ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

4 • 2011

БІОХІМІЯ

УДК 577.218

© 2011

А. А. Самойленко

Підвищення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в клітинах аденокарциноми грудної залози людини MCF-7 при дії інсуліну та інсуліноподібного фактора росту-1

(Представлено академіком НАН України С. В. Комісаренком)

Досліджено вплив гікопсії, інсуліну та інсуліноподібного фактора росту-1 (IGF-1) на експресію Ruk/CIN85. Показано, що експресія Ruk/CIN85 в клітинах аденокарциноми грудної залози людини MCF-7 не змінюється за умов м'якої гіпоксії, проте підвищується за дії інсуліну та IGF-1. Крім того, IGF-1 значно сильніше стимулює проліферацію клітин MCF-7, що надекспресують Ruk/CIN85, порівняно з контрольними клітинами. Як індукція експресії Ruk/CIN85, так і посилення проліферативної активності клітин MCF-7 не спостерігалися в присутності LY294 002 (інгібітора сигнального шляху PI3K/Akt). Таким чином, виявлено нові фактори, що можуть впливати на експресію та біологічну активність протеїну Ruk/CIN85.

Специфічність клітинної відповіді на дію численних стимулів потребує інтеграції різноманітних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Одним з ключових факторів, що забезпечують передачу регуляторних сигналів та їх специфічність, є адаптерні протеїни. Адаптерні протеїни — це некаталітичні молекули з численними доменами, які забезпечують протеїно-протеїнові і протеїно-ліпідні взаємодії та взаємодії із центрами посттрансляційних модифікацій, що функціонують у вузлах перетину внутрішньоклітинних сигнальних шляхів [1]. Здатність адаптерних протеїнів одночасно взаємодіяти з багатьма іншими молекулярними компонентами відіграє вирішальну роль у ендоцитних, біосинтетичних, секреторних процесах клітин.

Об'єктом наших досліджень щодо з'ясування ролі адаптерних протеїнів у внутрішньоклітинному сигналізуванні є протеїн Ruk/CIN85 (також відомий як SETA, CD2BP3 й SH3KBP1), який широко експресується в різних тканинах та лініях клітин [2]. Нагромад-

жені на сьогодні експериментальні дані дозволяють вважати Ruk/CIN85 представником окремої родини SH3-вмісних адаптерних протеїнів, які виконують інтегруючу роль у регулюванні архітектури актинового цитоскелета, адгезії та інвазії клітин, апоптозу, мітогенному сигналізуванні, трафіку мембранних везикул, лігандопосередкованому ендоцитозі рецепторних тирозинових протеїнкіназ [2–4].

Нещодавно нами було показано, що надекспресія Ruk/CIN85 має модулюючий вплив на експресію протеїнів, що стимулюється гіпоксією, зокрема інгібітора активатора плазміногена-1 (PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1) [5]. Протеїн PAI-1 є одним з компонентів системи активації плізміногена, що бере безпосередню участь як у процесах фібринолізу, так і в деградації позаклітинного матриксу, регулюванні міжклітинної адгезії, рухливості й інвазивності пухлинних клітин. Експресія PAI-1 посилюється не лише за умов гіпоксії, а також при дії інсуліну та інсуліноподібного фактора росту-1 (IGF-1, insulin-like growth factor type-1) [6]. Цікаво, що індукція PAI-1 як при дії інсуліну та IGF-1, так і за умов гіпоксії опосередкована зв'язуванням фактора відповіді на гіпоксію-1 (HIF-1, hypoxia-inducible factor-1) з елементом відповіді на гіпоксію (HRE, hypoxia response element) у промоторі *PAI-1* [7, 8]. Якщо сайт HRE в цьому промоторі не є функціональним, посилення залежної від промотору *PAI-1* репортерної активності гена люциферази при надекспресії Ruk/CIN85 не відбувається [5].

На сьогодні нема даних про вплив гіпоксії, інсуліну та IGF-1 на експресію Ruk/CIN85. За допомогою біоінформаційного пошуку нами було виявлено, що промоторний район гена, що кодує Ruk/CIN85, містить декілька послідовностей, які можуть виконувати функцію елементів відповіді на гіпоксію, а також регулювати експресію гена при дії інсуліну та IGF-1. Тому мета проведеного дослідження полягала в з'ясуванні, чи можуть внутрішньопухлинна гіпоксія, а також дія інсуліну та IGF-1 бути одними з факторів, що стимулюють експресію Ruk/CIN85.

Матеріали і методи. *Культура клітин.* Клітини аденокарциноми грудної залози людини MCF-7 та клітини ембріональної нирки людини HEK293 культивували в середовищі DMEM (PAA Laboratories, Австрія), яке містило 10% ембріональної сироватки теляти, 50 U/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Клітини утримували в CO_2 інкубаторі (Cytoperm 8080, Heraeus, Hanau, Німеччина) при 37 $^\circ$ C у зволоженій атмосфері, що містила 5% O_2 (помірна гіпоксія) або 16% O_2 (нормоксія), 5% CO_2 і, відповідно, 90% чи 79% N_2 (за об'ємом). Отримання сублінії клітин MCF-7 зі стабільною надекспресією протеїну Ruk/CIN85 описано раніше [5].

Вестерн-блот аналіз. Для дослідження вмісту протеїнів клітини висівали на чашки Петрі (6 см), культивували протягом першої доби за умов нормоксії, а протягом другої доби — за умов нормо- або гіпоксії (16 год або 24 год, як вказано). Перед додаванням до клітин IGF-1 або інсуліну клітини інкубували протягом 24 год у середовищі DMEM з низьким вмістом ембріональної сироватки теляти (0,1%). IGF-1 людини (Sigma, St. Louis, США), ресуспендований в 0,1 М оцтовій кислоті, додавали до кінцевої концентрації 100 нМ. Інсулін (розчинений в 0,9% NaCl з 0,1% сироватковим альбуміном) використовували в кінцевій концентрації 500 нМ. Де вказано, клітини протягом 30 хв передінкубували з 5 мкМ LY294 002 (Alexis, Gruenberg, Німеччина) або розчинником (0,03% DMSO). Клітини лізували та проводили Вестерн-блот аналіз як описано в [5] з використанням поліклональних антитіл кроля до Ruk/CIN85 (1 : 3000) [9] та до β-актину (1 : 5000) (Sigma). Імунореактивні смуги детектували за допомогою системи підсиленої хемілюмінісценції (ECL Western Blotting System, "Amersham", Велика Британія).

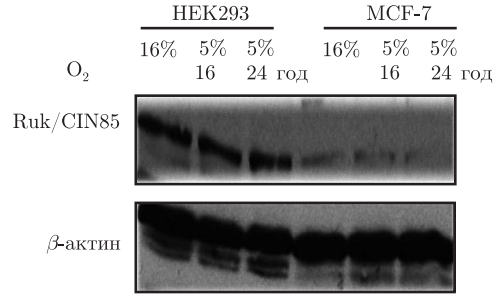

Рис. 1. Рівень протеїну Ruk/CIN85 в клітинах MCF-7 за умов гіпоксії.
Рівень протеїну визначали за допомогою Вестерн-блот аналізу в клітинах MCF-7. Клітини інкубували за умов нормоксії (16% O_2) або гіпоксії (5% O_2) протягом 16 або 24 год. Рівень експресії β-актину визначали для підтвердження однакової кількості протеїну в пробах

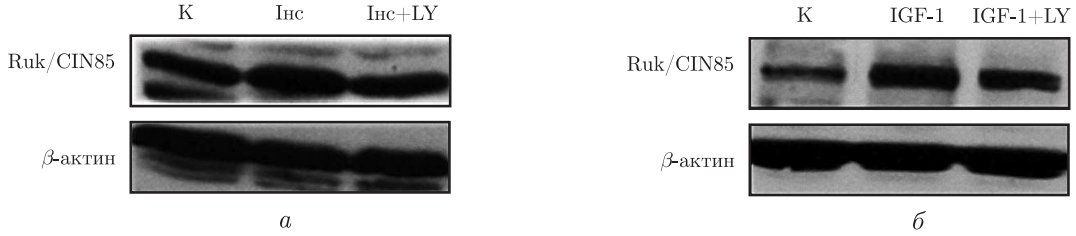

Рис. 2. Рівень Ruk/CIN85 в клітинах MCF-7 у присутності інсуліну (*а*) та IGF-1 (*б*).
Рівень протеїну визначали за допомогою Вестерн-блот аналізу в клітинах MCF-7. Клітини інкубували в присутності інсуліну протягом 24 год. За 30 хв до додавання індукторів клітини передінкубували з 5 мкМ LY294 002 або розчинником (DMSO). Рівень експресії β-актину визначали для підтвердження однакової кількості протеїну в пробах

Життєздатність клітин оцінювали через 72 год після висівання на культуральні чашки за активністю електронно-транспортного ланцюга, яку визначали за допомогою тесту з МТТ-реактивом (3- [4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій бромід). Реакцію проводили в 12-лункових планшетах при 37 °С протягом 3 год. Утворення МТТ-формазану визначали на цифровому спектрофотометрі (Beckman DU-600) при $\lambda = 570$ нм.

Результати дослідження та їх обговорення. *Індукція експресії гена Ruk/CIN85 при дії інсуліну та IGF-1.* Для того щоб дослідити, чи змінюється експресія Ruk/CIN85 за умов гіпоксії, а також при дії інсуліну та IGF-1, було використано клітини аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7, які за умов стаціонарного культивування характеризуються низьким вмістом повнорозмірної форми Ruk/CIN85. Клітини MCF-7 інкубували за умов гіпоксії (5% кисню) або нормоксії (16% кисню) протягом 16 або 24 год. Вестерн-блот аналіз з використанням поліклональних антитіл до Ruk/CIN85 не виявив відмінностей в рівнях експресії Ruk/CIN85 за різних концентрацій кисню (рис. 1). Аналогічні дані були отримані при використанні клітин ембріональної нирки людини HEK293, що в нормі експресують вищі, ніж MCF-7, рівні Ruk/CIN85 (див. рис. 1).

Клітини MCF-7 також інкубували в присутності IGF-1 людини в кінцевій концентрації 100 нМ та інсуліну людини в концентрації 500 нМ. Культивування клітин протягом 24 год у присутності як інсуліну, так і IGF-1 призводило до підвищення експресії повнорозмірної форми Ruk/CIN85 з *Mr* 85 кДа (рис. 2). Це підвищення експресії не спостерігали в клітинах, які інкубували з інсуліном або IGF-1 у присутності інгібітора сигнального шляху PI3K/Akt LY294002 (див. рис. 2).

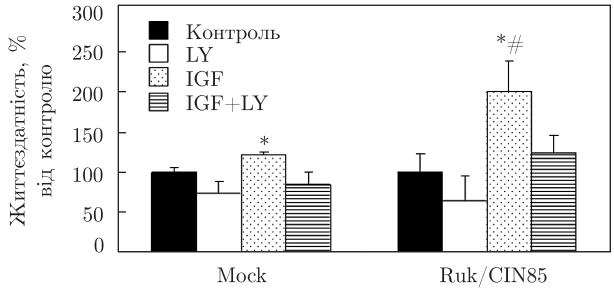

Рис. 3. Чутливість клітин MCF-7, що надекспресують Ruk/CIN85, до проліферації, стимульованої IGF-1. Клітини MCF-7, трансфіковані "пустим" вектором (mock), та клітини зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 культивували протягом 24 год в середовищі для голодування (DMEM з 0,1% ембріональною сироваткою теляти). Далі клітини інкубували 24 год в присутності IGF-1 (100 нМ) разом з LY294002 (5 мкМ) або розчинником (DMSO). Кількість клітин оцінювали з допомогою MTT тесту за утворенням MTT-формазану, яке визначали на спектрофотометрі ($\lambda = 570$ нм). Показники в контролі (без додавання IGF-1 та/або LY294002) прийнято за 100%. Вказано середні значення трьох експериментів ± SEM.
* — статистично значуща відмінність показників клітин, стимульованих IGF-1, від контрольних при парному порівнянні за t-критерієм Стьюдента і рівнем значущості $p \leqslant 0{,}05$. # — статистично значуща відмінність показників клітин, що надекспресують Ruk/CIN85, від "mock" клітин при парному порівнянні за t-критерієм Стьюдента і рівнем значущості $p \leqslant 0{,}05$

Таким чином, хоча відомо, що підвищення вмісту Ruk/CIN85 спричиняє стабілізацію транскрипційного фактора HIF-1α [5], м'яка гіпоксія сама по собі не є достатнім стимулом, щоб індукувати експресію Ruk/CIN85. Питання про те, чи може гіпоксія модулювати експресію Ruk/CIN85, стимульовану дією інших індукторів, потребує подальшого вивчення.

Надекспресія Ruk/CIN85 посилює стимульовану IGF-1 проліферацію клітин MCF-7. Відомо, що IGF-1 стимулює проліферацію клітин MCF-7 [10]. Відповідно, нашою наступною метою було дослідити, чи є клітини, що надекспресують Ruk/CIN85, більш чутливими до проліферації, індукованої IGF-1. За допомогою MTT тесту було виявлено, що кількість клітин MCF-7, трансфікованих контрольною плазмідою, при дії IGF-1 збільшується приблизно на 20%. Водночас проліферація клітин MCF-7, що надекспресують Ruk/CIN85, при дії IGF-1 посилювалася вдвічі (рис. 3). Посилення проліферації при дії IGF-1 не спостерігалося в присутності інгібітора PI3K/Akt сигнального шляху LY294002.

Вища чутливість клітин, що надекспресують Ruk/CIN85, до проліферації, стимульованої при дії IGF-1, може свідчити про роль Ruk/CIN85 у IGF-1-залежному внутрішньоклітинному сигналізуванні. Хоча відомо, що Ruk/CIN85 та споріднений з ним протеїн CD2AP відіграють важливу роль у Cbl-опосередкованому убіквітилюванні та деградації рецепторних тирозинкіназ, включаючи рецептори до EGF (epidermal growth factor) й PDGF (platelet-derived growth factor) [2], на сьогодні існує дуже мало даних про можливу участь Ruk/CIN85 в процесах, стимульованих IGF-1 та інсуліном. Відомо лише, що відсутність CD2AP у мишей порушує активування сигнальних шляхів PI3K/Akt та ERK1/2, стимульованих кількома факторами росту, включаючи IGF-1 [11]. Дослідження профілю транскрипції у мишей з використанням геномних мікрочіпів (whole genome microarrays) показали, що експресія Ruk/CIN85 посилюється при висококалорійному харчуванні, але повертається до контрольних значень за умов голодування [12]. Оскільки вживання продуктів з високим вмістом жирів супроводжується підвищенням рівня інсуліну в крові та розвитком нечутливості до інсуліну, висловлюється припущення, що посилення експресії Ruk/CIN85 призводить у мишей до розвитку резистентності до дії інсуліну через пригнічення PI3K/Akt сигнального

шляху [12]. Водночас, наші дані свідчать про позитивний вплив надекспресії Ruk/CIN85 на сигналювання, стимульоване IGF-1.

Дослідження здійснене за фінансової підтримки спільного українсько-німецького гранту МОН України (170–2009) та федерального МОН Німеччини (UKR 08/003), а також спільного українсько-російського гранту між ДФФД України та РФФД (№Ф28.4/041).

Автор висловлює подяку д-ру біол. наук проф. Л. Б. Дробот (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ) та проф. Т. Кітцманну (Університет Кайзерслаутерну, Німеччина та Університет Оулу, Фінляндія) за висловлені ідеї та всебічну підтримку в проведенні досліджень.

1. *Flynn D. C.* Adaptor proteins // Oncogene. – 2001. – **20**. – P. 6270–6272.
2. *Dikic I.* CIN85/CMS family of adaptor molecules // FEBS Lett. – 2002. – **529**. – P. 110–115.
3. *Gout I., Middleton G., Adu J. et al.* Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein // EMBO J. – 2000. – **19**. – P. 4015–4025.
4. *Havrylov S., Ichioka F., Powell K. et al.* Adaptor protein Ruk/CIN85 is associated with a subset of COPI-coated membranes of the Golgi complex // Traffic. – 2008. – **9**. – P. 798–812.
5. *Samoylenko A., Dimova E. Y., Kozlova N. et al.* The adaptor protein Ruk/CIN85 activates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression via hypoxia-inducible factor-1alpha // Thromb. Haemost. – 2010. – **103**. – P. 901–909.
6. *Dimova E. Y., Kietzmann T.* Metabolic, hormonal and environmental regulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: lessons from the liver // Ibid. – 2008. – **100**. – P. 992–1006.
7. *Kietzmann T., Samoylenko A., Roth U. et al.* Hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia response elements mediate the induction of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by insulin in primary rat hepatocytes // Blood. – 2003. – **101**. – P. 907–914.
8. *Dimova E. Y., Moller U., Herzig S. et al.* Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression by insulin-like growth factor-1 via MAP kinases and hypoxia-inducible factor-1 in HepG2 cells // Thromb. Haemost. – 2005. – **93**. – P. 1176–1184.
9. *Mayevska O., Shuvayeva H., Igumentseva N. et al.* Expression of adaptor protein Ruk/CIN85 isoforms in cell lines of various tissue origins and human melanoma // Exp. Oncol. – 2006. – **28**. – P. 275–281.
10. *Weinstein D., Simon M., Yehezkel E. et al.* Insulin analogues display IGF-I-like mitogenic and anti-apoptotic activities in cultured cancer cells // Diabetes Metab. Res. Rev. – 2009. – **25**. – P. 41–49.
11. *Tossidou I., Kardinal C., Peters I. et al.* CD2AP/CIN 85 balance determines receptor tyrosine kinase signaling response in podocytes // J. Biol. Chem. – 2007. – **282**. – P. 7457–7464.
12. *Raab R. M., Bullen J., Kelleher J. et al.* Regulation of mouse hepatic genes in response to diet induced obesity, insulin resistance and fasting induced weight reduction // Nutr. Metab. (Lond). – 2005. – 2: 15.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ *Надійшло до редакції 20.12.2010*

A. A. Samoylenko

Enhancement of the expression of adaptor protein Ruk/CIN85 in MCF-7 cells under the action of insulin and IGF-1

The effects of hypoxia, insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) on the Ruk/CIN85 expression are studied. It is demonstrated that the Ruk/CIN85 expression in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells is not changed under mild hypoxia but induced upon insulin and IGF-1 treatment. Moreover, the upregulation of Ruk/CIN85 increased the MCF-7 sensitivity to IGF-induced proliferation. Neither induction of Ruk/CIN85 expression nor increase in MCF-7 proliferative activity was observed in the cells pretreated with PI3K/Akt pathway inhibitor LY294002. Therefore, our study revealed new factors that influence Ruk/CIN85 expression and biological activity.