

КЛІТИННА МОДЕЛЬ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ РЕЦЕПТОРНОЇ ТА РЕГУЛЯТОРНОЇ ФУНКЦІЙ proHB-EGF ЛЮДИНИ

Н. В. КОРОТКЕВИЧ, А. Ю. ЛАБИНЦЕВ, К. Ю. МАНОЙЛОВ, О. І. КРИНІНА,
Л. В. ДЯЧЕНКО, Д. В. КОЛИБО, С. В. КОМІСАРЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: gnr.nata@gmail.com

Дослідження внутрішньоклітинних шляхів транспортування proHB-EGF, а також його ліганд-рецепторних комплексів, вимагає створення новітніх підходів та моделей, зокрема, із застосуванням флуоресцентних технік. З метою створення моделі для вивчення функцій proHB-EGF було одержано генетичну конструкцію pEGFP-N1-proHB-EGF, що кодує протеїн proHB-EGF-EGFP-proHB-EGF, злитий з посиленим зеленим флуоресцентним протеїном EGFP на цитоплазматичному кінці молекули. Шляхом трансфекції pEGFP-N1-proHB-EGF одержано евкаріотичні клітини лінії Vero, які експресували на поверхні злитий протеїн proHB-EGF-EGFP. Експресований у клітинах Vero proHB-EGF-EGFP зв'язував нетоксичне флуоресцентне похідне рецепторної субодиниці В дифтерійного токсину mCherry-SubB. Після стимуляції трансфєкованих клітин ТРА (12-0-тетрадеканоїлфорбол-13-ацетат), proHB-EGF-EGFP утворював флуоресцентно-мічений С-термінальний фрагмент молекули – СТФ-EGFP. Отже, одержана генетична конструкція pEGFP-N1-proHB-EGF дозволяє візуалізувати молекули proHB-EGF та СТФ у клітинах. Це відкриває нові можливості для дослідження їхніх функцій, зокрема рецепторної функції proHB-EGF при зв'язуванні з молекулою дифтерійного токсину, досліджень внутрішньоклітинних шляхів транспортування СТФ та пошуку природних лігандів для proHB-EGF.

Ключові слова: гепаринзв'язувальний EGF-подібний фактор росту (HB-EGF), дифтерійний токсин, В-субодиниця дифтерійного токсину, С-термінальний фрагмент (СТФ).

Гепаринзв'язувальний фактор росту, що подібний до епідермального фактору росту HB-EGF (від англ.: Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor) – трансмембранний глікопротеїн, який синтезується багатьма типами клітин, проте вперше був виявлений в культуральному середовищі клітин гістоцитарної лімфоми людини U937 [1]. Подібно до інших епідермальних факторів росту, HB-EGF синтезується як трансмембранний попередник. Трансмембранна форма HB-EGF (proHB-EGF) складається з про-, гепаринзв'язувального, EGF-подібного, юкстамембранного, трансмембранного та цитоплазматичного доменів. proHB-EGF злучується з клітинної поверхні під дією поверхневих матриксних протеїназ, що призводить до утворення розчинної форми HB-EGF – sHB-EGF (від англ.: Soluble Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor). sHB-EGF є потужним мітогеном та хемоатрактантом для багатьох

типів клітин [2]. Трансмембранна та розчинна форми HB-EGF виконують свої біологічні функції через взаємодію з EGF рецепторами 1 (EGFR, HER-1) та 4 (HER-4), які є регуляторами проліферації, ангиогенезу, міграції та метастазування [3].

Розщеплення молекули proHB-EGF продукує не лише зовнішньоклітинний фрагмент – sHB-EGF, а й залишковий внутрішньоклітинний фрагмент СТФ (від англ.: C-Terminal Fragment). За даними літератури, СТФ разом із трансмембранним доменом транспортується ретроградним шляхом до ядра клітини [4]. Ядерний СТФ взаємодіє з транскрипційними репресорами генів циклінів, що забезпечує так званий сигнал дерепресії. Водночас, sHB-EGF взаємодіє з EGFR та через Ras-MAPK сигнальні каскади сприяє прогресуванню G1-фази клітинного циклу шляхом регуляції експресії цикліну D1, c-Мус та ін. Дерепресійний вплив HB-EGF-СТФ та трансактиваційний

EGFR-опосередкований вплив sHB-EGF в поєднанні регулюють клітинний цикл у відповідь на зовнішньоклітинні чинники [5].

Особливістю proHB-EGF, що відрізняє його від інших факторів росту, є здатність формувати комплекси з іншими мембранними протеїнами. Так, proHB-EGF формує комплекс із CD9, CD44, CD63, CD81, CD82, $\alpha 3\beta 1$ інтегринами, антиапоптозним протеїном BAG-1, металопротеїназами типу ADAM (ADAM – A Disintegrin And Metalloproteinase) та мембранно-асоційованими гепарансульфат протеогліканами. Той факт, що комплекс локалізується в ділянках міжклітинних контактів, підтверджує думку, що HB-EGF відіграє важливу роль в міжклітинних взаємодіях [6]. Важливо відзначити, що взаємодія з гепарином перешкоджає протеолітичному процесингу proHB-EGF, тим самим пригнічуючи ріст клітин. Дослідження даного аспекту відкриває можливість контролювати баланс між юкстакринним, паракринним та аутокринним механізмом дії фактора на клітини.

Слід зазначити, що proHB-EGF та sHB-EGF також мають здатність взаємодіяти з дифтерійним токсином (ДТ) – основним фактором патогенності збудника *Corynebacterium diphtheriae*. Саме proHB-EGF виступає в ролі рецептора до ДТ, опосередковуючи проникнення та реалізацію його токсичних властивостей всередині клітини [7]. У структурі ДТ виділяють дві субодиниці: рецепторзв'язувальну – В (від англ.: binding) та ензиматичноактивну – А (від англ.: active). В-субодиниця складається з двох доменів: R, який безпосередньо відповідає за зв'язування з рецептором, та T, за рахунок якого відбувається транслокація А-субодиниці до цитозолу клітини, де і виявляється її ензиматична активність шляхом ADP-рибозилування евкаріотичного фактора елонгації-2 (eEF-2), що призводить до припинення протеїнового синтезу та загибелі клітини [8]. Рецепторна функція proHB-EGF є ще однією причиною інтенсивного дослідження біологічної активності даного протеїну та його ролі у механізмах патогенезу дифтерії.

З огляду на поліфункціональність молекули proHB-EGF виникає необхідність створення нових інструментів для дослідження детальніших молекулярних механізмів його функціонування. Тому нами запропоновано новий підхід для дослідження молекулярних механізмів ре-

лізації біологічної активності трансмембранної форми proHB-EGF людини шляхом створення його флуоресцентного міченого похідного. Такий підхід надав би можливість досліджувати не лише особливості реалізації рецепторної функції proHB-EGF після зв'язування із молекулою ДТ, а і вивчали його участь у процесах контактного інгібування росту клітин у культурі та особливості внутрішньоклітинного транспортування СТФ під час інтенсивної проліферації клітин.

Метою даної роботи було одержання флуоресцентного похідного трансмембранної форми proHB-EGF людини шляхом об'єднання нуклеотидної послідовності proHB-EGF із нуклеотидною послідовністю посиленого зеленого флуоресцентного протеїну (EGFP) як моделі для вивчення молекулярних механізмів реалізації біологічної активності трансмембранної форми proHB-EGF людини, а також його С-термінального фрагмента СТФ.

Матеріали і методи

Матеріали та обладнання. У роботі були використані такі реактиви: культуральне середовище RPMI-1640 із L-глутаміном, фетальна сироватка великої рогатої худоби, пеніцилін, стрептоміцин, амфотерицин (антимікотик), праймери, імідазол, поживне середовище LB, диметилформамід (ДМФА), $MgCl_2$, полімераза Taq, вільна від нуклеаз вода, ендонуклеази рестрикції BamHI, XhoI, ДНК-лігаза T4, лужна фосфатаза креветки, набір для виділення ДНК, ізопропіл- β -D-тіоґалактопіранозид (IPTG), протеїнові маркери молекулярної маси в діапазоні від 10 до 180 кДа, ДНК-маркери молекулярної маси в діапазоні від 100 до 10 000 п.н. (Fermentas, Литва), дезоксирибонуклеотидтрифосфати (dNTPs) (Amersham, США), Lipofectamine LTX (Invitrogen, США).

Ультразвуковий дезінтегратор Labsonic M (Sartorius, Німеччина), електроблоттер Hoefer TE77 (Amersham, США), електропоратор Eppendorf 2510 (Eppendorf, Німеччина).

У дослідженнях використовували червоний флуоресцентний протеїн mCherry та флуоресцентне похідне рекомбінантної субодиниці В дифтерійного токсину (mCherry-SubB), які одержували зі створених нами раніше штамів-продуцентів [9]. Експресію та виділення рекомбінантних протеїнів проводили згідно з

протоколами та рекомендаціями, описаними у роботі [9].

Культивування клітин евкаріот. Клітинна культура нирки зеленої мавпи Vero була отримана з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Клітини культивували у стандартних умовах у культуральному середовищі RPMI-1640 з додаванням 5–10% сироватки ембріонів телят за 5%-ї концентрації CO₂ в атмосфері.

Одержання генетичної конструкції pEGFP-N1-proHB-EGF. Джерелом нуклеотидної послідовності ділянки гена, що кодує proHB-EGF людини, була кДНК, яку отримували із клітин гістоцитарної лімфоми людини U937. За допомогою ПЛР із використанням специфічної пари праймерів було одержано нуклеотидну послідовність, що кодує ген *proHB-EGF* людини. Детальніше ця процедура описана в публікації [10]. Генетична конструкція *pEGFP-N1-proHB-EGF* була створена на основі вектора *pEGFP-N1* (AddGene, США). Плазмідну ДНК виділяли з клітин *E. coli* DH10B методом лужного лізису [11]. Вектор *pEGFP-N1* послідовно обробляли ендонуклеазами рестрикції BamHI, XhoI та лужною фосфатазою. Одержану в ході проведення ПЛР послідовність гена, що кодує proHB-EGF людини, обробляли відповідними рестриктазами для подальшого об'єднання із векторною ДНК. Лінійну послідовність вектора та послідовність гена, що кодує proHB-EGF людини, об'єднували в єдину генетичну конструкцію за допомогою T4 ДНК-лігази. Клонування проводили за «липкими» кінцями. Всі вищезазначені маніпуляції з ДНК проводили, дотримуючись рекомендацій виробника. Клітини *E. coli* штаму DH10B трансформували за допомогою генетичної конструкції *pEGFP-N1-proHB-EGF* методом електропорації [12] з наступним висіванням на тверде поживне середовище LB (триптон – 10 г/л, дріжджового екстракту – 5 г/л, NaCl – 10 г/л, агару – 15 г/л), яке містило 0,005%-ий канаміцин як селективний антибіотик. Після описаних маніпуляцій колонії перевіряли на наявність нуклеотидної послідовності вставки гена *proHB-EGF* у складі вектора за допомогою ПЛР із використанням пари праймерів, що фланкують ген *proHB-EGF* на 5'-кінці та ген *EGFP* на 3'-кінці. При проведенні ПЛР, кожен 25 мкл суміші містили:

0,6 мМ кожного з праймерів, по 0,2 мМ кожного з dNTP, 0,8 мМ MgCl₂, буфер для Taq полімерази, 1 одиницю активності Taq полімерази. Аналіз продуктів ПЛР проводили в 1%-му агарозному гелі. Результатом даної маніпуляції був ПЛР продукт, що містив у своєму складі нуклеотидні послідовності обох генів. Колонії, що містили вектор *pEGFP-N1*, у складі якого є ген *proHB-EGF* нарощували у рідкому поживному середовищі із додаванням селективного антибіотика та використовували у подальшому для напрацювання генетичної конструкції *pEGFP-N1-proHB-EGF*.

Трансфекція клітин евкаріот. Трансфекцію евкаріотичних клітин лінії Vero генетичною конструкцією *pEGFP-N1-proHB-EGF* проводили із використанням реагенту для трансфекції Lipofectamine LTX. Всі маніпуляції проводили згідно з рекомендаціями виробника. Після трансфекції клітини використовували для приготування препаратів для конфокальної мікроскопії.

Конфокальна мікроскопія. Клітини, які досягли 70–90% конфлюентного стану, пересівали на попередньо знежирені покривні скельця та культивували ще 24 год. Перед фарбуванням, клітини промивали розчином RPMI-1640. Зразки фарбували у RPMI-1640 із додаванням відповідних флуоресцентних похідних (mCherry-sHB-EGF та mCherry-sHB-EGF_{Δ84-106}) у концентрації 10 мкг/мл або моноклональних антитіл проти рецептора EGFR (1 : 2000), попередньо проінкубованих із FITC міченими антитілами кози проти Fc-фрагментів імуноглобулінів миші (1 : 1000), після чого інкубували за 37 °С протягом 15 хв. Перед фіксацією зразки двічі промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР). Фіксацію зразків проводили 5%-им параформальдегідом у натрій-фосфатному буфері, потім зразки промивали ЗФР та дистильованою водою. На кожен препарат клітин наносили 25 мкл DABCO-PVA (1,4-Diarabicyclo[2.2.2]octan - polyvinyl alcohol) для подальшого збереження та аналізу. До моменту проведення конфокальної мікроскопії, зразки зберігалися в темряві при 4 °С. Колокалізацію флуоресцентних міток FITC (зелений канал) та mCherry (червоний канал) визначали з використанням програмного забезпечення Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>).

Результати та обговорення

Одержання генетичної конструкції *pEGFP-N1-proHB-EGF*. Для дослідження рецепторної та регуляторної функцій proHB-EGF необхідним інструментом може бути флуоресцентне похідне трансмембранної форми HB-EGF, одержане шляхом об'єднання генетичних послідовностей, що кодують proHB-EGF та посилений зелений флуоресцентний протеїн EGFP.

З метою створення генетичної конструкції *pEGFP-N1-proHB-EGF*, що кодує трансмембранну форму HB-EGF, об'єднану із зеленим флуоресцентним протеїном EGFP на С-термінальному кінці молекули, було ампліфіковано нуклеотидну послідовність, що кодує proHB-EGF людини з використанням специфічної пари праймерів та кДНК, одержаної нами раніше із клітин лінії U937 [13]. Нуклеотидні послідовності вектора *pEGFP-N1* та *proHB-EGF* було об'єднано у генетичну конструкцію по сайтам щеплення ендонуклеаз рестрикції *XhoI* та *BamHI*, що дозволило зберегти єдину рамку зчитування обох генів – *proHB-EGF* та *EGFP* (рис. 1, 2). Внаслідок проведення вищезазначених маніпуляцій із ДНК, детально описаних у розділі «Матеріали і методи», одержано бактерії *E. coli* штаму *DH10B*, що містили генетичну конструкцію *pEGFP-N1-proHB-EGF*, з об'єднаною ДНК послідовність генів *proHB-EGF* і *EGFP* (рис. 3). Ці клітини у

подальшому використовували для клонування та виділення генетичної конструкції *pEGFP-N1-proHB-EGF*.

Генетична конструкція *pEGFP-N1-proHB-EGF* дозволяла експресувати proHB-EGF із флуоресцентною міткою на С-кінці молекули. Для забезпечення транспортування proHB-EGF-EGFP на поверхню клітинної мембрани, у складі ділянки гена, що кодує proHB-EGF, було залишено відповідну сигнальну послідовність. Таким чином, одержане флуоресцентне похідне proHB-EGF було здатне до транспортування на поверхню мембрани клітини та до подальшого утворення флуоресцентноміченого С-термінального фрагмента (CTF-EGFP) після протеолітичного процесингу proHB-EGF-EGFP. Наявність флуоресцентного протеїну на С-кінці молекули proHB-EGF уможливило проведення досліджень, пов'язаних із вивченням молекулярних механізмів реалізації біологічної активності як повнорозмірної молекули proHB-EGF, так і С-термінального фрагмента, а також шляхів їх внутрішньоклітинного транспортування. Це також відкриває можливості для дослідження впливу позаклітинних чинників, таких як UV-опромінення, радіація, форболові ефіри (TPA, PMA), ростові фактори, цитокіни та ін., на процеси утворення та внутрішньоклітинного транспортування CTF.

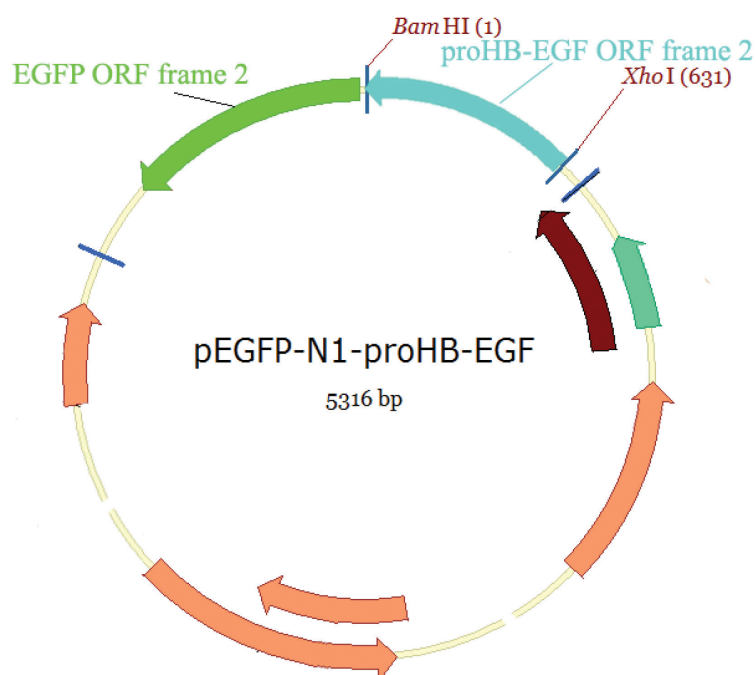


Рис. 1. Схематичне зображення генетичної конструкції *pEGFP-N1-proHB-EGF*

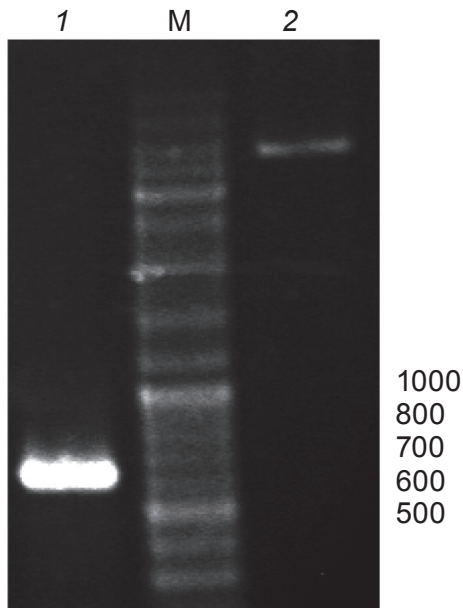


Рис. 2. Електрофореграма нуклеотидних послідовностей вставки – *proHB-EGF* та вектора – *pEGFP-N1*: 1 – нуклеотидна послідовність ділянки гена, що кодує *proHB-EGF*, ампліфікована за допомогою ПЛР та гідролізована ендонуклеазами рестрикції *XhoI* та *BamHI*; М – маркери молекулярної маси; 2 – вектор *pEGFP-N1* гідролізований ендонуклеазами рестрикції *XhoI* та *BamHI* і оброблений лужною фосфатазою креветки

Дослідження рецепторної функції флуоресцентного похідного трансмембранної форми *HB-EGF* людини (*proHB-EGF-EGFP*). Трансмембранні і секреторні (розчинні) форми ростових факторів зазвичай виконують функцію лігандів для відповідних рецепторів на поверхні клітин. Проте, *proHB-EGF* має унікальну особливість, яка вирізняє цей ростовий фактор серед інших членів родини епідермальних ростових факторів – це здатність виступати у ролі рецептора до дифтерійного токсину (ДТ). Незважаючи на те, що на сьогодні механізми рецепції ДТ та реалізації його цитотоксичної дії досить добре вивчені, актуальним залишається питання про можливість використання рекомбінантних похідних ДТ для цілеспрямованої доставки біологічно активних компонентів (протеїнів, пептидів) всередину клітини з терапевтичною метою. Вирішення такого завдання вимагає проведення досліджень щодо шляхів внутрішньоклітинного транспортування *proHB-EGF* після зв'язування не тільки власне самого ДТ, а і його нетоксичних похідних, які можуть бути позбавлені тих, чи інших протеїнових компонентів, притаманних цілій молекулі ДТ. Таким чином, дослідження рецепторної функції *proHB-EGF* є необхідним етапом для з'ясування можливостей створення

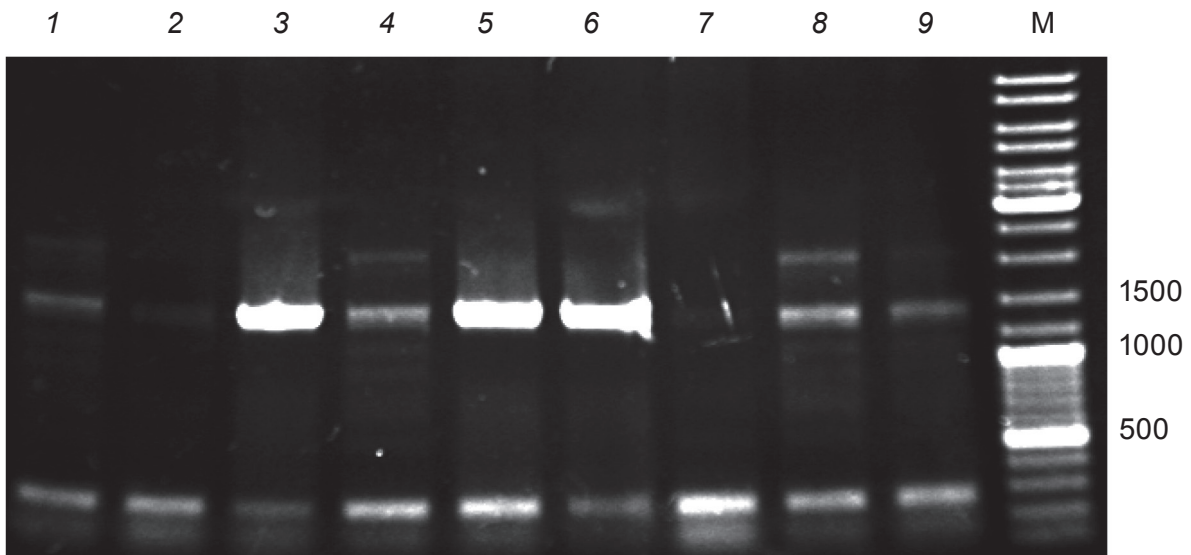


Рис. 3. Результати ПЛР аналізу бактерій *E. coli* DH10B, проведеного із використанням специфічної пари праймерів, що фланкують ген *proHB-EGF* на 5'-кінці і ген *EGFP* на 3'-кінці, та дозволяють отримувати ПЛР-продукт, що містить у своєму складі нуклеотидні послідовності обох генів. Колонії 3, 5, 6 несуть у собі об'єднану ДНК послідовність генів *proHB-EGF* та *EGFP*

терапевтичних препаратів на основі ДТ і окремих фрагментів його молекули та відкриває нові перспективи для з'ясування механізмів реалізації біологічної активності трансмембранних форм ростових факторів.

Для дослідження функціональної характеристики одержаного протеїну proHB-EGF-EGFP необхідно було встановити його здатність зв'язувати дифтерійний токсин. Для цього використано флуоресцентне похідне рецепторзв'язувальної В-субодиниці дифтерійного токсину – mCherry-SubB. Дослідження взаємодії флуоресцентного похідного ДТ та трансмембранної форми HB-EGF були проведені з використанням конфокальної мікроскопії на чутливих до дії ДТ клітинах лінії Vero, трансфікованих генетичною конструкцією *pEGFP-N1-proHB-EGF*. Еквімолярну кількість червоного флуоресцентного протеїну mCherry використовували як негативний контроль. З метою дослідження процесу ендоцитуювання утвореного ліганд-рецепторного комплексу proHB-EGF-EGFP/mCherry-SubB або proHB-EGF-EGFP/mCherry, клітини інкубували 15 хв

при температурі 37 °С за 5%-ї концентрації CO₂. Для підтвердження взаємодії між флуоресцентно-міченими рецептором та лігандом виявляли колоколізацію обох флуоресцентних міток EGFP (зелений канал) та mCherry (червоний канал) між собою з використанням програмного забезпечення Fiji (рис. 4).

Як можна бачити з результатів конфокальної мікроскопії, додавання mCherry-SubB до клітин лінії Vero, які експресували на своїй поверхні proHB-EGF-EGFP, призводило до утворення ліганд-рецепторного комплексу proHB-EGF-EGFP/mCherry-SubB та подальшої його інтерналізації, про що свідчать дані колоколізації флуоресцентних міток. Водночас, підтвердженням специфічності взаємодії mCherry-SubB із рецептором є майже повна відсутність зв'язування вільного mCherry з клітинами за тих самих умов.

Отже, можна зробити висновок про здатність proHB-EGF-EGFP зв'язувати флуоресцентно-мічену субодиницю В дифтерійного токсину. Таким чином, одержана генетична конструкція *pEGFP-N1-proHB-EGF*, що кодує proHB-EGF-

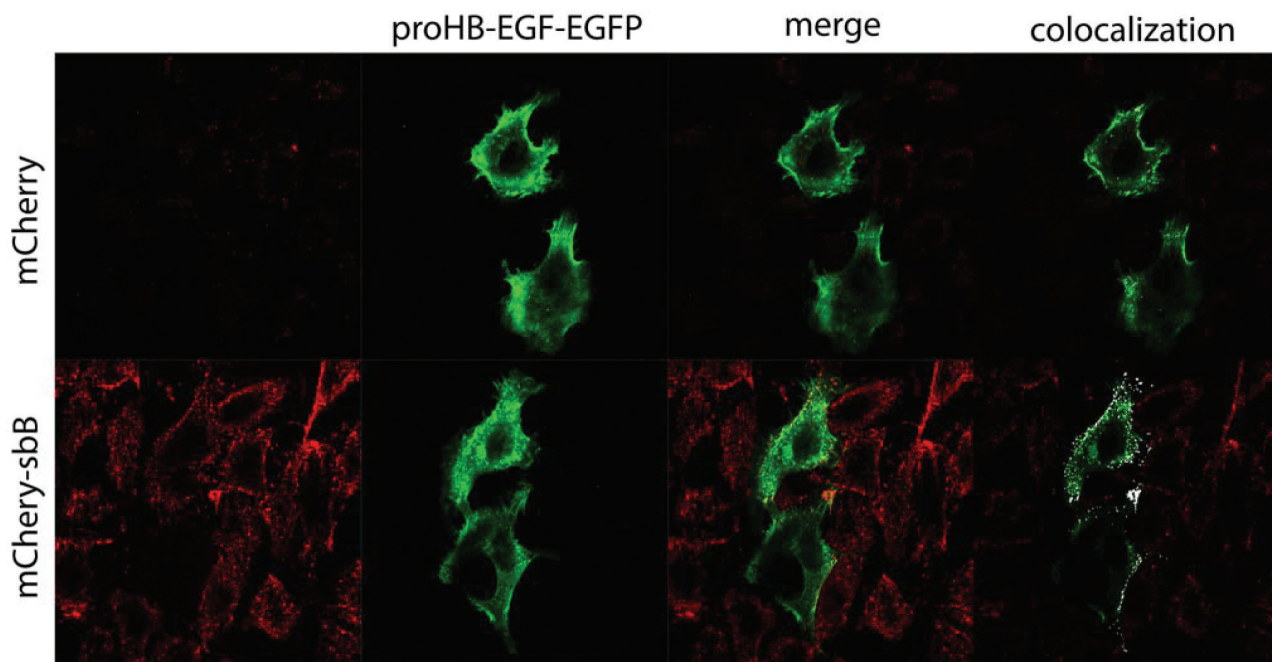


Рис. 4. Конфокальна мікроскопія препаратів клітин лінії Vero, трансфікованих генетичною конструкцією *pEGFP-N1-proHB-EGF* та забарвлених флуоресцентним похідним субодиниці В ДТ – mCherry-SubB або вільним mCherry; proHB-EGF-EGFP – зелений канал; mCherry-SubB/ mCherry – червоний канал; merge – накладання флуоресценції по зеленому та червоному каналах; colocalization (колоколізація) – накладання флуоресценції по зеленому та червоному каналам – білий колір

EGFP, може бути використана для трансфекції еукаріотичних клітин з метою дослідження рецепторної функції proHB-EGF.

Утворення С-термінального фрагмента proHB-EGF (CTF-EGFP) та його внутрішньоклітинна інтерналізація. Окрім рецепторної функції, proHB-EGF також може бути регуляторним елементом експресії певних генів після утворення С-термінального фрагмента (CTF, від англ.: C-Terminal Fragment) шляхом протеолітичного процесингу трансмембранної форми. Цитоплазматичний сегмент ретроградним шляхом транспортується до ядра клітини, де взаємодіє з репресорами транскрипції PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger protein) та Bcl6 (B cell leukemia 6), які негативно впливають на клітинний цикл шляхом пригнічення експресії цикліну A2, с-мус, цикліну D2 та ін [14]. Таким чином, утворений під час протеолітичного процесингу CTF може регулювати транскрипцію генів циклонів і, як наслідок, сприяти прогресії клітинного циклу.

Для дослідження здатності одержаного протеїну proHB-EGF-EGFP до процесингу під дією матриксних металопротеїназ вивчено його здатність утворювати флуоресцентно-мічений фрагмент CTF-EGFP під дією тетрафорболового ефіру (ТРА) на трансфікованих генетичною конструкцією *pEGFP-N1-proHB-EGF* клітинах лінії Vero. Для підтвердження специфічності впливу ТРА був використаний інгібітор поверхневих матриксних протеїназ – GM6001 та інгібітор клатринзалежного ендоцитозу – феніларсеноксид (РАО).

Оскільки генетична конструкція *pEGFP-N1-proHB-EGF* дозволяла візуалізувати С-термінальну частину молекули proHB-EGF, для візуалізації N-термінальної частини трансмембранної форми ростового фактора клітини забарвлювали флуоресцентно-міченою субодиницею В ДТ (mCherry-SubB). Таким чином, зв'язування mCherry-SubB із proHB-EGF-EGFP призводитиме до колокалізації червоної та зеленої флуоресцентних міток ліганду та рецептора. На противагу, у разі злущування ектодомену proHB-EGF зв'язування mCherry-SubB не відбуватиметься, а отже, можливо буде детектувати лише зелену флуоресцентну мітку вільного CTF.

Додавання до клітин ТРА у концентрації 100 нМ призводило до утворення везикул, які локалізувалися переважно у перенуклеар-

ному просторі клітин (рис. 5, В, Н, К). Зокрема, наявність невеликої кількості везикул, які містили mCherry-SubB, могла бути результатом неповного протеолітичного процесингу proHB-EGF-EGFP під дією ТРА, та, як наслідок, інтерналізації mCherry-SubB у комплексі із proHB-EGF-EGFP (рис. 5, С). Одночасне додавання ТРА та РАО не інгібувало утворення зелених везикул під дією ТРА. Можливим поясненням відсутності інгібувального впливу РАО за присутності ТРА на процес інтерналізації CTF-EGFP є його клатриннезалежний механізм. (рис. 5, К). Проте таке припущення потребує проведення подальших детальніших досліджень. Одночасне додавання ТРА, РАО та GM6001 призводило до істотного підвищення інтенсивності забарвлення поверхні клітин флуоресцентно-міченою субодиницею В ДТ (mCherry-SubB), про що свідчила переважна колокалізація червоної та зеленої міток на поверхні клітин, оскільки більшість молекул proHB-EGF залишається на поверхні клітини, а отже може вільно взаємодіяти із mCherry-SubB (рис. 5, G, H, I). Це свідчить про наявність інгібувального впливу GM6001 на процеси утворення CTF-EGFP під дією ТРА. На цій підставі можна зробити висновки про утворення в трансфікованих клітинах CTF-EGFP під дією ТРА та про клатриннезалежний механізм інтерналізації CTF-EGFP. У той же час, додавання РАО за відсутності ТРА призводило до повного інгібування інтерналізації утвореного ліганд-рецепторного комплексу proHB-EGF-EGFP/mCherry-SubB (рис. 5, D, E, F). Отже, інтерналізація повнорозмірної форми proHB-EGF, зв'язаної з дифтерійним токсином, відбувається за клатринзалежним механізмом, що підтверджується також і даними літератури [15].

Таким чином, одержана генетична конструкція *pEGFP-N1-proHB-EGF* дозволяє експресувати флуоресцентно-мічену трансмембранну форму proHB-EGF людини у клітинах еукаріот, зокрема у клітинах лінії Vero. Експресована в такий спосіб трансмембранна форма proHB-EGF може бути використана для дослідження біологічної активності proHB-EGF, а саме його рецепторних та регуляторних функцій, на що вказують результати експериментів із використанням флуоресцентно-міченої субодиниці В ДТ – mCherry-SubB та індуктора утворення С-термінального фрагмента – ТРА.

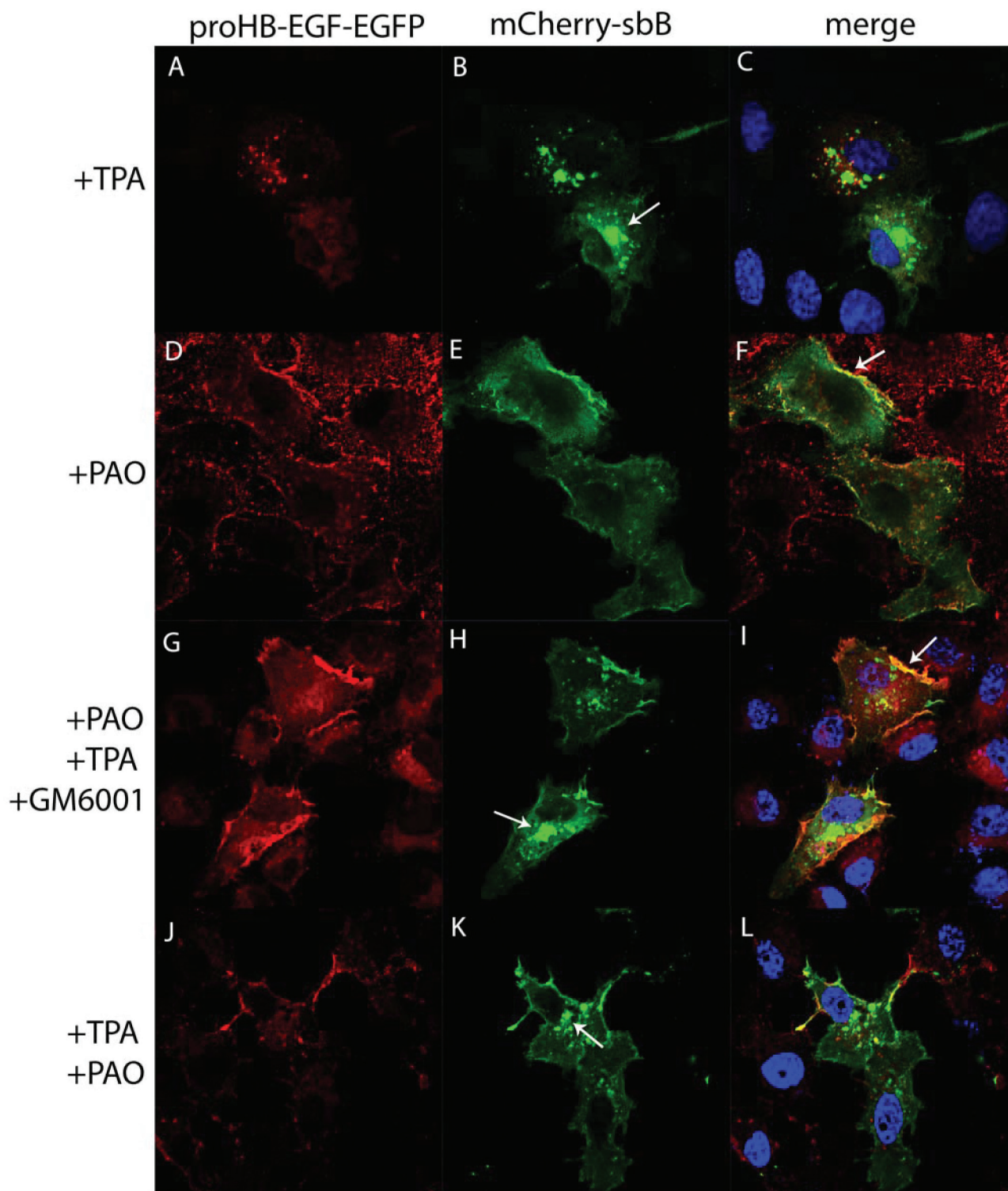


Рис. 5. Конфокальна мікроскопія клітин лінії Vero, трансфікованих генетичною конструкцією pEGFP-N1-proHB-EGF та забарвлених флуоресцентним похідним субодиниці B ДТ – mCherry-SubB під дією форболового ефіру (TPA) та/або інгібітору поверхневих матриксних протеїназ – GM6001 та/або інгібітору клатринзалежного ендозитозу – феніларсеноксиду (PAO). Білими стрілками позначені ендосомоподібні компартменти, що мають у своєму складі CTF-EGFP; proHB-EGF-EGFP – зелений канал; mCherry-SubB/mCherry – червоний канал; ядра клітин (hoechst) – синій канал; merge – накладання флуоресценції по зеленому, червоному та синьому каналах

КЛЕТОЧНАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕЦЕПТОРНОЙ И РЕГУЛЯТОРНОЙ ФУНКЦИЙ proHB-EGF ЧЕЛОВЕКА

*Н. В. Короткевич, А. Ю. Лабынцев,
К. Ю. Манойлов, О. И. Крынина,
Л. В. Дяченко, Д. В. Колибо,
С. В. Комисаренко*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: gnr.nata@gmail.com

Исследование внутриклеточных путей транспортирования proHB-EGF, а также его лиганд-рецепторных комплексов, требует создания новейших подходов и моделей, в частности, с использованием флуоресцентных техник. С целью создания модели для исследования функций proHB-EGF было получено генетическую конструкцию pEGFP-N1-proHB-EGF, которая кодирует протеин proHB-EGF-EGFP-proHB-EGF, слитый с усиленным зеленым флуоресцентным протеином EGFP на цитоплазматическом конце молекулы. Путем трансфекции pEGFP-N1-proHB-EGF были получены эукариотические клетки линии Vero, экспрессирующие на поверхности протеин proHB-EGF-EGFP. Экспрессированный в клетках эукариот proHB-EGF-EGFP обладал способностью связывать нетоксичное флуоресцентное производное рецепторной субъединицы В дифтерийного токсина mCherry-SubB. После стимулирования трансфицированных клеток ТРА (12-0-тетра-деканойлфорбол-13-ацетат), proHB-EGF-EGFP образовывал флуоресцентно-меченый С-терминальный фрагмент молекулы – СТФ-EGFP. Таким образом, полученная генетическая конструкция pEGFP-N1-proHB-EGF позволяет визуализировать молекулы proHB-EGF и СТФ в клетках. Это открывает новые возможности для исследования их функций, в частности, рецепторной функции proHB-EGF при связывании с молекулой дифтерийного токсина, исследований внутриклеточных путей транспортировки СТФ и для поиска новых лигандов proHB-EGF.

Ключевые слова: гепаринсвязывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF), дифтерийный токсин, В-субъединица дифтерийного токсина, С-терминальный фрагмент (CTF).

CELL MODEL FOR THE STUDY OF RECEPTOR AND REGULATORY FUNCTIONS OF HUMAN proHB-EGF

*N. V. Korotkevych, A. Ju. Labyntsev,
K. Yu. Manoilov, O. I. Krynina,
L. V. Dyachenko, D. V. Kolibo,
S. V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: gnr.nata@gmail.com

Developing of new models and approaches, particularly with fluorescent techniques, for investigation of intracellular transport of proHB-EGF and its ligand-receptor complexes is strongly required.

In order to create a model for studying proHB-EGF functions the genetic construction pEGFP-N1-proHB-EGF, encoding proHB-EGF-EGFP which is fluorescent-labeled form of proHB-EGF with enhanced green fluorescent protein EGFP in the cytoplasmic terminus of the molecule, was obtained. Eukaryotic cells expressing fusion protein proHB-EGF-EGFP on the cell surface were obtained by transfection with pEGFP-N1-proHB-EGF. Expressed in the Vero cells proHB-EGF-EGFP could bind fluorescent derivative of nontoxic receptor-binding subunit B of diphtheria toxin mCherry-SubB. After stimulation of transfected cells with TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate), proHB-EGF-EGFP formed a fluorescently-labeled C-terminal fragment of the molecule – CTF-EGFP. Thus, the obtained genetic construction pEGFP-N1-proHB-EGF could be helpful in visualization of molecules proHB-EGF and CTF in cells, may open new possibilities for the studying of their functions, such as receptor function of proHB-EGF for diphtheria toxin, intracellular translocation of CTF and provide possibilities for natural proHB-EGF ligands search.

Key words: heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), diphtheria toxin, B subunit of diphtheria toxin, C-terminal fragment of proHB-EGF (CTF).

References

1. Higashiyama S., Abraham J. A., Miller J., Fiddes J. C., Klagsbrun M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF // *Science*. – 1991. – **251**. – P. 936–939.

2. Raab G., Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – **1333**. – P. F179–F199.
3. Higashiyama S., Nanba D. ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2005. – **1751**. – P. 110–117.
4. Hieda M., Isokane M., Koizumi M., Higashi C., Tachibana T., Shudou M., Taguchi T., Hieda Y., Higashiyama S. Membrane-anchored growth factor, HB-EGF, on the cell surface targeted to the inner nuclear membrane // *J. Cell Biol.* – 2008. – **180**. – P. 763–769.
5. Higashiyama S., Iwabuki H., Morimoto C., Hieda M., Inoue H., Matsushita N. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands // *Cancer Sci.* – 2008. – **99**. – P. 214–220.
6. Harris R. C., Chung E., Coffey R. J. EGF receptor ligands // *Exp. Cell Res.* – 2003. – **284**. – P. 2–13.
7. Naglich J. G., Metherall J. E., Russel D. W., Eidels L. Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth precursor // *Cell.* – 1992. – **69**. – P. 1051–1061.
8. Lord J. M., Smith D. C., Roberts L. M. Toxin entry: how bacterial proteins get into mammalian cells // *Cell Microbiol.* – 1999. – **1**. – P. 85–91.
9. Kaberniuk A. A., Labyntsev A. J., Kolibo D. V., Oliinyk O. S., Redchuk T. A., Korotkevich N. V., Horchev V. F., Karahim S. O., Komisarenko S. V. Fluorescent derivatives of diphtheria toxin subunit B and their interaction with Vero cells // *Ukr. Biochem. J.* – 2009. – **81**, N 1. – P. 67–77. (In Ukrainian).
10. Korotkevich N. V., Labyntsev A. J., Kaberniuk A. A., Oliinyk O. S., Romanyuk S. I., Kolibo D. V., Komisarenko S. V. Cytotoxicity of the B subunit of diphtheria toxin to human histiocytic lymphoma U937 // *Ukr. Biochem. J.* – 2009. – **81**, N 4. – P. 69–80. (In Ukrainian).
11. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual // Cold Spring Harb. Lab. Press. – 1989. – A1.2 – A2.12.
12. Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation // *Nucleic Acids Res.* – **16**. – P. 6127–6145.
13. Korotkevich N. V., Kolibo D. V., Labyntsev A. Ju., Romaniuk S. I., Komisarenko S. V. Obtaining of recombinant human heparin-binding EGF-like growth factor and perspectives of its application in biotechnology // *Biotechnology.* – 2010. – **3**, N 4. – P. 44–54. (In Ukrainian).
14. Dethlefsen S. M., Raab G., Moses M. A., Adam R. M., Klagsbrun M., Freeman M. R. Extracellular calcium influx stimulates metalloproteinase cleavage and secretion of heparin-binding EGF-like growth factor independently of protein kinase C // *J. Cell. Biochem.* – 1998. – **69**. – P. 143–153.
15. Simpson J. C., Smith D. C., Roberts L. M., Lord J. M. Expression of mutant dynamin protects cells against diphtheria toxin but not against ricin // *Exp. Cell Res.* – 1998. – **239**. – P. 293–300.

Отримано 24.10.2013