



УДК 57.052.6.

ПРОТЕЇНкіНАЗА D ВЗАЄМОДіЄ З АДАПТЕРНИМ БІЛКОМ RUK/CIN85 І ФОСФОРИЛЮЄ ЙОГО

**Ю. А. Ржепецький^{1,2}, А. А. Самойленко¹, О. П. Кухаренко³,
С. В. Міхалап⁴, С. П. Сидоренко⁴, А. Гауссер⁵, Л. Б. Дробот¹**

¹Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ 01601, Україна

²Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна

³Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ 03143, Україна

⁴Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ 0322, Україна

⁵Інститут клітинної біології і імунології, Штутгартський Університет,
вул. Алмандрінг, 31, Штутгарт D-70569, Німеччина

Адаптерний білок Ruk/CIN85, побудований із множинних доменів і мотивів, залучених до міжмолекулярних взаємодій, функціонує як ключова ланка сигнальних мереж, що забезпечують координований контроль важливих фізіологічних відповідей клітин. Наявність великої кількості консенсусних мотивів для низки протеїнкіназ у структурі Ruk/CIN85 свідчить про те, що фосфорилування є однією з найімовірніших посттрансляційних модифікацій адаптерного білка, які можуть регулювати його біологічну активність залежно від клітинного контексту. У цій роботі нами продемонстровано, що протеїнкінази D (PKD) 1 і 2 співімунопреципітують з Ruk/CIN85 із лізатів клітин HEK293, тимчасово трансфікованих вектором pRc/CMV-Ruk. З використанням панелі GST-злитих фрагментів Ruk/CIN85 для преципітації PKD2-Flag показано, що PKD2 взаємодіє з SH3B та частково з SH3C доменом Ruk, причому присутність одночасно обох вказаних доменів суттєво посилює цю взаємодію. Виявилось, що найефективніше PKD2 взаємодіє з Pro-багатою ділянкою Ruk і виявляє значно нижчу спорідненість до суперспіралізованої ділянки. За результатами кіназної реакції *in vitro* в анти-PKD2-Flag-імунопреципітатах з використанням GST-злитих SH3 доменів Ruk, як субстратів, найвищий рівень включення радіоактивного ³²P з [γ -³²P]ATP спостерігався у фрагменті SH3AB порівняно зі значно нижчою інтенсивністю фосфорилування SH3ABC, SH3BC та SH3B фрагментів. Отримані дані дають змогу припустити, що PKD є новим зв'язувальним партнером Ruk/CIN85, залученим до регулювання його функціональної активності шляхом фосфорилування.

Ключові слова: адаптерні білки, кінази, фосфорилування, Ruk/CIN85, PKD1/2.

ВСТУП

Ruk/CIN85 (Regulator of ubiquitous kinase/Cbl-interacting protein of 85 kDa) і його гомолог CMS/CD2AP (CD2-associated protein/Cas ligand with multiple SH3 domains) належать до родини розповсюджених адаптерних білків, характерною особливістю будови яких є наявність трьох SH3 (Src-homology 3) доменів на N-кінці, центральній Pro-багатій ділянці та C-кінцевих Ser-багатого району і суперспіралізованого домену [5, 7, 11]. На сьогодні ідентифіковано понад 30 зв'язувальних партнерів Ruk/CIN85, що взаємодіють із його множинними доменами та мотивами, залученими до міжмолекулярної взаємодії. Зокрема, його SH3 домени розпізнають і зв'язують Pro-Arg-вмісний мотив (PxxxPR або Px(P/A)xxR) у таких білках-партнерах, як Cbl, Cbl-b, BLNK, AIP1/Alix, SB1, Dab2, CD2 та ін. [7, 8, 18–20]. Як свідчать дані, отримані за допомогою підходу, котрий поєднує афінне очищення зв'язувальних партнерів з подальшою їх ідентифікацією мас-спектрометричним аналізом (LC-MS/MS), перелік цих білків може бути набагато ширшим [14]. Водночас Pro-багаті мотиви взаємодіють з SH3 доменами тирозинових кіназ родини Src, регуляторної p85 α субодиниці PI-3-кінази, адаптерних білків Grb2, Crk та p130Cas, ендодфілінів [2, 11, 30, 34, 39]. Внутрішньомолекулярна взаємодія Pro-багатих мотивів адаптерного білка з власним SH3A доменом лежить в основі автоінгібування, унеможливаючи взаємодію з екзогенними лігандами [3, 15]. Цікаво, що суперспіралізована ділянка білка забезпечує не лише гомо- та гетеротипові взаємодії [3, 15], але й, за рахунок свого позитивного заряду, може брати участь у формуванні зв'язувальних центрів для нуклеїнових кислот [16] і фосфатидної кислоти [43].

Серед найкраще вивчених функцій Ruk/CIN85 є його роль у сприянні ендодфілінозису активованих рецепторних тирозинових кіназ шляхом взаємодії з убіквітинлігазами c-Cbl і Cbl-b, асоційованими з ендодфілінами [8, 30, 34], а також у регулюванні процесів внутрішньоклітинного транспорту мембранних везикул [13]. Встановлено, що CIN85, його сплайсинговий варіант CD2BP3, а також гомолог CD2AP/CMS, безпосередньо зв'язуються з цитоплазматичною частиною CD2 – важливого рецепторного глікопротеїну T-клітин, і, таким чином, беруть участь у контролюванні процесів поляризації, адгезії та рухливості цих клітин під час презентації антигену [35]. Окрім цього, Ruk/CIN85 залучений до таких клітинних процесів, як: апоптоз через взаємодію з p85 α субодиницею PI-3-кінази [11], білком AIP1/Alix [6] та кіназою Src [27]; перебудову цитоскелету через взаємодію з p130Cas, кортактином та ASAP1 [9, 17, 23]; регулювання відповіді клітин на стрес через взаємодію з MEKK4 [1]; поперечного зшивання F-актину у пучки [10]. Дослідженнями останніх років показано роль Ruk/CIN85 у патогенезі низки патологічних станів, зокрема, інфекційних захворювань через взаємодію з білком ICP0 віруса простого герпесу [22]; розвиток гломерулосклерозу на мишачій моделі хвороби [36] та інвазії клітин раку грудної залози через взаємодію з AMAP1 [26].

Наведені функціональні дані стосовно участі адаптерного білка Ruk/CIN85 у регулюванні гомеостазу клітин, як за умов норми, так і за умов патологій різного генезу, свідчать про те, що його біологічна активність повинна бути об'єктом строгого контролю з боку різноманітних клітинних регуляторних систем. У літературі є дані стосовно моноубіквітинілювання Ruk/CIN85 у множинних центрах за участю убіквітинлігаз c-Cbl/Cbl-b та Nedd4 та ролі цього процесу в ліганд-індукованому ендодфілінозі рецептора EGF [12, 38]. Виявлення менш рухливих форм Ruk/CIN85 при електрфорезі в SDS-ПААГ [24] та наявність великої кількості (понад 30) консенсусних

мотивів для низки кіназ свідчить про те, що фосфорилювання є найімовірнішою, поряд з убіквітинілюванням, посттрансляційною модифікацією досліджуваного білка, що може бути важливою складовою молекулярних механізмів контролю його функціональної активності. Водночас, на сьогодні не опубліковано жодних даних стосовно фосфорилювання Ruk/CIN85 і протеїнази, залучених до цього процесу, та біологічної значимості зазначеної посттрансляційної модифікації.

Метою нашого дослідження було перевірити можливість утворення комплексів між серин/треоніною кіназою PKD (для якої у структурі Ruk/CIN85 були виявлені потенційні центри фосфорилювання) і Ruk/CIN85 *in vivo*, з'ясувати механізми міжмолекулярної взаємодії, а також проаналізувати можливість посттрансляційної модифікації адаптерного білка за участю PKD2.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Культивування клітин і трансфекція

Клітини ліній HEK293, MCF-7 та MDA-MB231 (отримані з колекції Клітинного банку ліній з тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України) підтримували в середовищі DMEM („GibcoBRL”) за присутності 10% ембріональної сироватки крові теляти („GibcoBRL”), 2 мМ L-глутаміну, 50 МО/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину у зволоженої атмосфері з 5% CO₂ при 37°C. Тимчасову трансфекцію клітин лінії HEK293 здійснювали Ca²⁺-фосфатним методом, як описано [3].

Генетичні конструкції й антитіла

Трансфекцію клітин ембріональної нирки людини проводили з використанням експресувальних векторів pRc/CMV2-Ruk₁ [11] та pcDNA3.1/PKD2-Flag (вектор був люб'язно наданий Dr. T. Seufferlein, University of Ulm, Ulm, Germany). кДНК-фрагменти, які кодують ділянки Ruk-SH3AB (2–156), Ruk-SH3BC (101–327), Ruk-ABC (2–327), Ruk-Pro-rich (334–432), Ruk-Ser-rich (433–607) та Ruk-CC (608–665), ампліфікували за допомогою ПЛР, використовуючи як матрицю вектор pRc/CMV2-Ruk₁ [11], з подальшим субклонуванням у вектор pGEX-4T1 за центрами пізнавання ендонуклеазами рестрикції BamH1 та EcoR1. Отриманими векторами, а також векторами pGEX-2T/Ruk-SH3A, pGEX-2T/Ruk-SH3B, pGEX-2T/Ruk-SH3C [3], трансформували бактерії *E. coli* BL-21 („Stratagene”). Одержані трансформанти використовували для експресії та очистки GST-злитих білків. Для імунопреципітації і Вестерн-блот-аналізу використовували такі антитіла: поліклональні анти-PKD1 (PKC μ) („Santa Cruz Biotechnology”, США); поліклональні анти-PKD2 („Calbichem”, США); моноклональні анти-Flag M2 („Sigma”, США), моноклональні анти-SH3A до Ruk₁ [24], антимишачі й антикролячі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому („Promega”, США).

Імунопреципітація та Вестерн-блот-аналіз

Культивовані клітини двічі промивали охолодженим забуференим фосфатним розчином (ЗФР) і лізували на льодовій бані в буфері, що містив 10 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1%-ний Тритон X-100, 5 мМ EDTA, 50 мМ NaF, 1 мМ Na₃VO₄, 5 мМ бензамідин, 25 мкг/мл апротиніну („Sigma”), 10 мкг/мл лейпептину („Sigma”), 1 мкг/мл пепстатину („Fluka”), 1 мМ фенілметилсульфанілфториду (PMSF „Fluka”) протягом 20 хв. Нерозчинну у детергенті фракцію осаджували центрифугуванням при 12 000 об/хв протягом 15 хв. Концентрацію білка в надосадовій рідині визначали за методом Петерсона [29]. Для імунопреципітації PKD2-Flag і Ruk₁-non-tagged лізати

тимчасово трансфікованих клітин НЕК293, стандартизовані за вмістом білка (1,3–1,5 мг), інкубували при постійному перемішуванні протягом 2 год при 4°C з відповідними антитілами. Імунні комплекси осаджували за допомогою білок A/G-сефарози („Amersham Pharmacia Biotech AB”, Швеція). Гранули сефарози промивали 3–4 рази холодним буфером лізування і прогрівали у буфері для зразків при +95°C протягом 5 хв або використовували для проведення кіназної реакції *in vitro*. Електрофорез білків імунопреципітатів і клітинних лізатів проводили в блоках 10% ПААГ за присутності SDS у буферній системі Леммлі [21]. Перенос білків з SDS-ПААГ на мембрану PVDF здійснювали протягом 2 год при силі струму 250 мА у буфері, що містив: 25 мМ трис-НСІ, рН 8,3, 20%-ний метанол, 192 мМ гліцин [37]. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 5%-ним сухим знежиреним молоком у ЗФРТ (ЗФР/0,1%-ний Твін-20). Відповідно до поставленої мети, мембрану інкубували з першими антитілами у блокувальному буфері протягом 2 год із подальшим промиванням. Як другі антитіла використовували антимишачі або антикролячі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому в розведенні 1:2000 у блокувальному буфері. Імунореактивні смуги на блотах виявляли за допомогою набору фірми „Amersham” для посиленої хемілюмінесценції.

Експресія і очищення рекомбінантних білків, кон'югованих з GST, у бактерійній системі

Експресію рекомбінантних білків у бактеріях, трансформованих відповідними векторами, індукували додаванням до середовища IPTG до кінцевої концентрації 1,0 мМ з подальшим культивуванням клітин протягом 4 год при +25–+27°C. Клітини осаджували при 3000 об/хв, промивали охолодженим ЗФР, заморожували і зберігали у рідкому азоті. Осад бактерій лізували в охолодженому буфері (10 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 5 мМ EDTA, 50 мМ NaF, 1 мМ PMSF, 5 мМ бензамідин, 10 мкг/мл апротиніну, 10 мкг/мл лейпептину, 2 мкг/мл пепстатину, 0,125 мМ Na₃VO₄) 1:10 за об'ємом протягом 20 хв на льодяній бані. Клітинні лізати піддавали обробці на ультразвуковому дезінтеграторі „УЗДН-1” і центрифугували при 12 000 об/хв протягом 30 хв при +4°C. До надосадової рідини додавали 50% суспензію глутатіон-сефарози („GE Healthcare”, Швеція) у буфері для лізування. Зразки інкубували протягом 2 год при +4°C при перемішуванні. Сефарозу інтенсивно промивали ЗТРТ (50 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 150 мМ NaCl з 0,05% Твіна-20), після чого рекомбінантні білки елюювали з афінного сорбента 50 мМ розчином відновленого глутатіону в 100 мМ трис-НСІ, рН 8,0, 150 мМ NaCl. Після визначення концентрації білка в елюатах глутатіон видаляли діалізом проти буферу, який містив 50 мМ трис-НСІ, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ дитіотрейтол (DTT), 50%-ний гліцерин. Препарати GST-кон'югованих білків зберігали при -20°C.

Аналіз білково-білкових взаємодій

Білково-білкові взаємодії досліджували з використанням афінно очищених рекомбінантних GST-кон'югованих форм окремих фрагментів білка Ruk. Стандартизовані за концентрацією білка лізати клітин НЕК293, тимчасово трансфікованих вектором pCDNA3.1/PKD2-Flag, інкубували протягом 2 год при 4°C і постійному перемішуванні з GST-кон'югованими білками (5 мкг білка/зразок). Для оцінки рівня неспецифічного зв'язування отримані лізати інкубували з GST. Утворені білкові комплекси осаджували за допомогою глутатіон-сефарози („GE Healthcare”, Швеція) протягом 2 год при 4°C. Після завершення інкубації преципітати інтенсивно промивали буфером для лізування з подальшим Вестерн-блот-аналізом.

Кіназна реакція *in vitro* з використанням екзогенних субстратів

PKD2-Flag імунопреципітували з лізатів тимчасово трансфікованих клітин HEK293 за допомогою агарози, ковалентно кон'югованої з моноклональними анти-Flag антитілами („Sigma”). Імунопреципітати промивали 4x у буфері для лізування та два рази у кіназному буфері такого складу: 50 мМ HEPES, 0,05% Тритон X-100, 1 мМ CaCl₂, 20 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, рН 7,5. Після промивання до гранул сефарози додавали 30 мкл буферу, що містив очищені GST-злиті фрагменти Ruk/CIN85 (1 мкг/пробу), 25 мкМ АТФ та 5 мкКі [γ -³²P]АТФ/на зразок („Amersham”, Англія). Реакційну суміш інкубували 25 хв при 30°C. Реакцію зупиняли прогріванням у 2-кратному буфері Леммлі. ³²P-мічені білки аналізували електрофорезом у SDS-ПААГ, гелі фарбували Coomassie R-250, після чого проводили авторадіографію.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Беручи до уваги, що такі посттрансляційні модифікації, як фосфорилування по залишках тирозину і серину/треоніну, відіграють провідну роль у регулюванні функцій білків і сигнальних мереж, ми здійснили біоінформаційний пошук за допомогою сервера ScanSite і передбачили множинні потенційні центри фосфорилування у структурі адаптерного білка Ruk/CIN85. Зокрема, було ідентифіковано консенсусні мотиви для базофільних Ser/Thr кіназ (PKC α , β , γ , δ , ϵ та μ , Akt, Clk2, CaMK2); ацидофільних Ser/Thr кіназ (казеїнкінази 1 і 2, GSK3); кіназ, що активуються при пошкодженні ДНК (АТМ та DNA PK). Доступними для фосфорилування виявились: один залишок тирозину, 15 залишків треоніну і 48 залишків серину. Серед перелічених протеїнкіназ особливу увагу привертає PKC μ (на сьогодні PKC μ належать до нової родини серин/треонінових кіназ групи Ca²⁺/кальмодулін-залежних кіназ, яка включає PKD1/PKC μ , PKD2 та PKD3/PKC ν [31]. По-перше, на N-кінці PKD1 і PKD2 локалізована неполярна ділянка, багата на залишки проліну. По-друге, як PKD1, так і Ruk/CIN85 були виявлені в інвадоподіях, спеціалізованих видовженнях плазматичної мембрани у місцях руйнування позаклітинного матриксу, в надмолекулярних комплексах, що включали спільні компоненти [4, 26]. За результатами пошуку у структурі Ruk/CIN85 присутні три консенсусні послідовності для фосфорилування PKD:

Сайт	Послідовність
T88	NALLSSE T ILRTNKR
T144	EGVLNGK I GMFPSNF
T538	KKTSKTV T ISQVSDN

Для виявлення можливої взаємодії між Ruk/CIN85 та PKD1 і 2 *in vivo* зроблено пошук ліній клітин із високим рівнем експресії ендогенних форм зазначених кіназ. Як видно з рис. 1, аденокарциномні клітини грудної залози ліній MDA-MB 231 і MCF-7 характеризуються високим рівнем експресії PKD2 і низьким рівнем експресії PKD1, тоді як в ембріональних клітинах нирки людини лінії HEK293 вміст обох кіназ є достатньо високим. Виходячи з цієї обставини, клітини HEK293 тимчасово трансфікували вектором pRc/CMV-Ruk, що кодував структуру повнорозмірної форми Ruk без молекулярної мітки, з подальшою імунопреципітацією PKD1 і 2 за допомогою відповідних анти-PKD антитіл. Анти-Ruk/CIN85 Вестерн-блот-аналіз отриманих імунопреципітатів продемонстрував, що частина пулу адаптерного білка утворює комплекси як з PKD1, так і з PKD2 у трансфікованих клітинах HEK293 (рис. 2).

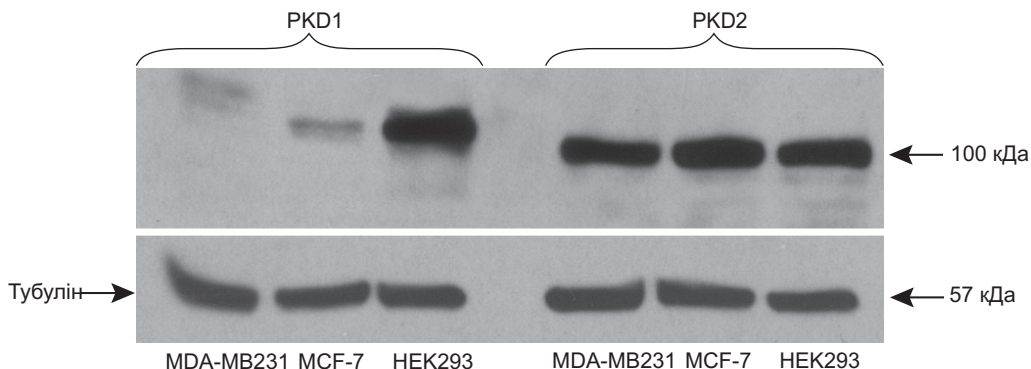


Рис. 1. Експресія PKD1 та PKD2 у клітинах аденокарциноми грудної залози ліній MDA-MB231 і MCF-7 та в клітинах ембріональної нирки людини лінії HEK293. Лізати клітин досліджували Вестерн-блот-аналізом із використанням кролячих поліклональних анти-PKD1 і анти-PKD2 антитіл

Fig. 1. Expression of PKD1 and PKD2 in breast adenocarcinoma MDA-MB231, MCF-7 cells, and human embryonic kidney HEK293 cells. Cell lysates were subjected to Western-blot-analysis using rabbit polyclonal anti-PKD1 and anti-PKD2 antibodies

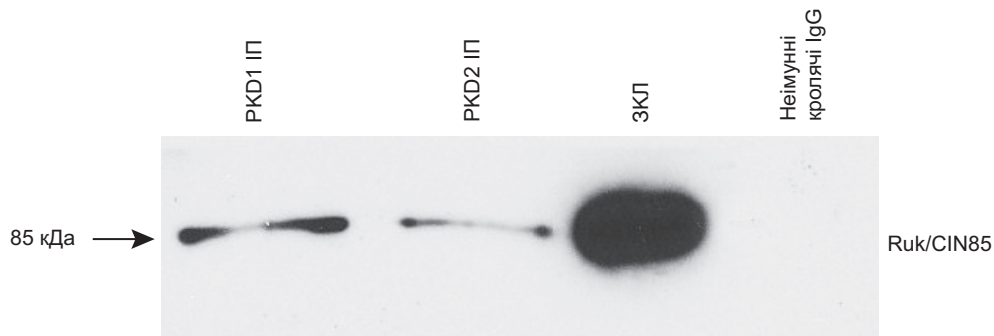


Рис. 2. PKD1 та PKD2 взаємодіють з Ruk/CIN85 *in vivo*. PKD1 та PKD2 імунопреципітували з лізатів клітин HEK293, тимчасово трансфікованих вектором, що кодує non-tagged Ruk, з подальшим Вестерн-блот-аналізом. Детекцію Ruk/CIN85 на блотах здійснювали за допомогою моноклонального анти-SH3A антитіла

Fig. 2. PKD1 and PKD2 interact with Ruk/CIN85 *in vivo*. PKD1 and PKD2 were immunoprecipitated from lysates of HEK293 cells transiently transfected with vector encoding non-tagged Ruk, followed by Western-blot-analysis. Monoclonal antibody to SH3A domain of Ruk/CIN85 was used for detection of this protein on the blots

З метою локалізації ділянок, відповідальних за виявлену взаємодію, проведено преципітацію PKD2-Flag з лізатів тимчасово трансфікованих клітин HEK293 за допомогою GST-злитих окремих фрагментів Ruk/CIN85. Отримані преципітати аналізували Вестерн-блот аналізом з використанням моноклонального антитіла до Flag-епітопу PKD2. Згідно з отриманими результатами (рис. 3), PKD2 взаємодіє з SH3B та, частково, з SH3C доменом Ruk/CIN85, причому присутність одночасно обох вказаних доменів суттєво посилює цю взаємодію. Використання як фрагменту GST-SH3ABC не приводило до прогресивного зростання рівня зв'язування. Несподіваним виявився факт, що найефективніше PKD2 взаємодіє з Про-багатою ділянкою Ruk/CIN85 (хоча і не містить Про-зв'язувальних доменів) і виявляє значно нижчу спорідненість до суперспіралізованої ділянки. Водночас трансфекція клітин

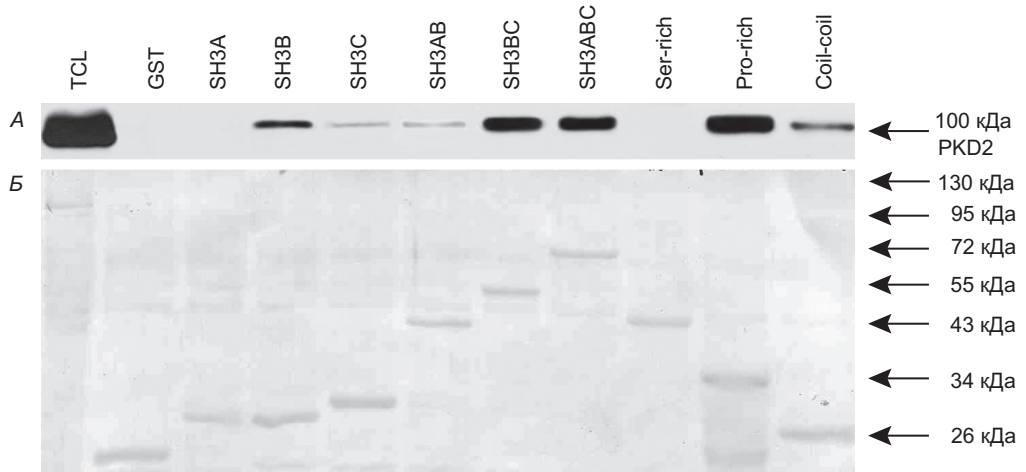


Рис. 3. PKD2 взаємодіє з поєднанням SH3 доменів, багатим на пролін районом і суперспіралізованим доменом Ruk/CIN85 *in vitro*. Flag-тагований PKD2 тимчасово експресували в клітинах HEK293. Для преципітації PKD2 з лізатів трансфікованих клітин використовували GST-кон'юговані форми окремих ділянок Ruk/CIN85.

A – блот, білки на якому замальовані Coomassie R-250; B – результати імуноблот-аналізу

Fig. 3. PKD2 binds to combination of SH3 domains, proline-rich region and coil-coiled domain of Ruk/CIN85 *in vitro*. Flag-tagged PKD2 was transiently expressed in HEK293 cells. To precipitate PKD2 from lysates of transfected cells, GST-fusion forms of separate Ruk/CIN85 regions were used.

A – Proteins on the blot were stained with Coomassie R-250; B – Results of Western-blot analysis

HEK293 вектором, який кодував кіназо-неактивну форму PKD2, не приводила до усунення взаємодії Ruk/CIN85-PKD2 (дані не представлені). Використання буферу для лізування з подвійною концентрацією NaCl (300 мМ) для промивання преципітатів супроводжувалося зниженням рівня зв'язування PKD2 SH3ABC фрагментом при збереженні порівняно високого рівня зв'язування Pro-багатою ділянкою (дані не представлено). Це може бути відображенням різниці в значеннях K_D для цих міжмолекулярних взаємодій.

На наступному етапі дослідження зроблено спробу з'ясувати, чи дійсно PKD використовує Ruk/CIN85 як субстрат. З цією метою проведено кіназу реакцію *in vitro* в анти-PKD2-Flag імунопреципітатах з використанням окремих GST-злитих фрагментів Ruk/CIN85, як субстратів. Як видно з рис. 4, найвищий рівень включення ^{32}P з $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ спостерігається у SH3AB фрагмент і значно нижчий – у SH3ABC, SH3BC та SH3B фрагменти. Фосфорилування SH3A та SH3C доменів за умов проведення експерименту не виявлялося. За результатами проведеного експерименту можна зробити такі висновки. По-перше, ефективність модифікації SH3AB фрагменту корелює з присутністю передбачуваних центрів фосфорилування для PKD у положенні Thr88, що локалізований у спейсерній ділянці між SH3A і B доменами, та Thr144 у складі SH3B домену. По-друге, присутність SH3C домену накладає конформаційні обмеження на доступність центрів фосфорилування для кінazi, що призводить до зниження рівня включення ^{32}P в SH3ABC та SH3BC фрагменти. Ці дані узгоджуються з нашими попередніми дослідженнями, згідно з якими SH3C домен не бере участі у внутрішньомолекулярних взаємодіях, але може відігравати регуляторну роль на рівні забезпечення загальної конформації Ruk для

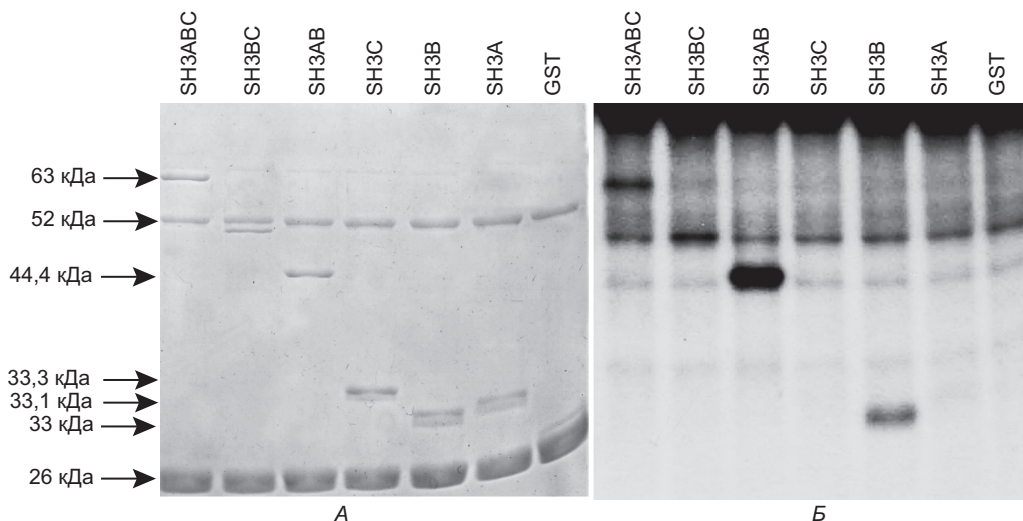


Рис. 4. PKD2 фосфорилує Ruk/CIN85 *in vitro*. Flag-тагований PKD2 тимчасово експресували в клітинах HEK293 з подальшою імунопреципітацією за допомогою моноклонального анти-Flag антитіла. Кіназну реакцію проводили в імунопреципітатах за присутності $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, використовуючи як субстрати GST-кон'юговані форми окремих SH3 доменів Ruk/CIN85.

Fig. 4. PKD2 phosphorylates Ruk/CIN85 *in vitro*. Flag-tagged PKD2 was transiently expressed in HEK293 cells followed by immunoprecipitation using monoclonal anti-Flag antibody. *In vitro* kinase assay was performed in immunoprecipitates in the presence of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ using GST-fusion forms of separate Ruk/CIN85 SH3 domains as substrates.

правильного розпізнавання багатих на пролін мотивів фрагментом SH3AB. Окрім цього, зроблено припущення, що SH3C домен накладає конформаційні обмеження на суперспіралізований район, обмежуючи рівень олігомеризації [3, 15].

До механізмів регулювання біологічної активності сигнальних білків, крім різних типів посттрансляційної модифікації, зазвичай відносять між- і внутрішньомолекулярні асоціації з інгібіторними молекулами або доменами, які можуть руйнуватись у відповідь на специфічний фізіологічний стимул [28]. Ruk/CIN85 є прикладом авторегулювання адаптерного білка, опосередкованого взаємодією SH3A домену з власними багатими на пролін мотивами. Водночас активність каталітичного домену PKD, локалізованого у С-кінцевій ділянці, також регулюється внутрішньомолекулярно за участю двох повторів багатих на цистеїн районів типу Zn-пальців, розділених дуже довгою спейсерною ділянкою, та плекстрин-гомологічного (PH) домену, локалізованих у N-кінцевій частині молекули [32]. Оскільки Ruk/CIN85 не втрачає здатності взаємодіяти з кіназо-неактивною формою PKD, то, найімовірніше, високоафінна взаємодія кінази з багатим на пролін районом адаптерного білка опосередковується її N-кінцевою регуляторною ділянкою, специфічні сайти зв'язування в межах якої поки що не ідентифіковано. Ці дані дають змогу висунути робочу гіпотезу про можливість реципрокного конкурентного витіснення із внутрішньомолекулярних взаємодій низькоафінних лігандів високоафінними у складі сигнальних молекул-партнерів. Ми також припускаємо, що фосфорилування специфічних залишків Ser/Thr, локалізованих як у районі SH3AB доменів, так і з С-кінця від багатого на пролін району, може додатково дестабілізувати

автоінгібіторну конформацію Ruk/CIN85. Аналіз багатого на пролін району PKD1/2 не виявив типових RxxxPR мотивів для SH3-доменів Ruk/CIN85, хоча в літературі описані субоптимальні ліганди для SH3 доменів, які включають один залишок проліну і, ймовірно, можуть використовуватися для стабілізації взаємодії білків [33, 40, 41]. Відомо також, що послідовність GAPPR у цитозольному компоненті p47^{phox} NADPH оксидази може набувати конформації спіралі PPII, хоча і не є канонічним SH3-зв'язувальним мотивом [42]. За результатами проведених досліджень можна припустити, що додатковий вклад у стабілізацію комплексу вносить взаємодія лужного суперспіралізованого району Ruk/CIN85 з кислим доменом PKD1/2, локалізованим між CRD і PH доменами. Таким чином, Ruk/CIN85 встановлює з PKD1/2 множинні контакти (низько- та високоафінні), які можуть забезпечувати взаємне регулювання біологічних функцій цих двох сигнальних білків і модулюватися фосфорилуванням.

ВИСНОВОК

Отримані дані дають змогу припустити, що PKD є новим зв'язувальним партнером Ruk/CIN85, залученим до регулювання його функціональної активності шляхом фосфорилування. Описана мережа взаємодій може забезпечувати взаємну регуляцію переходів цих сигнальних молекул від автоінгібувальної конформації до активної, яка, додатково, може контролюватися за рахунок посттрансляційної модифікації білків.

1. Aissouni Y., Zapart G., Iovanna J.L. et al. CIN85 regulates the ability of MEKK4 to activate the p38 MAP kinase pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 2005; 338(2): 808–814.
2. Borinstein S.C., Hyatt M.A., Sykes V.W. et al. SETA is a multifunctional adapter protein with three SH3 domains that binds Grb2, Cbl, and the novel SB1 proteins. **Cell. Signal**, 2000; 12(11): 769–779.
3. Borthwick E.B., Korobko I.V., Courtney L. et al. Multiple domains of Ruk/CIN85/SETA/CD-2BP3 are involved in interaction with p85 α regulatory subunit of PI 3-kinase. **J. Mol. Biol**, 2004; 343(4): 1135–1146.
4. Bowden E.T., Barth M., Thomas D. et al. An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. **Oncogene**, 1999; 18(31): 4440–9.
5. Buchman V.L., Luke C., Borthwick E.B. et al. Organization of the mouse Ruk locus and expression of isoforms in mouse tissues. **Gene**, 2002; 295(1): 13–17.
6. Chen B., Borinstein S.C., Gillis J. et al. The glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in astrocytes. **J. Biol. Chem**, 2000; 275(25): 19275–19281.
7. Dikic I. CIN85/CMS family of adaptor molecules. **FEBS Lett**, 2002; 529(1): 110–115.
8. Dikic I., Giordano S. Negative receptor signaling. **Curr. Opin. Cell Biol**, 2003; 15(2): 128–35.
9. Dustin M.L., Olszowy M.W., Holdorf A.D. et al. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. **Cell**, 1998; 94(5): 667–77.
10. Gaidos G., Soni S., Oswald D.J. et al. Structure and function analysis of the CMS/CIN85 protein family identifies actin-bundling properties and heterotypic-complex formation. **J. Cell Sci**, 2007; 120(Pt 14): 2366–77.
11. Gout I., Middleton G., Adu J. et al. Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. **EMBO J.**, 2000; 19(15): 4015–4025.
12. Haglund K., Shimokawa N., Szymkiewicz I., Dikic I. Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2002; 99(19): 12191–12196.

13. 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(5): 798–812.
14. Havrylov S., Rzhepetsky Y., Malinowska A. et al. Proteins recruited by SH3 domains of Ruk/CIN85 adaptor identified by LC-MS/MS. **Proteome Sci**, 2009; 7:21–30.
15. Ilytska O.M., Drel' V.R., Shuvayeva H.Yu. et al. Intra- and intermolecular interactions mediated by adaptor protein Ruk/CIN85/SETA. **Biopolymers and Cell**, 2005; 21(1): 48–54.
16. Kit Yu.Ya., Drel V.R., Petriv O.I. et al. Adaptor protein Ruk1 forms protein-protein complexes with endonuclease activity in HEK293 cells. **Biochemistry (Moscow)**, 2003; 68(7): 810–815.
17. Kowanetz K., Husnjak K., Holler D. et al. CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of EGF receptors. **Mol. Biol. Cell**, 2004; 15(7): 3155–3166.
18. Kowanetz K., Szymkiewicz I., Haglund K. et al. Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. **J. Biol. Chem**, 2003; 278(41): 39735–39746.
19. Kowanetz K., Terzic J., Dikic I. Dab2 links CIN85 with clathrin-mediated receptor internalization. **FEBS Lett.**, 2003; 554(1): 81–87.
20. Kurakin A.V., Wu S., Bredesen D.E. Atypical recognition consensus of CIN85/SETA/Ruk SH3 domains revealed by target-assisted iterative screening. **J. Biol. Chem**, 2003; 278(36): 34102–34109.
21. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227(5259): 680–684.
22. Liang Y., Kurakin A., Roizman B. Herpes simplex virus 1 infected cell protein 0 forms a complex with CIN85 and Cbl and mediates the degradation of EGF receptor from cell surfaces. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 2005; 102(16): 5838–5843.
23. Lynch D.K., Winata S.C., Lyons R.J. et al. A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. **J Biol Chem**, 2003 278(24): 21805–13.
24. 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(4): 275–81.
25. Moarefi I., LaFevre-Bernt M., Sicheri F. et al. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. **Nature**, 1997; 385(6617): 650–3.
26. 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; 26(3): 647–56.
27. Narita T., Nishimura T., Yoshizaki K., Taniyama T. CIN85 associates with TNF receptor 1 via Src and modulates TNF- α -induced apoptosis. **Exp. Cell Res**, 2005; 304(1): P.256–264.
28. Pawson T., Nash P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. **Science**, 2003; 300(5618): 445–452.
29. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal. Biochem**, 1977; 83(2): 346–356.
30. Petrelli A., Gilestro G.F., Lanzardo S. et al. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. **Nature**, 2002; 416(6877): 187–190.
31. Rozengurt E., Rey O., Waldron R.T. Protein kinase D signaling. **J. Biol. Chem**, 2005; 280(14): 13205–8.
32. Rykx A., De Kimpe L., Mikhalap S. et al. Protein kinase D: a family affair. **FEBS Lett**, 2003; 546(1): 81–86.
33. Sicheri F., Moarefi I., Kuriyan J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. **Nature**, 1997; 385(6617): 602–609.
34. Soubeyran P., Kowanetz K., Szymkiewicz I. et al. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. **Nature**, 2002; 416(6877): 183–187.
35. Tibaldi E.V., Reinherz E.L. CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities. **Int. Immunol**, 2003; 15(3): 313–329.
36. Tossidou I., Kardinal C., Peters I. et al. CD2AP/CIN85 balance determines receptor tyrosine kinase signaling response in podocytes. **J. Biol. Chem.**, 2007; 282(10): 7457–64.

37. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1979; 76(9): 4350–4354.
38. Verdier F., Valovka T., Zhyvoloup A. et al. Ruk is ubiquitinated but not degraded by the proteasome. **Eur. J. Biochem**, 2002; 269(14): 3402–3408.
39. Watanabe S., Take H., Takeda K. et al. Characterization of the CIN85 adaptor protein and identification of components involved in CIN85 complexes. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 2000; 278(1): 167–174.
40. Williams J.C., Weijland A., Gonfloni S. et al. The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. **J. Mol. Biol**, 1997; 274(5): 757–75.
41. Xu W., Doshi A., Lei M. et al. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. **Mol. Cell**, 1999; 3(5): 629–38.
42. Yuzava S., Suzuki N.N., Fujioka Y. et al. A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47^{phox}, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. **Genes to Cells**, 2004; 9(5): 443–456.
43. Zhang J., Zheng X., Yang X., Liao K. CIN85 associates with endosomal membrane and binds phosphatidic acid. **Cell Res**, 2009; 19(6): 733–746.

PROTEIN KINASE D INTERACTS WITH ADAPTOR PROTEIN RUK/CIN85 AND PHOSPHORYLATES IT

**Yu. A. Rzepetsky^{1,2}, A. A. Samoilenko¹, O. P. Kukharenko³,
S. V. Mikhalap⁴, S. P. Sidorenko⁴, A. Hausser⁵, L. B. Drobot¹**

¹*Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, 9, Leontovich St., Kyiv 01601, Ukraine*

²*Institute of Cell Biology NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

³*Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Academician Zabolotny St., Kyiv 03143, Ukraine*

⁴*Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine
45, Vasylykivska St., Kyiv 03022, Ukraine*

⁵*Institute of Cell Biology and Immunology, University of Stuttgart
31, Allmandring St., D-70569, Stuttgart, Germany*

Adaptor protein Ruk/CIN85 is built of multiple domains and motives involved in the intermolecular interactions. It functions as a key component of signalling networks that controls important cellular responses in coordinated fashion. The presence of many consensus motives for a number of protein kinases in Ruk/CIN85 structure suggests that phosphorylation is one of the most probable adaptor protein posttranslational modifications capable of regulating its biological activity depending on cellular context. In this study, we have demonstrated that protein kinases D (PKD) 1 and 2 co-immunoprecipitate with Ruk/CIN85 from lysates of HEK293 cells transiently transfected with pRc/CMV-Ruk₁ vector. By using the panel of Ruk/CIN85 GST-fusion fragments for PKD2-Flag precipitation, it was shown that PKD2 interacts with SH3B and, to a less extent, with SH3C Ruk domains, while the simultaneous presence of both domains enhances this interaction. It was also found that PKD2 most strongly interacts with Pro-rich region of Ruk and possesses considerably lower affinity to coil-coiled domain. The results of *in vitro* kinase assay using anti-PKD2-Flag immunoprecipitates and GST-fusion forms of Ruk SH3 domains, as substrates showed that the highest level of radioactive ³²P incorporation from [γ -³²P]ATP was observed in SH3AB fragment comparing with considerably lower intensity of SH3ABC and SH3B

phosphorylation. The obtained data suggest that PKD is a novel binding partner for Ruk/CIN85 involved in the control of its functional activity through phosphorylation.

Key words: adaptor proteins, kinases, phosphorylation, Ruk/CIN85, PKD1/2.

ПРОТЕИНКИНАЗА D ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С АДАПТЕРНИМ БЕЛКОМ RUK/CIN85 И ФОСФОРИЛИРУЕТ ЕГО

Ю. А. Ржепецкий^{1,2}, А. А. Самойленко¹, А. П. Кухаренко³,
С. В. Михалап⁴, С. П. Сидоренко⁴, А. Гауссер⁵, Л. Б. Дробот¹

¹Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины
ул. Леонтовича, 9, Киев 01601, Украина

²Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова, 14–16, Львов 79005, Украина

³Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев 03143, Украина

⁴Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, ул. Васильковская, 45, Киев 03022, Украина

⁵Институт клеточной биологии и иммунологии, Штуттгартский Университет,
ул. Алмандринг, 31, Штуттгарт Д-70569, Германия

Адаптерный белок Ruk/CIN85, в состав которого входят множественные домены и мотивы, вовлеченные в межмолекулярные взаимодействия, функционирует как ключевое звено сигнальных сетей, обеспечивающих координированный контроль важных физиологических ответов клеток. Наличие большого количества консенсусных мотивов для ряда протеинкиназ в структуре Ruk/CIN85 свидетельствует о том, что фосфорилирование является одной из наиболее вероятных посттрансляционных модификаций адаптерного белка, способных регулировать его биологическую активность в зависимости от клеточного контекста. В этой работе нами продемонстрировано, что протеинкиназы D (PKD) 1 и 2 копреципитируют с Ruk/CIN85 из лизатов клеток HEK293, временно трансфицированных вектором pRc/CMV-Ruk₁. С использованием панели GST-слитых фрагментов Ruk/CIN85 для преципитации PKD2-Flag показано, что PKD2 взаимодействует с SH3B и, частично, с SH3C доменом Ruk, причем одновременное присутствие обоих указанных доменов значительно усиливает это взаимодействие. Оказалось, что наиболее эффективно PKD2 взаимодействует с Pro-богатым участком Ruk и проявляет значительно более низкое сродство к суперспирализованному участку. По результатам киназной реакции *in vitro* в анти-PKD2-Flag-иммунопреципитатах с использованием GST-слитых SH3 доменов Ruk в качестве субстратов, наиболее высокий уровень включения радиоактивного ³²P из [γ -³²P]АТФ наблюдался в фрагмент SH3AB по сравнению со значительно более низкой интенсивностью фосфорилирования SH3ABC, SH3BC и SH3B фрагментов. Полученные данные позволяют предположить, что PKD является новым связывающим партнером Ruk/CIN85, вовлеченным в регуляцию его функциональной активности путем фосфорилирования.

Ключевые слова: адаптерные белки, киназы, фосфорилирование, Ruk/CIN85, PKD1/2.

Одержано: 25.09.2009