

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034880**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.01

(21) Номер заявки
201500724

(22) Дата подачи заявки
2015.05.28

(51) Int. Cl. **C12Q 1/00** (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ БИОТИН-ЛИГАЗЫ BIRA И ПЕПТИДОВ-АКЦЕПТОРОВ
БИОТИНА ВАР1070 И ВАР1108 ДЛЯ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ IN VIVO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПАР BIRA/ВАР1070 И BIRA/
ВАР1108**

(43) **2016.11.30**

(96) **KZ2015/022 (KZ) 2015.05.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ НА ПРАВЕ
ХОЗЯЙСТВЕННОГО ВЕДЕНИЯ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
БИОТЕХНОЛОГИИ" КОМИТЕТА
НАУКИ МИНИСТЕРСТВА
ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН (KZ)**

(56) KULYYASSOV Arman et al. PUB-MS: A Mass Spectrometry-based Method to Monitor Protein - Protein Proximity in vivo. Journal of proteome research, 2011, 10(10): pp. 4416-4427

FERNANDEZ-SUAREZ Marta et al. Protein-Protein Interaction Detection In Vitro and in Cells by Proximity Biotinylation. J Am Chem Soc., 2008, 130(29): pp. 9251-9253

(72) Изобретатель:
**Кулыясов Арман Табылович,
Раманкулов Ерлан Мирхайдарович
(KZ), Огрызько Василий Викторович
(FR)**

(57) Изобретение относится к генной инженерии, биохимии, биотехнологии, клеточной биологии и протеомике и может быть использовано для создания метода ранней диагностики рака. Согласно изобретению предлагается использовать биотин-лигазу BirA попарно с пептидами-акцепторами биотина ВАР1070 и ВАР1108 для мультиплексного детектирования in vivo белок-белковых взаимодействий в динамике или в определенный момент времени. При этом пептиды ВАР1070 и ВАР1108 характеризуются близкими значениями кинетики связывания биотина, одинаковыми уровнями экспрессии, различными величинами m/z и имеют длину в 27 а.о.

B1**034880****034880****B1**

Предпосылка изобретения

Одной из важнейших задач биологии является полное определение состава живой клетки и его компартментов, а также реконструкция пространственной структуры на молекулярном уровне и в динамике (Wodak Sh. J., Vlasblom J., Turinsky A. L., Pu Sh. Protein-protein interaction networks: the puzzling riches//Curr. Opin. in Struct. Biol. -2013, vol. 23, Issue 6, p. 941-953). Для решения этой задачи в первую очередь необходимо выявить, и систематизировать близость между различными компонентами в клетке и осуществлять их мониторинг во времени и в зависимости от физиологического состояния (Wells J. A., McClendon Ch. L. Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces//Nature. - 2007, vol. 450, No. 13, p. 1001-1009.). При этом белок-белковые взаимодействия (Protein-protein interactions, PPI) являются частным случаем более общих типов динамической самоорганизации в создании пространственно-временного порядка внутри клетки. Таким образом, детектирование сближения между белками может предоставить информацию не только об их взаимодействии, но и выявить некоторые аспекты пространственной организации *in vivo*, которые невозможно получить из экспериментов *in vitro* (Mosca R., Pons T., Ceol A., Valencia A., Aloy P. Towards a detailed atlas of protein-protein interactions//Curr. Opin. in Struct. Biol. - 2013, vol. 23, Issue 6, p. 929-940). Белок-белковые взаимодействия являются молекулярной основой большинства физиологических процессов, как в здоровой, так и в больной клетке. В случае возникновения рака PPI выполняют значимые регуляторные функции, например, в клеточном делении или передаче сигнала в клетке (Westermarck J., Ivaska J., Cordials G. L. Identification of protein interactions involved in cellular signaling//Mol. Cell. Proteomics. - 2013, vol. 12, No. 7, p. 1752-1763). Специфичность и аффинность этих взаимодействий чрезвычайно важна, поскольку их изменения приводят к неправильному функционированию клетки, как, например, неконтролируемый клеточный рост, характерный для развития опухоли (Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: The next generation//Cell. - 2011, vol. 144, p. 646-674). В связи с этим фармацевтическая индустрия сейчас крайне заинтересована в поиске и разработке модуляторов PPI-биологических агентов (таких как антитела) или небольших синтетических соединений для нужд медицины (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). 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 млн долларов США (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; 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, p. 393-400; 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). Поэтому разработка методов детектирования и количественной оценки белок-белковых взаимодействий *in vivo* является актуальной задачей, позволяющей помочь в создании лекарственных средств - модуляторов PPI.

В настоящее время существует несколько подходов для мониторинга белок-белкового сближения внутри живой клетки, среди которых следует отметить такие методы как FRET, BRET (Boute N., Jockers R., Issad T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. Trends Pharmacol. Sci. - 2002, vol. 23, p. 351-354), PCA и различные виды двух-гибридных систем (Lievens S., Lemmens I., Tavernier J. Mammalian two-hybrids come of age. Trends Biochem. Sci. 2009, vol. 34, p. 579-588). Однако они имеют определенные ограничения, как, например, невысокая чувствительность, небольшой динамический диапазон или детектирование сближения на коротких расстояниях (1-10 нм). Одним из перспективных подходов для решения этих проблем является метод, основанный на использовании пары фермент/субстрат, который позволяет пометить взаимодействующий или близко расположенный белок с помощью ковалентно-связанной метки. Меченые пептиды в дальнейшем можно анализировать с помощью Вестерн-блота, масс-спектрометрии или конфокальной микроскопии. Масс-спектрометрия является стандартным методом протеомики, позволяющий различать тысячи ионов с различными значениями величины m/z (отношение массы иона к заряду) и достоверно идентифицировать практически все белки, а также предоставляющим возможность мультиплексирования или мониторинга нескольких взаимодействий в одном эксперименте (Westermeyer R., Naven T., Höpker H. -R. Proteomics in practice. - Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GmbH, 2008, p. 482). Однако для приготовления образца требуется полностью лизировать клетку и, таким образом, информация о пространственном расположении и динамике внутри клетки становится недоступной (Von Hagen J. Proteomics sample preparation. - Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GmbH, 2008, p. 453).

Конфокальная микроскопия, напротив, предоставляет пространственную информацию внутри живой клетки (Pawley James. Handbook of biological confocal microscopy. Third edition. - 2006. Springer, p. 349). Оба метода имеют определенные недостатки, но в то же время обладают набором взаимодополняемых достоинств (фиг. 1), сочетание которых позволит получить наиболее полную и детальную информацию о процессах, происходящих внутри живой клетки.

Детальное описание изобретения

Изобретение относится к геной инженерии, биохимии, биотехнологии, клеточной биологии и протеомике, и может быть использовано для создания метода ранней диагностики рака.

Предлагаемый метод основан на специфическом мечении взаимодействующих (или сближенных) белков *in vivo*. Целью изобретения является специфическое детектирование взаимодействия (сближения) белков с использованием биотин-лигазы (BirA) и пептида акцептора биотина (Biotin Accepting Peptide - BAP), который является специфической мишенью фермента BirA (фиг. 2). Например, если интересующий нас белок А конъюгирован с BirA, в то время как другой белок В конъюгирован с BAP, то в случае взаимодействия или сближения исследуемых белков А и В друг с другом, фермент будет катализировать сайт-специфичное ковалентное присоединение биотина к пептиду BAP, что можно определить с помощью Вестерн-блота, масс-спектрометрии или конфокальной микроскопии.

Для практического осуществления этой идеи сконструированы два типа векторов - для экспрессии белков слитых с BirA и для экспрессии белков слитых с BAP (фиг. 3). Причем каждый тип вектора сконструирован в двух формах, регулирующих экспрессию белка с помощью сильного CMV (Cytomegalovirus) или слабого MoMuLV (Moloney murine leukemia virus) промоторов. Поскольку белок, слитый с ферментом BirA, многократно, без изменений, участвует в реакциях мечения биотином, то его количество по отношению к субстрату (белку, слитому с BAP) должно быть намного меньше (мишени BAP-B >> лигазы BirA-A). Поэтому для трансфекции можно использовать две плазмиды - CMV.BAP.B для экспрессии большого количества мишеней и MoMuLV.BirA.A для экспрессии минимально необходимого количества лигаз, что является крайне важным для количественного анализа.

В составе аминокислотной последовательности пептида BAP введены два фланкирующих остатка аргинина, который после трипсинолиза образует пептид, позволяющий идентифицировать его методом хромато-масс-спектрометрии LC-MS/MS (обозначен как BAP/MS на фиг. 3). Причем, для экспериментов предложены два варианта этого пептида, в одном имеется валиновый остаток (BAP1070), а в другом он заменен на гистидиновый (BAP1108), что позволяет проводить мультиплексные эксперименты с двумя типами меток, отличающимися величиной *m/z* (фиг. 3). В структуре плазмиды имеется также консенсусная Kozak последовательность ACCATG перед BAP, необходимая для инициации трансляции в эукариотических клетках (Kozak M.//J. Cell Biol., 1991, v. 115, N. 4, p. 887-903). Наряду с остатками аргинина в структуре домена BAP имеется также 7×His маркер, для возможности очистки или/и мониторинга количества белка-мишени вне зависимости от статуса его биотинилирования.

Для проверки того, что спроектированные пептиды BAP биотинилируются лигазой BirA, проведен модельный эксперимент с трансфекцией клеток HEK293T плазмидами MoMuLV.BirA.GFP и CMV.BAP.GFP. Несмотря на то, что белок GFP может образовывать димеры (Chalfie M., Kain S.R. Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and protocols; Wiley-Liss: New York, 1998), основная цель эксперимента заключалась не в детектировании взаимодействия GFP-GFP, а в тестировании биотинилирования пептида BAP, поскольку даже фоновое биотинилирование, обусловленное случайными столкновениями между невзаимодействующими белками, может вызвать заметно-детектируемый сигнал. В результате проведенных опытов не только удалось обнаружить уровень биотинилирования BAP-GFP, но и оказалось, что он практически линейно зависит от времени инкубации клеток биотином (фиг. 4).

Следует отметить, что в параллельном эксперименте, где проводили котрансфекцию GFP, слитую с другой последовательностью BAP (MAGLNDIFEAQKIEWHE), использованной ранее (Viens A., Mechold U., Lehrmann H., Harel - Bellan A., Ogryzko V. Use of protein biotinylation *in vivo* for chromatin immunoprecipitation.//Anal. Biochem. - 2004, 325, p. 68-76) биотинилирование проходило с большей скоростью (время полунасыщения -15 мин, в сравнении с 680 мин для новой последовательности BAP1070 и 700 мин для BAP1108). Вследствие того, что насыщение уровня биотинилирования BAP затухивает разницу в эффективности биотинилирования, то более медленная кинетика биотинилирования новой последовательности пептида BAP позволяет проводить более точную корреляцию биотинилирования BAP и белок-белкового сближения.

Поскольку в клетках млекопитающих требуется экспрессия бактериального биотинилирующего фермента BirA, то необходимо создание гуманизированной версии этого белка. Аминокислотная последовательность BirA является кодон-оптимизированной, где наиболее редкие кодоны заменены кодонами, наиболее часто используемыми в человеческих клетках. Гуманизированная версия BirA, которая используется в этом методе, имеет более высокую экспрессию в клетках, что приводит к лучшему биотинилированию *in vivo* (Mechold U., Gilbert C., Ogryzko V. Codon optimization of the BirA enzyme gene leads to higher expression and an improved efficiency of biotinylation of target proteins in mammalian cells//Journal of Biotechnology. - 2005, vol. 116, p. 245-249).

Наиболее близкими прототипами предлагаемого метода являются методы, основанные на использовании биотин лигазы BirA и пептида акцептора биотина AP(-3) (Fernandez-Suarez, M.; Chen, T. S.; Ting, A. Y. Protein-protein interaction detection *in vitro* and *in cells* by proximity biotinylation//J. Am. Chem. Soc. - 2008, No. 130, p. 9251-9253) или пептида BAP (Kulyassov 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, p. 4416-4427).

Недостатком первого прототипа, где используется пептид AP(-3) является узкий динамический диапазон времени мечения биотином. Для получения разницы в сигналах биотинилирования авторы этой работы проводили мечение за 1 мин до лизирования клетки. Недостатком второго прототипа, несмотря

на широкий динамический диапазон времени мечения, является ухудшение экспрессии белков в случае замены валинового остатка (V) на фенилаланиновый (F), либо осложнение обнаружения и количественной оценки, из-за побочной реакции пропионилирования остатка тирозина в случае замены V→Y.

Технической задачей изобретения является улучшение метода детектирования белок-белкового взаимодействия на основе пары BirA/BAP путем подбора дополнительного нового пептида с близкими значениями кинетики мечения биотином, с одинаковым уровнем экспрессии и без осложнений побочной реакцией с пропионовым ангидридом. Необходимость в разработке нового пептида обусловлена потребностью использования его в экспериментах с мультиплексированием, позволяющим проводить одновременный мониторинг двух взаимодействий внутри клетки. В сравнении с методом, где применяют дорогие стабильные изотопы (метод SILAC, Ong S. E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture., SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics//2002 - Molecular & Cellular Proteomics., vol. 1, No. 5, p. 376-386), мультиплексный подход выгодно отличается дешевизной. Поставленная техническая задача достигнута заменой в пептиде BAP валинового остатка на гистидиновый V→H.

Отличием предлагаемого метода от прототипов является возможность использования двух пептидов BAP1070 и BAP1108, обладающих близкими динамическими диапазонами биотинилирования и одинаковыми уровнями экспрессии в клетках, но различными величинами m/z, что позволяет проводить более точные мультиплексные эксперименты для изучения белок-белковых взаимодействий in vivo.

Конструирование плазмиды pcDNA3.1(+).BAP1108.H2Az

Для получения плазмиды с новым вариантом пептида акцептора биотина BAP1108 проведен дизайн олигонуклеотидов-праймеров, содержащих сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции KpnI и XbaI, что позволило провести клонирование по этим сайтам в векторную плазмиду pcDNA3.1(+).

Праймеры (двойное подчеркивание сайтов рестрикции KpnI и XbaI, одинарное подчеркивание сайтов BglII, XhoI и NotI, жирным шрифтом указана последовательность Kozak):

Primer 1 NKpnIBAD:

CACACACAGGTACCAGATCTTGA**ACCATGGG**ACACCATCACCATCACCAT
CATGGCCTGACA

Primer 2 NXhoIBAD:

CATCACCATCATGGCCTGACAAGAATCCTGGAAGCTCAGAAGATCCAC
AGAGGAGGCCTCGAG

Primer 3CH2AZNotXba IAS:

TGTGTGTGTCTAGAGCGGCCGCTAGACAGTCTTCTGTTGTC

ПЦР проводили в два раунда. В качестве матрицы для первого раунда ПЦР-амплификации BAP1108-H2Az использовали плазмиду pOz.BAP1135.H2Az (вариант пептида BAP с тирозином Y). Условия ПЦР: денатурация 94°C - 15 с, отжиг 54°C - 30 с, элонгация 72°C - 1 мин, количество циклов - 20.

После первого раунда ПЦР продукты реакции разделяли методом электрофореза в 0.8% агарозном геле, затем окрашивали с помощью бромистого этидия и с помощью скальпеля вырезали фрагмент, соответствующий по размеру ампликону (размер около 400 п.н.). Затем вырезанный кусочек геля, содержащий ампликон, помещали в пробирки из набора для выделения ДНК из агарозного геля фирмы Millipore (номер по каталогу LSKGEL050) и центрифугировали при 5000 g 10 мин. Полученный раствор с очищенным ампликоном использовали для второго раунда ПЦР.

В каждом раунде ПЦР смешивали смеси 1 и 2 и загружали в ПЦР амплификатор (табл. 1). 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) помещали в пробирки с фильтрующими элементами из набора для очистки продуктов ПЦР фирмы Millipore (номер по каталогу P36461, Rev. A, 03/05) и добавляли 300 мкл воды. Откручивали в центрифуге при 1000 g в течение 15 мин для удаления солей и праймеров. 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.

Полученный ампликон BAP1108-H2Az клонировали в вектор pcDNA3.1(+). Векторную ДНК pcDNA3.1(+).BAP1070.HP1γ (1 мкг), а также продукт ПЦР-амплификации BAP1108-H2Az подвергали гидролизу рестриктазами KpnI и XbaI (20 е.а. в 20 мкл реакционной смеси) в соответствующих буферных растворах при 37°C в течение 2 ч. Гидролизат разделяли электрофорезом в 0.8% агарозном геле, затем окрашивали с помощью бромистого этидия. 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 4°C.

После трансформации компетентных клеток E. coli штамма DH5α и отбора клонов, несущих рекомбинантные плазмиды со встроенным геном, получали плазмиду pcDNA3.1(+).BAP1108.H2Az, из которого заменой рамки считывания H2Az на другие гены (HP1α, HP1β, HP1γ, H2A) с помощью рестриктаз XhoI и NotI получали плазмиды, использованные в следующих примерах.

Таблица 1. Состав смесей 1 и 2 для синтеза ВАР1108-Н2Аз

Первый раунд ПЦР			
Смесь 1 (объем 25 мкл)		Смесь 2 (объем 25 мкл)	
Компоненты	Объем, мкл	Компоненты	Объем, мкл
1 Primer 2 NXhoIBAD	0.5	10x буфер ПЦР	5.0
2 Primer 3CH2AZNotXba IAS	0.5	MgSO ₄	5.0
3 pOz.BAP1135.H2Az (200 мкг)	0.5	Pwo полимеразы	0.5
4 H ₂ O	18.5	H ₂ O	14.5
5 dNTP (2,5 мМ)	5.0		
Второй раунд ПЦР			
Смесь 1 (объем 25 мкл)		Смесь 2 (объем 25 мкл)	
Компоненты	Объем, мкл	Компоненты	Объем, мкл
1 Primer 1 NKpnIBAD	0.5	10x буфер ПЦР	5.0
2 Primer 3CH2AZNotXba IAS	0.5	MgSO ₄	5.0
3 Смесь с первого раунда ПЦР	0.1	Pwo полимеразы	0.5
4 H ₂ O	18.9	H ₂ O	14.5
5 dNTP (2,5 мМ)	5.0		

Сущность изобретения поясняется следующими примерами конкретного выполнения изобретения.

Пример 1. Количественная оценка гетерологичного белок-белкового взаимодействия паралога гетерохроматинового белка HP1 α и HP1 γ

Белки HP1 образуют семейство на основании наличия в их структуре двух консервативных доменов: хромодомена (CD) и хромошэдоу домена (CSD), разделенных гибким звеном (Lomberg G., Wallrath L., Urrutia R. The Heterochromatin Protein 1 family//Genome Biol. - 2006, vol. 7, Issue 7, p. 228.1-228.8). Геном мыши кодирует три вида HP1 α , HP1 β и HP1 γ с функциями, аналогичными белкам из Drosophila (Singh P. B., Miller J. R., Pearce J., Kothary R., Burton R. D., Paro R., James T. C., Gaunt S. J. A sequence motif found in a Drosophila heterochromatin protein is conserved in animals and plants//Nucleic Acids Res. - 1991, vol. 19, № 4, p. 789-794). Родственные три вида белков HP1 закодированы также в геноме человека (Minc E., Allory Y., Courvalin J. C., Buendia B. Immunolocalization of HP1 proteins in metaphasic mammalian chromosomes//Methods Cell Sci. - 2001, vol. 23, Issue 1-3, p. 173-176). HP1 α является прогностическим маркером на наличие рака в организме человека (US Patent US2012/0046190 A1, 23 февраля 2012), изменение экспрессии которого в опухолевых клетках в сравнении со здоровыми клетками позволяет достоверно диагностировать рак молочной железы и опухоль мозга (Dialynas G. K., et al.//Mutation Research, 2008, v. 647, Issue 1-2, p. 13-20), рак мочевого пузыря, яичников и поджелудочной железы (De Koning L., et al.//EMBO Mol Med., 2009, v. 1, Issue 3, p. 178-191). Гетерохроматиновые белки HP1 образуют олигомеры благодаря наличию в структуре CSD домена.

Процент гомологии в аминокислотной последовательности участка CSD домена между паралогами гетерохроматиновых белков млекопитающих HP1 α и HP1 β составляет 70-90%. Эта же величина между HP1 α и HP1 γ составляет более 90% (Zeng W., Ball A. R., Yokomori K. HP1: heterochromatin binding proteins working the genome.//Epigenetics. - 2010, vol. 5, No. 4, p. 287-292). Рамка считывания (ORF) гена белка HP1 α состоит из 575 п.н., а молекулярная масса белка 22,23 кДа. ORF HP1 β - 558 п.н., а масса 21,42 кДа. ORF HP1 γ - 552 п.н., а масса белка 20,81 кДа.

Чтобы проверить пригодность двух пептидов ВАР1070 и ВАР1108 для мультиплексных экспериментов, использовали плазмиды, в которых они конъюгированы с HP1 α и HP1 γ . Выбор именно этих паралогов гетерохроматинового белка обусловлен тем, что они имеют наибольшее отличие по молекулярной массе и поэтому их легче разделить с помощью белкового электрофореза. Кроме того, CSD домены HP1 α и HP1 γ , ответственные за белок-белковое взаимодействие, имеют более высокую гомологию, в сравнении с HP1 β . Ранее было установлено, что степень гомологичного взаимодействия HP1 α -HP1 α и HP1 β -HP1 β примерно одинакова в пределах ошибки эксперимента, несмотря на большую разницу в последовательности CSD доменов (Кулясов А.Т., Жубанова Г.С., Раманкулов Е.М., Огрызко В.В. Метод количественной оценки взаимодействий гетерохроматинового белка HP1 in vivo II Биотехнология. Теория и практика. - 2014, - №1, с. 17-27). Эти результаты, свидетельствуют также о небольшой разнице между эффективностью взаимодействий HP1 α -HP1 α и HP1 α -HP1 γ что можно использовать для тестирования нового варианта пептида ВАР1108.

Протокол транзientной трансфекции клеток HEK293T

За 1 день до трансфекции посеяли 200,000 клеток HEK293T в каждую лунку 6 луночной планшеты в 2 мл среды DMEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки и 1% смеси антибиотиков пенициллин и стрептомицин. На следующий день за 1 ч до трансфекции поменяли среду на свежую 2 мл DMEM. Для проведения трансфекции в расчете на 1 лунку подготовили 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 2М раствора хлорида кальция и рассчитанное согласно табл. 2 внизу количество плазмидных ДНК. Во вторую пробирку (раствор В) загрузили 250 мкл буферного раствора 2xHBS (Состав 2xHBS на 200

мл): Нерес 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 добавляли раствор А к раствору В, оставляли на 15 мин и затем добавляли полученную смесь к клеткам HEK293Т.

На следующий день поменяли среду на новую DMEM. За 10 или 30 мин до сбора клеток поменяли среду на DMEM, приготовленную добавлением 10 мкл раствора биотина (1 мг/мл) и 100 мкл 50 mM HEPES (pH 7.35) к 2 мл среды (мечение биотином 10 и 30 мин). Для сбора клеток удалили среду, затем добавили 1 мл раствора PBS, ресуспендировали и перенесли в пробирку на 1.5 мл. Затем пробирки центрифугировали при +4°C, 700 gcf, 5 мин, удаляли супернатант и добавляли к клеткам по 100 мкл раствора буфера CSK, содержащего 0,5% тритона (Состав CSK - 100 mM NaCl, 300 mM сахароза, 10 mM Tris, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1.2 mM PMSF, 0.5% Triton X-100), пипетировали несколько раз и центрифугировали при 4000 rpm, 5 мин.

В результате на данном этапе метода были получены ядра клеток HEK293Т, 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: 2,4 мл 1M Трис, 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 мин) и открыли на мини-центрифуге на максимальной скорости. Электрофорез и иммуноблоттинг образцов осуществляли согласно методике из сборника (Higgins S. J., Hames B. D. Protein Expression. A practical approach, Oxford University Press, 1999, p. 282).

На фиг. 5 приведены результаты иммуноблоттинга образцов, полученных из ядер клеток HEK293Т. Уровень экспрессии рекомбинантных белков-мишеней, который пропорционален интенсивностям сигналов на мембранах, обработанных антителами α-His, заметно не изменяется при замене VAP1070 на VAP1108, как для HP1α так и для HP1γ. Следует отметить, что это связано с тем, что для трансфекции использовали плазмиды с близкими значениями A260/280 (табл. 2). В качестве контроля в этих экспериментах использовали трансфекцию без плазмид (образцы 0 и 0') или трансфекцию, где в качестве мишеней брали VAP-HP1β и VAP-GFP.

Уровень биотинилирования VAP-HP1β (нижний блот, образец 1, фиг. 5) оказался сопоставимым с уровнем для образцов 2 и 3, показывающим уровень взаимодействия BirA-HP1γ+VAP-HP1α+VAP-HP1γ. Аналогично уровни биотинилирования BirA-HP1γ+VAP-HP1α и BirA-HP1γ+VAP-HP1γ также оказались близкими. В то же время в экспериментах с заменой BirA-HP1α+VAP-HP1α и BirA-HP1α+VAP-HP1γ также наблюдалась картина с близким уровнем биотинирования (образцы 2' и 3'). В качестве контроля в этом эксперименте использовали VAP-GFP (образец 1'), который, несмотря на высокую экспрессию (согласно интенсивностям пятен на мембране α-His) и более длительное время мечения биотином (30 мин) не показал сигнал на мембране, обработанном конъюгатом стрептавидин-HRP, поскольку HP1 не взаимодействует с белком GFP.

Таблица 2. Расчет количеств плазмид для трансфекции

Плазмида	С, нг/мкл	A260/280	Кол-во, мкг	Объем, мкл
CMV.VAP1070.HP1α	289	1.86	1	3.4
CMV.VAP1070.HP1γ	370	1.86	1	2.7
CMV.VAP1108.HP1α	393	1.87	1	2.6
CMV.VAP1108.HP1γ	277	1.87	1	3.6
CMV.VAP1070.HP1β	280	1.86	1	3.5
CMV.VAP1070.GFP	200	1.85	0.5	2.5
CMV. BirA.HP1α	99	1.83	0.2	2.0
CMV. BirA.HP1γ	121	1.72	0.2	0.8

Протокол подготовки образца для LC-MS/MS

Фрагмент геля от предыдущего эксперимента с дорожкой от цветного белкового маркера отмывали в 30 мл дистиллированной воды 2 ч. Затем воду слили и с помощью скальпеля вырезали кусок геля, ориентируясь на сигналы белков HP1α и HP1γ на Вестерн-блоте относительно цветного белкового маркера. Вырезанные куски геля поместили в свободные от кератина пробирки Эппендорф на 1.5 мл.

Обработка образца пропионовым ангидридом

Перед началом реакции образец промыли 100 мкл смеси ацетонитрил:50 mM бикарбонат аммония (1:1) в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем удалили супернатант. Кусочки геля обрабатывали 100 мкл смеси 30%-ного пропионового ангидрида в метаноле при 37°C в течение 1 ч в присутствии 40 мкл 50 mM бикарбоната аммония (Robin Ph., Fritsch L., Philipot O., Svinarchuk F., Ait-Si-Ali S. Post-translational modifications of histones H3 and H4 associated with the histone methyltransferase Suv39h1 and G9a//Genome Biology. - 2007, vol. 8, Issue 12, p. 270.1-270.10). Затем удалили супернатант и промыли кусочки геля для последующей обработки трипсином.

Промывка и трипсинолиз образца

Промывку кусков геля осуществляли сначала 100 мкл смеси ацетонитрил:50 mM бикарбонат аммо-

ния (1:1) в течение 10 мин, затем удалили супернатант и добавили 100 мкл чистого ацетонитрила и перемешивали 10 минут при комнатной температуре. Повторили промывку 3 раза, а затем поместили образцы на SpeedVac на 5 минут для удаления остаточного ацетонитрила. Затем в каждую пробирку добавили по 100 мкл активированного трипсина (Westermeyer R., Naven T., Höpker H. - R. Proteomics in practice. - Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GmbH, 2008, p. 482).

Активированный трипсин получали прибавлением 15 мкл 190 mM раствора бикарбоната аммония к 100 мкл раствора гидрохлорида трипсина (Promega, V5280) с концентрацией 13.33 нг/мкл. Пробирки поместили в термоблок на 3 часа при 37°C при интенсивном перемешивании. После этого пробирки открутили на центрифуге, а супернатант перенесли в специальную пробирку для анализа на масс-спектрометре. Затем поместили образцы на SpeedVac и открутили пробирки под вакуумом досуха (около 40-60 мин при 40°C). В каждую пробирку прибавили по 7 мкл раствора для анализа ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}:\text{HCOOH}$, 3:97:0.1%) и поместили пробирки в автосэмплер хромато-масс-спектрометра (Agilent nanoHPLC 3D 6340 IonTrap). Отнесение пиков на масс-спектрах и идентификацию пептидов после MRM осуществляли их сравнением с теоретическими рассчитанными спектрами MS2, полученных с помощью программы Biolyx. Параметры наноВЭЖХ: режим MicroFlow Mode, скорость потока в колонке - 0.6 мкл/мин, время остановки - 16 мин, диапазон давления, минимум - 0 бар, максимум - 150 бар; растворители А: $\text{H}_2\text{O}+0.1\% \text{HCOOH}$, В: 90% $\text{CH}_3\text{CN}+10\% \text{H}_2\text{O}$; график времени - 0 мин - 3% В, 12.5 мин - 55% В, 15 мин - 95% В, 15.01 мин - 3% В.

Поскольку пептиды BAP1070 и BAP1108 близки по свойствам, т.е. как по уровню экспрессии в клетке, так и по скорости биотинилирования, но отличаются друг от друга величиной m/z , то это позволяет различать их методом LC-MS/MS и проводить мультиплексные эксперименты с одновременным мониторингом двух белков. В качестве модели для этого эксперимента выбрали систему с экспрессией рекомбинантных белков BAP1070-HP1 α +BAP1108-HP1 γ +BirA-HP1 γ . На фиг. 6 приведены хроматограммы и спектры MS/MS, показывающие пропионилированные и биотинилированные формы пептидов BAP1070 и BAP1108, отличающиеся по величинам m/z и временам удерживания, площади пиков в которых имеют определенные значения, пропорциональные содержанию в образце, что позволяет оценить уровень биотинилирования. Уровень биотинилирования (k_B) вычисляли по формуле $k_B = A_B / (A_B + R_e \times A_P)$, где A_B - площадь пика биотинилированной формы BAP, A_P - площадь пика пропионилированной формы BAP.

Коэффициент R_e в формуле, равный 0.1 для обоих пептидов BAP1070 и BAP1108, представляет собой отношение эффективностей ионизации биотинилированной формы по отношению к пропионилированной форме пептида (Gao Y. and Wang Y. A Method to Determine the Ionization Efficiency Change of Peptides Caused by Phosphorylation//J. Am. Soc. Mass Spectrom. -2007, vol. 18, p. 1973-1976), вычисленная с помощью метода SILAC (Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D. B., Steen H., Pandey A., Mann M. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics//2002. - Molecular & Cellular Proteomics., vol. 1, No. 5, p. 376-386).

По результатам анализа данных установлено, что уровень биотинилирования BAP1070-HP1 α +BirA-HP1 γ составляет 0.47, а уровень биотинилирования BAP1108-HP1 γ +BirA-HP1 γ равен 0.49. Полученные данные свидетельствуют о том, что нет большой разницы между гомологичным и гетерологичным взаимодействием двух форм: гетерохроматинового белка HP1.

Таким образом, показано, что варианты BAP1070 и BAP1108 являются оптимальными и удобными пептидами для проведения мультиплексных экспериментов по изучению белок-белковых взаимодействий *in vivo*.

Пример 2. Изменения в динамике состояния хроматина проксимального к белку RAD18

Отличительная особенность предлагаемого метода заключается в том, что в случае экспрессии белков, в которых BAP-пептид конъюгирован с гистоном, появляется возможность изучать хроматин в непосредственной близости к интересующему нас белку, конъюгированному с BirA. Более того, этот хроматин также имеет постоянную метку, поскольку при сближении биотин остается ковалентно связанной с мишенью, после того как взаимодействие между BAP- и BirA-слитыми партнерами будет потеряно, что предоставляет возможность изучения процессов в динамике. Среди возможных потенциальных применений такого типа анализа является изучение транспорта белков, измерение стабильности и последовательных модификации определенной фракции белков, которая была частью комплекса со специфическим белком-партнером.

Для проверки данного предположения была выбрана модель изучения проксимального к белку RAD18 хроматина в специфические времена после биотинилирования. Для этого использовали метод иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии для мониторинга распределения биотинилированного хроматина спустя 6 часов после его мечения BirA-RAD18. За 6 ч до мечения биотином клетки HEK293T клетки обрабатывали УФ-светом (мощность 20 Дж/м²), чтобы вызвать образование фокусов, в которых происходит ДНК-репарация и в которых накапливаются белки RAD18 (Sale J. E., Lehmann A. R., Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage//Nature Rev./Mol. Cell. Biol. - 2012, vol. 13, p. 141-152). Затем клетки были либо зафиксированы немедленно после мечения

биотином (Pulse labeling) либо интенсивно отмыты от биотина и оставлены в свежей среде на 6 ч до фиксации (Chase labeling). Образцы, помеченные как Pulse, показали явную колокализацию белков BAP-H2A с фокусами RAD18 (фиг. 7, верхний ряд). Однако, в образцах Chase после 6 ч колокализация биотинилированных фокусов и фокусов RAD18 была значительно менее выражена (фиг. 7, средний и нижний ряд).

Протокол транзientной трансфекции клеток HEK293T

Экспрессию рекомбинантных белков из полученных плазмид pcDNA3.1(+).BAP.H2A, pcDNA3.1(+).BirA.Rad18 осуществляли в клетках HEK293T с применением кальций-фосфатного метода (Graham F. L., van der Eb A. J. // Virology. - 1973, vol. 52, No 2, p. 456-467) с расчетом количеств плазмид согласно табл. 3. Обработку клеток биотином проводили за 15 мин до сбора клеток. Сбор, выделение ядер и Вестерн-блот образцов осуществляли аналогично приведенной выше методике для примера 1. Часть образца использовали для подготовки на иммунофлуоресцентную конфокальную микроскопию.

Таблица 3. Расчет количеств плазмид для трансфекции

Плазмида	C, нг/мкл	A260/280	Кол-во, мкг	Объем, мкл
CMV.BAP1108.H2A	500	1.84	0.5	1.0
CMV. BirA.Rad18	1400	1.85	0.3	0.2
CMV. BirA.GFP	1200	1.80	0.2	0.16

Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия

Клетки HEK293T промыли два раза холодным раствором PBS и фиксировали погружением в метанол при -20°C на 5 мин. Зафиксированные клетки промыли холодным раствором PBS и затем пермеализировали 0.2%-ным раствором Triton X-100 в PBS в течение 10 мин при 4°C и подвергли добавочному фиксированию 4%-ным формальдегидом: при комнатной температуре 20 мин. Затем клетки промыли раствором PBS.

Блокирование проводили 3%-ным раствором БСА 30 мин при медленном перемешивании. Клетки инкубировали мышиными моноклональными антителами на анти-RAD18 (Abcam; ab57447) с последующей трехкратной отмывкой раствором PBS при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали козьими антимышинными вторичными антителами, конъюгированными с Alexa-488 (Invitrogen; A11017) в течение 1 ч (разведение 1/1000). Конъюгаты Streptavidin-Cy3 (Sigma; S-6402) и ToPro (Invitrogen) также были добавлены (отношение 1/500 и 1/1000 соответственно) к той же инкубационной смеси. После 3 ч промывок раствором PBS покровные стекла поместили на стеклянные слайды с использованием среды (Vector Laboratories, H-1000). Клетки визуализировали на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 510 Meta используя объективы Plan-Apochromat 63×1.4. Изображения получены с помощью последовательного мультитракового сканирования отдельными длинами волн лазеров при 488 и 543 нм.

Таким образом, еще одним преимуществом данного метода является возможность изучения динамики белок-белковых взаимодействий. Как было показано выше pulse-chase мечение биотином может быть использовано для мониторинга в динамике меченого BAP-слитого белка после взаимодействия его с BirA-слитым белком-партнером. Этот подход представляет особенный интерес для изучения многостадийных внутриклеточных процессов, где меняются взаимодействующие партнеры и свойства этих белков (как например локализация или пост-трансляционная модификация).

Перечень фигур

Фиг. 1 - сравнение преимуществ (белый фон) и недостатков (черный фон) конфокальной микроскопии и масс-спектрометрии;

фиг. 2 - детектирование белок-белкового взаимодействия (сближения) с помощью биотин-лигазы (BirA) и пептида акцептора биотина (BAP);

фиг. 3 - дизайн векторов с указанием положения CMV/MoMuLV промоторов и нуклеотидных последовательностей BirA и BAP относительно рамки считывания генов белков A и B;

фиг. 4 - новые варианты пептида BAP1070 и BAP1108 биотинилируются с меньшей скоростью по сравнению со старой версией BAP. Вверху. Сравнение биотинилирования новых пептидов BAP (ILEAQKIVR и ILEAQKIHR, справа) и старого пептида BAP (MAGLNDIFEAQKIEWHE, слева) в присутствии BirA-GFP по результатам анализа иммуноблотинга. Верхний ряд; сигнал α-6×His-HRP; нижний ряд; сигнал стрептавидин-HRP. Внизу. Кривые кинетики биотинилирования трех пептидов BAP. Для построения кривой сигнал стрептавидин-HRP нормализовали с учетом соответствующего сигнала α-6×His-HRP. Для каждого отдельного эксперимента нормализованное значение уровня биотинилирования в каждой точке времени делили на соответствующее значение для временной точки 24 ч этого же эксперимента, который принимали за 100%. На графике приведены усредненные значения трех экспериментов;

фиг. 5 - мультиплексный подход определения уровня биотинилирования паралогов гетерохроматинового белка HP1α и HP1γ с помощью иммуноблотинга. Верхние блоты обработаны антителами α-His-HRP, нижние антибиотинные блоты обработаны конъюгатом стрептавидин-HRP. 0 и 0' - контрольные образцы, обработанные реагентом для трансфекции (фосфатом кальция) без плазмид. Время мечения биотином 10 мин (левые блоты) и 30 мин (правые блоты);

фиг. 6 - эксперимент с мультиплексированием с помощью tandemной хромато-масс-спектрометрии LC-MS/MS. Справа: Фрагментация MS/MS пропионилированных и биотинилированных вариантов пеп-

тидов BAP1070 и BAP1108 с ионами у- и b-серий. Слева: Хроматограмма экстрагированных ионов (Extracted Ion Chromatogram, EIC) наиболее интенсивных фрагментированных ионов из соответствующих MS/MS-спектров, полученных в режиме MRM-детекции;

фиг. 7 - анализ колокализации фокусов внутри клетки. Уменьшение колокализации между белком Rad18 и биотинилированным хроматином. В верхнем ряду изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии, демонстрирующие строгую колокализацию между белком Rad18 и биотинилированным хроматином в ядрах клеток НЕК293Т сразу же после 15-минутного мечения биотином (Pulse-labeling). В середине - снимки указывают на различную локализацию белка Rad18 и биотинилированного хроматина после 6 ч с момента 15-минутного мечения биотином (Chase). Внизу - увеличенная область Chase-эксперимента демонстрирующая, что фокусы биотинилирования не колокализуются с фокусами белка Rad18 и наоборот (указано стрелками).

Нуклеотидная последовательность пептида BAP1070 (5' -> 3'):
 ACCATGGGACACCATCACCATCACCATCATGGCCTGACAAGAATCCTGGAAGCTCAGAAGAT
 CGTGAGAGGAGGCCTCGAG

Аминокислотная последовательность пептида BAP1070 (N-конец -> C-конец):
 TMGNNNNNNHGLTRILEAQKIVRGGLLE

Нуклеотидная последовательность пептида BAP1108 (5' -> 3'):
 ACCATGGGACACCATCACCATCACCATCATGGCCTGACAAGAATCCTGGAAGCTCAGAAGAT
 CCACAGAGGAGGCCTCGAG

Аминокислотная последовательность пептида BAP1108 (N-конец -> C-конец):
 TMGNNNNNNHGLTRILEAQKIHRRGGLLE

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Применение биотин-лигазы BirA и пептидов-акцепторов биотина BAP1070 и BAP1108 для мультиплексного детектирования белок-белковых взаимодействий *in vivo* в динамике или в определенный момент времени с использованием пар BirA/BAP1070 и BirA/BAP1108, где указанные пептиды-акцепторы BAP1070 и BAP1108 характеризуются близкими значениями кинетики связывания биотина, одинаковыми уровнями экспрессии и различными величинами m/z, имеют длину в 27 а.о. и кодируются нуклеиновыми кислотами из 81 п.н., содержащими

консенсусную последовательность Kozak ACCATG на 5'-конце;

7 триплетов His-tag-маркера в положении 10-30;

в положениях 40 и 67 триплеты фланкирующих остатков аргинина, необходимых для трипсинолиза и образования пептида для идентификации и анализа с помощью масс-спектрометрии;

в положении 58 триплет остатка лизина для ковалентного присоединения биотина;

в положении 64 триплет остатка валина (BAP1070) или гистидина (BAP1108), причем пептиды-акцепторы биотина имеют следующие последовательности:

BAP1070

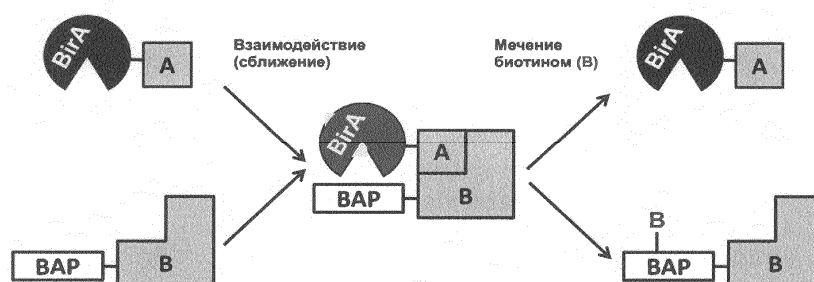
	10	20	30	40	50	60	70	80
ACCATGGGACACCATCACCATCACCATCATGGCCTGACAAGAATCCTGGAAGCTCAGAAGATCGTGAGAGGAGGCCTCGAG								
T M G H H H H H H G L T R I L E A Q K I V R G G L E								

BAP1108

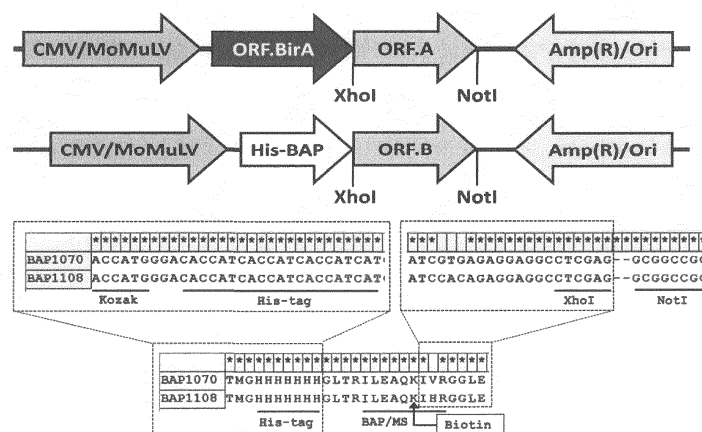
	10	20	30	40	50	60	70	80
ACCATGGGACACCATCACCATCACCATCATGGCCTGACAAGAATCCTGGAAGCTCAGAAGATCCACAGAGGAGGCCTCGAG								
T M G H H H H H H G L T R I L E A Q K I H R G G L E								



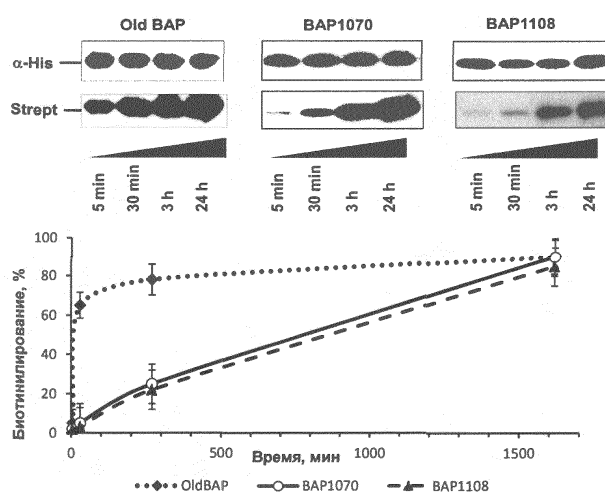
Фиг. 1



Фиг. 2



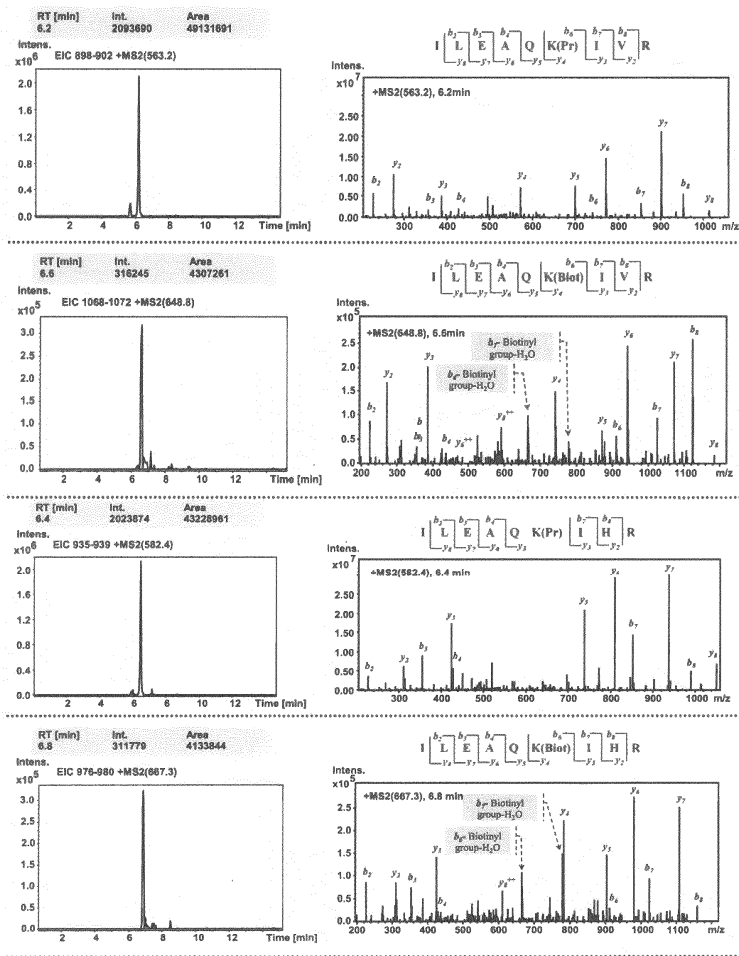
Фиг. 3

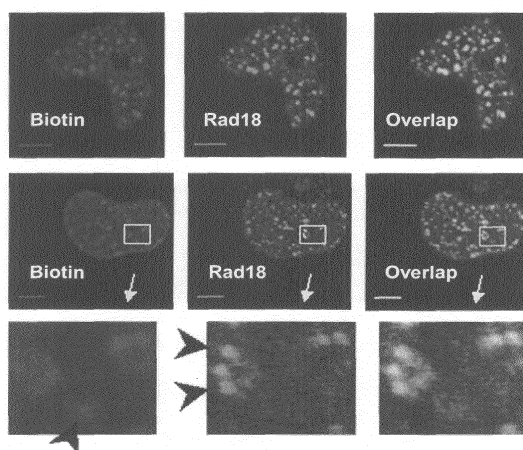


Фиг. 4



Фиг. 5





Фиг. 7

