

## Аналіз білок-білкових взаємодій, опосередкованих адаптерним білком Grb2, у процесі мегакаріоцитної диференціації клітин еритролейкемії людини лінії K562

О. М. Ільницька, О. Ю. Паливода, З. М. Гусак, Т. Й. Вальовка,  
Н. І. Ігуменцева, С. Й. Кусень, Л. Б. Дробот

Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України  
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

*Вивчали білок-білкові взаємодії, опосередковані адаптерним білком Grb2, у процесі PMA-індукованої мегакаріоцитної диференціації клітин еритролейкемії людини лінії K562. Аналіз зв'язування здійснювали in vitro з використанням рекомбінантних форм Grb2 (повнорозмірної форми Grb2 та його N- і C-кінцевих SH3 доменів), кон'югованих з етатіон-S-трансферазою. Ідентифіковано білки, зв'язування яких модулюється в клітинах, що диференціюються, та проаналізовано динаміку їхнього зв'язування. Припускаємо, що ряд мішеней Grb2 може використовуватися спільно в сигнальних шляхах, залучених як до стимуляції мітогенезу, так і до індукції диференціації лейкоцитних клітин K562.*

**Вступ.** Як свідчать експериментальні дані останніх років, більшість сигнальних шляхів, залучених до контролю росту, диференціації і трансформації клітин, ініціюється і/або регулюється шляхом фосфорилювання білків по залишках Туг як рецепторними, так і цитоплазматичними тирозиновими протеїнкіназами. Ключовими ланками вказаних сигнальних шляхів є невеликі за розміром адаптерні білки, побудовані переважно з доменів, основна функція яких полягає у забезпеченні білок-білкової взаємодії в процесі внутрішньоклітинного перетворення і проведення регуляторних сигналів. Більшість адаптерів включають одну або кілька копій Src-гомологічних доменів 2-го (SH2) і 3-го (SH3) типів, що впізнають і зв'язують залишки pTug і Pro-багаті райони відповідно у білках-мішенях [1]. У ряді випадків до складу адаптерних білків можуть входити додаткові функціональні модулі, такі як pTug-зв'язуючий (PTB) домен [2].

Слід підкреслити, що взаємодії з ефекторними білками, опосередковані SH3 доменами, є, як правило, конститутивними, в той час як модифікація специфічних залишків Туг визначає їхню асоціацію з SH2 або PTB доменами. В такий спосіб адаптери забезпечують формування надмолекулярних сигнальних комплексів, склад яких і стехіометрія між окремими компонентами залежать від конкретного клітинного контексту і фізіологічних потреб клітин.

Ph1-позитивні клітини еритролейкемії людини лінії K562 характеризуються високим рівнем експресії химерного онкобілка p210Bcr-Abl з конститутивною тирозинкіназою активністю і збереженою здатністю до диференціації під дією індукторів різної хімічної природи і скерованості дії [3, 4]. Одним з основних механізмів, за допомогою якого реалізується трансформуючий потенціал p210Bcr-Abl, є активація Ras-залежного сигнального шляху [5, 6]. Встановлено, що як потенційні ланки Bcr-Abl-опосередкованої активації p21Ras в гематопоезісних клітинах можуть функціонувати щонай-

© О. М. ІЛЬНИЦЬКА, О. Ю. ПАЛИВОДА, З. М. ГУСАК,  
Т. Й. ВАЛЬОВКА, Н. І. ІГУМЕНЦЕВА, С. Й. КУСЕНЬ,  
Л. Б. ДРОБОТ, 1999

менше три різних адаптерних білки (Grb2, Shc і CrkL), кожен з яких здатен активувати фактори, що стимулюють обмін гуанілових нуклеотидів у нуклеотид-зв'язуючому центрі високоафінної GTPази, і виявляється в комплексах з Vcr-Abl [5—7]. Аутофосфорилування залишка Tyr177 в активованій химерній протеїнкіназі супроводжується формуванням зв'язуючого центра для SH2 домена Grb2, що характеризується наступною лінійною організацією функціональних модулів: SH3-SH2-SH3 [5]. Заміщення Tyr177 на Phe попереджує зв'язування Grb2, призводить до блокування активації p21Ras, а також до значного зниження трансформуючої активності Vcr-Abl у Rat1 фібробластах, але не в гематопоетичних клітинах [5, 8]. Це, очевидно, пов'язано з тим, що взаємодія Grb2 з Vcr-Abl у гематопоетичних клітинах може здійснюватися не лише прямо, але й опосередковано. До останнього шляху причетний білок c-Cbl, здатний фосфорилуватися по множинних залишках Tyr у трансформованих клітинах, встановлюючи, в свою чергу, як прями, так і опосередковані контакти з химерним онкобілком [9]. Про важливу роль Grb2 у Vcr-Abl-залежній трансформації гематопоетичних клітин свідчать також наступні дані.

Так, «down»-регуляція Grb2 за допомогою антисенсових олігонуклеотидів супроводжується селективним пригніченням росту Vcr-Abl-позитивних клітин, але не Vcr-Abl-негативних клітин [10]. Крім цього, експресія делеційних мутантів Grb2, позбавлених N- чи C-кінцевого SH3 доменів, у клітинах лінії K562 індукує їх до диференціації за еритроїдним шляхом [11]. Таким чином, пошук засобів, за допомогою яких можна втручатися у процес взаємодії Vcr-Abl з Grb2 і блокувати його, є потенційним підходом, скерованим на досягнення реверсії трансформованого фенотипу Ph1-позитивних лейкемічних клітин.

Враховуючи викладене, ми вирішили проаналізувати спектри білків, що зв'язуються *in vitro* з рекомбінантними формами Grb2 (повнорозмірною формою та N- і C-кінцевими SH3 доменами), кон'югованими з глутатіон-S-трансферазою (GST), у процесі мегакаріоцитної диференціації клітин лінії K562, індукованої форбол-12-міристат-13-ацетатом (PMA).

**Матеріали і методи.** В експериментах використовували клітини еритролейкемії людини лінії K562, отримані з колекції клітинних культур Інституту цитології РАН. Клітини культивували в середовищі RPMI 1640 («Sigma», США) з додаванням 10 % інактивованої ембріональної сироватки телят («GibcoBRL»), 2 мМ L-глутаміну, 50 МО/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину («Gibco-

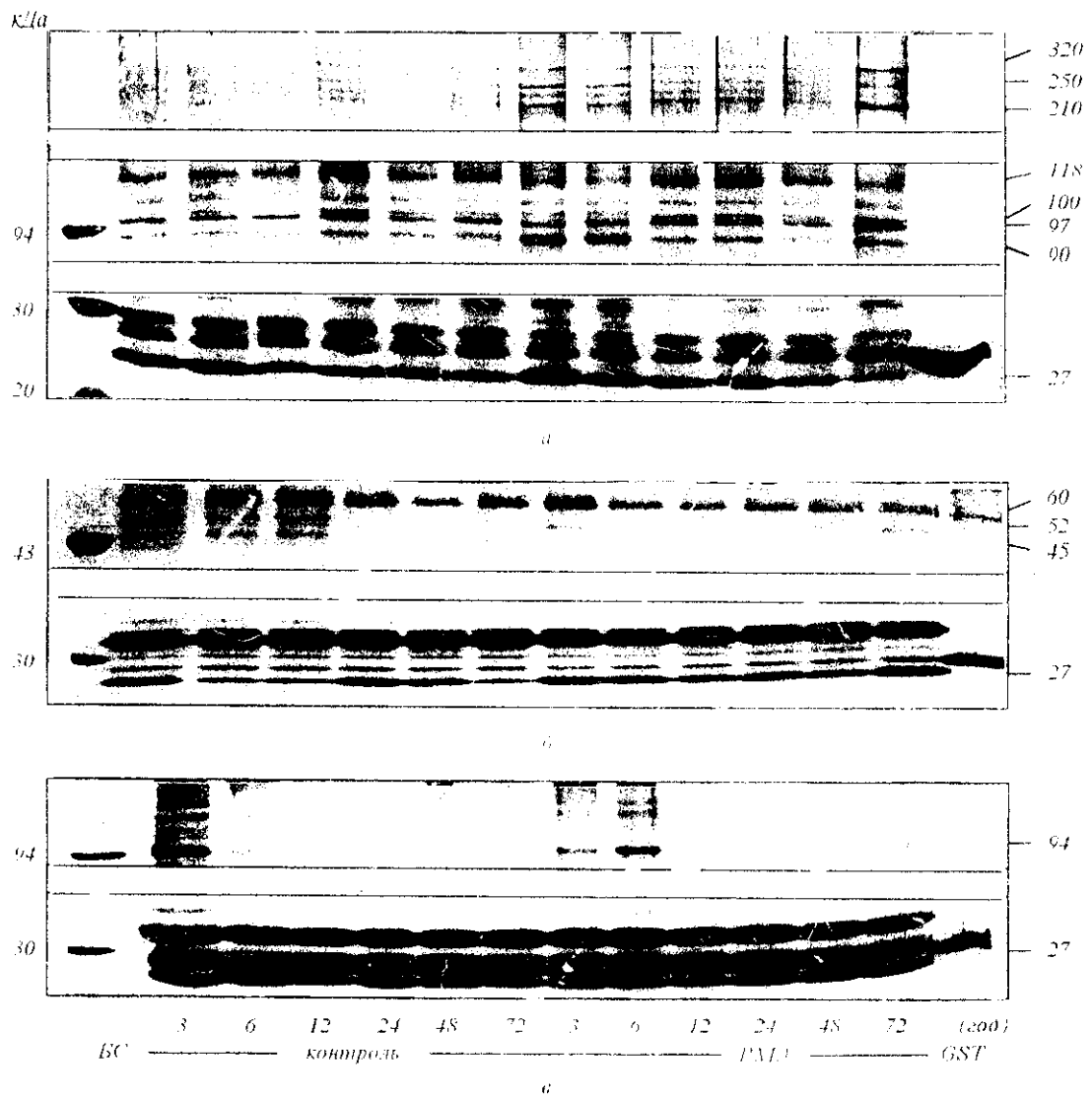
BRL») у зволоженої атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub> при температурі 37 °С. Мегакаріоцитну диференціацію клітин K562, що знаходилися в експоненціальній фазі росту, індукували PMA («Sigma»). Для цього, необхідну для проведення експерименту кількість клітин висівали в середовище для культивування (2·10<sup>5</sup> кл/мл) і інкубували з або без PMA (160 нМ) протягом трьох діб.

Після закінчення зазначеного часу інкубації клітини (1·10<sup>7</sup> кл/пробу) двічі промивали охолодженим забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,7 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,3) і лізували на льодяній бані в буфері, що містив 10 мМ трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1% тритон X-100, 5 мМ EDTA, 50 мМ NaF, 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 мМ бензамідин, 25 мкг/мл апротиніну («Sigma»), 10 мкг/мл лейпептину («Sigma»), 1 мкг/мл пенстатину («Fluka», Швейцарія), 1 мМ ФМСФ («Fluka»), протягом 20 хв. Детергент-нерозчинну фракцію осаджували центрифугуванням при 12000 об/хв протягом 15 хв. Концентрацію білка в супернатантах визначали за методом Петерсона [12].

Білок-білкові взаємодії вивчали *in vitro* з використанням рекомбінантних GST-кон'югованих форм Grb2 (повнорозмірної форми та фрагментів, що відповідають N- та C-кінцевим SH3 доменам Grb2). Для трансформації клітин *Escherichia coli* (DH-5α) використовували відповідні *pGEX-2T* плазмідні вектори. Експресію GST-кон'югованих білків у бактеріях індукували додаванням 0,5 мМ ізопропіл-1-тіо-β-D-галактопіранозиду.

Очистку GST-кон'югованих форм Grb2 із озвучених бактеріальних лізатів здійснювали за допомогою глутатіон-сефарози («Pharmacia Biotech»). Стандартизовані за концентрацією білка лізати клітин K562 інкубували протягом 2 год при 4 °С і постійному перемішуванні з GST-кон'югованими білками (5 мкг білка на пробу).

Для оцінки рівня неспецифічного зв'язування лізати контрольних клітин K562 інкубували з GST. Утворені білкові комплекси осаджували додаванням глутатіон-сефарози (25 мкл 50 %-ї суспензії сефарози на пробу) з наступною інкубацією протягом 1 год при 4 °С. Після завершення інкубації гранули сефарози промивали 4 рази буфером лізису і прогрівали в 25 мкл двократного буфера для зразків Леммлі при температурі 95 °С протягом 5 хв. Білки, що специфічно зв'язалися з глутатіон-сефарозою, розділяли в градієнтному (5—18 %) поліакриламідному гелі (ПААГ) у буферній системі Леммлі [13]. Отримані гелі зафарбовували сріблом [14].



Зв'язування білків лізатів контрольних і PMA-індукованих клітин K562 з рекомбінантними GST-кон'югованими формами Grb2: *a* — з повнорозмірною формою Grb2; *б* — з N-кінцевим SH3 доменом; *в* — C-кінцевим SH3 доменом. GST — зв'язування білків лізатів контрольних клітин з глутатіон-S-трансферазою; BC — білки-стандарти. Клітинні лізати отримували на 3, 6, 12, 24, 48 і 72-ту год культивування клітин K562 з або без PMA (160 нМ)

**Результати та обговорення.** Використання різноманітних *in vitro* і *in vivo* модельних систем дозволило показати, що фенотип гематопоетичних клітин, трансформованих онкобілком Bcr-Abl, характеризується проліферацією, незалежною від факторів росту [15, 16], інгібуванням здатності до апоптозу [17, 18] та зміненними адгезивними властивостями [19]. Недавно було також встановлено,

що експресія Bcr-Abl у лейкомічних клітинах M1 миші супроводжується індукцією диференціації по мієлоїдному ряду без супутньої зупинки їхньої проліферації [20].

Наведені дані дозволяють припустити, що як на якісному, так і на кількісному рівні багато сигнальних ланок може використовуватися спільно і/або перекриватися в сигнальних шляхах, залуче-

них до стимуляції мітогенезу, інгібування апоптозу і індукції диференціації в одному і тому ж типі Vcr-Abl-трансформованих клітин.

Для перевірки нашого припущення ми проаналізували зміни в спектрах білків, що взаємодіють з одним із активаторів Ras-залежного сигнального шляху, адаптерним білком Grb2, у процесі PMA-індукованої мегакаріоцитної диференціації клітин еритролейкемії людини лінії K562. Для цього лізати контрольних і індукованих клітин інкубували з GST-кон'югованими повнорозмірною формою Grb2 та його N- та C-кінцевими SH3 доменами. Розділення білків, що зв'язалися з глутатіон-сепарозою, здійснювали електрофорезом у ПААГ, а отримані гелі зафарбовували сріблом.

Як видно з рисунку, зв'язування ряду специфічних білків контрольних лізатів клітин K562 з рекомбінантними формами Grb2 не підтримується на постійному конститутивному рівні, а залежить від фази росту клітинної культури. Так, зв'язування білків з молекулярними масами 90, 97, 100, 118, 210, 250 і 320 кДа з повнорозмірною формою Grb2 досягає максимуму на 24-ту год і поступово знижується на 72-гу год культивування. Оскільки вказані білки не ідентифікуються в преципітатах з SH3 доменами, їхня взаємодія з Grb2, очевидно, опосередковується SH2 доменом. У той же час максимальний рівень асоціації p45, p52 і p60 з N-кінцевим SH3 доменом і p94 з C-кінцевим SH3 доменом виявляється на 3-ю год, знижується на 24-ту год і практично не детектується на 72-гу год. Взаємодія білка з молекулярною масою 27 кДа з усіма трьома формами Grb2 характеризується хвилеподібною динамікою з двома максимумами на 3-ю і 24-ту год. Слід зазначити, що виявлена різниця у зв'язуванні клітинних білків з SH3 доменами Grb2 у порівнянні з повнорозмірною формою може бути пов'язана із стеричними факторами, що впливають на доступність взаємодії окремих модулів зі своїми специфічними мішенями.

З отриманих нами результатів також випливає, що індукція мегакаріоцитної диференціації клітин K562 під впливом PMA супроводжується координуваними змінами у білок-білкових взаємодіях, опосередкованих Grb2. Так, характерним для індукованих клітин є посилення зв'язування з повнорозмірною формою білків з молекулярними масами 320, 210 і 100 кДа на 72-гу год культивування, коли спостерігається значне нагромадження диференційованих клітин (41 % від контролю) і пригнічення їхнього росту (58 % від контролю). До найбільш ранніх ефектів, пов'язаних з впливом PMA, слід віднести посилення зв'язування p90 з повнорозмірною формою Grb2, практично повне

інгібування взаємодії N-SH3 домену з p45, p52 і p60 на 3-ю год, а також посилення зв'язування C-SH3 домену з p94 на 6-ту год культивування в порівнянні з контролем. Крім цього, звертає на себе увагу залежність рівня зв'язування p27 з усіма трьома формами Grb2 у клітинах, що диференціюються, від відповідних показників у контролі (посилення зв'язування у випадку нижчого його рівня в контролі і навпаки).

Підсумовуючи проведені дослідження, можна припустити, що внутрішньоклітинний молекулярний ґрунт, асоційований з конкретною фізіологічною ситуацією, може впливати (через існування розгалуженої системи петель позитивних і негативних регуляторних зв'язків) на взаємодію одного з активаторів p21Ras в Vcr-Abl-трансформованих клітинах (адаптерного білка Grb2) зі своїми специфічними мішенями. Таким чином, імовірно, що індуктори диференціації можуть не просто десенситивувати функцію Ras на ранніх стадіях відповіді лейкемічних клітин, а швидше за все здатні переключати Ras-залежну сигналізацію на альтернативний шлях. До того ж ключові сигнальні білки експресуються у вигляді множинних молекулярних форм, що створює додаткові можливості для забезпечення узгодженого гнучкого контролю за різними гілками одного і того ж сигнального каскаду.

Робота була частково профінансована Міністерством науки і технологій України (грант № 5.4/38) та Західно-Українським Біомедичним дослідницьким центром (грант наданий у 1997 р.)

Автори висловлюють щире подяку співробітникам Лондонського відділення інституту ракових досліджень Людвіга Івану Гути за надання плазмідних векторів pGEX-2T/Grb2(full), pGEX-2T/Grb2(N-SH3) та pGEX-2T/Grb2(C-SH3).

*О. Н. Ильницкая, Е. Ю. Паливода, З. М. Гусак, Т. И. Валевка, Н. И. Игуменцева, С. И. Кусень, Л. Б. Дробот*

Анализ белок-белковых взаимодействий, опосредованных адаптерным белком Grb2, в процессе мегакариоцитной дифференцировки клеток эритролейкемии человека линии K562

#### Резюме

*Изучали белок-белковые взаимодействия, опосредованные адаптерным белком Grb2, в процессе PMA-индуцированной мегакариоцитной дифференцировки клеток эритролейкемии человека линии K562. Связывание анализировали in vitro с использованием рекомбинантных форм Grb2 (полноразмерной формы Grb2 и его N- и C-концевых SH3 доменов), конъюгированных с глутатион-S-трансферазой. Идентифицированы белки, связывание которых модулируется в дифференцирующихся клетках, и проанализирована динамика их связывания. Предполагается, что ряд мишеней Grb2 являются общими в сигнальных путях, вовлеченных как в стимуляцию митогенеза, так и в индукцию дифференцировки в лейкемических клетках K562.*

O. M. Il'nytska, O. Yu. Palyvoda, Z. M. Gusak, T. I. Val'ovka,  
N. I. Igumentseva, S. I. Kusen', L. B. Drobot

Analysis of protein-protein interactions mediated by adaptor protein Grb2 during the course of megakaryocytic differentiation of human erythroleukemia cell line K562

Summary

Protein-protein interactions mediated by adaptor protein Grb2 during the course of PMA-induced megakaryocytic differentiation of the human erythroleukemia cell line K562 were studied. Binding assay was performed in vitro using the recombinant forms of Grb2 (Grb2/full, Grb2/N-SH3 and Grb2/C-SH3), conjugated with glutathione-S-transferase. Proteins, binding of which are modulated in differentiated cells, were identified and binding dynamics was analysed. It is supposed that a set of Grb2 targets could be used in common in signalling pathways involved in both the stimulation of mitogenesis and the induction of differentiation in the K562 cells.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pawson T., Schlessinger J. SH2 and SH3 domains // *Curr. Biol.*—1993.—3, N 5.—P. 434—442.
2. Van der Geer P., Pawson T. PTB domain: a new protein module implicated in signal transduction // *Trends Biochem. Sci.*—1995.—20, N 7.—P. 277—280.
3. Rowley P. T., Ohlsson Wilhelm B. M., Farley B. A., LaBella S. Inducers of erythroid differentiation of K562 human leukemia cells // *Exp. Hematol.*—1981.—9, N 1.—P. 32—37.
4. Long M. W., Heffner C. H., Williams J. L., Peters C., Prochownik E. V. Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells // *J. Clin. Invest.*—1990.—85, N 4.—P. 1072—1084.
5. Pendergast A. M., Quilliam L. A., Cripe L. D., Bassing C. H., Dai Z., Li N., Batzer A., Rabun K. N., Der C. J., Schlessinger J. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein // *Cell.*—1993.—75, N 1.—P. 175—185.
6. Paül L., Liu J., Gish G., Mbamalu G., Bowtell D., Pelicci P. G., Arlinghaus R., Pawson T. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway // *EMBO J.*—1994.—13, N 4.—P. 764—773.
7. Senechal K., Halpern J., Sawyers C. L. The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the BCR-ABL oncogene // *J. Biol. Chem.*—1996.—271, N 38.—P. 23255—23261.
8. Goga A., McLaughlin J., Afar D. E., Saffaran D. C., Witte O. N. Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene // *Cell.*—1995.—82, N 6.—P. 981—988.
9. Jain S. K., Langdon W. Y., Varticovski L. Tyrosine phosphorylation of p120<sup>cb1</sup> in BCR/abl transformed hematopoietic cells mediates enhanced association with phosphatidylinositol 3-kinase // *Oncogene.*—1997.—14, N 18.—P. 2217—2228.
10. Tari A. M., Arlinghaus R., Lopez-Berestein G. Inhibition of Grb2 and Crkl proteins results in growth inhibition of Philadelphia chromosome positive leukemic cells // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1997.—235, N 2.—P. 383—388.
11. Gishizky M. L., Cortez D., Pendergast A. M. Mutant forms of growth factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92, N 24.—P. 10889—10893.
12. Peterson G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // *Anal. Biochem.*—1977.—83, N 3.—P. 346—356.
13. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—277, N 5259.—P. 680—685.
14. Gorg A., Postel W., Weser J. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins // *Sci. Tools.*—1985.—32, N 1.—P. 5—9.
15. Kabarowski J. H. S., Allen P. B., Wiedemann L. M. A temperature sensitive p210Bcr-Abl mutant defines the primary consequences of Bcr-Abl tyrosine kinase expression in growth factor dependent cells // *EMBO J.*—1994.—13, N 24.—P. 5887—5895.
16. Mandanas R. A., Boswell H. S., Lu L., Leibowitz D. Bcr-Abl confers growth factor independence upon a murine myeloid cell line // *Leukemia.*—1992.—6, N 8.—P. 796—800.
17. Rowley P. T., Keng P. C., Kosciolsek B. A. The effect of bcr-abl antisense oligonucleotide on DNA synthesis and apoptosis in K562 chronic myeloid leukemia cells // *Leuk. Res.*—1996.—20, N 6.—P. 473—480.
18. Cortez D., Stoica G., Pierce J. H., Pendergast A. M. The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signalling pathway // *Oncogene.*—1996.—13, N 12.—P. 2589—2594.
19. Verfaillie C. M., Hurley R., Zhao R. C., Prosper F., Delforge M., Bhatia R. Pathophysiology of CML: do defects in integrin function contribute to the premature circulation and massive expansion of the Bcr-Abl positive clone? // *J. Lab. Clin. Med.*—1997.—129, N 6.—P. 584—591.
20. Cambier N., Zhang Y., Vairo G., Kosmopoulos K., Metcalf D., Nicola A. N., Elefanty A. G. Expression of BCR-ABL in M1 myeloid leukemia cells induces differentiation without arresting proliferation // *Oncogene.*—1999.—18, N 2.—P. 343—352.

Надійшла до редакції 19.05.99