

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГРЯЗНОВА ТЕТЯНА АНАТОЛІЇВНА

УДК 577.29

ДИСЕРТАЦІЯ

КОМПЛЕКСИ БІЛКІВ РОДИНИ ІНТЕРСЕКТИНІВ З ВЕРПРОЛІНАМИ WIP І
CR16 – КОМПОНЕНТИ АПАРАТУ ТРАНСПОРТУ ВЕЗИКУЛ ТА
АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА

03.00.03 – молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Т.А. Грязнова

Науковий керівник: Риндич Алла Володимирівна, член-кореспондент НАН
України, д. б. н., професор

КИЇВ – 2019

АНОТАЦІЯ

Грязнова Т.А. Комплекси білків родини інтерсектинів з верпролінами WIP і CR16 – компоненти апарату транспорту везикул та актинового цитоскелета. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.

Важливу роль у нормальному розвитку та життєдіяльності клітини відіграють адаптерні білки, які регулюють утворення та функціонування макромолекулярних комплексів. До адаптерних білків належать інтерсектини, які асоційовані з розвитком нейродегенеративних захворювань та злоякісною трансформацією клітин. У хребетних родини інтерсектинів складається з двох білків (ITSN1 та ITSN2), які мають однакову доменну організацію. За допомогою альтернативного сплайсингу утворюються дві основні ізоформи інтерсектинів, коротка (ITSN-S) та довга (ITSN-L). Довгі ізоформи інтерсектинів, додатково до адаптерних функцій, взаємодіють з малою ГТФазою Cdc42, що призводить до дисоціації ГДФ і його заміни на ГТФ. У результаті цього утворюється активна форма Cdc42-ГТФ, яка регулює організацію актинових філаментів. Також відомо, що інтерсектини взаємодіють з ефектором Cdc42 – білком N-WASP, який активує Arp2/3 комплекс та викликає полімеризацію актину. Проте, роль інтерсектинів у перебудовах актинового цитоскелету є недостатньо вивченою.

За допомогою біоінформатичних методів було передбачено взаємодію інтерсектинів із регуляторами полімеризації актину – верпролінами WIP та CR16. У ссавців верпроліни включають три представника: WIP, CR16 та WIRE. Найбільш вивченим серед верпролінів є WIP, що асоційований із розвитком імунодефіциту при синдромі Віскотта-Олдрича та метастатичними злоякісними захворюваннями. Через взаємодію з актином і факторами нуклеації (кортактином та N-WASP) WIP регулює Arp2/3-залежну полімеризацію актину, яка важлива для ендоцитозу, міграції, інвазії клітин та інших процесів.

В роботі ідентифіковано та детально охарактеризовано взаємодію SH3-вмісних білків інтерсектинів з пролін-збагаченим білком WIP. Вперше виявлено, що білкові комплекси WIP/ITSN1 преципітуються з лізатів мозку миші та інвазивних клітин лінії MDA-MB-231, а також показано існування комплексу WIP/ITSN2 в клітинах лінії 293. Використовуючи афінно очищені рекомбінантні білки WIP та ITSN1, доведено пряму, не опосередковану іншими білками-партнерами, взаємодію між ними. Для картування ділянок у структурі WIP, які складають інтерфейс взаємодії з ITSN1, за допомогою делеційних конструкцій WIP, встановлено, що для взаємодії важливі амінокислотні залишки 318-450 пролін-збагаченого домена WIP. За допомогою преципітації з окремими GST-злитими доменами інтерсектинів встановлено, що WIP взаємодіє з SH3A-, C- та E-доменами ITSN1 та ITSN2.

Основною функцією інтерсектинів є збирання мультибілкових комплексів на різних етапах клатрин-опосередкованого ендоцитозу. Вперше продемонстровано, що ITSN1 та WIP колокалізуються як між собою, так і з клатрином, що свідчить про можливість їх участі у клатрин-опосередкованому ендоцитозі. За допомогою аналізу інтерналізації рецептора трансферину показано, що в клітинах 293 з надекспресованими ITSN1-L або WIP відбувається порушення внутрішньоклітинного транспорту трансферину, тоді як коекспресія ITSN1-L і WIP нормалізує інтерналізацію трансферину, що свідчить про участь комплексу в регуляції везикулярного транспорту. Внутрішньоклітинний перерозподіл трансферину відбувається кількома шляхами, одним із яких є RAB4-залежні ранні ендосоми. Вперше продемонстровано, що ITSN1, на відміну від WIP, колокалізується з ГТФазою RAB4 та надекспресія довгої ізоформи ITSN1-L сприяє колокалізації WIP з RAB4-позитивними везикулами в клітинах лінії MCF-7. Отже, виявлено, що комплекс ITSN1/WIP бере участь у везикулярному транспорті рецептора трансферину та є компонентом RAB4-залежних сигнальних шляхів.

Серед функцій, що є спільними для ITSN1 і WIP, широко відома їх участь у Arp2/3-залежних перебудовах актинового цитоскелету. Зокрема, обидва білки

взаємодіють з фактором нуклеації актину – N-WASP, який здатен активувати Arp2/3 комплекс, що ініціює полімеризацію актину. Вперше показано, що N-WASP та ITSN1 взаємодіють з різними пролін-збагаченими мотивами білка WIP, та виявлено існування потрібного комплексу між ITSN1, WIP і N-WASP. Показано *in vitro*, що у складі потрібного комплексу WIP сприяє взаємодії N-WASP з ITSN1, тоді як зв'язування WIP з ITSN1 зменшується за умови наявності N-WASP.

Відомо, що WIP взаємодіє як з G-актином так і з F-актином. ITSN1 також залучений до перебудов актинового цитоскелету, але його взаємодії з актином не виявлено. Вперше показано, що SH3-домени ITSN1 взаємодіють з WIP, який знаходиться у комплексі з ендогенним β -актином. Також продемонстровано, що комплекс ITSN1/WIP колокалізується з кортактином, який є маркером ділянок, де відбуваються активні перебудови кортикального актинового цитоскелету. За даними літератури, WIP разом із N-WASP та кортактином бере участь у формуванні актин-збагачених виростів клітинної мембрани, зокрема інвадоподій та філоподій. Філоподії – це пальцеподібні вирости на провідному краю клітини, які залучені до міжклітинного сигналіngu та визначення напрямку руху клітин. Інвадоподії – це актин-збагачені мембранні структури, які викликають деградацію міжклітинного матриксу і забезпечують інвазію клітин в оточуючі тканини, що призводить до метастазування. Виявлено, що комплекс ITSN1/WIP також залучено до цих процесів.

Вперше показано, що клітини лінії MCF-7 з коекспресією ITSN1-L і WIP формували значно більше філоподієподібних виступів порівняно з клітинами, що експресували тільки WIP або ITSN1-L. Отже, взаємодія інтерсектину та WIP індукує утворення філоподій. Найбільш вивченим механізмом утворення WIP-індукованих філоподій є N-WASP-опосередкована полімеризація актину. За допомогою делеційної конструкції WIP, що не взаємодіє з N-WASP, вперше показано, що WIP у комплексі з інтерсектином індукує утворення філоподієподібних виростів, як у присутності N-WASP, так і без нього. У випадку

відсутності N-WASP філоподії можуть утворюватися альтернативним кортактин-залежним шляхом.

За допомогою аналізу протеолітичної деградації позаклітинного матриксу вперше виявлено, що ендогенні ITSN1 і ITSN2, а також комплекс ITSN1/WIP локалізуються в інвадоподіях клітин лінії раку молочної залози MDA-MB-231. Отже, інтерсектини та комплекс ITSN1/WIP є компонентами інвадоподій і можуть бути залученими до процесів формування або функціонування цих інвазивних структур.

На основі проведених досліджень, з урахуванням даних літератури, запропоновано гіпотетичну модель Arp2/3-залежної полімеризації актину за участі комплексу ITSN/WIP. Відомо, що довгі ізоформи інтерсектинів зв'язують Cdc42, що призводить до утворення активної форми Cdc42-ГТФ, яка здатна активувати N-WASP, який в свою чергу активує Arp2/3 комплекс та стимулює полімеризацію актину. Проте, в клітині N-WASP знаходиться в комплексі з WIP в автоінгібованому стані, в якому він не здатний до активації. Згідно цієї моделі інтерсектин взаємодіє з комплексом WIP/N-WASP, в результаті чого знімається WIP-опосередковане блокування N-WASP, яке призводить до зміни конформації N-WASP і дозволяє Cdc42 активувати N-WASP, що призводить до полімеризації актину. Також, Arp2/3-залежна полімеризація актину може відбуватися через ITSN/WIP/кортактин. Таким чином, припускаємо, що інтерсектини слугують платформою для збірки та локалізації компонентів, необхідних для полімеризації актину, де відбувається їх часова і просторова регуляція.

Вперше ідентифіковано взаємодію ITSN1 та ITSN2 з другим представником родини верпролінів – CR16, який бере участь у передачі сигналу в нейронах та відіграє важливу роль у сперматогенезі. Виявлено, що CR16 формує комплекси з інтерсектинами і взаємодіє з нейрон-специфічною ізоформою SH3A-домена ITSN1 та SH3E-доменом ITSN2. Показано, що ITSN1, на відміну від ITSN2, зв'язує CR16, який знаходиться в комплексі з ендогенним β -актином. Вперше виявлено експресію транскриптів *CR16* у злоякісних пухлинах молочної залози людини та гліобlastомах. Продемонстровано, що ITSN1 та CR16 мають

спільну внутрішньоклітинну локалізацію, причому надекспресія CR16 сприяє локалізації ITSN1 з полімеризованим актином у клітинах лінії MCF-7.

Таким чином, у дисертаційній роботі ідентифіковано нові білки-партнери ITSN1 і ITSN2 – регулятори полімеризації актину WIP і CR16. Виявлено, що інтерсектини формують комплекси з WIP та CR16 *in vitro*. Встановлено, що комплекс ITSN1/WIP є залученим до везикулярного транспорту та перебудов актинового цитоскелету. Доведено формування потрійного комплексу ITSN1/WIP/N-WASP. Виявлено, що ITSN1 та ITSN2 є новими молекулярними компонентами інвадоподій. Запропоновано модель Arp2/3-залежних перебудов актинового цитоскелету за участі ITSN та WIP, згідно з якою взаємодія ITSN з WIP дозволяє Cdc42 активувати N-WASP з подальшою активацією Arp2/3 комплексу.

В даній роботі виявлено нові молекулярні компоненти інвадоподій, ITSN1 та ITSN2, та їх взаємодії з одним із ключових білків інвадоподій – WIP. Отримані результати щодо взаємодій інтерсектинів з регуляторами полімеризації актину, CR16 та WIP, можуть бути використані для подальших досліджень функціонування WIP/N-WASP/Arp2/3-опосередкованих перебудов актинового цитоскелету, з порушенням регуляції яких пов'язаний розвиток злоякісних новоутворень.

Ключові слова: інтерсектин, WIP, CR16, актиновий цитоскелет, інвадоподії, везикулярний транспорт, філоподієподібні виступи.

Список публікацій здобувача:

1. Gryaznova T, Gubar O, Burdyniuk M, Kropyvko S, Rynditch A. WIP/ITSN1 complex is involved in cellular vesicle trafficking and formation filopodia-like protrusions. *Gene*. 2018; 674: 49-56. *(Особистий внесок: проведення преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків, робота з культурами клітин, підготовка препаратів до імунофлуоресцентного аналізу, аналіз інтерналізації*

рецептора трансферину, статистична обробка результатів та підготовка статті до друку).

2. Кropyvko S, Gryaznova T, Morderer D, Rynditch A. Mammalian verprolin CR16 acts as a modulator of ITSN scaffold proteins association with actin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 484(4): 813-819. *(Особистий внесок: робота з культурами клітин, дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків, дослідження білок-білкових взаємодій, статистична обробка результатів та підготовка статті до друку).*

3. Gryaznova T, Kropyvko S, Burdyniuk M, Gubar O, Kryklyva V, Tsyba L, Rynditch A. Intersectin adaptor proteins are associated with actin-regulating protein WIP in invadopodia. *Cellular Signalling.* 2015; 27: 1499-1508. *(Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, проведення імунопреципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків, робота з культурами клітин, дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків, аналіз протеолітичної деградації позаклітинного матриксу, підготовка статті до друку).*

4. Kropyvko S, Gubar O, Gryaznova T, Morderer D, Gerasymchuk D, Syvak L, Grabovoy A, Rynditch A. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the adaptor/scaffold protein gene ITSN1. *Biopolymers and Cell.* 2016. 32: 203-221. *(Особистий внесок: робота з культурами клітин, проведення імунопреципітацій).*

5. Tsyba L, Gryaznova T, Dergai O, Dergai M, Skrypkina I, Kropyvko S, Boldyryev O, Nikolaienko O, Novokhatska O, Rynditch A. Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 372: 929-934. *(Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, дослідження білок-білкових взаємодій).*

6. Tsyba L, Skrypkina I, Gryaznova T, Dergai M, Dergai O, Kropyvko S, Novokhatska O, Drobot L, Rynditch A. Regulation of functional diversity of endocytic adaptor/scaffold proteins intersectins. 7th Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology; 2009 October 3-7, Yalta, Ukraine.

7. Gryaznova T, Kropyvko S, Burdyniuk M, Gubar O, Kryklyva V, Tsyba

L, Rynditch A. Adaptor protein ITSN1 is associated with actin-related protein WIP in invadopodia. XI Український біохімічний конгрес. Український біохімічний журнал; 2014 October 06-10, Kyiv,. Ukraine.

8. Kropyvko S, Gryaznova T, Gubar O, Kryklyva V, Burdyniuk M, Dergai M, Tsyba L, Vassetzky Y, Rynditch A. Macromolecular complexes in invadopodia formation. VII International Meeting From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies; 2015 October 18-20, Tbilisi, Georgia.

9. Kropyvko S, Gryaznova T, Kryklyva V, Burdyniuk M, Gubar O, Tsyba L, Rynditch A. New macromolecular complexes in invadopodia formation. 41th FEBS Congress «Molecular and Systems Biology for a Better Life»; 2016 September 3-8, Kusadasi, Turkey.

10. Kropyvko S, Gryaznova T, Gubar O, Kryklyva V, Burdyniuk M, Tsyba L, Rynditch A. ITSN1, TKS4 and verprolin family members WIP and CR16-containing macromolecular complexes in invadopodia. GDRI, 2016 September 19-22, Lviv, Ukrain.

SUMMARY

Gryaznova T.A. Protein complexes of intersectin family with verprolins WIP and CR16 are the components of vesicle transport apparatus and actin cytoskeleton. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

Adaptor proteins, which regulate formation and functioning of macromolecular complexes, play an important role in normal development and life of the cell. Intersectins, which are associated with the development of neurodegenerative disorders and malignancy, belong to adaptor proteins. In Vertebrates, intersectin protein family consists of two proteins (ITSN1 and ITSN2) with the same domain organization. Due to alternative splicing, two main intersectin isoforms are produced, the short (ITSN-S) and the long one (ITSN-L). In addition to adaptor functions, long isoforms of intersectins interact with small GTPase Cdc42 leading to GDP dissociation and GDP-GTP exchange, which resulted in the formation of active form of Cdc42-GTP that regulates organization of actin filaments. Intersectins are also known to interact with Cdc42 effector, N-WASP protein, which activates Arp 2/3 complex and initiates actin polymerization. However, the role of intersectins in the rearrangements of actin cytoskeleton is not well studied yet.

Using bioinformatics analysis, we predicted the possibility of intersectins to interact with the regulators of actin polymerization – verprolins WIP and CR16. In Mammals, verprolins include three members: WIP, CR16, and WIRE. The best-studied verprolin is WIP-associated with the development of immune deficiency in Wiskott-Aldrich syndrome and metastatic malignant tumors. By the interactions with actin and nucleation factors (cortactin and N-WASP), WIP regulates Arp2/3-dependent actin polymerization important for endocytosis, cell migration and invasion, and other processes.

In this work, interactions between SH3-containing proteins intersectins and proline-rich protein WIP have been identified and characterized. For the first time, precipitation of protein complexes WIP/ITSN1 from mouse brain lysates has been performed, and the existence of WIP/ITSN2 complex in 293 cell line has been shown. Using affinity purified recombinant WIP and ITSN1 proteins, their direct interactions without impact by any other partner proteins have been proved. For the mapping of ITSN1-interacting regions of WIP structure, WIP deletion constructions have been used, which led to the identification of the importance of 318-450 aa of WIP proline-rich domain for the above mentioned interactions. Using precipitation with separate GST-fusion domains of intersectins, the interactions between WIP and SH3A-, C-, and E-domains of ITSN1 and ITSN2 have been found.

Formation of multiprotein complexes at different steps of clathrin-mediated endocytosis is the main function of intersectins. For the first time, co-localization between ITSN1 and WIP as well as co-localization between above mentioned proteins and clathrin has been demonstrated, indicating their possibility to participate in clathrin-mediated endocytosis. An analysis of transferrin receptor internalization revealed defects of intracellular transport transferrin in 293 cells with overexpressed ITSN1-L or WIP whereas co-expression of ITSN1-L and WIP normalized transferrin internalization which suggests participation of the complex in the regulation of vesicular transport. Intracellular redistribution of transferrin occurs by several ways including RAB4-dependent early endosomes. It has been demonstrated for the first time that ITSN1 unlike WIP co-localized with GTPase RAB4, whereas overexpression ITSN1-L promoted co-localization of WIP with RAB4-positive vesicles in MCF-7 cell line. Thus, ITSN1/WIP complex has been demonstrated to participate in the vesicular transport of transferrin receptor and appears to be the component of RAB4-dependent signaling pathways.

Among the functions common to ITSN1 and WIP, their participation in Arp2/3-dependent remodeling of actin cytoskeleton is widely known. In particular, both interact with the factor of actin nucleation – N-WASP that can activate Arp2/3 complex, which initiates actin polymerization. It has been demonstrated for the first time that N-WASP

and ITSN1 interacted with different proline-rich motifs of WIP protein and the formation of triple ITSN1/WIP/N-WASP complex has been shown. It has been proved *in vitro* that in the triple complex, WIP promoted interactions between N-WASP and ITSN1 whereas binding WIP to ITSN1 in the presence of N-WASP was reduced.

WIP is known to interact with both, G-actin and F-actin. ITSN1 is also involved into the rearrangements of actin cytoskeleton, but its interaction with actin has not been shown. For the first time, SH3 domains of ITSN1 have been shown to interact with WIP, which forms a complex with endogenous β -actin. It has been also demonstrated that ITSN1/WIP complex is co-localized with cortactin – a marker of regions with active rearrangements of the cortical actin cytoskeleton. According to the literature, WIP with N-WASP and cortactin participates in the formation of actin-rich outgrowths of a cell membrane, in particular, invadopodia and filopodia. Filopodia are finger-like outgrowths on the leading edge of a cell involved into intercellular signaling and determination of the direction of cell movement. Invadopodia are actin-rich membrane structures causing degradation of the intercellular matrix and providing invasion of cells to neighboring tissues that leads to metastases. ITSN1/WIP complex has been found to be involved into these processes.

For the first time, MCF-7 cell line with the co-expression of ITSN1-L and WIP has been shown to form much more filopodia-like outgrowths comparing to cells expression only WIP or ITSN1-L. Thus, interactions between intersectin and WIP induced filopodia formation. The best studied mechanism of WIP-induced filopodia formation is N-WASP-associated actin polymerization. Using WIP deletion construction that did not interact with N-WASP, it has been showed for the first time that WIP in the complex with intersectin induced formation of filopodia-like outgrowths both, in the presence or absence of N-WASP. In the absence of N-WASP, filopodia can be formed in alternative, cortactin-dependent mechanism.

Analyzing proteolytic degradation of extracellular matrix, it has been showed for the first time that endogenous ITSN1 and ITSN2 as well as ITSN1/WIP complex localized in invadopodia of MDA-MB-231 breast cancer cell line. Consequently,

intersectins and ITSN1/WIP complex are the components of invadopodia and can be involved into the processes of these invasive structures formation or functioning.

Based on obtained results and data from the literature a hypothetical model of Arp2/3-dependent, ITSN1/WIP complex-associated actin polymerization has been suggested. Long isoforms of intersectins are known to bind Cdc42 leading to the formation of an active form of Cdc42-GTP able to activate N-WASP, which in turn activates Arp2/3 complex and stimulates actin polymerization. However, in the cell, N-WASP is in autoinhibited state while forming complex with WIP and thus is not able to be activated. WIP/N-WASP complex interacts with intersectin resulting in the decline of WIP-associated block of N-WASP and its activation by Cdc42 leading to actin polymerization. Additionally, Arp2/3-dependent actin polymerization can occur via ITSN1/WIP/cortactin. Thus, we suggest that intersectins served as a platform for assembling and localization of components needed for actin polymerization where their temporal and spatial regulation occurs.

For the first time, interactions between ITSN1 and ITSN2 with CR16, the second member of verprolin family which participates in neuronal signaling and plays an important role in spermatogenesis have been found. CR16 has been identified to form complexes with intersectins and to interact with neuronal isoform of SH3A of ITSN1 domain and SH3E domain of ITSN2. It has been showed that ITSN1 unlike ITSN2 binds CR16 in the complex with endogenous β -actin. For the first time, expression of *CR16* transcripts in malignant human breast cancer and glioblastomas has been found. It has been demonstrated that ITSN1 and CR16 had common intracellular localization and CR16 overexpression promoted localization of ITSN1 to the sites of actin polymerization in MCF-7 cell line.

Thus, in the dissertation new partner proteins of ITSN1 and ITSN2 – regulators of actin polymerization WIP and CR16 have been identified. Intersectins have been found to form complexes with WIP and CR16 *in vitro*. ITSN1/WIP complex has been established to be involved into vesicle transport and reorganization of actin cytoskeleton. The formation of triple complex ITSN1/WIP/N-WASP has been proved. It was also found that ITSN1 and ITSN2

were new molecular components of invadopodia. The model of Arp2/3-dependent rearrangements of actin cytoskeleton with the participation of ITSN1 and WIP has been suggested, according to which ITSN1-WIP interactions allowed Cdc42 to activate N-WASP with the subsequent activation of Arp2/3 complex.

In this work, new molecular components of invadopodia, ITSN1 and ITSN2, and their interactions with one of key invadopodia proteins, WIP, have been found. Obtained results of interactions between intersectins and regulators of actin polymerization, CR16 and WIP, can be used for further study of the functioning of N-WASP/Arp2/3-mediated rearrangements of actin cytoskeleton, which defects regulation are linked to the development of malignant tumors.

Key words: intersectin, WIP, CR16, actin cytoskeleton, vesicular trafficking, invadopodia, filopodia-like protrusions.

List of publications published on the topic of the dissertation:

1. Gryaznova T, Gubar O, Burdyniuk M, Kropyvko S, Rynditch A. WIP/ITSN1 complex is involved in cellular vesicle trafficking and formation filopodia-like protrusions. *Gene*. 2018; 674: 49-56.
2. Kropyvko S, Gryaznova T, Morderer D, Rynditch A. Mammalian verprolin CR16 acts as a modulator of ITSN scaffold proteins association with actin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; 484(4): 813-819.
3. Gryaznova T, Kropyvko S, Burdyniuk M, Gubar O, Kryklyva V, Tsyba L, Rynditch A. Intersectin adaptor proteins are associated with actin-regulating protein WIP in invadopodia. *Cellular Signalling*. 2015; 27: 1499-1508.
4. Kropyvko S, Gubar O, Gryaznova T, Morderer D, Gerasymchuk D, Syvak L, Grabovoy A, Rynditch A. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the adaptor/scaffold protein gene ITSN1. *Biopolymers and Cell*. 2016. 32: 203-221.
5. Tsyba L, Gryaznova T, Dergai O, Dergai M, Skrypkina I, Kropyvko S, Boldyryev O, Nikolaienko O, Novokhatska O, Rynditch A. Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in

neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 372: 929-934.

6. Tsyba L, Skrypkina I, Gryaznova T, Dergai M, Dergai O, Kropyvko S, Novokhatska O, Drobot L, Rynditch A. Regulation of functional diversity of endocytic adaptor/scaffold proteins intersectins. 7th Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology; 2009 October 3-7, Yalta, Ukraine.

7. Gryaznova T, Kropyvko S, Burdyniuk M, Gubar O, Kryklyva V, Tsyba L, Rynditch A. Adaptor protein ITSN1 is associated with actin-related protein WIP in invadopodia. Abstract book XI Ukrainian Biochemical Congress; 2014 October 06-10, Kyiv, Ukraine.

8. Kropyvko S, Gryaznova T, Gubar O, Kryklyva V, Burdyniuk M, Dergai M, Tsyba L, Vassetzky Y, Rynditch A. Macromolecular complexes in invadopodia formation. VII International Meeting From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies; 2015 October 18-20, Tbilisi, Georgia.

9. Kropyvko S, Gryaznova T, Kryklyva V, Burdyniuk M, Gubar O, Tsyba L, Rynditch A. New macromolecular complexes in invadopodia formation. 41th FEBS Congress «Molecular and Systems Biology for a Better Life»; 2016 September 3-8, Kusadasi, Turkey.

10. Kropyvko S, Gryaznova T, Gubar O, Kryklyva V, Burdyniuk M, Tsyba L, Rynditch A. ITSN1, TKS4 and verprolin family members WIP and CR16-containing macromolecular complexes in invadopodia. GDRI, 2016 September 19-22, Lviv, Ukrain.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Білки родини інтерсектинів	26
1.1.1. Загальна характеристика і структура білків ITSN1 та ITSN2	26
1.1.2. Функції інтерсектинів у клітинних процесах	30
1.1.3. Патології, що асоційовані з інтерсектинами	34
1.2. Реорганізація актинового цитоскелету – один із головних механізмів клітинної міграції та інвазії	35
1.2.1. Перебудови актинового цитоскелету за допомогою білків родини WASP та Arp2/3 комплексу	35
1.2.2. Верпроліни – регулятори актинового цитоскелету	39
1.2.2.1. Характеристика WIP (WASP Interacting Protein)	40
1.2.2.2. CR16 (Corticosteroid Responsive)	43
1.2.2.3. Функції WIRE у клітині	45
1.2.3. Інвадоподії та подосоми – ключові структури клітинної інвазії	46
1.2.4. Роль WIP і WIRE в інвазії та деградації позаклітинного матриксу	49
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	53
2.1. Матеріали	53
2.2. Біологічний матеріал	54
2.3. Синтез кДНК	54
2.4. Плазмідні конструкції	55
2.5. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	56
2.6. Реакція рестрикції та лігування	56
2.7. Електрофорез нуклеїнових кислот	57
2.8. Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю	57
2.9. Приготування компетентних клітин	57

2.10. Трансформація клітин плазмідною ДНК	58
2.11. Виділення плазмідної ДНК	58
2.12. Експресія рекомбінантних білків в <i>E. coli</i>	59
2.13. Приготування бактеріальних лізатів	59
2.14. Очистка рекомбінантних білків методом афінної хроматографії	59
2.15. Культивування клітин ссавців	60
2.16. Трансфекція клітин еукаріотичних ліній	60
2.17. Приготування лізатів головного мозку мишей лінії BALB/c	61
2.18. Преципітація білкових комплексів з використанням GST-злитих білків	61
2.19. Коімунопреципітація білкових комплексів	61
2.20. Електрофорез білків в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах	62
2.21. Вестерн-блот аналіз	62
2.22. Імунофлуоресцентний аналіз	63
2.23. Метод протеолітичної деградації позаклітинного матриксу	64
2.24. Аналіз інтерналізації трансферину	64
2.25. Візуалізація та підрахунок філоподієподібних виростів	64
2.26. Аналіз колокалізації білків	65
2.27. Статистична обробка даних	65
РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	66
3.1. Ідентифікація та характеристика взаємодій ITSN1 і ITSN2 людини з актин-регулюючим білком WIP	66
3.1.1. WIP та ITSN1 формують комплекс у клітинах	66
3.1.1.1. Взаємодія WIP з адаптерним білком ITSN1	66
3.1.1.2. Взаємодія білків ITSN1 та WIP <i>in vitro</i>	67
3.1.1.3. Внутрішньоклітинна локалізація комплексу ITSN1/WIP	69

3.1.1.4. Картування сайту взаємодії WIP на ITSN1	70
3.1.1.5. Картування фрагменту білка WIP, що забезпечує взаємодію з ITSN1	72
3.1.2. Комплекс WIP/ITSN1/N-WASP	74
3.1.2.1. Формування комплексу між WIP, ITSN1 і N-WASP	74
3.1.2.2. WIP сприяє взаємодії N-WASP з SH3-доменами ITSN1	76
3.1.3. Функції комплексу ITSN1/WIP у клітині	78
3.1.3.1. Вплив комплексу ITSN1-L/WIP на внутрішньоклітинний розподіл трансферину	79
3.1.3.2. ITSN1-L рекрутує WIP до RAB4-позитивних везикул	81
3.1.3.3. Комплекс ITSN1/WIP/ β -актин	83
3.1.3.4. Комплекс ITSN1-L/WIP стимулює утворення філоподієподібних виростів	85
3.1.4. Взаємодія адаптерного білка ITSN2 з WIP	89
3.1.5. Локалізація ендогенних білків ITSN1 та ITSN2 в інвадоподіях	91
3.2. Аналіз взаємодій ITSN1 та ITSN2 з білком CR16	97
3.2.1. Комплекси ITSN1/CR16 і ITSN2/CR16 у клітині	97
3.2.2. Експресія <i>CR16</i> у злоякісних пухлинах людини та колокалізація CR16 із білками везикулярного транспорту	101
3.2.3. Колокалізація комплексу CR16/ITSN1 з клатрин-позитивними везикулами	103
3.2.4. Надекспресія CR16 збільшує колокалізацію ITSN1 з полімеризованим актином	104
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	107
ВИСНОВКИ	118
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	120

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CCR	α -спіральний регіон
Cdc42	білок контролю клітинного поділу 42
CR16	білок, що реагує на кортикостероїди
DH-домен	Dbl-гомологічний домен
DMEM	модифіковане Дульбекко середовище Ігла
ECL	посилена хемілюмінесценсія
EH-домен	гомологічний домен Eps15
FBS	ембріональна сироватка теляти
FITC	флуоресцеїн ізотіоціанат
GFP	зелений флуоресцентний білок
GST	глутатіон-S-трансфераза
HA	гемаглютиніни
LB	поживне середовище Лурія Бертрані
MMP	матриксні металопротеїнази
NPFs	фактори, що сприяють нуклеації
N-WASP	нейрональний білок синдрому Віскотта-Олдрича
PBS	забуферений фосфатний розчин
PH-домен	домен гомологічний плекстрину
PMSF	фенілметилсульфонілфторид
SH3-домен	гомологічний до Src домен 3
WASP	білок синдрому Віскотта-Олдрича
WIP	білок, що взаємодіє з WASP
WIRE	білок, що споріднений з WIP
BCA	бичачий сироватковий альбумін
ГТФаза	гуанозинтрифосфат-гідролаза
ДСН	додецилсульфат натрію
ІБ	імуноблотинг
ІП	імунопреципітація

ІПТГ	ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид
КЛ	клітинний лізат
ПААГ	поліакриламідний гель
ПЕІ	поліетиленімін
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція

ВСТУП

Актуальність теми. Перебудови актинового цитоскелету відіграють важливу роль у процесах ендоцитозу, екзоцитозу, адгезії, внутрішньоклітинному везикулярному транспорті, міграції та інвазії клітин. Порушення регуляції актинового цитоскелету спостерігається при аутоімунних захворюваннях, нейродегенеративних патологіях та злоякісній трансформації клітин [1-3]. Реорганізацію актинових філаментів контролюють фактори нуклеації актину, такі як N-WASP та кортактин, що асоційовані в клітині з білком WIP, який регулює їх активність та стабілізує актинові філаменти [4-6].

WIP відноситься до родини верпролінів, що складається з трьох представників – CR16, WIP і WIRE, які є важливими регуляторами Arp2/3-залежної полімеризації актину [7]. Відомо, що WIP є одним із важливих компонентів інвадоподій та подосом – спеціалізованих мембранних структур клітинної інвазії [8]. Ключову роль у формуванні подосом та інвадоподій відіграє реорганізація актинового цитоскелету, яка регулюється інтегрованими сигнальними каскадами, що передають позаклітинні стимули на актинові філаменти [9]. Важливими компонентами сигнальних каскадів клітини є адаптерні білки, які регулюють утворення та функціонування макромолекулярних комплексів. До адаптерних білків належать інтерсектини (ITSN1 і ITSN2), що асоційовані з розвитком нейродегенеративних захворювань та злоякісною трансформацією клітин. Відомо, що за допомогою альтернативного сплайсингу утворюються дві основні ізоформи інтерсектинів, коротка (ITSN-S) та довга (ITSN-L) [10, 11]. Довгі ізоформи інтерсектинів, додатково до адаптерних функцій, забезпечують обмін ГДФ на ГТФ на малій ГТФазі Cdc42, що призводить до утворення активної форми Cdc42-ГТФ, яка регулює організацію актинових філаментів [12, 13]. Серед ITSN-зв'язуючих білків, що задіяні в регуляції актинового цитоскелету, відомі білок-активатор ГТФаз CdGAP та N-WASP, що є ефектором Cdc42 та активатором Arp2/3 комплексу [14, 15].

Таким чином, представники обох родин, інтерсектинів і верпролінів, беруть участь у спільних клітинних процесах – N-WASP-опосередкованих перебудовах актинового цитоскелету, які є важливими для клітинної міграції та інвазії. Однак, на сьогоднішній день відсутні дані щодо взаємодій між представниками вищезазначених родин. Біоінформатичними методами була передбачена можливість взаємодії між інтерсектинами та регуляторами полімеризації актину – WIP і CR16. Підтвердження передбачених взаємодій *in vitro* та *in vivo* є актуальним, тому що це дасть змогу виявити нові функціональні зв'язки в перебудовах актинового цитоскелету.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках наукових проєктів відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Молекулярні взаємодії інтерсектинів як компонентів ендоцитозу, перебудов актинового цитоскелету та підтримки вірусної латентності» (0111U008918, 2012-2016 рр.); «Роль білок-білкових взаємодій у перебігу ряду фізіологічних та патологічних процесів» (0112U002109, 2012-2016 рр.); «Функціональне значення ITSN-вмісних комплексів в регуляції молекулярних шляхів клітини» (0116U007522, 2017-2021 рр.).

Мета і завдання досліджень. Метою дисертаційної роботи було дослідити нові взаємодії адаптерних білків інтерсектинів із регуляторами полімеризації актину, WIP і CR16, та з'ясувати функціональне значення виявлених взаємодій у клітині.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Перевірити можливість взаємодії *in vitro* між інтерсектинами та новими потенційними партнерами, WIP та CR16, передбаченими біоінформатичними методами.
2. Виявити, які домени ITSN1 та ITSN2 забезпечують взаємодію з ідентифікованими білками-партнерами.

3. Дослідити внутрішньоклітинну локалізацію ITSN-вмісних білкових комплексів, що беруть участь у полімеризації актину.
4. Дослідити вплив ITSN-вмісних білкових комплексів на везикулярний транспорт.
5. Проаналізувати можливості ITSN-вмісних білкових комплексів у формуванні актин-збагачених субклітинних структур (філоподій та інвадоподій).
6. Перевірити можливість участі ITSN1 та ITSN2 в клітинній інвазії.

Об'єкт дослідження – молекулярні механізми функціонування адаптерних білків ITSNs.

Предмет дослідження – ідентифікація нових ITSN-зв'язуючих білків та їх роль у перебудовах актинового цитоскелету та везикулярному транспорті.

Методи дослідження – клонування фрагментів кДНК, короткотривала трансфекція клітин еукаріотів, Вестерн-блот аналіз, афінна хроматографія, преципітація *in vitro* білкових комплексів за допомогою GST-злитих білків, коімунопреципітація, імунофлуоресцентний аналіз, конфокальна мікроскопія, аналіз інтерналізації трансферину, протеолітична деградація позаклітинного матриксу та ін.

Наукова новизна отриманих результатів. В ході роботи вперше було ідентифіковано нові білки-партнери ITSN1 і ITSN2 – регулятори полімеризації актину WIP і CR16. Показано існування комплексів ITSN/WIP та ITSN/CR16 *in vitro*. Визначено, що утворення комплексів між інтерсектинами та WIP забезпечують SH3A-, SH3C- та SH3E- домени ITSN1 і ITSN2. Доведено пряму взаємодію між WIP та ITSN1, для якої важливі амінокислотні залишки 318-450 пролін-збагаченого домену WIP. Вперше виявлено, що комплекс ITSN1/WIP бере участь у везикулярному транспорті рецептора трансферину та є компонентом RAB4-позитивних везикул. Продемонстровано, що комплекс ITSN1/WIP локалізується в ділянках активних перебудов кортикального актинового цитоскелету та індукує утворення філоподієподібних виступів. Показано існування потрійного комплексу між ITSN1, WIP та N-WASP, у складі якого WIP

сприяє взаємодії N-WASP з ITSN1, тоді як наявність N-WASP зменшує зв'язування WIP з ITSN1.

Запропоновано гіпотетичну модель, згідно з якою взаємодія ITSN з WIP дозволяє Cdc42 активувати N-WASP з подальшою активацією Arp2/3 комплексу.

Вперше продемонстровано, що в клітинах лінії раку молочної залози MDA-MB-231, ендogenous білки ITSN1 і ITSN2 локалізуються в інвадоподіях.

Встановлено, що CR16 формує комплекси з нейрон-специфічною ізоформою SH3A-домена ITSN1 та SH3E-доменом ITSN2. Показано, що ITSN1, на відміну від ITSN2, зв'язує CR16, який знаходиться в комплексі з ендogenous β-актином, що сприяє його колокалізації з полімеризованим актином в клітинах лінії MCF-7. Вперше було виявлено наявність транскриптів *CR16* у гліобластомах та злоякісних пухлинах молочної залози людини.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати сприяють виявленню нових молекулярних компонентів інвадоподій – ITSN1 і ITSN2 та їх взаємодій з одним із ключових білків інвадоподій – WIP. Подальше вивчення компонентів інвадоподій та функціональних зв'язків між ними дозволить краще зрозуміти формування та функціонування цих інвазивних структур. Виявлення взаємодій інтерсектинів з WIP дає можливість розширити розуміння функціонування N-WASP/Arp2/3-опосередкованих перебудов актинового цитоскелету, з порушенням регуляції яких пов'язаний розвиток злоякісних новоутворень.

Збільшення кількості WIP корелює з високою клітинною інвазією та метастазуванням ракових клітин. Надекспресія *ITSN1* призводить до злоякісної трансформації фібробластів, навпаки надекспресія *ITSN2* асоційована зі сприятливим прогнозом щодо виживаності пацієнтів із раком молочної залози. Тому розуміння специфічних функцій WIP та інтерсектинів може дозволити використовувати ці білки в якості потенційних діагностичних біомаркерів інвазивності клітин.

Відкриття специфічної взаємодії нейрон-специфічної ізоформи ITSN1 з CR16 дозволить детальніше вивчити механізми функціонування ITSN1, що

асоційовані з нейродегенеративними патологіями, молекулярні механізми яких ще недостатньо з'ясовані.

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

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи автором самостійно проаналізовано наукову літературу за темою досліджень. Всі експериментальні дослідження виконувались особисто або за безпосередньої участі здобувача. Більшість представлених експериментів, а також обробку і аналіз отриманих результатів виконано особисто пошукачем. Клонування кодуєчої послідовності WIP для бактеріальної та еукаріотичної експресії; експресія плазмідних конструкцій, очистка рекомбінантних білків, дослідження білок-білкових взаємодій за допомогою GST-злитих білків та коїмунопреципітацій було проведено здобувачем. Здобувач також проводив роботу з культурами клітинних ліній еукаріот; дослідження локалізації ITSN1, ITSN2 та комплексу ITSN1/WIP в інвадоподіях методом протеолітичної деградації позаклітинного матриксу; дослідження впливу комплексу ITSN1/WIP на індукцію філоподієподібних структур та інтерналізацію трансферину.

Делеційні конструкції WIP були отримані разом з к.б.н. С.В. Кропивком. Плазмідні конструкції, що містять кодуєчі послідовності GST-злитих SH3-доменів ITSN1 та ITSN2, Omni-ITSN2, Muc-CR16, Cherry-ITSN1, Omni-ITSN1(+VKGEW) та Omni-ITSN1-L отримано к.б.н. С.В. Кропивком, к.б.н. О.В. Новохацькою та к.б.н. І.Я. Скрипкіною. Біоінформатичний аналіз та конфокальні дослідження щодо впливу комплексу ITSN1/WIP на індукцію філоподієподібних структур було проведено спільно з к.б.н. О.С. Губар. Дослідження прямої взаємодії між рекомбінантними афінно очищеними білками WIP і ITSN1 та картування фрагменту білка WIP, що забезпечує взаємодію з ITSN1 проводились за участю М.В. Бурдинюк. Конфокальну мікроскопію проводили спільно з к.б.н. С.О. Карахімом.

Автор висловлює подяку к.б.н. С.В. Кропивку, к.б.н. О.С. Губар, к.б.н. Л.О. Цибі та к.б.н. Д.Є. Мордереру за корисні поради під час планування експериментів та обговорення отриманих результатів.

Слова щирої вдячності автор висловлює науковому керівнику член-кореспонденту НАН України, д.б.н., професору А.В. Риндич за допомогу в розробці стратегії досліджень, аналізі, узагальненні та відображенні результатів експериментів у наукових публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались на поточних наукових семінарах відділів функціональної геноміки та біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології та генетики НАН України та на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях: 7th Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology (Ukraine, Yalta, 2009), 3-й з'їзд Українського товариства клітинної біології (Ялта, Україна, 2012), XI Український біохімічний конгрес (Київ, Україна, 2014), VII International Meeting From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies (Тбілісі, Грузія, 2015), 41th FEBS Congress «Molecular and Systems Biology for a Better Life» (Кушадаси, Турція, 2016), GDRI конференції «Від молекулярних до клітинних подій при патологіях людини» (Львів, Україна, 2016).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей у наукових фахових журналах та 5 тез доповідей у збірках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг дисертації – 139 сторінок машинописного тексту. Ілюстрований матеріал дисертації подано у вигляді 44 рисунків. Список використаної літератури налічує 188 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Білки родини інтерсектинів

1.1.1. Загальна характеристика і структура білків ITSN1 та ITSN2.

Інтерсектини (ITSNs) – еволюційно консервативні адаптерні білки, що були знайдені в усіх багатоклітинних організмах, від нематоли до людини. ITSNs, також відомі, як скафолдні білки, що забезпечують взаємодію між рецепторами і внутрішньоклітинними сигнальними шляхами та слугують платформою для формування мультибілкових сигнальних комплексів [16]. Родина інтерсектинів складається із двох білків (ITSN1 та ITSN2) у хребетних, тоді як геном безхребетних кодує лише один такий білок. Послідовності, які кодують ITSN1 та ITSN2 людини, було виявлено на хромосомах 21 (q22.1-22.2) та 2 (pter-p25.1) відповідно [10, 17]. Білки ITSN1 і ITSN2 мають однакову доменну організацію та характеризуються високим рівнем гомології [16]. У хребетних за допомогою альтернативного сплайсингу утворюються дві основні ізоформи інтерсектинів: коротка (ITSN-S) і довга (ITSN-L) [10, 18]. Коротка ізоформа утворюється внаслідок включення до транскрипту 30-го екзону, в результаті чого з'являється стоп-кодон. Вилучення 30-го екзону в транскриптах супроводжується заміною стоп-кодону на кодон триптофану внаслідок приєднання 31-го екзону та утворення транскриптів із додатковою послідовністю на 3'-кінці. Спільними для короткої (масою близько 140 кДа) та довгої ізоформ (190 кДа) інтерсектинів є два N-кінцевих Eps15 гомологічних домена (EH1 і EH2), центральна α -спіральна ділянка (CCR) та п'ять тандемно розташованих Src-гомологічних доменів (SH3(A-E)) (рис. 1.1).

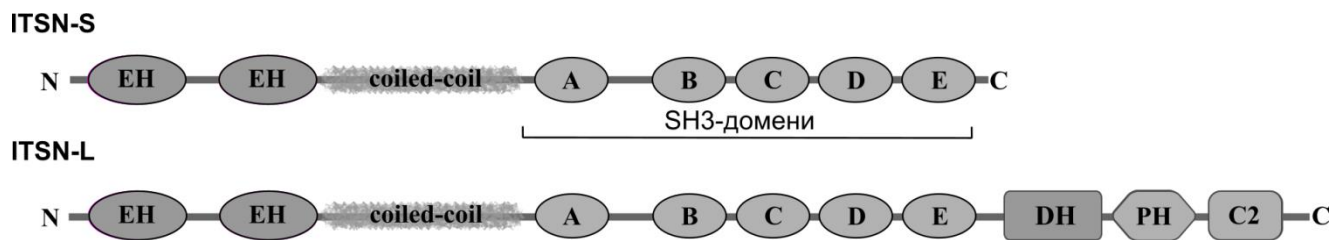


Рис. 1.1. Первинна організація основних ізоформ білків ITSN-S і ITSN-L. EH – домен, гомологічний Eps15, SH3 – домен, гомологічний домену 3 кінази Src, CCR – суперспіральний регіон, DH – домен, гомологічний Dbf, PH – домен, гомологічний плекстрину

Домени EH часто присутні у багатьох копіях і забезпечують взаємодію з білками, що містять мотиви «аспарагін-пролін-фенілаланін» (NPF) [19]. Ці домени виявлено у білках, що задіяні в процесах ендоцитозу, екзоцитозу, рециркуляції синаптичних пухирців та перебудов актинового цитоскелету [20]. Було виявлено, що експресія EH-доменів активує транскрипційний фактор Elk-1, але рівень активації зменшується при експресії повної ізоформи ITSN1-S [21]. Показано, що EH-домени відповідають за субклітинну локалізацію інтерсектина 1 [22].

Регіон між доменами EH2 і SH3A утворює позитивно заряджену α -спіральну ділянку. CCR-домен переважно складається з п'яти амінокислотних залишків: лізину (11%), лейцину (12%), глютамінової кислоти (20%), аргініну (13%) та глютаміну (15%). Відповідно до позначень амінокислотних залишків, цю ділянку також називають KLERQ. CCR-домен може забезпечувати гомо- та гетероолігомеризацію білків [23]. За допомогою CCR-домену ITSN1 зв'язується з нейрон-специфічним екзоцитозним білком SNAP-25, а коротка ізоформа інтерсектину взаємодіє з SNAP-23, що експресується у всіх тканинах [24]. Також через CCR-домен інтерсектин 1 взаємодіє з Eps15, адаптерним білком клатрин-опосередкованого ендоцитозу [25].

Домени SH3 виступають посередниками у білок-білкових взаємодіях, зв'язуючи короткі пролін-збагачені послідовності своїх лігандів. SH3-домени

присутні в різноманітних білках, що залучені до передачі мітогенного сигналу, внутрішньоклітинного транспорту та регуляції динаміки цитоскелету [26]. Інтерсектини людини містить п'ять послідовно розташованих SH3-доменів, завдяки їх тандемному розташуванню білок функціонує як модуль для збирання різних білків у комплекси. Вважається, що SH3-домени інтерсектину відіграють роль у збиранні субодиниць білкових комплексів (зокрема, для НАДФН-оксидази); модулюють активність фосфатидилінозитол-3-кінази; їх надекспресія здатна блокувати активність Ras, а також MAP-кінази (mitogen-activated protein kinase – мітоген-активованої протеїнкінази) шляхом пригнічення ендоцитозу [27]. Для партнерів інтерсектинів характерна взаємодія тільки з деякими його SH3-доменами. Його взаємодія з більшістю партнерів відбувається за допомогою набору доменів SH3A, SH3C та SH3E [28].

Довга ізоформа інтерсектинів містить додатково ще DH (Dbl-гомологічний домен), RH (плекстрин-гомологічний домен) та C2 домени, розташовані на С-кінці білка [11]. Домен DH каталізує обмін ГДФ/ГТФ і слугує активатором ГТФаз родини Rho. Відомо, що завдяки своєму DH-домену ITSN здатний до активації ГТФази Cdc42, що в свою чергу активує білок N-WASP (neural Wiskott-Aldrich Syndrome protein) [12]. Поряд з доменом DH розташований домен RH. Він присутній у багатьох зв'язаних з мембраною білках, що беруть участь у передачі сигналу або є складовою частиною цитоскелету, причому часто зустрічається у них поряд з DH-доменом. Вважають, що домен RH забезпечує приєднання білка до мембрани завдяки своїй здатності зв'язувати фосфоінозитиди [29]. RH-домен підсилює нуклеотид-обмінні властивості DH-домену, може брати участь у зв'язуванні ГТФази і зв'язувати білки ГТФазних каскадів. Хоча RH-домен інтерсектину 1 і зв'язується з фосфоінозитидами, це не впливає на здатність DH-RH-доменів до обміну гуанозин-нуклеотидів [30].

C2-домен є найменш вивченим серед доменів інтерсектинів. Зазвичай, C2-домени задіяні у Ca^{2+} -залежному та Ca^{2+} -незалежному зв'язуванні фосфоліпідів [16]. Функціонально більшість C2-вмісних білків беруть участь у передачі

сигналів (утворенні вторинних ліпідних месенджерів, фосфорилуванні білків, активації ГТФаз, зв'язуванні убіквітину) та мембранному транспорті [31].

Завдяки альтернативному сплайсингу відбувається формування різноманітних транскрипційних ізоформ інтерсектинів людини, специфічних для окремих тканин, їхнього стану та стадії розвитку. Крім основних ізоформ було описано інші варіанти альтернативного сплайсингу пре-мРНК обох генів інтерсектинів, проте існування більшості білкових ізоформ, на відміну від транскриптів, не є доведеним. Так, виявлено чотири події сплайсингу для гена *ITSN1*, що не призводять до зсуву рамки зчитування і з'являються на рівні білкового продукту: скорочення міждоменного лінкеру між EH-доменами; включення 20-го екзону, що кодує п'ять амінокислотних залишків (VKGEW) до структури першого SH3A-домена; відсутність домену SH3C; втрата С-кінцевої частини DH-домену і частини лінкеру між доменами DH та RH [32]. Найбільш цікавою та вивченою подією альтернативного сплайсингу *ITSN1* є включення п'яти амінокислотних залишків до структури n-Src петлі SH3A-домена *ITSN1*. Експресія цих транскрипційних ізоформ є нейрон-специфічною та характеризується регуляцією в онтогенезі. Альтернативний сплайсинг може регулювати доменну структуру *ITSN* та взаємодію з білками-партнерами. Відомо, що інсерція п'яти амінокислот, які кодуються 20 екзоном, призводить до зміни специфічності домену SH3A *ITSN1* по відношенню до білків-партнерів. Нейрон-специфічна ізоформа SH3A(+VKGEW) зв'язується ефективніше з ендоцитозними білками, такими як динамін 1, синаптоянін 1 та регулятором цитоскелету CdGAP, порівняно з повсюдно експресованою ізоформою SH3A [33].

Гени *ITSN1* та *ITSN2* широко експресуються у більшості тканинах ссавців [11, 22, 24, 32, 34]. Проте профіль експресії різних білкових ізоформ інтерсектинів відрізняється. Відомо, що короткі ізоформи *ITSN1* та *ITSN2* присутні у всіх досліджуваних тканинах ссавців, тоді як довга ізоформа інтерсектинів має відмінний профіль експресії [22, 34]. На відміну від довгої ізоформи *ITSN2*, що експресується усюди, довга ізоформа *ITSN1* експресується переважно в нейронах,

хоча низькі рівні транскриптів ITSN1-L було знайдено в нирці, печінці, легенях, м'язах та плаценті миші [10, 11, 32].

1.1.2. Функції інтерсектинів у клітинних процесах. Білки родини інтерсектинів формують численні взаємодії з білками-партнерами. Ідентифіковані білки-партнери взаємодіють з обома ізоформами, як з ITSN1 так і з ITSN2, специфічної взаємодії з одним із інтерсектинів не виявлено. На сьогодні, відомо близько сорока білків-партнерів для ITSN1 та досліджена його участь у процесах ендоцитозу, екзоцитозу, передачі мітогенного сигналу та регуляції динаміки актинового цитоскелету (рис. 1.2) [16, 28].

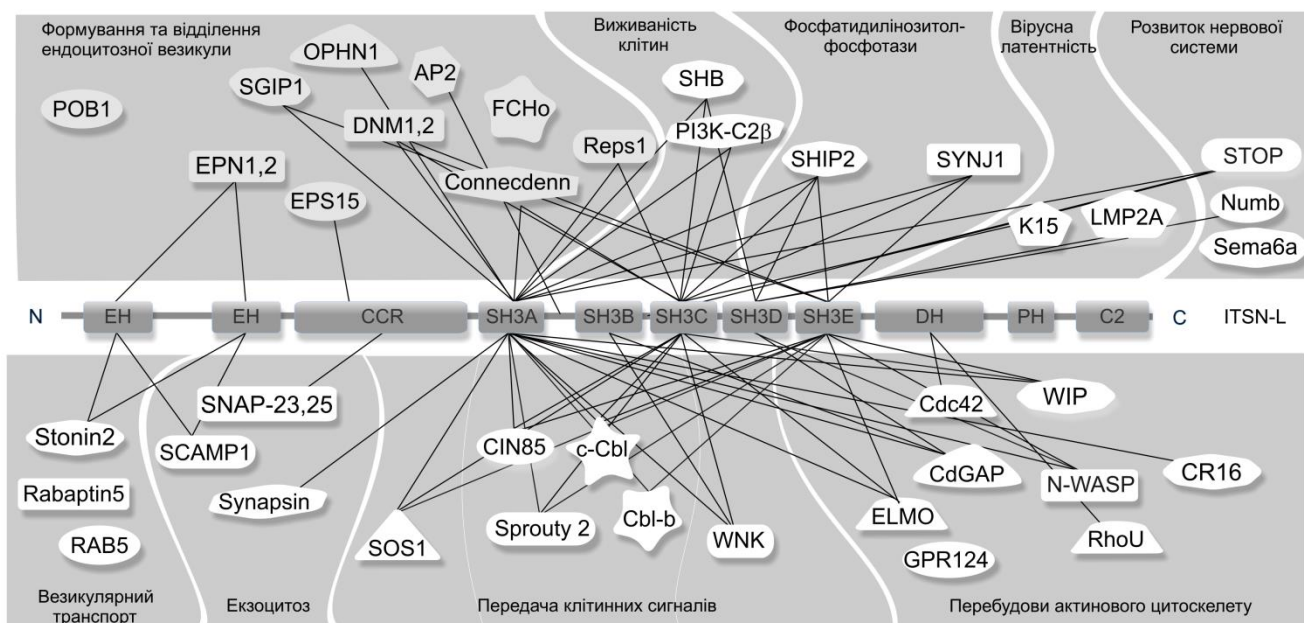


Рис. 1.2. Білки-партнери інтерсектина 1 та клітинні процеси, до яких він залучений

Вважається, що основною функцією інтерсектинів є їх участь у клатрин-залежному ендоцитозі. Під час ендоцитозу, матеріал, що має бути поглиненим, поступово оточується ділянками плазматичної мембрани, яка спочатку утворює вигин, а потім відщеплюється всередину клітини з формуванням ендоцитозної везикули, що містить у собі поглинений вантаж [34]. Інтерсектини беруть участь

на всіх етапах клатрин-опосередкованого ендоцитозу. За даними літератури відомо, що ITSN1 і ITSN2 разом з деформуючими мембрану білками FCHO1/2 (білки гомологічні домену Fer/Cip4) та адаптерами Eps15/Eps15R входять до складу ініціаторного комплексу, який є необхідним для визначення місць формування облямованих клатрином ямок на плазматичній мембрані і локалізує адаптерний комплекс клатрину (AP2), що поєднує клатрин із плазматичною мембраною [35]. EH2-домени інтерсектина взаємодіють з епсином, що бере участь у деформації мембрани, а також стоніном, який задіяний у сортуванні вантажів для синаптичних везикул [19, 36]. Домени SH3 зумовлюють здатність інтерсектинів зв'язувати ГТФазу динамін 1, яка на пізніх стадіях ендоцитозу забезпечує від'єднання клатрин-облямованої везикули від мембрани [24, 37, 38]. В процесі ендоцитозу інтерсектини взаємодіють з інозитолфосфатазою SHIP2, AP2-асоційованим білком коннекденом, синаптичним білком синапсином та синаптояніном 1, що бере участь у вивільненні клатрину на етапі «роздягання» везикули [39-41]. Відомо, що окремі домени ITSN1 здатні впливати на клатрин-опосередкований ендоцитоз, конкуруючи з повнорозмірним білком за зв'язування з білками-партнерами. Так, п'ять SH3-доменів ITSN1 відрізняються за своєю здатністю до блокування ендоцитозу. Найбільш активним у пригніченні утворення облямованих клатрином пухирців виявився SH3A-домен (концентрація, необхідна для досягнення половини максимуму інгібування, для нього становила приблизно 4 мкМ). Відповідні значення для SH3C та SH3E склали близько 10 мкМ; SH3D-домен виявився нездатним до інгібування, проте SH3B-домен здатен блокувати ендоцитоз лише на 10-20% навіть при концентрації 100 мкМ [42]. Таким чином, завдяки множинним взаємодіям ITSNs забезпечують формування мультибілкових комплексів під час ендоцитозу.

Встановлено, що як підвищення, так і зменшення кількості інтерсектину призводить до зниження інтенсивності рівня інтерналізації шляхом клатрин-опосередкованого ендоцитозу в різних типах клітин [22, 25, 43, 44]. Виявлено, що надекспресія рекомбінантних ITSN1 або ITSN2 призводить до зменшення кількості поглинутого трансферину в клітинах лінії COS-7 [22, 25]. Зниження

швидкості ендоцитозу та екзоцитозу в нейронах спостерігалось у мишей з нокаутом гену інтерсектину 1 [45]. Встановлено, що мутації, які порушують функцію інтерсектину 1 у безхребетних *Caenorhabditis elegans* (*Itsn1*) та *Drosophila melanogaster* (*Dap160*) призводять до зменшення кількості синаптичних везикул і перешкоджають формуванню та рециркуляції синаптичних везикул [46-48]. Вважається, що адаптерні білки найефективніше функціонують в клітині при оптимальній концентрації відносно до кількості асоційованих з ними білків-партнерів. При цьому відбувається формування «активних» комплексів та досягнення ефективною біологічної відповіді. Коли концентрація адаптерного білка стає вищою або нижчою за оптимальну, в клітині формуються «неактивні» комплекси та відповідно неефективний перебіг певного процесу в клітині [49].

Крім клатрин-опосередкованого ендоцитозу, інтерсектини задіяні у кавеолін-залежному ендоцитозі. Було показано, що пригнічення експресії довгої ізоформи *ITSN2* в ендотеліальних клітинах викликає зниження кількості активованої *Cdc42* та збільшення рівня кавеолярного ендоцитозу. Водночас надекспресія доменів DH-PH *ITSN2* призводила до підвищення активності *Cdc42* та інгібування кавеолярного ендоцитозу [13]. Продемонстровано роль інтерсектину в екзоцитозі. Довга форма *ITSN1* регулює перебудови актинового цитоскелету, які необхідні для екзоцитозу в нейроендокринних клітинах [50]. Крім того, *ITSN1* взаємодіє із білком *SNAP25*, який залучений до екзоцитозу синаптичних везикул [24].

Інтерсектини беруть участь у везикулярному транспорті. Виявлено, що *ITSN2* локалізується та взаємодіє з білком *RABEP1* (або *Rabartin 5*), який є ефектором основного білка ранніх ендосом – *Rab5*. Встановлено, що *ITSN2-L* сприяє деградації білка *Rabartin 5* у протеасомах і, через зміни кількості *RABEP1*, регулює везикулярний транспорт [51]. *ITSN1* також зв'язується з *RABEP1* та колокалізується з *Rab5*, але роль цих взаємодій залишається не зрозумілою [52].

Адаптерні білки *ITSNs* беруть участь у роботі різноманітних клітинних сигнальних шляхів, що забезпечують ріст, проліферацію та диференціацію клітин. Про це свідчить здатність *ITSN1* до активації фактора транскрипції

Elk-1 та до індукції онкогенної трансформації клітин [21]. Було показано, що надекспресія ITSN1 призводила до трансформації фібробластів гризунів, а також прискорювала прогестерон-залежну диференціацію ооцитів *Xenopus laevis*. Надекспресія EH-доменів, або повнорозмірного ITSN1 призводила до активації фактора транскрипції Elk-1 у клітинах лінії 293T, яка залежить від MAP-кінази JNK, а не опосередкована MAP-кіназами ERK1 та ERK2 [53]. Хоча ITSN1 напряду не активує ERK1 та ERK2, він залучений до регуляції сигнального каскаду RAS-ERK, тому що його SH3-домени взаємодіють з білком SOS1, фактором обміну гуанінових нуклеотидів для ГТФази RAS. Відомо, що взаємодія ITSN1 із фактором SOS1 стимулює ГДФ/ГТФ обмін на ГТФазі RAS, а надекспресія його SH3-доменів пригнічує рівень інтерналізації рецептора епідермального фактора росту та активацію ERK/MAPK-каскаду [27]. Крім MAP-кіназних сигнальних каскадів, інтерсектин 1 бере участь в регуляції PI3K-AKT сигнального шляху. В нейронах ITSN1 взаємодіє і активує фосфатидилінозитол-3-кіназу PI3K-C2 β , зменшення кількості ITSN1 негативно регулює сигнальний шлях PI3K-C2 β -AKT та викликає апоптоз клітин нейробластами [54]. Відома участь ITSN1 в інтерналізації активованого рецептора епідермального фактору росту (EGFR). Виявлено, що взаємодія ITSN1 з E3 убіквітин-лігазою Cbl стимулює убіквітування та деградацію EGFR [43]. Також, визначено взаємодії ITSN1 з інгібітором Cbl білком Spry2 та фосфатазою Shp2, що забезпечує дефосфорилування Spry2, яке призводить до активації Cbl [55, 56].

Важливою функцією ITSNs у перебудовах актинового цитоскелету є здатність їх довгих ізоформ ITSN-L проявляти GEF активність. ITSN-L є фактором обміну гуанінових нуклеотидів (GEF) для малої ГТФази Cdc42 що, регулює поляризацію клітин та полімеризацію актину, зумовлюючи утворення філоподій [15, 57]. Домени SH3 ITSNs взаємодіють з білком N-WASP – основним ефектором Cdc42, активація якого призводить до активації Arp2/3 комплексу та полімеризації актинових філаментів [15]. Ймовірно, ITSN-L слугує платформою, що одночасно активує Cdc42 та просторово наближує

його з N-WASP, забезпечуючи утворення актинових філаментів. Більш того, ITSNs взаємодіє з CdGAP – білком, що стимулює гідроліз ГТФ, приєднаного до малих ГТФаз, таким чином інгібуючи їх сигнальну активність [14, 28]. CdGAP є інгібітором малих ГТФаз Cdc42 та Rac1 [58]. Взаємодія з ITSN1 інгібує активність CdGAP, що забезпечує ще один механізм для ITSN1-залежної активації Cdc42 [14]. Відомо, що ITSN-залежні перебудови актинового цитоскелету важливі для екзоцитозу секреторних гранул у нейроендокринних клітинах, розвитку дендритних шипиків у нейронах, індукції поглинання рецептора T-клітин, а також утворення актинових хвостів при інфекції клітин вірусом коров'ячої віспи [50, 59-63].

Таким чином, родина адаптерних білків інтерсектинів забезпечує мультикомпонентні молекулярні взаємодії між ендоцитозом, сигнальною трансдукцією та перебудовами цитоскелету утворюючи мультибілкові комплекси з широкою мережею взаємодій.

1.1.3. Патології, що асоційовані з інтерсектинами. Одним з найбільш частих хромосомних захворювань людини є синдром Дауна, що зустрічається 1-2 рази на 1000 новонароджених. Причиною синдрому є повна або часткова трисомія 21-ї хромосоми. Вважається, що більшість генів, відповідних за прояви синдрому, сконцентровані у регіоні q21.1-q22.3 21-ї хромосоми [64]. Ген інтерсектина 1 людини картований у цьому регіоні і його експресія підвищується у пацієнтів з синдромом Дауна [65]. Патологічний фенотип пов'язують з відхиленнями процесу ендоцитозу у нервових тканинах: зміни у формі, кількості та щільності синапсів є характерною ознакою при синдромі Дауна. Збільшення кількості транскриптів короткої ізоформи інтерсектину 1 спостерігається у випадку хвороби Альцгеймера [66]. Встановлено, що ITSN1 є також асоційованим із захворюванням Хантингтона, яке характеризується збільшенням поліглютамінового регіону в білку хантингтині та накопиченням мутантного білку в нейронах [67]. Ці данні свідчать про можливу участь інтерсектина 1 у різних нейродегенеративних патологіях.

Інтерсектини задіяні у перебігу злякисних процесів. Було продемонстровано, що надекспресія *ITSN1* сприяє злякисній трансформації фібробластів [31,68]. Збільшену кількість короткої ізоформи *ITSN1* було визначено в гліальних пухлинах людини, що вказує на онкогенну роль *ITSN1-S* у розвитку гліоми [69]. На сьогодні показано протилежну роль членів родини інтерсектинів в канцерогенезі. *ITSN2* також залучений до злякисних процесів. Однак, на відміну від *ITSN1*, підвищений рівень експресії *ITSN2* є асоційованим із сприятливим прогнозом для пацієнтів із раком молочної залози [70].

1.2. Реорганізація актинового цитоскелету – один із головних механізмів клітинної міграції та інвазії

1.2.1. Перебудови актинового цитоскелету за допомогою білків родини WASP та Arp2/3 комплексу. Еукаріотичні клітини утворюють різноманітні структури актинових філаментів для виконання таких функцій як міграція клітини, транспорт везикул, цитокінез, регулювання міжклітинних контактів, контроль клітинної форми, інвазія та інші. Однією із специфічних форм актинового цитоскелету є високо динамічна, розгалужена мережа, яка має важливе значення для мігруючих клітин. Такі перебудови актинового цитоскелету регулюються групою малих G-білків, відомих як Rho-ГТФази. У людини відомо 20 членів родини Rho-ГТФаз [71]. Внаслідок дії різних позаклітинних сигналів, у тому числі факторів росту, хемокінів, молекул адгезії, Rho-ГТФази активуються та набувають здатності регулювати активність своїх ефекторних білків [72, 73]. Найбільш відомими та вивченими представниками родини Rho-ГТФаз є RhoA, Rac1 та Cdc42, які регулюють формування мембранних виступів під час міграції клітин, а саме стрес-волокон, ламелоподій та філоподій, відповідно [74].

Ламелоподії – це широкі мембранні виступи, які утворені розгалуженою мережею актинових філаментів під плазматичною мембраною. Філоподії є пальцеподібні вип'ячування на провідному краю клітини, які залучені у міжклітинний сигналінг та визначення напрямку руху щодо наявних

хемоатрактантів. ГТФаза Rac координує утворення ламелоподій. Cdc42 регулює полярність клітини та індукує утворення філоподій, а також може активувати Rac, індукуючи ламелоподії, що свідчить про взаємодію членів родини Rho між собою [74,75].

Динаміка актинових структур клітини заснована на здатності актину до оборотної полімеризації. Існує два основних способи стимулювання полімеризації актину: зародження нових (нуклеація), або подовження існуючих актинових філаментів. Нуклеація нових філаментів за допомогою мономерів актину термодинамічно несприятлива, оскільки димери актину нестабільні. В клітині існують декілька основних нуклеаторів для збірки нового філаменту, наприклад, Arp2/3 (actin-related protein2/3) комплекс та форміни [71]. Головним регулятором динаміки актину при міграції клітини, ендоцитозі, екзоцитозі, фагоцитозі, цитоплазматичній рухливості та адгезійних контактів слугує консервативний комплекс Arp2/3. Комплекс білків Arp2/3 складається з семи субодиниць, дві з яких (Arp2 та Arp3) орієнтуються іншими п'ятьма так, що формують перший актиновий димер, який ініціює утворення нового дочірнього філаменту на стороні існуючого, що призводить до утворення розгалуженої актинової мережі (рис. 1.3) [76].

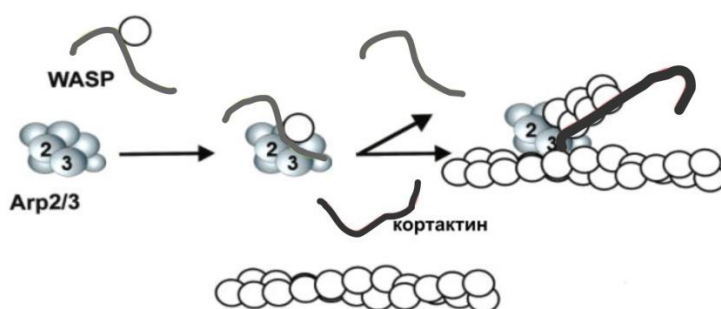


Рис. 1.3. Arp2/3 комплекс і фактори нуклеації актину кортактин та WASP (адаптовано з [76])

Окремий Arp2/3 комплекс має низьку активність нуклеації за умов *in vitro*. Для його активації потрібні фактори, що стимулюють нуклеацію актину (NPFs, nucleation promoting factors), які поділяються на дві групи. До факторів NPFs

першої групи відносять білки WASP/N-WASP, SCAR/WAVE (Supressor of cAMP receptor/WASP-family verprolin homology protein), WASH (WASP and SCAR homologue), WHAMM (WASP homologue associated with actin, membranes and microtubules) and JMY (Junction-mediating regulatory protein), які зв'язуються з G-актином та Arp2/3 комплексом за допомогою VCA-домену (V, домен гомологічний верпроліну; C – центральний домен, гомологічний кофіліну, A – домен з переважанням кислих амінокислотних залишків [4, 77-80]. Білки WASP та N-WASP відрізняються від інших членів своєї родини наявністю домену WH1 (WASP homology 1), який бере участь у взаємодіях із верпролінами та мотиву CRIB, який зв'язується із малою ГТФ-азою Cdc42 [81]. Білки SCAR/WAVE, на відміну від WASP/N-WASP, не взаємодіють з Rho ГТФазами, вони містять N-кінцевий SHD-домен невідомої функції. До активаторів другого типу відносять кортактин та HS1 (haematopoietic-specific protein 1), які також взаємодіють з Arp2/3 комплексом, але на відміну від активаторів першого типу взаємодіють з F-актином, а не з G-актином [4,82]. Відомо, що після утворення бічного актинового філаменту N-WASP звільняється у цитоплазму, в той час, як кортактин залишається зв'язаним із Arp2/3 комплексом [83]. Зв'язування кортактина з Arp2/3 комплексом слабо активує останній, але блокує розбирання філаментів і таким чином, може сприяти їх стабілізації [84]. Цікаво, що у присутності N-WASP, активація Arp2/3 комплексу кортактином значно збільшується, незважаючи на конкуренцію за загальний сайт зв'язування, розташований на білку Arp3 [85]. Хоча актинові NPFs стимулюють приєднання мономерів актину до полімерів, регуляторні білки актину, такі як деполімеризуючий білок кофілін, профілін, кемпінг-білки та інші прискорюють цей процес.

Члени родини білків WASP є важливими регуляторами архітектури та динаміки актинових філаментів. Інтегруючи різноманітні сигнали, що надходять від рецепторних тирозинкіназ, ГТФаз, фосфоліпідів PI(4,5)P2, білки WASP ініціюють спрямовану полімеризацію актину завдяки активації універсального механізму нуклеації актину – Arp2/3 комплексу [86].

WASP експресується виключно в гемопоетичних клітинах, але його гомолог N-WASP, який було пізніше виявлено у нейронах, широко розповсюджений в різноманітних клітинах. Білок N-WASP складається з N-кінцевого WASP гомологічного 1 домена (WH1), основного регіону (BR), Cdc42/Rac-зв'язуючого (CRIB), пролін-збагаченого (PR), двох верпролін гомологічних (V), кофілін гомологічного (C) та C-кінцевого кислотного (A) доменів (рис. 1.4) [7].

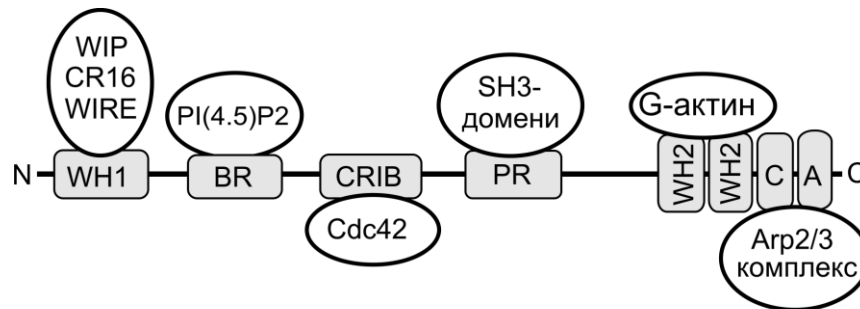


Рис. 1.4. Схематичне зображення доменної організації білка N-WASP та його основних партнерів

За допомогою WH1-домену WASP/N-WASP взаємодіють з білками родини верпролінів: WIP (WASP Interacting Protein), CR16 (Corticosteroid Responsive) та WIRE/WICH (WIP related/WIP CR16 homologous). Мутації в домені WH1, що запобігають зв'язуванню WASP із білком WIP, призводять до розвитку рідкісного X-зчепленого рецесивного синдрому Віскотта-Олдрича [80]. Дефекти цитоскелету та хемотаксису зустрічаються тільки у гемопоетичних клітинах хворих на синдром Віскотта-Олдрича. Регіон BR забезпечує взаємодію N-WASP з фосфатидилінозитол-4,5-дифосфатом та його локалізацію до плазматичної мембрани. Домен CRIB специфічно взаємодіє з активованою формою ГТФази Cdc42. Пролін-збагачений домен (PR) містить різноманітні мотиви для взаємодії з SH3-доменами білків, серед яких тирозинкіназа Src, кортактин, адаптерні білки Nck та Grb2, CIP4 (Cdc42-interactin protein 4), Toca 1 (transducer of Cdc42-dependent actin assembly 1), які регулюють фосфорилування та активність N-

WASP. Ділянка VCA зв'язує глобулярний актин та Arp2/3 комплекс і стимулює полімеризацію актину [87].

У клітині білки WASP та N-WASP знаходяться у неактивній автоінгібованій конформації за рахунок внутрішньомолекулярної взаємодії між VCA доменом з однієї сторони та CRIB і BR з другої [88, 89]. Активація WASP відбувається при зв'язуванні з сигнальними білками (ГТФазою Cdc42, фосфоінозитол-дифосфатами, деякими білками, що містять SH3-домени) завдяки припиненню автоінгібування і переходу у відкриту конформацію, яка здатна взаємодіяти з Arp2/3 комплексом та ініціювати полімеризацію актину [90].

В клітині білки N-WASP та WASP знаходяться у міцному комплексі із своїм конститутивним партнером WIP, який регулює їх активність, локалізацію, стабільність та функції (див. нижче) [7].

1.2.2. Верпроліни – регулятори актинового цитоскелету. Білки родини верпролінів (verprolins) беруть участь в процесах полімеризації актину та перебудовах актинового цитоскелету під час формування філоподій та інвадоподій, після приєднання до Т-клітинного рецептора, а також відіграють важливу роль в ендцитозі. Вперше верпролін було виявлено як білок дріжджів (*Vpr1p*), важливий регулятор актинового цитоскелету [91]. У ссавців родина верпролінів включає три білка: WIP, CR16 та WIRE. Всі три представника мають подібну доменну організацію, що складається з N-кінцевого верпролін-гомологічного домену (V-домен), пролін-збагаченої ділянки (ПЗД) та домену, що зв'язується з білками WASP та N-WASP (WBD) (рис. 1.5) [92].

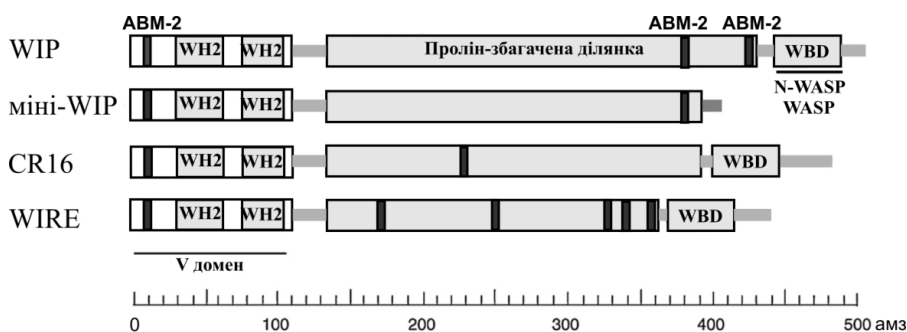


Рис. 1.5. Схематичне зображення білків родини верпролінів ссавців

V-домен складається з двох WASP гомологічних доменів (WH2), які взаємодіють з актином. Доменна структура верпролінів містить одну або кілька послідовностей ABM-2 (actin-based motility 2), що відповідають за взаємодію з профіліном, який є фактором обміну нуклеотидів, що каталізує від'єднання АДФ від G-актину і приєднання до нього АТФ, таким чином повертає актин в пул активованих мономерів, готових до полімеризації [93]. Усі три верпроліни ссавців надзвичайно пролін-збагачені (27-32%) та окрім зв'язування профіліну, залучені у взаємодії з SH3-доменами білків-партнерів [91]. Цікаво, що WIP усуває дефекти полярності, росту та ендоцитозу, які виникають у дріжджів за відсутності верпроліну, що свідчить про функціональну гомологію цих двох білків [94].

1.2.2.1. Характеристика WIP (WASP Interacting Protein). WIP відіграє важливу роль в організації актинового цитоскелету, ендоцитозі, функціонуванні імунних клітин та вважається ключовим компонентом інвазивних структур (подосом та інвадоподій) [7, 92]. Ген *WIPF1*, що кодує білок WIP, розташований на 2 хромосомі людини [95]. WIP експресується в усіх досліджуваних тканинах ссавців, проте високі рівні експресії спостерігаються у гемопоетичних та інвазивних клітинах [95- 97]. Для WIP відомо декілька подій альтернативного сплайсингу, які характеризуються тканино-специфічністю. Є дані про транскрипт *Ptprl2*, який виникає в результаті включення екзону 6а до структури білка [98]. На сьогодні функція *Ptprl2* не відома. Другою ізоформою є міні-WIP з укороченим C-кінцем, який не містить WASP-зв'язуючого домена та експресується лише у периферичних клітинах крові (Рис. 1.6). Вірогідно, ця ізоформа може конкурувати з повнорозмірним WIP за зв'язування з різними партнерами, модулюючи його функцію в клітині [98].

Спочатку WIP був ідентифікований як партнер WASP та регулятор WASP-залежної полімеризації актину [95]. Тому, на сьогодні найкраще охарактеризовано ті функції WIP у регуляції цитоскелету, які пов'язані з його здатністю взаємодіяти з білками WASP та N-WASP. Продемонстровано, що у лімфоцитах більше ніж 95% білків WIP та WASP знаходяться у комплексі [96, 99]. У гемопоетичних

клітинах WIP має вирішальне значення для підтримання рівня експресії WASP, оскільки захищає його від деградації калпаїном [96].

За допомогою експериментів з полімеризації актину *in vitro*, було виявлено, що WIP інгібує Cdc42-опосередковану активацію N-WASP [100]. Отримані дані протягом останніх років свідчать, що для звільнення блокування N-WASP білком WIP необхідна активація білка ТОСА-1 та присутність фосфатидилінозитол-4,5-дифосфату (ФІФ2). Було продемонстровано, що ФІФ2 достатньо для активації N-WASP за допомогою Cdc42, навіть за наявності високих концентрацій WIP [100]. ТОСА-1 формує комплекс одночасно з Cdc42 та N-WASP та звільняє WIP-опосередковане блокування, що призводить до зміни конформації N-WASP та забезпечує полімеризацію актину Arp2/3 комплексом [101].

N-WASP та WIP мають потужний ефект на клітинну динаміку актину. Ектопічна експресія WASP в різноманітних типах клітин савців призводила до масивного відкладення актин-вмісних кластерів. Збільшення кількості N-WASP викликає полімеризацію актину та утворення філоподій у фібробластах, що спостерігалось у випадку експресії активованої Cdc42 [102, 103]. До того ж мікроін'єкція WIP посилює утворення філоподій, а додавання анти-N-WASP, або анти-WIP антитіл інгібує їх формування [100]. Таким чином було доведено, що білки WIP, N-WASP та Cdc42 разом беруть участь у процесах полімеризації актину.

Білок WIP є ключовим регулятором перебудов актинового цитоскелету. Підвищення концентрації WIP у клітинах ВЈАВ (лімфома Беркіта) та фібробластах призводить до збільшення F-актину, а також до утворення збагачених на актин мембранних вигинів та філоподій [95, 100]. При цьому, WIP зменшує кількість галузень філаментів, опосередкованих Arp2/3 комплексом. Припускають, що WIP стабілізує актинові філаменти зменшуючи пул G-актину, а також через взаємодії з F-актином. Використовуючи тест на міграцію клітин, було продемонстровано, що надпродукція WIP у фібробластах призводить до появи витягнутих клітин, зменшує адгезію та міграцію у порівнянні з контрольними клітинами [104].

Відомо, що WIP впливає на динаміку актинового цитоскелету через безпосередню взаємодію з актином та білками, що регулюють цитоскелет, такими як кортактин, профілін та адаптерні білки Nck і CRKL [7, 95]. Було виявлено, що WIP взаємодіє з кортактином та підвищує його здатність активувати Arp2/3 комплекс [6]. Відповідно до цього, коекспресія WIP та кортактина призводить до збільшення мембранних вип'ячувань. За відсутності WIP спостерігається зміна локалізації кортактина в дендритних клітинах, яка призводить до втрати полярності та аберантним мембранним протрузіям [105]. Відомо, що взаємодія WIP з актином і актин-зв'язуючим білком 1 (Abp1) стимулює формування дорзальних рафлів у відповідь на стимуляцію тромбоцитарним фактором росту (PDGF) [106, 107]. Було також продемонстровано, що WIP формує комплекс з адаптерним білком Nck [108]. Білки функціонують разом на ранніх стадіях утворення інвадоподій [8].

Згідно з високим рівнем експресії, що спостерігається в лімфоїдних клітинах, WIP має вирішальне значення для функцій імунних клітин, оскільки його відсутність впливає на проліферацію, активацію та міграцію Т-клітин [109-111]. Було показано, що WASP разом з верпролінами функціонують як єдине ціле під час хемотаксису моноцитів, активність цього комплексу має вирішальне значення для визначення полярності клітини [112]. Верпроліни відіграють важливу роль в перебудовах актину, які пов'язані з активацією Т-клітинного рецептора. Т-лімфоцити, які були отримані з мишачої моделі з нокаутом *WIP*, після активації Т-рецептора не здатні секретувати інтерлейкін-2 та індукувати полімеризацію актину [109]. Для секреції інтерлейкіну-2 важливо, щоб WIP знаходився у комплексі з WASP та кіназою родини Scr – Fyn. Пригнічення взаємодії білків цього комплексу призводить до зниження активації родини транскрипційних факторів NFAT та втрати синтезу інтерлейкіну-2 [113]. Варто зазначити, що було продемонстровано взаємодію WIP із доменом SH3 адаптерного білка CRKL, що важливо для локалізації CRKL-WIP-WASP комплексу до ліпідних рафтів та імунних синапсів після активації Т-клітинного рецептора [99]. Також було визначено участь WIP у поляризації та транспорті

літичних гранул до синапсів у NK-клітинах, задіяних у противірусному та протипухлинному імунітеті [114]. Крім того, WIP необхідний для передачі сигналу високоафінного рецептора для імуноглобуліна E (FcεRI) у середину мастоцитів, відколи було виявлено, що у мастоцитів кісткового мозку була порушена здатність дегранулювати та секретувати інтерлейкін-6 після активації рецептора FcεRI [91]. Було також продемонстровано, що рекрутування комплексу WASP/WIP до плазматичної мембрани важливе для формування фагоцитарної чашки в макрофагах [115].

Важливо відмітити також функцію WIP в регуляції розвитку нейронів. Було продемонстровано, що WIP діє як негативний регулятор розміру соми, ініціації та дозрівання нейритів. Дефіцит WIP сприяє збільшенню нейритів і розвитку дендритів у первинних ембріональних нейронах миші [116]. Було встановлено, що WIP регулює нейритогенез шляхом зміни рівня фосфорилування декілька кіназ, що задіяні у сигнальному шляху мішені рапаміцинового комплексу 1 ссавців (mTORC1) та кінази рибосомного білка S6 (p70S6K) [117]. За відсутності WIP відбувається зниження кіназної активності, що призводить до зменшення кількості фосфорильованного білка S6K та його внутрішньоклітинного перерозподілу відносно структур, які збагачені F-актином. Розвиток дендритів тісно пов'язаний з виникненням поведінкових симптомів у ряді психічних розладів, таких як шизофренія та аутизм. Подальше вивчення внеску WIP у механізми, що контролюють морфогенез дендритів, не тільки покращить наше розуміння функціонування нервової системи, але також може допомогти виявити причини деяких нейродегенеративних захворювань.

1.2.2.2. CR16 (Corticosteroid Responsive). Ген *CR16 (WIPF3)* вперше було клоновано з бібліотеки кДНК гіпокампу щура, як мРНК, експресія якої регулюється глюкокортикоїдами [118]. В гіпокампі щура транскрипти мРНК *CR16* експресуються на низькому рівні та кількість їх підвищується у три рази після обробки кортикостероном [119]. Транскрипти мРНК *CR16* було виявлено в мозку, серці, яєчках та легенях щура [118]. Високий рівень експресії білку CR16

спостерігається у мозку та клітинах Сертолі, які містять попередників сперматозоїдів та відіграють важливу роль у сперматогенезі, низький – у серці, яєчках та легенях миші [120,121]. Ген *CR16* кодує пролін-збагачений білок, який бере участь у регуляції нейронів та грає важливу роль у передачі сигналу в центральній нервовій системі [122]. На сьогодні відомий один варіант альтернативного сплайсингу пре-мРНК гену *CR16* миші, який характеризується втратою сьомого екзону на С-кінці. Альтернативний сплайсинг *CR16* є потенційним регуляторним механізмом для взаємодії CR16 з N-WASP, оскільки лише повнорозмірний CR16, має здатність зв'язувати N-WASP на відміну від ізоформи без сьомого екзону [120]. Було продемонстровано, що CR16 формує комплекс з N-WASP в клітинах Сертолі та мозку миші [121]. За умов *in vitro* CR16 безпосередньо зв'язується з G- та F-актином, проте не впливає на кінетику полімеризації актину, опосередковану N-WASP та Arp2/3 комплексом, на відміну від WIP [120]. Білок CR16 містить численні пролін-збагачені мотиви, які зв'язуються з SH3-доменами Src кінази, субодиницею кінази PI3 (P85), адаптерним білком Grb2 та фосфоліпазою C гамма 1 (PLC γ) [119]. За допомогою експериментів *in vitro* було показано, що CR16 є субстратом для MAP кінази. Первинна амінокислотна послідовність CR16 містить вісім консенсусних сайтів для фосфорилування MAP кіназою, п'ять з яких знаходяться у потенційних SH3-зв'язуючих мотивах. При цьому, фосфорилування CR16 не впливає на зв'язування з відомими SH3-доменами білків-партнерів, тому на сьогодні, значення фосфорилування CR16 не відомо [119]. Не зважаючи на високий рівень експресії CR16 у нейронах, у мишачої моделі з не функціональним геном *CR16*, серйозних аномалій мозку не спостерігалось [121]. Цей ефект може бути пояснений наявністю інших членів родини верпролінів, WIP та WIRE, які також експресуються в мозку та можуть компенсувати втрату CR16. На відміну від цього, відомо, що нокдаун гену *CR16* у миші призводить до чоловічої стерильності, яка пов'язана з порушеннями сперматогенезу. Було показано, що білки CR16 та N-WASP формують комплекс в яєчках, причому відсутність CR16 призводила до зниження кількості білка N-WASP, що свідчить про залучення

обох білків до сперматогенезу [121]. Нещодавні дослідження виявили суттєве зниження рівнів білків CR16 та N-WASP у сім'яниках пацієнтів з ідіоматичною азооспермією у порівнянні зі здоровими чоловіками [122]. Таким чином, ці дані можуть свідчити, що CR16 бере участь у сигнальній трансдукції в нейронах, може функціонувати як посередник між кількома каскадами передачі сигналу та відіграє важливу роль у сперматогенезі.

1.2.2.3. Функції WIRE у клітині. WIRE людини, також відомий як WICH (WIP-CR16 homologous), був відкритий одночасно двома різними групами вчених, тому має подвійну назву [123,124]. Ген *WIPF2*, що кодує білок, знаходиться на 17 хромосомі людини. WIRE експресується в усіх досліджуваних тканинах ссавців. Через взаємодію з N-WASP, WIRE здатен регулювати з'єднання актинових філаментів за умов *in vitro* [125]. Було виявлено, що білки функціонують разом під час ендоцитозу рецептора тромбоцитарного фактору росту бета в ендотеліальних клітинах [126]. Крім того, WIRE формує потрійний комплекс з N-WASP та білком клітинної адгезії E-кадгерином, що свідчить про прямий зв'язок між епітеліально-мезенхімальним переходом (функціями кадгерину) та регуляцією цитоскелету [127].

WIRE бере участь у перебудовах актинового цитоскелету незалежно від N-WASP сприяючи утворенню стрес-фібрил та філоподій в ендотеліальних клітинах аорти свині [126]. Було встановлено, що WIRE-залежне утворення філоподій в ембріональних фібробластах миші опосередковано білком, що асоційований з інсуліновим рецептором IRSp53 (Insulin Receptor Substrate p53) і залежить від активації малої ГТФази Cdc42 [128]. Відомо, що WIRE зв'язується з G- та F-актином і стабілізує актинові філаменти шляхом зменшення рівня деполімеризації актину [124]. Таким чином, WIRE відіграє роль в WASP-залежній та WASP-незалежній організації актинового цитоскелету і поєднує процес ендоцитозу з перебудовами актинового цитоскелету.

1.2.3. Інвадоподії та подосоми – ключові структури клітинної інвазії.

Клітинна інвазія відіграє центральну роль у різноманітних біологічних явищах при фізіологічних та патологічних станах, таких як онкологічний ріст та метастазування [92]. Ключовими структурами інвазивності клітин є подосоми та інвадоподії. Подосоми та інвадоподії – це спеціалізовані мембранні структури, наявні в клітинах з фізіологічною чи патологічною інвазивною поведінкою, які локалізуються на вентральній поверхні клітини [9, 129]. Вони забезпечують клітинно-субстратну адгезію, сприяють деградації компонентів позаклітинного матриксу (ПКМ), і таким чином забезпечують міграцію та інвазію клітин в оточуючі тканини (рис. 1.6) [130].

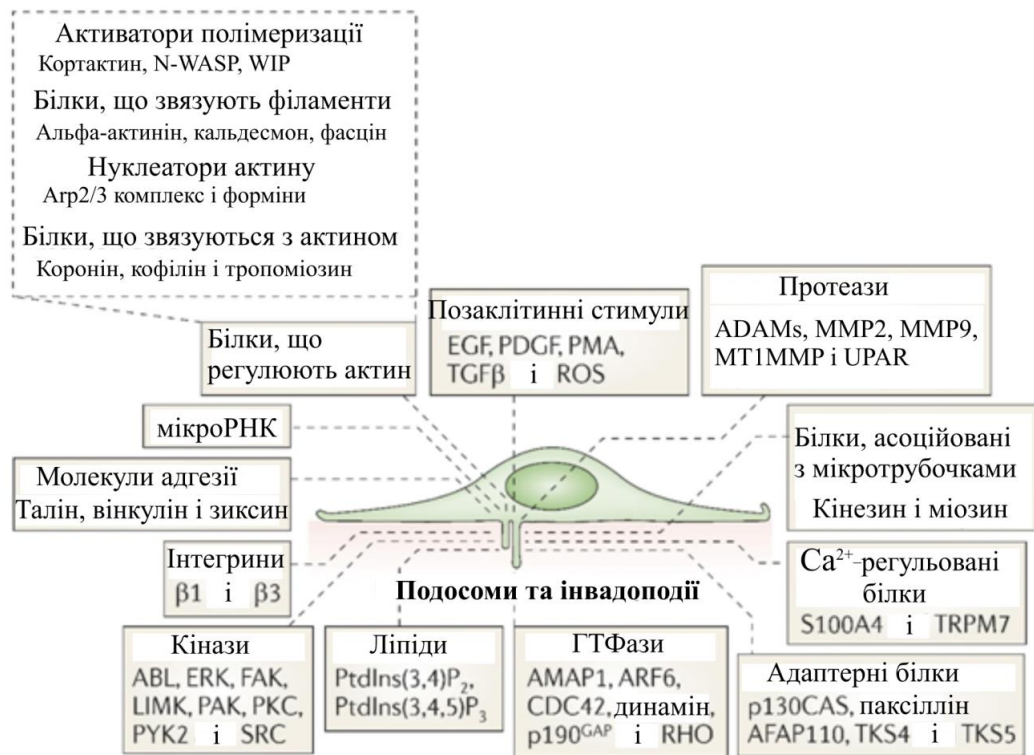


Рис. 1.6. Молекулярні компоненти інвадоподій та подосом (адаптовано [9])

Термін «подосома» зазвичай використовують для структур, знайдених в нормальних клітинах з фізіологічною здатністю до руху, інвазії та деградації ПКМ, наприклад, для моноцитарних клітин (моноцити, макрофаги, дендритні

клітини, остеокласти), клітин ендотелію та гладком'язових клітин судин. В той час як терміном «інвадоподія» позначають структури знайдені в інвазивних ракових клітинах [9, 129]. Крім того, існує збірне поняття «інвадосома», що характеризує клітинні структури адгезії, які залучені до деградації ПКМ та інвазії, охоплює подосоми та інвадоподії, та вживається, коли неважлива принципова різниця між ними [9, 131].

Подосоми та інвадоподії складаються з актин-збагаченого ядра, оточеного F-актином та регуляторами полімеризації актину. Серед молекулярних компонентів інвазивних структур виявлено: молекули адгезії; адаптерні білки; протеїнази, які здійснюють деградацію ПКМ; мембрано-ремоделюючі білки; кінази та інші [131, 132]. Для формування подосом та інвадоподій необхідна полімеризація актину, яка обумовлена взаємодією Arp2/3 комплексу з білками WASP та N-WASP [8, 133]. Як правило, молекулярні компоненти інвадоподій такі ж, як у подосом, але інвазивні структури відрізняються між собою кінетикою та динамікою. Вважається, що ключовими компонентами інвадоподій є адаптерний білок Tks5 (білок-субстрат для тирозинової кінази Src), регулятори актину – кортактин, WIP та N-WASP, тирозинова протеїнкіназа Src та трансмембранні матричні металопротеїнази [9]. Відомо, що збирання інвадоподії відбувається послідовно, включаючи стадії ініціації (формування попередника інвадоподій), стабілізації та дозрівання у функціональні структури. При формуванні попередників інвадоподій в клітині формуються точкові контакти з ПКМ шляхом взаємодії між інтегринами, тирозинкіназою Src та кіназою фокальної адгезії FAK, що призводять до кластеризації рецепторів в ділянках плазматичної мембрани, збагачених на ФІ(4,5)Ф2 [134]. Внаслідок дії епідермального, тромбоцитарного факторів росту, трансформуючого фактора росту- β та інших, тирозинкіназа Src набуває здатності зв'язуватись та фосфорилувати кортактин та Tks5, які у фосфорильованому стані переміщуються до ділянок, збагачених на ФІ(3,4)Ф2 [92, 135, 136]. Кортактин разом з актином взаємодіє з Arp2/3 комплексом, кофіліном та N-WASP і бере участь у формуванні попередників інвадоподій [137]. Далі адаптерний білок Nck1 рекрутується до сайтів формування інвадоподій та активує N-WASP-

опосередковану полімеризацію актину, після чого здійснюється локалізація Tks5 та стабілізація інвадоподій [138]. Мультибілковий комплекс, що складається із N-WASP, WIP, Arp2/3, кортактина та динаміна є мінімальною групою білків, що необхідна в інвадоподіях та подосомах для утворення вип'ячувань вентральної мембрани клітини [139]. Під час дозрівання інвадоподій відбувається її подовження за рахунок деградація ПКМ шляхом залучення та секреції матричних металопротеїназ (MMP2 та MMP9). Одночасно відбувається доставка трансмембранних металопротеїназ MT1-MMP на ведучий кінець вип'ячування мембрани, де MT1-MMP зв'язуються з кортактином, WIP та β 1-інтегрином [9]. Металопротеїнази є різноманітною родиною цинк-зв'язуючих ферментів, які специфічно взаємодіють з різними білками ПКМ. Ці ендopeптідази включають колагенази, желатинази, металоеластази, стромелізини та інші [140]. Залежно від типу секреції МПР відбувається деградація колагену, фібронектину, ламініну та інших матриксних компонентів [141]. Наприклад, секреція MT1-MMP забезпечує деградацію колагену, MMP2 активується для розщеплення желатину [72]. MMP повинні бути доставлені специфічно до ділянок деградації плазматичної мембрани. Кортактин та WIP регулюють залучення та секрецію мембранних металопротеїназ, тому відіграють головну роль на етапі дозрівання інвадоподій [142]. Протеїнази секретуються для деградації навколишнього ПКМ, таким чином сприяючи подовженню інвадоподій доки тіло клітини зможе проходити через новостворений розрив в ПКМ [129, 143].

Процес формування інвадоподій та подосом тісно пов'язаний з процесами ендо- та екзоцитозу, оскільки їх безперервне функціонування забезпечує постійне надходження необхідних молекулярних компонентів до цих динамічних мембранних структур, а також утилізацію відпрацьованих та непотрібних. За допомогою ендоцитозу клітина регулює склад її власної плазматичної мембрани у відповідь на зміни в оточуючому середовищі. Так, регуляція протеолітичної активності MT1-MMP відбувається шляхом інтерналізації їх до клітини через клатрин-опосередкований та кавеоларний ендоцитоз, після чого протеази досягають ранніх та пізніх ендосом, де відбувається їх деградація (рис. 1.7) [144].

Після рециклінгу в ендосомах MMP можуть знову надходити до плазматичної мембрани, зокрема, до ділянок утворення інвадоподій та подосом, де відбувається їх секреція у ПКМ шляхом екзоцитозу. Брати участь у залученні MMP до сайтів формування інвадоподій може адаптерний білок ITSN, що задіяний на різних етапах ендоцитозу та екзоцитозу.

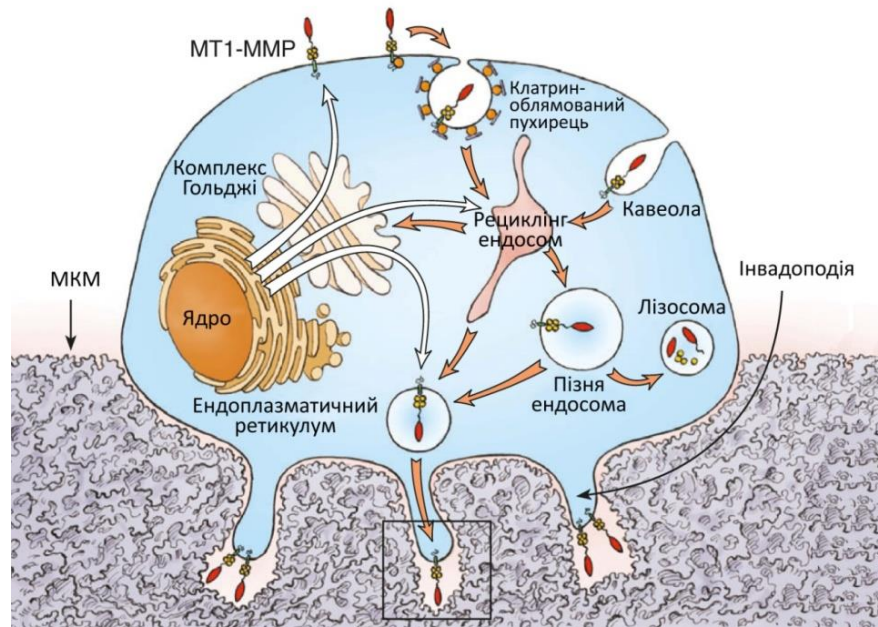


Рис. 1.7. Шляхи внутрішньоклітинного транспорту MT1-MMP (адаптовано з [144])

Незважаючи на проведення широких досліджень структури і функцій інвадоподій та подосом, багато важливих питань досі залишаються не розкритими. Подальше вивчення молекулярних компонентів інвадоподій та подосом, їх взаємодій між собою, а також сигнальних каскадів, що призводять до формування цих інвазивних структур, дозволить в майбутньому краще зрозуміти молекулярну основу канцерогенезу та визначити основні мішені протиракової терапії.

1.2.4. Роль WIP і WIRE в інвазії та деградації позаклітинного матриксу.
Дані, отримані протягом останніх років, свідчать, що перші два представника

родини верполінів, WIP та WIRE, які експресуються повсюдно, залучені до процесів інвазії та деградації ПКМ. Через специфічну експресію третього представника верпролінів, CR16, його роль в інвазивних процесах на сьогодні не відома. Було продемонстровано, що актин-регулюючий білок WIP локалізується у подосомах ендотеліальних та дендритних клітин, а також в остеокластах і є необхідним для утворення та функціонування цих структур [105, 145, 146]. Відомо, що подосоми – це недовговічні структури з тривалістю існування від тридцяти секунд до п'яти хвилин. Було показано, що за відсутності WIP, дендритні клітини не можуть утворювати подосоми, замість них спостерігаються великі, стабільні структури, подібні до структур фокальної адгезії з періодом життя від 30 до 60 хвилин [105]. Для функціонування подосом важлива взаємодія між білками WIP та WASP, інгібування якої суттєво знижує ефективність утворення подосом [112]. Окрім того клітини з пригніченою експресією WASP також не здатні формувати подосоми [147]. Багато дефектів у формуванні подосом, які спостерігаються за відсутності WIP в клітинах, пояснюються функцією WIP у запобіганні деградації білку WASP [96]. Проте, було доведено, що це не єдина роль WIP у формуванні подосом. Дендритні клітини зі зниженою експресією WIP не здатні утворювати подосоми. Формування подосом не вдалося відтворити шляхом відновлення рівня білку WASP за допомогою фармакологічного інгібування його деградації інгібіторами протеїназ та калпаїну [105]. Було виявлено, що WIP також забезпечує локалізацію WASP до сайтів де відбувається полімеризація актину та формування подосом.

Дослідження останніх років продемонстрували роль специфічної взаємодії WIP із кортактином. Було встановлено, що білки забезпечують локалізацію металопротеїназ до подосом та регулюють їх секрецію [148]. За відсутності цієї взаємодії, індукція подосом менших за розміром та з меншою кількістю F-актину все ж відбувається, але різко знижується їх здатність до деградації ПКМ. Зниження експресії WIP за допомогою siRNA зумовлює мембранну локалізацію кортактина та збільшує кількість спрямованих вгору хвилеподібних випинань цитоплазми [105, 148]. Таким чином було встановлено, що WIP разом із WASP та

кортактином є необхідними для утворення подосом, а також для їх функціонування.

Ключові білки інвадоподій, такі як кортактин, N-WASP, Tks5 взаємодіють з WIP та іншими членами верпролінів [6, 95, 149]. Використовуючи передові клітинні експерименти *in vivo*, які імітують умови інвазії пухлин, було встановлено, що WIP є важливим для ефективної клітинної інвазії. На клітинній лінії раку молочної залози MDA-MB-231 було показано, що нокдаун WIP за допомогою малих інтерферуючих РНК призводить до значного зменшення кількості інвадоподій [150]. Для утворення інвадоподій є важливою взаємодія WIP з N-WASP, порушення цієї взаємодії за допомогою надекспресії домену WBD білка WIP, інгібує ці структури у клітинах аденокарциноми MTLn3 щура [8].

Дослідження низки клітинних ліній виявило участь WIRE у процесах інвазії. Було продемонстровано, що WIRE коекспресується з WIP в різних інвазивних клітинних лініях [97]. Обидва верпроліни, WIRE та WIP, важливі для утворення інвадоподій та беруть участь на різних етапах цього процесу. Використовуючи клітинну лінію MDA-MB-231, було виявлено, що WIP регулює активність N-WASP і кортактина на початковому етапі збірки інвадоподій, тоді як WIRE регулює активність N-WASP під час дозрівання інвадоподій та деградації позаклітинного матриксу. Разом WIRE і WIP скоординовано регулюють формування інвадоподій. Цікаво, що надекспресія WIRE недостатньо для того, щоб компенсувати дефекти клітин, які виникають за відсутності WIP. Тоді як експресія WIP рятує клітини з нокдауном WIRE, що свідчить про те, що WIP може відновити клітинні функції WIRE [97].

Відповідно до важливої функції WIP у формуванні інвадоподій, з'явилися додаткові докази про його роль в метастатичних злоякісних захворюваннях. Встановлено, що ген WIP коекспресується з онкогенами *c-myc*, *p53* и *ESR1*, які асоційовані з процесами проліферації та апоптозу клітин [151]. Збільшення кількості WIP пов'язано з епітеліально-мезенхімальним переходом, при якому порушуються міжклітинні контакти, клітини набувають фібробластоподібну форму та можуть мігрувати поодиноці для того, щоб інвазувати довколишні органи

[152]. Високий рівень експресії *WIP* є асоційованим із несприятливим прогнозом для пацієнтів із раком молочної залози, кишківника та гліобластоми [151]. Було показано, що клітини раку молочної залози базального типу (MDA-MB-231, MDA-MB-157, Hs528T) з високо інвазивним фенотипом мають збільшену кількість *WIP* у порівнянні з менш інвазивними клітинами люмінального типу (MCF-7, T47D, BT-474, SK-BR-3) [97]. Тому, було запропоновано використовувати рівень експресії *WIP* як біомаркер для визначення прогнозу для типу злоякісного захворювання молочної залози людини.

Фізіологічні процеси, такі як морфогенез нейронів, міграція клітин та інвазія тканин, вимагають перебудов актинового цитоскелету, порушення регуляції яких викликає важкі патології [2, 3]. Полімеризацію актинового цитоскелету контролюють фактори, що стимулюють нуклеацію актину, такі як N-WASP і кортактин та пов'язані з ними білки, які регулюють їх активність, такі як *WIP* [92]. Полімеризація актину, яка опосередкована сигнальним шляхом Cdc42/N-WASP/*WIP*, відіграє ключову роль у формуванні інвадоподій [8]. Відомо, що довга форма інтерсектину є фактором гуанозин-нуклеотидного обміну для ГТФази Cdc42, основного регулятора актинового цитоскелету та важливого для утворення інвадоподій [15, 153, 154]. Крім того, *ITSN* взаємодіє з ефектором Cdc42 – N-WASP та сприяє полімеризації актину [15]. Оскільки інтерсектини взаємодіють з білками, які важливі для формування інвазивних структур, ми вирішили перевірити можливу участь інтерсектинів в клітинній інвазії. Дана робота присвячена характеристиці взаємодій *ITSN1* та *ITSN2* з регулятором полімеризації актину – *WIP* та визначенню їх біологічних функцій, а також виявленню специфічної взаємодії інтерсектинів з найменш вивченим членом родини верпролінів – CR16.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали

В роботі використовували органічні та 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». Також використовували ферменти компанії «Fermentas» (Литва): ендонуклеази рестрикції, зворотна транскриптаза M-MuLV, T4 ДНК-лігаза, РНКаз А, High Fidelity PCR Enzyme Mix, інгібітор РНКаз; глутатіон-сефарозу 4В виробництва «GE Healthcare» (Великобританія); Ni-NTA-агарозу («Quiagen», Німеччина); Protein A/G-агарозу «Santa Cruz Biotechnology» (США); суміш інгібіторів протеаз «Roche» (Швейцарія). Набір для виділення ДНК із гелю «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» та dNTP було придбано у компанії «Fermentas» (Литва). Середовище для культивування ліній клітин ссавців (DMEM), ембріональну сироватку теляти (FBS) та поліетиленімін (PEI) було придбано в компанії «Sigma-Aldrich» (США).

Поліклональні антитіла анти-WIP G-20 (sc-16882) та анти-N-WASP H-100 (sc-20770), моноклональні антитіла анти-Omni D-8 (sc-7270) та анти-Мус 9E10 (sc-40) були придбані в компанії «Santa-Cruz Biotechnology» (США). Моноклональні антитіла анти- β -актин, анти-НА (16B12), анти-Intersectin/ESE-1, анти-кортактин 4F11 (p80/85) отримали у «Sigma» (США), «Covance» (США), «BD Biosciences» (США) та «Millipore» (США), відповідно. Поліклональні кролячі антитіла до доменів EH2 ITSN1 та CCR ITSN2, а також мишачі антитіла до тандему доменів DH-PH ITSN1 були отримані раніше у

відділі сигнальних систем клітини. Кон'юговані з пероксидазою хрому вторинні антитіла проти імуноглобулінів кози, миші та кроля було придбано в компанії «Promega» (США). Вторинні антитіла віслюка проти імуноглобулінів кози та миші, кон'юговані з Alexa Fluor 633; антитіла віслюка проти імуноглобулінів кози, миші та кроля, кон'юговані з Alexa Fluor 555; антитіла віслюка проти імуноглобулінів миші, кон'юговані з Alexa Fluor 488; антитіла кози проти імуноглобулінів кроля, кон'юговані з Alexa Fluor 555 та Alexa Fluor 488; фалоїдин, кон'югований з Alexa Fluor 647 або Alexa Fluor 555 та FITC-желатин (G13186) були придбані в компанії «Invitrogen» (США). Кінські антитіла проти імуноглобулінів миші, кон'юговані з Texas Red, і антитіла вівці проти імуноглобулінів кроля, кон'юговані з Dylight 488 були отримані в «Vector Laboratories» (США) та «Seratec» (Німеччина), відповідно. Трансферин, кон'югований з Alexa Fluor 633 було отримано в «Sigma» (США).

2.2. Біологічний матеріал

У роботі використовували клітини *Escherichia coli* штамів BL21(DE3) «Novagen» (США) та XL1-Blue^{tet} «Stratagen» (США), лінії клітин людини 293 (клітини ембріональної нирки), U87MG (гліобластома), MCF-7 (неінвазивні клітини аденокарциноми молочної залози) та MDA-MB-231 (інвазивні клітини раку молочної залози). Крім того, використовували лізати головного мозку мишей лінії Balb/c.

2.3. Синтез кДНК

РНК із пухлин та ембріональних тканин людини було отримано к.б.н., с.н.с. І.Я. Скрипкіною. В реакційну суміш, загальним об'ємом 20 мкл, вносили: 5 мкг тотальної мРНК; праймери (Oligo dT₁₅) в кількості 100 пМ; 4 мкл 5X буфера; 1 мкл 100 мМ ДТТ; 2 мкл 10 мМ dNTP; 0,5 мкл інгібітора РНКаз (40 од./мкл) та 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.

2.4. Плазмідні конструкції

Плазмідна конструкція, що кодує кДНК WIP(аз 13-500) (NP_001070737.1) людини, була ампліфікована методом ПЛР з використанням прямого праймера 5'-CCG AAT TCC CCC GAC GTT TGC ACT GGC-3' і зворотнього праймера 5'-CCA GAT CTT GGG AGG GAG TGG TGG AGC-3' та вбудована у вектор pCMV-NA («Clontech», США) з додатковим NA-тагом за сайтами EcoRI та BglII. Плазмідна конструкція, що кодує кДНК WIP(аз 13-500), була ампліфікована за допомогою наступних праймерів: 5'-CCG AAT TCC CCC GAC GTT TGC ACT GGC-3', 5'-ACC TCG AGA GAT CTA GGG AGG GAG-3' та вбудована у вектор pET28c(+) («Novagen») за сайтами EcoRI та XhoI. Послідовність, яка відповідає амінокислотним залишкам 13-450 WIP, було ампліфіковано за допомогою прямого праймера 5'-CCG AAT TCC CCC GAC GTT TGC ACT GGC-3' і зворотнього праймера 5'-ATA GAT CTT CCC ACT CAT CTT CAC-3' та вбудовано у вектор pCMV-NA («Clontech», США) з додатковим NA-тагом. Фрагменти кДНК, що кодують WIP(аз 13-215), WIP(аз 318-500), WIP(Δ 216-317) було отримано із плазміди pCMV-NA/WIP(аз 13-500) за допомогою ендонуклеаз рестрикції та делеції фрагментів ДНК, кодующих амінокислотні залишки 216-500, 13-317 та 216-317, відповідно. Повнорозмірну кодуючу послідовність N-WASP (NP_003941.3) було вбудовано у вектор pCDNA4/HisMaxB (Invitrogen) з Omni-тагом.

Послідовність кДНК, яка відповідає короткій ізоформі ITSN1-S (NM_001001132.1; 274-3932 п.н.) і довгій ізоформі ITSN1-L (NM_003024.2; 274-5434 п.н.) було ампліфіковано за допомогою праймерів 5'-ACG GTA CCT CAG TTT CCA ACA CTT TTT-3', 5'-CCC TCG AGC TAC GGC TCA TCA AAC AAC-3' та 5'-ACG GTA CCT CAG TTT CCA ACA CTT TTT-3', 5'-ACC TCG AGT TCA TTG CTG GCT GGC TTG GGT -3', відповідно та було вбудовано у вектор pCDNA4/HisMaxC (Invitrogen) з Omni-тагом. Мозкоспецифічні ізоформи

ITSN1(+VKGEW) було клоновано з кДНК ембріонального мозку людини, повсюдно виражені ізоформи ITSN1 – з кДНК ембріональної нирки людини.

Плазмідні конструкції, що кодують злиті з GST окремі SH3-домени ITSN1 і ITSN2 та тандем із п'яти SH3(A-E)-доменів ITSN1, а також mCherry-ITSN1-S, Omni-ITSN2-S, GFP-ITSN1-L та Muc-CR16 були отримані у відділі раніше [28, 155-158]. Плазмідни, що кодують GFP-клатрин, GFP-кавеолін 1 та GFP-RAB4 було люб'язно надано д-р. С. Гавриловим (Варшава, Польща).

Нуклеотидні послідовності продуктів ПЛР та клонованих у векторах фрагментів кДНК були визначені на автоматичному секвенаторі 3130 Genetic Analyzes «Applied Biosystem» (США). Була показана відповідність отриманих послідовностей нуклеотидів до тих, що містяться в базах даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації, США (National Center for Biotechnology Information).

2.5. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

ПЛР проводили на приладах 2720 Thermal Cycler «Applied Biosystem» (США) з використанням набору реагентів High Fidelity PCR Enzyme Mix («Fermentas», Литва). Реакцію проводили в 25 або 50 мкл суміші, яка містила 1,5 мМ MgCl₂, 20 пмоль кожного праймера, 0,2 мМ dNTPs, 1.5 U полімерази згідно з протоколом до набору реагентів. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація – 94°C, 40 с (в першому циклі – 2 хв); температура реасоціації праймерів 56-58°C; синтез – 68-72°C та фінальна елонгація 7 хв. 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.

2.6. Реакція рестрикції та лігування

Рестрикцію проводили за допомогою ферментів виробництва «Fermentas» згідно з рекомендаціями виробника. Ефективність рестрикції

перевіряли, розділяючи рестриктні фрагменти методом електрофорезу ДНК в агарозному гелі і порівнюючи їх розмір з маркерними фрагментами ДНК («Fermentas», Литва). Реакцію лігування здійснювали при +22°C протягом 3 години за допомогою ДНК-лігази фага T4 («Fermentas») в концентрації 1 од. активності на 10 мкл реакційної суміші.

2.7. Електрофорез нуклеїнових кислот

Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот проводили у 0,8-2% агарозних гелях при напрузі 5 В/см, використовуючи 20 мМ трис-ацетатний електрофорезний буфер (20 мМ Tris, 20 мМ CH₃COOH, 1 мМ ЕДТА, рН 8,3). Для візуалізації фрагментів ДНК в гелі використовували бромистий етидій.

2.8. Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю

Фрагменти ДНК з агарозного гелю виділяли за допомогою набору «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» («Thermo Fisher Scientific», США) згідно з рекомендаціями виробника. Необхідний фрагмент ДНК вирізали з агарозного гелю та зважували. До гелю додавали 3-кратну за об'ємом кількість буферу для зв'язування. Інкубували агарозу при +56°C протягом 10 хв до повного розплавлення, потім додавали 3-4 мкл суспензії сорбенту, інтенсивно перемішували протягом 5-10 хв та центрифугували в центрифугі «Centrifuge 5415 С» виробництва «Eppendorf» (Німеччина) п'ять секунд при 10 тис. об/хв. Отриманий осад тричі промивали 400 мкл буферу для промивання. Потім проводили елюцію фрагменту ДНК, для цього осад розчиняли в потрібному об'ємі (5-15 мкл) дейонізованої води, інкубували протягом 10 хв при +56°C та центрифугували при 10 тис. об/хв. протягом 30 сек. Отриманий препарат ДНК до використання зберігали при -20°C.

2.9. Приготування компетентних клітин

Культуру клітин *E. coli* штамів BL21(DE3) та XL1-Blue^{tet} вирощували в 5 мл середовища Лурія Бертрані (LB) (1% NaCl; 1% бактотриптон; 0,5%

дріжджовий екстракт) продовж ночі при температурі +37°C за постійного перемішування при 120 об/хв. Далі 0,5 мл нічної культури клітин інокулювали у 100 мл свіжого середовища А (LB, 0,2% глюкоза, 10 мМ MgSO₄) і нарощували до оптичної щільності 0,3 при довжині хвилі 540 нм (5x10⁷ клітин/мл). Охолоджену культуру *E. coli* центрифугували при 3000 об/хв та при +4°C 7 хв. До осаджених клітин додавали 0,5 мл охолодженого середовища А, потім 2 мл 2xTSS (20% ПЕГ 600, 50 мМ MgSO₄, LB) та 1 мл 80% гліцерину. Аліквоти компетентних клітин фасували в охолоджені мікропробірки і зберігали при -70°C. Після заморожування оцінювали кількість компетентних клітин в аліквоті за стандартною методикою [159].

2.10. Трансформація клітин плазмідною ДНК

Аліквоту компетентних клітин *E. coli* розморожували при +4°C, після чого додавали плазмідну ДНК або лігазну суміш, об'єм яких не перевищував 5% від загального об'єму аліквоти. Клітини витримували у крижаній бані 15-30 хв, після чого проводили «тепловий шок» на водяній бані при +42°C протягом 2 хв з наступним охолодженням. Далі додавали 1 мл середовища LB і вирощували годину за температури +37°C. Клітини висівали чашку Петрі з твердим поживним середовищем (LB, 1,5% бактоагара) у присутності селективного антибіотика.

2.11. Виділення плазмідної ДНК

Плазмідну ДНК з малих об'ємів бактеріальної культури (1,5-3 мл середовища LB) виділяли методом лужного лізису [159]. Виділення плазмідної ДНК з великих об'ємів бактеріальної культури (100 мл і більше поживного середовища) проводили на колонках Tip-100 за допомогою набору Plasmid Midi Kit за стандартною методикою виробника «Qiagen» (США).

2.12. Експресія рекомбінантних білків в *E. coli*

Експресію His- та GST-злитих білків проводили у клітинах *E. coli* (штам BL21-DE3), які вирощували в середовищі 2xYTA (0,5% NaCl, 1,6% бакто-триптон, 1% дріжджовий екстракт) в присутності селективних антибіотиків при +37°C та постійного перемішування при 120 об/хв. Експресію цільових білків індукували додаванням IPTG до фінальної концентрації 1 мМ протягом 3-4 год.

2.13. Приготування бактеріальних лізатів

Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням протягом 7 хв при 5000 об/хв. Біомасу, що містить GST-злиті білки, ресуспендували в PBS (140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ KH₂PO₄, pH 7,4) з 1% Трітон X-100 та інгібіторів протеаз (Complete protease inhibitor, «Roche»). Біомасу з His-злитими білками ресуспендували в буфері для лізису клітин в нативних умовах (50 мМ Na₂HPO₄, 300 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоетанол, 10 мМ імідазол, pH 8,0) з додаванням інгібіторів протеаз (Complete protease inhibitor EDTA-free, «Roche»). Лізис бактеріальних клітин проводили за допомогою ультразвукового дезінтегратора шляхом обробки ультразвуком 20 кГц, 3 рази по 30 сек. Екстракт збирали центрифугуванням при 15000g протягом 15 хв. Лізати зберігали при температурі -70°C.

2.14. Очистка рекомбінантних білків методом афінної хроматографії

Білки з His-тагом очищували за допомогою Ni-NTA сефарози («Qiagen») в нативних умовах. Лізати наносили на хроматографічну колонку з Ni-NTA агарозой, попередньо урівноваженою буфером: 50 мМ Na₂HPO₄, 300 мМ NaCl, pH 8,0. Сорбент промивали буфером: 50 мМ Na₂HPO₄, 300 мМ NaCl, 20 мМ імідазол, pH 8,0. Зв'язаний білок елюювали буфером: 50 мМ Na₂HPO₄, 300 мМ NaCl, 250 мМ імідазол, pH 8,0.

Очистку GST-злитих білків проводили за допомогою глутатіон-сефарози 4В («GE Healthcare») згідно з рекомендаціями виробника.

Очищення білків від імідазолу та глутатіону проводили за допомогою діалізу в два етапи проти 2000 об'ємів PBS протягом 24 год. Концентрацію білків вимірювали при $\lambda=280$ нм. Чистоту білків перевіряли методом електрофорезу у ПААГ у денатуруючих умовах за методом Лемлі. Очищений препарат зберігали при -70°C .

2.15. Культивування клітин ссавців

Клітини ліній 293, MCF-7, U-87MG та MDA-MB-231 вирощували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM) з додаванням 10% ембріональної сироватки теляти (FBS), 4,6 г/л глюкози, 10 мкг/мл пеніциліну та 0.25 мкг/мл стрептоміцину при $+37^{\circ}\text{C}$ та вмісті 5% CO_2 . При досягненні клітинами 70-80% стану конфлюентності, їх пересівали у розведенні 1/10. Відбирали культуральне середовище, клітини промивали PBS та інкубували в розчині 0,05% трипсину з 0,053 мМ EDTA при кімнатній температурі протягом 3-10 хв. Потім клітини ресуспендували в DMEM з додаванням усіх необхідних компонентів та переносили в нові культуральні чашки.

2.16. Трансфекція клітин еукаріотичних ліній

Тимчасову трансфекцію клітин 293, MCF-7 та MDA-MB-231 проводили за допомогою поліетиленіміну (PEI) виробництва «Sigma». Плазмідну ДНК та PEI розчиняли окремо в однакових об'ємах 150 мМ NaCl, інкубували 5 хв, потім змішували розчини ДНК та PEI і інкубували протягом 15 хв. Утворений комплекс ДНК/PEI додавали до конфлюентних клітин, які вирощували протягом наступних 24-36 год.

Клітини лізували в буфері для імунопреципітації (20 мМ Тріс-HCl, 1% NP-40, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин, інгібітори протеаз «Roche», pH 7,5) або в буфері для преципітації з GST-злитими білками (PBS, 1% Трітон X-100, 2 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, pH 7,4).

2.17. Приготування лізатів головного мозку мишей лінії BALB/c

Для приготування лізатів – 1 г замороженої тканини мозку миші гомогенізували у 10 мл буферу для імунопреципітації. Від нерозчинної фракції позбавлялись шляхом центрифугування протягом 20 хв при 13000 об/хв, при +4°C. Лізати зберігали при температурі -70°C.

2.18. Преципітація білкових комплексів з використанням GST-злитих білків

Для іммобілізації GST-злитих білків на глутатіон-сефарозі сорбент двічі промивали буфером PBS, додавали лізат клітин, що експресували необхідний білок з GST-тагом або GST (контроль) та інкубували при перемішуванні одну годину при +4°C. Потім сорбент тричі промивали буфером для преципітації та після третьої промивки обережно видаляли супернатант. До відмитої глутатіон-сефарози додавали лізат культури еукаріотичних клітин або бактерій з індукованою експресією білка-партнера та інкубували з ним при +4°C протягом ночі при перемішуванні. На наступному етапі сорбент промивали тричі, осаджували центрифугуванням при 2400 об/хв протягом 5 хв, супернатант видаляли. До зразку додавали відповідний об'єм двократного буферу для нанесення (500 мМ Tris-HCl, 10% гліцерин, 1,2% ДСН, 1,2% β -меркаптоетанол, 0,1% бромфеноловий синій, рН6,8), кип'ятили протягом 10 хв та розділяли білки за допомогою білкового електрофорезу в ПААГ. Гель фарбували за допомогою розчину (0,15% Coomassie Brilliant Blue R250, 10% льодова оцтова кислота, 10% ізопропанол) або аналізували за допомогою Вестерн-блот аналізу.

2.19. Коімунопреципітація білкових комплексів

Лізати культури еукаріотичних клітин або лізати мишачого мозку розморожували при +4°C, центрифугували 15 хв при 13000 об/хв. До лізатів додавали 15 мкл 30% суспензії попередньо відмитої А/Г-агарози (Santa Cruz Biotechnology), відповідні антитіла (2-5 мкг) та інкубували 3 год при

активному перемішуванні при +4°C. Агарозу промивали тричі буфером для імунопреципітації, осаджували центрифугуванням 500 g протягом 3 хв. Елюцію білків проводили за допомогою буферу для нанесення Лемлі при +95°C протягом 10 хв. Зразки зберігали при температурі -20°C.

2.20. Електрофорез білків в поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах

Електрофоретичне розділення білків у денатуруючих умовах проводили у камерах для вертикального електрофорезу виробництва «Helicon» (Росія) за стандартною методикою [160]. Для білкового електрофорезу використовували 4% концентруючий та розділяючий гелі концентрацією 7,5-15%. Для приготування розділяючого гелю змішували 30% розчин акриламідну (при співвідношенні акриламідну і біс-акриламідну – 29:1), ddH₂O, 1,5 мМ Tris-HCl, рН 8,8, 10% розчин ДСН до кінцевої концентрації 375 мМ та 0,1% персульфат амонію. Полімеризація акриламідну ініціювалася додаванням 0,1% TEMED. Проводили електрофорез в тріс-гліциновому буфері (195 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, рН 8,3, 0,1% ДСН) при фіксованій силі струму 20-30 мА.

2.21. Вестерн-блот аналіз

Після електрофоретичного розділення білків в ПААГ за методом Лемлі, білки переносили на нітроцелюлозні мембрани в буфері для переносу (192 мМ гліцин, 25 мМ Tris-HCl, 20% метанол) при 250 мА протягом 1,5 год у апараті для електропереносу «Amersham Biosciences» (Швеція/Великобританія). Після переносу мембрану фарбували понсо С або блокували протягом 1 год у розчині 5% знежиреного молока в TBST (20 мМ трис-HCl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1% Triton X-100), щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню антитіл. Далі мембрану інкубували з відповідними первинними антитілами протягом 1 год та відмивали від первинних антитіл три рази по 5 хв. Після промивки мембрану інкубували протягом години в розчині вторинних антитіл відповідної специфічності з подальшою відмивкою TBST.

Для хемолюмінісцентної детекції (ECL) змішували рівні об'єми розчину А (100 мМ Tris-HCl, pH8.5, 2,5 мМ люмінал, 0.4 мМ кумарова кислота) та розчину Б (100 мМ Tris-HCl, pH8,5, 0.023% H₂O₂) та інкубували мембрану в отриманій суміші протягом 1 хв. Детекцію хемолюмінісцентного сигналу проводили за допомогою приладу Molecular Imager ChemiDoc XRS+ («BioRad», США). Інтенсивність сигналів обраховували, використовуючи програмне забезпечення ImageLab. Обробку даних здійснювали за допомогою програми OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation).

2.22. Імунофлуоресцентний аналіз

Клітини ліній 293, U87-MG, MCF-7, MDA-MB-231 сіяли на покривні скельця за 24 год до фарбування або трансфекції. Далі клітини фіксували за допомогою 4% розчину формальдегіду в PBS при кімнатній температурі протягом 15 хв. Залишки формальдегіду відмивались тричі по 5 хв в PBS з 0,2% Triton X-100. Клітини блокувались 2% розчином БСА в PBS з 0.2% Triton X-100 протягом 30 хв. Потім клітини інкубували із специфічними первинними антитілами у відповідному розведенні протягом 1 год, промивали тричі по 5 хв буфером PBS з 0,2% Triton X-100 та додавали відповідні вторинні антитіла. Після 1 год інкубації клітини знову промивали, як описано раніше. Фарбування ядер проводили реактивом Хьохста протягом 1,5 хв. Препарат на скельцях полімеризували за допомогою середовища Mowiol («Sigma»). Отримані препарати аналізували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу «Zeiss LSM 510 Meta» (Німеччина), використовуючи масляний об'єктив 63x 1.40 N.A та програму «LSM Browser». Вимірювання інтенсивності флуоресценції проводили за допомогою програми «ImageJ» (США).

Збільшені зображення ділянок, позначених білими прямокутниками, представлені на цьому ж слайді, або у рядку нижче. Приклади сигналів, що перекриваються, відмічені білими стрілками.

2.23. Метод протеолітичної деградації позаклітинного матриксу

Стерильні покривні 12-мм скельця інкубували 20 хв в розчині 0,5 мкг/мл полі-L-лізину («Sigma»), промивали PBS та фіксували розчином 0,5% глутарового альдегіду («Sigma») при кімнатній температурі. Після фіксації скельця промивали 3 рази PBS та наносили тонкий шар FITC-желатину («Invitrogen») на 10 хв, який використовували в якості позаклітинного матриксу. Скло з желатином промивали PBS тричі по 3хв та інкубували з розчином боргїдриду натрію (5мг/мл) протягом 3 хв. Далі скельця промивали PBS з 0,2% Triton X-100, інкубували у середовищі DMEM протягом 1 год при +37°C та висівали на них інвазивні клітини лінії MDA-MB-231 (30000-50000 клітин на скло). Для утворення інвадоподій клітини росли 6 год. Потім клітини фіксували розчином 4% формальдегіду, тричі промивали PBS з 0,2% Triton X-100 та проводили імуофлуоресцентне фарбування.

2.24. Аналіз інтерналізації трансферину

Трансфіковані клітини лінії 293, що були вирощені на покривних скельцях, промивали двічі PBS та інкубували в середовищі DMEM, що не містить FBS, при +37°C протягом 3 год. Потім клітини інкубували з кон'югованим Alexa Fluor 633 трансферином (50 мг/мл) протягом 30 хв при +37°C. Після інкубації клітини промивали два рази PBS, фіксували 4% формальдегідом та проводили імуофлуоресцентний аналіз, як описано вище.

2.25. Візуалізація та підрахунок філоподієподібних виростів

Через 24 год трансфіковані клітини лінії 293, що були вирощені на покривних скельцях, промивали 2 рази PBS, фіксували 4% формальдегідом та проводили імуофлуоресцентний аналіз, як описано вище. Філоподієподібні вирости було візуалізовано за допомогою фалоїдину, кон'югованого з Alexa Fluor 555. Кількість філоподієподібних структур на клітину було обчислено за допомогою плагіну FiloQuant з використанням програмного забезпечення

ImageJ [161]. Статистичний аналіз та візуалізація даних проводились в MS Excel або OriginPro 9.1.

2.26. Аналіз колокалізації білків

Для кількісної оцінки колокалізації між двома білками використовували коефіцієнт кореляції Спірмена, який розраховували за допомогою плагіну колокалізації PSC (Pearson-Spearman correlation) з використанням програмного забезпечення ImageJ 1.37c, згідно з процедурою, описаною в статті *Френча та ін.* [162]. Розрахунок коефіцієнту кореляції Спірмена проводили за всією площею клітини.

Графіки інтенсивності сигналу відображають інтенсивність флуоресценції для пікселів вздовж ліній 2,0–2,5 мкм, які були побудовані за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

2.27. Статистична обробка даних

Всі дані наведено як середнє арифметичне значення \pm стандартне відхилення. Статистичну обробку даних проводили із використанням програмного забезпечення MS Excel («Microsoft») або OriginPro 9.1 («OriginLab Corporation», США). Для порівняння двох вибірок спочатку перевіряли їх на нормальність розподілу за *W*-критерієм Шапіро-Уїлка. Статистичний аналіз нормально розподілених двох груп проводили за допомогою *t*-тесту, трьох і більше вибірок проводили за допомогою One-Way ANOVA з наступним тестом Фішера. Статистичний аналіз ненормально розподілених двох вибірок проводили за допомогою критерію Манна-Уїтні. В усіх випадках достовірною вважалася різниця між групами при $p < 0.05$.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Ідентифікація та характеристика взаємодій ITSN1 і ITSN2 людини з актин-регулюючим білком WIP

Як було зазначено у огляді літератури, інтерсектини (ITSN1 та ITSN2) та верпроліни (WIP, CR16) залучені до регуляції N-WASP/Arp2/3-залежних перебудов актинового цитоскелету, які відіграють ключову роль в клітинній інвазії. Взаємодії між представниками вище зазначених родин невідомі. Отже, як перший крок у напрямку з'ясування нових молекулярних зв'язків у N-WASP/Arp2/3-залежних перебудовах актинового цитоскелету, ми вирішили дослідити взаємодію інтерсектинів з білком WIP, який є конститутивним партнером N-WASP та відіграє важливу роль у формуванні та функціонуванні інвадоподій.

3.1.1. WIP та ITSN1 формують комплекс у клітинах. За допомогою сервісу Scansite (www.scansite.mit.edu) нами було передбачено зв'язування пролін-збагачених ділянок регулятора полімеризації актину WIP із SH3-вмісним адаптерним білком інтерсектином 1.

3.1.1.1. Взаємодія WIP з адаптерним білком ITSN1. Для експериментального підтвердження взаємодії між ITSN1 та WIP було проведено їх коїмунопреципітацію з лізатів головного мозку миші. За допомогою антитіл проти WIP було преципітовано ITSN1. Результати коїмунопреципітації свідчать, що WIP взаємодіє як з короткою так і з довгою ізоформами ITSN1 (рис. 3.1 *a*).

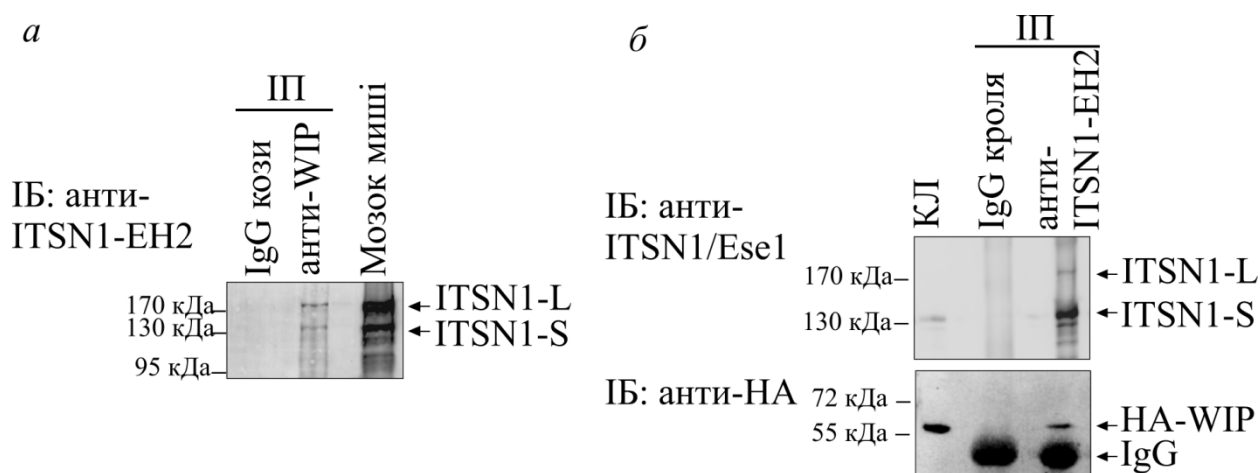


Рис. 3.1. ITSN1 та WIP формують комплекс. Вестерн-блот аналіз білків, преципітованих за допомогою анти-WIP антитіл з лізату головного мозку миші (а) або анти-ITSN1-EH2 антитіл з лізату клітин 293, що експресували HA-WIP (б). Ендогенні WIP та ITSN1 детектували анти-WIP та анти-ITSN1-EH2 антитілами, HA-WIP детектували анти-HA антитілами. IgG кози та IgG кроля було використано як негативний контроль

Ці дані також було підтверджено коімунопреципітацією рекомбінантного HA-WIP з ендогенним ITSN1. Для цього кодуючу послідовність білка WIP було клоновано у вектор для експресії в клітинах еукаріот, що містив HA-таг. Рекомбінантний білок HA-WIP було експресовано в клітинах лінії 293 та використано для дослідження взаємодій *in vitro*. Клітини 293, з короткотривалою експресією HA-WIP, лізували та використовували для коімунопреципітації за допомогою поліклональних антитіл, специфічних до EH2-домену ITSN1 (анти-ITSN1-EH2), які були отримані співробітниками відділу раніше [155]. Отримані імунопреципітати містили як ендогенні ITSN1-S та ITSN1-L, так і рекомбінантний HA-WIP (рис. 3.1 б). В якості контролю було використано неспецифічні імуноглобуліни кроля. Таким чином, отримані результати свідчать про те, що ITSN1 та WIP є компонентами спільних білкових комплексів.

3.1.1.2. Взаємодія білків ITSN1 та WIP *in vitro*. Раніше було показано, що у клітинах WIP знаходиться у міцному комплексі зі своїми конститутивними

партнерами – білками WASP або N-WASP [96, 101]. Було також продемонстровано, що N-WASP безпосередньо зв'язується з SH3-доменами ITSN1 для відновлення його гуаніннуклеотид-обмінної активності (обмін ГДФ на ГТФ) на малій ГТФазі Cdc42 [15]. Оскільки N-WASP може взаємодіяти як з ITSN1 так і з WIP, ми перевірили чи можуть білки ITSN1 та WIP зв'язуватись безпосередньо, або їх взаємодія опосередкована білком N-WASP. Для аналізу прямої взаємодії було використано преципітацію двох афінно очищених рекомбінантних білків. Оскільки WIP містить численні пролін-збагачені мотиви, які специфічно взаємодіють з SH3 доменами білків-партнерів, для експерименту було застосовано тільки SH3-домени ITSN1. Фрагмент кДНК, що кодує послідовність п'яти SH3(A-E) доменів ITSN1 було клоновано у векторі для бактеріальної експресії, що містить GST-таг (GST-ITSN1-SH3(A-E)). Послідовність кДНК WIP було клоновано у векторі для бактеріальної експресії, що містив His-таг. Рекомбінантні білки GST-ITSN1-SH3(A-E) та WIP-6xHis було експресовано в клітинах *E.coli*, афінно очищено за допомогою глутатіон-сефарози і Ni-NTA агарози, та використано в дослідженні взаємодій *in vitro*. Результати показали, що GST-злиті SH3-домени ITSN1 зв'язують рекомбінантний WIP-6xHis (рис. 3.2).

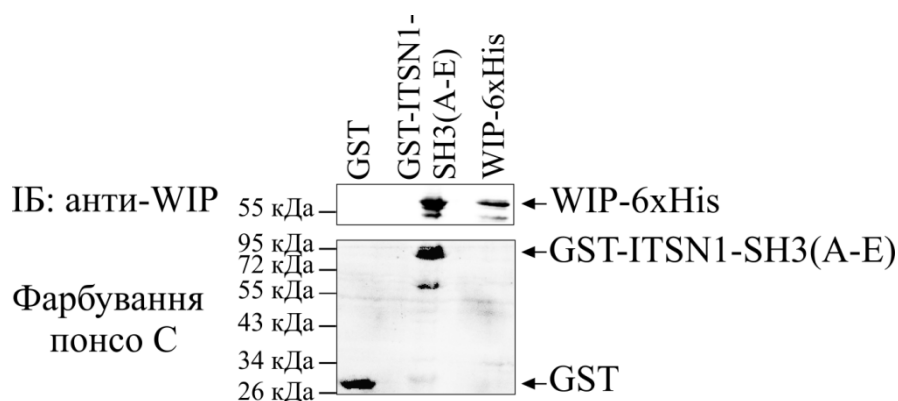


Рис. 3.2. Пряма взаємодія між ITSN1 та WIP. Імобілізовані на сорбенті білки GST (контроль) або GST-ITSN1-SH3(A-E) інкубували з афінно очищеним рекомбінантним білком WIP-6xHis. Преципітовані білки детектували антитілами анти-WIP, GST-злиті білки було візуалізовано за допомогою фарбування понсо С

Отримані дані вказують на те, що SH3(A-E)-домени ITSN1 та WIP взаємодіють напряму, а не опосередковано через N-WASP або інші білки-партнери.

3.1.1.3. Внутрішньоклітинна локалізація комплексу ITSN1/WIP. Білки, що спільно беруть участь у клітинних процесах, повинні колокалізуватися в одному компартменті клітини. Для того, щоб встановити, в яких компартментах може функціонувати ITSN1/WIP комплекс, ми дослідили внутрішньоклітинну локалізацію цих білків. Відомо, що ITSN1 знаходиться в клатрин-вмісних структурах на плазматичній мембрані [15], що мають вигляд дискретних точок при аналізі за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії. Ми перевірили, чи знаходяться рекомбінантні білки HA-WIP та флуоресцентно мічений за допомогою тагу mCherry ITSN1-S в цих структурах, використовуючи легкий ланцюг клатрину з GFP-міткою як маркер клатрин-облямованих пухирців (рис. 3.3).

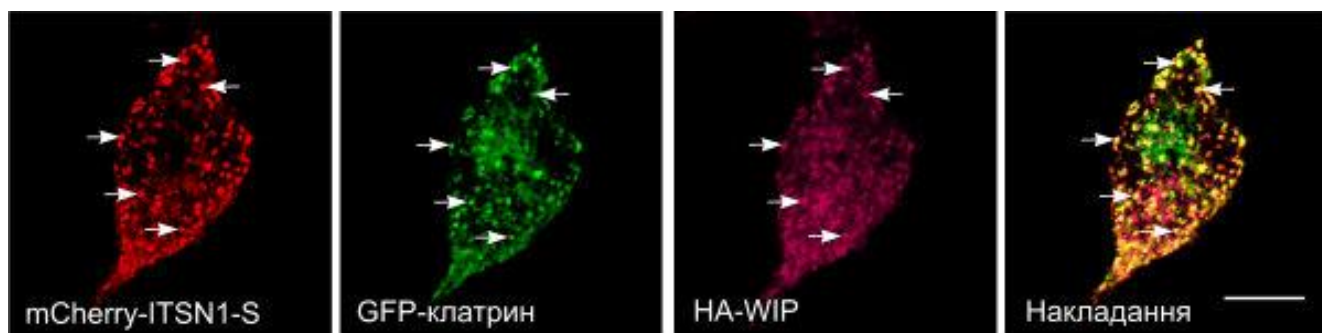


Рис. 3.3. Колокалізація ITSN1 та WIP в облямованих клатрином пухирцях. Клітини лінії NIH3T3 було котрансфіковано mCherry-ITSN1-S, HA-WIP та GFP-клатрином. WIP було детектовано за допомогою антитіл, специфічних до HA-тагу з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-633. GFP-клатрин та mCherry-ITSN1-S було візуалізовано прямою детекцією відповідних флуоресцентних білків. Масштабний відрізок – 10 мкм

Отримані дані показали перекривання сигналів трьох рекомбінантних білків, що вказує на колокалізацію ITSN1 та WIP в клатрин-облямованих пухирцях.

Відомо, що WIP є одним із ключових білків інвадоподій [92, 97]. Було показано, що WIP взаємодіє та колокалізується з кортактином [6]. Кортактин та WIP функціонують як регулятори перебудов кортикального актину, який відіграє вирішальну роль у процесах міграції та інвазії клітин. Кортактин локалізується на плазматичній мембрані в ділянках активних перебудов актинового цитоскелету і є одним з маркерів інвадоподій [143]. Тому для подальшого дослідження розташування ендогенних білків ITSN1 та WIP було обрано інвазивну клітинну лінію гліобластоми людини U87-MG, що здатна утворювати інвадоподії. Імунофлуоресцентний аналіз із використанням анти-ITSN1-ЕН2 та анти-WIP антитіл показав, що ендогенні досліджувані білки колокалізуються в клітинах даної лінії як між собою, так і з кортактином (рис. 3.4).

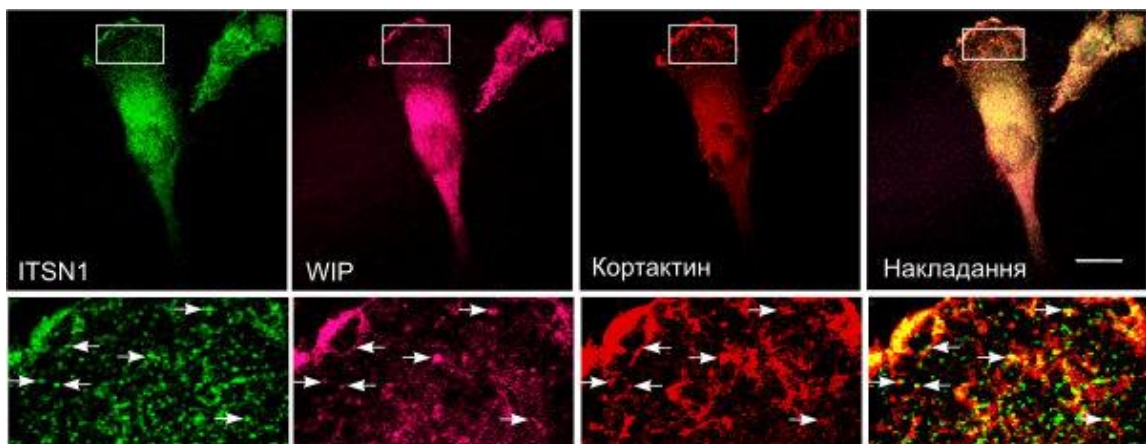


Рис. 3.4. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації ендогенних білків ITSN1, WIP та кортактина. Клітини лінії U87-MG висівали на покриті фібронектином скельця, через 24 години фіксували та використовували для імунофлуоресцентного аналізу. Ендогенні білки ITSN1, WIP та кортактин було детектовано за допомогою анти-ITSN1-ЕН2, анти-WIP та анти-кортактин антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з DyLight 488, Alexa Fluor 633 та Texas Red, відповідно. Масштабний відрізок – 10 мкм

Отже, отримані результати свідчать, що ITSN1 і WIP колокалізуються в клатрин-вмісних структурах та ділянках активних перебудов кортикального актинового цитоскелету.

3.1.1.4. Картування сайту взаємодії WIP на ITSN1. Визначальною рисою адаптерних білків є наявність декількох доменів, що забезпечують білок-білкові взаємодії. Основною функцією білків цього класу є утворення великих мультибілкових комплексів, які відповідають за правильне функціонування клітинних каскадів [163]. Центральною платформою, що забезпечує білкові взаємодії адаптерного білка ITSN1 є тандем із 5 доменів SH3, які забезпечують асоціацію з 31 із 45 відомих білків-партнерів. Для дослідження зв'язування окремих SH3-доменів ITSN1 з WIP *in vitro* було використано преципітацію GST-злитих білків (рис. 3.5).

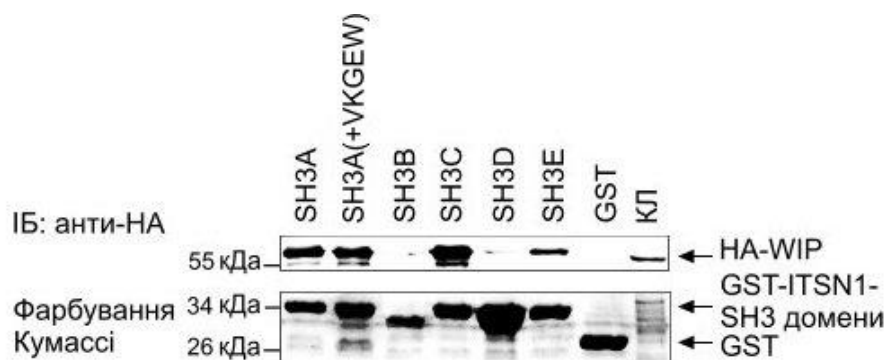


Рис. 3.5. Аналіз взаємодії SH3-доменів ITSN1 з WIP *in vitro*. Імобілізовані на сорбенті білки GST (контроль) або GST-SH3-домени ITSN1 інкубували з лізатом клітин 293, які експресували HA-WIP. Преципітовані білки детектували анти-НА антитілами, GST-злиті білки було візуалізовано фарбуванням Кумассі

Раніше в нашому відділі було клоновано послідовності кДНК окремих доменів SH3 ITSN1 (SH3A, SH3B, SH3C, SH3D та SH3E) за допомогою вектора для бактеріальної експресії, що містив GST-таг [157]. Відповідні рекомбінантні білки було експресовано в клітинах *E.coli*. З огляду на те, що нейрональна

інсерція 5 амінокислотних залишків (VKGEW), які кодуються 20-м екзоном, змінює структуру SH3A-домену ITSN1 та впливає на специфічність зв'язування з білками-партнерами було використано обидва варіанта SH3A домена – присутній у всіх тканинах (SH3A) та нейрон-специфічний (SH3A(+VKGEW)). Імобілізовані на глутатіон-сефарози GST-злиті SH3 домени інкубували з лізатами клітин 293, які експресували HA-WIP. Результати преципітації виявили, що WIP взаємодіє з доменами SH3A(+VKGEW), SH3A, SH3C та SH3E ITSN1.

3.1.1.5. Картування фрагменту білка WIP, що забезпечує взаємодію з ITSN1. Доменна структура WIP людини складається з N-кінцевого VH-домену, центральної пролін-збагаченої ділянки (ПЗД), С-кінцевого N-WASP-зв'язуючого домена (WBD) та трьох мотивів, що взаємодіють з профіліном (ABM-2) (рис. 3.6).

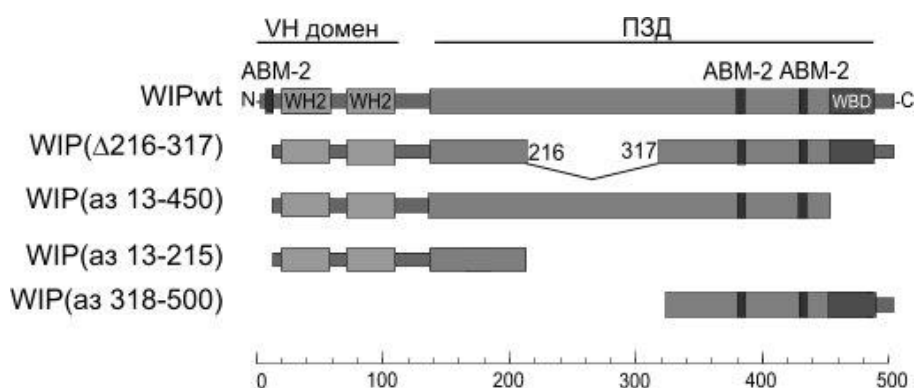


Рис. 3.6. Схематичне зображення структури повнорозмірного WIP (WIPwt) та делеційних конструкцій WIP

Пролін-збагачена ділянка білка WIP взаємодіє з SH3-доменами адаптерних білків (Nck та Crkl), кіназ (Syk та PKC θ) та білками, що зв'язуються з актином, такими як кортактин та Acp1 [164, 165]. Для визначення пролін-збагачених мотивів у структурі WIP, які складають інтерфейс взаємодії з ITSN1, було отримано делеційні конструкції WIP, які експресували в клітинах ссавців (рис. 3.6). В делеційній конструкції WIP(Δ 216-317) відсутній 101 амінокислотний залишок у центральній частині ПЗД з 216 по 317 позицію. Конструкція WIP(аз 13-

450) не містить WBD-домен, який забезпечує взаємодію з білком N-WASP. Делеційна конструкція WIP(аз 13-215) складається із VH-домену та N-кінцевої частини ПЗД, що забезпечує взаємодію з кортактином. Конструкція WIP(аз 318-500) містить тільки С-кінцеву частину ПЗД.

Повнорозмірний WIP (WIPwt) та отримані делеційні конструкції із НА-тагом було використано для трансфекції клітин лінії 293 і для подальшого дослідження їх взаємодій з тандемом із п'яти GST-SH3(A-E)-доменів ITSN1. Результати преципітації з використанням GST-злитих білків показали, що SH3-домени ITSN1 зв'язують WIP(Δ 216-317), WIP(аз 318-500) та повнорозмірний WIPwt (який використовували у якості позитивного контролю), тоді як взаємодію SH3(A-E)-доменів ITSN1 з конструкцією WIP(аз 13-215) не було виявлено (рис. 3.7).

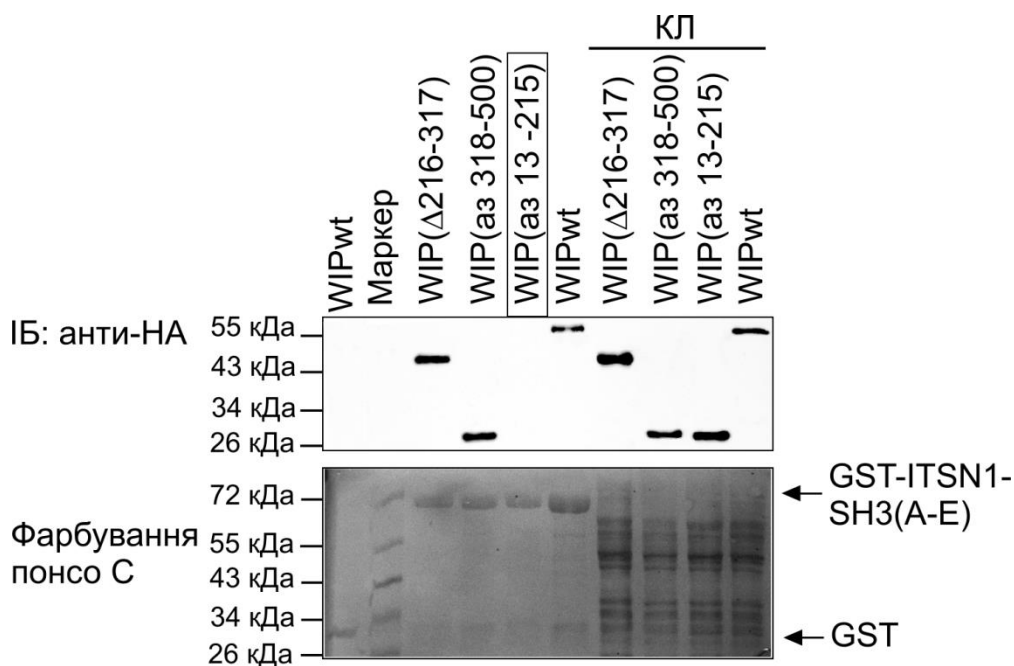


Рис. 3.7. Аналіз взаємодії SH3(A-E)-доменів ITSN1 з делеційними конструкціями WIP(аз 13-215), WIP(аз 318-500), WIP(Δ 216-317) та WIP(wt). Зв'язані з глутатіон-сефарозою білки GST (контроль) або GST-SH3(A-E)-домени ITSN1 інкубували з лізатами клітин 293, які експресували WIPwt, WIP(аз 13-215), WIP(аз 318-500) або WIP(Δ 216-317). Преципітовані білки детектували анти-НА антитілами. GST-злиті білки детектували за допомогою фарбування понсо С

Далі було продемонстровано, що конструкція WIP(аз 13-450) також формує комплекс з SH3(A-E)-доменами ITSN1, що слугує додатковим доказом того, що взаємодія між білками ITSN1 та WIP не опосередкована білком N-WASP (рис. 3.8).

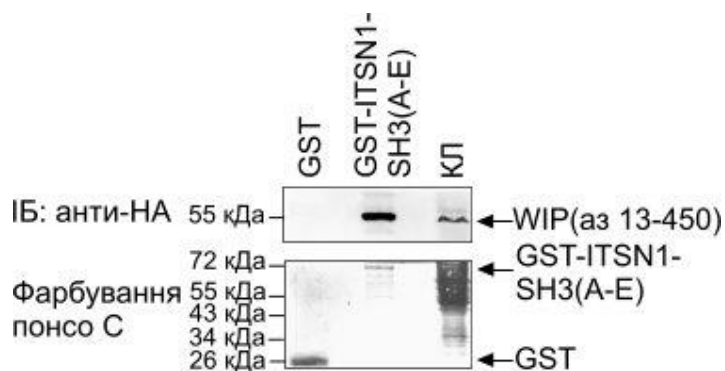


Рис. 3.8. Аналіз взаємодії SH3(A-E)-доменів ITSN1 з делеційною конструкцією WIP(аз 13-450). Імобілізовані на сорбенті GST або GST-SH3(A-E)-домени ITSN1 інкубували з лізатом клітин 293, які експресували HA-WIP(аз 13-450). Преципітовані білки детектували антитілами проти HA-тагу. GST-злиті білки детектували за допомогою фарбування понсо С

Отримані дані вказують на те, що амінокислотні залишки 318-450 є важливими для взаємодії з ITSN1, тоді як амінокислотні залишки 216-317 та 450-503 не є критичними для взаємодії досліджуваних білків.

3.1.2. Комплекс WIP/ITSN1/N-WASP. Отримані нами результати свідчать, що ITSN1 є асоційованим в клітині з WIP. Раніше було показано, що білки WIP та WASP формують комплекс в клітині, при розпаді якого WASP зазнає протеолітичної деградації [96]. З огляду на те, що ITSN1 та N-WASP взаємодіють з білком WIP та зв'язують різні його пролін-збагачені мотиви, ми припустити можливість існування потрійного комплексу між WIP, ITSN1 та N-WASP.

3.1.2.1. Формування комплексу між WIP, ITSN1 і N-WASP. Для перевірки даного припущення було проведено коімунопреципітацію ендogenous білків WIP, N-WASP та ITSN1 з лізатів клітин раку молочної залози MDA-MB-231. Клітини інвазивної лінії MDA-MB-231 було обрано для експерименту, тому що вони характеризуються збільшеною експресією білків WIP та N-WASP порівняно з клітинами неінвазивних ліній [97]. За допомогою антитіл проти WIP було преципітовано ендogenous білки N-WASP та коротку ізоформу ITSN1-S (рис. 3.9 а).

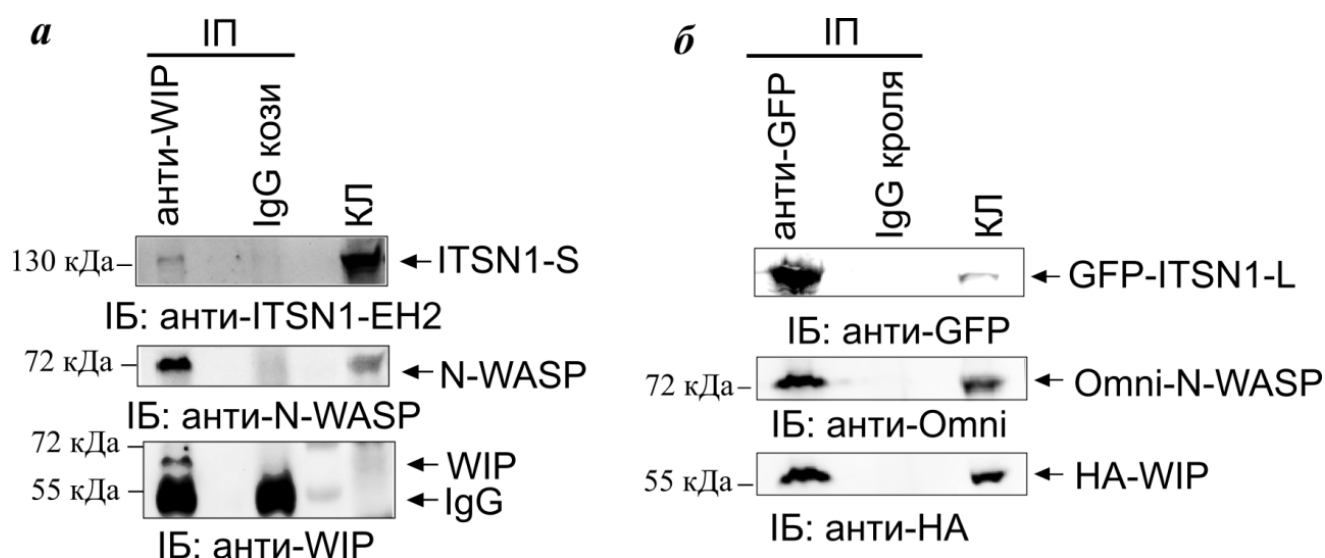


Рис. 3.9. Вестерн-блот аналіз комплексу ендogenous білків ITSN1-S, N-WASP та WIP, преципітованих за допомогою анти-WIP антитіл (а) та рекомбінантних білків GFP-ITSN1-L, Omni-N-WASP та HA-WIP, преципітованих за допомогою анти-GFP антитіл (б) з лізатів клітин MDA-MB-231. Ендogenous білки детектували анти-ITSN1, анти-N-WASP та анти-WIP антитілами. Білки GFP-ITSN1-L, Omni-N-WASP та HA-WIP детектували антитілами проти GFP, Omni та HA, відповідно. Нормальна сировотка кози та кроля була використана як негативний контроль

Довга ізоформа ITSN1-L також взаємодіє з комплексом WIP/N-WASP. Використовуючи коімунопреципітацію з рекомбінантним білками GFP-ITSN1-L,

Omni-N-WASP та HA-WIP було детектовано білки N-WASP та WIP у складі імунопреципітатів, отриманих за допомогою антитіл проти GFP (рис. 3.9 б).

Для дослідження внутрішньоклітинної локалізації комплексу ITSN1/WIP/N-WASP нами було використано імуофлуоресцентний аналіз на клітинах лінії MDA-MB-231, які було котрансфіковано трьома плазмідними конструкціями, що кодували HA-WIP, Omni-N-WASP та mCherry-ITSN1. Отримані дані показали перекривання сигналів трьох досліджуваних білків у цитоплазмі та на плазматичній мембрані (рис. 3.10).

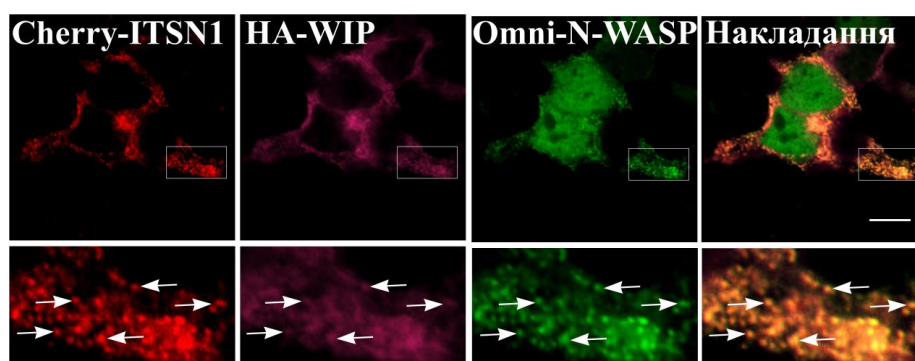


Рис. 3.10. Імуофлуоресцентний аналіз колокалізації ITSN1, WIP та N-WASP. Клітини лінії MDA-MB-231 було котрансфіковано mCherry-ITSN1, HA-WIP та Omni-N-WASP. Білки WIP та N-WASP було детектовано за допомогою анти-НА та анти-Omni антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-633 та Alexa Fluor-488 відповідно. mCherry-ITSN1-S було візуалізовано прямою детекцією флуоресцентних білків. Масштабний відрізок – 10 мкм

Таким чином, отримані результати свідчать, що ITSN1, N-WASP та WIP є компонентами спільних білкових комплексів, що відкриває перспективи для подальшого вивчення функціональних наслідків їхньої взаємодії.

3.1.2.2. WIP сприяє взаємодії N-WASP з доменами SH3 ITSN1. Відомо, що білок N-WASP взаємодіє з доменами SH3A, SH3C та SH3E інтерсектину 1

[15]. Отримані нами результати виявили, що WIP зв'язується з тими ж SH3-доменами ITSN1. Оскільки білки WIP та N-WASP переважно знаходяться в комплексі і взаємодіють з однаковими SH3-доменами ITSN1, ми перевірили чи конкурують ці білки за сайти зв'язування з інтерсектином 1. Для цього ми використали експеримент *in vitro* з GST-злитими SH3(A-E)-доменами ITSN1, які інкубували з лізатами клітин лінії 293, що експресували Omni-N-WASP та HA-WIP разом, або кожний з двох білків окремо з порожнім вектором, який використовували в якості контролю. Результати преципітації показали, що при наявності N-WASP взаємодія WIP з ITSN1 знизилась майже вдвічі (рис. 3.11, ліва панель; рис. 3.12 a).

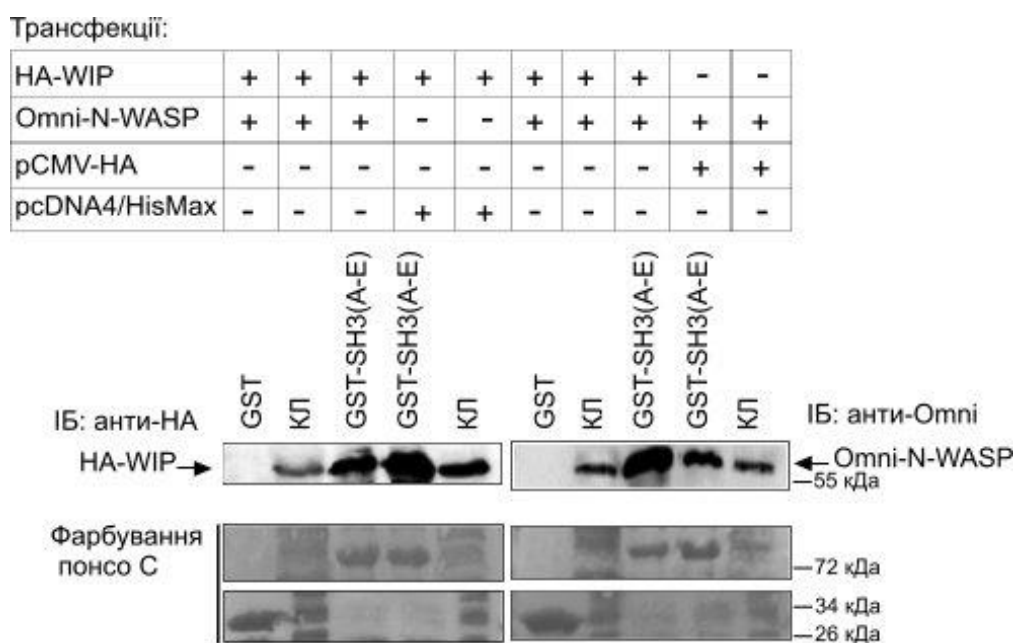


Рис. 3.11. WIP сприяє взаємодії N-WASP з SH3-доменами ITSN1 *in vitro*. Імобілізовані на сорбенті білки GST-SH3(A-E)-домени ITSN1 або GST інкубували з лізатами клітин 293, які коекспресували HA-WIP/pCDNA, HA-WIP/Omni-N-WASP або Omni-N-WASP/pCMV-HA. Преципітовані білки WIP та N-WASP детектували антитілами анти-HA та анти-Omni, відповідно

Одержані результати свідчать про конкуренцію між білками N-WASP та WIP за сайти зв'язування з ITSN1. Навпаки, взаємодія N-WASP з ITSN1 за умов

відсутності WIP значно зменшилась (рис. 3.11, права панель). Кількість білку N-WASP, яка зв'язується з SH3-доменами ITSN1 за умов відсутності WIP в шість раз менша порівняно з кількістю зв'язаного N-WASP, який було коекспресовано разом з WIP (рис. 3.12 б).

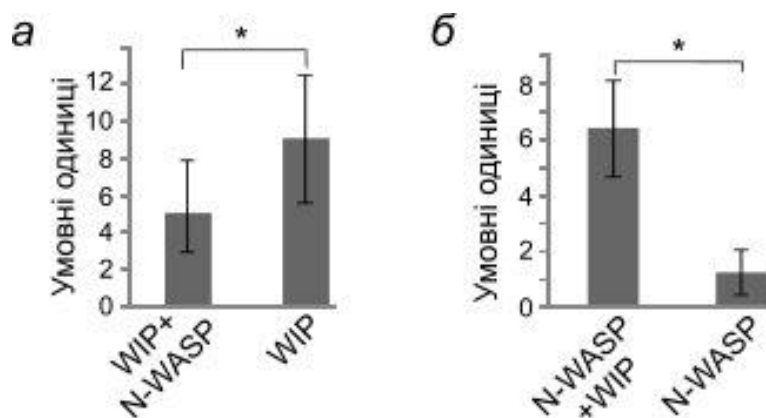


Рис. 3.12. Кількісна оцінка результатів, відображених на рис. 3.11. Діаграма демонструє інтенсивність сигналів WIP (а) та N-WASP (б), які було нормалізовано до пулу зв'язаних з ними SH3-доменів ITSN1. Статистичний аналіз результатів проводився за допомогою *t*-тесту * - $p < 0.05$

Таким чином, WIP збільшує кількість N-WASP зв'язаного з SH3-доменами ITSN1 за умов *in vitro*. Отримані результати узгоджуються з даними, що WIP є шапероном білку N-WASP та захищає його від деградації [7]. З іншого боку, взаємодія WIP з N-WASP може призводити до зміни конформації останнього, що забезпечує його більш ефективно зв'язування з інтерсектином 1.

Неочікувано, що взаємодія між WIP та ITSN1 за відсутності N-WASP значно краще ніж при наявності N-WASP. Цей факт може свідчити про блокування білком N-WASP сайтів зв'язування WIP з ITSN1, але в свою чергу WIP збільшує рівень зв'язування N-WASP з ITSN1. Отже, можливим поясненням може бути те, що у складі потрійного комплексу ITSN1/N-WASP/WIP, білок N-WASP прямо взаємодіє з SH3-доменами ITSN1, а WIP – опосередковано.

3.1.3. Функції комплексу ITSN1/WIP у клітині. Ми показали, що ITSN1 і WIP є білками-партнерами. Тому наступним етапом нашої роботи було визначення функціональної ролі комплексу ITSN1/WIP у клітині.

3.1.3.1. Вплив комплексу ITSN1-L/WIP на внутрішньоклітинний розподіл трансферину. Відомо, що ITSN1 відіграє важливу роль в ендоцитозі. Як надпродукція, так і зниження кількості цього адаптерного білка призводить до порушення рівня інтерналізації шляхом клатрин-опосередкованого ендоцитозу в різних типах клітин [22, 25, 43, 44]. Було показано, що WIP також бере участь в ендоцитозі, зменшення його кількості знижує рівень поглинання трансферину в клітинах лінії MDA-MB-231 [166]. За допомогою імуофлуоресцентного аналізу нами було виявлено колокалізацію ITSN1 та WIP з клатрином (рис 3.3), що вказує на можливу спільну функцію досліджуваних білків у клатрин-опосередкованому ендоцитозі. З метою перевірки цього припущення, було проаналізовано вплив комплексу ITSN1/WIP на ендоцитоз за допомогою аналізу інтерналізації рецептора трансферину. Відомо, що інтерналізація рецептора трансферину відбувається клатрин-залежним шляхом [167]. В експерименті ми використали флуоресцентно мічений трансферин. Клітини лінії 293 були котрансфіковані Omni-ITSN1-L і HA-WIP або кожним із білків окремо разом з порожнім вектором в якості контролю (Omni-ITSN1-L/pCMV-HA та HA-WIP/pCDNA4). Отримані результати свідчать, що $79.0 \pm 6.3\%$ контрольних (нетрансфікованих) клітин мають навколоядерне накопичення трансферину, що вказує на нормальну інтерналізацію цього рецептора. Навпаки, в клітинах з надекспресованими Omni-ITSN1-L (рис. 3.13 *a*) або HA-WIP (рис. 3.13 *б*) трансферин був диспергований по цитоплазмі. Тільки $32.4 \pm 8.6\%$ клітин з Omni-ITSN1-L та $28.4 \pm 2.7\%$ клітин з HA-WIP зберігали перинуклеарне розташування трансферину (рис. 3.13 *г*). Отримані дані вказують на те, що збільшення кількості ITSN1-L або WIP в клітині призводить до порушення везикулярного транспорту трансферину порівняно з контрольними клітинами. Несподівано, але комплекс ITSN1-L/WIP може відновлювати інтерналізацію рецептора трансферину. При одночасному збільшенні кількості

рекомбінантних білків ITSN1-L та WIP, $80.5 \pm 1.4\%$ клітин мають навколоядерне накопичення трансферину, що відповідає значенню контрольних клітин (рис. 3.13 з).

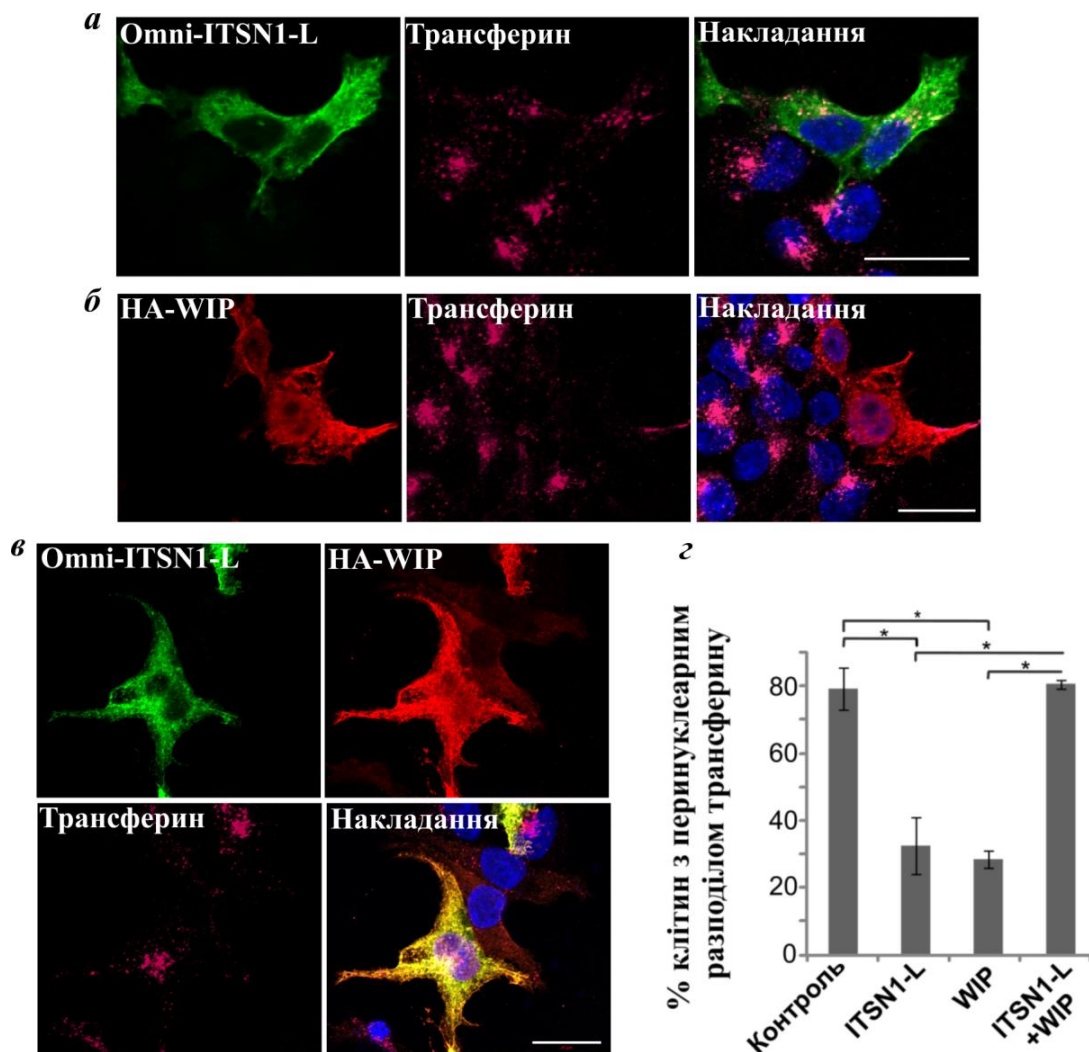


Рис. 3.13. Вплив ITSN1/WIP комплексу на внутрішньоклітинне розташування трансферину. Клітини лінії 293 було котрансфіковано: *a* – Omni-ITSN1-L та pCMV-HA; *б* – HA-WIP та pcDNA4; *в* – Omni-ITSN1-L та HA-WIP. Білки ITSN1 та WIP було детектовано анти-Omni та анти-HA антитілами з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-488 та Alexa Fluor-555, відповідно. Трансферин, кон'югований з Alexa Fluor-633 детектовано прямою флуоресценцією; *з* – графік відображає % клітин з перинуклеарним розподілом трансферину. * - $p < 0.05$ за One-Way ANOVA з наступним тестом Фішера. Масштабний відрізок – 20 мкм

Таким чином, отримані дані свідчать про можливу участь комплексу ITSN1-L/WIP у регуляції везикулярного транспорту рецептора трансферину.

3.1.3.2. ITSN1-L рекрутує WIP до RAB4-позитивних везикул. Одержані результати демонструють, що комплекс ITSN1/WIP є асоційований із везикулярним транспортом, проте незрозуміло, до якого етапу цього процесу він залучений. Внутрішньоклітинний перерозподіл трансферину відбувається кількома шляхами, одним із яких є RAB4-залежні ранні ендосоми [168, 169]. Вважається, що RAB4 контролює сортування вантажу шляхом швидкої рециркуляції. Під рециркуляцією ендосом розуміється повернення поглиненого вантажу (ділянок мембрани, в тому числі і рецепторів) назад на плазматичну мембрану клітини.

За допомогою імунофлуоресцентного аналізу дослідили колокалізацію ITSN1 і WIP з маркером рециркулюючих ендосом ГТФазою RAB4, флуоресцентно міченою GFP. Отримані результати із використанням анти-ITSN1 та анти-WIP антитіл виявили часткову колокалізацію ендогенних білків ITSN1 і WIP з GFP-RAB4 в клітинах раку молочної залози MCF-7 (рис. 3.14).

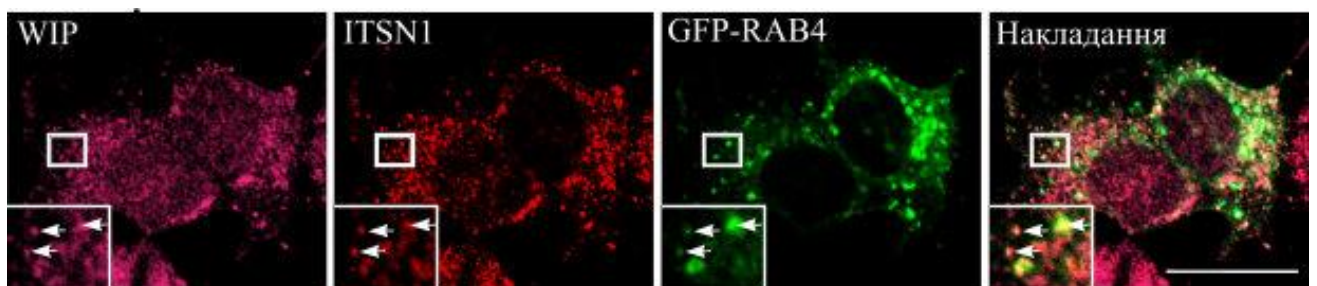


Рис. 3.14. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації ендогенних білків ITSN1 та WIP з GFP-RAB4. Клітини лінії MCF-7 було трансфіковано GFP-RAB4. Ендогенні білки ITSN1 та WIP було детектовано за допомогою анти-ITSN1 та анти-WIP антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-555 та Alexa Fluor-633, відповідно. GFP-RAB4 було детектовано прямою флуоресценцією. Масштабний відрізок – 20 мкм

Далі ми перевірили вплив рекомбінантних білків Omni-ITSN1-L та HA-WIP на їх колокалізацію з GFP-RAB4. Цікаво, що надекспресовані Omni-ITSN1-L та GFP-RAB4 значною мірою колокалізувалися в клітинах лінії MCF-7 (коефіцієнт кореляції Спірмена склав 0.71 ± 0.13 , $n=60$; рис. 3.15 *a*), тоді як колокалізація HA-WIP та GFP-RAB4 була практично відсутня, коефіцієнт кореляції Спірмена склав 0.18 ± 0.11 , $n=60$ (рис. 3.15 *б*).

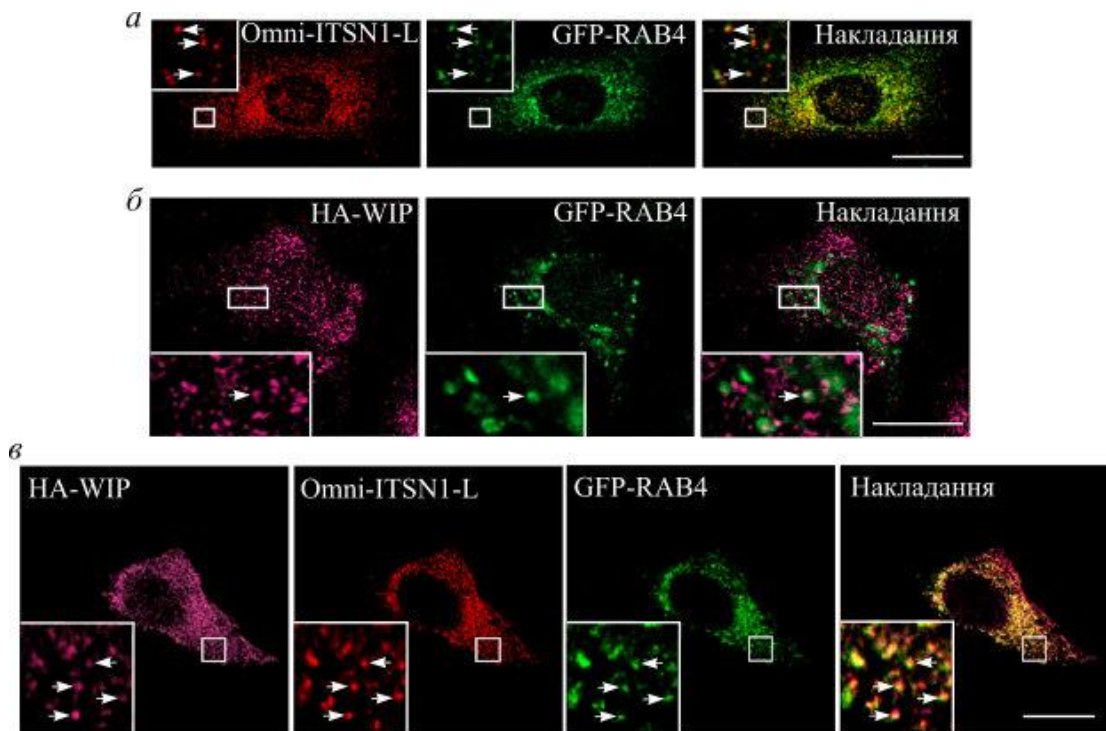


Рис. 3.15. Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної колокалізації надекспресованих ITSN1, WIP та RAB4. Клітини лінії MCF-7 було котрансфіковано: *a* – Omni-ITSN1-L та GFP-RAB4; *б* – HA-WIP та GFP-RAB4; *в* – Omni-ITSN1-L, HA-WIP та GFP-RAB4. Білки ITSN1 та WIP було детектовано за допомогою анти-Omni та анти-HA антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-555 та Alexa Fluor-633, відповідно. Масштабний відрізок – 20 мкм

Проте, при котрансфекції Omni-ITSN1-L, HA-WIP та GFP-RAB4 відбувається значна колокалізація всіх трьох досліджуваних білків, що

підтверджує гіпотезу про взаємодію RAB4 із комплексом ITSN1-L/WIP (рис. 3.15 в). Ми спостерігали збільшення у 3,4 рази колокалізації HA-WIP з GFP-RAB4 при одночасній коекспресії разом з Omni-ITSN1-L порівняно з клітинами, які коекспресують тільки HA-WIP і GFP-RAB4. Значення коефіцієнта кореляції Спірмена для білків HA-WIP та GFP-RAB4 у присутності Omni-ITSN1-L складало 0.61 ± 0.09 , $n=60$ (рис. 3.16).

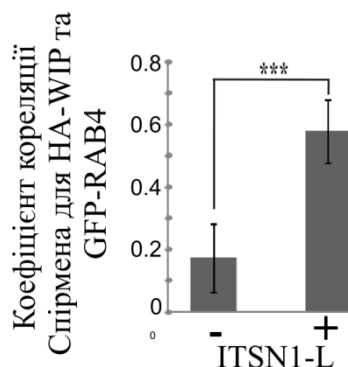


Рис. 3.16. Значення коефіцієнта кореляції Спірмена для колокалізації HA-WIP та GFP-RAB4 в клітинах, які додатково експресували Omni-ITSN1-L або порожній вектор (pcDNA/HisMax). Статистичний аналіз проводився за допомогою критерію Манна-Уїтні, *** – $p < 0.001$

Також подібний ефект збільшення колокалізації між HA-WIP та GFP-RAB4 ми спостерігали у присутності короткої ізоформи Omni-ITSN1-S (дані не представлені).

Отримані нами результати демонструють, що ITSN1 колокалізується з RAB4 та може рекрутувати WIP до RAB4-позитивних везикул. Таким чином, комплекс ITSN1/WIP є компонентом сигнального шляху, що регулюється ГТФазою RAB4.

3.1.3.3. Комплекс ITSN1/WIP/ β -актин. Всі процеси, що пов'язані з везикулярним транспортом, зокрема ендоцитоз, вимагають перебудов актинового цитоскелету [170, 171]. Білок WIP відіграє важливу роль в організації та регуляції

актинового цитоскелету. Відомо, що WIP безпосередньо зв'язується з G- та F-актином та регулює полімеризацію актину, опосередковану N-WASP та кортактином [7]. ITSN1 також бере участь у перебудовах актинового цитоскелету через взаємодію з білками Cdc42, N-WASP, WIP та CdGAP, але його прямої взаємодії з актином не було виявлено. Ми перевірили, чи впливає актин-зв'язуючий білок WIP на асоціацію інтерсектина 1 з актином. В еукаріотичних клітинах утворюються три ізоформи актину: α -, β - та γ -актин, які є тканино-специфічними та відрізняються внутрішньоклітинною локалізацією [172]. У нашій роботі ми вивчали цитоплазматичну ізоформу β -актину, яка відіграє важливу роль в таких ключових процесах, як адгезія, міграція, поляризація та цитокінез [173]. Для аналізу комплексу ITSN1/WIP/ β -актин було проведено преципітацію з використанням GST-злитих доменів SH3(A-E) ITSN1 та лізатів клітин 293, які були трансфіковані конструкціями HA-WIP або pCMV-HA. Результати преципітації демонструють відсутність зв'язування доменів SH3 ITSN1 з ендogenous β -актином у відсутності HA-WIP (рис. 3.17 а).

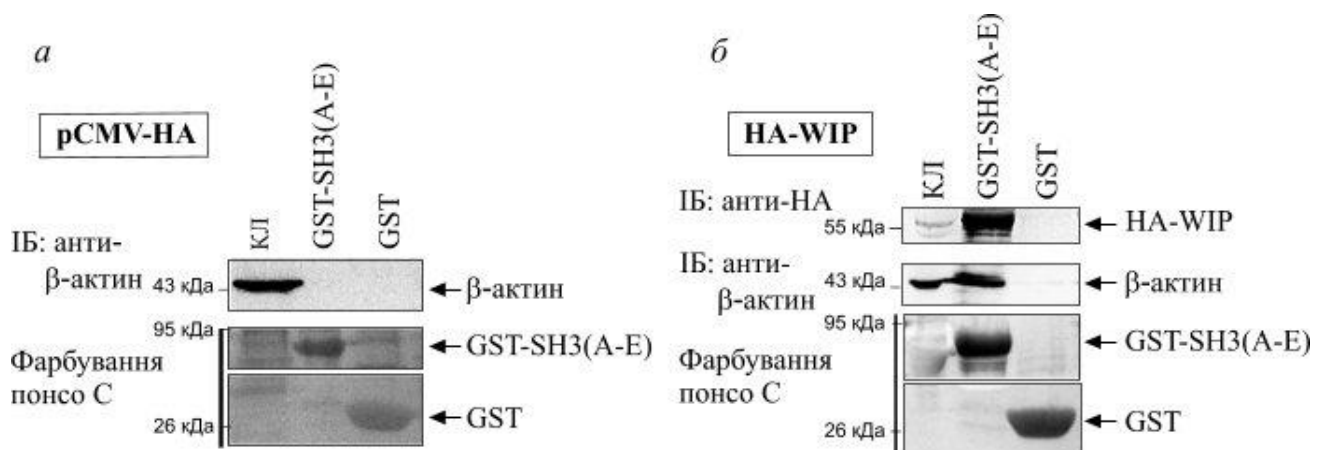


Рис. 3.17. Комплекс ITSN1/WIP/ β -актин. Вестерн-блот аналіз результатів преципітації доменів GST-SH3(A-E) ITSN1 з β -актином з лізатів клітин лінії 293, які були трансфіковані вектором без вставки pCMV-HA (а) або HA-WIP (б). Ендogenous актин та HA-WIP було детектовано анти- β -актин та анти-HA антитілами, відповідно. GST-злиті білки було візуалізовано фарбуванням за допомогою понсо С

Проте, у присутності надекспресованого HA-WIP, SH3-домени інтерсектину 1 взаємодіють із WIP, який формує комплекс з ендogenous β-актином (рис. 3.17 б). Таким чином, ITSN1 не заважає взаємодії WIP з β-актином, що свідчить про можливу роль комплексу ITSN1/WIP у перебудовах актинового цитоскелету.

3.1.3.4. Комплекс ITSN1-L/WIP стимулює утворення філоподієподібних виростів. Результати наших експериментів демонструють, що в клітині може існувати комплекс β-актин/WIP/ITSN1. Раніше було показано, що β-актин переважно знаходиться у ламелоподіях, міжклітинних адгезійних контактах, стрес-фібрилах та філоподіях [174]. Дані літератури свідчать, що надекспресія довгої ізоформи ITSN1 викликає полімеризацію актину та утворення філоподій у фібробластах, що також спостерігається у випадку експресії активованої Cdc42 [15]. Мікроін'єкція WIP також індукує утворення філоподій у фібробластах лінії NIH3T3 [5]. На підставі вищезазначеного ми перевірили, чи впливає комплекс ITSN1/WIP на формування філоподій. Для цього використали імунофлуоресцентний аналіз клітин лінії MCF-7, що були котрансфіковані наступними конструкціями GFP-ITSN1-L/HA-WIP, GFP-ITSN1-L/pCMV-HA, HA-WIP/pEGFP-C1 та pCMV-HA/pEGFP-C1. Вектори без вставок використовували в якості контролю. Філоподієподібні вирости детектували за допомогою кон'югованого з Alexa Fluor-555 фалоїдину, що здатний безпосередньо зв'язувати F-актинові фібрили та стабілізувати їх. Для підрахунку структур, що подібні до філоподій, було використано плагін «FiloQuant» для програми ImageJ [161]. Отримані результати свідчать, що контрольні клітини (трансфіковані векторами без вставок – pCMV-HA та pEGFP-C1) утворювали 5.2 ± 3.2 філоподієподібних виростів на клітину (рис. 3.18 а), тоді як клітини з надекспресією GFP-ITSN1-L (рис. 3.18 б) або HA-WIP (рис. 3.18 в) формували 18.3 ± 5.9 та 35.2 ± 9.8 філоподієподібних виростів, відповідно. Слід зазначити, що клітини з надекспресією HA-WIP утворювали вдвічі більше філоподієподібних виростів на клітину порівняно з клітинами, які експресували ITSN1-L.

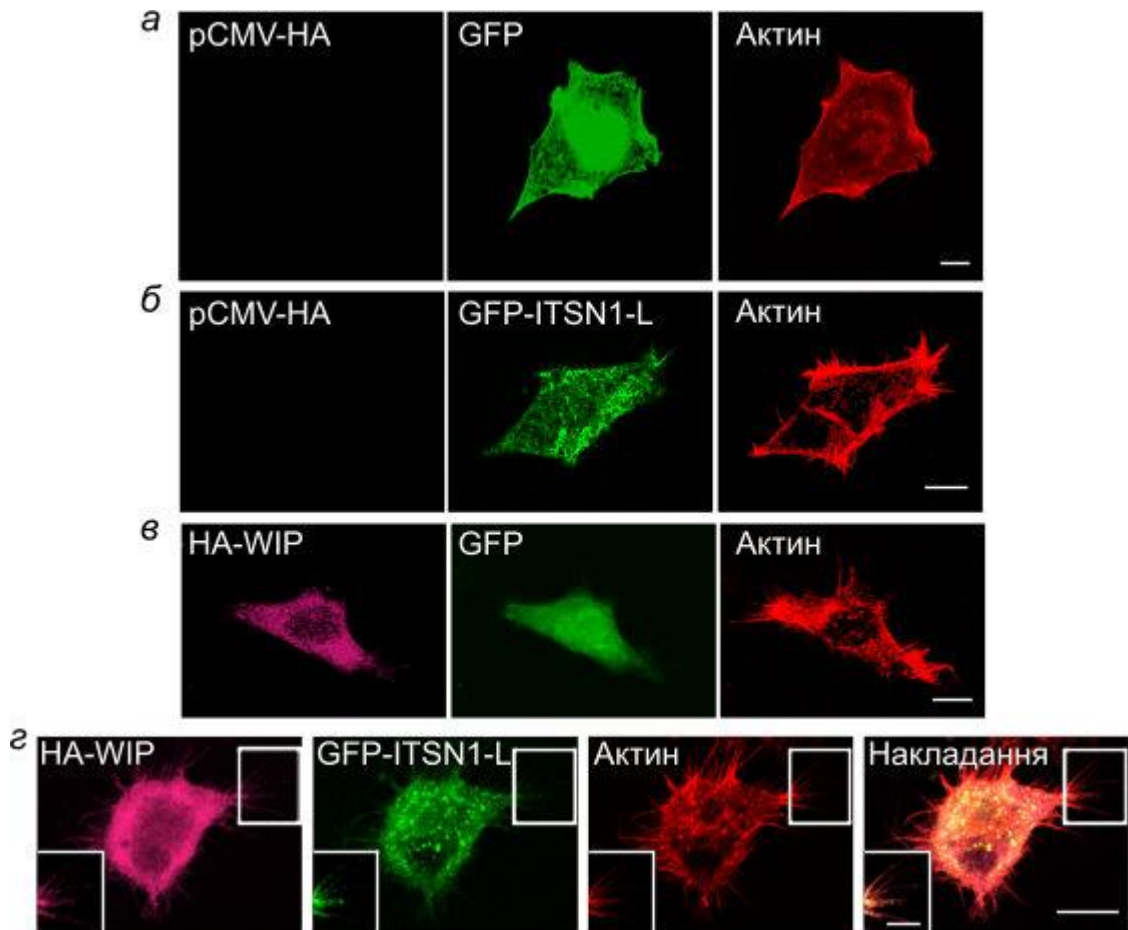


Рис. 3.18. Надекспресія комплексу ITSN1-L/WIP сприяє утворенню філоподієподібних виростів. Клітини лінії MCF-7 було котрансфіковано: *a* – pCMV-HA та pEGFP-C; *б* – GFP-ITSN1-L та pCMV-HA; *в* – HA-WIP та pEGFP-C; *г* – GFP-ITSN1-L та HA-WIP. GFP-ITSN1-L було детектовано прямою флуоресценцією. HA-WIP було детектовано за допомогою анти-HA антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-633. F-актин візуалізували за допомогою фалоїдину, кон'югованого з Alexa Fluor-555. Масштабний відрізок – 20 мкм

Клітини, що одночасно експресували GFP-ITSN1-L та HA-WIP (рис. 3.18 *г*) формували значно більше (51.9 ± 12.9) філоподієподібних виростів, майже в 1,5 рази більше порівняно з клітинами, які експресували тільки HA-WIP.

Також було продемонстровано колокалізацію білків ITSN-L та WIP у філоподієподібних виростах (рис. 3.18 *г*, збільшені ділянки).

Результати кількісного підрахунку філоподієподібних виростів представлені на рис. 3.19.

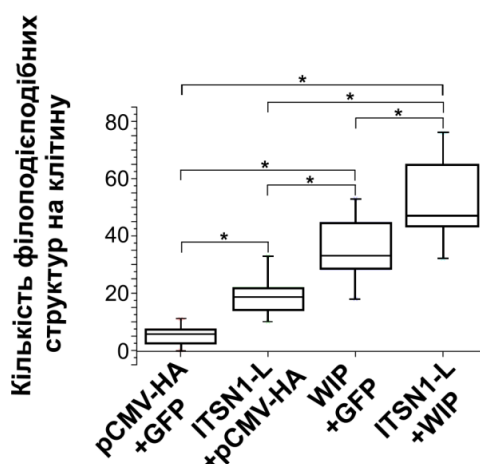


Рис. 3.19. Кількісний аналіз філоподієподібних виростів, які утворює клітина. Всього було пораховано понад 100 клітин для кожного з трьох незалежних експериментів. * - $p < 0.05$ за One-Way ANOVA з наступним тестом Фішера

Відомо, що одним із шляхів формування філоподій в клітині є активація Cdc42 та зв'язаного з ним сигнального шляху [71]. Найбільш вивченим механізмом утворення WIP-індукованих філоподій є Cdc42-N-WASP-залежна полімеризація актину [5]. Тому ми вирішили дослідити вплив білка N-WASP на формування філоподієподібних виростів комплексом ITSN1/WIP за допомогою делеційної конструкції WIP(аз 13-450), що не містить N-WASP-зв'язуючого домена. Для цього було проведено імуофлуоресцентний аналіз клітин лінії MCF-7, котрансфікованих GFP-ITSN1-L та делеційною формою HA-WIP(аз 13-450). Результати експерименту демонструють, що комплекс ITSN1/WIP(аз 13-450) також індукує філоподієподібні виступи (рис. 3.20 a). Порівняння кількості філоподієподібних виступів, що утворюють клітини з коекспресією інтерсектина з делеційною формою WIP (GFP-ITSN1-L/HA-WIP(аз13-450)) або диким типом WIP (GFP-ITSN1-L/HA-WIP) свідчить, що

статистично достовірної різниці між ними немає (рис. 3.20 б).

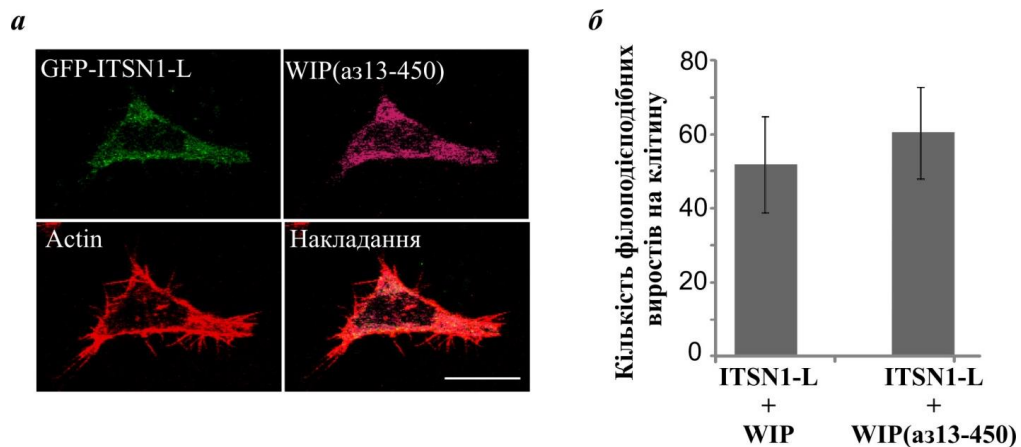


Рис. 3.20. Комплекс ITSN1-L/WIP(аз13-450) індукує утворення філоподієподібних виростів. (а) Клітини лінії MCF-7 було котрансфіковано HA-WIP(аз13-450) та GFP-ITSN1-L. GFP-ITSN1-L було візуалізовано прямою флуоресценцією. HA-WIP(аз13-450) було детектовано за допомогою анти-HA антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-633. Масштабний відрізок – 20 мкм. (б) Графік демонструє кількість філоподієподібних виростів, які утворює клітина при коекспресії ITSN1-L/WIP(аз13-450) або ITSN1-L/WIP

Отримані нами результати вказують на те, що білок N-WASP не є необхідним для утворення філоподієподібних виростів через взаємодію ITSN1-L з WIP(аз 13-450). Ми припускаємо, що в цьому випадку індукція філоподій може здійснюватися через взаємодію з іншим добре дослідженим партнером WIP – кортактином. Відомо, що взаємодія WIP з кортактином стимулює Arp2/3-залежну полімеризацію актину та призводить до збільшення кількості мембранних виростів [6].

Таким чином, було показано збільшення кількості філоподієподібних виростів при коекспресії ITSN1-L та WIP у клітинах лінії MCF-7, що дозволяє припустити участь комплексу у перебудовах актинового цитоскелету, що пов'язані з міграцією клітин.

білків-партнерів, зокрема з N-WASP, який є конститутивним партнером WIP [28].

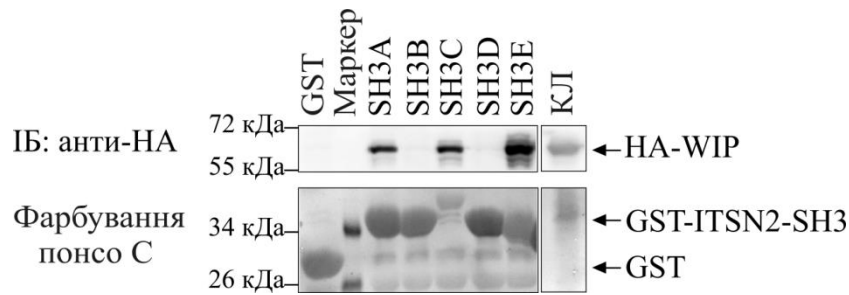


Рис. 3.22. Аналіз взаємодії доменів SH3 ITSN2 з WIP за умов *in vitro*. Імобілізовані на сорбенті білки GST або GST-SH3-домени ITSN2 інкубували з лізатом клітин MDA-MB-231, які трансфікували HA-WIP. Преципітовані білки детектували анти-НА антитілами. GST-злиті білки було візуалізовано фарбуванням за допомогою понсо С

Ми перевірили здатність SH3-доменів ITSN2 зв'язувати делеційну конструкцію WIP(аз13-450), що не містить N-WASP-зв'язуючого домену. Результати преципітації продемонстрували ефективне зв'язування WIP(аз13-450) з SH3-доменами ITSN2 (рис. 3.23).

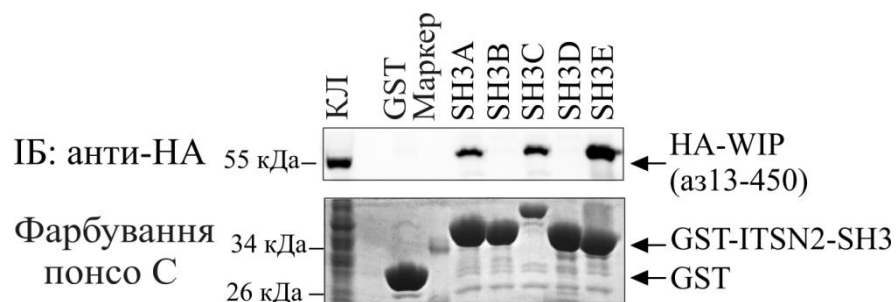


Рис. 3.23. Аналіз взаємодії доменів SH3 ITSN2 з WIP(аз13-450) *in vitro*. Імобілізовані на сорбенті білки GST або GST-SH3 домени ITSN2 інкубували з лізатом клітин MDA-MB-231, що містили HA-WIP(аз13-450). Преципітовані білки детектували анти-НА антитілами. GST-злиті білки було візуалізовано фарбуванням за допомогою понсо С

Таким чином, з'ясували, що взаємодія WIP з ITSN2, також як і з ITSN1, може відбуватися незалежно від N-WASP.

Для подальшого вивчення комплексу ITSN2/WIP, дослідили внутрішньоклітинну локалізацію ендogenous білків у клітинах гліоми лінії U-87MG. Імунофлуоресцентний аналіз із використанням анти-WIP та анти-ITSN2 антитіл показав, що ендogenous білки ITSN2 та WIP колокалізуються в клітині (рис. 3.24).

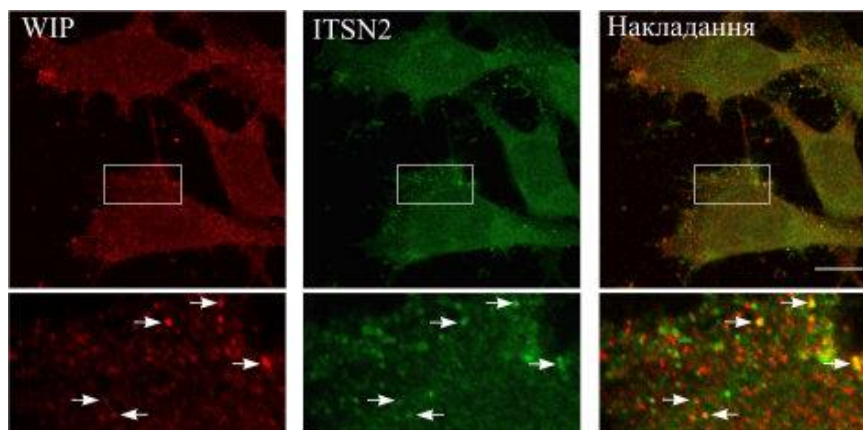


Рис. 3.24. Імунофлуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації ендogenous білків ITSN2 та WIP у клітинах лінії U-87MG. Білки WIP та ITSN2 було детектовано за допомогою анти-WIP та анти-ITSN2 антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-555 та Alexa Fluor-488, відповідно. Масштабний відрізок – 15 мкм

Таким чином отримані результати свідчать про те, що ITSN2 та WIP є компонентами спільних білкових комплексів.

3.1.5. Локалізація ендogenous білків ITSN1 та ITSN2 в інвадоподіях. Як було зазначено раніше, білки родини інтерсектинів ITSN1 та ITSN2 експресуються в більшості тканин ссавців та мають дві основні ізоформи – коротку та довгу [16]. Тоді як обидві ізоформи ITSN2, а також коротка ізоформа ITSN1 експресуються повсюдно, довга ізоформа ITSN1 бере участь у нейрональних процесах і експресуються на високому рівні у цьому типі клітин

[10]. Низькі рівні транскриптів ITSN1-L було детектовано у нирці, печінці, легенях, м'язах та плаценті миші [32]. Використовуючи специфічні антитіла проти DH-домену інтерсектину 1 (анти-ITSN1-DH), які специфічно детектують довгу ізоформу і не впізнають коротку ізоформу інтерсектину 1, було виявлено, що ITSN1-L експресуються в інвазивних клітинах лінії раку молочної залози MDA-MB-231. Результати преципітації продемонстрували наявність ITSN1-L, що є експериментальним підтвердженням експресії довгої ізоформи інтерсектину 1 на рівні білка в клітинах лінії MDA-MB-231 (рис. 3.25).

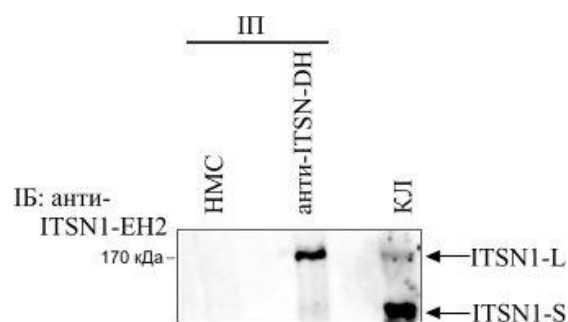


Рис. 3.25. Вестерн-блот аналіз білкових комплексів, преципітованих за допомогою анти-ITSN1-DH антитіл з лізату клітин MDA-MB-231. Преципітовані білки детектували анти-ITSN1-EH2 антитілами. Нормальна сироватка миші була використана як негативний контроль (HMC)

Відомо, що довгі ізоформи ITSN1 та ITSN2 беруть участь в регуляції перебудов актинового цитоскелету. Довгі ізоформи специфічно активують ГТФазу Cdc42, що регулює Arp2/3-залежну полімеризацію актину, яка важлива для утворення інвадоподій [8, 13, 15]. Окрім того, SH3-домени інтерсектинів здатні взаємодіяти з ключовими компонентами інвадоподій, а саме: ефektorом Cdc42 – білком N-WASP, та актин-регулюючим білком – WIP, який, у свою чергу, є одним із маркерів цих інвазивних структур. Тому вірогідно, що адаптерні білки інтерсектини також є компонентами інвадоподій.

Для дослідження локалізації інтерсектинів в інвадоподіях ми використали метод протеолітичної деградації позаклітинного матриксу.

Моделлю для дослідження було обрано клітини лінії раку молочної залози MDA-MB-231, що характеризуються високою інвазією та здатні утворювати інвадоподії. Клітини лінії MDA-MB-231 культивували на скельцях, покритих тонким шаром желатину, флуоресцентно міченого флуоресцеїном ізотіоціанатом (FITC). У разі утворення інвадоподій, відбувається руйнування позаклітинного матриксу (желатину) та утворення чорних дір, де відсутній флуоресцентний сигнал у FITC-міченому желатині. В якості маркера інвадоподій використовували F-актин. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації ендогенних білків ITSN1 та F-актина з використанням анти-ITSN1-ЕН2 антитіл продемонстрував перекривання сигналів цих білків із сайтами деградації позаклітинного матриксу (темними ділянками в желатині) (рис. 3.26).

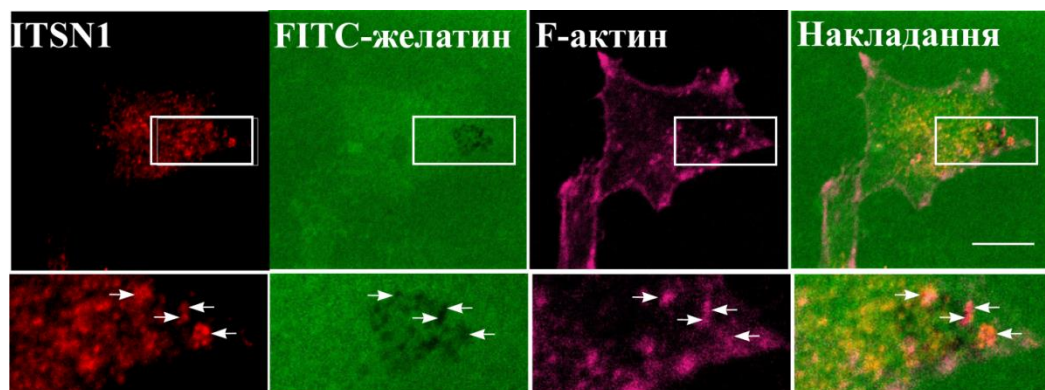


Рис. 3.26. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації ендогенних ITSN1 та F-актина в інвадоподіях. Клітини лінії MDA-MB-231 було культивовано на скельцях, покритих тонким шаром FITC-желатину протягом шести годин. Після чого клітини фіксували та детектували ITSN1 за допомогою анти-ITSN1-ЕН2 антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-555. F-актин було візуалізовано за допомогою фалоїдину, кон'югованого з Alexa Fluor-647. Масштабний відрізок – 10 мкм

Відомо, що WIP є одним із ключових білків, необхідних для формування

та функціонування інвадоподій [97]. Він регулює Arp2/3-залежну полімеризацію актину, бере участь у формуванні вигинів мембрани та секреції мембранних металопротеїназ, що спричиняють деградацію міжклітинного матриксу та забезпечують інвазію злоякісних клітин в оточуючі тканини [92, 150]. Крім того, поряд с F-актином та кортактином, WIP використовують як маркерний білок для детекції інвадоподій. Оскільки інтерсектини взаємодіють з білком WIP, ми дослідили їх колокалізацію в інвадоподіях. Аналіз протеолітичної деградації позаклітинного матриксу продемонстрував колокалізацію ендогенних білків ITSN1 та WIP в інвадоподіях, що свідчить про можливу участь інтерсектинів у формуванні або функціонуванні цих інвазивних структур (рис. 3.27).

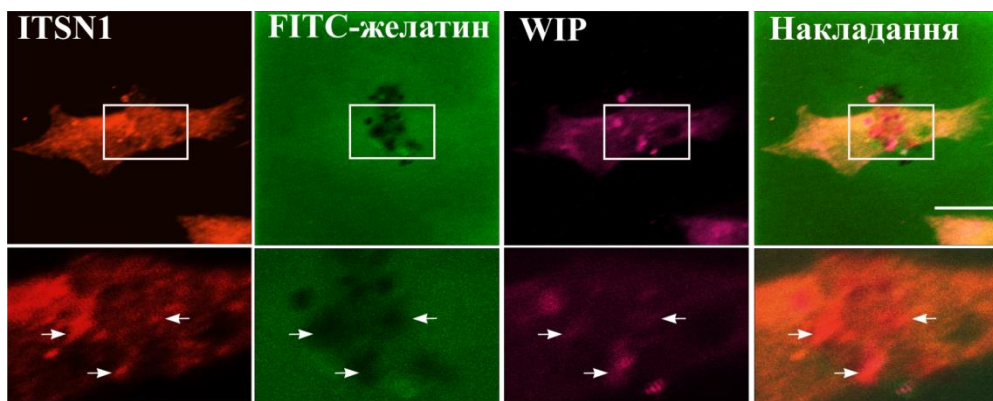


Рис. 3.27. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації ITSN1 та WIP в інвадоподіях у клітинах лінії MDA-MB-231. Ендогенні білки ITSN1 і WIP детектували за допомогою анти-ITSN1-ЕН2 і анти-WIP антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-555 та Alexa Fluor-647, відповідно. Масштабний відрізок – 10 мкм

На сьогоднішній день вже відомі дані про роль білків родини інтерсектинів у перебігу злоякісних процесів. Було показано, що надекспресія ITSN1-L у фібробластах гризунів підвищує рівень злоякісної трансформації цих клітин [68]. Однак, для ITSN2 було отримано протилежні результати:

збільшення кількості ITSN2 асоціюється із сприятливим прогнозом для пацієнтів із раком молочної залози після ад'ювантної хіміотерапії [70]. Несподівано, але наші експериментальні результати також демонструють колокалізацію ITSN2 з одним із маркерів інвадоподій – F-актином в інвазивних структурах, як і у випадку з ITSN1 (рис. 3.28).

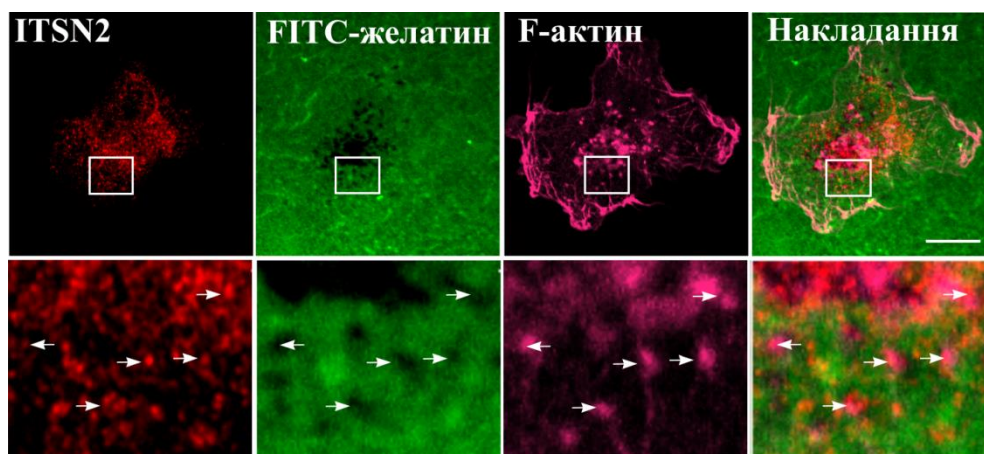


Рис. 3.28. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації ITSN2 та F-актина в інвадоподіях. Білок ITSN2 детектували за допомогою анти-ITSN2 антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-555. F-актин візуалізовано фалоїдином, кон'югованим з Alexa Fluor-647. Масштабний відрізок – 10 мкм

Отримані нами дані вказують на те, що адаптерні білки інтерсектини – ITSN1 та ITSN2 є компонентами інвадоподій і можуть бути залученими до процесів формування або функціонування цих інвазивних структур.

Таким чином, у цьому підрозділі дисертаційної роботи ідентифіковано нового білка-партнера ITSN1 та ITSN2 – регулятора полімеризації актину WIP. Показано, що взаємодія між інтерсектинами та WIP відбувається незалежно від N-WASP, який є конститутивним партнером WIP. Доказана можливість існування потрійного комплексу ITSN1/WIP/N-WASP. Продемонстрована участь комплексу ITSN1-L/WIP у перебудовах актинового

цитоскелету та везикулярному транспорті. Показано, що ендогенні ITSN1 та ITSN2, а також комплекс ITSN1/WIP локалізуються в інвадоподіях.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

1. Gryaznova T, Gubar O, Burdyniuk M, Kropyvko S, Rynditch A. WIP/ITSN1 complex is involved in cellular vesicle trafficking and formation filopodia-like protrusions. *Gene*. 2018; 674: 49-56.
2. Kropyvko S, Gubar O, Gryaznova T, Morderer D, Gerasymchuk D, Syvak L, Grabovoy A, Rynditch A. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the adaptor/scaffold protein gene ITSN1. *Biopolymers and Cell*. 2016. 32: 203-221.
3. Gryaznova T, Kropyvko S, Burdyniuk M, Gubar O, Kryklyva V, Tsyba L, Rynditch A. Intersectin adaptor proteins are associated with actin-regulating protein WIP in invadopodia. *Cellular Signalling*. 2015; 27: 1499-1508.
4. Kropyvko S, Gryaznova T, Gubar O, Kryklyva V, Burdyniuk M, Dergai M, Tsyba L, Vassetzky Y, Rynditch A. Macromolecular complexes in invadopodia formation. VII International Meeting From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies; 2015 October 18-20, Tbilisi, Georgia.
5. Gryaznova T, Kropyvko S, Burdyniuk M, Gubar O, Kryklyva V, Tsyba L, Rynditch A. Adaptor protein ITSN1 is associated with actin-related protein WIP in invadopodia. XI Український біохімічний конгрес. Український біохімічний журнал; 2014 October 06-10, Kyiv, Ukraine.
6. Tsyba L, Gryaznova T, Dergai O, Dergai M, Skrypkina I, Kropyvko S, Boldyryev O, Nikolaienko O, Novokhatska O, Rynditch A. Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 372: 929-934.
7. Kropyvko S, Gryaznova T, Kryklyva V, Burdyniuk M, Gubar O, Tsyba L, Rynditch A. New macromolecular complexes in invadopodia formation. 41th FEBS Congress «Molecular and Systems Biology for a Better Life»; 2016 September 3-8, Kusadasi, Turkey.
8. Kropyvko S, Gryaznova T, Gubar O, Kryklyva V, Burdyniuk M, Tsyba L,

Rynditch A. ITSN1, TKS4 and verprolin family members WIP and CR16-containing macromolecular complexes in invadopodia. GDRI; 2016 September 19-22, Lviv, Ukrain.

9. Tsyba L, Skrypkina I, Gryaznova T, Dergai M, Dergai O, Kropyvko S, Novokhatska O, Drobot L, Rynditch A. Regulation of functional diversity of endocytic adaptor/scaffold proteins intersectins. 7th Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology; 2009 October 3-7, Yalta, Ukraine.

3.2. Аналіз взаємодій ITSN1 та ITSN2 з білком CR16

Білок CR16 відноситься до родини верпролінів ссавців та є найменш вивченим серед членів своєї родини. Відомо, що CR16 містить 36 копій консенсусної послідовності PXXP, що взаємодіють з SH3-доменами білків-партнерів та має доменну структуру ідентичну WIP [119], який взаємодіє з ITSN1 та ITSN2. На основі вище зазначеного та біоінформатичного передбачення ми перевірили взаємодію білка CR16 з інтерсектинами.

3.2.1. Комплекси ITSN1/CR16 і ITSN2/CR16 у клітині. Для ідентифікації взаємодії за умов *in vitro* було перевірено зв'язування окремих SH3-доменив ITSN1 та ITSN2 із рекомбінантним білком Мус-CR16. Рекомбінантні білки, що відповідали злитим з GST доменам SH3A, SH3B, SH3C, SH3D та SH3E ITSN1 та ITSN2 було експресовано в клітинах *E.coli* та афінно очищено за допомогою глутатіон-сефарози. Імобілізовані на глутатіон-сефарозі GST-SH3-домени ITSN1 та ITSN2 інкубували з лізатами клітин лінії 293, з короткотривалою експресією рCMV/Мус-CR16. Результати експерименту виявили, що CR16 ефективно преципітується доменом SH3A інтерсектину 1 (рис. 3.29 *a*). Причому, нейрон-специфічна ізоформа домену SH3A(+VKGEW) ITSN1 значно ефективніше зв'язує CR16 порівняно з його широко розповсюдженою ізоформою (SH3A).

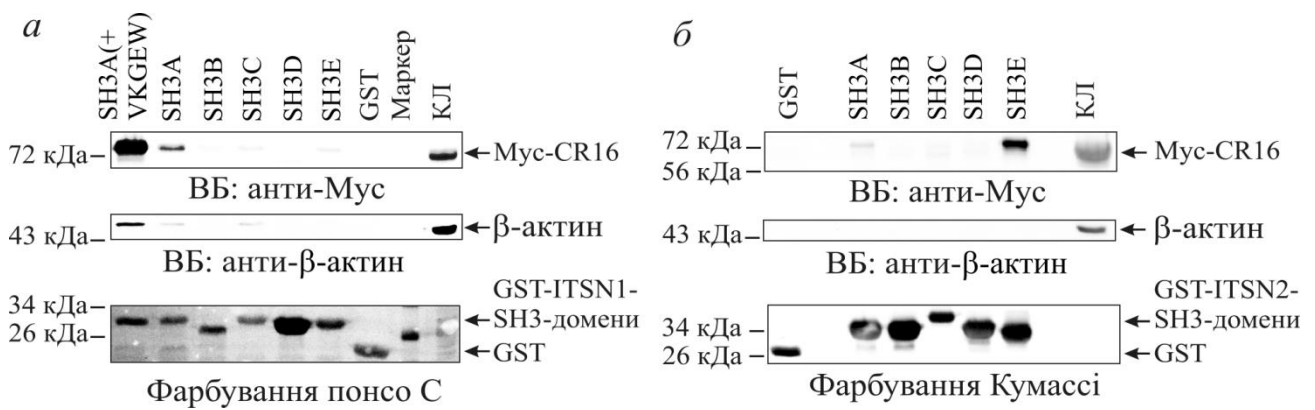


Рис. 3.29. Вестерн-блот аналіз результатів преципітації CR16 з ITSN1 (а) та ITSN2 (б). Імобілізовані на сорбенті білки GST або GST-SH3-ITSN інкубували з лізатом клітин 293, які містили Мус-СR16. Преципітовані білки детектували анти-Мус та анти- β -актин антитілами

Нейрон-специфічна ізоформа SH3A-домена ITSN1 відрізняється від широко розповсюдженої включенням додаткових п'яти амінокислотних залишків (VKGEW) до структури n-Src петлі SH3A-домена (рис. 1.2) [32]. Тому ми зробили висновок, що зв'язування між CR16 та ITSN1 опосередковано переважно послідовністю VKGEW SH3A-домена інтерсектину 1.

Отримані дані свідчать, що взаємодія між CR16 та ITSN2 відбувається завдяки SH3E-домену та на дуже слабкому рівні – SH3A-домену ITSN2 (рис. 3.29 б).

За даними літератури відомо, що домени SH3-домени ITSN1 та ITSN2 мають подібні інтерфейси взаємодії, що зумовлює наявність у них спільних білкових партнерів, які зв'язують однакові набори доменів SH3 [28]. Відомо, що взаємодія ITSN1 та ITSN2 з більшістю їхніх білків-партнерів забезпечується саме набором доменів SH3A, SH3C та SH3E [16]. Одержані нами результати вперше виявили білкового партнера інтерсектинів – CR16, який специфічно взаємодіє з інтерсектинами – переважно з нейрон-специфічною ізоформою SH3A-домена ITSN1 та SH3E-доменом ITSN2.

Оскільки CR16 є актин-зв'язуючим білком, цікаво було не лише підтвердити передбачені його взаємодії з ITSN1 та ITSN2, а й перевірити можливість існування комплексів з актином. Тому водночас з перевіркою взаємодій між інтерсектинами та CR16, методом Вестерн-блот аналізу було проаналізовано зв'язування SH3-доменів ITSN1 та ITSN2 з ендогенним β -актином за умов присутності та відсутності CR16. Результати експерименту демонструють, що SH3A-домен ITSN1 взаємодіє з CR16, який знаходиться у комплексі з β -актином (рис. 3.29 а), тоді як β -актин не детектується у комплексі CR16 з SH3E-доменом ITSN2 (рис. 3.29 б). Як негативний контроль для перевірки взаємодії інтерсектинів з актином за умов відсутності CR16 використовували лізат клітин 293 з короткотривалою трансфекцією вектором без вставки (pcDNA3.1). Отримані дані демонструють відсутність взаємодії між SH3-доменами інтерсектинів та актином (рис. 3.30).



Рис. 3.30. Вестерн-блот аналіз преципітації SH3-доменів ITSN1 та ITSN2 з β -актином. Імобілізовані на сорбенті білки GST або GST-SH3-домени ITSN1 та ITSN2 інкубували з лізатом клітин 293. Преципітовані білки детектували антитілами проти β -актину

Таким чином, одержані результати свідчать про здатність інтерсектинів регулювати асоціацію CR16 з β -актином *in vitro*: за умов надекспресії CR16, ITSN1 не заважає утворювати комплекс CR16 з β -актином, тоді як ITSN2 перешкоджає взаємодії CR16 з β -актином. Отже, взаємодія CR16 з тим чи

іншим інтерсектином може привести до різних функціональних наслідків, пов'язаних з регуляцією актинового цитоскелету.

Далі ми перевірили можливість існування білкових комплексів в клітині між CR16 та кожним із представників родини ITSN. Оскільки нами було виявлено переважно взаємодію нейрон-специфічної ізоформи SH3A(+VKGEW)-домену ITSN1 з CR16, в подальших експериментах використовували рекомбінантний повнорозмірний ITSN1 з додатковими п'ятьма амінокислотними залишками в SH3A-доміні (ITSN1(+VKGEW)). Методом коімунопреципітації з лізатів клітин лінії 293 з тимчасовою коекспресією Omni-ITSN1-L(+VKGEW) та Мус-CR16 за допомогою анти-Мус антитіл виявили, що ITSN1 копреципітується з CR16 (рис. 3.31 *а*).

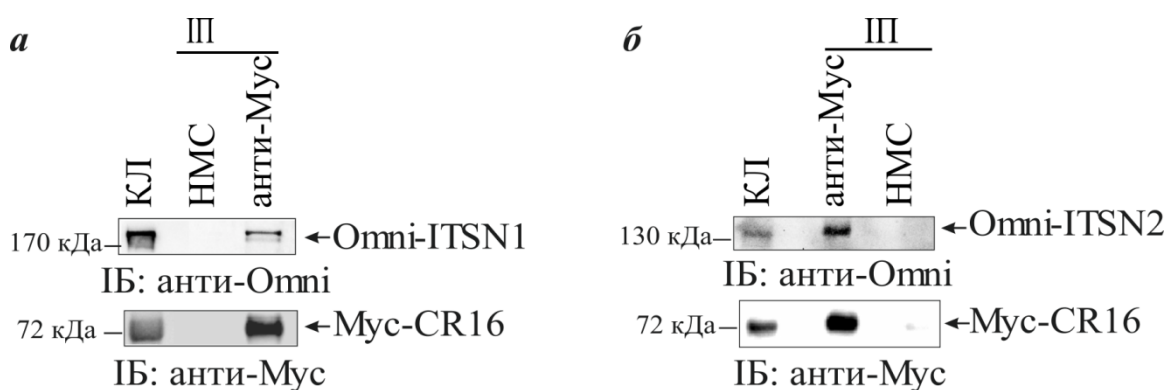


Рис. 3.31. Вестерн-блот аналіз результатів коімунопреципітації ITSN1 або ITSN2 з CR16. Для коімунопреципітації було використано лізати клітин лінії 293, що містили: Omni-ITSN1-L(+VKGEW) і Мус-CR16 (*а*) та Omni-ITSN2-S і Мус-CR16 (*б*). Інтерсектини та CR16 детектували за допомогою анти-Omni та анти-Мус антитіл, відповідно. Нормальну мишачу сироватку (НМС) використовували в якості негативного контролю для зв'язування

Для перевірки існування комплексу ITSN2/CR16 було проведено коімунопреципітацію за допомогою анти-Мус антитіл з лізатів клітин 293, що коекспресували Omni-ITSN2-S та Мус-CR16. В результаті експерименту було виявлено, що Omni-ITSN2-S копреципітується з Мус-CR16 (рис. 3.31 *б*).

Отримані дані вказують на те, що білки родини інтерсектинів можуть утворювати комплекси з CR16 в клітинах.

3.2.2. Експресія CR16 у злоякісних пухлинах людини та колокалізація CR16 із білками везикулярного транспорту. Відомо, що білок CR16, який кодується геном *WIPF3*, бере участь у передачі сигналу в нейронах та відіграє важливу роль у сперматогенезі. CR16 є тканино-специфічним, експресуються головним чином у мозку і яєчках та на низькому рівні у легнях і серці миші [118, 120, 121]. За даними літератури, обидва інших представника верпролінів, WIP та WIRE, експресуються повсюдно та характеризуються збільшеною експресією в злоякісних клітинних лініях [97]. Експресія CR16 у пухлинах людини не досліджувалася. Тому ми вирішили перевірили експресію мРНК *CR16* у злоякісних пухлинах простати, молочної залози і гліобластомі людини. За допомогою ЗТ-ПЛР-аналізу були виявлені транскрипти *CR16* у пухлинах молочної залози людини та гліобластомі, на відміну від раку простати (рис. 3.32).

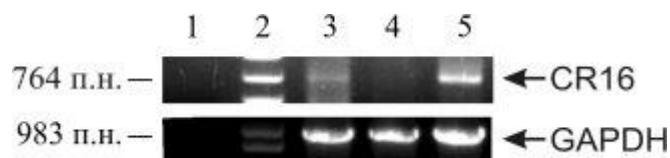


Рис. 3.32. ЗТ-ПЛР-аналіз експресії транскриптів гена *WIPF3* у тканинах злоякісних пухлин людини: 1 – контроль (ПЛР без використання матриці); 2 – маркер; 3 – гліобластома; 4 – рак простати; 5 – рак молочної залози. Ген GAPDH використовували як контроль якості синтезу кДНК

Відомо, що білки родини верпролінів беруть участь в ендоцитозі. Зокрема, було показано участь WIRE в інтерналізації рецептора тромбоцитарного фактору росту бета в ендотеліальних клітинах [126] та роль комплексу WIP/ITSN1 у везикулярному транспорті в клітинах лінії MCF-7 (рис. 3.13; 3.15). Проте, потенційні зв'язки CR16 із компонентами везикулярного транспорту на сьогодні

невідомі. Тому ми вирішили перевірити колокалізацію CR16 з клатрином, кавеоліном 1 та RAB4, які є маркерами клатрин-опосередкованого, кавеоларного ендоцитозу та швидкого рециркування ендосом, відповідно. Для цих експериментів використовували клітини аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7, тому що в них було виявлено експресію CR16. Колокалізацію Мус-CR16 та везикулярних маркерів, які містили GFP-таг, аналізували за допомогою скануючої конфокальної мікроскопії. Результати імунофлуоресцентного аналізу демонструють найкращу колокалізацію CR16 з RAB4 та клатрином (рис. 3.33).

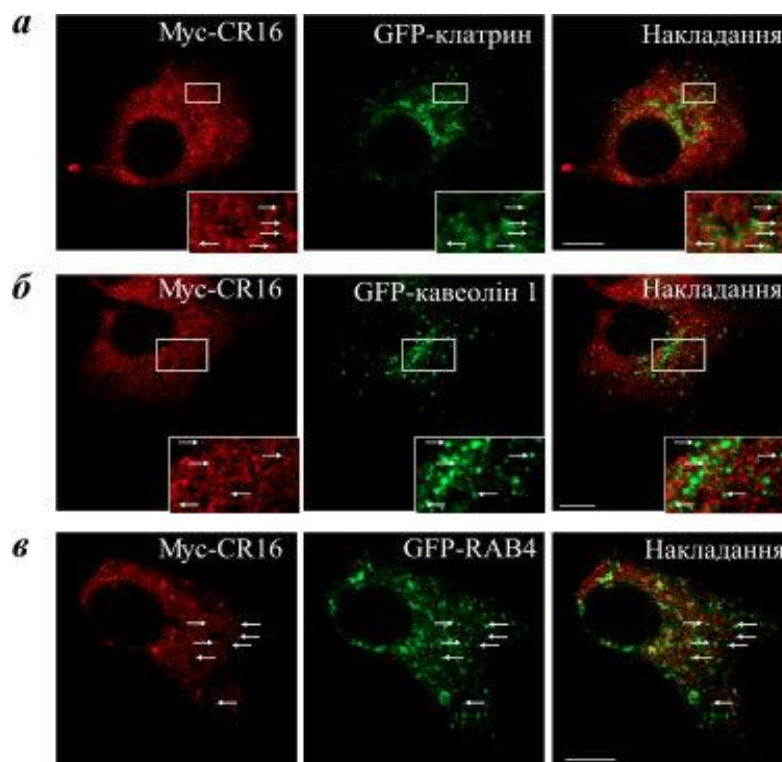


Рис. 3.33. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації CR16 з клатрином, кавеоліном 1 та RAB4. Клітини лінії MCF-7 було котрансфіковано: Мус-CR16 та GFP-клатрином (а); Мус-CR16 та GFP-кавеоліном 1 (б); Мус-CR16 та GFP-RAB4 (в). CR16 детектували за допомогою анти-Мус антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-555. GFP-клатрин, GFP-кавеолін 1 та GFP-RAB4 було візуалізовано прямою детекцією флуоресцентних білків. Масштабний відрізок – 10 мкм

Коефіцієнти кореляції Спірмена склали: для CR16 та клатрину – 0.61 ± 0.08 , $n=14$; для CR16 та RAB4 – 0.63 ± 0.07 , $n=11$; для CR16 та кавеоліну 1 значення було нижче і складало 0.47 ± 0.11 , $n=14$.

Таким чином, одержані результати виявили колокалізацію CR16 з рецикуючими ендосомами, клатрин- та кавеолін-вмісними структурами, що свідчить про його потенційну участь у везикулярному транспорті.

3.2.3. Колокалізація комплексу CR16/ITSN1 з клатрин-позитивними везикулами. Раніше було показано, що ITSN1 переважно зосереджено на плазматичній мембрані, де він колокалізується з клатрином [34]. Наші результати демонструють, що CR16 також колокалізується з клатрином (рис. 3.33 *a*). Для більш детального аналізу комплексу CR16/ITSN1, за допомогою імуофлуоресцентного аналізу, виявили, що білки CR16 та ITSN1 колокалізуються як між собою так і з клатрином у щільних дискретних точках по всій цитоплазмі (рис. 3.34).

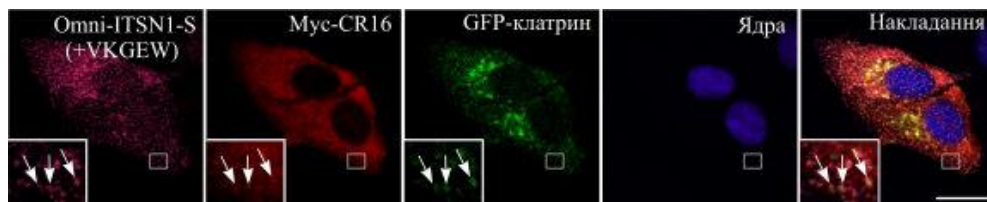


Рис. 3.34. Колокалізація CR16, ITSN1 та клатрину. Клітини лінії MCF-7 було котрансфіковано Мус-CR16, Omni-ITSN1-S(+VKGEW) та GFP-клатрином. Білки CR16 та ITSN1-S(+VKGEW) детектували за допомогою анти-Мус та анти-Omni антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-555 та Alexa Fluor-633, відповідно. Ядра детектували за допомогою Хьохста. Масштабний відрізок – 15 мкм

Отже, отримані результати вказують на можливу спільну функцію досліджуваних білків у клатрин-опосередкованому ендоцитозі.

3.2.4. Надекспресія CR16 збільшує колокалізацію ITSN1 з полімеризованим актином. Одержані нами результати демонструють, що надекспресія CR16 утворює комплекс ITSN1/CR16/ β -актин (рис. 3.29 *a*), тому, цілком можливо припустити, що дія комплексу ITSN1/CR16 може бути спрямована на актиновий цитоскелет. Щоб проаналізувати потенційний вплив CR16 на можливу зміну внутрішньоклітинного розподілу ITSN1 по відношенню до актину, було проведено імуофлуоресцентний аналіз клітин MCF-7, котрансфікованих Omni-ITSN1-L(+VKGEW) та Мус-CR16 у порівнянні з клітинами, які були котрансфіковані Omni-ITSN1-L(+VKGEW) та плазмідною рCMV-Мус без вставки (CR16) з подальшою візуалізацією F-актину. Отримані результати виявили значну колокалізацію ITSN1 з F-актином за умов наявності Мус-CR16 (рис. 3.35 *a*) та дуже слабку – за відсутності CR16 (рис. 3.35 *б*).

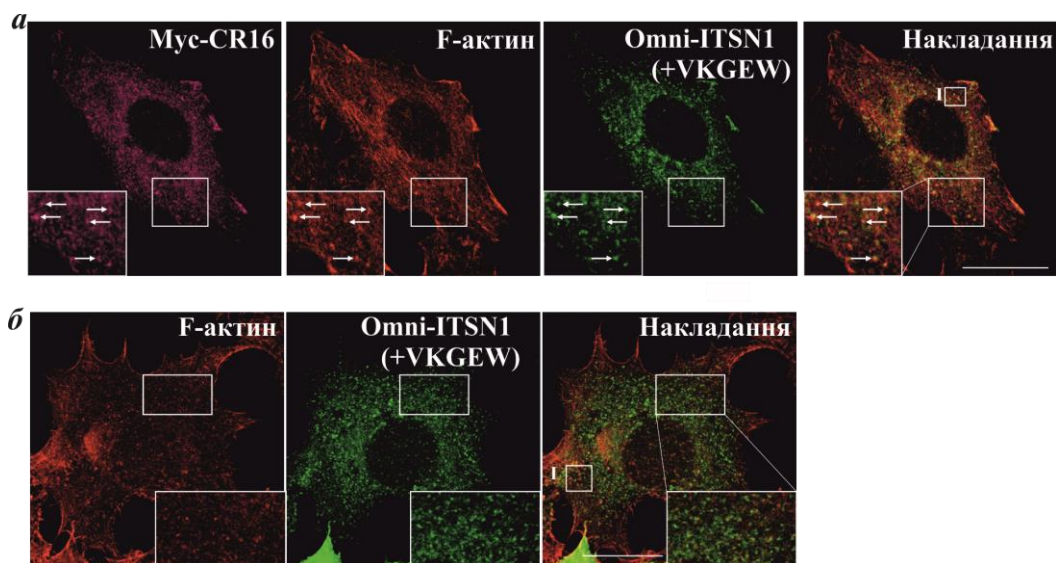


Рис. 3.35. Вплив CR16 на колокалізацію ITSN1-L(+VKGEW) з F-актином. Клітини лінії MCF-7 було котрансфіковано: *a* – Omni-ITSN1-L(+VKGEW) та Мус-CR16; *б* – Omni-ITSN1-L(+VKGEW) та рCMV-Мус. ITSN1 та CR16 детектували за допомогою анти-Omni та анти-Мус антитіл з подальшою візуалізацією вторинними антитілами, кон'югованими з Alexa Fluor-488 і Alexa Fluor-647, відповідно. F-актин візуалізували за допомогою Alexa Fluor-555-кон'югованого фалоїдину. Масштабний відрізок – 20 мкм

Значення коефіцієнта кореляції Спірмена для Omni-ITSN1-L(+VKG EW) та F-актина за умов наявності CR16 складало 0.55 ± 0.14 , $n=33$, тоді як за умов відсутності CR16 було значно нижчим і складало 0.19 ± 0.07 , $n=30$ (рис. 3.36).

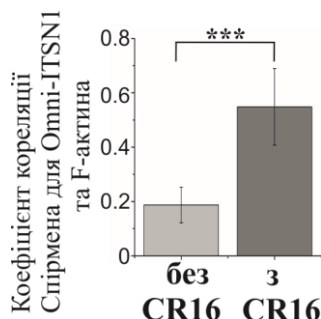


Рис. 3.36. Аналіз коефіцієнта кореляції Спірмена для Omni-ITSN1-L(+VKG EW) та F-актина в клітинах, які додатково надекспресували Мус-CR16 або вектор без вставки (pCMV-Мус). Статистичний аналіз проводився за допомогою критерію Манна-Уїтні, *** – $p < 0.001$

Таким чином, було виявлено зростання колокалізації між Omni-ITSN1-L(+VKG EW) та F-актином за умов надекспресії Мус-CR16, що можливо вказує на здатність CR16 сприяти локалізації інтерсектину з сайтами полімеризованого актину в клітинах лінії MCF-7.

Отже, у цьому підрозділі дисертаційної роботи ідентифіковано новий партнер інтерсектинів – актин-зв'язуючий білок CR16. Показано, що SH3-домени ITSN1 та ITSN2 можуть регулювати зв'язування CR16 з β -актином. Виявлено, що CR16 та ITSN1 колокалізуються між собою, а також з клатрином і F-актином. Показано, що взаємодія між CR16 та ITSN1 сприяє колокалізації ITSN1 з сайтами полімеризованого актину в клітинах лінії MCF-7.

Отримані результати слугують основою для подальших функціональних досліджень комплексів CR16/ITSN1 та CR16/ITSN2, які беруть участь у перебудовах актинового цитоскелету і везикулярному транспорті та можуть бути

пов'язані з функціонуванням нервової системи, сперматогенезом та злоякісною трансформацією клітин.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

1. Крорувко S, Gryaznova T, Morderer D, Rynditch A. Mammalian verprolin CR16 acts as a modulator of ITSN scaffold proteins association with actin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 484(4): 813-819.

2. Крорувко S, Gryaznova T, Gubar O, Kryklyva V, Burdyniuk M, Tsyba L, Rynditch A. ITSN1, TKS4 and verprolin family members WIP and CR16-containing macromolecular complexes in invadopodia. GDRI; 2016 September 19-22, Lviv, Ukrain.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Координована взаємодія молекулярних компонентів актинового цитоскелету необхідна для нормального розвитку і життєдіяльності клітини. Порушення функціонування апарату цитоскелету призводить до розвитку низки патологій, зокрема, злоякісної трансформації. Тому вивчення молекулярних механізмів регуляції актинового цитоскелету заслуговує особливої уваги [1-3]. Реорганізація актинових філаментів регулюється високо інтегрованими сигнальними каскадами, які забезпечують передачу позаклітинних стимулів на актинові філаменти. Ключову роль в інтеграції сигнальних каскадів та тонкій регуляції їх взаємодій відіграють адаптерні білки [174]. Адаптерні білки переважно позбавлені ензиматичної активності, складаються із модулів, що забезпечують білок-білкові взаємодії, та слугують для рекрутування білків та формування мультибілкових комплексів [175,176].

Представниками адаптерних білків є продукти генів *ITSN1* та *ITSN2*, що забезпечують багатокомпонентний молекулярний інтерфейс під час сигнальної трансдукції, ендоцитозу та реорганізації актинового цитоскелету, утворюючи мультибілкові комплекси з широкою мережею взаємодій [16]. До партнерів інтерсектинів, задіяних у регуляції актинового цитоскелету, належать білок-активатор ГТФаз CdGAP [14, 28] та N-WASP, що є ефектором ГТФази Cdc42 та активатором Arp2/3 комплексу [15, 62]. Відомо, що довгі ізоформи ITSN-L є факторами гуанозин-нуклеотидного обміну для ГТФази Cdc42, основного регулятора актинового цитоскелету, важливого для утворення філоподій та інвадоподій [13, 177]. Під час виконання роботи нами було розширено мережу взаємодій інтерсектинів, пов'язаних з актиновим цитоскелетом, шляхом ідентифікації нових білків-партнерів – актин-регулюючих білків CR16 і WIP, які є представниками родини верпролінів ссавців.

Білок WIP є асоційованим із розвитком імунодефіциту при синдромі Віскотта-Олдрича та відіграє важливу роль у формуванні інвазивних структур – подосом та інвадоподій [7, 92]. В нашій роботі було детально охарактеризовано взаємодію інтерсектинів з WIP та визначено функціональне значення комплексу WIP/ITSN1. Було виявлено, що білкові комплекси WIP/ITSN1 преципітуються з лізатів мозку миші та інвазивних клітин лінії MDA-MB-231. За допомогою преципітації із використанням білків, злитих з GST, було продемонстровано взаємодію пролін-збагаченого білка WIP з SH3-доменами ITSN1 та ITSN2. Варто зазначити, що взаємодія WIP з інтерсектинами забезпечувалася однаковими наборами доменів SH3, а саме доменами SH3A, SH3C та SH3E. За допомогою цього ж набору доменів інтерсектини також взаємодіють з білком N-WASP, який є конститутивним партнером WIP і знаходиться з ним у комплексі в клітині [7, 15, 28]. Тому важливо було з'ясувати, чи взаємодія між інтерсектинами та WIP опосередкована білком N-WASP, або відбувається напряму. За допомогою делеційного мутанта WIP, який не містить N-WASP-зв'язуючого домена, було встановлено, що зв'язування WIP з ITSN1 і ITSN2 відбувається незалежно від наявності білка N-WASP. Окрім того, використовуючи афінно очищені рекомбінантні білки WIP та ITSN1, було доказано пряму взаємодію між ними, а не опосередковану іншими білками-партнерами.

Відомо, що в клітинах білки WIP та N-WASP існують у комплексі, в якому N-WASP знаходиться в неактивному стані [7, 96, 99]. Беручи до уваги наші дослідження, які свідчать, що сайти зв'язування WIP та N-WASP з ITSN1 перекриваються (білки взаємодіють з однаковим набором SH3-доменів ITSN1), важливо було проаналізувати, чи здійснюються конкурентні взаємодії між білками. Спочатку нами було встановлено існування потрійного комплексу між ITSN1, WIP та N-WASP. Далі, за допомогою експериментів *in vitro*, було виявлено зниження ефективності взаємодії між SH3-доменами ITSN1 та WIP у складі потрійного комплексу, що свідчить про можливе блокування білком N-WASP зв'язування WIP з ITSN1. Навпаки, WIP збільшує в 6 раз взаємодію між N-WASP та ITSN1. Цей факт узгоджується з відомими на сьогодні даними літератури, що

WIP є шапероном для WASP і захищає його від кальпаїн-залежної деградації [96, 105]. З іншого боку, не можна виключити можливість конформаційних змін у комплексі WIP/N-WASP внаслідок взаємодії з ITSN1, які допомагають збільшити взаємодію між N-WASP та ITSN1. Відомо, що зв'язування N-WASP з SH3-доменами ITSN1 підвищує каталітичну активність DH-домену, що призводить до активації Arp2/3 комплексу та полімеризації актину [15]. Тому було зроблено припущення, що взаємодія комплексу WIP/N-WASP з ITSN1 може призводити до Arp2/3-залежних перебудов актинового цитоскелету, які відіграють важливу роль при міграції та інвазії клітин. Подальші наші дослідження були спрямовані на визначення функціональних наслідків комплексу WIP/ITSN1 у реорганізації актинового цитоскелету.

За даними літератури, обидва білка, WIP і ITSN, функціонують у клітинних процесах, пов'язаних із перебудовами актинового цитоскелету. Відомо, що WIP безпосередньо взаємодіє з G- і F-актином та бере участь у процесах полімеризації актину після з'єднання T-клітинного рецептора, інвазії вірусу коров'ячої віспи і під час формування інвадоподій та філоподій [5, 8, 95, 109, 178]. Інтерсектини також залучено до перебудов актинового цитоскелету, але безпосередньої їх взаємодії з актином не виявлено [50, 59-63]. Одержані нами результати виявили, що SH3-домени ITSN1 зв'язують WIP, який знаходиться в комплексі з β -актином (рис. 3.17). А також колокалізацію ендogenous ITSN1 з F-актином в інвазивних клітинах лінії MDA-MB-231 (рис. 3.26).

Дані літератури свідчать, що надекспресія довгої ізоформи ITSN1-L викликає утворення філоподій, також WIP сприяє формуванню філоподій у фібробластах миші [5, 15]. Нами було досліджено роль комплексу ITSN1-L/WIP в утворенні філоподієподібних виростів клітинами лінії MCF-7. Показано, що клітини з одночасною експресією ITSN1-L та WIP формували значно більше філоподієподібних структур порівняно з клітинами, що експресували тільки WIP або ITSN1-L. Найбільш вивченим механізмом утворення WIP-індукованих філоподій є Cdc42/N-WASP-опосередкована полімеризація актину [100]. Тому нами було досліджено роль N-WASP у формуванні ITSN1-L/WIP-індукованих

філоподієподібних виростів, за допомогою делеційної конструкції WIP(аз 13-450), що не містить N-WASP-зв'язуючого домена. На наше здивування, комплекс із делеційної форми WIP(аз 13-450) та ITSN1-L також індукував формування філоподієподібних виростів на рівні комплексу з диким типом WIP та ITSN1-L, що вказує на те, що білок N-WASP не є необхідним для утворення цих виростів. Ми припускаємо, що утворення філоподієподібних виростів шляхом ITSN1-L/WIP(аз13-450) може здійснюватися через взаємодію з іншим добре дослідженим партнером WIP – кортактином. Відомо, що взаємодія WIP з кортактином стимулює Arp2/3-залежну полімеризацію актину та призводить до збільшення кількості мембранних виростів [6]. Однак найбільш вірогідним є те, що N-WASP-залежні та кортактин-залежні шляхи утворення філоподій функціонують паралельно та є взаємозамінними.

Білок WIP регулює організацію та полімеризацію актинового цитоскелету за допомогою прямої взаємодії з актином та активаторами Arp2/3 комплексу – N-WASP та кортактином. За даними літератури відомо, що WIP пригнічує Cdc42-опосередковану N-WASP-залежну активацію Arp2/3 комплексу за умов *in vitro* [100]. Навпаки, взаємодія WIP з кортактином посилює Arp2/3-залежну полімеризацію актину [6]. Відомо, що взаємодія WIP з кортактином та N-WASP забезпечується різними частинами його пролін-збагаченої ділянки: N-кінцевою (аз 110-170) та C-кінцевою (аз 454-485) частинами, відповідно [6, 179]. Таким чином, WIP може регулювати активацію Arp2/3 комплексу за допомогою одночасного зв'язування N-WASP та кортактина. Картована нами ділянка білка WIP, що необхідна для взаємодії з ITSN1, включає пролін-збагачену ділянку (аз 318-450), яка не перекривається з сайтами зв'язування факторів нуклеації актину. Оскільки ITSN1, N-WASP та кортактин взаємодіють з різними мотивами пролін-збагаченої ділянки WIP, цілком можливо, що ці взаємодії можуть бути реалізованими одночасно та опосередковувати утворення функціонального мультибілкового комплексу. Це узгоджується з отриманими нами результатами імунофлуоресцентного аналізу, які демонструють існування комплексів ITSN1/WIP/N-WASP та ITSN1/WIP/кортактина в ділянках активних перебудов

кортикального актинового цитоскелету. Таким чином, нова функціональна роль адаптерного білка ITSN1 може полягати в локалізації та регуляції мультибілкових комплексів нуклеації актину в клітині.

Результати проведених досліджень, з урахуванням даних літератури, дозволяють узагальнити можливі механізми регуляції Arp2/3-залежної полімеризації актину за допомогою комплексу ITSN/WIP (рис. 4.1).

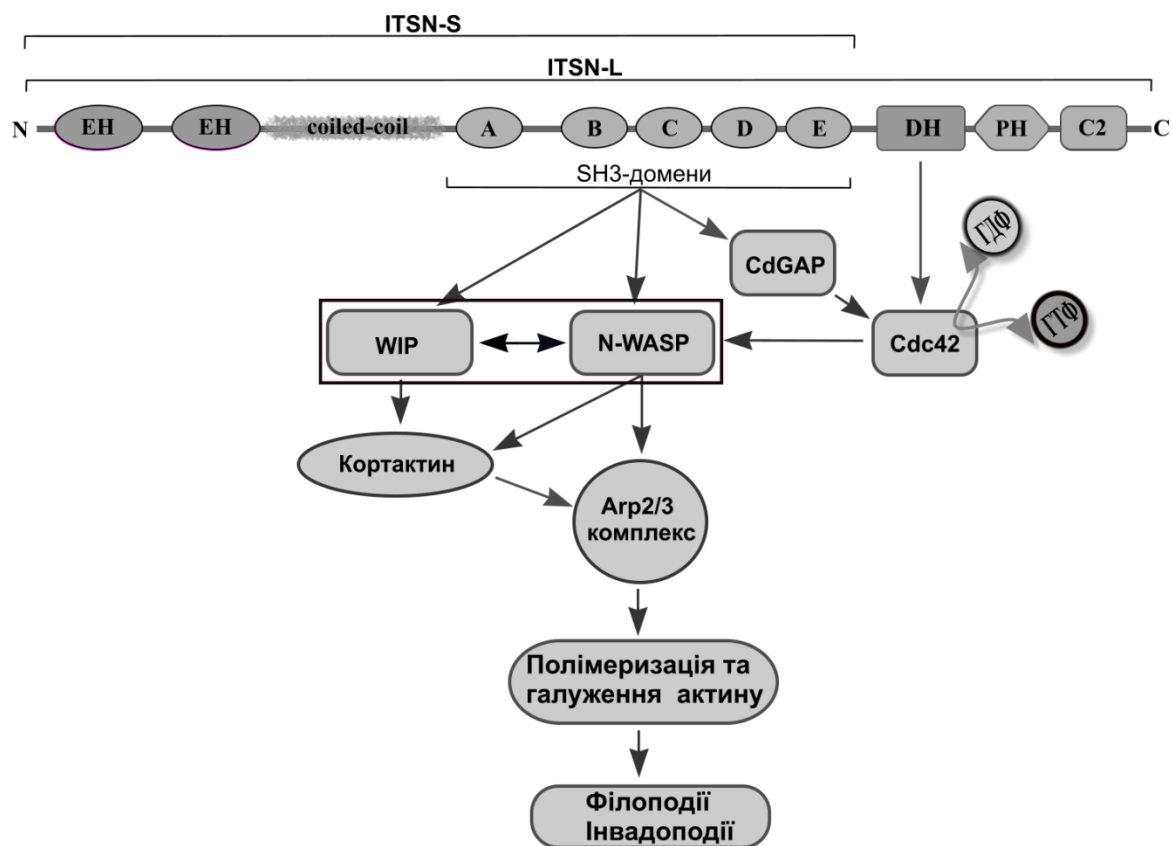


Рис. 4.1. Гіпотетична модель ITSN/WIP-залежного регулювання активації Arp2/3 комплексу за участі Cdc42 та N-WASP

Як відомо, до партнерів ITSNs, задіяних до регуляції актинового цитоскелету, належать ГТФаза Cdc42, N-WASP та білок-активатор ГТФаз Cdc42 та Rac1 – CdGAP [16]. Нами було ідентифіковано нового партнера ITSNs – регулятора полімеризації актину WIP, який взаємодіє з нуклеаторами актину – N-WASP та кортактином. Відомо, що довга ізоформа інтерсектинів каталізує гуанозин-нуклеотидний обмін на малій ГТФазі Cdc42. Домени DH-PH

інтерсектинів зв'язують Cdc42, що призводить до дисоціації ГДФ і його заміни на ГТФ. Таким чином утворюється активна форма Cdc42-ГТФ [15]. За допомогою SH3-доменів, ITSN формує комплекс із білком CdGAP та репресує його GAP-активність [14]. Після активації, Cdc42-ГТФ взаємодіє з білком N-WASP, що призводить до зміни конформації останнього та його активації. В свою чергу, активований N-WASP взаємодіє з Arp2/3 комплексом і забезпечує ініціацію Arp2/3-залежної полімеризації актину [15]. При взаємодії WIP з N-WASP, білок N-WASP знаходиться в автоінгібованому стані, не здатному до активації ГТФазою. У цій конформації N-WASP не може ініціювати Arp2/3-залежну полімеризацію актину навіть у присутності активного Cdc42 [101]. Взаємодія ITSN1 з WIP може призвести до інактивації WIP, що дозволяє Cdc42 активувати N-WASP та Arp2/3 комплекс. Таким чином, можна припустити наявність мультимолекулярного комплексу, який складається з вище перелічених партнерів ITSN-L. Отже, інтерсектини слугують платформою для збірки компонентів сигнального комплексу, де відбувається їх часова і просторова регуляція, модулюється сила, інтенсивність та тривалість відповіді.

На рисунку 4.1 наведено гіпотетичну схему регулювання активації Arp2/3 комплексу за допомогою довгої ізоформи ITSN-L, яка здатна взаємодіяти та активувати Cdc42. Проте аналогічні взаємодії між SH3-доменами ITSNs та білками WIP і N-WASP відбуваються і для короткої ізоформи ITSN-S. Коротка ізоформа інтерсектинів не здатна зв'язувати Cdc42, проте в клітині N-WASP може бути активований іншими молекулами [180]. Таким чином, можна припустити, що взаємодія ITSN1-S з WIP залучає комплекс WIP/N-WASP до місць, де відбувається реорганізація кортикального актину і де інші молекули кооперативно співпрацюють з інтерсектином для зняття автоінгібування з N-WASP.

Відомо, що Cdc42/N-WASP/WIP/Arp2/3-опосередкований сигнальний шлях відіграє значну роль в утворенні інвадоподій – актин-збагачених структур, які забезпечують інвазивність злоякісних клітин [8]. Оскільки інтерсектини здатні специфічно активувати малу ГТФазу Cdc42 та зв'язувати комплекс N-WASP/WIP, тобто взаємодіяти з ключовими компонентами формування інвадоподій, нами

було перевірено можливість участі ITSN в клітинній інвазії. Використовуючи метод протеолітичної деградації позаклітинного матриксу нами продемонстровано, що в інвазивних клітинах лінії MDA-MB-231 (пухлина молочної залози людини) ендogenous білки ITSN1 і ITSN2 локалізуються в інвадоподіях. З урахуванням здатності інтерсектинів активувати Cdc42 і безпосередньо взаємодіяти з N-WASP та WIP, ми вважаємо, що інтерсектини беруть участь у полімеризації актину під час утворення інвадоподій.

Основною функцією інтерсектинів є збирання мультибілкових комплексів на різних етапах клатрин-опосередкованого ендоцитозу. Адаптерні білки інтерсектини взаємодіють з ключовими компонентами ендоцитозу: деформуючими мембрану білками FCHo1/2, адаптерами Eps15/Eps15R, ГТФазою динаміном 1, фосфотазою синаптояніном 1 та іншими [19, 24, 25, 35]. Отримані в нашій роботі дані демонструють колокалізацію комплексу ITSN1/WIP з клатрином, що свідчить про його можливу участь в клатрин-опосередкованому ендоцитозі. Відомо, що інтерсектини задіяні в ендоцитозі рецепторів трансферину, епідермального фактору росту та бета 1 інтегрину [43, 44, 181]. За даними літератури надекспресія ITSN1-L або WIP інгібує інтерналізацію рецептора трансферину [25, 42, 166]. Проте отримані в нашій роботі дані з аналізу поглинання рецептора трансферину за умов надекспресії ITSN1 або WIP демонструють порушення внутрішньоклітинного розподілу трансферину, а не інгібування інтерналізації трансферину (рис. 3.14 *а, б*). У контрольних клітинах трансферин накопичується в навколоядерних регіонах, тоді як у трансфікованих ITSN1-L або WIP, трансферин був диспергований по цитоплазмі. Цікаво, що коекспресія ITSN1-L та WIP відновлює навколоядерне розташування рецептора трансферину, що співпадає з контрольним клітинам. Таким чином, взаємодія ITSN1-L з WIP є необхідною для везикулярного транспорту рецептора трансферина.

Цікаво, що функція комплексу ITSN1/WIP може бути пов'язана з рециклізацією рецептора трансферину. За даними літератури інтерналізований трансферин повертається до плазматичної мембрани за допомогою швидкої RAB4-залежної рециклізації [182]. Вперше отримані нами дані виявили

колокалізацію ендogenous білків ITSN1 і WIP з ГТФазою RAB4 та встановили, що надекспресія ITSN1-L збільшує колокалізацію WIP із RAB4-позитивними везикулами в клітинах лінії MCF-7.

Таким чином, комплекс ITSN1/WIP бере участь у клатрин-опосередкованому ендоцитозі та є компонентом RAB4-залежних сигнальних шляхів.

Однією із важливих характеристик злоякісного фенотипу пухлинної клітини є секреція та активність матричних металопротеїназ, що здатні розщеплювати різні компоненти ПКМ, наприклад, колаген та фібронектин [183]. Ремоделювання та деградація ПКМ сприяє клітинній міграції та інвазії злоякісних клітин у віддалені тканини і, як наслідок, метастазуванню первинної пухлини. За даними літератури специфічна взаємодія між WIP та кортактином в дендритних клітинах є необхідною для рекрутування проMMP-2/MMP-2 та проMMP-9/MMP-9 до сайтів деградації ПКМ та їх секреції [148]. Регуляція протеолітичної активності MMP відбувається шляхом інтерналізації через кавеоларний та клатрин-опосередкований ендоцитоз, після чого протеази можуть знову надходити до плазматичної мембрани за допомогою швидкого рециркулювання, що контролює ГТФаза RAB4. ГТФази RAB4 та RAB5 важливі для утворення інвадоподій та сприяють розповсюдженню пухлини [184]. Отже, дані літератури дають підстави припустити, що взаємодія між ITSN1 та WIP може бути важливою для функціонування MMP у сайтах формування інвадоподій під час інвазії пухлинних клітин. На користь висунутого припущення свідчать отримані нами дані про колокалізацію ендogenous білків ITSN1 та WIP в інвадоподіях у клітинах лінії MDA-MB-231, колокалізацію комплексу ITSN1/WIP з маркером рециркулюючих ендосом RAB4 та залучення комплексу до внутрішньоклітинного везикулярного транспорту.

На сьогодні накопичені певні дані щодо зв'язків між порушеннями ендоцитозу та нейродегенеративними патологіями. Високий рівень експресії RAB4 та ITSN1 було виявлено у пацієнтів із хворобою Альцгеймера і синдромом Дауна, а також на тваринних моделях синдрому Дауна [65, 185,

186]. Відомо, що довга ізоформа ITSN1 бере участь у нейрональних процесах і експресується на високому рівні в цьому типі клітин [60, 61]. Згідно отриманих нами даних, білки ITSN1-L та RAB4 можуть функціонувати в одних компартментах клітини. Це дає змогу припустити, що ITSN1-L разом з RAB4 причетні до аномалій ендосомального транспорту, пов'язаних з нейродегенеративними розладами.

Таким чином, наші дослідження продемонстрували участь комплексу ITSN1/WIP в інтерналізації трансферинового рецептора та у формуванні філоподієподібних виростів. Крім того, було встановлено, що ITSN1 та WIP є компонентами інвадоподій та RAB4-опосередкованого сигнального шляху. Результати наших експериментів свідчать про нову функцію інтерсектинів як адаптерних білків інвадоподій, які забезпечують багатоконпонентний молекулярний інтерфейс під час формування та функціонування інвазивних структур.

Також було ідентифіковано взаємодію ITSN1 та ITSN2 з іншим представником родини верпролінів – CR16, що є субстратом для MAP кінази, бере участь у перебудовах актинового цитоскелету та експресія якого є тканино-специфічною для яєчок та мозку [119-122].

На сьогодні функції CR16 є мало вивченими. Більшість досліджень було сфокусовано на сигнальній трансдукції в нейронах та на функції в сперматогенезі, пов'язаною з чоловічою стерильністю [121-122]. Отримані нами результати виявили експресію *CR16* в злоякісних пухлинах молочної залози людини та гліобластомі. Наші дослідження продемонстрували колокалізацію CR16 із везикулярними маркерами – клатрином, кавеоліном 1 та RAB4 у клітинах лінії MCF-7, що свідчить про можливу участь CR16 у везикулярному транспорті. У цій роботі було ідентифіковано нові партнери CR16 – адаптерні білки ITSN1 та ITSN2. За допомогою коїмунопреципітації, було виявлено існування білкових комплексів CR16/ITSN1 та CR16/ITSN2 в клітині. Використовуючи білки, злиті з GST, було визначено домени інтерсектинів, що опосередковують взаємодію з CR16. Варто зазначити, що

нами було вперше виявлено існування білка-партнера інтерсектинів, що зв'язується з різними SH3-доменами для ITSN1 та ITSN2: SH3A-доменом ITSN1 та SH3E-доменом ITSN2. Відомо, що більше 75% взаємодій забезпечуються SH3-доменами інтерсектинів. За даними літератури білки-партнери, як ITSN1 так і ITSN2, преципітуються однаковим тандемом SH3-доменів: SH3A, SH3C, SH3E або SH3B і SH3D [16, 28]. Цей факт пояснюється подібністю поверхонь зв'язування SH3-доменів інтерсектинів [28]. Домени SH3E ITSN1 та ITSN2 характеризуються високим рівнем ідентичності [28], проте відрізняються взаємодією з CR16, що вказує на існування специфічного сайту зв'язування в SH3E- домені ITSN2, який в подальших дослідженнях за допомогою низки мутантів можна буде визначити.

Відомо, що ITSN1, на відміну від ITSN2, має дві ізоформи SH3A-домена – широко розповсюджену (SH3A) та нейрон-специфічну (SH3A(+VKGEW)) [32]. Нейрон-специфічна ізоформа характеризується включенням 20 екзону, що кодує п'ять амінокислотних залишків VKGEW, до структури n-Src петлі SH3A-домена ITSN1. Відомо, що інсерція п'яти амінокислотних залишків змінює спорідненість білків-партнерів до інтерсектину 1: зменшує афінність зв'язування з сигнальними білками mSOS1 та убіквітин-лігазами родини CBL і збільшує взаємодію з регулятором актинового цитоскелету CdGAP та ендоцитозними білками (динаміном 1 та синаптояніном 1) порівняно з експресовано повсюдно ізоформою SH3A-домена [33]. Вищеперелічені білки, крім зв'язування з SH3A-доменом, взаємодіють також і з іншими SH3-доменами ITSN1. У даній роботі нами було вперше виявлено, що CR16 є унікальним білком, який взаємодіє виключно з SH3A-доменом інтерсектину 1, причому значно ефективніше з його нейрон-специфічною ізоформою SH3A(+VKGEW). Таким чином, послідовність VKGEW є основним мотивом, що забезпечує взаємодію між ITSN1 та CR16. Відомо, що VKGEW є однією із консенсусних послідовностей для пост-трансляційної модифікації – сумоїлювання [187]. Сумоїлювання впливає на клітинну локалізацію білка, ядерний транспорт, спектр білків-партнерів, зв'язування з ДНК, контроль функцій хроматину та інші

[188]. За допомогою аналізу бази даних SUMOplot™ (<http://www.abgent.com/sumoplot>) нами було передбачено шість сайтів для сумоїлювання інтерсектину 1, у тому числі залишку лізину в послідовності VKGEW. Таким чином, на основі біоінформатичного аналізу ми передбачили, що ITSN1 може зазнавати сумоїлювання і, можливо, це є додатковим механізмом регуляції взаємодії інтерсектина 1 з білками-партнерами (наприклад, CR16), локалізації в клітині та його функцій, що необхідно буде перевірити у наступних експериментальних дослідженнях.

Отримані нами дані свідчать про колокалізацію надекспресованих CR16 та ITSN1. Було встановлено, що надекспресія CR16 сприяє колокалізації ITSN1 з F-актином. Цей факт узгоджується з результатами експериментів *in vitro*, що демонструють існування комплексу між SH3A-доменами ITSN1, CR16 та ендogenous β-актином за умов надекспресії CR16. Слід зазначити, що такого комплексу у випадку з ITSN2 не існує. Одне з можливих пояснень полягає в тому, що домени SH3A ITSN1 та SH3E ITSN2 взаємодіють з різними пролін-збагаченими ділянками CR16. Отже, у випадку ITSN1, взаємодія з CR16 не заважає його зв'язуванню з актином, що призводить до утворення потрійного комплексу ITSN1/CR16/β-актин. Навпаки, взаємодія ITSN2 з CR16 перешкоджає зв'язуванню останнього з актином. Таким чином, одержані нами результати свідчать, що ITSN1, на відміну від ITSN2, формує комплекс з CR16, який знаходиться в комплексі з ендogenous β-актином, що призводить до колокалізації ITSN1 з сайтами полімеризованого актину в клітинах лінії MCF-7.

Дослідження взаємодій інтерсектинів з представниками родини верпролінів, CR16 та WIP, має як фундаментальне значення – розширення уявлень про молекулярні механізми регуляції динаміки актинового цитоскелету та везикулярного транспорту, порушення яких призводить до метастазування та прогресування раку, так і прикладну цінність – дані білки можуть виступати в якості потенційних мішеней для терапевтичних засобів лікування онкологічних станів, оскільки WIP є потенційним діагностичним біомаркером інвазивності ракових клітин молочної залози.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі охарактеризовані взаємодії між адаптерними білками ITSN1 і ITSN2 та регуляторами полімеризації актину WIP і CR16. Виявлено, що інтерсектини здатні формувати комплекси з WIP і CR16. Встановлено, що комплекс ITSN1/WIP є залученим до везикулярного транспорту та перебудов актинового цитоскелету. Доведено формування потрійного комплексу між ITSN1, WIP та N-WASP. Розроблено модель участі ITSN та WIP в N-WASP-опосередкованих перебудовах актинового цитоскелету. Виявлено, що ITSN1 і ITSN2 є компонентами інвазивних структур – інвадоподій.

1. Ідентифіковано нового білка-партнера для інтерсектинів – WIP, який формує комплекси з SH3A-, SH3C- та SH3E-доменами ITSN1 та ITSN2. Доведено безпосередню взаємодію між ITSN1 та WIP через амінокислотні залишки 318-450 пролін-збагаченого домену WIP.

2. Вперше встановлено формування потрійного комплексу між ITSN1, WIP та N-WASP, у складі якого WIP сприяє взаємодії між N-WASP та ITSN1 за умов *in vitro*.

3. Виявлено, що комплекс ITSN1/WIP бере участь у везикулярному транспорті рецептора трансферину та є компонентом RAB4-позитивних везикул.

4. Продемонстровано, що комплекс ITSN1/WIP локалізується в ділянках активних перебудов кортикального актинового цитоскелету та індукує утворення філоподієподібних виступів.

5. Показано, що в клітинах лінії раку молочної залози MDA-MB-231 ендогенні білки ITSN1 і ITSN2 локалізуються в інвадоподіях.

6. Створено гіпотетичну модель, згідно з якою взаємодія ITSN з WIP дозволяє Cdc42 активувати N-WASP з подальшою активацією Arp2/3 комплексу.

7. Встановлено, що CR16 формує комплекси з SH3E-доменом ITSN2 та нейрон-специфічною ізоформою SH3A-домена ITSN1, причому ITSN1 зв'язує

CR16, який знаходиться в комплексі з β -актином і сприяє його локалізації з полімеризованим актином.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. C. Wickramarachchi D, Theofilopoulos A, Kono D. Immune pathology associated with altered actin cytoskeleton regulation. *Autoimmunity*. 2010;43(1):64-75.
2. Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2007;1773(5):642-652.
3. Cairns N, Lee V, Trojanowski J. The cytoskeleton in neurodegenerative diseases. *The Journal of Pathology*. 2004;204(4):438-449.
4. Campellone K, Welch M. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010;11(4):237-251.
5. Martinez-Quiles N, Rohatgi R, Antón I, Medina M, Saville S, Miki H et al. WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nature Cell Biology*. 2001;3(5):484-491.
6. Kinley A, Weed S, Weaver A, Karginov A, Bissonette E, Cooper J et al. Cortactin Interacts with WIP in Regulating Arp2/3 Activation and Membrane Protrusion. *Current Biology*. 2003;13(5):384-393.
7. Antón I, Jones G, Wandosell F, Geha R, Ramesh N. WASP-interacting protein (WIP): working in polymerisation and much more. *Trends in Cell Biology*. 2007;17(11):555-562.
8. Yamaguchi H, Lorenz M, Kempniak S, Sarmiento C, Coniglio S, Symons M et al. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *The Journal of Cell Biology*. 2005;168(3):441-452.
9. Murphy D, Courtneidge S. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011;12(7):413-426.
10. Pucharcos C, Casas C, Nadal M, Estivill X, de la Luna S. The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 2001;1521(1-3):1-11.

11. Guipponi M, Scott H, Chen H, Schebesta A, Rossier C, Antonarakis S. Two Isoforms of a Human Intersectin (ITSN) Protein Are Produced by Brain-Specific Alternative Splicing in a Stop Codon. *Genomics*. 1998;53(3):369-376.
12. Snyder J, Rossman K, Baumeister M, Pruitt W, Siderovski D, Der C et al. Quantitative Analysis of the Effect of Phosphoinositide Interactions on the Function of Dbl Family Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(49):45868-45875.
13. Klein I, Predescu D, Sharma T, Knezevic I, Malik A, Predescu S. Intersectin-2L Regulates Caveola Endocytosis Secondary to Cdc42-mediated Actin Polymerization. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(38):25953-25961.
14. Jenna S, Hussain N, Danek E, Triki I, Wasiak S, McPherson P et al. The Activity of the GTPase-activating Protein CdGAP Is Regulated by the Endocytic Protein Intersectin. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;277(8):6366-6373.
15. Hussain N, Jenna S, Glogauer M, Quinn C, Wasiak S, Guipponi M et al. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nature Cell Biology*. 2001;3(10):927-932.
16. Tsyba L, Nikolaienko O, Dergai O, Dergai M, Novokhatska O, Skrypkina I et al. Intersectin multidomain adaptor proteins: Regulation of functional diversity. *Gene*. 2011;473(2):67-75.
17. Fuentes J, Dierssen M, Pucharcos C et al. Application of Alu-splice PCR on chromosome 21: DSCR1 and intersectin. *J Neural Transm Suppl*. 1999;(57):337-352.
18. Guipponi M, Scott H, Hattori M, Ishii K, Sakaki Y, Antonarakis S. Genomic structure, sequence, and refined mapping of the human intersectin gene (ITSN), which encompasses 250 kb on chromosome 21q22.1→q22.2. *Cytogenetic and Genome Research*. 1998;83(3-4):218-220.
19. Yamabhai M, Hoffman N, Hardison N, McPherson P, Castagnoli L, Cesareni G et al. Intersectin, a Novel Adaptor Protein with Two Eps15 Homology and Five Src Homology 3 Domains. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(47):31401-31407.
20. Montesinos M, Castellano-Muñoz M, García-Junco-Clemente P, Fernández-Chacón R. Recycling and EH domain proteins at the synapse. *Brain Research Reviews*. 2005;49(2):416-428.

21. Adams A, Thorn J, Yamabhai M, Kay B, O'Bryan J. Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(35):27414-27420.
22. Pucharcos C, Estivill X, de la Luna S. Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS Letters*. 2000;478(1-2):43-51.
23. Rose A., Schraegle SJ, Stahlberg EA et al. Coiled-coil protein composition of 22 proteomes – differences and common themes in subcellular infrastructure and traffic control. *BMC Evol. Biol.* 2005;5(66):1471-1491.
24. Okamoto M, Schoch S, Südhof T. ESH1/Intersectin, a Protein That Contains EH and SH3 Domains and Binds to Dynamin and SNAP-25. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(26):18446-18454.
25. Sengar A, Wang W, Bishay J, Cohen S, Egan S. The EH and SH3 domain Eps proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *The EMBO Journal*. 1999;18(5):1159-1171.
26. Tatosyan AG, Mizenina OA. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochem.* 2000;65(1):49-58.
27. Tong X, Hussain, E, de Heuvel. The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain. *The EMBO Journal*. 2000;19(6):1263-1271.
28. Novokhatska O, Dergai M, Tsyba L, Skrypkina I, Filonenko V, Moreau J et al. Adaptor Proteins Intersectin 1 and 2 Bind Similar Proline-Rich Ligands but Are Differentially Recognized by SH2 Domain-Containing Proteins. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e70546.
29. Rossman K, Cheng L, Mahon G, Rojas R, Snyder J, Whitehead I et al. Multifunctional Roles for the PH Domain of Dbs in Regulating Rho GTPase Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(20):18393-18400.
30. Pruitt W, Karnoub A, Rakauskas A, Guipponi M, Antonarakis S, Kurakin A et al. Role of the pleckstrin homology domain in intersectin-L Dbl homology domain activation of Cdc42 and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2003;1640(1):61-68.

31. Rizo J, Südhof T. C2-domains, Structure and Function of a Universal Ca²⁺-binding Domain. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(26):15879-15882.
32. Tsyba L, Skrypkina I, Rynditch A, Nikolaienko O, Ferenets G, Fortna A et al. Alternative splicing of mammalian Intersectin 1: domain associations and tissue specificities. *Genomics*. 2004;84(1):106-113.
33. Tsyba L, Gryaznova T, Dergai O, Dergai M, Skrypkina I, Kropyvko S et al. Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008;372(4):929-934.
34. Hussain N, Yamabhai M, Ramjaun A, Guy A, Baranes D, O'Bryan J et al. Splice Variants of Intersectin Are Components of the Endocytic Machinery in Neurons and Nonneuronal Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(22):15671-15677.
35. Henne W, Boucrot E, Meinecke M, Evergren E, Vallis Y, Mittal R et al. FCHo Proteins Are Nucleators of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Science*. 2010;328(5983):1281-1284.
36. Martina J, Bonangelino C, Aguilar R, Bonifacino J. Stonin 2: an adaptor-like protein that interacts with components of the endocytic machinery. *The Journal of Cell Biology*. 2001;153(5):1111-1120.
37. Roos J, Kelly R. Dap160, a Neural-specific Eps15 Homology and Multiple SH3 Domain-containing Protein That Interacts with *Drosophila* Dynamin. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(30):19108-19119.
38. Evergren E, Gad H, Walther K, Sundborger A, Tomilin N, Shupliakov O. Intersectin Is a Negative Regulator of Dynamin Recruitment to the Synaptic Endocytic Zone in the Central Synapse. *Journal of Neuroscience*. 2007;27(2):379-390.
39. Allaire P, Ritter B, Thomas S, Burman J, Denisov A, Legendre-Guillemain V et al. Connecdenn, A Novel DENN Domain-Containing Protein of Neuronal Clathrin-Coated Vesicles Functioning in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Journal of Neuroscience*. 2006;26(51):13202-13212.

40. Nakatsu F, Perera R, Lucast L, Zoncu R, Domin J, Gertler F et al. The inositol 5-phosphatase SHIP2 regulates endocytic clathrin-coated pit dynamics. *The Journal of Cell Biology*. 2010;190(3):307-315.
41. Cremona O, Di Paolo G, Wenk M, Lüthi A, Kim W, Takei K et al. Essential Role of Phosphoinositide Metabolism in Synaptic Vesicle Recycling. *Cell*. 1999;99(2):179-188.
42. Simpson F, Hussain NK, Qualmann B et al. SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat. Cell Biol*. 1999;1(2):119–124.
43. Martin N, Mohny R, Dunn S, Das M, Scappini E, O'Bryan J. Intersectin Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Endocytosis, Ubiquitylation, and Signaling. *Molecular Pharmacology*. 2006;70(5):1643-1653.
44. Thomas S, Ritter B, Verbich D, Sanson C, Bourbonnière L, McKinney R et al. Intersectin Regulates Dendritic Spine Development and Somatodendritic Endocytosis but Not Synaptic Vesicle Recycling in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(18):12410-12419.
45. Yu Y, Chu P, Bowser D, Keating D, Dubach D, Harper I et al. Mice deficient for the chromosome 21 ortholog Itsn1 exhibit vesicle-trafficking abnormalities. *Human Molecular Genetics*. 2008;17(21):3281-3290.
46. Rose S, Malabarba M, Krag C, Schultz A, Tsushima H, Di Fiore P et al. *Caenorhabditis elegans* Intersectin: A Synaptic Protein Regulating Neurotransmission. *Molecular Biology of the Cell*. 2007;18(12):5091-5099.
47. Koh T, Verstreken P, Bellen H. Dap160/Intersectin Acts as a Stabilizing Scaffold Required for Synaptic Development and Vesicle Endocytosis. *Neuron*. 2004;43(2):193-205.
48. Marie B, Sweeney S, Poskanzer K, Roos J, Kelly R, Davis G. Dap160/Intersectin Scaffolds the Periaxial Zone to Achieve High-Fidelity Endocytosis and Normal Synaptic Growth. *Neuron*. 2004;43(2):207-219.

49. Levchenko A, Bruck J, Sternberg P. Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(11):5818-5823.
50. Malacombe M, Ceridono M, Calco V, Chasserot-Golaz S, McPherson P, Bader M et al. Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. *The EMBO Journal*. 2006;25(15):3494-3503.
51. Yang X, Yan F, He Z, Liu S, Cheng Y, Wei K et al. ITSN2L Interacts with and Negatively Regulates RABEP1. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(12):28242-28254.
52. Wong K, Wilson J, Russo A, Wang L, Okur M, Wang X et al. Intersectin (ITSN) Family of Scaffolds Function as Molecular Hubs in Protein Interaction Networks. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e36023.
53. Mohny R, Das M, Bivona T, Hanes R, Adams A, Philips M et al. Intersectin Activates Ras but Stimulates Transcription through an Independent Pathway Involving JNK. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(47):47038-47045.
54. Das M, Scappini E, Martin N, Wong K, Dunn S, Chen Y et al. Regulation of Neuron Survival through an Intersectin-Phosphoinositide 3'-Kinase C2-AKT Pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 2007;27(22):7906-7917.
55. Okur M, Ooi J, Fong C, Martinez N, Garcia-Dominguez C, Rojas J et al. Intersectin 1 Enhances Cbl Ubiquitylation of Epidermal Growth Factor Receptor through Regulation of Sprouty2-Cbl Interaction. *Molecular and Cellular Biology*. 2011;32(4):817-825.
56. Okur M, Russo A, O'Bryan J. Receptor Tyrosine Kinase Ubiquitylation Involves the Dynamic Regulation of Cbl-Spry2 by Intersectin 1 and the Shp2 Tyrosine Phosphatase. *Molecular and Cellular Biology*. 2013;34(2):271-279.
57. Heasman S, Ridley A. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(9):690-701.

58. Lamarche-Vane N, Hall A. CdGAP, a Novel Proline-rich GTPase-activating Protein for Cdc42 and Rac. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(44):29172-29177.
59. Momboisse F, Ory S, Calco V, Malacombe M, Bader M, Gasman S. Calcium-regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells: Intersectin-1L Stimulates Actin Polymerization and Exocytosis by Activating Cdc42. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009;1152(1):209-214.
60. Irie F, Yamaguchi Y. EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nature Neuroscience*. 2002;5(11):1117-1118.
61. Nishimura T, Yamaguchi T, Tokunaga A, Hara A, Hamaguchi T, Kato K et al. Role of Numb in Dendritic Spine Development with a Cdc42 GEF Intersectin and EphB2. *Molecular Biology of the Cell*. 2006;17(3):1273-1285.
62. McGavin M, Badour K, Hardy L, Kubiseski T, Zhang J, Siminovitch K. The Intersectin 2 Adaptor Links Wiskott Aldrich Syndrome Protein (WASp)-mediated Actin Polymerization to T Cell Antigen Receptor Endocytosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001;194(12):1777-1787.
63. Humphries A, Donnelly S, Way M. Cdc42 and the Rho GEF intersectin-1 collaborate with Nck to promote N-WASP-dependent actin polymerisation. *Journal of Cell Science*. 2013;127(3):673-685.
64. McCormick M, Shero J, Cheung M, Kan Y, Hieter P, Antonarakis S. Construction of human chromosome 21-specific yeast artificial chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86(24):9991-9995.
65. Pucharcós C, Fuentes J, Casas C, de la Luna S, Alcántara S, Arbonés M et al. Alu-splice cloning of human Intersectin (ITSN), a putative multivalent binding protein expressed in proliferating and differentiating neurons and overexpressed in Down syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 1999;7(6):704-712.
66. Keating D, Chen C, Pritchard M. Alzheimer's disease and endocytic dysfunction: Clues from the Down syndrome-related proteins, DSCR1 and ITSN1. *Ageing Research Reviews*. 2006;5(4):388-401.

67. Scappini E, Koh T, Martin N, O'Bryan J. Intersectin enhances huntingtin aggregation and neurodegeneration through activation of c-Jun-NH2-terminal kinase. *Human Molecular Genetics*. 2007;16(15):1862-1871.
68. Wang J, Wu W, Cerione R. Cdc42 and Ras Cooperate to Mediate Cellular Transformation by Intersectin-L. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(24):22883-22891.
69. Gu F, Zhang H, Qin F, Liu X, Li W, Fu L et al. Intersectin1-s, A multidomain adapter protein, Is essential for malignant glioma proliferation. *Glia*. 2015;63(9):1595-1605.
70. Specht K, Harbeck N, Smida J, Annecke K, Reich U, Naehrig J et al. Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2009;118(1):45-56.
71. Ridley A. Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015;36:103-112.
72. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2009;28(1-2):15-33.
73. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 2002;420(6916):629-635.
74. Nobes C, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995;81(1):53-62.
75. Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. 1995;15(4):1942-1952.
76. MILLARD T, SHARP S, MACHESKY L. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochemical Journal*. 2004;380(1):1-17.

77. Campellone K, Webb N, Znameroski E, Welch M. WHAMM Is an Arp2/3 Complex Activator That Binds Microtubules and Functions in ER to Golgi Transport. *Cell*. 2008;134(1):148-161.
78. Linardopoulou E, Parghi S, Friedman C, Osborn G, Parkhurst S, Trask B. Human Subtelomeric WASH Genes Encode a New Subclass of the WASP Family. *PLoS Genetics*. 2007;3(12):e237.
79. Zuchero J, Coutts A, Quinlan M, Thangue N, Mullins R. p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nature Cell Biology*. 2009;11(4):451-459.
80. Derry J, Ochs H, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*. 1994;78(4):635-644.
81. Prehoda K, Scott J, Mullins R. Integration of Multiple Signals Through Cooperative Regulation of the N-WASP-Arp2/3 Complex. *Science*. 2000;290(5492):801-806.
82. Uruno T, Liu J, Li Y, Smith N, Zhan X. Sequential Interaction of Actin-related Proteins 2 and 3 (Arp2/3) Complex with Neural Wiscott-Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and Cortactin during Branched Actin Filament Network Formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(28):26086-26093.
83. Egile C, Rouiller I, Xu X, Volkmann N, Li R, Hanein D. Mechanism of Filament Nucleation and Branch Stability Revealed by the Structure of the Arp2/3 Complex at Actin Branch Junctions. *PLoS Biology*. 2005;3(11):e383.
84. Rotty J, Wu C, Bear J. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013;14(1):7-12.
85. Weaver A, Karginov A, Kinley A, Weed S, Li Y, Parsons J et al. Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Current Biology*. 2001;11(5):370-374.
86. Boujemaa-Paterski R, Gouin E, Hansen G, Samarin S, Le Clainche C, Didry D et al. Listeria Protein ActA Mimics WASP Family Proteins: It Activates Filament Barbed End Branching by Arp2/3 Complex. *Biochemistry*. 2001;40(38):11390-11404.
87. Kurisu S, Takenawa T. The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biology*. 2009;10(6):226.

88. Kim A, Kakalis L, Abdul-Manan N, Liu G, Rosen M. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott–Aldrich syndrome protein. *Nature*. 2000;404(6774):151-158.
89. Panchal S, Kaiser D, Torres E, Pollard T, Rosen M. A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2003;10(8):591-598.
90. Miki H, Takenawa T. Regulation of Actin Dynamics by WASP Family Proteins. *Journal of Biochemistry*. 2003;134(3):309-313.
91. Aspenström P. The verprolin family of proteins: Regulators of cell morphogenesis and endocytosis. *FEBS Letters*. 2005;579(24):5253-5259.
92. García E, Jones G, Machesky L, Antón I. WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes. *European Journal of Cell Biology*. 2012;91(11-12):869-877.
93. Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D, Carlier M. Formin Is a Processive Motor that Requires Profilin to Accelerate Actin Assembly and Associated ATP Hydrolysis. *Cell*. 2004;119(3):419-429.
94. Vaduva G, Martinez-Quiles N, Anton I, Martin N, Geha R, Hopper A et al. The Human WASP-interacting Protein, WIP, Activates the Cell Polarity Pathway in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(24):17103-17108.
95. Ramesh N, Anton I, Hartwig J, Geha R. WIP, a protein associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(26):14671-14676.
96. de la Fuente M, Sasahara Y, Calamito M, Antón I, Elkhali A, Gallego M et al. WIP is a chaperone for Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(3):926-931.
97. García E, Ragazzini C, Yu X, Cuesta-García E, Bernardino de la Serna J, Zech T et al. WIP and WICH/WIRE co-ordinately control invadopodium formation and maturation in human breast cancer cell invasion. *Scientific Reports*. 2016;6(1):23590.

98. Koduru S, Massaad M, Wilbur C, Kumar L, Geha R, Ramesh N. A novel anti-WIP monoclonal antibody detects an isoform of WIP that lacks the WASP binding domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;353(4):875-881.
99. Sasahara Y, Rachid R, Byrne M, de la Fuente M, Abraham R, Ramesh N et al. Mechanism of Recruitment of WASP to the Immunological Synapse and of Its Activation Following TCR Ligation. *Molecular Cell*. 2002;10(6):1269-1281.
100. Martinez-Quiles N, Rohatgi R, Antón I, Medina M, Saville S, Miki H et al. WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nature Cell Biology*. 2001;3(5):484-491.
101. Ho H, Rohatgi R, Lebensohn A, Le Ma, Li J, Gygi S et al. Toca-1 Mediates Cdc42-Dependent Actin Nucleation by Activating the N-WASP-WIP Complex. *Cell*. 2004;118(2):203-216.
102. Cory G, Garg R, Cramer R, Ridley A. Phosphorylation of Tyrosine 291 Enhances the Ability of WASP to Stimulate Actin Polymerization and Filopodium Formation. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(47):45115-45121.
103. Torres E, Rosen M. Contingent Phosphorylation/Dephosphorylation Provides a Mechanism of Molecular Memory in WASP. *Molecular Cell*. 2003;11(5):1215-1227.
104. Lanzardo S, Curcio C, Forni G, Antón I. Erratum to “A role for WASP Interacting Protein, WIP, in fibroblast adhesion, spreading and migration” [*Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 262–274]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(9):1743-1746.
105. Chou H, Antón I, Holt M, Curcio C, Lanzardo S, Worth A et al. WIP Regulates the Stability and Localization of WASP to Podosomes in Migrating Dendritic Cells. *Current Biology*. 2006;16(23):2337-2344.
106. Anton I, Saville S, Byrne M, Curcio C, Ramesh N, Hartwig J et al. WIP participates in actin reorganization and ruffle formation induced by PDGF. *Journal of Cell Science*. 2003;116(12):2443-2451.

107. Cortesio C, Perrin B, Bennin D, Huttenlocher A. Actin-binding Protein-1 Interacts with WASp-interacting Protein to Regulate Growth Factor-induced Dorsal Ruffle Formation. *Molecular Biology of the Cell*. 2010;21(1):186-197.
108. Antón I, Lu W, Mayer B, Ramesh N, Geha R. The Wiskott-Aldrich Syndrome Protein-interacting Protein (WIP) Binds to the Adaptor Protein Nck. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(33):20992-20995.
109. Antón I, de la Fuente M, Sims T, Freeman S, Ramesh N, Hartwig J et al. WIP Deficiency Reveals a Differential Role for WIP and the Actin Cytoskeleton in T and B Cell Activation. *Immunity*. 2002;16(2):193-204.
110. Gallego M, de la Fuente M, Anton I, Snapper S, Fuhlbrigge R, Geha R. WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1 α . *International Immunology*. 2006;18(2):221-232.
111. Le Bras S, Massaad M, Koduru S, Kumar L, Oyoshi M, Hartwig J et al. WIP is critical for T cell responsiveness to IL-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(18):7519-7524.
112. Tsuboi S. A Complex of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein with Mammalian Verprolins Plays an Important Role in Monocyte Chemotaxis. *The Journal of Immunology*. 2006;176(11):6576-6585.
113. Sato M, Sawahata R, Takenouchi T, Kitani H. Identification of Fyn as the binding partner for the WASP N-terminal domain in T cells. *International Immunology*. 2011;23(8):493-502.
114. Krzewski K, Chen X, Strominger J. WIP is essential for lytic granule polarization and NK cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(7):2568-2573.
115. Tsuboi S, Meerloo J. Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Is a Key Regulator of the Phagocytic Cup Formation in Macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(47):34194-34203.
116. Franco A, Knafo S, Banon-Rodriguez I, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Nieto M et al. WIP Is a Negative Regulator of Neuronal Maturation and Synaptic Activity. *Cerebral Cortex*. 2012;22(5):1191-1202.

117. Franco-Villanueva A, Wandosell F, Antón I. Neuritic complexity of hippocampal neurons depends on WIP-mediated mTORC1 and Abl family kinases activities. *Brain and Behavior*. 2015;5(11):e00359.
118. Masters J, Cotman S, Osterburg H, Nichols N, Finch C. Modulation of a Novel RNA in Brain Neurons by Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors. *Neuroendocrinology*. 1996;63(1):28-38.
119. Weiler M, Smith J, Masters J. CR16, a novel proline-rich protein expressed in rat brain neurons, binds to SH3 domains and is a MAP kinase substrate. *Journal of Molecular Neuroscience*. 1996;7(3):203-215.
120. Ho H, Rohatgi R, Ma L, Kirschner M. CR16 forms a complex with N-WASP in brain and is a novel member of a conserved proline-rich actin-binding protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(20):11306-11311.
121. Suetsugu S, Banzai Y, Kato M, Fukami K, Kataoka Y, Takai Y et al. Male-specific sterility caused by the loss of CR16. *Genes to Cells*. 2007;12(6):721-733.
122. Xiang W, Wen Z, Pang W, Hu L, Xiong C, Zhang Y. CR16 forms a complex with N-WASP in human testes. *Cell and Tissue Research*. 2011;344(3):519-526.
123. Aspenström P. The WASP-Binding Protein WIRE Has a Role in the Regulation of the Actin Filament System Downstream of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor. *Experimental Cell Research*. 2002;279(1):21-33.
124. Kato M, Miki H, Kurita S, Endo T, Nakagawa H, Miyamoto S et al. WICH, a Novel Verprolin Homology Domain-Containing Protein That Functions Cooperatively with N-WASP in Actin-Microspike Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;291(1):41-47.
125. Kato M, Takenawa T. WICH, a member of WASP-interacting protein family, cross-links actin filaments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;328(4):1058-1066.
126. Aspenström P. The mammalian verprolin homologue WIRE participates in receptor-mediated endocytosis and regulation of the actin filament system by distinct mechanisms. *Experimental Cell Research*. 2004;298(2):485-498.

127. Kovacs E, Verma S, Ali R, Ratheesh A, Hamilton N, Akhmanova A et al. N-WASP regulates the epithelial junctional actin cytoskeleton through a non-canonical post-nucleation pathway. *Nature Cell Biology*. 2011;13(8):934-943.
128. Misra A, Rajmohan R, Lim R, Bhattacharyya S, Thanabalu T. The mammalian Verprolin, WIRE induces filopodia independent of N-WASP through IRSp53. *Experimental Cell Research*. 2010;316(17):2810-2824.
129. Linder S, Wiesner C, Himmel M. Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011;27(1):185-211.
130. Fidler I. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(6):453-458.
131. Linder S. Invadosomes at a glance. *Journal of Cell Science*. 2009;122(17):3009-3013.
132. Gimona M, Buccione R, Courtneidge S, Linder S. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Current Opinion in Cell Biology*. 2008;20(2):235-241.
133. Calle Y, Chou H, Thrasher A, Jones G. Wiskott-Aldrich syndrome protein and the cytoskeletal dynamics of dendritic cells. *The Journal of Pathology*. 2004;204(4):460-469.
134. Albiges-Rizo C, Destaing O, Fourcade B, Planus E, Block M. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *Journal of Cell Science*. 2009;122(17):3037-3049.
135. Ayala I, Baldassarre M, Giacchetti G, Caldieri G, Tete S, Luini A et al. Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. *Journal of Cell Science*. 2008;121(3):369-378.
136. Seals D, Azucena E, Pass I, Tesfay L, Gordon R, Woodrow M et al. The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells. *Cancer Cell*. 2005;7(2):155-165.

137. Oser M, Yamaguchi H, Mader C, Bravo-Cordero J, Arias M, Chen X et al. Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *The Journal of Cell Biology*. 2009;186(4):571-587.
138. Sharma V, Eddy R, Entenberg D, Kai M, Gertler F, Condeelis J. Tks5 and SHIP2 Regulate Invadopodium Maturation, but Not Initiation, in Breast Carcinoma Cells. *Current Biology*. 2013;23(21):2079-2089.
139. Buccione R, Orth J, McNiven M. Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004;5(8):647-657.
140. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(31):21491-21494.
141. Stylli S, Kaye A, Lock P. Invadopodia: At the cutting edge of tumour invasion. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2008;15(7):725-737.
142. Clark E, Whigham A, Yarbrough W, Weaver A. Cortactin Is an Essential Regulator of Matrix Metalloproteinase Secretion and Extracellular Matrix Degradation in Invadopodia. *Cancer Research*. 2007;67(9):4227-4235.
143. Artym V, Zhang Y, Seillier-Moiseiwitsch F, Yamada K, Mueller S. Dynamic Interactions of Cortactin and Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase at Invadopodia: Defining the Stages of Invadopodia Formation and Function. *Cancer Research*. 2006;66(6):3034-3043.
144. Poincloux R, Lizarraga F, Chavrier P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *Journal of Cell Science*. 2009;122(17):3015-3024.
145. Chabadel A, Bañon-Rodríguez I, Cluet D, Rudkin B, Wehrle-Haller B, Genot E et al. CD44 and β 3 Integrin Organize Two Functionally Distinct Actin-based Domains in Osteoclasts. *Molecular Biology of the Cell*. 2007;18(12):4899-4910.
146. Moreau V, Tatin F, Varon C, Genot E. Actin Can Reorganize into Podosomes in Aortic Endothelial Cells, a Process Controlled by Cdc42 and RhoA. *Molecular and Cellular Biology*. 2003;23(19):6809-6822.

147. Olivier A, Jeanson-Leh L, Bouma G, Compagno D, Blondeau J, Seye K et al. A Partial Down-regulation of WASP Is Sufficient to Inhibit Podosome Formation in Dendritic Cells. *Molecular Therapy*. 2006;13(4):729-737.
148. Bañón-Rodríguez I, Monypenny J, Ragazzini C, Franco A, Calle Y, Jones G et al. The cortactin-binding domain of WIP is essential for podosome formation and extracellular matrix degradation by murine dendritic cells. *European Journal of Cell Biology*. 2011;90(2-3):213-223.
149. Oikawa T, Itoh T, Takenawa T. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *The Journal of Cell Biology*. 2008;182(1):157-169.
150. García E, Machesky L, Jones G, Antón I. WIP is necessary for matrix invasion by breast cancer cells. *European Journal of Cell Biology*. 2014;93(10-12):413-423.
151. Staub E, Groene J, Heinze M, Mennerich D, Roepcke S, Klaman I et al. An expression module of WIPF1-coexpressed genes identifies patients with favorable prognosis in three tumor types. *Journal of Molecular Medicine*. 2009;87(6):633-644.
152. Gu X, Zerbini L, Otu H, Bhasin M, Yang Q, Joseph M et al. Reduced PDEF Expression Increases Invasion and Expression of Mesenchymal Genes in Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*. 2007;67(9):4219-4226.
153. Qadir M, Parveen A, Ali M. Cdc42: Role in Cancer Management. *Chemical Biology & Drug Design*. 2015;86(4):432-439.
154. Heasman S, Ridley A. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(9):690-701.
155. Nikolaienko O, Skrypkina I, Tsyba L, Fedyshyn Y, Morderer D, Buchman V et al. Intersectin 1 forms a complex with adaptor protein Ruk/CIN85 in vivo independently of epidermal growth factor stimulation. *Cellular Signalling*. 2009;21(5):753-759.
156. Morderer D, Nikolaienko O, Skrypkina I, Cherkas V, Tsyba L, Belan P et al. Endocytic adaptor protein intersectin 1 forms a complex with microtubule stabilizer STOP in neurons. *Gene*. 2012;505(2):360-364.

157. Dergai O, Novokhatska O, Dergai M, Skrypkina I, Tsyba L, Moreau J et al. Intersectin 1 forms complexes with SGIP1 and Reps1 in clathrin-coated pits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;402(2):408-413.
158. Kropyvko SV. New partners of TKS4 scaffold protein. *Biopolym. Cell*. 2015;31:395–401.
159. Маниатис Т, Фрич Э, Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Пер. с англ. Москва: Мир; 1984: 479.
160. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning*. New York (NY): A Laboratory Manual Cold Spring Harbor laboratory press; 1989:931-957.
161. Jacquemet G, Paatero I, Carisey A, Padzik A, Orange J, Hamidi H et al. FiloQuant reveals increased filopodia density during breast cancer progression. *The Journal of Cell Biology*. 2017;216(10):3387-3403.
162. French A, Mills S, Swarup R, Bennett M, Pridmore T. Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nature Protocols*. 2008;3(4):619-628.
163. Flynn D. Adaptor proteins. *Oncogene*. 2001;20(44):6270-6272.
164. Noy E, Fried S, Matalon O, Barda-Saad M. WIP Remodeling Actin behind the Scenes: How WIP Reshapes Immune and Other Functions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(6):7629-7647.
165. Cortesio C, Perrin B, Bennin D, Huttenlocher A. Actin-binding Protein-1 Interacts with WASp-interacting Protein to Regulate Growth Factor-induced Dorsal Ruffle Formation. *Molecular Biology of the Cell*. 2010;21(1):186-197.
166. Gargini R, Escoll M, García E, García-Escudero R, Wandosell F, Antón I. WIP Drives Tumor Progression through YAP/TAZ-Dependent Autonomous Cell Growth. *Cell Reports*. 2016;17(8):1962-1977.
167. Mayle K, Le A, Kamei D. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2012;1820(3):264-281.

168. van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Mâle P, Goud B, Mellman I. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*. 1992;70(5):729-740.
169. Daro E, van der Sluijs P, Galli T, Mellman I. Rab4 and cellubrevin define different early endosome populations on the pathway of transferrin receptor recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(18):9559-9564.
170. Monteiro P, Rossé C, Castro-Castro A, Irondelle M, Lagoutte E, Paul-Gilloteaux P et al. Endosomal WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. *The Journal of Cell Biology*. 2013;203(6):1063-1079.
171. Morel E, Gruenberg J. Annexin A2 Binding to Endosomes and Functions in Endosomal Transport Are Regulated by Tyrosine 23 Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(3):1604-1611.
172. Otey C, Kalnoski M, Bulinski J. Identification and quantification of actin isoforms in vertebrate cells and tissues. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1987;34(2):113-124.
173. Dugina V, Zwaenepoel I, Gabbiani G, Clement S, Chaponnier C. Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *Journal of Cell Science*. 2009;122(16):2980-2988.
174. Vondriska T, Pass J, Ping P. Scaffold proteins and assembly of multiprotein signaling complexes*1. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2004;37(2):391-397.
175. Gunasekaran K, Tsai C, Kumar S, Zanuy D, Nussinov R. Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold. *Trends in Biochemical Sciences*. 2003;28(2):81-85.
176. Maldonado-Báez L, Wendland B. Endocytic adaptors: recruiters, coordinators and regulators. *Trends in Cell Biology*. 2006;16(10):505-513.
177. Rossman K, Der C, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005;6(2):167-180.

178. Moreau V, Frischknecht F, Reckmann I, Vincentelli R, Rabut G, Stewart D et al. A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nature Cell Biology*. 2000;2(7):441-448.
179. Peterson F, Deng Q, Zettl M, Prehoda K, Lim W, Way M et al. Multiple WASP-interacting Protein Recognition Motifs Are Required for a Functional Interaction with N-WASP. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(11):8446-8453.
180. Torres E, Rosen M. Contingent Phosphorylation/Dephosphorylation Provides a Mechanism of Molecular Memory in WASP. *Molecular Cell*. 2003;11(5):1215-1227.
181. Teckchandani A, Mulkearns E, Randolph T, Toida N, Cooper J. The clathrin adaptor Dab2 recruits EH domain scaffold proteins to regulate integrin β 1 endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*. 2012;23(15):2905-2916.
182. McCaffrey M, Bielli A, Cantalupo G, Mora S, Roberti V, Santillo M et al. Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Letters*. 2001;495(1-2):21-30.
183. Linder S, Scita G. RABGTPases in MT1-MMP trafficking and cell invasion: Physiology versus pathology. *Small GTPases*. 2015;6(3):145-152.
184. Frittoli E, Palamidessi A, Marighetti P, Confalonieri S, Bianchi F, Malinverno C et al. A RAB5/RAB4 recycling circuitry induces a proteolytic invasive program and promotes tumor dissemination. *The Journal of Cell Biology*. 2014;206(2):307-328.
185. Cataldo A, Peterhoff C, Troncoso J, Gomez-Isla T, Hyman B, Nixon R. Endocytic Pathway Abnormalities Precede Amyloid β Deposition in Sporadic Alzheimer's Disease and Down Syndrome. *The American Journal of Pathology*. 2000;157(1):277-286.
186. Cataldo A, Petanceska S, Peterhoff C, Terio N, Epstein C, Villar A et al. AppGene Dosage Modulates Endosomal Abnormalities of Alzheimer's Disease in a Segmental Trisomy 16 Mouse Model of Down Syndrome. *The Journal of Neuroscience*. 2003;23(17):6788-6792.

187. Yang X, Chiang C. Sumoylation in gene regulation, human disease, and therapeutic action. *F1000Prime Reports*. 2013;5.

188. Flotho A, Melchior F. Sumoylation: A Regulatory Protein Modification in Health and Disease. *Annual Review of Biochemistry*. 2013;82(1):357-385.