

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИКИ**

На правах рукопису

МОРДЕРЕР ДМИТРО ЄВГЕНОВИЧ

УДК 577.29

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ Ca^{2+} -ЗАЛЕЖНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ
СКАФОЛДНОГО БІЛКА ITSN1 ТА ЙОГО ВЗАЄМОДІЇ З ЦИТОСКЕЛЕТНИМ
БІЛКОМ STOP У НЕЙРОНАХ**

03.00.03 - молекулярна біологія

ДИ С Е Р Т А Ц І Я

на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник

Риндич Алла Володимирівна

доктор біологічних наук, професор

член-кореспондент НАН України

КИЇВ – 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	13
1.1. Загальні принципи функціонування скафолдних білків.....	13
1.2 Роль скафолдного білка ITSN1 у внутрішньоклітинних процесах.....	18
1.2.1. Загальні відомості про скафолдні білки родини ITSN.....	18
1.2.2. Роль ITSN1 у клатрин-опосередкованому ендоцитозі.....	20
1.2.3. Участь ITSN1 у сигнальній трансдукції.....	23
1.2.4. Роль ITSN1 у функціонуванні нейронів.....	26
1.2.5. Шляхи регуляції функціонування ITSN1.....	32
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	36
2.1. Хімічні реактиви і ферменти.....	36
2.2. Біологічний матеріал.....	37
2.3. Виділення РНК.....	37
2.4. Синтез кДНК.....	37
2.5. Плазмідні конструкції.....	38
2.6. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).....	40
2.7. Електрофорез нуклеїнових кислот у агарозному гелі.....	40
2.8. Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю.....	40
2.9. Реакції рестрикції та лігування.....	41
2.10. Отримання компетентних клітин <i>E. coli</i> та їх трансформація плазмідною ДНК.....	41
2.11. Виділення плазмідної ДНК.....	42
2.12. Експресія рекомбінантних білків в <i>E. coli</i>	43

2.13 Очищення рекомбінантних білків з використанням афінної хроматографії	44
2.14. Приготування загального лізату розчинних білків з мозку миші	44
2.15. Преципітація партнерів цільових GST-злитих білків з лізатів клітин та тканин.....	44
2.16. Преципітація партнерів цільових His-злитих білків з лізатів клітин і тканин.....	45
2.17. Ко-імунопреципітація білкових комплексів.....	46
2.18. Виділення фракції білків, що зв'язуються з кальмодуліном.....	46
2.19. <i>In vitro</i> кіназна реакція	46
2.20. Білковий електрофорез в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах	47
2.21. Вестерн-блот аналіз	47
2.22. Фарбування білків у гелі барвником Кумасі бриліантовий синій.....	48
2.23. Денситометричні вимірювання інтенсивності сигналу від білкових смуг у гелях та блотах	48
2.24. Біоінформатичне передбачення сайтів фосфорилування.....	49
2.25. Фарбування фосфорильованих білків у поліакриламідному гелі	49
2.26. MALDI-TOF мас-спектрометрія	50
2.27. Тандемна мас-спектрометрія.....	50
2.28. Культивування клітин	51
2.29. Трансфекція клітин в культурі плазмідною ДНК.....	52
2.30. Аналіз резистентності мікротрубочок до холоду і нокодазолу	53
2.31. Імунофлюоресцентний аналіз клітин	53
2.32. Аналіз морфології дендритного дерева нейронів.....	54

	4
2.33. Статистична обробка результатів.....	55
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	56
3.1. Пошук нових нейрональних білків-партнерів <i>ITSN1</i>	56
3.1.1. <i>Визначення білків-партнерів SH3 доменів ITSN1, злитих з GST, в лізатах головного мозку миші.</i>	56
3.1.2. <i>Перевірка результатів мас-спектрометричного аналізу.</i>	64
3.1.4. <i>Вплив ITSN1 на STOP(MAP6)-опосередковану стабілізацію мікротрубочок.</i>	69
3.2. Вплив <i>ITSN1</i> на ріст дендритів у клітин первинної культури нейронів гіпокампу щурів	75
3.3 <i>Ca²⁺-залежна регуляція ITSN1</i>	83
3.3.1. <i>Вплив іонів Ca²⁺ на зв'язування EH доменів ITSN1 з Епсином 1.</i>	83
3.3.2. <i>Ca²⁺-кальмодулін-залежне фосфорилування ITSN1</i>	88
3.3.3 <i>Ідентифікація сайтів Ca²⁺/кальмодулін-залежного фосфорилування ITSN1</i>	92
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	97
ВИСНОВКИ	112
ДОДАТОК А	114
Вторинні спектри фосфорильованих пептидів, отримані за допомогою тандемної мас-спектрометрії	114
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	116

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- 293 – клітини ембріональної нирки людини 293
- AP2 – адаптерний білок 2
- aPKC – атипова протеїнкіназа C
- CBL – білок лімфоми В-клітин КасітасА
- CCR – надспіралізована ділянка
- CDC42 – білок контролю клітинного поділу 42
- CdGAP – активатор ГТФазної активності CDC42
- Dap160 – асоційований з динаміном білок масою 160 кДа
- DH domain – домен, гомологічний до Dbl
- EGFP – покращений зелений флуоресцентний білок
- EH domain – домен, гомологічний до Eps15
- EPS15 – субстрат рецептора епідермального фактора росту 15
- ERK – кіназа, що регулюється позаклітинним сигналом
- GST - глутатіон-S-трансфераза
- HeLa – клітини раку шийки матки Генрієтти Лакс
- JNK – N-кінцева кіназа білка c-Jun
- LB – середовище Лурії-Бертрані
- MALDI-TOF – матрикс-асоційована лазерна десорбційна іонізаційна часопроботна мас-спектрометрія
- MAP-кіназа - активована мітогеном протеїнкіназа
- MAP6 – асоційований з мікротрубочками білок 6
- MOWSE – алгоритм пошуку білків за молекулярною масою протеолітичних фрагментів
- Ni-NTA - нікельнітрилтриоцтова кислота
- N-WASP – нейрональний білок синдрому Віскота-Олдрича
- PBS — буферний фосфатний розчин
- PH domain – домен, гомологічний до плекстрину
- PI3K – фосфоінозитид-3-кіназа

RAS – білок саркоми щурів

SH3 domain – гомологічний до Src домен 3

Spry – гомологічний до sprouty білок 2

STOP– стабілізуючий поліпептид, що взаємодіє тільки з мікротрубочками

Tris - трис-гідроксиметиламінометан

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ГТФаза – гуанозинтрифосфат-гідролаза

ДСН – додецилсульфат натрію

ДТТ – дитіотреїтол

ЕГТА – етиленглікольтетраоцтова кислота

ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція з використанням зворотної
транскрипції

ІПТГ - ізопропіл-D-тіогалактопіранозид

ПААГ — поліакриламідний гель

ВСТУП

Актуальність теми. Перебіг процесів, необхідних для життєдіяльності клітин, супроводжується динамічним утворенням багатокомпонентних молекулярних комплексів, необхідних для виконання відповідних біологічних функцій. Формування таких комплексів здійснюється за допомогою скафолдних білків. Молекули цих білків містять декілька модулів, які взаємодіють з іншими молекулами. Таким чином, скафолдні білки, слугуючи платформою для побудови молекулярних комплексів і забезпечуючи їх просторово-часову організацію, здійснюють модуляцію функціонування клітинних систем, спрямовуючи перебіг того чи іншого процесу в потрібний бік.

Скафолдні білки родини ITSN задіяні в перебігу процесів ендоцитозу, сигнальної трансдукції та реорганізації цитоскелету [1]. Білки, що входять до цієї родини, кодуються двома генами – *ITSN1* та *ITSN2*. У геномі людини *ITSN1* було картовано у хромосомі 21 [2] і відмічено його підвищену експресію у осіб з синдромом Дауна [3]. Крім того, підвищення експресії *ITSN1* пов'язують з розвитком таких нейродегенеративних захворювань, як хвороба Альцгеймера та хорея Гентінгтона [4,5]. *ITSN1* є одним з можливих факторів, що зумовлює розвиток симптомів цих хвороб, зокрема порушення когнітивних функцій центральної нервової системи. Було показано, що *ITSN1* залучений до низки процесів, пов'язаних з розвитком та функціонуванням нейронів, зокрема до ендоцитозу синаптичних везикул та формування дендритних шипиків у нейронах гіпокампу щурів [6,7]. Крім того, хоча експресія *ITSN1* характерна практично для всіх типів клітин організму, нейрони містять унікальні ізоформи цього білка, утворені шляхом альтернативного сплайсингу [8]. Це свідчить про важливість *ITSN1* для функціонування нейронів.

Для передбачення наслідків підвищення експресії *ITSN1* при синдромі Дауна та інших нейродегенеративних захворюваннях важливим є встановлення

його ролі у розвитку та функціонуванні нейронів. На сьогоднішній день дослідження ITSN1 зосереджені в основному на його функціях, загальних для багатьох типів клітин, на кшталт участі у клатрин-опосередкованому ендоцитозі або організації внутрішньоклітинних сигнальних каскадів. В той же час, участь ITSN1 у специфічних для нейронів клітинних процесах залишається менш дослідженою. Одним з шляхів дослідження ролі ITSN1 в цих клітинах є визначення білків-партнерів, з якими цей білок формує комплекси. Крім того, встановлення способів регуляції активності ITSN1 важливе для виявлення його зв'язку з певними клітинними процесами. Проведення досліджень у цьому напрямку дозволить більш детально розкрити значення ITSN1 в нейронах, а також механізми регуляції його активності. Це сприятиме створенню підґрунтя для розробки засобів керування його активністю, що має значення для створення терапії вищезазначених хвороб.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукових проектів відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України «Організація і регуляція ITSN-залежних шляхів (державний реєстраційний номер №0106U005435, 2007-2011 рр.), «Молекулярні взаємодії інтерсектинів як компонентів ендоцитозу, перебудов актинового цитоскелету та підтримки вірусної латентності» (державний реєстраційний номер №0111U008918 2012-2016 рр.), «Патології людини: від молекулярного до клітинного рівня» (державний реєстраційний номер №0113U002831, 2013-2016 рр.), «Молекулярні механізми клітинної сигналізації в нормі та патології: фокус на іонні канали» (номер F46.2/001, 2010-2012 рр.).

Мета та завдання. Метою роботи було дослідити нові взаємодії ITSN1 у нейронах, його вплив на розвиток нейронів та потенційні шляхи регуляції його функціонування. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

1. Визначити нові білки-партнери ITSN1 в нейронах за допомогою преципітації білкових комплексів *in vitro* в поєднанні з MALDI-TOF мас-спектрометрією.
2. Встановити, які домени ITSN1 забезпечують взаємодію з ідентифікованими партнерами
3. Дослідити вплив пригнічення експресії гена ITSN1 на розвиток дендритного дерева культивованих первинних нейронів гіпокампу щурів, використовуючи морфометричний аналіз клітин.
4. Перевірити можливість фосфорилування ITSN1 Ca^{2+} -залежними кіназами *in vitro*.
5. Визначити сайти Ca^{2+} -залежного фосфорилування ITSN1 за допомогою тандемної мас-спектрометрії.

Об'єкт дослідження. Функціонування скафолдного білка ITSN1.

Предмет дослідження. Білок-білкові взаємодії та пост-трансляційні модифікації скафолдного білка ITSN1.

Методи дослідження. Клонування фрагментів кДНК, афінна хроматографія, імунопреципітація та Вестерн-блот аналіз, кіназна реакція *in vitro*, мас-спектрометрія MALDI-TOF, тандемна мас-спектрометрія, преципітація білкових комплексів із використанням GST-злитих білків, короткотривала трансфекція первинної культури нейронів гіпокампу щурів, конфокальна флуоресцентна мікроскопія, широкопольна флуоресцентна мікроскопія, морфометричний аналіз нейронів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше було ідентифіковано взаємодію адаптерного білка ITSN1 з нейрональною ізоформою цитоскелетного білка STOP(MAP6) в нейронах, визначено, що взаємодію здійснює SH3A-домен ITSN1. Вперше продемонстровано часткову ко-локалізацію ITSN1 та STOP в сомі та дендритах культивованих первинних нейронів гіпокампу щурів. Вперше визначено, що зниження експресії *ITSN1* призводить до пригнічення росту дендритів у первинних нейронах гіпокампу щурів. Вперше показано існування

Ca²⁺/кальмодулін-залежного фосфорилування ITSN1 та визначено сайти фосфорилування у складі білка.

Практичне значення одержаних результатів. Ідентифікація нових функціональних зв'язків ITSN1 у нейронах, а також механізмів регуляції його активності, дозволить детальніше вивчити механізми функціонування білка та передбачати наслідки підвищення його експресії при трисомії хромосоми 21, яка спостерігається при синдромі Дауна. Визначення ролі ITSN1 у життєдіяльності нейронів, зокрема у розвитку дендритного дерева, дозволить розширити наші знання про механізми розвитку захворювань, з якими асоційований ITSN1, що може сприяти розробці нових терапевтичних підходів для їх лікування. Дослідження Ca²⁺-залежної регуляції ITSN1 дозволить зрозуміти зміни, що відбуваються у його функціонуванні у відповідь на зміну умов оточуючого середовища, і в перспективі може стати основою для розробки інструментів впливу на активність ITSN1 для управління протіканням ITSN1-залежних процесів.

Матеріали дисертації також можуть бути використані для підготовки спецкурсів з молекулярної біології для студентів біологічних факультетів.

Особистий внесок здобувача. Усі дослідження здійснені за безпосередньої участі здобувача. Обробку та аналіз отриманих результатів здійснено безпосередньо здобувачем. Плазмідні конструкції, що містять кодуючі послідовності GST-злитих EH-доменів, SH3-доменів та CCR було отримано к.б.н. Скрипкіною І.Я., к.б.н. Ніколаєнком О.В., к.б.н. Дергаєм М.В., к.б.н. Дергаєм О.В. та к.б.н. Кропивком С.В. Мас-спектрометрія та дослідження субклітинної локалізації білків було проведено спільно з к.б.н. Ніколаєнком О.В. Експерименти з вивчення впливу надекспресії ITSN1 на асоціацію STOP з мікротрубочками було проведено спільно з Ванданою Йоші, (лабораторія структури та функції біомолекул у нормі та патології університету м. Еврі Франція). Культивування первинних нейронів гіпокампу щурів здійснювали за підтримки к.б.н. Цугорки Т. (Інститут фізіології ім. Богомольця НАН України

Київ), а також співробітників лабораторії молекулярної та клітинної нейробиології Міжнародного інституту молекулярної та клітинної біології м. Варшава, Польща. Експерименти з впливу іонів Ca^{2+} на зв'язувальні властивості ЕН-доменів *ITSN1* було проведено спільно з Римаренком О.В. Здобувачем особисто проведено імунопреципітації, аналіз білок-білкових взаємодій із використанням GST-злитих білків, дизайн та виготовлення конструкцій для спригнічення експресії генів, морфометричний аналіз нейронів, кіназну реакцію *in vitro*.

Автор висловлює подяку співробітникам лабораторії молекулярної та клітинної нейробиології Міжнародного інституту молекулярної та клітинної біології м. Варшава доктору А. Малік та М. Пепржик за корисні консультації щодо дизайну коротких шпилькових РНК та проведення морфометричного аналізу нейронів. Автор щиро вдячний к.б.н. Черкасу В.П. та доктору Т. Вегерському за корисні поради щодо використання лазерної скануючої конфокальної мікроскопії. Частина експериментальної роботи з визначення впливу пригнічення *ITSN1* на морфологію дендритного дерева культивованих первинних нейронів гіпокампу щурів було проведено в лабораторії молекулярної та клітинної нейробиології Міжнародного інституту молекулярної та клітинної біології (Варшава, Польща) у співпраці з проф. Я. Яворським. Автор також висловлює подяку д.б.н. П.В. Белану (Київ, Україна) та проф. П. Курмі (Еврі, Франція) за надання реактивів, плазмідних конструкцій, а також за плідні обговорення роботи. Автор щиро вдячний науковому керівникові, д.б.н., проф., член-кор. НАН України А.В. Риндич та співробітникам відділів функціональної геноміки і біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за корисні поради під час планування експериментів та обговорення отриманих результатів.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було представлено на поточних наукових семінарах відділів функціональної геноміки і біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології і

генетики НАН України та на міжнародних і вітчизняних конференціях: III міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології», (Львів, Україна, 2007), Конференція молодих науковців, аспірантів і студентів з молекулярної біології, присвяченій 185 річниці з дня народження Г. Менделя (Київ, 2007), RECOOP HST Consortium “Bridges in Life Sciences” (Загреб, Хорватія, 2008; Будапешт, Угорщина, 2012; Прага, Чехія, 2013), VIII Парнасівська конференція з біохімії і молекулярної біології (Варшава, Польща, 2011), 22nd IUBMB-37th FEBS Congress “From Single Molecules to Systems Biology” (Севілья, Іспанія, 2012), Annual GDRI Meeting "From Molecular to Cellular Events in Human Diseases" (Париж, Франція, 2013), GDRI meeting "From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies" (Рига, Латвія, 2014).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 5 статей у наукових фахових журналах та тези 8 доповідей у збірниках матеріалів наукових з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел та додатку. Дисертацію викладено на 137 сторінках стандартного машинопису. Вона містить 39 рисунків, 4 таблиці. Список використаної літератури охоплює 224 найменування.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальні принципи функціонування скафолдних білків

Згідно з сучасними уявленнями живі клітини містять надзвичайно високу концентрацію макромолекул, що обмежує їх контакт з водою і суттєво ускладнює їх вільну дифузію всередині клітини. В таких умовах життєво важливою задачею клітини є забезпечення просторово-часової організації функціонально пов'язаних між собою макромолекул, що дає можливість їм ефективно виконувати свої функції. Прикладами такої організації є спрямування окремих груп макромолекул до певних компартментів клітини, а також утворення макромолекулярних комплексів, центральним компонентом яких є скафолдні білки.

Скафолдними білками називають білки, які містять декілька функціональних модулів для здійснення білок-білкових взаємодій. Одними з перших ідентифікованих скафолдних білків були білки, що поєднували у своїй структурі SH2 (Src homology 2) та SH3 (Src homology 3) домени, такі як v-Crk та SHC [9]. SH2 домени здатні взаємодіяти з фосфорильованими залишками тирозинів у складі білків-партнерів, тоді як SH3 домени в основному взаємодіють з пролін-збагаченими амінокислотними мотивами [9,10]. Відповідно до властивостей цих доменів, функцією вищезазначенх білків є забезпечення зв'язку між рецепторними тирозин-кіназами та внутрішньоклітинними сигнальними білками [9]. Іншим класичним прикладом скафолдного білка є ідентифікований у клітинах дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* білок Ste5, що здатен одночасно взаємодіяти з трьома кіназами MAP-

кіназного сигнального каскаду, таким чином забезпечуючи їх просторово-часове поєднання і, відповідно, проходження сигналу [11]. Переважна більшість відомих на сьогодні скафолдних білків бере участь в організації функціонування внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, тому наявні експериментальні та теоретичні дослідження загальних принципів їх функціонування в основному стосуються їх впливу на властивості внутрішньоклітинної передачі сигналу.

Найбільш очевидною функцією скафолдних білків, яка напряду впливає з їх визначення, є збірка компонентів сигнальних каскадів у комплекси. У випадку наявності альтернативних можливих субстратів у сигнальних ферментів це забезпечує як проходження сигналу, так і його специфічність [12]. Математичне моделювання процесу сигнальної трансдукції також вказує на те, що окрім фізичного забезпечення проходження сигналу, залучення скафолдних білків до сигнальних шляхів клітин може кардинально змінювати параметри проходження сигналу. Згідно з теоретичними передбаченнями, залежність кількісних параметрів відповіді сигнальних систем клітини від кількісних параметрів вхідного сигналу може бути гіперболічною (за аналогією з характером залежності швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату у класичній кінетиці Міхаеліса-Ментен), ультрачутливою, або субчутливою [13]. В першому випадку відповідь має дозозалежний характер, в другому – характер «все або нічого», або відповідь по типу перемикача. Для MAP-кіназного сигнального шляху у випадку відсутності скафолдних білків було передбачено ультрачутливий характер відповіді на сигнал, що узгоджувалось з експериментальними даними, отриманими на екстрактах ооцитів *Xenopus laevis* [14,15]. Проте наявність скафолду дозволяє перетворити ультрачутливість сигнального шляху на гіперболічну чутливість [16]. Це дозволяє з одного боку знизити поріг активації сигнального каскаду, з іншого – запобігти неконтрольованій ампліфікації сигналу. Крім того, теоретично також показана зворотня можливість за допомогою скафолду перетворювати тип

відповіді на сигнал з гіперболічного на ультрачутливий [17]. У більш пізній роботі показана здатність за допомогою скафолду посилювати слабкий сигнал і, навпаки, послаблювати сильний [18]. Таким чином, скафолдні білки можуть відігравати важливу роль не лише у забезпеченні збірки сигнальних комплексів, але також обумовлювати характер проходження цього сигналу у клітині.

Іншим важливим висновком, що випливає з математичних моделей функціонування скафолдних білків, є двохфазний характер залежності інтенсивності сигналу від концентрації скафолду [16,19]. Він полягає в тому, що найвища інтенсивність сигналу досягається при певній концентрації скафолду, зміна якої у бік як збільшення, так і зменшення, призводить до зниження ефективності проходження сигналу. Цей ефект можна пояснити необхідністю дотримання певних співвідношень між концентраціями скафолду та його білків-партнерів у клітині для ефективного утворення комплексів. Дійсно, якщо концентрація скафолду буде перевищувати концентрацію його білків-партнерів, це призводитиме до розподілення їх молекул між молекулами скафолдних білків і, відповідно, до формування неповноцінних комплексів. Через цю властивість скафолдних білків деякі з них були помилково визначені як інгібітори відповідних сигнальних шляхів [20]. Такі особливості функціонування скафолдних білків теоретично дають можливість клітині здійснювати регуляцію інтенсивності проходження сигналу шляхом зміни концентрації скафолду через зміну рівня його експресії або періоду напівжиття.

Активація одного й того самого сигнального шляху (наприклад, ERK MAP-кіназного сигнального шляху) може призводити до різних наслідків для клітини [21]. Одним з механізмів, що забезпечує це різноманіття клітинних відповідей, є так звана компартменталізація сигналу, що полягає у спрямуванні сигнального комплексу до певного компартменту клітини, в якому знаходяться його мішені. Скафолдні білки являються одними з чинників, що зумовлюють локалізацію сигнального комплексу. Так, різні білки родини АКАР (A-kinase

anchoring proteins) зумовлюють локалізацію протеїн-кінази А у різних компартментах клітини [22]. Крім того, скафолд-опосередкована локалізація сигнальних комплексів також впливає на тривалість сигналу, яка є одним з чинників, що зумовлюють характер клітинної відповіді [21]. Зокрема, після активації рецептора фактора росту скафолдний білок KSR, що взаємодіє з кіназами RAF, MEK1 та ERK1, переміщується до плазматичної мембрани і забезпечує швидкоплинну активацію ERK, тоді як скафолдний білок MP1 переміщує комплекси MEK1-ERK1 до пізніх ендосом, зумовлюючи тривалу активацію ERK1 [23–25]. Таким чином, скафолдні білки відіграють важливу роль у спрямуванні сигналу до певних мішеней у клітині, а також зумовлюють часові характеристики проходження сигналу, що впливає на характер клітинної відповіді.

Залучення скафолдних білків до організації сигнальних шляхів надає клітині широкі можливості для переспрямування потоків інформації [26]. Це відбувається шляхом створення «перехрестів» між різними сигнальними шляхами, компоненти яких можуть входити до складу одного комплексу, що утворюється за допомогою скафолду. Цікаво, що цю властивість здатні використовувати патогенні мікроорганізми. Так, чумна паличка *Yersinia pestis* продукує скафолд-подібний білок YoM, що проникає до імунних клітин хазяїна, де зв'язується з кіназами PRK2 та RSK1, які зазвичай не взаємодіють одна з одною [27]. Така взаємодія є необхідною для вірулентності *Yersinia pestis*. Таким чином, скафолдні білки можуть виступати у ролі своєрідних «диспетчерів», що визначають напрямок проходження сигналу.

З огляду на ключову роль, яку відіграють скафолдні білки у сигнальній трансдукції, вони є важливою мішенню для регуляції. На сьогодні в літературі описано чимало прикладів пост-трансляційних модифікацій скафолдних білків, зокрема їх фосфорилювання, убіквітинування, сумоїлювання, меристилування, пальмітилування та ін. [28]. Пост-трансляційні модифікації скафолду можуть здійснюватись в тому числі і компонентами сигнального шляху, до організації

якого цей скафолд залучений, що створює підґрунтя для регуляції цього сигнального шляху за типом позитивного або негативного зворотнього зв'язку. Наприклад, згадуваний вище скафолдний білок KSR фосфорилується кіназою ERK, що призводить до дисоціації комплексу KSR-RAF і, відповідно, до пригнічення RAF-ERK MAP-кіназного шляху [29]. Подібні механізми можуть застосовуватись клітиною для регуляції інтенсивності і тривалості проходження сигналу.

Скафолдні білки є ключовими макромолекулами, що беруть участь в організації функціонування клітинних систем. Вивчення особливостей їх функціонування становить надзвичайний фундаментальний інтерес, оскільки дозволить краще зрозуміти механізми організації шляхів внутрішньоклітинної передачі інформації та формування клітинної відповіді на чинники зовнішнього середовища. Оскільки дерегуляція скафолдних білків має місце при розвитку таких захворювань, як рак, діабет та ожиріння, захворювань серця та нирок, неврологічних захворювань, а також запальних та автоімунних процесів [28], такі дослідження становлять також і певний практичний інтерес. Перспективним практичним напрямком, що виник в результаті досліджень функціонування скафолдів, є створення штучних скафолдних білків і введення їх до клітин з метою зміни та контролю клітинної відповіді на зовнішній сигнал. Так, наприклад, було створено химерний скафолдний білок, за допомогою якого у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* вдалося активувати альтернативний сигнальний каскад, що зазвичай не активується за обраного типу стимуляції [30]. Таким чином, скафолдні білки є важливим об'єктом досліджень, вивчення яких дозволить зрозуміти фундаментальні механізми протікання різноманітних клітинних процесів і в перспективі може призвести до виникнення засобів тонкого управління ними.

1.2 Роль скафолдного білка ITSN1 у внутрішньоклітинних процесах

1.2.1. Загальні відомості про скафолдні білки родини ITSN.

Скафолдні білки родини ITSN у хребетних тварин кодуються двома паралогічними генами *ITSN1* та *ITSN2*. Унікальною особливістю, що вирізняє ці білки, є поєднання у складі їх молекули EH (Eps15 homology) та SH3 (Src homology 3) доменів, між якими розташована надспіралізована ділянка (CCR). Крім того, як *ITSN1*, так і *ITSN2* мають по дві основні ізоформи: коротку (*ITSN1/2S*) та довгу (*ITSN1/2L*), що утворюються внаслідок альтернативного сплайсингу [31,32]. Довгі ізоформи цих білків додатково містять DH (Dbl homology), PH (pleckstrin homology) та C2 домени [31,33]. Окрім основних ізоформ, було показано існування численних альтернативних транскриптів обох генів, утворених внаслідок альтернативного сплайсингу, що може призводити до утворення білків з делеціями окремих доменів або міждомених лінкерів, інсерціями додаткових амінокислотних мотивів, а також білків зі зміненим доменним складом внаслідок зміщення відкритої рамки зчитування [32,34–39]. Структура основних ізоформ білків ITSN хребетних тварин показана на рис. 1.1.

Структурні домени, що входять до складу молекул білків родини ITSN, зустрічаються також у складі інших білків, і їх властивості є достатньо добре дослідженими. Так, EH домени являють собою два близько розташовані мотиви типу спіраль-петля-спіраль, що часто містять амінокислотні послідовності, характерні для так званих мотивів EF-hand, які здатні зв'язувати іони Ca^{2+} [40,41]. Ці домени часто зустрічаються у складі білків, функція яких пов'язана з ендоцитозом та мембранним транспортом [42]. Найчастіше такі домени взаємодіють з NPF (аспарагін-пролін-фенілаланін) мотивами у складі білків партнерів, проте для деяких також було показано можливість взаємодіяти з FW (фенілаланін-триптофан), WW (триптофан-триптофан), SWG (серин-триптофан-

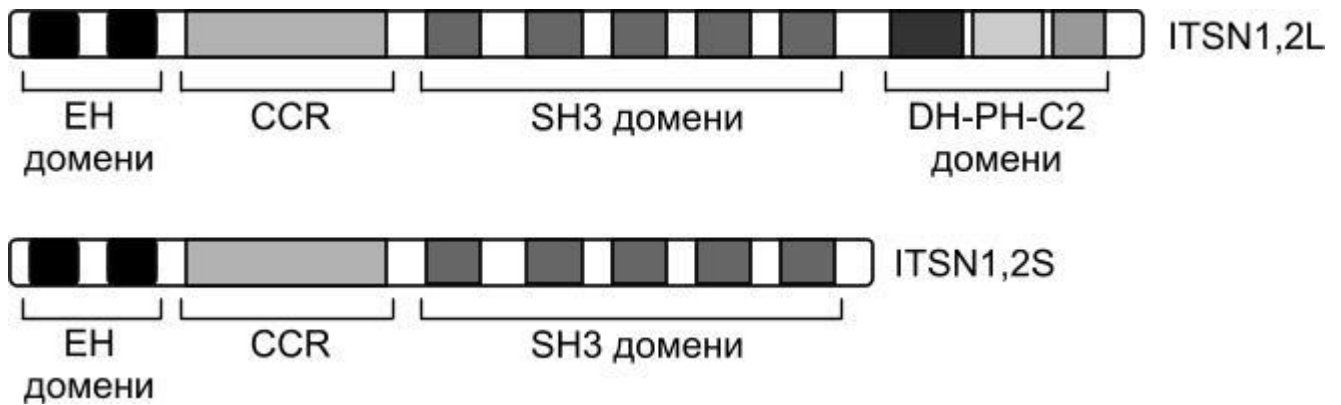


Рис. 1.1. Доменна структура основних ізоформ білків ITSN хребетних тварин

гліцин) та H(S/T)F (гістидин-серин/треонін-фенілаланін) мотивами [43]. CCR-ділянки, в свою чергу, являють собою універсальний мотив для олігомеризації білків через здатність взаємодіяти між собою [44]. Канонічними амінокислотними мотивами для взаємодії з SH3 доменами є пролін-збагачені мотиви виду PXXP [10,45], проте також відомі приклади взаємодії SH3 доменів з іншими консенсусами [46]. Тандем DH-PH є визначальною ознакою білків, що формують родину факторів обміну гуанінових нуклеотидів родини Dbp, що каталізують заміну ГДФ на ГТФ у малих ГТФаз родини Rho, обумовлюючи їх активацію [47]. При цьому DH домен є каталітично активним, а PH домен здебільшого грає роль у забезпеченні локалізації DH домену через взаємодію з фосфоінозидами мембран або елементами цитоскелету, а іноді також у регуляції активності DH домену шляхом міждомених взаємодій [48,49]. C2 домени, зазвичай, залучені у Ca^{2+} -залежне та Ca^{2+} -незалежне зв'язування фосфоліпідів [50]. Відомості щодо функціонування цих доменів у складі ITSN1 буде наведено у наступних розділах.

Гени *ITSN1* та *ITSN2* експресуються у більшості тканин ссавців [31,33–35,51,52], проте профіль експресії різних білків родини ITSN істотно різниться. Так, експресія деяких ізоформ є тканинозалежною. На відміну від довгої ізоформи ITSN2 (ITSN2-L), що експресується повсюдно, довга ізоформа ITSN1

(ITSN1-L) переважно експресується в нейронах [31,32,52]. Низькі рівні ITSN1-L було детектовано також у нирці, печінці, легенях, м'язах та плаценті [32,35,37]. Крім того, транскрипти *ITSN1*, що містять екзон 20, є нейрон-специфічними [8,35]. Натомість, більшість робіт вказують на відсутність короткої ізоформи ITSN1 (ITSN1-S) у нейронах [51,53], хоча методом ЗТ-ПЛР було показано наявність транскрипту, що відповідає цій ізоформі, в нейронах таламусу миші [37].

В наступних розділах буде обговорено участь білка ITSN1, який вивчався у даній роботі, у клітинних процесах.

1.2.2. Роль ITSN1 у клатрин-опосередкованому ендоцитозі.

У ранніх роботах з визначення ролі ITSN1 та його ортологів у клітинних процесах було виявлено, що він здатен взаємодіяти з рядом білків, які задіяні у процесі клатрин-опосередкованого ендоцитозу, таких як епсин, EPS15, динамін та синаптоянін [33,34,54,55]. Також було визначено, що в клітинах лінії COS-7 ITSN1 локалізується у клатрин-облямованих ямках [51]. Таким чином, були отримано перші свідчення про участь ITSN1 у клатрин-опосередкованому ендоцитозі, що послужили підґрунтям для подальших досліджень його ролі у цьому процесі.

Процес клатрин-опосередкованого ендоцитозу забезпечується великою кількістю макромолекул, що надзвичайно координовано і динамічно вступають у взаємодії між собою впродовж формування клатрин-облямованої везикули. Цей процес умовно поділяють на п'ять етапів [56]. Під час ініціації, або нуклеації, на плазматичній мембрані відбувається збірка ініціаторного комплексу, що складається з молекул легких та важких ланцюгів клатрину та адаптерного білка AP2, який поєднує клатрин з плазматичною мембраною. На етапі селекції вантажу до ініціаторного комплексу надходять молекули, що підлягають інтерналізації. Ці молекули можуть взаємодіяти або безпосередньо з AP2, або з так званими «адаптерами вантажу», які поєднують молекули вантажу з AP2 [57]. На етапі збірки клатринової облямівки до везикули, що

формується, надходять додаткові молекули клатрину AP2, та допоміжних клатринових адаптерів (епсину, EPS15 та AP180), що організовують збірку клатрину у складну тривимірну структуру навколо ямки, яка формується. Цей процес супроводжується зростаючим вигинанням плазматичної мембрани всередину клітини, що забезпечується деякими білками, які взаємодіють з мембраною та індукують її викривлення (епсин, амфіфізін, ендofilін). На наступному етапі відбувається відщеплення сформованої везикули від плазматичної мембрани. Для цього навколо шийки, що поєднує везикулу з мембраною, відбувається полімеризація білка динаміну, що рекрутується в цей сайт білками, що містять SH3 домени. Динамін є механохімічним ферментом, що здатен каталізувати гідроліз ГТФ, зазнаючи при цьому конформаційних змін. Таким чином, під час гідролізу ГТФ відбуваються конформаційні перетворення полімеризованого динаміну, що призводять до від'єднання везикули від плазматичної мембрани [58]. Зрештою, на заключному етапі відбувається звільнення утвореної везикули від клатринової облямівки. В цьому процесі беруть участь такі білки, як ауксилін, HSC70 та синаптоянін [59–61].

Роль ITSN1 у клатрин-опосередкованому ендоцитозі здебільшого залишається нез'ясованою. Окрім зазначених вище, ITSN1 взаємодіє з рядом інших білків ендоцитозу, що задіяні на різних етапах цього процесу (рис. 1.2), зокрема з AP2, ендofilіном, стоніном 2 («адаптер вантажу», що забезпечує компенсаторний ендоцитоз синаптичних везикул у пресинаптичних нервових закінченнях), SGIP (один з білків, що деформує плазматичну мембрану) та ін. [62–65]. Надекспресія або, навпаки, пригнічення експресії *ITSN1* негативно впливають на інтенсивність клатрин-опосередкованого ендоцитозу деяких молекул у ряді досліджуваних типів клітин [33,66,67]. Так, було показано, що надекспресія ITSN1 знижує інтенсивність ендоцитозу рецептора трансферину у клітинах COS-7. Цей ефект був нівельований за допомогою надекспресії динаміну, що свідчить про роль ITSN1 у забезпеченні локалізації динаміну під

час клатрин-опосередкованого ендоцитозу [33]. На підтвердження цього, нокаут *Dap160* (гену-ортолога *ITSN1* у *Drosophila melanogaster* *Dap160*) призводив до порушення локалізації динаміну та кількох інших білків ендоцитозу у пресинаптичних закінченнях нервово-м'язових синапсів [68,69]. Ці дані свідчать на користь гіпотези про те, що функцією ITSN1 у клатрин-опосередкованому

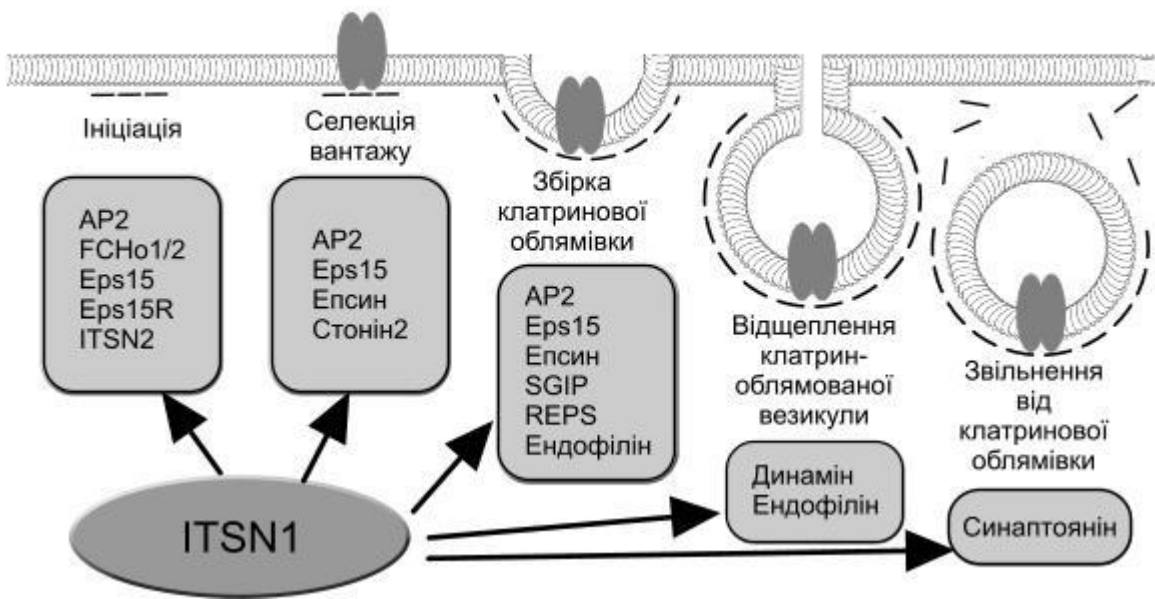


Рис. 1.2. Взаємодія ITSN1 з білками, що задіяні у різних стадіях клатрин-опосередкованого ендоцитозу

ендоцитозі є організація білків ендоцитозу у комплекси в місцях утворення клатрин-облямованих везикул.

Якщо ITSN1 є необхідним для організації молекулярних комплексів у місцях формування клатрин-облямованих везикул, неважко передбачити, що додавання його окремих доменів призводитиме до порушення цього процесу через конкуренцію між окремими доменами і повнорозмірним білком за зв'язування білків-партнерів. Дійсно, SH3A, SH3C, SH3E та меншою мірою SH3B домени ITSN1 здатні інгібувати ендоцитоз [70]. При цьому, якщо SH3C та SH3E домени інгібують пізні стадії ендоцитозу, що узгоджується з даними про їх взаємодію з динаміном та синаптояніном, SH3A домен інгібує проміжні

стадії ендоцитозу, що пов'язані з дозріванням клатрин-облямованої ямки. Таким чином, ймовірно, ITSN1 бере участь у процесі клатрин-опосередкованого ендоцитозу на різних стадіях формування клатрин-облямованої везикули. Нещодавно Henne та спів. показали, що ITSN1 разом з білками FCHo1, FCHo2, Eps15, Eps15R, а також ITSN2 входить до складу ініціаторного комплексу, що визначає місце формування майбутньої клатрин-облямованої везикули а плазматичній мембрані і рекрутує туди молекули AP2 і клатрину [71]. Щоправда, більш пізні дослідження показали, що білки FCHo1/2 важливі для стабілізації сформованого ініціаторного комплексу, а не для власне ініціації формування клатрин-облямованої ямки [72]. Тим не менш, FCHo1/2 та Eps15 разом з AP2 є одними з перших білків, які з'являються у сайтах формування везикул [73]. Це дозволяє припустити також і участь ITSN1 на початкових стадіях клатрин-опосередкованого ендоцитозу.

Таким чином, ITSN1 є інтегральним компонентом молекулярного апарату, що забезпечує клатрин-опосередкований ендоцитоз. ITSN1 є присутнім на всіх етапах цього процесу і послідовно рекрутує необхідні білки-партнери у сайти формування клатрин-облямованої везикули.

1.2.3. Участь ITSN1 у сигнальній трансдукції.

Процес ендоцитозу тісно пов'язаний з сигнальною трансдукцією, оскільки інтерналізація рецепторів та подальше їхнє спрямування в різні компартменти клітини визначає інтенсивність і тривалість сигналу, а також його результат у вигляді клітинної відповіді. З іншого боку, сигнал, що передається, може також модифікувати процес ендоцитозу, оскільки білки ендоцитозу можуть бути мішенями для сигнальних ферментів. Таким чином, ендоцитоз і сигнальна трансдукція є надзвичайно тісно пов'язаними взаємозалежними процесами [74]. З огляду на це, білки ендоцитозу часто відіграють важливу роль у внутрішньоклітинній передачі сигналу.

Велика кількість досліджень свідчать про зв'язок ITSN1 з мітогенними сигнальними шляхами. Надекспресія повнорозмірного ITSN1 або окремо його

EH доменів призводила до активації транскрипційного фактора Elk-1 у клітинах лінії 293T [75]. ITSN1-залежна активація Elk-1 не опосередковується MAP-кіназами ERK1 та ERK2, але залежить від активності іншої MAP кінази – JNK [75,76]. Надекспресія ITSN1 або його EH доменів призводила до онкогенної трансформації фібробластів, а також прискорювала прогестерон-залежну диференціацію ооцитів *Xenopus laevis* [75]. Таким чином, ITSN1 пов'язаний з сигнальними шляхами, важливими для росту та диференціації клітин.

Хоча надекспресія ITSN1 напряду не активує ERK1 та ERK2, ITSN1 залучений до регуляції RAS-ERK сигнального каскаду. SH3A, SH3C та SH3E домени ITSN1 взаємодіють з білком Sos1, що є фактором обміну гуанінових нуклеотидів для малої ГТФази RAS [77]. Ця взаємодія стимулює активацію RAS [76]. Пригнічення експресії *ITSN1* призводить до зниження рівня і тривалості активації ERK1 та ERK2 [66,78].

Вплив ITSN1 на сигнальну трансдукцію зумовлюється також його участю у регуляції функціонування рецепторних тирозин-кіназ. ITSN1 є компонентом апарату, що забезпечує інтерналізацію активованого рецептора епідермального фактора росту (EGFR) [66]. Крім того, ITSN1 стимулює убіквітинування і деградацію EGFR, взаємодіючи з E3 убіквітин-лігазою Cbl [66]. Окрім прямої взаємодії, ITSN1 також впливає на функціонування Cbl, застосовуючи більш складні механізми. Зокрема, ITSN1 взаємодіє з білком Spry2, який є інгібітором Cbl, і ця взаємодія порушує взаємодію між Cbl та Spry2, знімаючи інгібуючий ефект останнього [79]. Більш того, ITSN1 взаємодіє з фосфатазою Shp2, забезпечуючи дефосфорилування Spry2, що також призводить до активації Cbl [80].

Окрім MAP-кіназних сигнальних каскадів, ITSN1 бере участь у регуляції інших сигнальних шляхів. Зокрема, було показано його взаємодію з фосфатидилінозитол-3-кіназою PI3K-C2 β , що є складовою PI3K-AKT сигнального шляху [81]. Взаємодія з ITSN1 підвищує його активність і призводить до активації AKT. Цікаво, що PI3K-C2 β взаємодіє з

безнуклеотидною формою малої ГТФази RAS [82]. Wong та співробітники запропонували модель, згідно з якою PI3K-C2 β та безнуклеотидна форма Ras знаходяться у комплексі в неактивному стані і можуть в такому вигляді переміщуватись до цільових компартментів. Взаємодія PI3K-C2 β з ITSN1 порушує цей комплекс і призводить до активації як RAS, так і PI3K-C2 β [82].

Участь ITSN1 у функціонуванні сигнальних шляхів, таких як MAP-кіназний та PI3K-AKT, що забезпечують проліферацію та ріст клітин, свідчить про його важливість для виживання клітин. Пригнічення експресії *ITSN1* за допомогою коротких інтерферуючих РНК призводить до апоптозу ендотеліальних клітин, а також клітин нейробластоми миші лінії N1E-115 під час диференціації у нейрони [78,81]. При цьому розвиток апоптозу супроводжується пригніченням обох вищезазначених шляхів [78,81].

Ортолог ITSN1 у *Drosophila melanogaster* DAP160 залучений до регуляції комплексу атипової протеїн-кінази C (aPKC) та білків PAR3 та PAR6, що регулюють асиметричний клітинний поділ, необхідний для структурування і диференціації клітин впродовж розвитку багатоклітинних організмів [83]. DAP160 взаємодіє з aPKC, підвищуючи його активність, а також з PAR6, який інгібує aPKC [84]. Рівень активації aPKC визначається кількісним співвідношенням між DAP160 та PAR6 [84].

Окремою важливою складовою участі ITSN1 у сигнальних процесах є здатність його довгої ізоформи (ITSN1L) каталізувати обмін ГДФ на ГТФ за рахунок того, що ця ізоформа містить DH домен з відповідною ферментативною активністю. ITSN1L є фактором обміну гуанінових нуклеотидів (GEF) для малої ГТФази Cdc42 [85], що регулює поляризацію клітин та полімеризацію актину, зумовлюючи утворення філоподій [86]. Крім того, SH3 домени ITSN1 взаємодіють з білком N-WASP – основним ефектором Cdc42, активація якого призводить до активації Arp2/3 комплексу та нуклеації полімеризації актину [85]. Ймовірно, ITSN1L може служити платформою, що одночасно активує Cdc42 та просторово зближує його з N-WASP, забезпечуючи

ініціацію утворення актинових філаментів. Більш того, ITSN1 взаємодіє з CdGAP – білком, що стимулює гідроліз ГТФ, приєднаного до малих ГТФаз, таким чином інгібуючи їх сигнальну активність [87]. CdGAP є інгібітором малих ГТФаз Cdc42 та Rac1 [88]. Взаємодія з ITSN1 інгібує активність CdGAP, що забезпечує ще один механізм для ITSN1-залежної активації Cdc42 [87]. ITSN1-залежна полімеризація актину є складовою багатьох процесів, таких як екзоцитоз секреторних гранул у нейроендокринних клітинах [89,90], розвиток дендритних шипиків у нейронах [7,91], а також утворення актинових хвостів при інфекції клітин вірусом коров'ячої віспи [92].

Таким чином, ITSN1 бере участь у функціонуванні різноманітних клітинних сигнальних шляхів, що забезпечують ріст, проліферацію та диференціацію клітин (рис. 1.3).

1.2.4. Роль ITSN1 у функціонуванні нейронів.

Високий рівень експресії *ITSN1* у нейронах було продемонстровано у багатьох дослідженнях, проведених на різних модельних організмах [69,93–96]. Окрім високого рівня експресії, нейрони вирізняються з поміж інших клітин унікальним набором ізоформ ITSN1, утворених шляхом альтернативного сплайсингу. Описана вище ізоформа ITSN1L практично повністю замінює коротку ізоформу ITSN1S в нейронах [51,53], хоча певна кількість мРНК ITSN1S у цих клітинах все ж детектується [37]. Крім того, внаслідок включення екзону 20 до мРНК нейрональні ізоформи ITSN1 містять додаткові 5 амінокислотних залишків в p-Src петлі SH3A домену, що призводить до певної зміни його властивостей [8,97]. Про важливість ITSN1 для функціонування нейронів також непрямо свідчить його роль у розвитку захворювань, пов'язаних з розладом функціонування нервової системи. Так, ген *ITSN1* людини знаходиться на 21-ій хромосомі у регіоні, що є критичним для розвитку синдрому Дауна [2,31]. Було продемонстровано, що експресія *ITSN1* у осіб з синдромом Дауна є підвищеною [3,98]. Надекспресію *ITSN1* також було виявлено у пацієнтів при хворобі Альцгеймера [4]. Цікаво, що при обох цих

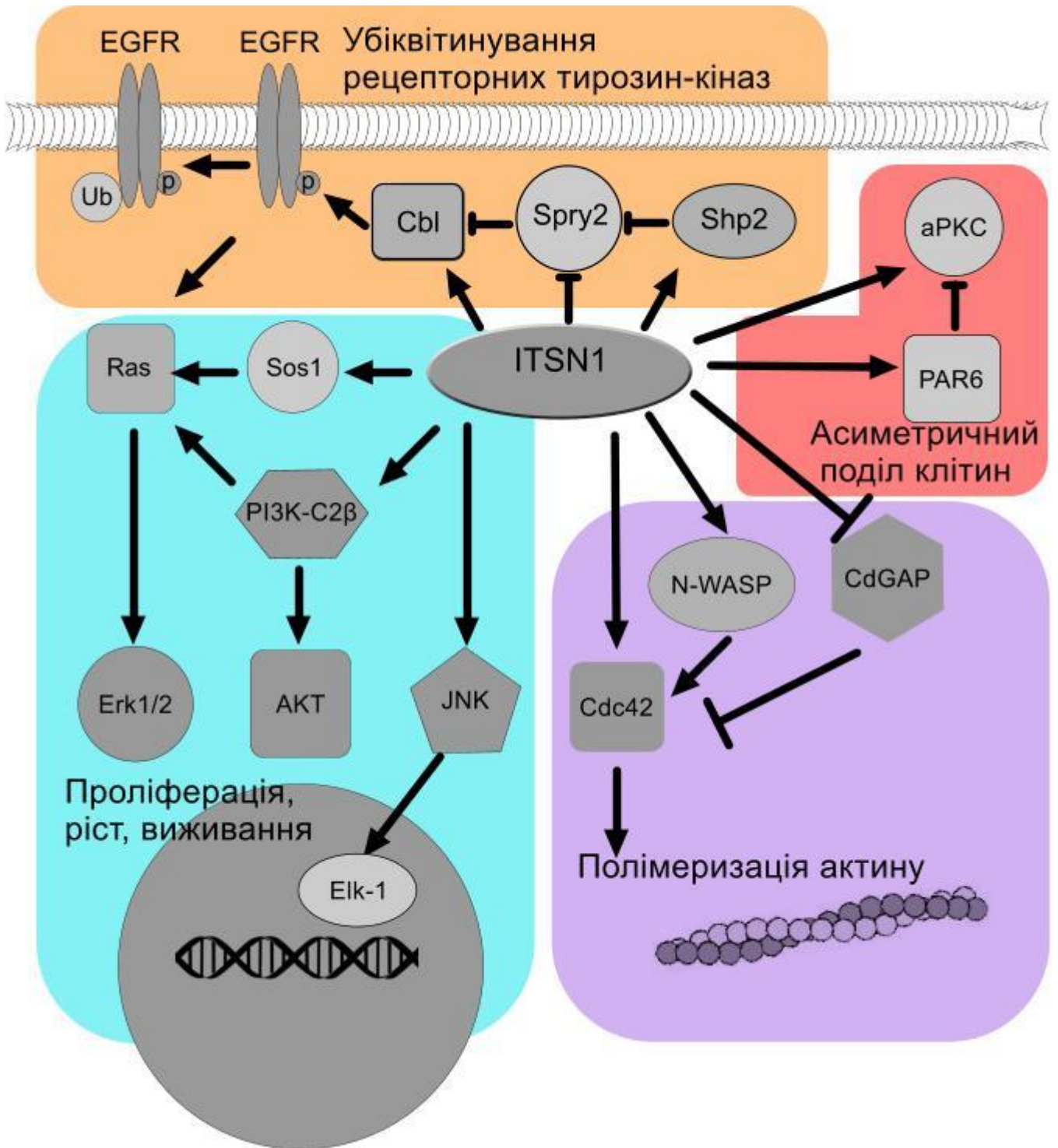


Рис. 1.3. Участь ITSN1 у функціонуванні сигнальних шляхів

патологіях відбуваються порушення ендоцитозу, які у випадку хвороби Альцгеймера проявляються на ранніх етапах патогенезу [99,100]. Крім того, підвищена експресія *ITSN1* посилює нейродегенеративний процес у *in vivo* моделі захворювань, пов'язаних з утворенням поліглютамінового тракту, а

також сприяє агрегації білка Htt, що свідчить про його можливу участь у розвитку хвороби Гентінгтона [5]. Таким чином, ITSN1 відіграє важливу роль у нейронах і може бути залученим до розвитку ряду нейрологічних та нейродегенеративних захворювань.

Багато даних про роль ITSN1 у розвитку нервової системи було отримано у дослідженнях модельних організмів з відсутністю експресії *ITSN1*. Одним з функціональних ефектів пригнічення його експресії є порушення ендоцитозу синаптичних везикул – процесу, що забезпечує як відновлення пулу синаптичних везикул після їх злиття з плазматичною мембраною, так і мембранний гомеостаз. Так, у *Drosophila melanogaster* відсутність експресії *Dap160* призводить до зниження кількості синаптичних везикул у пресинаптичних закінченнях нервово-м'язових синапсів, а також до зниження збуджуючого постсинаптичного потенціалу при тривалому збудженні, що вказує на пригнічення ендоцитозу синаптичних везикул [68,69]. Такі мухи гинули на пізніх личинкових стадіях розвитку, що свідчить про життєву важливість *Dap160* для їх життєдіяльності [68,69]. У нематод *Caenorhabditis elegans* відсутність ITSN1 також призводила до зниження кількості синаптичних везикул та дисфункції пресинаптичних нервових закінчень, проте, на відміну від мух, нематоди залишались життєздатними [93,101]. Таким чином, ITSN1 у нематод відіграє скоріше допоміжну роль у ендоцитозі синаптичних везикул. Цікаво, що як у мух, так і у нематод було визначено, що в процесі ендоцитозу синаптичних везикул ITSN1 функціонально пов'язаний з білком EPS15 [93,101,102].

Чимало даних свідчать про те, що однією з основних функцій ITSN1 та його ортологів в процесі ендоцитозу синаптичних везикул є забезпечення локалізації білків ендоцитозу у відповідних зонах синапсу. На підтвердження цієї тези, вміст таких білків ендоцитозу, як динамін, ендофілін та синаптоянін у пресинаптичних закінченнях нервово-м'язового синапсу мух з відсутністю експресії *Dap160* був суттєво нижчим в порівнянні з мухами дикого типу

[68,69]. Підвищення експресії *Dap160* також призводило до зниження вмісту синаптояніну у цих зонах [103]. Крім того, було показано, що локалізація ITSN1 та його партнерів може визначатися синаптичною активністю. На ультраструктурному рівні в гігантському ретикулоспінальному синапсі міноги було виявлено, що ITSN1 при стимуляції синапсу переміщується з активної зони синапсу до периактивної, де відбувається ендоцитоз [104]. Подібні переміщення *Dap160*, індуковані синаптичною активністю, спостерігались також у нервово-м'язовому синапсі *Drosophila melanogaster* [105]. Переміщуючись до зон, де відбувається ендоцитоз синаптичних везикул, *Dap160* забезпечує надходження динаміну до ендоцитозних структур, що впливає на успішне проходження так званого «масового» (bulk) ендоцитозу, який відбувається при інтенсивній роботі синапсу [105].

На відміну від безхребетних організмів, роль ITSN1 у ендоцитозі синаптичних везикул ссавців є доволі суперечливою. У декількох роботах стверджувалося, що ITSN1 локалізується в соматодендритних регіонах та практично відсутній у пресинаптичних нервових закінченнях [7,67]. Більш того, пригнічення експресії *ITSN1* не призводило до пригнічення ендоцитозу синаптичних везикул у культивованих нейронах гіпокампу щурів та у гігантському синапсі «чашечка Хелда» [67,106]. З іншого боку, у культурах кортикальних нейронів, що були приготовані, використовуючи трансгенних мишей з відсутністю гену *ITSN1*, спостерігалось зниження швидкості компенсаторного ендоцитозу синаптичних везикул після стимуляції [53]. В кількох роботах також було продемонстровано пресинаптичну локалізацію ITSN1 в синапсах ссавців [62,106]. Його участь у ендоцитозі синаптичних везикул також підтверджується біохімічними даними, оскільки ITSN1 входить до складу білкових комплексів, асоційованих з синаптотагміном – кальцієвим сенсором, що є інтегральним компонентом білкового апарату синаптичних везикул [107]. Зрештою, нещодавно було доведено участь ITSN1 у «роздяганні» клатрин-облямованих синаптичних везикул у синапсах спинного мозку та

кортикальних нейронів миші [63]. Таким чином, ITSN1 залучений до ендцитозу синаптичних везикул, проте його роль у цьому процесі у різних організмах і різних типах клітин дещо відрізняється.

Іншим аспектом функціонування ITSN1 у нейронах є його участь у розвитку нейронів і формуванні синаптичних контактів. У миш з відсутнім геном *Dap160* спостерігалось значно підвищене формування бічних сателітних пресинаптичних бутонів у нервово-м'язових синапсах, що може бути пов'язано з порушенням регуляції актинового цитоскелету [68,69]. Пізніше було показано, що *Dap160* взаємодіє з білком *Nwk*, відсутність якого веде до розвитку схожого фенотипу. Як і *Dap160*, *Nwk* регулює актиновий цитоскелет через взаємодію з *N-WASP* [108–110]. Крім того, *Dap160* є негативним регулятором BMP сигнального шляху, що активує розвиток пресинаптичних бутонів [108]. Нещодавно також з'явилися свідчення про участь ITSN1 у формуванні пресинаптичних нервових закінчень у ссавців. Він присутній у конусах росту аксонів гіпокампальних нейронів щурів, і дерегуляція функціонування його DN домену призводить до утворення додаткових бічних конусів росту та галуження аксона [111]. Підтвердженням важливості ITSN1 для росту аксонів є порушення будови головного мозку миші, а саме відсутність нейрональних трактів, що поєднують між собою великі півкулі, при пригніченні експресії його гена [112].

ITSN1 також бере участь у формуванні синапсів і на постсинаптичному рівні. Пригнічення або надекспресія ITSN1 призводили до порушення морфології дендритних шипиків - специфічних утворень на дендритному дереві, що формують постсинаптичні нервові закінчення у збуджуваних синапсах [7,67]. Такі шипики характеризувались видовженою шийкою та несформованою головкою, що призводить до зменшення площі синаптичного контакту. Цей ефект обумовлений GEF активністю ізоформи ITSN1L, що здатна активувати малу ГТФазу *Cdc42*, необхідну для формування дендритних шипиків [7,91]. Було показано, що ця активність підвищується при взаємодії

ITSN1 з білками N-WASP та Numb, а також з EphB2 – рецепторною тирозин кіназою, що залучена до морфогенезу дендритних шипиків [7,91]. Лігандом EphB2 є трансмембранний білок ефрин В, який знаходиться в мембрані сусідньої клітини, що формує синапс, тому відповідний сигнальний шлях активується при формуванні контакту між двома клітинами [113]. Таким чином, ITSN1 залучений до сигнального шляху, що забезпечує морфогенез дендритного шипику при його контакті з пресинаптичним нервовим закінченням.

Крім участі у морфогенезі дендритних шипиків, у постсинаптичних нервових закінченнях ITSN1 також може брати участь у ендоцитозі. Так, у інтернейронах *Caenorhabditis elegans* ITSN1 залучений до інтерналізації рецепторів глутамату типу AMPA [114]. Кількість цих рецепторів у постсинаптичному закінченні визначає фізичні параметри проведення електричного стимулу, а регуляція їх присутності на постсинаптичній плазматичній мембрані, в тому числі шляхом ендоцитозу, є одним з механізмів, які забезпечують синаптичну пластичність – ключовий фізіологічний механізм, що лежить в основі процесів навчання і пам'яті [115]. В той же час, відсутність ITSN1 у мишей не призводила до порушень синаптичної пластичності [112], тому участь ITSN1 у механізмах, що забезпечують синаптичну пластичність у ссавців видається малоімовірною.

Таким чином, ITSN1 виконує у нейронах важливі і досить різносторонні функції. Проте детальні молекулярні механізми його функціонування здебільшого залишаються нез'ясованими. Зокрема, досі невідомо, що забезпечує преміщення ITSN1 під час синаптичної активності, яким чином регулюється активність ITSN1 під час розвитку нейрону та формування синапсів, яким чином ITSN1 вбудований у сигнальні шляхи, що зумовлюють характер нейрогенезу у відповідь на дію зовнішніх факторів, яким є склад ITSN1-залежних молекулярних комплексів у нейронах. Отримання відповідей

на ці питання дозволить краще зрозуміти роль *ITSN1* у розвитку патологій нервової системи.

1.2.5. Шляхи регуляції функціонування *ITSN1*.

ITSN1 бере участь у низці внутрішньоклітинних процесів, під час перебігу яких він вступає у взаємодії з великою кількістю білків-партнерів. Кількість відомих на сьогодні білків-партнерів *ITSN1* значно перевищує кількість функціональних доменів у складі його молекули, які здатні опосередковувати ці взаємодії. З огляду на це, доволі обґрунтованим виглядає припущення про те, що асоціація *ITSN1* з тими чи іншими білками-партнерами має залежати від певних факторів, таких як фізіологічний стан клітини, дія чинників навколишнього середовища, тощо. На сьогодні питання про регулюючий вплив таких факторів на функціонування *ITSN1* в цілому залишається недослідженим. В цьому розділі ми обговоримо відомі молекулярні події, що впливають на властивості *ITSN1* та можуть лежати в основі клітинних механізмів регуляції його функціонування.

У попередніх розділах ми обговорили, як концентрація скафолдного білка може впливати на ефективність збірки комплексів та функціонування асоційованих з ним сигнальних шляхів (див. розділ 1.1). Таким чином, зміни рівнів експресії генів, що кодують скафолдні білки, є потужним інструментом для регуляції їх функціонування. На сьогоднішній день достеменно не відомо, як рівень експресії *ITSN1* може регулюватися на транскрипційному рівні. Проте на пост-транскрипційному рівні було показано, що експресія *ITSN1* може регулюватися за допомогою мікроРНК *miR-194* [116]. Підвищення експресії цієї мікроРНК призводить до зниження експресії *ITSN1* у клітинах HEK293T, а також до збільшення кількості надекспресованих калієвих каналів ROMK на поверхні цих клітин [116]. Оскільки *ITSN1* залучений до ендочитозу цих каналів [117], такий ефект ймовірно пов'язаний саме з порушенням інтерналізації ROMK. Рівень експресії *miR-194* у нирках миші залежить від насиченості їх дієти калієм [116], тому подібний функціональний взаємозв'язок

між miR-194 та *ITSN1* може бути важливим для регуляції кількості калієвих каналів у нирках в залежності від рівня калію в організмі.

Іншим пост-транскрипційним механізмом регуляції експресії *ITSN1* є альтернативний сплайсинг його пре-мРНК. Багато подій альтернативного сплайсингу *ITSN1* призводять до зсуву відкритої рамки зчитування та появи передчасного стоп-кодону, що знаходиться на відстані більше 50 нуклеотидів від останнього екзон-екзонного з'єднання [32,35,37]. Такі транскрипти зазвичай підлягають деградації за механізмом nonsense-mediated decay (NMD) [118]. Кількість подібних транскриптів *ITSN1* є досить високою, що може свідчити про наявність регуляції експресії *ITSN1* шляхом альтернативного сплайсингу.

Альтернативний сплайсинг не лише здатен регулювати рівень експресії *ITSN1*, а й визначати властивості його білкових продуктів. Утворення короткої або довгої ізоформи *ITSN1* визначається, відповідно, включенням або виключенням з транскрипту екзону 30, що містить стоп-кодон для короткої ізоформи [31–33]. Крім того, існують щонайменше 4 еволюційно консервативні події альтернативного сплайсингу *ITSN1*, що не призводять до зсуву рамки зчитування і на рівні білкового продукту проявляються у скороченні міждоменного лінкеру між EH доменами, включенні п'яти амінокислотних залишків до n-Src петлі SH3A домену, вирізанні SH3C домену та втраті C-кінцевої частини DH домену і частини лінкеру між DH та RH доменами [32,34,35]. Як було зазначено вище (див. розділ 1.2.4), включення п'яти амінокислотних залишків до SH3A домену є нейрон-специфічною подією. Така форма SH3A домену має підвищену здатність до зв'язування таких білків, як динамін 1, синаптоянін та CdGAP, а також понижену здатність до зв'язування mSos1 та Cbl у порівнянні з звичайною формою SH3A [8]. Роль інших подій альтернативного сплайсингу у функціонуванні *ITSN1* залишається невивченою, проте цілком очевидно, що зміна доменної будови молекули *ITSN1* має призвести до змін у його зв'язувальних властивостях та може грати роль у виборі білків-партнерів. Наприклад, було показано, що білок REPS1 здатен

взаємодіяти лише з SH3С доменом ITSN1 [65], тож видалення цього домену внаслідок альтернативного сплайсингу унеможливилюватиме створення такого комплексу.

Взаємодія з тими чи іншими білками-партнерами також впливає на функціональні властивості ITSN1. GEF активність ITSN1L посилюється при взаємодії SH3 доменів з N-WASP, EphB2 або Numb [7,85,91]. Цей ефект можна пояснити наявністю внутрішньомолекулярного інгібування DH домену, що здійснюється SH3 доменами ITSN1 [119]. Було показано, що це інгібування забезпечується внутрішньомолекулярною взаємодією між SH3E та DH доменом [120]. Ймовірно, взаємодія SH3 доменів з білками-партнерами може призводити до конформаційних змін молекули ITSN1 і зняття інгібування DH домену, що супроводжується збільшенням його GEF активності. Іншим прикладом кооперативності між різними білок-білковими взаємодіями ITSN1 є інгібування його зв'язування з синаптояніном при взаємодії з AP2 [62]. Цікаво, що при цьому взаємодія з AP2 не впливає на зв'язування ITSN1 з динаміном, який взаємодіє з тими самими SH3 доменами ITSN1, що і синаптоянін [62]. Таким чином, взаємодія ITSN1 з тими чи іншими партнерами може впливати і на його подальші взаємодії, визначаючи склад молекулярного комплексу, що формується.

Як ми вже обговорювали в попередньому розділі, у деяких пресинаптичних нервових закінченнях у відповідь на стимуляцію роботи синапсу спостерігається внутрішньоклітинна релокалізація ITSN1 з активної до періактивної зони синапсу [104,105] (див. розділ 1.2.4.). Молекулярний механізм, що забезпечує таку релокалізацію, залишається невідомим. Подібна залежна від синаптичної активності зміна локалізації характерна також для низки інших білків ендоцитозу, таких як динамін, EPS15, епсин 1 та амфіфізін [102,104,121,122]. Оскільки синаптична активність супроводжується підвищенням внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca^{2+} , ймовірним пусковим механізмом цих переміщень можуть бути Ca^{2+} -залежні

посттрансляційні модифікації. На підтвердження цього, Ca^{2+} -залежна фосфатаза кальцінейрин дефосфорилує низку білків ендоцитозу, а саме динамін, синаптоянін та амфіфізин 1 і 2, що є необхідним для проходження ендоцитозу синаптичних везикул [123]. З огляду на це, вивчення можливих механізмів Ca^{2+} -залежної регуляції ITSN1 є досить актуальним.

Посттрансляційні модифікації є потужним інструментом регуляції функціонування білків. Для ITSN1 на сьогодні відомо декілька сайтів фосфорилування, що були ідентифіковані при масштабних дослідженнях фосфопротеому з використанням сучасних мас-спектрометричних методів [124–127]. Проте ані функціональні наслідки, ані фізіологічний контекст цих подій фосфорилування залишаються невідомими. Нещодавно було показано, що надекспресія у клітинах 293 мембранного білка LMP2A вірусу Епштейна-Бар та асоційованій з ним нерцепторної тирозин-кінази Syk призводить до фосфорилування залишків тирозину у молекулі ITSN1 [128]. При цьому стимуляція цих клітин епідермальним фактором росту не призводила до фосфорилування тирозинів у ITSN1, на відміну від ITSN2 [129]. Таким чином, ITSN1 може бути фосфорильованим за певних умов, проте наслідки цього фосфорилування потребують подальшого вивчення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Хімічні реактиви і ферменти

В роботі використовували органічні і неорганічні хімічні реактиви виробництва компаній «Fluka» (США), «Merck» (США), «Sigma-Aldrich» (США), «Helicon» (Росія), «Bio-Rad» (США), «Amersham Pharmacia Biotech» (Швеція/Великобританія), «Thermo Fisher Scientific» (США), або вітчизняні реактиви кваліфікації «хч» і «осч». В роботі використовувались ферменти виробництва компанії «Fermentas» (Литва). В роботі використовували глутатіон-сефарозу 4В виробництва «GE Healthcare» (Великобританія), Ni-NTA-агарозу («Qiagen», Німеччина), кальмодулін-агарозу «Sigma-Aldrich» (США), Protein A/G-агарозу «Santa Cruz Biotechnology» (США), суміш інгібіторів для протеаз «Roche» (Швейцарія). Набір реактивів для фарбування фосфорильованих білків в акриламідному гелі «Phosphoprotein Gel Stain Kit» було придбано в компанії «Invitrogen» (США). Набір для виділення ДНК із гелю «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» було придбано у компанії «Fermentas» (Литва). Середовища для культивування клітин DMEM та Neurobasal media, а також ембріональну сироватку теляти (FBS), реагенти для культивування нейронів та реагент для трансфекції «Lipofectamine 2000» було придбано в компанії «Invitrogen» (США). Реагент для трансфекції «Turbofect» було придбано в компанії «Fermentas» (Литва).

Моноклональні антитіла миші anti-STOP було придбано в компанії «Millipore» (США). Моноклональні антитіла проти β -тубуліну отримали у банку гібридом «DSHB» (США). Поліклональні антитіла кроля проти β -

тубуліну III (T2200) було придбано в компанії «Sigma-Aldrich» (США). Поліклональні антитіла до другого ЕН-домену інтерсектину 1 було отримано раніше в нашій лабораторії [130]. Кон'юговані з пероксидазою хрому вторинні антитіла цапа anti-Mouse та anti-Rabbit було придбано у компанії «Promega» (США). Вторинні антитіла, кон'юговані з флуоресцентними барвниками, було придбано в компанії «Invitrogen» (США).

2.2. Біологічний матеріал

У роботі використовували клітини *Escherichia coli* штамів BL21(DE3) «Novagen» (США) та XL1-Blue^{tet} «Stratagen» (США), а також лінії клітин ссавців 293 (клітини ембріональної нирки людини) і HeLa (клітини аденокарциноми шийки матки). Крім того, використовували лізати головного мозку мишей лінії Balb/c. Для приготування первинних дисоційованих культур нейронів гіпокампу використовували щурів лінії Wistar.

2.3. Виділення РНК

РНК з тканин миші виділяли гуанідинізоціанатним методом [131] із використанням реагента «Trizol» («Gibco BRL», США).

2.4. Синтез кДНК

В реакційну суміш, загальним об'ємом 20 мкл, вносили 5 мкг тотальної мРНК, праймери (Oligo dT₁₅) в кількості 100 пМ, 4мкл 5X буфера, 1мкл 100 мМ ДТТ, 2мкл 10мМ dNTP, 0,5мкл інгібітора РНКаз (40 од./мкл), 1 мкл зворотної транскриптази (50 од./мкл). Денатурацію РНК проводили при 65°C протягом 10 хв. Синтез проводився при 42°C протягом однієї години. Для проведення подальших

ПЛР в якості матриці використовували 5% отриманої кДНК (1мкл реакційної суміші). До використання зберігали при 4°C.

2.5. Плазмідні конструкції

Повнорозмірну кодуючу послідовність кДНК ізоформи ITSН1S (NM_001001132.1) було ампліфіковано методом ПЛР з використанням прямого праймера 5`-AGGCTCGAGТААСАГААССАТGGCTC-3` і зворотнього праймера 5`-TGGAАТТСАТТGCTGGCTTGTGGGTCCA-3` та клоновано у векторі рEGFP-C1 («Clonteh», США) за сайтами XhoI та EcoRI. Конструкцію, що кодує злиті ДН-РН-С2 домени, було люб'язно надано Др. Сюзанною де ла Луна (Барселона, Іспанія). Конструкцію, що кодує ізоформу ITSН1L, злику з зеленим флуоресцентним білком EGFP, було зібрано з конструкцій, описаних вище, шляхом вставки послідовності ДН-РН-С2 у конструкцію рEGFP-C1-ITSН1S за сайтами EcoRI та Sall. Повнорозмірну кодуючу послідовність кДНК нейрональної ізоформи STOP (NM_010837) було ампліфіковано методом ПЛР з використанням прямого праймера 5`-GТАGАТСТСАТGGCGTGGCCG-3` та зворотнього праймера 5`-СТGGТАССТСАGGGGАТСССТC-3` та клоновано у векторі рmCherry-N1 («Clontech», США) за сайтами рестрикції BglII та KpnI. Конструкції, що кодують GST-злитий SH3A-домен ITSН1, а також касету GST-SH3A-E, було отримано раніше у нашій лабораторії [8,128]. Конструкції, що кодують інші GST-злиті SH3 домени ITSН1, було отримано шляхом клонування в векторі рGEX-4Т-3 GE Healthcare», Великобританія) за сайтами рестрикції EcoRI та XhoI нуклеотидних послідовностей цих доменів, отриманих методом ПЛР ампліфікації з кДНК ембріональної печінки людини з використанням наступних праймерів:

SH3B: прямий – 5`-ССGAАТТССАССGTTCCAAGTGCCG-3`, зворотній – 5`-GCCTCGAGGGCTACTCGCTTTAGAC-3`;

SH3C: прямий – 5'-CATGAATTCGTCTACAAGCATGGATT-3', зворотній – 5'-ACTCTCGAGTTTCCCAGCAGTTCCAG-3';

SH3D: прямий – 5'-AGAATTCTGGAACTGCTGGGAAAACA-3', зворотній – 5'-GTCTCGAGGTTGGAGTGATTTTGCTC-3';

SH3E: прямий – 5'-CGAATTCAGAGCCACСТАAGTCAACA-3', зворотній – 5'-GACTCGAGTCTGAACACCATTTGCTGG-3'

Для отримання конструкції, що кодує GST-злиту надспіралізовану ділянку *ITSN1* (GST-CCR) фрагмент кДНК *ITSN1*, що кодує цю ділянку було ампліфіковано методом ПЛР, використовуючи прямий праймер 5'-AGGAATTCTCGATCTGGCAGTGGTAT-3' і зворотній праймер 5'-CTCTCGAGGCTGGTTCTTGGTGTGA-3', та клоновано у векторі pGEX-4T-3 («GE Healthcare», Великобританія) за сайтами рестрикції EcoRI та XhoI. Конструкцію повнорозмірної кодуючої послідовності Епсину 1 у векторі pGEM-T було надано Др. Сергієм Кропивком. Конструкцію, що кодує злитий з His-тагом С-кінцевий фрагмент Епсину 1 отримували, вирізавши ділянку нуклеотидної послідовності, що кодує цей фрагмент (а.з. 457-576, Q9Y6I3), з повнорозмірної конструкції за допомогою ендонуклеаз рестрикції PstI та NotI, і клонувавши її у векторі pBluescriptSK+, після чого цей фрагмент було вирізано і клоновано у векторі pET28c («EMD Biosciences», США), використовуючи ендонуклеази рестрикції EcoRI та NotI. Нуклеотидні послідовності усіх творених плазмідних конструкцій було визначено за допомогою секвенування за методом Сенгера та автоматичному секвенаторі «Applied Biosystems 3130» (США). Плазмиду, що кодує GST-злиті ЕН-домени, було люб'язно надано Др. Миколою Дергаєм (Київ, Україна). Конструкцію, що кодує короткі шпилькові РНК, комплементарні до кодуючої послідовності *ITSN1*, було люб'язно надано Др. Стефаном Гасманом (Страсбург, Франція). Конструкцію EGFP під контролем промотора β -актину було люб'язно надано Др. Яцеком Яворським (Варшава, Польща).

2.6. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Полімеразні ланцюгові реакції проводили на приладах «DNA Thermal Cycler» («Perkin Elmer», США) або «2720 Thermal Cycler» («Applied Biosystem», США) в 20 або 50 мкл суміші з використанням набору реагентів «High Fidelity PCR Enzyme Mix» («Fermentas», Литва). Реакційні суміші містили 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,4 пМ обох праймерів, 1,5 U полімерази згідно з протоколом до набору реагентів. В якості матриці використовували препарат кДНК з печінки 12-тижневого ембріону людини. Умови проведення реакції визначали згідно з рекомендаціями виробника набору реагентів для ПЛР в залежності від довжини очікуваного ПЛР-фрагменту, температуру реасоціації праймерів визначали за допомогою програми Oligo.

2.7. Електрофорез нуклеїнових кислот у агарозному гелі

Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот проводили у 0,8-2% агарозних гелях при напрузі 5В/см. В якості буферного розчину використовували 40 мМ трис-ацетатний буфер (40 мМ Tris, 20 мМ CH_3COOH , 1 мМ ЕДТА, рН 8,3). Для візуалізації фрагментів ДНК в гелі використовували бромистий етидій.

2.8. Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю

Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю проводили, використовуючи набір реагентів “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit” компанії “Thermo Fisher Scientific” (США) згідно з рекомендаціями виробника. Необхідний фрагмент ДНК вирізали з агарозного гелю, зважували і додавали буфер для зв'язування з розрахунку 3 мкл буферу на 1 мкг агарози, що містила ДНК. Після цього суміш інкубували при 56°C протягом 10 хв., добиваючись

повного розплавлення агарози. Надалі до суміші додавали 5 мкл суспензії скляних кульок, що служили сорбентом ДНК, та інкубували при кімнатній температурі протягом 7 хв., перемішуючи. Після цього сорбент осаджували центрифугуванням на настільній центрифугі моделі 5418 («Eppendorf», Німеччина) при 5000 об/хв. протягом 30 с та двічі промивали 500 мкл буферу для промивки. Потім сорбент сушили при кімнатній температурі протягом 5 хв. та додавали до нього бажаний об'єм деіонізованої води, після чого інкубували протягом 10 хв. при 56°C, центрифугували на настільній центрифугі моделі 5418 («Eppendorf», Німеччина) при максимальних обертах та відбирали супернатант.

2.9. Реакції рестрикції та лігування.

Реакції рестрикції та лігування проводили з використанням буферів та ферментів виробництва компанії «Fermentas» (Литва) згідно з рекомендаціями виробника. Реакцію проводили при 37°C, якщо для конкретної рестриктази не було зазначено іншої температури, протягом 1 год. Ефективність рестрикції перевіряли, розділяючи рестриктні фрагменти методом електрофорезу ДНК в агарозному гелі і порівнюючи їх розмір з маркерними фрагментами ДНК («Fermentas», Литва).

2.10. Отримання компетентних клітин *E. coli* та їх трансформація плазмідною ДНК

Для отримання компетентних клітин 0,5 мл нічної культури клітин *E. coli* необхідного штаму, вирощеної в середовищі LB (1% NaCl; 1% триптон; 0,5% дріжджовий екстракт) протягом 12-16 год., інокулювали у 100 мл свіжого середовища А (LB+0,2% глюкози+10мМ MgSO₄). Вирощували при 195 об/хв..

та 37⁰С до OD₆₀₀ = 0,3 (5x10⁷ клітин/мл). Оптичну щільність клітин вимірювали на спектрофотометрі «Ultrospec 1000» («Amesham Pharmacia Biotech», Швеція/Великобританія) при довжині хвилі 600 нм. Культуру охолоджували протягом 5-7 хв на льоду та збирали клітини центрифугуванням у центрифугі «Jouan» при 3000 об/хв, 6-7 хв при 4⁰С. Видаляли надосадову рідину та обережно ресуспендували осад клітин в 0,5 мл охолодженого середовища А. Додавали 2 мл 2^x TSS (20% ПЕГ 6000; 100мМ MgSO₄; до 50 мл LB) та 1 мл 80% гліцерину. Отриману суспензію клітин фасували по 200 мкл в наперед охолоджені мікропробірки (приблизно 17 пробірок), які зберігали до використання при -70⁰С.

Аліквоту суспензії компетентних клітин розміщували у крижаній бані та давали клітинам відтанути протягом 5-10 хв., після чого додавали розчин плазмідної ДНК або лігазної суміші, об'єм яких не перевищував 5% від загального об'єму аліквоти. Суміш перемішували та інкубували пробу на крижаній бані протягом 15-30 хв, після чого проводили тепловий шок на водяній бані (42⁰С) протягом 2 хв. Далі інкубували пробу на крижаній бані 3-4 хв та додавали 1 мл середовища LB без антибіотика. Отриману суспензію інкубували протягом 1 год. при 37⁰С. Відбирали необхідний об'єм суспензії та висівали її на стерильну чашку Петрі з твердим поживним середовищем (LB + 1,5 % бактоагар) з відповідним антибіотиком за допомогою бактеріального шпателя. Чашки інкубували протягом ночі при 37⁰С, перевіряючи наявність колоній, що вирости, на наступний день.

2.11. Виділення плазмідної ДНК

3 мл середовища LB (1% NaCl; 1% триптон; 0,5% дріжджовий екстракт), яке містило 50 мкг/мл ампіциліна інокулювали одиначною колонією та вирощували в термостаті при 37⁰С протягом ночі.

Бактеріальні клітини збирали центрифугуванням в настільній мікроцентрифузі протягом 1 хв. при 14000 об/хв. Осад ресуспендували у 200 мкл охолодженого буфера P1 (50мМ Tris-HCl, pH 8,0; 10мМ ЕДТА) з 1 мкл РНКазі А (10 мг/мл). Додавали до суспензії 200 мкл буфера P2 (200 мМ NaOH; 1% ДСН), обережно перемішували 4-7 разів та відразу додавали 200 мкл охолодженого буфера P3 (3М CH₃COOK, pH 5,5). Після цього суміш інкубували 15 – 20 хв на крижаній бані та центрифугували при 14000 об/хв 10 – 20 хв. Супернатант переносили в нову мікропробірку та додавали 0,7 об'єму (420 мкл) ізопропанолу, перемішували та інкубували при кімнатній температурі 15 хв. Суміш центрифугували при 14000 об/хв протягом 15 хв, осад двічі промивали 400 мкл 70% етанолу Після видалялення етанолу осад сушили при кімнатній температурі 5 – 10 хв. та розчиняли в потрібному об'ємі деіонізованої води або буфера TE. Отриманий препарат ДНК до використання зберігали при –20⁰С.

Для отримання плазмід в препаративній кількості використовувались набори реагентів «Plasmid Midi Kit» («Quiagen», Німеччина) або «GeneJET Plasmid Maxiprep Kit» («Thermo Fisher Scientific», США). Виділення плазмід проводили згідно з протоколами виробника. Правильність вставки у отриманих плазмідах перевіряли шляхом секвенування за допомогою автоматичного секвенатора «3130 Genetic Analyzer» («Applied Biosystem», США).

2.12. Експресія рекомбінантних білків в *E. coli*

Експресію His- та GST-злитих білків проводили у клітинах *E. coli* штамму BL21(DE3)Rosetta в середовищі LB в присутності селективних антибіотиків. Індукцію проводили при досягненні культурою оптичної щільності OD₆₀₀=0.6, додаючи до культури розчин ізопропил-β-D-1-тіогалактопіранозиду (ІПТГ, «Thermo Fisher Scientific», США) до фінальної концентрації 1мМ. Індукцію проводили протягом 4 год. при температурі 37⁰С.

2.13 Очищення рекомбінантних білків з використанням афінної хроматографії

Лізати бактерій, що експресували GST-злиті білки, готували в 1^x PBS (140 мМ NaCl; 2,7мМ KCl; 10 мМ Na₂HPO₄; 1,8 мМ KH₂PO₄). Лізати бактерій, що експресували His-злиті білки, готували у буфері для лізису в нативних умовах (10 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, 1% NP-40, 10 мМ імідазол, рН 7.5). Лізис бактеріальних клітин проводили шляхом обробки ультразвуком 20 кГц – 3 рази по 30 сек. з такими ж інтервалами. Після цього лізати центрифугували при 4⁰С при максимальних обертах центрифуги протягом 30 хв. Очистку GST-злитих білків проводили за допомогою глутатіон-сефарози 4В (див. ст.37) згідно з рекомендаціями виробника. Виділення та очистку His-злитих білків проводили, використовуючи Ni-NTA-агарозу (див. ст.37) згідно з протоколом виробника для нативних умов.

2.14. Приготування загального лізату розчинних білків з мозку миші

Мишей вбивали шляхом цервікальної дислокації. Головний мозок розтирали у гомогенізаторі Поттера у 10 мл буферу EB1 (10мМ Tris-HCl рН 7,5; 1% Triton-X100; 150мМ NaCl; 5мМ EDTA рН 8,0; 50мМ NaF; 5мМ бензамідін, 1мМ фенілметилсульфонілфлуорид; 1мкл/мл апротинін; 0,125 мМ ортованадат натрію). Лізат центрифугували у настільній мікроцентрифузі при 13000об/хв. і температурі 4⁰С 20 хв. Супернатант відбирали і заморожували при -70⁰С.

2.15. Преципітація партнерів цільових GST-злитих білків з лізатів клітин та тканин

Глутатіон-сефарозу двічі промивали в 1^x PBS, після чого додавали GST-злитий білок або окремо GST (контроль) та інкубували з нею при 4⁰С, одну

годину при перемішуванні. Потім осаджували глутатіон-сефарозу, обережно видаляли супернатант та тричі промивали 1^x PBS. До відмитої глутатіон-сефарози додавали матеріал, що містив передбачувані білки-партнери (лізат мозку миші, культур клітин або бактерій з індукованою експресією білка-партнера), та інкубували з ним при 4⁰С протягом ночі при перемішуванні. На наступному етапі промивали, як було описано вище, отриману суспензію 10 об'ємами (від об'єму глутатіон-сефарози) 1^x PBS, осаджували глутатіон-сефарозу, видаляли супернатант, додавали відповідний об'єм двократного буферу для нанесення (500мМ Tris-HCl, рН 6,8; 10% гліцерол; 1,2% ДСН; 1,2% β-меркаптоетанол; 0,1% бромфеноловий синій), кип'ятили протягом десяти хвилин та розділяли за допомогою білкового електрофорезу в ПААГ та далі аналізували за допомогою Вестерн-блот аналізу або фарбування гелю.

2.16. Преципітація партнерів цільових His-злитих білків з лізатів клітин і тканин

Для проведення преципітації з використанням His-злитих білків до відмитої Ni-NTA-агарози додавали лізат клітин *E.coli*, що експресували His-злитий білок, та інкубували перемішуючи при температурі 4⁰С протягом 1 год. Після промивки до агарози додавали лізат, що містив передбачувані білки-партнери. До складу реакції додавали 0.5 мМ ЕГТА та, де вказано, 1.5 мМ CaCl₂ або MgCl₂. Суміш інкубували протягом 1 год. при 4⁰С, перемішуючи на ротаторі. Після цього Ni-NTA-агарозу тричі промивали (до буферів для відмивки додавали відповідні солі двохвалентних катіонів або ЕГТА), додавали відповідний об'єм двократного буферу для нанесення, кип'ятили протягом десяти хвилин та розділяли за допомогою білкового електрофорезу в ПААГ та далі аналізували за допомогою Вестерн-блот аналізу або фарбування гелю.

2.17. Ко-імунопреципітація білкових комплексів

До відмитої Protein-A/G-сефарози додавали лізат мишачого мозку та 2 мкг відповідних антитіл. Інкубували протягом ночі при +4⁰C. Після промивки буфером EB1 сефарозу осаджували, додавали відповідний об'єм двократного буферу для нанесення, кип'ятили десять хвилин та розділяли за допомогою білкового електрофорезу в ПААГ та далі аналізували за допомогою Вестерн-блот аналізу.

2.18. Виділення фракції білків, що зв'язуються з кальмодуліном

Головний мозок мишей гомогенізували у буфері MEM (100 мМ MOPS, pH 6.75; 400 мМ NaCl; 1 мМ MgCl₂; 1 мМ EGTA; 2 мМ ДТТ; коктейль інгібіторів протеаз "Roche") та центрифугували 20 хв. при 12000g при 4⁰C. До супернатанту додавали CaCl₂ до кінцевої концентрації 2 мМ і завантажували його у колонку з кальмодулін-агарозою. Після промивки проводили елюцію білків, що зв'язалися, додаючи до колонки буфер MEM без додавання CaCl₂.

2.19. *In vitro* кіназна реакція

Фракцію білків, що зв'язалися з кальмодуліном, було діалізовано проти кіназного буферу (50 мМ Тріс-HCl, pH 7.5; 10 мМ MgCl₂; 2 мМ ДТТ), використовуючи мембрану для діалізу Spectra/Por 1 DialysisMembrane («Spectrum Laboratories Inc.» США). Рекombінантні GST та GST-злиті білки було експресовано в клітинах *E. coli* штамму BL21(DE3)Rosetta та очищено за допомогою глутатіон-сефарози 4В, як було описано вище. Зв'язані з сефарозою білки примивалися кіназним буфером, після чого до них додавали діалізовану фракцію білків, що зв'язалися з кальмодуліном, до кінцевого об'єму 50 мкл у кожній пробі. Всі реакційні суміші містили 0.4М EGTA та 0.5 мкМ

мікроцистин, крім того, деякі з них містили 100 мкМ АТФ, 3 мкМ кальмодулін, 2 мМ CaCl₂ або 2 мМ ЕГТА. *In vitro* кіназні реакції проводили при температурі 30⁰С протягом 30 хв., після чого їх перебіг зупиняли додаванням рівного об'єму буферу для нанесення білків на білковий електрофорез в денатуруючі умови і подальшим кип'ятінням.

2.20. Білковий електрофорез в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах

Електрофоретичне розділення білків у денатуруючих умовах проводили у камерах для вертикального електрофорезу виробництва «Helicon» (Росія) за стандартною методикою [132]. Для білкового електрофорезу використовували 4% концентруючий та розділюючі гелі концентрацією 7.5-15% при співвідношенні акриламіді і біс-акриламіді 29:1. Проводили електрофорез в тріс-гліциновому буфері (192мМ гліцин; 25мМ Tris-ОН; 1%ДСН). Після закінчення електрофорезу білки візуалізували за допомогою Вестерн-блот аналізу або одного з методів фарбування білків, описаних нижче.

2.21. Вестерн-блот аналіз

Переніс білків на нітроцелюлозну мембрану проводився у апараті для електропереносу «Amersham Biosciences» (Швеція/Великобританія). Переніс білків з ПААГ здійснювали мембрану в буфері для переносу (192 мМ гліцин; 25мМ Tris-ОН; 20% метанол) при 250 мА протягом 1,5 годин. Для цього з гелю після SDS-електрофорезу та нітроцелюлозної мембрани складали “сендвіч”: негативний електрод → плата → 3ММ фільтровальний папір → гель → нітроцелюлозна мембрана → 3ММ фільтровальний папір → плата → позитивний електрод; та закладали цей сендвіч в прилад для переносу. Попередньо нітроцелюлозну мембрану змочували у воді та витримували 5 хв. у

буфері для переносу. Після переносу мембрану підсушували та інкубували півтори години в 5% розчині молока у буфері 1^xTBS-T (20мМ Tris-HCl, рН 8,0; 150мМ NaCl; 1% Triton X-100), після чого інкубували в тому ж буфері з розведеними первинними антитілами протягом 1 год. Після промивки від первинних антитіл мембрану інкубували протягом 1 год. в розчині з вторинними антитілами, промивали чотири рази та проводили хемолюмінісцентну (ECL) детекцію: в ємності швидко змішували рівні об'єми розчину А (0,1М Tris-HCl, рН8.5; 2,5 мМ люмінол; 0.4 мМ кумарова кислота) та розчину Б (0,1М Tris-HCl, рН8.5; 0.02% H₂O₂) та інкубували мембрану в отриманій суміші протягом 1 хв. при перемішуванні. Детекцію хемілюмінісцентного сигналу проводили за допомогою рентгенівської плівки або системи гель-документації «ChemiDoc» і програми ImageLab («BioRad», США).

2.22. Фарбування білків у гелі барвником Кумасі бриліантовий синій.

По закінченню електрофорезу гель поміщали у розчин барвника (0,1% Кумасі бриліантовий синій R250, 40% метанол, 10% оцтова кислота) на 20 хв. Після цього відмивали гель від фонового забарвлення шляхом кип'ятіння в дистильованій воді до отримання чіткого контрастного зображення.

2.23. Денситометричні вимірювання інтенсивності сигналу від білкових смуг у гелях та блотах

Денситометричні вимірювання білкових смуг, отриманих у результаті Вестерн-блот аналізу або фарбування гелів Кумасі бриліантовим синім при проведенні преципітацій партнерів цільових His-злитих білків з лізатів клітин і тканин, проводили за допомогою програми «ImageLab». Для нормалізації сигналу отримані значення інтенсивності смуг білків, що зв'язалися, ділили на

значення інтенсивності смуг цільових His-злитих білків. Нормалізовані значення інтенсивності смуг усіх експериментальних варіантів кожного експериментального повтору підсумовувалися і визначалось процентне значення від отриманої суми для кожного варіанту.

2.24. Біоінформатичне передбачення сайтів фосфорилювання

Передбачення потенційних сайтів фосфорилювання проводили за допомогою онлайн-сервісів «Scansite», «NetPhos» та «KinasePhos», а також програми «GPS 2.1» [133–137]. Для передбачення використовували ізоформу ITSN1L (номер Q15811 у базі даних «UniProtKB»). У всіх випадках передбачення проводили для Ca²⁺/кальмодулін-залежної кінази 2. У програмі «Scansite» використовували рівень параметру «Stringency» – «High». На сервері «NetPhos» обирали рівень порогового значення «Score»=0.50. На сервері «KinasePhos» пошук проводили за значення «Prediction Specificity»=95%. У програмі «GPS 2.1» використовували значення параметру «Threshold» – «High».

2.25. Фарбування фосфорильованих білків у поліакриламідному гелі

Фарбування фосфорильованих білків у гелі проводили за допомогою барвника «Pro-Q Diamond» з набору реагентів «Phosphoprotein Gel Stain Kit» компанії «Invitrogen» (США) згідно з протоколом виробника. Для контролю нанесення після фарбування гелю барвником «Pro-Q Diamond» здійснювали фарбування барвником «Sypro Ruby» з набору реагентів «Phosphoprotein Gel Stain Kit», що забарвлює білки незалежно від їх статусу фосфорилювання. В обох випадках детекцію проводили за допомогою лазерного документатора «PharosFX» («BioRad», США), використовуючи програмне забезпечення «Quantity One» («BioRad», США).

2.26. MALDI-TOF мас-спектрометрія

Після фарбування поліакриламідного гелю Кумасі бриліантовим синім білкові смуги було вирізано та механічно подрібнені. Відмивку від барвника і розщеплення трипсином у гелі проводили за описаною процедурою [138]. Мас-спектрометричну ідентифікацію отриманих пептидів здійснювали за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометра «Reflex III» («Bruker», США). Вихідні білки ідентифікували зі спектру пептидних мас за допомогою алгоритму «MOWSE» програми «Mascot» («Matrix Science», США) [139] з введенням наступних критеріїв пошуку: протеолітичний фермент – трипсин; один дозволений пропущений сайт розрізання; варіабельні модифікації – окислення метіоніну та пропіонамідування цистеїну; допустима похибка пептидних мас - ± 70 ppm. Пошук проводили у базі даних «NCBI nr 20050427», що на момент пошуку містила 2430812 послідовностей, застосовуючи таксономічний фільтр «миша» (78398 послідовностей). Результати вважали достовірними при значенні «MOWSE score» > 61 , що відповідає $p < 0,05$.

2.27. Тандемна мас-спектрометрія

Білки було піддано протеолізу у гелі при 37°C протягом ночі за допомогою трипсину або протеази Glu-C при співвідношенні протеази до білку 1:50. Наступного дня пептиди екстрагували з гелю та знесолювали за допомогою набору реагентів «Oasis C18» («Waters», США). Після цього пептиди було розведено таким чином, щоб кінцева концентрація мурашиної кислоти у зразку становила 4%. Отримані зразки було проаналізовано за допомогою мас-спектрометра «LTQ Orbitrap Velos Pro», обладнаного іонізатором «Nanospray Flex» та системою рідинної хроматографії «Dionex Ultimate NCS-3000» («Thermo Fisher Scientific», США). Фрагментація іонів проводилася методом дисоціації, що індукується високоенергетичним

співударянням (HCD). Спектри було отримано за допомогою програми «Proteome Discoverer™» («Thermo Fisher Scientific», США). Отримані спектри аналізували за допомогою програми «Mascot» («Matrix Science», США) з наступними критеріями пошуку: протеолітичний фермент – трипсин; кількість дозволених пропущених сайтів розрізання – 2; фіксовані модифікації – карбамідометилування цистеїну; варіабельні модифікації – окислення метіоніну, ацетилювання N-кінцевого амінокислотного залишку та фосфорилування серину/треоніну; допустима похибка маси іона-прекурсора - ± 15 ppm; допустима похибка маси іона-продукта – 0,05 Да. Пошук проводили у базі даних «Mascot5_SwissProt_Homo sapiens (human)», що на момент пошуку містила 16405 послідовностей. Пептиди з достовірно визначеними сайтами фосфорилування відбирали за значенням «Mascot Delta Ion Score» згідно з існуючими рекомендаціями, приймаючи порогове значення 13 [140], після чого додатково перевіряли визначені сайти вручну, аналізуючи спектри мас іонів-продуктів з використанням програми «Scaffold» (версія 3.6.5., «Proteome Software», США) [141].

2.28. Культивування клітин

Клітини ембріональної нирки людини лінії 293 та клітини карциноми шийки матки людини лінії HeLa культивували при 37°C у атмосфері, що містила 5% CO₂ 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.

Для приготування первинних культур нейронів використовувались щури лінії Wistar. Для дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків використовувалась культура нейронів гіпокампу новонароджених щурів, яку виготовляли і культивували як було описано раніше [142]. Гіпокапи щурів було дисоційовано за допомогою трипсину і висіяно на скельця вкриті ламініном та полі-L-орнітином. Дисоційовані клітини інкубували у середовищі, що містило

мінімальне основне середовище, 10% сироватку коня та додаток N2 («Invitrogen», США). Клітини використовували для експериментів після двох тижнів культивування.

Для дослідження морфології нейронів культуру нейронів гіпокампу виготовляли з мозку 19-денних ембріонів щура (E19) як було описано [143]. Клітини висівалися на покривні скельця, вкриті ламініном та полі-L-лізином. Культури вирощувались у середовищі Neurobasal medium, що також містило 2% додаток B27 («Invitrogen», США), 0.5 мМ глутамін, 12.5 мкМ глутамат та суміш пеніциліну і стрептоміцину. Клітини використовували для експериментів після 1 тижня культивування.

2.29. Трансфекція клітин в культурі плазмідною ДНК

Трансфекцію клітин 293 та HeLa проводили, використовуючи реагент для трансфекції «TurboFect» («Thermo Fisher Scientific», США) згідно з рекомендаціями виробника. Трансфекцію нейронів гіпокампу новонароджених щурів проводили за допомогою реагенту «Lipofectamine 2000» («Invitrogen», США) після двох тижнів культивування за стандартною процедурою виробника. Трансфекцію нейронів гіпокампу ембріонів щурів проводили за допомогою реагенту «Lipofectamine 2000» після одного тижня культивування, використовуючи описаний модифікований протокол [144]. Згідно з цим протоколом, для трансфекції нейронів, що культивувалися у одній лунці 24-лункового культурального планшету, 0,9 мкг плазмідної ДНК розчиняли у 100 мкл середовища Neurobasal medium та додавали до суміші 1,6 мкл реагенту «Lipofectamine 2000», після чого інкубували трансфекційну суміш протягом 30 хв. Протягом цього часу готували свіже поживне середовище та додавали його до середовища, в якому інкубувались нейрони, у співвідношенні 1:1. Після перемішування половину утвореного змішаного середовища відбирали і зберігали при 37°C. Суміш ДНК та реагенту «Lipofectamine 2000» додавали до

клітин та інкубували їх при 37°C у атмосфері, що містила 5% CO₂, протягом 2-4 год. Потім клітини двічі промивали середовищем Neurobasal media та додавали до них збережену суміш старого та свіжого середовищ.

2.30. Аналіз резистентності мікротрубочок до холоду і нокодазолу

Клітини лінії HeLa культивували протягом доби після трансфекції, після чого інкубували їх на льоду протягом 30 хв., або додавали до середовища для культивування нокодазол до фінальної концентрації 1 мкМ та інкубували при 37°C протягом 1 год. Після інкубації клітини фіксували, резистентність мікротрубочок до факторів стресу визначали шляхом візуалізації інтактних тубулінових філаментів методом імунофлюоресцентного аналізу.

2.31. Імунофлюоресцентний аналіз клітин

Клітини, вирощені на покривних скельцях, фіксувалися у 3.7% розчині формальдегіду у 1xPBS при кімнатній температурі протягом 15 хв. Для досліджень структури мікротрубочок клітини фіксували у 100% метанолі протягом 20 хв. при -20°C. Після фіксації клітини тричі промивали 1xPBS і інкубували протягом 30 хв. у буфері для блокування (1xPBS, 0.2% TritonX-100, 2% бичачий сироватковий альбумін). Потім клітини почергово інкубували з первинними та вторинними антитілами, розведеними у буфері для блокування згідно з рекомендаціями виробників, протягом години для кожного антитіла. Між інкубаціями клітини тричі промивалися 1xPBS. Після останньої промивки скельця з клітинами приклеювали до предметного скла за допомогою гістологічного середовища на основі полівінілового спирту з 1,4-діазобіцикло[2,2,2]октаном («Fluka», США). Отримані препарати досліджували методом флюоресцентної мікроскопії. Зокрема, дослідження ко-локалізації білків проводили за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа «Zeiss LSM 510 Meta» (Німеччина), використовуючи масляний

об'єктив 63x 1.40 N.A та програму «LSM Browser». Для дослідження морфології нейронів, а також впливу коротких шпилькових РНК на експресію *ITSN1* використовували лазерний скануючий конфокальний мікроскоп «Zeiss LSM 5 Pascal» (Німеччина) з повітряним об'єктивом 20x 0.5 N.A. та масляним об'єктивом 63x 1.40 N.A відповідно, що управлявся програмним забезпеченням «ZEN» (Великобританія). Для експериментів зі структури мікротрубочок використовували широкопольний флуоресцентний мікроскоп «Leica DM4000 B» (Німеччина) з масляним об'єктивом 100x 1.25 N.A. Вимірювання інтенсивності флуоресценції проводили за допомогою програми «ImageJ»(США).

2.32. Аналіз морфології дендритного дерева нейронів

Для аналізу відбирали клітини з трьох незалежних експериментів. Для кожного аналізованого нейрона за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа отримували серію зображень вздовж оптичної осі z , що проектувались у єдине зображення за допомогою програмного пакету ImageJ, використовуючи максимальну інтенсивність проекції. В отриманих проекціях за допомогою плагіну NeuronJ програмного пакету ImageJ [145] вздовж дендритів проводили лінії, кількість і загальна довжина яких вимірювалась цим самим плагіном і відповідає сумарній довжині та кількості дендритів відповідно. Надалі отримані «відбитки» дендритного дерева зберігались у окремому файлі і використовувались для проведення аналізу Шолля [146] за допомогою плагіну «ShollAnalysisTest» програмного пакету «ImageJ» (США). Результати аналізу Шолля усереднювались і наносились на графік у декартовій системі координат, де по осі абсцис відкладали радіус кола (r), по осі ординат – кількість перетинів кола дендритами (N). Результати позначали у вигляді середнє значення \pm стандартне відхилення. Крім того, для визначення коефіцієнту регресії Шолля k ми будували графік залежності

величини $\ln \frac{N}{S}$, де S – площа кола, від радіусу кола r , та апроксимували отримані графіки лінійними функціями виду $\ln \frac{N}{S} = -kr + m$. За коефіцієнт регресії Шолля k приймали коефіцієнт при змінній.

2.33. Статистична обробка результатів

Кількісні дані у роботі представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення. Статистичну обробку даних проводили, використовуючи програми «GraphPad Prism 5» («GraphPad Software», США) та «OriginPro 9.1» («OriginLab», США). Для порівняння двох вибірок спочатку перевіряли їх на нормальність розподілу за W -критерієм Шапіро-Уїлка. Порівняння двох нормально розподілених вибірок, а також коефіцієнтів регресії Шолля проводили використовуючи t -критерій Стюдента. Множинні порівняння сигналів Вестерн-блот аналізів проводили, використовуючи критерій Краскела-Уолліса. Порівняння кривих аналізу Шолля проводили, використовуючи ANOVA тест. В усіх випадках достовірною вважалася різниця при ймовірності помилкового відхилення нульової гіпотези $p < 0.05$. $(100-\alpha)$ -відсоткові довірчі інтервали різниці середніх для двох нормально розподілених вибірок вираховували за наступною формулою:

$$(X_1 - X_2) - t_{\alpha} s_{X_1 - X_2} < \mu_1 - \mu_2 < (X_1 - X_2) + t_{\alpha} s_{X_1 - X_2}$$

де X_1 та X_2 – вибіркові середні; μ_1 та μ_2 – істинні середні; $s_{X_1 - X_2}$ – стандартна похибка різниці вибіркових середніх; t_{α} – критичне значення критерію Стюдента для значення ймовірності $p = \alpha$. Відповідні значення визначались за допомогою програми «OriginPro 9.1» («OriginLab», США).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Пошук нових нейрональних білків-партнерів ITSN1

3.1.1. Визначення білків-партнерів SH3 доменів ITSN1, злитих з GST, в лізатах головного мозку миші.

До завдань дисертаційної роботи входив пошук нових білків-партнерів ITSN1 у нейронах. Одним з потужних сучасних методів виявлення білок-білкових взаємодій є преципітація білкових комплексів *in vitro* в поєднанні з мас-спектрометричним аналізом білків, що увійшли до складу такого комплексу [147]. Суть методу полягає у тому, що цільовий білок використовується в якості «наживки», з якою взаємодіють його партнери. Така «наживка» іммобілізується на сорбенті шляхом афінного зв'язування з ним і інкубується з біологічним матеріалом, що містить потенційні білки-партнери. Після відмивки сорбенту проводиться елюція білків, що зв'язалися, та їх розділення методом електрофорезу та/або рідинної хроматографії. Індивідуальні білки підлягають протеолітичному розщепленню на короткі пептиди, відношення маси до заряду яких можна визначити за допомогою мас-спектрометрів, обладнаних іонізаторами типу MALDI або електроспрей, що дозволяють іонізувати пептиди. Таким чином, для кожного білка можна отримати спектр відношень маса/заряд, після аналізу якого за допомогою біоінформатичних інструментів можна встановити вихідний білок. Схему подібного експерименту зображено на рис. 3.1.

Білки родини ITSN містять у своєму складі певну кількість структурних доменів, що здатні взаємодіяти з відповідними молекулами-

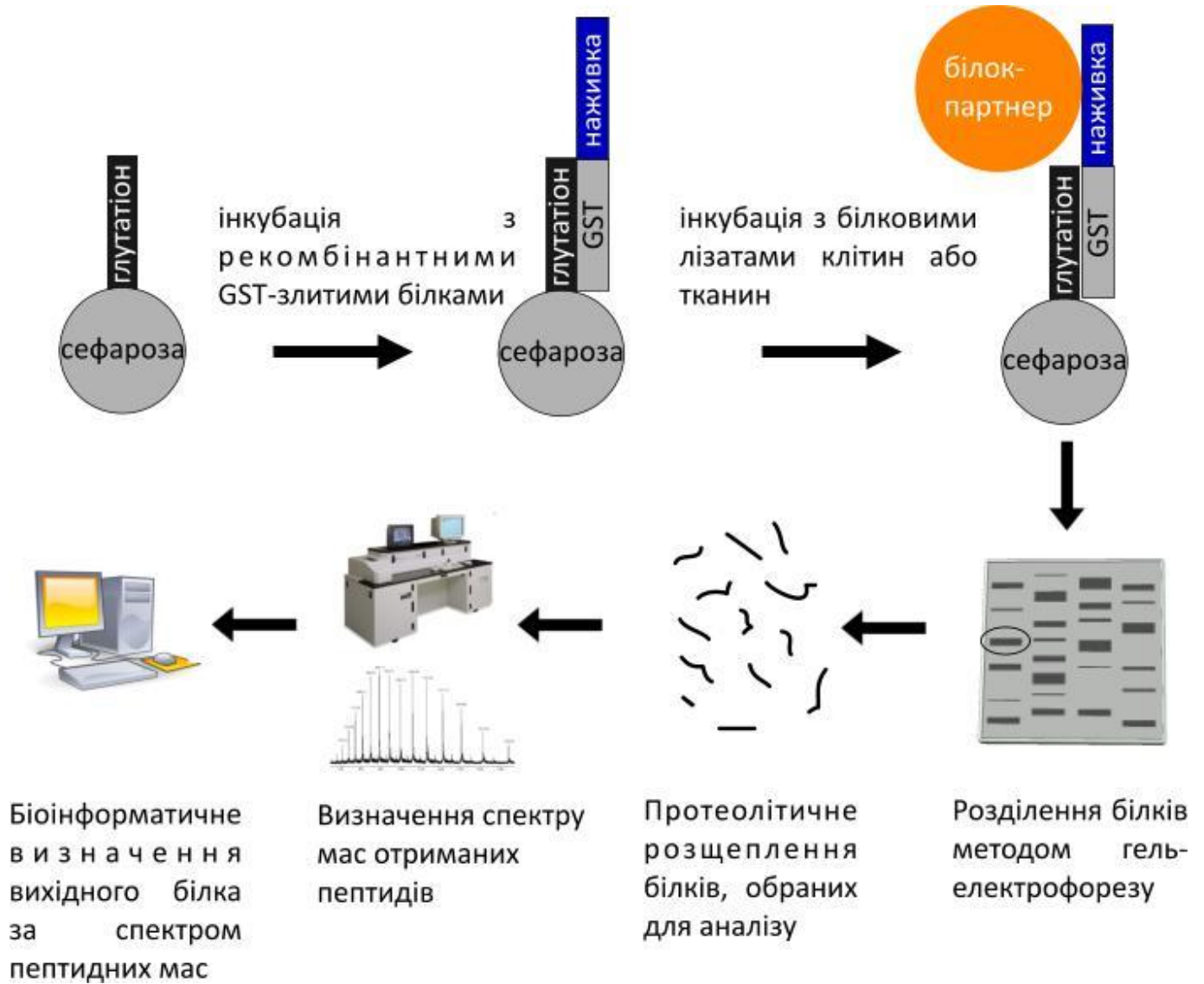


Рис. 3.1. Загальна схема експерименту з визначення білків-партнерів з використанням GST-злитих рекомбінантних білків

лігандами. Зокрема, основні ізоформи ITSN1 містять п'ять SH3 доменів, що взаємодіють з пролін-багатими мотивами у складі білків-партнерів. Ці домени було використано для пошуку нових білків-партнерів ITSN1. Для цього фрагменти кДНК ембріональної печінки людини, що кодують SH3 домени

ITSN1, було ампліфіковано методом ПЛР та клоновано у векторі pGEX-4T3, який застосовується для синтезу GST-злитих рекомбінантних білків у клітинах прокариот (рис.3.2). Наявність у цьому векторі промотора P_{tac}

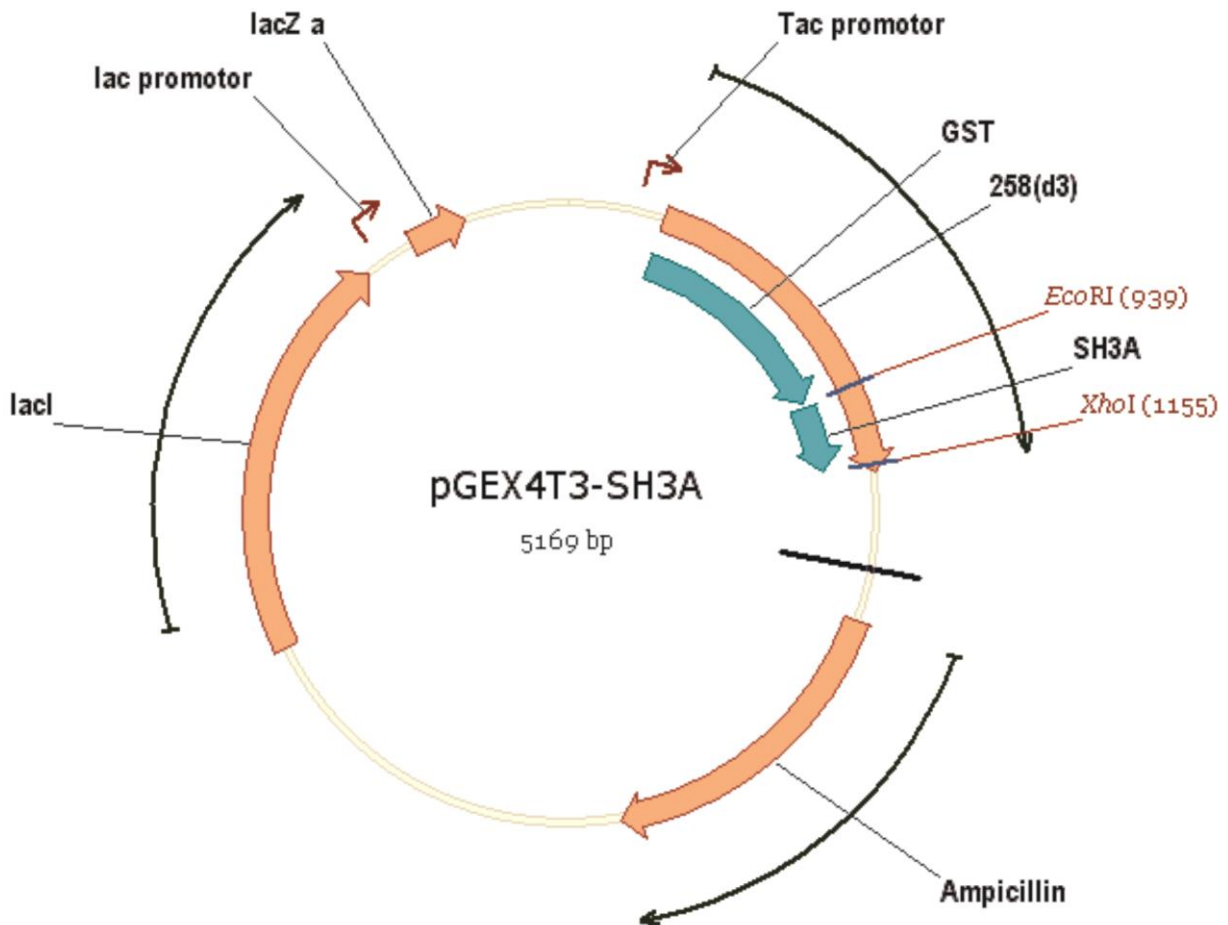


Рис. 3.2. Схематичне зображення конструкції, що кодує SH3A домен ITSN1, злитий з GST. Конструкція створена на базі вектора для бактеріальної експресії pGEX-4T-3

дозволяє проводити індукцію його експресії у клітинах *E.coli* за допомогою IPTG. Послідовність вставок у отриманих плазмідних конструкціях було перевірено методом секвенування. Перевірені плазмідні конструкції було використано для експресії GST-злитих рекомбінантних SH3 доменів ITSN1 у клітинах *E.coli* штаму BL21(DE3)Rosetta. Для перевірки ефективності експресії лізати індукованих клітин було розділено методом електрофорезу у ПААГ.

Проведений аналіз засвідчив високий рівень експресії GST-злитих SH3 доменів ITSN1 та їх присутність у розчинній фракції білків, що є важливим для їх подальшого використання з метою дослідження білок-білкових взаємодій (рис.3.3). Експресовані GST-злиті білки іммобілізували на глутатіон-сефарозі і потім інкубували з білками лізату головного мозку мишей.

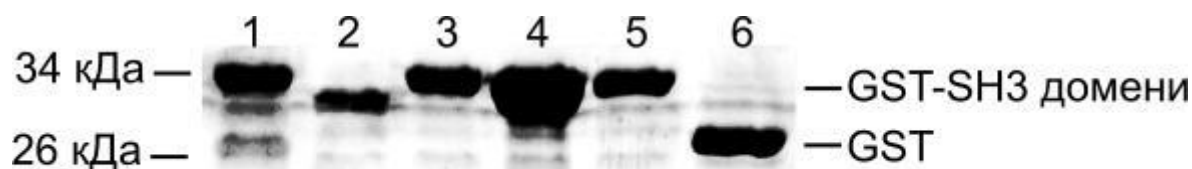


Рис. 3.3. Електрофореграма афінно очищених GST-злитих SH3 доменів ITSN1 в 12,5% ПААГ: 1 - GST-SH3A домен; 2 - GST-SH3B домен; 3 - GST-SH3C домен; 4 - GST-SH3D домен; 5 - GST-SH3E домен; 6 - GST

Після проведення преципітації білки, що зв'язалися, було розділено за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі (рис.3.4). Для ідентифікації методом MALDI-TOF мас-спектрометрії було обрано дві смуги, а саме: смугу розміром близько 100 кДа, що була наявна у доріжках, які відповідають SH3A, SH3C та SH3E доменам, а також смугу розміром близько 120 кДа, яка була наявна лише для SH3A домену (рис.3.4). Отримані спектри пептидних мас аналізувалися за допомогою програми Mascot, використовуючи алгоритм MOWSE [139]. Ця програма визначає білки, амінокислотна послідовність яких може співпадати з визначеними пептидами, а також ймовірність випадкового співпадіння з пептидами для кожного з визначених білків. Достовірно визначеними вважаються білки, для яких ця ймовірність не перевищує значення $P < 0.05$, проте враховуючи великий об'єм бази даних, з якою порівнюються експериментально визначені пептиди, програма застосовує поправку Бонферроні для множинних порівнянь, що призводить до зниження гранично допустимого значення P на декілька порядків [139]. Для спрощення

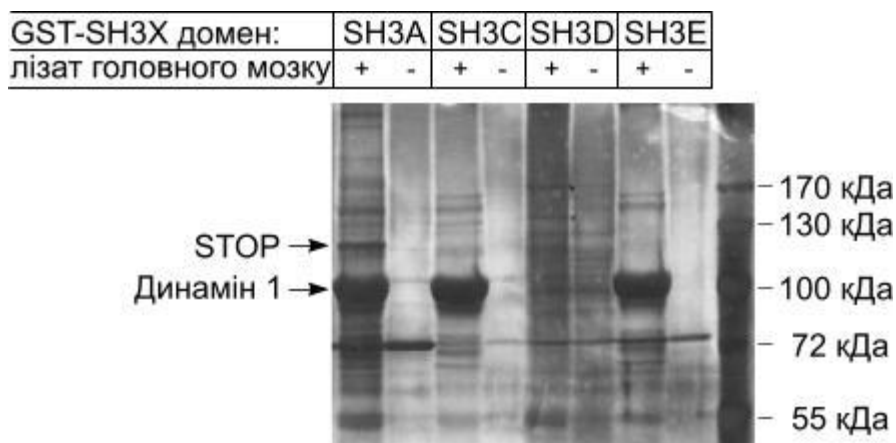


Рис. 3.4. Електрофореграма продуктів преципітації білків головного мозку миші з GST-злитими SH3 доменами ITSN1 у 7,5% ПААГ. Стрілками позначені смуги, що було обрано для аналізу і визначено методом MALDI-TOF мас спектрометрії

аналізу отриманих результатів, для кожного білка програма вираховує чисельне значення $MOWSE\ score = -10 \cdot \lg(P)$, а також визначає гранично допустиме значення $MOWSE\ score$, нижче якого визначені співпадиння з білками вважається недостовірним. В наших експериментах граничне значення $MOWSE\ score$ становило 61.

Обрані білкові смуги було ідентифіковано як STOP(MAP6) та динамін 1 відповідно (Таблиці 3.1 та 3.2). Динамін 1 –це білок ендцитозу, що здійснює

Таблиця 3.1

Ідентифікація партнера ITSN1 за отриманим спектром мас пептидів смуги розміром близько 120 кДа за допомогою програми Mascot

№	Інвентарний номер у базі даних NCBI	Молекулярна маса, Да	Кількість піків, що співпадають/загальна кількість піків	MOWSE score	Назва у базі даних NCBI
1	gi 6754758	96405	15/24	119	microtubule-associated protein 6 [Mus musculus]

Продовження таблиці 3.1

2	gi 7513832	96346	14/24	104	stable tubule only polypeptide - mouse
3	gi 31418674	61068	12/24	99	MAP6 protein [Mus musculus]
4	gi 32264653	90487	8/24	47	Tmc6 protein [Mus musculus]
5	gi 33355701	90487	8/24	47	transmembrane channel-like protein 6 [Mus musculus]

відокремлення ендоцитозної везикули від плазматичної мембрани, взаємодія якого з ITSN1 була описана раніше [34,54,55]. STOP(MAP6) – це асоційований з мікротрубочками білок, що зумовлює їх резистентність до холоду та деполімеризуючого хімічного агенту нокодазолу [148]. Теоретично розрахована

Таблиця 3.2

Ідентифікація партнера ITSN1 за отриманим спектром мас пептидів смуги розміром близько 100 кДа за допомогою програми Mascot

№	Інвентарний номер у базі даних NCBI	Молекул ярна маса, Да	Кількість піків, що співпадають/загальна кількість піків	MOW SE score	Назва у базі даних NCBI
1	gi 60360130	97583	37/76	213	mKIAA4093 protein [Mus musculus]
2	gi 33859538	97305	35/76	201	dynamain [Mus musculus]

3	gi 35193307	96024	35/76	199	Dnm1 protein [Mus musculus]
4	gi 21961254	97741	35/76	199	Dnm1 protein [Mus musculus]
5	gi 12847915	57285	28/76	173	unnamed protein product [Mus musculus]

маса STOP(MAP6) виявилась меншою за масу смуги, яку ми аналізували, що є характерною рисою STOP(MAP6) та деяких інших білків, які взаємодіють з мікротрубочками [148]. В різних тканинах організму миші утворюються різні за масою і доменною структурою ізоформи STOP(MAP6), основні з яких представлено на рис. 3.5. Крім зображених на цьому рисунку, в літературі було

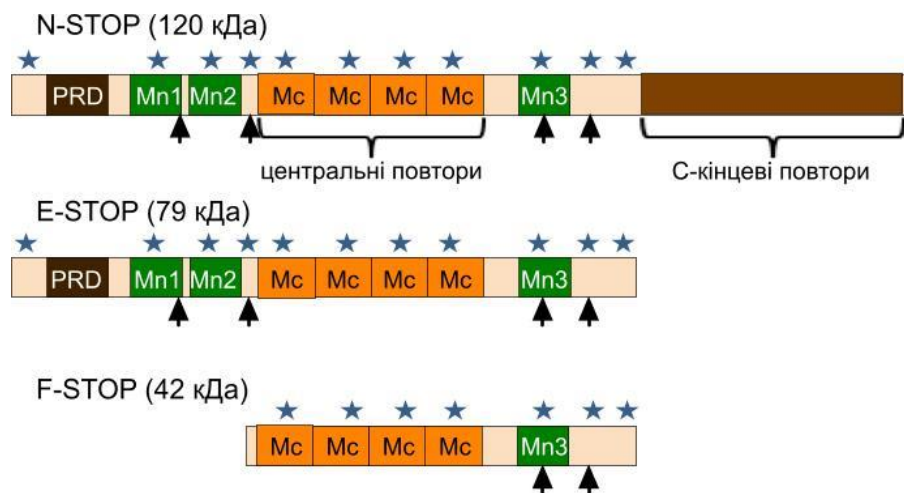


Рис.3.5. Схематичне зображення структури основних ізоформ STOP(MAP6): N-STOP (нейрональний STOP), E-STOP (ембріональний STOP) та F-STOP. PRD – пролін-збагачена ділянка, Mn та Mc – сайти зв'язування з мікротрубочками. Синіми зірочками позначені сайти взаємодії з Ca²⁺-кальмодуліном, чорними стрілками – сайти фосфорилування Ca²⁺/кальмодулін-залежною кіназою II

описано також ізоформи O-STOP (олігодендроцитний STOP, 89 кДа), A-STOP (астроцитарний STOP, 60 кДа), а також ізоформа STOP-48 (48 кДа), амінокислотні послідовності та доменна структура яких є недослідженими [149,150]. Молекулярна маса досліджуваного білка та визначені пептиди дозволяють зробити висновок, що нами було ідентифіковано взаємодію SH3A домену ITSN1 з нейрональною ізоформою STOP(MAP6) (рис.3.6).

```

1 MAWPCITRAC CIARFWNQLD KADIAVPLVF TKYSEATEHP GAPPQPPAPL
51 QPALAPPSRA VAIETQPAQG ESDAVARATG LAPGPSVDRE TVAAPGRSGL
101 GLGAASASTS GSGPADSVMR QDYRAWKVQR PEPSCRPRSE YQPSDAPFER
151 ETQYQKDFRA WPLPRRGDHP WIPKPVQIPA TSQPSQPVLG VPKRRPQSQE
201 RGPMQLSADA RDPEGAGGAG VLAAGKASGV DQRDTRRKAG PAWMVTRNEG
251 HEEKPLPPAQ SQTQEGGPAA GKASGADQRD TRRKAGPAWM VTRSEGHEEK
301 PLPPAQSQTQ EGGPAAGKAS GADQRDTRRK AGPAWMVTRT EGHEETPLPP
351 AQSQTQEGGP AAGKASGADE RDTRRKAGPA WMVRRSEGHE QTPAANAQGT
401 GPEGSKGRAV ADALNRQIRE EVASTVSSSY RNEFRAWTDI KPVKPIKAKP
451 QYKPPDDKMV HETSYSAQFK GEANKPSAAD NKAMDRRRIR SLYSEPFKEC
501 PKVEKPSVQS SKPKKTSTSH KPPRKAKDKQ VVSGQAAKKK TTEGPSATKP
551 DDKEQSKEMN NKLAEAKESR VKPTSDASKN RGPVTKEPHK DQGSVAPGLP
601 KGQEPLKDQG PVVPGLPKDQ VPVVPGS LKG QSPTAPGPTK DQGAVLLGPV
651 KDLGPVAPAP IKVQDHIASE LLKNKDSVPL APAKAQSPLL PEPLKNQSPV
701 VPASTKDQSF PTPAPRKDPG FVIVPEPEKDR APTVPERRKD QHVSIMASLK
751 NEAPVVPESV KNQGLAGPEL VKDTGTDTTA PRYLKGHDSV FVAPVKNQGP
801 VIPEPVKSQD PIIPALAKDQ GPMLPEPPKN QSPVVLGPIK NQDPIIPVPL
851 KGQDPLVPAP TKDQGPTAPD PLKTQGPKGT QLPTVSPSPP VMIPTVPHTE
901 YIEGSP

```

Рис. 3.6. Амінокислотна послідовність нейрональної ізоформи білка STOP(MAP6) (N-STOP). Червоним кольором позначені фрагменти послідовності, що відповідають пептидам, визначеним методом мас-спектрометрії. Зеленим кольором позначена послідовність, що є унікальною для N-STOP

3.1.2. Перевірка результатів мас-спектрометричного аналізу.

Для перевірки результатів мас-спектрометричного аналізу ми провели преципітацію білків лізату головного мозку миші з GST-злитими SH3 доменами ITSN1, що використовувались для пошуку нових білків партнерів. Після проведення преципітації білки, що зв'язалися, було розділено методом електрофорезу у поліакриламідному гелі і проведено Вестерн-блот аналіз з використанням моноклональних антитіл anti-STOP (див. розділ «Матеріали і методи»). Для виключення можливості неспецифічного зв'язування STOP з глутатіон-сефарозою, що може бути опосередкована тубуліновим цитоскелетом, ми також провели Вестерн-блот аналіз результатів преципітації з антитілами проти β -тубуліну III. Крім того, для контролю однорідності нанесення проб нижню частину гелю фарбували Кумасі бриліантовим синім для візуалізації GST та GST-злитих SH3 доменів ITSN1. Проведений експеримент підтвердив здатність SH3A домену ITSN1 взаємодіяти зі STOP(MAP6) *in vitro* (рис.3.7). Крім того, було виявлено, що серед SH3 доменів ITSN1 взаємодія зі

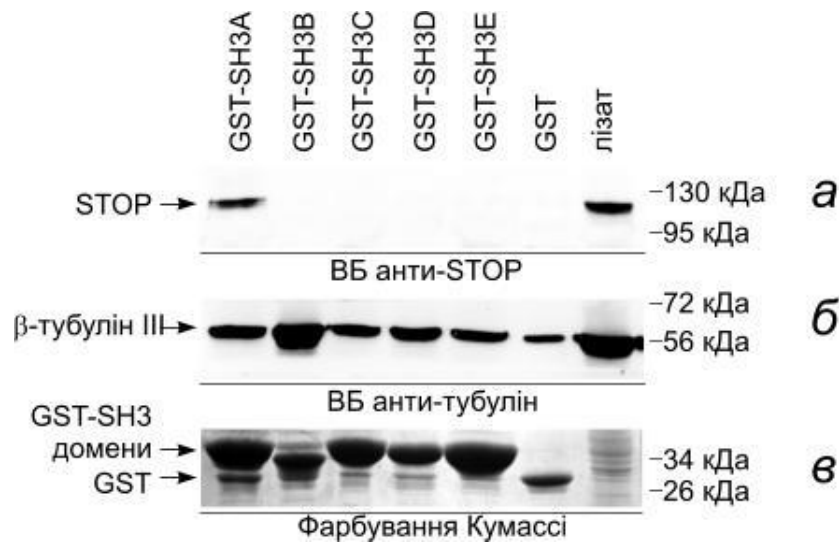


Рис. 3.7. Преципітація білків лізату головного мозку миші з використанням GST-злитих SH3 доменів ITSN1: *а* - Вестерн-блот аналіз результатів преципітації з антитілами anti-STOP; *б* - Вестерн-блот аналіз результатів преципітації з антитілами anti- β -тубулін III; *в* - Фарбування нанесених GST злитих доменів ITSN1 Кумасі бриліантовим синім

STOP(MAP6) є специфічною лише для SH3A домену. Оскільки, на відміну від STOP(MAP6), β -тубулін був присутній в приблизно однаковій кількості в усіх зразках включно з негативним контролем, його зв'язування з глутатіон-сефарозою або GST не впливає на присутність STOP(MAP6) і, таким чином, взаємодія STOP(MAP6) з SH3A доменом ITSN1 є специфічною.

Здатність ITSN1 до взаємодії зі STOP(MAP6) було також проаналізовано методом ко-імунопреципітації їх комплексу з лізату головного мозку миші. Цей метод дозволяє виявляти існуючі білкові комплекси в лізатах клітин або тканин, і тому використовується для непрямого підтвердження існування таких комплексів *in vivo*. Для ко-імунопреципітації було використано моноклональні антитіла anti-STOP, а також поліклональні антитіла anti-ITSN1. Білки, що зв'язалися з іммобілізованими антитілами, було розділено методом електрофорезу у поліакриламідному гелі та проаналізовано методом Вестерн-блот з використанням антитіл anti-STOP та anti-ITSN1. В результаті проведення експерименту було виявлено, що обидва білки присутні як у складі комплексів, преципітованих за допомогою антитіл anti-ITSN1, так і у складі комплексів, преципітованих за допомогою білків anti-STOP (рис.3.8). Це свідчить про те, що ITSN1 та STOP(MAP6) дійсно можуть утворювати комплекс у клітинах головного мозку миші.

3.1.3. Субклітинна локалізація ITSN1 та STOP(MAP6) у клітинах первинної дисоційованої культури нейронів гіпокампу щурів

Білки, що спільно беруть участь у певних клітинних процесах, мають колокалізуватися в одному компартменті клітини [151]. Отже, було вирішено дослідити субклітинну локалізацію ITSN1 та STOP(MAP6) та визначити можливі компартменти їх ко-локалізації. Оскільки нами було виявлено взаємодію ITSN1 з нейрональною ізоформою STOP, було вирішено досліджувати їх взаємну локалізацію у нейронах. Зручним об'єктом для таких досліджень є первинна дисоційована культура нейронів гіпокампу щурів, що

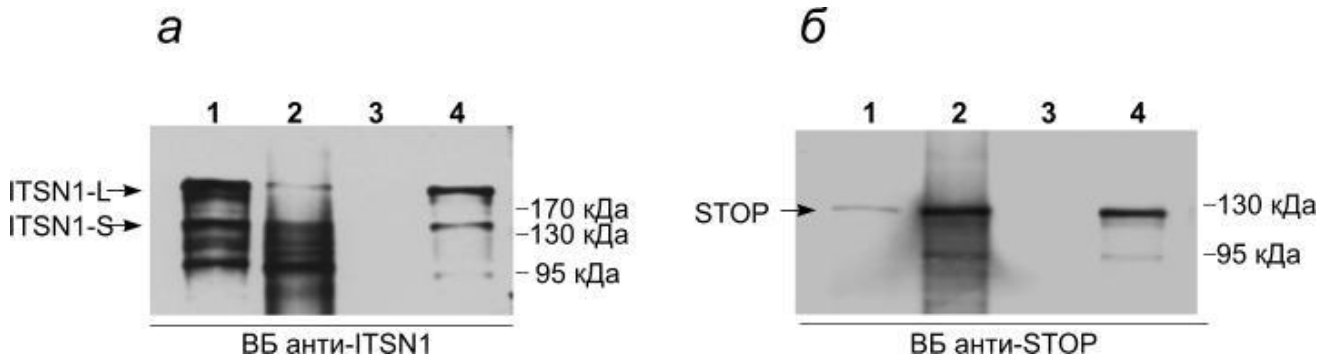


Рис. 3.8. Вестерн-блот аналіз з використанням антитіл anti-ITSN1 (а) та anti-STOP (б) результатів ко-імунопреципітації комплексів ITSN1 та STOP з лізату головного мозку миші: 1 – імунореципітація з використанням антитіл anti-ITSN1; 2 - імунопреципітація з використанням антитіл anti-STOP; 3 - імунопреципітація з використанням неспецифічних імуноглобулінів G кроля; 4 - лізат головного мозку миші

широко використовується в лабораторній практиці. Для створення такої культури гіпокамп новонароджених тварин або ембріонів дисоціюють у трипсині, висівають дисоційовані клітини на покриті полі-лізином та ламініном покривні скельця та культивують у поживному середовищі з додаванням компонентів, необхідних для росту й розвитку нейронів. Важливою рисою такої культури є те, що під час культивування у нейронів відбувається ріст дендритів та аксонів, а також формування синаптичних контактів, що робить умови існування клітин у культурі наближеними до фізіологічних.

Для аналізу субклітинної локалізації ITSN1 та STOP(MAP6) нами було створено плазмідні конструкції, що кодували ці білки в одній рамці зчитування з зеленим флюоресцентним білком EGFP та червоним флюоресцентним білком mCherry відповідно (на рис.3.9 представлена схема конструкції EGFP-ITSN1). У випадку ITSN1 у векторі було клоновано послідовність кДНК, що відповідає ізоформі ITSN1L, що є більш представленою в нейронах, ніж ізоформа ITSN1S. Клоновані послідовності було перевірено методом секвенування. Отримані конструкції було використано для проведення трансфекції клітин первинної

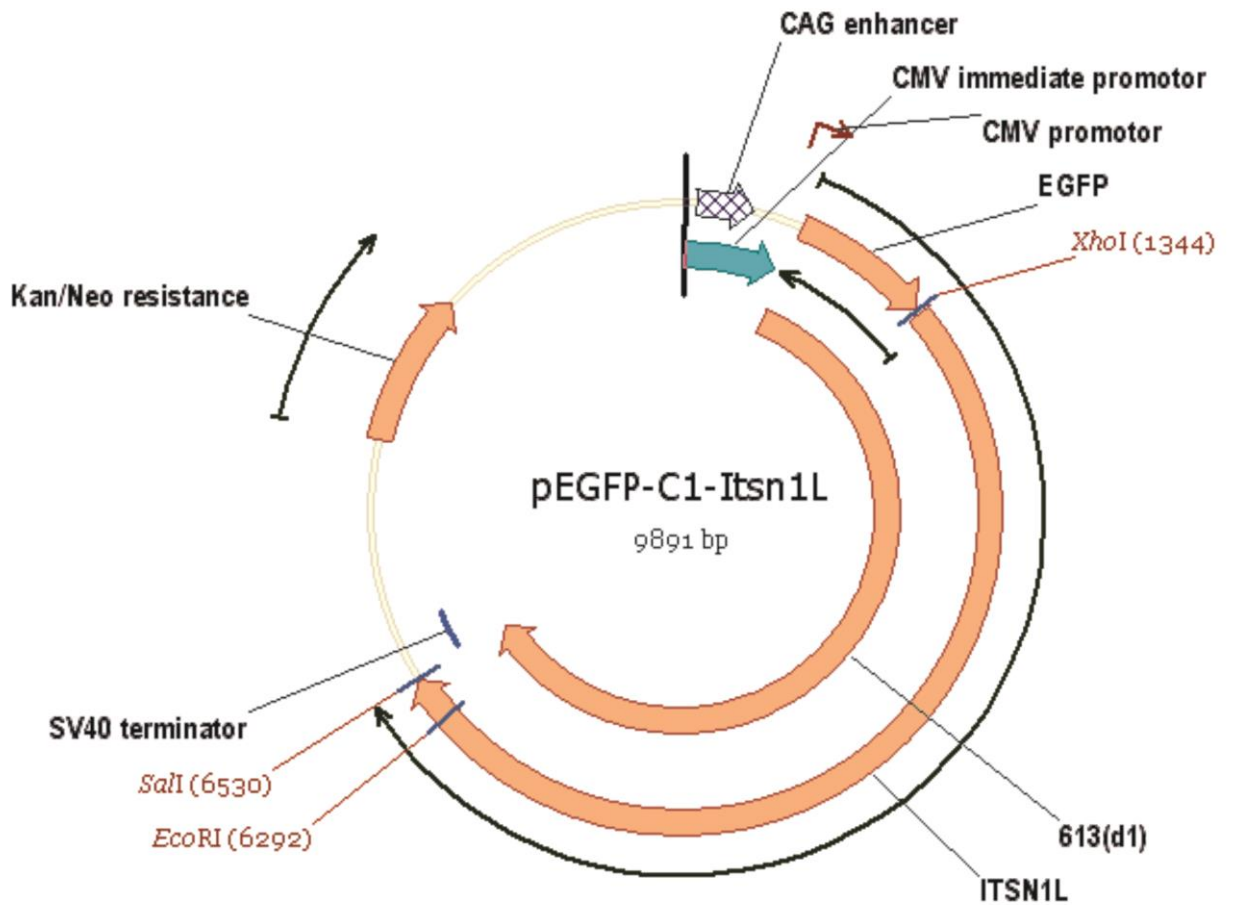


Рис. 3.9. Схематичне зображення конструкції, що кодує ITSN1, злитий з зеленим флуоресцентним білком EGFP. Плазміда створена на базі вектора pEGFP-C1

культури нейронів гіпокампу щурів, що культивувались впродовж 2-3 тижнів (від 14 до 21 діб у культурі). Через два дні після трансфекції клітини фіксувались і субклітинна локалізація білків вивчалась за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа. Було виявлено, що характер внутрішньоклітинного розподілу білків досить суттєво відрізняється (рис.3.10). Як і очікувалось, ITSN1 в основному локалізувався у дискретних точках різного розміру, що знаходились близько до плазматичної мембрани, як було показано у попередніх дослідженнях [51]. В той же час STOP(MAP6) був дифузно розподілений по клітині вздовж фібрилярних структур, що, ймовірно, являють

собою мікротрубочки. Незважаючи на це, у сомі та дендритах нейронів нам вдалося ідентифікувати точки ко-локалізації цих двох білків (рис. 3.10).

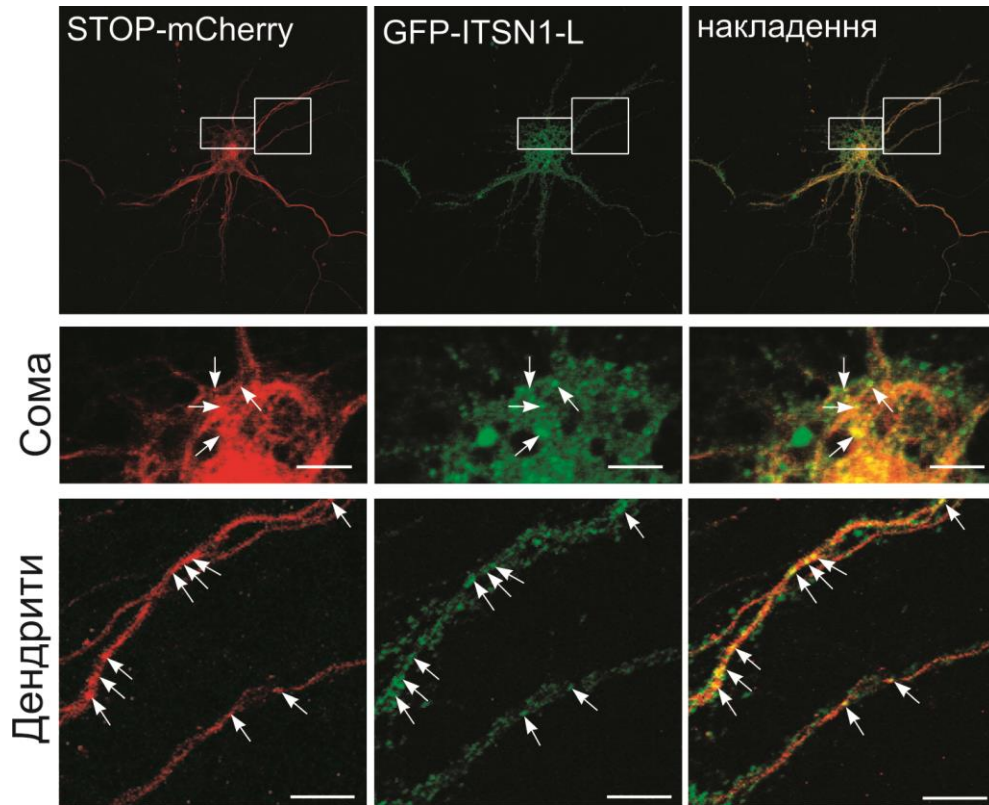


Рис. 3.10. Субклітинна локалізація надекспресованих білків ITSN1 та STOP в культивованих нейронах гіпокампу щурів. У нижньому рядку подано збільшене зображення ділянок, позначених білими квадратами. Стрілками позначені місця ко-локалізації сигналів. Розмір масштабної лінійки – 5 мкм

Враховуючи можливість впливу надекспресії білків на характер їх внутрішньоклітинного розподілу, ми також дослідили субклітинну локалізацію ендогенних ITSN1 та STOP(MAP6) методом імуофлюоресцентного аналізу, використовуючи антитіла anti-ITSN1 та anti-STOP. Ендогенні білки демонстрували характер локалізації, подібний до надекспресованих ITSN1 та STOP(MAP6) (рис.3.11). Як і у випадку надекспресованих білків, було виявлено точки ко-локалізації ITSN1 та STOP(MAP6) у сомі та дендритах.

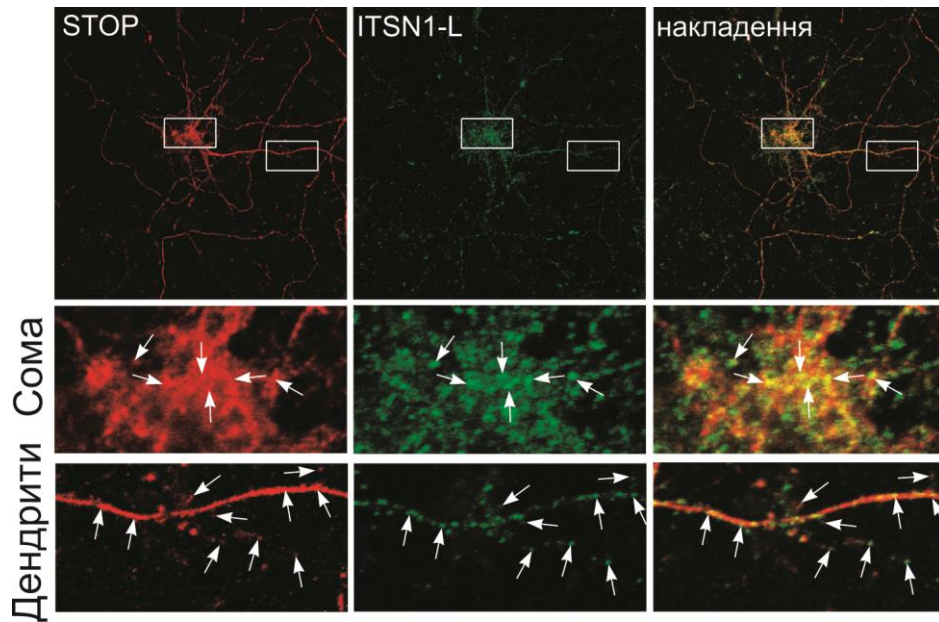


Рис. 3.11. Субклітинна локалізація ендогенних білків ITSN1 та STOP в культивованих нейронах гіпокампу щурів. Для покращення візуалізації нейронів було проведено їх трансфекцію конструкцією, що кодувала жовтий флуоресцентний білок mCitrine, який дифузно розподіляється у цитоплазмі. У нижньому рядку подано збільшене зображення ділянок, позначених білими квадратами. Стрілками позначені місця ко-локалізації сигналів. Розмір масштабної лінійки – 5 мкм.

3.1.4. Вплив ITSN1 на STOP(MAP6)-опосередковану стабілізацію мікротрубочок.

Білок STOP(MAP6) вперше було виділено та ідентифіковано як фактор, що зумовлює резистентність мікротрубочок до холоду [152]. Роль його ізоформ у стабілізації мікротрубочок була підтверджена у експериментах з культурами клітин різного походження [148,149,153]. Крім того, було показано, що STOP(MAP6) також забезпечує резистентність мікротрубочок до нокодазолу – хімічного агенту, що спричиняє деполімеризацію мікротрубочок [148]. Така стабілізація мікротрубочок визначається наявністю у молекулі STOP(MAP6) двох типів повторюваних мотивів, здатних зв'язуватись з мікротрубочками, які мають назву M_n та M_c модулі [154]. Цікаво, що резистентність мікротрубочок,

виділених з головного мозку щурів, до холоду втрачається при додаванні до них кальмодуліну та іонів Ca^{2+} у концентраціях, субстехіометричних до концентрації тубуліну [155]. Такий ефект можна пояснити тим, що білок STOP(MAP6) містить мотиви зв'язування Ca^{2+} -кальмодуліну (Cam і CamR), що перекриваються з Mп та Mc модулями [154]. Нещодавно на структурному рівні було підтверджено, що Ca^{2+} -кальмодулін конкурує з мікротрубочками за зв'язування ділянок, що перекриваються, у складі молекули STOP(MAP6) [156]. Таким чином, резистентність мікротрубочок до холоду і нокодазолу визначається їх асоціацією зі STOP(MAP6), при порушенні якої ця резистентність втрачається.

Ми показали, що STOP(MAP6) може взаємодіяти з адаптерним білком ендцитозу ITSN1. На сьогоднішній день залучення ITSN1 до функціонування мікротрубочок показано не було. З огляду на це ми припустили, що ITSN1 може взаємодіяти зі STOP, який не взаємодіє з мікротрубочками. З іншого боку, постає питання, чи спричиняє взаємодія з ITSN1 від'єднання STOP від мікротрубочок. На цьому етапі роботи ми перевіряли це припущення.

Раніше було показано, що клітини карциноми шийки матки лінії HeLa не містять резистентних до холоду субпопуляцій мікротрубочок [157]. Ймовірно, це обумовлено тим, що у цих клітинах відсутні білки родини STOP(MAP6) [148]. Трансфекція плазмідних конструкцій, що кодують STOP(MAP6), у клітини HeLa призводить до виникнення резистентності до холоду і нокодазолу у мікротрубочок в трансфікованих клітинах [148]. Ця резистентність є зручним маркером, за яким можна визначати асоціацію STOP(MAP6) з мікротрубочками. Тому для визначення впливу ITSN1 на взаємодію STOP(MAP6) з мікротрубочками ми вивчали ефект його надекспресії на STOP(MAP6)-опосередковану стабілізацію мікротрубочок. Для цього ми провели трансфекцію плазмідних конструкцій, що кодують STOP(MAP6) та ITSN1 в одній рамці зчитування з червоним флуоресцентним білком mCherry та зеленим флуоресцентним білком EGFP відповідно, у клітини лінії HeLa. За 24

години після трансфекції клітини було піддано інкубації на холоді або обробці нокодазолом, після чого методом імуофлюоресцентного аналізу визначали наявність стабільних мікротрубочок у трансфікованих клітинах. Як і було показано раніше, трансфекція конструкцією, що кодує злитий білок STOP(MAP6)-mCherry призводила до збереження інтактних мікротрубочок у трансфікованих клітинах, в той час як у нетрансфікованих клітинах спостерігалось їх повне руйнування (рис.3.12а). Натомість трансфекція

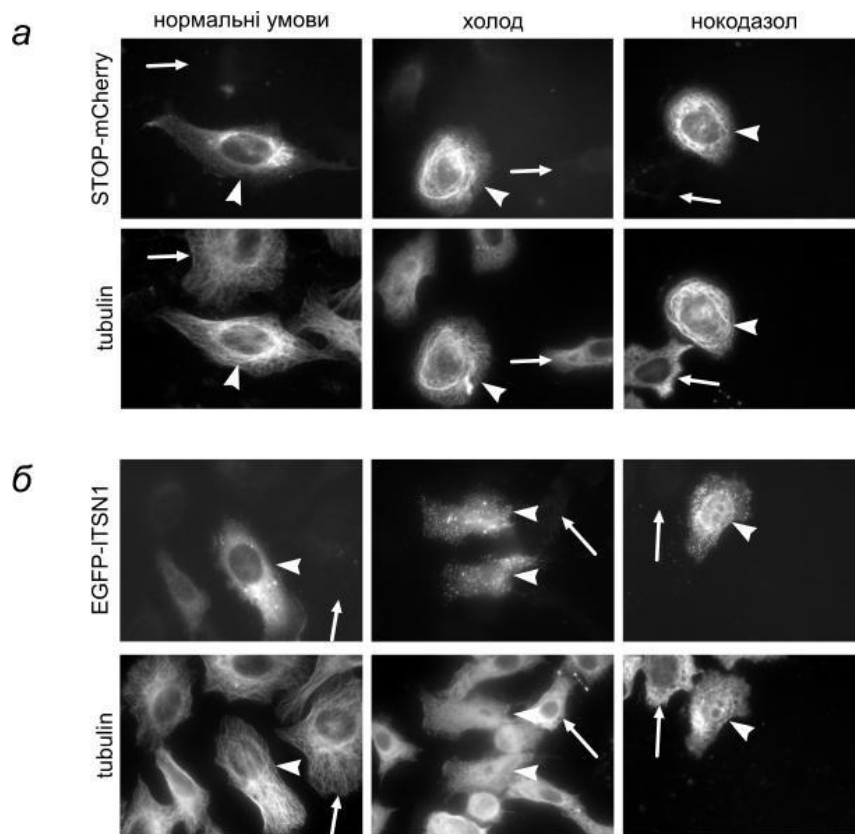


Рис. 3.12. Вплив STOP та ITSN1 на стабілізацію мікротрубочок в клітинах карциноми шийки матки лінії HeLa: *a* - клітини HeLa було трансфіковано конструкцією, що кодувала STOP, злитий з червоним флуоресцентним білком mCherry. Мікротрубочки трансфікованих клітин залишаються стабільними під дією холоду та нокодазолу; *б* - клітини HeLa було трансфіковано конструкцією, що кодувала ITSN1, злитий з зеленим флуоресцентним білком EGFP. Мікротрубочки трансфікованих клітин розпадаються під дією холоду та нокодазолу. Короткими і довгими стрілками позначено трансфіковані і нетрансфіковані клітини, відповідно

конструкцією, що кодує злитий білок EGFP-ITSN1, не призводила до стабілізації мікротрубочок (рис.3.12б). При ко-трансфекції обома конструкціями стабілізація мікротрубочок спостерігалася, як і у випадку з трансфекцією лише конструкцією STOP(MAP6)-mCherry (рис.3.13). Це свідчить про те, що ITSN1 не впливає на асоціацію STOP(MAP6) з мікротрубочками.

Таким чином, в результаті проведеної роботи було ідентифіковано новий нейрональний партнер скафолдного білка ITSN1 – цитоскелетний білок STOP. Було визначено, що взаємодія зі STOP опосередковується SH3A доменом ITSN1, інші SH3 домени ITSN1 не беруть участь в цій взаємодії. Взаємодія між ITSN1

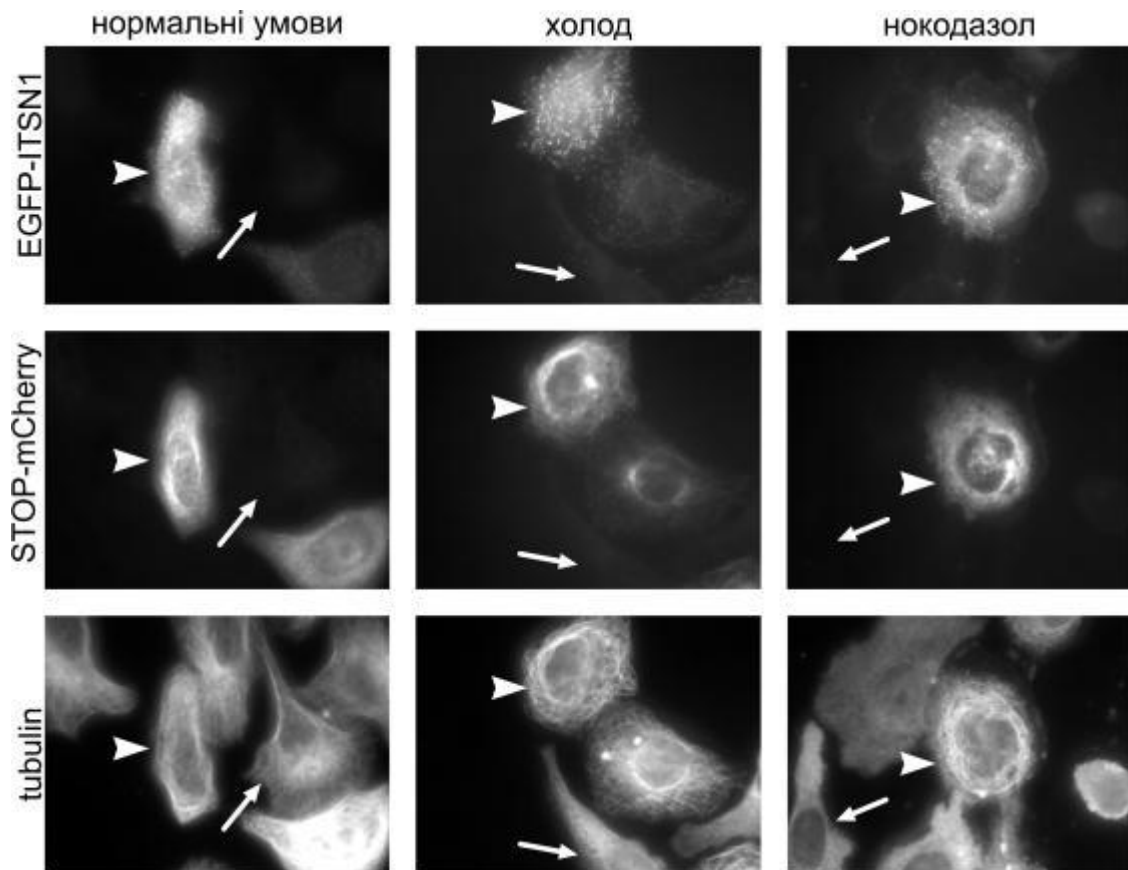


Рис. 3.13. Вплив ITSN1 на STOP-опосередковану стабілізацію мікротрубочок. Клітини HeLa було одночасно трансфіковано конструкціями, що кодують STOP-mCherry та EGFP-ITSN1. Мікротрубочки трансфікованих клітин лишалися резистентними до холоду та нокодазолу. Короткими і довгими стрілками позначено трансфіковані і нетрансфіковані клітини, відповідно

та STOP відбувається *in vivo*, що підтверджується ко-імунопреципітацією білків з лізату головного мозку миші. ITSN1 та STOP частково ко-локалізуються у первинних нейронах гіпокампу щурів. Взаємодія з ITSN1 не впливає на STOP-опосередковану стабілізацію мікротрубочок, і таким чином не призводить до припинення асоціації STOP з мікротрубочками.

Результати даного розділу опубліковані в наступних роботах:

1. Endocytic adaptor protein ITSN1 forms a complex with microtubule stabilizer STOP in neurons / Dmytro Morderer, Oleksii Nikolaienko, Inessa Skrypkina, Volodymyr Cherkas, Liudmyla Tsyba, Pavel Belan, Alla Rynditch // *Gene*. – 2012. – Vol.505. – P. 360-364.
2. Intersectin 1 interacts with cytoskeletal protein MTAP6 / Morderer D., Nikolaienko O., Tsyba L., Skrypkina I., Rynditch A. // RECOOP HST Consortium, Bridges in Life Scienced Annual Scientific Review, (Zagreb). – Zagreb. – 2008. – P. 23.
3. Interaction of endocytic adaptor intersectin 1 with microtubule stabilizer STOP, which is involved in synaptic transmission / Dmytro Morderer, Oleksii Nikolaienko, Inessa Skrypkina, Liudmyla Tsyba, Volodymyr Cherkas, Alla Rynditch // VIII Parnas Conference: Acta Biochimica Polonica,(Warsaw, 27-31 Aug). – Warsaw. – 2011. – P. 67.
4. Endocytic adaptor protein Intersectin 1 (ITSN1) interacts with cytoskeletal protein STOP in neurons / Dmytro Morderer, Oleksii Nikolaienko, Inessa Skrypkina, Lyudmyla Tsyba, Volodymyr Cherkas, Pavel Belan, Alla Rynditch // IUBMB&FEBS Young Scientists Program, (Cadiz, 1-4 September). – Cadiz. – 2012. – P. 72.
5. Intersectin 1 interacts with STOP protein in neurons / Morderer D., Nikolaienko O., Skrypkina I., Tsyba L., Rynditch A. // RECOOP HST Bridges in Life Sciences 7th Annual Scientific Conference, (Budapest, March 30 – April 1). – Budapest. – 2012. – P.82.
6. New aspects of endocytic adaptor ITSN1 functioning in neurons / Morderer D., Nikolaienko O, Skrypkina I, Rymarenko O, Tsyba L, Rynditch A. // RECOOP HST

Bridges in Life Sciences 8th Annual Scientific Conference “Laugh and Be the Best in Research and Patient Care”, (Prague, April 5-7). – Prague. – 2013. – P. 77.

7. MAP6 – новий потенційний партнер інтерсектину 1 / Мордерер Д.Є., Ніколаєнко О.В., Циба Л.О., Скрипкіна І.Я // III міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології», (Львів, 2007). – Львів. - С.397.

8. Identification of novel intersectin 1 binding partner – MAP6 / Morderer D., Nikolaienko O., Tsyba L., Skrypkina I., Rynditch A. // Conference for young scientists, PhD students and students on Molecular Biology and Genetics, (Kyiv., 2007). – Kyiv. – P. 79.

9. Endocytic scaffold ITSN1: novel connections and way of regulation in neurons / Morderer D., Nikolaienko O., Skrypkina I., Rymarenko O., Cherkas V., Belan P., Rynditch A. // VIIth Int. GDRI conf. “From Molecular to Cellular Events in Human Pathology” (Riga, Latvia). – Riga. – P. 27.

3.2. Вплив *ITSN1* на ріст дендритів у клітин первинної культури нейронів гіпокампу щурів

Нейрони є клітинами, яким притаманний високий рівень структурної пластичності. Ця властивість дозволяє нейронам формувати відростки та утворювати синаптичні контакти у відповідь на дії зовнішніх чинників, підлаштовуючись під геометрію нейронних ланцюгів, що формуються. Ключову роль у поляризації нейронів та у розвитку дендритів та аксонів відіграють білки, що беруть участь у функціонуванні актинового та тубулінового цитоскелету, зокрема білки, асоційовані з мікротрубочками (MAP) [158,159]. Нещодавно було показано, що STOP(MAP6), який також відноситься до цієї групи білків, впливає на розвиток дендритного дерева клітин первинної культури нейронів гіпокампу щурів [160]. Взаємодія *ITSN1* зі STOP(MAP6), так само як і його участь у регуляції полімеризації актину, вказує на те, що *ITSN1* також може бути залученим до процесів формування дендритного дерева, що викликає суттєвий інтерес в контексті його участі у розвитку психічних та нейродегенеративних захворювань.

Для визначення впливу *ITSN1* на розвиток дендритного дерева ми застосували стратегію пригнічення експресії гену *ITSN1* у первинній культурі нейронів гіпокампу щурів шляхом РНК інтерференції. Для цього ми використали плазмідну конструкцію pSUPER-anti-*ITSN1*, що кодує короткі анти смислові комплементарні до гену *ITSN1* шпилькові РНК, яку було люб'язно надано др. Стефаном Гасманом [89]. Цю конструкцію було створено на основі вектору pSUPER, який містить Н1 промотор РНК-полімерази III та сигнал термінації транскрипції, який являє собою повтор п'яти тимідинів, що дозволяє отримувати короткі транскрипти РНК без поліаденозинового хвоста [161]. Схему конструкції зображено на рис. 3.14. В якості контролю ми використали вектор pSUPER, що не містив жодної вставки. Для візуалізації трансфікованих клітин використовували конструкцію, що кодує зелений

флуоресцентний білок EGFP під контролем промотора β -актину, яку було люб'язно надано др. Яцеком Яворським [162].

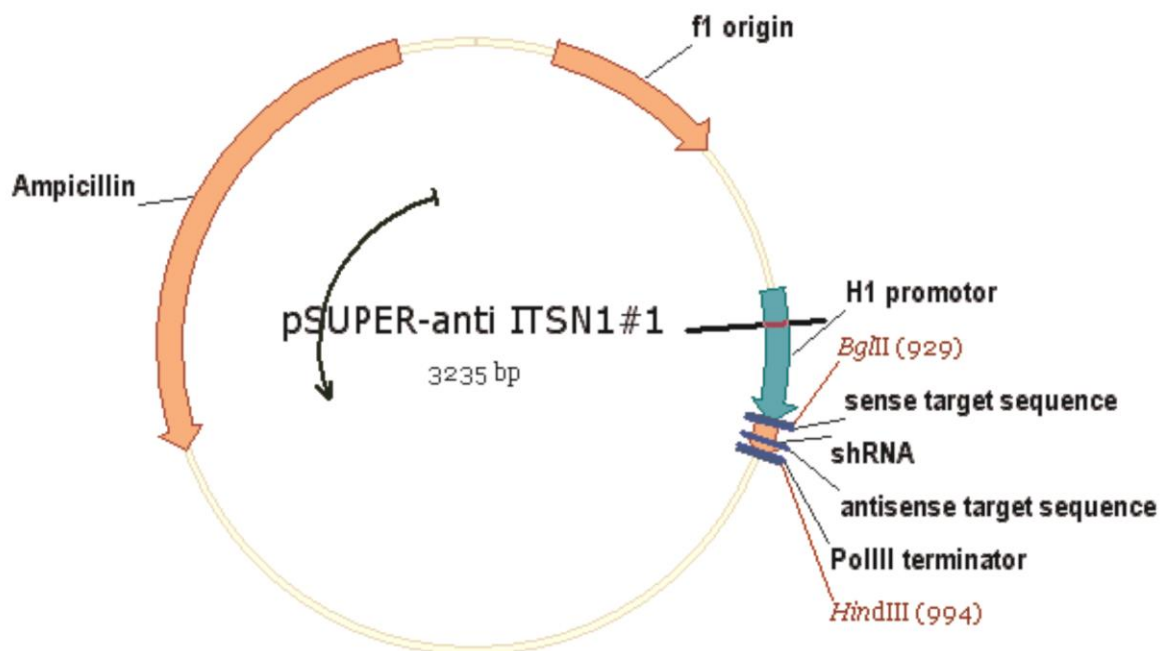


Рис. 3.14. Схематичне зображення конструкції, що кодує короткі анти смислові шпилькові РНК, комплементарні до кодуючої послідовності *ITSN1*. Конструкція створена на базі вектора pSUPER

На першому етапі даного експерименту було визначено ефективність пригнічення експресії *ITSN1* при трансфекції нейронів гіпокампу щурів конструкцією pSUPER-anti-ITSN1. Для цього нейрони, що культивувалися протягом двох тижнів, були трансфіковані плазмідами pSUPER та pSUPER-anti-ITSN1. Через три доби після трансфекції клітини фіксували і аналізували вміст *ITSN1* методом імунофлюоресцентного аналізу. В результаті було виявлено, що трансфекція pSUPER-anti-ITSN1 достовірно знижує вміст *ITSN1* у нейронах (різниця вибірових середніх – 35,4%, ДІ 95% різниці середніх - 27,1-43,6%) (рис. 3.15). Як відомо, для адаптерних білків існує поняття «оптимальної

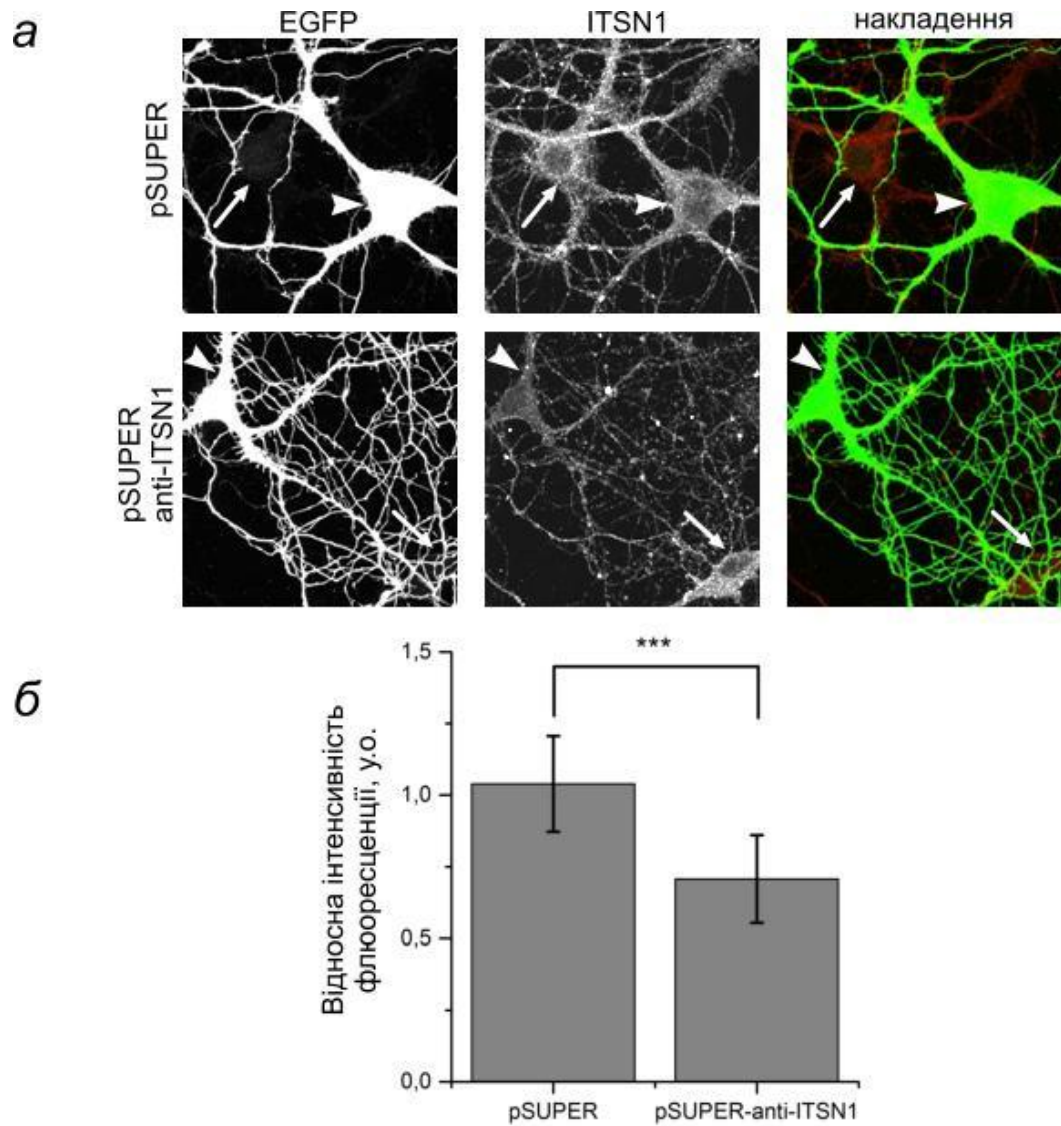


Рис. 3.15. Пригнічення експресії *ITSN1* у культивованих нейронах гіпокампу щурів за допомогою коротких анти смислових шпилькових РНК: *a* - репрезентативне зображення нейронів, що були трансфіковані конструкціями pSUPER-anti-ITSN1 та pSUPER та пофарбовані за допомогою антитіл anti-ITSN1. Трансфіковані клітини візуалізували за допомогою конструкції, що кодує зелений флуоресцентний білок EGFP під контролем промотора β -актину, яку додавали до трансфекційної суміші. Короткими і довгими стрілками позначено трансфіковані і нетрансфіковані клітини, відповідно; *б* - Кількісний аналіз вмісту ITSN1 у клітинах, трансфікованих конструкціями pSUPER (N=17) та pSUPER-anti-ITSN1 (N=28). Відносну інтенсивність флюоресценції визначали як відношення середньої інтенсивності флюоресценції трансфікованих і нетрансфікованих клітин. *** - $p < 0.001$ за t -критерієм Стьюдента

концентрації», при відхиленні від якої їх ефективність суттєво знижується [16]. З огляду на це, ми вирішили використовувати конструкцію pSUPER-anti-ITSN1 в подальшій роботі, незважаючи на порівняно невеликий рівень зменшення експресії *ITSN1*, що спостерігався внаслідок трансфекції нейронів цією конструкцією.

Інтенсивне формування дендритного дерева у нейронів гіпокампу щурів у культурі відбувається протягом другого тижня культивування [163]. З огляду на це, для дослідження впливу *ITSN1* на формування дендритного дерева ми проводили трансфекцію конструкцій pSUPER-anti-ITSN1 та pSUPER у нейрони, що культивувалися протягом 7 діб, з подальшим їх культивуванням протягом 5 діб. Після цього морфологія трансфікованих нейронів досліджувалась за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа. Морфологію нейрона оцінювали за загальною довжиною дендритів та їх кількістю. В результаті проведеного аналізу було виявлено, що загальна кількість дендритів у клітин, що експресували короткі шпилькові РНК, комплементарні до кодуєчої послідовності *ITSN1*, не відрізнялася від контрольних клітин. Натомість, ми спостерігали відносно невелике (10-30%), проте статистично достовірне зменшення сумарної довжини дендритів у нейронах, що експресували короткі шпилькові РНК (різниця вибірових середніх – 921 мкм, ДІ 95% різниці середніх – 442-1400 мкм) (рис.3.16). Таким чином, зниження експресії *ITSN1* не впливало на утворення дендритів, але певною мірою пригнічувало їх ріст.

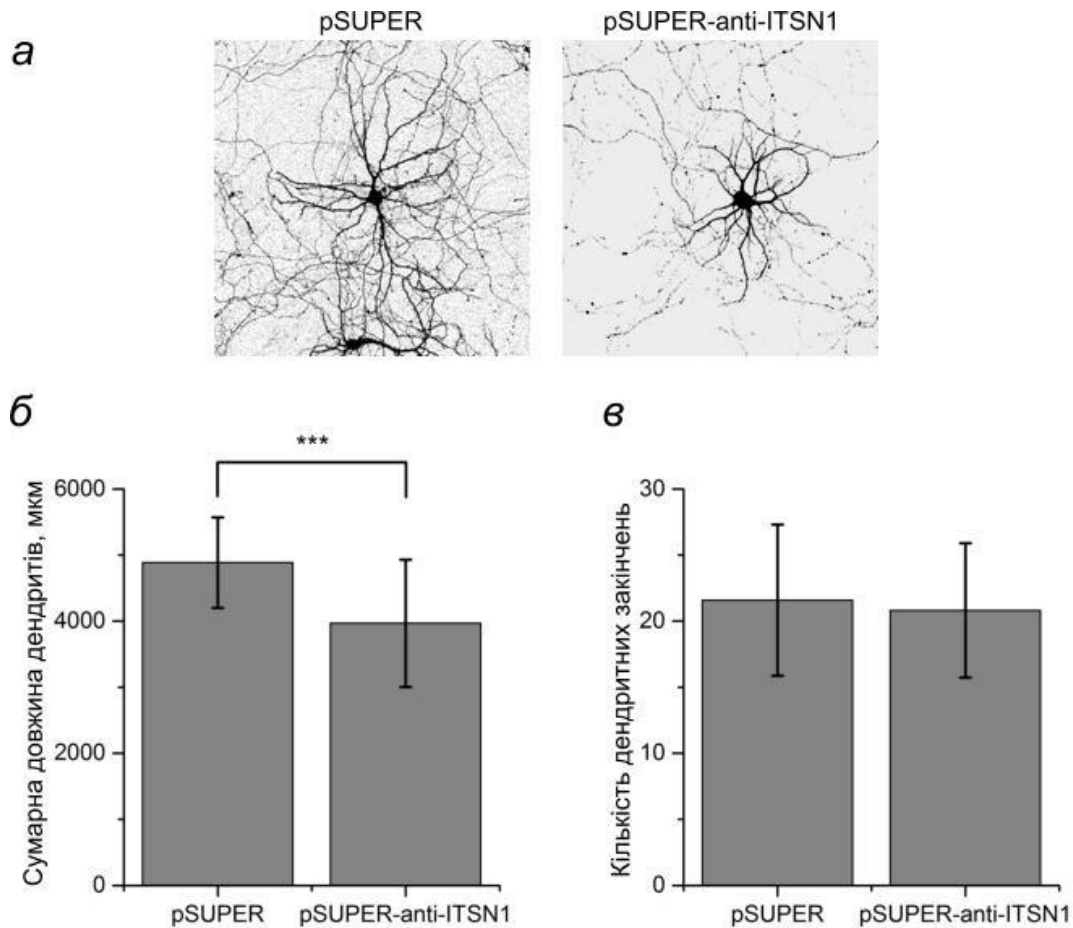


Рис. 3.16. Вплив пригнічення експресії *ITSN1* на морфологію дендритного дерева культивованих нейронів гіпокампу щурів: *a* - репрезентативне зображення нейронів, що були трансфіковані конструкціями pSUPER-anti-ITSN1 та pSUPER; *б* - кількісний аналіз сумарної довжини дендритів нейронів, що були трансфіковані конструкціями pSUPER-anti-ITSN1 (N=32) та pSUPER (N=21); *в* - кількісний аналіз кількості дендритних закінчень нейронів, що були трансфіковані конструкціями pSUPER-anti-ITSN1 та pSUPER. *** - $p < 0.001$ за *t*-критерієм Стьюдента

Для порівняння ступеню складності будови дендритного дерева ми застосували аналіз Шолля, загальний принцип якого відображений на рис.3.17 [146]. Візуальний аналіз отриманих кривих продемонстрував, що у клітинах з пригніченою експресією *ITSN1* максимальна кількість дендритів, що

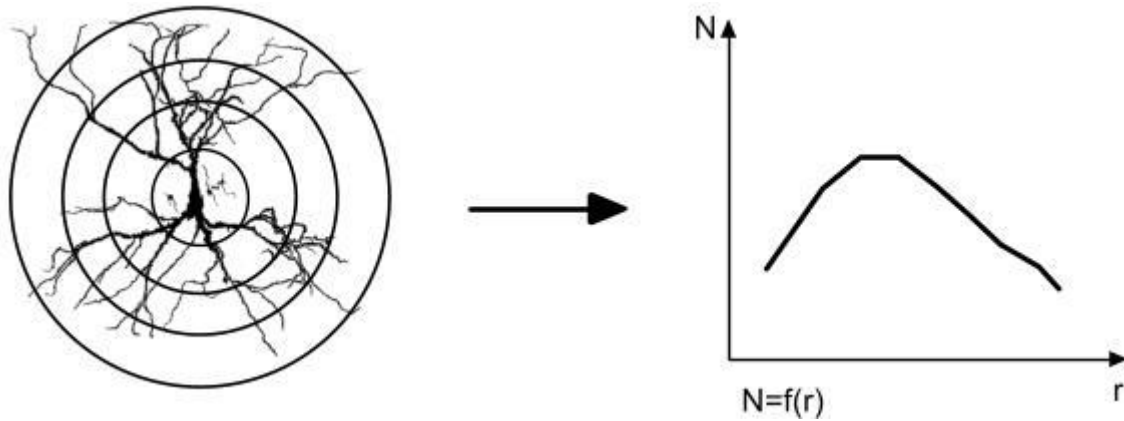


Рис. 3.17. Схематичне зображення принципу аналізу Шолля. Концентричні кола зі зростаючим радіусом малюють таким чином, щоб їх центри розташовувались у сомі нейрона. Для кожного кола підраховують кількість його перетинів з дендритами (N), після чого визначають залежність N від радіусу кола r ($N=f(r)$)

перетинаються одним колом, практично не відрізняється від такої у контрольних клітин (рис.3.18). Натомість, контрольні клітини характеризувались повільнішим спаданням графіку, ніж клітини, трансфіковані

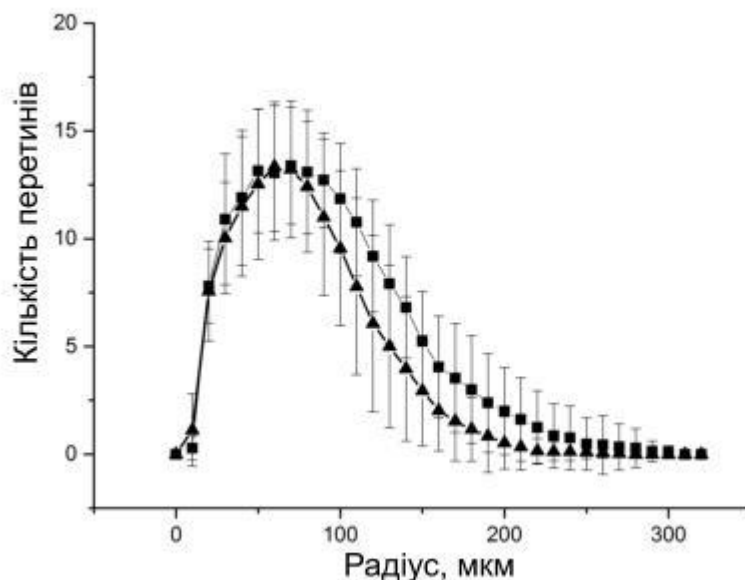


Рис. 3.18. Визначення впливу пригнічення експресії *ITSN1* на будову дендритного дерева культивованих нейронів гіпокампу щура за допомогою аналізу Шолля: **—▲—** - pSUPER-anti-ITSN1; **—●—** - pSUPER

конструкцією pSUPER-anti-ITSN1, що відображає скорочення довжини їх дендритів і зменшення площі, що займають ці клітини. Для кількісної оцінки різниці у швидкості зменшення дендритної густини по мірі віддалення від соми нейрона ми визначили коефіцієнти регресії Шолля для кожної з отриманих кривих. Для цього ми перебудували графіки у напівлогарифмічних координатах, відкладаючи значення радіусу кола r по осі абсцис та значення $\ln \frac{N}{S}$, де S – площа кола, по осі ординат (рис. 3.19). Отримані графіки апроксимували лінійними функціями, визначаючи коефіцієнти регресії Шолля як коефіцієнти при змінній. Таким чином було визначено, що коефіцієнт регресії Шолля для клітин,

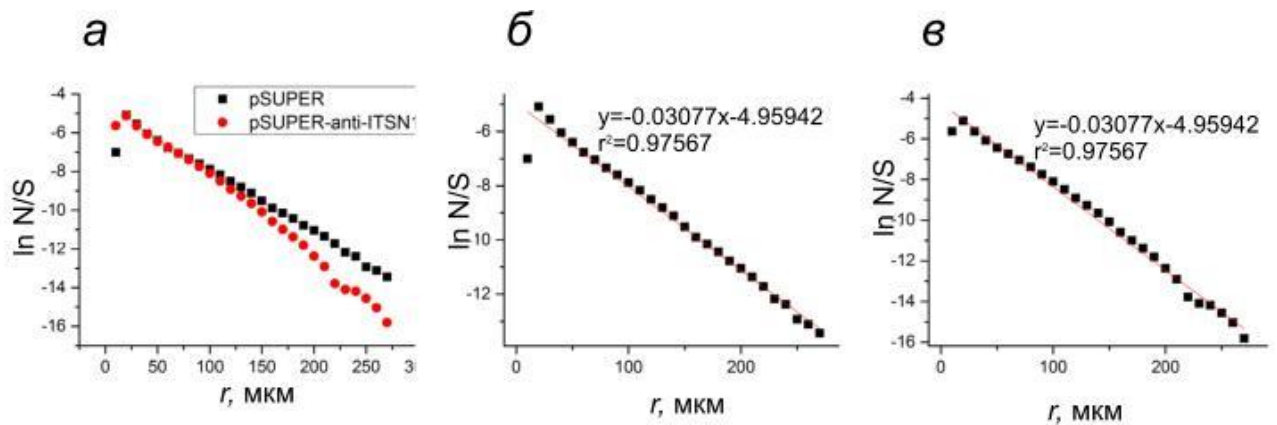


Рис. 3.19. Вивчення впливу пригнічення експресії *ITSN1* на будову дендритного дерева культивованих нейронів гіпокампу щура методом напівлогарифмічного аналізу Шолля: *а* - порівняння клітин, трансфікованих конструкціями pSUPER та pSUPER-anti-ITSN1; *б* і *в* - апроксимація лінійними функціями графіків, отриманих для нейронів, трансфікованих конструкціями pSUPER (*б*) та pSUPER-anti-ITSN1 (*в*)

трансфікованих конструкцією pSUPER, становить $0,03077 \pm 9.53 \cdot 10^{-4}$, а для клітин, трансфікованих конструкцією pSUPER-anti-ITSN1 – $0,04101 \pm 7.86 \cdot 10^{-4}$. Визначені коефіцієнти статистично достовірно відрізнялися ($p < 0,001$ за t -критерієм Стьюдента). Оскільки коефіцієнт регресії Шолля є мірою зменшення

дендритної густини як функції від відстані від соми, його збільшення внаслідок пригнічення експресії *ITSN1* свідчить про зменшення площі, яку займає нейрон. Отримані результати підтверджують те, що пригнічення експресії *ITSN1* викликає скорочення довжини дендритів у нейронах гіпокампу щурів.

Результати, викладені в цьому розділі, було опубліковано в наступних роботах:

1. New aspects of endocytic adaptor ITSN1 functioning in neurons / Morderer D., Nikolaienko O, Skrypkina I, Rymarenko O, Tsyba L, Rynditch A. // RECOOP HST Bridges in Life Sciences 8th Annual Scientific Conference “Laugh and Be the Best in Research and Patient Care”, (Prague, April 5-7). – Prague. – 2013. – P. 77.
2. Endocytic scaffold ITSN1: novel connections and way of regulation in neurons / Morderer D., Nikolaienko O., Skrypkina I., Rymarenko O., Cherkas V., Belan P., Rynditch A. // VIIIth Int. GDRI conf. “From Molecular to Cellular Events in Human Pathology” (Riga, Latvia). – Riga. – P. 27.

3.3 Ca²⁺-залежна регуляція ITSN1

Зміна внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca²⁺ у нейронах є чинником, що регулює різноманітні аспекти їх функціонування, від синаптичної передачі нервового імпульсу до експресії генів [164]. Дія іонів Ca²⁺ опосередковується їх зв'язуванням з сенсорними білками, що перетворюють кальцієвий сигнал у специфічні зміни функціонування клітин [165]. Одним з найбільш вивчених сенсорів кальцію є білок кальмодулін, який змінює свою конформацію при зв'язуванні іонів Ca²⁺, що надає йому змогу взаємодіяти з білками-мішенями. Серед таких мішеней є білки-ферменти, зокрема Ca²⁺/кальмодулін-залежні кінази, що відіграють значну роль у функціонуванні нейронів, зокрема у їх розвитку та синаптичній активності [166]. Як було описано вище, ITSN1 також залучений до цих процесів і відіграє важливу роль у функціонуванні нейронів. З огляду на це, ймовірним виглядає припущення про можливість існування функціонального зв'язку ITSN1 з кальцієвою сигнальною системою. В цій частині роботи ми проаналізували можливі шляхи регуляції функціонування ITSN1, опосередковані іонами Ca²⁺.

3.3.1. Вплив іонів Ca²⁺ на зв'язування ЕН доменів ITSN1 з Епсином 1.

Усі відомі ізоформи ITSN1, за винятком ідентифікованої на рівні мРНК ізоформи, яка транскрибується з альтернативного промотора [38], містять два N-кінцеві ЕН домени. Ці домени здатні зв'язуватись з мотивами аспарагін-пролін-фенілаланін (NPF) у складі білків-партнерів. Зокрема, ЕН домени опосередковують взаємодію ITSN1 з Епсином 1 – допоміжним білком ендозитозу, який бере участь в утворенні викривлення плазматичної мембрани, формування клатрин-облямованої ямки та сортування вантажу при клатрин-опосередкованому ендозитозі [54,167]. ЕН домени є розповсюдженими серед білків, що беруть участь у мембранному транспорті, і складаються з двох послідовних структурних мотивів типу «спіраль-петля-спіраль», що часто містять канонічні амінокислотні послідовності, притаманні мотивам EF-hand

[40]. Відомо, що ці мотиви здатні зв'язувати іони Ca^{2+} [41]. Нещодавно здатність першого ЕН домену ITSН1 зв'язувати ці іони було підтверджено методом рентгеноструктурного аналізу [запис 3FIA у базі даних RCSB Protein Data Bank, неопубліковані дані]. Метою цього етапу моєї роботи була перевірка впливу іонів Ca^{2+} на взаємодію ITSН1 з С-кінцевим фрагментом Епсину 1, що містить сайт зв'язування з ЕН доменами.

Для перевірки ефекту іонів Ca^{2+} на функціонування ЕН доменів ITSН1 було здійснено ряд *in vitro* преципітацій за допомогою His-таг злитих білків. Для цього С-кінцевий фрагмент Епсину 1, що містить сайти зв'язування з ЕН доменами ITSН1, було клоновано у векторі рЕТ28с (рис.3.20). Цей вектор дає

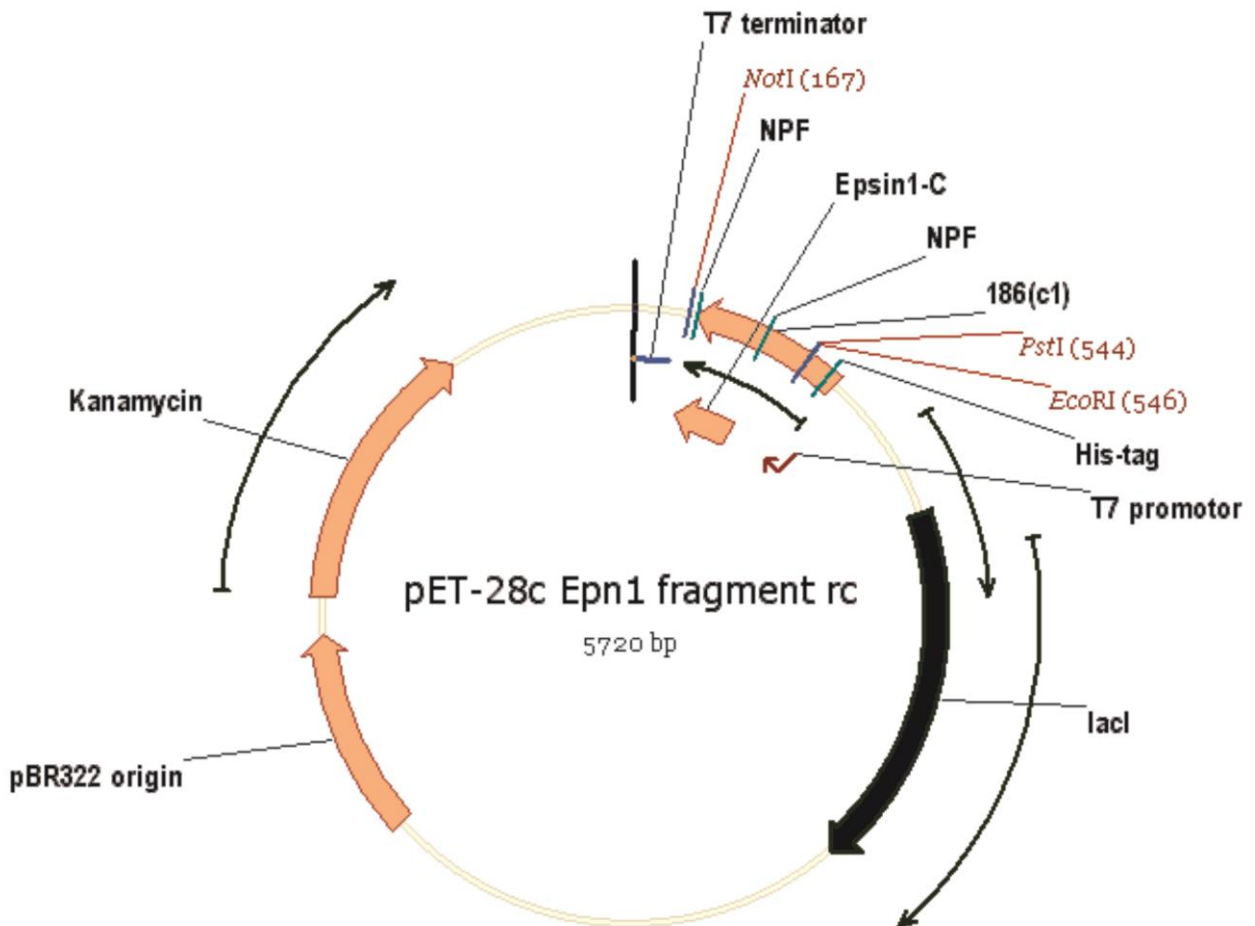


Рис. 3.20. Схематичне зображення конструкції, що кодує С-кінцевий фрагмент Епсину 1, злитий з His-тагом. Плазмиду створено на базі вектора для бактеріальної експресії рЕТ28с

можливість експресувати цільову кДНК в одній відкритій рамці зчитування з полігістидиновим тагом. Індукція експресії білка за допомогою ППТГ забезпечується одночасним зняттям репресії T7 промотора у векторі та промотора T7 РНК-полімерази у геномі *E.coli* штаму BL21(DE3) при додаванні лактозоподібних речовин. Таким чином, ми експресували злитий з гістидиновим тагом С-кінцевий фрагмент епсину 1 (His-Epsin1-C). Рівень експресії та наявність білка у розчинній фазі було підтверджено за допомогою електрофорезу індукованих бактеріальних лізатів у ПААГ (рис.3.21). Аналогічно було проведено експресію GST-злитих ЕН доменів ITSН1 та перевірено ефективність їх експресії і наявність у розчинній фракції (рис.3.22).

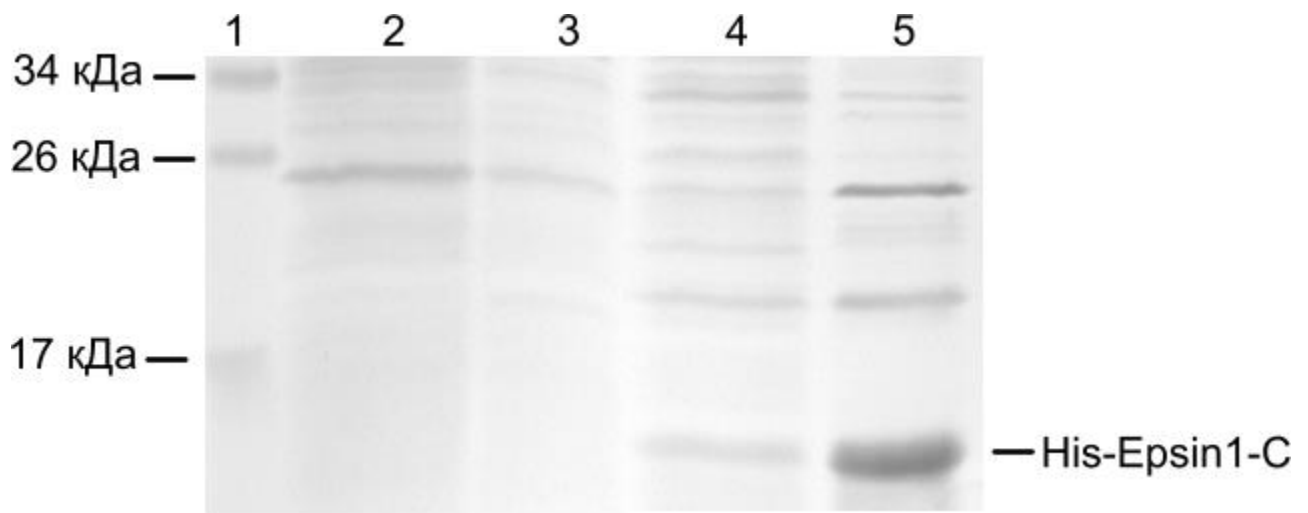


Рис. 3.21. Рис. 3.22. Електрофореграма результатів експресії та очищення His-Epsin1-C: 1 – маркер; 2 – лізат нетрансформованих клітин *E.coli* BL21(DE3); 3 – лізат трансформованих неіндукованих клітин *E.coli* BL21(DE3); 4 – лізат трансформованих індукованих клітин *E.coli* BL21(DE3); 5 – афінно очищений лізат індукованих клітин *E.coli* BL21(DE3)

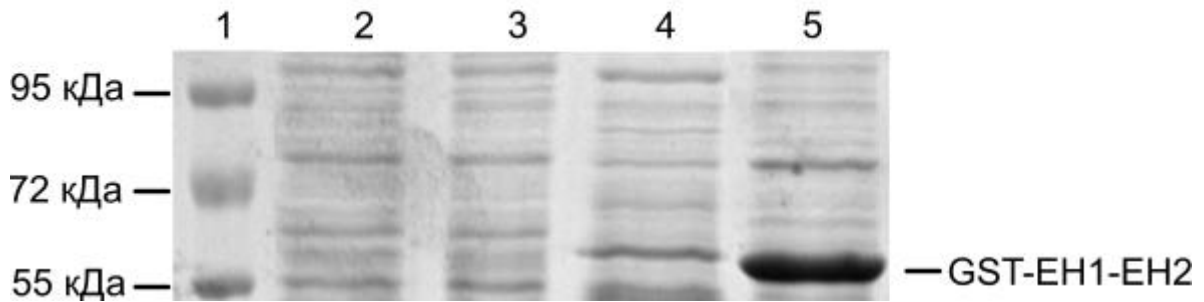


Рис. 3.22. Електрофореграма продукції та очищення GST-EH1-EH2. (7,5% ПААГ): 1 – маркер; 2 – лізат нетрансформованих клітин *E.coli* BL21(DE3); 3 – лізат трансформованих неіндукованих клітин *E.coli* BL21(DE3); 4 – лізат трансформованих індукованих клітин *E.coli* BL21(DE3); 5 – афінно очищений лізат індукованих клітин *E.coli* BL21(DE3)

In vitro преципітацію з використанням His-злитих білків проводили у трьох варіантах: 1) з додаванням CaCl_2 ; 2) з додаванням MgCl_2 ; 3) без додавання двохвалентних катіонів. Білки, що зв'язалися, було розділено методом електрофорезу в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. Для кожного експериментального варіанту кількість білка, що зв'язався, визначалась як відношення між сигналами GST-EH1-EH2 та His-Epsin1-C. Додавання двохвалентних катіонів в середньому призводило до незначного збільшення рівня зв'язування His-Epsin1-C, що було навіть більш виражене у варіанті з додаванням MgCl_2 (рис.3.23). Тим не менш, ми не виявили статистично достовірного впливу Ca^{2+} та Mg^{2+} на утворення комплексу між His-Epsin1-C та GST-EH1-EH2. Щоб виключити можливий ефект неправильного фолдингу експресованих у бактеріях EH доменів ITSN1 ми провели преципітацію His-Epsin1-C з лізатом клітин ембріональної нирки людини лінії 293 з подальшим визначенням кількості ITSN1, що зв'язався, методом Вестерн-блот з використанням антитіл anti-ITSN1. Проведений експеримент підтвердив, що додавання іонів Ca^{2+} або Mg^{2+} не призводить до значних змін у зв'язуванні His-Epsin1-C білком ITSN1 (рис.3.24).

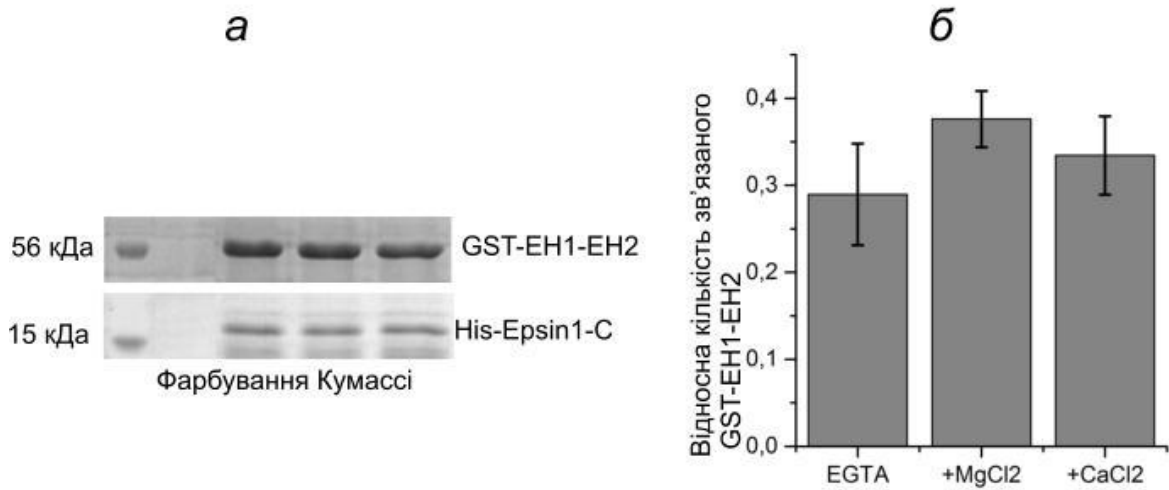


Рис. 3.23. Вплив іонів Ca^{2+} на взаємодію His-Epsin1-C з GST-EH1-EH2: *a* - електрофореграма результатів преципітації His-Epsin1-C та GST-EH1-EH2; *б* - кількісний підрахунок зв'язаного білка (N=8). Відносну кількість зв'язаного білка визначали як долю нормалізованого сигналу від сумарного значення нормалізованих сигналів у трьох експериментальних варіантах. Різниця між варіантами є статистично недостовірною за критерієм Краскела-Уолліса

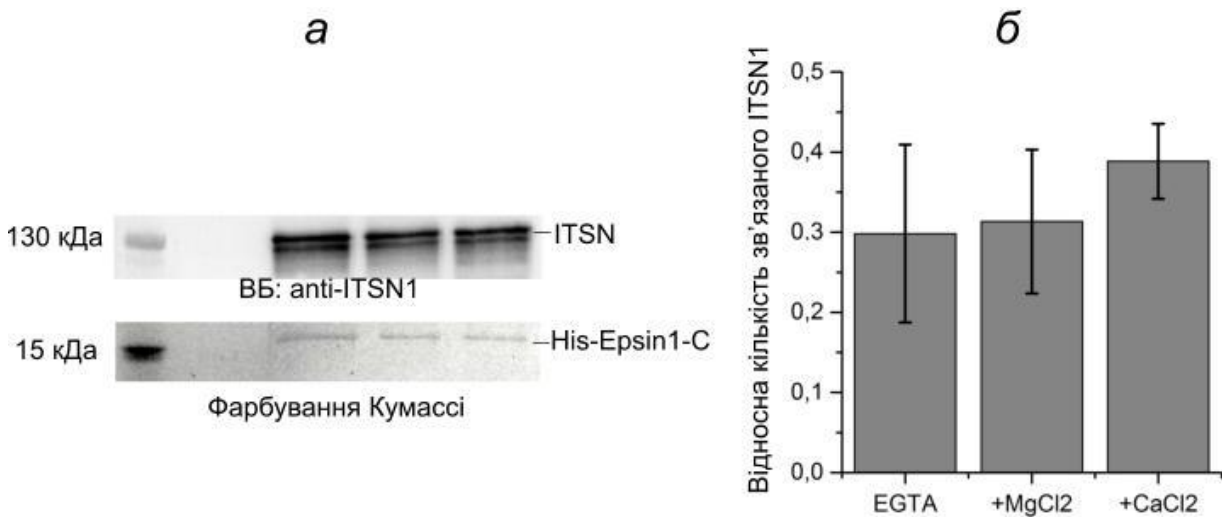


Рис. 3.24. Вплив іонів Ca^{2+} на взаємодію His-Epsin1-C з ITSN1: *a* - електрофореграма результатів преципітації His-Epsin1-C та ITSN1; *б* - кількісний підрахунок зв'язаного білка (N=8). Відносну кількість зв'язаного білка визначали як долю нормалізованого сигналу від сумарного значення нормалізованих сигналів у трьох експериментальних варіантах. Різниця між варіантами є статистично недостовірною за критерієм Краскела-Уолліса

3.3.2. Ca^{2+} -кальмодулін-залежне фосфорилування ITSN1

Пост-трансляційні модифікації білків є надзвичайно поширеним клітинним механізмом тонкої регуляції їх функціонування. Одним з найбільш вивчених типів пост-трансляційних модифікацій білків є їх фосфорилування по залишках серину, треоніну або тирозину. Фосфорилування ITSN1 було продемонстровано у декількох масштабних дослідженнях фосфопротеомів [124–127]. Більшість ідентифікованих сайтів знаходяться у надспіралізованій ділянці ITSN1, а також у ділянці, що містить SH3 домени. На сьогодні залишаються невідомими ані фізіологічний контекст, ані функціональні наслідки, ані власне кінази, що відповідають за це фосфорилування. На цьому етапі роботи ми перевіряли припущення щодо можливого Ca^{2+} /кальмодулін-залежного фосфорилування ITSN1. Спочатку ми провели біоінформатичне передбачення потенційних сайтів фосфорилування ITSN1, використовуючи онлайн-сервіси Scansite, NetPhos та KinasePhos, а також програму GPS 2.1 [133–137]. Для більшості цих ресурсів, окрім GPS 2.1, наявна можливість передбачати сайти фосфорилування лише для Ca^{2+} /кальмодулін-залежної кінази 2 (CaMK2), тому передбачення було зроблено саме для неї. Результати проведеного біоінформатичного аналізу представлені в таблиці 3.3.

Як видно з таблиці, основна частина передбачених сайтів фосфорилування знаходиться у лінкерних ділянках між функціональними доменами, а також у надспіралізованій ділянці ITSN1. Для подальшого вивчення можливості Ca^{2+} -залежного фосфорилування ITSN1 фрагменти кДНК, що кодують деякі з цих ділянок ITSN1, а саме надспіралізовану та ділянку, яка містить SH3 домени, було клоновано у векторі pGEX4T3 для отримання GST-злитих рекомбінантних білків. Ці конструкції було використано для експресії GST-злитих SH3-вмісної ділянки (GST-SH3A-E) та надспіралізованої ділянки (GST-CCR) в клітинах *E.coli*. Наявність цільових рекомбінантних білків у бактеріальних лізатах було

Таблиця 3.3

**Біоінформатичне передбачення сайтів фосфорилювання ITSN1
Ca²⁺/кальмодулін-залежною кіназою 2 (CaMK2)**

Сайт фосфорилювання (номери за послідовністю Q1511 у базі даних UniProt)	Ділянка у складі молекули ITSN1	Сервіс передбачення
S203	EH1-EH2 лінкер	GPS 2.1
S313	EH2-CCR лінкер	GPS 2.1, KinasePhos
S315	EH2-CCR лінкер	GPS 2.1, KinasePhos
S318	EH2-CCR лінкер	KinasePhos
S324	EH2-CCR лінкер	KinasePhos
T505	CCR	GPS 2.1
S624	CCR	GPS 2.1
S687	CCR	GPS 2.1, Scansite
S891	SH3A-B лінкер	KinasePhos, NetPhos
S978	SH3B-C лінкер	GPS 2.1
S981	SH3B-C лінкер	KinasePhos
S995	SH3B-C лінкер	GPS 2.1, KinasePhos
S1071	SH3C-D лінкер	KinasePhos
S1137	SH3D	KinasePhos
S1306	DH	GPS 2.1
S1334	DH	GPS 2.1
S1555	PH	GPS 2.1

підтверджено афінною хроматографією з послідуочим аналізом методом електрофорезу у ПААГ (рис.3.25).

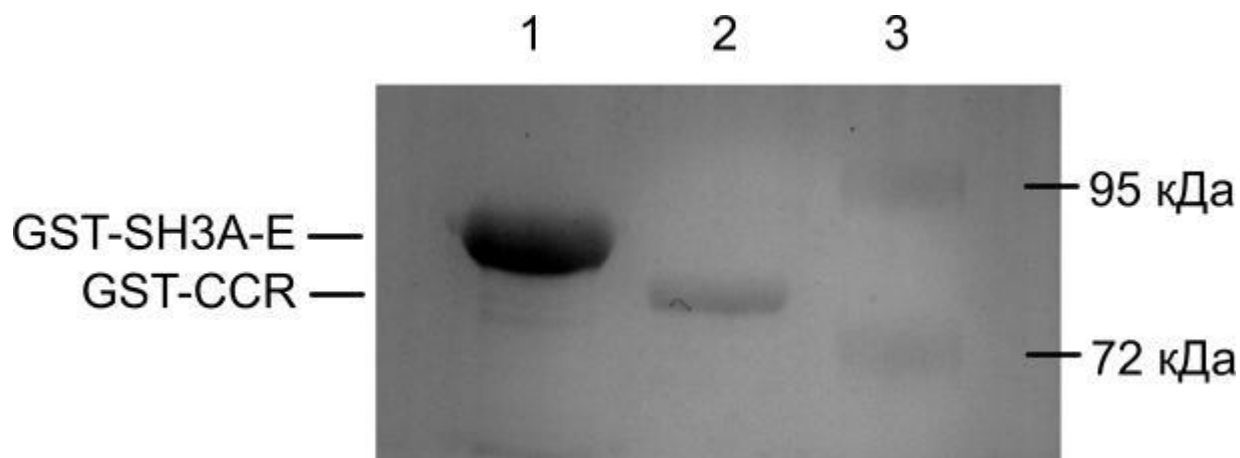


Рис. 3.25. Електрофореграма афінно очищених білків GST-SH3A-E (1) та GST-CCR (2) (7,5% ПААГ), 3 – маркер

Для підтвердження наявності сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування у молекулі ITSN1, було проведено *in vitro* кіназну реакцію з використанням Ca^{2+} -залежних кіназ. Для цього з лізату головного мозку миші методом афінної хроматографії з використанням кальмодулін-агарози було очищено фракцію білків, що зв'язуються з кальмодуліном. Ефективність очищення було перевірено за допомогою Вестерн-блот аналізу очищеної фракції з антитілами anti-STOP, оскільки відомо, що білок STOP взаємодіє з кальмодуліном (рис.3.26) [154]. Фракцію, отриману після елюції з кальмодулін-агарози, було використано для проведення *in vitro* кіназної реакції з рекомбінантними GST-злитими фрагментами ITSN1, що містили надспіралізовану ділянку (GST-CCR) і SH3 домени (GST-SH3A-E) ITSN1. Реакції проводились у кількох варіантах з додаванням різних компонентів у реакцію (рис.3.27). Було виявлено, що додавання до реакції кальмодуліну та іонів Ca^{2+} призводить до фосфорилування обох досліджуваних фрагментів ITSN1, але не окремого білка

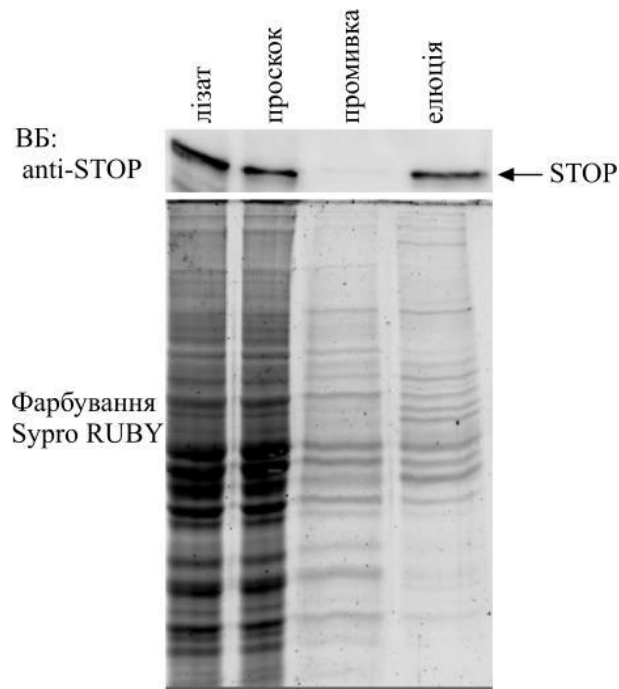


Рис. 3.26. Виділення фракції білків, які зв'язуються з кальмодуліном, з лізату головного мозку миші

GST, що використовувався в якості негативного контролю. Фосфорилування відбувалось лише при додаванні кальмодуліну та Ca^{2+} . Таким чином, було показано, що ITSN1 фосфорилується *in vitro* у Ca^{2+} /кальмодулін-залежний спосіб.

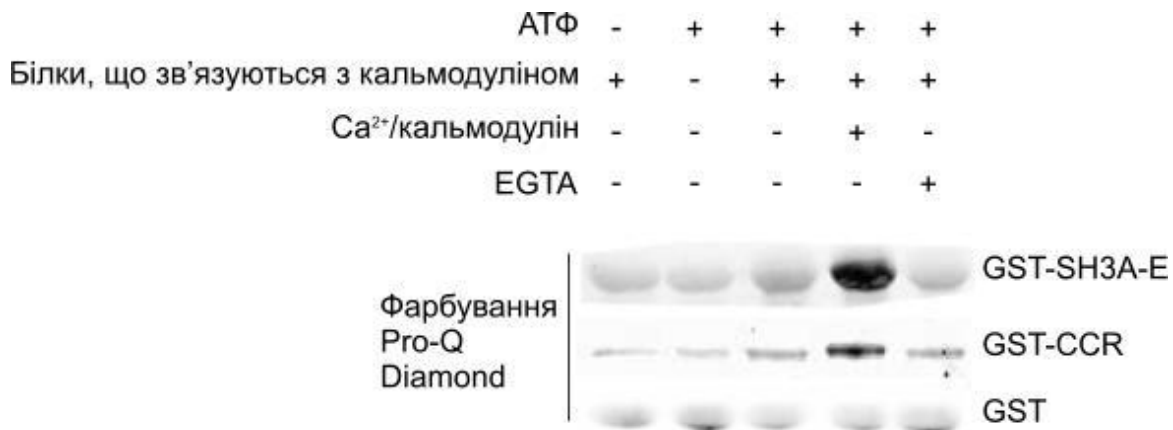


Рис. 3.27. Електрофореграма продуктів *in vitro* кінзної реакції між білками, що зв'язуються з кальмодуліном, і рекомбінантними GST-злитими фрагментами ITSN1. Інтенсивне забарвлення смуг при додаванні Ca^{2+} та кальмодуліну до реакції відчить про фосфорилування білків

3.3.3 Ідентифікація сайтів Ca^{2+} /кальмодулін-залежного фосфорилування ITSN1

Найбільш потужним сучасним методом, що дозволяє точно визначити сайт фосфорилування у білку, є тандемна мас-спектрометрія (MS/MS) [168]. Цей метод полягає у двохетапному аналізі зразків. На першому етапі пептиди, утворені внаслідок протеолізу, іонізуються і аналізуються в першому мас-аналізаторі. Після іонізації ці пептиди визначаються як іони-прекурсори. На другому етапі окремі іони-прекурсори розділяються і підлягають фрагментації, що супроводжується руйнуванням пептидних зв'язків і утворенням набору іонів-продуктів, що аналізується у другому мас-аналізаторі. Перевагою такого підходу є можливість визначити точний сайт фосфорилування у випадку, якщо іон-прекурсор містить декілька амінокислотних залишків, що можуть бути фосфорильовані.

Для ідентифікації сайтів Ca^{2+} /кальмодулін-залежного фосфорилування рекомбінантних фрагментів ITSN1 проби після *in vitro* кіназної реакції, що містили фосфорильовані білки, було піддано аналізу методом тандемної мас-спектрометрії. Для збільшення покриття ідентифікованими пептидами амінокислотних послідовностей фрагментів, що досліджувались, зразки було поділено навпіл і піддано незалежному протеолізу з використанням двох окремих ендопротеаз: трипсину та Glu-C. В результаті було отримано 48.7% покриття послідовності фрагменту GST-CCR та 59.4% покриття послідовності фрагменту GST-SH3A-E при використанні трипсину. Для Glu-C відповідні показники становили 39.1% та 23.3%. Сумарне покриття становило 61.6% та 67.4% для GST-CCR та GST-SH3A-E відповідно (рис. 3.28).

В результаті проведення мас-спектрометрії було ідентифіковано низку фосфорильованих пептидів. Отримані фосфопептиди було відсортовано за значенням Mascot Delta Ion Score для відбору пептидів з достовірно визначеним сайтом фосфорилування. У такий спосіб ми отримали п'ять фосфопептидів, що містили сайти фосфорилування у позиціях, відповідних до позицій T349, T567,

CCR

312_RSGSGISVISSTSDQRLPEEPVLEDEQQLEKKLPVTFEDKKRENFERGNLELE^{KRR}QALLEQQR
 KEQERLAQLERAQEQRKERERQEQRKRQLELEKQLEKQRELERQREEERRKEIERREAAKRELERQRQLEWERNRRQ
ELLNQRNKEQEDIVVLKAKKKTLEFELEALNDKKHQLEGLQDIR^{CRLTTQRQEIESTNKSRELRIAEITHL}
QQQLQESQMLGRLIPEKQILNDQLKQVQQNSLHRDSLVTLKR^{ALEAKE}LARQHRLDQLDEVEKETRS
KLQEIDIFNNQLKELREIHNKQQLQKQKSMEAERLKQKE^{QER}KIIELEK^{QKEEAQRRAQER}RDKQWLEHVQ
QEDEHQRRPR^{KLHEEEKLRREESVKKKDGEEKGKQEAQDKLGRLFHQHQEP_715}

SH3A-E

718_PAVQAPWSTAEKGPLTISAQENVK^{VVYYR}ALYPFESR^{SHDEITIQPGDIVMVKGEWVDE}SQTGEPGWLGGE
LKGKTGWFPANYAEKIPENEVPAPVKPVTDSAPAPKLALRE^{TPAPLAVTSSEPSTTPNNWADFSSTWPTST}
 NEKPETDNWDAAWAQPSLTVPSAGQLRQRSFTPATATGSSPSPVLGQGEK^{VEGLQAQALYPWRAK}KDNHLNF
NKNDVITVLEQQDMWWFGEVQGQGWFPK^{SYVK}LISGPIRKSTSMDSGSSESPASLKRVASPAAKPV
VSGEEFIAMYTYE^{ESSEQDLTFQQGDVILVTK}KDGDWWTGTVGDKAGVFPSNYVR^{LKDSEGSSTAGKTGSLGK}
KPEIAQVIASYTATGPEQLTLAPGQLILIRKKNPGGWEGELQAR^{GKK}RQIGWFPANYVKLLSPGTSKI
TPTEPPKSTALAAVCQVIGMYDYTAQNDELAFNKGQIINVLNKEDPDWWKGEVNGQVGLFPSNYV
KLTTDMDPSQQ_1220

Рис. 3.28. Амінокислотні послідовності фрагментів ITSN1, що досліджувались. Послідовності, ідентифіковані за допомогою мас-спектрометрії, виділено збільшеним шрифтом та підкреслюванням. Послідовності, ідентифіковані після протеолізу за допомогою трипсину, виділено жирним шрифтом. Послідовності, ідентифіковані після протеолізу за допомогою Glu-C, виділено курсивом

S624, S904 та S978 у послідовності повно розмірного ITSN1 (таблиця 3.4). Вторинні спектри обраних фосфопептидів було також перевірено вручну на предмет наявності фосфоспецифічних вторинних іонів для підтвердження достовірності ідентифікованих сайтів. В усіх п'яти випадках наявні піки підтверджували достовірність визначених сайтів фосфорилування (Додаток А). Два з ідентифікованих сайтів розташовуються у надспіралізованій ділянці ITSN1 (CCR), ще три – в між доменних лінкерах між EH та CCR, SH3A та SH3B, а також SH3B та SH3C доменами (рис. 3.29). Слід зазначити, що ми також ідентифікували ряд фосфорильованих пептидів, в яких точний сайт фосфорилування встановити неможливо через наявність двох або більше залишків серину та/або треоніну і недостатню кількість ідентифікованих іонів продуктів. Таким чином, ми ідентифікували щонайменше п'ять сайтів Ca²⁺/кальмодулін-залежного фосфорилування ITSN1.

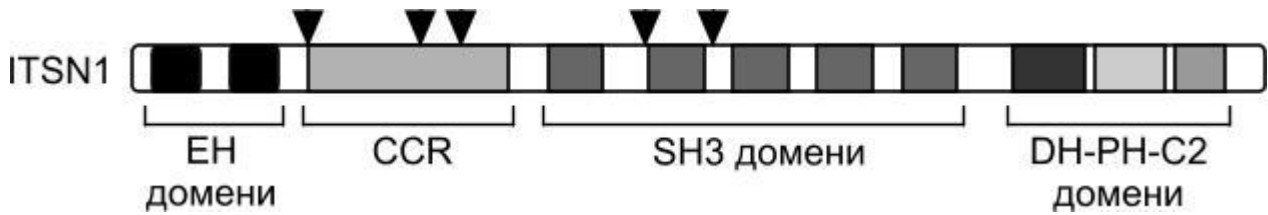


Рис. 3.29. Схематичне зображення розташування ідентифікованих сайтів фосфорилування у молекулі ITSN1. Сайти фосфорилування позначені трикутниками

Отже, в ході роботи ми перевірили два принципово можливі шляхи регуляції функціонування скафолдного білка ITSN1. Ми показали, що підвищення концентрації іонів Ca^{2+} не впливає на взаємодію його EH доменів з С-кінцевим фрагментом білка ендцитозу епсину 1. З іншого боку, ми встановили, що ITSN1 потенційно може підлягати Ca^{2+} -кальмодулін-залежному фосфорилуванню, що було продемонстровано в експерименті *in vitro*. Ми також визначили п'ять сайтів у складі рекомбінантних фрагментів ITSN1, що можуть бути фосфорильовані.

Таблиця 3.4

Ідентифікація сайтів фосфорилування рекомбінантних фрагментів білка ITSN1.

Сайт фосфорилування (номери за послідовністю Q15811 у базі даних UniProt)	Рекомбінантний фрагмент ITSN1	Іон-прекурсор	m/z	z	Відхилення від теоретичної маси, Да	Mascot DeltaIon score
T349	CCR	(K)KLPVtFEDK(K)	578,79	2	0,0014	35,3

Продовження таблиці 3.4

T567	CCR	(R)DSLVT ^t LKR(A)	506,27	2	0,00033	19,7
S624	CCR	(E)IH ^N KQQLQKQKs ^s MEA ERLKQKE(Q)	701,37	4	0,0043	35,2
S904	SH3A-E	(R)SAFTPATATGSSPsPV LGQGEK(V)	1085,51	2	0,0027	15,0
S978	SH3A-E	(K)STsMDSGSSESPASLK R(V)	903,82	2	0,0053	16,4

Результати, викладені в цьому розділі, було опубліковано в наступних роботах:

1. Identification of Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation sites of endocytic scaffold ITSN1 by tandem mass spectrometry. / D. Ye. Morderer, O. V. Nikolaienko, A. V. Rynditch // Biopolym. Cell. – 2015. Vol.31. –P. 338-344.
2. Ca²⁺ does not affect the binding properties of ITSN1 EH domains / Morderer D. Ye., Rymarenko O. V., Skrypkina I. Ya., Rynditch A. V. // Biopolym. Cell. - 2014. Vol. 30. N 6. –P. 481-484.
3. Ca/calmodulin-dependent phosphorylation of endocytic scaffold ITSN1 / D. Ye. Morderer, O. V. Nikolaienko, I. Ya. Skrypkina, O. V. Rymarenko, S. V. Kropyvko, L. O. Tsyba, A. V. Rynditch // Biopolym. Cell. – 2014. Vol.30. –P. 74-76.
4. Intersectin 1 forms a complex with adaptor protein Ruk/CIN85 in vivo independently of epidermal growth factor stimulation / Nikolaienko O, Skrypkina I, Tsyba L, Fedyshyn Y, Morderer D, Buchman V, de la Luna S, Drobot L, Rynditch A // Cell signal. – 2009. – Vol.21. – P. 753 – 759.
5. New aspects of endocytic adaptor ITSN1 functioning in neurons / Morderer D, Nikolaienko O, Skrypkina I, Rymarenko O, Tsyba L, Rynditch A. // RECOOP HST Bridges in Life Sciences 8th Annual Scientific Conference “Laugh and Be the Best in Research and Patient Care”, (Prague, April 5-7). – Prague. – 2013. – P. 77.

6. Endocytic scaffold ITSN1: novel connections and way of regulation in neurons / Morderer D., Nikolaienko O., Skrypkina I., Rymarenko O., Cherkas V., Belan P., Rynditch A. // VIIth Int. GDRI conf. “From Molecular to Cellular Events in Human Pathology” (Riga, Latvia). – Riga. – P. 27.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Як було зазначено в огляді літератури, скафолдні білки є важливими компонентами клітинних систем, що забезпечують їх функціонування шляхом сприяння побудові макромолекулярних комплексів, необхідних для протікання більшості внутрішньоклітинних процесів. Склад таких комплексів також залежить від скафолдних білків, оскільки визначається їх здатністю здійснювати взаємодії з тими чи іншими білками-партнерами. Варіюючи склад молекулярних комплексів шляхом залучення різних скафолдів або регулюючи функціонування окремого скафолда, клітина може змінювати характер протікання внутрішньоклітинних процесів. Таким чином, здатність скафолдного білка здійснювати взаємодії з тими чи іншими молекулами-партнерами відіграє фундаментальну роль у функціонуванні клітини, тому дослідження функціональних зв'язків скафолдних білків є важливою дослідницькою задачею для більш глибокого розуміння засад роботи клітинних систем.

Одним з завдань цієї роботи був пошук нових білків-партнерів скафолдного білка ITSN1 у нейронах. Для цього ми клонували та експресували окремі його SH3 домени і використали їх для проведення преципітації *in vitro* з білками лізату мозку миші. Потім білки, які зв'язалися з SH3 доменами, було ідентифіковано методом MALDI-TOF мас-спектрометрії. Таким чином, ми вперше продемонстрували здатність ITSN1 взаємодіяти з цитоскелетним білком STOP(MAP6). Провівши аналіз пептидів, визначених методом MALDI-TOF мас-спектрометрії, а також електрофоретичної рухливості ізоформи STOP(MAP6), що взаємодіє з ITSN1, ми визначили, що ідентифікована

взаємодія відбувається з нейрональною ізоформою STOP(MAP6), відомою як N-STOP. Можлива взаємодія ITSN1 з іншими ізоформами STOP(MAP6), що експресуються в інших типах клітин, залишається темою для подальших досліджень.

У наступних експериментах ми здійснили перевірку результатів мас-спектрометричного аналізу. Повторна преципітація GST-злитими SH3 доменами ITSN1 білків лізату головного мозку миші з подальшим Вестерн-блот аналізом білків, що зв'язалися, з використанням антитіл anti-STOP підтвердила здатність SH3A домену ITSN1 до взаємодії зі STOP(MAP6). Більш того, ми продемонстрували, що взаємодія зі STOP(MAP6) є специфічною лише для SH3A домену ITSN1, оскільки інші SH3 домени не зв'язували STOP(MAP6). Раніше було показано, що SH3A домен має підвищену у порівнянні з іншими SH3 доменами ITSN1 спорідненість до пролін-багатих консенсусів PPVPPR [77]. У STOP (MAP6) такий мотив відсутній, проте є досить схожий мотив PTVPER, що знаходиться у С-кінцевій частині молекули. Таким чином, специфічність взаємодії STOP (MAP6) з SH3A доменом ITSN1 може бути обумовлена його взаємодією саме з цим мотивом, що має бути перевірено експериментально в подальших дослідженнях. Ми також довели, що наявність STOP(MAP6) серед білків, що зв'язалися з SH3A доменом, не є результатом неспецифічної взаємодії через елементи цитоскелету, оскільки він взаємодіє виключно з SH3A доменом, тоді як тубулін був присутній у всіх доріжках в приблизно однаковій кількості. Крім того, ми продемонстрували наявність взаємодії між STOP(MAP6) та ITSN1 *in vivo*, виявивши їх комплекс методом коімунопреципітації.

Слід зауважити, що останнім часом з'являються відомості про взаємодію ITSN1 з іншими білками, функція яких пов'язана з регуляцією динаміки мікротрубочок. Скринінг різних кДНК бібліотек методом дріжджової дигібридної системи виявив взаємодію ITSN1 з білками TACC1, PDE4DIP та CLIP-115, що пов'язані з функціонуванням мікротрубочок [169]. Раніше також

було показано, що ITSN1 взаємодіє з білком DISC1, що асоційований з центросомою і бере участь у транспорті синаптичних білків вздовж мікротрубочок [170,171]. Таким чином, на основі даних, отриманих в тому числі і в нашій роботі, можна припустити участь ITSN1 у регуляції динаміки мікротрубочок, а також у асоційованому з мікротрубочками внутрішньоклітинному транспорті.

Дослідження локалізації STOP(MAP6) та ITSN1 в первинній культурі нейронів гіпокампу щурів виявило відмінності характеру локалізації цих білків у клітинах. Незважаючи на це, ми ідентифікували певні локуси ко-локалізації цих білків. На жаль, ці сайти неможливо співвіднести з певними компартментами клітин. Слід зауважити, що субклітинна локалізація STOP(MAP6) у нейронах може залежати від синаптичної активності. Було показано, що фосфорилування STOP(MAP6) Ca^{2+} -кальмодулін-залежною кіназою 2 призводить до його від'єднання від мікротрубочок і асоціації з актиновими філаментами у синаптичних сайтах [172]. Ми вивчали локалізацію STOP(MAP6) лише у стані спокою. Крім того, нещодавно з'явилися відомості про інші сайти локалізації STOP(MAP6) в клітині, що не пов'язані з мікротрубочками, такі як апарат Гольджі та мітохондрії [173]. З огляду на це, питання ко-локалізації ITSN1 та STOP(MAP6) потребує подальших досліджень.

Білок STOP(MAP6) вперше був відкритий як фактор, що обумовлює Ca^{2+} -кальмодулін-залежну резистентність деяких субпопуляцій мікротрубочок до холоду та деполімеризуючих хімічних агентів [152]. Сайти взаємодії з Ca^{2+} -кальмодуліном у складі молекули STOP(MAP6) перекриваються з сайтами взаємодії з мікротрубочками, тому наявність Ca^{2+} -кальмодуліну у клітині призводить до від'єднання STOP від мікротрубочок [154]. За аналогією з цим ефектом, взаємодія STOP(MAP6) з іншими білками-партнерами може впливати на його здатність до взаємодії з мікротрубочками. Ми перевірили це припущення для випадку взаємодії STOP(MAP6) з ITSN1. У випадку, якщо ця взаємодія інтерферує зі здатністю STOP до асоціації з мікротрубочками,

надекспресія *ITSN1* мала б призводити до від'єднання *STOP(MAP6)* від мікротрубочок і до втрати їх резистентності до холоду і нокодазолу. Проте ми показали, що надекспресія *ITSN1* не впливає на *STOP*-залежну резистентність мікротрубочок. Таким чином, роль взаємодії *STOP(MAP6)* та *ITSN1* у стабілізації тубулінового цитоскелету виглядає малоїмовірною.

Окрім ролі механічного стабілізатора мікротрубочок, *STOP(MAP6)* ймовірно виконує і інші ролі у клітині. У мишей за відсутності експресії гену *MAP6* спостерігається зниження кількості синаптичних везикул у синапсах гіпокампу, що може вказувати на порушення ендоцитозу синаптичних везикул [174]. Роль *ITSN1* у цьому процесі було детально розглянуто у огляді літератури. Про участь *STOP(MAP6)* у цьому процесі опосередковано свідчить його наявність у протеомі синаптичних везикул, а також його ре-локалізація до синаптичних терміналей при фосфорилуванні Ca^{2+} -кальмодулін-залежною кіназою 2 [172,175,176]. Відсутність *STOP(MAP6)* у мишей також призводить до порушення деяких видів синаптичної пластичності, які можуть бути обумовлені порушенням молекулярних механізмів, що їх забезпечують, як на пост-, так і на пресинаптичному рівнях [174]. Таким чином, однією з важливих функцій утворення комплексу між *ITSN1* та *STOP(MAP6)* може бути участь у функціонуванні синаптичних везикул.

У нещодавніх дослідженнях було показано, що *STOP(MAP6)* є важливим для росту аксонів і дендритів у культивованих нейронах [160,177]. В свою чергу, відсутність експресії *ITSN1* у мишей призводить до морфологічних порушень будови головного мозку, в основі яких можуть лежати порушення механізмів росту нейронів і утворення контактів між ними [112]. Ми показали, що пригнічення експресії *ITSN1* призводить до пригнічення росту дендритів у первинних нейронах гіпокампу щурів. Цей ефект може бути обумовленим як взаємодією зі *STOP(MAP6)*, так і здатністю *ITSN1* активувати малу ГТФазу *Cdc42*. Відомо, що *Cdc42* є позитивним регулятором ініціації нейритів, поляризації нейронів та росту дендритів та аксонів [178]. Крім того, партнери

ITSN1, що беруть участь у сигналінгу Cdc42, а саме WASP та WIP [179], також відіграють певну роль у рості нейритів [180,181]. Виявлений нами ефект є цікавим в контексті участі ITSN1 у розвитку синдрому Дауна, оскільки у дітей старше 2-х років при цьому синдромі відбувається значне скорочення довжини дендритів у нейронах головного мозку, з чим можуть бути пов'язані когнітивні порушення [182].

Відсутність експресії STOP(MAP6) у мишей також призводить до низки поведінкових порушень, що частково припинюються при додаванні до їх корму препаратів, які застосовуються при лікуванні шизофренії [174]. У ряді подальших робіт було виявлено, що ці миші проявляють симптоми, які можуть бути співвіднесені з позитивними та негативними симптомами пацієнтів, хворих на шизофренію [183–189]. Цікаво, що ITSN1 взаємодіє також з білком DISC1, вкорочення якого внаслідок хромосомної транслокації генетично детермінує розвиток шизофренії [170,190]. Форма DISC1 дикого типу локалізується у центросомі, а також опосередковано взаємодіє з мікротрубочками [170]. Було показано, що DISC1 бере участь в організації тубулінових філаментів у клітині і впливає на ріст нейритів у клітинах феохромоцитомі лінії PC12 та кортикальних нейронах [191]. З огляду на те, що порушення експресії як *DISC1*, так і *MAP6* призводить до розвитку фенотипу, подібного до шизофренії, одним з молекулярних механізмів цього захворювання може бути порушення організації тубулінового цитоскелету [192]. Наявність функціональних зв'язків ITSN1 з цими білками ставить питання про роль ITSN1 у організації мікротрубочок, а також про його можливу участь у розвитку шизофренії.

ITSN1 взаємодіє з великою кількістю білків, які беруть участь у різноманітних внутрішньоклітинних процесах, що значною мірою ускладнює розуміння загальної картини його функціонування. Водночас досить очевидним є те, що взаємодії з тими чи іншими білками зумовлюються певними чинниками, наприклад локалізацією ITSN1, фізіологічним станом клітини,

факторами навколишнього середовища, що діють на клітину. Крім того, ймовірно, що на різних стадіях того чи іншого внутрішньоклітинного процесу ITSN1 може динамічно змінювати білків-партнерів, про що свідчать його взаємодії як з ранніми, так і з пізніми білками ендоцитозу. З огляду на це, повинні існувати певні механізми регуляції взаємодії ITSN1 з тими чи іншими партнерами.

У нейронах зміна внутрішньоклітинної концентрації кальцію є одним з основних чинників, який регулює їх функціонування [164]. Враховуючи значну роль ITSN1 у функціонуванні нейронів, наявність кальцієвої регуляції білок-білкових взаємодій, що він здійснює, виглядає досить ймовірною. Крім того, наявність у складі його молекули двох мотивів EF-hand, що здатні зв'язувати іони Ca^{2+} , також вказує на можливість регуляції взаємодії ITSN1 з партнерами за допомогою Ca^{2+} . Обидва EF-hand мотиви знаходяться у складі EH доменів ITSN1, які взаємодіють з рядом білків. Проте, в цій роботі ми не виявили впливу іонів Ca^{2+} на зв'язування ITSN1 з С-кінцевим фрагментом білка ендоцитозу Епсину 1, що є одним з відомих білків-партнерів EH доменів. При цьому здатність цих доменів зв'язувати іони Ca^{2+} було підтверджено за допомогою рентгеноструктурного аналізу. Таким чином, згідно з нашими даними, іони Ca^{2+} не відіграють регуляторної ролі у функціонуванні ITSN1, проте можуть відігравати певну роль у набутті EH доменом необхідної конформації. Цікаво, що у складі інших білків також існують EH домени з функціональними EF-hand мотивами, проте чітких даних про регуляторну роль іонів Ca^{2+} у функціонуванні цих доменів на сьогодні немає. Щоправда, Kelly та Phillips у своїй роботі стверджують, що додавання EGTA знижує ефективність зв'язування EH доменів ортолога ITSN1 Dap160 з синаптичним білком stoned-V приблизно на 25% в порівнянні з додаванням CaCl_2 [193]. Незважаючи на це, автори роблять висновок, що іони Ca^{2+} не чинять істотного впливу на цю взаємодію, що загалом співпадає з нашими висновками. Проте певні розбіжності між нашими результатами можна пояснити міжвидовими

розбіжностями у функціонуванні ЕН доменів або різницею у характері взаємодії ЕН доменів з різними білками партнерами. Таким чином, отримані нами та іншими групами, вказують на відсутність визначної ролі іонів Ca^{2+} у регуляції функціонування ЕН доменів ITSN1.

Іншим можливим способом регуляції функціонування ITSN1 за допомогою іонів Ca^{2+} є його Ca^{2+} -залежне фосфорилування. Для перевірки такої гіпотези ми провели біоінформатичний аналіз можливості фосфорилування ITSN1 Ca^{2+} -кальмодулін-залежною кіназою 2 (CAMK2), оскільки серед інших Ca^{2+} -кальмодулін-залежних кіназ у більшості сервісів для передбачення фосфорилування наявна можливість аналізу лише щодо неї. В результаті ми визначили 17 потенційних сайтів фосфорилування ITSN1 кіназою CAMK2. Лише два з них, а саме S313 та S315, було ідентифіковано як сайти фосфорилування в попередніх дослідженнях фосфопротеому людини з використанням мас-спектрометричного аналізу [125]. Крім того, фосфорилування серину, аналогічного до S1137, було ідентифіковано у протеомі щура [126]. Остання модифікація особливо цікава тим, що вона була ідентифікована у зразках так званої пост-синаптичної щільності, яка формується у пост-синаптичних нервових закінченнях. Пост-синаптична щільність є спеціалізованим білковим комплексом, функцією якого є проведення та модуляції сигналів, які надходять до пост-синаптичного закінчення нейронів, й багато компонентів цього комплексу регулюються фосфорилуванням [194]. Крім того, кіназа CAMK2 у відповідь на певні типи стимуляції переміщується до регіону пост-синаптичної щільності, де фосфорилує багато мішеней, що призводить до функціональної перебудови синапсу і розвитку довготривалої потенціації, що вважається молекулярнофізіологічною основою процесів пам'яті і навчання [195,196]. З огляду на це, ймовірно, що функціонування ITSN1 у пост-синаптичному закінченні може регулюватися шляхом Ca^{2+} -кальмодулін-залежного фосфорилування.

Для підтвердження можливості Ca^{2+} -кальмодулін-залежного фосфорилування ми провели *in vitro* кіназну реакцію із виділеною з головного мозку мишей фракцією білків, які взаємодіють з кальмодуліном у Ca^{2+} -залежний спосіб. Згідно з нашими очікуваннями, ця фракція мала містити Ca^{2+} -кальмодулін залежні кінази. Ефективність очищення цієї фракції було перевірено за наявністю у ній білка STOP методом Вестерн-блот аналізу. Отриману фракцію використали для проведення *in vitro* кіназної реакції з рекомбінантними фрагментами ITSN1, які містили надспіралізовану ділянку та SH3 домени. Використані фрагменти ITSN1 містили 12 з 17 амінокислотних залишків, які було передбачено як потенційні сайти фосфорилування для САМК2. У результаті проведення реакції ми виявили, що обидва взяті для аналізу фрагменти ITSN1 здатні фосфорилуватися білками виділеної фракції. Важливо, що фосфорилування проходило лише у присутності іонів Ca^{2+} та кальмодуліну, що підтверджує присутність Ca^{2+} -кальмодулін-залежних ферментів у ній.

Визначення функціонального значення Ca^{2+} -кальмодулін-залежного фосфорилування ITSN1 є неможливим без ідентифікації точних сайтів фосфорилування. Для їх визначення ми провели аналіз фосфорильованих фрагментів ITSN1 методом тандемної мас-спектрометрії, що в порівнянні зі звичайною мас-спектрометрією дозволяє більш точно ідентифікувати сайти пост-трансляційних модифікацій. За значенням «Mascot Delta Score» нам вдалося ідентифікувати п'ять достовірних сайтів фосфорилування – два в надспіралізованій ділянці, один в лінкерній ділянці з N-кінця надспіралізованої ділянки і два в лінкерних ділянках між SH3 доменами. Крім того, аналіз отриманих спектрів мас за допомогою програми «Scaffold» дозволяє з високою ймовірністю припустити наявність інших сайтів фосфорилування, що не могли бути достовірно ідентифіковані через велику кількість залишків серину і треоніну в пептидних іонах-прекурсорах і недостатню кількість отриманих вторинних іонів. Наприклад, як мінімум один з амінокислотних залишків T323

або S324 (а, можливо, і обидва) було фосфорильовано, проте з отриманого спектру визначити, який саме, було неможливо. Не виключена можливість також фосфорильовання залишків T894, T899, S976, S977, S981 та S983. Частково таку можливість підтверджує наявність у протеомі щура фосфорильовання за позицією T970, що відповідає позиції S977 у послідовності ITSN1 людини [197].

Серед ідентифікованих нами п'яти достовірних сайтів потенційного Ca^{2+} -кальмодулін-залежного фосфорильовання ITSN1 лише два, а саме S624 та S978, було передбачено біоінформатично. Відповідно, лише два сайти серед 12 передбачених було підтверджено нами експериментально. Це певною мірою підтверджує низьку чутливість та специфічність наявних на сьогодні біоінформатичних інструментів для передбачення сайтів фосфорильовання білків [198]. З іншого боку, серед ідентифікованих нами сайтів лише для сайту S904 та аналогічному сайті S897 у щурів у попередніх дослідженнях було виявлено наявність фосфорильовання [124,125,127,199]. Фосфорильовання інших сайтів ITSN1 *in vivo* має бути підтверджена в подальших дослідженнях.

З п'яти визначених нами сайтів фосфорильовання лише два, а саме S624 та S978, відповідають класичному мотиву R/K-X-X-S/T, що впізнається кальмодулін-залежними кіназами [200]. Природньо, що саме ці два сайти було передбачено в результаті проведеного біоінформатичного аналізу. Амінокислотне оточення інших сайтів не дозволяє визначити ймовірну кіназу, субстрактна специфічність якої відповідала б певному мотиву з високою точністю. Проте, як відомо, відсутність повноцінного консенсусного мотиву для фосфорильовання певною кіназою не завжди означає відсутність фосфорильовання цією кіназою даного субстрату [201]. Наприклад, було показано, що у деяких випадках циклін-залежна кіназа CDK1 замість канонічного мотиву впізнавання S/T-P-X-K/R може фосфорильовати мінімальний мотив впізнавання S/T-P [201,202]. Такому мотиву відповідає ідентифікований нами сайт S904. З обох боків цей сайт оточений залишками

пролінів, що дозволяє припустити можливість його фосфорилування так званими пролін-спрямованими кіназами, до яких належать кінази родин CDK, MAPK, JNK та GSK [203]. Для кіназ CDK4 та CDK5 було показано можливість прямо чи непрямо взаємодіяти з кальмодуліном, тому вони цілком могли бути присутніми у виділеній нами фракції білків [204,205]. Крім того, активація CDK5 під час певних фізіологічних процесів може залежати від підвищення концентрації іонів Ca^{2+} , в той час як активація CDK4 може регулюватися Ca^{2+} -кальмодулін-залежною кіназою 1 [206,207], що може пояснювати залежність фосфорилування, яке ми спостерігали, від присутності іонів Ca^{2+} . На користь можливості фосфорилування ITSN1 циклін-залежними кіназами свідчить біоінформатичне передбачення коротких функціональних сайтів у складі його молекули, проведене за допомогою серверу ELM [208]. Цей сервер передбачає наявність у ITSN1 потенційних сайтів для докінгу цикліну та CKS1, що забезпечують рекрутування циклін-залежних кіназ до їх субстратів [209,210]. Інші родини пролін-спрямованих кіназ також здатні підлягати Ca^{2+} -залежній регуляції [211–214], проте виглядають менш ймовірними кандидатами для здійснення ідентифікованого нами фосфорилування через відсутність даних про їх зв'язок з кальмодуліном.

Амінокислотне оточення сайтів T349 та T567 не співпадає з канонічними мотивами впізнавання для найбільш відомих і вивчених кіназ. Ці сайти є певною мірою подібними між собою, оскільки містять залишки гідрофобних амінокислот у позиціях -2, -1 та +1 від фосфорильованого залишку треоніну, а також позитивно заряджених амінокислотних залишків у позиції -5. З іншого боку, їх суттєво відрізняє наявність позитивно заряджених амінокислотних залишків у позиціях +2 та +3 для сайту T567 в порівнянні з негативно зарядженими амінокислотними залишками для сайту T349. У позиції -4, натомість, сайт T349 має лізин, тоді як T567 – аспартат. Таким чином, кіназна специфічність щодо цих сайтів видається не до кінця зрозумілою.

Майже усі виявлені нами сайти є еволюційно консервативними серед хребетних тварин, за виключенням сайту S624, що присутній лише у ссавців. Функціональне значення виявлених нами сайтів фосфорилювання залишається предметом подальших досліджень, проте базуючись на відомих на сьогодні даних можна зробити деякі припущення. Так, сайти T567 та S624 знаходяться у надспіралізованій ділянці, що складається з кількох α -спіральних участків, які взаємодіють між собою. Раніше було показано, що фосфорилювання залишків треоніну в позиціях b та e гептадних повторів, з яких складаються спіралі надспіралізованих ділянок, призводить до дестабілізації спіралей, в той час як фосфорилювання залишків серину в залежності від положення може як стабілізувати, так і дестабілізувати спіраль [215,216]. Можна очікувати, що зміни модифікацій амінокислотних залишків надспіралізованих ділянок можуть впливати на їх здатність до олігомеризації і утворення зв'язків з іншими білками. На підтвердження цього, нещодавно було показано, що фосфорилювання певних залишків надспіралізованої ділянки білка CRN2 призводить до зміни характеру його взаємодій з білками апарату регуляції актинового цитоскелету, що призводить до зміни архітектури останнього і пригнічує міграцію клітин [217].

Сайти T349, S904 та S978 розташовані в міждоменних лінкерних ділянках, що не мають вторинної структури, або у так званих регіонах внутрішньої невпорядкованості. Саме в таких регіонах найчастіше відбувається фосфорилювання залишків серину та треоніну [218–220]. Більш того, сайти S904 та S978 знаходяться у ділянках, що є надзвичайно збагаченими на залишки серину та треоніну, що вказує на можливе функціональне значення цих ділянок як кластерів, множинне фосфорилювання яких певним чином модулює функціонування ITSN1 (рис. 4.1). Наявність таких серинових та треонінових кластерів в інших білках було показано в масштабних дослідженнях фосфопротеому [220]. Крім того, для ITSN1 було ідентифіковано фосфорилювання у сайтах S901, S902, S977, S986, а також сайт T977 у щурів,

740 KVYYRALYPFESRSHDEITIQPGDIVMVKGEWVDESQTGEPGWLGGELKG
SH3A ДОМЕН
KTGWFPANYAEKIPENEVPAPVKPVTDSTSAAPAPKLALRETPAPLAVTSSEPSTTPN
 NWADFSSTWPTSTNEKPETDNWDAAWAQPSLTVPSAGQLRQRSFAFTPATATGSS
PSPVLGQGEKVEGLQAQALYPWRAKKDNHLNFNKNDVITVLEQQDMWWFGEVQ
SH3B ДОМЕН
GQKGWFPKSYVKLISGPIRKSTSMDSGSSESPASLKRVASPAAKPVVSGEEFIAMY
TYESSEQGDLTFQQGDVILVTKKGDWWTGTVGDKAGVFPSNYVRLKDS **1060**
SH3C ДОМЕН

Рис. 4.1. Фрагмент амінокислотної послідовності ITSN1 між SH3A та SH3C доменами. Послідовності, що відповідають доменам, виділено сірим кольором, між доменним лінкерам – чорним кольором. Залишки серину та треоніну в складі доменів виділено синім, в складі між доменних лінкерів – червоним. Загальна частота зустрічальності залишків серину та треоніну у фрагменті – 1,69 на 10 залишків, у доменах – 0,98 на 10 залишків, у міждоменних лінкерах – 2,65 на 10 залишків

який відповідає залишку S984 в послідовності ITSN1 людини, [124,125,127]. Всі ці сайти знаходяться в безпосередній близькості від сайтів, ідентифікованих нами, що підтверджує можливе функціональне значення цих кластерів. На сьогодні роль міждоменних невпорядкованих лінкерів ITSN1 практично не вивчена. Відомо лише, що лінкер між SH3A та SH3B доменом містить коротку послідовність, що взаємодіє з α - та β -субодиницями адаптерного білка ендоцитозу AP2 [62]. Фосфорилування цих лінкерів може свідчити про наявність у них більшої кількості функцій, що залишилися поза увагою дослідників. Наприклад, фосфорилування може створювати нові інтерфейси для білок-білкових взаємодій. Сервер ELM передбачає, що фосфорилування ITSN1 у позиції S978 створює мотив для фосфозалежної взаємодії з білками родини 14-3-3 та WW доменами білків Pin. Наявність таких взаємодій може бути предметом подальших досліджень функціональних зв'язків ITSN1.

Серин/треонін-збагачені ділянки, в яких знаходяться сайти S904 та S978, безпосередньо оточують з обох боків SH3B домен ITSN1. З огляду на це, регуляція функціонування SH3B домену також може бути одним з функціональних наслідків фосфорилування ITSN1. Довгий час було невідомо, які саме білок-білкові взаємодії здійснює SH3B домен, проте нещодавно було показано його здатність взаємодіяти з SH3 доменом білка ендоцитозу ендofilіну 1 у нехарактерний для SH3 доменів спосіб [63]. Можливість впливу фосфорилування на цю взаємодію також має стати предметом подальшого вивчення.

Ca²⁺/кальмодулін-залежне фосфорилування у клітині залучене до регуляції багатьох процесів у нейронах, в тому числі і до розвитку дендритного дерева [221–223]. В цій роботі ми показали, що ITSN1 залучений до росту дендритів і, до того ж, може бути мішенню для Ca²⁺/кальмодулін-залежного фосфорилування. Функціональних наслідків цього фосфорилування на сьогоднішній день ми ще не визначали, проте ми припускаємо, що таке фосфорилування здатне регулювати залучення ITSN1 до процесів росту дендритів. Крім того, ми продемонстрували, що ITSN1 формує комплекси з цитоскелетним білком STOP(MAP6), який також впливає на розвиток дендритного дерева. Раніше було знайдено, що цей вплив визначається роллю STOP(MAP6) у регуляції лізосомального транспорту у дендритах, оскільки присутність лізосом у конусах росту дендритів є необхідною для функціонування систем, що забезпечують ріст [160]. Участь ITSN1 у дендритному транспорті на сьогодні не було показано, і це питання потребує подальших досліджень, проте транспорт лізосом є не єдиним можливим механізмом участі STOP(MAP6) у формуванні дендритного дерева. Нещодавно було показано, що STOP(MAP6) може опосередковувати передачу сигналу від комплексів рецепторів, що визначають спрямований ріст аксонів, через PI3K-АКТ сигнальний каскад [224]. Не виключено, що подібну роль він може відігравати й у дендритах. Слід зазначити, що ITSN1 також може брати участь у

функціонуванні цього сигнального шляху [81]. Іншим можливим механізмом участі STOP(MAP6) у формуванні морфології нейронів є його зв'язок з актиновим цитоскелетом. При надекспресії STOP(MAP6) та залученого до регуляції клітинної рухливості білка VMCC1S у клітинах HeLa спостерігається утворення подібних до філоподій багатих на актинові філаменти мембранних виростів [177]. В цих виростах відсутні мікротрубочки, проте присутній STOP(MAP6). Цікаво, що STOP(MAP6) може дисоціювати з мікротрубочок і зв'язуватись з актиновими філаментами у відповідь на Ca^{2+} /кальмодулін-залежне фосфорилування [172]. Це може свідчити про існування механізму ініціації утворення філоподій, залежного від активності нейрону, що полягає у Ca^{2+} /кальмодулін-залежному фосфорилуванні STOP(MAP6) з його подальшою взаємодією з актином. Як відомо, формування філоподій є початковим етапом у формуванні нейритів [158], тому така активність STOP(MAP6) також може пояснювати його вплив на морфологію нейронів. Механізм актин-регулюючої активності STOP залишається недослідженим, проте цей ефект може бути обумовлений взаємодією з ITSN1, участь якого у формуванні філоподій є добре відомою [85]. Таким чином, взаємодія між ITSN1 та STOP(MAP6), а також фосфорилування ITSN1 Ca^{2+} /кальмодулін-залежними кіназами, ідентифіковані в цій роботі, дозволяють представити гіпотетичні зв'язки між ITSN1, STOP(MAP6) та Ca^{2+} /кальмодулін-залежними кіназами, а також потенційні механізми їх участі та регуляції при формуванні дендритного дерева, які підсумовані на рисунку 4.2.

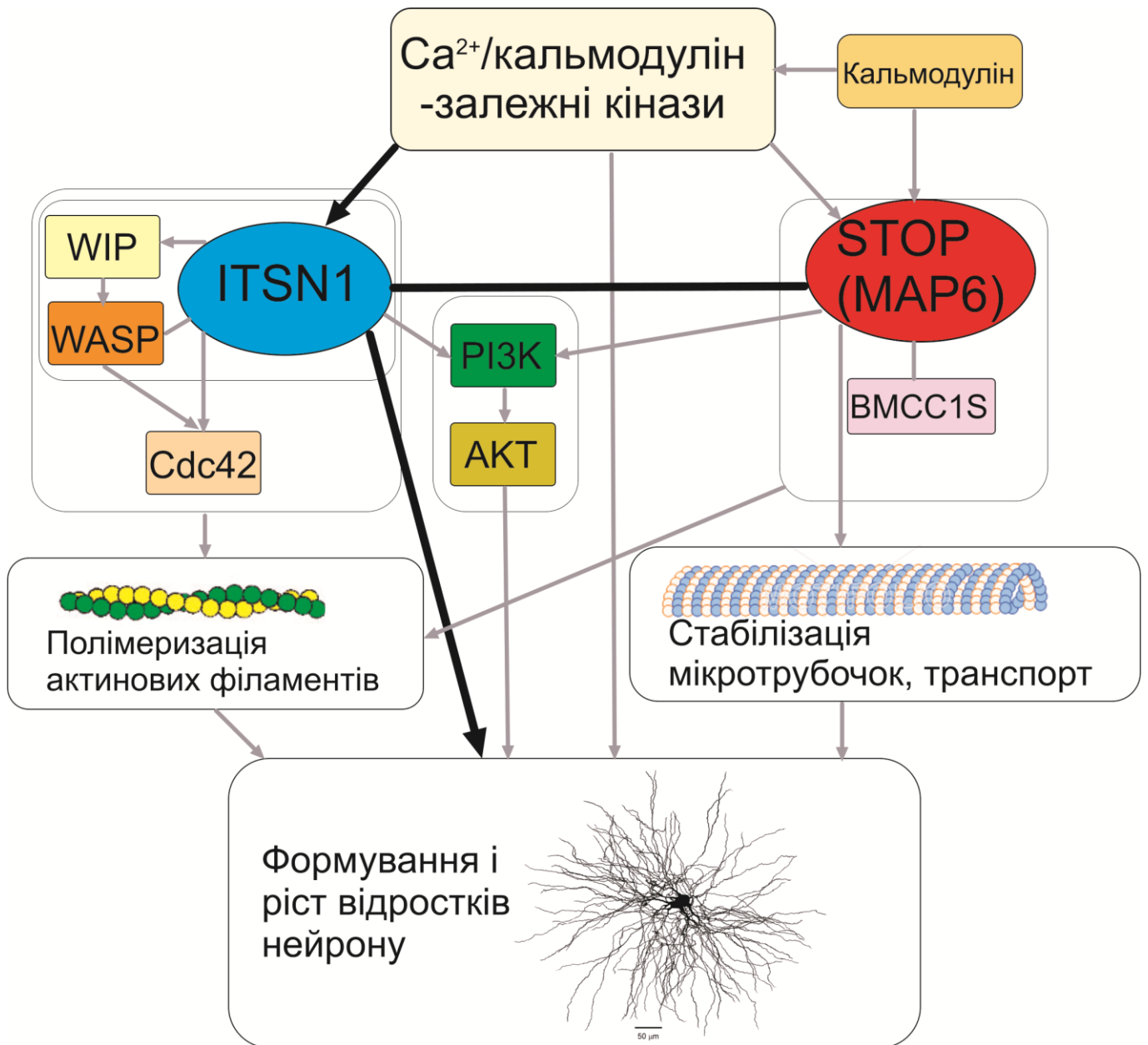


Рис. 4.2. Гіпотетична схема участі ITSN1 та STOP у формуванні дендритного дерева. Жирними лініями позначено зв'язки, ідентифіковані в цій роботі

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено, що ITSN1 через SH3A-домен формує комплекс з цитоскелетним білком STOP в нейронах, приймає участь у рості дендритів та піддається Ca^{2+} /кальмодулін-залежному фосфорилуванню.

1. За допомогою мас-спектрометрії MALDI-TOF вперше ідентифіковано новий нейрональний партнер скафолдного білка ендоцитозу ITSN1 – цитоскелетний білок STOP. Результати мас-спектрометрії підтверджено за допомогою преципітації білків з лізату головного мозку миші з використанням GST-злитих SH3-доменів ITSN1 та ко-імунопреципітації комплексів ITSN1 та STOP з лізату головного мозку миші з подальшим Вестерн-блот аналізом білків, що зв'язалися.
2. Визначено, що ITSN1 формує комплекс зі STOP за допомогою SH3A-домену.
3. Показано, що ITSN1 та STOP частково ко-локалізуються у сомі та дендритах культивованих первинних нейронів гіпокампу щурів.
4. Продемонстровано, що пригнічення експресії гена ITSN1 не призводить до зменшення кількості дендритів культивованих первинних нейронів гіпокампу щурів.
5. Встановлено, що при пригніченні експресії гена *ITSN1* відбувається скорочення довжини дендритів культивованих первинних нейронів гіпокампу щурів.
6. За допомогою біоінформатичних методів передбачено 17 потенційних сайтів Ca^{2+} -залежного фосфорилування ITSN1.
7. Встановлено, що надспіралізована та SH3-домен-вмісна ділянки ITSN1 здатні підлягати Ca^{2+} /кальмодулін-залежному фосфорилуванню *in vitro*.
8. З використанням тандемної мас-спектрометрії, поєднаної з рідинною хроматографією, ідентифіковано 5 сайтів Ca^{2+} /кальмодулін-залежного

фосфорилування ITS_N1: для надспіралізованої ділянки ідентифіковано 3 сайти фосфорилування, а для ділянки, що містить SH3-домени, – 2 сайти.

ДОДАТОК А

Вторинні спектри фосфорильованих пептидів, отримані за допомогою тандемної мас-спектрометрії

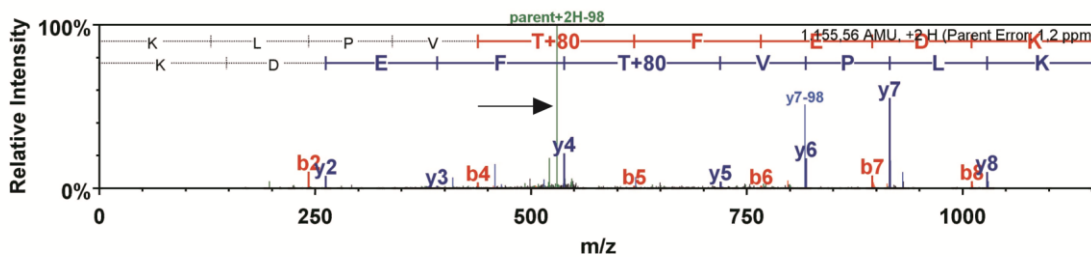


Рис. А.1 Вторинний спектр пептиду (K)KLPVpTFEDK(K) (залишки 345-353). Найвищий пік (позначений чорною стрілкою) відповідає первинному іону з нейтральною втратою H_3PO_4 (-98), що вказує на фосфорилування у позиції T349.

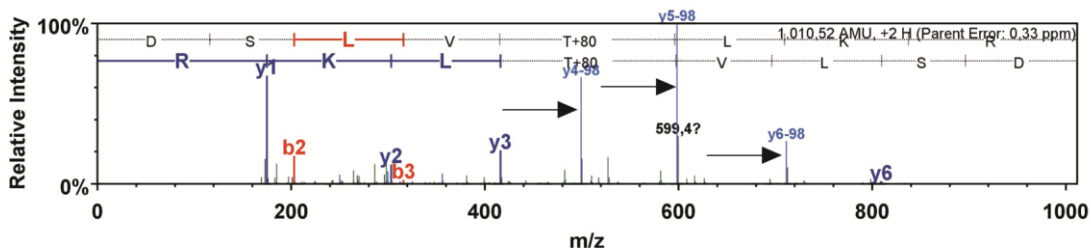


Рис. А.2 Вторинний спектр пептиду (R)DSLVPpTLKR(A) (залишки 563-570). Фосфорилування T567 підтверджується наявністю іонів y_4 , y_5 та y_6 (позначені чорними стрілками) з нейтральними втратами H_3PO_4 (-98).

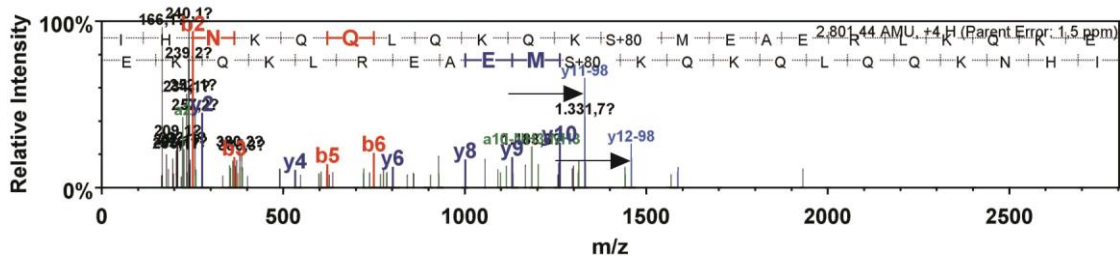


Рис. А.3 Вторинний спектр пептиду (E)IHNKQQLQKQKpSMEAERLKQKE(Q) (residues 613-634). Фосфорилування S624 підтверджується наявністю іонів y11 та y12 (позначені чорними стрілками) з нейтральними втратами H_3PO_4 (-98).

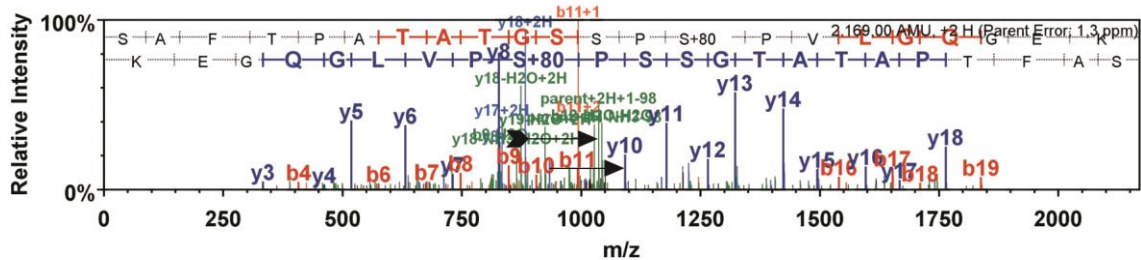


Рис. А.3 Вторинний спектр пептиду (R)SAFTPATATGSSPpSPVLGQGEK(V) (залишки 891-912). Фосфорилування пептиду підтверджується наявністю піку, що відповідає первинному іону з нейтральною втратою H_3PO_4 (-98) (позначено чорною стрілкою з хвостом). Фосфорилування позиції S904 підтверджується наявністю іона y10 (позначений чорною стрілкою).

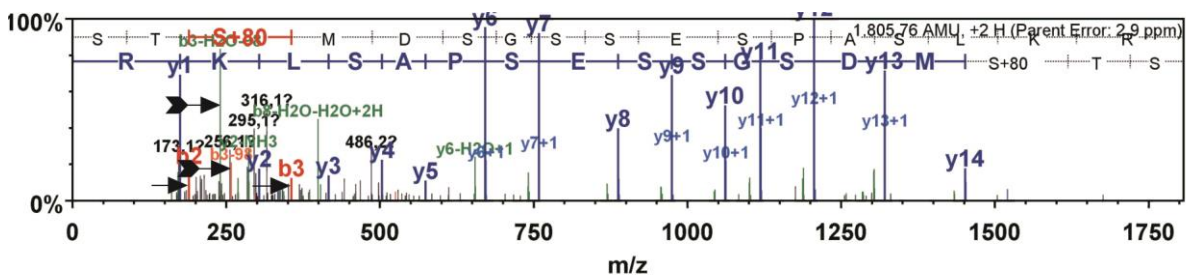


Рис. А.4 Вторинний спектр пептиду of (K)STpSMDSGSSESPASLKR(V) (залишки 976-992). Фосфорилування S978 підтверджується наявністю іонів b2 та b3 (позначені чорними стрілками), а також іонів b3 з нейтральними втратами H_3PO_4 (-98) та $\text{H}_3\text{PO}_4+\text{H}_2\text{O}$ (-116) (позначені чорними стрілками з хвостом).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Intersectin multidomain adaptor proteins: Regulation of functional diversity / L. Tsyba, O. Nikolaienko, O. Dergai [et al.] // *Gene*. – 2011. – № 2. – P. 67–75
2. Genomic structure, sequence, and refined mapping of the human intersectin gene (ITSN), which encompasses 250 kb on chromosome 21q221-->q222 / M. Guipponi, H.S. Scott, M. Hattori [et al.] // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1998. – № 3-4. – P. 218–220
3. Alu-splice cloning of human Intersectin (ITSN), a putative multivalent binding protein expressed in proliferating and differentiating neurons and overexpressed in Down syndrome / C. Pucharcós, J.-J. Fuentes, C. Casas [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 1999. – № 6. – P. 704–712
4. Translational gene mapping of cognitive decline / B. Wilmot, S.K. McWeeney, R.R. Nixon [et al.] // *Neurobiol. Aging*. – 2008. – № 4. – P. 524–541
5. Intersectin enhances huntingtin aggregation and neurodegeneration through activation of c-Jun-NH2-terminal kinase / E. Scappini, T.-W. Koh, N.P. Martin [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2007. – № 15. – P. 1862–1871
6. Pechstein A. Intersectin 1: a versatile actor in the synaptic vesicle cycle / A. Pechstein, O. Shupliakov, V. Haucke // *Biochem. Soc. Trans.* – 2010. – № Pt 1. – P. 181–186
7. Role of numb in dendritic spine development with a Cdc42 GEF intersectin and EphB2 / T. Nishimura, T. Yamaguchi, A. Tokunaga [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2006. – № 3. – P. 1273–1285
8. Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in neurons / L. Tsyba, T. Gryaznova, O. Dergai [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – № 4. – P. 929–934
9. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins / C.A. Koch, D. Anderson, M.F. Moran [et al.] // *Science* (80-.). – 1991. – № 5006. – P. 668–674
10. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site / R. Ren, B. Mayer,

- P. Cicchetti [et al.] // *Science* (80-.). – 1993. – № 5098. – P. 1157–1161
11. Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S cerevisiae* / K.-Y. Chol, B. Satterberg, D.M. Lyons [et al.] // *Cell*. – 1994. – № 3. – P. 499–512
 12. Shaw A.S. Scaffold proteins and immune-cell signalling / Andrey S Shaw, Erin L Filbert // *Nat. Rev. Immunol.* – 2009. – № 1. – P. 47–56
 13. Koshland D. Amplification and adaptation in regulatory and sensory systems / D. Koshland, A. Goldbeter, J. Stock // *Science* (80-.). – 1982. – № 4556. – P. 220–225
 14. Ferrell J.E. Tripping the switch fantastic: How a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs / J.E. Ferrell // *Trends Biochem. Sci.* – 1996. – № 12. – P. 460–466
 15. Huang C.Y. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade / C Y Huang, J E Ferrell // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1996. – № 19. – P. 10078–10083
 16. Levchenko A. Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties / A. Levchenko, J. Bruck, P.W. Sternberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2000. – № 11. – P. 5818–5823
 17. Ferrell J.E. What Do Scaffold Proteins Really Do? / J.E. Ferrell // *Sci. STKE*. – 2000. – № 52. – P. 1–3
 18. Locasale J.W. Scaffold proteins confer diverse regulatory properties to protein kinase cascades / J.W. Locasale, A.S. Shaw, A.K. Chakraborty // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2007. – № 33. – P. 13307–13312
 19. Bray D. Computer-based analysis of the binding steps in protein complex formation / D Bray, S Lay // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1997. – № 25. – P. 13493–13498
 20. Burack W.R. Signal transduction: hanging on a scaffold / W. Richard Burack, Andrey S. Shaw // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2000. – № 2. – P. 211–216
 21. Ebisuya M. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity / M. Ebisuya // *J.*

- Cell Sci. – 2005. – № 14. – P. 2997–3002
22. Wong W. AKAP signalling complexes: focal points in space and time / Wei Wong, John D Scott // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2004. – № 12. – P. 959–970
 23. C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1 / J. Müller, S. Ory, T. Copeland [et al.] // *Mol. Cell.* – 2001. – № 5. – P. 983–993
 24. Teis D. Localization of the MP1-MAPK Scaffold Complex to Endosomes Is Mediated by p14 and Required for Signal Transduction / D. Teis, W. Wunderlich, L.A. Huber // *Dev. Cell.* – 2002. – № 6. – P. 803–814
 25. p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis / D. Teis, N. Taub, R. Kurzbauer [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2006. – № 6. – P. 861–868
 26. Good M.C. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information / M.C. Good, J.G. Zalatan, W.A. Lim // *Science.* – 2011. – № 6030. – P. 680–686
 27. The Yersinia Virulence Factor YopM Forms a Novel Protein Complex with Two Cellular Kinases / C. McDonald, P.O. Vacratsis, J.B. Bliska [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – № 20. – P. 18514–18523
 28. Modularity and functional plasticity of scaffold proteins as p(l)acemakers in cell signaling / C.Q. Pan, M. Sudol, M. Sheetz [et al.] // *Cell. Signal.* – 2012. – № 11. – P. 2143–2165
 29. McKay M.M. Signaling dynamics of the KSR1 scaffold complex / M.M. McKay, D.A. Ritt, D.K. Morrison // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2009. – № 27. – P. 11022–11027
 30. Park S.-H. Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms / S.-H. Park, A. Zarrinpar, W.A. Lim // *Science.* – 2003. – № 5609. – P. 1061–1064
 31. Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon / M. Guipponi, H.S. Scott, H. Chen [et al.] // *Genomics.* – 1998. – № 3. – P. 369–376
 32. The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed /

- C. Pucharcos, C. Casas, M. Nadal [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* – 2001. – № 1-3. – P. 1–11
33. The EH and SH3 domain Eps proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15 / A.S. Sengar, W. Wang, J. Bishay [et al.] // *EMBO J.* – 1999. – № 5. – P. 1159–1171
34. Okamoto M. ESH1/Intersectin, a Protein That Contains EH and SH3 Domains and Binds to Dynamin and SNAP-25: a Protein Connection Between Exocytosis and Endocytosis? / M. Okamoto, S. Schoch, T.C. Sudhof // *J. Biol. Chem.* – 1999. – № 26. – P. 18446–18454
35. Alternative splicing of mammalian Intersectin 1: Domain associations and tissue specificities / L. Tsyba, I. Skrypina, A. Rynditch [et al.] // *Genomics.* – 2004. – № 1. – P. 106–113
36. Expression analysis of human intersectin 2 gene (ITSN2) minor splice variants showing differential expression in normal human brain / M. Seifert, C. Ampofo, Y. Mehraein [et al.] // *Oncol. Rep.* – 2007. – № 5. – P. 1207–1211
37. Structural diversity and differential expression of novel human intersectin 1 isoforms / S. Kropyvko, D. Gerasymchuk, I. Skrypina [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2010. – № 6. – P. 2789–2796
38. Identification and functional analysis of an alternative promoter of human intersectin 1 gene / S. V. Kropyvko, L.O. Tsyba, I.Y. Skrypina [et al.] // *Biopolym. Cell.* – 2010. – № 2. – P. 115–120
39. Identification and characterization of a novel mammalian isoform of the endocytic adaptor ITSN1 / M. Dergai, I. Skrypina, O. Dergai [et al.] // *Gene.* – 2011. – № 2. – P. 120–129
40. Confalonieri S. The Eps15 homology (EH) domain / Stefano Confalonieri, Pier Paolo Di Fiore // *FEBS Lett.* – 2002. – № 1. – P. 24–29
41. Lewit-Bentley A. EF-hand calcium-binding proteins / Anita Lewit-Bentley, Stéphane Réty // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2000. – № 6. – P. 637–643
42. The EH Network / E. Santolini, A.E. Salcini, B.K. Kay [et al.] // *Exp. Cell Res.* –

1999. – № 1. – P. 186–209
43. Recognition specificity of individual EH domains of mammals and yeast / S. Paoluzi, L. Castagnoli, I. Lauro [et al.] // *EMBO J.* – 1998. – № 22. – P. 6541–6550
 44. Burkhard P. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif / P. Burkhard, J. Stetefeld, S. V. Strelkov // *Trends Cell Biol.* – 2001. – № 2. – P. 82–88
 45. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains / Y. Hongtao, J.K. Chen, S. Feng [et al.] // *Cell.* – 1994. – № 5. – P. 933–945
 46. Saksela K. SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? / Kalle Saksela, Perttu Permi // *FEBS Lett.* – 2012. – № 17. – P. 2609–2614
 47. Zheng Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors / Y. Zheng // *TBS.* – 2001. – № 12. – P. 724–732
 48. Cerione R.A. The Dbl family of oncogenes / Richard A. Cerione, Yi Zheng // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 1996. – № 2. – P. 216–222
 49. Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav / J. Han, K. Luby-Phelps, B. Das [et al.] // *Science (80-.)*. – 1998. – № 5350. – P. 558–560
 50. Rizo J. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺- binding domain / Josep Rizo, Thomas C Sudhof // *J. Biol. Chem.* – 1998. – № 26. – P. 15879–15882
 51. Splice Variants of Intersectin Are Components of the Endocytic Machinery in Neurons and Nonneuronal Cells / N.K. Hussain, M. Yamabhai, A.R. Ramjaun [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – № 22. – P. 15671–15677
 52. Pucharcos C. Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis / C. Pucharcos, X. Estivill, S. de la Luna // *FEBS Lett.* – 2000. – № 1-2. – P. 43–51
 53. Mice deficient for the chromosome 21 ortholog Itsn1 exhibit vesicle-trafficking abnormalities / Y. Yu, P.-Y. Chu, D.N. Bowser [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2008. – № 21. – P. 3281–3290
 54. Intersectin, a Novel Adaptor Protein with Two Eps15 Homology and Five Src

- Homology 3 Domains / M. Yamabhai, N.G. Hoffman, N.L. Hardison [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – № 47. – P. 31401–31407
55. Roos J. Dap160, a neural-specific Eps15 homology and multiple SH3 domain-containing protein that interacts with *Drosophila* dynamin / Jack Roos, Regis B. Kelly // *J. Biol. Chem.* – 1998. – № 30. – P. 19108–19119
56. McMahon H.T. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis / Harvey T McMahon, Emmanuel Boucrot // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – № 8. – P. 517–533
57. Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex / B.M. Collins, A.J. McCoy, H.M. Kent [et al.] // *Cell.* – 2002. – № 4. – P. 523–535
58. Sweitzer S.M. Dynamin Undergoes a GTP-Dependent Conformational Change Causing Vesiculation / Sharon M. Sweitzer, Jenny E. Hinshaw // *Cell.* – 1998. – № 6. – P. 1021–1029
59. An enzyme that removes clathrin coats: Purification of an uncoating ATPase / D.M. Schlossman, S.L. Schmid, W. a. Braell [et al.] // *J. Cell Biol.* – 1984. – № 2. – P. 723–733
60. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles / E. Ungewickell, H. Ungewickell, S.E.H. Holstein [et al.] // *Nature.* – 1995. – № 6557. – P. 632–635
61. Essential Role of Phosphoinositide Metabolism in Synaptic Vesicle Recycling / O. Cremona, G. Di Paolo, M.R. Wenk [et al.] // *Cell.* – 1999. – № 2. – P. 179–188
62. Regulation of synaptic vesicle recycling by complex formation between intersectin 1 and the clathrin adaptor complex AP2 / A. Pechstein, J. Bacetic, A. Vahedi-Faridi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2010. – № 9. – P. 4206–4211
63. Vesicle uncoating regulated by SH3-SH3 domain-mediated complex formation between endophilin and intersectin at synapses / A. Pechstein, F. Gerth, I. Milosevic [et al.] // *EMBO Rep.* – 2015. – № 2. – P. 232–239
64. Stonin 2: An Adaptor-like Protein That Interacts with Components of the Endocytic Machinery / J.A. Martina, C.J. Bonangelino, R.C. Aguilar [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2001. – № 5. – P. 1111–1120

65. Intersectin 1 forms complexes with SGIP1 and Reps1 in clathrin-coated pits / O. Dergai, O. Novokhatska, M. Dergai [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – № 2. – P. 408–413
66. Intersectin Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Endocytosis, Ubiquitylation, and Signaling / N.P. Martin, R.P. Mohny, S. Dunn [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2006. – № 5. – P. 1643–1653
67. Intersectin regulates dendritic spine development and somatodendritic endocytosis but not synaptic vesicle recycling in hippocampal neurons / S. Thomas, B. Ritter, D. Verbich [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – № 18. – P. 12410–12419
68. Koh T.-W. Dap160/Intersectin Acts as a Stabilizing Scaffold Required for Synaptic Development and Vesicle Endocytosis / T.-W. Koh, P. Verstreken, H.J. Bellen // *Neuron.* – 2004. – № 2. – P. 193–205
69. Dap160/Intersectin Scaffolds the Periaxonal Zone to Achieve High-Fidelity Endocytosis and Normal Synaptic Growth / B. Marie, S.T. Sweeney, K.E. Poskanzer [et al.] // *Neuron.* – 2004. – № 2. – P. 207–219
70. SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation / F. Simpson, N.K. Hussain, B. Qualmann [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 1999. – № 2. – P. 119–124
71. FCHO Proteins Are Nucleators of Clathrin-Mediated Endocytosis / W.M. Henne, E. Boucrot, M. Meinecke [et al.] // *Science* (80-.). – 2010. – № 5983. – P. 1281–1284
72. The First Five Seconds in the Life of a Clathrin-Coated Pit / E. Cocucci, F. Aguet, S. Boulant [et al.] // *Cell.* – 2012. – № 3. – P. 495–507
73. A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis / M.J. Taylor, D. Perrais, C.J. Merrifield [et al.] // *PLoS Biol.* – 2011. – № 3. – P. e1000604
74. Sorkin A. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks / Alexander Sorkin, Mark von Zastrow // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – № 9. – P. 609–622
75. Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways / A. Adams, J.M. Thorn, M. Yamabhai [et al.] // *J.*

- Biol. Chem. – 2000. – № 35. – P. 27414–27420
76. Intersectin Activates Ras but Stimulates Transcription through an Independent Pathway Involving JNK / R.P. Mohney, M. Das, T.G. Bivona [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – № 47. – P. 47038–47045
 77. The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain / X.K. Tong, N.K. Hussain, E. de Heuvel [et al.] // EMBO J. – 2000. – № 6. – P. 1263–1271
 78. Intersectin-1s Regulates the Mitochondrial Apoptotic Pathway in Endothelial Cells / S.A. Predescu, D.N. Predescu, I. Knezevic [et al.] // J. Biol. Chem. – 2007. – № 23. – P. 17166–17178
 79. Intersectin 1 Enhances Cbl Ubiquitylation of Epidermal Growth Factor Receptor through Regulation of Sprouty2-Cbl Interaction / M.N. Okur, J. Ooi, C.W. Fong [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2012. – № 4. – P. 817–825
 80. Okur M.N. Receptor Tyrosine Kinase Ubiquitylation Involves the Dynamic Regulation of Cbl-Spry2 by Intersectin 1 and the Shp2 Tyrosine Phosphatase / M.N. Okur, A. Russo, J.P. O'Bryan // Mol. Cell. Biol. – 2014. – № 2. – P. 271–279
 81. Regulation of Neuron Survival through an Intersectin-Phosphoinositide 3'-Kinase C2 -AKT Pathway / M. Das, E. Scappini, N.P. Martin [et al.] // Mol. Cell. Biol. – 2007. – № 22. – P. 7906–7917
 82. A New Dimension to Ras Function: A Novel Role for Nucleotide-Free Ras in Class II Phosphatidylinositol 3-Kinase Beta (PI3KC2 β) Regulation / K.A. Wong, A. Russo, X. Wang [et al.] // PLoS One. – 2012. – № 9. – P. e45360
 83. Gönczy P. Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way / P. Gönczy // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2008. – № 5. – P. 355–366
 84. Chabu C. Dap160/intersectin binds and activates aPKC to regulate cell polarity and cell cycle progression / Chiswili Chabu, Chris Q Doe // Development. – 2008. – № 16. – P. 2739–2746
 85. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP / N.K. Hussain, S. Jenna, M. Glogauer [et al.] // Nat. Cell Biol. – 2001. – № 10. – P.

927–932

86. Heasman S.J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies / Sarah J Heasman, Anne J Ridley // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – № 9. – P. 690–701
87. The Activity of the GTPase-activating Protein CdGAP Is Regulated by the Endocytic Protein Intersectin / S. Jenna, N.K. Hussain, E.I. Danek [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – № 8. – P. 6366–6373
88. Lamarche-Vane N. CdGAP, a Novel Proline-rich GTPase-activating Protein for Cdc42 and Rac / Nathalie Lamarche-Vane, Alan Hall // *J. Biol. Chem.* – 1998. – № 44. – P. 29172–29177
89. Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42 / M. Malacombe, M. Ceridono, V. Calco [et al.] // *EMBO J.* – 2006. – № 15. – P. 3494–3503
90. Calcium-regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells: Intersectin-1L Stimulates Actin Polymerization and Exocytosis by Activating Cdc42 / F. Momboisse, S. Ory, V. Calco [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – № 1. – P. 209–214
91. Irie F. EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP / Fumitoshi Irie, Yu Yamaguchi // *Nat. Neurosci.* – 2002. – № 11. – P. 1117–1118
92. Humphries A.C. Cdc42 and the Rho GEF intersectin-1 collaborate with Nck to promote N-WASP-dependent actin polymerisation / A.C. Humphries, S.K. Donnelly, M. Way // *J. Cell Sci.* – 2014. – № 3. – P. 673–685
93. *Caenorhabditis elegans* Intersectin: A Synaptic Protein Regulating Neurotransmission / S. Rose, M.G. Malabarba, C. Krag [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2007. – № 12. – P. 5091–5099
94. Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis / P. Tomancak, A. Beaton, R. Weiszmann [et al.] // *Genome Biol.* – 2002. – № 12. – P. RESEARCH0088
95. Neuronal distribution of ESH1/intersectin: Molecular linker between clathrin-

- mediated endocytosis and signaling pathways / Y.J. Ma, M. Okamoto, F. Gu [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2003. – № 4. – P. 468–477
96. Human chromosome 21 gene expression atlas in the mouse / A. Reymond, V. Marigo, M.B. Yaylaoglu [et al.] // *Nature.* – 2002. – № 6915. – P. 582–586
97. Microexon-based regulation of ITSN1 and Src SH3 domains specificity relies on introduction of charged amino acids into the interaction interface / M. Dergai, L. Tsyba, O. Dergai [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2010. – № 2. – P. 307–312
98. Intersectin 1 contributes to phenotypes in vivo / M.P. Hunter, M. Nelson, M. Kurzer [et al.] // *Neuroreport.* – 2011. – № 15. – P. 767–772
99. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations / A.M. Cataldo, C.M. Peterhoff, J.C. Troncoso [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2000. – P. 277–286
100. Keating D.J. Alzheimer's disease and endocytic dysfunction: Clues from the Down syndrome-related proteins, DSCR1 and ITSN1 / D.J. Keating, C. Chen, M.A. Pritchard // *Ageing Res. Rev.* – 2006. – № 4. – P. 388–401
101. ITSN-1 Controls Vesicle Recycling at the Neuromuscular Junction and Functions in Parallel with DAB-1 / W. Wang, M. Bouhours, E.O. Gracheva [et al.] // *Traffic.* – 2008. – № 5. – P. 742–754
102. Eps15 and Dap160 control synaptic vesicle membrane retrieval and synapse development / T.-W. Koh, V.I. Korolchuk, Y.P. Wairkar [et al.] // *J. Cell Biol.* – 2007. – № 2. – P. 309–322
103. Chang K.T. Upregulation of three Drosophila homologs of human chromosome 21 genes alters synaptic function: Implications for Down syndrome / Karen T Chang, K.-T. Min // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2009. – № 40. – P. 17117–17122
104. Intersectin Is a Negative Regulator of Dynamin Recruitment to the Synaptic Endocytic Zone in the Central Synapse / E. Evergren, H. Gad, K. Walther [et al.] // *J. Neurosci.* – 2007. – № 2. – P. 379–390

105. The dynamin-binding domains of Dap160/intersectin affect bulk membrane retrieval in synapses / A.M.E. Winther, W. Jiao, O. Vorontsova [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2013. – № 4. – P. 1021–1031
106. Fast neurotransmitter release regulated by the endocytic scaffold intersectin / T. Sakaba, N.L. Kononenko, J. Bacetic [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2013. – № 20. – P. 8266–8271
107. “Fractional Recovery” Analysis of a Presynaptic Synaptotagmin 1-Anchored Endocytic Protein Complex / R. Khanna, Q. Li, E.F. Stanley [et al.] // *PLoS One.* – 2006. – № 1. – P. e67
108. O’Connor-Giles K.M. Nervous Wreck Interacts with Thickveins and the Endocytic Machinery to Attenuate Retrograde BMP Signaling during Synaptic Growth / K.M. O’Connor-Giles, L.L. Ho, B. Ganetzky // *Neuron.* – 2008. – № 4. – P. 507–518
109. Rodal A.A. Nervous Wreck and Cdc42 Cooperate to Regulate Endocytic Actin Assembly during Synaptic Growth / A.A. Rodal, R.N. Motola-Barnes, J.T. Littleton // *J. Neurosci.* – 2008. – № 33. – P. 8316–8325
110. Nervous Wreck, an SH3 Adaptor Protein that Interacts with Wsp, Regulates Synaptic Growth in *Drosophila* / I.P. Coyle, Y.-H. Koh, W.-C.M. Lee [et al.] // *Neuron.* – 2004. – № 4. – P. 521–534
111. Non-Muscle Myosin II Regulates Neuronal Actin Dynamics by Interacting with Guanine Nucleotide Exchange Factors / E.-Y. Shin, C.-S. Lee, C.-Y. Yun [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – № 4. – P. e95212
112. Vertebrate Intersectin1 Is Repurposed to Facilitate Cortical Midline Connectivity and Higher Order Cognition / A.S. Sengar, J. Ellegood, A.P. Yiu [et al.] // *J. Neurosci.* – 2013. – № 9. – P. 4055–4065
113. Brückner K. Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands / Katja Brückner, Rüdiger Klein // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 1998. – № 3. – P. 375–382
114. RAB-10 Regulates Glutamate Receptor Recycling in a Cholesterol-dependent Endocytosis Pathway / D.R. Glodowski, C.C.-H. Chen, H. Schaefer [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2007. – № 11. – P. 4387–4396

115. Malinow R. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity / Roberto Malinow, Robert C. Malenka // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2002. – № 1. – P. 103–126
116. MicroRNA-194 (miR-194) regulates ROMK channel activity by targeting intersectin 1 / D.-H. Lin, P. Yue, C. Zhang [et al.] // *AJP Ren. Physiol.* – 2014. – № 1. – P. F53–F60
117. Intersectin links WNK kinases to endocytosis of ROMK1 / G. He, H.-R. Wang, S.-K. Huang [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2007. – № 4. – P. 1078–1087
118. McGlincy N.J. Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? / Nicholas J. McGlincy, Christopher W.J. Smith // *Trends Biochem. Sci.* – 2008. – № 8. – P. 385–393
119. Zamanian J.L. Intersectin 1L Guanine Nucleotide Exchange Activity Is Regulated by Adjacent src Homology 3 Domains That Are Also Involved in Endocytosis / J.L. Zamanian // *Mol. Biol. Cell.* – 2003. – № 4. – P. 1624–1637
120. Ahmad K.F. The Minimal Autoinhibited Unit of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Intersectin / K.F. Ahmad, W.A. Lim // *PLoS One.* – 2010. – № 6. – P. e11291
121. Role of epsin 1 in synaptic vesicle endocytosis / J. Jakobsson, H. Gad, F. Andersson [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – № 17. – P. 6445–6450
122. Amphiphysin is a Component of Clathrin Coats Formed During Synaptic Vesicle Recycling at the Lamprey Giant Synapse / E. Evergren, M. Marcucci, N. Tomilin [et al.] // *Traffic.* – 2004. – № 7. – P. 514–528
123. Marks B. Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals / Bruno Marks, Harvey T McMahon // *Curr. Biol.* – 1998. – № 13. – P. 740–749
124. Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain / B.A. Ballif, J. Villén, S.A. Beausoleil [et al.] // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2004. – № 11. – P. 1093–1101
125. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation / N. Dephoure, C. Zhou, J. Villen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – № 31. – P. 10762–10767
126. Comprehensive identification of phosphorylation sites in postsynaptic density

- preparations / J.C. Trinidad, C.G. Specht, A. Thalhammer [et al.] // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2006. – № 5. – P. 914–922
127. Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver / J. Villén, S.A. Beausoleil, S.A. Gerber [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – № 5. – P. 1488–1493
128. The LMP2A protein of Epstein–Barr virus regulates phosphorylation of ITSN1 and Shb adaptors by tyrosine kinases / O. Dergai, M. Dergai, I. Skrypkina [et al.] // *Cell. Signal.* – 2013. – № 1. – P. 33–40
129. Adaptor Proteins Intersectin 1 and 2 Bind Similar Proline-Rich Ligands but Are Differentially Recognized by SH2 Domain-Containing Proteins / O. Novokhatska, M. Dergai, L. Tsyba [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – № 7. – P. e70546
130. Intersectin 1 forms a complex with adaptor protein Ruk/CIN85 in vivo independently of epidermal growth factor stimulation / O. Nikolaienko, I. Skrypkina, L. Tsyba [et al.] // *Cell. Signal.* – 2009. – № 5. – P. 753–759
131. P. Chomczynski N.S. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate / N.S. P. Chomczynski // *Anal Biochem.* – 1987. – № 1. – P. 156–159
132. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor laboratory press / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis [et al.] // New York. – 1989. – 931–957 P.
133. Obenauer J.C. Scansite 20: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs / J.C. Obenauer // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – № 13. – P. 3635–3641
134. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence / N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta [et al.] // *Proteomics*. – 2004. – № 6. – P. 1633–1649
135. KinasePhos: A web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites / H.D. Huang, T.Y. Lee, S.W. Tzeng [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – № SUPPL. 2. – P. W226–W229
136. GPS 20, a Tool to Predict Kinase-specific Phosphorylation Sites in Hierarchy / Y. Xue, J. Ren, X. Gao [et al.] // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2008. – № 9. – P. 1598–1608

137. GPS 21: enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection / Y. Xue, Z. Liu, J. Cao [et al.] // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2011. – № 3. – P. 255–260
138. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels / A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm [et al.] // *Anal. Chem.* – 1996. – № 5. – P. 850–858
139. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data / D.N. Perkins, D.J.C. Pappin, D.M. Creasy [et al.] // *Electrophoresis.* – 1999. – № 18. – P. 3551–3567
140. Confident Phosphorylation Site Localization Using the Mascot Delta Score / M.M. Savitski, S. Lemeer, M. Boesche [et al.] // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2011. – № 2. – P. M110.003830–M110.003830
141. Searle B.C. Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies / B.C. Searle // *Proteomics.* – 2010. – № 6. – P. 1265–1269
142. Decoding glutamate receptor activation by the Ca²⁺ sensor protein hippocalcin in rat hippocampal neurons / A. V. Dovgan, V.P. Cherkas, A.R. Stepanyuk [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2010. – № 3. – P. 347–358
143. Banker G. Developments in neuronal cell culture / G Banker, K. Goslin // *Nature.* – 1988. – № 6195. – P. 185–186
144. Zipcode Binding Protein 1 Regulates the Development of Dendritic Arbors in Hippocampal Neurons / M. Perycz, A.S. Urbanska, P.S. Krawczyk [et al.] // *J. Neurosci.* – 2011. – № 14. – P. 5271–5285
145. Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images / E. Meijering, M. Jacob, J.-C.F. Sarria [et al.] // *Cytometry. A.* – 2004. – № 2. – P. 167–76
146. Sholl D.A. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat / D.A. Sholl // *J. Anat.* – 1953. – № 4. – P. 387–406
147. Aebersold R. Mass spectrometry-based proteomics / Ruedi Aebersold, Matthias Mann // *Nature.* – 2003. – № 6928. – P. 198–207

148. Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP / C. Bosc, J.D. Cronk, F. Pirollet [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1996. – № 5. – P. 2125–2130
149. Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts / E. Denarier, A. Fourest-Lieuvin, C. Bosc [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1998. – № 11. – P. 6055–6060
150. Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms / M.R. Galiano, C. Bosc, A. Schweitzer [et al.] // J. Neurosci. Res. – 2004. – № 3. – P. 329–337
151. Kuriyan J. The origin of protein interactions and allostery in colocalization / John Kuriyan, David Eisenberg // Nature. – 2007. – № 7172. – P. 983–990
152. Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks / D. Job, C.T. Rauch, E.H. Fischer [et al.] // Biochemistry. – 1982. – № 3. – P. 509–515
153. STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells / L. Guillaud, C. Bosc, A. Fourest-Lieuvin [et al.] // J. Cell Biol. – 1998. – № 1. – P. 167–179
154. Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins / C. Bosc, R. Frank, E. Denarier [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001. – № 33. – P. 30904–30913
155. Job D. Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin / D. Job, E.H. Fischer, R.L. Margolis // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1981. – № 8. – P. 4679–4682
156. Structural basis for the association of MAP6 protein with microtubules and its regulation by calmodulin / J. Lefèvre, P. Savarin, P. Gans [et al.] // J. Biol. Chem. – 2013. – № 34. – P. 24910–24922
157. Intrinsic microtubule stability in interphase cells / A. Lieuvin, J.C. Labbé, M. Dorée [et al.] // J. Cell Biol. – 1994. – № 6. – P. 985–996
158. The yin-yang of dendrite morphology: unity of actin and microtubules / P.C.

- Georges, N.M. Hadzimichalis, E.S. Sweet [et al.] // *Mol. Neurobiol.* – 2008. – № 3. – P. 270–284
159. Conde C. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites / Cecilia Conde, Alfredo Cáceres // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – № 5. – P. 319–332
160. The FTLN risk factor TMEM106B and MAP6 control dendritic trafficking of lysosomes / B.M. Schwenk, C.M. Lang, S. Hogg [et al.] // *EMBO J.* – 2013. – № 5. – P. n/a–n/a
161. Brummelkamp T.R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells / T.R. Brummelkamp, R. Bernards, R. Agami // *Science* (80-.). – 2002. – № 5567. – P. 550–553
162. Liprin α 1 Degradation by Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Regulates LAR Receptor Tyrosine Phosphatase Distribution and Dendrite Development / C.C. Hoogenraad, M.I. Feliu-Mojer, S.A. Spangler [et al.] // *Dev. Cell.* – 2007. – № 4. – P. 587–602
163. Kaech S. Culturing hippocampal neurons / Stefanie Kaech, Gary Banker // *Nat. Protoc.* – 2006. – № 5. – P. 2406–2415
164. Berridge M.J. Neuronal Calcium Signaling / M.J. Berridge // *Neuron.* – 1998. – № 1. – P. 13–26
165. Burgoyne R.D. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca $^{2+}$ signalling / R.D. Burgoyne // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – № 3. – P. 182–193
166. Calmodulin-Kinases: Modulators of Neuronal Development and Plasticity / G.A. Wayman, Y.-S. Lee, H. Tokumitsu [et al.] // *Neuron.* – 2008. – № 6. – P. 914–931
167. Epsin: Inducing membrane curvature / C.A.J. Horvath, D. Vanden Broeck, G.A.V. Boulet [et al.] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2007. – № 10. – P. 1765–1770
168. Tandem mass spectrometry strategies for phosphoproteome analysis / A.M. Palumbo, S.A. Smith, C.L. Kalcic [et al.] // *Mass Spectrom. Rev.* – 2011. – № 4. – P. 600–625

169. Intersectin (ITSN) family of scaffolds function as molecular hubs in protein interaction networks / K.A. Wong, J. Wilson, A. Russo [et al.] // PLoS One. – 2012. – № 4. – P. e36023
170. DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: Regulation and loss of interaction with mutation / J.A. Morris, G. Kandpal, L. Ma [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 2003. – № 13. – P. 1591–1608
171. DISC1: Structure, Function, and Therapeutic Potential for Major Mental Illness / D.C. Soares, B.C. Carlyle, N.J. Bradshaw [et al.] // ACS Chem. Neurosci. – 2011. – № 11. – P. 609–632
172. Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II / J. Baratier, L. Peris, J. Brocard [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – № 28. – P. 19561–19569
173. Non-Microtubular Localizations of Microtubule-Associated Protein 6 (MAP6) / S. Gory-Fauré, V. Windscheid, J. Brocard [et al.] // PLoS One. – 2014. – № 12. – P. e114905
174. The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders / A. Andrieux, P.A. Salin, M. Vernet [et al.] // Genes Dev. – 2002. – № 18. – P. 2350–2364
175. The in Vivo Phosphorylation Sites in Multiple Isoforms of Amphiphysin I from Rat Brain Nerve Terminals / G.E. Craft, M.E. Graham, N. Bache [et al.] // Mol. Cell. Proteomics. – 2008. – № 6. – P. 1146–1161
176. Burré J. The synaptic vesicle proteome / Jacqueline Burré, Walter Volkandt // J. Neurochem. – 2007. – № 6. – P. 1448–1462
177. Bmcc1s, a novel brain-isoform of Bmcc1, affects cell morphology by regulating MAP6/STOP functions / J. Arama, A.-C. Boulay, C. Bosc [et al.] // PLoS One. – 2012. – № 4. – P. e35488
178. Govek E.E. The role of the Rho GTPases in neuronal development / E.E. Govek, S.E. Newey, L. Van Aelst // Genes Dev. – 2005. – № 1. – P. 1–49

179. Intersectin adaptor proteins are associated with actin-regulating protein WIP in invadopodia / T. Gryaznova, S. Kropyvko, M. Burdyniuk [et al.] // *Cell. Signal.* – 2015. – № 7. – P. 1499–1508
180. Sustained Activation of N-WASP through Phosphorylation Is Essential for Neurite Extension / S. Suetsugu, M. Hattori, H. Miki [et al.] // *Dev. Cell.* – 2002. – № 5. – P. 645–658
181. WIP Is a Negative Regulator of Neuronal Maturation and Synaptic Activity / A. Franco, S. Knafo, I. Banon-Rodriguez [et al.] // *Cereb. Cortex.* – 2012. – № 5. – P. 1191–1202
182. Becker L.E. Dendritic atrophy in children with Down's syndrome / L.E. Becker, D.L. Armstrong, F. Chan // *Ann. Neurol.* – 1986. – № 4. – P. 520–526
183. Reduced expression of STOP/MAP6 in mice leads to cognitive deficits / J. Volle, J. Brocard, M. Saoud [et al.] // *Schizophr. Bull.* – 2013. – № 5. – P. 969–978
184. The stop null mice model for schizophrenia displays cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics / M. Bégou, J. Volle, J.-B. Bertrand [et al.] // *Neuroscience.* – 2008. – № 1. – P. 29–39
185. Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia / K.J. Powell, S.E. Hori, R. Leslie [et al.] // *Behav. Neurosci.* – 2007. – № 5. – P. 826–835
186. Sustained increase of alpha7 nicotinic receptors and choline-induced improvement of learning deficit in STOP knock-out mice / C. Bouvrais-Veret, S. Weiss, A. Andrieux [et al.] // *Neuropharmacology.* – 2007. – № 8. – P. 1691–1700
187. The deletion of STOP/MAP6 protein in mice triggers highly altered mood and impaired cognitive performances / V. Fournet, A. Schweitzer, C. Chevarin [et al.] // *J. Neurochem.* – 2012. – № 1. – P. 99–114
188. Both chronic treatments by epothilone D and fluoxetine increase the short-term memory and differentially alter the mood status of STOP/MAP6 KO mice / V. Fournet, G. de Lavilléon, A. Schweitzer [et al.] // *J. Neurochem.* – 2012. – № 6. – P. 982–996
189. STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in

- sensorimotor gating / R.L. Fradley, G.F. O'Meara, R.J. Newman [et al.] // *Behav. Brain Res.* – 2005. – № 2. – P. 257–264
190. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia / J.K. Millar, J.C. Wilson-Annan, S. Anderson [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2000. – № 9. – P. 1415–1423
191. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development / A. Kamiya, K. Kubo, T. Tomoda [et al.] // *Nat. Cell Biol.* – 2005. – № 12. – P. 1167–1178
192. Gozes I. Microtubules, schizophrenia and cognitive behavior: preclinical development of davunetide (NAP) as a peptide-drug candidate / I. Gozes // *Peptides.* – 2011. – № 2. – P. 428–431
193. Kelly L.E. Molecular and genetic characterization of the interactions between the *Drosophila* stoned-B protein and DAP-160 (intersectin) / Leonard E. Kelly, A. Marie Phillips // *Biochem. J.* – 2005. – № 1. – P. 195–204
194. Yamauchi T. Molecular constituents and phosphorylation-dependent regulation of the post-synaptic density / T. Yamauchi // *Mass Spectrom. Rev.* – 2002. – № 4. – P. 266–286
195. Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density / S. Strack, S. Choi, D.M. Lovinger [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – № 272. – P. 13467–13470
196. Yoshimura Y. Phosphorylation-dependent reversible association of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II with the postsynaptic densities / Yoshiyuki Yoshimura, Takashi Yamauchi // *J. Biol. Chem.* – 1997. – № 272. – P. 26354–26359
197. Qualitative and Quantitative Analyses of Protein Phosphorylation in Naive and Stimulated Mouse Synaptosomal Preparations / R.P. Munton, R. Tweedie-Cullen, M. Livingstone-Zatchej [et al.] // *Mol. Cell. Proteomics.* – 2006. – № 5. – P. 283–293
198. Trost B. Computational prediction of eukaryotic phosphorylation sites / Brett Trost,

- Anthony Kusalik // *Bioinformatics*. – 2011. – № 21. – P. 2927–2935
199. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins / S.A. Beausoleil, M. Jedrychowski, D. Schwartz [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2004. – № 33. – P. 12130–12135
 200. Substrate specificity of a multifunctional calmodulin-dependent protein kinase / R.B. Pearson, J.R. Woodgett, P. Cohen [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1985. – № 27. – P. 14471–14476
 201. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1 / J.A. Ubersax, E.L. Woodbury, P.N. Quang [et al.] // *Nature*. – 2003. – № 6960. – P. 859–864
 202. Rudner A.D. Phosphorylation by Cdc28 Activates the Cdc20-dependent Activity of the Anaphase-promoting Complex / A.D. Rudner // *J. Cell Biol.* – 2000. – № 7. – P. 1377–1390
 203. Lu K.P. Pinning down proline-directed phosphorylation signaling / K.P. Lu, Y.-C. Liou, X.Z. Zhou // *Trends Cell Biol.* – 2002. – № 4. – P. 164–172
 204. Calmodulin is essential for cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) activity and nuclear accumulation of cyclin D1-Cdk4 during G1 / M. Taulés, E. Rius, D. Talaya [et al.] // *J Biol Chem.* – 1998. – № 50. – P. 33279–33286
 205. Huber R.J. Cyclin-dependent kinase 5 is a calmodulin-binding protein that associates with puromycin-sensitive aminopeptidase in the nucleus of *Dictyostelium* / R.J. Huber, A. Catalano, D.H. O'Day // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* – 2013. – № 1. – P. 11–20
 206. Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by phosphatidylinositol-linked dopamine receptor in rat brain / X. Zhen, S. Goswami, S.A. Abdali [et al.] // *Mol Pharmacol.* – 2004. – № 6. – P. 1500–1507
 207. Kahl C.R. Regulation of Cyclin D1/Cdk4 Complexes by Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase I / Christina R. Kahl, Anthony R. Means // *J. Biol. Chem.* – 2004. – № 15. – P. 15411–15419
 208. ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins / P. Puntervoll, R. Linding, C. Gemünd [et al.] // *Nucleic Acids*

Res. – 2003. – № 13. – P. 3625–3630

209. Pan Z.Q. Characterization of the in vitro reconstituted cyclin A or B1-dependent cdk2 and cdc2 kinase activities / Z.Q. Pan, A. Amin, J. Hurwitz // *J. Biol. Chem.* – 1993. – № 27. – P. 20443–20451
210. Patra D. Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis / Debabrata Patra, William G. Dunphy // *Genes Dev.* – 1998. – № 16. – P. 2549–2559
211. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca²⁺, and Calmodulin / N. Agell, O. Bachs, N. Rocamora [et al.] // *Cell. Signal.* – 2002. – № 8. – P. 649–654
212. Calcium Activation of ERK Mediated by Calmodulin Kinase I / J.M. Schmitt, G.A. Wayman, N. Nozaki [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – № 23. – P. 24064–24072
213. Calmodulin-dependent kinase kinase/calmodulin kinase I activity gates extracellular-regulated kinase-dependent long-term potentiation / J.M. Schmitt, E.S. Guire, T. Saneyoshi [et al.] // *J. Neurosci.* – 2005. – № 5. – P. 1281–1290
214. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Binds to Raf-1 and Modulates Integrin-stimulated ERK Activation / M. Illario, A.L. Cavallo, K.U. Bayer [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – № 46. – P. 45101–45108
215. Phosphorylation destabilizes α -helices / L. Szilák, J. Moitra, D. Krylov [et al.] // *Nat. Struct. Biol.* – 1997. – № 2. – P. 112–114
216. Szilák L. Design of a leucine zipper coiled coil stabilized 14 kcal mol⁻¹ by phosphorylation of a serine in the e position / L. Szilák, J. Moitra, C. Vinson // *Protein Sci.* – 1997. – № 6. – P. 1273–1283
217. Phosphorylation of CRN2 by CK2 regulates F-actin and Arp2/3 interaction and inhibits cell migration / C.-P. Xavier, R.H. Rastetter, M. Blömacher [et al.] // *Sci. Rep.* – 2012
218. Intrinsic disorder and protein function / A.K. Dunker, C.J. Brown, J.D. Lawson [et al.] // *Biochemistry.* – 2002. – № 21. – P. 6573–6582
219. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation / L.M. Iakoucheva, P. Radivojac, C.J. Brown [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – № 3. – P. 1037–

1049

220. Phosphoproteomic Analysis of the Mouse Brain Cytosol Reveals a Predominance of Protein Phosphorylation in Regions of Intrinsic Sequence Disorder / M.O. Collins, L. Yu, I. Campuzano [et al.] // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2008. – № 7. – P. 1331–1348
221. Redmond L. Calcium regulation of dendritic growth via CaM kinase IV and CREB-mediated transcription / L. Redmond, A.H. Kashani, A. Ghosh // *Neuron*. – 2002. – № 6. – P. 999–1010
222. A CaMKII-NeuroD Signaling Pathway Specifies Dendritic Morphogenesis / B. Gaudillière, Y. Konishi, N. De La Iglesia [et al.] // *Neuron*. – 2004. – № 2. – P. 229–241
223. Activity-Dependent Dendritic Arborization Mediated by CaM-Kinase I Activation and Enhanced CREB-Dependent Transcription of Wnt-2 / G. a. Wayman, S. Impey, D. Marks [et al.] // *Neuron*. – 2006. – № 6. – P. 897–909
224. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth / J.-C. Deloulme, S. Gory-Fauré, F. Mauconduit [et al.] // *Nat. Commun.* – 2015. – P. 7246