

КРОПИВКО С. В.✉, ГРЯЗНОВА Т. А., РИНДИЧ А. В.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

✉ s.v.kropyvko@imbg.org.ua

ВЗАЄМОДІЯ СКАФOLDНОГО БІЛКА ІНВАДОПОДІЙ TKS4 З РОДИНОЮ ІНТЕРСЕКТИНІВ

Мета. Скафолдний білок TKS4 є одним із ключових білків інвадоподій – спеціалізованих мембранних структур, які забезпечують інвазію та метастазування злоякісних клітин. TKS4 – білок-субстрат для тирозинової кінази SRC, який бере участь у формуванні вигинів мембрани, впливає на продукцію клітиною активних форм кисню, взаємодіє з мембранними металопротеїназами, які спричиняють деградацію позаклітинного матриксу, але досі остаточно не з'ясована його роль в інвазивних структурах. Подальше вивчення молекулярних компонентів інвадоподій, а також специфічних взаємодій між ними дозволить краще зрозуміти механізми клітинної інвазії. **Методи.** Білок-білкові взаємодії ідентифікували за допомогою *in vitro* преципітації білкових комплексів за допомогою GST-злитих білків та коїмунопреципітації. **Результати.** Ідентифіковані нові партнери TKS4 – адаптерні білки ITSN1 і ITSN2. Визначено, що утворення комплексів між інтерсектинами та TKS4 забезпечують домени SH3A, SH3C та SH3E ITSN1 та ITSN2. Встановлено, що фосфорилування TKS4 за залишками тирозину не впливає на взаємодію з інтерсектинами. **Висновки.** Скафолдний білок TKS4 взаємодіє з адаптерними білками ITSN1 та ITSN2 *in vitro*. Утворення білкового комплексу TKS4/ITSN1 підтверджено *in vivo* в інвазивних клітинах лінії MDA-MB-231.

Ключові слова: TKS4, ITSN1, ITSN2, білок-білкові взаємодії.

TKS4 – представник родини скафолдних білків TKS (TKS4 та TKS5), які є субстратами для тирозинової кінази SRC і важливі для формування інвадоподій та подосом [1–3]. Подосоми й інвадоподії – це спеціалізовані мембранні структури, що представлені в клітинах із фізіологічною чи патологічною інвазивною поведінкою та локалізуються на вентральній поверхні клітини [4]. Вони забезпечують клітинно-субстратну адгезію, викликають деградацію

компонентів позаклітинного матриксу і таким чином забезпечують міграцію та інвазію клітин в навколишні тканини. Білки TKS4 та TKS5 беруть участь у формуванні та функціонуванні інвадоподій, а їх нокаун повністю блокує утворення цих інвазивних структур [4].

TKS4 кодується геном *SH3PXD2B* (інші назви – *FAD49*, *FTHS*, *HOFI*, *KIAA1295*, *TKS4*, *TSK4*), розміщеним на 5 хромосомі людини. Найвищий рівень транскрипції гена спостерігається в зразках тканин та в клітинних лініях ембріонів, крім того, достатній для виявлення рівень транскрипції гена спостерігається в органах дорослих, а саме: в серці, селезінці, мозку, скелетних м'язах, нирках та печінці [3]. Скафолдний білок TKS4 складається з одного PX-домени та чотирьох SH3-доменив, а також має кілька пролін-збагачених послідовностей [1, 3]. Відомо, що кіназа SRC фосфорилує TKS4 за 25, 373 та 508 залишками тирозину [3]. Фосфорилування має значення для передачі клітинного сигналу та внутрішньоклітинної локалізації TKS4 [5]. Через SH3-домени TKS4 взаємодіє з більшістю своїх білків-партнерів, яких на сьогодні відомо дев'ять [6]. Подальший пошук партнерів TKS4 дозволить краще зрозуміти механізми утворення інвадоподій.

Процес формування інвадоподій та подосом тісно пов'язаний із процесами ендо- та екзоцитозу. За допомогою ендоцитозу клітина регулює склад її власної плазматичної мембрани у відповідь на зміни в навколишньому середовищі. Обидва представники родини інтерсектинів (ITSN), ITSN1 та ITSN2 беруть участь на різних етапах клатрин-опосередкованого ендоцитозу [7]. Окрім того, інтерсектини локалізуються в інвадоподіях та безпосередньо взаємодіють із ключовими компонентами цих структур – Cdc42, N-WASP та WIP [7, 8]. Отже, було вирішено перевірити взаємодію між TKS4 та білками родини інтерсектинів.

Матеріали і методи

Плазмідні конструкції. У роботі були використані конструкції, які кодуєть GST-SH3(A-E) ITSН1 та ITSН2, повнорозмірний ITSН1S-omni [8]. Конструкції, які кодуєть дикий тип TKS4-flag та мутант за 25, 373 та 508 залишками тирозину, що замінені на фенілаланіни TKS4(FFF)-flag, люб'язно надані Sara A. Courtneidge [3].

Експресія рекомбінантних GST-злитих білків у клітинах бактерій та приготування лізатів. Рекомбінантні домени GST-SH3(A-E) ITSН1 та ITSН2 були отримані з бактеріальних лізатів *E. coli* TOP10A, що були трансформовані відповідними конструкціями та індуковані за стандартним протоколом фірми «Amersham Biosciences».

Антитіла. Моноклональні anti-flag-M2 та anti-omni D-8 (sc-7270) антитіла були придбані в компаніях «Sigma» та «Santa-Cruz Biotechnology» (США). Кон'юговані з пероксидазою хрому вторинні антитіла проти імуноглобулінів миші були придбані в компанії «Promega» (США).

Клітинні лінії та трансфекція. Клітини лінії MDA-MB-231 вирощували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM) з додаванням 10 % ембріональної сироватки теляти (FBS), 4,6 г/л глюкози, 10 мкг/мл пеніциліну та 0,25 мкг/мл стрептоміцину за +37°C та вмісту 5 % CO₂. Клітини були тимчасово трансфіковані за допомогою поліетиленіміну (PEI) виробництва «Sigma» (США), як зазначено в інструкції виробника, та культивувалися 24 год.

GST pull-down та Вестерн-блот аналізи. Рекомбінантні GST-злиті SH3-домени були отримані з лізатів бактеріальних клітин *Escherichia coli* Top10A та афінно очищені за допомогою глутатіон-сефарози 4В (GE Healthcare) згідно з інструкцією виробника. Лізати тимчасово 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 за 12000 g за +4°C. Для преципітації використовували 5–10 мкг GST або GST-злитих доменів, які інкубували з 30 мкл 50 % кульок глутатіон-сефарози 4В, потім сорбент тричі промивали буфером для преципітації. До відмитої глутатіон-сефарози дода-

вали клітинний лізат та інкубували протягом 1 год за +4°C. Сорбент інтенсивно промивали та кип'ятили десять хвилин у буфері Лемлі (500 mM Tris-HCl, 10 % гліцерин, 1,2 % ДСН, 1,2 % β-меркаптоетанол, 0,1 % бромфенолової синій, pH6,8). Білки розділяли за допомогою білкового електрофорезу в ДСН-ПААГ, після чого переносили на нітроцелюлозну мембрану («Bio-Rad»), блокуючи вільні від білків ділянки 5 % знежиреним молоком. Мембрану інкубували з первинними антитілами протягом 1 год, після чого промивали та інкубували протягом 40 хв із вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому. Імунореактивні ділянки детектували ECL (enhanced chemiluminescence) реагентом. Візуалізацію здійснювали на приладі Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ («Bio-Rad»).

Імунопреципітація. Лізати культури еукаріотичних клітин розморожували за +4°C, центрифугували 15 хв за 13000 об/хв. До лізатів додавали 15 мкл 30 % суспензії попередньо відмитої А/Г-агарози («Santa Cruz Biotechnology»), відповідні антитіла (2–5 мкг) та інкубували 3 год за активного перемішування за +4°C. Агарозу промивали тричі буфером для імунопреципітації, осаджували центрифугуванням 500 g протягом 3 хв. Елюцію білків проводили за допомогою буфера для нанесення Лемлі за +95°C протягом 10 хв. Зразки зберігали за температури –20°C.

Результати та обговорення

Результати преципітації з використанням GST-злитих білків показали, що TKS4 взаємодіє з білками родини інтерсектинів. Для аналізу взаємодії використовували рекомбінантні окремі GST-злиті SH3-домени ITSН1 та ITSН2 або тандем із п'яти SH3(A-E)-доменів (SH3-бокс), з якими інкубували лізати клітин MDA-MB-231 із надекспресованим TKS4, що містив flag-таг. У результаті експерименту було виявлено, що TKS4 взаємодіє з SH3A-, SH3C- та SH3E-доменами ITSН1 (рис. 1 А) та ITSН2 (рис. 1 Б). Взаємодію TKS4 було показано як для широко розповсюдженої ізоформи SH3A-домена, так і для нейрон-специфічної ізоформи – SH3An, яка містить додаткові амінокислоти у результаті альтернативного сплайсингу 20 екзону (рис. 1 А).

Існування білкового комплексу між TKS4 та ITSН1 *in vivo* було підтверджено коімунопре-

ципітацією з лізатів клітин лінії MDA-MB-231 з надекспресованими TKS4-flag та ITSN1S-omni. За допомогою антитіл проти omni було преципітовано TKS4-flag (рис. 2). Мишачі імуноглобуліни IgG було використано в якості негативного контролю.

Відомо, що TKS4 підлягає фосфорилуванню поширеним онкогеном – тирозин кіназою SRC. Кіназа SRC фосфорилує TKS4 за 25, 373 та 508 залишками тирозину, фосфорилування за цими залишками тирозинів важливе для утворення інвадоподій [3]. Ми перевірили, чи впливає відсутність фосфорилування TKS4 за цими залишками тирозину на його взаємодію з ITSN1 та ITSN2. Для цього провели преципітацію

окремих GST-злитих SH3-доменів ITSN1 та ITSN2 з мутантною формою TKS4 за всіма трьома залишками тирозинів, які фосфорилуються TKS4(FFF)-flag. Отримані результати свідчать, що TKS4(FFF), як і TKS4, взаємодіє з SH3A-, SH3C- та SH3E-доменами ITSN1 та ITSN2 (рис. 3). Таким чином, фосфорилування за залишками тирозину у складі TKS4 не впливає на взаємодію з інтерсектинами.

Виявлені взаємодії між TKS4 та інтерсектинами, які важливі для процесів екзоцитозу та ендоцитозу, дозволяють припустити можливу участь TKS4 у транспортуванні везикул до місць утворення інвадоподій.

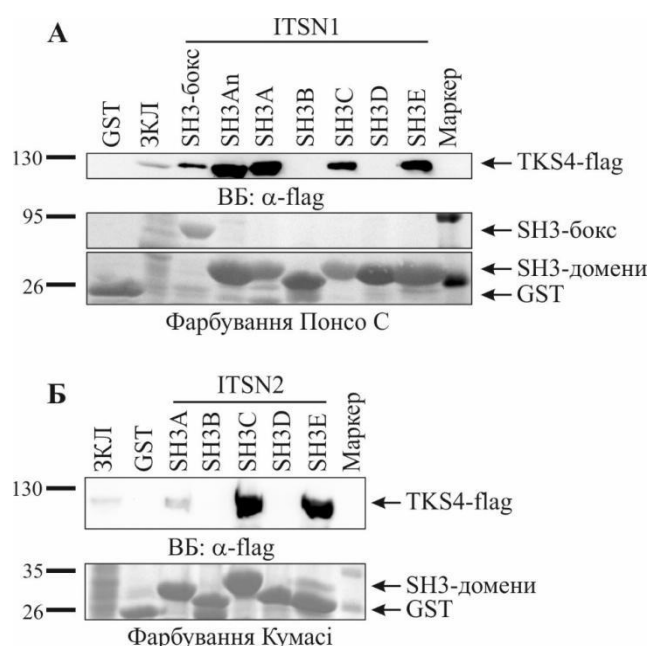


Рис. 1. Вестерн-блот аналіз результатів преципітації SH3-доменів ITSN1 (А) та ITSN2 (Б) з надекспресованим TKS4-flag. ЗКЛ – загальний клітинний лізат, ВБ – Вестерн-блот.

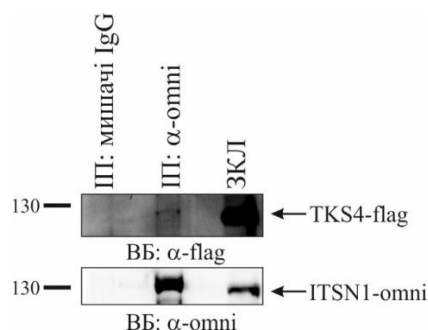


Рис. 2. Вестерн-блот аналіз білкового комплексу TKS4/ITSN1. Для коімунопреципітації було використано лізати лінії MDA-MB-231, що містили ITSN1-omni та TKS4-flag. ЗКЛ – загальний клітинний лізат, ВБ – Вестерн-блот, III – імунопреципітація.

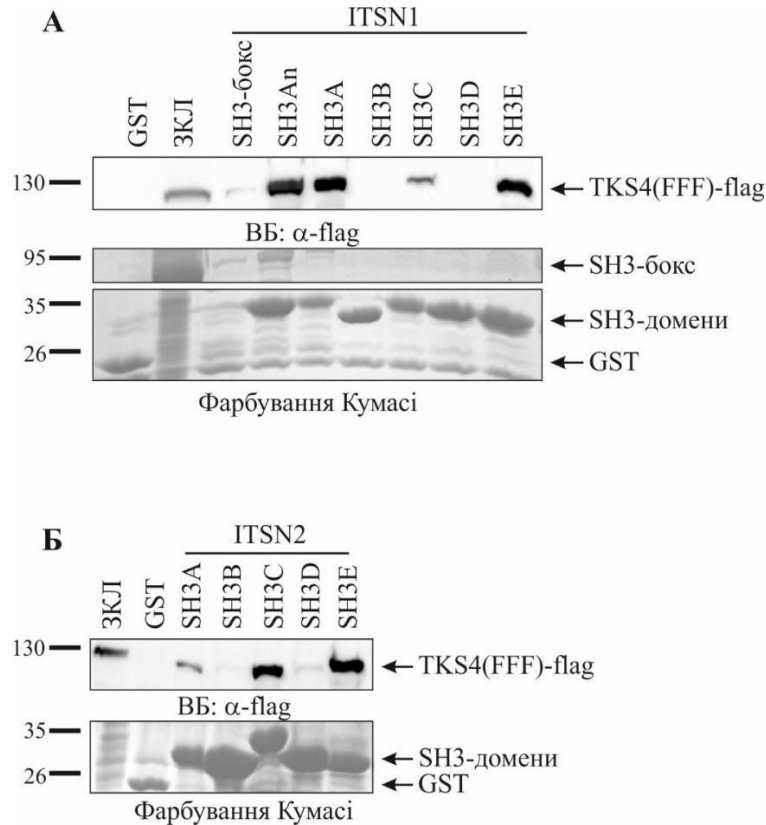


Рис. 3. Вестерн-блот аналіз взаємодії SH3-доменив ITSN1 (А) та ITSN2 (Б) з надекспресованим TKS4(FFF)-flag. 3КЛ – загальний клітинний лізат, ВБ – Вестерн-блот.

Висновки

Отже, у результаті проведеної роботи виявлені нові взаємодії скафолдного білка TKS4 з родиною інтерсектинів (ITSN1 та ITSN2). Визначено, що утворення комплексів між інтерсек-

тинами та TKS4 забезпечують домени SH3A, SH3C та SH3E ITSN1 і ITSN2. Доведено за допомогою мутанта TKS4(FFF), що фосфорилування за залишками тирозину у складі TKS4 не впливає на його взаємодію з ITSN1 та ITSN2.

References

1. Abram C. L., Seals D. F., Pass I., Salinsky D., Maurer L., Roth T.M., Courtneidge S.A. The Adaptor Protein Fish Associates with Members of the ADAMs Family and Localizes to Podosomes of Src-transformed Cells. *J Biol Chem.* 2003. Vol. 278, № 19. P. 16844–16851. doi: 10.1074/jbc.M300267200.
2. Lock P., Abram C.L., Gibson T., Courtneidge S.A. A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. *EMBO J.* 1998. Vol. 17, № 15. P. 4346–4357. doi: 10.1093/emboj/17.15.4346.
3. Buschman M.D., Bromann P.A., Cejudo-Martin P., Wen F., Pass I., Courtneidge S.A. The Novel Adaptor Protein Tks4 (SH3PXD2B) Is Required for Functional Podosome Formation. *Mol. Biol. Cell.* 2009. Vol. 20, № 5. P. 1302–1311. doi: 10.1091/mbc.E08-09-0949.
4. Murphy D.A., Courtneidge S.A. The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 2011. Vol. 12, № 7. P. 413–426. doi: 10.1038/nrm3141.
5. Kropyvko S.V. New partners of TKS4 scaffold protein. *Biopolym. Cell.* 2015. Vol. 31, № 5. P. 395–401. doi: http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008FC.
6. Tsyba L.O., Dergai M.V., Skrypka I.Ya., Nikolaienko O.V., Dergai O.V., Kropyvko S.V., Novokhatska O.V., Morderer D.Ye., Gryaznova T.A., Gubar O.S., Rynditch A.V. ITSN protein family: regulation of diversity, role in signalling and pathology. *Biopolym. Cell.* 2013. Vol. 29, № 3. P. 244–251. doi: 10.7124/bc.00081E.
7. 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.

KROPYVKO S. V., GRYAZNOVA T. A., RYNDITCH A. V.

*Institute of Molecular Biology and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 03680, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150*

INTERACTIONS OF INVADOPODIA SCAFFOLD PROTEIN TKS4 WITH INTERSECTIN FAMILY PROTEINS

Aim. TKS4 is one of the key proteins of invadopodies, specialized membrane structures that provide invasiveness and metastatic potential of malignant cells. This protein is a substrate for the tyrosine kinase SRC, which is involved in the formation of the membrane bends, affects cellular production of active forms of oxygen, interacts with membrane metalloproteinases causing degradation of the extracellular matrix, but its role in invasive structures has not yet been fully understood. Further study of molecular components of invadopodies and their specific interactions provides better understanding of mechanisms of cellular invasion. **Methods.** Protein-protein interactions were identified by in vitro precipitation of protein complexes using GST-fused proteins and co-immunoprecipitation. **Results.** Adapter proteins ITSN1 and ITSN2 are new partners of TKS4. Interactions between intersectins and TKS4 are mediated by the SH3A, SH3C and SH3E domains of ITSN1 or ITSN2. TKS4 phosphorylation on tyrosine residues does not affect interactions between TKS4 and intersectins. **Conclusions.** In this study, we have showed that TKS4 interacts with endocytic adaptor proteins of the intersectin family, ITSN1 and ITSN2. We have also demonstrated that TKS4 and ITSN1 can form a complex in invasive MDA-MB-231 breast cancer cell line.

Keywords: TKS4, ITSN1, ITSN2, protein-protein interactions.