ДОПОВІДІ
НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ

12 • 2013

БІОХІМІЯ

УДК 577.29:57.085.23

Г. В. Пасічник, О. О. Поворознюк, І. Р. Горак, Д. С. Геращенко, О. В. Пономаренко, А. А. Самойленко, Н. В. Биць, Л. Б. Дробот

Надекспресія адаптерного протеїну Ruk_l/CIN85 в аденокарциномних клітинах молочної залози людини лінії MCF-7 супроводжується підвищенням їх хіміорезистентності

(Представлено академіком НАН України С. В. Комісаренком)

Проведено аналіз чутливості клітин MCF-7 з надекспресією адаптерного протеїну Ruk_l/CIN85 до дії окремих протипухлинних препаратів, а також досліджено стан активності ланок регуляторних систем, потенційно залучених до розвитку хіміорезистентності. Встановлено, що надекспресія Ruk_l/CIN85 супроводжується підвищенням стійкості досліджуваних клітин до дії цисплатину та етопозиду, зростанням активності альдегіддегідрогенази та АТФ-зв'язувальних касетних транспортерів.

На сьогодні досягнуто вагомих успіхів у лікуванні онкологічних захворювань. Крім таких стандартних підходів, як хірургічне втручання, опромінення та хіміотерапія, використовується персоніфіковане лікування, скероване на специфічні ланки регуляторних систем пухлинних клітин, що зазнали змін у неоплазіях онкологічних хворих. Незважаючи на значні досягнення в терапії раку, хіміотерапія залишається важливим компонентом лікування. Водночас розвиток стійкості до хіміотерапевтичних препаратів значно знижує ефективність лікування онкологічних захворювань [1, 2]. Зокрема, хіміорезистентність є причиною неефективності терапії в більш ніж 90% пацієнтів з метастатичним раком [3]. У зв'язку зі сказаним з'ясування механізмів, залучених до розвитку хіміорезистентності, є важливим для розробки нових терапевтичних підходів у лікуванні раку.

Розвиток множинної стійкості до лікарських препаратів пов'язаний із блокуванням апоптозу, змінами в регуляції клітинного циклу, активацією систем детоксикації (наприклад, ензиму альдегіддегідрогенази) та АТФ-зв'язувальних касетних (ABC) транспортерів [4, 5]. Для глибшого розуміння тонких механізмів формування хіміорезистентності важливим є дослідження ролі в цьому процесі окремих компонентів сигнальних мереж клітин, зокрема адаптерних протеїнів. Протеїни CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa) (у людини) та

© Г. В. Пасічник, О. О. Поворознюк, І. Р. Горак, Д. С. Геращенко, О. В. Пономаренко, А. А. Самойленко, Н. В. Биць, Л. Б. Дробот, 2013

Ruk (regulator of ubiquitous kinase) (у гризунів), відомі також як SETA та CD2BP3 (далі Ruk/CIN85), належать до групи мультифункціональних адаптерних/риштувальних протеїнів. Ruk_l/CIN85 характеризується модульною організацією і складається з трьох SH3 доменів, пролін-багатого району та С-кінцевої суперспіралізованої ділянки [6]. За рахунок зв'язування з численними протеїнами-партнерами досліджуваний адаптер залучений до регуляції мембранного транспорту [6, 7], апоптозу [8, 9], перебудов актинового цитоскелета, клітинної адгезії та інвазії [10]. Все більше з'являється даних, що свідчать про потенційну роль Ruk_l/CIN85 у процесах злоякісної трансформації клітин [10]. Зокрема, результати наших попередніх досліджень виявили підвищення експресії адаптерного протеїну Ruk_l/CIN85 в аденокарциномах молочної залози людини, особливо в зонах інвазивного росту. Встановлено, що сублінії слабко інвазивних аденокарциномних клітин молочної залози людини лінії MCF-7 зі стабільною надекспресією адаптерного протеїну Ruk_l/CIN85 набувають фібробластоподібної морфології, характеризуються зниженням інтенсивності росту та адгезивності, підвищеними виживанням, колонієутворювальною здатністю та рухливістю.

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що Ruk_l/CIN85 залучений до посилення трансформувального потенціалу клітин MCF-7 [11]. Наша мета — проаналізувати чутливість клітин MCF-7 з надекспресією Ruk_l/CIN85 до дії окремих протипухлинних препаратів, а також дослідити стан активності ланок регуляторних систем, потенційно залучених до розвитку хіміорезистентності.

Матеріали та методи. Клітини аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 вирощували в середовищі DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium; Gibco, Invitrogen, США), що містило додатково 2 мМ глутамін, 10% ембріональну сироватку телят (ECT, HyClone, Thermo Scientific, США), пеніцилін (50 од/мл; HyClone, Thermo Scientific, США) та стрептоміцин (50 мкг/мл; HyClone, Thermo Scientific, США), при 37 °С в інкубаторі з 5% CO_2 у зволоженій атмосфері. У дослідженні була використана сублінія MCF-7 з надекспресією Ruk_l/CIN85, отримана і частково охарактеризована раніше (сублінія G9) [11]. Ці клітини культивували у присутності селективного антибіотика G418 (0,5 мг/мл; "Sigma", США). Рівень експресії Ruk_l/CIN85 контролювали вестерн-блот аналізом. Отримання лізатів клітин, визначення концентрації протеїну та вестерн-блот аналіз здійснювали як описано раніше [11]. Детекцію протеїнів на блотах проводили з використанням перших моноклональних анти-Ruk/CIN85 (1 : 1000) [12] та анти-β-actin (1 : 5000) ("Sigma") антитіл. Імунореактивні смуги детектували за допомогою системи для підсиленої хемілюмінесценції (ECL Western Blotting System, "Amersham", Велика Британія).

Чутливість клітин до цисплатину та етопозиду оцінювали за їх впливом на проліферацію з використанням MTT тесту як описано в роботі [13]. Екстинкцію вимірювали на цифровому спектрофотометрі μ Quant (BioTEK, США) при $\lambda = 570$ нм. Метаболічну активність клітин виражали у відсотках відносно контролю. IC_{50} визначали як концентрацію протипухлинного препарату, що викликала зниження рівня проліферативної активності клітин вдвічі порівняно з такою за його відсутності. Для обчислення IC_{50}, статистичного аналізу і побудови графіків використовували програмне забезпечення Graphpad prism (версія 5.00).

Активність альдегіддегідрогенази визначали за допомогою PicoProbe™ Aldehyde Dehydrogenase Activity Fluorometric Assay Kit (BioVision). Клітини ($1 \cdot 10^6$) лізували в 200 мкл ALDH Assay буферу протягом 10 хв на льодяній бані з подальшим центрифугуванням при 12 000 об/хв протягом 5 хв. Потім 50 мкл реакційної суміші, яка містила ALDH Assay буфер, PicoProbe™, Substrate Mix і ацетальдегід, додавали до кожної з лунок з NADH стан-

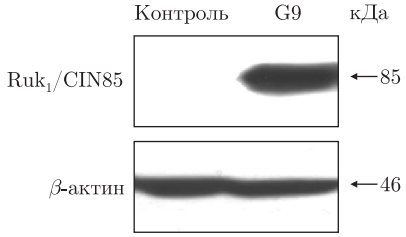

Рис. 1. Вестерн-блот аналіз вмісту Ruk$_1$/CIN85 у контрольних клітинах MCF-7 та клітинах сублінії G9. Вміст β-актину визначали для підтвердження однакової кількості протеїну в пробах

дартами, досліджуваними зразками та контролями фону. Після інкубації протягом 10 хв флуоресценцію вимірювали на планшетному рідері FL800 (BioTEK, США) при 535ex/587em нм і обчислювали активність альдегіддегідрогенази за інструкцією до набору.

Накопиченя і виключення родаміну 123 вимірювали як описано раніше [14] з деякими модифікаціями. Спочатку клітини трипсинізували і двічі промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), що містив 2% ЕСТ. $1{\cdot}10^6$клітин суспендували в 100 мкл ЗФР/2% ЕСТ і інкубували з 500 нг/мл родаміну 123 протягом 1 год при 37 °С. Потім клітини промивали двічі ЗФР/2% ЕСТ, ресуспендували в середовищі, що не містило родамін 123, та інкубували протягом 1, 2 та 3 год при 37 °С. Вміст внутрішньоклітинного родаміну 123 визначали за допомогою протокового цитофлуориметра COULTER EPICS XL™ (Beckman Coulter) при 488ex/525em нм.

Усі експерименти проводили у трьох паралелях, як мінімум, тричі. Статистичний аналіз здійснювали за допомогою Microsoft Excel. Визначали парний критерій Стьюдента. Різницю вважали достовірною при значенні $P \leqslant 0{,}05$.

Результати та їх обговорення. Для з'ясування залежності між чутливістю клітин до дії окремих хіміотерапевтичних препаратів і рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk$_1$/CIN85 було використано клітини MCF-7 зі стабільною надекспресією Ruk$_1$/CIN85 (сублінія G9), отримані та охарактеризовані раніше [11]. Як видно з рис. 1, клітини сублінії G9 характеризуються високим рівнем надекспресії Ruk$_1$/CIN85.

Чутливість контрольних клітин MCF-7 та клітин сублінії G9 досліджували до дії таких препаратів, як цисплатин та етопозид. Цисплатин використовували в концентраціях від 0,01 до 100 мкМ, а етопозид — від 0,1 до 500 мкМ. Клітини інкубували з протипухлинними препаратами протягом 3 діб. Аналіз метаболічної активності оброблених клітин показав, що сублінія G9 зі значним рівнем надекспресії Ruk$_1$/CIN85 стійкіша до дії досліджуваних хіміотерапевтичних агентів порівняно з контрольними клітинами (рис. 2). Значення IC_{50} для цисплатину становили $7{,}79 \pm 2{,}4$ мкМ для контрольних клітин і $25{,}6 \pm 9{,}6$ мкМ для клітин G9 (див. рис. 2, *а*), для етопозиду — $26{,}6 \pm 4{,}0$ і $53{,}9 \pm 4{,}2$ мкМ відповідно (див. рис. 2, *б*). За результатами проведених досліджень величина IC_{50} виявилась у 3,3 раза більшою для клітин з надекспресією Ruk$_1$/CIN85, оброблених цисплатином, і в 2 рази більшою для цих же клітин, оброблених етопозидом, порівняно з контрольними клітинами. Слід зазначити, що при низьких концентраціях досліджуваних хіміотерапевтичних препаратів спостерігалася значна відмінність у життєздатності клітин G9, оброблених цисплатином, порівняно з контрольними клітинами і дещо менша для клітин G9, оброблених етопозидом. Після досягнення концентрації препаратів, що відповідали IC_{50}, відмінності у життєздатності досліджуваних клітин ставали менш вираженими. Таким чином, надекспресія Ruk$_1$/CIN85 супроводжується збільшенням стійкості клітин MCF-7 до дії цисплатину та етопозиду.

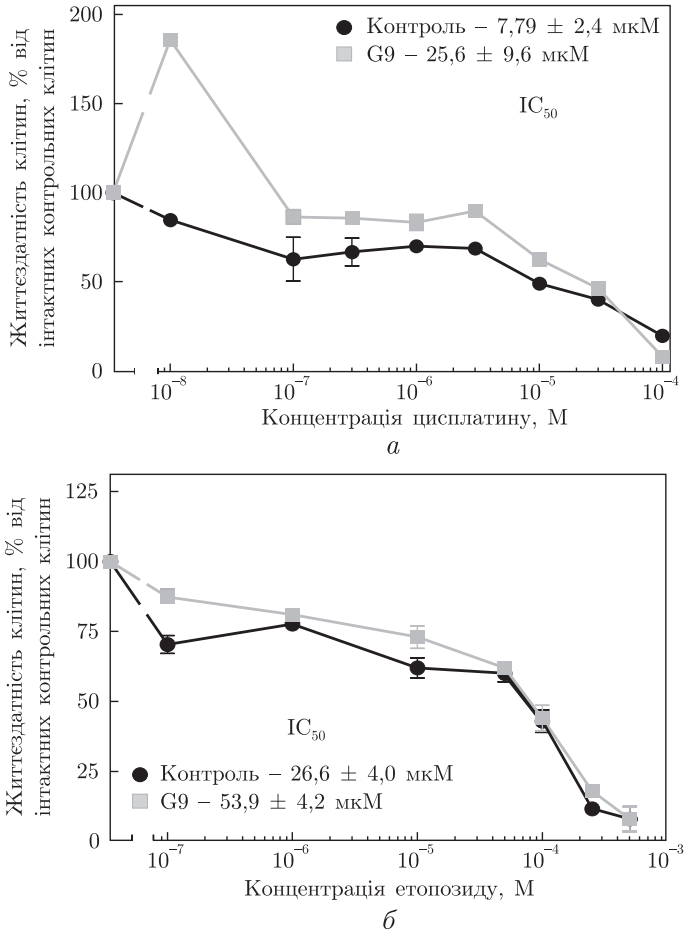

Рис. 2. Життєздатність клітин MCF-7, оброблених цисплатином (*а*) та етопозидом (*б*). Наведено середні дані з п'яти експериментів ±SEM

Для з'ясування можливих механізмів, залучених до підвищення хіміорезистентності клітин, що надекспресують Ruk_l/CIN85, оцінювали активність ензиму системи детоксикації альдегіддегідрогенази та активність АТФ-зв'язувальних касетних (ABC) транспортерів. Активність альдегіддегідрогенази досліджували з використанням комерційного набору PicoProbe™ Aldehyde Dehydrogenase Activity Fluorometric Assay (BioVision). Встановлено, що активність даного ензиму на 36% вища у клітинах сублінії G9 порівняно з контрольними клітинами (рис. 3).

Активність ABC транспортерів оцінюють за ефективністю виключення вітальних барвників (Hoechst 33 342, родамін 123) з оброблених клітин [15]. Здатність клітин з надекспресією Ruk_l/CIN85 акумулювати та виключати родамін 123 досліджували протоковою цитофлуорометрією. Поглинання родаміну 123 характеризувалося зменшенням його накопичення клітинами сублінії G9 порівняно з контрольними клітинами. Виключення родаміну 123 оцінювали за кількістю родамін 123-негативних клітин. Викид даного барвника вивчали в динаміці: після 1, 2 та 3 год інкубації в середовищі, що не містило родамін 123. Як видно з рис. 4, *а*, у досліджуваних клітинах детектуються дві популяції клітин — з високим та низьким вмістом родаміну 123. Нас цікавила популяція клітин з низьким рівнем ро-

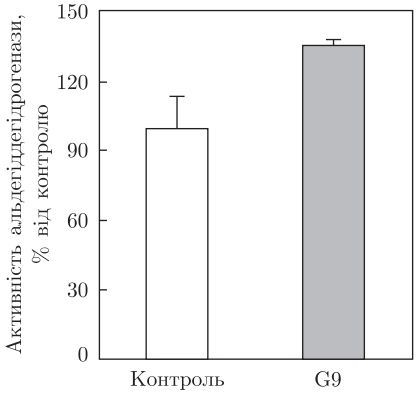

Рис. 3. Активність альдегіддегідрогенази в контрольних клітинах MCF-7 та клітинах сублінії G9. Наведено середні дані з трьох експериментів ±SEM

даміну 123. Показано, що розмір цієї популяції зростає зі збільшенням часу інкубації як для контрольних клітин, так і клітин, що надекспресують Ruk_l/CIN85 (рис. 4, *б*). Водночас кількість родамін 123-негативних клітин у кожній часовій точці була вищою для клітин G9 порівняно з контрольними. Різниця в кількості родамін 123-негативних клітин між досліджуваною сублінією та контрольними клітинами MCF-7 виявилась достовірною на 3-тю год інкубації. За результатами проведених досліджень можна зробити висновок, що надекспресія Ruk_l/CIN85 супроводжується збільшенням активності ABC транспортерів.

Таким чином, підвищення стійкості клітин MCF-7 з надекспресією Ruk_l/CIN85 до дії цисплатину та етопозиду порівняно з контрольними клітинами може бути пов'язане, принаймні частково, з активацією альдегіддегідрогенази та ABC транспортерів, які відіграють важливу роль у розвитку хіміорезистентності. Відомо також, що важлива роль у формуванні стійкості до хіміотерапії належить клітинам, що знаходяться в стані проліферативного спокою [4]. Цікаво, що, як було показано раніше, клітини з надекспресією Ruk_l/CIN85 характеризуються зниженням інтенсивності росту [11]. Це може свідчити про те, що частина популяції таких клітин перебуває в стані проліферативного спокою, і, як наслідок, здійснює внесок у зниження чутливості клітин сублінії G9 до дії досліджуваних хіміотерапевтичних препаратів. Крім того, у розвитку хіміорезистентності важливою є активація окремих сигнальних шляхів. Зокрема, PI3K/Akt/mTOR сигнальний шлях залучений до регуляції таких клітинних відповідей, як клітинний ріст, метаболізм, рухливість та виживаність. Відомо, що активація Akt-залежного сигнального шляху забезпечує зниження чутливості клітин до дії протипухлинних препаратів за рахунок інгібування апоптозу. Наприклад, у клітинах дрібноклітинного раку легені людини пригнічення mTOR супроводжується збільшенням їх чутливості до етопозиду [4]. Раніше було виявлено конститутивну активацію Akt кінази в клітинах, що надекспресують Ruk_l/CIN85 [11], що узгоджується з отриманими нами даними стосовно підвищення хіміорезистентності до дії цисплатину та етопозиду клітин сублінії G9.

Результати проведених досліджень свідчать про те, що клітини MCF-7 з надекспресією адаптерного протеїну Ruk_l/CIN85 є стійкіші до дії цисплатину та етопозиду порівняно з контрольними клітинами, що може бути зумовлене вищою активністю ензиму детоксикації — альдегіддегідрогенази та АТФ-зв'язувальних касетних транспортерів у цих клітинах від-

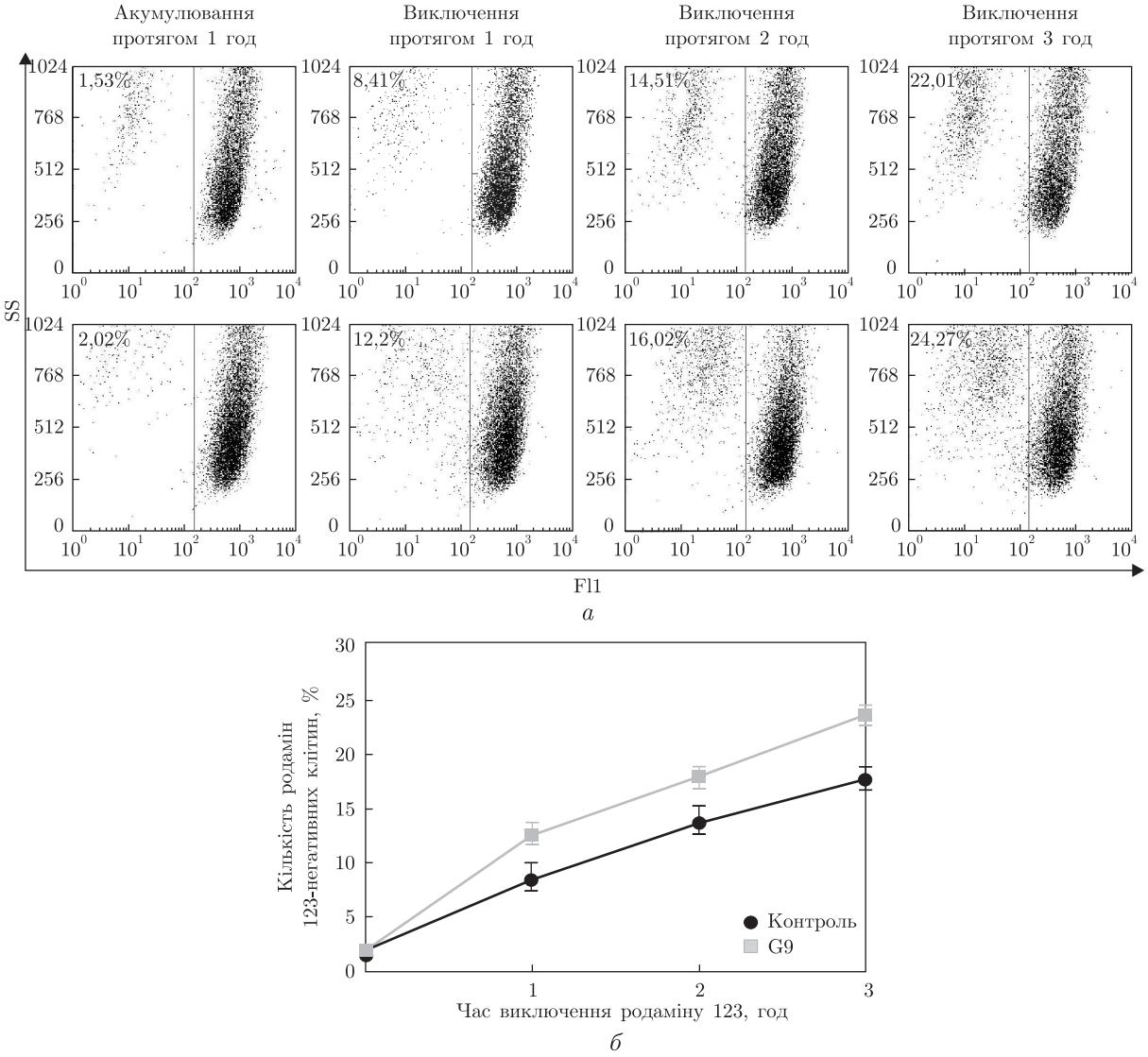

Рис. 4. Ефективність виключення родаміну 123 клітинами MCF-7 та клітинами сублінії G9: *а* — FACS (Fluorescence-activated cell sorting) аналіз вмісту родаміну 123 у клітинах; *б* — динаміка виключення родаміну 123 протягом 3 год. Наведено середні дані з чотирьох експериментів ±SEM; * статистично значуща відмінність показників клітин сублінії G9 від контрольних при парному порівнянні за t-критерієм Стьюдента при $P \leqslant 0{,}05$

носно контрольних. Таким чином, можна припустити, що за умов надекспресії Ruk_1/CIN85 потенційно залучений до розвитку хіміорезистентності клітин аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7.

Дослідження було здійснене за фінансової підтримки цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України "Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій".

1. *Abdullah L. N., Chow E. K.* Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells // Clin. and Transl. Med. – 2013. – **2**. – P. 1–9.

2. *Redmond K. M., Wilson T. R., Johnston P. G., Longley D. B.* Resistance mechanisms to cancer chemotherapy // Front. in Biosc. – 2008. – **2**. – P. 5138–5154.
3. *Longley D. B., Johnston P. G.* Molecular mechanisms of drug resistance // J. Pathol. – 2005. – **205**. – P. 275–292.
4. *Alison M., Lin W., Lim S., Nicholson L.* Cancer stem cells: In the line of fire // Cancer Treat. Rev. – 2012. – **38**. – P. 589–598.
5. *Gottesman M.* Mechanisms of cancer drug resistance // Annu. Rev. Med. – 2002. – **53**. – P. 615–627.
6. *Dikic I.* CIN85/CMS family of adaptor molecules // FEBS Lett. – 2002. – **529**. – P. 110–115.
7. *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.
8. *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.
9. *Narita T., Nishimura T., Yoshizak K., Taniyama T.* CIN85 associates with TNF receptor 1 via Src and modulates TNF-alpha-induced apoptosis // Exp. Cell Res. – 2005. – **304**. – P. 256–264.
10. *Havrylov S., Redowicz M., Buchman V.* Emerging roles of Ruk/CIN85 in vesicle-mediated transport, adhesion, migration and malignancy // Traffic. – 2010. – **11**. – P. 721–731.
11. *Samoylenko A., Vynnytska-Myronovska B., Byts N. et al.* Increased levels of the HER1 adaptor protein Rukl/CIN85 contribute to breast cancer malignancy // Carcinogenesis. – 2012. – **33**. – P. 1976–1984.
12. *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.
13. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Meth. – 1983. – **65**. – P. 55–63.
14. *Vesuna F., Lisok A., Kimble B., Raman V.* Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression // Neoplasia. – 2009. – **11**. – P. 1318–1328.
15. *Lizard G., Roignot P., Maynadie M. et al.* Flow cytometry evaluation of the multidrug-resistant phenotype with functional tests involving uptake of daunorubicin, Hoechst 33342, or Rhodamine 123: a comparative study // Cancer Detect. Prev. – 1995. – **19**. – P. 527–534.

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

Надійшло до редакції 21.06.2013

А. В. Пасечник, О. А. Поворознюк, И. Р. Горак, Д. С. Геращенко, О. В. Пономаренко, А. А. Самойленко, Н. В. Биць, Л. Б. Дробот

Сверхэкспрессия адаптерного протеина Ruk_l/CIN85 в аденокарциномных клетках молочной железы человека линии MCF-7 сопровождается повышением их химиорезистентности

Проведен анализ чувствительности клеток MCF-7 со сверхэкспрессией адаптерного протеина Ruk_l/CIN85 к действию отдельных противоопухолевых препаратов, а также исследовано состояние активности звеньев регуляторных систем, потенциально вовлеченных в развитие химиорезистентности. Установлено, что сверхэкспрессия Ruk_l/CIN85 сопровождается повышением стойкости исследуемых клеток к действию цисплатина и этопозида, увеличением активности альдегиддегидрогеназы и АТФ-связывающих кассетных транспортеров.

G. V. Pasichnyk, O. O. Povorozniuk, I. R. Gorak, D. S. Gerashchenko, O. V. Ponomarenko, A. A. Samoylenko, N. V. Byts, L. B. Drobot

Overexpression of adaptor protein Ruk_I/CIN85 in human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 is accompanied by increased chemoresistance

The analysis of the sensitivity of MCF-7 cells with adaptor protein Ruk_I/CIN85 overexpression to certain antitumor drugs is performed, and the activity of components of regulatory systems potentially involved in the development of chemoresistance is investigated. It is found that Ruk_I/CIN85 overexpression was accompanied by an increased resistance of studied cells to the action of cisplatin and etoposide, as well as by an enhancement of the activity of aldehyde dehydrogenase and ATP-binding cassette transporters.