспериментах с обратным порядком вставок в рекомбинантных белках уровень биотинилирования также выше в случае взаимодействия белков VAP-wtKap1 и BirA-HP1 α . Отношение между биотинилированием VAP-mutKap1 и VAP-wtKap1 в присутствии BirA-HP1 α составило 0,2 \pm 0,04.

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

QUANTITATIVE EVALUATION OF INTERACTIONS OF TRANSCRIPTION FACTOR KAP1 AND HETEROCHROMATIN PROTEIN HP1 *IN VIVO*

А.Т. Kulyyassov¹, G.S. Zhubanova¹, E.M. Ramanculov¹, V.V. Ogryzko²

¹Republican State Enterprise “National Center for Biotechnology” under the Science Committee of Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, 13/1, Valikhanov str., Astana, 010000, Kazakhstan
akulyyasov@gmail.com

²Institut Gustave Roussy, CNRS UMR8126, 94805, Villejuif, France, 39 Rue Camille Desmoulin

ABSTRACT

Protein-protein interactions (PPI) play a key role in many processes within the cell, and their affinity and specificity are fine-tuned with respect to the functions they perform. Disturbances in the signal transduction pathways associated with PPI lead to the development and progression of cancer. Study of

protein-protein interactions not only improve our understanding the mechanism of the processes inside the cell, but also help in the search of small molecule modulators of PPI for the treatment of various types of tumors.

We have used method, called the Proximity Utilizing Biotinylation (PUB), based on co-expression within a single cell of the recombinant proteins - the protein of interest fused with biotin ligase BirA and its partner with the biotin acceptor peptide BAP, which allows an accurate quantitative assessment of the extent of their interaction *in vivo*.

The aim of this work is to develop a method for quantifying interactions *in vivo* of oncomarker proteins HP1 α and transcription factor KAP1.

In experiments on protein expression of BAP and BirA fusions of HP1 α and KAP1 in HEK293T cells we found elevated levels of biotinylation due to *in vivo* interaction of proteins BAP-HP1 α and BirA-wtKAP1. The ratio of biotinylation between BAP-HP1 α in samples with BirA-mutKap1 and BirA-wtKap1 was $0,43\pm 0,086$.

In reciprocal experiments, the level of biotinylation was higher in case of interaction between proteins BAP-wtKap1 and BirA-HP1 α . The ratio of biotinylation of BAP-mutKap1 and BAP-wtKap1 in the presence of BirA-HP1 was $0,2\pm 0,04$.

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

ВВЕДЕНИЕ

Белок-белковые взаимодействия (Protein-protein interactions, PPI) являются молекулярной основой большинства физиологических процессов, как в здоровой, так и в больной клетке [1-8]. В случае возникновения рака PPI выполняют значимые регуляторные функции, например, в клеточном делении [4] или передаче сигнала в клетке [6]. Специфичность и аффинность этих взаимодействий чрезвычайно важна, поскольку их изменения приводят к неправильному функционированию клетки, как например, неконтролируемый клеточный рост, характерный для развития опухоли. В связи с этим фармацевтическая индустрия сейчас крайне заинтересована в поиске и разработке модуляторов PPI – либо биологических агентов (таких как антитела) или небольших синтетических соединений для нужд медицины [5, 7, 8, 9]. На сегодняшний день более 12 низкомолекулярных модуляторов PPI проходят клинические испытания, а прогнозы по их продажам во всем мире в течение ближайших 5 лет оцениваются в объеме 800 миллионов долларов США [1]. Поэтому разработка методов детектирования и количественной оценки белок-белковых взаимодействий *in vivo* является актуальной задачей, позволяющей помочь в создании лекарственных средств – модуляторов PPI.

Одним из значимых объектов для изучения PPI являются транскрипционные факторы, присутствующие в ядре и участвующие в регуляции экспрессии генов [10]. Эти регуляторные белки являются примером модульности в архитектуре, имеющие в своей структуре независимые, функционально разделенные домены, ответственные за локализацию в ядре, сиквенс-специфичное связывание с ДНК, гетеро- или гомоолигомеризацию, активацию и репрессию транскрипции. Например, домены, переносящие репрессию, часто представляют собой консервативные аминокислотные последовательности, встречающихся в одном или более семействах белков и имеющих общие домены связывания с ДНК. Примерами являются WRPW, VTB/POZ, SNAG и Kruppel-associated box (KRAB) [11-16]. Последние KRAB репрессирующие домены первоначально идентифицированы в белках человеческих клеток как консервативные аминокислотные последовательности, содержащие много остатков Cys2-His2 (C2H2) на C-конце и названные ZFP (*zinc finger proteins*) белки с цинковыми пальцами. Примерно от 300 до 700 человеческих генов кодируют белки с цинковыми пальцами [17], треть из которых содержит KRAB-домен [12]. KRAB-домен состоит из примерно 75 аминокислотных остатков, и его наличие связано с репрессирующей активностью [16].

Белок KAP1 (KRAB-associated protein 1, также известный как TIF1 β , transcription intermediary factor 1 и TRIM28, tripartite motif protein 28) является важным кофактором белков KRAB с цинковыми пальцами [18-20]. Регуляция белка Kap1 нарушена во многих

видах опухоли, например, пациенты с высоким уровнем Кар1 показывают значительно меньшую выживаемость в сравнении с пациентами с низким уровнем этого белка [21]. Кар1 – это большой белок, который может взаимодействовать со множеством факторов, вовлеченных как в активацию генов, так и в их репрессию. На N-конце Кар1 содержит 4 консервативных структурных домена, включая *RING finger*, *B boxes*, лейциновые застезки *coiled-coil*, которые вместе называются RBCC или TRIM доменом (рисунок 1).

ВСТАВИТЬ РИС.1

Центральная часть Кар1 содержит пентапептидный участок P×V×L, который позволяет взаимодействовать с гетерохроматиновым белком HP1. Участок *RHD finger* (*plant homeodomain*) и бромодомен расположены на C-конце Кар1. Показано, что вышеперечисленные домены данного белка выполняют важную роль в образовании больших комплексов, которые вовлечены в образование гетерохроматиновых комплексов [22-24]. P×V×L домен взаимодействует с HP1 [25], который в свою очередь может связываться с гистоном H3, с метилированным лизином 9 (H3K9me3). Таким образом, RHD, бромодомен и P×V×L домены предположительно работают кооперативно в образовании конденсированного гетерохроматина, характеризующегося низким ацетилизацией гистонов, высоким H3K9me3 и связыванием с HP1. N-конец Кар1 содержит RBCC домен, предназначенный для связывания со множеством транскрипционных факторов. Например, RBCC домен белка Кар1 может взаимодействовать с KRAB доменами, содержащимися во многих KRAB ZNF транскрипционных факторах и в некоторых белках, которые не имеют «цинковых пальцев», но вместо этого служат в качестве связывающего моста между Кар1 и ДНК-связывающих факторов [26].

Члены семейства белков, содержащих тройной мотив (*tripartite motif*, TRIM) можно классифицировать как E3 убиквитин лигазы, поскольку они содержат *RING-finger* домен, хотя не все белки, содержащие этот домен, работают как E3 убиквитин лигазы [27, 28]. Известно более 70 TRIM белков в организме человека и мыши, которые закодированы примерно в 71 гене человека, и некоторые из них сгруппированы в кластеры. Кроме *RING-finger* домена, TRIM белки имеют один или два цинк-связывающих мотива, называемых B-боксами, и ассоциированных с *coiled-coil* областью. TRIM белки классифицируются на подсемейства от I до XI на основании различий в их доменной структуре [29-31].

Белки семейства TRIM участвуют во многих биологических процессах, и отклонения в их работе связаны с различными патологическими состояниями, нейродегенеративными болезнями, вирусными инфекциями и раком (таблица 1) [27, 32]. Большинство TRIM белков действуют как E3 убиквитин-лигазы, и несколько из них вовлечены в различные онкогенные процессы, такие как транскрипционное регулирование, пролиферация клеток и апоптоз.

TRIM24 (также известный как *TIF1alpha*) содержит TRIM мотив, бокс для взаимодействия с внутриядерным рецептором (NR box) и C-терминальный участок, содержащий *RHD-finger* домен и бромодомен [33-35], которые являются высококонсервативными мотивами для внутриядерных белков, участвующих в ремоделировании хроматина [36-39]. TRIM24 ассоциирован с хроматином посредством взаимодействий бромодомен-ДНК и бромодомен-нуклеосома [40] и регулирует несколько внутриядерных рецепторов, включая рецептор ретиной кислоты (*Retinoic acid receptor-α*, RARα), тиреоидного рецептора и эстрогенного рецептора (ERs). Этот белок является потенциальным супрессором рака печени в мышцах и ослабляет RARα-связанную транскрипцию.

Таблица 1. Изменения в уровне белков и генов TRIM в раковых заболеваниях

Table 1. Alterations in TRIM proteins and genes in cancers and cancer-related diseases

Ген Gene	Тип рака Cancer type	Наблюдаемое изменение Observed alterations	Ссылка Refs
TRIM24	Папиллярный рак щитовидной железы Papillary thyroid cancer	Хромосомная транслокация: RET* Chromosome translocation: RET*	45
	Миелопролиферативный синдром Myeloproliferative syndrome	Хромосомная транслокация: FGFR1 Chromosome translocation: FGFR1	46
	Рак печени Liver cancer	Хромосомная транслокация: BRAF Chromosome translocation: BRAF	47
	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukaemia	Повышенная экспрессия Overexpression	48
	Рак молочной железы Breast cancer	Повышенная экспрессия Overexpression	49,50
TRIM28	Рак желудка Gastric cancer	Повышенная экспрессия Overexpression	21
TRIM33	Хроническая миеломоноцитная лейкемия Chronic myelomonocytic leukaemia	Пониженная экспрессия Reduced expression	51
<p>* RET (Rearranged during transfection) прото-онкоген кодирующий рецептор тирозин киназы, FGFR1 (Fibroblast growth factor receptor 1); BRAF ген человека кодирующий белок B-Raf, TRIM (tripartite motif)</p> <p>* RET (Rearranged during transfection) proto-oncogene encoding receptor of tyrosine kinase, FGFR1 (Fibroblast growth factor receptor 1); BRAF human gene encoding B-Raf protein, TRIM (tripartite motif)</p>			

TRIM28 (также известный как TIF1beta или Kap1) экспрессируется в большом количестве в опухоли и участвует в дезактивации белка p53. TRIM28 связывается с гетерохроматин-связанными факторами HP1a, HP1b и HP1g для промотирования умолчания генов в эухроматине [41, 42]. Более того, колокализация как TRIM28, так и HP1a или HP1b у центромеров, необходима для индукции эндотермальной дифференциации [43, 44].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование ДНК

Субклонирование фрагментов wt(mut)Kap1 из вектора pOz.FHNN в вектор pcDNA3.1(+) осуществляли с помощью рестриктаз XhoI и NotI, с последующим лигированием и бактериальной трансформацией согласно стандартным методикам [52]. Для выделения фрагментов использовали плазмиды pOz.MoMuLV.BirA.wtKap1 (197 ng) и

pOz.MoMuLV.BirA.mutKapI (166 ng), а для получения вектора – pcDNA3.1(+).CMV.BirA.GFP (212 ng).

После трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма DH5 α и отбора клонов, несущих рекомбинантные плазмиды со встроенным геном, получили плазмиды pcDNA3.1(+).BAP.wt(mut)Kap1 или pcDNA3.1(+).BirA.wt(mut)Kap1.

Секвенирование ДНК

Первичную структуру ДНК определяли с использованием наборов BigDye v.3.1 (Life technologies, 4337455) на автоматических анализаторах ДНК AB3730xl (Applied Biosystems) с использованием праймеров BirA_3_FD (5' AGGACGGAATCATCAAGC 3') и primer2EMC (5' AGACGGCAATATGGTGGA 3').

Для проведения реакции использовали 2.5x Ready Reaction premix (Applied Biosystems, N4337455), 5x BigDye Sequencing buffer, FD и RS праймеры, 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 открутили при 7000 об., 45 минут при 4°C, удалили супернатант. Промыли 140 мкл 70% этанола, открутили при 7000 об., 15 минут при 4°C, удалили супернатант. Высушивали в течение 15 минут (в темноте) при комнатной температуре для удаления этанола и добавили 14 мкл формамида (Hi-Di, Applied Biosystems, 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.

Вектора, не содержащие эндотоксины (pcDNA3.1(+).BAP.HP1, pcDNA3.1(+).BAP.wtKap1, pcDNA3.1(+).BAP.mutKap1, pcDNA3.1(+).BirA.HP1, pcDNA3.1(+).BirA.wtKap1, pcDNA3.1(+).BirA.mutKap1), нарабатывали с помощью наборов для выделения плазмидной ДНК (Sigma, PLED35-1KT или Qiagen, 12362), согласно протоколам, приведенным в инструкциях или на сайтах компаний-производителей.

Транзientная трансфекция клеток HEK293T

Экспрессию рекомбинантных белков из полученных плазмид pcDNA3.1(+).BAP.HP1 α , pcDNA3.1(+).BirA.HP1 α , pcDNA3.1(+).BAP.wt(mut)Kap1 и pcDNA3.1(+).BirA.wt(mut)Kap1 осуществляли в клетках HEK293T (Human embryonic kidney cells линия 293T), с помощью кальций-фосфатного метода, как описано ранее [53-57].

Трансфекция клеток плазмидными конструкциями pcDNA3.1(+).BAP.HP1 α и pcDNA3.1(+).BirA.wt(mut)Kap1

Плазмиды с BAP-мишенями брали в количестве 1,0 мкг, а плазмиды с биотин-лигазой (BirA) в количестве 0,2 мкг в расчете на 1 лунку 6-луночной планшеты.

Время мечения биотином 30 минут.

Трансфекция клеток плазмидными конструкциями pcDNA3.1(+).BAP.wt(mut)Kap1 и pcDNA3.1(+).BirA.HP1 α . Эксперименты с обратным порядком вставок в рекомбинантных белках

Плазмиды с BAP-мишенями брали в количестве 0,5 мкг, а плазмиды с биотин-лигазой (BirA) в количестве 0,1 мкг в расчете на 1 лунку 6-луночной планшеты. В качестве компетитора использовали плазмиды pM2.wtKap1 и pM2.mutKap1 в количестве 5 мкг.

Время мечения биотином 5 минут.

Подготовка образцов на Вестерн-блот

Выделение ядер после трансфекции и подготовку образца для Вестерн-блота осуществляли согласно ранее описанному методу [54-57]. Для белкового электрофореза использовали готовые кассеты с градиентным полиакриламидным гелем на 10 лунок (Life technologies № NP0321BOX) и на 12 лунок (Life technologies, № NP0322BOX). В качестве

загрузочного буфера использовали 4x NUPAGE LDS sample buffer (Life technologies, №NP0007). Электрофорез проводили с использованием буферного раствора MOPS (Life technologies, № 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. Для денситометрического анализа иммуноблотов использовали доступную в online программу ImageJ 1.47v.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что гетерохроматиновый белок HP1 сильно взаимодействует с белком Kap1 и домен в белке Kap1, ответственный за взаимодействие, включая ключевую аминокислотную последовательность (рисунок 1), был охарактеризован и идентифицирован ранее [18, 25]. Нами был выбран HP1-связывающий домен белка Kap1 (называемый также wtKAP1BD) наряду с мутантной версией, аннулирующей взаимодействие (mutKAP1BD) для того, чтобы показать, что метод PUB позволяет обнаруживать специфическое белок-белковое взаимодействие.

Плазмиды pcDNA3.1(+).BAP.wt(mut)Kap1 и pcDNA3.1(+).BirA.wt(mut)Kap1 получены субклонированием из вектора pOzFHNN.BAP.wt(mut)Kap1 и pOzFHNN.BirA.wt(mut)Kap1. Рамка считывания (ORF) гена белка wt(mut)Kap1BD составляет 540 п.н., или 177 аминокислотных остатка, а масса белка 17,8 кДа.

Эксперименты с экспрессией взаимодействующих рекомбинантных белков, конъюгированных с мишенями (BAP) и лигазами (BirA). Экспрессия рекомбинантных белков BirA-mutKap1, BirA-wtKap1 и BAP-HP1 в клетках HEK293T и детектирование белок-белкового взаимодействия in vivo

В экспериментах проводили совместную экспрессию дикого или мутантного типа белка BirA-Kap1 с BAP-HP1 α (рисунок 2, изображения векторов получены из полной нуклеотидной последовательности ДНК плазмиды с помощью программы Vector NTI Advance 11.5.0). В качестве отрицательного контроля использовали BAP-GFP, где вообще не наблюдалось сигнала биотинилированных производных этих белков (мембрана справа, образцы 3, 4, рисунок 4а).

Гетерохроматиновые белки HP1 α вначале образуют димеры, благодаря наличию в структуре CSD домена (рисунок 2). Причем один из взаимодействующих белков может оказаться рекомбинантным, т.е. слитым с пептидом акцептором биотина BAP. Образовавшийся димер BAP-HP1-HP1 имеет участок на поверхности, который может связываться с R \times V \times L-доменом дикого типа транскрипционного фактора KAP1, слитого с биотин-лигазой BirA. В результате взаимодействия белков происходит также сближение BirA и BAP, которое в присутствии биотина в среде приводит к ковалентному мечению пептида акцептора биотина. Причем уровень биотинилирования сильно зависит от степени взаимодействия белков, например, в случае мутантной версии mutKAP1, которая слабо взаимодействует с димером гетерохроматинового белка интенсивность мечения биотином в 2,3 раза меньше по сравнению с диким типом wtKAP1 (рисунок 2).

ВСТАВИТЬ РИСУНКИ 2, 3,

Таким образом, сильное биотинилирование BAP-HP1 α происходило только в случае совместной экспрессии с BirA-wtKap1 (образец 1, рисунок 4а, правый блот). Уровень мечения биотином белка BAP-HP1 α в присутствии BirA-mutKap1 был значительно меньше (отношение между биотинилированием BAP-HP1 α в образцах с BirA-mutKap1 и BirA-wtKap1 составило 0,43 \pm 0,086, рисунок 5).

Экспрессия рекомбинантных белков VAP-wtKap1, VAP-mutKap1 и BirA-HP1 в клетках HEK293T и детектирование белок-белкового взаимодействия in vivo. Эксперименты с обратным порядком вставок в рекомбинантных белках

Мы также провели эксперименты с обратным порядком вставок в рекомбинантных белках, где на этот раз wtKap1 был слит с мишенью (VAP), а HP1 с биотин-лигазой (BirA). В проведенных опытах мы экспрессировали рекомбинантные белки VAP-wtKap1, VAP-mutKap1 и BirA-HP1, транзientной трансфекцией соответствующих векторов (рисунок 3, программа Vector NTI Advance 11.5.0) кальций-фосфатным методом в клетках HEK293T. Схема эксперимента состояла в следующем: в двух 6-луночных планшетах подготовили для трансфекции клетки HEK293T и трансфецировали их двумя плазмидами pcDNA3.1(+).VAP.wtKap1+pcDNA3.1(+).BirA.HP1 или pcDNA3.1(+).VAP.mutKap1 + pcDNA3.1(+).BirA.HP1, в четырех повторностях (где в одной повторности биотин не добавляли и эти две лунки были контрольными, а в других образцах метили биотином за 5 минут до сбора клеток).

Согласно данным иммуоблота с α -His-антителами, уровни экспрессии мутантной формы и дикого типа фрагментов Kap1 были почти идентичны (рисунок 4b, верхний блот). Однако, уровень биотинилирования рекомбинантного белка VAP-wtKap1 (лунка 3, рисунок 4b, нижний блот) был значительно выше, чем мутантной версий VAP-mutKap1 (лунка 4). В контрольных лунках 1 и 2 без добавления биотина наблюдали ожидаемое отсутствие сигнала. Интересно отметить результаты трансфекции, в которых дополнительно добавляли конкуритора - немаркированные белки wtKap1 и mutKap1, не содержащие VAP или His-маркер. Одновременная экспрессия конкуритора wtKap1 подавляла биотинилирование (лунка 5), в то время как экспрессия мутантного конкуритора mutKap1 не оказывала влияния на уровень биотинилирования (лунка 7) дикого типа VAP-wtKap1. Интересно отметить влияние конкуриторов на величину отношения уровня биотинилирования VAP-mutKap1/VAP-wtKap1 (рисунок 5).

ВСТАВИТЬ РИСУНКИ 4, 5

В то время как при добавлении конкуритора дикого типа wtKap1 это отношение увеличивается с 0,2 до 0,27, что понятно в связи с конкуренцией между wtKap1 и VAP-wtKap1, то в присутствии mutKap1 это отношение уменьшается с 0,2 до 0,072, что, возможно, связано с конкуренцией между mutKap1 и VAP-mutKap1. Для трансфекции брали 10-кратный избыток конкуритора по отношению к рекомбинантным белкам (0,5 мкг плазмиды CMV.VAP. wt(mut)Kap1 и 5 мкг плазмиды pM2. wt(mut).Kap1).

ВЫВОДЫ

По результатам проведенных экспериментов на модельной системе взаимодействий между гетерохроматиновым белком HP1 и транскрипционным фактором Kap1, апробированных в двух вариантах, а именно VAP.HP1 α + BirA.wtKap1 и с обратным порядком вставок VAP.wtKap1+BirA.HP1 α продемонстрирована возможность обнаружения PPI *in vivo*. На основании данных по экспрессии рекомбинантных белков VAP.HP1 α , BirA.wtKap1, BirA.mutKap1, VAP.wtKap1, VAP.mutKap1 и BirA.HP1 в клетках HEK293T установлено, что полученные плазмидные конструкции pcDNA3.1(+).VAP.wt(mut)Kap1, pcDNA3.1(+).BirA.wt(mut)Kap1, pcDNA3.1(+).VAP.HP1 и pcDNA3.1(+).BirA.HP1 обеспечивают высокий уровень экспрессии, достаточный для работ, связанных с количественной протеомикой, и изучения белок-белковых взаимодействий. Сравнением результатов экспериментов с использованием рекомбинантных белков wtKap1 дикого типа и mutKap1 мутанта показано, что метод PUB

позволяет обнаруживать специфическое белок-белковое взаимодействие *in vivo* между wtKap1 и гетерохроматиновым белком HP1, обусловленное наличием HP1-связывающего (или P×V×L) домена в белке wtKap1.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта «Разработка метода, позволяющего проводить количественную оценку взаимодействий белка Kap1, онкомаркера рака желудка» на 2012-2014 гг. (номер госрегистрации 0112РК00350).

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. Nero T.L., Morton C.J., Holien J.K., Wielens J., Parker M.W. Oncogenic protein interfaces: small molecules, big challenges // *Nature Rev. Cancer.* – 2014. – Vol. 14. – P. 248-262.
2. Ivanov A.A., Khuri F.R., Fu H. Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy // *Trends in Pharm. Sci.* – 2013. – Vol. 34, №7. – P. 393-400.
3. Wells J.A., McClendon Ch.L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces // *Nature.* – 2007. – Vol. 450, №13. – P. 1001-1009.
4. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: The next generation // *Cell.* – 2011. Vol. 144. – P. 646-674.
5. Hoe K.K., Verma Ch.S., Lane D.P. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy // *Nature Rev./Drug Discovery.*-2014.-Vol.13.-P.217-236. doi: 10.1038/nrd4236.
6. Westermarck J., Ivaska J., Corthals G.L. Identification of protein interactions involved in cellular signaling // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2013. – Vol. 12, №7. – P. 1752-1763.
7. Aeluri M., Chamakuri S., Dasari B., Guduru Sh.K.R., Jimmidi R., Jogula S., Arya P. Small molecule modulators of protein-protein interactions: Selected case studies // *Chem. Rev.* – 2014. – Vol. 114, Issue 9. – P. 4640-4694.
8. Milroy L.-G., Grossmann T.N., Hennig S., Brunsveld L., Ottmann Ch. Modulators of protein-protein interactions // *Chem. Rev.* – 2014. – Vol. 114, Issue 9. – P. 4695-4748.
9. Arkin M.R., Tang Y., Wells J.A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing toward the reality // *Chem. & Biol.* – 2014. – Vol. 21, Issue 9. – P.1102-1114.
10. Britten R.J., and Davidson E.H. Gene regulation for higher cells: a theory // *Science.* – 1969. – Vol. 165. – P. 349–357.
11. Albagli O., Dhordain P., Deweindt C., Lecocq G., and Leprince D. The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins // *Cell Growth Differ.* – 1995. – Vol. 6, №9. – P. 1193–1198.
12. Bellefroid E.J., Poncelet D.A., Lecocq P.J., Revelant O., Martial J.A. The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88, №9. – P. 3608-3612.
13. Dawson S.R., Turner D.L., Weintraub H., Parkhurst S.M. Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain

and suggests two separable modes of transcriptional repression // *Mol. Cell. Biol.* – 1995. – Vol. 15, №12. – P. 6923-6931.

14. Grimes H.L., Gilks C.B., Chan T.O., Porter S., Tschlis P.N. The Gfi-1 protooncoprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol. 93, №25. – P. 14569-14573.

15. Friedman J.R., Fredericks W.J., Jensen D.E., Speicher D.W., Huang X.P., Neilson E.G., F.J. Rauscher III. KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain // *Genes Dev.* – 1996. – Vol. 10. – P. 2067-2078.

16. Margolin J.F., Friedman J.R., Meyer W.K., Vissing H., Thiesen H.J., Rauscher F.J. III. Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91, №10. – P. 4509-4513.

17. Klug A., Schwabe J.W. Protein motifs 5. Zinc fingers // *FASEB J.* – 1995. – Vol. 9, №8. – P. 597-604.

18. Lechner M.S., Begg G.E., Speicher D.W., Rauscher III F.J. Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain KAP-1 corepressor interaction is essential // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 20, №17. – P. 6449-6465.

19. Collins T., Stone J.R., Williams A.J. All in the Family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN Domains // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – Vol. 21, №11. – P. 3609-3615.

20. Wang G., Ma A., Cheok-Man W., Horsley D., Brown N.R., Cowell I.G., Singh P.B. Conservation of Heterochromatin Protein 1 Function // *Mol. Cell. Biol.* – 2000. – Vol. 20, №18. – P. 6970-6983.

21. Yokoe T., Toiyama Y., Okugawa Y., Tanaka K., Ohi M., Inoue Y., Mohri Y., Miki C., and Kusunoki M. KAP1 is associated with peritoneal carcinomatosis in gastric cancer // *Ann. Surg. Oncol.* – 2010. – Vol. 17, Issue 3. – P. 821-828.

22. Nielsen A.L., Ortiz J.A., You J., Oulad-Abdelghani M., Khechumian R., Gansmuller A., Chambon P., Losson R. Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18, №22. – P. 6385-6395.

23. Schultz D.C., Ayyanathan D.K., Negorev G.G., and Rauscher III F. J. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins // *Genes Dev.* – 2002. – Vol. 16. – P. 919-932.

24. Schultz D.C., Friedman J.R., and Rauscher III F. J. Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD // *Genes Dev.* – 2001. – Vol. 15. – P. 428-443.

25. Ryan R.F., Schultz D.C., Ayyanathan K., Singh P.B., Friedman J.R., Fredericks W.J., Rauscher III F.J. KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing // *Mol. Cell. Biol.* – 1999. – Vol. 19, №6. – P. 4366-4378.

26. Iyengar S., Ivanov A.V., Jin V.X., Rauscher III F.J., and Farnham P.J. Functional Analysis of KAP1 Genomic Recruitment // *Molecular and cellular biology.* – 2011. – Vol. 31, №9. – P. 1833-1847.

27. Hatakeyama Sh. TRIM proteins and cancer // *Nature Reviews. Cancer.* – 2011. – Vol. 11. – P. 792-804.

28. Reymond A., Meroni G., Fantozzi A., Merla G., Cairo S., Luzi L., Riganelli D., Zanaria E., Messali S., Cainarca S., Guffanti A., Minucci S., Pelicci P. and Ballabio A. The tripartite motif family identifies cell compartments // *EMBO J.* – 2001. – Vol. 20, №9. – P. 2140-2151.

29. Short K.M., Cox T.C. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, №13. – P. 8970-8980.
30. Ozato K., Shin D.M., Chang T.H., Morse H.C. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity // *Nature Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 849-860.
31. McNab F.W., Rajsbaum R., Stoye J.P., O'Garra A. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation // *Curr. Opin. Immunol.* – 2011. – Vol. 23, Issue 1. – P. 46-56.
32. Meroni G., Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases // *Bioessays.* – 2005. – Vol. 27, Issue 11. – P. 1147-1157.
33. Borden K.L. RING domains: master builders of molecular scaffolds? // *J. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 295, Issue 5. – P. 1103-1112.
34. Peng H., Feldman I., Rauscher F.J. Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression // *J. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 320, Issue 3. – P. 629-644.
35. Le Douarin B., Nielsen A.L., Garnier J.M., Ichinose H., Jeanmougin F., Losson R., Chambon P. A possible involvement of TIF1 α and TIF1 β in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors // *EMBO J.* – 1996. – Vol. 15, №23. – P. 6701-6715.
36. Aasland R., Gibson T.J., Stewart A.F. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation // *Trends. Biochem. Sci.* – 1995. – Vol. 20, Issue 2. – P. 56-59.
37. Jeanmougin F., Wurtz J.M., Le Douarin B., Chambon P., Losson R. The bromodomain revisited // *Trends. Biochem. Sci.* – 1997. – Vol. 22, Issue 5. – P. 151-153.
38. Dyson M.H., Rose S., Mahadevan L.C. Acetyllysine-binding and function of bromodomain-containing proteins in chromatin // *Front. Biosci.* – 2001. – Vol. 6. – P. 853-865.
39. Teyssier C., Ou C.Y., Khetchoumian K., Losson R., Stallcup M.R. Transcriptional intermediary factor 1 α mediates physical interaction and functional synergy between the coactivator-associated arginine methyltransferase 1 and glucocorticoid receptor-interacting protein 1 nuclear receptor coactivators // *Mol. Endocrinol.* – 2006. – Vol. 20, №6. – P. 1276-1286.
40. Remboutsika E., Yamamoto K., Harbers M., Schmutz M. The bromodomain mediates transcriptional intermediary factor 1 α -nucleosome interactions // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, №52. – P. 50318-50325.
41. Eissenberg J.C., Elgin S.C. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2000. – Vol. 10, Issue 2. – P. 204-210.
42. Li Y., Kirschmann D.A., Wallrath L.L. Does heterochromatin protein 1 always follow code? // *Proc. Natl Acad. Sci. USA* – 2002. – Vol. 99, №4. – P. 16462-16469.
43. Bartova E., Pachernik J., Kozubik A., Kozubek S. Differentiation-specific association of HP1 α and HP1 β with chromocentres is correlated with clustering of TIF1 β at these sites // *Histochem. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 127, Issue 4. – P. 375-388.
44. Cammas F., Oulad-Abdelghani M., Vonesch J.L., Huss-Garcia Y., Chambon P., Losson R. Cell differentiation induces TIF1 β association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction // *J. Cell Sci.* – 2002. – Vol. 115, №17. – P. 3439-3448.
45. Klugbauer S., Rabes H.M. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas // *Oncogene.* – 1999. – Vol. 18, №30. – P. 4388-4393.
46. Belloni E., Trubia M., Gasparini P., Micucci C., Tapinassi C., Confalonieri S., Nuciforo P., Martino B., Lo-Coco F., Pelicci P., Di Fiore P. 8p11 myeloproliferative syndrome with a novel t(7;8) translocation leading to fusion of the FGFR1 and TIF1 genes // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2005. – Vol. 42, Issue 3. – P. 320-325.
47. Le Douarin B., Le Douarin B., Zechel C., Garnier J.M., Lutz Y., Tora L., Pierrat P., Heery D., Gronemeyer H., Chambon P., Losson R. The N-terminal part of TIF1, a putative

mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18 // *EMBO J.* – 1995. – Vol. 14, №9. – P. 2020-2033.

48. Gandini D., De Angeli C., Aguiari G., Manzati E., Lanza F., Pandolfi P.P., Cuneo A., Castoldi G.L., del Senno L. Preferential expression of the transcription coactivator HTIF1 α gene in acute myeloid leukemia and MDS-related AML // *Leukemia.* – 2002. – Vol. 16, №5. – P. 886-893.

49. Tsai W.W., Wang Z., Yiu T.T., Akdemir K.C., Xia W., Winter S., Tsai C.Y., Shi X., Schwarzer D., Plunkett W., Aronow B., Gozani O., Fischle W., Hung M.C., Patel D.J., Barton M.C. TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer // *Nature.* – 2010. – Vol. 468. – P. 927-932.

50. Chambon M., Orsetti B., Berthe M.L., Bascoul-Mollevis C., Rodriguez C., Duong V., Gleizes M., Thénot S., Bibeau F., Theillet C., Cavaillès V. Prognostic significance of TRIM24/TIF-1 α gene expression in breast cancer // *Am. J. Pathol.* – 2011. – Vol. 178, Issue 4. – P. 1461-1469.

51. Aucagne R., Droin N., Paggetti J., Lagrange B., Largeot A., Hammann A., Bataille A., Martin L., Yan K.P., Fenaux P., Losson R., Solary E., Bastie J.N., Delva L. Transcription intermediary factor 1 γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia // *J. Clin. Invest.* – 2011. – Vol. 121, Issue 6. – P. 2361-2370.

52. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрун Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.

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

54. Kulyyassov A., Shoaib M., Ogryzko V. Use of in vivo biotinylation for chromatin immunoprecipitation // *Curr. Protoc. Cell Biol.* – 2011. – Chapter 17, Unit17.12. – P. 17.12.1-17.12.22.

55. 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.

56. Shoaib M., Kulyyassov A., Robin C., Winczura K., Tarylkov 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.

57. Кулыясов А.Т., Жубанова Г.С., Раманкулов Е.М., Огрызько В.В. Метод количественной оценки взаимодействий гетерохроматинового белка HP1 *in vivo* // *Биотехнология. Теория и практика.* – 2014. – №1. – С.17-27.

REFERENCES

1. Nero T.L., Morton C.J., Holien J.K., Wielens J., Parker M.W. Oncogenic protein interfaces: small molecules, big challenges. *Nature Rev.Cancer*, 2014, vol. 14, pp. 248-262. doi: 10.1038/nrc3690.

2. Ivanov A.A., Khuri F.R., Fu H. Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy. *Trends in Pharm. Sci.*, 2013, vol. 34, no. 7, pp. 393-400. dx.doi.org/10.1016/j.tips.2013.04.007.

3. Wells J.A., McClendon Ch.L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature*, 2007, vol. 450, no. 13, pp. 1001-1009. doi: 10.1038/nature06526.

4. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 2011, vol. 144, pp. 646-674. doi 10.1016/j.cell.2011.02.013.

5. Hoe K.K., Verma Ch.S., Lane D.P. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nature Rev.Drug Discovery*, 2014, vol. 13, pp. 217-236. doi: 10.1038/nrd4236.

6. Westermarck J., Ivaska J., Corthals G.L. Identification of protein interactions involved in cellular signaling. *Mol. Cell. Proteomics*, 2013, vol. 12, no. 7, pp. 1752-1763. doi 10.1074/mcp.R113.027771.
7. Aeluri M., Chamakuri S., Dasari B., Guduru Sh.K.R., Jimmidi R., Jogula S., Arya P. Small molecule modulators of protein-protein interactions: Selected case studies. *Chem. Rev.*, 2014, vol. 114, issue 9, pp. 4640-4694. dx.doi.org/10.1021/cr4004049.
8. Milroy L.-G., Grossmann T.N., Hennig S., Brunsveld L., Ottmann Ch. Modulators of protein-protein interactions. *Chem. Rev.*, 2014, vol. 114, issue 9, pp. 4695-4748. dx.doi.org/10.1021/cr400698c.
9. Arkin M.R., Tang Y., Wells J.A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing toward the reality. *Chem. & Biol.*, 2014, vol. 21, issue 9, pp. 1102-1114. dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.09.001.
10. Britten R.J., and Davidson E.H. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science*, 1969, vol. 165, pp. 349-357. doi:10.1126/science.165.3891.349.
11. Albagli O., Dhordain P., Deweindt C., Lecocq G., and Leprince D. The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ*, 1995, vol. 6, no. 9, pp. 1193-1198. PMID:8519696.
12. Bellefroid E.J., Poncelet D.A., Lecocq P.J., Revelant O., and Martial J.A. The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, no. 9, pp. 3608-3612. doi: 10.1073/pnas.88.9.3608.
13. Dawson S.R., Turner D.L., Weintraub H., and Parkhurst S. M. Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, vol. 15, no. 12, pp. 6923-6931. PMID:8524259.
14. Grimes H.L., Gilks C.B., Chan T.O., Porter S., and Tschlis P.N. The Gfi-1 protooncoprotein represses Bax expression and inhibits T-cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, no. 25, pp. 14569-14573. PMID:8962093.
15. Friedman J.R., Fredericks W.J., Jensen D.E., Speicher D.W., Huang X.P., Neilson E.G., and F.J. Rauscher III. KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev.*, 1996, vol. 10, pp. 2067-2078. PMID:8769649.
16. Margolin J.F., Friedman J.R., Meyer W.K., Vissing H., Thiesen H.J., and Rauscher F.J. III. Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, no. 10, pp. 4509-4513. PMID:8183939.
17. Klug A., and Schwabe J.W. Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J.*, 1995, vol. 9, no. 8, pp. 597-604. PMID:7768350.
18. Lechner M.S., Begg G.E., Speicher D.W., Rauscher III F.J. Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain KAP-1 corepressor interaction is essential. *Mol. Cell. Biol.*, 2000, vol. 20, no. 17, pp. 6449-6465. PMID:10938122.
19. Collins T., Stone J.R., Williams A.J. All in the Family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN Domains. *Mol. Cell. Biol.*, 2001, vol. 21, no. 11, pp. 3609-3615. PMID:11340155.
20. Wang G., Ma A., Cheok-Man W., Horsley D., Brown N.R., Cowell I.G., Singh P.B. Conservation of Heterochromatin Protein 1 Function. *Mol. Cell. Biol.*, 2000, vol. 20, no. 18, pp. 6970-6983. PMID:10958692.
21. Yokoe T., Toiyama Y., Okugawa Y., Tanaka K., Ohi M., Inoue Y., Mohri Y., Miki C., and Kusunoki M. KAP1 is associated with peritoneal carcinomatosis in gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 2010, vol. 17, issue 3, pp. 821-828. doi: 10.1245/s10434-009-0795-8.
22. Nielsen A.L., Ortiz J.A., You J., Oulad-Abdelghani M., Khechumian R., Gansmuller A., Chambon P., Losson R. Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.*, 1999, vol. 18, no. 22, pp. 6385-6395. PMID:10562550.

23. Schultz D.C., Ayyanathan D.K., Negorev G.G., and Rauscher III F.J. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.*, 2002, vol. 16, pp. 919-932. PMID:11959841.
24. Schultz D.C., Friedman J.R., and Rauscher III F.J. Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev.*, 2001, vol. 15, pp. 428-443. PMID:11230151.
25. Ryan R.F., Schultz D.C., Ayyanathan K., Singh P.B., Friedman J.R., Fredericks W.J., Rauscher III F.J. KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.*, 1999, vol. 19, no. 6, pp. 4366-4378. PMID:10330177.
26. Iyengar S., Ivanov A.V., Jin V.X., Rauscher III F.J., and Farnham P.J. Functional Analysis of KAP1 Genomic Recruitment. *Molecular and cellular biology*, 2011, vol. 31, no. 9, pp. 1833-1847. doi: 10.1128/MCB.01331-10.
27. Hatakeyama Sh. TRIM proteins and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 2011, vol. 11, pp. 792-804. doi:10.1038/nrc3139.
28. Reymond A. Meroni G., Fantozzi A., Merla G., Cairo S., Luzi L., Riganelli D., Zanaria E., Messali S., Cainarca S., Guffanti A., Minucci S., Pelicci P. and Ballabio A. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.*, 2001, vol. 20, no. 9, pp. 2140-2151. doi 10.1093/emboj/20.9.2140.
29. Short K.M., Cox T.C. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J. Biol. Chem.*, 2006, vol. 281, no. 13, pp. 8970-8980. PMID:16434393.
30. Ozato K., Shin D.M., Chang T.H., Morse H.C. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nature Rev. Immunol.*, 2008, vol. 8, pp. 849-860. doi:10.1038/nri2413.
31. McNab F.W., Rajsbaum R., Stoye J.P., O'Garra A. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr. Opin. Immunol.*, 2011, vol. 23, issue 1, pp. 46-56. doi: 10.1016/j.coi.2010.10.021.
32. Meroni G., Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays*, 2005, vol. 27, issue 11, pp. 1147-1157. PMID:16237670.
33. Borden K.L. RING domains: master builders of molecular scaffolds?. *J. Mol. Biol.*, 2000, vol. 295, issue 5, pp. 1103-1112. PMID:10653689.
34. Peng H., Feldman I., Rauscher F.J. Hetero- oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression. *J. Mol. Biol.*, 2002, vol. 320, issue 3, pp. 629-644. PMID:12096914.
35. Le Douarin B., Nielsen A.L., Garnier J.M., Ichinose H., Jeanmougin F., Losson R., Chambon P. A possible involvement of TIF1 α and TIF1 β in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.*, 1996, vol. 15, no. 23, pp. 6701-6715. PMID:8978696.
36. Aasland R., Gibson T.J., Stewart A.F. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends. Biochem. Sci.*, 1995, vol. 20, issue 2, pp. 56-59. PMID:7701562.
37. Jeanmougin F., Wurtz J.M., Le Douarin B., Chambon P., Losson R. The bromodomain revisited. *Trends. Biochem. Sci.*, 1997, vol. 22, issue 5, pp. 151-153. PMID:9175470.
38. Dyson M.H., Rose S., Mahadevan L.C. Acetyllysine-binding and function of bromodomain-containing proteins in chromatin. *Front. Biosci.*, 2001, vol. 6, pp. 853-865. PMID:11487465.

39. Teyssier C., Ou C.Y., Khetchoumian K., Losson R., Stallcup M.R. Transcriptional intermediary factor 1 α mediates physical interaction and functional synergy between the coactivator-associated arginine methyltransferase 1 and glucocorticoid receptor-interacting protein 1 nuclear receptor coactivators. *Mol. Endocrinol.*, 2006, vol. 20, no. 6, pp. 1276-1286. dx.doi.org/10.1210/me.2005-0393.
40. Remboutsika E., Yamamoto K., Harbers M., Schmutz M. The bromodomain mediates transcriptional intermediary factor 1 α -nucleosome interactions. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 52, pp. 50318-50325. PMID:12384511.
41. Eissenberg J.C., Elgin S.C. The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2000, vol. 10, issue 2, pp. 204-210. PMID:10753776.
42. Li Y., Kirschmann D.A., Wallrath L.L. Does heterochromatin protein 1 always follow code? *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, no. 4, pp. 16462-16469. PMID:12151603.
43. Bartova E., Pachernik J., Kozubik A., Kozubek S. Differentiation-specific association of HP1 α and HP1 β with chromocentres is correlated with clustering of TIF1 β at these sites. *Histochem. Cell Biol.* 2007, vol. 127, issue 4, pp. 375-388. PMID:17205308.
44. Cammas F., Oulad-Abdelghani M., Vonesch J.L., Huss-Garcia Y., Chambon P., Losson R. Cell differentiation induces TIF1 β association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction. *J. Cell Sci.*, 2002, vol. 115, no. 17, pp. 3439-3448. PMID:12154074.
45. Klugbauer S., Rabes H.M. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*, 1999, vol. 18, no. 30, pp. 4388-4393. PMID:10439047.
46. Belloni E., Trubia M., Gasparini P., Micucci C., Tapinassi C., Confalonieri S., Nuciforo P., Martino B., Lo-Coco F., Pelicci P., Di Fiore P. 8p11 myeloproliferative syndrome with a novel t(7;8) translocation leading to fusion of the FGFR1 and TIF1 genes. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005, vol. 42, issue3, pp. 320-325. doi:10.1002/gcc.20144.
47. Le Douarin B., Le Douarin B., Zechel C., Garnier J.M., Lutz Y., Tora L., Pierrat P., Heery D., Gronemeyer H., Chambon P., Losson R. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.*, 1995, vol. 14, no. 9, pp. 2020-2033. PMID:7744009.
48. Gandini D., De Angeli C., Aguiari G., Manzati E., Lanza F., Pandolfi P.P., Cuneo A., Castoldi G.L., del Senno L. Preferential expression of the transcription coactivator HTIF1 α gene in acute myeloid leukemia and MDS-related AML. *Leukemia*, 2002, vol. 16, no. 5, pp. 886-893. PMID:11986951.
49. Tsai W.W., Wang Z., Yiu T.T., Akdemir K.C., Xia W., Winter S., Tsai C.Y., Shi X., Schwarzer D., Plunkett W., Aronow B., Gozani O., Fischle W., Hung M.C., Patel D.J., Barton M.C. TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer. *Nature*, 2010, vol. 468, pp. 927-932. doi: 10.1038/nature09542.
50. Chambon M., Orsetti B., Berthe M.L., Bascoul-Mollevis C., Rodriguez C., Duong V., Gleizes M., Thénot S., Bibeau F., Theillet C., Cavaillès V. Prognostic significance of TRIM24/TIF-1 α gene expression in breast cancer. *Am. J. Pathol.*, 2011, vol. 178, issue 4, pp. 1461-1469. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.12.026.
51. Aucagne R., Droin N., Paggetti J., Lagrange B., Largeot A., Hammann A., Bataille A., Martin L., Yan K.P., Fenaux P., Losson R., Solary E., Bastie J.N., Delva L. Transcription intermediary factor 1 γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J. Clin. Invest.*, 2011, vol. 121, issue 6, pp. 2361-2370. doi: 10.1172/JCI45213.
52. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 480 p.
53. Higgins S.J., Hames B.D. Protein Expression. *A practical approach*. Oxford University Press, 1999, 282 p.
54. 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.

55. 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.

56. 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.

57. Kulyyassov A.T., Zhubanova G.S., Ramanculov E.M., Ogryzko V.V. Metod kolichestvennoj ocenki vzaimodejstvij geterohromatinovogo belka NR1 *in vivo* [Method of quantitative evaluation of heterochromatin protein HP1 interactions *in vivo*]. *Biotehnologija. Teorija i praktika - Biotechnology. Theory and practice*, 2014, no. 1, pp. 17-27.

ТҮЙІН

Ақуыз-ақуыздық әрекеттесулер (Protein-protein interactions, PPI) жасуша ішіндегі көптеген процесстерде негізгі рөл атқарады, және олардың аффинділігі мен телімділігі өздері орындайтын функцияларға қатысты нақты реттелген. PPI-мен байланысты сигналдық жолдардың жұмысындағы бұзушылықтар обырдың дамуына және күшеюіне әкеледі. Ақуыз-ақуыздық әрекеттесулерді зерттеулер жасуша ішінде өтіп жатқан процесстердің тетігін түсініп қана қоймай, сонымен бірге ісіктердің алуан түрлерін емдеу үшін PPI төмен молекулалы модуляторларын жасауға да көмектесуге мүмкіндік береді.

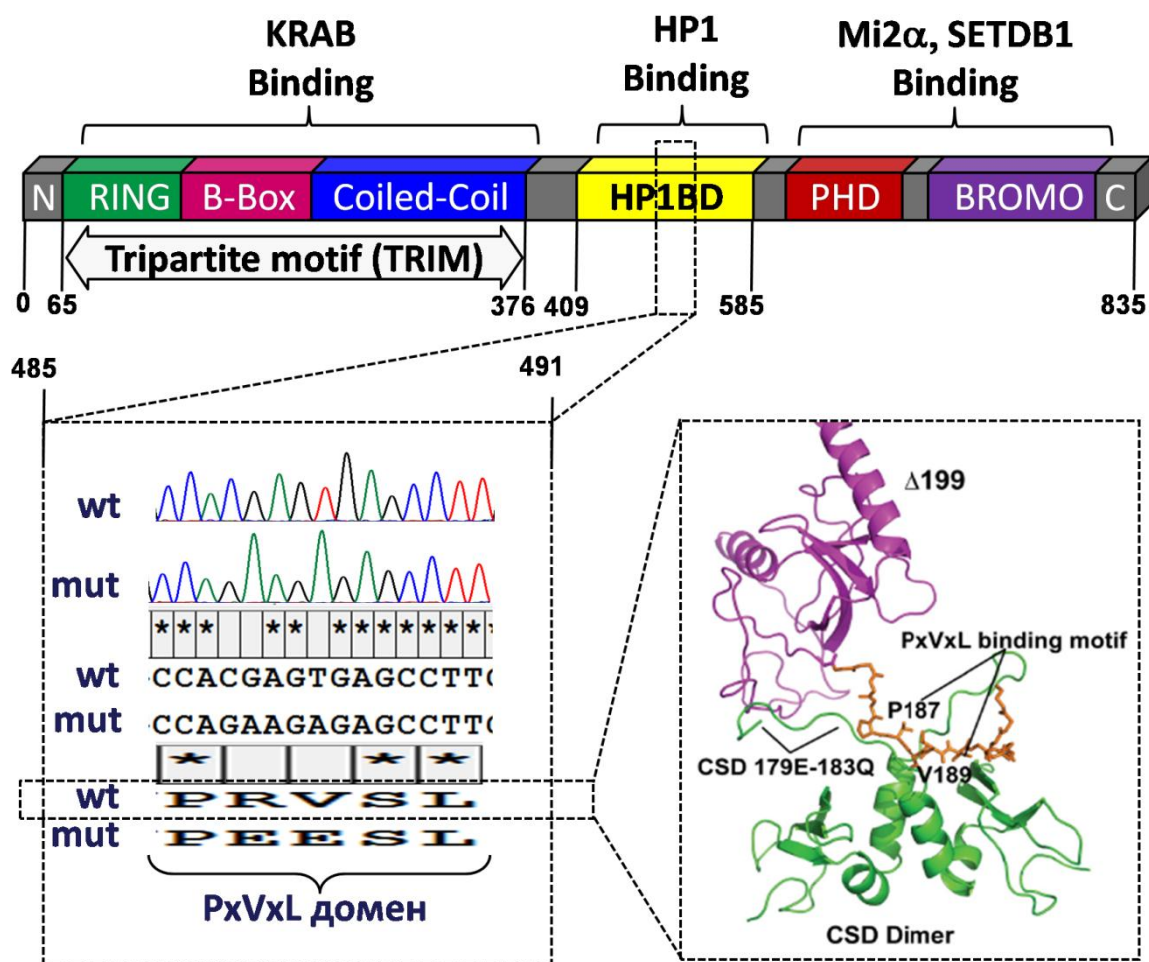
Біз әзірлеген, Proximity Utilizing Biotinylation (PUB) немесе *in vivo* ақуыздарының жақындасуынан (әрекеттесуінен) биотинилдену деп аталған әдіс бір жасуша ішінде рекомбинантты ақуыздардың – BirA биотин лигазасын қажетсінетін ақуыздың және VAP биотині пептидті акцепторымен оның серіктесінің бірлескен экспрессиясына негізделген, ол олардың әрекеттесу дәрежесіне дәл сандық бағалау жүргізуге мүмкіндік береді.

Осы жұмыстың мақсаты *in vivo* HP1 α ақуыздары-онкомаркерлерінің және KAP1 транскрипциялық факторының әрекеттесулерін сандық бағалау әдісін әзірлеу болып табылады.

HEK293T жасушаларында VAP және BirA-мен біріктірілген HP1 α және KAP1 ақуыздарының экспрессиясы бойынша эксперименттерде *in vivo* VAP-HP1 және BirA-wtKAP1 ақуыздарының әрекеттесуі себебінен биотинилдену деңгейінің жоғарылағандығы байқалды. BirA-mutKAP1 және BirA-wtKAP1 үлгілеріндегі VAP-HP1a биотинилдену арасындағы өзара қатынас $0,43 \pm 0,086$ құрады.

Рекомбинантты ақуыздардағы ендірмелердің кері тәртібімен жасалған эксперименттердегі биотинилдену деңгейі VAP-wtKAP1 және BirA-HP1 ақуыздарының әрекеттесулері жағдайында да осыған ұқсас жоғары. BirA-HP1 қатысуымен VAP-mutKAP1 және VAP-wtKAP1 биотинилденуі арасындағы өзара қатынас $0,2 \pm 0,04$ құрады.

Кілтті сөздер: ақуыз-ақуыздық әрекеттесулер, биотинилдену, онкомаркерлер, биотин-лигаза, биотин акцепторының пептиді, плазмидалар, транзиентті трансфекция, иммуноблот.

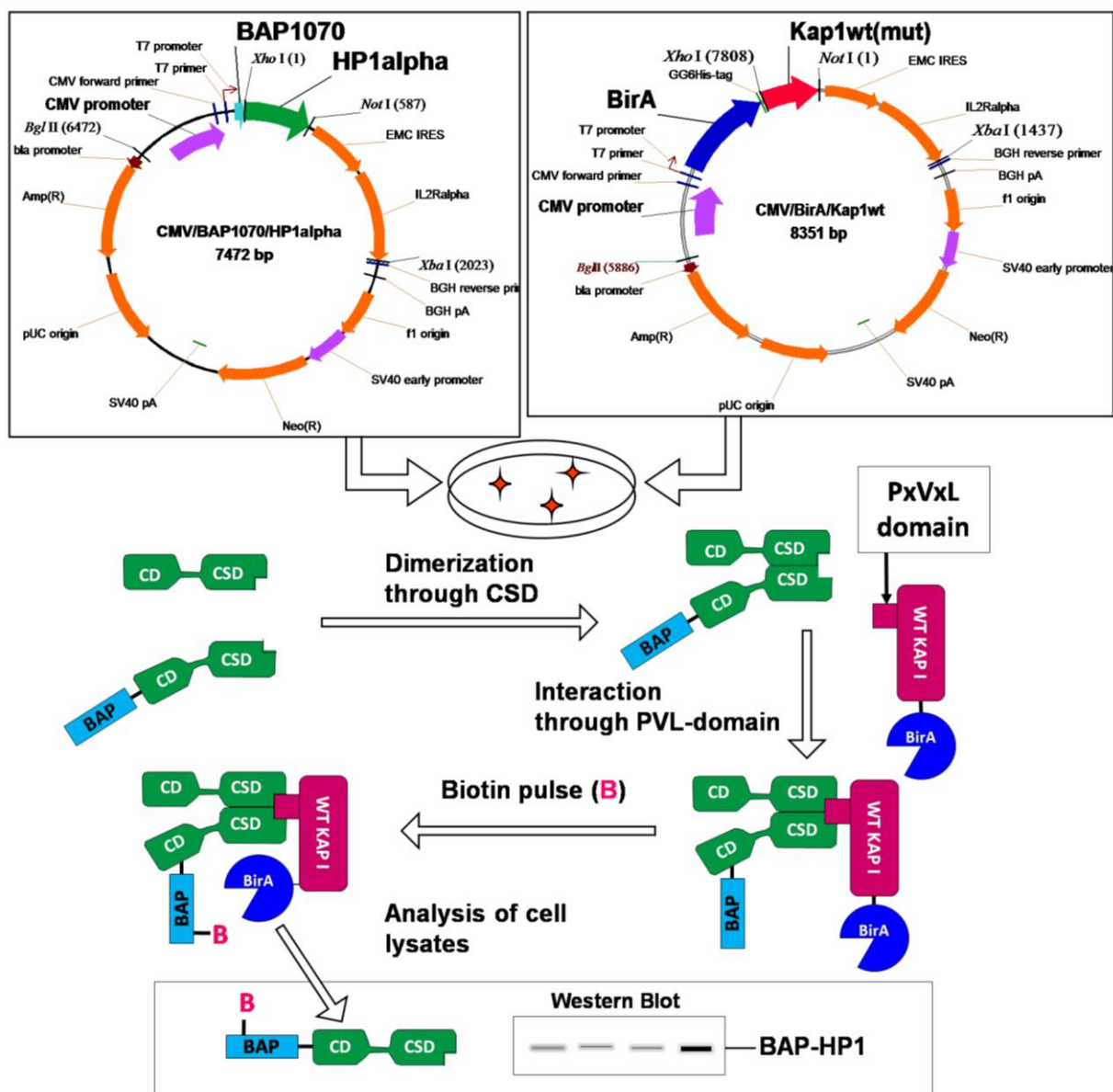


(В группе C-VI для белка TRIM28 (Kap1) в середине последовательности имеется HP1 связывающий (HP1BD) или P×V×L домен). Выравнивание аминокислотных последовательностей, полученных по результатам секвенирования фрагментов плазмидных конструкции дикого типа и мутанта - pcDNA3.1(+).BAP.wt/mutKap1. Совпадения аминокислот отмечены звездочкой: PRVSL или P×V×L-домен, соответствует дикому типу, а PEESL-домен присутствует в мутантной версии KAP1. Для выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали доступную online программу MEGA4. Рисунок пространственной структуры комплекса димера гетерохроматинового белка HP1 с P×V×L-связывающим мотивом приведен в статье Xu X., Lee Y.J., Holm J.B., Terry M.D., Oswald R.E., Horne W.A. The Ca²⁺ channel b4c subunit interacts with heterochromatin protein 1 via PxVxL binding motif // *The journal of biological chemistry*. – 2011. – Vol. 286, №11. – P. 9677-9687.

Рис. 1. Схематическое представление последовательности доменов семейства белков TRIM

Alignment of amino acid sequences obtained by sequencing of the plasmid constructs of wild-type and mutant - pcDNA3.1 (+). BAP.wt / mutKap1. Matches of amino acids marked with an asterisk: PRVSL or P×V×L-domain corresponds to the wild type, and PEESL-domain is present in the mutant version of KAP1. For alignment of nucleotide and amino acid sequences, the program MEGA4 (freely available online) was used. Spatial structure of dimer complex of heterochromatin protein HP1 with P×V×L binding motif is described in the paper Xu X., Lee Y.J., Holm J.B., Terry M.D., Oswald R.E., Horne W.A. The Ca²⁺ channel b4c subunit interacts with heterochromatin protein 1 via PxVxL binding motif. *The journal of biological chemistry*, 2011, vol. 286, no. 11, pp. 9677-9687.

Fig. 1. Schematic representation of the domain sequence of the TRIM family proteins (in group C-VI for the protein TRIM28 (KAP1) in the middle of the sequence HP1 binding (HP1BD) or P×V×L domain is present)

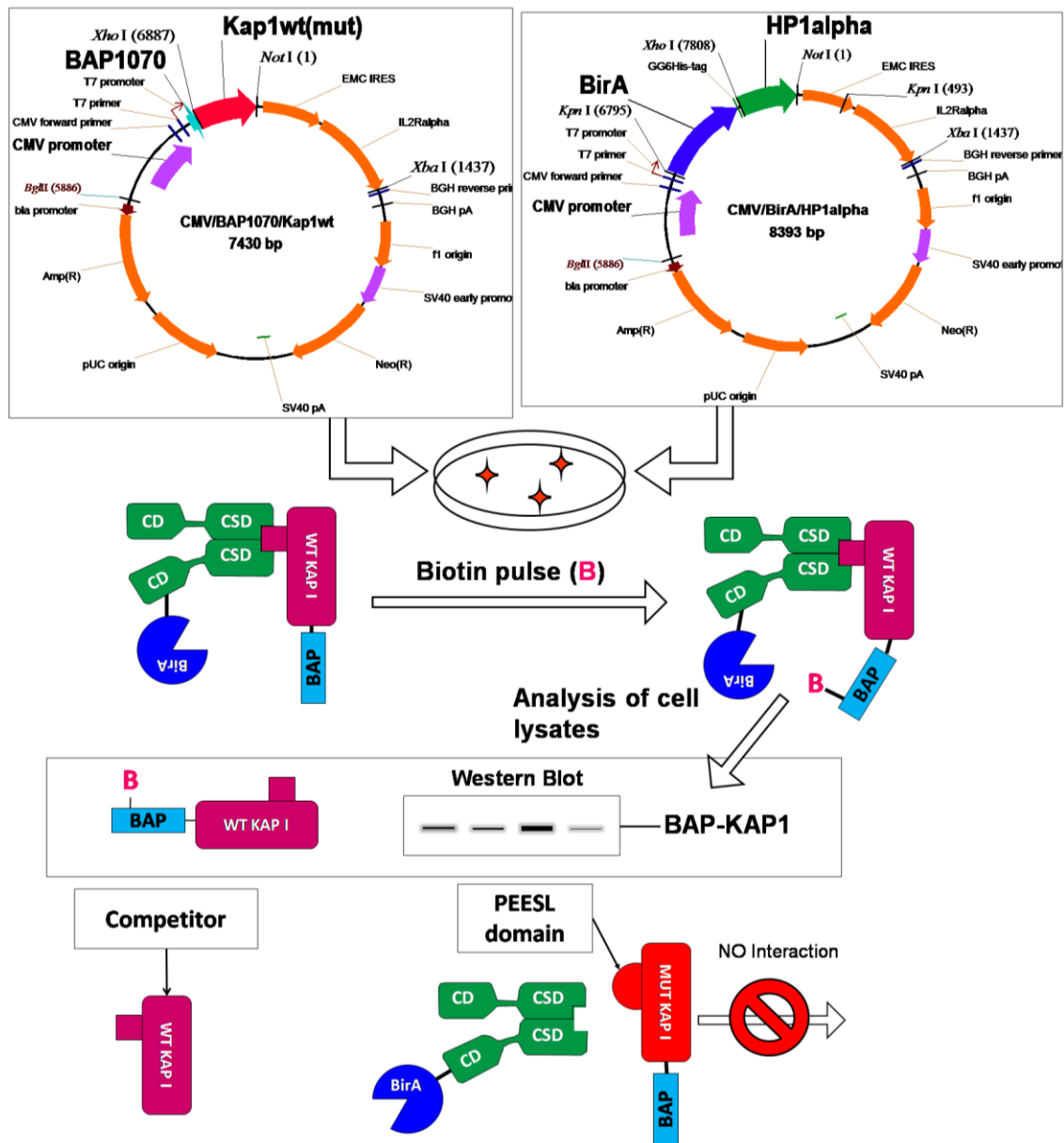


Вверху: Дизайн векторов для трансфекции в эукариотических клетках на примере конструкции, содержащей ген CBX5, кодирующей последовательность гетерохроматинного белка HP1alpha, слитый с BAP, и гена, кодирующего белок транскрипционного фактора дикого типа или мутанта wt(mut)KAP1, слитого с биотин-лигазой BirA. Конструкция получена на основе стандартной плазмиды pcDNA3.1(+) с CMV промотором. Внизу: Дизайн и описание принципа биотинилирования от сближения (взаимодействия) на примере взаимодействия белков HP1 и wtKAP1. *In vivo* взаимодействие белков HP1 и wtKAP1, слитых с пептидом акцептором биотина (BAP) и биотин-лигазой (BirA), соответственно в клетках HEK293T детектируют на основании уровня биотинилирования с помощью Вестерн-блота. Вследствие наличия CSD-домена в белке HP1alpha происходит его димеризация, что приводит к возможности образования комплекса с белком wtKAP1 через P×V×L-домен.

Рис. 2. Схема эксперимента с экспрессией взаимодействующих рекомбинантных белков, конъюгированных с мишенями (BAP) и лигазами (BirA)

Top: Design of vectors for transfection in eukaryotic cells on example of construct, containing CBX5 gene, encoding sequence of heterochromatin protein HP1alpha fused with BAP and gene of wild type and mutant of transcription factor KAP1, fused with biotin-ligase BirA. Vector is constructed on the basis of standard plasmid pcDNA3.1(+) with CMV promoter. Bottom: Design and principle of PUB on the example of interaction between HP1alpha and wtKAP1 proteins. *In vivo* interactions of HP1 and wtKAP1 proteins fused with Biotin Acceptor Peptide (BAP) and biotin-ligase (BirA) respectively in HEK293T cells are detected by measuring of biotinylation level on Western Blot. Due to the presence of CSD-domain in HP1alpha protein, its dimerization occurs, which leads to the possibility of forming a complex with the protein through wtKAP1 P×V×L-domain.

Fig. 2. Scheme of experiment with coexpression of interacting recombinant proteins, fused with targets (BAP) or ligases (BirA)

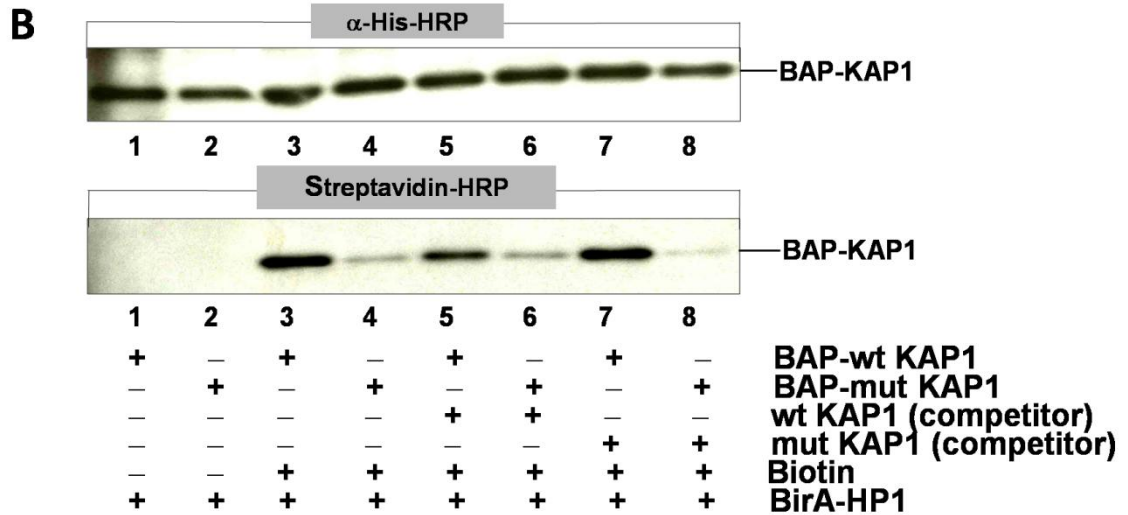
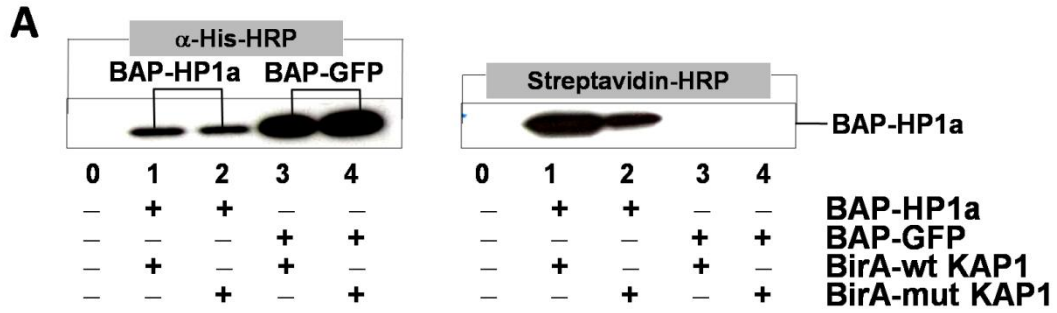


Вверху: Дизайн векторов для трансфекции в эукариотических клетках на примере конструкции, содержащей ген, кодирующей последовательность транскрипционного фактора дикого типа или мутанта wt(mut)KAP1, слитый с BAP, и гена, кодирующего гетерохроматиновый белок HP1alpha, слитого с биотин-лигазой BirA. Внизу: Дизайн и описание принципа биотинилирования от сближения (взаимодействия) на примере взаимодействий белков HP1 и wtKAP1. *In vivo* взаимодействие белков HP1 и wtKAP1, слитых с биотин-лигазой (BirA) и пептидом акцептором биотина (BAP), соответственно в клетках HEK293T детектируют на основании уровня биотинилирования с помощью Вестерн-блота. В качестве дополнительного контроля проводили эксперименты с добавлением конкуратора wt(mut)KAP1. Вследствие наличия мутации в PEESL-домене в белке mutKAP1 происходит значительное ослабление его взаимодействия с димером гетерохроматинового белка HP1alpha.

Рис. 3. Схема эксперимента с обратным порядком вставок в рекомбинантных белках

Top: Design of vectors for transfection in eukaryotic cells on example of construct, containing gene of wild type and mutant of transcription factor KAP1 fused with BAP and, CBX5 gene, encoding sequence of heterochromatin protein HP1alpha fused with biotin-ligase BirA. Bottom: Design and principle of PUB on the example of interaction between HP1alpha and wtKAP1 proteins. *In vivo* interactions of HP1 and wtKAP1 proteins fused with biotin-ligase (BirA) and Biotin Acceptor Peptide (BAP) respectively in HEK293T cells are detected by measuring of biotinylation level on Western-blot. Due to the presence of mutations in PEESL-domain of protein mutKAP1, there is a significant weakening of its interaction with heterochromatin protein dimer HP1alpha.

Fig. 3. The experimental scheme with the reverse order in the inserts of recombinant proteins

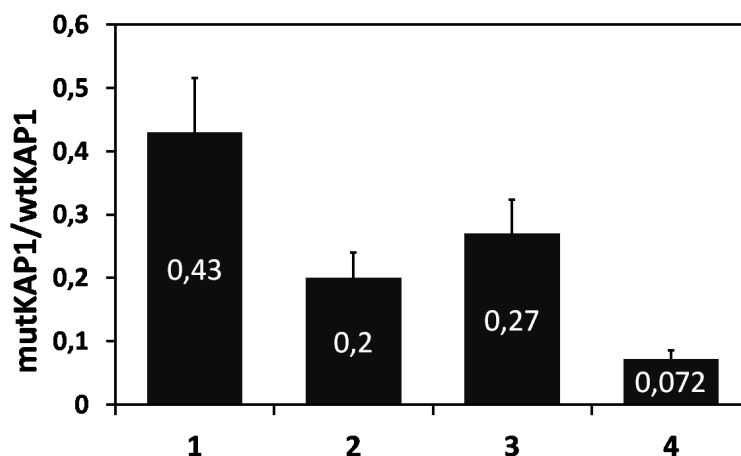


Вверху (4A): Вестерн-блот лизатов ядер клеток HEK293T после трансфекции плазмидами BAP-HP1a+BirA-wt(mut)KAP1, 0 – контроль (трансфекция кальций фосфатом без добавления плазмиды), 1 – трансфекция BAP-HP1a+BirA-wtKAP1; 2 – трансфекция BAP-HP1a+BirA-mutKAP1; 3 – трансфекция BAP-GFP+BirA-wtKAP1; 4 – трансфекция BAP-GFP+BirA-mutKAP1. Время мечения биотином – 30 минут. Внизу (4B): Вестерн-блот лизатов ядер клеток HEK293T после трансфекции плазмидами BAP-wt(mut)KAP1+BirA-HP1α (эксперимент с обратным порядком вставок в рекомбинантных белках). 1, 3, 5, 7 – BAP-wtKap1+BirA-HP1α; 2, 4, 6, 8 – BAP-mutKap1 +BirA-HP1α; 1, 2 – биотин не был добавлен к клеткам; 5, 6 – добавлен 10-кратный избыток плазмиды pM2.wtKap1, экспрессирующей немаркированную wtKap1 как компетитор; 7, 8 – то же самое, что и в 5, 6, только добавлена немаркированная mutKap1 как компетитор; Время мечения биотином – 5 минут.

Рис. 4. Вестерн-блот образцов, содержащих рекомбинантные белки wt(mut)KAP1 и HP1α

Western-blot of HEK293T cell nuclear lysates, after transfection by BAP-HP1α+BirA-wt(mut)KAP1. 0 – control (transfection by calcium phosphate without plasmid), 1 – transfection BAP-HP1α+BirA-wtKAP1, 2 – transfection BAP-HP1α+BirA-mutKAP1, 3 – transfection BAP-GFP+BirA-wtKAP1, 4 – transfection BAP-GFP+BirA-mutKAP1. Biotin pulse – 30 min. Middle (4B): Western-blot of HEK293T cell nuclear lysates, after transfection by BAP-wt(mut)KAP1+BirA-HP1α (the experimental scheme with the reverse order in the inserts of recombinant proteins). 1, 3, 5, 7 – BAP-wtKap1+BirA-HP1; 2, 4, 6, 8 – BAP-mutKap1 +BirA-HP1; 1, 2 – No biotin was added to cells; 5, 6 – 10-fold excess of a plasmid pM2.wt Kap1, expressing untagged wtKAP1BD as competitor was added; 7, 8 – the same as 5,6 but mutKAP1BD used. Biotin pulse – 5 min.

Fig. 4. Western Blot of samples containing recombinant proteins wt(mut)KAP1 and HP1α. Top (4A)



Количественная оценка уровней биотинилирования. Интенсивности сигналов определяли денситометрическим методом, с использованием программы ImageJ 1.47v, а затем сигналы стрептавидиновых блотов нормализовали с учетом сигнала на α -His, показывающее общее количество экспрессируемых белков. 1 – Отношение между биотинилированием BAP-HP1 α в образцах с BirA-mutKap1 и BirA-wtKap1 ($0,43 \pm 0,086$); 2 – Отношение между биотинилированием BAP-mutKap1 и BAP-wtKap1 в присутствии BirA-HP1 ($0,2 \pm 0,04$); 3 – Отношение между биотинилированием BAP-mutKap1 и BAP-wtKap1 в присутствии BirA-HP1 и добавлении конкурента wtKap1 ($0,27 \pm 0,054$); 4 – Отношение между биотинилированием BAP-mutKap1 и BAP-wtKap1 в присутствии BirA-HP1 и добавлении конкурента mutKap1 ($0,072 \pm 0,014$). Показаны средние значения отношений, вычисленные для 3 экспериментов.

Рис. 5. Зависимость уровней биотинилирования от сближения (взаимодействия)

Quantitative evaluation of biotinylation level. The signal intensities were first measured by densitometry with the program ImageJ 1.47v (freely available online), then the streptavidin signal for every BAP-fusion was normalized by dividing it by the α -His signal. 1 – the ratio between biotinylation of BAP-HP1 α in samples with BirA-mutKap1 and BirA-wtKap1 ($0,43 \pm 0,086$), 2 – the ratio between biotinylation of BAP-mutKap1 and BAP-wtKap1 in the presence of BirA-HP1 ($0,2 \pm 0,04$), 3 – the ratio between biotinylation of BAP-mutKap1 and BAP-wtKap1 in the presence of BirA-HP1 and addition of competitor wtKap1 ($0,27 \pm 0,054$); 4 – the ratio between biotinylation of BAP-mutKap1 and BAP-wtKap1 in the presence of BirA-HP1 and addition of competitor mutKap1 ($0,072 \pm 0,014$). Shown are average values calculated for three experiments.

Fig. 5. Biotinylation levels are interaction/proximity dependent