ВІСНИК
УКРАЇНСЬКОГО ТОВАРИСТВА
ГЕНЕТИКІВ І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ

УДК 577.22

ВЗАЄМОДІЯ ВЕРПРОЛІНА WIRE З РОДИНОЮ АДАПТЕРНИХ БІЛКІВ ІНТЕРСЕКТИНІВ

С. В. КРОПИВКО, А. В. РИНДИЧ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: s.v.kropyvko@imbg.org.ua

Мета. *WIRE — скафолдний білок, який регулює перебудови актинового цитоскелету та утворення актин-збагачених мембранних виростів, відповідальних за інвазію та міграцію. ITSN1 та ITSN2 — представники родини інтерсектинів, які приймають участь як в реорганізації актинового цитоскелету, так і в інших процесах, таких як ендо-/ензоцитоз, передача клітинного сигналу та інших. Оскільки ці білки приймають участь в однакових процесах, ми перевірили їх взаємодію між собою.* ***Методи.*** *Білок-білкові взаємодії ідентифікували за допомогою методу GST Pull-down.* ***Результати.*** *Ми дослідили, що SH3-домени ITSN1 та ITSN2 взаємодіють з WIRE, та виявили що WIRE при цьому знаходиться в комплексі з ендогенним актином.* ***Висновки.*** *ITSN1 та ITSN2 взаємодіють з WIRE, який знаходиться в комплексі з ендогенним актином.*

Ключові слова: *WIRE, ITSN1 та ITSN2, актин.*

Вступ. Реорганізація актинового цитоскелету необхідна для нормального функціонування клітини, а його дерегуляція призводить до різних патологій. Регульоване збирання та розбирання актинових філаментів є важливим для багатьох клітинних процесів, таких як внутрішньоклітинний везикулярний транспорт, ендоцитоз, патогенні інфекції, міграція та інвазія клітин (Dominguez and Holmes, 2011). Ключовими регуляторами цього процесу є різні білки, зокрема такі, як WASP, його повсюдно виражений варіант N-WASP, Arp2/3 комплекс, верпроліни WIP, CR16 та WIRE та інші.

Родина скафолдних білків верпролінів, яка включає в себе WIP, CR16 та WIRE, залучені в реорганізацію актинового цитоскелету через Cdc42/N-WASP/Arp2/3 сигнальний шлях. Всі вони мають подібну доменну організацію: два WH2 (WASP Homology 2) домена на N-кінці, які опосередковують взаємодію з актином, і багата пролінами послідовність (PRM), яка взаємодіє з SH3-доменами білків-партнерів верпролінів. Окремо в PRM виділяють домен зв'язування для WASP та N-WASP (WBD), який знаходиться на C-кінці, оскільки ці білки вважаються основними партнерами для представників цієї родини. WIP і WIRE експресуються повсюдно, а експресія CR16 переважно відбувається в мозку і яєчках (Aspenström, 2002; Ho et al., 2001; Kato et al., 2002; Sasahara et al., 2002; Weiler et al., 1996).

WIRE є одним з малодосліджених представників верпролінів. Через взаємодію з N-WASP він веде перехресне зв'язування філаментів актину та бере участь у ендоцитозі тромбоцитарного рецептора фактора росту бета (PDGFβ) в ендотеліальних клітинах аорти свиней (Kato and Takenawa, 2005; Aspenstrom, 2004).

Як WIP, так і WIRE функціонують разом з N-WASP в інвадоподіях — актин збагачених виростах мембрани з позаклітинною активністю деградації матриксу, які присутні в ракових інвазивних клітинах. Було продемонстровано, що взаємодія WIP з N-WASP є суттєвою для збирання інвадоподій, тоді як WIRE регулює активацію N-WASP у їх дозріванні (Yamaguchi et al., 2005; García et al., 2016).

© С. В. КРОПИВКО, А. В. РИНДИЧ, 2019

У комплексі з мембранодеформуючим адаптером IRSp53 WIRE індукує утворення філоподій в клітинах миші (Misra 2010).

Інша родина білків, що бере участь в N-WASP-залежній полімеризації актину, в яку залучений Arp2/3-комплекс, є родина інтерсектинів (ITSN). Вона включає ITSN1 і ITSN2, обидва з яких широко експресуються в тканинах ссавців і мають дві основні ізоформи, коротку та довгу, що утворюються в результаті альтернативного сплайсингу. Коротка форма ITSN-S містить два EH (Eps15 homology) домена, надспіралізований домен (CCR) і п'ять SH3 (Src homology 3) доменів. Довга форма ITSN-L додатково включає DH (Dbl homology l), PH (plekstrin homology) і C2 домени на С-кінці (Sengar et al., 1999; Pucharcos et al., 2001). Інтерсектини слугують молекулярними каркасами для білок-білкових взаємодій під час процесів в яких вони задіяні, таких як клатрин-опосередкований ендоцитоз і перебудови актинового цитоскелету (Tsyba et al., 2011; O'Bryan, 2010). Крім того, ITSN-L функціонує як фактор обміну гуанін-нуклеотидів для малої ГТФази Cdc42, яка відіграє істотну роль в перебудовах актинового цитоскелету. Інтерсектини взаємодіють з N-WASP, ефектором Cdc42, активація якого призводить до збирання актину через Arp2/3 комплекс (Hussain et al., 2001; McGavin et al., 2001; Rossman et al., 2005; Klein et al., 2009). ITSN1 або ITSN2 також утворюють комплекс з CdGAP, інгібітором Cdc42 і було показано, що зв'язування ITSN1 Cdc42 інгібує активність CdGAP (Jenna et al., 2002; Novokhatska et al., 2013). Нещодавно ми продемонстрували, що ITSN1 та ITSN2 взаємодіють з білками WIP та CR16, що призводить до збільшення полімеризації актина та утворення актин-збагачених клітинних виростів, таких як інвадоподії та філоподії (Gryaznova et al., 2015; Kropyvko et al., 2017). Тому ми вирішили перевірити взаємодію останнього представника верпролінів WIRE з родиною інтерсектинів.

Матеріали і методи

Експресія рекомбінантних GST-злитих білків в клітинах бактерій та приготування лізатів. Рекомбінантні домени ITSN1 та ITSN2 SH3A-E були отримані з бактеріальних лізатів *E. coli XL1-blu*^{tet}, що були трансформовані відповідними конструкціями та індуковані за стандартним протоколом фірми «Amersham Biosciences».

Антитіла. Моноклональні anti-Myc (9E10, sc-40) («Santa Cruz Biotechnology», США), anti-β-actin («Sigma», США), anti-GST («GE Healthcare Life Sciences», США). Вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрону anti-mouse та anti-rabbit («Promega», США).

Клітинні лінії та трансфекція. Клітини лінії 293 були культивовані у стандартному ростовому середовищі (DMEM), яке було доповнене 10 % бичачим сироватковим альбуміном, 50 од/мл пеніциліном та 100 мг/мл стрептоміцином. Клітини були транзієнтно трансфіковані за допомогою ПЕІ (поліетиленімін) («Sigma», США), як зазначено в інструкції виробника, та культивувалися 24 год.

GST pull-down та Western blot аналізи. Рекомбінантні GST-злиті SH3-домени були отримані з лізатів бактеріальних клітин *Escherichia coli* Top10A та афінно очищені за допомогою глутатіон-Сефарози 4B (GE Healthcare) згідно інструкції виробника. Лізати транзієнтно трансфікованих клітин MDA-MB-231 були отримані екстракцією в буфері, що містив 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM фенілметилсульфонілфлуорид (PMSF) та коктейль інгібіторів протеаз («Roche»). Лізат еукаріотичних клітин центрифугували 10 хв при 12 000 g при +4 °C. Для Pull-down експериментів 5–10 мкг GST або GST-злитих доменів кон'югували з 30 мкг 50 % кульок глутатіон-Сефарози 4B та інкубували з клітинним лізатом протягом 1 год при +4 °C. Кульки екстенсивно промивали та кип'ятили у буфері Леммлі. Білки розділяли за допомогою ДСН-ПААГ, після чого переносили на нітроцелюлозну мембрану («Bio-Rad»), блокуючи вільні від білків ділянки 5% знежиреним молоком. Мембрани інкубували з первинними антитілами протягом 1 год, після чого промивали та інкубували з вторинними видоспецифічними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрону протягом 40 хв. Імунореактивні ділянки детектували ECL (enhanced chemiluminescence) реагентом. Візуалізацію здійснювали на приладі Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ («Bio-Rad»).

Коімунопреципітація білкових комплексів. Лізати культури еукаріотичних клітин розморожували при +4 °C, центифугували 15 хв при 13000 об/хв. До лізатів додавали 15 мкл 30 % суспензії попередньо відмитої A/G-агарози (Santa Cruz Biotechnology), відповідні антитіла (2–5 мкг) та інкубували 3 год при активному перемішуванні при +4 °C. Агарозу промивали тричі буфером для імунопреципітації, осаджували центрифугуванням 500 g протягом 3 хв. Елюцію білків проводили за допомогою буферу для нанесення Лемлі при +95 °C протягом 10 хв. Зразки зберігали при температурі –20 °C.

Результати та обговорення

Раніше за допомогою двогібридної дріжджової системи було показано взаємодію WIRE з ITSN2 (Wong et al., 2012). Оскільки ITSN1 і ITSN2 взаємодіють з двома іншими членами родини верпролінів, CR16 та WIP (Gryaznova et al., 2015; Kropyvko et al., 2017), ми вирішили також дослідити їх взаємодію з WIRE. За допомогою GST pull-down з GST-SH3 доменами ITSN1 і ITSN2 ми виявили, що тільки SH3A та SH3E домени ITSN1 опосередковували взаємодію з WIRE. Обидва сплайс-варіанти SH3A-домену (повсюдно експресований та нейрон-специфічний) ITSN1 однаково взаємодіяли з WIRE (рис. 1А). У випадку ITSN2 взаємодія з WIRE відбувалася через SH3A, SH3C та SH3E домени (рис. 1Б).

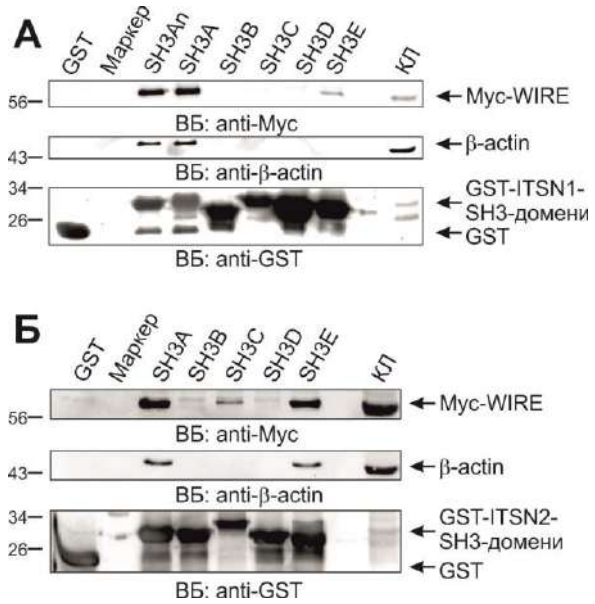

Рис. 1. Перевірка взаємодії SH3-доменів ITSN1 (А) та ITSN2 (Б) з WIRE. КЛ — клітинний лізат. ВБ — вестерн блот

Попередні дослідження показали, що WIRE також може взаємодіяти з актиновим цитоскелетом шляхом зв'язування G-актину через його V-домен і F-актин через центральну частину PRM (Kato and Takenawa, 2005).

У цьому дослідженні з використанням GST pull-down аналізу ми показали, що SH3-домени як ITSN1, так і ITSN2 преципітували ендогенний актин у присутності надекспресованого WIRE в клітинах 293 (рис. 1А, Б)., тоді як у її відсутності WIRE такої преципітації не спостерігалося (рис. 2). Ці результати вказують на те, що WIRE є важливим для зв'язку між актином і SH3-доменами ITSN1 і ITSN2, що узгоджується з нашими попередніми дослідженнями для CR16 та ITSN1 (Kropyvko et al., 2017).

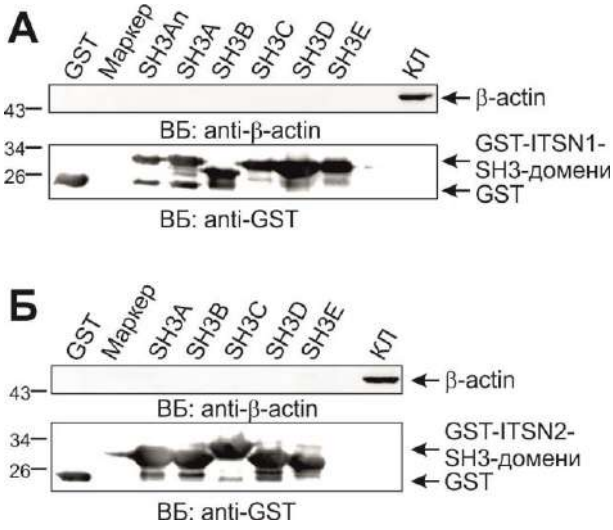

Рис. 2. Перевірка взаємодії SH3-доменів ITSN1 (А) та ITSN2 (Б) з ендогенним β-актином. КЛ — клітинний лізат. ВБ — вестерн блот

Висновки

Отримані результати демонструють, що родини інтерсектинів та верпролінів спільно приймають участь в регуляції перебудов актинового цитоскелету, які необхідні для утворення інвадоподій, що в свою чергу може мати вплив на розвиток різних інвазивних видів раку.

References

1. *Aspenström* P. The WASP-binding protein WIRE has a role in the regulation of the actin filament system downstream of the platelet-derived growth factor. *Exp. Cell Res*. 2002. Vol. 279, № 1. P. 21–33. doi: 10.1006/excr.2002.5576.
2. Aspenstrom P. The mammalian verprolin homologue WIRE participates in receptor-mediated endocytosis and regulation of the actin filament system by distinct mechanisms. *Exp. Cell Res*. 2004. Vol. 298, № 2. P. 485–498. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.04.050.
3. *Dominguez* R., *Holmes* K. C. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 2011. Vol. 40. P. 169–186. doi: 10.1146/annurev-biophys-042910-155359.
4. *García* E., *Ragazzini* C., *Yu* X., *Cuesta-García* E., *Bernardino de la Serna* J., *Zech* T., *Sarrió* D., *Machesky* L. M., *Antón* I.M. WIP and WICH/WIRE coordinately control invadopodium formation and maturation in human breast cancer cell invasion. *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 23590. doi: 10.1038/srep23590.
5. *Gryaznova* T., *Kropyvko* S., *Burdyniuk* M., *Gubar* O., *Kryklyva* V., *Tsyba* L., *Rynditch* A. Intersectin adaptor proteins are associated with actin-regulating protein

WIP in invadopodia. Cell Signal. 2015. Vol. 27, № 7. P. 1499–1508. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.03.006.
6. *Ho* H. H., *Rohatgi* R., *Ma* L., *Kirschner* M. W. CR16 forms a complex with N-WASP in brain and is a novel member of a conserved proline-rich actin-binding protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2001. Vol. 98, № 20. P. 11306–11311. doi: 10.1073/pnas.211420498.
7. *Hussain* N. K., *Jenna* S., *Glogauer* M., *Quinn* C. C., *Wasiak* S., *Guipponi* M., *Antonarakis* S. E., *Kay* B. K., *Stossel* T. P., *Lamarche-Vane* N., *McPherson* P. S. Endocytic protein intersectin-l regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat. Cell. Biol.* 2001. Vol. 3, № 10. P. 927–932. doi: 10.1038/ncb1001-927.
8. *Jenna* S., *Hussain* N. K., *Danek* E. I., *Triki* I., *Wasiak* S., *McPherson* P. S., *Lamarche-Vane* N. The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 8. P. 6366–6373. doi: 10.1074/jbc.M105516200.
9. *Kato* M., *Miki* H., *Kurita* S., *Endo* T., *Nakagawa* H., *Miyamoto* S., *Takenawa* T. WICH, a novel verprolin homology domain-containing protein that functions cooperatively with N-WASP in actin-microspike formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2002. Vol. 291, № 1. P. 41–47. doi: 10.1006/bbrc.2002.6406
10. *Kato* M., *Takenawa* T. WICH, a member of WASP-interacting protein family, cross-links actin filaments. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005. Vol. 328, № 4. P. 1058–1066. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.058
11. *Klein* I. K., *Predescu* D. N., *Sharma* T., *Knezevic* I., *Malik* A. B., *Predescu* S. Intersectin-2L regulates caveola endocytosis secondary to Cdc42-mediated actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 38. P. 25953–25961.
12. *Kropyvko* S., *Gryaznova* T., *Morderer* D., *Rynditch* A. Mammalian verprolin CR16 acts as a modulator of ITSN scaffold proteins association with actin. Biochem Biophys Res Commun. 2017. Vol. 484, № 4. P. 813–819. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.177.
13. *McGavin* M. K. H., *Badour* K., *Hardy* L. A., *Kubiseski* T. J., *Zhang* J., *Siminovitch* K. A. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. J. Exp. Med. 2001. Vol. 194, № 12. P. 1777–1787.
14. *Misra* A., *Rajmohan* R., *Lim* R. P., *Bhattacharyya* S., *Thanabalu* T. The mammalian Verprolin, WIRE induces filopodia independent of N-WASP through IRSp53. Exp Cell Res. 2010. Vol. 316, № 17. P. 2810–2824. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.07.015.
15. *Novokhatska* O., *Dergai* M., *Tsyba* L., *Skrypkina* I., *Filonenko* V., *Moreau* J., *Rynditch* A. Adaptor proteins intersectin 1 and 2 bind similar proline-rich ligands but are differentially recognized by SH2 domain-containing proteins. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 7. P. e70546. doi: 10.1371/journal.pone.0070546.
16. *O'Bryan* J. P. Intersecting pathways in cell biology. *Sci. Signal*. 2010. Vol. 3, № 152. P. re10. doi: 10.1126/scisignal.3152re10.
17. Pucharcos C., Casas C., Nadal M., Estivill X., de la Luna S. The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. Vol. 1521. P. 1–11. doi: 10.1016/S0167-4781(01)00276-7.
18. *Rossman* K. L., *Der* C. J., *Sondek* J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005. Vol. 6, № 2. P. 167–180. doi: 10.1038/nrm1587.
19. *Sasahara* Y., *Rachid* R., *Byrne* M. J., *de la Fuente* M. A., *Abraham* R. T., *Ramesh* N., *Geha* R. S. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol. Cell.* 2002. Vol. 10, № 6. P. 1269–1281. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00728-1.
20. *Sengar* A. S., *Wang* W., *Bishay* J., *Cohen* S., *Egan* S. E. The EH and SH3 domain Ese proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. EMBO J. 1999. Vol. 18, № 5. P. 1159–1171. doi: 10.1093/emboj/18.5.1159.
21. *Tsyba* L., *Nikolaienko* O., *Dergai* O., *Dergai* M., *Novokhatska* O., *Skrypkina* I., *Rynditch* A. Intersectin multidomain adaptor proteins: regulation of functional diversity. Gene. 2011. Vol. 473, № 2. P. 67–75. doi: 10.1016/j.gene.2010.11.016.
22. *Weiler* M. C., *Smith* J. L., *Masters* J. N. CR16, a novel proline-rich protein expressed in rat brain neurons, binds to SH3 domains and is a MAP kinase substrate. *J. Mol. Neurosci.* Fall. 1996. Vol. 7, № 3, P. 203–215.
23. *Wong* K. A., *Wilson* J., *Russo* A., *Wang* L., *Okur* M. N., *Wang* X., *Martin* N. P., *Scappini* E., *Carnegie* G. K., *O'Bryan* J. P. Intersectin (ITSN) family of scaffolds function as molecular hubs in protein interaction networks. PLoS ONE. 2012. Vol. 7, № 4. P. e36023. doi: 10.1371/journal.pone.0036023.
24. *Yamaguchi* H., *Lorenz* M., *Kempiak* S., *Sarmiento* C., *Coniglio* S., *Symons* M., *Segall* J., *Eddy* R., *Miki* H., *Takenawa* T., *Condeelis* J. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. J. Cell Biol. 2005. Vol. 168, № 3. P. 441–452. doi: 10.1083/jcb.200407076.

Представлено В. В. Філоненком
Надійшла 14.05.2019

THE INTERACTION OF VERPROLIN WIRE WITH THE ADAPTER PROTEINS FAMILY INTERSECTIN

S. V. Kropyvko, A. V. Rynditch

Institute of Molecular Biology and Genetics of
Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150
e-mail: s.v.kropyvko@imbg.org.ua

Aim. WIRE is a scafold protein that regulates actin cytoskeleton rearrangements and the formation of actin enriched membrane processes responsible for invasion and migration. ITSN1 and ITSN2 are representatives of the family of intersectins who participate in the reorganization of the actin cytoskeleton, as well as in other processes, such as endo/enzocytosis, cellular signal transduction, etc. As these proteins participate in the same processes, we checked their interaction with each other. **Methods**. Protein-protein interactions were identified using the GST pull-down method. **Results.** We showed that the SH3 domains of ITSN1 and ITSN2 interact with WIRE, and found that while WIRE is in a complex with endogenous actin. **Conclusions**. ITSN1 and ITSN2 interact with WIRE, which is located in a complex with endogenous actin.

Keywords: WIRE, ITSN1 and ITSN2, actin.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВЕРПРОЛИНА WIRE С СЕМЕЙСТВОМ АДАПТЕРНЫХ БЕЛКОВ ИНТЕРСЕКТИНОВ

С. В. Кропивко, А. В. Рындич

Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины,
Украина, 03143, г.
Киев, ул. Академика Заболотного, 150
e-mail: s.v.kropyvko@imbg.org.ua

Цель. WIRE — скафолдный белок, который регулирует перестройки актинового цитоскелета и образование актин обогащённых мембранных выростов, ответственных за инвазию и миграцию. ITSN1 и ITSN2 представители семейства интерсектинов, которые принимают участие как в реорганизации актинового цитоскелета, так и в других процессах, таких как эндо-/энзоцитоз, передача клеточного сигнала и др. Поскольку эти белки принимают участие в одинаковых процессах, мы проверили их взаимодействие между собой. **Методы.** Белок-белковые взаимодействия идентифицировали при помощи метода GST Pull-down. **Результаты.** Мы показали, что SH3-домены ITSN1 и ITSN2 взаимодействуют с WIRE, и выявили что при этом WIRE находится в комплексе з эндогенным актином. **Выводы.** ITSN1 и ITSN2 взаимодействуют с WIRE, который находится в комплексе з эндогенным актином.

Ключевые слова: WIRE, ITSN1 и ITSN2, актин.