

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики

к.б.н. Олексій Юрійович Нипорко

Протокол №____ засідання кафедри

Від “___” _____ 2022 р.

**Створення генетичних конструкцій для бактеріальної та
еукаріотичної експресії білків, потенційно здатних
взаємодіяти з РН доменом білка BCR/ABL**

Випускна кваліфікаційна робота магістра

студентки спеціальності 16.162

Високі технології (Біотехнологія)

Кричун Анастасії Костянтинівни

Науковий керівник від кафедри

кандидат біологічних наук

Драган Анатолій Іванович

Робота виконана у відділі молекулярної генетики

Інституту молекулярної біології і генетики

Під керівництвом к.б.н. **Гур'янов Дмитро Сергійович**

Оцінка захисту роботи

Київ

2022

Зміст

1. Вступ	4
2. Літературний огляд.....	6
2.1. Хронічна мієлоїдна лейкемія	6
2.2. Білок BCR-ABL	6
2.3. Білкові домени BCR	7
2.4. Білкові домени ABL	7
2.5. Взаємодія доменів з функціями клітин	7
2.6. Сигнальні шляхи BCR-ABL.....	8
2.6.1. STAT	8
2.6.2. RAS.....	8
2.6.3. PI3K.....	8
2.6.4. ROS.....	8
2.7. Білок SMC	9
2.7.1. Молекулярні особливості білка	10
2.7.2. Комплекси SMC.....	10
2.7.3. Когезин.....	11
2.7.4. Конденсин	12
2.7.5. Участь SMC білків у мейозі.....	12
2.7.6. SMC1 участь у канцерогенезі	13
2.8. FBP17.....	13
2.9. Взаємодія SMC1 та FBP17 з BCR-ABL.....	14
3. Матеріали та методи досліджень.....	15
3.1. Штам <i>E. coli</i>	15
3.2. Розчини, буфери, поживні середовища	15
3.3. Плазмідні.....	16
3.4. Ферменти.....	16
3.5. Створення компетентних клітин <i>E. coli</i>	17
3.6. Трансформація компетентних клітин	17
3.7. Виділення плазмід <i>pCDNA-SMC1</i> , <i>pGEX</i> , <i>pmCherry-FBP</i>	18

3.8. Очищення плазмід	18
3.9. Рестрикція плазмід pCDNA-SMC1, pGEX, pmCherry-FBP	18
3.10. Виділення фрагментів плазмідної ДНК з гелю	19
3.11. Лігування	20
3.12. Експресія білку конструкції pGEX4T1-FBP17 та pGEX4T2-CTTN 21	
4. Результати	22
4.1. Створення генетичної конструкції pGEX4T1-FBP17	22
4.2. Створення генетичної конструкції SMC1-mCherry	24
4.3. Результат експресії білку генетичної конструкції pGEX4T1-FBP17 та pGEX4T2-CTTN.....	26
4.4. Результат експресії білку генетичної конструкції pGex з кортактином.	27
5.Висновки	29
6.Література	30

1. Вступ

Хронічна мієлоїдна лейкемія відрізняється від інших видів раку наявністю філадельфійської хромосоми. У результаті помилки перебудови хромосом 9 та 22 в соматичних клітинах їх частини з'єднуються та формується філадельфійська хромосома. Ген *abl1* хромосоми 9 поєднується з геном *bcr* хромосоми 22. Результатом цієї транслокації є онкогенний білок BCR-ABL, який через свою постійну кіназну активність викликає неконтрольований поділ клітини. [24] В залежності від місця розриву хромосоми 22 та гену *bcr* у природі зустрічаються 3 типи білка BCR-ABL: p190 BCR-ABL, p210 BCR-ABL and p230 BCR-ABL. Усі ці різновиди мають у своєму складі кільцевий олігомеризований домен та серін/треонін кіназний домен. PH домен зустрічається лише у p210 та p230. Вони ж і є найбільш розповсюдженими видами BCR-ABL. [21]

Були проведені дослідження на культурі клітин K562, у яких наявна філадельфійська хромосома, які показали, що ряд білків може взаємодіяти з доменом PH білку BCR-ABL. [20] Серед цих білків є FBP17 та SMC1A. Обидва білка грають важливу роль у клітині. SMC1A необхідний при перебудові хромосом під час мітозу та мейозу, а FBP17 є складовим цитоскелету клітини.

Вивчення взаємодії PH домену онкогенного білка з клітинними білками може відкрити нові лікарські мішені для подолання хронічної мієлоїдної лейкемії.

Кортактин – це актин-зв'язувальний білок, який задіяний у цитоскелетній регуляції, дуже часто він надекспресується у ракових клітин. Кортактин прискорює формування інваподій, які руйнують позаклітинний матрикс та підвищують інвазивність клітини та формування метастаз. Різні види лейкемії характеризуються високою експресією кортактину. [25]

Задля вивчення взаємодії між BCR-ABL та білками FBP17 та SMC1A була поставлена мета підготувати генетичні конструкції для вивчення взаємодії білків шляхом флуоресцентної мікроскопії. Для цього були поставлені наступні задачі:

- 1) Створити генетичну конструкцію, що кодує повнорозмірний білок SMC1A з флуоресцентним білком mCherry;
- 2) Створити генетичну конструкцію, що кодує повнорозмірний білок FBP17 у векторі pGex;
- 3) Перевірити експресію білка конструкції pGex-4T1-FBP17;
- 4) Перевірити експресії білка генетичної конструкції pGex4T2-CTTN.

2. Літературний огляд

2.1. Хронічна мієлоїдна лейкемія

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) є мієлопроліферативним захворюванням, що характеризується двофазним або трифазним протіканням хвороби: повільна хронічна фаза, яка переходить у прогресуючу фазу та агресивну бластофазу. [1] За повільної хронічної фази у крові знаходиться менше 10% бластів – незрілих лейкоцитів. За прогресуючої фази від 10% до 19% бластів, а за агресивної – більше 20%. [2] 90% повнолітніх з ХМЛ мають Філадельфійську хромосому. Філадельфійська хромосома з'являється за реципрокної транслокації [t(9;22)(q34;q11)] та об'єднанні ABL тирозинкінази в 9 хромосомі з BCR геном у 22 хромосомі. У результаті утворюється химерний онкоген BCR-ABL.

2.2. Білок BCR-ABL

Молекулярна маса білка BCR-ABL варіюється в межах 185-230 кДа в залежності від того в якому місці гену BCR відбудеться розрив. [3] BCR-ABL P210 зустрічається у 98% хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію, а P190 у 80% випадках гострого лімфобластного лейкозу з філадельфійськими хромосомами. [21] Білок BCR-ABL приймає участь у сигнальних процесах, які впливають на адгезію клітин, на сигналінг під час мітозу, інгібування апоптозу та трансформацію кровотворних стовбурових клітин. [4] Інгібування тирозин-кіназної активності BCR-ABL призводить до зниження проліферації ХМЛ клітин з Філадельфійською хромосомою. [3]

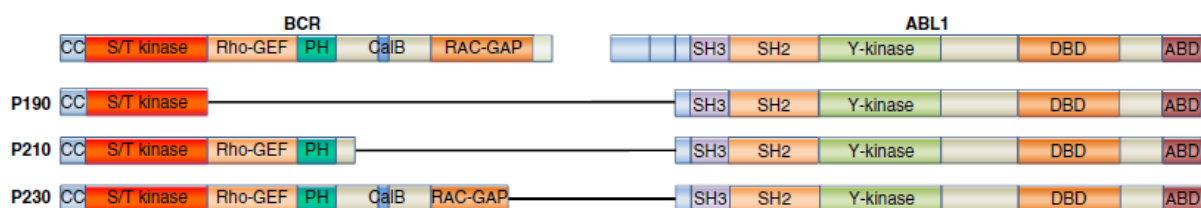


Рис. 2.1. Структури генів BCR та ABL1 з основними білковими доменами. В залежності від точки розриву у гені BCR, білок може складатись з доменів: CC – кільцевий олігомеризований домен, серін/треонін кіназний домен (S/T-kinase), Rho-GEF – Rho гуанідін нуклеотид обмінний фактор, PH – домен гомології плекстрину, Cal-B – домен кальцій залежного зв'язування ліпідів та урізаний домен RAC-GAP.

2.3. Білкові домени BCR

CC олігомеризуючий домен, що складається з 61 амінокислотного залишку, спричиняє гомотетраолігомеризацію BCR та завдяки цьому активує ABL кіназу. Через кіназну активність BCR-ABL відбувається автофосфорилування 177 тирозину в BCR, який є найбільшим сайтом приєднання в BCR-ABL. Саме Tyr177 регулює фосфорилування тирозину скафолдного білка Gab2. Білок Gab2 є необхідним для мієлоїдної трансформації BCR-ABL. [4]

2.4. Білкові домени ABL

Тирозин кіназа ABL разом з доменами SH2 та SH3 гомологічна до родини Src-протеїнкіназ. Також ABL має білковий домен ядерної локалізації, 3 ДНК-зв'язуючі домени, та актин-зв'язуючий домен. [4]

2.5. Взаємодія доменів з функціями клітин

Мутації в SH2 та SH3 доменах ABL призводили до того, що клітина перетворювалася на фібробласт, а не кровотворну клітину. Видалення олігомеризуючого домену призводило до блокування кіназної активності BCR-ABL. SH2 домен не приймає участі у трансформації клітини, видалення ділянки зв'язування CRKL-SH3 зменшує здатність онкобілку до трансформації фібробластів. Наявність пролін-збагаченого домену CRKL-SH3 трансформує мієлоїдні клітини через наявність факторів росту клітини. CRKL може приєднувати фосфорильовані за тирозином білки до ферментів та активувати шляхи трансформації лейкоцитів. [5] BCR-ABL у клітині

співлокалізується з цитоскелетом та приєднується С-кінцевою частиною до актину за рахунок ділянок зв'язування з актином. Цитоскелет клітин з Філадельфійською хромосомою складається з більшої кількості F-актину, ніж нормальні клітини та тирозин їх цитоскелетних білків більш фосфорильований. [6]

2.6. Сигнальні шляхи BCR-ABL

BCR-ABL приймає участь у таких сигнальних шляхах: шлях передачі сигналу та активації транскрипції (STAT), RAS, фосфатидилінозитол-3 кіназний шлях (PI3K) та шлях реактивного кисню (ROS). [4]

2.6.1. STAT

У клітин ХМЛ постійно увімкнений JAK/STAT. Втручання у цей сигнальний шлях призводить до некоректної роботи імунного відклику, а також призводить до вимкнення інтерферон-приєднувальної ділянки ICSPR. Це порушує гемопоез клітин. [4]

2.6.2. RAS

Цей шлях відповідає за апоптоз. Таким чином клітини з BCR-ABL вимикають цю здатність клітини. [7]

2.6.3. PI3K

PI3K шлях може фосфосфорилувати фосфатидилінозитол (PI) у D3 положенні, зазвичай утворюються такі вторинні месенджери PI-(3,4)-біфосфат та PI-(3,4,5)-трифосфат. PI3K відповідає за виживання, проліферацію, ріст, синтез білка. У ракових клітинах цей шлях завжди увімкнений. [8]

2.6.4. ROS

Коли кровотворні клітини трансформуються через BCR-ABL, у клітині збільшується кількість реактивного кисню. Надмірна експресія супероксиду генерує NADPH оксидазу Mox1 в фібробластах, що

призводить до росту клітини та індукує нові ракові утворення. [9] Деякі ферменти вкрай чутливі до оксидизації. Наприклад, оксидизація Cys118 в RAS призводить до активації ГТФази. [4]

2.7. Білок SMC

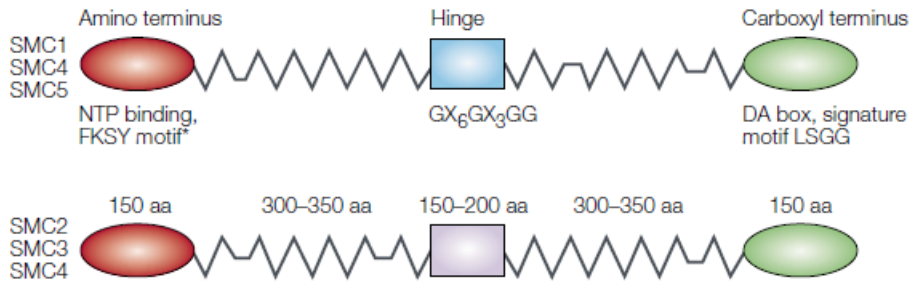


Рис. 2. 2. Загальна структура шести членів родини SMC білків. Гетеродимери утворюються між двома типами субодиниць.

Субодиниці комплексу SMC контролюють четвертинну структуру хромосоми, когезію сестринських хроматид, конденсацію хромосом, рекомбінацію ДНК та відновлення пошкоджених ділянок. До складу субодиниць SMC входять: «голова» у вигляді ABC АТФази, має вигляд петлі, «шарнір» димеризовані домени та 49 нм спіральні «руки». [10]

«Голова» молекули може приєднуватись або від'єднуватись від хромосоми в залежності від наявності АТФ. [10]

Родина SMC має 6 підвидів білків. Білки SMC зустрічаються у природі димерами. Відомі димери: SMC1/SMC3, SMC2/SMC4, SMC5/SMC6. Кожен димер має специфічні функції. [11]

2.7.1. Молекулярні особливості білка

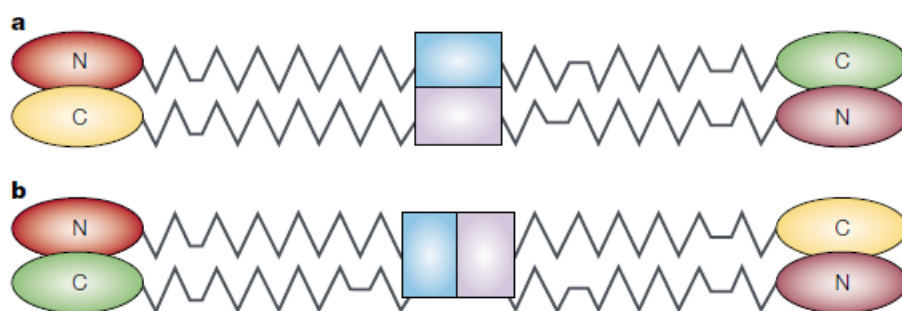


Рис. 2. 3. Дві моделі фолдинга та гетеродимеризації білка SMC. А) Два білка SMC взаємодіють по всій довжині. В) Димеризація відбувається тільки в «голові» молекули.

C-кінець SMC, на відміну від N-кінця має високу специфічність до подвійної структури ДНК. Це відбувається завдяки наявності збагаченої А-Т ділянки. Домени, що розташовані на с-кінці викликають АТФ-незалежне розходження комплементарних ділянок ДНК та зменшують вигини ДНК. [12]

«Голова» молекули має вигляд петлі. Завдяки своїй формі SMC молекула гнучка та дозволяє двом «рукам» молекули відчинятись та закриватись. Гнучкість α -спіралі досягається чотирма консервативними гліциновими залишками. [12]

2.7.2. Комплекси SMC

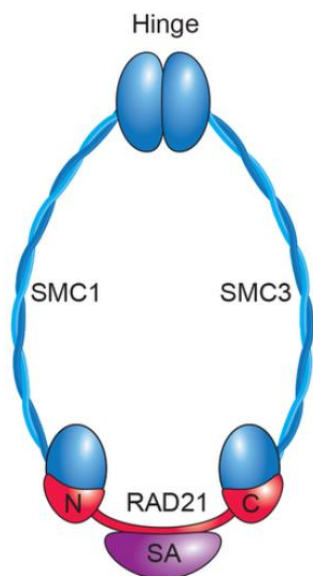
Комплекси SMC1- SMC3 формують когезин, SMC2- SMC4 – конденсин. Також існують комплекси SMC5- SMC6. У ссавців присутній комплекс RC-1 до складу якого входять SMC1 та SMC3.

Комплекс	Функція	SMC компоненти
Когезин	Когезія сестринських хроматид	SMC1- SMC3
Конденсин	Конденсація хромосом	SMC2- SMC4

MIX-1-DPY-27	Дозова компенсація генів	MIX-1, DPY-27
RC-1	Відновлення рекомбінаційних помилок	SMC1, SMC3
SMC5- SMC6	Відновлення ДНК після реплікації	SMC5, SMC6
Мейотичний комплекс	SMC Когезія сестринських хроматид, рекомбінація під час мейозу	SMC1 α , SMC3
Мейотичний комплекс	SMC Когезія сестринських хроматид	SMC1 β , SMC3

Таблиця 2. 1. У таблиці зображені відомі еукаріотичні SMC білки та комплекси, їх функції.

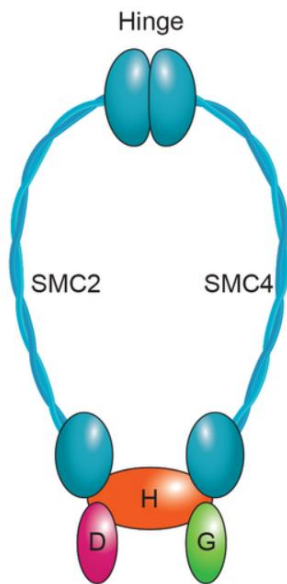
2.7.3. Когезин



Когезин необхідний для когезії сестринських хроматид. Крім SMC1 та SMC3 до комплексу також входять два інших білка: Scc-Mcd1-Rad21 та Scc-SA. У еукаріотичних клітин зустрічаються 2 різновиди когезину, відрізняються вони SA1 та SA2 білками.[13] Scc1 приєднується до доменів аміно- та карбокси-термінальні кінців SMC1 та SMC3, утворюючи міст між ними. Інші білкові частини приєднуються до Scc1. [14] Зазвичай когезин приєднується до А-Т-збагачених ділянок ДНК та до центромери, також може приєднуватись до теломер. У дріжджів когезин приєднується до хромосом під час фази G1, призводить до когезії у S фазі та залишається на

хромосомі до метафазно-анафазного розходження у мітозі. Хромосоми роз'єднуються коли від комплексу відщеплюється Scc1-Mcd1 внаслідок дії цистеїнової протеази Esp1. [12]

2.7.4. Конденсин



Завдання конденсину полягає у конденсації хромосом на початку мітозу. В інтерфазі конденсин знаходиться у цитозолі, а під час мітозу приєднується до хромосом. Крім SMC2- SMC4 до складу також входять білки CAP-D2, CAP-G, CAP-H.

В присутності топоізомерази I та холокомплексу відбувається АТФ-залежна надспіралізація ДНК. Близько 190 п.н. ДНК обертаються у спіраль конденсином. [15]

Деактивація відбувається фосфорилуванням не-SMC складових комплексу циклін-В-Cdc2 кіназою.

2.7.5. Участь SMC білків у мейозі

SMC та зв'язані з ним білки необхідна під час мейозу для когезії сестринських хроматид, рекомбінації та підновлення пошкоджених ділянок ДНК, конденсації хромосом. Усе це відбувається впродовж мейотичного циклу. [12]

Наприклад, *Saccharomyces cerevisiae* має SMC3 та Rec8 (гомолог Scc1), які залучені у когезії сестринських хроматид та рекомбінації під час мейозу. Присутність SMC3 у мейотичній профазі I впливає на формування осьових елементів синаптомемального комплексу. SMC3, пов'язаний з синаптомемальним комплексом, залишається у клітині до пізньої профазі, після чого від від'єднується від хромосомних рук, як і білок Rec8, залишаються ці білки тільки на центромері. [22]

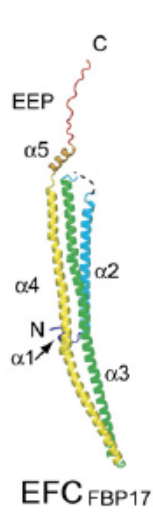
2.7.6. SMC1 участь у канцерогенезі

SMC1 може виступати посилювачем онкогенезу. Вимкнення гену, що кодує білок призводить до підвищення частоти апоптозу, а його надекспресія посилює ріст пухлин та інгібує апатоз. Когезин, до складу якого входить SMC1, залучений до формування раку прямої кишки через регуляцію транскрипції. [19]

При колатеральному раку були знайдені мутації білків SMC1 та SMC3, які призводили до дефектів когезії хроматид та хромосомної нестабільності. [23]

2.8. FBP17

FBP17 (formin-binding protein) входить до родини білків, які кодуються геном FNBP1. Також цей білок відносять до підродини білків з F-BAR доменом, завданням яких є перебудова мембрани. [17]



Приймає участь у процесах, пов'язаних з актином, таких, як цитокінез, формування філоподій, клатрин-залежний ендоцитоз, а також формування філаментів, необхідних для тубуляції. FBP17 – це димер, що складається з двох спіральних доменів консервативного F-BAR та EFC домену приблизно 220 А завдовжки.

Домен EFC складається з короткого N-термінального хеліксу, трьох довгих α хеліксів та короткого C-термінального хеліксу, що закінчується 17 амінокислотними залишками. Ці амінокислотні залишки приймають участь у гомодимеризації.

Завдяки вигнутій структурі домену BAR він легко приєднується до мембран. [16]

Досліджували участь FBP17 у формуванні інваподій та метастазуванні раку. Було показано, що FBP17 експресується на 30-58% більше при раку

молочної залози, а саме у клітинах, які характеризувались більш швидкою інвазією. Дослідження показало, що FBP17 значно підвищений у погано диференційованих пухлинах. [18]

2.9. Взаємодія SMC1 та FBP17 з BCR-ABL

Було проведено дослідження на взаємодію білку BCR-ABL з іншими білками. Досліджувались клітини K562 з філадельфійською хромосомою. Було знайдено 26 білків, які можуть зв'язуватись з РН доменом BCR-ABL. Кожен з білків відповідає за різні функції всередині клітини (метаболізм, адгезія, сигналінг, проліферація). 22 білка з переліку можуть бути пов'язані з раком та регуляцією клітини. [20]

Table 1 – Identified proteins interacting with pleckstrin homology domain of Bcr-Abl protein.

No a)	Protein identity b)	Accession no. b)	Probability b)	Est'd Z b)	Sequence coverage, %	Theoretical value		Experimental value		Matched peptides
						pI	Mr (kDa)	pI	Mr (kDa)	
1	Ribosomal protein P2	NP_000995.1	9.7e-001	0.62	45	4.4	11.65	5.8	16	6
2	F-actin-binding protein	NP_065910.1	1.0+000	1.11	10	8.1	218.24	6.0	16	10
3	SMC1 structural maintenance of chromosomes 1-like 1	NP_006297.2	9.6e-001	1.02	21	7.6	143.84	6.0	16	26
4	Keratin 10, type I, cytoskeletal	KRHU0	1.0e+000	1.91	27	5.2	59.74	6.2	25	16
5	Hypothetical protein	CAD38623.1	1.0e+000	1.80	18	9.4	198.11	5.5	12	27
6	pRb-interacting protein RbBP-36	AAN73272.1	6.5e-001	0.67	22	6.3	61.20	6.0	10	9
7	Oncogene EMS1	NP_612632.1	1.0e+000	1.40	27	5.2	57.62	6.1	10	12
8	Collagen IV, alpha-1 polypeptide	NP_001836.1	1.0e+000	1.85	21	8.9	161.73	5.2	10	19
9	Heat shock protein 27	AAA62175.1	1.0e+000	2.16	48	8.1	22.42	4.3	12	11
10	Formin-binding protein 17	AAK49824.1	9.7e-001	0.67	17	5.9	78.53	5.9	10	12
11	Keratin 10, type I, cytoskeletal	KRHU0	1.0e+000	2.12	34	5.2	59.74	5.2	10	19
12	Interferon-responsive finger protein 1 long form	BAB17050.1	5.7e-001	0.28	13	8.4	99.81	4.4	10	14
13	Hypothetical protein	CAD38684.1	1.0e+000	1.78	20	6.5	87.64	4.4	10	17
14	Beta 5-tubulin	NP_821133.1	1.0e+000	2.39	32	4.8	50.11	4.3	10	18
15	Ubiquitin specific protease 1	NP_003359.1	1.0e+000	1.29	23	5.4	89.22	5.2	60	17
16	Zizimin 1 (KIAA1058)	CAC27814.1	1.0e+000	1.34	22	7.6	178.03	5.3	60	26
17	Phospholipase C, epsilon	NP_006217.1	1.0e+000	1.06	27	5.4	114.54	5.4	60	22
18	Rho-GTPase-activating protein 7	NP_872584.1	9.6e-001	1.21	16	6.0	172.29	5.7	44	23
19	Golgi sialoglycoprotein MG-160	Q92896	9.8e-001	0.63	18	6.5	138.46	5.5	45	25
20	Nuclear factor NF-kappa-B inhibitor kinase beta	O14920	9.7e-001	1.20	26	5.6	87.57	6.5	45	21
21	Tubulin, beta, 2	NP_006079.1	1.0e+000	1.94	23	4.8	50.27	7.0	50	15
23	Keratin 10, type I, cytoskeletal	KRHU0	1.0e+000	1.85	41	5.1	59.73	6.1	65	28
24	Zinc finger protein 217	NP_006517.1	1.0e+000	1.30	18	9.3	117.14	5.5	40	20
25	KIAA0853	NP_055885.2	1.0e+000	1.36	11	9.6	185.24	5.5	35	17
26	Hypothetical protein	CAD898999.1	1.0e+000	1.82	18	9.4	198.00	5.2	29	31

3. Матеріали та методи досліджень

3.1. Штам *E. coli*

Для дослідження використовувався штам *E. coli* NEB® Turbo (New England Biolabs, США) з генотипом *F' proA B lacI^q ΔlacZM15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10)Tet^S endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5*.

3.2. Розчини, буфери, поживні середовища

Рідке поживне середовище LB: 1% триптон, 0,5% екстракту дріжджів, 1% NaCl.

Тверде поживне середовище LB: 1% триптон, 0,5% екстракту дріжджів, 1% NaCl, 2% агару.

Буфер для промивки з високою концентрацією солей	120 мл 5 М NaCl 4 мл 1 М MgSO ₄ 2 мл 0.5 М EDTA 10 мл 1 М HEPES
Буфер для промивки з низькою концентрацією солей	Tris-HCl (1 м, pH 8.0) 500 μL EDTA (0.5 м, pH 8.0) 100 μL NaCl (5 м) 1.5 mL Triton X-100 (10%) 5 mL Double-distilled water 42.9 mL
S1 (ресуспендууючий буфер)	50mM Глюкоза 25mM Tris-HCl, pH 8.0 10mM EDTA
S2 (лізуючий буфер)	на 100 мл буфера: NaOH (5M) – 4 мл SDS (10%) – 10 мл H ₂ O – 86 мл
S3 (нейтралізуючий буфер)	на 250 мл буфера:

	CH ₃ COONa*3 H ₂ O – 102г CH ₃ COOH – 28,75 мл H ₂ O – 221,25 мл
буфер для адсорбції	6M Guanidine Thiocyanate 50mM Tris-HCl pH 7.5 20mM EDTA pH 8.0
ТАЕ буфер	2 M Tris base 1 M acetic acid 50 mM EDTA
Середовище для автоіндукції	1 % N-Z-amine AS, 0.5 % yeast extract, 25 mM Na ₂ HPO ₄ , 25 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM NH ₄ Cl, 5 mM Na ₂ SO ₄ , 2 mM MgSO ₄ , 0.5 % glycerol, 0.05 % glucose, 0.2 % α-lactose

3.3. Плазмідн

Для створення генетичної конструкції використовувались плазмідн рGEX-4T1 (<https://www.addgene.org/vector-database/2876/>), рCDNA-SMC1 (<https://www.addgene.org/32363/>) та рmCherry-FBP17 (<https://www.addgene.org/27688/>).

3.4. Ферменти

В якості ферментів використовувались ендонуклеази рестрикції та Т4 ДНК лігаза.

З рестриктазами Bgl II, Eco RI, Bam HI, Xho I, Sal I використовувались буфери Fast та Tango (Thermo, США).

Для лігування використовувалась лігаза T4 DNA Ligase (5 U/μL) та буфер T4 DNA Ligase buffer Thermo Scientific™.

3.5. Створення компетентних клітин *E. coli*

Компетентні клітини створюються для трансформації бактерій плазмідами. Для їх створення клітини *E. coli* штаму NEB® Turbo 16 годин вирощуються у рідкому середовищі LB на шейкері при 37°C. Потім культура розводиться у співвідношенні 75 мкл середовища на 2 мл культури свіжим поживним середовищем. Клітини вирощуються до оптичної густини OD₆₀₀=0.3-0.5 суспензії клітин при 600 нм. Цей показник відповідає логарифмічній фазі росту культури *E.coli*. Протягом години клітини інкубуються на льоду. Охолоджені клітини центрифугуються при 4°C на 2000 обертів протягом 20 хвилин. Осаджені клітини ресуспендуються в 0,1М CaCl₂ та залишали на льоду протягом години. Суміш ще раз центрифугується при 7000 обертів 6 хвилин за температури 4°C. Перед заморожуванням (-70 °C) *E.coli* ресуспендуються у розчині 0,1М CaCl₂ та 10% гліцерину та фасуються по 200 мкл пробіркам.

3.6. Трансформація компетентних клітин

Компетентні клітини розморожуються на льоду протягом 10 хвилин. До розморожених клітин додається плазмідна у співвідношенні на 100 мкл суміші клітин 10 нг плазмід. Клітини з плазмідною перемішуються та залишаються на льоді протягом 30 хвилин. Потім робимо тепловий шок для наших клітин. Для цього інкубуємо протягом 90 секунд на водяній бані при 42°C та переносимо пробірку на 1 хвилину на лід. Після цього додаємо на 200 мкл компетентних клітин 400 мкл поживного середовища та залишаємо на 45 хвилин в інкубаторі на 37°C. Висіваємо трансформовані клітини на чашку Петрі з твердим середовищем LB з доданими для селекції антибіотиками відповідної концентрації. Для плазмід рSMC-тус та рGEX додавали ампіцилін (до кінцевої концентрації 100мкг/мл), а для pmCherry-FBP - канаміцин (до кінцевої концентрації 100мкг/мл). Після чого інкубували при 37°C протягом 16 годин.

3.7. Виділення плазмід *pCDNA-SMC1*, *pGEX*, *pmCherry-FBP*

Стерильними зубочистками вибираємо одну з колоній на чашці Петрі та висіваємо у 100 мл рідкого середовища LB з відповідним антибіотиком. Протягом 16 годин культура нарощується при 37°C при постійному перемішуванні. Потім осаджуємо клітини у центрифугу на 2000 G протягом 20 хвилин. Зливаємо надосад, а до осаджених клітин додаємо ресуспендуєчий буфер (S1) 5 мл, ресуспендуємо у ньому клітини та витримуємо 2 хвилини на льоду. Потім додаємо 10 мл лізуючого буферу (S2) та 5 хвилин перемішуємо за кімнатної температури. Останнім додаємо 7,5 мл нейтралізуючого буферу (S3) та залишаємо 5 хвилин на льоду. Отриману суміш за допомогою паперового фільтру очищуємо від клітинних залишків та центрифугуємо при 2000 G протягом 20 хвилин. Прибираємо надосад та додаємо 1:1 ізопропанолу, витримуємо приблизно годину та осаджуємо плазмиди центрифугуванням (2000 G на хвилину протягом 20 хвилин). Осад ДНК висушуємо за кімнатної температури та розчиняємо у 0,5 мл дистильованої води.

3.8. Очищення плазмід

Щоб очистити плазмиди від РНК та іншого бруду додаємо до 0,5 мл плазмиди подвійний об'єм 4,2 М CaCl₂. Перемішуємо та осаджуємо центрифугуванням при 16000 G протягом 10 хв. Надосад переносимо в нову пробірку. Додаємо 0,6 об'єму ізопропілового спирту, перемішуємо та осаджуємо 20 хв при 16000 G. Викидаємо надосад, додаємо 500 мкл 70% етилового спирту, центрифугуємо 5 хв при 16000 G. Викидаємо надосад, висушуємо залишки спирту та розчиняємо осад ДНК у 50-100 мкл дистильованої води.

3.9. Рестрикція плазмід *pCDNA-SMC1*, *pGEX*, *pmCherry-FBP*

За допомогою спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo, США) виміряли концентрацію плазмід. pCDNA-SMC1 – 150 нг/мкл, pmCherry-FBP – 100 нг/мкл, pGEX – 70 нг/мкл.

На основі отриманих концентрацій робили рестрикцію плазмід.

pmCherry-FBP		pGEX	
Вода	14.6 мкл	Вода	12.6 мкл
Буфер (FAST)	2 мкл	Буфер (FAST)	2 мкл
Плазміда	3 мкл	Плазміда	5 мкл
Eco RI	0.2 мкл	Eco RI	0.2 мкл
Bgl II	0.2 мкл	Xho I	0.2 мкл
pmCherry-FBP		pCDNA-SMC1	
Вода	12.6 мкл	Вода	14.6 мкл
Буфер (FAST)	2 мкл	Буфер (FAST)	2 мкл
Плазміда	5 мкл	Плазміда	3 мкл
Sal I	0.2 мкл	Bam HI	0.2 мкл
Bgl II	0.2 мкл	Xho I	0.2 мкл

Рестрикція відбувалась протягом 2 годин при 37°C, інактивувались рестриктази нагріванням до 80°C протягом 20 хвилин.

3.10. Виділення фрагментів плазмідної ДНК з гелю

Щоб розділити плазмідну ДНК, проводили електрофорез ДНК в 1% агарозному гелі у буфері TAE. Протягом 45 хвилин при напрузі 100В відбувався електрофорез. Візуалізація результатів відбувалась фарбуванням розчином бромістого етидію. Разом з ДНК використовувався маркер молекулярної ваги 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs, США). Необхідні за розміром фрагменти вручну вирізались з гелю та поміщались у пробірку. Для виділення ДНК частинку гелю зважували та до кожної пробірки з гелем додавали буфер для абсорбції у співвідношенні 4:1

буфера до гелю. Після перемішування витримували 5 хвилин на водяній бані (55°C) до повного розчинення гелю. Суміш пропускали через колонки для очищення ДНК та промивали двічі 200 мкл буфером для промивки з високою концентрацією солей та двічі 200 мкл буфером для промивки з низькою концентрацією солей. Очищену ДНК змивали з колонок 20 мл дистильованої води.

3.11. Лігування

Замішували лігазну суміш для двох конструкцій.

Склад	20 мкл
T4 DNA Ligase Buffer (10X)	2 мкл
Vector DNA - pGEX	3 мкл
Insert DNA – FBP17	4 мкл
Вода	9 мкл
T4 DNA Ligase	1 мкл
АТФ	1 мкл
Склад	20 мкл
T4 DNA Ligase Buffer (10X)	2 мкл
Vector DNA –mCherry	1 мкл
Insert DNA – SMC1	5 мкл
Вода	10 мкл
T4 DNA Ligase	1 мкл
АТФ	1 мкл

Залишаємо суміші при 16°C на ніч, потім інактивуємо лігазу при 65°C протягом 10 хвилин на водяній бані.

Після лігування трансформуємо компетентні клітини лігазною сумішшю за протоколом вище.

3.12. Експресія білку конструкції pGEX4T1-FBP17 та pGEX4T2-CTTN

Штам клітин *E. coli* BL Rosetta розводимо у співвідношенні 1/500 в 50 мл середовища для автоіндукції та залишаємо на 18 годин при температурі 25°C. Суміш клітин центрифугуємо та до осаду клітин додаємо лізис буфер. Перед лізисом залишаємо клітини на 30 хвилин на льоді. Потім клітини лізуємо ультразвуком та центрифугуємо на 2000 обертів на хвилину протягом 20 хвилин. Верхню фракцію забираємо для аналізу. Щоб впевнитись у наявності білка у розчинній фракції додавали фарбу для нанесення на електорофорез білків в поліакриламідному гелі та кип'ятили протягом 5 хвилин. З пофарбованим білком робили білкову електрофорез при 120В протягом 100 хв.

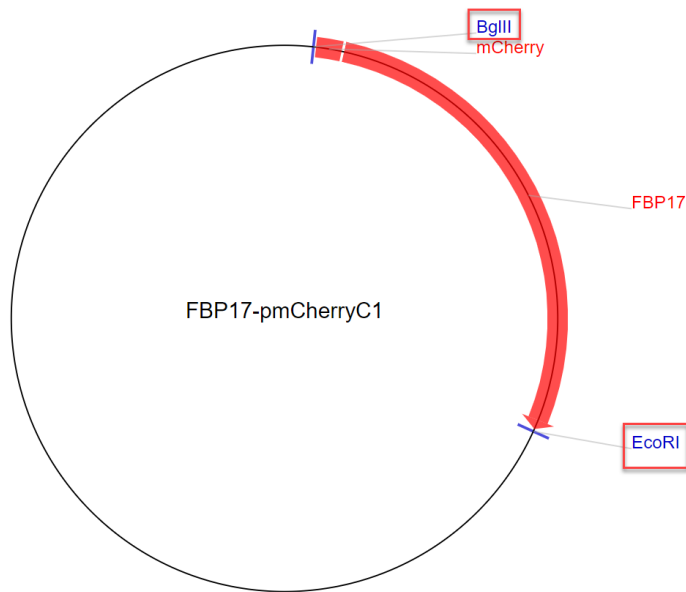


Рис 4. 1. Схематичне зображення плазмід рGEX-4Т1 зверху та pmCherry-FBP17 знизу.

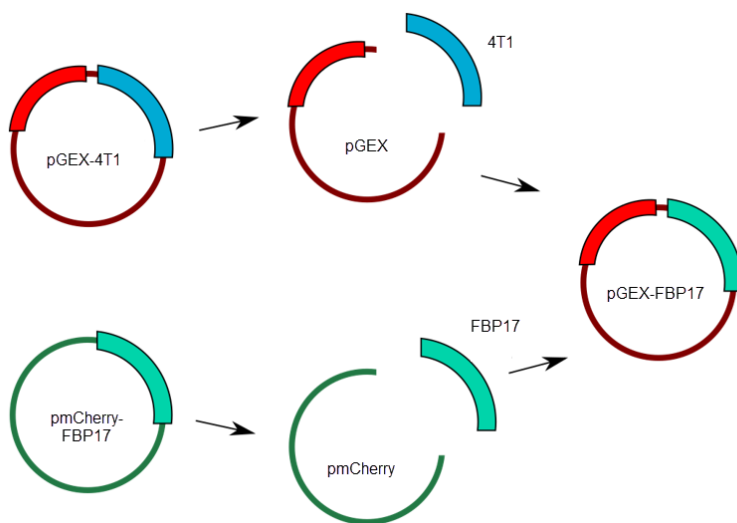


Рис 4. 2. Схема клонування рGEX4Т1-FBP17

Отримані фрагменти ДНК зшивались лігазами, а результати перевірялись за допомогою електрофореграми ДНК. Фрагмент рGEX містить 4954 пар нуклеотидів, FBP17 – 1850, таким чином розмір генетичної конструкції – 6804 п.н. На рисунку 3 можна побачити результати рестрикції ДНК, виділеної з 12 колоній після лігування. 12 плазмід були оброблені рестриктазою HindIII. Ця рестриктаза ріже нашу плазмиду в 1 точці, тому на

електрофореграммі можна побачити одну полосу, що відповідає розміру плазміди – 8654 н.п. Ми бачимо, що плазміда з колонії 7 відповідає нашим умовам за розміром.

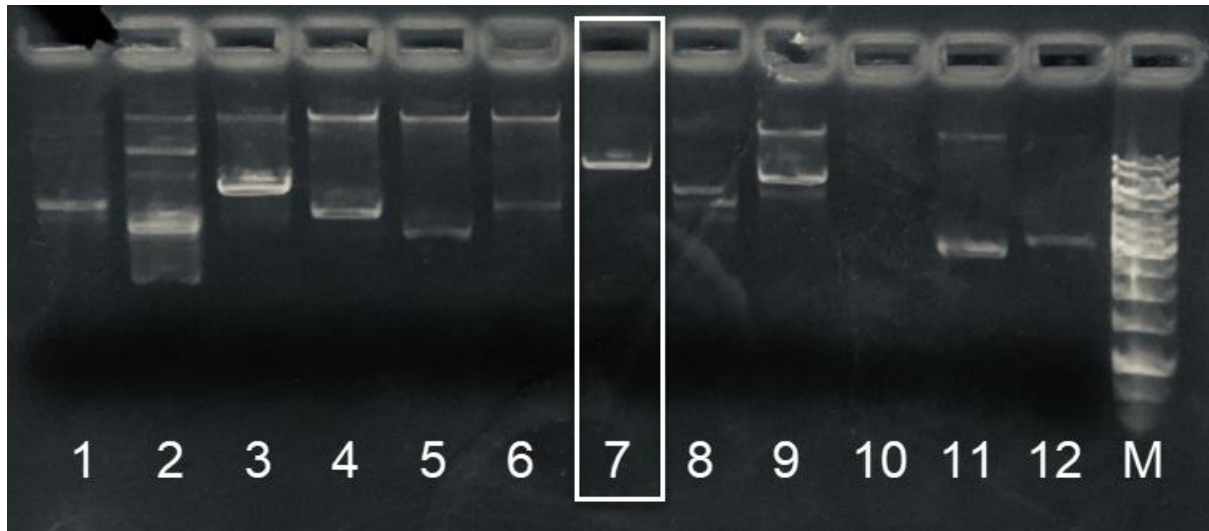


Рис 4. 3. Результат електрофореграмми. Плазміди 12 колоній, отриманих після лігування та маркер. Для перевірки користувались рестриктазою HindIII. М – маркер 1 kb DNA Ladder.

4.2. Створення генетичної конструкції SMC1-mCherry

Генетична конструкція має містити послідовності SMC1 та флуоресцентного білка mCherry. Таким чином можна проводити дослідження локалізації білка у клітині шляхом флуоресцентної мікроскопії. Ми помістили послідовність SMC1 з плазміди pCDNA-SMC1 (<https://www.addgene.org/32363/>) у вектор mCherry з плазміди pmCherry-FBP17 (<https://www.addgene.org/27688/>). pCDNA-SMC1 різали рестриктазами Bam HI та Xho I, pmCherry-FBP17 – Sal I та Bgl II.

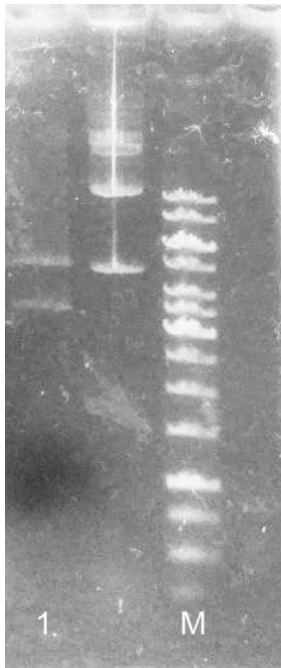


Рис 4. 6. Результат електрофореграми ДНК. 1 – плазміда клону pmCherry-SMC. М – маркер 1 kb DNA Ladder. Використовували рестриктази EcoRI та BamHI.

4.3. Результат експресії білку генетичної конструкції pGEX4T1-FBP17 та pGEX4T2-CTTN.

На рисунку 7 можна побачити результат експресії GST-FBP17 та GST. Розмір білка GST-FBP17 приблизно 90 кДа, що ми і бачимо на електрофореграмі.

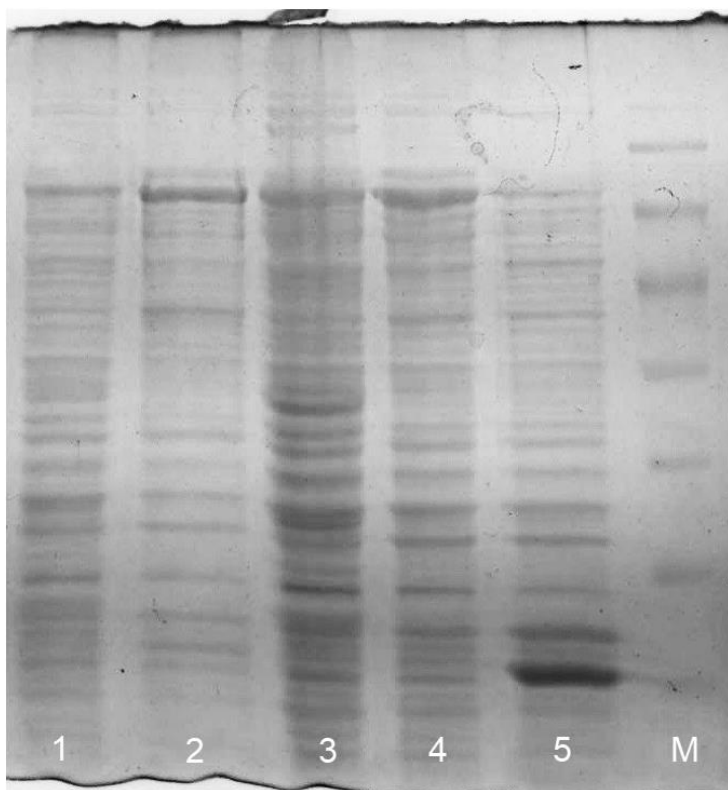


Рис 4. 7. Результат білкової електрофореграми. 1 – 1 клон pGEX4T1-FBP17 до індукції білка, 2 – 1 клон pGEX4T1-FBP17 після індукції білка, 3 - 2 клон pGEX4T1-FBP17 до індукції білка, 4 – 2 клон pGEX4T1-FBP17 після індукції білка, 5 – pGex після індукції, M – маркер Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10-250 кДа.

4.4. Результат експресії білку генетичної конструкції pGex з кортактином.

На рисунку 8 можна побачити результат експресії білка GST, GST-CTTN з кортактином та GST-FBP17.

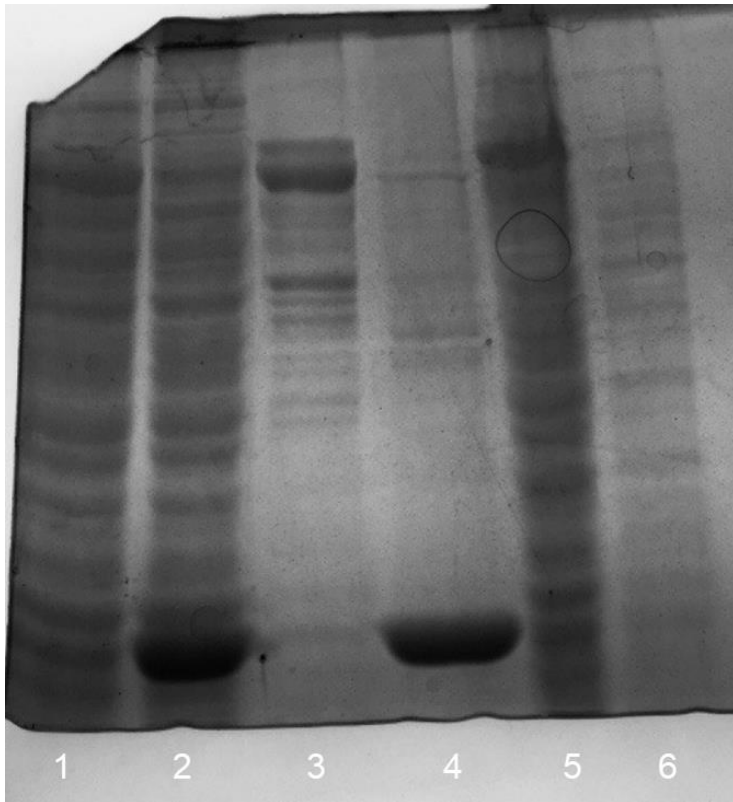


Рис. 4. 8. 1 - pGEX4T2-CTTN розчинна фаза, 2 - pGex розчинна фаза, 3 - pGEX4T2-CTTN очищений 4 - pGex очищений, 5 - pGEX4T1-FBP17 після ночі індукції, 6 - pGEX4T1-FBP17 до індукції.

5.Висновки

1. Було створено генетичну конструкцію, що кодує повнорозмірний білок SMC1 злитий з mCherry. Ця конструкція в подальшому буде використовуватися для трансфекції клітин ссавців та створення препаратів для флуоресцентної мікроскопії.
2. Було створено генетичну конструкцію pGEX4T1-FBP17 для бактеріальної експресії рекомбінантного білка FBP17 злитого з глутатіон-S-трансферазою.
3. Було перевірено експресію білка конструкції pGEX4T1-FBP17, що відповідав очікуваним розмірам.
4. Було перевірено експресію білка з конструкції pGEX4T2-CTTN, що відповідав очікуваним розмірам та знаходився в розчинній фазі.

6. Література

1. Ting Zhou, L. Jeffrey Medeiros, Shimin Hu (2018) Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1. *Current Hematologic Malignancy Reports* (2018) 13:435–445 <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0474-6>
2. <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-chronic-myeloid-cml/phases>
3. Xin An, Amit K. Tiwari, Yibo Sun, Pei-Rong Ding, Charles R. Ashby Jr., Zhe-Sheng Chen. (2010) BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leukemia Research* 34 (2010) 1255–1268
4. Martin Sattler and James D. Griffin. (2003) Molecular Mechanisms of Transformation by the BCR-ABL Oncogene. *Semin Hematol* 40(suppl 2):4-10.
5. Heaney C, Kolibaba K, Bhat A, et al: Direct binding of CRKL to BCR-ABL is not required for BCR-ABL transformation. *Blood* 89:297-306, 1997
6. McWhirter J, Wang J: Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of c-Abl by Bcr sequences in Bcr/Abl fusion proteins. *Mol Cell Biol* 11:1553-1565, 1991
7. Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM: Structural and signaling requirements for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol* 15:5531-5541, 1995
8. Rameh LE, Cantley LC: The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274:8347-8350, 1999
9. Suh Y-A, Arnold RS, Lassegue B, et al: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401:79-82, 1999

10. Marie-Laure Diebold-Durand, Hansol Lee, Laura B. Ruiz Avila. (2017) Structure of Full-Length SMC and Rearrangements Required for Chromosome Organization. *Molecular Cell* 67, 1–14
11. Rolf Jessberger. (2003) SMC Proteins at the Crossroads of Diverse Chromosomal Processes. *Life*, 55(12): 643–652
12. Jessberger, R. (2002). The many functions of smc proteins in chromosome dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(10), 767–778
13. Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R., Identification and characterization of SA/Scc3p subunits in the *Xenopus* and human cohesion complexes. *J. Cell Biology* 150,- (2000)
14. Carson, D. R. & Christman, M. F. Evidence that replication fork components catalyze establishment of cohesion between sister chromatids. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2001)
15. Kimura, K. & Hirano, T. ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell* (1997)
16. Atsushi Shimada, Hideaki Niwa, Kazuya Tsujita. Curved EFC/F-BAR-Domain Dimers Are Joined End to End into a Filament for Membrane Invagination in Endocytosis. *Cell* (2007)
17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2889966/>
18. Suman, P., Mishra, S., & Chander, H. (2020). High formin binding protein 17 (FBP17) expression indicates poor differentiation and invasiveness of ductal carcinomas. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-68454-9
19. Li, J., He, J., Wang, Y., Shu, Y., & Zhou, J. (2019). SMC1 promotes proliferation and inhibits apoptosis through the NF- κ B signaling pathway in colorectal cancer. *Oncology Reports*. doi:10.3892/or.2019.7273

20. (ROLE OF Bcr/Abl IN LEUKEMOGENESIS) G.D. Telegeev*, A.N. Dubrovskaya, M.V. Dybkov (Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv 03143, Ukraine)
21. Gong Z, Medeiros LJ, Cortes JE, Zheng L, Khoury JD, Wang W, et al. Clinical and prognostic significance of e1a2 BCR-ABL1 transcript subtype in chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2017;7(7):e583.
22. Kein F., A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* (1999)
23. Barber, T. D., McManus, K., Yuen, K. W. Y., Reis, M., Parmigiani, G., Shen, D., ... Hieter, P. (2008). Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9), 3443–3448.
24. Sattler M., & Griffin, J. D. (2003). Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Seminars in Hematology*, 40, 4–10.
25. R. Castellanos-Martinez, K. E Jimenez-Camacho, M. Schnoor (2020). Cortactin Expression in Hematopoietic Cells: Implications for Hematological Malignancies, *The American Journal of Pathology*, Vol. 190, No. 5