

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

ПАНЬКІВСЬКИЙ Сергій Володимирович



УДК 577.22 + 577.29

**ПОШУК ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДЕРНИХ ФУНКЦІЙ ПРОТЕЇНА
ЕНДОЦИТОЗУ ITSN1**

03.00.03 – молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України
Риндич Алла Володимирівна,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач відділу функціональної геноміки.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини»,
професор кафедри загальної та медичної генетики;


доктор біологічних наук, професор
Борисова Тетяна Олександрівна,
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна
НАН України,
завідувач відділу нейрохімії.

Захист відбудеться 24 листопада 2020 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано « » жовтня 2020 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., с.н.с.



I.V. Крупська

ЗАГАЛЬНИЙ ХАРАКТЕР РОБОТИ

Актуальність теми. Скафолдні протеїни є важливими клітинними компонентами, які містять кілька структурних доменів та сайтів посттрансляційних модифікацій. Такі протеїни слугують платформами для збірки білкових комплексів та регулюють їх просторову та часову організацію (Good et al., 2011). Актуальність дослідження скафолдних білків та їх ролі в розвитку патологічних станів значно зросла за умов активного вивчення феномену багатofункціональності протеїнів (англ. protein moonlighting).

ITSN1 та ITSN2 є скафолдними білками, що беруть участь у процесах клатрин-опосередкованого ендоцитозу, везикулярного транспорту, перебудов актинового цитоскелету та виступають регуляторами кількох важливих сигнальних шляхів клітини (Herrero-Garcia & O'Bryan, 2017). Оскільки ITSN1 та ITSN2 модулюють активність різноманітних процесів у клітинах організму, порушення експресії генів *ITSN1* та *ITSN2* асоційовані із злоякісною трансформацією клітин та порушенням функціонування нервової системи. Зокрема, надекспресія гена *ITSN1* спостерігається у клітинах нейробластоми, тоді як пригнічення його експресії інгібує ріст пухлин цього типу (Harris et al., 2017; Russo & O'Bryan, 2012). Надекспресія *ITSN1* стимулює проліферацію, міграцію та інвазію клітин гліобластоми (Gu et al., 2015). З іншого боку, ITSN1 пригнічує проліферацію, ріст та міграцію ракових клітин легень (Jeganathan et al., 2016). У нейронах та гліальних клітинах ITSN1 регулює везикулярний транспорт та синаптичну передачу стимулів (Gubar et al., 2013), сприяє розвитку дендритних шипиків (Nishimura et al., 2006) та модулює міграцію нейронів гіпокампу під час розвитку нервової системи (Jakob et al., 2017). Крім того, порушення експресії гена *ITSN1* спостерігається у пацієнтів із синдромом Дауна та хворобами Альцгеймера і Гантінгтона (Keating et al., 2006; Scarpini et al., 2007).

Аналіз клітинної локалізації білків та дослідження їх інтерактому є одними із найважливіших підходів, що використовуються для функціональної характеристики білків у клітині. Хоча для білків родини ITSN описана їх роль у цитоплазматичних процесах, нещодавні дані свідчать про те, що ITSN1 може бути залученим до регуляції процесів, що відбуваються у ядрі клітини. Таке припущення пов'язано із результатами кількох досліджень. По-перше, нещодавно було виявлено, що ITSN1 локалізується у ядрах клітин ліній 293 та HeLa (Alvisi et al., 2018). По-друге, попередні дослідження та біоінформатичний аналіз вказують на те, що протеїни родини ITSN можуть формувати комплекси із ядерними РНК-зв'язуючими білками. По-третє, білки, які містять домени SH3 та ділянку CCR можуть брати участь у формуванні немембранних субкомпартментів клітини, більшість яких знаходиться у ядрі та асоційовані із функціонуванням РНК-зв'язуючих білків. Хоча більшість досліджень ролі ITSN1 у клітині пов'язані із процесами, що відбуваються у цитоплазмі, наразі немає даних, які описували б функціональний зв'язок ITSN1 із протеїнами, що локалізуються у ядрі клітини, зокрема із РНК-зв'язуючими білками.

Одним із потенційних партнерів ITSN1 у ядрі є РНК-зв'язуючий білок SAM68. Він містить пролінові мотиви, взаємодіє із білками, що мають SH3-домени, та переважно локалізується у ядрі. SAM68 є модулятором сплайсингу та регулює

проліферацію, ріст та міграцію трансформованих клітин, а також є важливим для функціонування та розвитку нейронів (Sanchez-Jimenez & Sanchez-Margalet, 2013). Таким чином, детальне вивчення взаємодій між ITSN1 та РНК-зв'язуючими білками, зокрема SAM68, *in vitro* та *in vivo*, а також визначення їх функціонального значення є актуальними з точки зору розуміння молекулярних механізмів регуляції клітинних процесів, порушення яких може призводити до злоякісної трансформації або розвитку нейродегенеративних захворювань.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Роботу виконано в рамках наукових проектів відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Роль білок-білкових взаємодій у перебігу ряду фізіологічних та патологічних процесів» (номер державної реєстрації – 0112U002109, 2012-2016 рр.); «Функціональне значення ITSN-вмісних комплексів в регуляції молекулярних шляхів клітини» (номер державної реєстрації – 0116U007522, 2017-2021 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи є дослідження взаємодії між ITSN1 та РНК-зв'язуючими білками і встановлення функціонального значення ядерної локалізації ITSN1.

Відповідно до мети роботи було поставлено такі завдання:

1. Перевірити можливість взаємодії ITSN1 із РНК-зв'язуючими білками *in vitro*.
2. Охарактеризувати взаємодію між ITSN1 та РНК-зв'язуючим білком SAM68.
3. Дослідити вплив ITSN1 на властивості SAM68 за умов *in vitro*.
4. Проаналізувати вплив ITSN1 на властивості та локалізацію білка SAM68 у клітинах лінії HeLa.
5. Перевірити можливість участі ITSN1 в регуляції процесів альтернативного сплайсингу, які модулюються РНК-зв'язуючим білком SAM68.

Об'єкт дослідження – взаємодія скафолдного протеїна ITSN1 з РНК-зв'язуючими білками.

Предмет дослідження – ідентифікація нових білків-партнерів ITSN1 та визначення його ролі у процесах, що відбуваються в ядрі клітини.

Методи дослідження – біоінформатичний аналіз баз даних білків, клонування фрагментів кДНК, створення рекомбінантних плазмідних конструкцій, короткотривала трансфекція клітин еукаріотів, Вестерн-блот аналіз, синтез та афінна очистка рекомбінантних білків, преципітація білкових комплексів за допомогою GST- та His-злитих білків, аналіз змін електрофоретичної рухливості РНК, імуофлуоресцентний аналіз, метод наближеного лігування, аналіз взаємодії протеїнів у клітині з використанням мікротрубочок, флуоресцентна мікроскопія, атомно-силова мікроскопія, ЯМР-спектроскопія, пригнічення експресії генів з використанням коротких антисенсових шпилькових РНК, виділення РНК, ПЛР в реальному часі, аналіз альтернативного сплайсингу, та ін.

Наукова новизна отриманих результатів. Показано, що ITSN1 локалізується в ядрах клітин лінії раку шийки матки HeLa. Вперше виявлено, що ITSN1 взаємодіє із РНК-зв'язуючими білками SAM68, LARP6 та WBP11 *in vitro*. Встановлено, що білки SAM68, LARP6 та WBP11 також можуть взаємодіяти із білками ендцитозу ITSN2, AMPH, BIN1 та білками модуляторів перебудов актинового цитоскелету CTTN1, TKS4, TKS5 *in vitro*. Взаємодію ITSN1 і SAM68 підтверджено за допомогою

преципітації білкових комплексів *in vitro*. За допомогою флуоресцентної мікроскопії проведено характеристику взаємодії протеїнів ITSN1 та SAM68 у клітинах лінії HeLa та проаналізовано співлокалізацію цих білків у ядрах клітин. Встановлено, що ідентифікована взаємодія опосередковується доменом SH3A ITSN1 та проліновим мотивом P0 SAM68. Виявлено, що ITSN1 конкурує із адаптерним білком GRB2 за зв'язування із SAM68 та безпосередньо запобігає агрегації SAM68 за умов *in vitro*. Вперше виявлено пряму взаємодію між ITSN1 та РНК. Продемонстровано, що ITSN1 модулює формування SAM68-специфічних тілець в ядрах клітин лінії HeLa, індукуючи їх дисоціацію. Виявлено, що ITSN1 впливає на функціональну активність SAM68 у процесах сплайсингу та залучений до регуляції експресії прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу SRSF1.

Запропоновано гіпотетичну модель, згідно з якою ITSN1, який взаємодіє із мРНК, може запобігати формуванню SAM68-специфічних ядерних тілець. Механізм цього процесу можна пояснити регуляцією білком ITSN1 фазових переходів SAM68, що є характерним для багатьох РНК-зв'язуючих білків, які є основою немембранних субкомпартментів клітини. Таким чином, ITSN1 може бути залученим до регуляції функціональної активності SAM68, асоційованої із процесами сплайсингу в трансформованих клітинах.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати сприяють розумінню ролі комплексу ITSN1-SAM68 у канцерогенезі та розвитку нейродегенеративних захворювань. Представлені дослідження вказують на те, що протеїн ITSN1 можна розглядати як регулятор функціонування РНК-зв'язуючих білків, асоційованих із різноманітними патологічними станами. Ці дані сприяють подальшому вивченню ролі протеїна ITSN1 у процесах дозрівання та транспорту мРНК, з порушенням регуляції яких пов'язаний розвиток злоякісних новоутворень та нейродегенеративних захворювань.

В даній роботі виявлено, що ITSN1 може запобігати агрегації білка SAM68 за рахунок регуляції фазових переходів SAM68 *in vitro* та в клітині. Така модель може бути використана для подальших досліджень, пов'язаних із аналізом структури та функцій немембранних органел клітини та дослідженням значенням цих компартментів у розвитку патологічних станів. Крім того, в даному контексті SAM68 може розглядатись як потенційна мішень таргетної терапії.

Матеріали дисертації також можуть бути використані при підготовці лекційних та практичних занять для студентів.

Особистий внесок здобувача. Всі представлені експерименти було виконано особисто здобувачем або за його безпосередньої участі. Більшість проведених експериментів, обробка та аналіз отриманих результатів виконувались особисто здобувачем. Аналіз ЯМР-спектру SH3D-домену ITSN1 виконували у співробітництві із Е. Штайнер на базі лабораторії SABNP університету Еврі (Франція). Автор дякує С.В. Кропивку за люб'язно надані бактеріальні лізати із GST-злитими SH3-доменами, а Н. Сенченко та П. Буську – за допомогу при створенні генно-інженерних конструкцій та проведенні преципітації протеїнових комплексів.

Автор висловлює щиру подяку проф. Д. Пастре, др. Л. Хамону та др. А. Мокюеру (лабораторія SABNP, університет Еврі, Франція) за допомогу у розробці

стратегій досліджень, корисні поради в ході планування експериментів, обговорення отриманих результатів та відображенні результатів експериментів у наукових публікаціях. Слова щирої вдячності автор висловлює науковому керівнику роботи член-кореспонденту НАН України, д.б.н., професору А.В. Риндич за керівництво, корисні поради і зауваження під час проведення дисертаційної роботи та публікації результатів.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались на поточних наукових семінарах відділів функціональної геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, а також на міжнародних і вітчизняних наукових конференціях: XI Український біохімічний конгрес (Київ, Україна, 2014), XI Parnas Conference: Young Scientist Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Kyiv, Ukraine, 2018), XII Відкрита конференція молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 2018), 3rd International Conference «Smart Bio», (Kaunas, Lithuania, 2019), XVII міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки» (Київ, Україна, 2019), XIII annual Conference of Young Scientists IMBG NAS of Ukraine (Kyiv, Ukraine, 2019), 16th Horizons in Molecular Biology: International PhD Student Symposium (Göttingen, Germany, 2019), XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 2019), Virtual meeting on Genome Organization and Nuclear Function (USA, Cold Spring Harbor, 2020).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 3 статті у наукових фахових журналах та 9 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, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел, який охоплює 220 найменувань. Дисертацію викладено на 154 сторінках стандартного машинопису і містить 44 рисунки та 3 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Створення плазмідних конструкцій. Ампліфікацію фрагментів кДНК проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), використовуючи специфічні праймери. Відповідні продукти ПЛР вставляли у вектори для експресії в бактеріальній системі або в клітинах еукаріотів. Послідовність та рамку зчитування генно-інженерних конструкцій перевіряли за допомогою секвенування.

Клітинні лінії та трансфекція. Клітини ліній 293 (ембріональна нирка людини) та HeLa (аденокарцинома шийки матки) культивували згідно з рекомендаціями Американського банку клітин та тканин (ATCC). Трансфекцію клітин проводили за допомогою реагенту PEI (Sigma, США) або Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США).

Експресія рекомбінантних білків. Для експресії рекомбінантних білків у бактеріях та клітинах ссавців використовували плазмідні конструкції на основі векторів pET22b(+) (Novagen, США), pGEX-4T (GE Healthcare, Великобританія), pEGFPC (Clontech, США), pEF-Dest51 (Invitrogen, США). Рекомбінантні білки, злиті із His- та GST-тагами експресували в клітинах *E.coli* BL21 (DE3) і очищали з використанням Ni-NTA агарози (QIAGEN, Німеччина) та глутатіон-сефарози 4B (GE Healthcare, Великобританія) згідно з рекомендаціями виробника.

Дослідження білок-білкових взаємодій in vitro. Аналіз білкових взаємодій *in vitro* проводили за допомогою преципітації із використанням білків, злитих з GST- або His-тагом. Преципітати аналізували, використовуючи Вестерн-блот аналіз.

Флуоресцентна мікроскопія. Клітини на покривних скельцях фіксували у холодному метанолі та 4% розчині формальдегіду. Далі зразки покривали середовищем Mowiol (Sigma, США) або фарбували відповідними антитілами. Клітини пермеабілізували за допомогою розчину Triton X-100, блокували та інкубували із специфічними первинними антитілами і відповідними флуоресцентно міченими вторинними антитілами. Фарбування ядер проводили за допомогою DAPI. Отримані препарати аналізували на інвертованому мікроскопі Axiovert 220 (Zeiss, Німеччина), використовуючи масляний об'єктив 63×/1.40 NA. Аналіз інтенсивності флуоресценції та ядерно-цитоплазматичного співвідношення флуоресцентних сигналів проводили за допомогою програми «ImageJ 1.52a» (США).

Дослідження білок-білкових взаємодій в клітині. Аналіз білкових взаємодій в клітині проводили з використанням мікротрубочок як носіїв. Клітини трансфікували генно-інженерними конструкціями, що кодують два рекомбінантні білки: (1) білок, злитий із RFP та доменом, що зв'язується із мікротрубочками (MBD, microtubule binding domain); (2) білок, злитий із GFP. Взаємодія білків-партнерів призводила до їх співлокалізації на мікротрубочках, що аналізували за допомогою флуоресцентної мікроскопії.

Аналіз співлокалізації флуоресцентних сигналів на мікротрубочках. Для кількісної оцінки співлокалізації рекомбінантних білків на мікротрубочках проводили кореляційний аналіз. На відповідному зображенні будували лінію, яка перетинала мікротрубочки. Профілі інтенсивності флуоресцентних сигналів вздовж лінії для двох каналів перетворювали в числові значення, які було використано для оцінки коефіцієнту кореляції.

Метод зближеного лігування (Proximity Ligation Assay, PLA). Аналіз проводили з використанням набору Duolink II PLA (Olink Bioscience, Швеція) згідно з рекомендаціями виробника. Фіксовані і пермеабілізовані клітини блокували відповідним розчином із набору та інкубували з первинними антитілами. Далі зразки інкубували із PLA-зондами та сумішшю для лігування. Потім зразки покривали сумішшю для ампліфікації та проводили фарбування хроматину за допомогою DAPI.

Аналіз електрофоретичної рухливості мРНК. Для аналізу електрофоретичної рухливості мРНК очищені рекомбінантні білки інкубували із синтезованою *in vitro* мРНК гена люциферази у відповідному буфері при кімнатній температурі. Утворені комплекси розділяли в агарозному гелі у 0,5× буфері TBE при напрузі 25 В та візуалізували за допомогою етидид броміду.

Атомно-силова мікроскопія. Для аналізу комплексів мРНК-білок очищений білок інкубували із мРНК гена люциферази та наносили на поверхню зрізу слюди. Фіксацію зразка проводили за допомогою 0,02% ураніл ацетату. Зразки аналізували на атомно-силовому мікроскопі Nanoscope V Multimode 8 (Bruker, США).

ЯМР-спектроскопія. ЯМР-спектроскопію проводили на спектрометрі Bruker AVIII HD 600 MHz при температурі 298 К. Для отримання 2D спектрів білка за умов наявності одноланцюгової ДНК, ^{15}N -мічений білок інкубували із одноланцюговими олігодезоксинуклеотидами CA_6 або T_{12} у молярному співвідношенні 1:1,2 та аналізували за допомогою протоколу SOFAST-HMQC.

*Нокдаун гена *ITSN1*.* Нокдаун *ITSN1* проводили згідно з стандартним протоколом TRC (The RNAi Consortium), використовуючи лентівірусні частки для доставки плазмідних конструкцій pLKO-shRNA-1 та pLKO-shRNA-2, які кодували короткі антисенсові шпилькові РНК, специфічні до мРНК *ITSN1*. Для селекції клітин застосовували антибіотик пуроміцин. В якості контролю використовували пустий вектор pLKO.

Аналіз експресії генів та сплайсингу. Аналіз відносної експресії досліджуваних генів та їх ізоформ проводили за допомогою кількісної ПЛР з використанням специфічних праймерів. Оцінку відносної експресії генів проводили за допомогою методу $\Delta\Delta\text{C}_\text{T}$, використовуючи експресію *GAPDH* для нормалізації. Для аналізу змін в подіях сплайсингу отримували співвідношення експресії відповідних ізоформ кожного гена. Далі співвідношення експресії ізоформ у досліджуваних клітинах (shRNA) нормалізували до відповідних показників контрольних клітин (pLKO).

Біоінформатичний аналіз. Для аналізу потенційних білок-білкових взаємодій було використано бази даних BioGrid (<http://thebiogrid.org/>), MINT (<https://mint.bio.uniroma2.it/>) та IntAct (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>).

Статистична обробка даних. Всі дані наведено як середнє арифметичне значення \pm стандартне відхилення. Статистичну обробку даних проводили із використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 5 або MS Excel. Дві вибірки перевіряли на нормальність розподілу за *W*-критерієм Шапіро-Уїлка. Статистичний аналіз нормально розподілених двох вибірок проводили за допомогою *t*-тесту. Статистичний аналіз ненормально розподілених двох груп проводили за допомогою критерію Манна-Уїтні. В обох випадках достовірною вважалася різниця між групами при $p < 0.05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Детекція *ITSN1* в ядрах клітин HeLa. Аналіз клітинної локалізації ендогенного *ITSN1s* в клітинах лінії HeLa показав, що крім цитоплазми ендогенний *ITSN1s* локалізувався також в перинуклеарній ділянці та в ядрі, де проявлявся у вигляді дифузної та гомогенної флуоресценції (рис. 1.a). Про це свідчила однакова інтенсивність його флуоресценції в цитоплазмі та в ядрі. Надекспресований рекомбінантний *ITSN1s-GFP* локалізувався переважно в цитоплазмі із формуванням дрібних гранул. В деяких клітинах *ITSN1s-GFP* розташовувався як в цитоплазмі, так і в ядрі, рівномірно заповнюючи обидва компартменти (рис. 1.б).

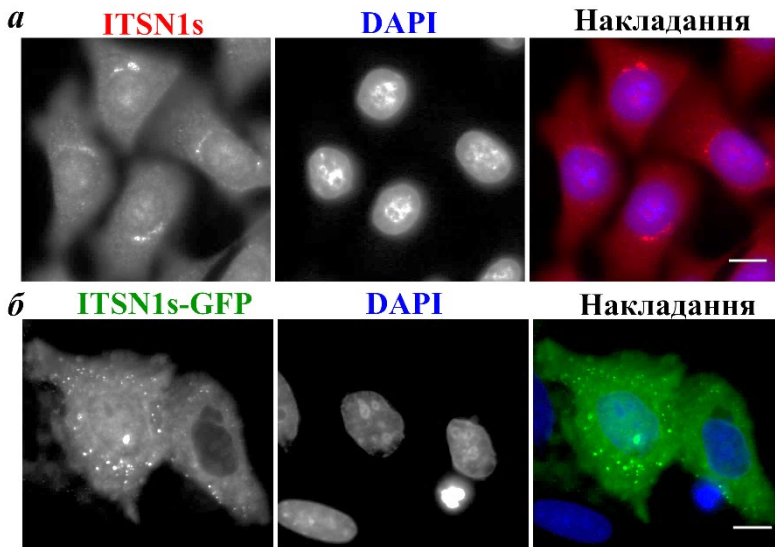


Рис. 1. Аналіз локалізації ITSN1s в клітинах лінії HeLa.

а – імунофлуоресцентний аналіз локалізації ендogenous ITSN1s за допомогою специфічних антитіл та вторинних антитіл, мічених Alexa Fluor 594.

б – Флуоресцентний аналіз локалізації рекомбінантного білка ITSN1s-GFP. Візуалізацію ядер проводили за допомогою барвника DAPI. Масштаб – 15 мкм

Аналіз взаємодії ITSN1 із РНК-зв'язуючими білками SAM68, WBP11 та LARP6 *in vitro*. Аналіз баз даних білок-білкових взаємодій виявив серед 236 відомих потенційних партнерів ITSN1 39 білків, які локалізуються в ядрі і беруть участь в регуляції ядерних процесів. Оскільки більшість визначених партнерів є РНК-зв'язуючими білками, які регулюють процесинг та транспорт мРНК, для подальшого аналізу вибрали три з них, а саме SAM68, WBP11 та LARP6, які містять пролінові мотиви, що потенційно можуть взаємодіяти із SH3-доменами ITSN1. Для підтвердження цих взаємодій провели преципітацію надекспресованих SAM68, WBP11 та LARP6 із лізатів клітин 293, використовуючи злитий із GST тандем п'яти SH3-доменів ITSN1 (ITSN1_{SH3-box}). Виявлено, що SH3-домени ITSN1 преципітували усі проаналізовані РНК-зв'язуючі білки (рис. 2). Зазначені РНК-зв'язуючі білки також взаємодіяли із білками ендозитозу ITSN2, AMPH, BIN1 та білками модуляторами перебудов актинового цитоскелету CTTN1, TKS4, TKS5.

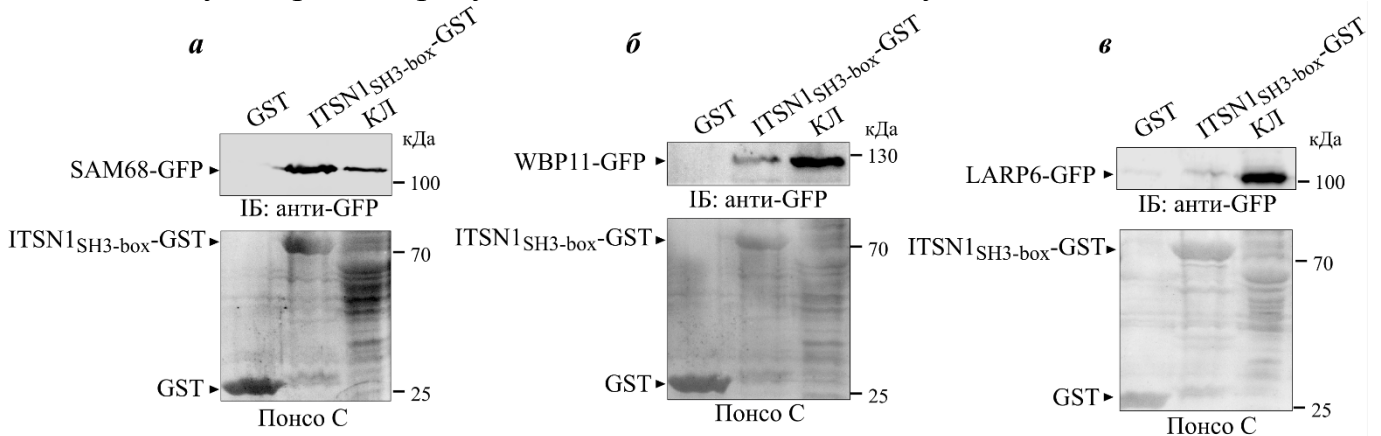


Рис. 2. Аналіз взаємодії SH3-доменів ITSN1 із РНК-зв'язуючими білками SAM68, WBP11 та LARP6 *in vitro*. Імобілізований на глутатіон-сефарозі ITSN1_{SH3-box}-GST інкубували із лізатами клітин 293, що містили рекомбінантні білки SAM68-GFP (а), WBP11-GFP (б) або LARP6-GFP (в). Преципітовані білки детектували за допомогою антитіл, специфічних до GFP. GST-злиті SH3-домени візуалізували за допомогою фарбування Понсо С. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот

Аналіз взаємодії між ITSN1 і SAM68 в клітині з використанням мікротрубочок як носіїв. На наступному етапі ми проаналізували взаємодію між ITSN1 і SAM68 з використанням методу, що ґрунтується на ідентифікації взаємодії між партнерами в клітині з використанням мікротрубочок як носіїв. В результаті

котрансфекції плазмідними конструкціями в клітинах експресуються два рекомбінантні білки, один з яких асоційований із мікротрубочками і злитий із RFP, інший – злитий із GFP. Асоціація та співлокалізація обох білків на мікротрубочках, яку можна виявити за допомогою флуоресцентної мікроскопії, свідчить про взаємодію білків інтересу в інтактній клітині (рис. 3).

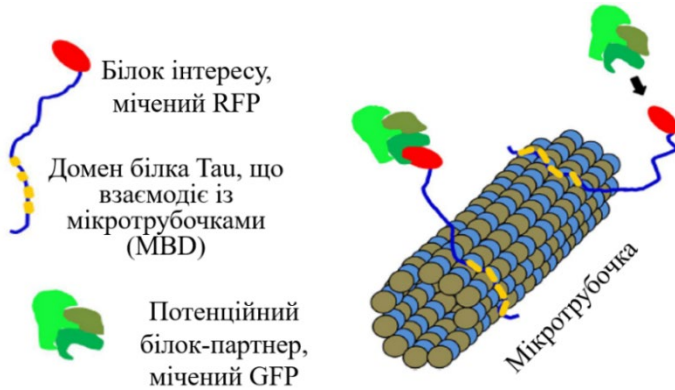


Рис. 3. Схематичне зображення принципу аналізу білок-білкових взаємодій у клітині з використанням мікротрубочок як носіїв. Адаптовано з (Voca et al., 2015)

Аналіз виявив співлокалізацію рекомбінантних білків SAM68-RFP-MBD та ITSN1s-GFP на мікротрубочках (коефіцієнт кореляції 0.82 ± 0.08) (рис. 4.а). У якості контролю використовували TDP-43 – РНК-зв'язуючий білок, який не містить пролінових мотивів і потенційно не володіє здатністю взаємодіяти із SH3-доменами ITSN1. Як наслідок, в контрольних клітинах, в яких експресували ITSN1s-GFP та RFP-MBD-злитий TDP-43, коефіцієнт кореляції дорівнював 0.23 ± 0.13 (рис. 4.б), підтверджуючи можливість взаємодії ITSN1 та SAM68 в клітині.

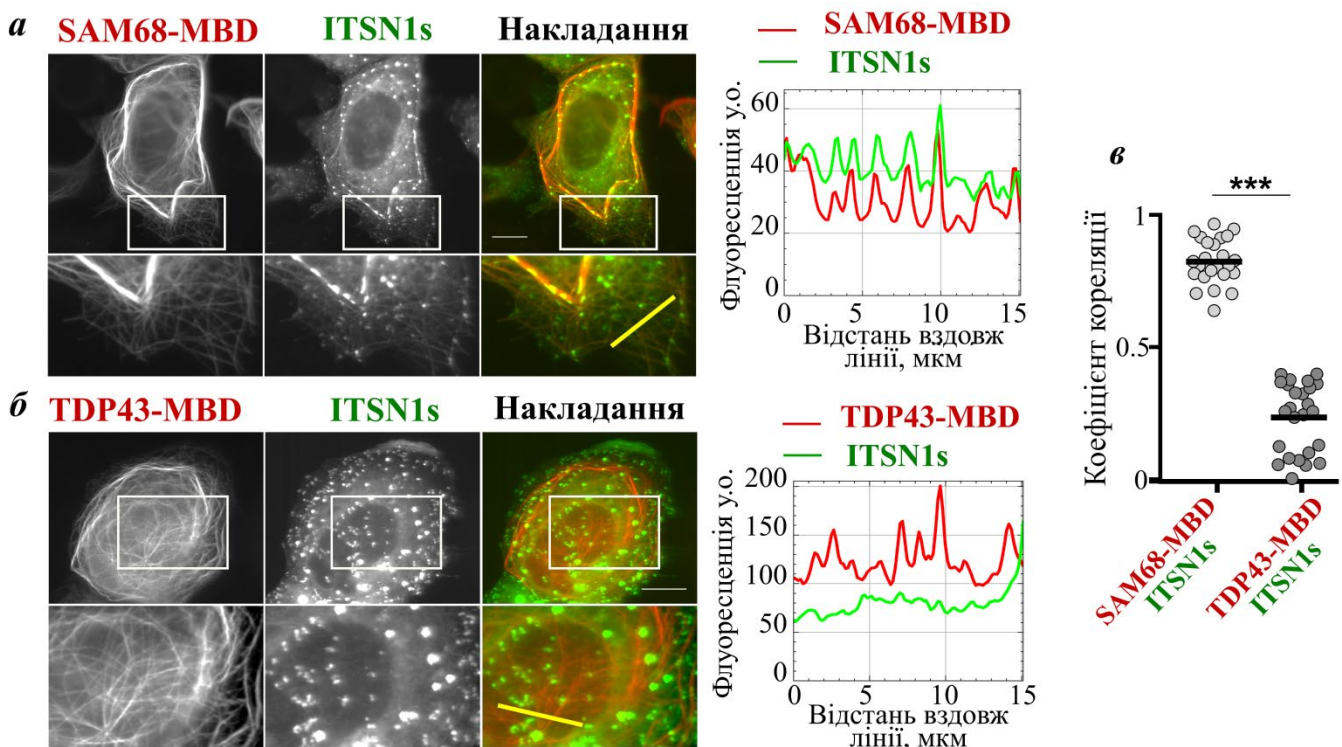


Рис. 4. Аналіз взаємодії ITSN1 та SAM68 у клітині з використанням мікротрубочок як носіїв: а – клітини лінії HeLa, трансфіковані конструкціями, що кодують рекомбінантні білки SAM68-RFP-MBD та ITSN1s-GFP; б – контрольні клітини, трансфіковані конструкціями, що кодують TDP-43-RFP-MBD та ITSN1s-GFP. Масштаб – 15 мкм. Графіки відображають відносний рівень флуоресценції вздовж лінії на відповідній мікрофотографії; в – точкова діаграма, яка відображає коефіцієнти кореляції флуоресцентних сигналів RFP та GFP вздовж однієї лінії. Статистичний аналіз: *t*-тест, *** $p < 0.0005$

Аналіз співлокалізації ITSN1 та SAM68 у клітинах лінії HeLa. На наступному етапі було проаналізовано співлокалізацію ендогенних білків ITSN1 та SAM68 в клітинах лінії HeLa. За допомогою методу зближеного лігування при використанні антитіл до ITSN1 та SAM68 було виявлено флуоресцентні сигнали як в ядрі, так і в цитоплазмі клітин HeLa (рис. 5). Отримані результати вказують на співлокалізацію білків ITSN1 та SAM68 як в цитоплазмі, так і в ядрах клітин HeLa. Флуоресцентних сигналів не було виявлено у контрольних клітинах, які інкубували лише з антитілами, специфічними до ITSN1 або SAM68.

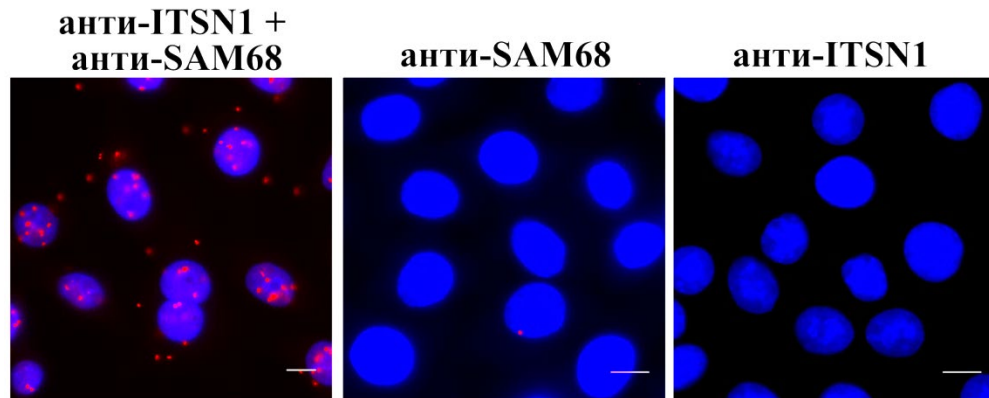


Рис. 5. Аналіз співлокалізації ITSN1 та SAM68 з використанням методу зближеного лігування. Фіксовані клітини лінії HeLa було інкубовано із антитілами анти-ITSN1 та анти-SAM68. Контрольні клітини інкубували лише з антитілами, специфічними до ITSN1 або SAM68. Детекцію точок зближення двох білків проводили за допомогою набору *Duolink® in situ fluorescence*. Для візуалізацію ядер використовували DAPI. Масштаб – 20 мкм

Картування ділянок взаємодії між ITSN1 та SAM68. Далі ми провели картування ділянок ITSN1 та SAM68, що опосередковують взаємодію. За допомогою GST-злитого ITSN1_{SH3-box}, іммобілізованого на глутатіон-сефарозі, було проведено преципітацію SAM68 із лізатів клітин 293. Лише SH3A-домен, а також його нейрональна ізоформа (SH3A-N) преципітували SAM68 (рис. 6).

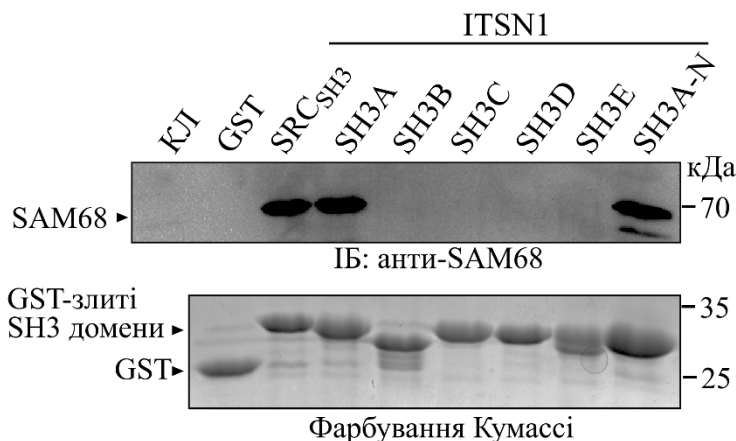


Рис. 6. Аналіз взаємодії SH3-доменів ITSN1 із SAM68 *in vitro*. Іммобілізований на сорбенті ITSN1_{SH3-box} інкубували з лізатами клітин лінії 293. Негативний контроль – GST, позитивний контроль – GST-злитий SH3-домен кінази SRC. Преципітовані білки детектували за допомогою антитіл до SAM68, GST-злиті білки візуалізували за допомогою фарбування Кумассі. ІБ – імуноблот, КЛ – клітинний лізат

Білок SAM68 містить шість пролінових мотивів (P0 – P5), розташованих на N- та C-кінцевих неструктурованих ділянках, що оточують центральний РНК-зв'язуючий домен КН. Відомо, що SH3A-домен ITSN1 специфічно взаємодіє із проліновими мотивами класу II (PxxPxR). Оскільки такий мотив наявний на N-кінці білка SAM68 (P0, PPLPHR, а.з. 38-44), ми припустили, що безпосередня взаємодія

між ITSN1 та SAM68 забезпечується SH3A-доменом ITSN1 та N-кінцевим проліновим мотивом P0 білка SAM68.

Аналіз співлокалізації GFP- та RFP-злитих білків виявив, що тандем SH3-доменів ITSN1 взаємодіє із повнорозмірним SAM68 та виключно із його N-кінцевим фрагментом. Видалення пролінового мотиву P0 білка SAM68 запобігало взаємодії між ITSN1 та SAM68 в клітині (рис. 7).

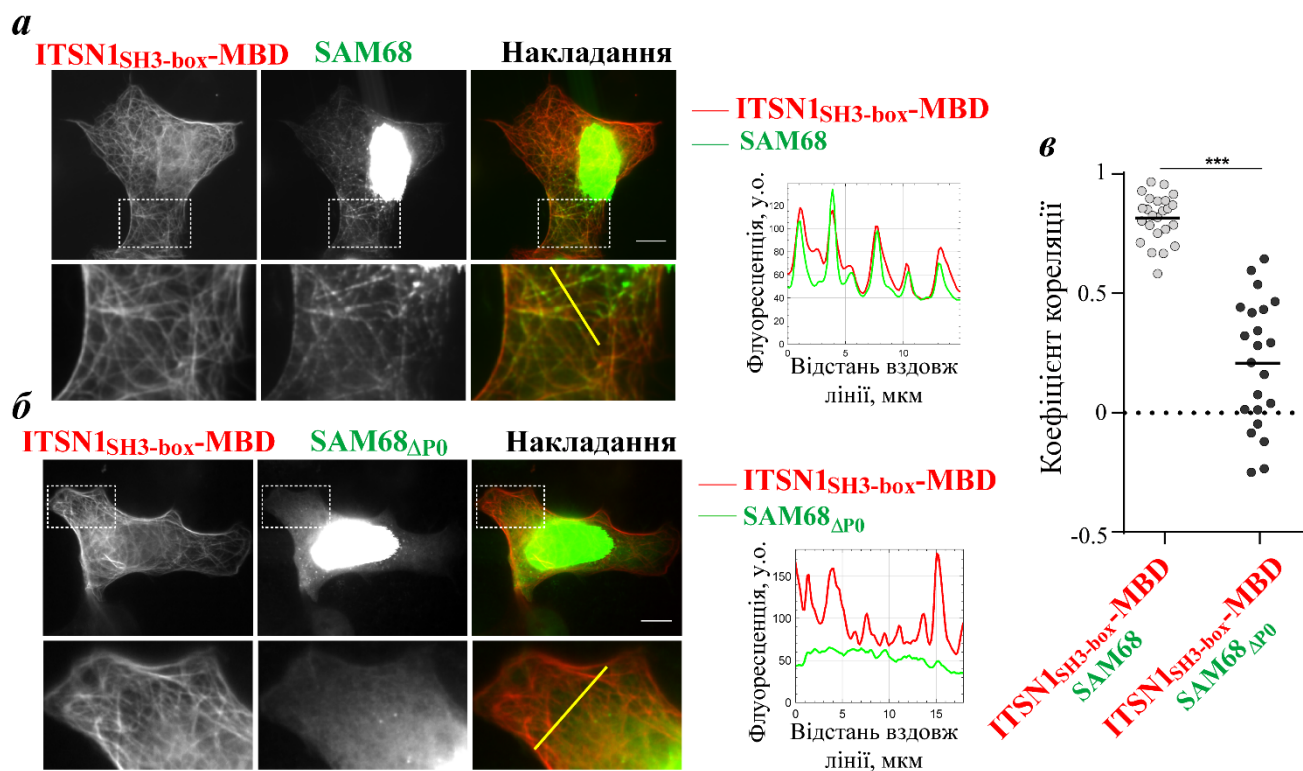


Рис. 7. Аналіз взаємодії ITSN1 із делеційним фрагментом SAM68 у клітині з використанням мікротрубочок: *a* – клітини HeLa, трансфіковані конструкціями, що кодують рекомбінантні білки ITSN1^{SH3-box}-RFP-MBD та SAM68-GFP або делеційний мутант SAM68^{ΔP0}-GFP. Масштаб – 15мкм. Графіки відображають рівень флуоресценції вздовж лінії на відповідній мікрофотографії. *б* – Точкова діаграма, яка відображає коефіцієнти кореляції флуоресцентних сигналів ITSN1^{SH3-box}-RFP-MBD або RFP-MBD та SAM68-GFP або SAM68^{ΔP0}-GFP. Статистичний аналіз: *t*-тест, *** $p < 0.0005$

Зростання розчинності SAM68 в присутності SH3-доменів ITSN1 *in vitro*. Білок SAM68, як і деякі інші РНК-зв'язуючі білки, має як структуровані домени, так і неупорядковані ділянки, збагачені аргінін-гліциновими мотивами (RG-мотиви), за рахунок яких він проявляє тенденцію до агрегації. Оскільки проліновий мотив P0 SAM68, який взаємодіє із ITSN1, знаходиться поряд із RG-мотивами, ми припустили, що ITSN1 може запобігати агрегації SAM68. Для аналізу впливу ITSN1 на агрегацію SAM68 *in vitro* ми провели оцінку седиментації рекомбінантного білка SAM68-His при різних концентраціях очищеного ITSN1^{SH3-box}-GST за допомогою центрифугування суміші білків. За відсутності та при низьких концентраціях ITSN1^{SH3-box}-GST білок SAM68-His майже повністю перебував у преципітаті після центрифугування. Але при високих концентраціях ITSN1^{SH3-box}-GST частка SAM68-His в осаді зменшувалась, тоді як його кількість у супернатанті зростала (рис. 8), вказуючи на те, що ITSN1 може перешкоджати агрегації SAM68 *in vitro*.

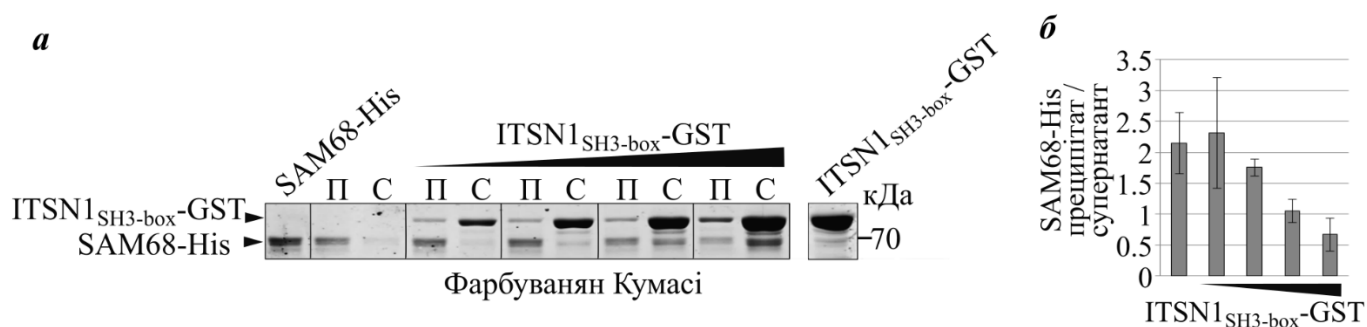


Рис. 8. Аналіз седиментації білка SAM68 у присутності ITSN1. Реконбінантний білок SAM68-His інкубували із ITSN1_{SH3-box}-GST та осаджували за допомогою центрифугування. Обидві фракції (преципітат та супернатант) було розділено електрофоретично та візуалізовано за допомогою фарбування Кумасі. П – преципітат, С – супернатант

Виявлення неканонічної взаємодії між ITSN1 та РНК. Оскільки RG-мотиви можуть також забезпечувати зв'язування РНК, ми висунули припущення, що ITSN1 може запобігати формуванню комплексу SAM68-мРНК. Для перевірки потенційного впливу ITSN1 на взаємодію між SAM68 та РНК було проведено аналіз зміни електрофоретичної рухливості комплексів мРНК-SAM68 у присутності ITSN1. Для перевірки потенційного впливу SH3-доменів ITSN1 на взаємодію SAM68-РНК ми провели аналіз електрофоретичної рухливості РНК в присутності реконбінантних білків SAM68-His та ITSN1_{SH3-box}-His. SH3-домени ITSN1 не вплинули на формування комплексів SAM68-мРНК, так як ці структури були присутні у лунках гелю. Натомість ми виявили зміну рухливості вільної мРНК, що свідчило про потенційний вплив тандему SH3-доменів ITSN1 на рухливість мРНК (рис. 9.a). Інкубація реконбінантного білка ITSN1_{SH3-box}-His із мРНК гена люциферази призводила до зміни її електрофоретичної рухливості, вказуючи на пряму взаємодію між мРНК та SH3-доменами ITSN1 (рис. 9.б).

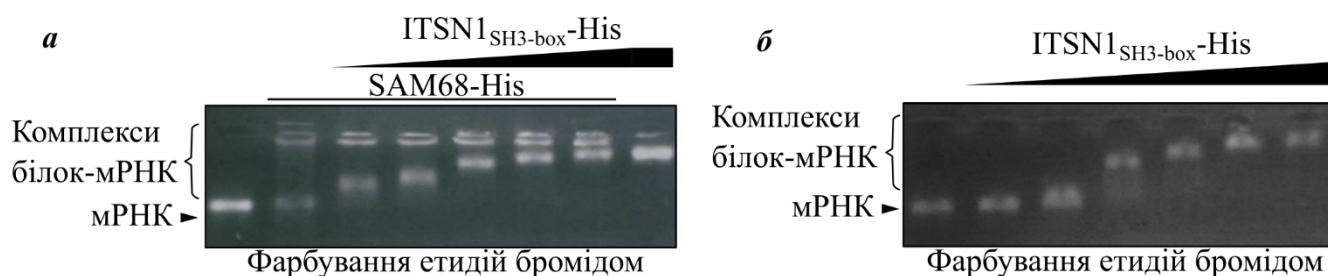


Рис. 9. Аналіз електрофоретичної рухливості мРНК в присутності реконбінантних білків SAM68 та ITSN1_{SH3-box}. мРНК гена люциферази, синтезовану в системі *in vitro*, було інкубовано із відповідними очищеними реконбінантними білками, розділено за допомогою гель-електрофорезу та візуалізовано з використанням етидій бромідом. а – електрофоретична рухливості мРНК в присутності реконбінантних білків SAM68-His та ITSN1_{SH3-box}-His. б – електрофоретичної рухливості мРНК в присутності реконбінантного білка ITSN1_{SH3-box}-His

Аналіз комплексів мРНК-білок за допомогою атомно-силової мікроскопії. Для подальшого підтвердження взаємодії SH3-доменів ITSN1 із мРНК було використано метод атомно-силової мікроскопії, що дозволяє візуалізувати макромолекулярні комплекси, утворені білками та нуклеїновими кислотами. Ми підтвердили, що ITSN1_{SH3-box} формує комплекси із мРНК, про що свідчить дифузна локалізація білка на молекулах мРНК (рис. 10).

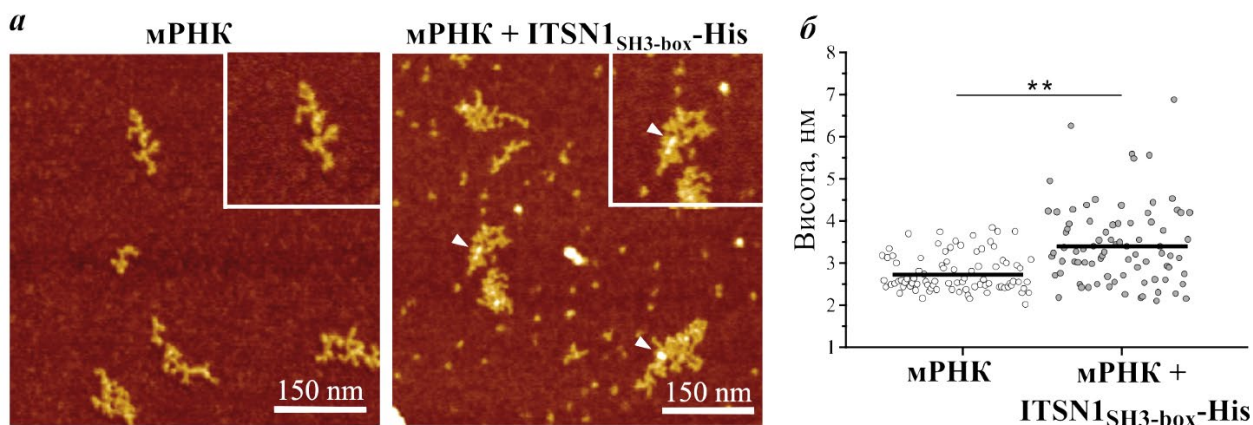


Рис. 10. Аналіз комплексів мРНК-ITSN1 за допомогою атомно-силової мікроскопії. *a* – мРНК гена люциферази було інкубовано із очищеним рекомбінантним ITSN1_{SH3-box}-His та іммобілізовано на адсорбційній поверхні для подальшого аналізу. Стрілками позначено точки локалізації ITSN1_{SH3-box}-His на мРНК. *б* – Порівняльний аналіз максимальної висоти мРНК та комплексів мРНК-ITSN1_{SH3-box}, отриманих за допомогою атомно-силової мікроскопії. Статистичний аналіз: *t*-тест, ** $p < 0.005$

Ідентифікація SH3-домену ITSN1, який взаємодіє із мРНК. Далі ми проаналізували, який із SH3-доменів ITSN1 може взаємодіяти із мРНК *in vitro*. Для цього перевіряли електрофоретичну рухливість мРНК гена люциферази у присутності окремих GST-злитих SH3-доменів ITSN1. Лише SH3D-домен ITSN1 і тандем п'яти SH3-доменів (ITSN1_{SH3-box}) призводив до зміни електрофоретичної рухливості мРНК гена люциферази (рис. 11), вказуючи на пряму взаємодію між цим доменом і мРНК.

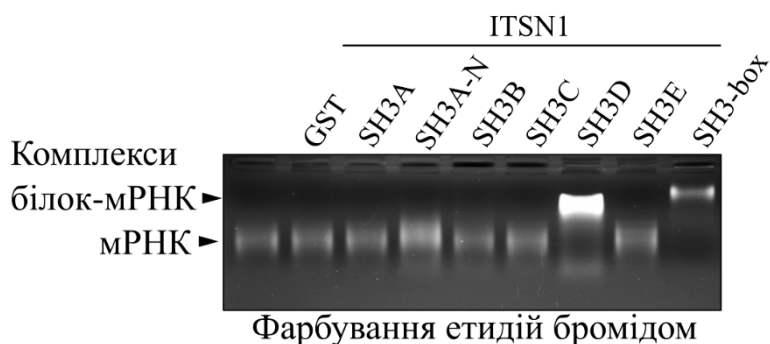


Рис. 11. Електрофоретична рухливість мРНК в присутності рекомбінантних SH3-доменів ITSN1, злитих із GST

Для більш детального аналізу взаємодії домену SH3D ITSN1 із нуклеїновими кислотами було застосовано метод ЯМР-спектроскопії. На першому етапі ми отримали та проаналізували 3D ЯМР-спектр очищеного рекомбінантного білка SH3D-His, міченого ізотопами ¹³N та ¹⁴C, що дозволило встановити відповідність між ЯМР-піками та більшістю амінокислотних залишків цього білка.

На наступному етапі ми отримали 2D ЯМР спектр ¹³N-міченого білка SH3D-His за умов присутності коротких одноланцюгових молекул ДНК – CA₆ та T₁₂. В ході порівняльного аналізу спектрів вільного білка та зв'язаного із олігодезоксирибонуклеотидами ми виявили значні хімічні зсуви кількох амінокислотних залишків, що відображається у вигляді зміщень відповідних ЯМР-піків (рис. 12). Відмінності між хімічними зсувами спектрів комплексів SH3D-CA₆ та SH3D-T₁₂ вказують на наявність можливої селективності та специфічності домену SH3D щодо нуклеотидних послідовностей одноланцюгових ДНК та РНК.

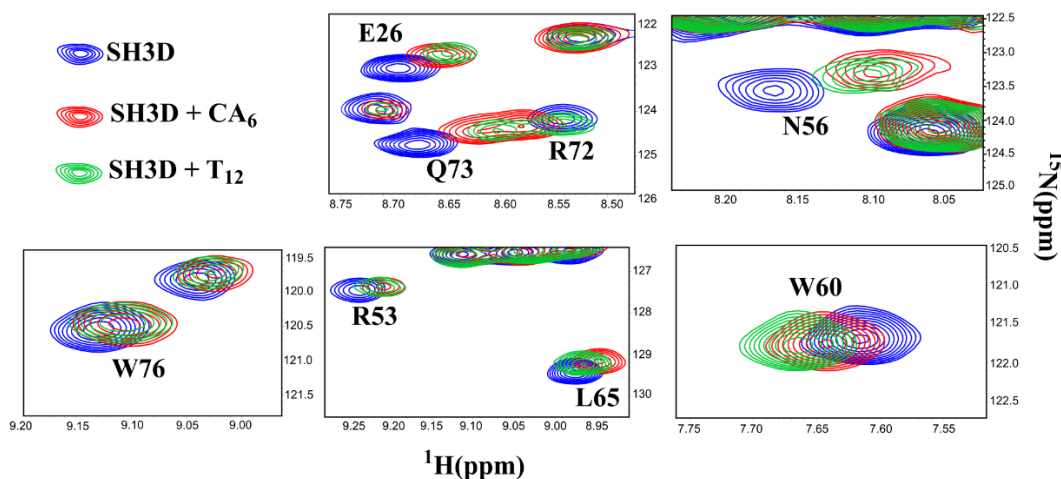


Рис. 12. Двовимірний ^1H - ^{15}N ЯМР-спектр вибраних амінокислотних залишків SH3D-домену ITSN1 за умов присутності одноланцюгових олігодезоксирибонуклеотидів CA_6 та T_{12} . Показано вісім залишків, які характеризувались найбільш значним хімічним зсувом ЯМР спектру

На наступному етапі ми провели картування відповідних амінокислотних залишків із найбільш значними хімічними зсувами використовуючи уже відому просторову структуру домену SH3D ITSN1 (ідентифікатор PDB – 6GBU) Ці амінокислотні залишки, які представлені переважно позитивно-зарядженими та гідрофобними амінокислотами, розташовуються на поверхні домену між трьома неструктурованими петлями (рис. 13).

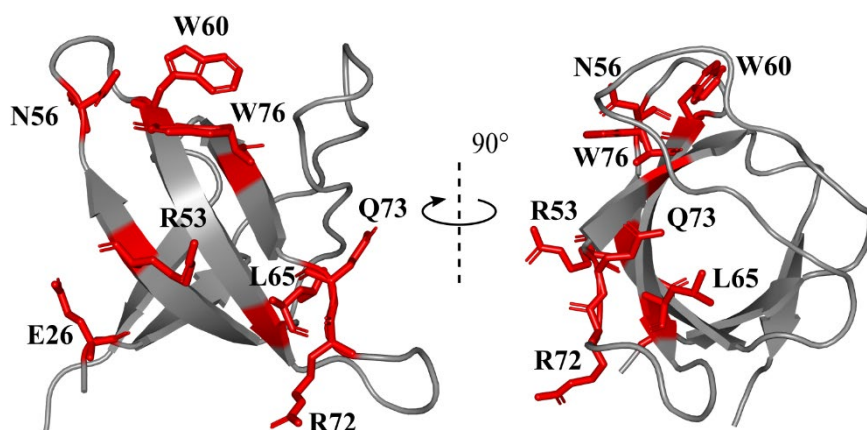


Рис. 13. Просторова структура домену SH3D ITSN1 (PDB ідентифікатор – 6GBU). Виділено та позначено амінокислотні залишки, які характеризувались найбільш значним хімічним зсувом ЯМР спектру за умов присутності олігодезоксирибонуклеотидів

Ми припустили, що ідентифіковані залишки формують поверхню, що забезпечує взаємодію SH3D-домену ITSN1 із нуклеїновими кислотами, зокрема одноланцюговою ДНК та РНК. Ці залишки відсутні в інших SH3-доменах ITSN1, але є високо консервативними у SH3D-доменах в гомологах ITSN1 хребетних та безхребетних тварин, що підтверджує їх функціональне значення.

Вплив ITSN1 на формування SAM68-специфічних ядерних тілець у клітинах HeLa. Відомо, що SAM68 характеризується дифузною локалізацією в ядрі, тоді як в деяких трансформованих лініях клітин він формує SAM68-специфічні ядерні тільця, які можуть бути пов'язані із процесами сплайсингу, хоча остаточна функція цих структур в клітині невідома. Оскільки нами було виявлено, що ITSN1 може запобігати агрегації SAM68 *in vitro*, ми перевірили вплив ITSN1 на формування SAM68-специфічних ядерних тілець у клітинах HeLa.

Було проаналізовано накопичення білка SAM68 у ядерних тільцях клітин із нокадауном гена *ITSN1*, що було здійснено з використанням двох антисенсових шпилькових РНК – shRNA-1 та shRNA-2. За допомогою імуноблоту було виявлено двократне зниження кількості ITSN1 в клітинах лінії HeLa, що експресували ITSN1-специфічні антисенсові шпилькові РНК (рис. 14).

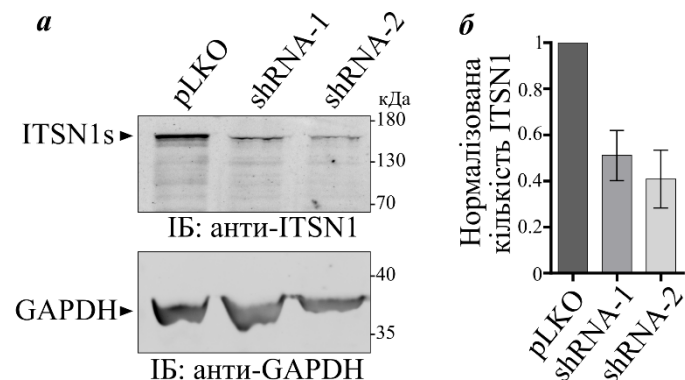


Рис. 14. Ефективність нокадауну гена *ITSN1* в клітинах лінії HeLa з використанням двох антисенсових шпилькових РНК shRNA-1, shRNA-2.

а – Вестерн-блот аналіз рівня синтезу ITSN1. Детекцію ITSN1 та GAPDH проводили з використанням специфічних антитіл. ІБ – імуноблот.

б – гістограма відображає відносну кількість ITSN1 у відповідних лізатах клітин HeLa

За допомогою флуоресцентної мікроскопії було виявлено збільшення інтенсивності флуоресценції SAM68-специфічних тілець у клітинах HeLa з нокадауном гена *ITSN1* (рис. 15). Наше спостереження вказує на те, що зниження експресії *ITSN1* призводить до накопичення SAM68 у ядерних тільцях. Таким чином, можна припустити, що ITSN1 може впливати на агрегацію SAM68 у ядрах клітин HeLa.

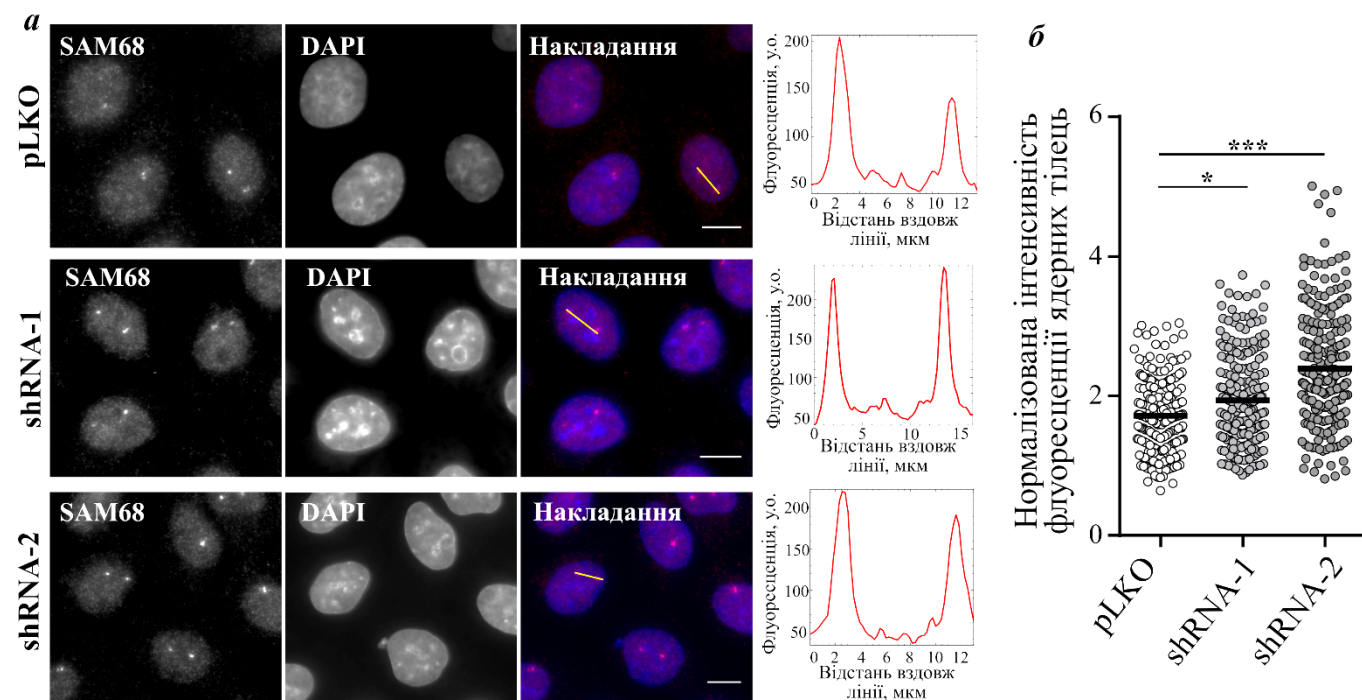


Рис. 15. Імунофлуоресцентний аналіз SAM68-специфічних ядерних тілець в клітинах лінії HeLa за умови пригнічення експресії гена *ITSN1*. **а** – клітини було інфіковано відповідними вірусними частками та інкубовано протягом трьох днів. SAM68 детектовано за допомогою антитіл до SAM68. Візуалізацію ядер проводили за допомогою DAPI. Масштаб – 15 мкм. Графіки відображають рівень флуоресценції вздовж лінії на відповідній мікрофотографії. **б** – точкова діаграма зображує інтенсивність флуоресценції SAM68-специфічних ядерних тілець у відповідних зразках. Кожна точка відображає нормалізовану інтенсивність флуоресценції ядерних тілець у ядрі. Статистичний аналіз: *t*-тест, * $p < 0.05$, *** $p < 0.0005$

Роль домену SH3A *ITSN1* у формуванні ядерних тілець SAM68. Для підтвердження того, що SH3A-опосередкована взаємодія *ITSN1* із SAM68 може впливати на формування SAM68-специфічних ядерних тілець, в клітинах лінії HeLa було проведено пригнічення експресії ендogenous *ITSN1* та здійснено експресію GFP-мічених повнорозмірного *ITSN1* та *ITSN1* без SH3A-домену (*ITSN1* $_{\Delta SH3A}$), використовуючи трансфекцію відповідними конструкціями. За допомогою флуоресцентної мікроскопії було виявлено, що цитоплазматична локалізація рекомбінантних білків *ITSN1s*-GFP (рис. 16.а, верхня трансфікована клітина) та *ITSN1s* $_{\Delta SH3A}$ -GFP (рис. 16.б, верхня трансфікована клітина) не впливала на формування SAM68-специфічних ядерних тілець. Натомість, накопичення *ITSN1s*-GFP у ядрах призводило до дисоціації SAM68-специфічних ядерних тілець і, відповідно, до зменшення інтенсивності їх флуоресценції (рис. 16.а, нижня трансфікована клітина). SAM68-специфічні ядерні тільця зберігались у клітинах, в ядрах яких накопичувався рекомбінантний білок *ITSN1s* $_{\Delta SH3A}$ -GFP (рис. 16.б, нижня трансфікована клітина), що вказує на участь SH3A-домену *ITSN1* в регуляції формування SAM68-специфічних тілець.

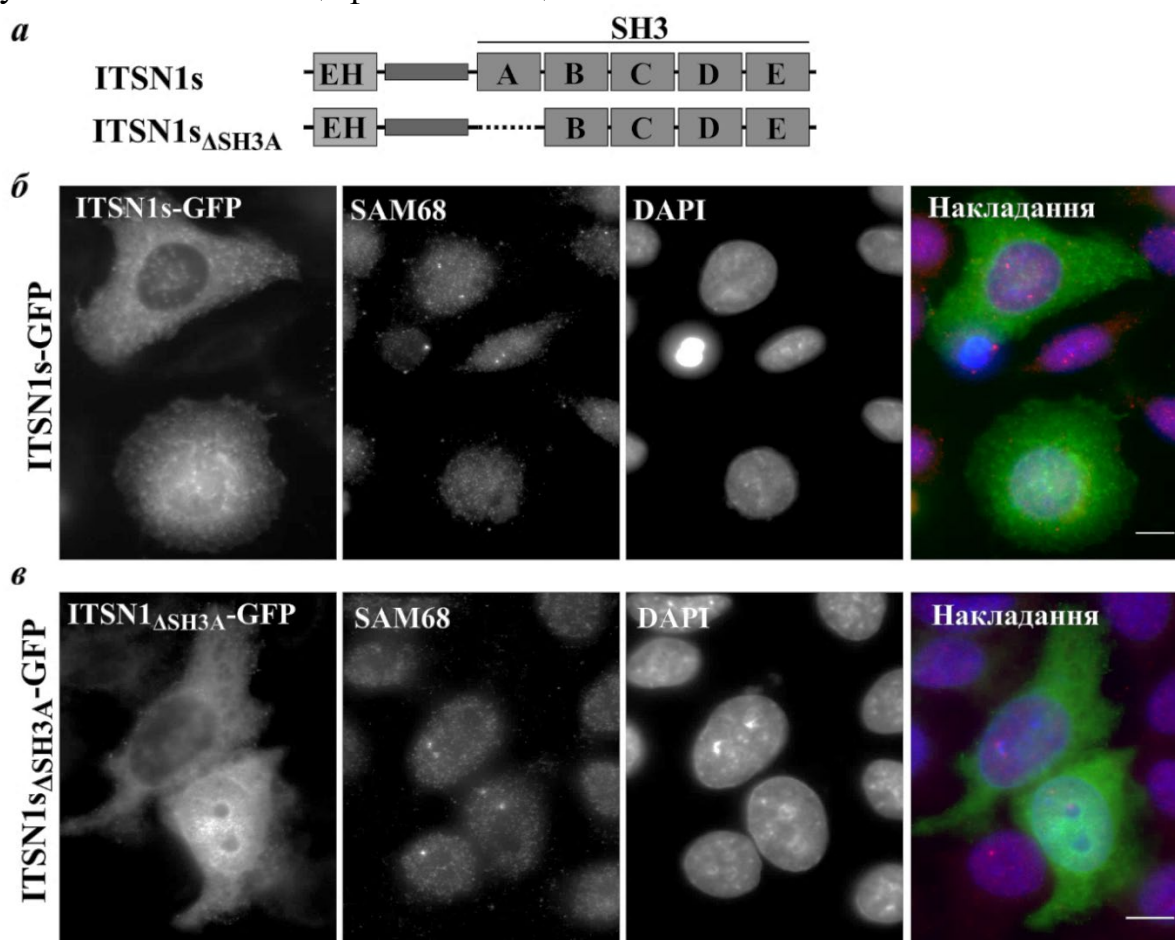


Рис. 16. Імунофлуоресцентний аналіз SAM68-специфічних ядерних тілець за умови пригнічення експресії *ITSN1* та надекспресії делеційних фрагментів *ITSN1s*-GFP. Після нокадауну гена *ITSN1* за допомогою антисенсової РНК (shRNA-2) клітини було трансфіковано конструкціями, що кодували *ITSN1s*-GFP (а) або *ITSN1s* $_{\Delta SH3A}$ -GFP (б). SAM68 візуалізовано за допомогою відповідних антитіл, ядра – за допомогою DAPI

Аналіз інтенсивності флуоресценції SAM68 за умов синтезу делеційних фрагментів *ITSN1s*-GFP показав наявність негативної кореляції між значенням

ядерно-цитоплазматичного співвідношення ITSN1s-GFP та накопиченням SAM68 у ядерних тільцях в клітинах HeLa (рис. 17.а). Таку кореляцію не спостерігали у клітинах, трансфікованих конструкцією, що кодувала рекомбінантний білок ITSN1_{SΔSH3A}-GFP (рис. 17.б).

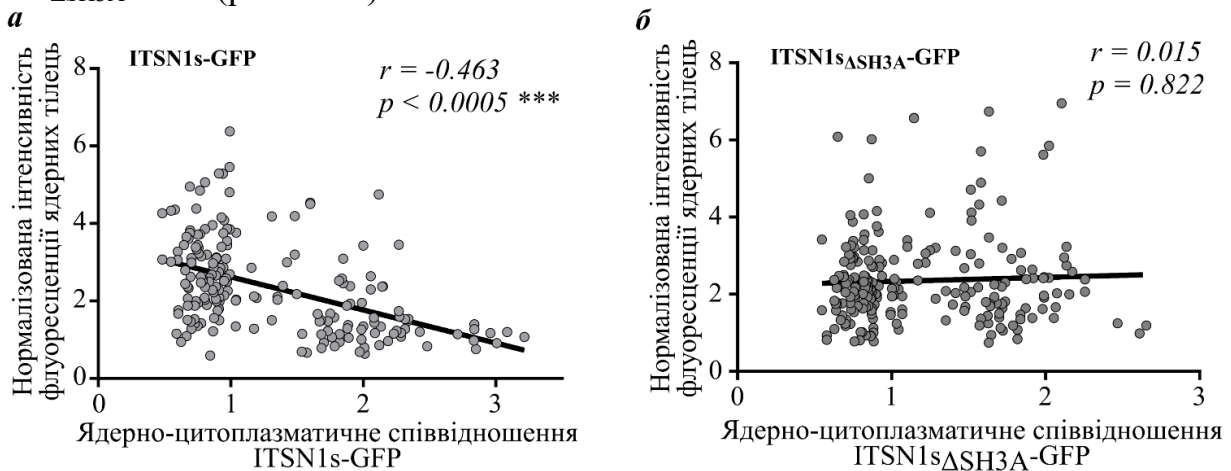


Рис. 17. Аналіз кореляції між інтенсивністю флуоресценції ядерних тілець SAM68 та ядерно-цитоплазматичним співвідношенням GFP-злитих ITSN1s та ITSN1_{SΔSH3} у клітинах HeLa. Діаграми відображають взаємозв'язок між нормалізованим максимальним рівнем флуоресценції SAM68 та ядерно-цитоплазматичним співвідношенням флуоресценції ITSN1s-GFP (а) або ITSN1_{SΔSH3}-GFP (б). Коефіцієнти кореляції та їх статистична достовірність зазначені на діаграмах

Аналіз впливу ITSN1 на процеси сплайсингу, що опосередковуються білком SAM68. Відомо, що однією із найважливіших функцій білка SAM68 у клітині є регуляція альтернативного сплайсингу пре-мРНК деяких генів. Тому з метою подальшої характеристики взаємодії між ITSN1 та SAM68 в клітині нами було проаналізовано SAM68-залежні події альтернативного сплайсингу за умов нокдауну гена *ITSN1* в клітинах лінії HeLa. Було відібрано п'ять подій альтернативного сплайсингу, які, як відомо з даних літератури, підлягають специфічній регуляції білком SAM68, а саме: включення в дозрілий транскрипт екзона 2s гена *BCL-X* (*BCL-X_s*) та екзона v5 гена *CD44* (*CD44v5*), збереження у дозрілій мРНК інтрона 4 гена *CCND1* (*CCND1b*) та інтрона 3 гена *SRSF1* (*ASF/SF2-FL*) та видалення із дозрілого транскрипту екзона 7 генів *SMN1/SMN2* (*SMN1/2s*). Відносну експресію відповідних ізоформ визначали за допомогою кількісної ПЛР, використовуючи специфічні праймери.

Пригнічення експресії ITSN1 в клітинах лінії HeLa призводило до незначного, але статистично достовірного зниження експресії SAM68-індукованих ізоформ *CCND1b* та *SMN1/2* на 10-20% (рис. 18). Також, нокдаун *ITSN1* призвів до статистично достовірного зростання рівня експресії ізоформи *CD44v5* на 20%. Більш того, нокдаун ITSN1 в клітинах лінії HeLa призводив до щонайменш двократного зростання рівня експресії прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу *SRSF1-L* порівняно із контрольними клітинами. Ці дані можуть вказувати на активацію SAM68 із подальшим збереженням інтрона 3 в дозрілій мРНК гена *SRSF1*. Отримані результати свідчать на користь участі ITSN1 в регуляції функціональної активності білка SAM68 в альтернативному сплайсингу мРНК прото-онкогена *SRSF1*.

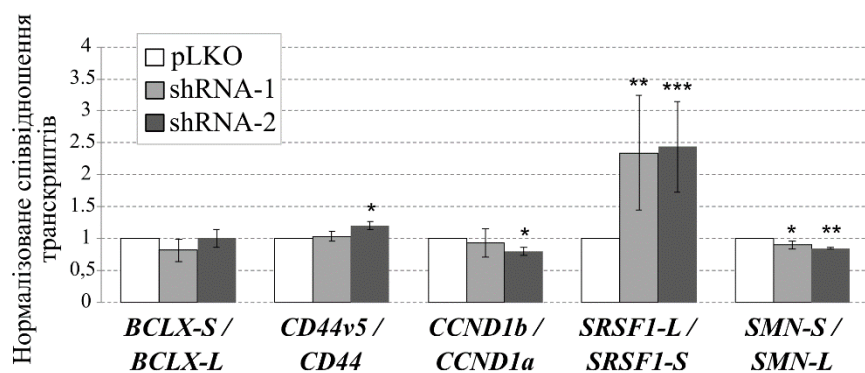


Рис. 18. Вплив нокдауну *ITSN1* на події сплайсингу, які регулюються білком SAM68. Гістограма відображає нормалізоване співвідношення ізоформ кожного гена в клітинах із нокдауном *ITSN1* порівняно із контрольними клітинами (pLKO). Статистичний аналіз: *t*-тест, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

Отже, на основі проведених досліджень запропоновано гіпотетичну модель функціонального значення взаємодії між *ITSN1* та ядерним РНК-зв'язуючим білком SAM68 (рис. 19). Виявлено, що *ITSN1* запобігає формуванню SAM68-специфічних ядерних тілець та впливає на функціональну активність SAM68 у процесах альтернативного сплайсингу, зокрема може регулювати експресію прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу SRSF1, експресію якої стимулює SAM68. Отже, отримані результати вказують на те, що у ядрі клітини *ITSN1* може регулювати функціонування РНК-зв'язуючих білків та брати участь у процесах, що регулюють злоякісну трансформацію клітин.

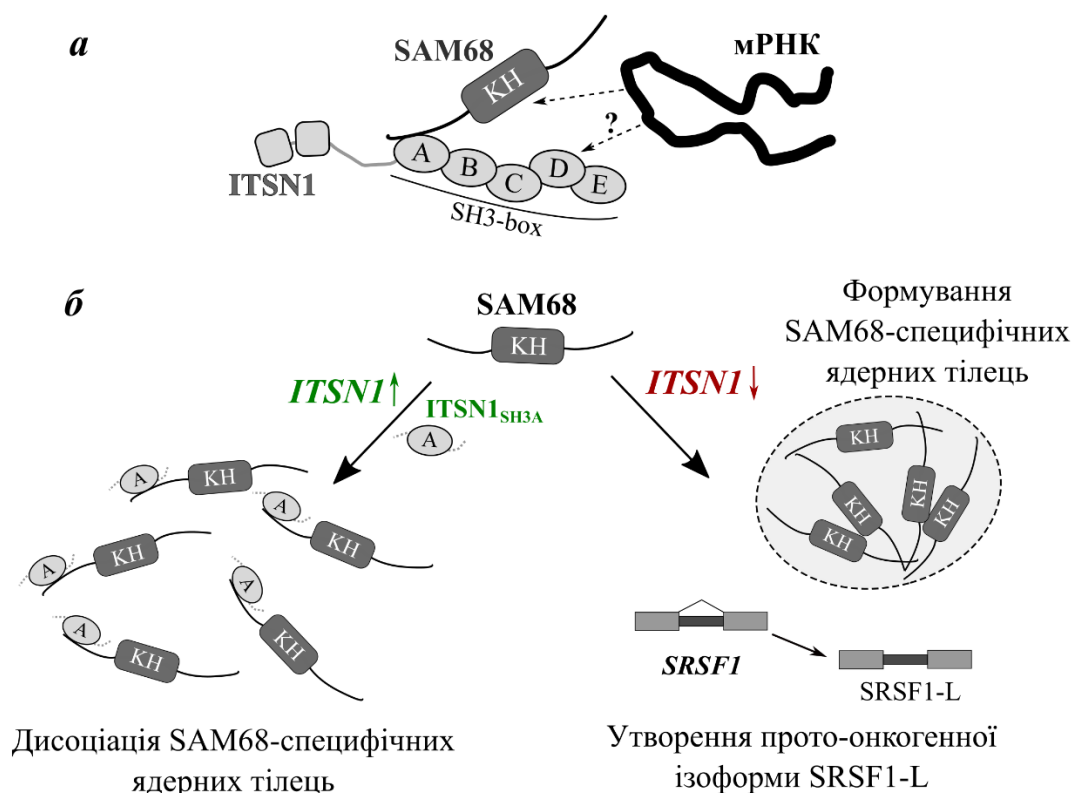


Рис. 19. Гіпотетична модель структурного та функціонального взаємозв'язку між *ITSN1* та SAM68. *а* – *ITSN1* взаємодіє із РНК-зв'язуючим білком SAM68 за рахунок SH3A-домену, який безпосередньо зв'язується із N-кінцевим проліновим мотивом SAM68, тоді як за рахунок SH3D-домену *ITSN1* потенційно може взаємодіяти із РНК. *б* – у клітинах лінії HeLa *ITSN1* сприяє дисоціації SAM68-специфічних ядерних тілець за рахунок SH3A-опосередкованої взаємодії із SAM68. Зниження рівня експресії *ITSN1* призводить до накопичення SAM68 у ядерних тілцях та утворення прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу SRSF1-L, альтернативний сплайсинг якої регулюється білком SAM68

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі підтверджено ядерну локалізацію ITSN1 та виявлено взаємодію між ITSN1 та РНК-зв'язуючими білками, зокрема SAM68. Встановлено, що ITSN1 модулює утворення SAM68-специфічних ядерних тілець та може регулювати експресію прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу SRSF1, утворення якої стимулюється білком SAM68.

1. Показано, що ITSN1 локалізується не тільки в цитоплазмі, але і в ядрах клітин лінії карциноми шийки матки HeLa та взаємодіє із РНК-зв'язуючими білками SAM68, LARP6 та WBP11 *in vitro*.

2. Встановлено, що РНК-зв'язуючі білки SAM68, LARP6 та WBP11 можуть взаємодіяти із білками ендцитозу ITSN2, AMPH, BIN1 та білками-модуляторами перебудов актинового цитоскелету CTTN1, TKS4, TKS5 *in vitro*.

3. Показано, що ITSN1 та SAM68 співлокалізуються в ядрах клітин лінії HeLa, тоді як їх взаємодія опосередковується доменом SH3A ITSN1 та проліновим мотивом P0 SAM68.

4. Виявлено, ITSN1 конкурує із адаптерним білком GRB2 за зв'язування із SAM68 та запобігає агрегації SAM68 *in vitro*.

5. Вперше показано пряму взаємодію між доменом SH3D ITSN1 та нуклеїновими кислотами *in vitro*.

6. Продемонстровано, що ITSN1 впливає на формування SAM68-специфічних тілець в ядрах клітин лінії HeLa, сприяючи їх дисоціації.

7. Виявлено, що ITSN1 впливає на функціональну активність SAM68 у процесах сплайсингу та може бути залученим до регуляції експресії прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу SRSF1.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Pankivskiy S., Pastré D., Steiner E., Joshi V., Rynditch A., Hamon L. ITSN1 regulates SAM68 solubility through SH3 domain interactions with SAM68 proline-rich motifs. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2020. DOI: 10.1007/s00018-020-03610-y. (Особистий внесок: створення генно-інженерних конструкцій, отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, флуоресцентна мікроскопія, преципітація рекомбінантних білків, аналіз білок-білкових взаємодій, атомно-силова мікроскопія, аналіз електрофоретичної рухливості нуклеїнових кислот, статистичний аналіз, біоінформатичний аналіз, написання рукопису).

2. Pankivskiy S., Senchenko N., Busko P., Rynditch A. RNA-binding protein SAM68 interacts with endocytic proteins and actin cytoskeleton modulators. *Dopov. Nac. akad. nauk. Ukr.*, 2020, (5), p. 103-109. (Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, преципітація рекомбінантних білків, аналіз білок-білкових взаємодій, аналіз подій сплайсингу, статистичний аналіз, написання рукопису).

3. Pankivskiy S., Senchenko N., Busko P., Rynditch A. Scaffold proteins ITSN1 and ITSN2 interact with nuclear RNA-binding proteins. *Biopolymers and cell*, 2019, 35(2), p.81-90. (Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, преципітація рекомбінантних білків, аналіз білок-білкових взаємодій, біоінформатичний аналіз, написання рукопису).

4. **Pankivskiy S.**, Pastre D., Steiner E., Joshi V., Rynditch A., Hamon L. Multidomain scaffold ITSN1 regulates solubility of nuclear RNA-binding protein SAM68. Virtual meeting on Genome Organization and Nuclear Function, 2020, Cold Spring Harbor, USA. *(Особистий внесок: створення генно-інженерних конструкцій, отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, флуоресцентна мікроскопія, преципітація рекомбінантних білків, аналіз білок-білкових взаємодій, атомно-силова мікроскопія, аналіз електрофоретичної рухливості нуклеїнових кислот статистичний аналіз).*

5. **Pankivskiy S.**, Senchenko N., Busko P., Rynditch A. Effect of scaffold protein ITSN1 on interactions and aggregation properties of RNA-binding protein SAM68. XII Ukrainian Biochemical Congress. 2019, Ternopil, Ukraine. *(Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, флуоресцентна мікроскопія, преципітація рекомбінантних білків, аналіз білок-білкових взаємодій, статистичний аналіз).*

6. Busko P., **Pankivskiy S.**, Senchenko N., Rynditch A. Analysis of the Interaction between RNA-Binding Protein SAM68 and Scaffold Protein ITSN1 *in vitro*. 16th Horizons in Molecular Biology, International PhD Student Symposium, 2019, Göttingen, Germany. *(Особистий внесок: створення генно-інженерних конструкцій, отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, преципітація рекомбінантних білків, аналіз білок-білкових взаємодій).*

7. **Pankivskiy S.**, Senchenko N., Busko P., Hamon L., Pastre D., Rynditch A. The effect of scaffold protein ITSN1 on the functioning of RNA-binding protein SAM68. XIII annual Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NASU, 2019, Kyiv, Ukraine. *(Особистий внесок: створення генно-інженерних конструкцій, отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, флуоресцентна мікроскопія).*

8. **Pankivskiy S.**, Hamon L., Pastre D., Rynditch, A. A novel role of scaffold protein ITSN1 in the functioning of RNA-binding proteins. 3rd International Conference «Smart Bio», 2019, Kaunas, Lithuania. *(Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, флуоресцентна мікроскопія, аналіз білок-білкових взаємодій, атомно-силова мікроскопія, аналіз подій сплайсингу, статистичний аналіз)*

9. Busko P., **Pankivskiy S.**, Kropyvko S. The characteristic of the interaction between scaffold protein ITSN1 and RNA-binding protein SAM68. XVII international scientific conference of XVII International Conference of Students and Young Scientists “Shevchenkivska Vesna: Bioscience Advances”, 2019, Kyiv, Ukraine. *(Особистий внесок отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, преципітація рекомбінантних білків, аналіз білок-білкових взаємодій).*

10. **Pankivskiy S.**, Hamon L., Pastre D., Rynditch A. Detection and characterization of the interaction between RNA-binding protein Sam68 and scaffold protein ITSN1. XI Parnas Conference, Young Scientist Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine», 2018, Kyiv, Ukraine. *(Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, флуоресцентна мікроскопія, аналіз білок-білкових взаємодій)*

11. **Pankivskiy S.**, Rynditch A. Identification of the interaction between scaffold protein ITSN1 and RNA-binding protein SAM68. XII annual Conference of Young Scientists, Institute of Molecular Biology and Genetics NASU. 2018, Kyiv, Ukraine. *(Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, преципітація рекомбінантних білків, аналіз білок-білкових взаємодій, статистичний аналіз).*

12. Dergai M., Dergai O., **Pankivskiy S.**, Novokhatska O., Miaczynska M., Rynditch A. Novel functions of endocytic proteins in the regulation of intracellular signalling. XI Ukrainian Biochemical Congress. 2014, Kyiv, Ukraine. *(Особистий внесок: створення генно-інженерних конструкцій, робота з культурами клітин, флуоресцентна мікроскопія).*

АНОТАЦІЯ

Паньківський С.В. Пошук та характеристика ядерних функцій протеїна ендочитозу ITSN1. – 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, 2020.

Дисертаційна робота присвячена вивченню потенційної ролі скафолдного білка ITSN1 у ядрі і його зв'язку із компонентами ядерного протеому, зокрема РНК-зв'язуючими білками. За допомогою флуоресцентної мікроскопії було підтверджено факт локалізації ендогенного та надекспресованого ITSN1s в ядрах клітин лінії HeLa. Виявлено, що за рахунок SH3-доменів ITSN1 може взаємодіяти із РНК-зв'язуючими білками SAM68, LARP6 та WBP11 *in vitro*. Показано, що ITSN1 та SAM68 співлокалізуються як в цитоплазмі, так і в ядрах клітин HeLa, а їх взаємодія забезпечується SH3A-доменом ITSN1 та N-кінцевим проліновим мотивом P0 білка SAM68. Виявлено, що взаємодія SH3-доменів ITSN1 із SAM68 перешкоджає агрегації цього РНК-зв'язуючого білка *in vitro*. Вперше показано, що ITSN1 може прямо зв'язуватись із нуклеїновими кислотами *in vitro*. За цю взаємодію можуть відповідати кілька позитивно заряджених та гідрофобних залишків амінокислот на поверхні SH3D-домену. Продемонстровано, що ITSN1 може впливати на формування SAM68-специфічних ядерних тілець в клітинах HeLa, так як нокдаун гена *ITSN1* стимулює накопичення SAM68 у цих структурах, а надекспресія ITSN1 і локалізація його в ядрі сприяють дисоціації тілець, що не спостерігається при видаленні SH3A-домену ITSN1. Встановлено, що ITSN1 може регулювати утворення прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу SRSF1, альтернативний сплайсинг якої регулюється білком SAM68. Оскільки SRSF1 сприяє епітеліально-мезенхімальному переходу клітин, було здійснено припущення, що у ядрі клітини ITSN1 залучений до регуляції процесів, асоційованих із злоякісною трансформацією клітин.

Ключові слова: ITSN1, SAM68, ядерні тільця, РНК-зв'язуючі білки, альтернативний сплайсинг.

АННОТАЦИЯ

Панькивский С.В. Поиск и характеристика ядерных функций протеина эנדочитоза ITSN1. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.03 «Молекулярная биология». – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2020.

Диссертационная работа посвящена изучению потенциальной роли скафолдного белка ITSN1 в ядре клетки и его связи с компонентами ядерного протеома, в частности РНК-связывающими белками. С помощью флуоресцентной микроскопии был подтвержден факт локализации эндогенного и надекспресованого ITSN1s в ядрах клеток линии HeLa. Выявлено, что за счет SH3-доменов ITSN1 может взаимодействовать с РНК-связывающими белками SAM68, LARP6 и WBP11 *in vitro*. Показано, что ITSN1 и SAM68 колокализуются как в цитоплазме, так и в

ядрах клеток HeLa, а их взаимодействие обеспечивается SH3A-доменом ITSN1 и N-концевым пролиновым мотивом P0 белка SAM68. Выявлено, что взаимодействие SH3-доменов ITSN1 с SAM68 препятствует агрегации этого РНК-связывающего белка *in vitro*. Впервые показано, что ITSN1 может прямо связываться с нуклеиновыми кислотами *in vitro*. За это взаимодействие могут отвечать несколько положительно заряженных и гидрофобных остатков аминокислот на поверхности SH3D-домена. Выявлено, что ITSN1 может влиять на формирование SAM68-специфических ядерных телец в клетках HeLa, так как нокаун гена *ITSN1* стимулирует накопление SAM68 в этих структурах, а надэкспрессия ITSN1 и локализация его в ядре способствуют диссоциации телец, что не наблюдается при удалении SH3A-домена ITSN1. Установлено, что ITSN1 может быть вовлечен в регуляцию образования прото-онкогенного изоформы фактора сплайсинга SRSF1, альтернативный сплайсинг которой регулируется белком SAM68. Поскольку SRSF1 способствует эпителиально-мезенхимальному переходу клеток, было осуществлено предположение, что в ядре клетки ITSN1 привлечен к регуляции процессов, ассоциированных со злокачественной трансформацией клеток.

Ключевые слова: ITSN1, SAM68, ядерные тельца, РНК-связывающие белки, альтернативный сплайсинг.

SUMMARY

Pankivskiy S.V. Search and characterization of nuclear functions of endocytic protein ITSN1. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

A dissertation submitted to acquire the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2020.

Multiple cellular processes are regulated by scaffold proteins that serve as platforms for the formation of protein complexes, regulating their spatial and temporal organization. Impaired expression and mutations in scaffold-encoding genes lead to alterations in cellular process associated with pathological states.

ITSN1 is a scaffold that modulates clathrin-mediated endocytosis, vesicular transport, actin cytoskeleton rearrangement, and several mitogenic signaling pathways. Altered *ITSN1* expression is associated with the proliferation and invasion of glioblastoma, neuroblastoma and lungs cancer cells, as well as with the development of Down syndrome, Alzheimer's disease and Huntington's disease.

Recently, it has been found that in addition to the cytoplasm, ITSN1 also localizes in a cell nucleus, though the functional significance of this phenomenon remains unknown. The current work concerns the analysis of the putative role of ITSN1 in a cell nucleus and the interaction between ITSN1 and nuclear RNA-binding proteins.

Using fluorescent microscopy, we found that endogenous and overexpressed GFP-labeled ITSN1 localized in HeLa cells nuclei. Analyzing the protein interaction databases, we identified thirty-nine putative ITSN1 partners, that are involved in the regulation of mRNA processing, chromatin remodeling, DNA repair and replication. Using the GST pull-down approach, we confirmed the interaction between ITSN1 and RNA-binding proteins SAM68, LARP6 and WBP11 *in vitro*.

Considering functional features of SAM68, in particular, its role in the oncogenic transformation, we performed the analysis of the interaction between ITSN1 and SAM68. SAM68 is an RNA-binding protein mainly involved in mRNA processing, specifically alternative splicing. The protein stimulates the formation of pro-oncogenic isoforms, whereas in neurons, it induces the expression of neuron-specific transcripts. We demonstrated that ITSN1 and SAM68 colocalized in HeLa cells nuclei and cytoplasm, whereas the interaction between proteins was mediated by the SH3A domain of ITSN1 and the N-terminal proline motif P0 of SAM68.

Similar to other RNA-binding proteins, SAM68 contains RG-enriched disordered regions prone to aggregation. We demonstrated that ITSN1 suppress SAM68 aggregation *in vitro* possibly by masking RG-motifs located in close proximity to P0 proline motif. For the first time, we identified that ITSN1 directly interacts with nucleic acids, in particular, RNA and single-stranded DNA. The interaction was confirmed by several approaches, including the mRNA mobility gel shift assay and atomic force microscopy. The detected interaction is mediated by the fourth SH3 domain (SH3D) of ITSN1. Using NMR spectrometry, we identified several positively-charged and hydrophobic residues, that form the putative nucleic acid-binding site on the surface of ITSN1 SH3D domain. We proposed that the interaction could stabilize the formation of the complexes between ITSN1 and RNA-binding proteins.

It has been previously shown that SAM68 forms specific nuclear bodies in HeLa cells with unknown function. Here, we demonstrated that ITSN1 depletion stimulated the accumulation of SAM68 in nuclear bodies in HeLa cells. Moreover, accumulation of overexpressed ITSN1 in the nucleus stimulated the dissociation of SAM68 nuclear bodies while deletion of SH3A domain did not affect SAM68 nuclear bodies formation, which allowed us to suggest that ITSN1 could prevent SAM68 aggregation in a nucleus.

It is known that SAM68 regulates alternative splicing of pre-mRNA transcripts of several genes involved in carcinogenesis. These genes include *BCL-X*, *CD44*, *AR-V*, *mTOR*, *SRSF1*, *CCND1*, *BIRC5*, etc. In the present work, the effect of *ITSN1* knockdown on the SAM68-mediated alternative splicing events in HeLa cells was analyzed. *ITSN1* knockdown caused two-fold increase in the expression of the pro-oncogenic isoform of splicing factor SRSF1. Overexpression of this SRSF1 isoform is known to activate the epithelial-mesenchymal transition in various cancer cells. As SAM68 is one of the regulators of the expression and alternative splicing of SRSF1 pre-mRNA, the obtained results indicated that the suppression of ITSN1 may increase functional activity of SAM68, in particular, in the nuclear bodies.

As a result, we proposed hypothetical model of the functional interplay between ITSN1 and SAM68 in a nucleus. According to the model, protein ITSN1 directly affects aggregation of SAM68 in a cell nucleus. As ITSN1 directly binds mRNA, the formation of a triple complex in a cell nucleus prevents SAM68 assembly and induces the dissociation of SAM68 nuclear bodies. Hence, ITSN1 regulates the functioning of SAM68 contributing to the processes of SAM68-mediated alternative splicing, associated with the expression of specific isoforms involved in carcinogenesis, in particular, *SRSF1*.

Key words: ITSN1, SAM68, nuclear bodies, RNA-binding proteins, alternative splicing.

ДЛЯ НОТАТОК

ДЛЯ НОТАТОК