

УДК 577.113

*Андрій ЦИРУЛЬНИК<sup>1</sup>, Володимир СНІТИНСЬКИЙ<sup>1</sup>, Ростислав СТОЙКА<sup>2†</sup>*

## **СИНТЕЗ МОДИФІКОВАНОГО ГЕНА ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ФАКТОРА STAT5A**

<sup>1</sup>*Львівський Національний Аграрний Університет,  
вул. В.Великого, 1, 80381 Львів-Дубляни, Україна*

<sup>2</sup>*Інститут Біології Клітини Національної Академії Наук України,  
вул. Драгоманова, 14/16, 79005 Львів, Україна  
e-mail: [stoika@cellbiol.lviv.ua](mailto:stoika@cellbiol.lviv.ua)*

*Транскрипційні фактори родини STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) є ключовими регуляторами експресії генів стимульованих цитокінами, що впливають на різні клітинні процеси. Транскрипційний фактор STAT5a опосередковує стимуляцію клітинного росту, проліферації та ангиогенезу. Сучасні дослідження біологічної ролі білків STAT проводять шляхом створення експериментальних моделей мишей, що містять у геномі штучно синтезовані та модифіковані форми генів відповідних транскрипційних факторів. Метою даної роботи був синтез модифікованого гена STAT5a. Введення цього гена у геном миші дозволяє моделювати процеси активації STAT5a in vivo та досліджувати його роль у забезпеченні патологічних змін в організмі.*

*Ключові слова: синтез ДНК, транскрипційні фактори STAT, модифікація генів.*

Дослідження біохімічних процесів, що лежать в основі росту, поділу, диференціації та загибелі клітини є актуальним напрямком сучасної біології. Ключовими внутрішніми регуляторами цих процесів є транскрипційні фактори родини STAT (Signal Transducers and Activator of Transcription), що забезпечують регуляцію таких процесів на генетичному рівні [1, 2, 3].

Відомо 7 білків родини STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b та STAT6. Ці транскрипційні фактори містяться у цитоплазмі клітини у неактивній формі. Ряд цитокінів, таких як IL2, IL3, IL5, IL6, IL7, BMP2I, GM-CSF, IFNs, EGF, HGF, LIF, зв'язуючись із специфічними клітинними рецепторами, активують JAK протеїнкіназу (Janus Kinase), яка активує білки STAT шляхом фосфорилування. Після активації білки STAT утворюють димери і транспортуються у ядро, де вони зв'язуються із специфічними ділянками ДНК і регулюють експе-

---

†Кореспондуючий автор: [stoika@cellbiol.lviv.ua](mailto:stoika@cellbiol.lviv.ua)

сію певних генів. Деактивація білків STAT у ядрі відбувається шляхом їх дефосфорилування, після чого вони видаляються із ядра [4, 5].

Порушення процесів фосфорилування та дефосфорилування білків STAT впливає на різні біологічні процеси на усіх організаційних рівнях [6, 7].

Встановлено, що при таких типах онкологічних захворювань як лейкемія, рак легені і печінки, трансформовані клітини містять конститутивно активну форму транскрипційного фактору STAT5a [8, 9, 10]. Гіперактивація STAT5a забезпечує стимуляцію росту і проліферації пухлинних клітин, активує ангиогенез пухлин і діє як імуносупресорний чинник. Виявлення конститутивно активної форми STAT5a в онкохворих вказує на важкість захворювання і підвищений ризик для цих хворих.

Дослідження механізмів розвитку захворювань, що виникають за умов викликаних гіперактивації білків STAT, у більшості випадків проводяться шляхом створення експериментальних моделей трансгенних мишей, які містять у геномі штучно синтезовані конститутивно активні форми генів відповідних транскрипційних факторів [11, 12, 13]. Синтез конститутивно активної форми гена STAT5a та його введення в у геном миші дозволяє створити ефективну модель *in vivo* для вивчення ролі цього транскрипційного фактора у розвитку різних патологічних процесів.

Метою роботи був синтез фрагменту ДНК, що містить конститутивно активну форму гена STAT5a (caSTAT5a) і гена поверхневого маркера CD2. Введення штучно створеної ДНК у геном миші дозволяє моделювати процес гіперактивації STAT5a *in vivo* і досліджувати індуковані зміни біологічних процесів.

#### **Синтез конститутивно активної форми STAT5a**

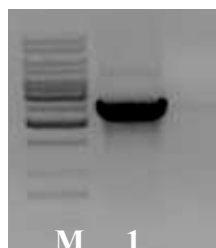
Синтезовано конститутивно активну форму гена транскрипційного фактора STAT5a. Встановлено, що його білковий продукт із заміною залишка серину на фенілаланін ((Ser711→Phe711) володіє конститутивною активністю і забезпечує стимулювання клітинного росту та проліферації за відсутності дії цитокінів [14].

Для експресування *in vivo* конститутивно активної форми білка STAT5a було синтезовано ген цього транскрипційного фактора із заміною відповідної нуклеотидної послідовності (TCC→TTC/Ser→Phe711). Синтез ДНК був проведений із використанням класичних методик (Site-Directed Mutagenesis/QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit та Polymerase Chain Reaction/Fermentas High Fidelity PCR Kit). Для ефективної транскрипції гена STAT5a, а також зв'язування мРНК із рибосомою і трансляції білкової молекули, перед СТАРТ-кодоном (ATG) цього гена введено послідовність 5'-UTR гена β-глобіну (GACTCACAACCCAGAAACA) і оптимальну послідовність KOZAK (CCACC) (рис. 1).

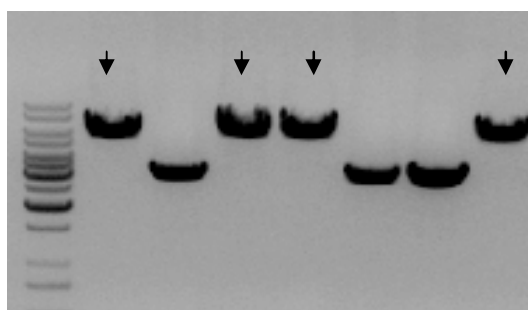
#### **Синтез допоміжних генетичних елементів IRES, CD2, PolyA**

На наступному етапі було синтезовано та включено допоміжні генетичні елементи IRES, CD2, PolyA та гена резистентності у плазмиду-носії PMSCV-типу. Послідовність IRES забезпечує експресію гена поверхневого маркера CD2 а послідовність PolyA необхідна для завершення зчитування фрагмента ДНК [15]. Ген резистентності до ампіциліну дозволяє проводити селекцію клітин, трансформованих модифікованою ДНК. Фрагменти ДНК синтезували із використанням специфічних олігонуклеотидів і клонували у плазмиду використовуючи класичні методи. Одержані фрагменти ДНК було додатково очищено за допомогою електрофорезу у агарозному гелі. Для введення цих фрагментів у плазмиду проведено лігацію із використанням T4-лігази. Синтезований фрагмент містить специфічний сайт роз-

щеплення ендонуклеазою *Bam*HI. Це дозволило швидко проводити пошук і біотестування позитивних бактерійних колоній за допомогою розщеплення створеної плазмиди цією ендонуклеазою. Виявлено чотири колонії бактерій, що містили модифіковану плазмиду (рис. 2).



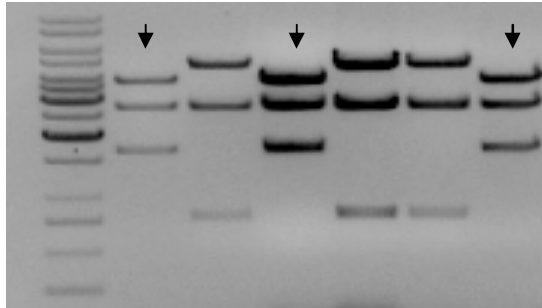
**Рис. 1.** Синтез конститутивно активної форми гена STAT5a, із заміною нуклеотидної послідовності (TCC→TTC/Ser→Phe711). Зміну у нуклеотидній послідовності гена STAT5a та ампліфікацію його модифікованої форми проведено класичними методами (Site-Directed Mutagenesis та Polymerase Chain Reaction). Одержаний ДНК (1) продукт очищено електрофорезом у гелі агарози.



**Рис. 2.** Модифікована плазмиди PMSCV, що містить допоміжні генетичні елементи IRES-CD2-PolyA та ген резистентності до ампіциліну. Аналіз проведено шляхом розщеплення ДНК ендонуклеазою *Bam*HI та електрофорезу одержаних фрагментів у гелі агарози (стрілками вказано позитивні колонії).

У створену плазмиду шляхом лігування введено синтезований ген caSTAT5a. Пошук позитивних колоній проведено шляхом розщеплення із використанням ендонуклеази *Xho*I, сайт якої міститься у фрагменті caSTAT5a. Три бактерійні колонії містили нову модифіковану плазмиду із усіма генетичними елементами (caSTAT5a, IRES, CD2 та PolyA) у своєму складі (рис. 3).

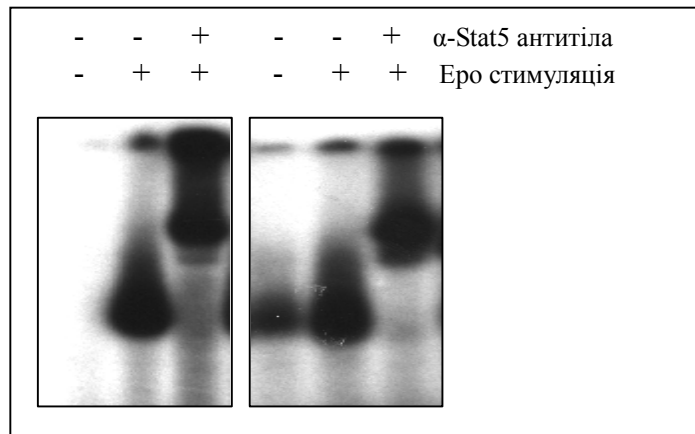
Перевірку нуклеотидних послідовностей усіх синтезованих та клонованих елементів ДНК здійснено шляхом секвенування. Одержані результати засвідчили що плазмиди PMSCV містить caSTAT5a-IRES-CD2-PolyA фрагменти. Невиявлені жодні неспецифічні зміни у нуклеотидних послідовностях синтезованих генів.



**Рис. 3.** Модифікована плазміда PMSCV, що містить caSTAT5a-IRES-CD2-PolyA фрагменти та ген резистентності до ампіциліну. Аналіз проведено шляхом розщеплення ДНК ендонуклеазою *XhoI* та електрофорезу одержаних фрагментів у гелі агарози (стрілками вказано позитивні колонії).

#### Тестування функціональної активності caSTAT5a

Функціональну активність синтезованого гена вивчали із застосуванням методу ДНК-зв'язування (DNA binding assay). Для цього плазміду PMSCV очищено електрофорезом у гелі агарози. Клітини лінії NIH3T3 трансформували плазмідами PMSCV, що містять нативну форму STAT5a (контроль) і синтезований фрагмент caSTAT5a-IRES-CD2-PolyA. Культивування клітин проводили з їх стимуляцією еритропоетином та без неї. На відміну від нативної форми, конститутивно активна форма STAT5a експресувалася в клітині й володіла ДНК зв'язувальною активністю до STAT5a-специфічного олігонуклеотида. Використано антитіла анти-STAT5a, що дозволило підтвердити що саме білок STAT5a утворює комплекс із ДНК (рис. 4).



**Рис. 4.** Тестування функціональної активності конститутивно активної форми STAT5a методом ДНК-зв'язування (DNA binding assay). Конститутивно активна форма STAT5a здатна зв'язуватись із специфічною ділянкою ДНК-проби за відсутності стимуляції трансформованих клітин цитокінами.

Проведене дослідження дозволяє стверджувати, що створена модифікована форма STAT5a у складі плазміди PMSCV володіє конститутивною активністю у клітині без стимуляції цитокінами і тому може бути використана для створення ефективної трансгенної моделі гіперактивації транскрипційного фактора STAT5a *in vivo*.

### Висновки

Введення створеного нами фрагмента caSTAT5a-IRES-CD2-PolyA у геном миші дозволить одержати експресію конститутивно активної форми STAT5a *in vivo* і дослідити роль гіперактивації цього фактора у порушеннях клітинних процесів та функціонування організму в цілому. Ген маркерного поверхневого антигена CD2 забезпечує виявлення трансформованих клітин і визначення рівня експресії у них модифікованої ДНК.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Takeda K., Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses // Cytokine Growth Factor Reviews. – 2000. – Vol. 11. – P. 199-207.
2. Li WX. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling // Trends Cell Biol. – 2008. – Vol. 18. – P. 545-551.
3. Murray P.J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration // J Immunol. – 2007. – Vol. 178. – P. 2623-2629.
4. Hebenstreit D., Horejs-Hoeck J., Duschl A. JAK/STAT-dependent gene regulation by cytokines // Drug News Perspect. – 2005. – V. 18, N. 4. – P. 243-249.
5. Rawlings J.S., Rosler K.M., Harrison D.A. The JAK/STAT signaling pathway // J Cell Sci. – 2004. – Vol. 15. – P. 1281-1283.
6. O'Sullivan L., Liongue C., Lewis R., Stephenson S., Ward A.C. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease // Mol Immunol. – 2007. – Vol. 44. – P. 2497-2506.
7. Touw I., De Koning J., Ward A., Hermans M. Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease // Mol Cell Endocrinol. – 2000. – Vol. 25. – P. 1-9.
8. Tan S., Nevalainen M. Signal transducer and activator of transcription 5A/B in prostate and breast cancers // Endocr Relat Cancer. – 2008. – Vol. 15. – P. 367-390.
9. Moriggl R., Sexl V., Kenner L., Dutsch C., Stangl K., Gingras S., Hoffmeyer A., Bauer A., Piekorz R., Wang D., Bunting K., Wagner E., Sonneck K., Valent P., Ihle J., Beug H. Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis // Cancer Cell. – 2005. – Vol. 7. – P. 87-99.
10. De Groot R., Raaijmakers J., Lammers J., Jove R., Koenderman L. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells // Blood. – 1999. – Vol. 1. – P. 1108-1112.
11. Ye D., Wolff N., Li L., Zhang S., Ilaria R. STAT5 signaling is required for the efficient induction and maintenance of CML in mice // Blood. – 2006. – Vol. 15. – P. 4917-4925.
12. Hiai H., Tsuruyama T., Yamada Y. Pre-B lymphomas in SL/Kh mice: a multifactorial disease model // Cancer Sci. – 2003. – Vol. 94. – P. 847-850.
13. Tsuruyama T., Nakamura T., Jin G., Ozeki M., Yamada Y., Hiai H. Constitutive activation of Stat5a by retrovirus integration in early pre-B lymphomas of SL/Kh strain mice // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2002. – Vol. 11. – P. 8253-8258.

14. Grebien F., Kerenyi M., Kovacic B., Kolbe T., Becker V., Dolznig H., Pfeiffer K., Klingmüller U., Müller M., Beug H., Müllner E., Moriggl R. Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2 // *Blood*. – 2008. – Vol. 1. – P. 4511-4522.
15. Filbin M., Kieft J. Toward a structural understanding of IRES RNA function // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2009. – Vol. 19. – P. 267-276.

#### SUMMARY

Andriy TSYRULNYK<sup>1</sup>, Volodymyr SNITYNSKY<sup>1</sup>, Rostyslav STOIKA<sup>2</sup>

#### SYNTHESIS OF MODIFIED GENE OF TRANSCRIPTION FACTOR STAT5A

<sup>1</sup>*Lviv National Agricultural University,  
V. Velikiy str., 1, 80381 Lviv-Dubljany, Ukraine*

<sup>2</sup>*Institute of Cell Biology of National Academy of Sciences,  
Dragomanov str., 14/16, 79005 Lviv, Ukraine  
[stoika@cellbiol.lviv.ua](mailto:stoika@cellbiol.lviv.ua)*

Cytokines are small secreted proteins which mediate cell growth, proliferation, survival and apoptosis. They are crucial regulators of immunity and hematopoiesis. Cytokines generally act at very low concentration and short time spans. The JAK-STAT signaling pathway is one of the most important mechanisms of cell response to the cytokines. Binding of cytokine to the specific membrane receptor on the cell activates the JAK (Janus Kinase) kinase which adds a phosphate group to the STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) proteins. After phosphorylation, STAT proteins form via their SH2 domain the active dimers. The dimers move into the cell nucleus via importin  $\alpha/\beta$  and RanGDP complex and bind to DNA-recognition region called gamma activated sites (GAS) in the promoter region of cytokine inducible genes and activates transcription of these genes. Then, nuclear phosphatases dephosphorylate the STATs which leads to their inactivation and transportation from the nucleus by exportin  $\text{crm1}/\text{RanGTP}$  complex. There are seven members of STAT protein family: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b and STAT6. STAT1 and STAT2 become activated in response to the interferons and can form the homodimers or heterodimers with other STATs. STAT3 is activated by interleukin 5, interleukin-6, hepatocyte growth factor, interferons, epidermal growth factor and leukemia inhibitory factor (LIF). STAT3 regulates cell growth and apoptosis. Since it has anti-apoptotic and proliferative effects, hyperactivation of this transcription factor is associated with various tumors, such as chronic lymphocytic leukemia, Burkitt's lymphoma, cutaneous T cell lymphoma, Hodgkin disease, malignant melanoma, lung cancer, prostate carcinoma and renal cell carcinoma. STAT4 and STAT6 become phosphorylated in response to interleukin-4 and interleukin-12, respectively. They are involved in regulation of immune response and lymphocyte activation. The transcription factor STAT5b is activated by interleukin 2, interleukin 4 and CSF1. It mediates apoptosis, TCR signaling and liver gene expression. Our studies we focused on STAT5a, since it plays a crucial role in basic cell functions, like cell growth, proliferation, angiogenesis and additionally, serves as powerful anti-apoptotic factor through activation of BCL2L1/BCL-X(L) expression in the cell. JAK kinase phosphorylates STAT5a in response to interleukin 2, interleukin 3, interleukin 7 GM-CSF, erythropoietin and thrombopoietin. The high level of activated STAT5a was found in erythroleukemia, acute lymphocytic leukemia, acute myelogenous leukemia, chronic myelogenous leukemia, megakaryocytic leukemia, Sezary syndrome, anaplastic large T cell lymphoma, B cell lymphoma, head and neck cancer, cerebral meningiomas, neuroendocrine tumors, pancreatic carcinoma, ovarian carcinoma and colon cancer. Detection of hyperactivated STAT5a protein serves as one of the diagnostic markers of these tumors. Investigation of the role of STAT5a in tumor development is a very perspective direction of biology and medicine since it can help in designing a new effective diagnostic and therapeutic approaches. Modern investigations of the biological role of STATs in tumor formation are mainly performed by generation of transgenic animal models with modified genes of appropriate transcription factor. The main goal of this work was to synthesize modified STAT5a gene. We used classic methods for DNA synthesis and purification including polymerase chain reaction, site direct mutagenesis and electrophoresis in agarose gels. The cloning was performed with using various endonucleases and T4-ligase. All steps of DNA synthesis and cloning were analyzed by DNA sequencing. We also tested functional activity of modified STAT5a by transformation of NIH 3T3 cells. Our data confirmed synthesis of the modified STAT5a gene. The

protein of this gene is expressed at high level and possesses a specific DNA binding activity. Introduction of modified gene of STAT5a into mouse genome allows to modulate the process of STAT5a hyperactivation *in vivo* and to investigate the role of this transcription factor in the mechanisms of tumor development.

Key words: DNA sythesis, STAT transcription factors, gene modification.

## РЕЗЮМЕ

Андрей ЦИРУЛЬНИК<sup>1</sup>, Владимир СНИТИНСКИЙ<sup>1</sup>, Ростислав СТОЙКА<sup>2</sup>

### СИНТЕЗ МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЕНА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА STAT5A

<sup>1</sup>Львовский Национальный аграрный университет,  
ул. В. Великого, 1, 80381 Львов-Дубляны, Украина

<sup>2</sup>Институт биологии клетки Национальной академии наук Украины,  
ул. Драгоманова, 14/16, 79005 Львов, Украина  
[stoika@cellbiol.lviv.ua](mailto:stoika@cellbiol.lviv.ua)

Транскрипционные факторы семейства STAT (**S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription) являются ключевыми регуляторами экспрессии генов, стимулированных цитокинами, влияющими на разные клеточные процессы. Транскрипционный фактор STAT5a способствует стимуляции клеточного роста, пролиферации и ангиогенезу. Современные исследования биологической роли белков STAT проводят с использованием экспериментальных мышинных моделей, имеющих в составе своего генома искусственно синтезированные и модифицированные гены транскрипционных факторов. Целью данной работы был синтез модифицированного гена STAT5a. Введение этого гена в геном мыши позволит моделировать процесс активации STAT5a *in vivo* и проводить исследование его роли в процессах развития патологических процессов в организме.

Ключевые слова: синтез ДНК, транскрипционные факторы STAT, модификация генов.

Надійшла 20.03.2010.  
Після доопрацювання 06.05.2010.  
Прийнята до друку 12.05.2010.