

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О. В. ПАЛЛАДІНА

БАЗАЛІЙ АНДРІЙ ВІКТОРОВИЧ

УДК 577.112.7:576.322

**РОЛЬ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ Ruk/CIN85 У РЕЦЕПТОР-ЗАЛЕЖНИХ
МЕХАНІЗМАХ АКТИВАЦІЇ NADPH-ОКСИДАЗИ І
ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО СИГНАЛЮВАННЯ У ПУХЛИННИХ
КЛІТИНАХ**

03.00.04 - біохімія

**Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,
Дробот Людмила Борисівна,
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
завідувач лабораторії сигнальних механізмів клітини

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Філоненко Валерій Вікторович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу сигнальних систем клітини

доктор біологічних наук, професор
Матишевська Ольга Павлівна,
Київський національний університет ім. Т. Г. Шевченка,
професор кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології»

Захист дисертації відбудеться “26” вересня 2016 р. о 16⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

Автореферат розіслано “1” серпня 2016 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук

Н. П. Карлова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Зовнішній контроль проліферації, міграції й інвазії клітин здійснюють фактори росту, цитокіни і хемокіни шляхом активації рецептор-залежних внутрішньоклітинних сигнальних каскадів. Експериментальні дані останніх років свідчать, що рецептор-залежне зростання рівня внутрішньоклітинного пероксиду гідрогену (H_2O_2), – нового вторинного посередника, – не тільки забезпечує посилення і подовження активності рецептор-залежних сигнальних каскадів, але й пов'язане з регулюванням біологічних відповідей клітин та розвитком низки системних патологічних станів (Russell and Cotter, 2015; Drobot et al., 2013; Bae et al., 2011; Petri et al., 2009; Rhee, 2006; Finkel, 2001; Griendling et al., 2000). Ефекторними ензимами, залученими до продукування активних форм кисню (АФК), є представники родини мембранних NADPH-оксидаз. NADPH-оксидаза (НФ 1.6.99.6), або оксидаза дихального вибуху, є ензимним комплексом, що локалізований як на плазматичній мембрані, так і на внутрішньоклітинних мембранних структурах. При відповідній активації NADPH-оксидаза використовує цитоплазматичний NADPH, електрони від якого через FAD і гем переносяться через мембрану на її зовнішній бік до кисню з утворенням супероксид-радикалу (O_2^-), який надалі швидко трансмутує до H_2O_2 (Lambeth, 2004; Bae et al., 2011; Russell and Cotter, 2015). У свою чергу, підвищена внутрішньоклітинна концентрація H_2O_2 у стимульованих клітинах може підтримуватись за рахунок його пасивної дифузії в клітину, де в примембранній області відбувається локальна інактивація пероксиредоксинів, які в нормі інактивують окиснювальний чинник. Інший механізм включає рецептор-залежний ендоцитоз активних Nox, які генерують H_2O_2 у внутрішній простір люмену з наступною його дифузиею до цитоплазматичного компартменту. Крім ендосом, на сьогодні встановлена локалізація NADPH-оксидаз у фокальних комплексах, кавеолах/ліпідних рафтах, ендоплазматичному ретикулумі, що забезпечує контрольоване просторово-часове продукування H_2O_2 (Белоусов и др., 2013; Ushio-Fukai, 2009).

На сьогодні показано, що через окиснювальну модифікацію тіолових груп в протеїнах H_2O_2 регулює активність ключових компонентів сигнальних мереж клітин, таких як РКС, MAPK, PI3K, фосфотирозинові фосфатази, PTEN, рецепторні і цитоплазматичні тирозинові кінази та ін. Водночас, важливу роль у H_2O_2 -залежному сигналюванні відіграє тіоредоксин/тіоредоксин-редуктазна система, відповідальна за відновлення окиснених протеїнів (Chen et al., 2009; Russell and Cotter, 2015). Таким чином, наявні дані свідчать про те, що H_2O_2 -сигналювання за своїми закономірностями і біологічною значимістю є співставним з основними парадигмами, сформульованими для сигналювання, залежного від посттрансляційної модифікації клітинних протеїнів шляхом фосфорилування. Однак, незважаючи на великий масив нагромаджених експериментальних даних, необхідні наступні дослідження, скеровані на з'ясування функціональної значимості локалізованого продукування H_2O_2 , механізмів рецептор-залежної активації NADPH-оксидаз і їх компартменталізації. Важливо також ідентифікувати нові мішені H_2O_2 у редокс-залежних сигнальних і біологічних подіях, таких як

хемотаксис, проліферація, інвазія, диференціювання, біологічне старіння та апоптоз, що є важливим для розробки новітніх фармакологічних препаратів скерованої дії.

Попередніми дослідженнями встановлено, що організатор NADPH-оксидазного комплексу протеїн Tks4 (Gianni et al., 2010) є зв'язувальним партнером адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (Navtylov et al., 2009), що дозволяє припустити участь останнього у регулюванні активності NADPH-оксидази й біологічних відповідей клітин. Наявні експериментальні дані свідчать, що Ruk/CIN85 бере участь в реалізації таких тривалих клітинних відповідей як везикулярний транспорт, ліганд-залежний ендоцитоз рецепторних тирозинових кіназ, проліферація, адгезія, міграція й інвазія пухлинних клітин (Navtylov et al., 2010). Ruk/CIN85 пов'язує комплекси тирозинкіназних рецепторів з головним регулятором їх ендоцитозу, убіквітинлігазою c-Cbl, а також з ендофілінами – ендосомними протеїнами, що забезпечують інвагінацію плазматичної мембрани на ранніх стадіях ендоцитозу. У злякано трансформованих клітинах ці рецептори уникають протеасомної деградації, що призводить до конститутивної активації сигнальних шляхів, які запускаються за їх участі. Припускається, що при цьому порушується взаємодія Ruk/CIN85 з Cbl, внаслідок чого Ruk/CIN85 накопичується у периферійних структурах, таких як фокальні контакти і ламеліподії, та у внутрішньоклітинних мембранних структурах (Dikic and Giordano, 2003; Navtylov et al., 2010). Враховуючи вищесказане, з'ясування потенційної ролі Ruk/CIN85 у механізмах NADPH-залежного продукування H_2O_2 є актуальною проблемою сучасної біохімії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відповідності з планами наукових досліджень лабораторії сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. У роботі використані результати досліджень, отримані в рамках бюджетної теми «Механізми участі адаптерного/риштувального білка Ruk/CIN85 у регулюванні біологічних відповідей нормальних і трансформованих клітин» (№ держреєстрації 0110U002698, 2010-2014 рр.). Робота виконувалась також у рамках спільного українсько-російського гранту між НАН України та РФФД 2012 р. «НАДФН-оксидаза як потенційна біомішень і ключовий регулятор міграції і проліферації клітин» (№ держреєстрації 0110U003761, 2012-2013 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження було з'ясувати потенційну роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у регулюванні функціональної активності NADPH-оксидаз та внутрішньоклітинного сигналювання в пухлинних клітинах.

Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Провести порівняльний аналіз продукування АФК пухлинними клітинами залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та дії інгібітора збирання NADPH-оксидазного комплексу апоциніну.
2. Клонувати експресійний вектор, що кодує флуоресцентний сенсор H_2O_2 , злитий з адаптерним протеїном Ruk/CIN85, з'ясувати його субклітинну локалізацію та здатність детектувати пероксид водню.
3. Дослідити вплив інгібітора збирання NADPH-оксидазного комплексу апоциніну та пастки для АФК NAC на активацію ключових сигнальних молекул у відповідь на стимуляцію пухлинних клітин з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 епідермальним фактором росту (EGF).

4. Дослідити вплив апоциніну на міграцію клітин лінії MCF-7 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.
5. Проаналізувати рівень експресії ізоформ NOX у клітинах MCF-7 з різним вмістом Ruk/CIN85.
6. З'ясувати особливості взаємодії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та субодиноці-організатора NADPH-оксидаз Tks4 в пухлинних клітинах за допомогою реакції імунопреципітації та GST *in vitro* pull-down аналізу.

Об'єкт дослідження. Молекулярні механізми контролю функціональної активності NADPH-оксидазного комплексу і редокс-залежного сигналювання.

Предмет дослідження. Вклад адаптерного протеїну Ruk/CIN85 до регулювання функціональної активності NADPH-оксидазного комплексу в пухлинних клітинах і рецептор-залежного внутрішньоклітинного сигналювання.

Методи дослідження: методи роботи з культурами клітин, методи молекулярного клонування, трансфекція клітин, визначення АФК хемілюмінесцентним методом з люмінолом, МТТ тест, аналіз міграції з використанням модифікованої камери Бойдена, електрофорез протеїнів у ПААГ та нуклеїнових кислот в агарозному гелі, Вестерн-блот аналіз, імунопреципітація, GST *in vitro* pull down аналіз, флуоресцентна мікроскопія, конфокальна прижиттєва мікроскопія.

Наукова новизна роботи. Вперше показано, що продукування АФК пухлинними клітинами, опосередковане функціонуванням мембранних NADPH-оксидазних комплексів, позитивно корелює з рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Вперше сконструйовано плазмідний вектор для експресії в клітинах ссавців, що кодує внутрішньоклітинний біосенсор пероксиду водню HyPer, злитий з адаптерним протеїном Ruk/CIN85, *Ruk/CIN85-HyPer-N1*. За допомогою прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії вперше продемонстровано співлокалізацію Ruk/CIN85 та генерування H₂O₂ у «dot»-подібних везикулярних структурах в тимчасово трансфікованих клітинах MCF-7. Вперше показано, що попередня обробка клітин MCF-7 субклону G10 з високим рівнем експресії Ruk/CIN85 апоциніном і NAC призводить до реверсії тривалої EGF-індукованої активації Akt кінази на тимчасову з одночасним посиленням автофосфорилування рецептора EGF, що супроводжується пригніченням міграції клітин. За допомогою ПЛР у реальному часі встановлено, що підвищене продукування АФК в клітинах MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 корелює з диференційними системними змінами у рівні експресії генів *NOX*. Взаємодію Ruk/CIN85 з ендогенним протеїном Tks4, організатором NADPH-оксидазного комплексу, підтверджено за допомогою реакції імунопреципітації та детально проаналізовано за допомогою GST *in vitro* pull down аналізу в лініях клітин різного тканинного походження.

Практичне значення одержаних результатів. Результати проведених досліджень засвідчили існування регуляторного взаємозв'язку між рівнем експресії Ruk/CIN85, інтенсивністю продукування АФК та особливостями його компартменталізації, динамікою активації редокс-залежного сигналювання та біологічними відповідями пухлинних клітин. Отримані дані є потенційно важливими для пошуку і ідентифікації нових редокс-залежних мішеней для розробки відповідних фармакологічних препаратів скерованої дії. Отримана

генетична конструкція, що кодує химерний протеїн Ruk/CIN85-HyPer, може бути запропонована як новий інструмент для дослідження локалізованого продукування H_2O_2 у живих клітинах. Результати дисертаційної роботи рекомендуються для використання в загальному курсі «Молекулярна біологія клітини» та спецкурсі «Сигнальні механізми клітин» для студентів університетів зі спеціальностей «біохімія», «молекулярна біологія», «біотехнологія».

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи автором особисто відібрано та проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження. Дисертантом спільно з науковим керівником розроблено програму проведення досліджень та вибрано методи розв'язання поставлених завдань. Експериментальна частина дисертаційної роботи була виконана здобувачем особисто, за винятком деяких експериментів, що проводились спільно зі співробітниками факультету фундаментальної медицини Московського державного університету ім. М. В. Ломоносова та лабораторії сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України. Дослідження динаміки внутрішньоклітинного продукування пероксиду водню за допомогою прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії проведено спільно з к.б.н. Тюріним-Кузьміним П. О. та доцентом Воротніковим О. В. (МДУ ім. М. В. Ломоносова, Росія). Результати вищезгаданих досліджень опубліковано у спільних публікаціях.

Апробація результатів досліджень. Основні положення дисертації були представлені на наступних наукових конференціях: VII Парнасівській конференції (Польща, Варшава, 2011), конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2013» (Київ, 2013), конференції «Тиждень клітинних технологій» (Київ, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, 2014), конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015» (Київ, 2015), Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології» (Львів, 2015) та науковому семінарі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна «Актуальні проблеми сучасної біохімії».

Публікації. За темою дисертації опубліковано 12 робіт, які включають 6 статей у фахових виданнях та тези 6 доповідей на вітчизняних і міжнародних наукових конференціях і з'їздах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить такі розділи: вступ, аналітичний огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати досліджень, аналіз та обговорення результатів досліджень, висновки та список використаних джерел. Дисертацію викладено на 125 сторінках машинописного тексту і проілюстровано 34 рисунками та 1 таблицею. Список використаної літератури охоплює 135 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Огляд літератури. В огляді літератури висвітлено сучасний стан проблеми організації і функціонування сигнальних мереж клітин за нормальних фізіологічних умов та при канцерогенезі. Приведено дані стосовно доменної організації сигнальних протеїнів та проаналізовано роль міжмолекулярних взаємодій у перетворенні та внутрішньоклітинному проведенні регуляторних сигналів. Особлива увага приділена аналізу ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у реалізації клітинних відповідей у нормальних і пухлинних клітинах. Детально

охарактеризовано роль активних форм кисню у регулюванні внутрішньоклітинного сигналювання, будову й механізми рецептор-залежної активації ензимів родини NADPH-оксидаз (NOXs), проаналізовано регуляторну роль пероксиду гідрогену як нового вторинного посередника у редокс-залежному сигналюванні.

Матеріали та методи досліджень. У дисертаційній роботі використано такі плазмідні вектори, сконструйовані для експресії в клітинах бактерій і ссавців: лінеаризований вектор для позитивного клонування *pJET1.2/blunt* з летальною вставкою, яка забезпечує ефективне субклонування продуктів ПЛР з тупими кінцями (Thermo Fisher Scientific); *pEGFP-N1* (BD Biosciences Clontech, GenBank Accession #U55762); *PH-Btk-HyPer-MigRI*, що кодує PH домен тирозинової кінази Btk кон'югований з HyPer (вектор наданий для роботи О. В. Вороніковим, Московський державний університет ім. М. В. Ломоносова, Росія); *pRc-Ruk_l* (вектор наданий для роботи В. Л. Бухманом, Кардіфський університет, Велика Британія), рекомбінантні *pGEX-4T1* вектори, що кодують SH3A, SH3B, SH3C, SH3AB, SH3BC, SH3ABC, Pro-rich, Ser-rich та coiled-coil домени Ruk/CIN85 (Ржепецький і ін., 2009); для конструювання рекомбінантних векторів були використані такі реагенти: ендонуклеази рестрикції BamHI, EcoRI, XhoI, NotI, ДНК-полімераза Pfu, ДНК-лігаза T4, набір реактивів для елюції ДНК з агарозного гелю Silica Bead DNA Gel Extraction Kit, агароза, середовище LB і IPTG (Fermentas), набір для виділення плазмідної ДНК GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific), набір реактивів для лігазної реакції («Takara», Японія); для Вестерн-блот аналізу використано такі антитіла і реагенти: моноклональне антитіло до SH3A домену Ruk (Mayevska et al., 2006), моноклональні анти-β-актинові антитіла («Sigma», США), поліклональні анти-Tks4 («Millipore», США), анти-Erk1/2 («Sigma», США), анти-фосфо-Erk-1/2 (Thr202/Tyr204) («Sigma», США), анти-Akt («Cell Signaling», США), анти-фосфо-Akt (Ser473) («Cell Signaling», США), анти-EGFR («Cell Signaling», США), анти-фосфо-EGFR (Tyr845) («Invitrogen», США), анти-фосфо-EGFR (Tyr1068) («Invitrogen», США), мишачі анти-кролячі IgG, які не впізнають денатуровані антитіла (L27A9) («Cell Signaling», США), анти-фосфо-mTOR (Ser2448) («Cell Signaling», США), анти-мишачі та анти-кролячі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому («Sigma», США), розчини для ECL детекції («Amersham», Велика Британія).

У роботі використовували стабільно трансфіковані клітини аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7, що надекспресують повнорозмірну форму адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (Samoylenko et al., 2012), та клітини з пригніченим рівнем експресії досліджуваного адаптера, отримані за допомогою siRNA-інтерференції (Samoylenko et al., 2013), клітини аденокарциноми грудної залози лінії MDA-MB-231, клітини меланоми людини лінії MM-4, клітини аденокарциноми прямої кишки людини ліній DLD-1 та HT-29, клітини ембріональної нирки людини лінії HEK293, мишачі клітини карциноми легені Льюїс лінії LLC та фібробласти миші лінії NIH 3T3. Клітини вирощували в середовищі DMEM («Sigma», США) за присутності 10% ембріональної сироватки теляти, 2 мМ L-глутаміну, 50 МО/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину («GibcoBRL», США) у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при 37°C.

Концентрацію протеїну в лізатах клітин визначали за допомогою комерційного набору «Pierce™BCA Protein Assay» («Thermo Scientific», США). Клітинні протеїни розділяли електрофорезом у ПААГ за присутності SDS у буферній системі Леммлі (Laemmli, 1970). Імуноблот-аналіз протеїнів здійснювали після їх електропереносу з ПААГ на нітроцелюлозну або полівінілідифторидну мембрани (Towbin, 1979). Імунореактивні смуги протеїнів на блотах виявляли за допомогою набору для підсиленої хемілюмінесценції. Трансфекцію клітин НЕК293 проводили за допомогою Ca^{2+} -фосфатної преципітації, як описано в (Webster and Perkins, 1999), клітин MCF-7 – за допомогою реагента для трансфекції FuGene 6 згідно до рекомендацій виробника (Roche Molecular Biochemicals, Німеччина).

Продукцію активних форм кисню (АФК) визначали за допомогою хемілюмінесцентного аналізу на люмінометрі FLx800 (BioTek, США), використовуючи люмінол та пероксидазу («Sigma», США), як описано в (Gianni et al., 2009).

Конфокальну мікроскопію фіксованих препаратів проводили за допомогою спектральної мультифотонної лазер-сканувальної конфокальної системи LSM 510 META («Carl Zeiss», ФРН) за допомогою програмного забезпечення Carl Zeiss Confocal Software і Zeiss LSM Image Browser Version 4.0.0.241. Для сканування клітин використовували об'єктив 63x/0,75 Corr. Сканування здійснювали при довжині хвилі збудження 489 нм для NuPer (аргон-іонний лазер).

Для аналізу атрактант-індукованої рухливості клітин використовували модифіковану камеру Бойдена, що містила мембранну перегородку з розміром пор 8 мкм (Becton Dickinson). Нижню поверхню мембрани камер покривали колагеном І типу (10 мкг/мл) і поміщали їх у 24-лунковий планшет. Де зазначено, до клітин попередньо додавали апоцинін на 12 год. Після індукування клітини висівали на верхню поверхню мембрани камери Бойдена за присутності 0,1% сироватки. У лунки планшетів вносили середовище, що містило 5% сироватки. Інкубацію проводили протягом 12 год. Клітини, що мігрували на нижню поверхню мембрани, фіксували 4% параформальдегідом. Ці клітини барвили 1% розчином кристалічного фіолетового і підраховували у 5-ти випадково вибраних полях зору (у кожній експериментальній точці підраховували більше ніж 100 клітин).

РНК виділяли за допомогою innuSOLV RNA Reagent («Analytik Jena», Німеччина). Після завершення виділення здійснювали спектрофотометричне вимірювання концентрації РНК та оцінювали чистоту виділеного препарату. Для проведення ПЛР у реальному часі проводили зворотню транскрипцію шляхом додавання до препарату РНК 1× буферу (1 мкМ кожного dNTP, 6,7 мкМ MgCl_2 , 20 U RiboLock™ інгібіторів РНКаз, 5 мкМ випадкових праймерів і 40 U M-MuLV зворотної транскриптази, «Thermo Scientific», США).

Статистичний аналіз даних проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2007.

Результати досліджень та їх обговорення

1. Дослідження продукування АФК пухлинними клітинами залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та впливу на цей процес інгібітора збирання NADPH-оксидазного комплексу апоциніну. На першому етапі досліджень було проведено порівняльний аналіз продукування АФК стабільними

трансфектантами клітин аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 за допомогою хемілюмінесцентного аналізу з використанням люмінолу і пероксидази на люмінометрі. Дані субклони були отримані з метою з'ясування впливу надекспресії Ruk/CIN85 на біологічні властивості пухлинних клітин (Samoylenko et al., 2012). Моніторинг продукування АФК здійснювали протягом 30 хв. Як видно з рис. 1., субклони G4 та G10 клітин лінії MCF-7 з високим рівнем експресії Ruk/CIN85 продукують майже вдвічі більше АФК, ніж клітини дикого типу, стабільно трансфіковані вектором без вставки, та субклону D4 з низьким рівнем експресії досліджуваного адаптерного протеїну. Отримані дані дозволяють припустити, що продукування АФК аденокарциномними клітинами грудної залози людини лінії MCF-7 залежить від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

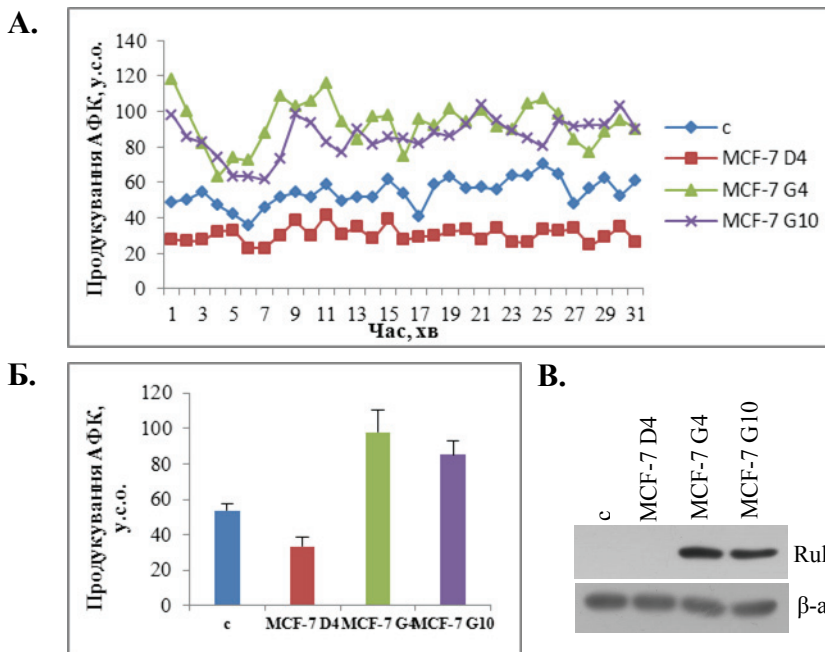


Рис. 1. *Продукування АФК аденокарциномними клітинами грудної залози людини лінії MCF-7 залежить від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.*

А. Динаміка продукування АФК субклонами клітин лінії MCF-7; **Б.** Середні значення продукування АФК субклонами клітин лінії MCF-7; **В.** Імуноблот-аналіз вмісту Ruk/CIN85 в лізатах клітин лінії MCF-7. (у.с.о. – умовні світлові одиниці).

Водночас, залишалось відкритим питання щодо джерела продукування АФК у клітинах. Одним з поширених експериментальних підходів для його вирішення є інгібіторний аналіз. З метою з'ясування можливого залучення NADPH-оксидаз до продукування АФК, які детектувалися хемілюмінесцентним методом, було використано інгібітор збирання NADPH-оксидазних комплексів апоцинін. Було продемонстровано, що продукування АФК клітинами субклону G10 з високим рівнем експресії Ruk/CIN85 дозозалежно пригнічується за присутності апоциніну, тоді як вміст адаптерного протеїну за використаних експериментальних умов не змінюється (Рис. 2).

Для підтвердження залучення Ruk/CIN85 до контролю функціонування NADPH-оксидазного комплексу було проведено down-регулювання досліджуваного адаптерного протеїну з використанням siRNA-інтерференції (Рис. 3). Пригнічення експресії гену Ruk/CIN85 здійснювали за допомогою shRNA (small hairpin RNA), субклонуваної у лентівірусний вектор *pLKO.1 puro* (Addgene). Отриманими специфічними лентівірусами інфікували клітини MCF-7 субклону G10.

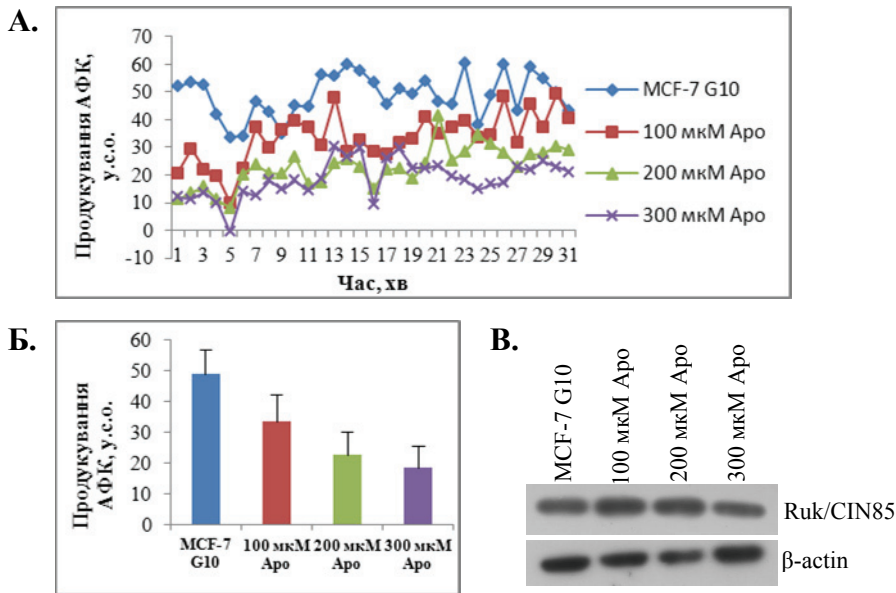


Рис. 2. Інгібітор збирання NADPH-оксидазного комплексу апоцинін пригнічує продукування АФК клітинами лінії MCF-7 субклубу G10. **А.** Динаміка продукування АФК клітинами G10, передінкубованих протягом 12 год за різних концентрацій апоциніну; **Б.** Середні значення продукування АФК клітинами субклубу G10 за різних концентрацій апоциніну; **В.** Імуноблот-аналіз вмісту Ruk/CIN85 в лізатах клітин G10.

Інфіковані клітини відбирали за присутності селективного антибіотику пуроміцину протягом 7 діб з наступним культивуванням клітин, що вижили. Ступінь down-регулювання Ruk/CIN85 контролювали Вестерн-блот аналізом відповідних лізатів. Результати хемілюмінесцентного аналізу, представлені на Рис. 3, свідчать, що shRNA-опосередковане зниження експресії Ruk/CIN85 в клітинах G10 супроводжується практично повним пригніченням продукування АФК.

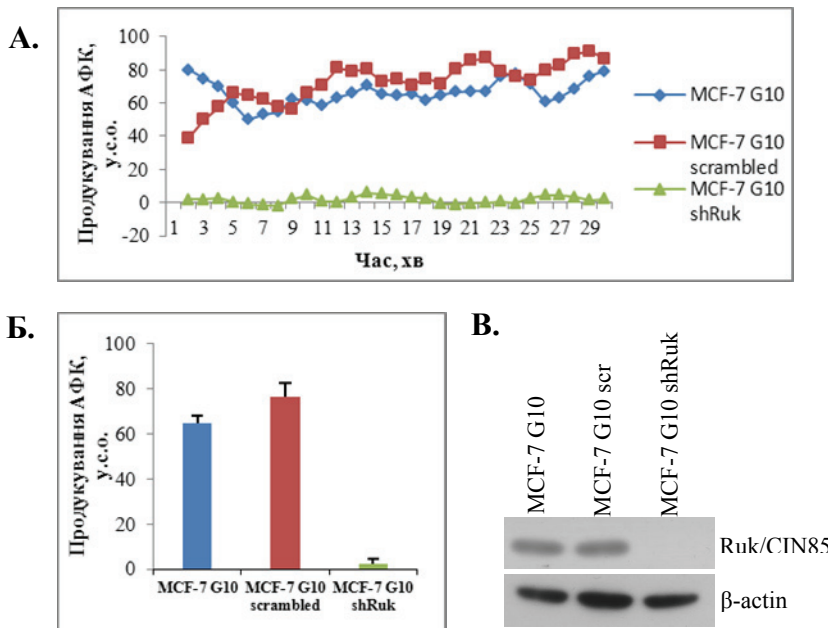


Рис. 3. Продукування АФК клітинами субклубу G10 пригнічується за умов зниження рівня експресії Ruk/CIN85. Рівень експресії Ruk/CIN85 пригнічували за допомогою специфічних shRNA лентівірусів. **А.** Динаміка продукування АФК клітинами субклубу G10 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85; **Б.** Середні значення продукування АФК; **В.** Імуноблот-аналіз вмісту Ruk/CIN85 в лізатах клітин G10.

Згідно з результатами, отриманими раніше в лабораторії сигнальних механізмів клітини, надекспресія Ruk/CIN85 в низькоінвазивних клітинах грудної залози людини лінії MCF-7 супроводжується значним посиленням їхнього трансформувального потенціалу (Samoylenko et al., 2012). Тому, було вирішено порівняти продукування АФК аденокарциномними клітинами грудної залози лінії MDA-MB-231 та аденокарциномними клітинами ободової кишки лінії HT-29, що характеризуються високим ступенем малігнізації, та залежність цього процесу від рівня експресії досліджуваного адаптерного протеїну. Як свідчать дані, представлені на Рис. 4, інтенсивність продукування АФК клітинами MDA-MB-231 є подібною до такої

клітинами субклову G10. Значно вища інтенсивність продукування АФК є характерною для клітин HT-29 (Рис. 5), що, за даними літератури, пов'язано з їхнім тканивним походженням. Як і для клітин G10, продукування АФК практично повністю пригнічується в клітинах інфікованих Ruk/CIN85-специфічними shRNA лентивірусами.

Таким чином, за допомогою хемілюмінесцентного аналізу було показано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 залучений до продукування АФК клітинами лінії MCF-7 в апоцінін-залежний спосіб. Встановлено, що продукція АФК зростає при надекспресії даного протеїну та зменшується при його down-регулюванні. Отримані дані підтверджують висловлене нами припущення про можливу регуляторну роль Ruk/CIN85 у функціонуванні NADPH-оксидазного комплексу.

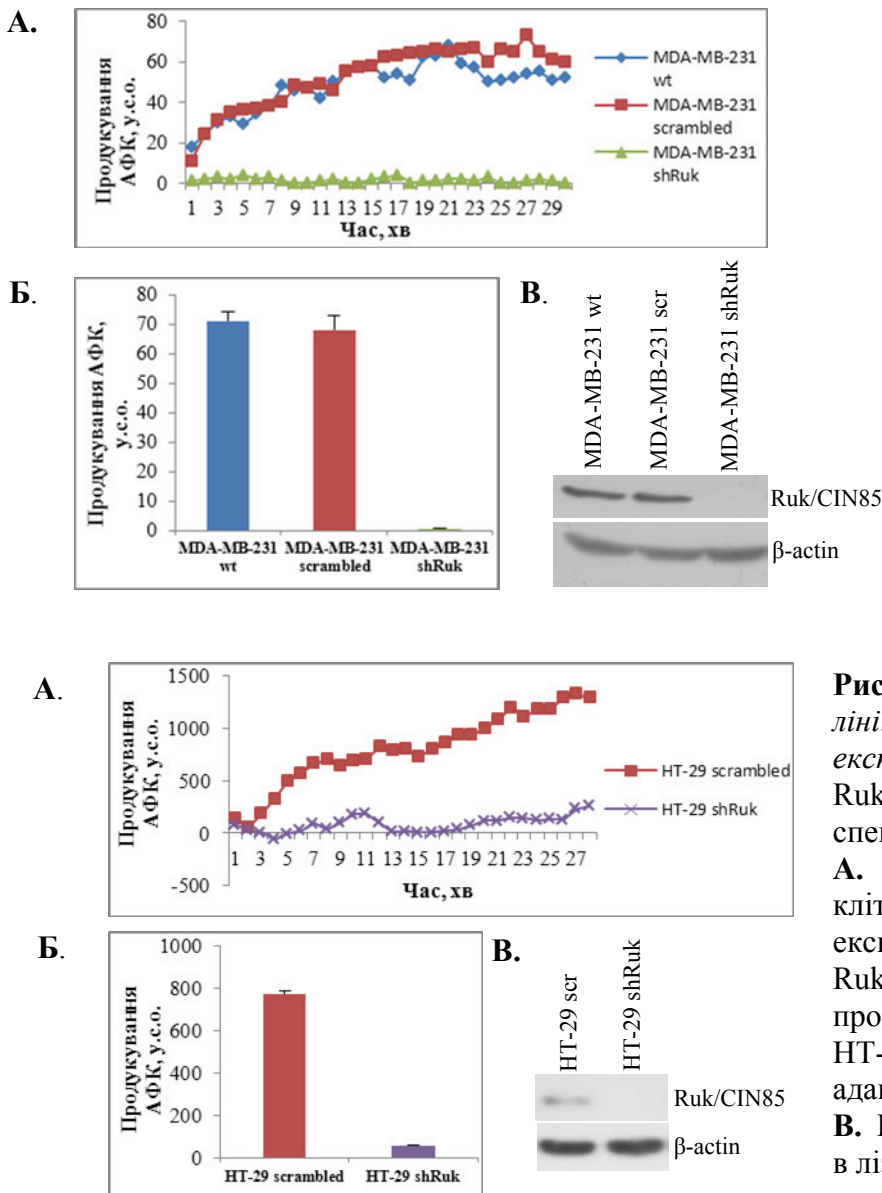


Рис. 4. Продукування АФК клітинами лінії MDA-MB-231 залежить від рівня експресії Ruk/CIN85. Рівень експресії Ruk/CIN85 пригнічували за допомогою специфічних shRNA лентивірусів. **А.** Динаміка продукування АФК клітинами лінії MDA-MB-231 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85; **Б.** Середні значення продукування АФК клітинами лінії MDA-MB-231 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85; **В.** Імуноблот-аналіз вмісту Ruk/CIN85 в лізатах клітин лінії MDA-MB-231.

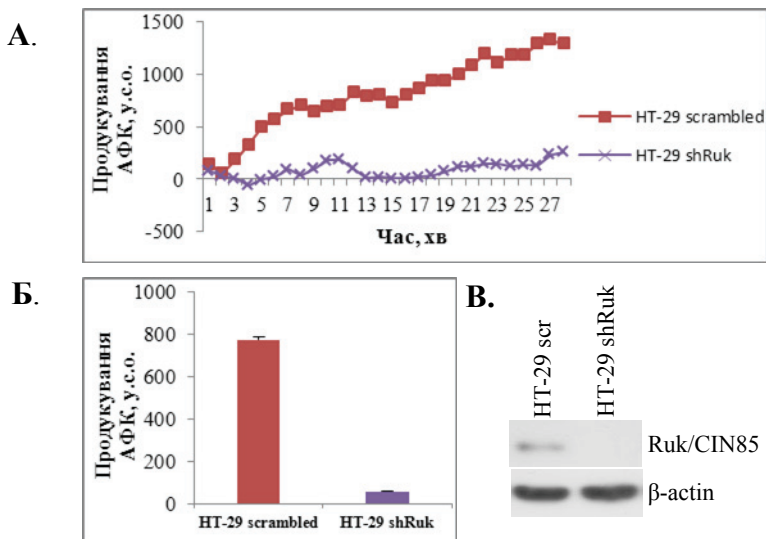


Рис. 5. Продукування АФК клітинами лінії HT-29 залежить від рівня експресії Ruk/CIN85. Рівень експресії Ruk/CIN85 пригнічували за допомогою специфічних shRNA лентивірусів. **А.** Динаміка продукування АФК клітинами лінії HT-29 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85; **Б.** Середні значення продукування АФК клітинами лінії HT-29 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85; **В.** Імуноблот-аналіз вмісту Ruk/CIN85 в лізатах клітин лінії HT-29.

2. Клоування експресійного вектора, що кодує флуоресцентний сенсор H_2O_2 , (HyPer), злитий з адаптерним протеїном Ruk/CIN85, з'ясування його субклітинної локалізації та здатності детектувати пероксид гідрогену. Для конструювання плазмідного вектора, що кодує химерний флуоресцентний сенсор H_2O_2 , Ruk/CIN85-HyPer, була обрана стратегія, детально описана в «Матеріалах і

методах». На першому етапі, кДНК HyPer вставляли в екаріотичний вектор *pEGFP-N1*, замість кДНК EGFP, за центрами пізнання ендонуклеазами рестрикції *Bam*HI і *Not*I. На наступному етапі, кДНК *Ruk*₁ субклонували в отриману генетичну конструкцію за центрами пізнання ендонуклеазами рестрикції *Xho*I і *Eco*RI (карти векторів представлені на Рис. 6, А, В). Розмір і правильну орієнтацію вставок перевіряли рестрикційним аналізом (Рис. 6, Б, Г).

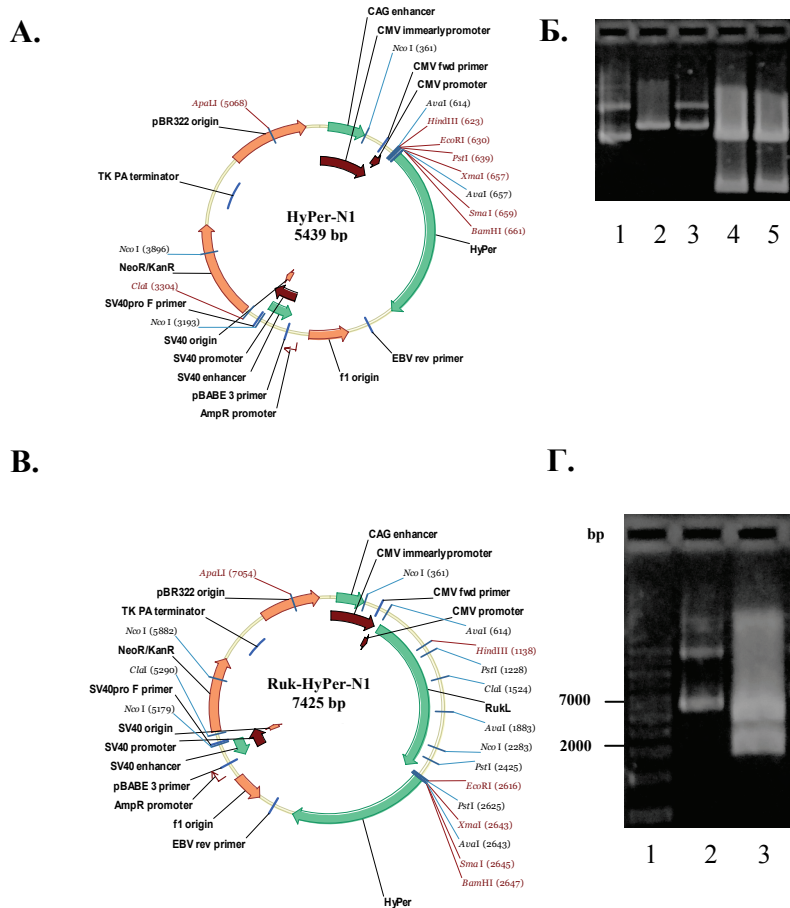


Рис. 6. Конструювання векторів *HyPer-N1* та *Ruk/CIN85-HyPer-N1*. **А.** Карта вектора *HyPer-N1*. **Б.** Рестрикційний аналіз *HyPer-N1*: 1. плазміда *HyPer-N1*; 2. *HyPer-N1*, розщеплена *Eco*RI; 3. *HyPer-N1*, розщеплена *Xho*I; 4. *HyPer-N1*, подвійно розщеплена *Bam*HI і *Not*I; 5. *HyPer-N1*, подвійно розщеплена *Eco*RI і *Not*I. **В.** Карта вектора *Ruk/CIN85-HyPer-N1*. **Г.** Рестрикційний аналіз *Ruk/CIN85-HyPer-N1*: 1. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (#SM0311); 2. плазміда *Ruk/CIN85-HyPer-N1*; 3. *Ruk/CIN85-HyPer-N1*, розщеплена *Eco*RI and *Xho*I.

Ефективність експресії *HyPer* і *Ruk/CIN85-HyPer* та особливості їх внутрішньоклітинної локалізації досліджували на моделі клітин НЕК293, тимчасово трансфікованих відповідним векторами. За допомогою Вестерн-блот

аналізу з використанням моноклонального антитіла, що розпізнає N-кінцевий SH3A домен адаптерного протеїну, було підтверджено уявну молекулярну масу рекомбінантного протеїну близько 120 кДа (Рис. 7, А).

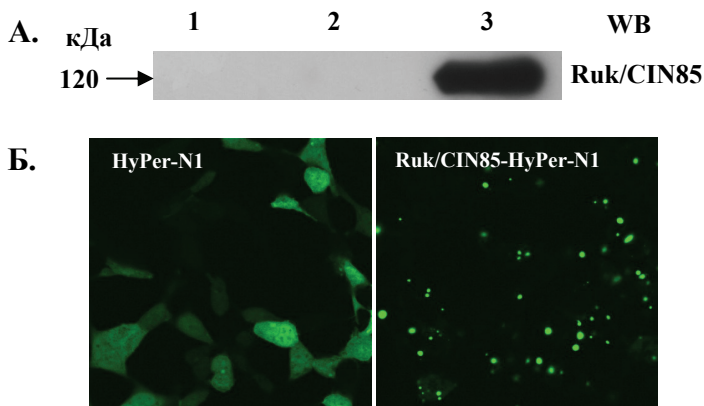


Рис. 7. Рекомбінантні протеїни *HyPer* та *Ruk/CIN85-HyPer* ефективно експресуються у тимчасово трансфікованих клітинах НЕК293.

А. Вестерн-блот аналіз *Ruk/CIN85-HyPer* в Тритон X-100 розчинних лізатах тимчасово трансфікованих клітин НЕК293: 1. Нетрансфіковані клітини НЕК293; 2. Клітини НЕК293, трансфіковані *HyPer-N1*; 3. Клітини НЕК293, трансфіковані *Ruk/CIN85-HyPer-N1*. **Б.** Флуоресцентна мікроскопія *HyPer* і *Ruk/CIN85-HyPer* у клітинах НЕК293.

З Рис. 7, Б видно, що флуоресценція при 504/520 нм протеїну *HyPer* в контрольних клітинах НЕК293, тимчасово трансфікованих *HyPer-N1*, характеризується дифузним патерном по всьому об'єму клітин. Навпроти,

флуоресценція Ruk/CIN85-Hyper в клітинах HEK293, тимчасово трансфікованих Ruk/CIN85-Hyper-N1, після фіксації параформальдегідом чітко детектується у вигляді зелених «dot»-подібних утворень різного розміру. У низці попередніх публікацій була продемонстрована точкоподібна локалізація як ендогенного, так і екзогенного Ruk/CIN85, яка є характерною для протеїнів, залучених до контролю внутрішньоклітинного мембранного трафіку (Mayevska et al., 2006; Havrylov et al., 2008). Зокрема, показано асоціацію Ruk/CIN85 з частиною COP1-оторочених везикул комплексу Гольджі (Havrylov et al., 2008). З іншого боку, продемонстровано, що в клітинах MCF-7 GFP-Ruk/CIN85 локалізується і концентрується у навколоядерній зоні в округлих примембранних структурах, які одночасно є клатрин-позитивними (Nikolaienko et al., 2009). В клітинах COS-7 виявлено локалізацію Ruk/CIN85 по краях округлих темних везикулярних структур, які містили ендоцитований EGF (Zhang et al., 2009). Автори відзначають, що виявлені структури не є агрегосомами, оскільки вони не співлокалізовані з шапероном Hsp70, залученим до відповіді на незгорнуті протеїни. Таким чином, можна припустити, що виявлені точкоподібні структури є агрегатами Ruk/CIN85 і його зв'язувальних партнерів.

Здатність рекомбінантного протеїну Ruk/CIN85-Hyper детектувати H_2O_2 перевіряли за допомогою прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії на моделі тимчасово трансфікованих клітин MCF-7. Як видно з Рис. 8, А, Б, протягом зазначеного часу експерименту в репрезентативних везикулярних структурах спостерігається зростання концентрації H_2O_2 , яке відповідає зміні кольору від зеленого через жовтий до червоного. І хоча природа та біологічна значимість виявлених везикулярних структур на сьогодні невідома, отримані дані дозволяють припустити участь адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у локалізованому продукуванні H_2O_2 . В контексті проблеми, що вивчається, важливо зазначити, що у низці публікацій останнього часу показана критична роль NADPH-оксидаз, локалізованих у ендосомних структурах клітини і асоційованих зі специфічними сигнальними комплексами, для забезпечення компартменталізованого продукування вторинного посередника і регулювання біологічних відповідей клітин (Li et al., 2008; Miller et al., 2009; Ejlerskov et al., 2012; Lukyanov and Belousov, 2014).

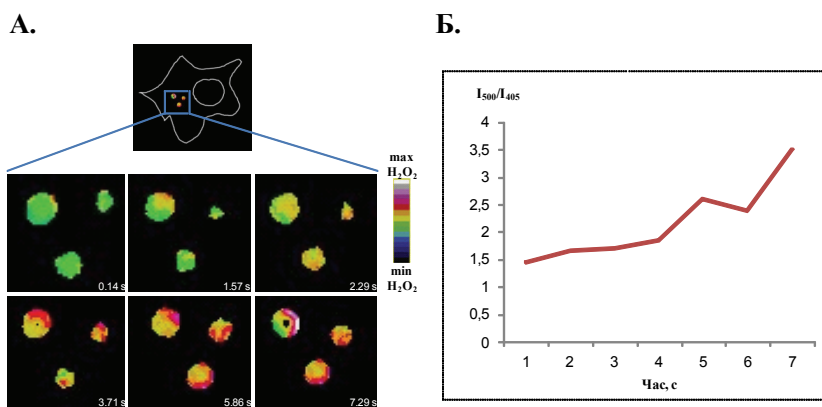


Рис. 8. Детектування H_2O_2 за допомогою прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії в клітинах MCF-7, що експресують химерний протеїн Ruk/CIN85-Hyper. **А.** Індивідуальні фрагменти фільмування репрезентативної ділянки клітини, що відповідають зазначеному часу. **Б.** Динаміка продукування H_2O_2 , асоційованого з репрезентативними ділянками клітини, показаними на рис. А.

3. Дослідження впливу інгібітора збирання NADPH-оксидазного комплексу апоцініну та пастки для АФК NAC на активацію ключових сигнальних молекул

у відповідь на стимуляцію пухлинних клітин з різним рівнем експресії *Ruk/CIN85* епідермальним фактором росту (EGF). Дослідженнями співробітників лабораторії сигнальних механізмів клітини раніше було показано, що підвищення експресії *Ruk/CIN85* сприяє злоякісній трансформації клітин аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7, зокрема впливає на рухливість, адгезивні властивості й ріст у напіврідкому агарі, забезпечує швидку і тривалу EGF-залежну активацію Erk1/2 та Akt і Src кіназ (Samoilenko et al., 2012), ініціює розвиток ознак ракових стовбурових клітин (Пасічник і ін., 2013). Для з'ясування можливості залучення АФК, асоційованих з функціонуванням NADPH-оксидазних комплексів, до забезпечення тривалої EGF-залежної активації кіназ Erk1/2, Akt та рецептора EGFR в клітинах MCF-7 з надекспресією *Ruk/CIN85*, контрольні клітини MCF-7 та клітини субклону G10 попередньо інкубували з апоциніном або N-ацетилцистеїном (NAC) з наступною стимуляцією EGF.

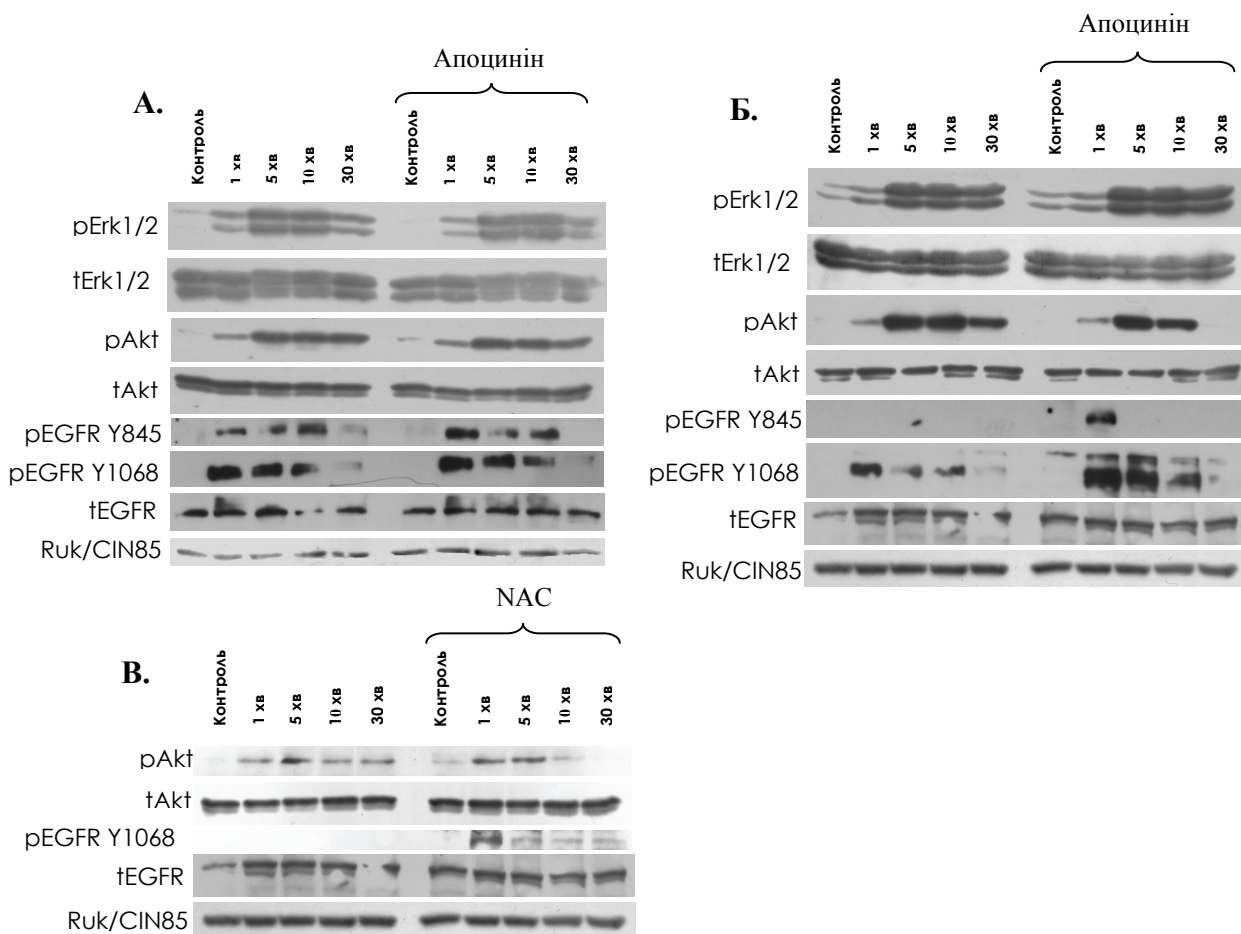


Рис. 9. Адаптерний протеїн *Ruk/CIN85* у редокс-залежний спосіб модулює динаміку активації кінази Akt у клітинах MCF-7. Імуноблот-аналіз активності кіназ Erk1/2, Akt та рецептора EGFR за вмістом їх фосфорформ в контрольних клітинах MCF-7, стабільно трансфікованих пустим вектором (А), та сублінії G10 із надекспресією *Ruk/CIN85* (Б, В) залежно від попереднього інкубування з апоциніном (А, Б) або NAC (В).

Як свідчать дані, представлені на Рис. 9, апоцинін не впливає на динаміку активації кінази Erk як в контрольних клітинах MCF-7, так і субклону G10. Водночас, нами продемонстровано, що попередня обробка клітин MCF-7 субклону G10 апоциніном і NAC призводить до реверсії тривалої активації кінази Akt на

тимчасову з одночасним посиленням автофосфорилування рецептора EGF (Рис. 9, Б, В). При цьому слід зазначити, що змін у динаміці активації кінази Akt і фосфорилування рецептора EGF по залишках Y845 і Y1068 за використаних експериментальних умов у контрольних клітинах виявити не вдалось (Рис. 9, А). Важливим є також той факт, що рівень EGF-стимульованого фосфорилування EGFR у клітинах субклону G10, необроблених інгібітором NADPH-оксидази, є нижчим порівняно з контрольними клітинами, але не відрізняється суттєво за особливостями динаміки. Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок про потенційну роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у редокс-залежних механізмах, які забезпечують оптимальний рівень автофосфорилування EGFR, необхідний для підтримання тривалої активації кінази Akt.

4. Дослідження впливу апоциніну на міграцію клітин лінії MCF-7 з різним рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Попередніми дослідженнями лабораторії сигнальних механізмів встановлено, що клітини MCF-7 з високим рівнем стабільної надекспресії Ruk/CIN85 мігрують значно ефективніше порівняно з контрольними клітинами як через напівпроникну мембрану модифікованої камери Бойдена, так і в процесі заростання подряпини у клітинному моношарі (Samoylenko et al., 2012). Для з'ясування можливого вкладу АФК, що генеруються мембранними NADPH-оксидазними комплексами, до забезпечення підвищеного міграційного потенціалу клітин MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85, нами було використано інгібіторний аналіз. Досліджувані клітини попередньо інкубували з апоциніном в концентрації 300 мкМ протягом 12 год з наступним аналізом їх хемотаксису. Клітини, висіяні на зовнішню поверхню мембрани верхнього відсіку камери Бойдена в середовищі з 0,1% FBS, мігрували на внутрішню поверхню мембрани нижнього відсіку, який містив середовище з 5% FBS. Середовище як у верхньому, так і нижньому відсіках містило апоцинін (300 мкМ). Встановлено, що апоцинін незначно пригнічував міграцію контрольних клітин MCF-7, тоді як кількість клітин субклону G10, оброблених апоциніном, які мігрували на нижню поверхню мембрани камери Бойдена, зменшувалась більш як на 50% до рівня міграції контрольних клітин (Рис. 10).

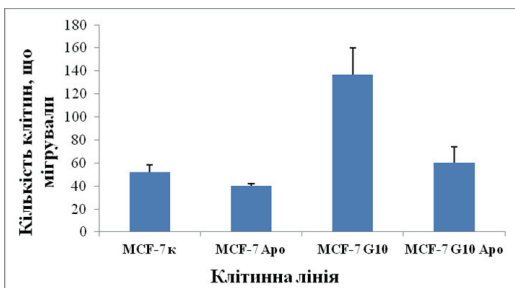


Рис. 10. Інгібітор збирання NADPH-оксидазного комплексу ефективно пригнічує міграційний потенціал клітин MCF-7 з надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

5. Аналіз рівня експресії ізоформ NOX у клітинах MCF-7 з різним вмістом Ruk/CIN85.

Рецептор-опосередковане регулювання NADPH-оксидаз і посилення продукування АФК супроводжується змінами редокс-залежного сигналювання, що, в кінцевому рахунку, може призводити до змін у диференційній експресії окремих ізоформ NOX (Lambeth, 2004). Для з'ясування можливих змін у рівні експресії генів, що кодують різні форми каталітичних субодиниць NADPH-оксидазного комплексу (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox2) та субодиницю p22^{phox}, залежно від рівня експресії Ruk/CIN85, використовували полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі (qPCR). Праймери підбирали за допомогою комп'ютерної програми Primer Express

(«Applied Biosystems», «Foster City», США). Нуклеотидні послідовності праймерів наведено в статті (Bazalii et al., 2016).

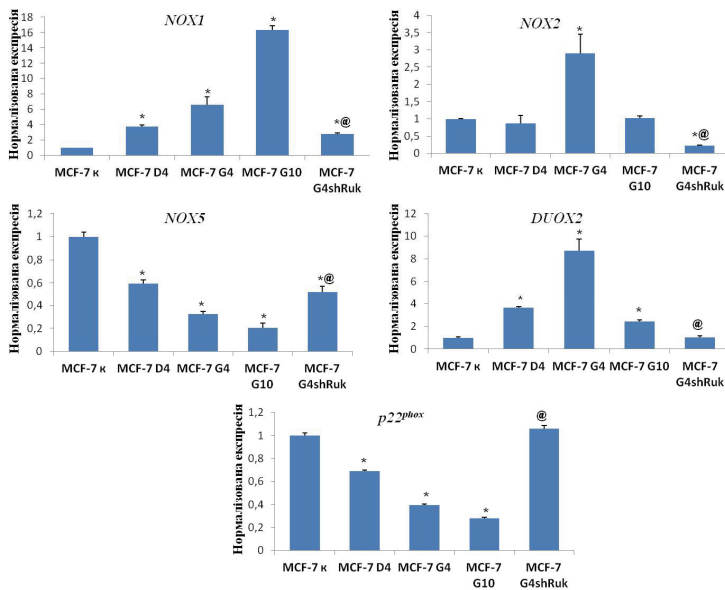


Рис. 11. Рівень експресії генів *NOX* в клітинах лінії MCF-7 та її субклонах D4, G4, G10 й G4shRuk. Рівень експресії зазначених генів вивчали за допомогою ПЛР у реальному часі; * - $p(U) < 0,05$ до MCF-7 к, @ - $p(U) < 0,05$ до G4 (Mann-Witney U-тест).

Показано, що в стабільних субклонах аденокарциномних клітин грудної залози людини лінії MCF-7 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 експресуються чотири гени – *NOX1*, *NOX2*, *NOX5* та *Duox2* (Рис. 11). Експресії *NOX4* як в контрольних клітинах MCF-7, так і клітинах

субклонів за використаних експериментальних умов детектувати не вдалось. Продемонстровано, що у клітинах субклонів із високим рівнем експресії Ruk/CIN85 (G4 і G10) значно більше утворюється мРНК *NOX1* та *NOX2*, ніж у клітинах дикого типу та субклону D4 з низьким рівнем експресії Ruk/CIN85. Також спостерігалось значне зниження вмісту мРНК відповідних NADPH-оксидаз у клітинах G4, інфікованих shRNA-лентівірусом, специфічним до Ruk/CIN85. Водночас, рівень експресії мРНК *NOX5*, навпаки, знижується з підвищенням вмісту досліджуваного адаптерного протеїну. В клітинах субклону G4 з високим рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 також відмічено значне зростання вмісту мРНК *DUOX2* порівняно з контрольними клітинами, клітинами субклонів D4 і G10 та його зниження за умов siRNA інтерференції Ruk/CIN85. Цікаво, що рівень експресії гена спільної субодиниці *p22^{phox}* для *NOX1*- і *NOX2*-вмісних оксидазних комплексів обернено корелює з рівнем експресії генів каталітичних субодиниць. Не виключено, що саме оптимальний рівень експресії *p22^{phox}* є фактором, який забезпечує формування функціонально активних оксидазних комплексів. Одержані експериментальні дані свідчать про те, що підвищене продукування АФК в клітинах MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 корелює з диференційними системними змінами у рівні експресії генів *NOX*.

6. Вивчення особливостей взаємодії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та субодиниці-організатора NADPH-оксидаз Tks4 в пухлинних клітинах за допомогою реакції імунореципітації та GST in vitro pull-down аналізу. За допомогою мас-спектрометричного аналізу LS-MS/MS було ідентифіковано понад 100 протеїнів, що зв'язуються з SH3 доменами Ruk/CIN85 в клітинах карциноми матки людини лінії HeLa in vitro (Navtylov et al., 2009). Серед нових потенційних зв'язувальних партнерів протеїн Tks4 посів одне з перших місць за кількістю ідентифікованих пептидів і загальному перекриттю всієї амінокислотної послідовності. В цілому, був ідентифікований 21 пептид, які перекрили 27% з 911 амінокислотних залишків Tks4. Згодом, було показано, що Tks4 є організатором NADPH-оксидазного комплексу, опосередкованого *NOX1*, взаємодіючи

безпосередньо з NOXA1 (Gianni, et al., 2009). Взаємодія різних форм NOX зі специфічними організаторами може відігравати ключову роль у локальному утворенні пероксиду в різних компартментах клітини.

Для з'ясування особливостей взаємодії SH3 доменів Ruk/CIN85 з ендogenous протеїном Tks4 залежно від клітинного контексту проводили GST *in vitro* pull-down аналіз з використанням лізатів клітин різного тканинного походження. Для імуноблотингу використовували отримані нами поліклональні антитіла до фрагменту Tks4, який включав його SH3AB домени. Для досліджень були використані аденокарциномні клітини молочної залози, ободової кишки людини, легені миші, а також меланоми людини та фібробласти миші (Рис. 12).

Встановлено, що лише SH3A домен преципітує ендogenous форму Tks4 з лізатів клітин грудної залози (лінії MCF-7 та MDA-MB-231) та меланоми (лінія MM4) людини. В клітинах карциноми легені Льюїс миші (лінія LLC) Tks4 преципітується, в основному, SH3A доменом. Водночас, слабкі імунореактивні смуги приблизно однакової інтенсивності виявляються в SH3C- та SH3BC-преципітатах. В SH3B- та SH3AB-преципітатах Tks4 за умов експерименту практично не детектується, тоді як в SH3ABC-преципітаті спостерігається значне зниження рівня зв'язування Tks4 порівняно з використанням як «байту» SH3A домену. Проведений аналіз дозволяє зробити припущення, що на рівні просторової організації рекомбінантного протеїну GST-SH3ABC саме SH3B домен екранує зв'язувальну поверхню SH3A домену для пролін-багатих послідовностей Tks4 в клітинах LLC. Можна також припустити, що фосфорилування специфічних залишків Ser/Thr, локалізованих як у районі SH3AB доменів, так і з С-кінця від Pro-багатого району в ендogenous протеїні Ruk/CIN85, опосередковане вхідним сигналом, буде призводити до дестабілізації його автоінгібіторної конформації і забезпечувати можливість утворення комплексів із специфічними зв'язувальними партнерами.

Особливо цікавими виявились результати pull-down аналізу при використанні як моделі клітинних ліній раку ободової кишки людини HT-29 та DLD-1. Як видно з Рис. 12, повнорозмірна форма Tks4 з M_r 120 кДа виявляється лише в SH3A-преципітаті. Водночас, всі використані GST-SH3 фрагменти Ruk/CIN85 (A, B, C, AB, BC та ABC) з високою ефективністю преципітують додаткову форму з M_r 90 кДа, вміст якої в клітинах є низьким і виявляється в лізатах лише при внесенні в лунки ПЛАГ більшої кількості протеїну, що свідчить про її високу афінність до SH3 доменів Ruk/CIN85. Не виключено, що форма з молекулярною масою близько 160 кДа, що детектується в преципітатах, може бути продуктом посттрансляційної модифікації Tks4 шляхом убіквітилювання і інших подібних типів модифікації. У фібробластах миші NIH 3T3 додаткова форма характеризується більшою рухливістю (M_r близько 75 кДа) і преципітується також усіма GST-SH3 фрагментами Ruk/CIN85 (A, B, C, AB, BC та ABC), а також добре детектується у клітинних лізатах. Слід зауважити, що, у порівнянні з клітинами ободової кишки, високомолекулярна форма хоча і виявляється в лізатах клітин NIH 3T3, проте не преципітується SH3 доменами Ruk/CIN85. Важливо зауважити, що за умов передінкубації анти-Tks4 антитіл з очищеним фрагментом GST-Tks4/SH3AB детектування всіх імунореактивних смуг усувалось за рахунок конкурентного зв'язування антигену (дані не представлені).

На сьогодні, молекулярна природа нових множинних форм Tks4 з M_r 75-90 і 160 кДа, ідентифікованих у нашому дослідженні, не встановлена. Водночас, отримані дані дозволяють зробити висновок, що можливість взаємодії SH3 доменів Ruk/CIN85 з ендogenous протеїном Tks4 визначається клітинним контекстом, тоді як рівень взаємодії контролюється залежно від фізіологічних потреб клітин.

GST *in vitro* pull-down аналіз було використано також для аналізу особливостей динаміки міжмолекулярної взаємодії Tks4-Ruk/CIN85 в контрольних клітинах MCF-7 і субклону G10 з надекспресією досліджуваного адаптерного протеїна при стимуляції EGF (100 нг/мл) в діапазоні часових інтервалів, вказаних на Рис. 13. Встановлено, що в контрольних клітинах MCF-7 кількість Tks4, що преципітується GST-SH3A доменом Ruk/CIN85, збільшується у процесі реалізації клітинної відповіді на EGF.

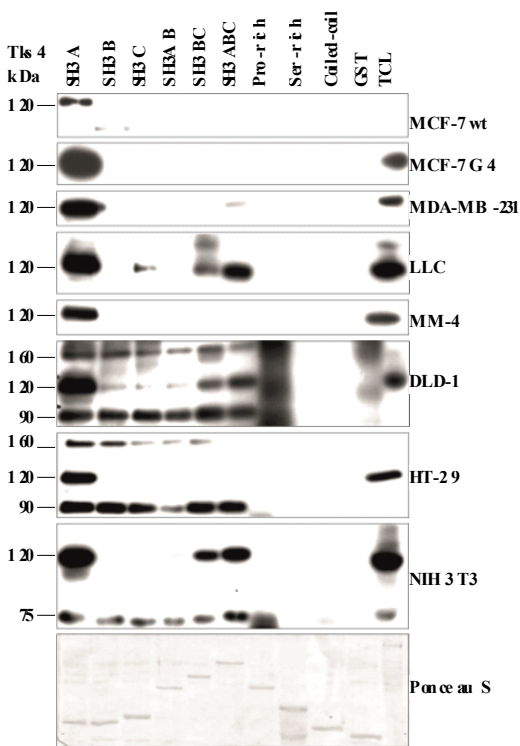
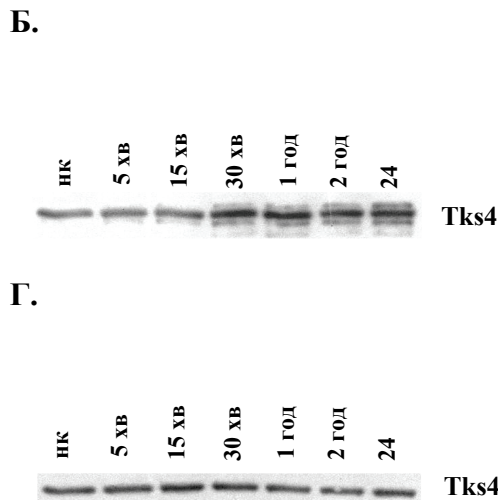
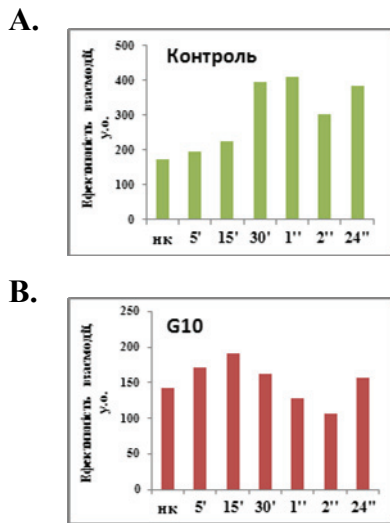


Рис. 12. SH3 домени Ruk/CIN85 диференційно преципітують ендogenous протеїн Tks4 з лізатів клітин різного тканинного походження. Імуноблот-аналіз проводили з використанням анти-Tks4AB антитіл, розведення 1:5000. TCL – загально-клітинний лізат; GST – глутатіон-S-трансфераза.

Це, у свою чергу, свідчить про пригнічення внутрішньомолекулярних взаємодій *in cellulo* і зростання доступності Про-багатих ділянок Tks4 для взаємодії з екзогенним байтом. Навпаки, за результатами GST *in vitro* pull-down аналізу в EGF-стимульованих клітинах MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85 спостерігається посилення досліджуваної міжмолекулярної взаємодії, що може мати потенційну значимість у регулюванні внутрішньоклітинного сигналювання.

Рис. 13. Рівень взаємодії ендogenous форми Tks4 з SH3A доменом Ruk/CIN85 змінюється у процесі EGF-індукованої клітинної відповіді.



Особливості динаміки міжмолекулярної взаємодії вивчали за допомогою GST *in vitro* pull-down аналізу. Як байт використовували GST-SH3A домен Ruk/CIN85. А. Динаміка взаємодії Tks4 з Ruk/CIN85 у контрольних клітинах лінії MCF-7, стимульованих EGF; Б. Імуноблот-аналіз взаємодії Tks4 з Ruk/CIN85 у контрольних клітинах лінії MCF-7, стимульованих EGF.

В. Динаміка взаємодії Tks4 з Ruk/CIN85 у клітинах MCF-7 субклону G10, стимульованих EGF; Г. Імуноблот-аналіз взаємодії Tks4 з Ruk/CIN85 у клітинах MCF-7 субклону G10, стимульованих EGF; нк – нестимульовані клітини.

Як видно з Рис. 14, результати GST *in vitro* pull-down аналізу обернено корелюють з результатами імунопреципітації Tks4 поліклональними антитілами до SH3A домену Ruk/CIN85 з лізатів клітин субклубу G10, стимульованих EGF з наступним анти-Tks4 імуноблот-аналізом, що є ще одним свідченням на користь біологічної значимості взаємодії між досліджуваними адаптерними протеїнами.

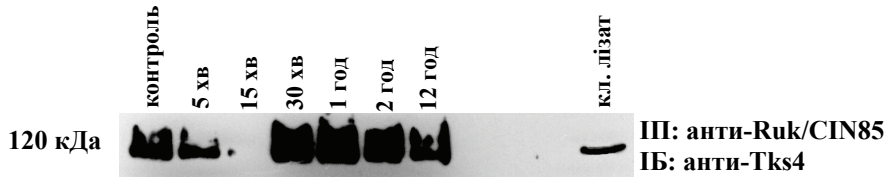


Рис. 14. Рівень взаємодії ендogenous форм адаптерних протеїнів Tks4 та Ruk/CIN85 змінюється у процесі EGF-індукованої клітинної відповіді. Для

співімунопреципітації зв'язувальних партнерів Ruk/CIN85 з лізатів клітин субклубу G10, стимульованих EGF; використовували афінно очищені поліклональні антитіла до SH3A домену Ruk/CIN85.

ВИСНОВКИ

Проведено комплекс експериментальних робіт, які свідчать про існування регуляторного взаємозв'язку між рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 пухлинних клітинах, інтенсивністю продукування АФК та особливостей його компартименталізації, динамікою активації редокс-залежного сигналювання та біологічними відповідями пухлинних клітин; показано, що підвищене продукування АФК в клітинах MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 корелює з диференційними системними змінами у рівні експресії генів *NOX*; продемонстровано формування ендogenous комплексу Ruk/CIN85 із організатором NADPH-оксидазного комплексу, протеїном Tks4, та потенційну біологічну значимість цієї взаємодії.

1. Виявлено, що продукування АФК пухлинними клітинами, опосередковане функціонуванням мембранних NADPH-оксидазних комплексів, корелює із рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.
2. Отримано генетичні конструкції, що кодують внутрішньоклітинний біосенсор H_2O_2 , HyPer та злитий протеїн Ruk/CIN85-HyPer. З використанням прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії продемонстровано співлокалізацію генерування H_2O_2 та адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у «dot»-подібних везикулярних структурах різних розмірів у тимчасово трансфікованих клітинах MCF-7.
3. Продемонстровано, що попередня обробка клітин MCF-7 субклубу G10 інгібітором збирання NADPH-оксидазного комплексу апоциніном і пасткою для АФК N-ацетилцистеїном призводить до реверсії тривалої активації кінази Акт на тимчасову з одночасним посиленням автофосфорилування рецептора EGF.
4. Показано, що обробка клітин MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 апоциніном супроводжується пригніченням клітинної міграції.
5. Встановлено, що підвищене продукування АФК в клітинах MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 корелює з диференційними системними змінами у рівні експресії генів *NOX*.

6. Показано, що можливість взаємодії SH3 доменів Ruk/CIN85 з ендogenous протеїном Tks4 у пухлинних клітинах різного тканинного походження визначається клітинним контекстом, тоді як рівень взаємодії контролюється залежно від фізіологічних потреб клітин. Продемонстровано посилення взаємодії між ендogenous формами досліджуваних адаптерних протеїнів в клітинах MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 при дії EGF.
7. Отримана генетична конструкція, що кодує химерний протеїн Ruk/CIN85-HyPer, може бути запропонована як новий інструмент для дослідження локалізованого продукування H_2O_2 у живих клітинах.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Самойленко А. А. Відповідь пухлинних клітин на пригнічення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 рекомбінантними лентівірусами / Самойленко А. А., Биць Н. В., Пасічник Г. В., Козлова Н. В., **Базалій А. В.**, Геращенко Д. С., Шандренко С. Г., Воротніков О. В., Кітцманн Т., Комісаренко С. В., Дробот Л. Б. // *Biotech. Acta.* – 2013. – Vol. 6, №4. – P. 182-189. *(Здобувач брав участь у виконанні експериментів, аналізі даних, написанні та оформленні статті)*
2. Drobot L. B. Reactive oxygen species in signal transduction / Drobot L.B., Samoylenko A. A., Vorotnikov A. V., Tyurin-Kuzmin P. A., **Bazalii A. V.**, Kietzmann T., Tkachuk V. A., Komisarenko S. V. // *Укр. Біохім. Журн.* – 2013. – т.85, №6. – с. 208-216. *(Здобувач брав участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті)*
3. **Bazalii A. V.** Interaction between adaptor proteins Ruk/CIN85 and Tks4 in normal and tumor cells of different tissue origins / **Bazalii A. V.**, Samoylenko A. A., Petukhov D. M., Rynditch A. V., Redowicz M.-J., Drobot L. B. // *Biopolym. Cell.* – 2014. – Vol. 30, №1. – P. 37-41. *(Здобувач виконав експерименти, брав участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті)*
4. **Bazalii A. V.** Recombinant fluorescent sensor of hydrogen peroxide HyPer fused with adaptor protein Ruk/CIN85: desining of expression vector and functional characterization / **Bazalii A. V.**, Vorotnikov A. V., Tyurin-Kuzmin P. A., Tkachuk V. A., Komisarenko S. V., Drobot L. B. // *Biotech. Acta.* – 2015. – Vol. 8, №5. – P. 19-26. *(Здобувач виконав експерименти, брав участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті)*
5. **Bazalii A. V.** Transcriptional regulation of *NOX* genes expression in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells is modulated by adaptor protein Ruk/CIN85 / **Bazalii A. V.**, Pasichnyk G. V., Horak I. R., Komisarenko S. V., Drobot L. B. // *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88, №1. – P. 119-125. *(Здобувач виконав експерименти, брав участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті)*
6. **Bazalii A. V.** Apocynin attenuates motility and induces transition from sustained to transient EGF-dependent Akt activation in MCF-7 cells that overexpress adaptor protein Ruk/CIN85 / **Bazalii A. V.**, Drobot L. B., Komisarenko S. V. // *Biopolym. Cell.* – 2016. – Vol. 32, №1. – P. 21-25. *(Здобувач виконав експерименти, брав участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті)*
7. Drobot L. Overexpression of the adaptor protein Ruk/CIN85 increases the stemness potential of MCF-7 breast adenocarcinoma cells / Drobot L., Byts N., Pasichnyk H.,

- Samoylenko O., Ponomarenko O., Povorozniuk O., **Bazaliy A.**, Geraschenko D., Vynnytska B., Kietzmann T., Komisarenko S. // FEBS J. – 2012. – Vol. 279, Suppl. 1 – P. 321.
8. **Базалій А. В.** Продукування пероксиду водню пухлинними клітинами залежить від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 / **Базалій А.В.**, Петухов Д.М., Воротніков О.В., Ткачук В.А., Комісаренко С.В., Дробот Л.Б. // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, №5 (Suppl. 1). – P. 92.
 9. **Базалій А.** Конструювання рекомбінантних плазмідних векторів для експресії в клітинах ссавців, що кодують внутрішньоклітинний біосенсор до пероксиду водню HyPer Ruk/CIN85-HyPer / **Базалій А.**, Воротніков О., Дробот Л. // Укр. Біохім. Журн. – 2013. – т.85, №4. – с. 131.
 10. **Bazalii A.** Specific repertoire of endogenous Tks4 proteins are precipitated by SH3 domains of adaptor protein Ruk/CIN85 from cell lines of different tissue origins / **Bazalii A.**, Petuchov D., Dvornikov D., Pasichnyk G., Gerashchenko D., Rzhetsky Yu., Samoylenko A., Vorotnikov O., Drobot L. // Cell Tech Week. – 2013. – P. 27.
 11. **Базалій А. В.** Особливості експресії генів NOX та продукування активних форм кисню у клітинах аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7 з надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 / **Базалій А. В.**, Дробот Л. Б. // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87, №4. – P. 11.
 12. **Bazalii A. V.** Apocynin decreases ROS production and induces transition from sustained to transient EGF-dependent Akt signaling in Ruk/CIN85 overexpressing human breast adenocarcinoma MCF-7 cells / **Bazalii A. V.**, Drobot L. B. // Lviv, International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology. – 2015.

АНОТАЦІЯ

Базалій А. В. Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у рецептор-залежних механізмах активації NADPH-оксидази і внутрішньоклітинного сигналювання у пухлинних клітинах. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2016.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у функціонуванні NADPH-оксидаз на моделі аденокарциномних клітин молочної залози людини лінії MCF-7. За результатами проведених досліджень вперше продемонстровано існування регуляторного взаємозв'язку між рівнем експресії Ruk/CIN85 у пухлинних клітинах та інтенсивністю продукування АФК, залежного від функціонування NADPH-оксидаз. Отримано генетичні конструкції, що кодують внутрішньоклітинний біосенсор H_2O_2 , HyPer та злитий протеїн Ruk/CIN85-HyPer. З використанням прижиттєвої флуоресцентної мікроскопії продемонстровано співлокалізацію генерування H_2O_2 та адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у «dot»-подібних везикулярних структурах різних розмірів у тимчасово трансфікованих клітинах MCF-7. Показано, що попередня обробка клітин MCF-7 субклону G10 інгібітором збирання NADPH-оксидазного комплексу апоциніном і пасткою для АФК N-ацетилцистеїном призводить до реверсії тривалої активації

кінази Akt на тимчасову з одночасним посиленням автофосфорилування рецептора EGF та пригніченням клітинної міграції. Встановлено, що підвищене продукування АФК в клітинах MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 корелює з диференційними системними змінами у рівні експресії генів *NOX*. Показана можливість взаємодії SH3 доменів Ruk/CIN85 із субодиницею-організатором NADPH-оксидазного комплексу Tks4 у пухлинних клітинах різного тканинного походження. Продемонстровано посилення взаємодії між ендогенними формами досліджуваних адаптерних протеїнів в клітинах MCF-7 із надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85 при дії EGF.

Ключові слова: адаптерний протеїн Ruk/CIN85, АФК, апоцинін, NADPH-оксидаза, клітинне сигналювання.

АННОТАЦИЯ

Базалий А. В. Роль адаптерного белка Ruk/CIN85 в рецептор-зависимых механизмах активации NADPH-оксидазы и внутриклеточной сигнализации в опухолевых клетках. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертационная работа посвящена исследованию роли адаптерного белка Ruk/CIN85 в функционировании NADPH-оксидаз на модели аденокарциномных клеток молочной железы человека линии MCF-7. По результатам проведенных исследований впервые продемонстрировано существование регуляторной взаимосвязи между уровнем экспрессии Ruk/CIN85 в опухолевых клетках и интенсивностью продукции АФК, зависимой от функционирования NADPH-оксидаз. Получены генетические конструкции, которые кодируют внутриклеточный биосенсор H_2O_2 , HyPer, и слитый белок Ruk/CIN85-HyPer. При использовании прижизненной флуоресцентной микроскопии продемонстрировано колокализацию продукции H_2O_2 и адаптерного белка Ruk/CIN85 в «dot»-подобных везикулярных структурах разных размеров во временно трансфицированных клетках MCF-7. Показано, что предварительная обработка клеток MCF-7 субклона G10 ингибитором сборки NADPH-оксидазного комплекса апоцинином и ловушкой для АФК N-ацетилцистеином приводит к реверсии длительной активации киназы Akt на временную с одновременным усилением автофосфорилирования рецептора EGF и угнетением клеточной миграции. Установлено, что повышенная продукция АФК в клетках MCF-7 со сверхэкспрессией адаптерного белка Ruk/CIN85 коррелирует с дифференцированными системными изменениями в уровне экспрессии генов *NOX*. Показана возможность взаимодействия SH3 доменов Ruk/CIN85 с субъединицей-організатором NADPH-оксидазного комплекса Tks4 в опухолевых клетках разного тканевого происхождения. Продемонстрировано усиление взаимодействия между ендогенными формами исследуемых адаптерных белков в клетках MCF-7 со сверхэкспрессией адаптерного белка Ruk/CIN85 при действии EGF.

Ключевые слова: адаптерный белок Ruk/CIN85, АФК, апоцинин, NADPH-оксидаза, клеточная сигнализация.

SUMMARY

Bazalii A. V. The role of adapter protein Ruk/CIN85 in receptor dependent mechanisms of NADPH-oxidase activation and intracellular signaling in tumor cells. – Manuscript.

Thesis for Ph. D. degree in Biology, specialty 03.00.04 – Biochemistry. – Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 2016.

The thesis is devoted to investigation of the role of adapter protein Ruk/CIN85 in the functioning of NADHP-oxidase using as a model human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. First, the results of the study demonstrated the existence of the regulatory relationship between the level of Ruk/CIN85 expression in MCF-7 cells and the intensity of ROS production dependent on NADPH oxidase functional activity. Genetic constructs, which encode the intracellular H₂O₂ biosensor, Hyper, and the fusion protein Ruk/CIN85-HyPer were obtained. Using intravital fluorescence microscopy, colocalization of H₂O₂ production and adaptor protein Ruk/CIN85 was demonstrated in «dot»-like vesicular structures of different sizes in transiently transfected MCF-7 cells. According to our data, pretreatment of G10 MCF-7 cells with inhibitor of NADPH-oxidase complex assembly apocynin and trap for ROS N-acetylcysteine led to the reversion from sustained Akt kinase activation to transient with simultaneous increase of EGF receptor autophosphorylation and inhibition of cell migration. The data obtained can suggest that ROS produced by NADPH oxidases are signaling components, upstream to Akt kinase, that mediate the increased migratory potential of Ruk/CIN85-overexpressing MCF-7 cells. The system multidirectional changes in mRNA levels for *NOX1*, *NOX2*, *NOX5*, *DUOX2* and *p22^{Phox}* were revealed in Ruk/CIN85 overexpressing cells in comparison to control cells. Knocking down of Ruk/CIN85 using technology of RNA-interference resulted in the reversion of these changes. Further studies are necessary to elucidate, by which molecular mechanisms Ruk/CIN85 could affect transcriptional regulation of NOXs genes. Using GST *in vitro* pull-down assay, we determined that SH3A domain of adaptor protein Ruk/CIN85 precipitated full-length form of adaptor protein Tks4 (*Mr* 120 kDa) from lysates of human breast (MCF-7, MDA-MB-231), melanoma (MM-4), colon (HT-29, DLD-1) tumor cells as well as from lysates of mouse Lewis lung carcinoma cells (LLC) and mouse fibroblasts (NIH 3T3). It has been also revealed that all Ruk/CIN85 SH3 domains (A, B and C) with high efficiency precipitated the additional forms of Tks4 with *Mr* 75, 90 and 160 kDa from lysates of human colon carcinoma cells and mouse fibroblasts. The molecular nature of new multiple forms of Tks4 has not been determined to date. The data obtained suggest that interaction between Ruk/CIN85 SH3 domains with Tks4 endogenous forms is determined by cellular context while a level of this interaction can be regulated in the course of physiological cellular responses. Increased interaction between the endogenous forms of both adaptor proteins in MCF-7 cells overexpressing Ruk/CIN85 was demonstrated in the course of EGF treatment.

Keywords: adaptor protein Ruk/CIN85, ROS, apocynin, NADPH-oxidase, cell signaling.