

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ПАНЬКІВСЬКИЙ СЕРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 577.22 + 577.29

ДИСЕРТАЦІЯ

ПОШУК ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ЯДЕРНИХ ФУНКЦІЙ ПРОТЕЇНА
ЕНДОЦИТОЗУ ITS1

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

_____ С.В. Паньківський

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

Київ – 2020

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.

Значна частина процесів у клітині регулюються скафолдними білками, які містять кілька різних структурних доменів. Ці молекули слугують платформами для збірки білкових комплексів та регулюють їх просторову і часову організацію. Дуже часто скафолдні білки характеризуються багатофункціональністю. Як наслідок, порушення експресії та наявність мутацій в генах цих білків призводить до змін клітинних процесів, асоційованих із розвитком патологічних станів.

ITSN1 та *ITSN2* – білки скафолди, які модулюють клатрин-опосередкований ендочитоз, везикулярний транспорт, перебудови актинового цитоскелету, а також деякі мітогенні сигнальні каскади клітини. Як наслідок, ці білки асоційовані із злоякісною трансформацією клітин та порушеннями функціонування нервової системи, зокрема розвитком нейродегенеративних захворювань. Порушення експресії гена *ITSN1* пов'язано із проліферацією та інвазією гліобластоми, нейробластоми та ракових клітин легень. Порушення експресії гена *ITNS1* у нейронах асоційовано із розвитком синдрому Дауна, хвороб Альцгеймера та Гантінгтона.

Нещодавно було виявлено, що крім цитоплазми, *ITSN1* також може локалізуватися в ядрі клітини, хоча функціональне значення такої властивості залишається невідомим. Характеристика структури та пошук нових функцій білків родини *ITSN* у клітині є важливими для розуміння молекулярних механізмів розвитку патологій, що опосередковуються даними білками. Тому в даній роботі було проаналізовано потенційну роль *ITSN1* в

ядрі клітини та охарактеризовано зв'язок ITSN1 із ядерними РНК-зв'язуючими білками.

Попередньо було показано, що ITSN1 локалізується в ядрі клітини та потенційно може взаємодіяти із ядерними білками, що було показано в кількох попередніх дослідженнях. На першому етапі даної роботи було проаналізовано та охарактеризовано взаємодію ITSN1 із такими білками. За допомогою флуоресцентної мікроскопії було підтверджено факт локалізації ITSN1 в ядрах клітин лінії HeLa. Було показано, що домени EH та SH3 залучені до регуляції ядерно-цитоплазматичного транспорту ITSN1. В ході аналізу баз даних білок-білкових взаємодій було виявлено тридцять дев'ять потенційних партнерів білків ITSN1, які залучені в регуляцію процесингу мРНК, ремоделювання хроматину, репарації і реплікації ДНК. В нашій роботі ми підтвердили взаємодію ITSN1 із РНК-зв'язуючими білками SAM68, LARP6 та WBP11 за умов *in vitro*. Вперше було показано, що дані РНК-зв'язуючі білки також взаємодіють із протеїнами ендоцитозу ITSN2, AMPH1 та BIN1 і регуляторами ремоделювання актинового цитоскелету CTTN, TKS4 та TKS5, що може свідчити про взаємозв'язок процесів транспорту РНК із ендоцитозом та перебудовами актинових філаментів. Враховуючи функціональну особливість білка SAM68, а саме його участі в злоякісній трансформації клітин, наше дослідження було спрямоване на аналіз взаємодії ITSN1 та SAM68. SAM68 – РНК-зв'язуючий білок, основною функцією якого є процесинг мРНК, зокрема регуляція альтернативного сплайсингу. Виявлено, що SAM68 стимулює експресію прото-онкогенних ізоформ кількох генів. В нейронах SAM68 стимулює утворення нейрон-специфічних транскриптів. Показано, що надекспресія гена SAM68 спостерігається у різних типах раку, включаючи рак молочної залози, простати, ротової порожнини, прямої кишки, шийки матки та карциноми нирки.

В даній роботі було показано зв'язування ITSN1 і SAM68 за умов *in vitro*, підтверджено взаємодію цих білків у інтактній клітині та виявлено їх

співлокалізацію в ядрах клітин лінії аденокарциноми шийки матки HeLa. Встановлено, що взаємодія між ITSN1 та SAM68 відбувалась за рахунок SH3A доменів ITSN1 та N-кінцевою ділянкою білка SAM68, яка містить канонічний проліновий мотив класу II PxxPxR, що специфічно розпізнається доменом SH3A ITSN1. Видалення цього мотиву перешкоджало взаємодії досліджуваних білків.

З даних літератури відомо, що SAM68 взаємодіє із SH3 доменами кінази родини SRC, регуляторною субодиницею p85 α кінази PI3K та адаптерними білками (наприклад, GRB2 та NCK1). Взаємодія SAM68 із кіназами та адаптерами призводить до його посттрансляційних модифікацій із подальшою зміною його активності. Ми виявили, що ITSN1 та адаптерний білок GRB2 можуть конкурувати за зв'язування із SAM68 *in vitro*. Оскільки ITSN1 та GRB2 беруть участь у регуляції сигнальних шляхів PI3K і MAPK можна припустити, що взаємодія ITSN1 та SAM68 є важливою для регуляції зазначених мітогенних сигнальних шляхів.

Відомо, що SAM68 формує димери та олігомери, за рахунок чого відбувається регуляція активності SAM68 у процесах сплайсингу. Нами було вперше виявлено, що ITSN1 та мРНК пригнічують агрегацію SAM68 *in vitro*. Ми припустили, що ITSN1 та мРНК порушують міжмолекулярні взаємодії, які можуть виникати між непорядкованими ділянками SAM68, що є характерним для багатьох РНК-зв'язуючих білків. Виявлено, що ITSN1 може безпосередньо взаємодіяти із нуклеїновими кислотами, зокрема РНК та одноланцюговою ДНК. Ця взаємодія опосередковувалась доменом SH3D, що було підтверджено за допомогою аналізу зміни електрофоретичної рухливості РНК та атомно-силової мікроскопії. За допомогою ЯМР-спектроскопії ми виявили кілька позитивно-заряджених та гідрофобних залишків амінокислот, які формують потенційний сайт зв'язування нуклеїнових кислот на поверхні SH3D домену ITSN1. Враховуючи те, що SH3A домен ITSN1 взаємодіє із SAM68, тоді як SH3D домен зв'язує РНК,

було запропоновано, що наявність РНК може стабілізувати взаємодію між ITSN1 та SAM68.

З даних літератури відомо, що SAM68 формує специфічні ядерні тільця в клітинах лінії HeLa, що спостерігається також і для інших РНК-зв'язуючих білків, які містять неструктуровані ділянки. Утворення таких немембранних компартментів відбувається за рахунок розподілу рідких фаз, що пов'язано із формуванням високо концентрованих крапель – немембранних конденсованих гранул, утворених комплексами білків та нуклеїнових кислот. Ми вперше показали, що пригнічення експресії гена *ITSN1* стимулює накопичення SAM68 у ядерних тільцях в клітинах лінії HeLa. Більш того, виявлено, що локалізація ITSN1 в ядрах клітин HeLa знижує рівень накопичення SAM68 у ядерних тільцях. Оскільки видалення SH3A домену ITSN1 та наявність мотиву P0 SAM68 призводить до зниження рівня накопичення SAM68 у ядерних тільцях, ми припустили, що SH3A домен ITSN1 та проліновий мотив P0 SAM68 є важливими елементами, наявність яких може запобігати агрегації SAM68 у ядрі. Таким чином, накопичення надекспресованого ITSN1 в ядрі сприяє дисоціації цих тілець або пригнічує їх збірку, що може бути пов'язаним із інгібуванням фазового розподілу комплексів SAM68.

З даних літератури відомо, що SAM68 регулює альтернативний сплайсинг пре-мРНК генів, асоційованих із процесами злоякісної трансформації клітин, зокрема *BCL-X*, *CD44*, *AR-V*, *mTOR*, *SRSF1*, *CCND1*, та *BIRC5*. Ми проаналізували ефект нокдауну гена *ITSN1* на процеси сплайсингу, які опосередковуються білком SAM68 у клітинах лінії HeLa, та ідентифікували двократне зростання рівня експресії прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу ASF/SF2 (*SRSF1*), що пов'язане із збереженням інтрона 3 у дозрілому транскрипті *SRSF1*. Надекспресія цієї прото-онкогенної ізоформи ASF/SF2, яка активує епітеліально-мезенхімальний перехід клітин, спостерігається при розвитку багатьох типів раку. Оскільки SAM68 є одним із регуляторів експресії та сплайсингу *SRSF1*, отримані нами дані вказують

на те, що пригнічення експресії ITSN1 може призводити до зростання функціональної активності SAM68, зокрема у ядерних тільцях.

Ґрунтуючись на результатах нашого дослідження, ми створили гіпотетичну модель функціональної взаємодії ITSN1 та SAM68 в ядрі клітини. ITSN1 може безпосередньо впливати на ди- та олігомеризацію SAM68, регулюючи його фазові переходи та агрегацію в ядрі. За рахунок прямої взаємодії із SAM68 та мРНК, ITSN1 запобігає агрегації SAM68 та сприяє дисоціації ядерних тілець. Як наслідок, ITSN1 регулює функціонування SAM68, впливаючи на процеси альтернативного сплайсингу, які регулюються SAM68 та пов'язані із експресією ізоформ генів, асоційованих із злоякісною трансформацією клітин (наприклад, *SRSF1*).

Отримані результати характеризують взаємодію скафолдного білка ITSN1 та РНК-зв'язуючого білка SAM68 в ядрах клітин лінії HeLa, розкривають нові функції білків родини ITSN та розширюють їх функціональне значення в клітинних процесах, асоційованих із злоякісною трансформацією клітин.

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

Список публікацій здобувача:

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.

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. DOI: 10.15407/dopovidi2020.05.103.

3. Pankivskyi 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. DOI: 10.7124/bc.000999.

4. Pankivskyi 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.

5. Pankivskyi S., Senchenko N., Busko P., Rynditch A. Effect of scaffold protein ITSN1 on interactions and aggregation properties of RNA-binding protein SAM68. XII Український біохімічний конгрес, 2019, Тернопіль, Україна.

6. Busko P., Pankivskyi 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.

7. Pankivskyi 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.

8. Pankivskyi 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.

9. Бусько П., Паньківський С., С. Кропивко Характеристика взаємодії скафолдного білка ITSN1 з РНК-зв'язуючим білком SAM68. XVII міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки», 2019, Київ.

10. Pankivskyi 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.

11. Pankivskyi 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.

12. Дергай М. В., Дергай О. В., Паньківський С. В., Новохацька О. В., Мячинська М., Риндич А. В. Нові функції протеїнів ендоцитозу в контролі внутрішньоклітинного сигналіngu. XI Український біохімічний конгрес. 2014, Київ, Україна.

SUMMARY

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

Thesis for obtaining 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.

Significant number of cellular processes are regulated by scaffold proteins, that have several different structural domains. Usually, these molecules do not possess any enzymatic activity. They serve as scaffolds for the formation of protein complexes, regulating their spatial and temporal organization. Scaffold proteins are characterized by multiple functions and are referred to moonlighting proteins. As a result, impaired expression and presence of mutations in scaffold proteins-encoding genes leads to alterations in cellular process associated with the development of pathological states.

The ITSN proteins – ITSN1 and ITSN2, are scaffold proteins that modulate the processes of clathrin-mediated endocytosis, vesicular transport, actin cytoskeleton rearrangement, and several cellular mitogenic signaling pathways. As a result, these proteins are associated with oncogenic transformation of cells and impairment of the nervous system functioning, in particular, with the development of neurodegenerative diseases. For example, decreased *ITSN1* expression is associated with the proliferation and invasion of glioblastoma, neuroblastoma, and lungs cancer cells. Impaired ITSN1 expression is also observed in patients with 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. Structure characterization and search of new functions of ITSN protein in a cell are important for the understanding of the molecular mechanisms underlying the development of pathologic conditions mediated by the ITSN proteins. Therefore, the current work concerns the analysis of the putative role of

ITSN1 in a cell nucleus, characterization the interaction between ITSN1 and nuclear RNA-binding proteins.

It has been found in previous studies that ITSN1 localizes in a cell nucleus and may potentially interact with a number of nuclear proteins. Thus, in the current research, the interaction between ITSN1 and several nuclear proteins was analyzed and characterized. Using fluorescent microscopy, we confirmed that ITSN1 localizes in HeLa cells nuclei. We demonstrated that N-terminal EH domains, as well as SH3 domains, are involved in the regulation of nuclear-cytoplasmic shuttling of ITSN1. Analyzing the protein interaction databases we identified thirty nine putative ITSN1 partners, that are involved in the regulation of mRNA processing, chromatin remodeling, DNA reparation and replication. We confirmed the interaction between ITSN1 and RNA-binding proteins SAM68, LARP6 and WBP11 *in vitro*. For the first time, we showed that RNA-binding proteins also interacted with SH3 domains of endocytic proteins ITSN2, AMPH1 and BIN1, as well as modulators of actin cytoskeleton remodeling CTTN, TKS4 and TKS5, suggesting the link between mRNA transport and endocytosis or actin cytoskeleton remodeling processes. 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 prooncogenic isoforms, whereas in neurons, it induces the expression of neuron-specific transcripts. SAM68 overexpression is observed in different cancer type, including breast, prostate, oral cavity, colorectal, cervical, and kidney cancers.

We demonstrated that ITSN1 and SAM68 directly interact *in vitro* and colocalize in HeLa cells nuclei and cytoplasm. We showed that the interaction between ITSN1 and SAM68 was mediated by the SH3A domain of ITSN1 and the N-terminal region of SAM68 containing canonic class II proline motif PxxPxR, which specifically interacts with ITSN1 SH3A domain. The deletion of this motif prevented the interaction between ITSN1 and SAM68.

It is known that SAM68 interacts with SH3 domains of SRC kinases, PI3K regulatory subunit p85 α , methyltransferases, and adaptor proteins, including GRB2 and NCK1. The interaction between SAM68 and regulatory enzymes or adaptors leads to SAM68 posttranslational modification affecting the protein activity. Indeed, we found that ITSN1 and adaptor protein GRB2 compete for the binding to SAM68 *in vitro*. As ITSN1 and GRB2 are involved in the regulation of signaling pathways PI3K and MAPK, we suggested that the interaction between ITSN1 and SAM68 can be important for the regulation of the mentioned pathways.

Formation of dimers and oligomers by SAM68 controls its functioning in alternative splicing processes. Here, we demonstrated that ITSN1 and mRNA suppress SAM68 aggregation *in vitro*. We suggested that ITSN1 and mRNA affect intra- and intermolecular interactions that may occur between SAM68 low-complexity regions, which are common for RNA-binding proteins. 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 ITSN1-SAM68 complex.

It has been previously shown that SAM68 forms specific nuclear bodies in HeLa cells. This property was also shown for other RNA-binding proteins containing low-complexity and unstructured regions. The formation of the nuclear bodies can be described by the liquid phase transitions, associated with the formation of highly concentrated droplets – membraneless condensed granules that contain protein-RNA complexes. Here, we demonstrated that ITSN1 depletion stimulates the accumulation of SAM68 in nuclear bodies in HeLa cells. Moreover, we showed that nuclear localization of ITSN1 reduces the level of SAM68 enrichment in nuclear bodies. As the deletion of SH3A domain ITSN1 or

truncation of P0 proline motif in SAM68 leads to decreased accumulation of SAM68 in nuclear bodies, we suggested that the SH3A domain of ITSN1 and the P0 proline motif SAM68 are interacting regions that prevent SAM68 aggregation in a nucleus. As a result, accumulation of overexpressed ITSN1 in the nucleus stimulates the dissociation of SAM68 nuclear bodies or prevents their assembly suppressing phase transitions of SAM68 complexes. This suggestion correlates with the fact that endogenous ITSN1 and mRNA were not detected in SAM68 nuclear bodies demonstrating the importance of these factors for the maintaining of SAM68 in dissociated form.

It is known that SAM68 regulates alternative splicing of mRNA molecules 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 a two-fold increase in the level of intron retention in SRSF1 (ASF/SF2) transcript, associated with the enhanced expression of pro-oncogenic isoform of splicing factor ASF/SF2. 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 indicates 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 dimerization and oligomerization of SAM68 regulating its phase transitions and aggregation 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 the 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, for example, *SRSF1*.

The interaction between scaffold protein ITSN1 and RNA-binding protein SAM68 confirms the moonlighting functions of ITSN proteins and expands their functional role in cellular processes, associated with oncogenesis.

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

List of publications published on the topic of the dissertation:

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.

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. DOI: 10.15407/dopovidi2020.05.103.

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. DOI: 10.7124/bc.000999.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	19
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. Характеристика білків родини ITSN	26
1.1.1. Характеристика доменної структури білків родини ITSN	26
1.1.2. Функції білків ITSN у клітині	28
1.1.3. Роль білків родини ITSN у патологічних процесах	31
1.2. Характеристика РНК-зв'язуючого білка SAM68	34
1.2.1. Загальна характеристика РНК-зв'язуючих білків	34
1.2.2. Структурна характеристика білка SAM68	37
1.2.3. Функції білка SAM68 у клітині	39
1.2.4. Роль білка SAM68 в розвитку патологій	42
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	45
2.1. Матеріали	45
2.2. Біологічний матеріал	46
2.3. Плазмідні конструкції	46
2.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	49
2.5. Реакції рестрикції та лігування	50
2.6. Електрофорез нуклеїнових кислот	50
2.7. Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю	50
2.8. Приготування компетентних клітин	51
2.9. Трансформація клітин плазмідною ДНК	51
2.10. Виділення плазмідної ДНК	52
2.11. Експресія рекомбінантних білків в <i>E. coli</i>	52
2.12. Приготування бактеріальних лізатів	53
2.13. Очистка рекомбінантних білків методом афінної хроматографії	53
2.14. Культивування клітин ссавців	54
2.15. Трансфекція клітин плазмідною ДНК	55

	16
2.16. Преципітація білкових комплексів за допомогою GST-злитих білків	55
2.17. Коїмунопреципітація білкових комплексів із лізатів клітин	56
2.18. Електрофорез білків в поліакриламідному гелі	56
2.19. Вестерн-блот аналіз	57
2.20. Імунофлуоресцентний аналіз	57
2.21. Флуоресцентна гібридизація мРНК <i>in situ</i>	58
2.22. Метод зближеного лігування	58
2.23. Флуоресцентна мікроскопія	59
2.24. Аналіз співлокалізації флуоресцентних сигналів на мікротрубочках	59
2.25. Аналіз ядерно-цитоплазматичного співвідношення флуоресцентних сигналів	60
2.26. Аналіз інтенсивності флуоресценції ядерних тілець	60
2.27. Аналіз конкурентного зв'язування білків <i>in vitro</i>	61
2.28. Транскрипція мРНК <i>in vitro</i>	61
2.29. Аналіз седиментації рекомбінантних білків	62
2.30. Аналіз електрофоретичної рухливості мРНК	62
2.31. Атомно-силова мікроскопія	63
2.32. ЯМР-спектроскопія	63
2.33. Нокдаун ITSН1 в клітинах лінії HeLa	63
2.34. Виділення РНК	64
2.35. Синтез кДНК	64
2.36. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі	65
2.37. Аналіз рівня експресії та сплайсингу	66
2.38. Біоінформатичний аналіз	67
2.39. Статистична обробка даних	67
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	68
3.1. Аналіз клітинної локалізації ITSН1 та ідентифікація взаємодій ITSН1 із РНК-зв'язуючими білками	68
3.1.1. Детекція ITSН1 в ядрах клітин HeLa	68

3.1.2. Пошук потенційних партнерів ITSN1, які локалізуються і функціонують в ядрі	71
3.1.3. Аналіз взаємодії ITSN1 та ITSN2 із РНК-зв'язуючими білками SAM68, WBP11 та LARP6 <i>in vitro</i>	73
3.1.4. Аналіз взаємодій білків SAM68, WBP11 і LARP6 із білками регуляторами ендоцитозу та перебудов актинових філаментів <i>in vitro</i>	75
3.2. Характеристика взаємодії між білком ITSN1 та РНК-зв'язуючим білком SAM68	80
3.2.1. Підтвердження взаємодії ITSN1-SAM68 <i>in vitro</i> та в клітині	80
3.2.1.1. Аналіз взаємодії між ITSN1 та SAM68 <i>in vitro</i>	80
3.2.1.2. Аналіз взаємодії між ITSN1 і SAM68 в клітині з використанням мікротрубочок як носіїв	81
3.2.1.3. Аналіз співлокалізації ITSN1 та SAM68 у клітинах лінії HeLa	85
3.2.1.4. Картування ділянок взаємодії між ITSN1 та SAM68	86
3.2.2. Функціональна характеристика взаємодії ITSN1 та SAM68	90
3.2.2.1. Аналіз конкурентного зв'язування ITSN1 та GRB2 із SAM68	90
3.2.2.2. Зростання розчинності SAM68 в присутності SH3 доменів ITSN1 <i>in vitro</i>	92
3.2.2.3. Виявлення неканонічної взаємодії між ITSN1 та РНК	94
3.2.2.4. Аналіз комплексів мРНК-білок за допомогою атомно-силової мікроскопії	96
3.2.2.5. Ідентифікація SH3 домену ITSN1, який взаємодіє із мРНК	97
3.2.2.6. Вплив ITSN1 на формування SAM68-специфічних ядерних тілець у клітинах HeLa	101
3.2.2.7. Роль домену SH3A ITSN1 у формуванні ядерних тілець SAM68	103
3.2.2.8. Роль мотиву P0 у накопиченні SAM68 в ядерних тільцях	107
3.2.2.9. Аналіз співлокалізації SAM68-специфічних ядерних тілець із ITSN1 та мРНК в клітинах HeLa	109
3.2.2.10. Аналіз впливу ITSN1 на процеси сплайсингу, що опосередковуються білком SAM68	110

РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	116
ВИСНОВКИ	129
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	130
ДОДАТОК А	153

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CCR	суперспіралізована ділянка
DH-домен	Dbl-гомологічний домен
DMEM	модифіковане Дульбекко середовище Ігла
ECL	посилена хемілюмінесценція
EH-домен	домен, гомологічний Eps15
FBS	ембріональна сироватка теляти
GFP	зелений флуоресцентний білок
GST	глутатіон-S-трансфераза
KH	домен, гомологічний hnRNPК
LB	поживне середовище Лурія Бертрані
LLPS	розділення рідких фаз
MBD	домен, що зв'язується із мікротрубочками
NLS	сигнал ядерної локалізації
PBS	натрій-фосфатний буфер
PH-домен	домен, гомологічний плекстрину
PMSF	фенілметилсульфонілфторид
RFP	червоний флуоресцентний білок
SDS	додецилсульфат натрію
SH3-домен	гомологічний до Src домен 3
SNB	ядерні тільця SAM68
ІБ	імуноблот
ІІ	імунопреципітація
ІІТГ	ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид
КЛ	клітинний лізат
ПААГ	поліакриламідний гель
ПЕІ	поліетиленімін
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція

ВСТУП

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 (1). Актуальність дослідження скафолдних білків та їх ролі в розвитку патологічних станів значно зросла за умов активного вивчення феномену багатофункціональності 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 (2). 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 (3, 4). Надекспресія *ITSN1* стимулює проліферацію, міграцію та інвазію клітин гліобластоми (5). З іншого боку, ITSN1 пригнічує проліферацію, ріст та міграцію ракових клітин легень (6). У нейронах та гліальних клітинах ITSN1 регулює везикулярний транспорт та синаптичну передачу стимулів (7), сприяє розвитку дендритних шипиків (8), та модулює міграцію нейронів гіпокампу під час розвитку нервової системи (9). Крім того, порушення експресії гена *ITSN1* спостерігається у пацієнтів із синдромом Дауна та хворобами Альцгеймера і Гантінгтона (10, 11).

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. 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 (12). 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 ITSН1 локалізується в ядрах клітин лінії раку шийки матки HeLa. Вперше виявлено, що ITSН1 взаємодіє із РНК-зв'язуючими білками SAM68, LARP6 та WBP11 *in vitro*. Встановлено, що білки SAM68, LARP6 та WBP11 також можуть взаємодіяти із білками ендоцитозу ITSН2, AMPH, BIN1 та білками модуляторів перебудов актинового цитоскелету CTTN1, TKS4, TKS5 *in vitro*. Взаємодію ITSН1 і SAM68 підтверджено за допомогою преципітації білкових комплексів *in vitro*. За допомогою флуоресцентної мікроскопії проведено характеристику взаємодії протеїнів ITSН1 та SAM68 у клітинах лінії HeLa та проаналізовано співлокалізацію цих білків у ядрах клітин. Встановлено, що ідентифікована взаємодія опосередковується доменом SH3A ITSН1 та проліновим мотивом P0 SAM68. Виявлено, що ITSН1 конкурує із адаптерним білком GRB2 за зв'язування із SAM68 та безпосередньо запобігає агрегації SAM68 за умов *in vitro*. Вперше виявлено пряму взаємодію між ITSН1 та РНК. Продемонстровано, що ITSН1 модулює формування SAM68-специфічних тілець в ядрах клітин лінії HeLa, індукуючи їх дисоціацію. Виявлено, що ITSН1 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 ITSН1, який взаємодіє із мРНК, може запобігати формуванню SAM68-специфічних ядерних тілець. Механізм цього процесу можна пояснити регуляцією білком ITSН1 фазових переходів SAM68, що є характерним для багатьох РНК-зв'язуючих білків, які є основою немембранних субкомпартментів клітини. Таким чином, ITSН1 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 ITSН1-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 щире 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика білків родини ITSN

1.1.1. Характеристика доменної структури білків родини ITSN.

Інтерсектини (ITSN) – родина еволюційно консервативних мультидоменних білків, що задіяні у клатрин-опосередкованому ендоцитозі, передачі внутрішньоклітинних сигналів та координації перебудов актинових філаментів. У людини та інших хребетних родина інтерсектинів представлена двома білками-паралогами – ITSN1 та ITSN2, які мають схожу доменну структуру та високий ступінь гомології. Ген *ITSN1* людини локалізується на хромосомі 21 (q22.1-22.2), тоді як ген *ITSN2* знаходиться на хромосомі 2 (pter-p25.1) (13, 14). За рахунок альтернативного сплайсингу обидва гени кодують дві основні ізоформи ITSN1 та ITSN2 – довгу (молекулярна маса білкового продукту 190 кДа) та коротку (молекулярна маса – 140 кДа) (14).

Коротка ізоформа ITSN1s та ITSN2s (рис. 1.1.) складається з двох EPS15-гомологічних доменів (EH1 та EH2), ділянки CCR (coiled-coil region) та п'яти SRC-гомологічних доменів (SH3A – E) (15). Кожен із доменів забезпечує взаємодію ITSN1 та ITSN2 із білками партнерами та безпосередньо опосередковує молекулярні функції інтерсектинів. Зокрема, домени EH зв'язуються із мотивами NPF (аспарагін-пролін-фенілаланін), які наявні в деяких адаптерних білках ендоцитозу, а саме: EPN1/2 (15), DAB2 (16), SCAMP1 (17), та STON2 (18). Варто зазначити, що домени EH наявні лише у кількох білках, які функціонують у процесах везикулярного транспорту, ендоцитозу та екзоцитозу (19).

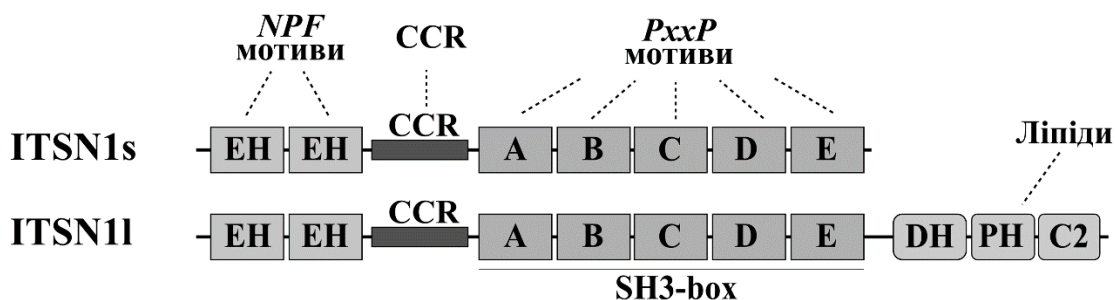


Рис. 1.1. Схематичне зображення доменної структури коротких (ITSN1/2s) та довгих (ITSN1/2l) ізоформ ITSN1 та ITSN2 і їх лігандів. NPF – мотив аспарагін-пролін-фенілаланін, CCR – суперспіралізована ділянка, PxxP – пролін-збагачені мотиви (де, P – пролін, x – будь-яка амінокислота), ФІФ – фосфатидилінозитолфосфати

Суперспіралізована ділянка CCR являє собою позитивно заряджену спіраль, збагачену амінокислотними залишками лізину, аргініну, глутамату, глутаміну та лейцину. Відомо, що CCR ділянка білків родини ITSN забезпечує їх гомо- та гетероолігомеризацію. Зокрема, за рахунок ділянки CCR інтерсектини взаємодіють між собою (20), а також зв'язуються із ендоцитозним адаптером EPS15 (21) та асоційованими із мембраною білками SNAP-23 та SNAP-25, які забезпечують злиття мембран під час екзоцитозу везикул (22).

SH3 домени інтерсектинів взаємодіють із проліновими мотивами білків, що функціонують у багатьох процесах клітини, включаючи ендоцитоз (DNM1, SYNJ1, SGIP1, SHIP2) (15, 22-24), перебудови актинового цитоскелету (N-WASP, WIP, CdGAP) (25-27), та сигнальну трансдукцію (PI3KC2 β , SOS, CBL, CIN85, WNK) (28-32). SH3 домени ITSN1 та ITSN2 характеризуються високим ступенем гомології і мають багато спільних партнерів (33). Домени SH3A, SH3C та SH3E взаємодіють із більшістю відомих партнерів інтерсектинів (33), тоді як для доменів SH3B та SH3D характерне зв'язування із неканонічними лігандами. Наприклад, SH3B ITSN1 взаємодіє із нетиповими лінійними мотивами (34) та може формувати димери

із SH3 доменом білка ендофіліну (SH3GL2) (35), тоді як SH3D домен ITSN1 може зв'язуватись із SH3 доменом білка FCHSD2 (36).

Довга ізоформа інтерсектинів (ITSN11 та ITSN21) містить тандем трьох додаткових С-кінцевих доменів DH, PH та C2. Домен DH, або RhoGEF стимулює обмін ГДФ на ГТФ у ГТФазі Cdc42 (13, 37). Домен PH зв'язує фосфоінозитиди мембрани та безпосередньо регулює домен DH, стимулюючи його активність (38). Домен C2 є найменш вивченим доменом білків ITSN і його функція залишається невідомою (2, 39). В інших білках цей домен залучений до Ca^{2+} -залежного та Ca^{2+} -незалежного зв'язування із фосфоліпідами мембрани (40).

Експресія та клітинна локалізація ізоформ білків ITSN варіюють. Зокрема, ITSN1s експресується у всіх тканинах та локалізується у цитоплазмі та перинуклеарній ділянці клітин (41-44). Крім того, ITSN1s також локалізується на клатрин-облямованих ямках та везикулах (41), ділянках вигину мембрани – кавеолах та везикулах апарату Гольджі (42), тоді як стимуляція епідермальним фактором росту індукує релокалізацію ITSN1 до плазматичної мембрани (45). Довга ізоформа ITSN11 є нейрон-специфічною і разом із короткою ізоформою ITSN1s локалізуються біля пре- та постсинаптичних ділянок нейронів (8, 46-49). ITSN2s та ITSN21 експресуються у всіх клітинах і, як ITSN1s, локалізуються переважно у цитоплазмі клітин та є асоційованими із везикулярними структурами (43, 50).

Експериментальні дані, отримані у відділі функціональної геноміки ІМБГ НАНУ та нещодавно опубліковані результати (51) вказують на те, що ITSN1 може локалізуватися у ядрах клітин ліній 293 та HeLa. Функціональне значення такої властивості ITSN1, а також партнери ITSN1 в ядрі клітини залишались невідомими і є основним предметом цієї дисертаційної роботи.

1.1.2. Функції білків ITSN у клітині. Найперше було виявлено, що білки родини ITSN являються компонентами білкових комплексів, які регулюють процес клатрин-опосередкованого ендоцитозу (15). Подальші

дослідження підтвердили важливу роль цих білків у формуванні, дозріванні та відділенні мембранних везикул. Відомо, що білки ITSN1 та ITSN2 регулюють процес ініціації ендоцитозу, відділення везикули та пов'язують процес ендоцитозу із полімеризацією актинових філаментів та сигнальними шляхами клітини (2, 52). На етапі ініціації ендоцитозу ITSN1 та EPS15 і їх паралоги ITSN2 та EPS15R регулюють кластеризацію білків FCHO1/2 на плазматичній мембрані, що є необхідним для визначення місць формування ендоцитозних ямок (53). Це призводить до активації адаптерного комплексу AP2, який рекрутує важкі та легкі ланцюги клатрину до місць формування інвагінацій мембрани (54). ITSN1 та ITSN2 взаємодіють із ендоцитозними адаптерами EPN1, DAB2, STON2 (15, 16, 18), що опосередковують взаємодію клатрину із мембраною та інтерналізованими рецепторами, тоді як лінкерна ділянка між доменами SH3A та SH3B ITSN1 безпосередньо зв'язується із адаптерним комплексом AP2 (47). Показано, що домени SH3 ITSN1 та ITSN2 зв'язують та стимулюють формування олігомерів ГТФази динаміну, що забезпечує відділення сформованої везикули від мембрани (22, 55). Крім того, SH3 домени ITSN1 рекрутують інозитолфосфатази SYNJ1 (47) та SHIP2 (24) до клатрин-облямованих везикул, що забезпечує процес відділення клатрину від сформованої везикули (24, 35, 56).

За рахунок множинних взаємодій ITSN1 та ITSN2 виступають платформою для збірки білкових комплексів під час формування везикул (рис. 1.2.). Підтвердженням цього є те, що надекспресія або дефіцит ITSN1 та ITSN2 призводить до інгібування інтерналізації рецепторів шляхом клатрин-опосередкованого ендоцитозу в різних типах клітин (21, 43, 45, 53). Наприклад, нокдаун гена *ITSN1* з використанням інтерферуючої РНК пригнічує інтерналізацію рецепторів епідермального фактору росту та калієвого каналу ROMK1 у клітинах лінії 293 і знижує рівень ендоцитозу трансферину в нейронах гіпокампу (28, 45, 48). Пригнічення експресії білка DAP160, ортолога ITSN, призводить до зменшення кількості синаптичних везикул, збільшення їх розмірів та порушення їх рециркуляції у нервових

клітинах *Drosophila melanogaster* (57). У мишей з нокаутом гена *ITSN1* спостерігається збільшення розміру ранніх ендосом в нейронах та порушення ендо- та екзоцитозу в секреторних клітинах, хоча нокаут гена *ITSN1* у мишей не є летальним (58, 59).

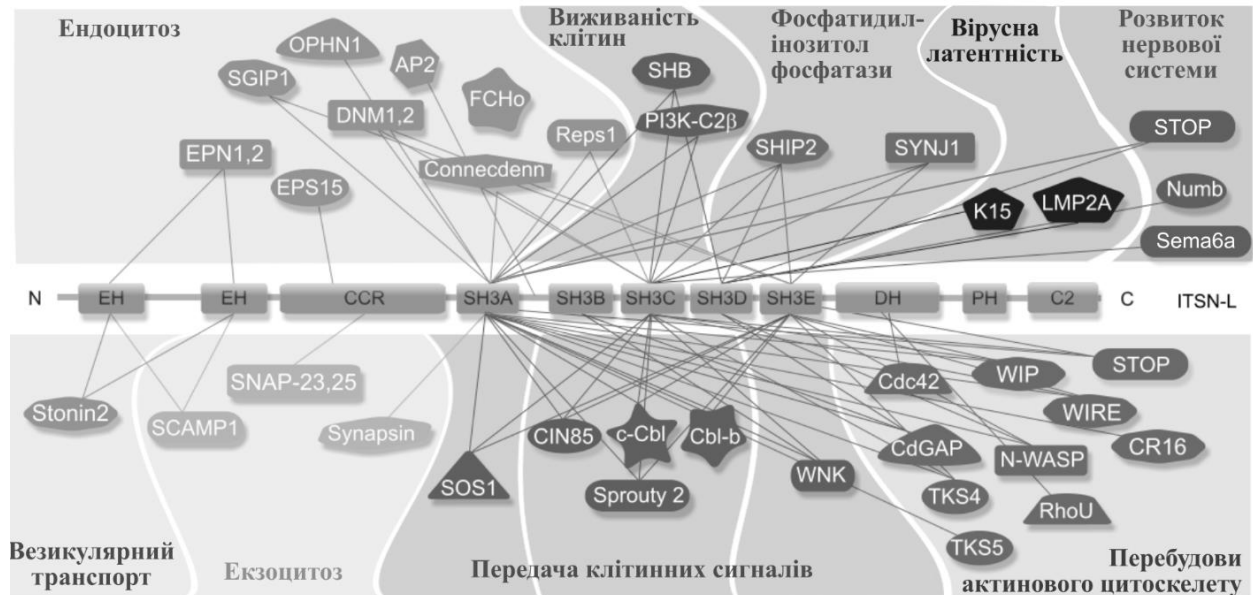


Рис. 1.2. Партнери білків родини ITSN. Адаптовано з (52)

ITSN1 та ITSN2 також забезпечують зв'язок процесу ендоцитозу із перебудовами актинових філаментів та безпосередньо беруть участь в процесах ремоделювання актинового цитоскелету. Домени SH3 ITSN1 та ITSN2 взаємодіють із ефектором ГТФази Cdc42 – білком N-WASP (25, 60), а домени DH стимулюють обмін ГДФ на ГТФ у Cdc42 (25, 50). Білки N-WASP та Cdc42 активують комплекс Arp2/3, що забезпечує полімеризацію та галуження актинових філаментів. Виявлено, що домен SH3E ITSN1 пригнічує активність домену DH, тоді як зв'язування домену SH3E із N-WASP та Numb призводить до звільнення домену DH від автоінгібування (8, 61, 62). Надекспресія ITSN1 у фібробластих стимулює полімеризацію актину та утворення філоподій (25). Крім того, ITSN1 та ITSN2 взаємодіють із білком WIP, який зв'язується із актином і регулює активність, стабільність та локалізацію білка N-WASP (26, 63). Було виявлено, що ITSN1 та ITSN2 локалізуються в інвадоподіях клітин раку молочної залози та стимулюють їх

утворення, що пов'язано із WIP-опосередкованою стимуляцією полімеризації актинових філаментів (26, 63).

Також показано, що білки родини інтерсектинів забезпечують координацію ендоцитозу із процесами сигнальної трансдукції та регулюють мітогенні сигнальні каскади клітини. У відповідь на активацію рецептора епідермального фактору росту *ITSN1* активує малу ГТФазу RAS. Було запропоновано, що активація RAS опосередковується взаємодією між *ITSN1* та білком SOS1, який являється активатором RAS (30, 44). Як наслідок, надекспресія SH3 доменів *ITSN1* пригнічує активацію RAS (64). Подальші дослідження виявили, що *ITSN1*-опосередкована активація RAS відбувається за рахунок взаємодії *ITSN1* із кіназою PI3K2 β , яка блокує RAS (65). Крім того, *ITSN1* відіграє важливу роль в активації мембранних рецепторів. Зокрема, нокдаун *ITSN1* пригнічує інтерналізацію рецептору EGFR та запобігає активації мітогенного сигнального шляху ERK/MAPK (45). *ITSN1* сприяє убіквітинуванню рецептора епідермального фактору росту, його інтерналізації та деградації за рахунок взаємодії із E3-убіквітинлігазою Cbl та пригнічення її інгібіторів – білків Spry2, Sts1/2, Cool/Pix (45, 66). У легенях *ITSN1* може пригнічувати активацію RAS-ERK сигнального шляху, оскільки нокдаун *ITSN1* у легенях мишей призводить до стійкої TGF β -опосередкованої активації ERK1/2 (67). Показано, що *ITSN1*, а саме домени EH, стимулюють JNK- опосередковану активацію транскрипційного фактору Elk-1 незалежно від активації сигнального шляху RAS-ERK/MAPK (44). Взаємодія *ITSN1* із PI3K-C2 β та активація PI3K-AKT шляху забезпечує виживання нервових клітин, тоді як нокдаун *ITSN1* призводить до інгібування сигнального шляху PI3K-C2 β -AKT та подальшого апоптозу клітин нейробластоми (68).

1.1.3. Роль білків родини ITSN у патологічних процесах. Порушення експресії генів *ITSN1* та *ITSN2* пов'язано із такими патологічними процесами як нейродегенеративні захворювання, патологічні ураження легень та

канцерогенез. Зокрема, *ITSN1* асоційований із розвитком синдрому Дауна. Ген *ITSN1* знаходиться на 21 хромосомі, і у пацієнтів із цим захворюванням спостерігається його надекспресія (69, 70). Відомо, що у нейронах пацієнтів із синдромом Дауна спостерігається збільшення розмірів раних ендосом (71). Ймовірно, трисомія 21-ї хромосоми та надекспресія *ITSN1* порушують, насамперед, структуру пре- та постсинаптичних мембран, так як *ITSN1* бере участь в модуляції везикулярного транспорту у нейронах (7). Збільшення розміру ендосом також спостерігались у мишей із трисомією 16-ої хромосоми, яка є частково гомологічною 21-ій хромосомі людини (58). Крім того, у нейронах пацієнтів із синдромом Дауна спостерігається зниження щільності дендритних шипиків. Такі ж дефекти наявні при надекспресії доменів SH3 *ITSN1* та пролін-багатої ділянки білка Numb (8, 49). Для пацієнтів із хворобою Альцгеймера також було виявлено порушення ендоцитозу та збільшення раних ендосом, що дозволило пов'язати рівень експресії *ITSN1* із розвитком цього захворювання (10).

Роль *ITSN1* було виявлено і в розвитку хореї Гантінгтона. Причиною цієї патології є деградація нейронів внаслідок формування агрегатів із мутантної форми білка Httⁿ. Було показано, що *ITSN1* взаємодіє із Httⁿ, підвищує його здатність до агрегації та спричиняє нейроцитотоксичність. Припускають, що такий механізм опосередкований сигнальним шляхом JNK-MAPK (11). Було виявлено, що *ITSN1* контролює міграцію нервових клітин кори головного мозку та гіпокампу в ході розвитку нервової системи за рахунок регуляції рилін-опосередкованого сигнального шляху (9) та регулює виживання нейронів, модулюючи сигнальний шлях PI3K-Akt (68). Нокаут гена *ITSN1* у мишей асоційований із зменшенням розміру мозку та порушенням навчання і пам'яті (58, 59).

Виявлено, що білки родини *ITSN* задіяні також в процесах онкогенезу. Було показано, що надекспресія *ITSN1* призводить до онкогенної трансформації фібробластів мишей (72). Надекспресія *ITSN1* спостерігається у клітинах та пухлинах нейробластоми, тоді як нокаунт *ITSN1* призводив до

пригнічення онкогенного потенціалу клітин нейробластоми та інгібування росту пухлин в мишей (3, 4). Також було виявлено, що *ITSN1* стимулює проліферацію клітин гліоми (лінії U87 та LN229), пригнічує їх апоптоз та активує їх міграцію та інвазію *in vitro* та *in vivo* (5, 73, 74). На противагу, зниження рівня експресії *ITSN1* спостерігається у клітинах раку легень. Надекспресія гена *ITSN1* призводить до пригнічення проліферації, росту та міграції клітин раку легень лінії A549 (6). *ITSN2* також може бути залученим до злякисних процесів, так як високий рівень експресії *ITSN2* корелює із кращою виживаністю пацієнтів із раком молочної залози після ад'ювантної хіміотерапії (75).

ITSN1 також може бути асоційованим із патологічними процесами у легенях. Зокрема показано, що нокдаун *ITSN1* пригнічує сигнальний шлях ERK/MAPK та стимулює мітохондріальний шлях апоптозу в ендотеліальних клітинах *in vitro* (76). Крім того, *ITSN1* регулює проникність судин у легенях та впливає на виживаність легеневих ендотеліальних клітин. Нокдаун *ITSN1* у мишей призводить до активації апоптозу ендотеліальних клітин та руйнування альвеол, що корелює із пошкодженням ендотеліального бар'єру та розвитком легеневої едеми (77). Також було виявлено, що за умов запальних процесів, асоційованих із легеневою артеріальною гіпертензією, в ендотеліальних клітинах легень *ITSN1* підлягає протеолітичному розрізанню протеазою GmV в ділянці домену EH2. Утворений N-кінцевий фрагмент білка транспортується в ядро, де опосередковано через активацію шляху p38/MAPK активує транскрипційний фактор Elk-1, тоді як C-кінцевий фрагмент, що містить SH3 домени, інгібує активацію сигнального шляху RAS/ERK/MAPK. Ці процеси призводять до підвищення експресії гена *c-fos* та патологічної проліферації ендотеліальних клітин легень (78, 79). Надекспресія N-кінцевого фрагменту *ITSN1* у мишей із дефіцитом повнорозмірного *ITSN1* призводила до значного ураження ендотеліальних клітин.

1.2. Характеристика РНК-зв'язуючого білка SAM68

1.2.1. Загальна характеристика РНК-зв'язуючих білків. РНК-зв'язуючі білки (RBP, RNA binding proteins) представляють групу біомолекул, які за рахунок здатності зв'язувати РНК можуть формувати рибонуклеопротейнові комплекси. Такі комплекси є динамічними структурами, що підлягають постійному ремоделюванню, а порушення функціонування рибонуклеопротейнових комплексів призводить до розвитку патологічних станів (80).

Більш ніж 1500 білків в протеомі людини (7,5%) вважаються РНК-зв'язуючими білками, для яких показані взаємодії із різними видами РНК (80). Виявлено близько 600 різноманітних структурних доменів та мотивів, які можуть взаємодіяти із РНК. Найбільш типовими та канонічними РНК-зв'язуючими доменами є RRM (RNA recognition motif), КН (K homology domain), DSRM (double-stranded RNA-binding motif), геліказний домен DEAD та цинкові пальці (80). Багато RBP характеризуються комбінацією та повторюванням цих доменів, що дозволяє збільшувати їх афінність та специфічність до певних РНК. Кілька широкомасштабних аналізів протеому людини вказує на те, що окрім класичних RBP існують білки, які взаємодіють із РНК, але не містять типових РНК-зв'язуючих доменів, і становлять близько 55% всіх білків, які можуть взаємодіяти із РНК (81). Крім того, більшість РНК-зв'язуючих білків характеризуються високим рівнем консервативності, особливо у хребетних тварин. Це вказує на структурну та функціональну стабільність РНК-зв'язуючих білків (80).

Окрім доменів та мотивів, які безпосередньо взаємодіють із РНК, багато РНК-зв'язуючих білків містять мотиви для взаємодії із іншими білками та сайти посттрансляційних модифікацій, включаючи фосфорилування, метилування та убіквітінування (80), що забезпечує контроль функціонування РНК-зв'язуючих білків.

Хоча більшість РНК-зв'язуючих білків залучені до посттранскрипційної регуляції експресії генів, їх специфічні функції та структурні характеристики є досить варіабельними. Зокрема, РНК-зв'язуючі білки координують транскрипцію, сплайсинг, дозрівання, транспорт та деградацію всіх видів РНК (80). Дуже часто ці білки виступають шаперонами РНК та запобігають агрегації та неправильному фолдингу незрілих молекул РНК.

Багато РНК-зв'язуючих білків регулюють локалізацію РНК у різноманітних гранулах, де відбувається зберігання та процесинг молекул РНК. Така функція РНК-зв'язуючих білків пов'язана з їх здатністю опосередковувати розділення рідких фаз (liquid-liquid phase separation, LLPS). Цей процес пов'язаний із утворенням двох стабільних фаз біомолекул у гомогенному розчині. За рахунок специфічних взаємодій, одна з двох фаз стає щільною білок-збагаченою, де висококонцентрований білковий розчин формує краплю, або гранулу, відділену від оточуючого середовища (82, 83). Процес фазових переходів рідин у біологічних системах вважається основним механізмом компартменталізації в клітині, зокрема утворення немембранних цитоплазматичних та ядерних органел та гранул, включаючи стресові гранули, Р-тіляця, ядерця, тіляця Кахаля, ядерні спекли, тіляця промієлоцитної лейкемії, параспекли, тощо (84, 85). Переважно, ці структури виникають при дозріванні та процесингу (сплайсинг, транскрипція, деградація) різних типів РНК, хоча функції багатьох ядерних тілець залишаються невідомими (84, 85).

Збірка та дисоціація таких немембранних компартментів у живих клітинах є динамічним процесом, що регулюється за рахунок посттрансляційних модифікацій білків та їх взаємодіями (82, 83), тоді як *in vitro* ці процеси можуть регулюватися фізичними властивостями розчину – осмолярністю, рН, концентрацією білка (82, 83). Важливими компонентами таких структур є РНК та РНК-зв'язуючий білок, який має здатність до самоагрегації. РНК є одним із основних компонентів немембранних органел та активатором фазових переходів. За умов низького рівня співвідношення

концентрацій РНК/білок, РНК стимулює розділення фаз РНК-зв'язуючих білків, тоді як висока концентрація РНК може інгібувати самозбірку цих структур (86).

Іншим важливими детермінантами фазових переходів є наявність РНК-зв'язуючого домену та адгезивних ділянок, які забезпечують стабільні міжмолекулярні взаємодії. Мотиви збагачені повторами амінокислот (наприклад, полігліцинові, поліглутамінові, поліпролінові повтори та ін.) є високоефективними в процесі розподілу фаз за участі РНК-зв'язуючих білків (87). Аргінін-гліцинові повтори RGG/RG є прикладом таких мотивів. Виявлено, що повтори RGG/RG можуть безпосередньо взаємодіяти із РНК та з меншою ефективністю із одноланцюговою ДНК. За рахунок функціональних груп аргініну ці мотиви можуть формувати електростатичні та водневі зв'язки із фосфатами нуклеїнових кислот, а також водневі та π -стекингові взаємодії із залишками рибози та азотистих основ (87). Виявлено, що повтори RGG/RG таких РНК-зв'язуючих білків як hnNRPU, EWS, FMRP, FUS та PGL-3 безпосередньо зв'язують РНК та стабілізують взаємодію білок-РНК (87-89). Формування π -стекингових та водневих взаємодій між пептидними зв'язками залишків гліцину та гуанідинової групи аргініну сприяє тому, що повтори RGG/RG забезпечують міжмолекулярні взаємодії білків стимулюючи самозбірку білкових комплексів та агрегатів (90). Оскільки RGG/RG повтори опосередковують взаємодії білок-білок та білок-РНК, вони є необхідними компонентами фазових переходів, що спостерігається у багатьох РНК-зв'язуючих білків, включаючи FUS, EWS, TAF15, FMRP та GRBP1, які формують стресові гранули (87).

Процеси розділення рідких фаз за участі РНК-зв'язуючих білків відіграють важливу роль у патологічних процесах. Зокрема, мутації у декількох РНК-зв'язуючих білках, які залучені у формуванні цитоплазматичних стресових гранул (TDP43, FUS, hnRNPA1, TAF15, ATX1 та ін.), призводять до розвитку нейродегенеративних захворювань (наприклад, латеральний аміотрофічний склероз, хвороби Альцгеймера та

Гантінтона), пов'язаних із утворенням нерозчинних фібрил у нейронах (91, 92). Ці процеси спричинені ущільненням стресових гранул і формуванням агрегатів РНК-зв'язуючих білків та РНК за рахунок порушення регуляції фазових переходів (91, 93). Порушення процесів розділення рідких фаз також спостерігають при ракових захворюваннях, де, наприклад, відбуваються порушення формування комплексів репарації ДНК, порушення формування стресових гранул і тілець промієлоцитної лейкемії (93). Таким чином, дослідження РНК-зв'язуючих білків в контексті розділення рідких фаз є важливими для розуміння механізмів розвитку патологічних станів, пов'язаних із неконтрольованою агрегацією білків або порушенням процесингу РНК.

1.2.2. Структурна характеристика білка SAM68. Білок SAM68 (Src-Associated substrate in Mitosis of 68 kDa), що кодується геном *KHDRBS1* (KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1) належить до родини РНК-зв'язуючих білків STAR (Signal Transduction and Activation of RNA), які забезпечують регуляцію процесів транскрипції та процесингу РНК у відповідь на зміни сигнальних каскадів клітини. Окрім SAM68 ця родина білків включає також білок QKI, фактор сплайсингу SF1 та паралогі SAM68 – SLM1 (*KHDRBS2*) та SLM2 (*KHDRBS3* або T-STAR) (94).

Білок SAM68 містить центральний домен GSG (GRP33/SAM68/GLD-1), фланкований N- та C-кінцевими неупорядкованими ділянками. GSG домен утворений РНК-зв'язуючим доменом KH (домен гомологічний hnRNP K) та двома фланкуючими структурованими ділянками NK (Qua1) та СК (Qua2) (12). GSG домен забезпечує безпосередню взаємодію із РНК та димеризацію білка SAM68 (95-99). Відомо, що за рахунок KH домену SAM68 неспецифічно взаємодіє із полі(А) та полі(U) РНК та специфічно зв'язує нуклеотидні послідовності UAAA та UUAA *in vitro* (99). *In vivo* було показано, що SAM68 взаємодіє із мРНК β-актину, hnRNP A2/B1, імпортину β, TFIIЕα та ін. (100, 101). В результаті альтернативного сплайсингу

утворюється ізоформа SAM68, яка не містить домену КН. Виявлено, що ця ізоформа експресується у клітинах з пригніченим ростом, що вказує на важливість КН домену у регуляції переходу G1/S в ході клітинного циклу (102). Структурована ділянка НК безпосередньо забезпечує димеризацію SAM68, тоді як ділянка СК робить внесок у зв'язування РНК (96) (рис. 1.3.).

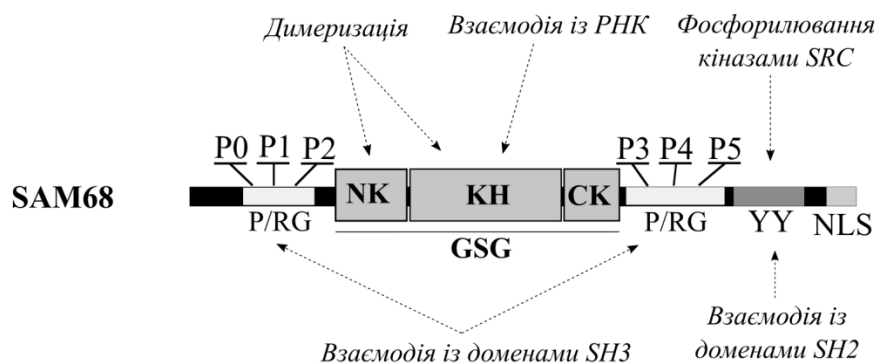


Рис. 1.3. Схема доменної організації білка SAM68

N- та С-кінцеві невпорядковані ділянки білка SAM68 містять набір мотивів, які забезпечують різноманітні білок-білкові взаємодії або підлягають посттрансляційним модифікаціям. SAM68 містить п'ять пролін-збагачених мотивів, що забезпечують взаємодію із білками, які містять домени SH3 та WW. Зокрема, за рахунок пролінових мотивів SAM68 взаємодіє із фосфоліпазою $C\gamma$ (PLC γ -1), метилтрансферазами PRMT1 та PRMT2, адаптерними білками GRB2, NCK, GRAP, CRK, VAV та цитоплазматичними тирозиновими кінзами, включаючи SRC, FTN, LCK, BRK, ZAP70, TEC і BTK (12, 103). Мотив, збагачений залишками тирозину, може підлягати фосфорилуванню та опосередковувати взаємодію із сигнальними білками, що містять SH2 домени, зокрема кінзами родини SRC, BRK, PLC γ -1, RasGAP (104-106). Крім того, фосфорилування по залишках тирозину запобігає взаємодії SAM68 із РНК (105). SAM68 містить також вісім потенційних сайтів MAPK-опосередкованого фосфорилування по залишках серину та треоніну (107). Ацетилювання залишків лізину в домені GSG має позитивний вплив на зв'язування РНК (108), тоді як

метилування RG (аргінін/гліцин)-збагачених повторів N-метилтрансферазами є важливим для ядерної локалізації SAM68 та запобігає його взаємодії із SH3 доменами (109, 110). На С-кінці білка SAM68 знаходиться сигнал ядерної локалізації, що забезпечує транспорт білка у ядро (111).

SAM68 експресується у всіх типах тканин і клітин. За рахунок наявності сигналу ядерної локалізації SAM68 переважно локалізується в ядрі, де він рівномірно розташовується в нуклеоплазмі та може формувати SAM68-специфічні ядерні тільця, які є характерними для деяких злоякісних клітинних ліній (12, 112). Також SAM68 може локалізуватись в цитоплазмі та розташовуватись біля плазматичної мембрани і брати участь в регуляції функціонування деяких мембранних рецепторів та цитоплазматичних сигнальних шляхів (12).

1.2.3. Функції білка SAM68 у клітині. Однією з найважливіших функцій білка SAM68 у клітині є його здатність регулювати альтернативний сплайсинг. SAM68 взаємодіє із регуляторними ділянками інтронів між поліпіримідиновим трактом та 3'-сайтом сплайсингу пре-мРНК (113), формує комплекси із факторами сплайсингу (наприклад, U2AF68) та білками, асоційованими із сплайсосою (110). Було виявлено, що SAM68 регулює альтернативний сплайсинг специфічних пре-мРНК. Найперше було показано, що SAM68 забезпечує збереження альтернативного екзона v5 в мРНК рецептора CD44, а фосфорилування SAM68 MAPK кінзама ERK1/2 стимулює його функціональну активність (107). Включення екзона v5 CD44 сприяє злоякісній трансформації та міграції клітин, що корелює із активацією мітогенного сигнального шляху RAS-MAPK (114). SAM68 також зв'язується із інтроном пре-мРНК цикліну D1, що сприяє збереженню цього інтрона у дозрілому транскрипті та експресії прото-онкогенної ізоформи цикліну D1b (115). Активація сигнального шляху MAPK у клітинах раку простати також активує дану подію сплайсингу, яка опосередковується білком SAM68 (115). MAPK-опосередковане фосфорилування SAM68 призводить також до

збереження інтрона в 3'-UTR пре-мРНК прото-онкогена ASF/SF2 (*SRSF1*), що сприяє стабілізації мРНК ASF/SF2 та активації епітеліально-мезенхімального переходу клітин раку прямої кишки SW480 (116). SAM68 стимулює вибір альтернативного 5'-сайту сплайсингу екзона 2 пре-мРНК гена *BCLX*. Це призводить до експресії проапоптичної ізоформи гена *BCLX* (*BCLX-S*) в клітинах лінії 293 (117). Фосфорилування SAM68 по залишках тирозину кіназами родини SRC інгібує SAM68-опосередкований сплайсинг пре-мРНК *BCLX* та сприяє експресії антиапоптичної ізоформи – *BCLX-L*. SAM68 зв'язується із сайтами сплайсингу інтрона 5 пре-мРНК гена *mTOR*. Збереження цього інтрона знижує стабільність мРНК *mTOR*, так як цей інтрон містить додатковий стоп кодон. Нокаут SAM68 у мишей призводить до збереження інтрона 5 у мРНК *mTOR*, що призводить до зниження рівня експресії *mTOR* та порушення адипогенезу у мишей (118). SAM68 відіграє також важливу роль в процесах сплайсингу нейрон-специфічних мРНК. Зокрема, SAM68 регулює сплайсинг щонайменше 24 екзонів під час нейрогенезу, регулюючи розвиток нервової системи, тоді як нокаунт SAM68 пригнічує диференціацію нейрональних прогеніторних клітин мишей (119, 120). Деполяризація нейронів мишей стимулює фосфорилування SAM68 по залишку серину, що призводить до активації сплайсингу пре-мРНК нейрексину 1 (*NRXN1*) та видалення екзона 20, який є важливим для регуляції білок-білкових взаємодій цього білка, який модулює функціонування пресинаптичних ділянок нейронів (121). Крім того, SAM68 стимулює видалення екзона 7 у пре-мРНК гена *SMN2* *in vitro* та *in vivo*, що призводить до експресії нефункціонального білка *SMN2*, який стимулює виживання нейронів (122, 123).

Виявлено, що SAM68 також залучений у регуляцію транскрипції. Зокрема, взаємодія SAM68 із РНК-зв'язуючим білком hnRNPК призводить до інгібування транскрипційної активності hnRNPК на промоторній ділянці прото-онкогена *c-Myc* (124). SAM68 також прямо взаємодіє із андрогеновим рецептором (AR), зв'язується із AR-специфічними промотерними ділянками

гена калікреїну-3 (*KLK3*) та регулює AP-залежну експресію генів у клітинах аденокарциноми простати LNCaP (125). Також було показано, що SAM68 може регулювати дозрівання пре-мікроРНК. Зокрема, SAM68 формує комплекс із білками DICER та DROSHA у чоловічих гаметах, тоді як нокдаун SAM68 у цих клітинах призводить до змін експресії дванадцяти мікро-РНК (126). У вторинних сперматоцитах мишей SAM68 може переміщуватись із ядра в цитоплазму, де він взаємодіє із трансляційним комплексом eIF4F та регулює трансляцію асоційованих із полісомами мРНК генів, задіяних у сперматогенезі – *Tenr* (testis nuclear RNA-binding protein), *PPI* (protein phosphatase type 1), *Grtp1* (GH-regulated TBC protein 1) та *Spag16* (Sperm Associated Antigen 16) (127, 128). SAM68 забезпечує асоціацію мРНК β-актину із синаптичними полісомами у дендритах, що регулює кількість синапсів нейронів гіпокампу (129). Ці дані вказують на те, що SAM68 також залучений у регуляцію трансляції мРНК.

Враховуючи те, що SAM68 взаємодіє із сигнальними адаптерними білками та ензимами, було запропоновано, що він виступає посередником між цитоплазматичними сигнальними шляхами та процесингом мРНК. Було виявлено, що SAM68 може локалізуватись у цитоплазмі та біля плазматичної мембрани і брати безпосередню участь у модуляції деяких сигнальних шляхів. Наприклад, SAM68 сприяє взаємодії між PLCγ1 та кіназою FYN, що призводить до фосфорилування та активації фосфоліпази. Формування комплексу SAM68/PLCγ1/FYN стимулюється короткою ізоформою рецептора c-KIT, надекспресія якої спостерігається в багатьох типах раку (130). Крім того, SAM68 залучений в регуляцію сигнальних шляхів, які активуються інсуліновим рецептором (131, 132), лептиновим рецептором (133, 134), рецепторами фактора некрозу пухлин альфа (TNFR1) (135) та епідермального фактору росту (EGF) (136), а також Т-клітинним рецептором (TCR) (137) і Toll-подібним рецептором (TLR) (138). Наприклад, у відповідь на стимуляцію інсулінового та лептинового рецептора SAM68 релокалізується із ядра в цитоплазму та підлягає фосфорилуванню по

залишках тирозину. Більш того, SAM68 взаємодіє із сигнальними білками GRB2, GAP та регуляторною субодиницею кінази PI3K і співлокалізується із зазначеними рецепторами біля плазматичної мембрани. Нокдаун SAM68 пригнічує сигнальні шляхи MAPK та PI3K при стимуляції інсулінового та лептинового рецепторів та інгібує ріст і проліферацію клітин (131, 139-141). Нокаут SAM68 у фібробластах мишей інгібує NF-κB-опосередковану експресію генів та блокує апоптоз при активації рецептора фактора некрозу пухлин TNF-α. Подальший аналіз показав, що SAM68 рекрутується до рецептора TNFR1 у відповідь на стимуляцію TNF-α, безпосередньо взаємодіє із TNFR1 і кіназою RIPK1 та стимулює її убіквітинування (135).

1.2.4. Роль білка SAM68 в розвитку патологій. Порушення експресії гена *KHDRBS1* та зміна функціональної активності SAM68 асоційовані із злоякісною трансформацією клітин, раковими захворюваннями та деякими патологіями нервової системи. Надекспресія SAM68 спостерігається у різних типах раку, включаючи рак молочної залози, простати, ротової порожнини, прямої кишки, шийки матки та карциному нирки (142). Зокрема, SAM68 стимулює прогресію пухлини та міграцію клітин раку молочної залози та модулює активність тирозинових кіназ, наприклад, BRK та SRC, які активують онкогенні сигнальні шляхи (143-145). Нокдаун SAM68 індукує експресію інгібіторів клітинного циклу p21 та p27 та пригнічує проліферацію ракових клітин (143, 144). Надекспресія SAM68, що спостерігається у пацієнтів із раком простати, стимулює проліферацію та виживання ракових клітин при використанні хіміотерапії, тоді як нокдаун SAM68 пригнічує ріст та проліферацію клітин раку простати LNCaP (146). Механізми SAM68-опосередкованої прогресії раку простати включають активацію сплайсингу та експресію прото-онкогенних ізоформ цикліну D1, BCLX, андрогенового рецептора, а також регуляцію мітогенних сигнальних шляхів (115, 125, 146, 147).

Активність SAM68 також пов'язана із нормальним функціонуванням нервової системи та розвитком нейродегенеративних захворювань. Зокрема, виявлено, що порушення SAM68-опосередкованого сплайсингу спостерігається при розвитку синдрому тремору та атаксії, асоційованих із ламкою X хромосоною (Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome, FXTAS) (148). Це нейродегенеративне захворювання характеризується накопиченням в нервових клітинах мРНК гена *FMRI*. За рахунок повторів CGG (50-200 CGG повторів) ця мРНК ініціює формування агрегатів РНК-зв'язуючих білків у нейронах. Виявлено, що SAM68 співлокалізується із CGG-збагаченими агрегатами у нейронах мозку пацієнтів із синдромом FXTAS та рекрутує РНК-зв'язуючі білки MBNL1 та hnRNP G у ділянки CGG-агрегатів. Агрегація SAM68 призводить до порушення його активності та пригнічення SAM68-опосередкованого сплайсингу пре-мРНК генів *SMN2* та *ATP11B* у нейрональних лініях клітин та нейронах мозку пацієнтів із синдромом FXTAS, тоді як фосфорилування SAM68 по залишках тирозину запобігає його накопиченню у CGG-збагачених агрегатах (148).

Інші дослідження вказують на те, що SAM68 регулює сплайсинг пре-мРНК гена *SMN2* та, як наслідок, бере участь в розвитку аутосомного рецесивного генетичного захворювання – спінальної м'язової атрофії (СМА). Це нейродегенеративне захворювання спричинене делецією у гені *SMN1*, функціональний продукт якого є необхідним для виживання мотонейронів. Наявність у геномі людини додаткової копії гена *SMN* (*SMN2*) може частково компенсувати відсутність продукту гена *SMN1*. Але заміна цитозину на тимін у позиції +6 екзона 7 *SMN2* призводить до його видалення із дозрілого транскрипту, що сприяє деградації мРНК *SMN2*. Виявлено, що мутація C→T створює сайт зв'язування із білком SAM68. Як наслідок, SAM68 взаємодіє із репресором сплайсингу hnRNP A1, безпосередньо зв'язується із екзоном 7 пре-мРНК *SMN2* та стимулює видалення цього екзона із дозрілого транскрипту (122). Подальші дослідження *in vivo* виявили, що SAM68 та hnRNP A1 взаємодіють із екзоном 7 пре-мРНК гена *SMN2* у нейронах мозку

мишей із СМА. Нокаут SAM68 призводить до збереження екзона 7 у дозрілій мРНК *SMN2* у мозку модельних тварин. Як наслідок, миші із СМА, в яких здійснено нокаут SAM68, характеризуються довшою тривалістю життя, більшою вагою, втратою меншої кількості моторних нейронів і нижчим рівнем м'язової атрофії (123).

Дослідження *in vivo* виявили, що хоча миші із нокаутом SAM68 характеризуються нормальною тривалістю життя та розвитком (149), відсутність SAM68 призводить до порушення репродуктивної функції (150), затримки розвитку раку молочної залози (144), порушення базальної координації м'язів (151), та інгібування адипогенезу (118).

SAM68 також модулює процесинг та транспорт мРНК ретровірусів. Зокрема, SAM68 взаємодіє із білком Rev вірусу імунодефіциту людини, активує RRE-опосередковану експресію вірусних генів, стимулює CRM1-залежний транспорт вірусної РНК в цитоплазму та індукує реплікацію ВІЛ-1 (152). Нокаун SAM68 призводить до значного пригнічення утворення вірусних часток ВІЛ-1, що пов'язано із інгібуванням Rev-опосередкованого транспорту вірусної РНК у цитоплазму (153).

Таким чином, вивчення молекулярних механізмів функціонування РНК-зв'язуючого білка SAM68 дозволить виявити нові неохарактеризовані шляхи розвитку ракових захворювань та нейродегенеративних захворювань, пов'язаних із порушенням альтернативного сплайсингу та неконтрольованою агрегацією РНК-зв'язуючих білків.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали

В роботі використовували органічні та неорганічні хімічні реактиви виробництва компаній «Fluka» (США), «Merck» (США), «Promega» (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 ензими компанії «Thermo Fisher Scientific» (США): ендонуклеази рестрикції, T4 ДНК-лігаза, РНКаза А, High Fidelity PCR Enzyme Mix, інгібітор РНКази, Ni-NTA-агарозу («Quiagen», Німеччина), глутатіон-сефарозу 4В було придбано у «GE Healthcare» (Великобританія), 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 «Thermo Fisher Scientific» (США). Для синтезу кДНК та проведення ПЛР в реальному часі було використано набір GoTaq® qPCR компанії «Promega» (США). Середовище для культивування ліній клітин ссавців (DMEM), ембріональну сироватку теляти (FBS) та поліетиленімін (ПЕІ) було придбано в компанії «Sigma-Aldrich» (США). Реагент для трансфекції «Lipofectamine 2000» було придбано в компанії «Invitrogen» (США).

Поліклональні антитіла до домену EN2 ITSN1 та CCR ITNS2 було отримано раніше співробітниками відділу функціональної геноміки (29, 33). Поліклональні антитіла до GFP були отримані раніше у відділі сигнальних систем клітини ІМБГ НАНУ. Моноклональні антитіла анти-SAM68 (7-1, sc-1238) було придбано в компанії «Santa-Cruz Biotechnology» (США).

Моноклональні антитіла анти-GAPDH (71.1) та анти-GFP (7.1/13.1) отримали у компанії «Sigma-Aldrich» (США) та «Roche» (Швейцарія), відповідно. Кон'юговані з пероксидазою хрому вторинні антитіла, специфічні до імуноглобулінів миші та кроля, було придбано у компанії «Promega» (США). Вторинні антитіла, кон'юговані з флуоресцентними барвниками Alexa Fluor™ 594 та Alexa Fluor™ 488, було придбано в компанії «Invitrogen» (США).

2.2. Біологічний матеріал

У роботі використовували клітини *Escherichia coli* штамів BL21(DE3) «Novagen» (США), XL1-Blue^{tet} «Stratagen» (США) та TOP10 «Invitrogen» (США), а також лінії клітин ссавців 293 (клітини ембріональної нирки людини) і HeLa (клітини аденокарциноми шийки матки).

2.3. Плазмідні конструкції

Для створення плазмідних конструкцій, які кодують делеційні фрагменти ITSN1, злиті із GFP, відповідні фрагменти кДНК було ампліфіковано із плазмідної конструкції pсDNA4/HisMaxC-ITSN1s, використовуючи наступні пари праймерів: ITSN1_{EH} (а.з. 1-316) – 5'-GCG GAA TTC TAT GGC TCA GTT TCC AAC AC-3' та 5'-ATG GTC GAC TAC CAC TGC CAG ATC GAA C-3'; ITSN1_{EH-CCR} (а.з. 1-736) – 5'-GCG GAA TTC TAT GGC TCA GTT TCC AAC AC-3' та 5'-GCG GTC GAC GTG CAG AAA TGG TAA GTG-3'; ITSN1_{CCR-SH3-box} (а.з. 310-1220) – 5'-AGG AAT TCT CGA TCT GGC AGT GGT AT-3' та 5'-GCG GTC GAC TTG CTG GCT TGG GTC CAT GTC-3'; ITSN1_{SH3-box} (а.з. 730-1220) – 5'-GCG GAA TTC AGG TCC ACT TAC CAT TTC TGC-3' та 5'-GCG GTC GAC TTG CTG GCT TGG GTC CAT GTC-3'. Ампліфіковані кДНК було вбудовано у вектор pEGFPC1 («Clontech») за сайтами рестрикції EcoRI та SalI. Вкорочену форму ITSN1s, що не містить

домену EH1 (ITSN1_{ΔEH1}, а.з. 187-1220), було створено після видалення відповідного фрагменту із конструкції pEGFPC1-ITSN1s використовуючи фермент рестрикції BglII. Делеційний варіант ITSN1s, що не містить доменів EH1 та SH3A (ITSN1_{ΔEH1-ΔSH3A}), було створено в два етапи. На першому етапі з конструкції pEGFPC1-ITSN1_{EH-CCR} за допомогою ферменту рестрикції BglII було видалено фрагмент, що кодує домен EH1. На другому етапі кДНК, що кодує чотири домени SH3 (SH3B-SH3E, а.з. 811-1220) було ампліфіковано та вставлено у вищезгадану конструкцію за сайтами рестрикції SalI and BamHI. Плазмідну конструкцію, що кодує повнорозмірну коротку ізоформу ITSN1s у векторі pEGFPC1 було отримано раніше (23).

Фрагменти кДНК, що кодують делеційні мутанти білка SAM68, було ампліфіковано із плазмідної конструкції pCDNA3.1-GFP-SAM68 та вбудовано у вектор pEGFPC1 за сайтами рестрикції EcoRI та SalI. Було використано наступні пари праймерів: SAM68_{N-KH} (а.з. 1-282) – 5'- GCG AAT TCA ATG CAG CGC CGG GAC GAC-3' та 5'-GCG TCG ACA CGA GAG GGT TCA GGT ACT C-3'; SAM68_{KH} (а.з. 95-282) – 5'-GAG AAT TCA GTC AAG ATG GAG CCA GAG AAC-3' та 5'-GCG TCG ACA CGA GAG GGT TCA GGT ACT C-3'; SAM68_{KH-C} (а.з. 95-443) – 5'-GAG AAT TCA GTC AAG ATG GAG CCA GAG AAC-3' та 5'-GCG TCG ACA TAA CGT CCA TAT GGG TGC TCT C-3'; Для клонування кДНК, що відповідає SAM68_{ΔPO} (а.з. 51-443), відповідний фрагмент було вставлено у вектор pEGFPC1 за сайтами рестрикції BamHI/BglII та SalI.

Спосіб створення плазмідних конструкцій, що кодують кДНК SAM68 та короткої ізоформи ITSN1 людини, злитих із RFP та доменом білка Tau, що взаємодіє із мікротрубочками (MBD, microtubule-binding domain), було описано раніше (154). кДНК, що кодує повнорозмірний SAM68, було ампліфіковано з використанням праймерів 5'-GCG TTA ATT AAA TGC AGC GCC GGG ACG AC-3' та 5'-GCG GGC GCG CCA CAT AAC GTC CAT ATG GGT G-3', використовуючи в якості матриці плазмідну конструкцію pCDNA3.1-GFP-SAM68. Нуклеотидну послідовність, що кодує фрагмент

ITSN1 із п'ятьма SH3 доменами (ITSN1_{SH3-box}, а.з. 730-1220, NP_001001132.1), було ампліфіковано використовуючи праймери 5'-GCG TTA ATT AAA TGG GTC CAC TTA CCA TTT CTG-3' та 5'-CGC GGC GCG CCA TTT GCT GGC TTG GGT CCA TG -3' та плазмідну конструкцію pcDNA4/HisMaxC-ITSN1s. Продукти ампліфікації було вбудовано у вектор RFP-MBD-pCR8/GW/TOPO за сайтами рестрикції PacI та AseI. Послідовності, що кодують ITSN1_{SH3-box}-RFP-MBD та SAM68-RFP-MBD, було клоновано із плазмід на основі вектору pCR8/GW/TOPO у вектор Gateway® pEF-Dest51 («Invitrogen») використовуючи набір Gateway LR Clonase II Enzyme mix «Invitrogen» (США) згідно з протоколом виробника. Плазмідну конструкцію pEF-Dest51-TDP43-RFP-MBD було отримано та описано раніше (155).

Для створення плазмідних конструкцій, що кодують злиті із His-тагом білки SAM68, тандем п'яти SH3 доменів ITSN1 (ITSN1_{SH3-box} а.з. 730-1220) та домен SH3D ITSN1 (а.з. 1063-1150), відповідні кДНК було ампліфіковано за допомогою наступних пар праймерів: SAM68 – 5'-GCG AAT TCA ATG CAG CGC CGG GAC GAC-3' і 5'-GCG TCG ACA TAA CGT CCA TAT GGG TGC TCTC-3'; ITSN1_{SH3-box}–5'-GCG GAA TTC AGG TCC ACT TAC CAT TTC TGC-3' та 5'-GCG GTC GAC TTG TGG CTT GGG TCC ATG TC-3'; SH3D – 5'-GCG AAT TCC TCT GGA ACT GCT GGG AAA AC-3' та 5'-ATG TCG ACC TTA GGT GGC TCT GTT GGA G-3'. Зазначені ампліфіковані фрагменти кДНК було вбудовано у вектор pET22b за сайтами рестрикції EcoRI та SalI.

Плазмідні конструкції, що кодують короткі шпилькові РНК (shRNA), специфічні до мРНК ITSN1, було створено згідно із стандартним протоколом TRC (The RNAi Consortium) (156). Нуклеотидні послідовності, специфічні до мРНК ITSN1 було отримано із бази даних TRC. Для створення двох різних shRNA, було використано наступні сенсові та антисенсові олігонуклеотиди:

shRNA-1: 5'-CCG GGA TAC TCA ATG ACC AAT TAA ACT CGA GTT TAA TTG GTC ATT GAG TAT CTT TTTG-3'; 5'-AAT TCA AAA AGA TAC TCA ATG ACC AAT TAA ACT CGA GTT TAA TTG GTC ATT GAG TATC-3';

shRNA-2: 5'-CCG GGC ACT AGC TGA CAT GAA TAA TCT CGA GAT TAT TCA TGT CAG CTA GTG CTT TTT G-3'; 5'-AAT TCA AAA AGC ACT AGC TGA CAT GAA TAA TCT CGA GAT TAT TCA TGT CAG CTA GTG C-3'.

Відповідні пари олігонуклеотидів було інкубовано 5 хв при температурі 95°C та охолоджено до кімнатної температури. Продукти гібридизації було клоновано у вектор pLKO.1 за сайтами рестрикції AgeI та EcoRI.

Плазмідні конструкції, що кодують злиті з GST SH3-домени ITSN1, SRC, TKS4, TKS5, AMPH, BIN1, CTTN, GRB2, а також тандеми із п'яти SH3 доменів ITSN1 та ITSN2, були отримані у відділі раніше (29, 157, 158).

Плазмідні конструкції, що кодують SAM68-GFP, WBP11-GFP та LARP6-GFP, було люб'язно надано др. Д. Еліотом (159), др. М. Боленом (160) та др. Л. Шварцом (161) відповідно. Вектор pLKO.1 для клонування коротких шпилькових РНК та плазмідні конструкції psPAX2 і pMD2.G для продукції лентівірусних часток було надано др. А. Мокюером (162).

2.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за допомогою набору реагентів High Fidelity PCR Enzyme Mix («Thermo Scientific», США) на приладах 2720 та 9700 ABI GeneAMP Thermal Cycler «Applied Biosystem» (США). Реакцію проводили в 25 або 50 мкл суміші, яка містила 1,5 мМ MgCl₂, 20 пмоль кожного праймера, 0,2 мМ dNTPs, та 1.5 U полімерази. Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація – 95°C, 10 с (в першому циклі – 5 хв); температура реасоціації праймерів 55-68°C; синтез – 72°C, фінальна елонгація 7 хв. Специфічні умови проведення реакції залежали від довжини очікуваного ПЛР-фрагменту. Температуру реасоціації праймерів визначали за допомогою програми Oligo.

2.5. Реакції рестрикції та лігування

Реакції рестрикції проводили ендонуклеазами рестрикції («Thermo Scientific», США) згідно рекомендаціям фірми-виробника. Реакцію лігування здійснювали при 22°C протягом 2 год за допомогою ДНК-лігази фага T4 в концентрації 1 од. Вейса на 10 мкл реакційної суміші («Thermo Scientific», США).

2.6. Електрофорез нуклеїнових кислот

Електрофоретичне розділення ДНК проводили в 1-1,5% агарозному гелі при напрузі 5 В/см, використовуючи 20 мМ трис-ацетатний електрофорезний буфер (20 мМ Трис, 20 мМ CH_3COOH , 1 мМ ЕДТА, рН 8,3) та гліцериновий буферний розчин для нанесення проб. Візуалізацію ДНК в гелі проводили з використанням етидид броміду.

2.7. Виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю

Виділення ДНК з агарозного гелю проводили набором Silica Bead DNA Gel Extraction Kit. До фрагменту гелю, що містив відповідний фрагмент ДНК, додавали Binding Buffer у співвідношенні 1/3 (100 мг гелю / 300 мкл буферу) та інкубували при +55°C протягом 10 хв до повного розплавлення агарози. Далі додавали 3-4 мкл Silica Powder Suspension інтенсивно перемішували протягом 5-15 хв, та центрифугували 1 хв при 3 тис. об/хв. Отриманий осад тричі промивали 0,5 мл Washing Buffer. З метою елюції фрагментів ДНК осад розчиняли в потрібному об'ємі (10-20 мкл) деіонізованої води, інкубували 5 хв при +55°C та центрифугували при 10 тис. об/хв протягом 30 сек. Отриманий препарат ДНК до використання зберігали при -20°C.

2.8. Приготування компетентних клітин

Для отримання компетентних клітин *E. coli* штамів XL1-Blue^{tet}, BL21(DE3) та TOP10 використовували наступному методику. Отримували 5 мл нічної культури на середовищі LB (на 1 л: бакто-триптон – 10 г, бакто-дріжджовий екстракт – 5 г, NaCl – 10 г, рН 7,2-7,4). Інокулювали 0,5 мл нічної культури у 100 мл свіжого середовища LB в 500 мл колбі та інкубували при 195 об/хв і +37°C до OD₅₄₀ = 0,3 (5 × 10⁷ клітин/мл). Оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі Ultrospec 1000 фірми “Amersham Pharmacia Biotech” при довжині хвилі 540 нм. Культуру охолоджували протягом 5-7 хв на льоду та осаджували за допомогою центрифуги “Jouan” при 3000 об/хв, 7 хв при +4°C. Після видалення надосадової рідини осад клітин обережно ресуспендували в 0,5 мл охолодженого середовища А. Додавали 2 мл 2×TSS (LB, ПЕГ–20%, MgSO₄ – 50 мМ) та 1 мл 80% гліцерину. Отриману суспензію клітин розливали по 200 мкл в мікропробірки та зберігали при –70 °C. Після заморожування кількість компетентних клітин в аліквоті оцінювали за стандартною методикою. Отримані клітини використовували для трансформації препаратами плазмідної ДНК або лігазною сумішшю.

2.9. Трансформація клітин плазмідною ДНК

Компетентні клітини *E. coli* розморожували на льодяній бані протягом 5-10 хв та додавали розчин плазмідної ДНК або лігазної суміші, об’єм яких не перевищував 5% від загального об’єму аліквоти. Суміш обережно перемішували та інкубували на льодяній бані протягом 15-30 хв, після чого швидко переносили на водяну баню (+42°C) на 1,5 хв. Після цього аліквоту компетентних клітин інкубували на льоду 5-10 хв та додавали 1 мл середовища LB без селективного антибіотика. Після інкубування протягом 1 год при +37°C необхідний об’єм суспензії клітин відбирали та висівали на

стерильну чашку Петрі з твердим поживним середовищем (LB та 1,5 % агар) із селективним антибіотиком ампіциліном або канаміцином. Чашки інкубували при +37°C протягом 15-18 годин.

2.10. Виділення плазмідної ДНК

Плазмідну ДНК з малих об'ємів бактеріальної культури (1,5 - 3 мл поживного середовища) виділяли методом лужного лізису. Клітини, вирощені з 5 мл культури, осаджували центрифугуванням протягом 30 с при 10-12 тис об/хв. Осад клітин ресуспендували в 200 мкл буферу PI з додаванням РНКазіА (100 мг/мл). Потім додавали 200 мкл буферу PII з подальшим обережним перемішуванням. Після додавання 200 мкл буферу PIII суміш інкубували при -20°C протягом 20 хв та центрифугували 30 хв, при 12 тис об/хв при +4°C. Супернатант (~600 мкл) переносили в нову мікропробірку та додавали 420 мкл ізопропанолу. Вміст пробірки перемішували та інкубували при кімнатній температурі 30 хв. Після центрифугування протягом 25 хв при кімнатній температурі супернатант видаляли, а осад двічі промивали 70% етанолом та просушували 5 хв. Осаджену плазмідну ДНК розчиняли у необхідному об'ємі деіонізованої води. Буфер PI: 50 mM Трис-НСl, рН 8.0, 10 mM EDTA; буфер PII: 200 mM NaOH, 1% SDS; буфер PIII: CH₃CO₂K (3.0 M, рН5.5). Для отримання плазмід в препаративній кількості використовували набір реагентів «Plasmid Midi Kit» («Quiagen», Німеччина) згідно з протоколом виробника.

2.11. Експресія рекомбінантних білків в *E. coli*

Експресію His- та GST-злитих білків проводили у клітинах *E. coli* 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 до оптичної щільності

$OD_{600} = 0.6$. Для продукції рекомбінантного білка SH3D-His, міченого ізотопами ^{15}N - або $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$, клітини *E.coli* інкубували у мінімальному середовищі M9, що містило ^{13}C -мічену глюкозу (0,15 г/мл) та ^{15}N -мічений NH_4Cl (0,2 г/мл). Експресію цільових білків індукували додаванням ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозиду до фінальної концентрації 1 мМ протягом 3-4 год при 37°C або 15 год при $17\text{-}20^\circ\text{C}$.

2.12. Приготування бактеріальних лізатів

Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням протягом 7 хв при 5000 об/хв. Біомасу з His-злитими білками ресуспендували в буфері для лізису клітин в нативних умовах, що містив 20 мМ Трис- HCl , рН 8,0, 500 мМ або 1М NaCl , 1,5 мМ β -меркаптоетанол, 10 мМ імідазол, 1 мМ фенілметилсульфонілфторид («Sigma Aldrich») та інгібітор протеаз (Complete protease inhibitor EDTA-free, «Roche»). Буфер для ресуспендування His-злитого SAM68 також містив 8 М сечовину. Біомасу із GST-злитими білками ресуспендували в буфері, що містив 20 мМ Трис- HCl , рН 7,4, 150 мМ NaCl , 10% гліцерин, 1% Тритон X-100, 1 мМ PMSF («Sigma») та інгібітор протеаз (Complete protease inhibitor, «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 або безпосередньо використовували для очистки цільових білків.

2.13. Очистка рекомбінантних білків методом афінної хроматографії

Білки з His-тагом очищували за допомогою Ni-NTA анарози («Qiagen») в нативних умовах згідно з рекомендаціями виробника. Лізати інкубували із сорбентом за постійного перемішування при $+4^\circ\text{C}$ протягом 1 год. Використовуючи хроматографічні колонки Poly-Prep® «Bio-Rad» (США),

сорбент промивали буфером, що містив 20 мМ Трис-НСІ, рН 8,0, 500 мМ NaCl та 20 мМ імідазол. Зв'язані білки елюювали буфером: 20 мМ Трис-НСІ, рН 8,0, 300 мМ та 250 мМ імідазол.

Очистку GST-злитих білків проводили за допомогою глутатіон-сефарози 4В («GE Healthcare») згідно з рекомендаціями виробника. Лізати інкубували із сорбентом за постійного перемішування при +4°C протягом 1 год. Використовуючи хроматографічні колонки Poly-Prep® «Bio-Rad» (США), сорбент промивали буфером із 20 мМ Трис-НСІ, рН 7,4, 150 мМ NaCl, 10% гліцерином та 1% Трітон Х-100. Білки елюювали буфером, що містив 20 мМ Трис-НСІ, рН 7,4, 150 мМ NaCl та 10 мМ відновлений глутатіон («Sigma»).

Очищення білків від імідазолу та глутатіону проводили за допомогою діалізу проти 20 мМ Трис-НСІ, рН 7,4 та 150 мМ NaCl тричі протягом 12 год. Буфер для діалізу SAM68-His містив також 8М сечовину, тоді як SH3D-His для ЯМР-спектроскопії діалізували проти 12мМ калій-фосфатного буферу, 25 мМ KCl та 1мМ Трис(2-карбоетил)фосфіну. Концентрацію білків вимірювали при $\lambda=280$ нм. Чистоту білків перевіряли методом електрофорезу у ПААГ у денатуруючих умовах за методом Лемлі. Після додавання 10% гліцерину (за винятком $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -міченого SH3D-His) очищені препарати білків зберігали при -70°C .

2.14. Культивування клітин ссавців

Клітини ліній 293 та HeLa культивували при +37°C у зволоженій атмосфері, що містила 5% CO₂. Клітини вирощували в модифікованому Дюльбеко середовищі Ігла (DMEM) з 10% ембріональною сироваткою теляти (FBS) («Sigma»), 10 мкг/мл пеніциліну та 0,25 мкг/мл стрептоміцину. При досягненні клітинами 70-80% стану конфлюентності їх пересівали у розведенні 1/4. Пасування клітин проводили за допомогою 0.05% трипсину з 0,053 мМ ЕДТА протягом 5хв. Клітини ресуспендували у середовищі DMEM та переносили у нові чашки для культивування клітин.

2.15. Трансфекція клітин плазмідною ДНК

Для короткотривалої трансфекції клітини 293 відповідними плазмідними конструкціями було використано поліетиленімін (ПЕІ) «Sigma». Плазмідну ДНК та ПЕІ розчиняли в 150 мМ NaCl, інкубували 5 хв, змішували рівні об'єми та інкубували протягом 15 хв. Утворений комплекс додавали до клітин в середовищі DMEM. Після 24-48 год клітини були лізовані в буфері для імунопреципітації (20 мМ Трис-HCl pH 7,5, 1% NP40, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин, 1 мМ EDTA, інгібітор протеаз «Roche»). Трансфекцію клітин HeLa проводили за допомогою реагенту «Lipofectamine 2000» («Invitrogen», США) згідно з протоколом виробника. Плазмідну ДНК та реагент для трансфекції розчиняли в середовищі Opti-MEM («Life Technologies», США), інкубували 5 хв, змішували та після інкубації протягом 15 хв додавали до клітин HeLa в середовищі DMEM.

2.16. Преципітація білкових комплексів за допомогою GST-злитих білків

Для іммобілізації GST-злитих білків на глутатіон-сефарозі сорбент двічі промивали буфером для преципітації, додавали лізат клітин, що експресували цільовий 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 іммобілізованих на глутатіон-сефарозі білків додавали лізат культури еукаріотичних клітин та інкубували при +4°C протягом двох годин при постійному перемішуванні. На наступному етапі сорбент промивали тричі, осаджували центрифугуванням при 3200 об/хв протягом 1 хв, супернатант видаляли. До зразку додавали відповідний об'єм двократного буферу для нанесення (500 мМ Трис-HCl, 10% гліцерин, 1,2% ДСН, 1,2% β-меркаптоетанол, 0,1% бромфеноловий синій, pH 6,8), та кип'ятили протягом

10 хв. Білки розділяли за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Гель фарбували за допомогою барвника Кумассі (0,15% Coomassie Brilliant Blue R250, 10% льодова оцтова кислота, 10% ізопропанол) або аналізували за допомогою Вестерн-блот аналізу.

2.17. Коімунопреципітація білкових комплексів із лізатів клітин

A/G-агарозу («Santa Cruz Biotechnology») тричі промивали буфером для преципітації, ресуспендували, перемішували та центрифугували при 3200 об/хв протягом 30 с. До сорбенту додавали лізат клітин 293 і відповідні антитіла (5 мкг) та інкубували 3 год або протягом ночі при постійному перемішуванні при +4°C. Сорбент із іммобілізованими антитілами та білками промивали тричі буфером для імунопреципітації та осаджували центрифугуванням 3200 об/хв протягом 1 хв. До зразку додавали відповідний об'єм двократного буферу для нанесення та кип'ятили протягом 10 хв. Білки розділяли за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі.

2.18. Електрофорез білків в поліакриламідному гелі

Електрофоретичне розділення білків проводили у камерах для вертикального електрофорезу Mini-PROTEAN Tetra «Bio-Rad» (США) за стандартною методикою (163). Для білкового електрофорезу використовували 4% концентруючий та розділяючі гелі з концентрацією акриламідну 7,5%, 10% або 12,5%. Для приготування розділяючого гелю змішували 30% розчин акриламідну (при співвідношенні акриламідну і біс-акриламідну – 29:1), H₂O, 1,5 мМ Трис-НСl, рН 8,8, 10% розчин ДСН та 0,1% персульфат амонію. Полімеризація акриламідну ініціювалася додаванням 0,1% TEMED. Електрофорез проводили в Трис-гліциновому буфері (195 мМ гліцин, 25 мМ Трис-НСl, рН 8,3, 0,1% ДСН) при фіксованій напрузі 150 В.

2.19. Вестерн-блот аналіз

Після проведення електрофоретичного розділення білки переносили на нітроцелюлозну мембрану (фірми «Millipore», Ірландія) в буфері для переносу (25 мМ Трис-НСІ, 192 мМ гліцин, 10 % метанол, рН 8,3) при 250 мА протягом двох години у апараті для електропереносу «Amersham Biosciences» (Швеція/Великобританія). Після переносу мембрану інкубували 1 год в 5 % розчині знежиреного молока в TBST (20 мМ Трис-НСІ рН 8,0, 150 мМ NaCl, 0,1 % Tween). Далі мембрану інкубували із відповідними первинними антитілами протягом 1 год та проводили відмивку від первинних антитіл тричі по 5 хв з використанням TBST. Потім мембрану інкубували 40 хв в розчині з вторинними антитілами відповідної специфічності. Мембрану відмивали тричі по 5 хв з використанням TBST. Після цього проводили ECL-детекцію з використанням розчину, що містив 100 мМ Трис-НСІ рН 8,5, 250 мМ люмінол, 90 мМ кумарову кислоту та 0.023% H₂O₂. Мембрану інкубували в даному розчині протягом 1 хв при перемішуванні та аналізували на приладі Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ «Bio-Rad» (США). Для фарбування білків, що знаходяться на мембрані, використовували барвник Понсо С (Ponseau S). Денситометричні вимірювання інтенсивність сигналів обраховували, використовуючи програмне забезпечення ImageLab («Bio-Rad»).

2.20. Імунофлуоресцентний аналіз

Клітини ліній HeLa сіяли на 12 мм покривні скельця за 24 год до фіксування або трансфекції. Далі клітини фіксували у холодному метанолі протягом 15 хв при -20°C та 4% розчині формальдегіду в PBS при кімнатній температурі протягом 30 хв. Залишки формальдегіду відмивались тричі по 5 хв в PBS-T (PBS із 0,2% Трітон X-100). Для довготривалого зберігання зразків препарат клітин на скельцях покривали середовищем Mowiol

(«Sigma») або фарбували з відповідними антитілами. Для цього клітини блокували 2% розчином БСА в PBS-T протягом 30 хв. Потім клітини інкубували із специфічними первинними антитілами у відповідному розведенні протягом 1 год, промивали тричі по 5 хв буфером PBS-T та додавали відповідні вторинні антитіла, мічені флуоресцентними мітками. Після 1 год інкубації клітини знову промивали буфером PBS-T. Фарбування ядер проводили за допомогою 1 мкг/мл DAPI протягом 1,5 хв. Далі препарат покривали середовищем Mowiol.

2.21. Флуоресцентна гібридизація мРНК *in situ*

Клітини лінії HeLa, що росли на покривних скельцях, фіксували за допомогою метанолу та параформальдегіду, як описано вище, та інкубували у холодному 70% етанолі протягом 10 хв при -20°C та 1 М Трис-НСІ рН 8,0 протягом 5 хв. Далі зразки інкубували із Су3-міченими полі(Т) зондами («Sigma», США) в концентрації 1 мкг/мкл в буфері для гібридизації, що містив $2\times$ SSC ($1\times$ SSC: 150 мМ NaCl, 15 мМ цитрат натрію рН 7,0), 0,005% БСА, 1 мг/мл дріжджову РНК, 10% декстрин сульфат, та 25% формамід. Інкубацію проводили у вологій камері протягом 1 год при $+37^{\circ}\text{C}$. Далі зразки промивали двічі $4\times$ SSC та один раз $2\times$ SSC і покривали середовищем Mowiol.

2.22. Метод зближеного лігування

Флуоресцентний аналіз наближеного лігування (proximity ligation assay, PLA) було проведено з використанням набору «Duolink II PLA» («Olink Bioscience», Швеція) згідно з рекомендаціями виробника. Клітини лінії HeLa, що росли на 12 мм покривних скельцях, фіксували 4% параформальдегідом протягом 20 хв, пермеабілізували за допомогою 0.1% Triton-X100 у PBS протягом 5 хв та блокували відповідним розчином із набору протягом 30 хв.

Зразки інкубували з первинними антитілами у відповідному буфері виробника протягом ночі при +4°C. Далі покривні скельця інкубували із PLA зондами (розведення 1:5) протягом 1 год при +37°C. Після відмивання зразків з використанням PBS зразки інкубували із сумішшю для лігування (розведення лігази 1:40) протягом 30 хв при +37°C. Далі зразки відмивали за допомогою PBS та інкубували із сумішшю для ампліфікації (розведення полімерази 1:80) протягом 100 хв при +37°C. Після останнього етапу відмивки проводили фарбування хроматину за допомогою 1 мкг/мл DAPI та наносили середовище Mowiol.

2.23. Флуоресцентна мікроскопія

Препарати аналізували на інвертованому мікроскопі Axiovert 220 («Carl Zeiss 5 MicroImaging, Inc», Німеччина), використовуючи масляний об'єктив 63×/1.40. Аналіз інтенсивності флуоресценції та співлокалізації сигналів на мікротрубочках проводили за допомогою програми «ImageJ 1.52a» (США).

2.24. Аналіз співлокалізації флуоресцентних сигналів на мікротрубочках

Для кількісної оцінки співлокалізації рекомбінантних білків, мічених RFP-MBD та GFP, проводили кореляційний аналіз. Використовуючи програмне забезпечення «ImageJ 1.52a», на відповідному зображенні було побудовано лінію довжиною 100-150 пікселів, яка перетинає мікротрубочки. Профілі інтенсивності флуоресцентних сигналів вздовж лінії для двох каналів було перетворено в числові значення, які було використано для оцінки коефіцієнту кореляції. Функція Microsoft Excel CORREL було використано для визначення коефіцієнту кореляції Пірсона між значеннями флуоресцентних сигналів червоного та зеленого каналів. Щонайменше

двадцять ліній із трьох незалежних повторів аналізували в кожному експерименті.

2.25. Аналіз ядерно-цитоплазматичного співвідношення флуоресцентних сигналів

Ядерно-цитоплазматичне співвідношення флуоресцентних сигналів GFP-мічених білків у клітинах лінії HeLa було визначено з використанням програмного забезпечення «ImageJ 1.52a». Після коригування фонові флуоресценції GFP та DAPI було виділено межі клітини та ядра. Далі було визначено середні та інтегральні значення флуоресценції GFP у ядрі та в усій клітині. Рівень флуоресценції GFP у цитоплазмі було оцінено як різницю між інтегральними значеннями флуоресценції усєї клітини та ядра, що було поділено на площу цитоплазми (різниця між площами усєї клітини та ядра). Для кожного експерименту було проаналізовано близько 150 клітин з трьох незалежних повторів.

2.26. Аналіз інтенсивності флуоресценції ядерних тілець

Для аналізу ядерних тілець отримували мікрофотографії із кількох фокусних площин зразків клітин з інтервалом 500 нм. Для накладання отриманих мікрофотографій та кількісної оцінки інтенсивності флуоресценції ядерних тілець використовували програмне забезпечення «ImageJ 1.52a». На першому етапі визначали межі ядра, використовуючи сигнал DAPI. Далі визначали середнє та максимальне (сигнал ядерного тільця) значення інтенсивності флуоресцентного сигналу в ядрі. На наступному етапі проводили нормалізацію максимальної флуоресценції до її середнього значення у межах ядра – співвідношення максимальної інтенсивності флуоресценції білка (рівень флуоресценції ядерного тільця) та середньої інтенсивності флуоресценції цього ж білка у ядрі клітини. Залежно

від експерименту та зразка в трьох експериментах було проаналізовано загалом 120-200 індивідуальних клітин із 185-250 ядерними тільцями.

2.27. Аналіз конкурентного зв'язування білків *in vitro*

Ni-NTA агарозу («Qiagen») двічі промивали буфером А (20 мМ Трис-НСІ, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 10 мМ імідазол, 8М сечовина, 1% Трітон-Х100), додавали очищений рекомбінантний білок SAM68-His (50 пмоль) та інкубували при постійному перемішуванні одну годину при +4°C. Далі сорбент відмивали двічі буфером А та двічі буфером Б (20 мМ Трис-НСІ рН 7,5, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин, 1% Трітон-Х100). До сорбенту додавали очищені рекомбінантні білки GRB2-GST та ITSN1_{SH3-box}-GST у наступних кількостях: (1) GRB2-GST – 50 пмоль, ITSN1_{SH3-box}-GST – 75 пмоль, 180 пмоль, 360 пмоль або 720 пмоль; (2) ITSN1_{SH3-box}-GST – 75 пмоль, GRB2-GST – 50 пмоль, 100 пмоль, 200 пмоль або 400 пмоль.

Сорбент та суміші білків інкубували в буфері Б при +4°C протягом однієї години та відмивали тричі буфером Б. До зразків додавали відповідний об'єм двократного буферу для нанесення та кип'ятили протягом 10 хв. Преципітовані білки розділяли за допомогою білкового електрофорезу в поліакриламідному гелі та аналізували за допомогою Вестерн-блот аналізу.

2.28. Транскрипція мРНК *in vitro*

мРНК, яку використовували для аналізу комплексів білок-мРНК, було синтезовано *in vitro*. Для цього лінійну плазмідну конструкцію рSP72-2Luc, яка містила розділені лінкером дві повнорозмірні кДНК, що кодували люциферази *Renilla reiformis* та *Photinus pyralis*, було використано як матрицю в процесі синтезу мРНК розміром ~2500 п.н. Транскрипцію *in vitro* проводили за допомогою набору HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit («NEB», США) згідно з рекомендацій виробника.

2.29. Аналіз седиментації рекомбінантних білків

Аналіз седиментації рекомбінантного білка SAM68-His було проведено з використанням протоколу, описаного раніше (164). Очищений рекомбінантний білок SAM68-His (20 пмоль) інкубували у буфері для зв'язування (20 мМ Трис-НСІ рН 7,4, 50 мМ NaCl) в умовах наявності або відсутності мРНК гена люциферази (0,4 пмоль) протягом 5 хв при кімнатній температурі. Далі до суміші додавали очищений рекомбінантний GST-ITSN1_{SH3-box} (5 пмоль, 10 пмоль, 20 пмоль, 40 пмоль) та інкубували в загальному об'ємі 15 мкл протягом 10 хв при кімнатній температурі. Зразки центрифугували при 1000 об/хв. протягом 1 хв при +4°C. Супернатант переносили в нову мікропробірку, тоді як до преципітату додавали 15 мкл буферу для зв'язування. Білки преципітату та супернатанту аналізували за допомогою гель-електрофорезу у 10% ПААГ та фарбування Кумассі. Денситометричні вимірювання інтенсивність сигналів обраховували за допомогою програмного забезпечення «ImageJ 1.52a».

2.30. Аналіз електрофоретичної рухливості мРНК

Для аналізу електрофоретичної рухливості мРНК очищені рекомбінантні білки SAM68-His (2 пмоль, 4 пмоль, 8 пмоль, 16 пмоль, 32 пмоль), ITSN1_{SH3-box}-His (5 пмоль, 10 пмоль, 20 пмоль, 40 пмоль, 80 пмоль, 160 пмоль) та GST-ITSN1_{SH3D} (10 пмоль, 20 пмоль, 40 пмоль, 60 пмоль, 120 пмоль) інкубували із 0,4 пмоль синтезованої *in vitro* мРНК люциферази у буфері, що містив 20 мМ Трис-НСІ рН 7,4 та 50 мМ KCl, при кімнатній температурі протягом 5 хв. Комплекси білок-мРНК розділяли у 0,7 % агарозному гелі у 0,5× буфері TBE (45 мМ Трис-Н₃ВО₃, 1 мМ ЕДТА) при кімнатній температурі протягом 1 год при напрузі 25 В та візуалізували за допомогою етидій броміду.

2.31. Атомно-силова мікроскопія

Для аналізу комплексів мРНК-білок за допомогою атомно-силової мікроскопії 20-25 нМ очищеного білка інкубували із 0,3 нМ мРНК гена люциферази у буфері (15 мМ КСl, 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 3 мМ путресцин Pu^{2+}) при 37 °С протягом 5 хв. На наступному етапі 10 мкл реакційної суміші наносили на поверхню тонкого зрізу слюди та інкубували 20 с. Фіксацію зразка проводили за допомогою 0,02% ураніл ацетату. Аналіз зразків проводили на атомно-силовому мікроскопі Nanoscope V Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara, CA) з використанням раніше описаних параметрів (164).

2.32. ЯМР-спектроскопія

ЯМР-спектроскопію проводили на спектрометрі Bruker AVIII HD 600 MHz при температурі 298 К. Для отримання 2D спектрів білка за наявності одноланцюгової ДНК, 300 мкМ ^{15}N -міченого білка інкубували із одноланцюговими олігодезоксинуклеотидами CA_6 або T_{12} у молярному співвідношенні 1:1,2 та аналізували за допомогою протоколу SOFAST-NMQC. Принцип протоколу та обробку даних описано у (165) та (166).

2.33. Нокдаун ITSН1 в клітинах лінії HeLa

Нокдаун ITSН1 в клітинах лінії HeLa проводили згідно з стандартним протоколом TRC (The RNAi Consortium) (156), використовуючи лентівірусні частки, що містили плазмідні конструкції pLKO.1-shRNA1 та pLKO.1-shRNA2, які кодували короткі шпилькові РНК, специфічні до мРНК ITSН1. Клітини лінії 293, що росли на культуральних 6 см чашках в об'ємі 5 мл середовища, було трансфіковано зазначеними плазмідними конструкціями або вектором pLKO.1 (1 мкг) та додатковими плазмідними ДНК – psPAX2 (1 мкг) і pMD2.G (0,5 мкг), що містили структурні гени лентівірусу, необхідні

для утворення функціональних вірусних часток. Трансфіковані клітини інкубували 15 год при 37°C в атмосфері 5% CO₂. Після заміни середовища клітини 293 інкубували в тих же умовах протягом 48 год. Рідке поживне середовище, в якому культивували клітини і яке містило сформовані лентівірусні частки, відбирали, фільтрували від залишків клітин за допомогою фільтру із діаметром пор 0,45 мкм та зберігали для подальшого використання при -70°C. На наступному етапі до клітин лінії HeLa додавали 300 мкл середовища, що містило лентівірусні частки та інкубували протягом 24 год. Клітини інкубували у середовищі, що містило антибіотик пуроміцин (1 мкг/мкл) для селекції клітин, які були інфіковані вірусом. Інфіковані клітини використовували для виділення тотальної РНК або приготування лізатів для Вестерн-блот аналізу після чотирьох днів інкубування.

2.34. Виділення РНК

РНК з клітин лінії HeLa виділяли гуанідинізоціанатним методом (167) із використанням реагенту «TRI Reagent®» («Molecular Research Center, Inc», США) згідно з рекомендаціями виробника. Концентрацію, чистоту та цілісність виділеної РНК було оцінено спектрофотометрично при $\lambda=260$ нм і $\lambda=280$ нм та електрофоретично фарбуванням етидій бромідом.

2.35. Синтез кДНК

Синтез кДНК проводили з використанням набору зворотної транскриптази «ImProm-II™ Reverse Transcription System» («Promega», США) згідно з рекомендаціями виробника. В реакційну суміш об'ємом 6 мкл додавали 1 мкг тотальної РНК та 1 мкл праймерів (Oligo dT15, 100 пМ) та проводили денатурацію РНК при 65°C протягом 5 хв. Далі в суміш додавали 4 мкл 5X буфера, 1 мкл 1 мМ dNTP, 3 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,5 мкл інгібітора

РНКази (40 од./мкл) та 1 мкл зворотної транскриптази (50 од/мкл) і доводили до фінального об'єму 20 мкл. Синтез проводився при 42°C протягом 50 хв.

2.36. Полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

Кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі проводили з використанням набору «GoTaq® qPCR Master Mix» («Promega», США) згідно з рекомендацій виробника. В реакційну суміш об'ємом 10 мкл додавали 1 мкл синтезованої кДНК, по 0,5 мкл специфічних праймерів та 5 мкл суміші «GoTaq® qPCR Master Mix». Перелік праймерів, що використовувались у реакціях вказано у таблиці 2.1. Кожну реакцію, включаючи контроль без кДНК, було проаналізовано в трьох повторах.

Таблиця 2.1.

Перелік праймерів, що було використано в реакціях кількісної ПЛР

Назва гена та ізоформи	Нуклеотидні послідовності пар праймерів
<i>ITSN1s</i>	5'-GGACGAGCAAAATCACTCCAAC-3' 5'-ATTGACTTCTCCTTTCCACCAGTC-3'
<i>BCLX-S</i>	5'-CAGCATATCAGAGCTTTGAACAGGATAC-3' 5'-CATTTCCGACTGAAGAGTGAGCC-3'
<i>BCLX-L</i>	5'-GCATATCAGAGCTTTGAACAGGTAGTG-3' 5'-GTTCCACAAAAGTATCCCAGCCG-3'
<i>CD44-v5</i>	5'-GATGTAGACAGAAATGGCACCCTG-3' 5'-TGGTGCTTGTAGAATGTGGGGTTC-3'
<i>CD44</i>	5'-AGACACATTCCACCCAGTGG-3' 5'-CAGAGGTTGTGTTTGCTCCACC-3'
<i>CCND1-a</i>	5'-GTTCAATTTCCAATCCGCCCTCC-3' 5'-CTTGGGGTCCATGTTCTGCTG-3'
<i>CCND1-b</i>	5'-GTTCAATTTCCAATCCGCCCTCC-3' 5'-CCTGGGACATCACCTCACTTAC-3'
<i>SRSF1-FL</i>	5'-ATGGAGGCAATGGTTTGGATTGG-3' 5'-CACACGAATGCGGTTTGGTTG-3'
<i>SRSF1-NMD+</i>	5'-GCCTCCTCTTTTTTGGTTTTGCTG-3' 5'-CACACGAATGCGGTTTGGTTG-3'

<i>SMN1/2-L</i>	5'-TGCCTCCATTTCTTCTGGACC-3' 5'-GAATGTGAGCACCTTCCTTCTTTTG-3'
<i>SMN1/2-S</i>	5'-TGCCTCCATTTCTTCTGGACC-3' 5'-CTGCTCTATGCCAGCATTTCCATAT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

Кількісну ПЛР проводили на приладі «CFX384 Touch™ Real-Time PCR» («Bio-Rad», США). Ампліфікацію та детекцію сигналу здійснювали за таких умов: денатурація – 95°C, 15 с (в першому циклі – 5 хв) і реасоціація праймерів та синтез продукту – 60°C, 1 хв (40 циклів). Аналіз кривої плавлення проводили за допомогою нагрівання зразків від 65°C до 95°C з кроком 0.5°C.

2.37. Аналіз рівня експресії та сплайсингу

Оцінку відносної експресії зазначених генів проводили з використанням програмного забезпечення «Bio-Rad CFX Manager 2.1» (США) та MS Excel («Microsoft») за допомогою методу $\Delta\Delta C_T$ (168), використовуючи рівень експресії *GAPDH* для нормалізації. Для аналізу змін в подіях сплайсингу було знайдено співвідношення рівнів експресії обох ізоформ для кожного із зазначених генів у контрольних (pLKO) та досліджуваних (shRNA) зразках:

$$r = \frac{\text{Ізоформа}_1}{\text{Ізоформа}_2} \quad (1)$$

де r – співвідношення рівнів експресії ізоформ; ізоформа₁ – відносний рівень експресії ізоформи, утворення якої стимулюється SAM68; ізоформа₂ – відносний рівень експресії ізоформи, утворення якої пригнічується SAM68.

Співвідношення рівнів експресії ізоформ у досліджуваних клітинах було нормалізовано до відповідних показників контрольних клітин:

$$R = \frac{r_{shRNA}}{r_{pLKO}} \quad (2)$$

де R – нормалізоване співвідношення рівнів експресії ізоформ, r_{shRNA} - співвідношення рівнів експресії ізоформ у досліджуваних зразках, r_{pLKO} - співвідношення рівнів експресії ізоформ у контрольних зразках

2.38. Біоінформатичний аналіз

Пошук амінокислотних послідовностей білків інтересу в протеомах представників еукаріот проводився на основі баз даних анотованих протеомів NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Виявлення гомологічних білків було здійснено з використанням пошукового сервісу NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Передбачення доменної структури знайдених білків проводили з використанням сервісів PROSITE (<https://prosite.expasy.org>). Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей проводили за допомогою алгоритму Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Для аналізу 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/>).

2.39. Статистична обробка даних

Всі дані наведено як середнє арифметичне значення \pm стандартне відхилення. Статистичну обробку даних проводили із використанням програмного забезпечення «GraphPad Prism 5» («GraphPad Software», США) або MS Excel («Microsoft»). 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 $p < 0.05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Аналіз клітинної локалізації ITSN1 та ідентифікація взаємодій ITSN1 із РНК-зв'язуючими білками

3.1.1. Детекція ITSN1 в ядрах клітин HeLa. Раніше співробітниками відділу функціональної геноміки було показано, що білок ITSN1 може локалізуватися в ядрах клітин лінії 293, що узгоджується із нещодавно опублікованими результатами (51). Оскільки функціональне значення ITSN1 в ядрі залишалось невідомим, подальші дослідження були спрямовані на характеристику властивостей ITSN1 у ядрі клітини.

Оскільки порушення експресії ITSN1 пов'язане із трансформацією клітин та розвитком ракових захворювань, ми проаналізували можливе накопичення ITSN1 в ядрах клітин лінії раку шийки матки HeLa. Використовуючи імуофлуоресцентний аналіз було проаналізовано клітинну локалізацію ендогенного ITSN1 та надекспресованої GFP-міченої короткої ізоформи ITSN1 (GFP-ITSN1s). Оскільки довга ізоформа ITSN1 (ITSN1l) експресується лише в нейронах, подальший аналіз властивостей ITSN1 в клітинах лінії HeLa проводили з використанням його короткої ізоформи.

Крім цитоплазми, ендогенний ITSN1 локалізувався також в перинуклеарній ділянці та в ядрі клітин лінії HeLa, де проявлявся у вигляді дифузної та гомогенної флуоресценції (рис. 3.1.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. 3.1.б).

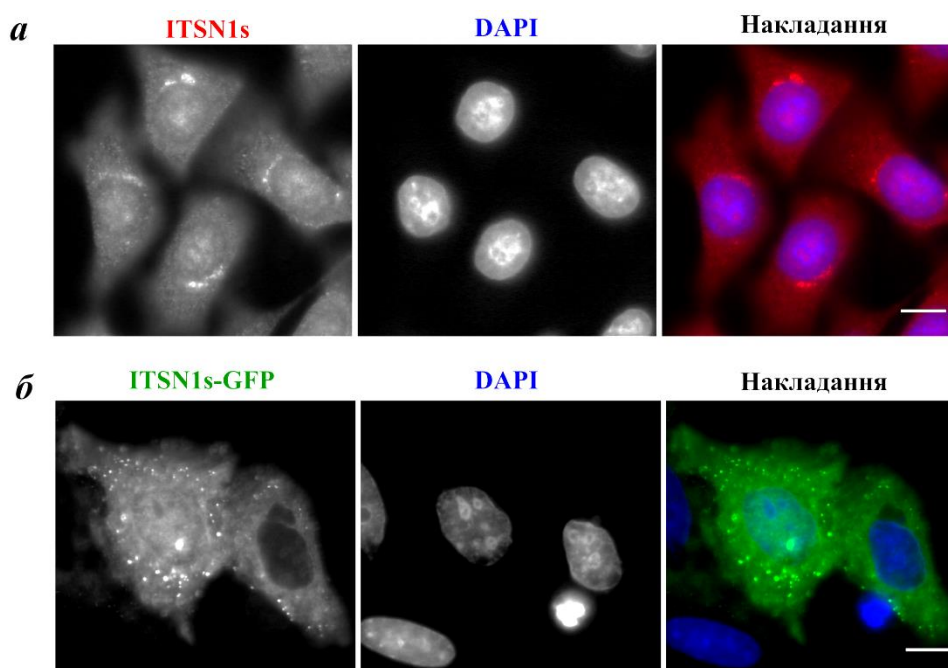


Рис. 3.1. Аналіз внутрішньоклітинної локалізації ITSN1s в клітинах лінії HeLa. *a* – імуофлуоресцентний аналіз локалізації ендогенного ITSN1s. Візуалізацію ITSN1s проводили за допомогою специфічних антитіл та відповідних вторинних антитіл, мічених Alexa Fluor 594. *б* – флуоресцентний аналіз локалізації рекомбінантного білка ITSN1s-GFP. Візуалізацію ядер проводили за допомогою барвника DAPI. Масштаб – 15 мкм

Враховуючи мультидоменну структуру ITSN1 та роль його окремих доменів у взаємодії із різноманітними партнерами, на наступному етапі було проаналізовано клітинну локалізацію делеційних фрагментів ITSN1s. Було створено генно-інженерні конструкції, що кодують злиті із GFP фрагменти ITSN1s, які включали два домени ЕН ($ITSN1_{EH}$), домени ЕН та суперспіралізовану ділянку ($ITSN1_{EH-CCR}$), ділянку CCR із доменами SH3 ($ITSN1_{CCR-SH3-box}$) та блок доменів SH3 ($ITSN1_{SH3-box}$). Експресію створених плазмідних конструкцій перевіряли за допомогою трансфекції клітин лінії 293 та імуоблоту з використанням антитіл, специфічних до білка GFP (рис. 3.2.).

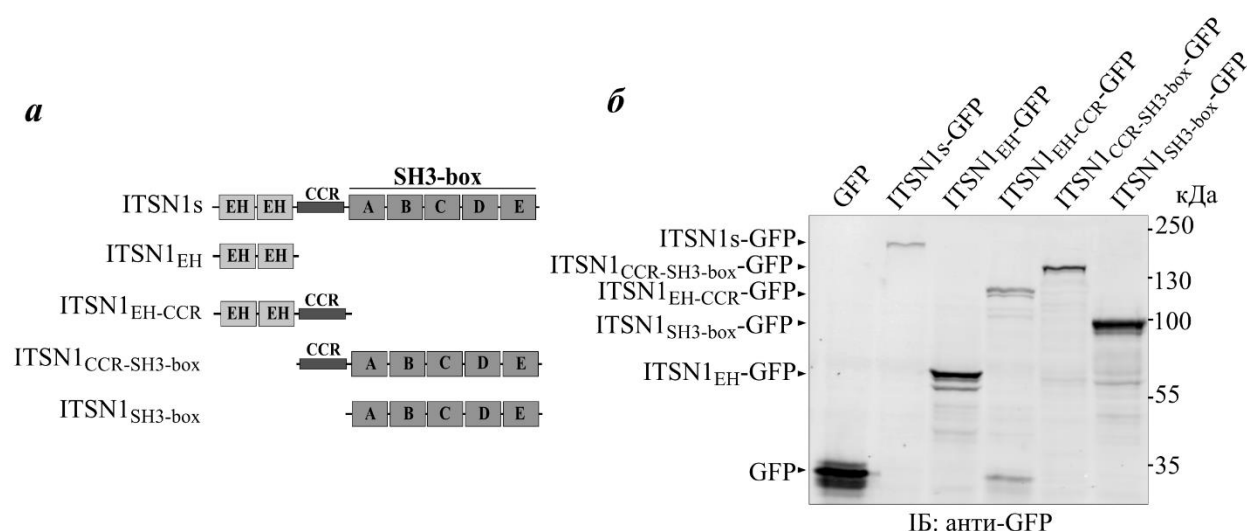


Рис. 3.2. Створення генно-інженерних конструкцій, що кодують делеційні форми білка ITSN1s. *a* – схематичне зображення делеційних форм білка ITSN1s. *б* – аналіз експресії плазмідних конструкцій. Імуноблот (ІБ) було проведено з використанням антитіл, специфічних до GFP

Фрагменти ITSN1, які містять EH домени, а саме ITSN1_{EH} та ITSN1_{EH-CCR}, локалізувалися однаковою мірою в цитоплазмі і ядрі в усіх клітинах лінії HeLa (рис. 3.3. *a, б*). Вкорочені фрагменти ITSN1s-GFP, які містили тандем п'яти SH3 доменів ITSN1 (ITSN1_{CCR-SH3-box} та ITSN1_{SH3-box}) також локалізувалися як в цитоплазмі, так і в ядрі клітин. Але їх накопичення у ядрі спостерігалось не в усіх клітинах HeLa, а лише в окремій частині клітинної популяції (рис. 3.3. *в, г*). Таке спостереження нагадує клітинну локалізацію повнорозмірного рекомбінантного білка ITSN1s, злитого із GFP (рис. 3.1. *б*).

Отримані результати вказують на те, що як EH домени, так і SH3 домени ITSN1 можуть опосередковувати та регулювати його ядерно-цитоплазматичний транспорт. Оскільки ці домени опосередковують взаємодію ITSN1 із білками-партнерами, можна припустити, що ядерно-цитоплазматичний транспорт ITSN1 та його функціональне значення прямо або опосередковано пов'язані із білками, які локалізуються в ядрі і можуть взаємодіяти із ITSN1.

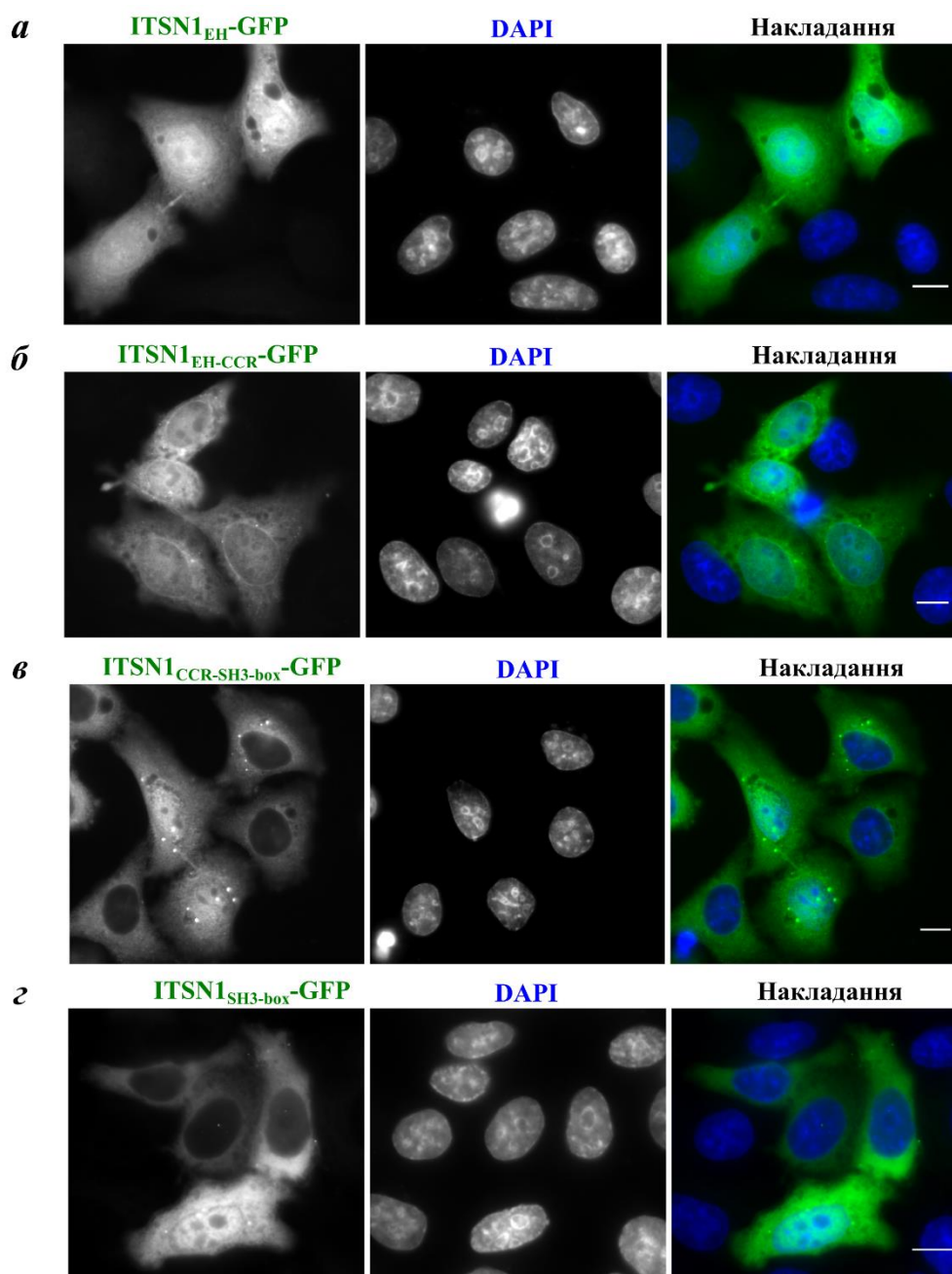


Рис. 3.3. Флуоресцентний аналіз внутрішньоклітинної локалізації злитих із GFP делеційних мутантів ITSN1s в клітинах лінії HeLa. *a* – ITSN1_{EH}, *б* – ITSN1_{EH-CCR}, *в* – ITSN1_{CCR-SH3-box}, *г* – ITSN1_{SH3-box}. Візуалізацію ядер проводили за допомогою барвника DAPI. Масштаб – 15 мкм

3.1.2. Пошук потенційних партнерів ITSN1, які локалізуються і функціонують в ядрі. Для визначення можливої ролі ядерної локалізації білка ITSN1 було здійснено пошук його потенційних білків-партнерів, які локалізуються в ядрі і асоційовані із певною ядерною функцією. Для

виявлення таких білків проаналізували бази даних білок-білкових взаємодій, ідентифікованих за допомогою експериментальних підходів. Оскільки білки ITSН1 та ITSН2 характеризуються високим рівнем гомології, проводили пошук відомих потенційних партнерів обох білків. Ідентифіковані партнери перевіряли на можливу ядерну локалізацію з використанням сервісу анотації генів QuickGO.

В ході аналізу виявлено, що серед 236 уже відомих потенційних білків-партнерів ITSН1 та ITSН2 39 білків локалізуються в ядрі і беруть участь в регуляції транскрипції, процесингу та транспорту мРНК, ремоделюванні хроматину або реплікації та репарації ДНК (таблиця 3.1.)

Таблиця 3.1.

Перелік потенційних партнерів ITSН1 та ITSН2, які функціонують в ядрі клітини

Метод, яким було ідентифіковано взаємодію	Функція			
	Регуляція транскрипції	Процесинг та транспорт мРНК	Ремоделювання хроматину	Реплікація та репарація ДНК
Кофракціонування		SKIV2L TTC37		RNASEH2A
Мас-спектрометрія	ZMAT3	CSNK2A2 SF1	EZH2 HIST2H2AC MCRS1	RAD18
Фаговий дисплей		KHDRBS1 (SAM68)		
Дигібридний аналіз у дріжджах	LMO4 RPS6KA5 NR2C2 TP53 TRIM8 ZFPM2	LSM8 TBL3 SF3B4 WBP11 CPSF6 EEF1A1 HNRNPK LARP6 LUC7L3 MBNL1 PDE4DIP PIK3C2B RBMX	SMARCC2 KDM1A RNF20 RNF40 HMG20A	BCCIP AHDC1 ANKRD17 YLPM1

3.1.3. Аналіз взаємодії ITSN1 та ITSN2 із РНК-зв'язуючими білками SAM68, WBP11 та LARP6 *in vitro*. Згідно з отриманими результатами усі попередньо виявлені потенційні взаємодії між білками ITSN та білками, що функціонують у ядрі, було ідентифіковано в ході так званих високопродуктивних скринінгів (англ. high-throughput screening), включаючи дигібридний аналіз у дріжджах, фаговий дисплей, кофракціонування та мас-спектрометричний аналіз. Незважаючи на переваги даних методів, підтвердження безпосередньої взаємодії між цими білками потребують більш детального аналізу *in vitro* та *in vivo*.

Тому на наступному етапі роботи було перевірено можливу взаємодію ITSN1 та ITSN2 із кількома ідентифікованими ядерними білками з використанням підходів перевірки білок-білкових взаємодій *in vitro*. Оскільки більшість визначених партнерів є РНК-зв'язуючими білками, які регулюють процесинг та транспорт мРНК, для подальшого аналізу вибрали три РНК-зв'язуючі білки, а саме: SAM68, WBP11 та LARP6. Аналіз амінокислотних послідовностей цих білків виявив, що вони містять пролін-збагачені ділянки та пролінові мотиви RxxP, які потенційно можуть взаємодіяти із SH3 доменами ITSN1 та ITSN2.

Відомо, що SAM68 залучений до регуляції транскрипції, сплайсингу, та транспорту мРНК, зокрема транскриптів мРНК прото-онкогенів *CD44*, *CCND1*, *SRSF1* і *BIRC5*, і сприяє проліферації та міграції ракових клітин (142). LARP6 специфічно зв'язується із мРНК колагену типу I та регулює її ядерно-цитоплазматичний транспорт і трансляцію (169). Цей білок також стимулює ангіогенез та ріст ракових клітин (170). WBP11 – РНК-зв'язуючий білок, який регулює альтернативний сплайсинг пре-мРНК генів *FGF4* та *TUBGCP6*, взаємодіє із регуляторами сплайсингу SC35 та U2B і бере участь у дуплікації центріолей (171-173).

Для підтвердження цих взаємодій провели преципітацію надекспресованих білків SAM68, WBP11 та LARP6 із лізатів клітин 293, використовуючи тандеми із п'яти SH3 доменів ITSN1 та ITSN2 (ITSN1_{SH3-box}

та ITSN2_{SH3}). З цією метою іммобілізовані на сорбенті рекомбінантні білки ITSN1_{SH3-box} та ITSN2_{SH3-box} інкубували із лізатами клітин лінії 293, попередньо трансфікованими генно-інженерними конструкціями, що кодували білки SAM68, WBP11 та LARP6, злитих із GFP. Виявлено, що SH3 домени ITSN1 та ITSN2 преципітували усі проаналізовані РНК-зв'язуючі білки (рис. 3.4.).

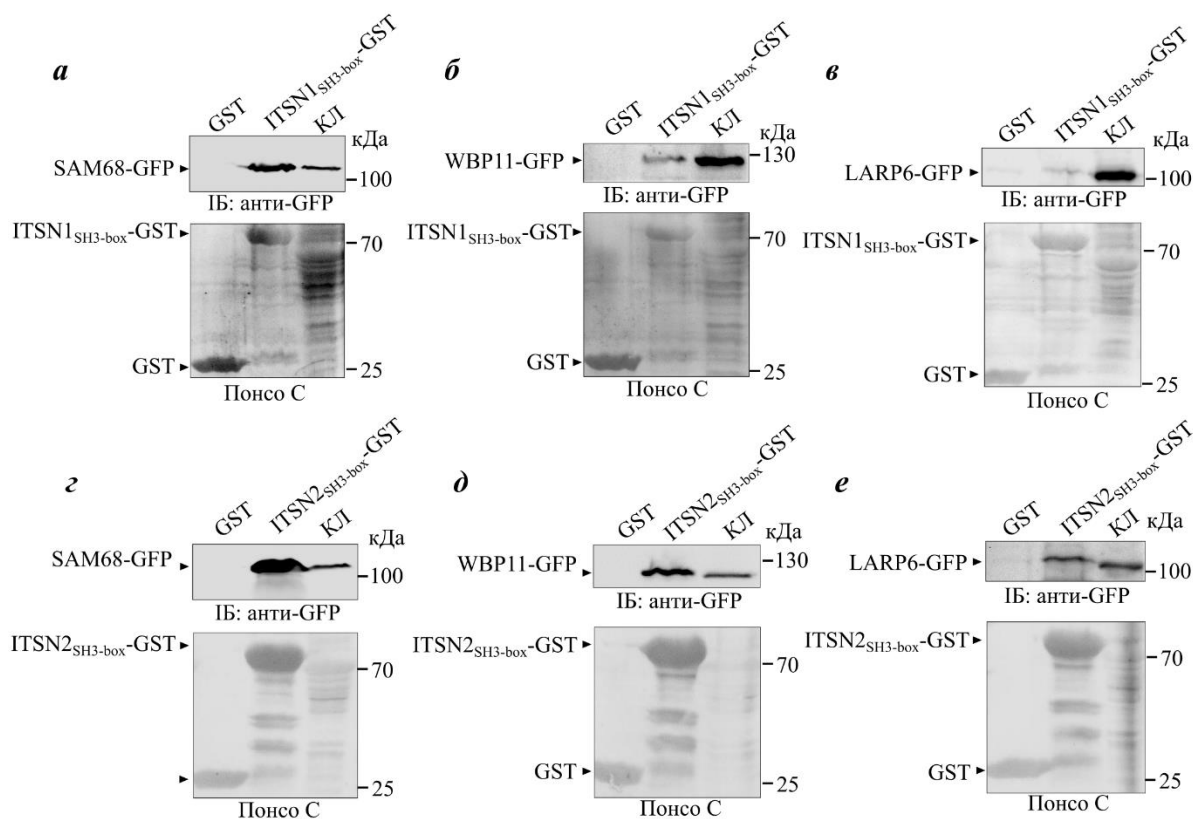


Рис. 3.4. Аналіз взаємодії SH3 доменів ITSN1 та ITSN2 із РНК-зв'язуючими білками SAM68, WBP11 та LARP6 *in vitro*. Злиті із GST іммобілізовані на глутатіон-сефарозі тандеми SH3 доменів ITSN1(*a, б, в*) або ITSN2(*г, д, е*) інкубували із лізатами клітин 293, що містили рекомбінантні білки SAM68-GFP (*a, г*), WBP11-GFP (*б, д*) або LARP6-GFP (*в, е*). Преципітовані білки детектували за допомогою антитіл специфічних до GFP. GST-злиті SH3 домени візуалізували за допомогою фарбування Понсо С. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот

На наступному етапі за допомогою коімунопреципітації було проаналізовано можливість формування комплексів ITSN1 та ITSN2 із

зазначеними РНК-зв'язуючими білками. Використовуючи антитіла специфічні до ITSN1 або ITSN2, ми виявили преципітацію SAM68-GFP та LARP6-GFP із лізатів клітин лінії 293, попередньо трансфікованих відповідними генно-інженерними конструкціями (рис. 3.5.). Отримані результати вказують на те, що ITSN1 та ITSN2 можуть бути компонентами спільних білкових комплексів із РНК-зв'язуючими білками SAM68 та LARP6.

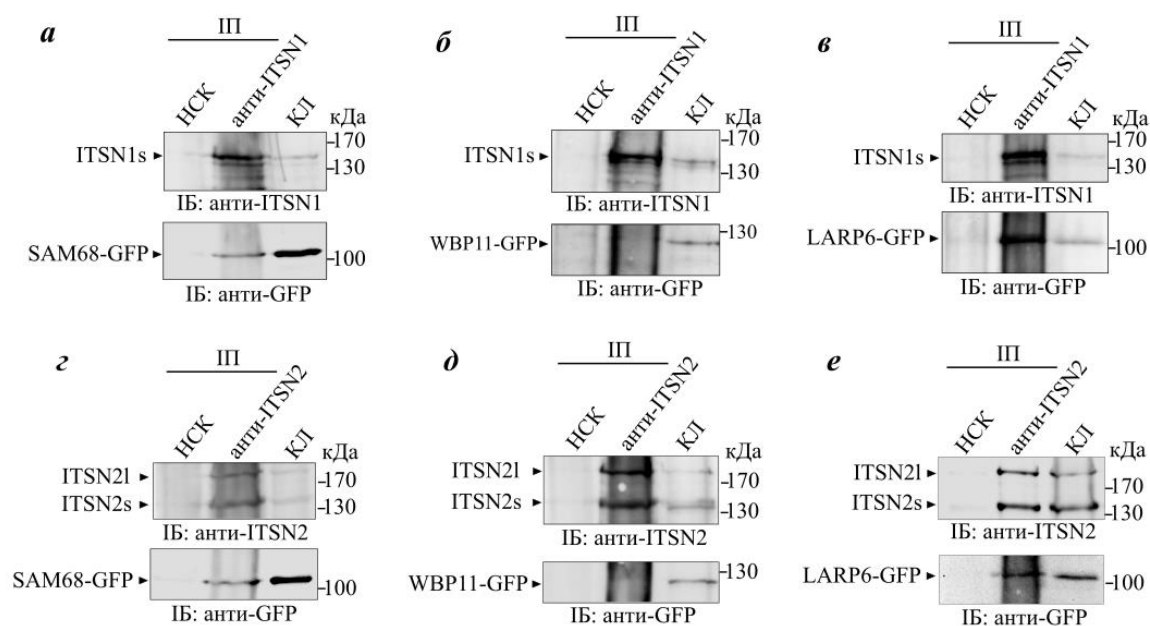


Рис. 3.5. Аналіз копреципітації білків SAM68-GFP, WBP11-GFP та LARP6-GFP з використанням антитіл специфічних до ITSN1 (a-в) або ITSN2 (г-е). Преципітовані білки ідентифікували за допомогою антитіл специфічних до GFP та ITSN1 або ITSN2. Нормальна сироватка кроля (НСК) була використана як негативний контроль. ІП – імунопреципітація, КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот

3.1.4. Аналіз взаємодій білків SAM68, WBP11 і LARP6 із білками регуляторами ендоцитозу та перебудов актинових філаментів *in vitro*. Виявлені взаємодії ITSN1 та ITSN2 із РНК-зв'язуючими білками можуть свідчити про безпосередній взаємозв'язок процесів ендоцитозу та ремоделювання актинового цитоскелету із процесингом та транспортом мРНК. Крім того, відомо, що деякі білки ендоцитозу та регулятори перебудов

актинових філаментів, зокрема BIN1 та CTTN, можуть локалізуватись у ядрі клітини. Тому на наступному етапі дослідження було проаналізовано можливі взаємодії білків SAM68, WBP11 та LARP6 із білками, які містять SH3 домени та беруть участь у процесах формування везикул (AMPH1 та BIN1) або регулюють формування філоподій та інвадоподій (CTTN, TKS4 та TKS5). Для виявлення можливих взаємодій між цими білками GST-злиті SH3 домени зазначених білків було іммобілізовано на сорбенті та інкубовано із відповідними лізатами клітин 293. Було виявлено, що SH3 домени AMPH1, BIN1 та CTTN, а також SH3-3 домен TKS4 та SH3-5 домен TKS5 преципітували SAM68 (рис. 3.6.).

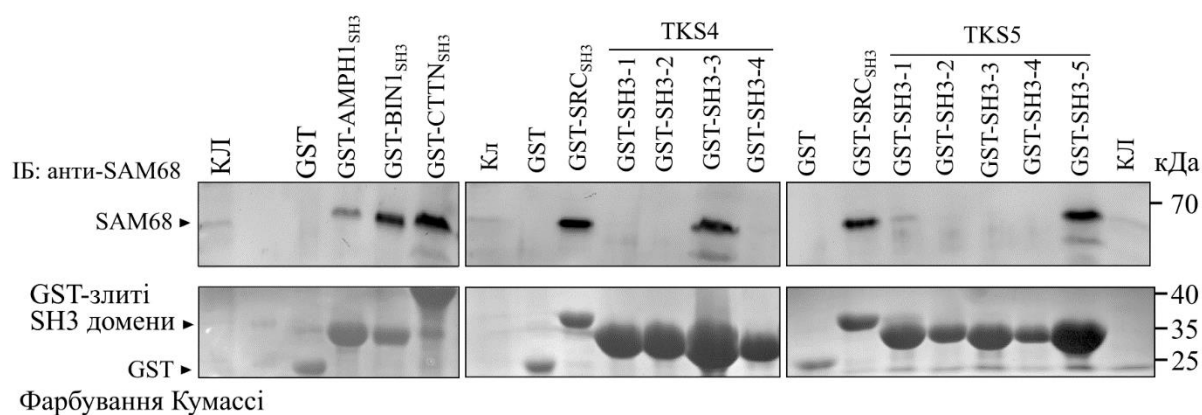


Рис. 3.6. Аналіз взаємодії SH3 доменів AMPH1, BIN1, CTTN, TKS4 та TKS5 із РНК-зв'язуючим білком SAM68 *in vitro*. Іммобілізовані на глутатіон-сефарозі SH3 домени AMPH1, BIN1 та CTTN1 (а), TKS4 (б) та TKS5 (в), злиті із GST, інкубували із лізатами клітин 293. Преципітовані білки детектували за допомогою антитіл специфічних до SAM68. GST-злиті SH3 домени візуалізували за допомогою Кумассі. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот

Також було показано, що SH3 домен CTTN, SH3-3 та SH3-4 домени білка TKS4 та SH3-1, SH3-3, SH3-5 і меншою мірою SH3-2 домени білка TKS5 преципітували рекомбінантний білок WBP11-GFP (рис. 3.7.).

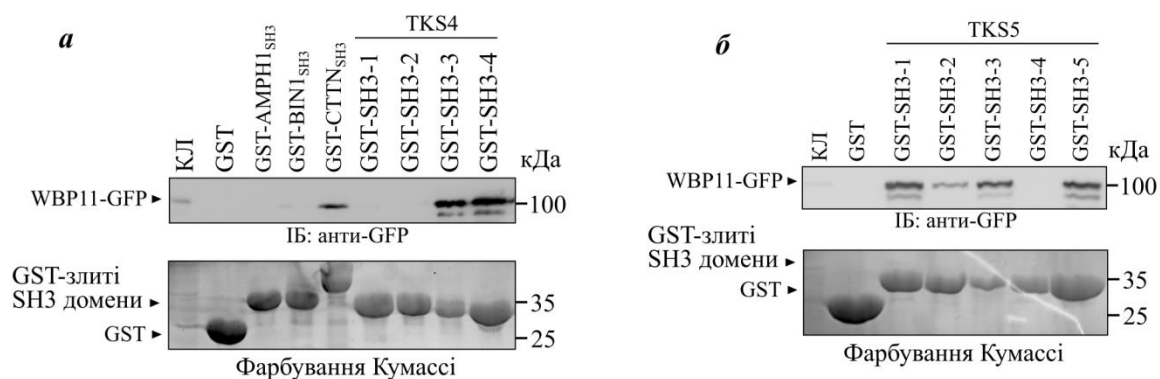


Рис. 3.7. Аналіз взаємодії SH3 доменів AMPH1, BIN1, CTTN, TKS4 та TKS5 із РНК-зв'язуючим білком WBP11 *in vitro*. Імобілізовані на глутатіон-сефарозі SH3 домені AMPH1, BIN1, CTTN1, TKS4 (а) та TKS5 (б), злиті із GST, інкубували із лізатами клітин 293, що містили рекомбінантний білок WBP11-GFP. Преципітовані білки детектували за допомогою антитіл специфічних до GFP. GST-злиті SH3 домені візуалізували за допомогою Кумассі. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот

Також показано, що SH3 домені білків AMPH1, BIN1 та CTTN і SH3-5 домен білка TKS5 преципітували білок LARP6-GFP (рис. 3.8.).

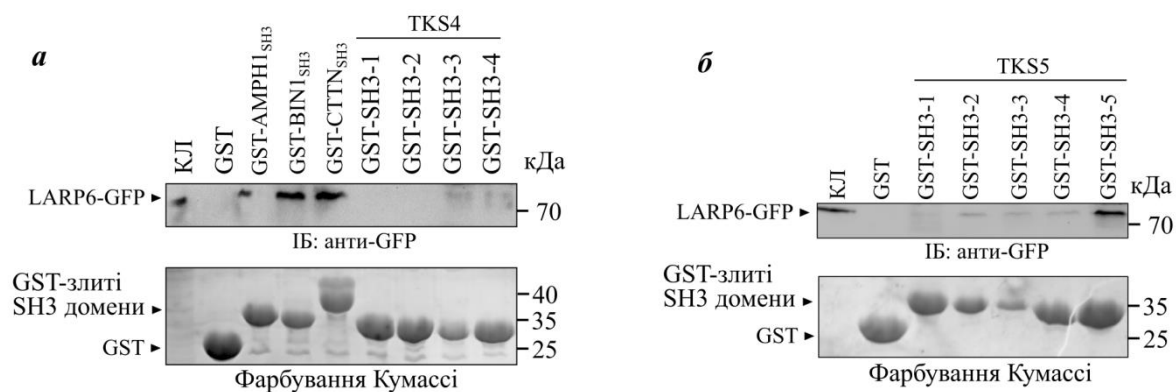


Рис. 3.8. Аналіз взаємодії SH3 доменів AMPH1, BIN1, CTTN, TKS4 та TKS5 із РНК-зв'язуючим білком LARP6 *in vitro*. Імобілізовані домені AMPH1, BIN1, TKS4 (а) та TKS5 (б), злиті із GST, інкубували із лізатами клітин 293, що синтезували LARP6-GFP. Преципітовані білки детектували за допомогою антитіл специфічних до GFP. GST-злиті SH3 домені візуалізували за допомогою Кумассі. КЛ – клітинний лізат, ІБ – імуноблот

Таким чином, можна припустити, що SAM68 є потенційним партнером білків ендоцитозу AMPH1 і BIN1 та регуляторів реорганізації актинових філаментів CTTN, TKS4 та TKS5, тоді як WBP11 може взаємодіяти із CTTN, TKS4 та TKS5, а LARP6 може зв'язуватись із AMPH1, BIN1, CTTN та TKS5.

Отримані результати вказують на те, що ITSN1 локалізується в ядрах клітин лінії HeLa. Виявлено, що SH3 домени ITSN1 можуть взаємодіяти із РНК-зв'язуючими білками SAM68, LARP6 та WBP11 *in vitro*, які також можуть формувати комплекси із іншими білками-регуляторами ендоцитозу (AMPH, BIN1, ITSN2) та реорганізації актинових філаментів (CTTN, TKS4, TKS5). Ці дані значно розширюють інтерактом досліджуваних білків і вказують на можливий прямий зв'язок між процесингом мРНК та ендоцитозом і перебудовами актинового цитоскелету.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковано в працях:

1. Pankivskyi 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.

2. Pankivskyi 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.

3. Pankivskyi S., Senchenko N., Busko P., Rynditch A. Effect of scaffold protein ITSN1 on interactions and aggregation properties of RNA-binding protein SAM68. XII Український біохімічний конгрес, 2019, Тернопіль, Україна.

4. Pankivskyi 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.

5. Pankivskyi 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

6. Дергай М. В., Дергай О. В., Паньківський С. В., Новохацька О. В., Мячинська М., Риндич А. В. Нові функції протеїнів ендоцитозу в контролі внутрішньоклітинного сигналіngu. XI Український біохімічний конгрес. 2014, Київ, Україна.

3.2. Характеристика взаємодії між білком ITSN1 та РНК-зв'язуючим білком SAM68

3.2.1. Підтвердження взаємодії ITSN1-SAM68 *in vitro* та в клітині. Враховуючи зв'язок ITSN1 та SAM68 із злоякісною трансформацією клітин та нейродегенеративними захворюваннями, подальші дослідження було спрямовано на структурну та функціональну характеристику взаємодії між ITSN1 та SAM68.

3.2.1.1. Аналіз взаємодії між ITSN1 та SAM68 *in vitro*. На першому етапі характеристики взаємодії між ITSN1 та SAM68 було проведено аналіз безпосереднього зв'язування між обома білками за умов *in vitro*. Рекombінантні білки ITSN1_{SH3-box}-GST та SAM68-His, які синтезувались в клітинах *E.coli*, очищали за допомогою афінної хроматографії на глутатіон-сефарозі та Ni-NTA агарозі. На наступному етапі іммобілізований на Ni-NTA агарозі рекombінантний білок SAM68-His інкубували із очищеним ITSN1_{SH3-box}-GST. Очищений білок GST було використано як негативний контроль. Також в якості негативного контролю проводили інкубування рекombінантного очищеного ITSN1_{SH3-box}-GST із Ni-NTA агарозою, на якій не було іммобілізовано рекombінантного білка SAM68-His.

Рекombінантний білок SAM68 преципітував тандем SH3 доменів ITSN1 (рис. 3.9.), що свідчить про пряму взаємодію цих білків. В контрольних реакціях преципітації рекombінантного ITSN1_{SH3-box}-GST виявлено не було. Отримані результати підтверджують факт безпосередньої взаємодії між ITSN1 та SAM68, яка відбувається за рахунок доменів SH3 ITSN1 та пролін-збагачених мотивів SAM68.

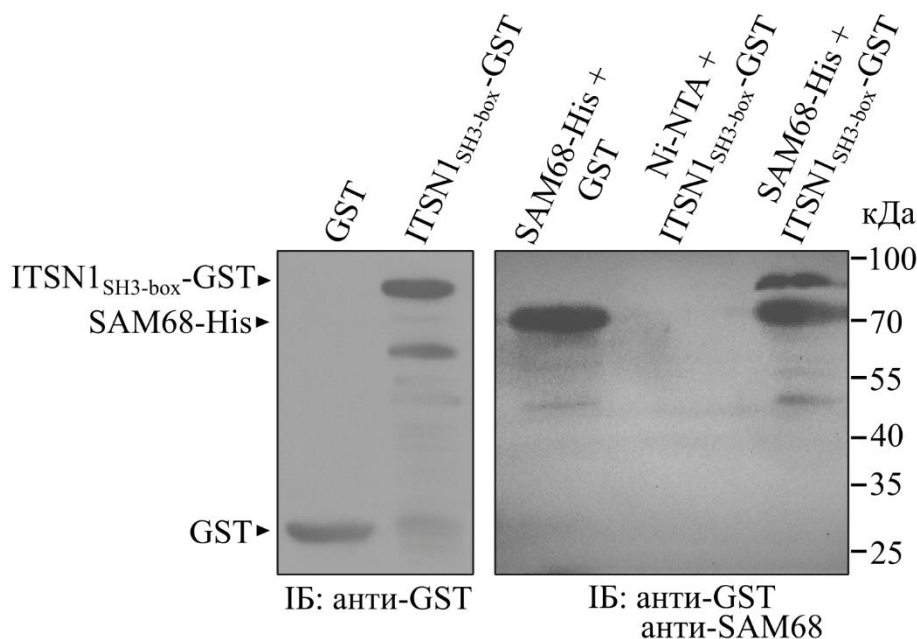


Рис. 3.9. Аналіз прямої взаємодії SH3 доменів ITSN1 із білком SAM68 *in vitro*. Іммобілізований на Ni-NTA агарозі SAM68-His інкубували із афінно очищеними рекомбінантним ITSN1_{SH3-box}-GST або GST (негативний контроль). Також в якості негативного контролю проводили інкубування ITSN1_{SH3-box}-GST із Ni-NTA агарозою. Преципітовані білки детектували за допомогою антитіл, специфічних до GST та SAM68

3.2.1.2. Аналіз взаємодії між ITSN1 і SAM68 в клітині з використанням мікротрубочок як носіїв. На наступному етапі було проведено аналіз взаємодії ITSN1 із білком SAM68 в клітині. Для цього було використано метод, що ґрунтується на ідентифікації взаємодії між двома партнерами в клітині з використанням мікротрубочок як носіїв (154). Для цього клітини котрансфікували генно-інженерними конструкціями, що кодують два рекомбінантні білки: 1 – білок інтересу, злитий із RFP та фрагментом білка Tau, що зв'язується із мікротрубочками (MBD, microtubule binding domain); 2 – білок інтересу, злитий із GFP (рис. 3.10.). В результаті котрансфекції в клітинах експресуються обидва модифіковані білки, один з яких асоційований із мікротрубочками. Взаємодія білків-партнерів призводить до їх співлокалізації на мікротрубочках клітини. Таким чином,

асоціація та співлокалізація обох білків на мікротрубочках, яку можна виявити за допомогою флуоресцентної мікроскопії, свідчить про взаємодію білків інтересу в інтактній клітині.

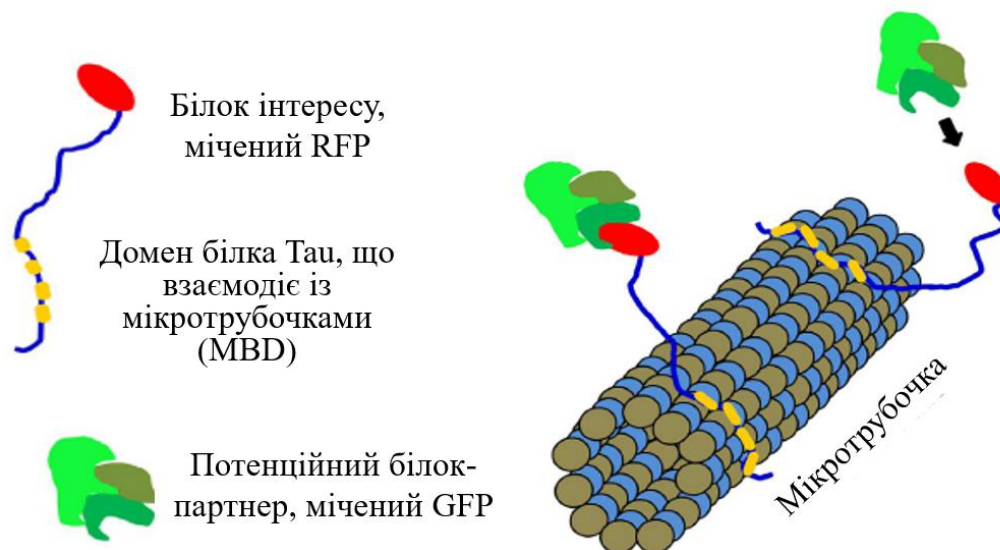


Рис. 3.10. Схематичне зображення принципу аналізу білок-білкових взаємодій у клітині з використанням мікротрубочок як носіїв. Адаптовано з (154)

Таким чином, клітини лінії HeLa були котрансфіковані конструкціями, що кодують рекомбінантні білки $ITSN1_{SH3\text{-}box}\text{-RFP-MBD}$ та $SAM68\text{-GFP}$. В якості контролю використовували рекомбінантний білок $RFP\text{-MBD}$, який локалізувався на мікротрубочках, але не взаємодівав із білком інтересу $SAM68\text{-GFP}$. Результати аналізу виявили значний рівень співлокалізації між $ITSN1_{SH3\text{-}box}\text{-RFP-MBD}$ та $SAM68\text{-GFP}$ на мікротрубочках, про що свідчить високий показник середнього значення коефіцієнта кореляції (0.8 ± 0.08) (рис. 3.11. *a*). Перекриття сигналів між $RFP\text{-MBD}$ та $SAM68\text{-GFP}$ на мікротрубочках контрольних клітин не було ідентифіковано (рис. 3.11. *б*), на що вказує коефіцієнт кореляції близький до нуля (0.185 ± 0.22). Статистично достовірна відмінність між коефіцієнтами кореляції підтвердила специфічність взаємодії між $ITSN1$ і $SAM68$.

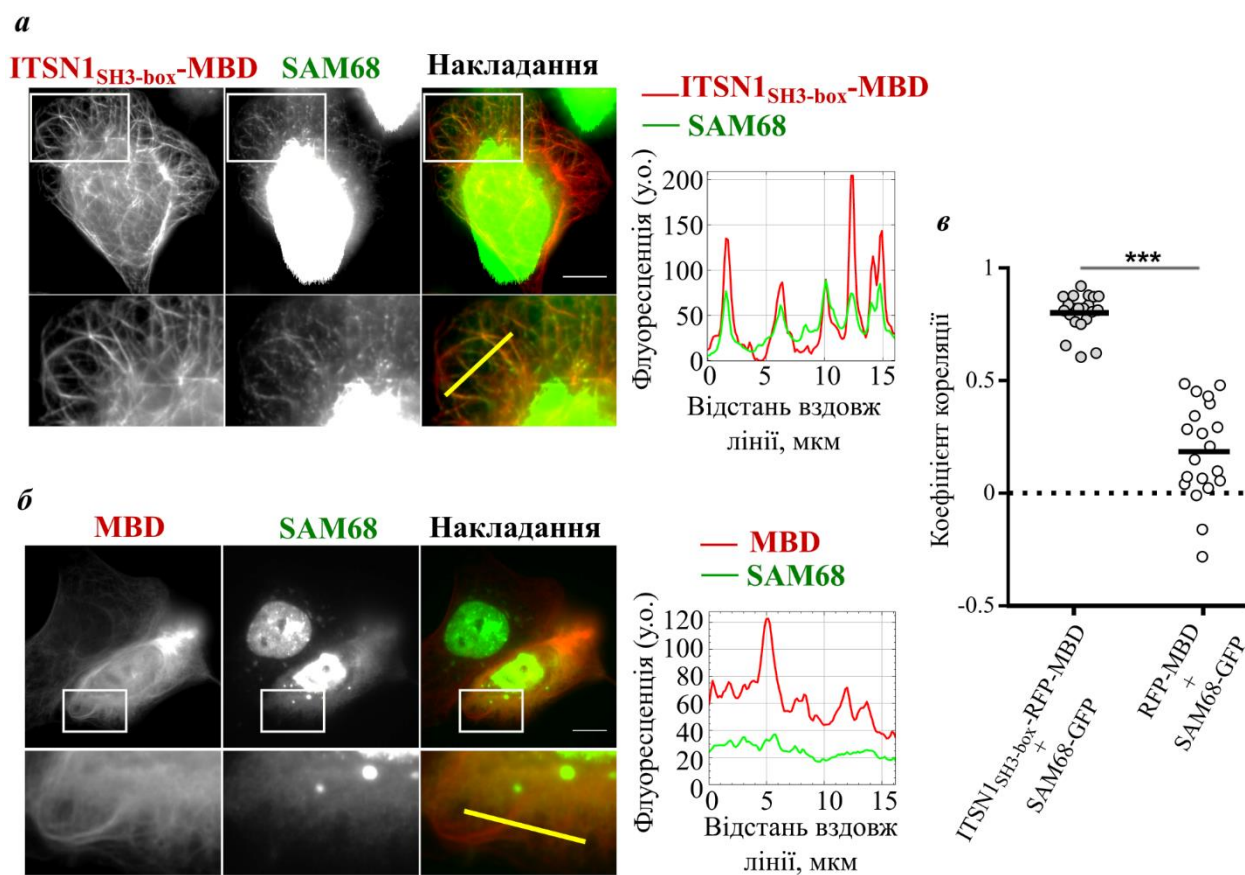
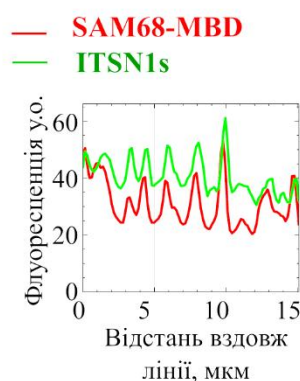
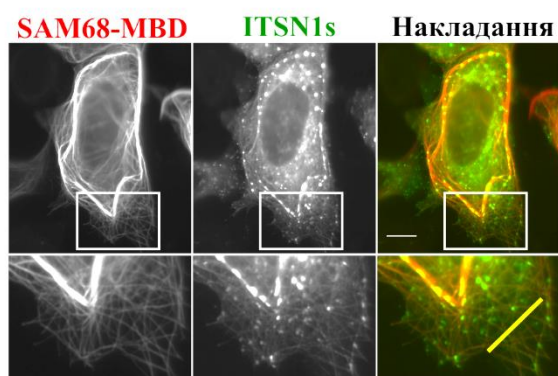


Рис. 3.11. Аналіз взаємодії SH3 доменів ITSN1 із SAM68 у клітині з використанням мікротрубочок як носіїв: *а* – клітини HeLa, трансфіковані генно-інженерними конструкціями, що кодують рекомбінантні білки ITSN1_{SH3-box}-RFP-MBD та SAM68-GFP; *б* – контрольні клітини, трансфіковані генно-інженерними конструкціями RFP-MBD та SAM68-GFP. Масштаб – 15мкм. Графіки відображають 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, *** $p < 0.0005$

На наступному етапі провели реципроний аналіз, в ході якого перевірили взаємодію асоційованого із мікротрубочками рекомбінантного SAM68-RFP-MBD та повнорозмірного ITSN1s-GFP. Ці рекомбінантні білки також співлокалізувалися на мікротрубочках (коефіцієнт кореляції 0.82 ± 0.08) (рис. 3.12. *а*). У контрольних клітинах, в яких експресували ITSN1s-GFP

із RFP-MBD-злитими рекомбінантним білком TDP-43, коефіцієнт кореляції дорівнював 0.23 ± 0.13 (рис. 3.12. б). TDP-43 – РНК-зв’язуючий білок, який не містить пролінових мотивів і потенційно не володіє здатністю прямо взаємодіяти із доменами SH3 ITSN1. Отримані результати підтверджують специфічність взаємодії ITSN1 та SAM68 в інтактній клітині.

a



б

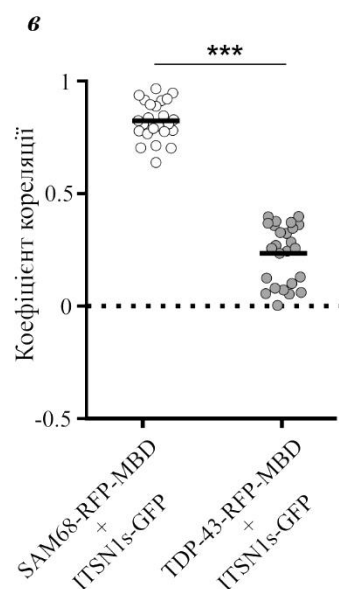
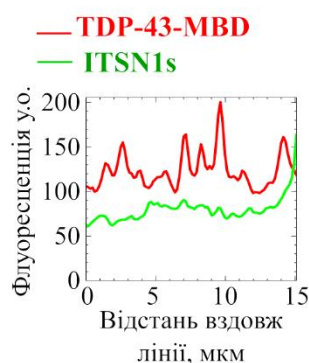
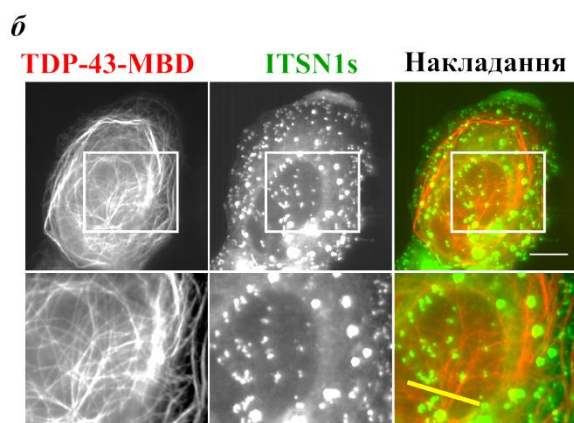


Рис. 3.12. Аналіз взаємодії ITSN1 та SAM68 у клітині з використанням мікротрубочок як носіїв: *a* – клітини лінії HeLa, трансфіковані конструкціями, що кодують рекомбінантні білки SAM68-RFP-MBD та ITSN1s-GFP; *б* – контрольні клітини, трансфіковані конструкціями, що кодують TDP-43-RFP-MBD та ITSN1s-GFP. Масштаб – 15мкм. 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, *** $p < 0.0005$

3.2.1.3. Аналіз співлокалізації ITSN1 та SAM68 у клітинах лінії HeLa.

На наступному етапі було проаналізовано співлокалізацію ендогенних білків ITSN1 та SAM68 в клітині лінії HeLa. Для цього було використано метод зближеного лігування та набору *Duolink® in situ fluorescence*. Принцип методу полягає у візуалізації точок близького розташування білків у клітині. Для цього фіксовані клітини інкубували із антитілами, специфічними до білків інтересу ITSN1 і SAM68 та відповідними вторинними антитілами, кон'югованими із олігонуклеотидними фрагментами ДНК. Після лігування цих фрагментів та ампліфікації утвореної ДНК, специфічні олігонуклеотиди, мічені флуоресцентною міткою використовували для візуалізації сайтів ампліфікації. Таким чином, наявність сигналу свідчила про близьке розташування досліджуваних білків у клітині (рис. 3.13.).

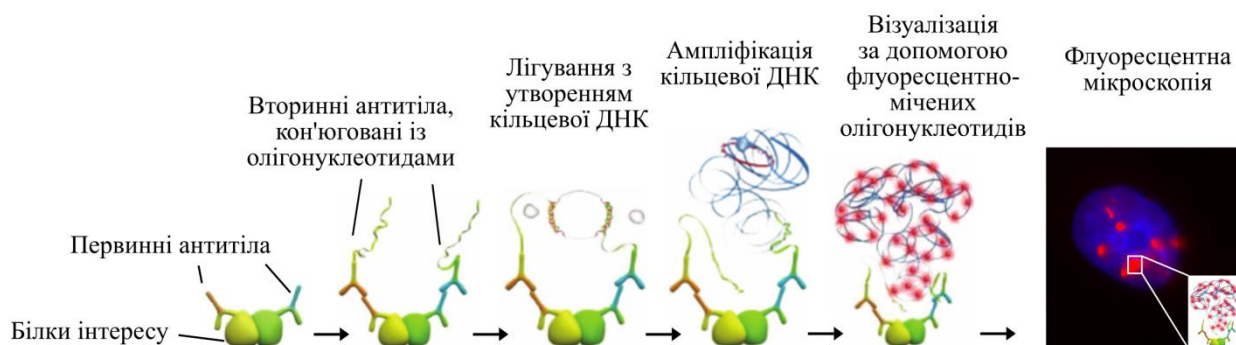


Рис. 3.13. Принцип методу зближеного лігування. Адаптовано з (174)

За допомогою описаного підходу було виявлено флуоресцентні сигнали як в ядрі, так і в цитоплазмі клітин лінії HeLa при використанні антитіл до ITSN1 та SAM68 (рис. 3.14.). Отримані результати вказують на співлокалізацію білків ITSN1 та SAM68 в клітинах лінії HeLa. Флуоресцентних сигналів не було виявлено у контрольних клітинах, які інкубували лише з антитілами, специфічними до ITSN1 або до SAM68.

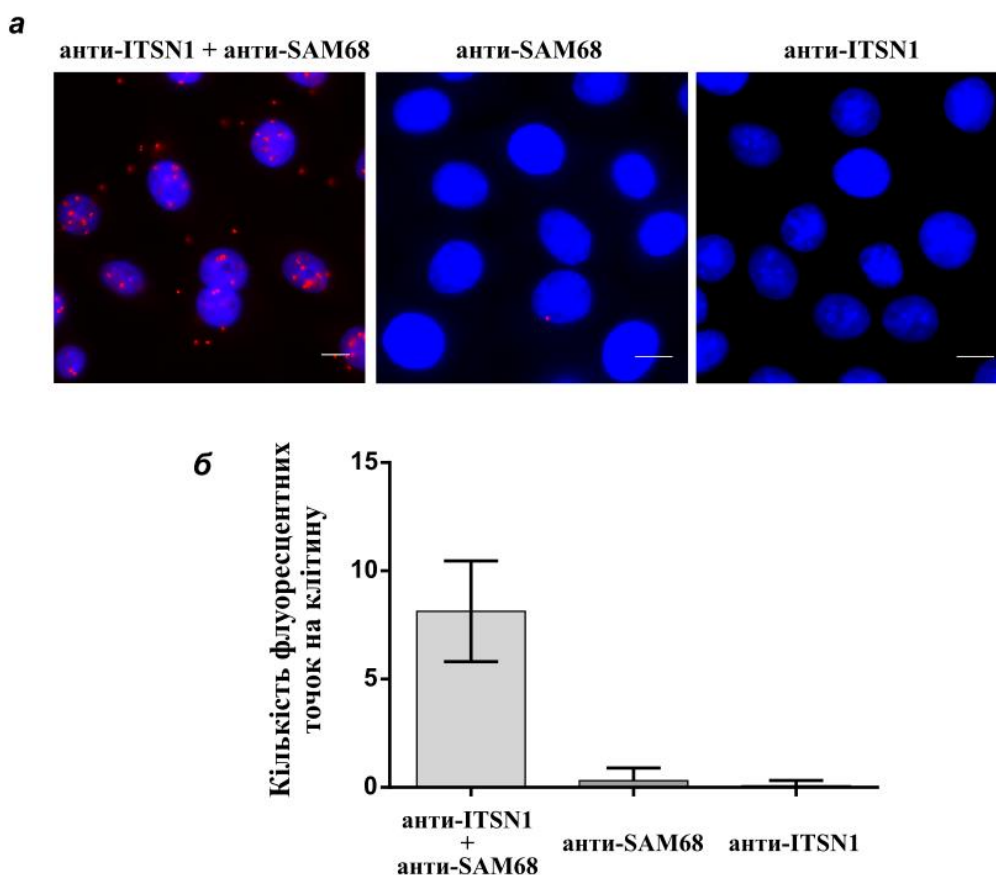


Рис. 3.14. Аналіз співлокалізації ITSN1 та SAM68 з використанням методу наближеного лігування. *а* – фіксовані клітини лінії HeLa було інкубовано із антитілами анти-ITSN1 та анти-SAM68. Контрольні клітини інкубували лише з антитілами, специфічними до ITSN1 або SAM68. Детекцію точок наближення двох білків проводили за допомогою набору *Duolink® in situ fluorescence*. Візуалізацію ядер клітини проводили за допомогою флуоресцентного барвника DAPI. Масштаб – 20 мкм. *б* – Діаграма відображає середнє значення кількості флуоресцентних точок на клітину у відповідних зразках

3.2.1.4. Картування ділянок взаємодії між ITSN1 та SAM68. На наступному етапі було проведено картування ділянок ITSN1 та SAM68, що опосередковують взаємодію між ними. Оскільки SH3 домени ITSN1 характеризуються різною специфічністю, було проаналізовано які з них забезпечують пряму взаємодію із SAM68. Для цього за допомогою GST-

злитих SH3 доменів ITSN1, іммобілізованих на глутатіон-сефарозі, провели преципітацію ендогенного SAM68 із лізатів клітин 293. Виявили, що лише SH3A домен, а також його нейрональна ізоформа (SH3A-N) преципітували SAM68 (рис. 3.15.).

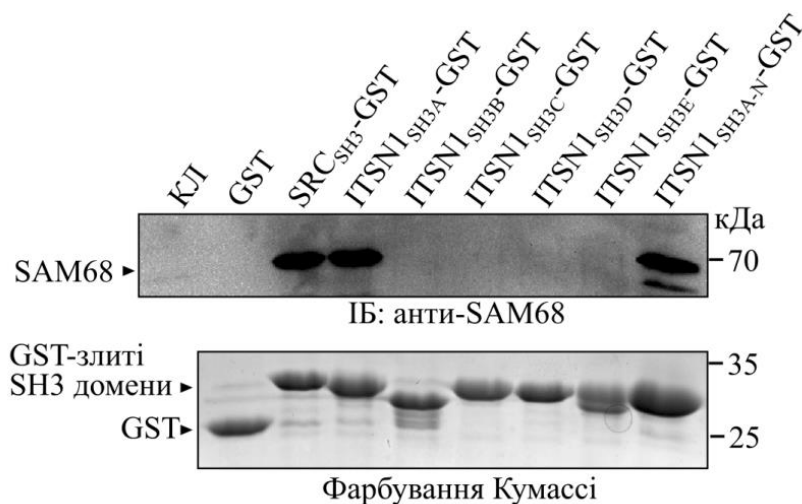


Рис. 3.15. Аналіз взаємодії SH3 доменів ITSN1 із SAM68 *in vitro*. Іммобілізовані на сорбенті GST-злиті SH3 домени ITSN1 було інкубовано з лізатами клітин лінії 293. В якості негативного контролю використовували GST, тоді як GST-злитий SH3 домен кінази SRC було використано як позитивний контроль. Преципітовані білки детектували за допомогою анти-SAM68 антитіл, GST-злиті білки візуалізували за допомогою фарбування Кумассі. ІБ – імуноблот, КЛІ – клітинний лізат

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

Для визначення ділянки SAM68, яка взаємодіє із SH3 доменами ITSN1, ми створили генно-інженерні конструкції, що кодують GFP-злиті делеційні

фрагменти білка SAM68: N-кінцевий фрагмент SAM68 та його центральний РНК-зв'язуючий домен (SAM68_{N-KH}), центральний структурований домен (SAM68_{KH}), РНК-зв'язуючий домен із С-кінцевою неструктурованою ділянкою (SAM68_{KH-C}) та SAM68 із видаленим проліновим мотивом P0 (SAM68_{ΔP0}) (рис. 3.16.).

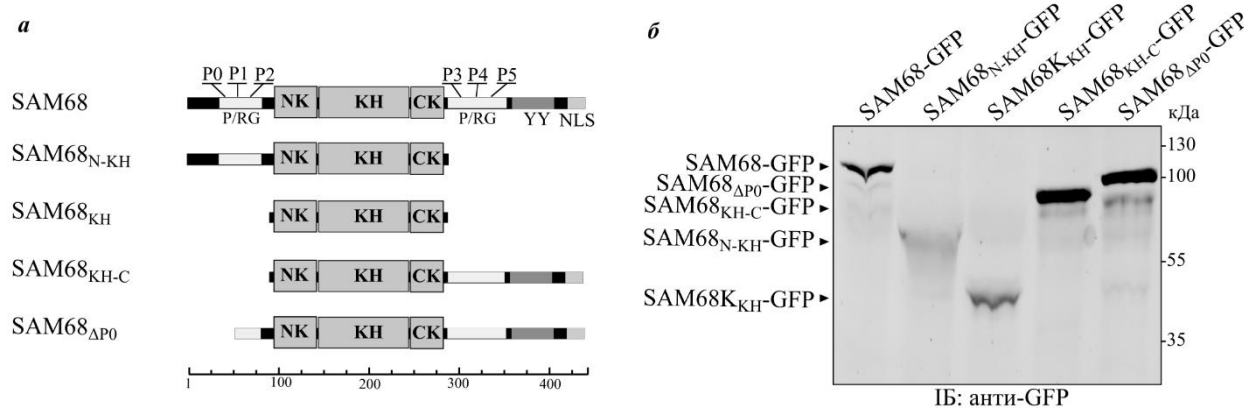


Рис. 3.16. Створення генно-інженерних конструкцій, що кодують делеційні фрагменти білка SAM68. *a* – схематичне зображення делеційних фрагментів SAM68. *б* – аналіз експресії плазмідних конструкцій, що кодували делеційні форми SAM68. Імуноблот було проведено з використанням антитіл, специфічних до GFP

Взаємодію отриманих фрагментів SAM68 із доменами SH3 ITSN1 перевіряли у клітинах лінії HeLa з використанням мікротрубочок як носіїв. Клітини трансфікували генно-інженерними конструкціями, що кодували тандем п'яти SH3 доменів ITSN1, злитих із RFP та MBD, та конструкціями, що кодували один із делеційних фрагментів SAM68, злитих із GFP. В якості контролю використовували рекомбінантний білок RFP-MBD (рис. 3.17.).

Аналіз співлокалізації GFP- та RFP-злитих білків виявив, що SH3 домени ITSN1 взаємодіяли із повнорозмірним SAM68 та виключно із його N-кінцевим фрагментом. Видалення пролінового мотиву P0 білка SAM68 запобігає взаємодії між ITSN1 та SAM68 (рис. 3.18.).

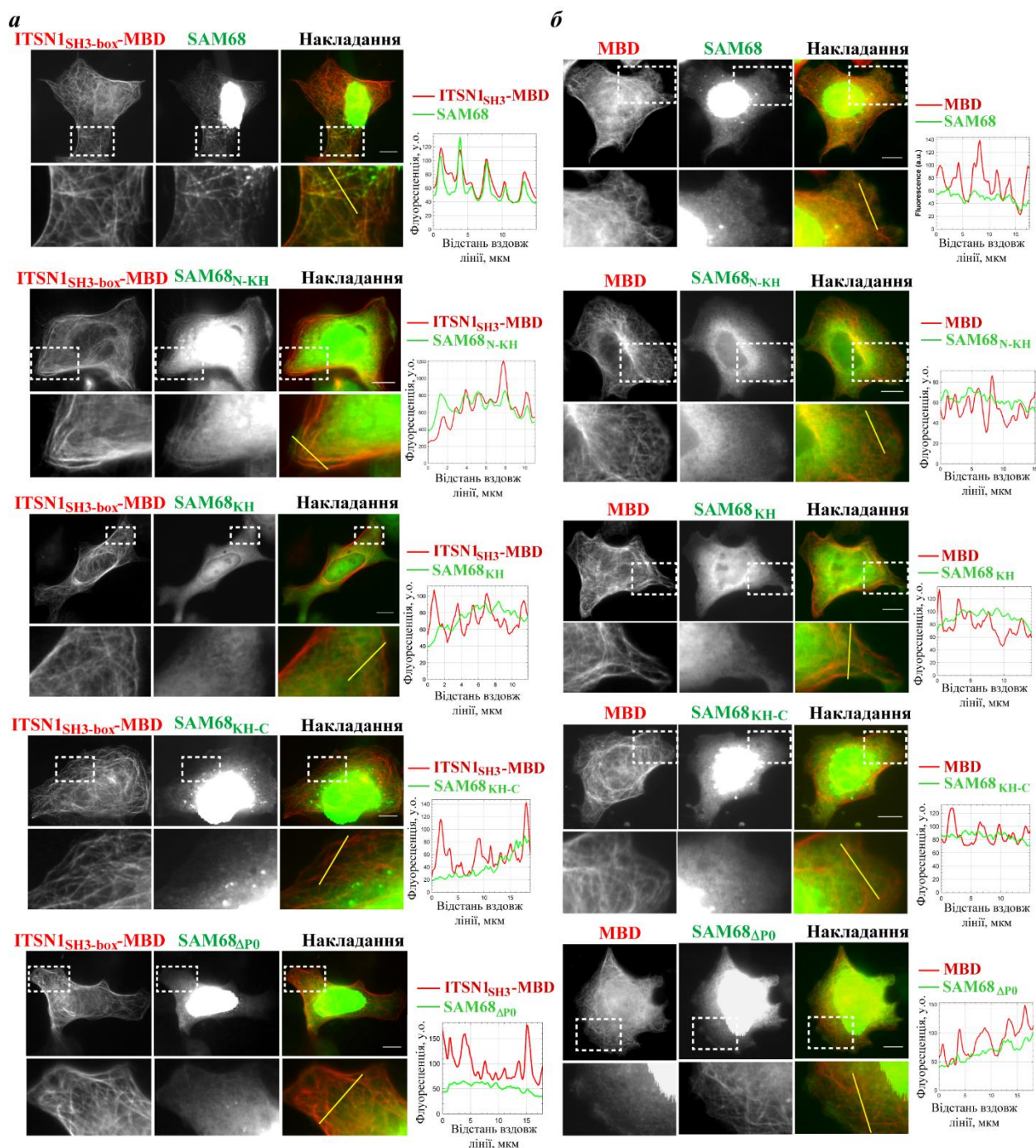


Рис. 3.17. Аналіз взаємодії ITSN1 із делеційними фрагментами SAM68 у клітині з використанням мікротрубочок: *a* – клітини HeLa, трансфіковані конструкціями, що кодують рекомбінантні білки ITSN1_{SH3-box}-RFP-MBD та одну із делеційних фрагментів SAM68, злитих із GFP; *б* – контрольні клітини, трансфіковані конструкцією RFP-MBD. Масштаб – 15мкм. Графіки відображають рівень флуоресценції вздовж лінії на відповідній мікрофотографії

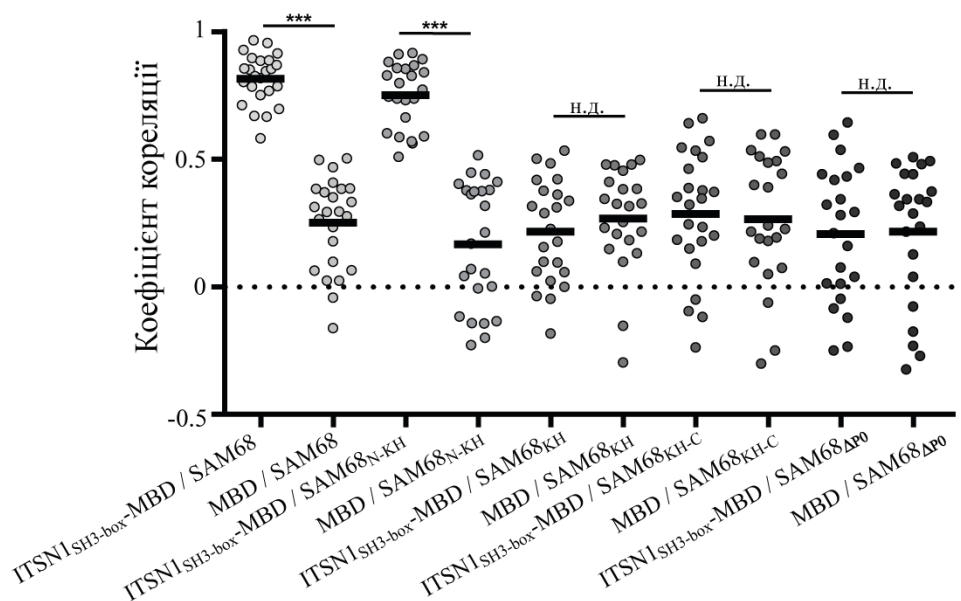


Рис. 3.18. Точкова діаграма, яка відображає коефіцієнти кореляції флуоресцентних сигналів ITSN1_{SH3-box}-RFP-MBD або RFP-MBD та делеційних фрагментів SAM68, злитих із GFP. Статистичний аналіз: *t*-тест, *** $p < 0.0005$, н.д. – не достовірно

3.2.2. Функціональна характеристика взаємодії ITSN1 та SAM68. Враховуючи виявлену взаємодію між скафолдним білком ITSN1 та РНК-зв'язуючим білком SAM68, на наступному етапі дослідження ми проаналізували можливий вплив ITSN1 на його властивості та функціональну активність *in vitro* та в клітині.

3.2.2.1. Аналіз конкурентного зв'язування ITSN1 та GRB2 із SAM68. Раніше було показано, що низка білків, які містять SH3 домени, взаємодіють із SAM68. До таких білків належать адаптерні білки (Grb2, Crk, Vav, Nck1/2), тирозинові кінази (Src, Fyn, Brk) та інші сигнальні ензими (PLC γ 1, PRMT2, PI3K-p85 α), які можуть модулювати функціональну активність SAM68 (142).

Було також описано конкуренцію між ITSN1 та GRB2 за зв'язування із сигнальним білком SOS1, що може впливати на активацію сигнального каскаду RAS-RAF-MAPK. Тому наступним кроком наших досліджень був аналіз можливої конкуренції між ITSN1 та GRB2 за зв'язування із SAM68 *in*

in vitro. Для цього було використано очищені рекомбінантні His-злитий SAM68 (SAM68-His) та GST-злиті GRB2 (GRB2-GST) і тандем п'яти SH3 доменів ITSN1 (ITSN1_{SH3-box}-GST). На першому етапі ми провели зв'язування білка SAM68-His на Ni-NTA агарозі, а потім інкубували одночасно із GRB2-GST та ITSN1_{SH3-box}-GST. При цьому в усіх реакціях використовували однакову кількість GRB2-GST, тоді як кількість ITSN1_{SH3-box}-GST збільшували. Виявили, що кількість преципітованого на SAM68 GRB2-GST зменшується при зростанні концентрації ITSN1_{SH3-box}-GST. При цьому кількість преципітованого ITSN1_{SH3-box}-GST зростає (рис. 3.19.).

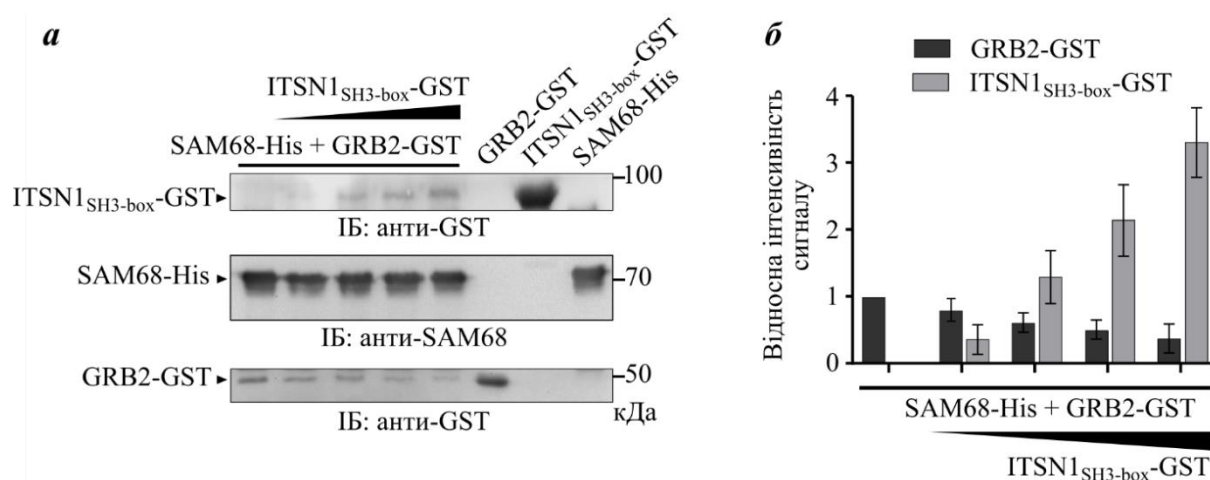


Рис. 3.19. Аналіз конкурентного зв'язування GRB2 та ITSN1 із SAM68. *а* – очищений рекомбінантний SAM68-His було іммобілізовано на Ni-NTA агарозі та інкубовано із рекомбінантними GST-злитими білками GST та ITSN1_{SH3-box}. Преципітовані білки було розділено електрофоретично та візуалізовано за допомогою анти-SAM68 та анти-GST антитіл. ІБ – імуноблот. *б* – діаграма відображає середнє значення нормалізованої інтенсивності сигналу преципітованого GRB2-GST та ITSN1_{SH3-box}-GST

В наступному експерименті було проведено аналогічні реакції зв'язування, в яких збільшували кількість GRB2-GST, тоді як кількість ITSN1_{SH3-box}-GST не змінювали. Аналіз показав, що при збільшенні кількості рекомбінантного білка GRB2-GST спостерігалось заміщення ITSN1_{SH3-box}-GST на GRB2-GST (рис. 3.20.). Отримані дані свідчать про те, що білки

GRB2 та ITSN1 можуть витіснити один одного і конкурують за зв'язування із SAM68 *in vitro*

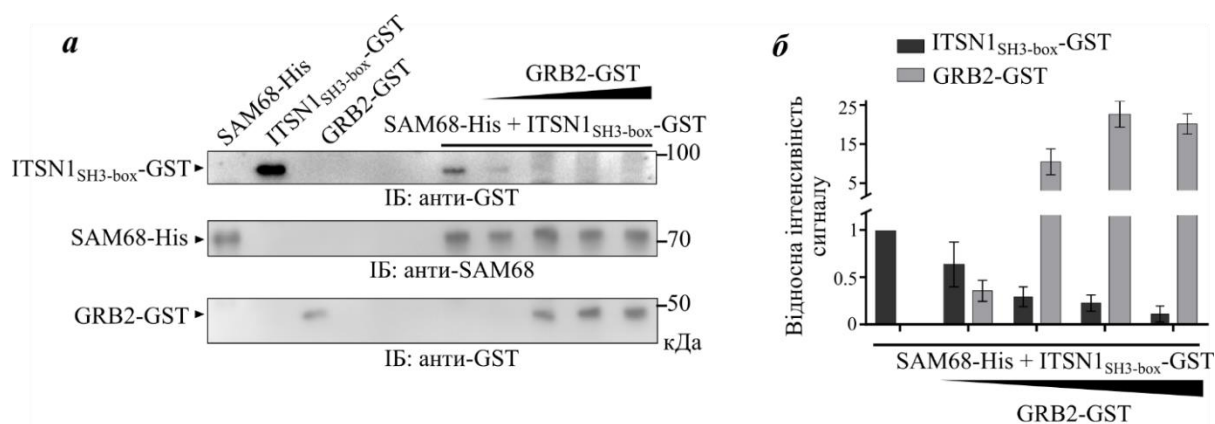


Рис. 3.20. Аналіз конкурентного зв'язування GRB2 та ITSN1 із SAM68. *a* – очищений рекомбінантний SAM68-His було іммобілізовано на Ni-NTA агарозі та інкубовано із рекомбінантними GST-злитими білками ITSN1_{SH3-box} та GRB2. Преципітовані білки було розділено електрофоретично та візуалізовано за допомогою анти-SAM68 та анти-GST антитіл. ІБ – імуноблот. *б* – діаграма відображає середнє значення нормалізованої інтенсивності сигналу преципітованого ITSN1_{SH3-box}-GST та GRB2-GST

3.2.2.2. 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 неструктуровані ділянки, за рахунок чого він проявляє тенденцію до гомодимеризації і олігомеризації (96, 97). Неструктуровані N- та С-кінцеві ділянки білка SAM68 можуть вносити значний вклад в агрегацію білка *in vitro*.

Оскільки проліновий мотив P0 SAM68, який взаємодіє із ITSN1, знаходиться поряд із RG-мотивами, ми припустили, що ITSN1 може запобігати агрегації SAM68. Тому ми перевірили можливий вплив ITSN1 на агрегацію SAM68 *in vitro*. Для цього було проведено оцінку седиментації рекомбінантного білка SAM68-His при різних концентраціях очищеного ITSN1_{SH3-box}-GST за допомогою центрифугування суміші білків. Вміст білків у преципітаті та супернатанті було перевірили методом електрофорезу в

ПААГ. За відсутності та при низьких концентраціях ITSN1_{SH3-box}-GST білок SAM68-His майже повністю перебував в осаді після центрифугування. Але при високих концентраціях ITSN1_{SH3-box}-GST частка SAM68-His у преципітаті зменшувалась, тоді як його кількість у супернатанті зростала (рис. 3.21.).

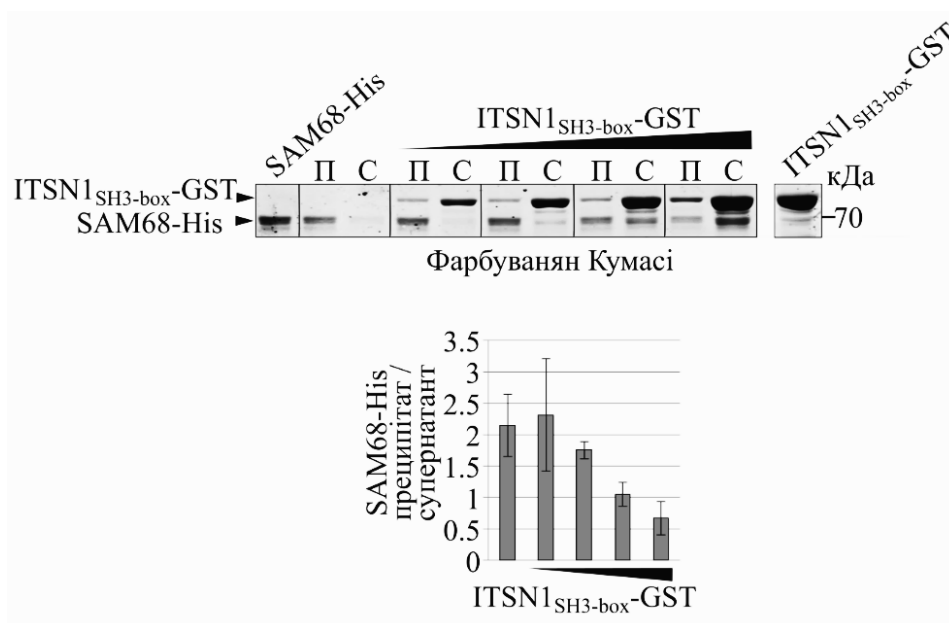


Рис. 3.21. Аналіз седиментації білка SAM68 у присутності ITSN1. Рекombінантний білок SAM68-His інкубували із ITSN1_{SH3-box}-GST та осаджували за допомогою центрифугування. Обидві фракції (преципітат та супернатант) було розділено електрофоретично та візуалізовано за допомогою фарбування Кумасі. П – преципітат, С – супернатант

Оскільки для деяких РНК-зв'язуючих білків показано, що наявність РНК знижує рівень їх агрегації, було проаналізовано рівень седиментації SAM68 за наявності мРНК. Для цього SAM68-His інкубували із очищеною мРНК гена люциферази та осаджували за допомогою центрифугування. У присутності мРНК частка SAM68-His в преципітаті знижується (рис. 3.23. в). Подальший аналіз показав, що інкубація комплексів SAM68-His/мРНК із ITSN1_{SH3-box}-GST також підвищує розчинність SAM68-His (рис. 3.22. б). Отримані результати вказують на те, що мРНК і ITSN1 перешкоджають агрегації SAM68 *in vitro*.

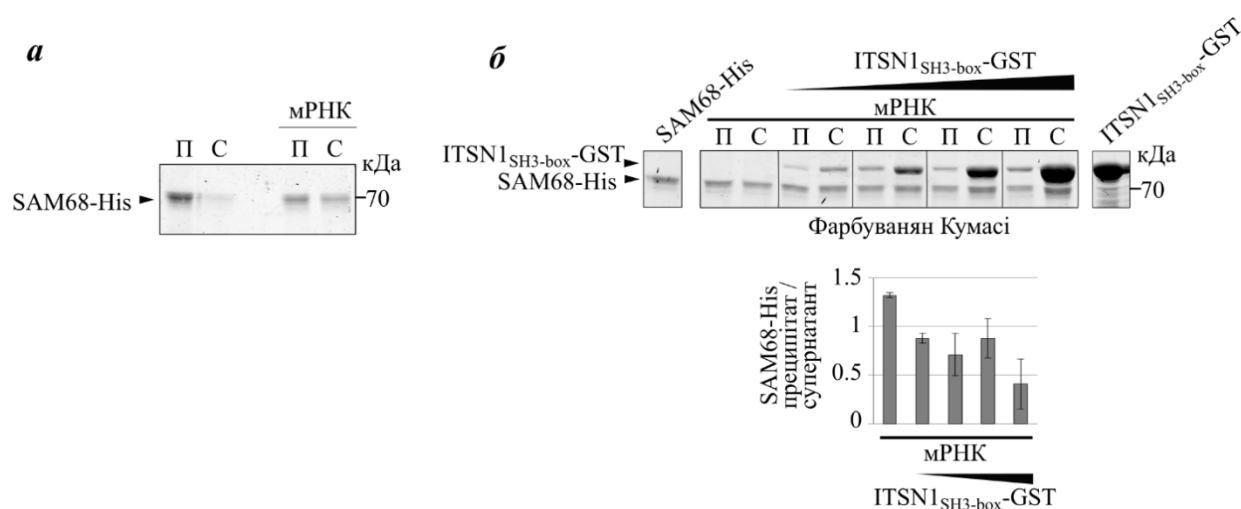


Рис. 3.22. Аналіз седиментації білка SAM68 у присутності мРНК та ITSN1. Реконбінантний SAM68-His було інкубовано із мРНК (а) або мРНК та ITSN1_{SH3-box}-GST (б) і осаджено за допомогою центрифугування. Обидві фракції (преципітат та супернатант) було розділено електрофоретично та візуалізовано за допомогою фарбування Кумасі. П – преципітат, С – супернатант

3.2.2.3. 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. З цією метою очищений реконбінантний білок SAM68-His інкубували із мРНК гена люцифрази, синтезованою *in vitro*. Виявили, що SAM68 взаємодіє із РНК та формує великі агрегати, які залишаються у лунках агарозного гелю (рис. 3.23. а).

Для перевірки потенційного впливу SH3 доменів ITSN1 на формування агрегатів SAM68-РНК ми провели аналіз електрофоретичної рухливості РНК в присутності реконбінантних білків SAM68-His та ITSN1_{SH3-box}-His. Наявність SH3 доменів ITSN1 не вплинуло на формування малорозчинних агрегатів SAM68-мРНК, так як ці комплекси були присутні у лунках

агарозного гелю. Натомість було виявлено зміну рухливості вільної мРНК, що свідчило про потенційний вплив тандему SH3 доменів ITSN1 (рис. 3.23. б).

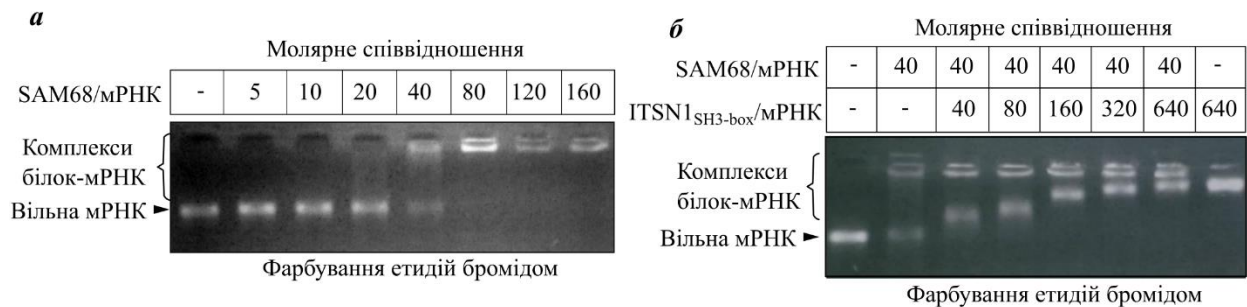


Рис. 3.23. Аналіз електрофоретичної рухливості мРНК в присутності рекомбінантних білків SAM68 та ITSN1_{SH3-box}. мРНК гена люциферази, синтезовану в системі *in vitro*, було інкубовано із відповідними очищеними рекомбінантними білками, розділено за допомогою гель-електрофорезу та візуалізовано з використанням етидій броміду. *а* – зміна електрофоретичної рухливості мРНК в присутності рекомбінантного білка SAM68-His. *б* – зміна електрофоретичної рухливості мРНК в присутності рекомбінантних білків SAM68-His та ITSN1_{SH3-box}-His

Інкубація рекомбінантного білка ITSN1_{SH3-box}-His із мРНК гена люциферази призводила до зміни її електрофоретичної рухливості, що свідчило про пряму взаємодію із SH3 доменами ITSN1 (рис. 3.24.).

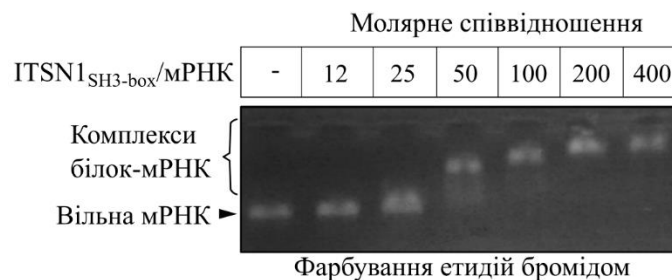


Рис. 3.24. Аналіз електрофоретичної рухливості мРНК в присутності рекомбінантного білка ITSN1_{SH3-box}. мРНК гена люциферази було інкубовано із очищеним рекомбінантним білком ITSN1_{SH3-box}-His. Комплекси білок-мРНК було розділено за допомогою гель-електрофорезу та візуалізовано з використанням етидій броміду

3.2.2.4. Аналіз комплексів мРНК-білок за допомогою атомно-силової мікроскопії. Для більш детального вивчення взаємодії SH3 доменів ITSN1 із мРНК було використано метод атомно-силової мікроскопії, що дозволяє візуалізувати макромолекулярні комплекси утворені білками та нуклеїновими кислотами. Такі комплекси наносяться на поверхню тонкого зрізу слюди та скануються за допомогою тонкої голки. Переміщення зразка відбувається за допомогою п'єзокристалу, тоді як відхилення голки, що індукуються нерівною поверхнею зразка, фіксуються лазером на фотодетекторі.

В даному випадку атомно-силову мікроскопію використовували для візуалізації мРНК гена люцифрази в комплексі із очищеним ITSN1_{SH3-box}-His.

Ми показали, що ITSN1_{SH3-box} формує комплекси із мРНК, про що свідчить дифузна локалізація білка на молекулах мРНК (рис. 3.25.). Це підтверджує результати електрофоретичної рухливості мРНК за умов присутності ITSN1_{SH3-box}.

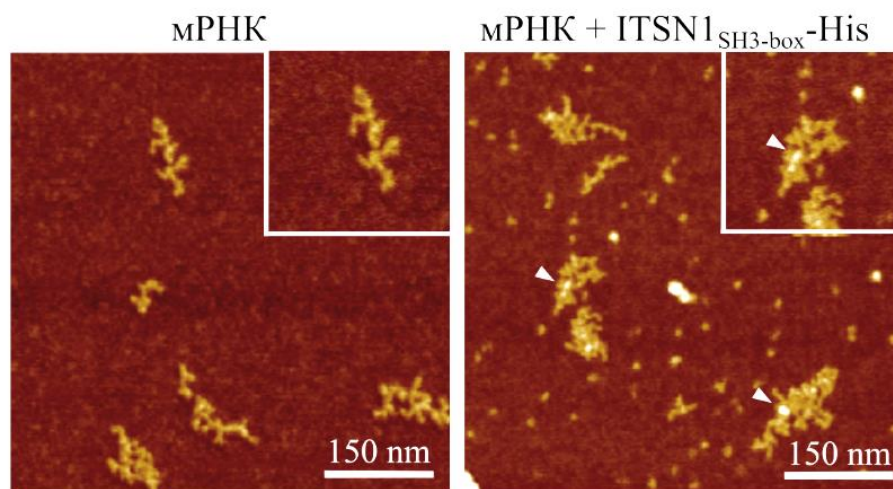


Рис. 3.25. Аналіз комплексів мРНК-ITSN1_{SH3-box} за допомогою атомно-силової мікроскопії. мРНК гена люцифрази було інкубовано із очищеними рекомбінантними ITSN1_{SH3-box}-His та іммобілізовано на адсорбційній поверхні для подальшого аналізу. Стрілками відзначено точки локалізації ITSN1_{SH3-box}-His на мРНК

Статистичний аналіз максимальної висоти макромолекулярних структур показав достовірну різницю між вільною мРНК та комплексами мРНК-ITSN1_{SH3-box} (рис. 3.26.). Отримані результати корелюють із даними, отриманими в ході аналізу зміни електрофоретичної рухливості мРНК за умов присутності ITSN1, підтверджуючи факт взаємодії SH3 доменів ITSN1 із мРНК.

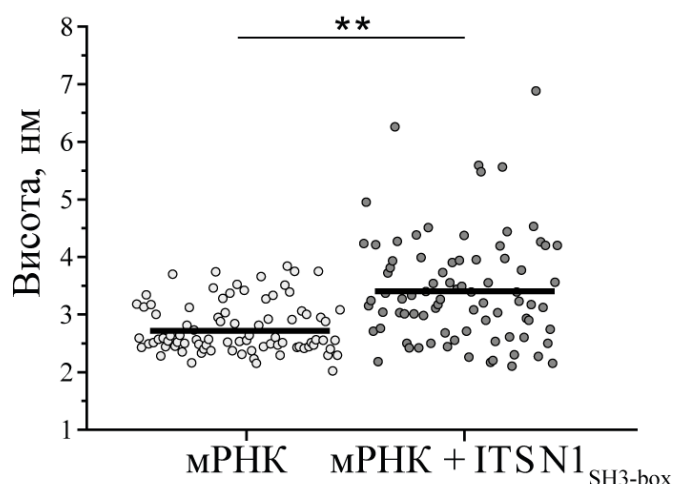


Рис. 3.26. Порівняльний аналіз максимальної висоти мРНК та комплексів мРНК-ITSN1_{SH3-box}, отриманих за допомогою атомно-силової мікроскопії. Статистичний аналіз: *t*-тест, ** $p < 0.005$

3.2.2.5. 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 очищених GST-злитих SH3 доменів ITSN1. Лише SH3D домен ITSN1 і тандем п'яти SH3 доменів спричиняв зсув електрофоретичної рухливості мРНК гена люциферази (рис. 3.27. а). Зміна електрофоретичної рухливості мРНК в присутності SH3D домену ITSN1 залежала від концентрації останнього (рис. 3.27. б).

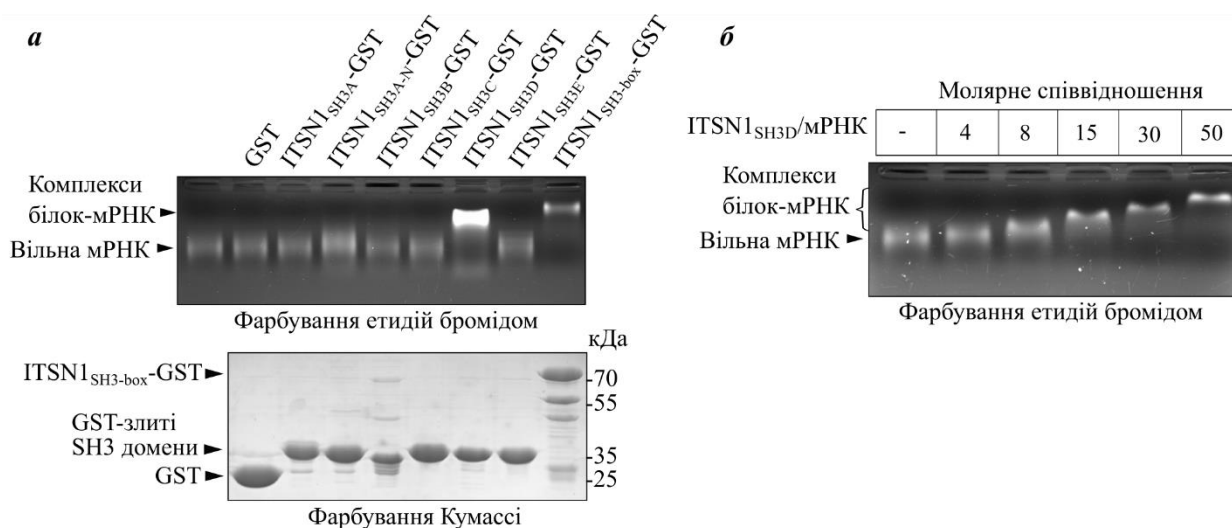


Рис. 3.27. Аналіз електрофоретичної рухливості мРНК в присутності рекомбінантних SH3 доменів ITSN1. *а* – мРНК гена люциферази було інкубовано із окремими очищеними SH3 доменами та тандемом SH3 доменів ITSN1, злитими із GST. Очищений білок візуалізували за допомогою ПААГ. *б* – мРНК гена люциферази було інкубовано із очищеним рекомбінантним GST-злитим SH3D доменом ITSN1. Комплекси білок-мРНК розділяли в агарозному гелі та візуалізували з використанням етидій броміду

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

На наступному етапі ми отримали 2D ЯМР спектр ^{13}N -міченого білка SH3D-His за умов присутності коротких одноланцюгових молекул ДНК – CA₆ (шість повторів CA) та T₁₂ (дванадцять повторів T). В ході порівняльного аналізу спектрів вільного білка та зв'язаного із олігодезоксирибонуклеотидами було виявлено значні хімічні зсуви кількох амінокислотних залишків, що відображається у вигляді зміщень відповідних ЯМР-піків (рис. 3.28.). Відмінності між хімічними зсувами спектрів комплексів SH3D-CA₆ та SH3D-T₁₂ вказують на наявність селективності та

специфічності домену SH3D щодо нуклеотидної послідовності одноланцюгової ДНК та РНК.

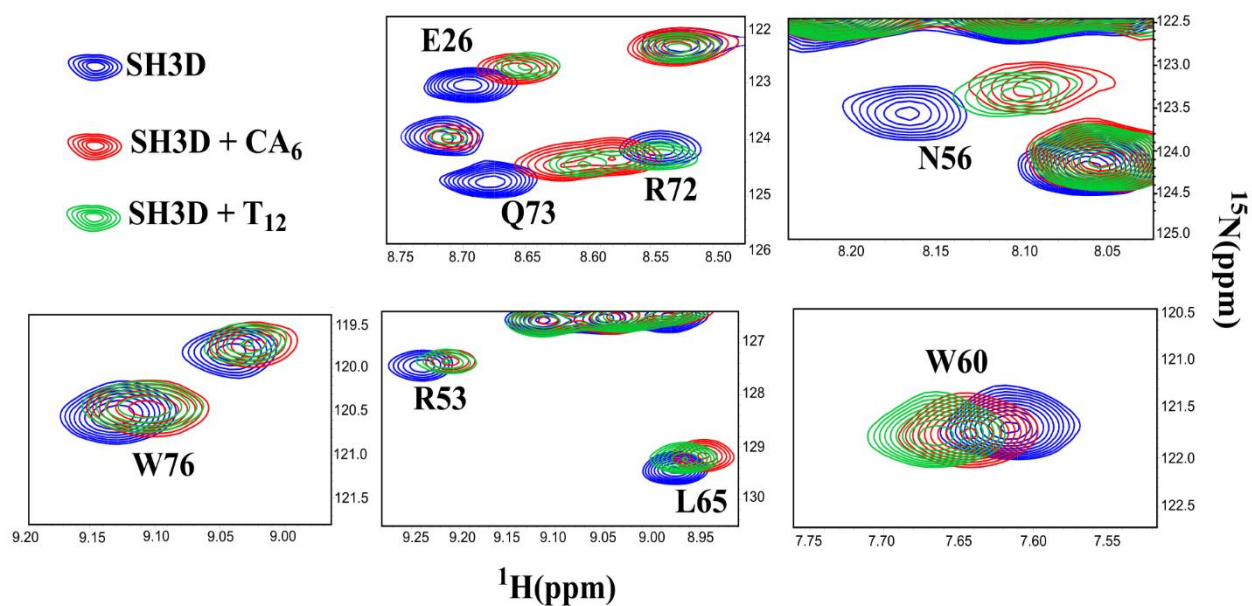


Рис. 3.28. Двовимірний ^1H - ^{15}N ЯМР-спектр вибраних амінокислотних залишків SH3D домену ITSН1 за умов присутності одноланцюгових олігодезоксинуклеотидів CA_6 та T_{12} . Показано вісім залишків, які характеризувались найбільш значним хімічним зсувом ЯМР спектру

На наступному етапі ми провели картування відповідних амінокислотних залишків із найбільш значними хімічними зсувами використовуючи уже відому просторову структуру домену SH3D ITSН1 (ідентифікатор PDB – 6GBU) (рис. 3.29.). Ці амінокислотні залишки, які представлені переважно позитивно-зарядженими та гідрофобними амінокислотами, розташовуються на поверхні домену між трьома неструктурованими петлями. Ми припустили, що ідентифіковані залишки формують поверхню, що забезпечує взаємодію із нуклеїновими кислотами, зокрема одноланцюговою ДНК та РНК.

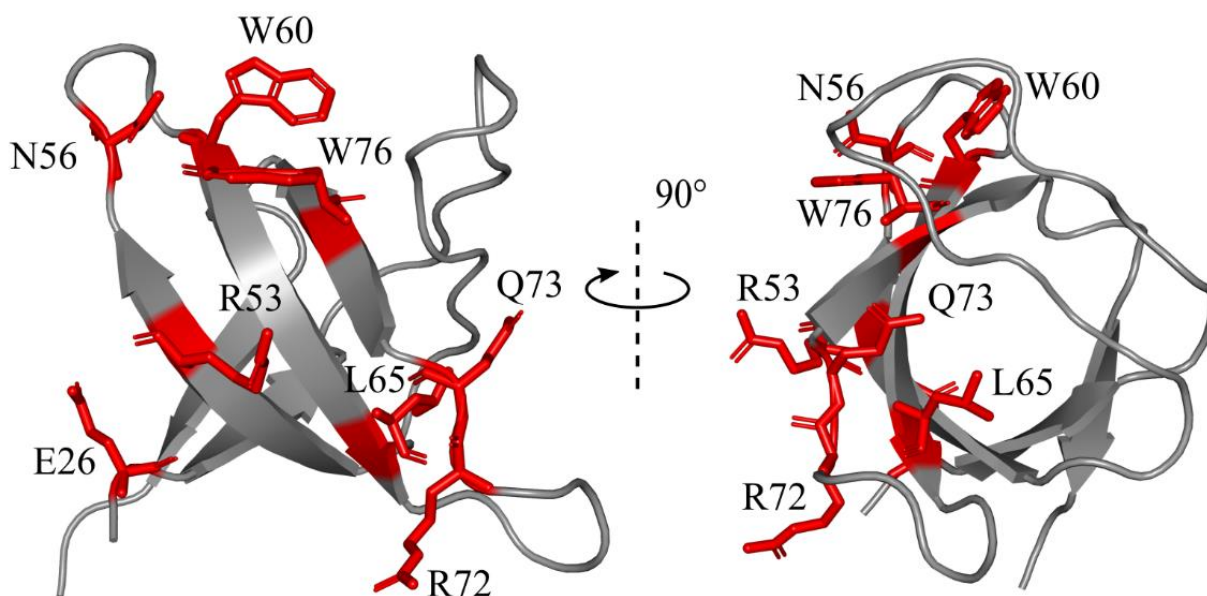


Рис. 3.29. Просторова структура домену SH3D ITSN1 (PDB ідентифікатор – 6GBU). Виділено та позначено амінокислотні залишки, які характеризувались найбільш значним хімічним зсувом ЯМР спектру за умов присутності олігодезоксинуклеотидів

Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей п'яти SH3 доменів ITSN1 виявив, що ідентифіковані залишки, які можуть брати участь у зв'язуванні РНК, відсутні або не є консервативними у відповідних позиціях інших чотирьох доменів SH3 ITSN1 (рис. 3.30. *a*). Натомість ми виявили майже абсолютну ідентичність цих залишків між доменами SH3D ITSN1 та ITSN2 (рис. 3.30. *b*). Високий рівень консервативності даних амінокислотних залишків та цілого домену SH3D спостерігався також в амінокислотних послідовностях домену SH3D ITSN1 хребетних та ITSN безхребетних (рис. 3.30. *в*). Ці залишки є абсолютно консервативними в SH3D домені ITSN1 хордових тварин. Високий рівень консервативності залишків, що знаходяться як у структурованих ділянках, так і в петлях вказує на їх важливе функціональне значення, зокрема на їх можливу участь у взаємодії із нуклеїновими кислотами.

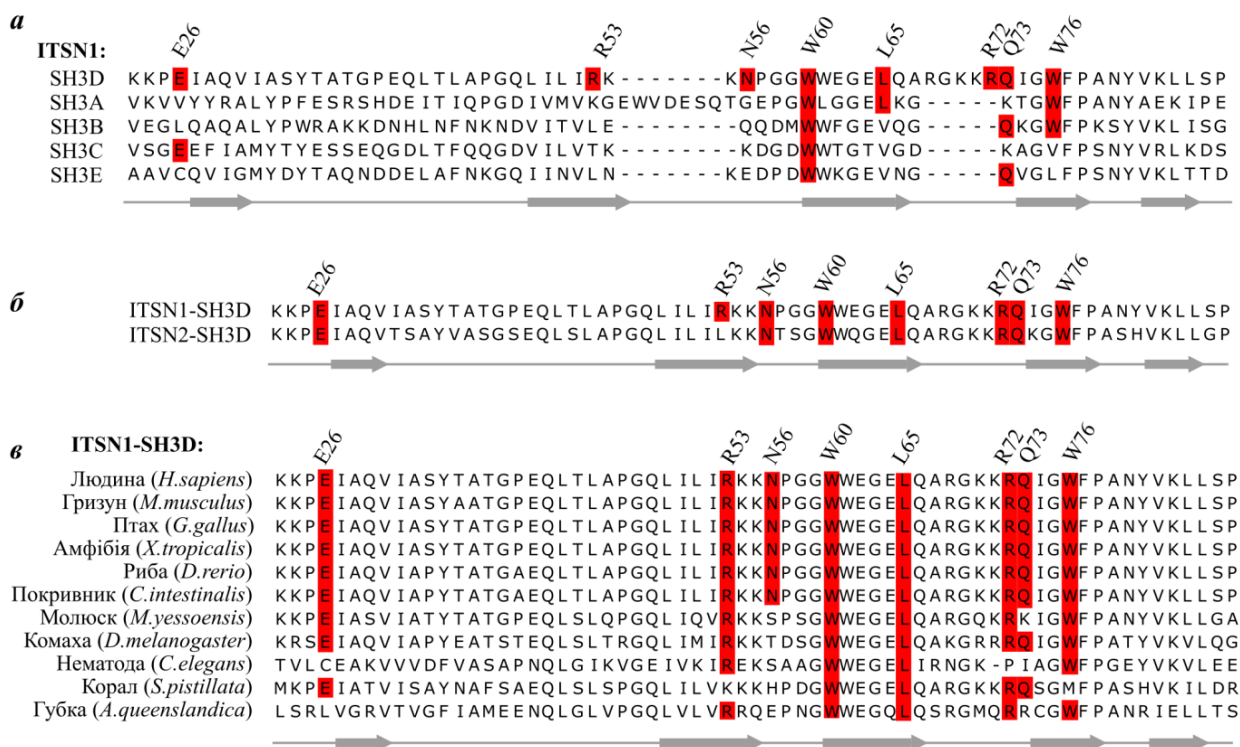


Рис. 3.30. Аналіз консервативності амінокислотних залишків домену SH3D, які характеризувались найбільш значимим хімічним зсувом ЯМР спектру. Вирівнювання амінокислотних послідовностей: *a* – п'ять доменів SH3 ITSN1; *b* – домени SH3D ITSN1 та ITSN2; *в* – домени SH3D ITSN1 хребетних та ITSN безхребетних тварин

Отримані результати вказують на те, що SH3D домен ITSN1 може взаємодіяти із нуклеїновими кислотами (РНК та одноланцюговою ДНК), що може бути важливим для взаємодії ITSN1 із РНК-зв'язуючими білками та регуляції їх функцій.

3.2.2.6. Вплив ITSN1 на формування SAM68-специфічних ядерних тілець у клітинах HeLa. Відомо, що SAM68 характеризується дифузною локалізацією в ядрі. В деяких трансформованих лініях клітин (наприклад, HeLa) цей білок формує SAM68-специфічні ядерні тільця. Оскільки ITSN1 може впливати на розчинність SAM68 *in vitro*, ми перевірили вплив ITSN1 на формування SAM68-специфічних ядерних тілець у клітинах HeLa.

Ми проаналізували накопичення білка SAM68 у ядерних тільцях клітин із нокдауном гена *ITSN1* з використанням двох антисенсових шпилькових РНК – shRNA_{ITSN1}-1 та shRNA_{ITSN1}-2. За допомогою імуноблоту було виявлено значене зниження кількості ITSN1 в клітинах лінії HeLa, що експресували ITSN1-специфічні антисенсові шпилькові РНК (рис. 3.31.).

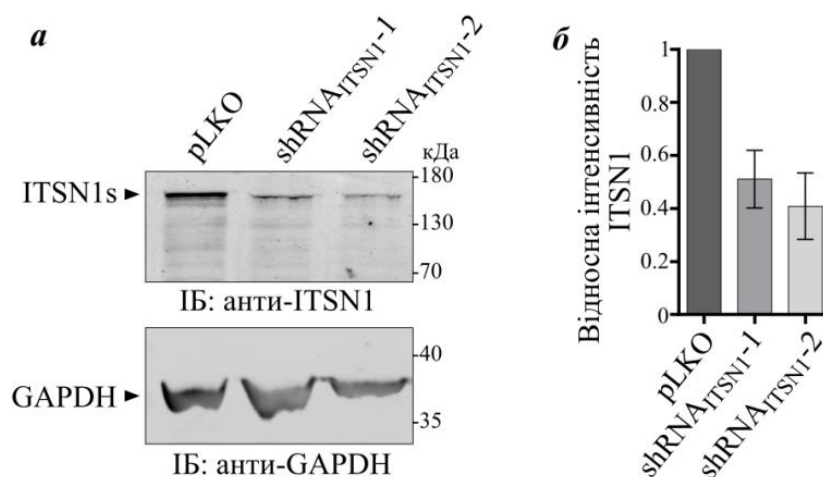


Рис. 3.31. Аналіз ефективності нокдауну гена *ITSN1* в клітинах лінії HeLa. Клітини було інфіковано лентівірусами, які містили конструкції pLKO-shRNA_{ITSN1}-1, pLKO-shRNA_{ITSN1}-2, що кодували короткі шпилькові РНК, специфічні до мРНК ITSN1. В якості контролю використовували клітини, інфіковані лентівірусом, що містив пустий вектор pLKO.1. *a* – 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 ми виявили збільшення інтенсивності флуоресценції SAM68-специфічних тілець у клітинах HeLa з нокдауном гена *ITSN1* (рис. 3.32.). 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.

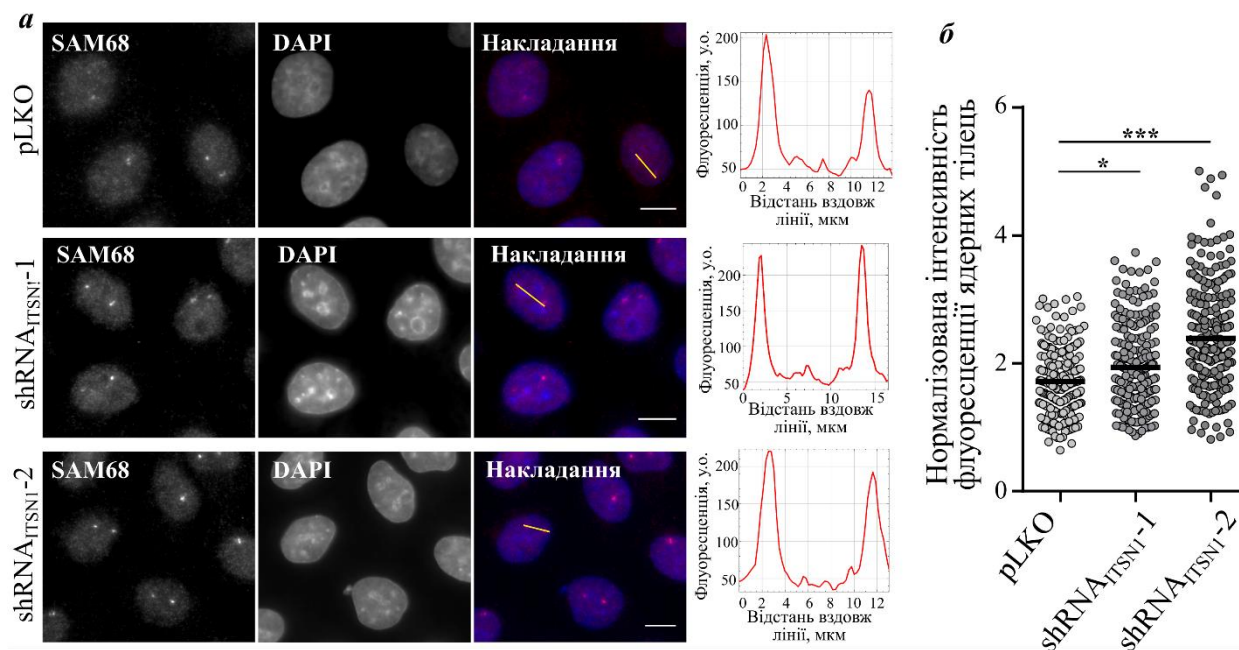


Рис. 3.32. Імунофлуоресцентний аналіз SAM68-специфічних ядерних тілець в клітинах лінії HeLa за умови пригнічення експресії гена *ITSN1*. *a* – клітини було інфіковано відповідними вірусними частками та інкубовано протягом трьох днів. SAM68 візуалізовано за допомогою анти-SAM68 антитіл. Візуалізацію 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, * $p < 0.05$, *** $p < 0.0005$

3.2.2.7. 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, ми здійснили нокдаун *ITSN1* в клітинах HeLa та провели короткотривалу трансфекцію конструкціями, що кодують GFP-злиті *ITSN1*s та делеційну форму *ITSN1*s, в якій відсутній SH3A домен. Оскільки в цьому експерименті було використано *shRNA*_{*ITSN1*-2}, яка специфічно взаємодіє із мРНК *ITSN1* в ділянці, що кодує домен EH1, для відновлення експресії

ITSN1s застосували стійкі до $\text{shRNA}_{\text{ITSN1-2}}$ делеційні фрагменти, де відсутні домени EH1 – $\text{ITSN1}_{\text{S}\Delta\text{EH1}}\text{-GFP}$ та $\text{ITSN1}_{\text{S}\Delta\text{EH1-}\Delta\text{SH3A}}\text{-GFP}$ (рис. 3.33.).

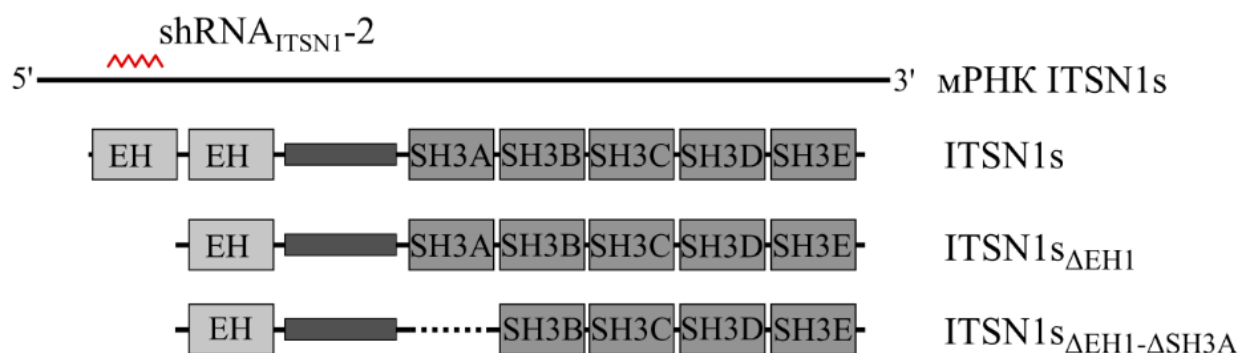


Рис. 3.33. Схематичне зображення стійких до $\text{shRNA}_{\text{ITSN1-2}}$ делеційних фрагментів ITSN1s використаних для аналізу SAM68-специфічних ядерних тілець в клітинах лінії HeLa

Таким чином, в клітинах лінії HeLa було проведено пригнічення експресії ендogenous ITSN1 та здійснено експресію зазначених делеційних фрагментів ITSN1s, мічених GFP, за допомогою трансфекції відповідними конструкціями. За допомогою флуоресцентної мікроскопії ми виявили, що цитоплазматична локалізація рекомбінантних білків $\text{ITSN1}_{\text{S}\Delta\text{EH1}}\text{-GFP}$ (рис 3.34. б, верхня трансфікована клітина) та $\text{ITSN1}_{\text{S}\Delta\text{EH1-}\Delta\text{SH3A}}\text{-GFP}$ (рис 3.34. в, верхня трансфікована клітина) не впливала на формування SAM68-специфічних ядерних тілець. Натомість накопичення $\text{ITSN1}_{\text{S}\Delta\text{EH1}}\text{-GFP}$ у ядрах призводила до дисоціації SAM68-специфічних ядерних тілець і, відповідно, до зменшення інтенсивності їх флуоресценції (рис 3.34. б, нижня трансфікована клітина). SAM68-специфічні ядерні тільця зберігались у клітинах, в ядрах яких накопичувався рекомбінантний білок $\text{ITSN1}_{\text{S}\Delta\text{EH1-}\Delta\text{SH3A}}\text{-GFP}$ (рис 3.34. в, нижня трансфікована клітина), що вказує на участь SH3A домену ITSN1 в регуляції формування SAM68-специфічних тілець.

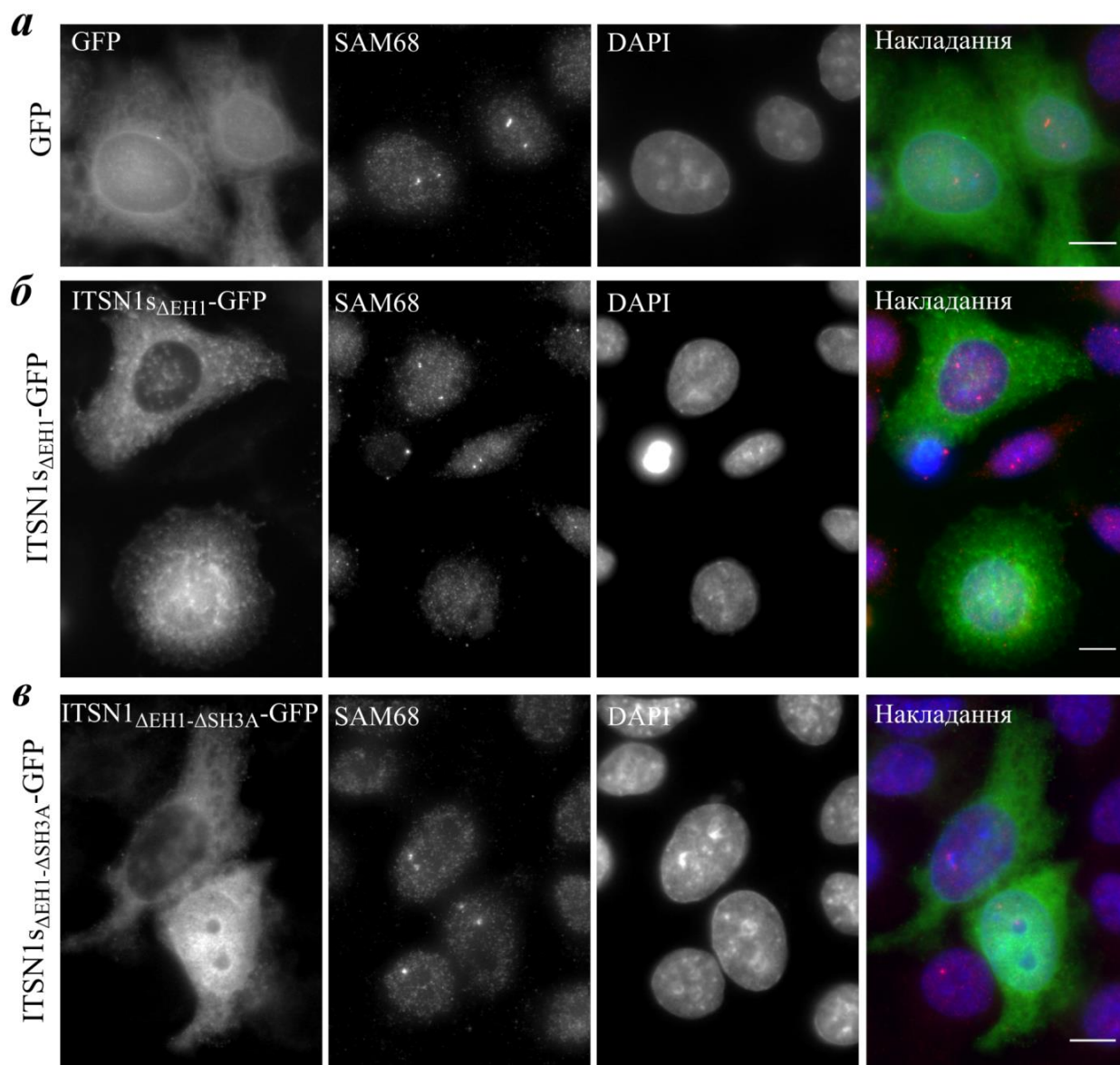


Рис. 3.34. Імунофлуоресцентний аналіз SAM68-специфічних ядерних тілець за умови пригнічення експресії *ITSN1* та надекспресії делеційних фрагментів *ITSN1s*-GFP. Після нокадауну гена *ITSN1* за допомогою антисенсової РНК (pLKO-shRNA_{ITSN1}-2) клітини було трансфіковано конструкціями, що кодували GFP (контроль), *ITSN1*_{ΔEH1}-GFP або *ITSN1*_{ΔEH1-ΔSH3A}-GFP. SAM68 візуалізовано за допомогою анти-SAM68 антитіл, ядра – за допомогою DAPI

Аналіз інтенсивності флуоресценції SAM68 за умов синтезу делеційних фрагментів *ITSN1s*-GFP показав наявність негативної кореляції між значенням ядерно-цитоплазматичного (Я/Ц) співвідношення *ITSN1*_{ΔEH1}-GFP

та накопиченням SAM68 у ядерних тільцях в клітинах HeLa. Таку кореляцію не спостерігали у клітинах, трансфікованих конструкцією, що кодувала рекомбінантний білок ITSN1s_{ΔЕН1-ΔSH3A}-GFP (рис. 3.35.).

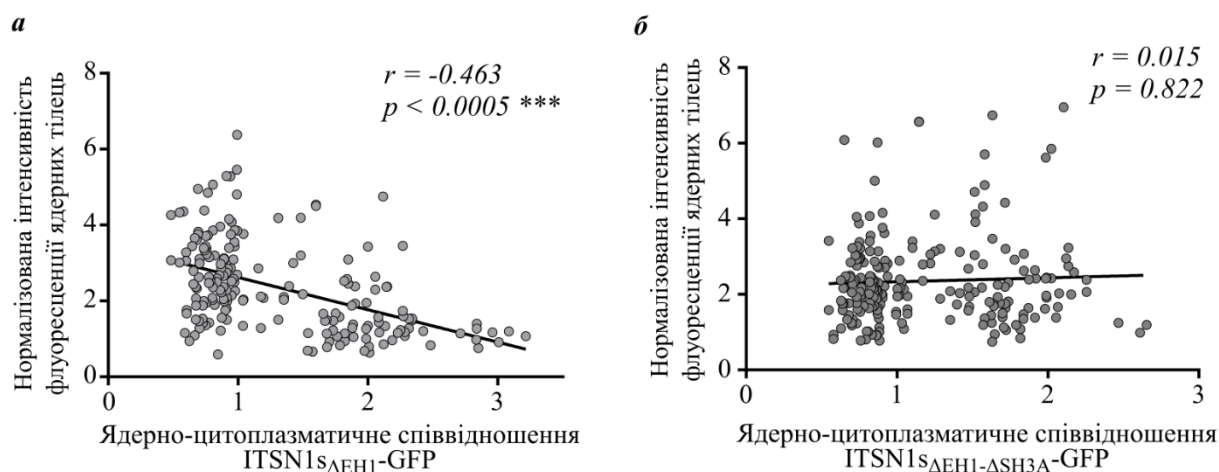


Рис. 3.35. Аналіз кореляції між інтенсивністю флуоресценції ядерних тілець SAM68 та ядерно-цитоплазматичним співвідношенням GFP-злитих делеційних фрагментів ITSN1s у клітинах HeLa. Точкові діаграми відображають взаємозв'язок між нормалізованим максимальним рівнем флуоресценції SAM68 та ядерно-цитоплазматичним співвідношенням ITSN1s_{ΔЕН1}-GFP (а) або ITSN1s_{ΔЕН1-ΔSH3A}-GFP (б) в ядрі. Коефіцієнти кореляції та їх статистична достовірність зазначені на діаграмах

Статистичний аналіз виявив достовірну відмінність між показниками інтенсивності флуоресценції SAM68-специфічних ядерних тілець в клітинах із ядерною локалізацією ITSN1s_{ΔЕН1}-GFP та ITSN1s_{ΔЕН1-ΔSH3A}-GFP ($Я/Ц \geq 1$). Статистично достовірну різницю було також виявлено і між інтенсивністю флуоресценції SAM68-специфічних ядерних тілець у клітинах, де ITSN1s_{ΔЕН1}-GFP накопичувався в ядрі ($Я/Ц \geq 1$), та клітинах, де цей білок локалізувався переважно у цитоплазмі ($Я/Ц \leq 1$). Такої відмінності не спостерігалось у клітинах із ITSN1s_{ΔЕН1-ΔSH3A}-GFP, в яких середня інтенсивність флуоресценції ядерних тілець була майже однаковою із тим же показником у контрольних клітинах із GFP (рис. 3.36.).

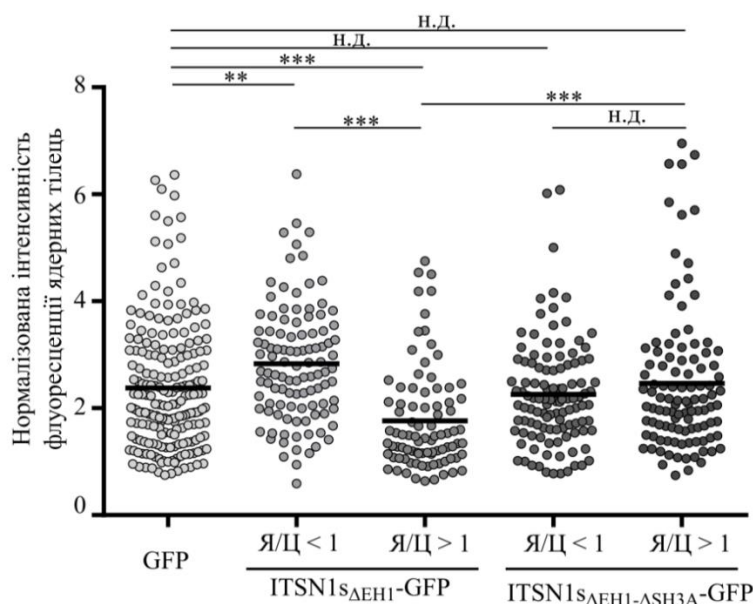


Рис. 3.36. Статистичний аналіз інтенсивності флуоресценції SAM68-специфічних ядерних тілець у клітинах HeLa за умов нокдауну *ITSN1* та трансфекції конструкціями, що кодували GFP, ITSN1_{ΔSH3A}-GFP або ITSN1_{ΔSH3A}-GFP. Точкова діаграма відображає нормалізовану інтенсивність флуоресценції SAM68-специфічних ядерних тілець у відповідних зразках та клітинах. Я/Ц – ядерно-цитоплазматичне співвідношення GFP-злитих білків у трансфікованих клітинах. Статистичний аналіз: *t*-тест, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$

3.2.2.8. Роль мотиву P0 у накопиченні SAM68 в ядерних тільцях. Оскільки ми виявили, що SH3A домен ITSN1 та проліновий мотив P0 SAM68 опосередковують взаємодію цих білків, на наступному етапі було проаналізовано роль пролінового мотиву P0 у накопиченні SAM68 в ядерних тільцях. Для цього клітини HeLa трансфікували конструкціями, які кодували злиті із GFP повнорозмірний SAM68 та його делеційний фрагмент SAM68_{ΔP0}, де відсутній N-кінцевий проліновий мотив P0.

Аналіз клітинної локалізації зазначених рекомбінантних білків за допомогою флуоресцентної мікроскопії показав, що як SAM68-GFP, так і SAM68_{ΔP0}-GFP локалізувались у ядерних тільцях. Але видалення N-кінцевого пролінового мотиву призвело до зростання кількості SAM68 у ядерних

тілцях, оскільки інтенсивність флуоресценції SAM68 Δ P0-GFP у них є вищою, ніж інтенсивність повнорозмірного SAM68-GFP, що підтверджується результатами статистичного аналізу (рис. 3.37.).

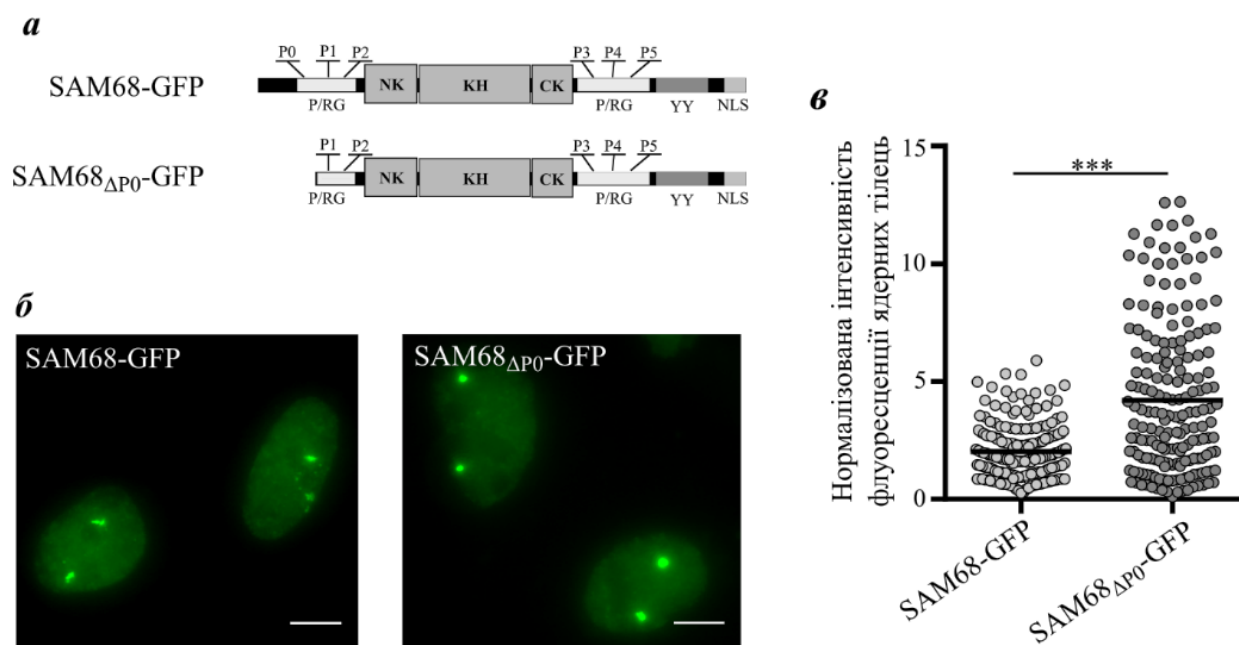


Рис. 3.37. Вплив пролінового мотиву P0 на рівень накопиченні білка SAM68 у ядерних тілцях в клітинах лінії HeLa. *a* – схематичне зображення повнорозмірного білка SAM68 та делеційного фрагменту SAM68 Δ P0; *б* – флуоресцентний аналіз клітин HeLa, трансфіковані конструкціями, що кодували SAM68-GFP та SAM68 Δ P0-GFP; *в* – точкова діаграма, що відображає нормалізовану інтенсивність флуоресценції ядерних тілець, утворених відповідними рекомбінантними білками

Отже, що проліновий мотив P0 білка SAM68 бере участь у формування ядерних тілець SAM68. Таким чином, отримані результати підтверджують, що взаємодія між ITSN1 та SAM68, яка опосередковується доменом SH3A та проліновим мотивом P0, зменшує формування SAM68-специфічних ядерних тілець.

3.2.2.9. Аналіз співлокалізації SAM68-специфічних ядерних тілець із ITSN1 та мРНК в клітинах HeLa. Оскільки як ITSN1, так і мРНК запобігають агрегації SAM68 *in vitro*, а ITSN1 стимулює дисоціацію SAM68 специфічних тілець у ядрах клітин HeLa, за допомогою імуофлуоресцентної мікроскопії ми проаналізували співлокалізацію ITSN1 та мРНК із SAM68-специфічними ядерними тільцями. Використовуючи антитіла, специфічні до ITSN1 та SAM68, ми виявили, що ITSN1 не локалізується у ядерних тільцях, збагачених SAM68 (рис.3.38. *а*). Використовуючи флуоресцентні полі(Т) зонди, які зв'язуються із мРНК, було показано відсутність дозрілої мРНК у SAM68-специфічних ядерних тільцях (рис. 3.38. *б*).

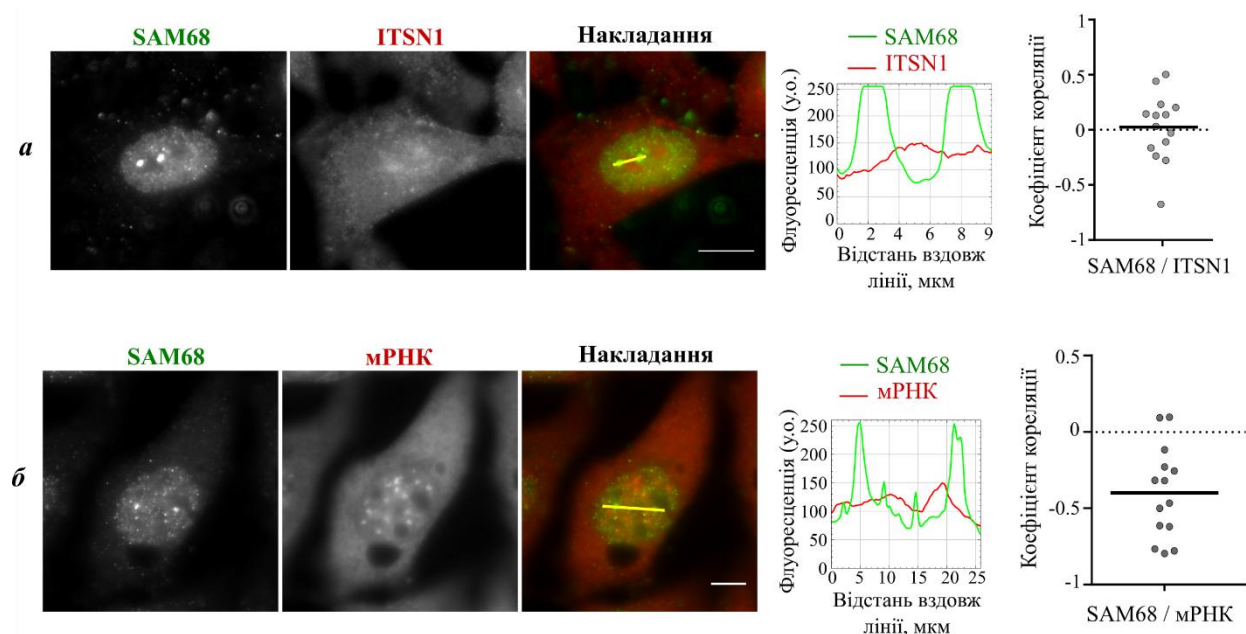


Рис. 3.38. Імуофлуоресцентний аналіз співлокалізації ITST1 та мРНК із SAM68-специфічними ядерними тільцями у клітинах лінії HeLa. Візуалізацію ендogenous SAM68 проводили за допомогою специфічних антитіл *а* – візуалізацію ITSN1 проводили за допомогою анти-ITSN1 антитіл. *б* – мРНК візуалізували за допомогою Су3-мічених полі(Т) зондів. Масштаб – 20 мкм. Графіки відображають відносний рівень флуоресценції вздовж лінії на відповідній мікрофотографії. Точкові діаграми відображають коефіцієнти кореляції відповідних флуоресцентних сигналів

Це спостереження корелює із результатами в клітинах та *in vitro*, які вказують на те, що ITSNI та мРНК можуть пригнічувати агрегацію SAM68. Таким чином, відсутність значної кількості ITSNI та мРНК у SAM68-специфічних ядерних тільцях узгоджується із утворенням агрегатів SAM68.

3.2.2.10. Аналіз впливу ITSNI на процеси сплайсингу, що опосередковуються білком SAM68. Відомо, що однією із найважливіших функцій білка SAM68 у клітині є регуляція альтернативного сплайсингу мРНК деяких генів. Зокрема було показано, що SAM68 модулює альтернативний сплайсинг пре-мРНК генів *BCL-X*, *CD44*, *AR-V*, *SMN2*, *NRX1*, *mTOR*, *SRSF1*, *CCND1*, *BIRC5* та інших. Тому з метою подальшої характеристики взаємодії між ITSNI та SAM68 в клітині ми проаналізували SAM68-залежні події альтернативного сплайсингу за умов нокдауну ITSNI в клітинах лінії HeLa.

Ефективність нокдауну ITSNI в клітинах лінії HeLa оцінювали за допомогою кількісної ПЛР в реальному часі. Для цього з клітин HeLa, що експресували pLKO-shRNA_{ITSNI-1} або pLKO-shRNA_{ITSNI-2}, було екстраговано тотальну РНК та отримано комплементарну кДНК, яку використовували у кількісній ПЛР. Відносний рівень експресії *ITSNI* в клітинах лінії HeLa оцінювали за допомогою методу $\Delta\Delta C_T$ (168) з використанням даних експресії GAPDH для нормалізації.

В клітинах лінії HeLa, що експресували антисенсові шпилькові РНК, спостерігалось статистично достовірне зниження рівня експресії гена *ITSNI* приблизно на 50% порівняно з контрольними клітинами, інфікованими порожнім вектором pLKO (рис. 3.44.). Ці дані відповідають результатам, отриманих за допомогою Вестерн-блот аналізу, де було також показано двократне зниження продукції ITSNIs за умов пригнічення експресії його гена за допомогою коротких шпилькових РНК (рис. 3.39.).

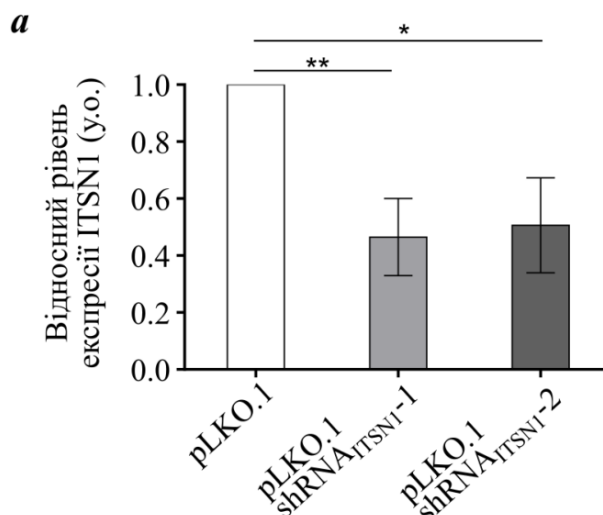


Рис. 3.39. Аналіз ефективності нокдауну гена *ITSN1* в клітинах лінії HeLa з використанням коротких шпилькових антисенсових РНК. Діаграма відображає відносний рівень експресії *ITSN1* у клітинах HeLa, інфікованих відповідними вірусними частками. Відносний рівень експресії було оцінено за допомогою кількісної ПЛР з використанням методу $\Delta\Delta C_T$. Експресія GAPDH було використано для нормалізації. Статистичний аналіз: *t*-тест, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

Далі, використовуючи кількісну ПЛР в реальному часі, ми проаналізували зміни SAM68-залежних подій альтернативного сплайсингу за умов пригнічення експресії гена *ITSN1*. Було відібрано п'ять подій альтернативного сплайсингу, які, як відомо з даних літератури, підлягають специфічній регуляції білком SAM68: 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*); видалення із дозрілого транскрипту екзона 7 генів *SMN1/SMN2* (*SMN1/2s*). Перелік подій сплайсингу, які аналізували в експерименті, та їх функціональна роль в клітині зазначено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2.

Схематичне зображення подій сплайсингу, які модулюються білком SAM68. Червоним кольором позначено транскрипти, утворення яких стимулюється SAM68, та їх функціональне значення. Стрілки позначають місця зв'язування праймерів, що використовувались у кількісній ПЛР для оцінки рівня експресії кожного із транскриптів.

Ген	Подія сплайсингу	Схема сплайсингу	Ефект
<i>BCLX</i>	видалення екзону 2s		Апоптоз
<i>CD44</i>	включення екзону v5		Міграція
<i>CCND1A</i>	включення інтрону 4		Активация клітинного циклу
<i>SRSF1</i>	включення інтрону 3		Епітеліально мезенхімальний перехід
<i>SMN2</i>	видалення екзону 7		Спінальна м'язова атрофія

Для характеристики подій альтернативного сплайсингу було визначено співвідношення умовного рівня експресії обох ізоформ кожного гена. Отримані показники було нормалізовано до контрольних клітин, що були інфіковані вірусом із вектором pLKO. Таким чином, зростання нормальзовного значення порівняно із контрольними клітинами свідчило про активацію SAM68-опосередкованого сплайсингу, тоді як зниження цього показника характеризувало інгібування події сплайсингу, що залежить від SAM68 (рис. 3.40.).

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%. Також, нокдаун *ITSN1* призвів до статистично достовірного зростання рівня експресії ізоформи *CD44v5* на 20%. В усіх зазначених випадках, клітини, що експресували

shRNA-2 характеризувались більш вираженим ефектом. Більш того, нокдаун *ITSN1* в клітинах лінії HeLa призводив до значного щонайменш двократного зростання рівня експресії прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу *SRSF1-L* порівняно із контрольними клітинами. Ці дані можуть вказувати на значну 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 гена *SRSF1*.

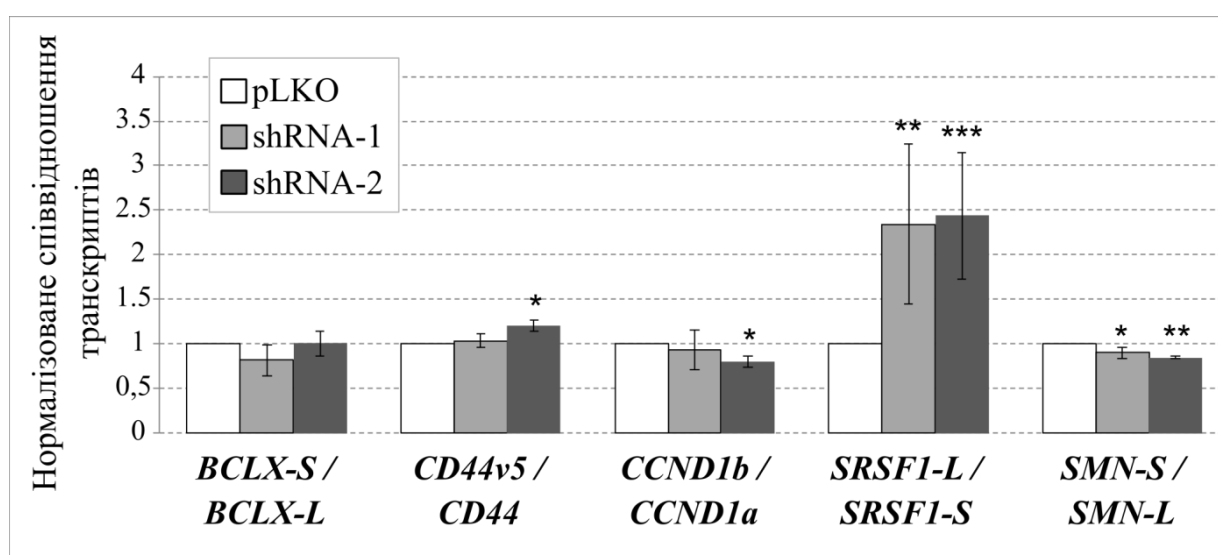


Рис. 3.40. Аналіз впливу нокдауну *ITSN1* на події сплайсингу, які регулюються білком SAM68. Оцінку відносного рівня експресії ізоформ генів *BCLX*, *CD44*, *CCND1*, *SRSF1* та *SMN1/2* проводили за допомогою кількісної ПЛР в реальному часі з використанням специфічних праймерів. Гістограма відображає 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, в цьому розділі дисертаційної роботи підтверджено взаємодію скафолдного білка *ITSN1* та РНК-зв'язуючого білка SAM68. *ITSN1* та SAM68 взаємодіють *in vitro* та в клітині і співлокалізуються в ядрах клітин лінії HeLa. SH3A домен білка *ITSN1* забезпечує пряму взаємодію із N-

кінцевим проліновим мотивом P0 SAM68. ITSN1 може конкурувати із GRB2 за зв'язування із білком SAM68 *in vitro*. Крім цього, що мРНК та ITSN1 пригнічують утворення агрегатів білка SAM68 *in vitro*, тоді як накопичення ITSN1 у ядрах клітин лінії HeLa корелює із дисоціацією SAM68-специфічних ядерних тілець. SH3A домен ITSN1 та проліновий мотив P0 SAM68 запобігає формуванню ядерних тілець SAM68. Нокаунт гена *ITSN1* в клітинах лінії HeLa призводить до змін подій сплайсингу, які регулюються білком SAM68. Зокрема, ми виявили значне зростання рівня експресії протоонкогенної ізоформи гена *SRSF1*, що вказує на потенційний вплив ITSN1 на функціональну активність SAM68 у ядрі.

Результати досліджень, поданих у підрозділі, опубліковано в працях:

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.
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.
3. Pankivskiy S., Pastré 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.
4. Pankivskiy S., Senchenko N., Busko P., Rynditch A. Effect of scaffold protein ITSN1 on interactions and aggregation properties of RNA-binding protein SAM68. XII Український біохімічний конгрес, 2019, Тернопіль, Україна.
5. Pankivskiy S., Hamon L., Pastré 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.
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.

7. Pankivskyi 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.

8. Бусько П., Паньківський С., С. Кропивко Характеристика взаємодії скафолдного білка ITSN1 з РНК-зв'язуючим білком SAM68. XVII міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки», 2019, Київ.

9. Pankivskyi 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.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

ITSN1 та ITSN2 – еволюційно консервативні білки, які контролюють процеси ендоцитозу, перебудов актинових філаментів та залучені до модуляції активності сигнальних шляхів. Відомо, що порушення експресії ITSN1 та ITSN2 корелює з розвитком певних патологій, зокрема раку та нейродегенеративних захворювань. Таким чином, дослідження структурних та функціональних властивостей білків родини ITSN дає можливість виявляти нові механізми впливу на сигнальні процеси клітини, порушення яких призводить до розвитку патологічних станів. В цій роботі ми виявили функціональний зв'язок ITSN1 із ядерним РНК-зв'язуючим білком SAM68 та проаналізували основні структурні зміни в білках-гомологах ITSN в контексті еволюції еукаріотів.

Відомо, що кілька білків, які контролюють процеси ендоцитозу можуть також локалізуватися у ядрі клітини, де вони виконують специфічні функції (175). Так, близько 5% важкого ланцюга клатрину клітини перебуває у ядрі, де він стимулює р53-залежну транскрипцію за рахунок рекрутування ацетилтрансферази гістонів р300 до р53-залежних генів (176). Білок Eps15 є можливим регулятором транскрипції, що було показано за допомогою репортерного гена GAL4, а також стимулює CRM1-залежний транспорт РНК вірусу імунодефіциту людини у цитоплазму за рахунок взаємодії із експортином HRB (177, 178). Ендоцитозний білок BIN1 зв'язується із онкогеном с-Мус, блокує транскрипцію с-Мус-залежних генів та інгібує трансформацію клітин, викликаючи апоптоз (179). Низка ендоцитозних білків-адаптерів також виявлено у ядрі. Зокрема, білок CALM, який містить домен активації транскрипції, взаємодіє із ядерними транскрипційними

факторами лімфоїдних органів (CATS) (180). Білок β -арестин 1 зв'язується із промотерними ділянками генів *c-fos* та *p27* та рекрутує гістонацетилтрансферазу p300 до транскрипційного фактору CREB, що призводить до підвищення рівня експресії генів *c-fos* та *p27* (181). Адаптер DAB2 виступає негативним регулятором транскрипційного комплексу AP-1(c-Fos/c-Jun) (182), тоді як білок NUMB регулює транскрипцію шляхом запобігання убіквітинувannya та деградації білка p53 за рахунок зв'язування із E3 убіквітинлігазою MDM2 (HDM2) (183). Більш того, деякі рецептори (наприклад, EGFR, HER-2/neu, ErbB-3, ErbB-4, FGFR, IGF1R, VEGFR та ін.), які підлягають інтерналізації шляхом клатрин-опосередкованого ендоцитозу, також можуть транспортуватись в ядро (184).

Попередній аналіз фосфопроотеому ядер клітин HeLa виявив, що фосфорильований білок ITSN1 може локалізуватися у ядрі клітини (185). В цій роботі ми підтвердили факт локалізації як ендogenous, так і рекомбінантного білка ITSN1 у ядрі клітин лінії HeLa. Крім того, результати, описані в дисертаційній роботі корелюють із нещодавно опублікованими даними, які показують, що білок ITSN1 накопичується в клітинах лінії HeLa за нормальних умов та при інгібуванні ядерного експорту за допомогою лептоміцину В (LMB), співлокалізується із ядерною мембраною та ламіном A/C і взаємодіє із імпортином α (IMP α) (51). Авторами також було показано, що фрагменти ITSN1, які містять EH- та SH3-домени, можуть локалізуватися у ядрах клітин HeLa, тоді як SH3 домени, зокрема SH3D домен, який містить функціональний сигнал ядерного імпорту, є необхідними для ядерно-цитоплазматичного транспорту ITSN1 (51), що підтверджує результати, отримані у нашому дослідженні. Зокрема, отримані нами результати вказують на те, що домени EH і тандем SH3 доменів ITSN1 можуть локалізуватись в ядрі клітини. Але фрагменти ITSN1, які містили EH домени локалізувалися у ядрах усіх клітин HeLa, тоді як рекомбінантні білки ITSN1_{CCR-SH3-box} та ITSN1_{SH3-box} локалізувалися в ядрах лише частини клітин. В даному випадку можна припустити, що транспорт SH3 доменів ITSN1 у

ядро може залежати від стану клітини, наприклад, фази клітинного циклу, або ж SH3 домени можуть взаємодіяти із білками, які опосередковують динамічний ядерно-цитоплазматичний транспорт ITSN1, тоді як домени EN не можуть експортуватись із ядра.

Проаналізувавши бази даних білок-білкових взаємодій, ми виявили, що білки родини ITSN можуть взаємодіяти із низкою білків, які залучені у функціонуванні таких ядерних процесів, як дозрівання і транспорт мРНК. В цій роботі було підтверджено взаємодію білків родини ITSN із РНК-зв'язуючими білками SAM68 і LARP6, та частково із WBP11 за умов *in vitro*. Оскільки WBP11 не було преципітовано із лізатів клітин 293 за допомогою антитіл, специфічних до ITSN1 та ITSN2, можна припустити, що ці білки можуть формувати комплекси в інших типах клітин або лише за певних умов. Також ми виявили взаємодію зазначених РНК-зв'язуючих білків із SH3 доменами білків ендоцитозу AMPH1 та BIN1, а також регуляторами ремоделювання актинового цитоскелету CTTN, TKS4 та TKS5. Функціональне значення більшості виявлених взаємодій залишається невідомим. Отримані результати можуть свідчити про взаємозв'язок процесів транспорту РНК із ендоцитозом та перебудовами актинового цитоскелету або відображати неканонічні функції проаналізованих білків. Наприклад, РНК-зв'язуючий білок LARP6 взаємодіє із кількома транскрипційними факторами та забезпечує експорт мРНК колагену I типу із ядра. Надекспресія LARP6 у клітинах раку молочної залози MDA-MB-231 збільшує проліферацію клітин, стимулює формування ламелоподій та активує інвазивність клітин (161). Білок SAM68 може формувати комплекси із актином і віментином та є необхідним для міграції клітин лінії HeLa (186) та ембріональних фібробластів миші (187). Ці дані можуть свідчити про те, що білки LARP6 та SAM68 можуть безпосередньо взаємодіяти із компонентами актинового цитоскелету в клітині та контролювати міграцію клітин. Ядерна локалізація білків BIN1 (179) та CTTN (188) можуть також підтверджувати взаємозв'язок даних білків із SAM68, LARP6 та WBP11.

Наші подальші дослідження були спрямовані на характеристику взаємодії між ITSN1 та SAM68. Використовуючи кілька підходів, ми виявили, що ITSN1 взаємодіє із РНК-зв'язуючим білком SAM68 як *in vitro*, так і в клітині. Аналіз внутрішньоклітинної локалізації ITSN1 та SAM68 у клітинах лінії HeLa виявив, що ці білки співлокалізуються як в ядрі, так і в цитоплазмі клітин лінії HeLa, що може вказувати на пряму взаємодію ITSN1 та SAM68 в обох компартментах клітини. Співлокалізація ITSN1 та SAM68 у ядрі може вказувати на те, що ITSN1 може бути залученим до процесів дозрівання і транспорту РНК, що було показано для інших ендоцитозних білків (175).

Незважаючи на переважну локалізацію SAM68 у ядрі, відомо, що він може також локалізуватися у цитоплазмі та біля плазматичної мембрани, що пов'язано насамперед із його участю у ядерно-цитоплазматичному транспорті мРНК. Наприклад, SAM68 забезпечує транспорт мРНК актину до постсинаптичної мембрани і є необхідним для утворення дендритних шипиків у нейронах гіпокампу (129, 189). Дендритні шипики являють собою актин-збагачені вирости дендритів, які формують постсинаптичні ділянки більшості збудливих синапсів у мозку. Оскільки ITSN1 є одним із регуляторів перебудов актинового цитоскелету, локалізується у зонах формування дендритних шипиків і модулює їх утворення в нейронах гіпокампу (8, 48, 49), можна припустити, що взаємодія цих білків біля плазматичної мембрани нейронів є необхідною для координації біосинтезу актину та формування актинових філаментів. Виявлені взаємодії між SAM68 та білками-регуляторами реорганізації актинового цитоскелету (наприклад, CTTN) та нейрональною ізоформою SH3A домену ITSN1 можуть підтверджувати таке припущення. Враховуючи взаємозв'язок SAM68 та ITSN1 із розвитком кількох нейродегенеративних захворювань, аналіз взаємодії цих білків у нейронах є одним із можливих напрямків подальших досліджень.

Крім того, SAM68 може співлокалізуватись із сигнальними компонентами клітин, асоційованими із плазматичною мембраною, зокрема рецепторами інсуліну та лептину, та регулювати їх активність. Показано, що активація рецепторів цих гормонів стимулює фосфорилування SAM68 по залишках тирозину у різних клітинних лініях (131, 132, 139). Було показано, що SAM68 сприяє активації сигнального шляху PI3K у відповідь на стимуляцію рецепторів лептину та інсуліну, так як нокдаун SAM68 призводить до пригнічення проліферації та росту клітин лінії MCF7 у відповідь на дію відповідних гормонів (139, 141). Отримані нами дані можуть свідчити про потенційний функціональний зв'язок між SAM68 та ITSN1, а також TKS5, TKS4, AMPH, BIN1 і CTTN в контексті регуляції рецептор-опосередкованого сигналіngu у цитоплазмі. В цьому випадку ITSN1 може виступати в ролі скафолда, що рекрутує білок SAM68 до сигнальних протеїнових комплексів асоційованих із мембранними рецепторами.

В ході подальшого аналізу було виявлено, що взаємодія між ITSN1 та SAM68 опосередковується в основному SH3A доменом ITSN1 та N-кінцевою ділянкою білка SAM68, яка містить канонічний проліновий мотив класу II PxxPxR. Оскільки для SH3A домену показана виключна взаємодія із проліновими мотивами цього класу (34), отримані нами експериментальні дані підтверджують канонічне зв'язування SH3A домену ITSN1 із мотивом PPLPHR (а.з. 38-44) білка SAM68, який міститься саме на його N-кінцевій ділянці. Варто зазначити, що попередній аналіз білкових взаємодій з використанням фагового дисплея виявив лише слабку взаємодію між SH3C доменом ITSN1 та SAM68 (103). SH3A домен забезпечує більшість взаємодій ITSN1 із його партнерами, зокрема білками ендоцитозу FCHo, REPS, DNMI/2, SGIP1, DENND1A, сигнальними білками SOS1, CIN85, CBL-B, WNK, PI3K-C2 β та білками-регуляторами перебудов актинових філаментів CdGAP, N-WASP, WIP, CR16 (26, 52). Також було виявлено, що SAM68 взаємодіє із нейрон-специфічною ізоформою SH3A домену ITSN1, що може

підтверджувати взаємодію між ITSN1 та SAM68 у нейронах та їх функціонування у нейрональних процесах.

N-кінцева ділянка білка SAM68 збагачена залишками проліну, аргініну і гліцину та опосередковує його взаємодію із низкою інших білків. Зокрема, ця ділянка опосередковує співлокалізацію SAM68 із агрегатами РНК, збагаченої CGG повторами (148), та є необхідно для регуляції транскрипційної активності білка p53 (190). Крім того, пролінові ділянки, що розташовані на N-кінцевому фрагменті SAM68 взаємодіють із SH3 доменами кіназ родини SRC (HCK, LYN, SRC, YES), регуляторною субодиницею p85 α кінази PI3K та адаптерними білками GRB2, NCK1, FBP21, FBP30 (103, 110). Взаємодія SAM68 із регуляторними білками призводить до його посттрансляційних модифікацій із подальшою зміною активності (142). Наприклад, фосфорилування SAM68 кіназами родини SRC пригнічує його здатність формувати димери, зв'язувати РНК і модулювати сплайсинг (95, 117, 130), тоді як MAPK-опосередковане фосфорилування залишків треоніну та серину SAM68 навпаки призводить до активації білка SAM68 (107, 115, 116). Метилування залишків аргініну на N- та C-кінцевих невпорядкованих ділянках SAM68 метилтрансферазами PRMT1 та PRMT2 пригнічує взаємодію SAM68 із РНК та регулює його клітинну локалізацію та функціональну активність (109, 110, 191, 192). Оскільки сайти посттрансляційних модифікацій та ділянки зв'язування відповідних регуляторних ензимів частково перекриваються із проліновими ділянками SAM68, зокрема на його N-кінці, можна припустити, що взаємодія ITSN1 із SAM68 може модулювати посттрансляційні модифікації білка SAM68, зокрема фосфорилування та метилування.

Взаємодія SAM68 із адаптерними білками, які не володіють ензиматичною активністю також можуть впливати на функціонування SAM68 та регулювати сигнальні процеси клітини. Зокрема, білок SAM68 забезпечує зв'язок сигнального білка GAP із компонентами PI3K та MAPK сигнальних шляхів, а саме p85 PI3K та GRB2-SOS1, за умов активації

інсулінового рецептора (131, 141). В даній роботі було виявлено, що ITSN1 та GRB2 можуть конкурувати за зв'язування із SAM68 *in vitro*. Оскільки ITSN1 та GRB2 беруть участь у регуляції сигнальних шляхів PI3K (3, 31, 68) і MAPK (44, 64, 193) та можуть конкурувати за зв'язування із SAM68, ITSN1 та SAM68 можуть впливати на функцію PI3K та MAPK сигнальних шляхів. Ядерна локалізація GRB2 (194-196) також свідчить на користь конкуренції між ITSN1 та GRB2 у ядрі. Наразі подальші дослідження є необхідними для характеристики потенційного впливу ITSN1 на посттрансляційні модифікації SAM68 та зв'язок останнього із цитоплазматичними сигнальними шляхами.

Відомо, що SAM68 формує димери та олігомери, за рахунок чого відбувається регуляція активності SAM68 у процесах сплайсингу (95-97). Показано, що NK домен SAM68 є важливим для димеризації білка *in vitro*. Водночас, центральний домен SAM68 фланкований неструктурованими ділянками, збагаченими залишками аргініну, гліцину та проліну. Такі невпорядковані ділянки є характерними для РНК-зв'язуючих білків та опосередковують їх агрегацію *in vitro* та *in vivo* (87). Ми виявили, що ITSN1 та мРНК пригнічують агрегацію SAM68 *in vitro*. При цьому, спостерігається синергічний ефект мРНК та SH3 доменів, які підсилюють вплив один одного на агрегацію SAM68 *in vitro*. ITSN1 може взаємодіяти з N-кінцевими проліновими мотивами SAM68, порушуючи між- та внутрішньомолекулярні взаємодії, які виникають між невпорядкованими ділянками SAM68, збагачені проліновими мотивами та повторами аргінін-гліцин (RGG/RG). Крім того, ми виявляли, що мРНК також запобігає агрегації SAM68, що було показано також для інших РНК-зв'язуючих білків. За високих концентрацій РНК пригнічує агрегацію деяких РНК-зв'язуючих білків (наприклад, FUS та TDP43), які містять невпорядковані ділянки, збагачені аргінін-гліциновими повторами (86). Це можна пояснити тим фактом, що RGG/RG повтори можуть безпосередньо зв'язувати РНК, яка може перешкоджати агрегації цих мотивів. Таким чином, взаємодія SAM68 із SH3 доменами ITSN1 та РНК може запобігати формуванню агрегатів SAM68.

Незважаючи на те, що SH3 домени взаємодіють із пролін-збагаченими мотивами, для деяких SH3 доменів була показана взаємодія із неканонічними лігандами (34). Зокрема, було виявлено що, SH3 домен кінази CSK взаємодіє із структурним доменом фосфатази PEP (197), SH3 домен адаптерного білка GADS зв'язує неканонічні мотиви RxxK (198), SH3 домен адаптера кортактину (CTTN) взаємодіє із неканонічним мотивом наявним на С-кінці калієвого каналу (199), SH3 домен Sla1 дріжджів може прямо взаємодіяти із убіквітином (200), SH3B домен ITSN1 розпізнає неканонічні лінійні мотиви (34) та може прямо взаємодіяти із SH3 доменом ендofilіну (SH3GL2) (35), тоді як SH3D домен ITSN1 може прямо зв'язуватись із SH3 доменом білка FCHSD2 (36). Також було виявлено, що SH3 домени кінази SRC та адаптерного білка ADAP можуть прямо взаємодіяти із ліпідами, зокрема фосфатидилінозитами (201, 202).

В нашому дослідженні ми показали, що SH3D домен ITSN1 може призводити до зміни електрофоретичної рухливості мРНК, що свідчить про пряму взаємодію цього домену із РНК *in vitro*. Цю взаємодію було підтверджено за допомогою атомно-силової мікроскопії та ЯМР-спектроскопії. Відомо, що SH3-подібні домени деяких білків можуть прямо взаємодіяти із нуклеїновими кислотами. Зокрема, деякі бактеріальні білки (репресор дифтерійного токсину DtxR, антирепресор білка CarS *Mycococcus xanthus*, рибосомний білок L2 *Bacillus stearothermophilus* та термостабільний білок Sso7d *Sulfolobus solfataricus*) та інтеграза вірусу ВІЛ містять SH3-подібні домени, які взаємодіють із РНК та ДНК (203-209). Крім того, білок людини KIN17 містить тандем двох SH3-подібних доменів, які взаємодіють із РНК (210), тоді як канонічний SH3 домен кінази BRK залучений у зв'язування довгої некодуєчої РНК LINK-A (211). Такі дані можуть вказувати на існування неканонічних взаємодій між нуклеїновими кислотами та SH3-подібними структурами, зокрема SH3D доменом ITSN1.

Взаємодія між SH3A доменом ITSN1 та SAM68, і зв'язування РНК доменом SH3D можуть вказувати на те, що ITSN1, SAM68 та РНК формують

потрійний комплекс *in vitro* та в клітині, а наявність РНК може стабілізувати взаємодію між ITSN1 та SAM68, водночас запобігаючи агрегації SAM68.

Відомо, що непорядковані ділянки РНК-зв'язуючих білків безпосередньо залучені у формування немембранних органел клітини, зокрема ядерець, Р-тілець, тілець Кахаля та цитоплазматичних стресових гранул, які є важливими структурами процесингу РНК (83). Формування таких немембранних компартментів відбувається за рахунок розподілу рідких фаз у клітині. Цей процес пов'язаний із формуванням концентрованих крапель, утворених комплексами білків та нуклеїнових кислот. Саме такі фазові переходи забезпечують відокремлення немембранних компартментів у клітинному середовищі (83). Відомо, що SAM68 також залучений у формування SAM68-специфічних ядерних тілець із складною структурою (186). Зокрема, ці ядерні компартменти руйнуються при дії РНКаз, містять більш ніж сорок різноманітних білків та являються динамічними структурами, які можуть дисоціювати у відповідь на дію актиноміцину, епідермального фактора росту та за умов підвищеної температури (112, 186, 212, 213). Формування SAM68-специфічних ядерних тілець було показано для трансформованих ліній клітин, зокрема HeLa та BT20, тоді як надекспресія кінази BRK призводить до зростання кількості цих тілець в клітинах лінії HeLa (112, 214). Хоча структурні та функціональні деталі цих тілець наразі невідомі, можна припустити, що їх утворення може забезпечуватися взаємодіями нуклеїнових кислот, SAM68 та інших РНК-зв'язуючих білків, що взаємодіють із SAM68.

В нашій роботі виявлено, що близько 70% популяції клітин лінії HeLa містять SAM68-специфічні ядерні тільця, що узгоджується із попередніми дослідженнями (112). Пригнічення експресії гена ITSN1 стимулювало накопичення SAM68 у ядерних тільцях в клітинах лінії HeLa. Акумуляція ITSN1 в ядрах клітин HeLa знижувало рівень накопичення SAM68 у ядерних тільцях. Видалення SH3A домену ITSN1 призводило до накопичення SAM68 в ядерних тільцях, тоді як відсутність проліновго мотиву P0 SAM68

збільшувало таке накопичення, вказуючи на те, що домен SH3A та проліновий мотив P0, які опосередковують взаємодію ITSN1-SAM68, є важливими елементами, що запобігають агрегації SAM68 у ядрі. Ці результати вказують, на те що ITSN1 може безпосередньо регулювати властивості SAM68 у ядрі клітини. Дані, які показують, що ITSN1 пригнічує агрегацію SAM68 *in vitro*, можуть свідчити про те, що накопичення надекспресованого ITSN1 в ядрі сприяє дисоціації цих тілець або пригнічує їх збірку, що пов'язане із інгібуванням фазового розподілу комплексів SAM68. Це припущення узгоджується із відсутністю ендogenous ITSN1 та мРНК у SAM68-специфічних ядерних тільцях, вказуючи на необхідність цих факторів для підтримки SAM68 у дисоційованому стані.

Відомо, що SAM68 може локалізуватись в цитоплазматичних стресових гранулах, що містять також білки TIA-1 (215) та G3BP1 (186), стресових гранулах, асоційованих із поліо- та герпесвірусною інфекціями (216, 217), а також в ядерних стресових гранулах асоційованих із генотоксичним ефектом (218). Це може вказувати на те, що ITSN1 також може впливати на фазові переходи цих структур, хоча взаємозв'язок між ITSN1 та SAM68-вмісними стресовими гранулами потребує подальших досліджень.

Враховуючи вплив ITSN1 на формування SAM68-специфічних ядерних тілець, на наступному етапі дослідження було проаналізовано ефект нокдауну ITSN1 на процеси сплайсингу, які опосередковуються білком SAM68 у клітинах лінії HeLa. Було виявлено зростання видалення інтрона 4 *CCND1* та екзона 7 *SMN1/2*, що може бути пов'язане із пригніченням функціональної активності білка SAM68. Водночас спостерігали незначне, але статистично достовірне, зростання експресії ізоформи CD44v5, пов'язане із збереженням екзона v5, що опосередковується SAM68. Більш того, було ідентифіковано двократне зростання рівня експресії прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу ASF/SF2 (*SRSF1*), що пов'язане із збереженням інтрона 3 у дозрілому транскрипті *SRSF1*. Надекспресія цієї прото-онкогенної ізоформи ASF/SF2 спостерігається при розвитку багатьох типів раку (219).

Експресія цієї ізоформи безпосередньо пов'язана із регуляцією сплайсингу. Ділянка 3'-UTR на мРНК *SRSF1* містить інтрон, який за нормальних умов видаляється, що призводить до утворення ізоформи NMD+ (nonsense-mediated decay), яка містить сигнал NMD-опосередкованої деградації мРНК. За рахунок цього відбувається регуляція синтезу фактора сплайсингу ASF/SF2, який є прото-онкогеном (220). Збереження інтрона на 3'-UTR ділянці призводить до утворення ізоформи FL (full-length), яка не містить сигналу NMD і призводить до надекспресії *SRSF1*. Було виявлено, що SAM68 взаємодіє із сайтами сплайсингу пре-мРНК *SRSF1* та сприяє збереженню 3'-UTR інтрона. Водночас, фосфорилування SAM68, яке опосередковується за рахунок мітогенного сигнального шляху MAPK-ERK1/2, призводить до підвищеного рівня експресії ASF/SF2 та індукування епітеліально-мезенхімального переходу клітин раку товстого кишечника SW40 (116). Таким чином, пригнічення експресії *ITSN1* призводить до підвищення експресії прото-онкогена ASF/SF2, що корелює із попередніми даними, які вказували на те, що низький рівень експресії *ITSN1* спостерігається у клітинах раку легень A549 (6). Оскільки SAM68 стимулює експресію *SRSF1* та регулює сплайсинг пре-мРНК *SRSF1*, отримані дані свідчать про те, що пригнічення експресії *ITSN1* може призводити до зростання функціональної активності SAM68, зокрема у ядерних тільцях, що можуть бути пов'язаними із дозріванням деяких транскриптів, зокрема пре-мРНК гена *SRSF1*.

Отримані нами результати вказують на те, що як надекспресія, так і нокдаун *ITSN1* можуть індукувати функціональну активність SAM68. Зокрема, накопичення надекспресованого *ITSN1* стимулює дисоціацію SAM68-специфічних ядерних тілець, що узгоджується із активацією SAM68 та ініціюванням процесів сплайсингу (186). З іншої сторони, нокдаун *ITSN1* призводить до збільшення кількості SAM68 у ядерних тільцях та зростання експресії *SRSF1*. Такі спостереження можна пояснити тим, що нормальне функціонування скафолдних білків спостерігається за певних оптимальних концентрацій, тоді як надмірна кількість, так і недостача таких скафолдів

порушує нормальне формування білкових комплексів, що призводить до змін певних процесів клітини (1). Це корелює з тим фактом, що як надекспресія (21), так і нокдаун ITSN1 (28, 45, 48) може призводити до порушень процесів ендоцитозу.

Результати нашого дослідження вказують на існування щонайменше двох механізмів, за рахунок яких ITSN1 регулює функціональну активність SAM68. По-перше, ITSN1 може конкурувати із сигнальними білками, зокрема кіназами, білками-адаптерами або метилтрансферазами, за зв'язування із SAM68. За рахунок такої конкуренції ITSN1 може регулювати посттрансляційні модифікації білка SAM68 (наприклад, фосфорилування та метилування), які є важливими для модуляції функціональної активності SAM68. По-друге, ITSN1 може безпосередньо впливати на димеризацію та олігомеризацію SAM68 регулюючи його участь у фазових переходах та агрегацію в ядрі. Формування потрійного комплексу ITSN1-SAM68, а також взаємодія ITSN1 із мРНК може запобігати агрегації SAM68 в ядрі, сприяючи дисоціації ядерних тілець. Як наслідок, ITSN1 регулює функціонування SAM68, впливаючи на процеси альтернативного сплайсингу, які регулюються SAM68 та пов'язані із експресією ізоформ генів, залучених в злоякісних трансформаціях клітин (наприклад, *SRSF1*) (рис. 4.1.).

Отже, у дисертаційній роботі показано співлокалізацію ITSN1 із РНК-зв'язуючим білком SAM68 в ядрах клітин лінії HeLa та підтверджено і охарактеризовано взаємодію зазначених білків. ITSN1 запобігає формуванню SAM68-специфічних ядерних тілець в клітинах лінії HeLa та впливає на функціональну активність SAM68 у процесах альтернативного сплайсингу, зокрема регулює експресію прото-онкогенної ізоформи фактора сплайсингу SRSF1.

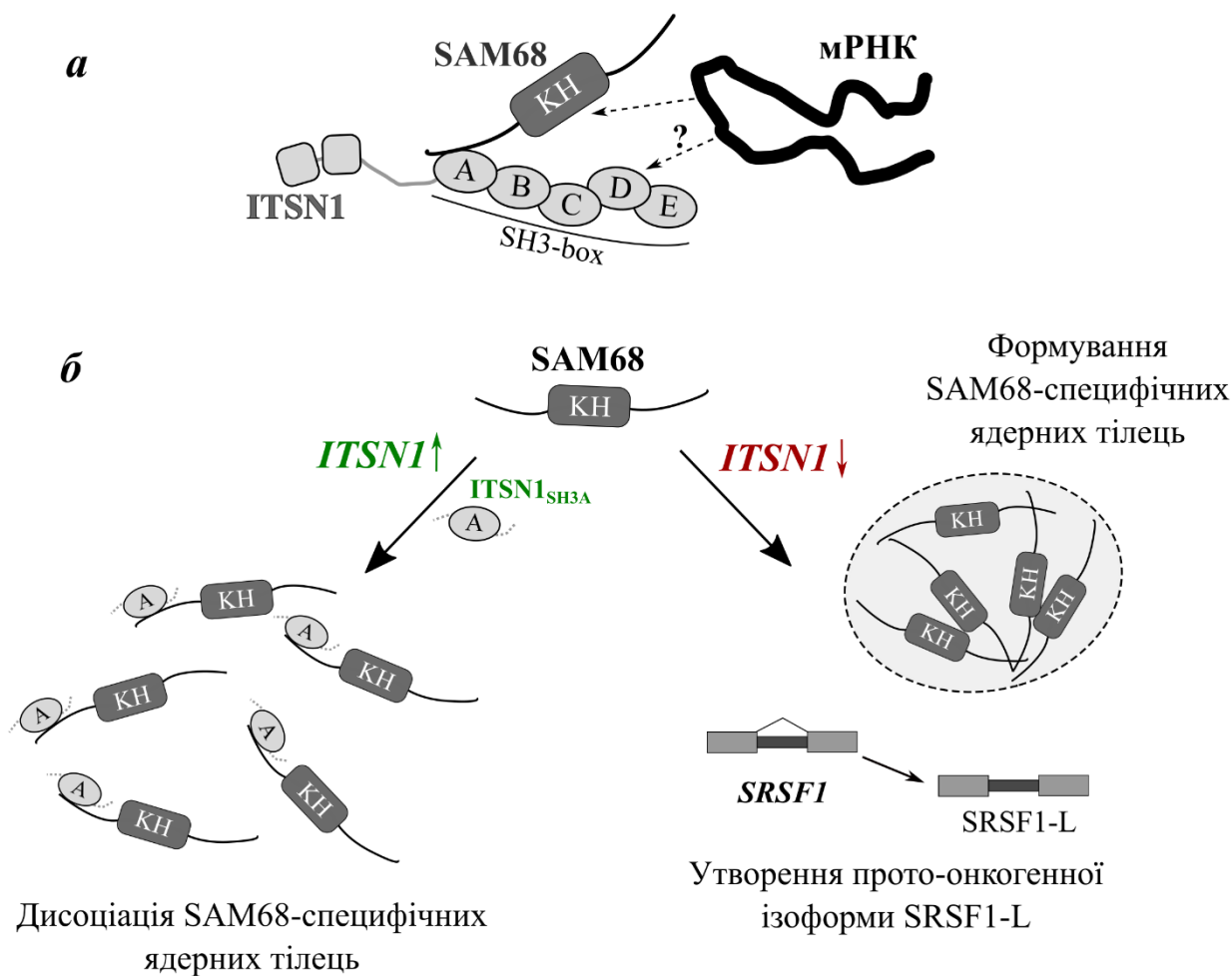


Рис. 4.1. Гіпотетична модель структурного та функціонального взаємозв'язку між ITSN1 та SAM68. *а* – ITSN1 взаємодіє із РНК-зв'язуючим білком SAM68 за рахунок SH3A домену, який безпосередньо зв'язується із N-кінцевим проліновим мотивом SAM68, тоді як за рахунок SH3D домену ITSN1 потенційно може взаємодіяти 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 тільцях 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 ендоцитозу 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Good MC, Zalatan JG, Lim WA. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science*. 2011;332(6030):680-6.
2. Herrero-Garcia E, O'Bryan JP. Intersectin scaffold proteins and their role in cell signaling and endocytosis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017;1864(1):23-30.
3. Russo A, O'Bryan JP. Intersectin 1 is required for neuroblastoma tumorigenesis. *Oncogene*. 2012;31(46):4828-34.
4. Harris J, Herrero-Garcia E, Russo A, Kajdacsy-Balla A, O'Bryan JP, Chiu B. Silencing Intersectin 1 Slows Orthotopic Neuroblastoma Growth in Mice. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017;39(8):e413-e8.
5. 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):1595-605.
6. Jeganathan N, Predescu D, Zhang J, Sha F, Bardita C, Patel M, et al. Rac1-mediated cytoskeleton rearrangements induced by intersectin-1s deficiency promotes lung cancer cell proliferation, migration and metastasis. *Mol Cancer*. 2016;15(1):59.
7. Gubar O, Morderer D, Tsyba L, Croise P, Houy S, Ory S, et al. Intersectin: The Crossroad between Vesicle Exocytosis and Endocytosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:109.
8. 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):1273-85.
9. Jakob B, Kochlamazashvili G, Japel M, Gauhar A, Bock HH, Maritzen T, et al. Intersectin 1 is a component of the Reelin pathway to regulate neuronal migration and synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(21):5533-8.

10. Keating DJ, Chen C, Pritchard MA. Alzheimer's disease and endocytic dysfunction: clues from the Down syndrome-related proteins, DSCR1 and ITSN1. *Ageing Res Rev.* 2006;5(4):388-401.
11. Scappini E, Koh TW, Martin NP, O'Bryan JP. Intersectin enhances huntingtin aggregation and neurodegeneration through activation of c-Jun-NH2-terminal kinase. *Hum Mol Genet.* 2007;16(15):1862-71.
12. Sanchez-Jimenez F, Sanchez-Margalet V. Role of Sam68 in post-transcriptional gene regulation. *Int J Mol Sci.* 2013;14(12):23402-19.
13. Guipponi M, Scott HS, Chen H, Schebesta A, Rossier C, Antonarakis SE. Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon. *Genomics.* 1998;53(3):369-76.
14. Pucharcos C, Casas C, Nadal M, Estivill X, de la Luna S. The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1521(1-3):1-11.
15. Yamabhai M, Hoffman NG, Hardison NL, McPherson PS, Castagnoli L, Cesareni G, et al. Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains. *J Biol Chem.* 1998;273(47):31401-7.
16. Teckchandani A, Mulkearns EE, Randolph TW, Toida N, Cooper JA. The clathrin adaptor Dab2 recruits EH domain scaffold proteins to regulate integrin beta1 endocytosis. *Mol Biol Cell.* 2012;23(15):2905-16.
17. Fernandez-Chacon R, Achiriloaie M, Janz R, Albanesi JP, Sudhof TC. SCAMP1 function in endocytosis. *J Biol Chem.* 2000;275(17):12752-6.
18. Martina JA, Bonangelino CJ, Aguilar RC, Bonifacino JS. Stonin 2: an adaptor-like protein that interacts with components of the endocytic machinery. *J Cell Biol.* 2001;153(5):1111-20.
19. Miliaras NB, Wendland B. EH proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics.* 2004;41(2):295-318.

20. Wong KA, Wilson J, Russo A, Wang L, Okur MN, Wang X, et al. Intersectin (ITSN) family of scaffolds function as molecular hubs in protein interaction networks. *PLoS One*. 2012;7(4):e36023.
21. Sengar AS, Wang W, Bishay J, Cohen S, Egan SE. The EH and SH3 domain Eps proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15. *The EMBO journal*. 1999;18(5):1159-71.
22. Okamoto M, Schoch S, Sudhof TC. ESH1/intersectin, a protein that contains EH and SH3 domains and binds to dynamin and SNAP-25. A protein connection between exocytosis and endocytosis? *J Biol Chem*. 1999;274(26):18446-54.
23. Dergai O, Novokhatska O, Dergai M, Skrypka I, Tsyba L, Moreau J, et al. Intersectin 1 forms complexes with SGIP1 and Reps1 in clathrin-coated pits. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;402(2):408-13.
24. Nakatsu F, Perera RM, Lucast L, Zoncu R, Domin J, Gertler FB, et al. The inositol 5-phosphatase SHIP2 regulates endocytic clathrin-coated pit dynamics. *J Cell Biol*. 2010;190(3):307-15.
25. Hussain NK, Jenna S, Glogauer M, Quinn CC, Wasiak S, Guipponi M, et al. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol*. 2001;3(10):927-32.
26. Gryaznova T, Kropyvko S, Burdyniuk M, Gubar O, Kryklyva V, Tsyba L, et al. Intersectin adaptor proteins are associated with actin-regulating protein WIP in invadopodia. *Cell Signal*. 2015;27(7):1499-508.
27. Jenna S, Hussain NK, Danek EI, Triki I, Wasiak S, McPherson PS, et al. The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. *J Biol Chem*. 2002;277(8):6366-73.
28. He G, Wang HR, Huang SK, Huang CL. Intersectin links WNK kinases to endocytosis of ROMK1. *J Clin Invest*. 2007;117(4):1078-87.
29. Nikolaienko O, Skrypka 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. *Cell Signal*. 2009;21(5):753-9.
30. Tong XK, Hussain NK, de Heuvel E, Kurakin A, Abi-Jaoude E, Quinn CC, et al. The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain. *Embo j*. 2000;19(6):1263-71.
 31. Russo A, Okur MN, Bosland M, O'Bryan JP. Phosphatidylinositol 3-kinase, class 2 beta (PI3KC2beta) isoform contributes to neuroblastoma tumorigenesis. *Cancer Lett*. 2015;359(2):262-8.
 32. Okur MN, Russo A, O'Bryan JP. Receptor tyrosine kinase ubiquitylation involves the dynamic regulation of Cbl-Spry2 by intersectin 1 and the Shp2 tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*. 2014;34(2):271-9.
 33. 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.
 34. Teyra J, Huang H, Jain S, Guan X, Dong A, Liu Y, et al. Comprehensive Analysis of the Human SH3 Domain Family Reveals a Wide Variety of Non-canonical Specificities. *Structure*. 2017;25(10):1598-610.e3.
 35. Pechstein A, Gerth F, Milosevic I, Japel M, Eichhorn-Grunig M, Vorontsova O, et al. Vesicle uncoating regulated by SH3-SH3 domain-mediated complex formation between endophilin and intersectin at synapses. *EMBO Rep*. 2015;16(2):232-9.
 36. Almeida-Souza L, Frank RAW, Garcia-Nafria J, Colussi A, Gunawardana N, Johnson CM, et al. A Flat BAR Protein Promotes Actin Polymerization at the Base of Clathrin-Coated Pits. *Cell*. 2018;174(2):325-37.e14.
 37. Snyder JT, Rossman KL, Baumeister MA, Pruitt WM, Siderovski DP, Der CJ, et al. Quantitative analysis of the effect of phosphoinositide interactions on the function of Dbl family proteins. *J Biol Chem*. 2001;276(49):45868-75.
 38. Pruitt WM, Karnoub AE, Rakauskas AC, Guipponi M, Antonarakis SE, Kurakin A, et al. Role of the pleckstrin homology domain in intersectin-L Dbl

- homology domain activation of Cdc42 and signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1640(1):61-8.
39. Zhang W, Shen Y, Xiong G, Guo Y, Deng L, Li B, et al. Crystal structure of human Intersectin-2L C2 domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;431(1):76-80.
 40. Rizo J, Sudhof TC. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem*. 1998;273(26):15879-82.
 41. Hussain NK, Yamabhai M, Ramjaun AR, Guy AM, Baranes D, O'Bryan JP, et al. Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *J Biol Chem*. 1999;274(22):15671-7.
 42. Predescu SA, Predescu DN, Timblin BK, Stan RV, Malik AB. Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 2003;14(12):4997-5010.
 43. Pucharcos C, Estivill X, de la Luna S. Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS Lett*. 2000;478(1-2):43-51.
 44. Mohney RP, Das M, Bivona TG, Hanes R, Adams AG, Philips MR, et al. Intersectin activates Ras but stimulates transcription through an independent pathway involving JNK. *J Biol Chem*. 2003;278(47):47038-45.
 45. Martin NP, Mohney RP, Dunn S, Das M, Scappini E, O'Bryan JP. Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling. *Mol Pharmacol*. 2006;70(5):1643-53.
 46. Ma YJ, Okamoto M, Gu F, Obata K, Matsuyama T, Desaki J, et al. Neuronal distribution of EHS1/intersectin: molecular linker between clathrin-mediated endocytosis and signaling pathways. *J Neurosci Res*. 2003;71(4):468-77.
 47. Pechstein A, Bacetic J, Vahedi-Faridi A, Gromova K, Sundborger A, Tomlin N, et al. Regulation of synaptic vesicle recycling by complex formation between intersectin 1 and the clathrin adaptor complex AP2. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107(9):4206-11.
48. Thomas S, Ritter B, Verbich D, Sanson C, Bourbonniere L, McKinney RA, et al. Intersectin regulates dendritic spine development and somatodendritic endocytosis but not synaptic vesicle recycling in hippocampal neurons. *J Biol Chem*. 2009;284(18):12410-9.
 49. Irie F, Yamaguchi Y. EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nature Neuroscience*. 2002;5(11):1117-8.
 50. Klein IK, Predescu DN, Sharma T, Knezevic I, Malik AB, Predescu S. Intersectin-2L regulates caveola endocytosis secondary to Cdc42-mediated actin polymerization. *J Biol Chem*. 2009;284(38):25953-61.
 51. Alvisi G, Paolini L, Contarini A, Zambarda C, Di Antonio V, Colosini A, et al. Intersectin goes nuclear: secret life of an endocytic protein. *Biochem J*. 2018;475(8):1455-72.
 52. 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.
 53. Henne WM, Boucrot E, Meinecke M, Evergren E, Vallis Y, Mittal R, et al. FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science*. 2010;328(5983):1281-4.
 54. Umasankar PK, Ma L, Thieman JR, Jha A, Doray B, Watkins SC, et al. A clathrin coat assembly role for the muniscin protein central linker revealed by TALEN-mediated gene editing. *Elife*. 2014;3.
 55. Knezevic I, Predescu D, Bardita C, Wang M, Sharma T, Keith B, et al. Regulation of dynamin-2 assembly-disassembly and function through the SH3A domain of intersectin-1s. *J Cell Mol Med*. 2011;15(11):2364-76.
 56. Allaire PD, Ritter B, Thomas S, Burman JL, Denisov AY, Legendre-Guillemain V, et al. Connecdenn, a novel DENN domain-containing protein of

- neuronal clathrin-coated vesicles functioning in synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci*. 2006;26(51):13202-12.
57. Koh TW, Verstreken P, Bellen HJ. Dap160/intersectin acts as a stabilizing scaffold required for synaptic development and vesicle endocytosis. *Neuron*. 2004;43(2):193-205.
 58. Yu Y, Chu PY, Bowser DN, Keating DJ, Dubach D, Harper I, et al. Mice deficient for the chromosome 21 ortholog *Itsn1* exhibit vesicle-trafficking abnormalities. *Hum Mol Genet*. 2008;17(21):3281-90.
 59. Sengar AS, Ellegood J, Yiu AP, Wang H, Wang W, Juneja SC, et al. Vertebrate intersectin1 is repurposed to facilitate cortical midline connectivity and higher order cognition. *J Neurosci*. 2013;33(9):4055-65.
 60. McGavin MK, Badour K, Hardy LA, Kubiseski TJ, Zhang J, Siminovitch KA. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. *J Exp Med*. 2001;194(12):1777-87.
 61. Zamanian JL, Kelly RB. Intersectin 1L guanine nucleotide exchange activity is regulated by adjacent src homology 3 domains that are also involved in endocytosis. *Mol Biol Cell*. 2003;14(4):1624-37.
 62. Ahmad KF, Lim WA. The minimal autoinhibited unit of the guanine nucleotide exchange factor intersectin. *PLoS One*. 2010;5(6):e11291.
 63. Gryaznova T, Gubar O, Burdyniuk M, Kropyvko S, Rynditch A. WIP/ITSN1 complex is involved in cellular vesicle trafficking and formation of filopodia-like protrusions. *Gene*. 2018;674:49-56.
 64. Tong XK, Hussain NK, Adams AG, O'Bryan JP, McPherson PS. Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis. *J Biol Chem*. 2000;275(38):29894-9.
 65. Wong KA, Russo A, Wang X, Chen YJ, Lavie A, O'Bryan JP. A new dimension to Ras function: a novel role for nucleotide-free Ras in Class II phosphatidylinositol 3-kinase beta (PI3KC2beta) regulation. *PLoS One*. 2012;7(9):e45360.

66. Okur MN, Ooi J, Fong CW, Martinez N, Garcia-Dominguez C, Rojas JM, et al. Intersectin 1 enhances Cbl ubiquitylation of epidermal growth factor receptor through regulation of Sprouty2-Cbl interaction. *Mol Cell Biol.* 2012;32(4):817-25.
67. Bardita C, Predescu DN, Sha F, Patel M, Balaji G, Predescu SA. Endocytic deficiency induced by ITSN-1s knockdown alters the Smad2/3-Erk1/2 signaling balance downstream of Alk5. *J Cell Sci.* 2015;128(8):1528-41.
68. Das M, Scappini E, Martin NP, Wong KA, Dunn S, Chen YJ, et al. Regulation of neuron survival through an intersectin-phosphoinositide 3'-kinase C2beta-AKT pathway. *Mol Cell Biol.* 2007;27(22):7906-17.
69. Pucharcos C, Fuentes JJ, Casas C, de la Luna S, Alcantara S, Arbones ML, 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. *Eur J Hum Genet.* 1999;7(6):704-12.
70. Hunter MP, Nelson M, Kurzer M, Wang X, Kryscio RJ, Head E, et al. Intersectin 1 contributes to phenotypes in vivo: implications for Down's syndrome. *Neuroreport.* 2011;22(15):767-72.
71. Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol.* 2000;157(1):277-86.
72. Wang JB, Wu WJ, Cerione RA. Cdc42 and Ras cooperate to mediate cellular transformation by intersectin-L. *J Biol Chem.* 2005;280(24):22883-91.
73. Ma Y, Wang B, Li W, Liu X, Wang J, Ding T, et al. Intersectin1-s is involved in migration and invasion of human glioma cells. *J Neurosci Res.* 2011;89(7):1079-90.
74. Ma Y, Wang B, Li W, Ying G, Fu L, Niu R, et al. Reduction of intersectin1-s induced apoptosis of human glioblastoma cells. *Brain Res.* 2010;1351:222-8.
75. 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 Res Treat.* 2009;118(1):45-56.
76. Predescu SA, Predescu DN, Knezevic I, Klein IK, Malik AB. Intersectin-1s regulates the mitochondrial apoptotic pathway in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2007;282(23):17166-78.
77. Bardita C, Predescu D, Justice MJ, Petrache I, Predescu S. In vivo knockdown of intersectin-1s alters endothelial cell phenotype and causes microvascular remodeling in the mouse lungs. *Apoptosis.* 2013;18(1):57-76.
78. Loeb CR, Harris JL, Craik CS. Granzyme B proteolyzes receptors important to proliferation and survival, tipping the balance toward apoptosis. *J Biol Chem.* 2006;281(38):28326-35.
79. Patel M, Predescu D, Tandon R, Bardita C, Pogoriler J, Bhorade S, et al. A novel p38 mitogen-activated protein kinase/Elk-1 transcription factor-dependent molecular mechanism underlying abnormal endothelial cell proliferation in plexogenic pulmonary arterial hypertension. *J Biol Chem.* 2013;288(36):25701-16.
80. Gerstberger S, Hafner M, Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet.* 15. England 2014. p. 829-45.
81. Beckmann BM, Castello A, Medenbach J. The expanding universe of ribonucleoproteins: of novel RNA-binding proteins and unconventional interactions. *Pflugers Arch.* 2016;468(6):1029-40.
82. Mitrea DM, Kriwacki RW. Phase separation in biology; functional organization of a higher order. *Cell Commun Signal.* 2016;14:1.
83. Boeynaems S, Alberti S, Fawzi NL, Mittag T, Polymenidou M, Rousseau F, et al. Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 2018;28(6):420-35.
84. Mao YS, Zhang B, Spector DL. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet.* 2011;27(8):295-306.
85. Stanek D, Fox AH. Nuclear bodies: news insights into structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2017;46:94-101.

86. Maharana S, Wang J, Papadopoulos DK, Richter D, Pozniakovsky A, Poser I, et al. RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science (New York, NY)*. 2018;360(6391):918-21.
87. Chong PA, Vernon RM, Forman-Kay JD. RGG/RG Motif Regions in RNA Binding and Phase Separation. *J Mol Biol*. 2018;430(23):4650-65.
88. Yoshizawa T, Ali R, Jiou J, Fung HYJ, Burke KA, Kim SJ, et al. Nuclear Import Receptor Inhibits Phase Separation of FUS through Binding to Multiple Sites. *Cell*. 2018;173(3):693-705.e22.
89. Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Darnell RB. Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. *Hum Mol Genet*. 2009;18(17):3164-77.
90. Vernon RM, Chong PA, Tsang B, Kim TH, Bah A, Farber P, et al. Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation. *Elife*. 2018;7.
91. Alberti S, Dormann D. Liquid-Liquid Phase Separation in Disease. *Annu Rev Genet*. 2019;53:171-94.
92. Harrison AF, Shorter J. RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. *Biochem J*. 2017;474(8):1417-38.
93. Spann S, Tereshchenko M, Mastromarco GJ, Ihn SJ, Lee HO. Biomolecular condensates in neurodegeneration and cancer. *Traffic*. 2019;20(12):890-911.
94. Ehrmann I, Fort P, Elliott DJ. STARs in the CNS. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(4):1066-72.
95. Chen T, Damaj BB, Herrera C, Lasko P, Richard S. Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Mol Cell Biol*. 1997;17(10):5707-18.
96. Meyer NH, Tripsianes K, Vincendeau M, Madl T, Kateb F, Brack-Werner R, et al. Structural basis for homodimerization of the Src-associated during mitosis, 68-kDa protein (Sam68) Qua1 domain. *J Biol Chem*. 2010;285(37):28893-901.

97. Feracci M, Foot JN, Grellscheid SN, Danilenko M, Stehle R, Gonchar O, et al. Structural basis of RNA recognition and dimerization by the STAR proteins T-STAR and Sam68. *Nature Communications*. 2016;7:10355.
98. Galarneau A, Richard S. The STAR RNA binding proteins GLD-1, QKI, SAM68 and SLM-2 bind bipartite RNA motifs. *BMC Mol Biol*. 2009;10:47.
99. Lin Q, Taylor SJ, Shalloway D. Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains. *J Biol Chem*. 1997;272(43):27274-80.
100. Itoh M, Haga I, Li QH, Fujisawa J. Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(24):5452-64.
101. Tremblay GA, Richard S. mRNAs associated with the Sam68 RNA binding protein. *RNA Biol*. 2006;3(2):90-3.
102. Barlat I, Maurier F, Duchesne M, Guitard E, Tocque B, Schweighoffer F. A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain. *J Biol Chem*. 1997;272(6):3129-32.
103. Asbach B, Ludwig C, Saksela K, Wagner R. Comprehensive analysis of interactions between the Src-associated protein in mitosis of 68 kDa and the human Src-homology 3 proteome. *PLoS One*. 2012;7(6):e38540.
104. Taylor SJ, Anafi M, Pawson T, Shalloway D. Functional interaction between c-Src and its mitotic target, Sam 68. *J Biol Chem*. 1995;270(17):10120-4.
105. Derry JJ, Richard S, Valderrama Carvajal H, Ye X, Vasioukhin V, Cochrane AW, et al. Sik (BRK) phosphorylates Sam68 in the nucleus and negatively regulates its RNA binding ability. *Mol Cell Biol*. 2000;20(16):6114-26.
106. Guitard E, Barlat I, Maurier F, Schweighoffer F, Tocque B. Sam68 is a Ras-GAP-associated protein in mitosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;245(2):562-6.
107. Matter N, Herrlich P, Konig H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature*. 2002;420(6916):691-5.

108. Babic I, Jakymiw A, Fujita DJ. The RNA binding protein Sam68 is acetylated in tumor cell lines, and its acetylation correlates with enhanced RNA binding activity. *Oncogene*. 2004;23(21):3781-9.
109. Cote J, Boisvert FM, Boulanger MC, Bedford MT, Richard S. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol Biol Cell*. 2003;14(1):274-87.
110. Bedford MT, Frankel A, Yaffe MB, Clarke S, Leder P, Richard S. Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J Biol Chem*. 2000;275(21):16030-6.
111. Ishidate T, Yoshihara S, Kawasaki Y, Roy BC, Toyoshima K, Akiyama T. Identification of a novel nuclear localization signal in Sam68. *FEBS Lett*. 1997;409(2):237-41.
112. Chen T, Boisvert FM, Bazett-Jones DP, Richard S. A role for the GSG domain in localizing Sam68 to novel nuclear structures in cancer cell lines. *Molecular biology of the cell*. 1999;10(9):3015-33.
113. Grossman JS, Meyer MI, Wang YC, Mulligan GJ, Kobayashi R, Helfman DM. The use of antibodies to the polypyrimidine tract binding protein (PTB) to analyze the protein components that assemble on alternatively spliced pre-mRNAs that use distant branch points. *Rna*. 1998;4(6):613-25.
114. Wielenga VJ, van der Voort R, Taher TE, Smit L, Beuling EA, van Krimpen C, et al. Expression of c-Met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer. *Am J Pathol*. 2000;157(5):1563-73.
115. Paronetto MP, Cappellari M, Busa R, Pedrotti S, Vitali R, Comstock C, et al. Alternative splicing of the cyclin D1 proto-oncogene is regulated by the RNA-binding protein Sam68. *Cancer Res*. 2010;70(1):229-39.
116. Valacca C, Bonomi S, Buratti E, Pedrotti S, Baralle FE, Sette C, et al. Sam68 regulates EMT through alternative splicing-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *The Journal of cell biology*. 2010;191(1):87-99.

117. Paronetto MP, Achsel T, Massiello A, Chalfant CE, Sette C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J Cell Biol.* 2007;176(7):929-39.
118. Huot ME, Vogel G, Zabarauskas A, Ngo CT, Coulombe-Huntington J, Majewski J, et al. The Sam68 STAR RNA-binding protein regulates mTOR alternative splicing during adipogenesis. *Mol Cell.* 2012;46(2):187-99.
119. Chawla G, Lin CH, Han A, Shiue L, Ares M, Jr., Black DL. Sam68 regulates a set of alternatively spliced exons during neurogenesis. *Mol Cell Biol.* 2009;29(1):201-13.
120. La Rosa P, Bielli P, Compagnucci C, Cesari E, Volpe E, Farioli Vecchioli S, et al. Sam68 promotes self-renewal and glycolytic metabolism in mouse neural progenitor cells by modulating Aldh1a3 pre-mRNA 3'-end processing. *Elife.* 2016;5.
121. Iijima T, Wu K, Witte H, Hanno-Iijima Y, Glatter T, Richard S, et al. SAM68 regulates neuronal activity-dependent alternative splicing of neurexin-1. *Cell.* 2011;147(7):1601-14.
122. Pedrotti S, Bielli P, Paronetto MP, Ciccocanti F, Fimia GM, Stamm S, et al. The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. *Embo j.* 2010;29(7):1235-47.
123. Pagliarini V, Pelosi L, Bustamante MB, Nobili A, Berardinelli MG, D'Amelio M, et al. SAM68 is a physiological regulator of SMN2 splicing in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol.* 2015;211(1):77-90.
124. Yang JP, Reddy TR, Truong KT, Suhasini M, Wong-Staal F. Functional interaction of Sam68 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *Oncogene.* 2002;21(47):7187-94.
125. Rajan P, Gaughan L, Dalglish C, El-Sherif A, Robson CN, Leung HY, et al. The RNA-binding and adaptor protein Sam68 modulates signal-dependent splicing and transcriptional activity of the androgen receptor. *J Pathol.* 2008;215(1):67-77.

126. Messina V, Meikar O, Paronetto MP, Calabretta S, Geremia R, Kotaja N, et al. The RNA binding protein SAM68 transiently localizes in the chromatoid body of male germ cells and influences expression of select microRNAs. *PLoS One*. 2012;7(6):e39729.
127. Paronetto MP, Zalfa F, Botti F, Geremia R, Bagni C, Sette C. The nuclear RNA-binding protein Sam68 translocates to the cytoplasm and associates with the polysomes in mouse spermatocytes. *Mol Biol Cell*. 2006;17(1):14-24.
128. Paronetto MP, Messina V, Bianchi E, Barchi M, Vogel G, Moretti C, et al. Sam68 regulates translation of target mRNAs in male germ cells, necessary for mouse spermatogenesis. *The Journal of cell biology*. 2009;185(2):235-49.
129. Klein ME, Younts TJ, Castillo PE, Jordan BA. RNA-binding protein Sam68 controls synapse number and local β -actin mRNA metabolism in dendrites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(8):3125-30.
130. Paronetto MP, Venables JP, Elliott DJ, Geremia R, Rossi P, Sette C. Tr-kit promotes the formation of a multimolecular complex composed by Fyn, PLCgamma1 and Sam68. *Oncogene*. 2003;22(54):8707-15.
131. Sanchez-Margalet V, Najib S. p68 Sam is a substrate of the insulin receptor and associates with the SH2 domains of p85 PI3K. *FEBS Lett*. 1999;455(3):307-10.
132. Sanchez-Margalet V, Gonzalez-Yanes C, Najib S, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I. The expression of Sam68, a protein involved in insulin signal transduction, is enhanced by insulin stimulation. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(4):751-8.
133. Martin-Romero C, Sanchez-Margalet V. Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol*. 2001;212(2):83-91.
134. Sanchez-Jimenez F, Perez-Perez A, Gonzalez-Yanes C, Najib S, Varone CL, Sanchez-Margalet V. Leptin receptor activation increases Sam68 tyrosine

- phosphorylation and expression in human trophoblastic cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;332(1-2):221-7.
135. Ramakrishnan P, Baltimore D. Sam68 is required for both NF-kappaB activation and apoptosis signaling by the TNF receptor. *Mol Cell.* 2011;43(2):167-79.
 136. Lukong KE, Larocque D, Tyner AL, Richard S. Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression. *J Biol Chem.* 2005;280(46):38639-47.
 137. Fusaki N, Iwamatsu A, Iwashima M, Fujisawa J. Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6214-9.
 138. Tomalka JA, de Jesus TJ, Ramakrishnan P. Sam68 is a regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(1):107-17.
 139. Perez-Perez A, Sanchez-Jimenez F, Vilarino-Garcia T, de la Cruz L, Virizuela JA, Sanchez-Margalet V. Sam68 Mediates the Activation of Insulin and Leptin Signalling in Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158218.
 140. Sanchez-Jimenez F, Perez-Perez A, Gonzalez-Yanes C, Varone CL, Sanchez-Margalet V. Sam68 mediates leptin-stimulated growth by modulating leptin receptor signaling in human trophoblastic JEG-3 cells. *Hum Reprod.* 2011;26(9):2306-15.
 141. Sanchez-Margalet V, Najib S. Sam68 is a docking protein linking GAP and PI3K in insulin receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;183(1-2):113-21.
 142. Frisone P, Pradella D, Di Matteo A, Belloni E, Ghigna C, Paronetto MP. SAM68: Signal Transduction and RNA Metabolism in Human Cancer. *Biomed Res Int.* 2015;2015:528954.
 143. Song L, Wang L, Li Y, Xiong H, Wu J, Li J, et al. Sam68 up-regulation correlates with, and its down-regulation inhibits, proliferation and tumourigenicity of breast cancer cells. *J Pathol.* 2010;222(3):227-37.

144. Richard S, Vogel G, Huot ME, Guo T, Muller WJ, Lukong KE. Sam68 haploinsufficiency delays onset of mammary tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*. 2008;27(4):548-56.
145. Chen X, Zhang L, Kuang Z, Zou Y, Tang T, Zhang W, et al. Sam68 Promotes the Progression of Human Breast Cancer through Inducing Activation of EphA3. *Curr Cancer Drug Targets*. 2019.
146. Busa R, Paronetto MP, Farini D, Pierantozzi E, Botti F, Angelini DF, et al. The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells. *Oncogene*. 2007;26(30):4372-82.
147. Paronetto MP, Farini D, Sammarco I, Maturo G, Vespasiani G, Geremia R, et al. Expression of a truncated form of the c-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer. *Am J Pathol*. 2004;164(4):1243-51.
148. Sellier C, Rau F, Liu Y, Tassone F, Hukema RK, Gattoni R, et al. Sam68 sequestration and partial loss of function are associated with splicing alterations in FXTAS patients. *Embo j*. 2010;29(7):1248-61.
149. Richard S, Torabi N, Franco GV, Tremblay GA, Chen T, Vogel G, et al. Ablation of the Sam68 RNA binding protein protects mice from age-related bone loss. *PLoS Genet*. 2005;1(6):e74.
150. Bianchi E, Barbagallo F, Valeri C, Geremia R, Salustri A, De Felici M, et al. Ablation of the Sam68 gene impairs female fertility and gonadotropin-dependent follicle development. *Hum Mol Genet*. 2010;19(24):4886-94.
151. Lukong KE, Richard S. Motor coordination defects in mice deficient for the Sam68 RNA-binding protein. *Behav Brain Res*. 2008;189(2):357-63.
152. Reddy TR, Xu W, Mau JK, Goodwin CD, Suhasini M, Tang H, et al. Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nat Med*. 1999;5(6):635-42.
153. Modem S, Badri KR, Holland TC, Reddy TR. Sam68 is absolutely required for Rev function and HIV-1 production. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(3):873-9.

154. Boca M, Kretov DA, Desforbes B, Mephon-Gaspard A, Curmi PA, Pastre D. Probing protein interactions in living mammalian cells on a microtubule bench. *Sci Rep.* 2015;5:17304.
155. Maucuer A, Desforbes B, Joshi V, Boca M, Kretov DA, Hamon L, et al. Microtubules as platforms for probing liquid-liquid phase separation in cells - application to RNA-binding proteins. *J Cell Sci.* 2018;131(11).
156. Moffat J, Grueneberg DA, Yang X, Kim SY, Kloepfer AM, Hinkle G, et al. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell.* 2006;124(6):1283-98.
157. Kropyvko S. New partners of TKS4 scaffold protein. *Biopolymers and Cell.* 2015.
158. Dergai M, Tsyba L, Dergai O, Zlatskii I, Skrypkina I, Kovalenko V, et al. Microexon-based regulation of ITSN1 and Src SH3 domains specificity relies on introduction of charged amino acids into the interaction interface. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;399(2):307-12.
159. Venables JP, Dalgliesh C, Paronetto MP, Skitt L, Thornton JK, Saunders PT, et al. SIAH1 targets the alternative splicing factor T-STAR for degradation by the proteasome. *Hum Mol Genet.* 2004;13(14):1525-34.
160. Llorian M, Beullens M, Lesage B, Nicolaescu E, Beke L, Landuyt W, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the splicing factor SIPP1. *J Biol Chem.* 2005;280(46):38862-9.
161. Shao R, Scully SJ, Jr., Yan W, Bentley B, Mueller J, Brown C, et al. The novel lupus antigen related protein acheron enhances the development of human breast cancer. *Int J Cancer.* 2012;130(3):544-54.
162. Tari M, Manceau V, de Matha Salone J, Kobayashi A, Pastré D, Maucuer A. U2AF65 assemblies drive sequence-specific splice site recognition. *EMBO reports.* 2019;20(8):e47604.
163. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. xxxviii + 1546 pp. p.

164. Abrakhi S, Kretov DA, Desforbes B, Dobra I, Bouhss A, Pastre D, et al. Nanoscale Analysis Reveals the Maturation of Neurodegeneration-Associated Protein Aggregates: Grown in mRNA Granules then Released by Stress Granule Proteins. *ACS Nano*. 2017;11(7):7189-200.
165. Schanda P, Brutscher B. Very Fast Two-Dimensional NMR Spectroscopy for Real-Time Investigation of Dynamic Events in Proteins on the Time Scale of Seconds. *Journal of the American Chemical Society*. 2005;127(22):8014-5.
166. Kretov DA, Clement MJ, Lambert G, Durand D, Lyabin DN, Bollot G, et al. YB-1, an abundant core mRNA-binding protein, has the capacity to form an RNA nucleoprotein filament: a structural analysis. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(6):3127-41.
167. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.
168. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
169. Zhang Y, Stefanovic B. LARP6 Meets Collagen mRNA: Specific Regulation of Type I Collagen Expression. *Int J Mol Sci*. 172016.
170. R S, SJ S, W Y, B B, J M, C B, et al. The Novel Lupus Antigen Related Protein Acheron Enhances the Development of Human Breast Cancer. *International journal of cancer*. 2012;130(3).
171. EM P, PM S, K C, KB C, K Z, SA G, et al. WBP11 Is Required for Splicing the TUBGCP6 pre-mRNA to Promote Centriole Duplication. *The Journal of cell biology*. 2020;219(1).
172. Iwasaki Y, Thomsen GH. The splicing factor PQBP1 regulates mesodermal and neural development through FGF signaling. *Development*. 1412014. p. 3740-51.
173. G C, PM F, D L, J W, T P, S G, et al. A Nuclear SH3 Domain-Binding Protein That Colocalizes With mRNA Splicing Factors and Intermediate

- Filament-Containing Perinuclear Networks. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(32).
174. Wang Y, Li J, Li F, Li S, Zhong R. In Situ Detection of the p53-E6 and pRb-E7 Complex Formation in EC109 Cell by Proximity Ligation Assay. *Journal of Cancer Therapy*. 2019;10(4):336.
175. Pyrzynska B, Pilecka I, Miaczynska M. Endocytic proteins in the regulation of nuclear signaling, transcription and tumorigenesis. *Molecular oncology*. 2009;3(4):321-38.
176. Ohmori K, Endo Y, Yoshida Y, Ohata H, Taya Y, Enari M. Monomeric but not trimeric clathrin heavy chain regulates p53-mediated transcription. *Oncogene*. 2008;27(15):2215-27.
177. Vecchi M, Polo S, Poupon V, van de Loo J-W, Benmerah A, Di Fiore PP. Nucleocytoplasmic Shuttling of Endocytic Proteins. *The Journal of Cell Biology*. 2001;153(7):1511.
178. Doria M, Salcini AE, Colombo E, Parslow TG, Pelicci PG, Di Fiore PP. The eps15 homology (EH) domain-based interaction between eps15 and hrb connects the molecular machinery of endocytosis to that of nucleocytoplasmic transport. *The Journal of cell biology*. 1999;147(7):1379-84.
179. Elliott K, Sakamuro D, Basu A, Du W, Wunner W, Staller P, et al. Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene*. 1999;18(24):3564-73.
180. Archangelo LF, Glasner J, Krause A, Bohlander SK. The novel CALM interactor CATS influences the subcellular localization of the leukemogenic fusion protein CALM/AF10. *Oncogene*. 2006;25(29):4099-109.
181. Kang J, Shi Y, Xiang B, Qu B, Su W, Zhu M, et al. A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell*. 2005;123(5):833-47.
182. Tseng CP, Ely BD, Pong RC, Wang Z, Zhou J, Hsieh JT. The role of DOC-2/DAB2 protein phosphorylation in the inhibition of AP-1 activity. *An*

- underlying mechanism of its tumor-suppressive function in prostate cancer. *J Biol Chem.* 1999;274(45):31981-6.
183. Colaluca IN, Tosoni D, Nuciforo P, Senic-Matuglia F, Galimberti V, Viale G, et al. NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature.* 2008;451:76.
184. Wang YN, Yamaguchi H, Hsu JM, Hung MC. Nuclear trafficking of the epidermal growth factor receptor family membrane proteins. *Oncogene.* 2010;29(28):3997-4006.
185. Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J, et al. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(33):12130-5.
186. Huot M-E, Vogel G, Richard S. Identification of a Sam68 ribonucleoprotein complex regulated by epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry.* 2009;284(46):31903-13.
187. Huot M-E, Brown CM, Lamarche-Vane N, Richard S. An adaptor role for cytoplasmic Sam68 in modulating Src activity during cell polarization. *Molecular and cellular biology.* 2009;29(7):1933-43.
188. Ito A, Shimazu T, Maeda S, Shah AA, Tsunoda T, Iemura S, et al. The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. *Sci Signal.* 2015;8(404):ra120.
189. Ben Fredj N, Grange J, Sadoul R, Richard S, Goldberg Y, Boyer V. Depolarization-induced translocation of the RNA-binding protein Sam68 to the dendrites of hippocampal neurons. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 7):1079-90.
190. Li N, Richard S. Sam68 functions as a transcriptional coactivator of the p53 tumor suppressor. *Nucleic acids research.* 2016;44(18):8726-41.
191. Rho J, Choi S, Jung CR, Im DS. Arginine methylation of Sam68 and SLM proteins negatively regulates their poly(U) RNA binding activity. *Arch Biochem Biophys.* 2007;466(1):49-57.
192. Vhuyian MI, Pak ML, Park MA, Thomas D, Lakowski TM, Chalfant CE, et al. PRMT2 interacts with splicing factors and regulates the alternative splicing of BCL-X. *J Biochem.* 2017;162(1):17-25.

193. Adams A, Thorn JM, Yamabhai M, Kay BK, O'Bryan JP. Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways. *J Biol Chem.* 2000;275(35):27414-20.
194. Romero F, Ramos-Morales F, Dominguez A, Rios RM, Schweighoffer F, Tocque B, et al. Grb2 and its apoptotic isoform Grb3-3 associate with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C, and these interactions are modulated by poly(U) RNA. *J Biol Chem.* 1998;273(13):7776-81.
195. Yamazaki T, Zaal K, Hailey D, Presley J, Lippincott-Schwartz J, Samelson LE. Role of Grb2 in EGF-stimulated EGFR internalization. *Journal of Cell Science.* 2002;115(9):1791.
196. Verbeek BS, Adriaansen-Slot SS, Rijksen G, Vroom TM. Grb2 overexpression in nuclei and cytoplasm of human breast cells: a histochemical and biochemical study of normal and neoplastic mammary tissue specimens. *J Pathol.* 1997;183(2):195-203.
197. Ghose R, Shekhtman A, Goger MJ, Ji H, Cowburn D. A novel, specific interaction involving the Csk SH3 domain and its natural ligand. *Nat Struct Biol.* 2001;8(11):998-1004.
198. Liu Q, Berry D, Nash P, Pawson T, McGlade CJ, Li SS. Structural basis for specific binding of the Gads SH3 domain to an RxxK motif-containing SLP-76 peptide: a novel mode of peptide recognition. *Mol Cell.* 2003;11(2):471-81.
199. Tian L, Chen L, McClafferty H, Sailer CA, Ruth P, Knaus H-G, et al. A noncanonical SH3 domain binding motif links BK channels to the actin cytoskeleton via the SH3 adapter cortactin. *The FASEB Journal.* 2006;20(14):2588-90.
200. He Y, Hicke L, Radhakrishnan I. Structural basis for ubiquitin recognition by SH3 domains. *J Mol Biol.* 2007;373(1):190-6.
201. Heuer K, Arbuzova A, Strauss H, Kofler M, Freund C. The helically extended SH3 domain of the T cell adaptor protein ADAP is a novel lipid interaction domain. *J Mol Biol.* 2005;348(4):1025-35.

202. Perez Y, Maffei M, Igea A, Amata I, Gairi M, Nebreda AR, et al. Lipid binding by the Unique and SH3 domains of c-Src suggests a new regulatory mechanism. *Sci Rep.* 2013;3:1295.
203. Eijkelenboom APAM, Puras Lutzke RA, Boelens R, Plasterk RHA, Kaptein R, Hård K. The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold. *Nature Structural Biology.* 1995;2(9):807-10.
204. Pohl E, Holmes RK, Hol WG. Crystal structure of a cobalt-activated diphtheria toxin repressor-DNA complex reveals a metal-binding SH3-like domain. *J Mol Biol.* 1999;292(3):653-67.
205. Leon E, Navarro-Aviles G, Santiveri CM, Flores-Flores C, Rico M, Gonzalez C, et al. A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(15):5226-41.
206. Wang G, Wylie GP, Twigg PD, Caspar DL, Murphy JR, Logan TM. Solution structure and peptide binding studies of the C-terminal src homology 3-like domain of the diphtheria toxin repressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(11):6119-24.
207. D'Aquino JA, Ringe D. Determinants of the SRC homology domain 3-like fold. *J Bacteriol.* 2003;185(14):4081-6.
208. Baumann H, Knapp S, Lundback T, Ladenstein R, Hard T. Solution structure and DNA-binding properties of a thermostable protein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Nat Struct Biol.* 1994;1(11):808-19.
209. Nakagawa A, Nakashima T, Taniguchi M, Hosaka H, Kimura M, Tanaka I. The three-dimensional structure of the RNA-binding domain of ribosomal protein L2; a protein at the peptidyl transferase center of the ribosome. *Embo j.* 1999;18(6):1459-67.
210. le Maire A, Schiltz M, Stura EA, Pinon-Lataillade G, Couprie J, Moutiez M, et al. A tandem of SH3-like domains participates in RNA binding in KIN17, a human protein activated in response to genotoxics. *J Mol Biol.* 2006;364(4):764-76.

211. Lin A, Li C, Xing Z, Hu Q, Liang K, Han L, et al. The LINK-A lncRNA activates normoxic HIF1 α signalling in triple-negative breast cancer. *Nat Cell Biol.* 2016;18(2):213-24.
212. Mannen T, Yamashita S, Tomita K, Goshima N, Hirose T. The Sam68 nuclear body is composed of two RNase-sensitive substructures joined by the adaptor HNRNPL. *The Journal of Cell Biology.* 2016;214(1):45.
213. Fong K-w, Li Y, Wang W, Ma W, Li K, Qi RZ, et al. Whole-genome screening identifies proteins localized to distinct nuclear bodies. *The Journal of Cell Biology.* 2013;203(1):149.
214. Lukong KE, Larocque D Fau - Tyner AL, Tyner Al Fau - Richard S, Richard S. Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression. (0021-9258 (Print)).
215. Henao-Mejia J, He JJ. Sam68 relocalization into stress granules in response to oxidative stress through complexing with TIA-1. *Exp Cell Res.* 2009;315(19):3381-95.
216. Piotrowska J, Hansen SJ, Park N, Jamka K, Sarnow P, Gustin KE. Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells. *J Virol.* 2010;84(7):3654-65.
217. Finnen RL, Pangka KR, Banfield BW. Herpes Simplex Virus 2 Infection Impacts Stress Granule Accumulation. *Journal of Virology.* 2012;86(15):8119.
218. Busa R, Sette C. An emerging role for nuclear RNA-mediated responses to genotoxic stress. *RNA Biol.* 2010;7(4):390-6.
219. Das S, Krainer AR. Emerging functions of SRSF1, splicing factor and oncoprotein, in RNA metabolism and cancer. *Mol Cancer Res.* 2014;12(9):1195-204.
220. Lareau LF, Inada M, Green RE, Wengrod JC, Brenner SE. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature.* 2007;446(7138):926-9.

ДОДАТОК А

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. Pankivskyi 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.
2. Pankivskyi 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. DOI: 10.15407/dopovidi2020.05.103.
3. Pankivskyi 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. DOI: 10.7124/bc.000999.
4. Pankivskyi S., Pastré 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.
5. Pankivskyi S., Senchenko N., Busko P., Rynditch A. Effect of scaffold protein ITSN1 on interactions and aggregation properties of RNA-binding protein SAM68. XII Український біохімічний конгрес, 2019, Тернопіль, Україна.
6. Busko P., Pankivskyi 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.
7. Pankivskyi S., Senchenko N., Busko P., Hamon L., Pastré 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.

8. Pankivskyi 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.

9. Бусько П., Паньківський С., С. Кропивко Характеристика взаємодії скафолдного білка ITSN1 з РНК-зв'язуючим білком SAM68. XVII міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: Досягнення біологічної науки», 2019, Київ.

10. Pankivskyi 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.

11. Pankivskyi 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.

12. Дергай М. В., Дергай О. В., Паньківський С. В., Новохацька О. В., Мячинська М., Риндич А. В. Нові функції протеїнів ендоцитозу в контролі внутрішньоклітинного сигналіngu. XI Український біохімічний конгрес. 2014, Київ, Україна.