

ВІДПОВІДЬ ПУХЛИННИХ КЛІТИН НА ПРИГНІЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ RUK/CIN85 РЕКОМБІНАНТНИМИ ЛЕНТИВІРУСАМИ

А. А. САМОЙЛЕНКО¹, Н. В. БИЦЬ¹, Г. В. ПАСІЧНИК¹, Н. В. КОЗЛОВА¹,
А. В. БАЗАЛІЙ¹, Д. С. ГЕРАЩЕНКО¹, С. Г. ШАНДРЕНКО¹,
О. В. ВОРОТНИКОВ², Т. КІТЦМАНН³, С. В. КОМІСАРЕНКО¹, Л. Б. ДРОБОТ¹

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, Україна

²Факультет фундаментальної медицини, МДУ ім. М. В. Ломоносова, Москва, Росія

³Відділення біохімії і Біоцентр Оулу, Університет Оулу, Оулу, Фінляндія

E-mail: samoylenko@biochem.kiev.ua

Отримано 31.05.2013

Ruk/CIN85 є одним з адаптерних протеїнів, що відіграють важливу роль у регулюванні процесів проліферації, рухливості та загибелі клітин. Нещодавно нами було показано, що надекспресія Ruk/CIN85 посилює трансформувальний потенціал клітин аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7. Метою цього дослідження було з'ясувати, чи впливатиме на біологічні властивості клітин пригнічення експресії Ruk/CIN85. Для РНК-інтерференції Ruk/CIN85 було одержано лентивірусні конструкції, що містять Ruk/CIN85-специфічні послідовності small hairpin RNA. За допомогою отриманих рекомбінантних лентивірусів встановлено, що пригнічення експресії Ruk/CIN85 впливає на біологічні властивості (рухливість, проліферацію, рівень експресії транспортера ABCG2, утворення активних форм кисню) різних типів пухлинних клітин, а саме: аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7, аденокарциноми ободової кишки людини HT-29 та мишачої карциноми легень Льюїса.

Ключові слова: адаптерні протеїни, Ruk/CIN85, РНК-інтерференція, лентивірусні вектори, рухливість клітин, активні форми кисню.

Специфічність відповіді клітин на зовнішні стимули потребує інтеграції численних внутрішньоклітинних сигнальних шляхів. Однією з основних груп протеїнів, що відповідають за таку інтеграцію, є адаптерні та риштувальні (scaffold) протеїни, які забезпечують збирання надмолекулярних мультипротеїнових комплексів та їх регулювання [1]. Ці мультипротеїнові комплекси передають всередину клітини сигнали, залучені до контролю росту, диференціювання, адгезії, рухливості та виживання клітин. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 (Regulator for ubiquitous kinase/c-Cbl-interacting protein of 85 kDa) завдяки складній доменній організації та наявності множинних молекулярних форм бере участь у низці важливих внутрішньоклітинних сигнальних процесів, що лежать в основі регулювання архітектури актинового цитоскелета, адгезії, рухливості та інвазії клітин, апоптозу, мітогенного сигналювання, транспорту

мембранних везикул, ліганд-опосередкованого ендоцитозу рецепторних тирозинових протеїнкіназ, інфікування клітин вірусом простого герпесу [2–5].

Нещодавно нами було показано, що надекспресія Ruk/CIN85 посилює трансформувальний потенціал клітин аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7 [5]. Проте не було досліджено, який вплив на властивості клітин лінії MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85 матиме пригнічення експресії цього протеїну. Одним з найпоширеніших сучасних експериментальних підходів для дослідження функцій генів у культурах клітин є використання методології РНК-інтерференції [6]. Лентивірусні вектори, що кодують shRNA (small hairpin RNA), які вбудовуються в геном клітини-хазяїна, використовують для тривалого пригнічення (silencing) експресії відповідних генів [7]. З огляду на це, ми спрямували наші зусилля на конструювання рекомбінантних ленти-

вірусів, які містять послідовність shRNA для протеїну Ruk/CIN85. Одержання такої лентивірусної конструкції дало змогу пригнітити експресію Ruk/CIN85 у клітинах гліоми щура C6, аденокарциноми ободової кишки людини HT-29, у клітинах мишачої карциноми легень Льюїса (Lewis lung carcinoma, LLC) та аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85, а також виявити, що пригнічення експресії Ruk/CIN85 може впливати на рухливість, проліферацію і утворення активних форм кисню (АФК) у зазначених типах клітин. Для того, щоб оцінити потенційний вплив надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах MCF-7 на розвиток резистентності до протипухлинних препаратів, було також досліджено вміст одного з АТР-зв'язувальних мембранних касетних транспортів ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2), що відіграє роль у розвитку раку грудної залози людини [8].

Матеріали і методи

Культура клітин. Клітини аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7, ембріональної нирки людини HEK293T, аденокарциноми ободової кишки людини HT-29, мишачої карциноми LLC та гліоми щура C6 культивували в середовищі DMEM (PAA Laboratories, Австрія), яке містило 10% ембріональної сироватки теляти (fetal bovine serum, FBS), 50 U/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Клітини утримували в CO₂-інкубаторі (Cytoperm 8080, Heraeus, Hanau, Німеччина) при 37 °C у зволоженій атмосфері, що містила 5% CO₂ (за об'ємом). Одержання сублінії клітин MCF-7 зі стабільною надекспресією протеїну Ruk/CIN85 (G4) описано раніше [5].

Одержання рекомбінантних лентивірусів, що містять послідовності *shRNA* для протеїну *Ruk/CIN85*. Лентивірусні вектори для пригнічення експресії *Ruk/CIN85* методом РНК-інтерференції (pLKO.1-*shRuk/CIN85* R19-23) було отримано шляхом лігування відповідних олігонуклеотидів після їх відпалювання (для R22 5'-CCGGCCAGCAGAAACGAGAGATTAACTCGAGTTA-ATCTCTCGTTTCTGCTGGTTTTTG-3' та 5'-AATTCAAAAACCAGCAGAAACGAGAGATTAAC TCGAGTTAATCTCTCGTTTCTGCTGG-3') у вектор pLKO.1 puro (Addgene, США) за центрами пізнавання для ендонуклеаз рестрикції *EcoRI* і *AgeI*. Отримані плазміди були нароблені й очищені з клітин

E. coli з використанням набору для очищення плазмідної ДНК (NucleoSpin plasmid purification kit, Machery-Nagel, Німеччина). Лентивіруси, що містять Ruk/CIN85 shRNA або scrambled shRNA, одержали шляхом котрансфекції «пакувальних» клітин НЕК293Т векторами pLKO.1-R19-23 або pLKO.1-scrambled, вектором pMD2.G, що кодує вірусний протеїн капсиду VSV-G (Vesicular stomatitis virus G glycoprotein), та пакувальним вектором psPAX2, що кодує вірусні протеїни gag і pol. Вірус збирали на 36-ту, 48-му і 60-ту год після трансфекції. Після інфікування відповідними лентивірусами клітини пасажували кілька разів за присутності селективного антибіотика пуромицину без подальшого субклонування.

Вестерн-блот-аналіз. Для дослідження вмісту протеїнів клітини висівали на чашки Петрі (діаметром 6 см). Через 24 год до клітин додавали суспензію, яка містила ленті-вірусні частинки, за присутності катіонного полімеру полібрєну (10 мкг/мл), що забезпечувало підвищення ефективності інфікування клітин. Через 24 год середовище змінювали на свіже, що містило селективний антибіотик пуроміцин (1 мкг/мл). Клітини лізували та проводили вестерн-блот-аналіз, як описано у [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 для підсиленої хемілюмінесценції (ECL Western Blotting System, Amersham, Велика Британія). Інтенсивність отриманих сигналів аналізували за допомогою денситометрії з використанням програми ImageJ. Рівень експресії β -актину визначали для підтвердження однакової кількості протеїну в пробах.

Дослідження рухливості клітин методом «заростання подряпини» у клітинному моношарі. Для проведення експериментів клітини лінії MCF-7 wt та зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 (сублінія G4) висівали у 6-лункові планшети і вирощували до 80% конфлюенту в середовищі DMEM, що містило 10% FBS. Через 24 год після висівання клітини інфікували лентівірусами, які експресували Ruk/CIN85-shRNA або scrambled shRNA. Подряпину у клітинному моношарі робили за допомогою носика на 10 мкл до автоматичних піпеток. Після цього середовище культивування замінювали на свіже, що містило 1 мкМ мітоміцину C (Sigma) для усунення клітинної проліферації. Через 24 год ефективність заростання подряпини аналізували за допомогою

фазово-контрастного мікроскопа. Відстань, на яку мігрували клітини, вимірювали за допомогою програмного забезпечення QuickPHOTO Camera 2.2.

Протокова цитофлуориметрія. Для оцінювання вмісту ABCG2-транспортів клітини лінії MCF-7 wt зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 (сублінія G4) та клітини сублінії G4, інфіковані рекомбінантним лентивірусом R22 і відібрані за присутності пуромицину ($2 \cdot 10^6$ клітин на пробу), фіксували в 96%-му розчині етанолу протягом 30 хв. Після оброблення суспензії 0,1%-м розчином тритону X-100 клітинну суспензію інкубували з антитілами до ABCG2-транспортера (Abcam) протягом 45 хв за кімнатної температури з подальшим відмиванням PBS. Антимішачі антитіла, мічені AlexaFluor488 (Invitrogen), використовували як вторинні. Клітини аналізували на протоковому цитофлуориметрі COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter).

Оцінювання метаболічної активності клітин з використанням МТТ. Активність електронотранспортного ланцюга як показника кількості живих клітин оцінювали за швидкістю відновлення МТТ (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) у клітинах LLC, як описано в роботі [10]. Реакцію проводили у 96-лункових планшетах. Кількість клітин LLC у лунці становила $1 \cdot 10^4$ в об'ємі 200 мкл. У кожен лунку додавали 20 мкл розчину МТТ (4 мг/мл у PBS) та інкубували протягом 2 год при 37 °C. Після інкубації планшети центрифугували (600 g, 7 хв) і зберігали їх у темряві за 4 °C упродовж 20 год. Осад формазану розчиняли у 150 мкл диметилсульфоксиду. Через 15 хв вимірювали екстинкцію на цифровому спектрофотометрі μQuant (BioTEK, США) за $\lambda = 570$ нм. Метаболічну активність клітин подавали у відсотках відносно контролю.

Визначення продукції АФК. Внутрішньоклітинні рівні АФК аналізували методом хемілюмінесценції з використанням люмінолу, як описано в [11]. Клітини HT-29 вирощували до 80% конфлюенту у середовищі DMEM, що містило 10% FBS. Далі клітини обробляли розчином ацетази (1 хв при 37 °C), промивали PBS (без $MgCl_2$ і $CaCl_2$), осаджували центрифугуванням (1000 g протягом 5 хв) та ресуспендували в холодному розчині HBSS (з $MgCl_2$ і $CaCl_2$). Потім $2 \cdot 10^5$ клітин HT-29 висівали в кожен лунку 96-лункового планшета. До кожної лунки додавали 250 мкМ люмінолу та 1 U пероксидази хрому (кінцеві концентрації) в загальному об'ємі 200 мкл. Хемілюмінесценцію вимі-

рювали за допомогою люмінометра FLx800 (BioTek, США) через 5 хв після додавання суміші «пероксидаза хрому/люмінол» протягом 30 хв з інтервалом 1 хв за кімнатної температури.

Статистична обробка результатів. Статистичну обробку результатів проводили у програмі Excel 2007. Експериментальні результати подано як середнє арифметичне та стандартне відхилення вибірки. Достовірність змін оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

Результати та обговорення

Експресія shRNA, що пригнічує експресію адаптерного протеїну Ruk/CIN85, у клітинах ссавців

Послідовності shRNA, що гіпотетично можуть пригнічувати експресію Ruk/CIN85, було запропоновано компанією Open Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Inc, США). Усього було перевірено п'ять послідовностей: R19 (2435–2455), R20 (1775–1795), R21 (561–581), R22 (2175–2195) та R23 (1082–1102) (у дужках позначено позиції відповідних нуклеотидів на мРНК Ruk/CIN85, загальна довжина якої становить 3348 п. н.). Із цих послідовностей R20, R21, R22 та R23 локалізовані у протеїнокодуючій ділянці мРНК (рис. 1), а R19 — у 3'-нетрансльованій ділянці мРНК. Лентивірусні вектори для пригнічення експресії Ruk/CIN85 методом РНК-інтерференції (pLKO.1-shRuk/CIN85 R19-23) одержували, як описано в розділі «Матеріали і методи». Схему будови однієї з пар олігонуклеотидів (R22) наведено на рис. 1, Б.

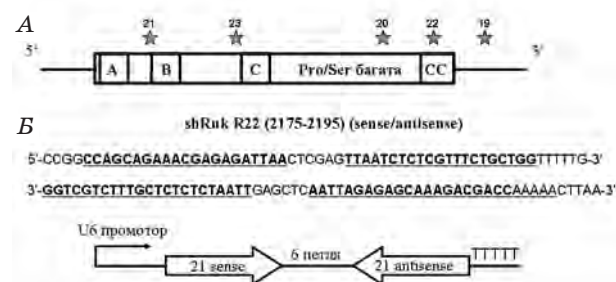


Рис. 1. Структурна організація повнорозмірного варіанта адаптерного протеїну Ruk/CIN85: показано SH3A-, SH3B- та SH3C-домени, Pro/Ser-багату ділянку та суперспіралізований (CC) район. Зірочками позначено ділянки протеїну, яким відповідають гіпотетичні shRNA-послідовності для РНК-інтерференції (R20, R21, R22, R23). Послідовність R19 комплементарна до 3'-нетрансльованої ділянки мРНК Ruk/CIN85

Геном лентівірусів містить три гени, що розташовані в геномній РНК у порядку 5'-gag-pol-env-3', а також допоміжні гени. З міркувань безпеки лентівірусні вектори, у тому числі pLKO.1 puro, ніколи не несуть гени, необхідні для їх реплікації. Для одержання віріонів клітини «пакувальної» клітинної лінії HEK293T, які експресують великий Т-антиген вірусу SV40, трансфікували трьома векторами — лентівірусним (pLKO.1), що містить послідовність для інтеграції в геном, пакувальним (psPAX2), який кодує протеїни gag і pol, та вектором, що кодує протеїн капсиду (pMD2.G) (рис. 2). Супернатант, що містить вірусні частинки, збирали перший раз через 36 год після трансфекції, а потім ще 2 рази кожні 12 год.

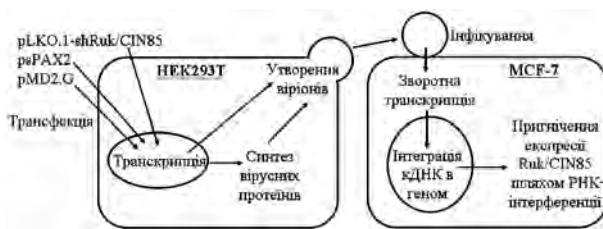


Рис. 2. Схема зараження «клітин-мішеней» лінії MCF-7 лентівірусами, одержаними в «пакувальних» клітинах HEK293T

Було отримано п'ять різних лентівірусів на основі pLKO.1puro, що містили потенційні послідовності анти-Ruk/CIN85 shRNA (R19-23). Ці віруси додавали (за присутності полібрену) до клітин-«мішеней», зокрема до гліоми C6, яка характеризується високим ендogenous вмістом Ruk/CIN85, та аденокарциноми грудної залози людини MCF-7 зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 (сублінія G4). Експресію Ruk/CIN85 у лізатах відповідних клітин досліджували за допомогою вестерн-блот-аналізу. Виявили, що одна з потенційних послідовностей, а саме R22, пригнічує експресію гена Ruk/CIN85 як у клітинах C6 (рис. 3, А), так і в клітинах лінії MCF-7 (рис. 3, В).

Дослідження впливу пригнічення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на клітинну міграцію, проліферацію, утворення АФК та експресію транспортера ABCG2 в пухлинних клітинах

Подальші дослідження впливу пригнічення експресії Ruk/CIN85 на біологічні властивості клітин здійснювали за допомогою експериментального підходу, що його широко використовують для порівняльного аналізу міграційного потенціалу клітин — заростання подряпини у клітинному моно-

шарі. Інфікування клітин G4 лентівірусами, що містили Ruk/CIN85 shRNA (R22), але не scrambled shRNA, супроводжувалося зниженням експресії Ruk/CIN85 приблизно на 70% (рис. 4, А). Через 24 год ефективність заростання подряпини аналізували за допомогою фазово-контрастного мікроскопа.

За результатами, наведеними на рис. 4, рухливість контрольних клітин була приблизно на 40% нижчою порівняно з клітинами субклову G4. Виявлено, що пригнічення експресії Ruk/CIN85 призводило до подальшого посилення рухливості клітин G4 ще на 40% порівняно з контрольними клітинами (рис. 4, Б, В). Наші дані, отримані на клітинах слаботрансформованої лінії аденокарциноми грудної залози людини MCF-7 за умов надекспресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, відрізняються від результатів, одержаних з використанням високоінвазивних ліній раку грудної залози людини MDA-MB-231, MDA-MB-435s та Hs578T. У цих лініях siRNA-опосередковане пригнічення експресії ендogenous Ruk/CIN85 зумовлювало інгібування інвазивних властивостей клітин в Matrigel assay [12].

Відомо, що клітини, які зазнають злоякісної трансформації, характеризуються підвищеною резистентністю до лікарських препаратів. Важливим чинником, що визначає множинну резистентність до лікарських препаратів під час хіміотерапії онкологічних захворювань, є транспортер ABCG2 [8].

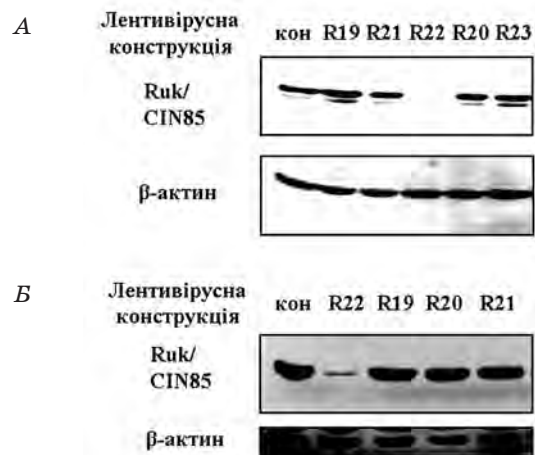


Рис. 3. Аналіз експресії Ruk/CIN85 у клітинах гліоми щура C6 (А) та в клітинах аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85 (сублінія G4) (Б) після оброблення лентівірусами pLKO.1puro R19-23:

клітини, інфіковані scrambled shRNA, використовували як контроль. Вміст протеїну визначали за допомогою вестерн-блот-аналізу

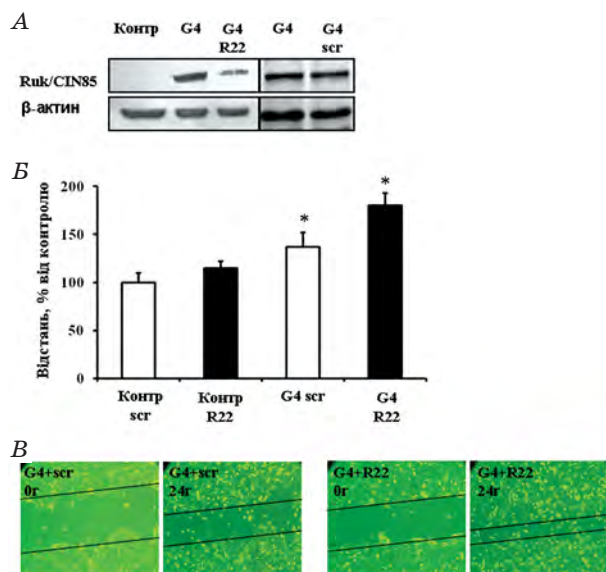


Рис. 4. Вестерн-блот-аналіз вмісту Ruk/CIN85 у клітинах лінії MCF-7 «дикого типу» (контроль), клітинах сублінії G4 і клітинах G4, інфікованих лентівірусами, що експресують Ruk/CIN85 shRNA R22 або scrambled shRNA (A). Субконфлюентні моношари клітин лінії MCF-7 «дикого типу» (контроль) або клітин сублінії G4 з високим рівнем стабільної надекспресії Ruk/CIN85 інфікували лентівірусами, що експресували Ruk/CIN85 shRNA R22 або scrambled shRNA (B).

Подано середні дані з чотирьох експериментів $\pm$ SEM. * Статистично значуща відмінність показників клітин сублінії G4 від контрольних за парного порівняння за t-критерієм Стьюдента і рівнем значущості $P \leq 0,05$.

Типові фотографії зон подряпини перед і після 24 год заростання: показано клітини сублінії G4, інфіковані лентівірусами, що експресують Ruk/CIN85 shRNA R22 або scrambled shRNA (B)

Для того, щоб дослідити зміни в рівні експресії цього транспортера в клітинах MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85, застосовували метод протокової цитофлуориметрії. Було виявлено, що близько 37% клітин сублінії G4 експресують ABCG2 порівняно з 13% контрольних клітин MCF-7 (рис. 5). Пригнічення експресії Ruk/CIN85 призвело до зниження експресії ABCG2 до рівнів, що суттєво не відрізнялись від значень у контрольних клітинах. Одержані дані свідчать про потенційну роль досліджуваного адаптерного протеїну в розвитку резистентності до протипухлинних препаратів.

Аби виявити, які ефекти спричинює пригнічення ендогенних рівнів експресії Ruk/CIN85, а також для оцінювання здатності одержаних лентівірусів інфікувати клітини різних типів, було використано клі-

тини мишачої карциноми легені Льюїса (LLC) та аденокарциноми ободової кишки людини HT-29. За допомогою МТ-тесту встановили, що через 24 год після висівання кількість клітин із пригніченою експресією Ruk/CIN85 була майже вдвічі вищою порівняно з контрольними клітинами, що свідчить про посилення проліферації клітин LLC за умов пригнічення експресії ендогенного протеїну Ruk/CIN85 (рис. 6). Ці результати загалом узгоджуються з даними щодо клітин лінії MCF-7, для яких показано повільнішу проліферацію за умов надекспресії Ruk/CIN85 [5].

Було виявлено, що повне пригнічення експресії Ruk/CIN85 призводило до зниження рівня утворення АФК в клітинах HT-29 приблизно на 72% від значень у контрольних клітинах (рис. 7). Наскільки нам відомо, роль Ruk/CIN85 у регулюванні продукції АФК раніше не було описано.

Оскільки зростання активності дихального ланцюга мітохондрій супроводжується підвищенням утворенням АФК, які є побічним продуктом цієї реакції, дані про те, що пригнічення експресії Ruk/CIN85 водночас призводить до посилення проліферації та зниження рівнів АФК, можуть видатися суперечливими. Проте слід мати на увазі, що важливим джерелом АФК у клітинах є протеїни плазматичної мембрани, зокрема НАДФН-оксидази [13]. Наші попередні дані вказують на те, що Ruk/CIN85 може брати участь у регулюванні НАДФН-оксидазної активності, проте підтвердження цієї гіпотези потребує подальших досліджень.

Таким чином, було одержано лентівірусну конструкцію R22, що пригнічує експресію Ruk/CIN85 у клітинах C6, HT-29, LLC, а також в сублінії клітин MCF-7 з надекспресією цього протеїну (G4). Результати експресії транспортера ABCG2 в клітинах аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7 свідчать про послаблення однієї з ознак, характерних для злоякісної трансформації, за зниження рівня Ruk/CIN85. Дещо несподіваними виявилися результати стосовно вищої рухливості клітин G4 зі зниженим вмістом Ruk/CIN85 порівняно з контрольними клітинами. Це можна пояснити тим, що рівень експресії Ruk/CIN85 у клітинах G4, інфікованих специфічним лентівірусом, ще залишався достатньо високим порівняно з контрольними клітинами лінії MCF-7. На сьогодні добре відомо, що адаптерні/риштувальні протеїни регулюють інтенсивність вихідного сигналу у концентраційно-залежний спосіб. Це означає, що

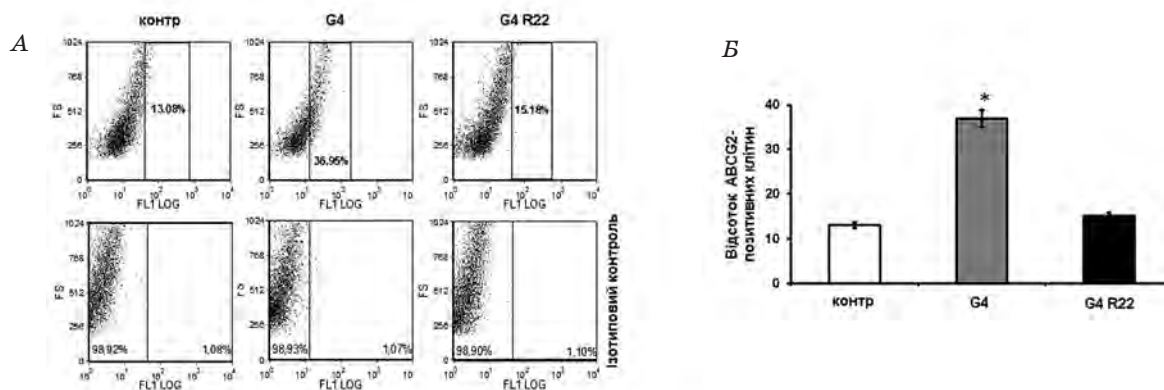


Рис. 5. FACS (fluorescence-activated cell sorting)-аналіз експресії мембранного транспортера ABCG2 у контрольних клітинах лінії MCF-7, клітинах сублінії G4 та клітинах G4 з пригніченою експресією Ruk/CIN85: А — точкова (dotplot) гістограма експресії ABCG2; Б — частка (у відсотках) ABCG2-позитивних клітин від загальної кількості досліджуваних клітин.

* Тут і далі — статистично значуща відмінність показників клітин сублінії G4 від контрольних за парного порівняння за t-критерієм Стьюдента і рівнем значущості $P \leq 0,05$

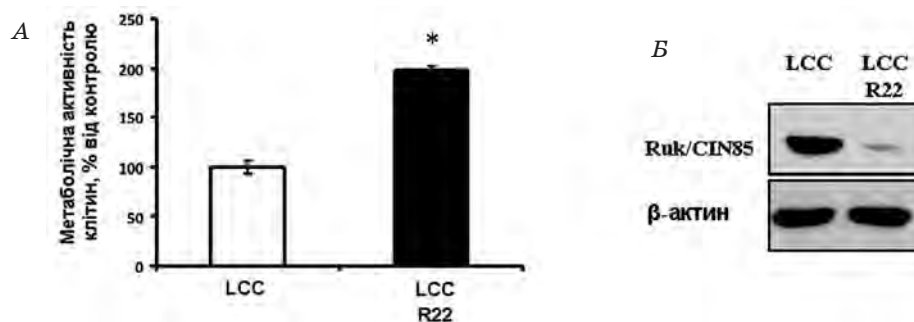


Рис. 6. Аналіз проліферативної активності контрольних клітин LLC та клітин LLC зі зниженою експресією Ruk/CIN85 за метаболічною активністю, визначеною з використанням МТТ:

А — метаболічну активність клітин з пригніченою експресією Ruk/CIN85 подавали у відсотках відносно активності контрольних клітин, яку було прийнято за 100%. Наведено середні дані з трьох експериментів $\pm$ SEM;

Б — вестерн-блот-аналіз експресії Ruk/CIN85 у контрольних клітинах LLC та клітинах, інфікованих лентівірусами, що експресують Ruk/CIN85 shRNA R22

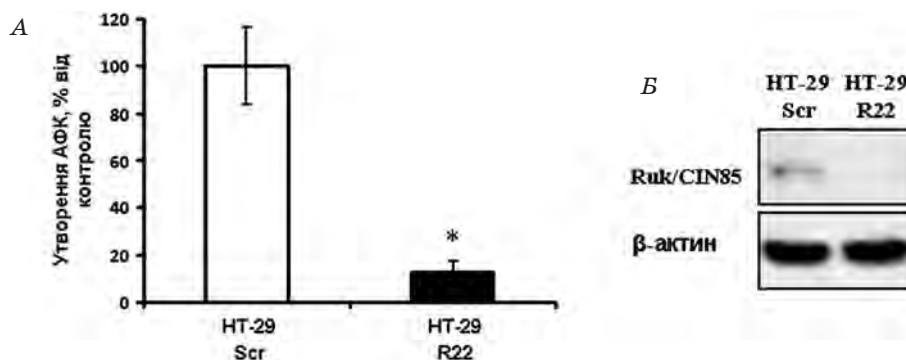


Рис. 7. Аналіз утворення АФК у контрольних клітинах HT-29 та клітинах зі зниженою експресією Ruk/CIN85 методом хемілюмінесценції з використанням люмінолу та пероксидази:

А — утворення АФК в клітинах з пригніченою експресією Ruk/CIN85 виражали у відсотках відносно активності контрольних клітин, яку було прийнято за 100%. Наведено середні дані з трьох експериментів $\pm$ SEM. Б — вестерн-блот-аналіз експресії Ruk/CIN85 у контрольних клітинах HT-29 та в клітинах, інфікованих лентівірусами, що експресують Ruk/CIN85 shRNA R22

надекспресія Ruk/CIN85 вище стехіометричного оптимуму може призводити до домінантно-негативного ефекту [14, 15]. Можна припустити, що «оптимальна» концентрація Ruk/CIN85, за якої рухливість клітин є максимальною, перевищує рівень контрольних клітин MCF-7, але нижча за рівень у клітинах G4.

Отже, результати вивчення проліферативної активності клітин мишачої карциноми легень LLC та утворення АФК клітинами аденокарциноми ободової кишки людини HT-29 свідчать про те, що зниження ендо-

генних рівнів Ruk/CIN85 змінює біологічні властивості зазначених типів клітин. Для того, щоб краще зрозуміти роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у регулюванні біологічних відповідей пухлинних клітин, необхідні подальші дослідження.

Роботу здійснено за фінансової підтримки цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій», а також спільного українсько-російського гранту між НАН України та РФФД 2012 р.

ЛІТЕРАТУРА

1. Flynn D. C. Adaptor proteins // *Oncogene*. — 2001. — V. 20, N 44. — P. 6270–6272.
2. Dikic I. CIN85/CMS family of adaptor molecules // *FEBS Lett.* — 2002. — V. 529, N 1. — 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. — V. 19, N 15. — P. 4015–4025.
4. Havrylov S., Redowicz M. J., Buchman V. L. Emerging roles of Ruk/CIN85 in vesicle-mediated transport, adhesion, migration and malignancy // *Traffic*. — 2010. — V. 11, N 6. — P. 721–731.
5. Samoylenko A., Vynnytska-Myronovska B., Byts N. et al. Increased levels of the HER1 adaptor protein Ruk₁/CIN85 contribute to breast cancer malignancy // *Carcinogenesis*. — 2012. — V. 33, N 10. — P. 1976–1984.
6. Sliva K., Schnierle B. S. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA // *Virol. J.* — 2010. — V. 7. — P. 248.
7. Stewart S. A., Dykxhoorn D. M., Palliser D. et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells // *RNA*. — 2003. — V. 9, N 4. — P. 493–501.
8. Mo W., Zhang J. T. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance // *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* — 2012. — V. 3, N 1. — P. 1–27.
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. — V. 28, N 4. — P. 275–281.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Meth.* — 1983. — V. 65, N 1–2. — P. 55–63.
11. Gianni D., Bohl B., Courtneidge S. A. et al. The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase-1 // *Mol. Biol. Cell.* — 2008. — V. 19, N 7. — P. 2984–2994.
12. Nam J. M., Onodera Y., Mazaki Y. et al. CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery // *Embo J.* — 2007. — V. 26, N 3. — P. 647–656.
13. Petry A., Weitnauer M., Görlach A. Receptor activation of NADPH oxidases // *Antioxid Redox Signal.* — 2010. — V. 13, N 4. — P. 467–487.
14. Ferrell J. E. J. What do scaffold proteins really do? // *Sci. STKE*. — 2000. — V. 52. — P. e1.
15. Razidlo G. L., Kortum R. L., Haferbier J. L., Lewis R. E. Phosphorylation regulates KSR1 stability, ERK activation, and cell proliferation // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, N 46. — P. 47808–47814.

ОТВЕТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕИНА RUK/CIN85 РЕКОМБИНАНТНЫМИ ЛЕНТИВИРУСАМИ

А. А. Самойленко¹
Н. В. Быць¹
А. В. Пасичник¹
Н. В. Козлова¹
А. В. Базалий¹
Д. С. Геращенко¹
С. Г. Шандренко¹
А. В. Воротников²
Т. Китцманн³
С. В. Комисаренко¹
Л. Б. Дробот¹

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев, Украина

²Факультет фундаментальной медицины,
МГУ им. М. В. Ломоносова,
Москва, Россия

³Отделение биохимии и Биоцентр Оулу,
Университет Оулу, Оулу, Финляндия

Ruk/CIN85 является одним из адаптерных протеинов, играющих важную роль в регулировании процессов пролиферации, подвижности и гибели клетки. Недавно нами было показано, что сверхэкспрессия Ruk/CIN85 усиливает онкогенный потенциал клеток аденокарциномы грудной железы человека линии MCF-7. Цель данного исследования — установить, влияет ли на свойства клеток подавление экспрессии Ruk/CIN85. Для Ruk/CIN85 РНК-интерференции были получены лентивирусные конструкции, содержащие Ruk/CIN85-специфические последовательности small hairpin RNA. С помощью полученных рекомбинантных лентивирусов установлено, что подавление экспрессии Ruk/CIN85 влияет на биологические свойства (подвижность, пролиферацию, уровень экспрессии транспортера ABCG2, образование активных форм кислорода) опухолевых клеток разных типов, а именно: аденокарциномы грудной железы человека линии MCF-7, аденокарциномы ободочной кишки человека HT-29 и мышинной карциномы легких Льюиса.

Ключевые слова: адаптерные протеины, Ruk/CIN85, РНК-интерференция, лентивирусные векторы, подвижность клеток, активные формы кислорода.

RECOMBINANT LENTIVIRUS-MEDIATED SILENCING OF ADAPTOR PROTEIN RUK/CIN85 EXPRESSION INFLUENCES BIOLOGICAL RESPONSES OF TUMOR CELLS

A. A. Samoylenko¹
N. V. Byts¹
G. V. Pasichnyk¹
N. V. Kozlova¹
A. V. Bazalii¹
D. S. Gerashchenko¹
S. G. Shandrenko¹
A. V. Vorotnikov²
T. Kietzmann³
S. V. Komisarenko¹
L. B. Drobot¹

¹Palladian Institute of Biochemistry
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

²Faculty of Fundamental Medicine,
Lomonosov Moscow State University,
Moscow, Russia

³Department of Biochemistry and Biocenter Oulu,
University of Oulu, Oulu, Finland

Ruk/CIN85 is an adaptor protein that plays important roles in the regulation of cellular processes such as cell death, proliferation and motility. It was recently shown that overexpression of Ruk/CIN85 increases the oncogenic potential of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. It was the aim of the present study to investigate whether inhibition of Ruk/CIN85 expression has an effect on the biological properties of the cells. In order to down-regulate Ruk/CIN85 expression of small interfering RNA-based approach was used. For down-regulation of Ruk/CIN85 lentiviral constructs encoding Ruk/CIN85-specific small hairpin RNA sequences were generated. By using the obtained recombinant lentiviruses it was shown that inhibition of Ruk/CIN85 expression influences biological properties (motility, proliferation, ABCG2 expression, and ROS generation) of various tumour cell types such as human breast adenocarcinoma MCF-7, human colorectal adenocarcinoma HT-29, and Lewis mouse lung carcinoma cells.

Key words: adapter proteins, Ruk/CIN85, RNA-interference, lentiviral vectors, cell motility, active oxygen forms.