

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

**МОРДЕРЕР Дмитро Євгенович**



УДК 577.29

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ  $Ca^{2+}$ -ЗАЛЕЖНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ  
СКАФOLDНОГО БІЛКА ITS1 ТА ЙОГО ВЗАЄМОДІЇ З  
ЦИТОСКЕЛЕТНИМ БІЛКОМ STOR У НЕЙРОНАХ**

03.00.03 – молекулярна біологія

**Автореферат**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

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

**Науковий керівник:**

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

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, професор  
**Сиволоб Андрій Володимирович,**  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-науковий центр «Інститут біології»,  
професор кафедри загальної та молекулярної генетики;

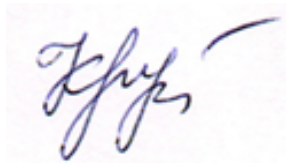
доктор біологічних наук, професор  
**Борисова Тетяна Олександрівна,**  
Інститут біохімії ім.О.В. Палладіна НАН України,  
завідувач відділу нейрохімії.

Захист дисертації відбудеться 22 березня 2016 року о 10.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано 19 лютого 2016 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої  
вченої ради  
кандидат біологічних  
наук, с.н.с.



І.В. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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

Скафолдні білки родини ITSN задіяні в перебігу процесів ендоцитозу, сигнальної трансдукції та реорганізації цитоскелету (Tsyba *et al.*, 2011). Білки, що входять до цієї родини, кодуються двома генами – *ITSN1* та *ITSN2*. У геномі людини *ITSN1* було картовано у хромосомі 21 (Guirroni *et al.*, 1998) і відмічено його підвищену експресію у осіб з синдромом Дауна (Pucharcos *et al.*, 1999). Крім того, підвищення експресії *ITSN1* пов'язують з розвитком таких нейродегенеративних захворювань, як хвороба Альцгеймера та хорея Гентінгтона (Wilmot *et al.*, 2008; Scarpini *et al.*, 2007). *ITSN1* є одним з можливих факторів, що зумовлює розвиток симптомів цих хвороб, зокрема порушення когнітивних функцій центральної нервової системи. Було показано, що *ITSN1* залучений до низки процесів, пов'язаних з розвитком та функціонуванням нейронів, зокрема до ендоцитозу синаптичних везикул та формування дендритних шипиків у нейронах гіпокампу щурів (Pechstein *et al.*, 2010; Nishimura *et al.*, 2005). Крім того, хоча експресія *ITSN1* характерна практично для всіх типів клітин організму, нейрони містять унікальні ізоформи цього білка, утворені шляхом альтернативного сплайсингу (Tsyba *et al.*, 2008), що вказує на важливість *ITSN1* для функціонування нейронів.

Для передбачення наслідків підвищення експресії *ITSN1* при синдромі Дауна та інших нейродегенеративних захворюваннях важливим є встановлення його ролі у розвитку та функціонуванні нейронів. На сьогоднішній день дослідження *ITSN1* зосереджені в основному на його функціях, загальних для багатьох типів клітин, на кшталт участі у клатрин-опосередкованому ендоцитозі або організації внутрішньоклітинних сигнальних каскадів. В той же час, участь *ITSN1* у специфічних для нейронів клітинних процесах залишається менш дослідженою. Одним з шляхів дослідження ролі *ITSN1* в цих клітинах є визначення білків-партнерів, з якими цей білок формує комплекси. Крім того, встановлення способів регуляції активності *ITSN1* важливе для виявлення його зв'язку з певними клітинними процесами. Проведення досліджень у цьому напрямку дозволить більш детально розкрити значення *ITSN1* в нейронах, а також механізми регуляції його активності. Це сприятиме створенню підґрунтя

для розробки засобів керування його активністю, що має значення для створення терапії вищезазначених хвороб.

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

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

1. Визначити нові білки-партнери ITSN1 в нейронах за допомогою преципітації білкових комплексів *in vitro* в поєднанні з MALDI-TOF мас-спектрометрією.

2. Встановити, які домени ITSN1 забезпечують взаємодію з ідентифікованими партнерами

3. Дослідити вплив пригнічення експресії гена *ITSN1* на розвиток дендритного дерева культивованих первинних нейронів гіпокампу щурів, використовуючи морфометричний аналіз клітин.

4. Перевірити можливість фосфорилювання ITSN1  $Ca^{2+}$ -залежними кіназами *in vitro*.

5. Визначити сайти  $Ca^{2+}$ -залежного фосфорилювання ITSN1 за допомогою тандемної мас-спектрометрії.

**Об'єкт дослідження.** Функціонування скафолдного білка ITSN1.

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

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

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше було ідентифіковано взаємодію адаптерного білка ITSN1 з нейрональною ізоформою цитоскелетного білка STOP(MAP6) в нейронах, визначено, що взаємодію здійснює SH3A-домен ITSN1. Вперше продемонстровано часткову ко-локалізацію ITSN1 та STOP в сомі та дендритах культивованих

первинних нейронів гіпокампу щурів. Вперше визначено, що зниження експресії *ITSN1* призводить до пригнічення росту дендритів у первинних нейронах гіпокампу щурів. Вперше показано існування  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежного фосфорилування *ITSN1* та визначено сайти фосфорилування у складі білка.

**Практичне значення одержаних результатів.** Ідентифікація нових функціональних зв'язків *ITSN1* у нейронах, а також механізмів регуляції його активності, дозволить детальніше вивчити механізми функціонування білка та передбачати наслідки підвищення його експресії при трисомії хромосоми 21, яка спостерігається при синдромі Дауна. Визначення ролі *ITSN1* у життєдіяльності нейронів, зокрема у розвитку дендритного дерева, дозволить розширити наші знання про механізми розвитку захворювань, з якими асоційований *ITSN1*, що може сприяти розробці нових терапевтичних підходів для їх лікування. Дослідження  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної регуляції *ITSN1* дозволить зрозуміти зміни, що відбуваються у його функціонуванні у відповідь на зміну умов оточуючого середовища, і в перспективі може стати основою для розробки інструментів впливу на активність *ITSN1* для управління протіканням *ITSN1*-залежних процесів.

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

**Особистий внесок здобувача.** Усі дослідження здійснені за безпосередньої участі здобувача. Обробку та аналіз отриманих результатів здійснено безпосередньо здобувачем. Плазмідні конструкції, що містять кодуючі послідовності GST-злитих ЕН-доменів, SH3-доменів та ССР було отримано к.б.н. Скрипкіною І.Я., к.б.н. Ніколаєнком О.В., к.б.н. Дергаєм М.В., к.б.н. Дергаєм О.В. та к.б.н. Кропивком С.В. Мас-спектрометрія та дослідження субклітинної локалізації білків було проведено спільно з к.б.н. Ніколаєнком О.В. Експерименти з вивчення впливу надекспресії *ITSN1* на асоціацію STOP з мікротрубочками було проведено спільно з Ванданою Йоші, (лабораторія структури та функції біомолекул у нормі та патології університету м. Еврі Франція). Культивування первинних нейронів гіпокампу щурів здійснювали за підтримки к.б.н. Цугорки Т. (Інститут фізіології ім. Богомольця НАН України Київ), а також співробітників лабораторії молекулярної та клітинної нейробиології Міжнародного інституту молекулярної та клітинної біології м. Варшава, Польща. Експерименти з впливу іонів  $\text{Ca}^{2+}$  на зв'язувальні властивості ЕН-доменів *ITSN1* було проведено спільно з Римаренком О.В. Здобувачем особисто проведено імунопреципітації, аналіз білок-білкових взаємодій із використанням GST-злитих білків, дизайн та виготовлення конструкцій для пригнічення експресії генів, морфометричний аналіз нейронів, кіназну реакцію *in vitro*.

Автор висловлює подяку співробітникам лабораторії молекулярної та клітинної нейробиології Міжнародного інституту молекулярної та клітинної біології м. Варшава доктору А. Малік та М. Пепржик за корисні

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

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

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

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

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

*Об'єкти досліджень.* У роботі використовували клітини *Escherichia coli* штамів BL21(DE3) («Novagen», США) та XL1-Blue<sup>let</sup> («Stratagen», США), а також лінії клітин ссавців 293 (клітини ембріональної нирки людини) і HeLa (клітини аденокарциноми шийки матки). Крім того, використовували лізати головного мозку мишей лінії BALB/c. Для приготування первинних дисоційованих культур нейронів гіпокампу використовували щурів лінії Wistar.

*Трансфекція.* Трансфекцію клітин 293 та HeLa проводили, використовуючи реагент для трансфекції «TurboFect» («Thermo Fisher Scientific», США) згідно з рекомендаціями виробника. Трансфекцію нейронів гіпокампу новонароджених щурів проводили за допомогою реагенту «Lipofectamine 2000» («Invitrogen», США) за стандартною процедурою згідно з рекомендаціями виробника.

*Створення плазмідних конструкцій.* Ампліфікацію фрагментів кДНК проводили, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) за допомогою специфічних праймерів, що містили сайти рестрикції. Отримані ПЛР-фрагменти очищували за допомогою набору реактивів «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» («Thermo Fisher Scientific», США) та піддавали рестрикції, після чого лігували з попередньо розрізаним тими ж ендонуклеазами рестрикції плазмідним вектором. Після цього проводили трансформацію компетентних клітин *E.coli* отриманими конструкціями. Бактеріальні клони перевіряли на наявність плазмід, нуклеотидну послідовність вставок визначали за допомогою секвенування за методом Сенгера на автоматичному секвенаторі «Applied Biosystems 3130» (США).

*Експресія рекомбінантних білків.* Рекомбінантні GST-злиті білки отримували, використовуючи відповідні плазмідні конструкції на основі векторів серії pGEX-4T («GE Healthcare», США) та клітини *E.coli* штам BL21(DE3) Rosetta. Експресію білків індукували за допомогою ізопропіл  $\beta$ -D-тіогалактозиду (ІПТГ). Експресовані білки афінно очищували за допомогою глутатіон-сефарози («GE Healthcare», США).

*Дослідження білок-білкових взаємодій.* Білок-білкові взаємодії досліджували методами преципітації білкових комплексів за допомогою антитіл з використанням білок-A/G агарози («Santa Cruz Biotechnology», США) та преципітації за допомогою імобілізованих на глутатіон-сефарозі («GE Healthcare», США) GST-злитих білків. Аналіз білків, що зв'язалися, проводили за допомогою Вестерн-блот аналізу або мас-спектрометрії.

*Вестерн-блот аналіз.* Перенесення білків на з ПААГ нітроцелюлозну мембрану проводилось у апараті для електропереносу «Amersham Biosciences» (Швеція/Великобританія) у буфері для переносу (192 мМ гліцин; 25 мМ Tris-ОН; 20% метанол) при 250 мА протягом 1,5 годин. Після переносу мембрану інкубували півтори години в 5% розчині молока у буфері 1<sup>x</sup>TBS-T (20 мМ Tris-HCl, рН 8,0; 150 мМ NaCl; 1% Triton X-100),

після чого інкубували в тому ж буфері з розведеними первинними антитілами протягом 1 год. Після промивки від первинних антитіл мембрану інкубували протягом 1 год. в розчині з вторинними антитілами, промивали чотири рази та проводили хемолюмінісцентну (ECL) детекцію: в ємності швидко змішували рівні об'єми розчину А (0,1М Tris-HCl, рН8.5; 2,5 мМ люмінол; 0.4 мМ кумарова кислота) та розчину Б (0,1М Tris-HCl, рН8.5; 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), після чого інкубували мембрану в отриманій суміші протягом 1 хв. Детекцію хемілюмінісцентного сигналу проводили за допомогою рентгенівської плівки або системи гель-документації «ChemiDoc» і програми ImageLab («BioRad», США).

*MALDI-TOF мас-спектрометрія.* Визначення білків проводили методом MALDI-TOF мас-спектрометрії. Після проведення електрофоретичного розділення у ДСН-ПААГ білки фарбували барвником Кумасі R250. Визначені смуги вирізали і проводили трипсинізацію описаним раніше методом (Shevchenko *et al.*, 1996). Фрагменти аналізували за допомогою мас-спектрометра «Reflex III» («Bruker», США). Білки визначались за допомогою алгоритму «MOWSE» програми «Mascot» («Matrix Science», США). Достовірно визначеними вважались білки зі значенням «MOWSE score» > 61.

*Дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків.* Субклітинну локалізацію білків досліджували методом імунофлюоресцентного аналізу або шляхом надекспресії білків з флюоресцентною міткою. Препарати аналізували за допомогою лазерної скануючої конфокальної мікроскопії на мікроскопі «LSM 510 Meta» («Carl Zeiss», Німечина).

*Морфометричний аналіз нейронів.* Культивовані нейрони гіпокампу шурів підлягали трансфекції на сьомий день культивування. Через 5 днів після трансфекції клітини фіксувалися і аналізувалися за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопу «LSM 5 Exciter» («Carl Zeiss», Німечина). Морфометричний аналіз дендритного дерева проводили, використовуючи плагін «NeuronJ» програми «ImageJ» (Meijering *et al.*, 2004).

*Кіназна реакція in vitro.* Фракцію білків, що зв'язуються з кальмодуліном, було отримано методом афінної хроматографії з використанням кальмодулін-агарози («Sigma-Aldrich», США) з лізату головного мозку миші, після чого було проведено діаліз отриманої фракції проти кіназного буферу (50 мМ Tris-HCl, рН 7.5; 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 2 мМ ДТТ), використовуючи мембрану для діалізу Spectra/Por 1 DialysisMembrane («Spectrum Laboratories Inc.» США). Після діалізу білки додавалися до очищених рекомбінантних фрагментів ITSN1. Реакційна суміш також містила 0.4 мМ ЕГТА та 0.5 мкМ мікроцистину. В окремі проби також додавали 100 мкМ АТФ, 3 мкМ кальмодулін, 2 мкМ CaCl<sub>2</sub> та 2 мМ ЕГТА. Реакцію проводили при 30°C протягом 30 хв. Фосфорилування білків визначалося фарбуванням білків барвником «Pro-Q-Diamond» («Invitrogen», США) після електрофорезу у ДСН-ПААГ.

*Тандемна мас-спектрометрія.* Білки було піддано протеолізу у гелі при 37°C протягом ночі за допомогою трипсину або протеази Glu-C при співвідношенні протеази до білку 1:50. Наступного дня пептиди було



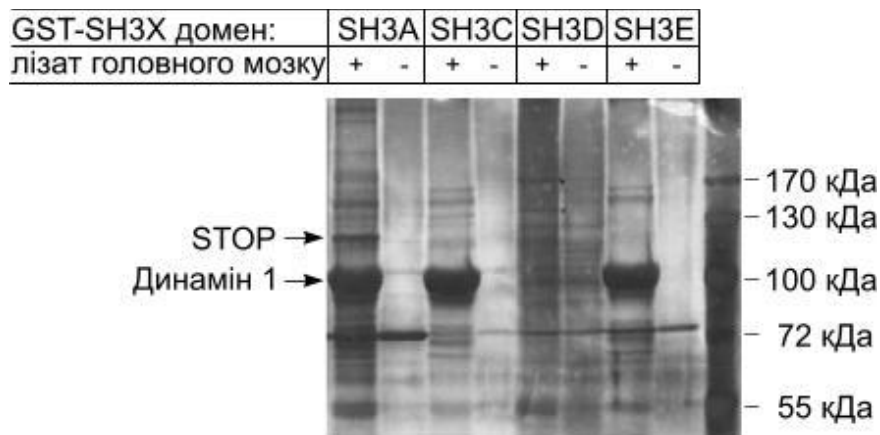
екстраговано з гелю та знесолено за допомогою набору реагентів «Oasis C18» («Waters», США). Після цього пептиди було розведено таким чином, щоб кінцева концентрація мурашиної кислоти у зразку становила 4%. Отримані зразки було проаналізовано за допомогою мас-спектрометра «LTQ Orbitrap Velos Pro», обладнаного іонізатором «Nanospray Flex» та системою рідинної хроматографії «Dionex Ultimate NCS-3000» («Thermo Fisher Scientific», США). Фрагментація іонів проводилася методом дисоціації, що індукується високоенергетичним співударянням (HCD). Спектри було отримано за допомогою програми «Proteome Discoverer™» («Thermo Fisher Scientific», США). Отримані спектри аналізували за допомогою програми «Mascot» («Matrix Science», США) з наступними критеріями пошуку: протеолітичний фермент – трипсин; кількість дозволених пропущених сайтів розрізання – 2; фіксовані модифікації – карбамідометилування цистеїну; варіабельні модифікації – окислення метіоніну, ацетилювання N-кінцевого амінокислотного залишку та фосфорилування серину/треоніну; допустима похибка маси іона-прекурсора -  $\pm 15$  ppm; допустима похибка маси іона-продукта – 0,05 Да. Пошук проводили у базі даних «Mascot5\_SwissProt\_Homo sapiens (human)», що на момент пошуку містила 16405 послідовностей. Пептиди з достовірно визначеними сайтами фосфорилування відбирали за значенням «Mascot Delta Ion Score» згідно з існуючими рекомендаціями, приймаючи порогове значення 13 (Savitski *et al.*, 2011), після чого додатково перевіряли визначені сайти вручну, аналізуючи спектри мас іонів-продуктів з використанням програми «Scaffold» (версія 3.6.5., «Proteome Software», США).

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

### **Результати досліджень та їх обговорення.**

*ITSN1 взаємодіє з цитоскелетним білком STOP, що асоційований з мікротрубочками.* Для пошуку нових партнерів ITSN1, що взаємодіють з його SH3-доменами в тканинах головного мозку, було проведено преципітацію білків лізату головного мозку миші за допомогою імобілізованих GST-злитих SH3-доменів ITSN1. Білки, що зв'язалися, були розділені методом

електрофорезу у поліакриламідному гелі і забарвлені барвником Кумасі R250 (рис. 1) Позначені на рисунку смуги було обрано для ідентифікації методом MALDI-TOF мас-спектрометрії.



**Рис. 1.** Електрофореграма результатів преципітації білків головного мозку миші з GST-злитими SH3 доменами ITSN1. Стрілками позначені смуги, що було обрано для аналізу методом MALDI-TOF мас-спектрометрії

Смугу масою близько 120 кДа, виявлену серед білків, які зв'язалися з SH3A-доменом, було ідентифіковано як білок STOP (stable tubule-only peptide), або MAP6 (microtubule-associated protein 6) (таблиця 1). Цей білок було вперше

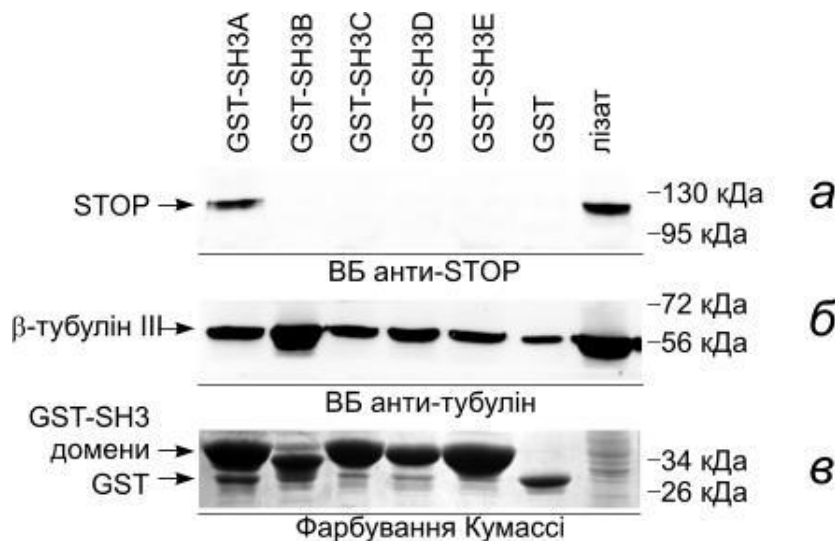
*Таблиця 1*

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

№	Інвентарний номер у базі даних NCBI	Молекулярна маса, Да	К-сть піків, що співпадають/заг. кількість піків	MO-WSE score	Назва у базі даних NCBI
1	gi 6754758	96405	15/24	119	microtubule-associated protein 6 [Mus musculus]
2	gi 7513832	96346	14/24	104	stable tubule only polypeptide - mouse
3	gi 31418674	61068	12/24	99	MAP6 protein [Mus musculus]
4	gi 32264653	90487	8/24	47	Tmc6 protein [Mus musculus]
5	gi 33355701	90487	8/24	47	transmembrane channel-like protein 6 [Mus musculus]

описано як фактор, що забезпечує резистентність деяких субпопуляцій мікротрубочок до холоду (Webb and Wilson, 1980). Згодом було виявлено негативний вплив  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодуліну на функціонування цього білка (Job *et al.*, 1981), механізм якого полягає в конкуренції між  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодуліном та мікротрубочками за зв'язування амінокислотних мотивів у складі молекули STOP (Bosc *et al.*, 2001; Lefevre *et al.*, 2013). Окрім стабілізації мікротрубочок, STOP також приймає участь у генерації синаптичної пластичності у синапсах гіпокампу (Andrieux *et al.*, 2002). Відсутність цього білка у мишей спричиняла їх атипову поведінку, що частково усувалася за допомогою препаратів, які використовуються в клінічній практиці для лікування шизофренії (Andrieux *et al.*, 2002).

Для перевірки результатів мас-спектрометричного аналізу ми провели преципітацію білків лізату головного мозку миші за допомогою імобілізованих GST-злитих SH3-доменів ITSN1 з подальшим Вестерн блот аналізом зв'язаних білків за допомогою моноклональних антитіл anti-STOP («Millipore», США) (рис. 2). Отримані результати підтвердили, що ITSN1 взаємодіє з білком STOP, і ця взаємодія опосередковується його SH3A-доменом. Для перевірки наявності

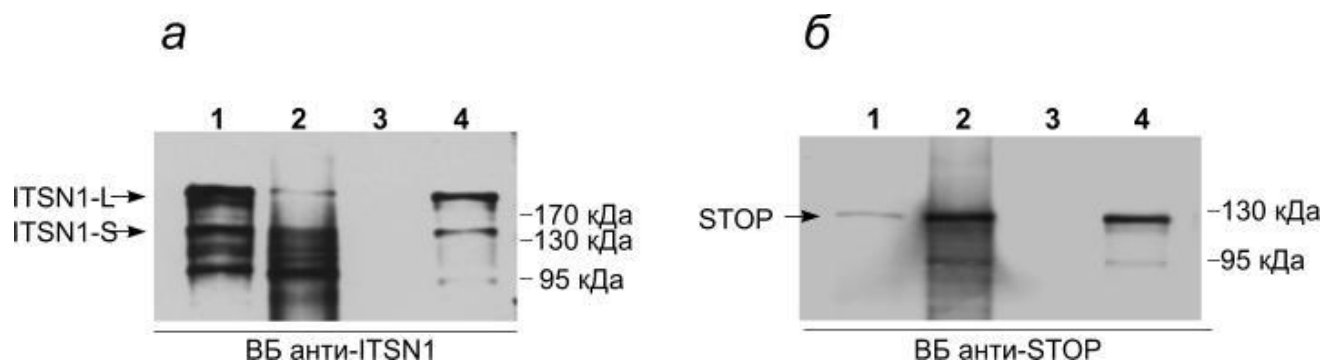


**Рис. 2. Преципітація білків лізату головного мозку миші з використанням GST-злитих SH3 доменів ITSN1: а - Вестерн-блот аналіз результатів преципітації з антитілами anti-STOP; б - Вестерн-блот аналіз результатів преципітації з антитілами anti-β-тубулін III; в - фарбування нанесених GST злитих доменів ITSN1 Кумасі бриліантовим синім**

взаємодії між ITSN1 та STOP ми провели ко-імунопреципітацію їх комплексу з лізату головного мозку миші. Обидва білки були преципітовані з використанням як антитіл anti-STOP, так і поліклональних антитіл до другого ЕН-домену інтерсектину 1 (рис. 3). Цей результат є ще одним підтвердженням взаємодії ITSN1 та STOP.

Відомо, що нейрони та гліальні клітини містять різні ізоформи STOP, що істотно відрізняються за молекулярною масою (Galiano *et al.*, 2004).

Ідентифікований нами білок масою близько 120 кДа відповідає нейрон-специфічній ізоформі STOP. Таким чином, взаємодія між STOP та ITSN1 щонайменше



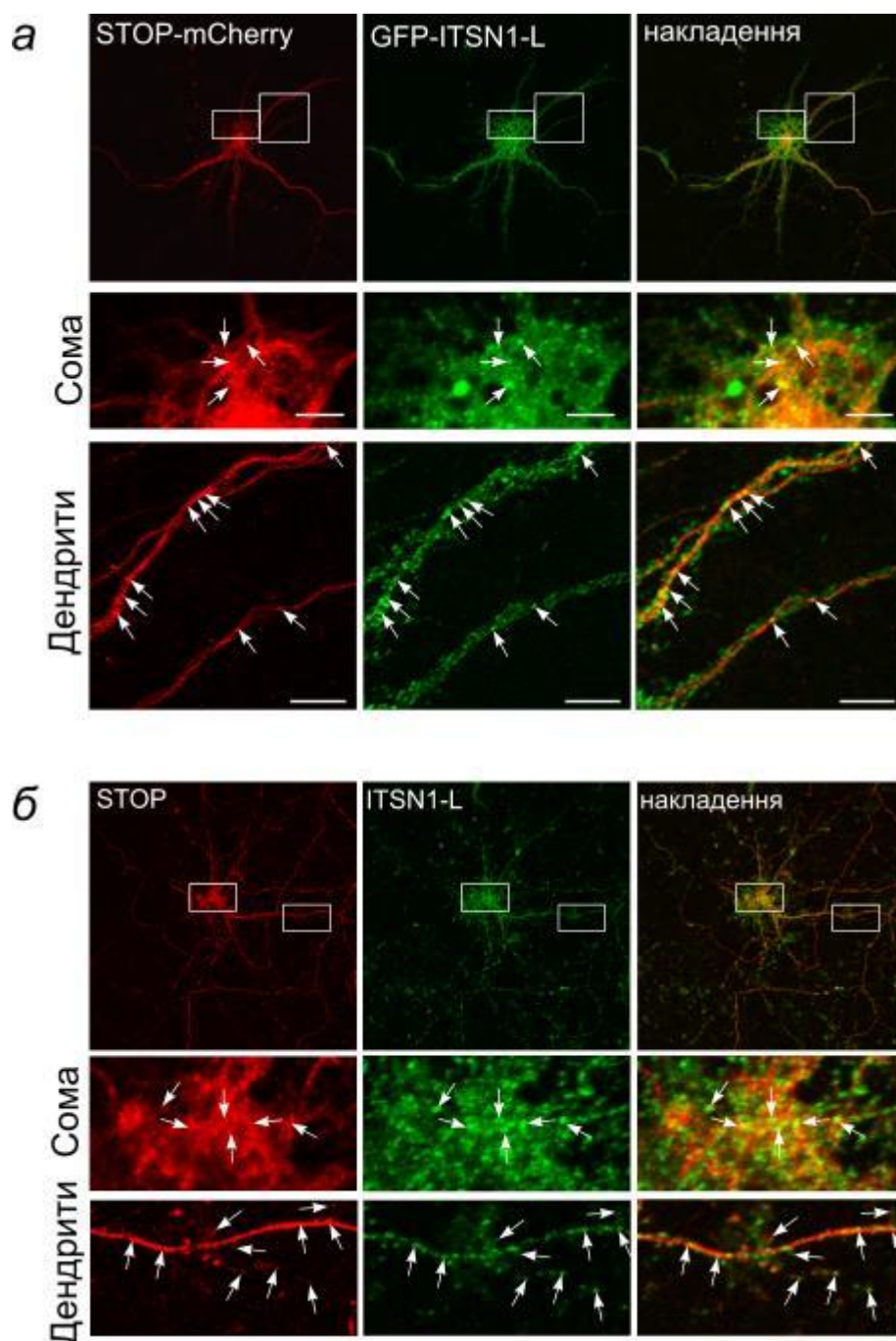
**Рис. 3. Вестерн-блот аналіз з використанням антитіл anti-ITSN1 (а) та anti-STOP (б) результатів ко-імунопреципітації комплексів ITSN1 та STOP з лізату головного мозку миші: 1 – імунореципітація з використанням антитіл anti-ITSN1; 2 - імунопреципітація з використанням антитіл anti-STOP; 3 - імунопреципітація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

відбувається у нейронах, тому ми досліджували їх внутрішньоклітинну локалізацію у первинній культурі культивованих нейронів гіпокампу щурів. У клітинах було надекспресовано ITSN1 та STOP, злиті з зеленим та червоним флуоресцентним білком відповідно. STOP розташовувався переважно вздовж мікротрубочок, тоді як ITSN1 – ближче до плазматичної мембрани у вигляді дискретних точок різного розміру, як і було описано раніше (Hussain *et al.*, 1999). Проте точки ко-локалізації цих двох білків були присутні у сомі та дендритах (рис. 4а). Аналогічні результати було отримано і при вивченні внутрішньоклітинного розподілу ендогенних ITSN1 та STOP методом імунофлуоресцентного забарвлення (рис.4б). Таким чином, нами було ідентифіковано новий білок-партнер ITSN1 – цитоскелетний білок STOP, що взаємодіє з SH3A-доменом ITSN1 у нейронах.

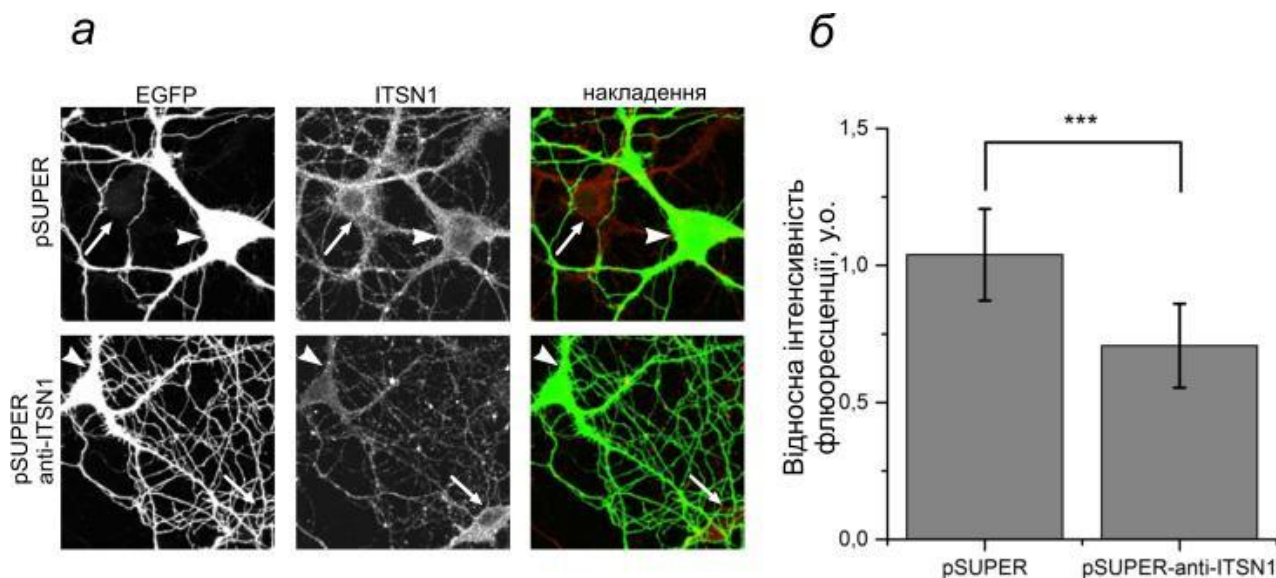
*Вплив ITSN1 на ріст дендритів у клітин первинної культури нейронів гіпокампу щурів.* Нейрони є клітинами, яким притаманний високий рівень структурної пластичності. Ця властивість дозволяє нейронам формувати відростки та утворювати синаптичні контакти у відповідь на дії зовнішніх чинників, підлаштовуючись під геометрію нейронних ланцюгів, що формуються. Ключову роль у поляризації нейронів та у розвитку дендритів та аксонів відіграють білки, що беруть участь у функціонуванні актинового та тубулінового цитоскелету, зокрема білки, асоційовані з мікротрубочками (MAP) (Georges *et al.*, 2008; Conde and Caceres, 2009). Нещодавно було показано, що STOP(MAP6), який також відноситься до цієї групи білків, впливає на розвиток дендритного дерева клітин первинної культури нейронів гіпокампу щурів (Schwenk *et al.*, 2013). Взаємодія ITSN1 зі

STOP(MAP6), так само як і його участь у регуляції полімеризації актину, вказує на те, що *ITSN1* також може бути залученим до процесів формування дендритного дерева, що викликає суттєвий інтерес в контексті участі *ITSN1* у розвитку психічних та нейродегенеративних захворювань. На даному етапі цієї роботи ми вивчали вплив пригнічення експресії *ITSN1* на формування дендритного дерева первинних нейронів гіпокампу щурів.

**Рис.4**  
Імунофлуоресцентний аналіз субклітинної локалізації білків *ITSN1* та *STOP* у первинних нейронах гіпокампу щурів: *а* - профілі локалізації надекспресованих білків EGFP-*ITSN1-L* та *STOP-mCherry*. Стрілками позначені місця ко-локалізації сигналів; *б* - профілі локалізації ендогенних білків *ITSN1* та *STOP*. Стрілками позначені місця ко-локалізації сигналів



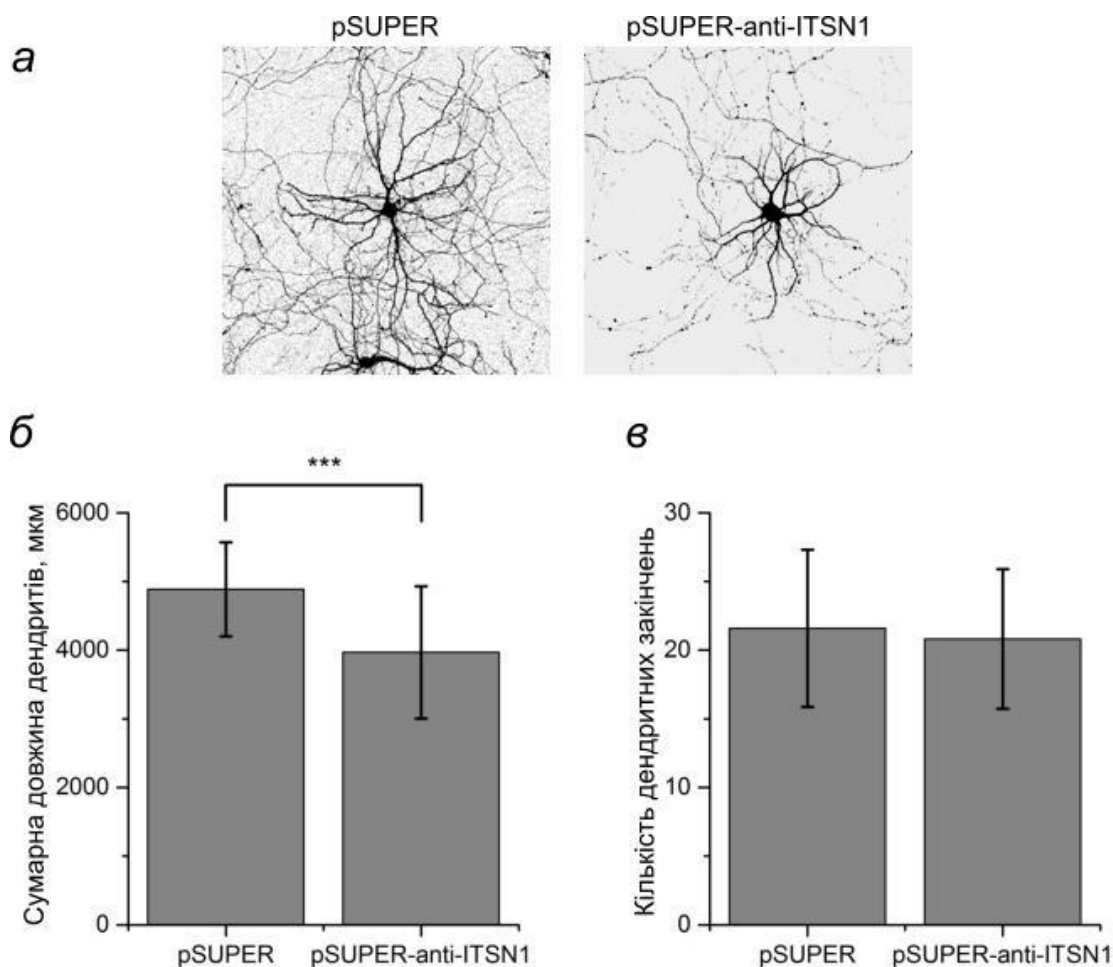
Для пригнічення експресії *ITSN1* ми здійснювали трансфекцію клітин плазмідною конструкцією, що кодувала коротку шпилькову РНК, комплементарну до кодуючої послідовності *ITSN1* (Malacombe *et al.*, 2006). Для контролю використовувався пустий вектор. Використана нами конструкція достовірно знижувала вміст *ITSN1* у клітинах приблизно на 35% (різниця вибірових середніх – 35,4%, ДІ 95% різниці середніх - 27,1-43,6%) (рис.5).



**Рис. 5. Пригнічення експресії *ITSN1* у культивованих нейронах гіпокампу щурів за допомогою коротких шпилькових РНК: а - репрезентативне зображення нейронів, що були трансфіковані конструкціями pSUPER-anti-ITSN1 та pSUPER та пофарбовані за допомогою антитіл anti-ITSN1. Трансфіковані клітини візуалізовано за допомогою конструкції, що кодує зелений флуоресцентний білок EGFP під контролем промотора β-актину, яку додавали до трансфекційної суміші. Короткими і довгими стрілками позначено трансфіковані і нетрансфіковані клітини, відповідно; б - кількісний аналіз вмісту *ITSN1* у клітинах, трансфікованих конструкціями pSUPER (N=17) та pSUPER-anti-ITSN1 (N=28). Відносну інтенсивність флюоресценції визначали як відношення середньої інтенсивності флюоресценції трансфікованих і нетрансфікованих клітин. \*\*\* -  $p < 0.001$  за t-критерієм Стьюдента**

Для дослідження впливу *ITSN1* на формування дендритного дерева ми проводили трансфекцію конструкцій pSUPER-anti-ITSN1 та pSUPER у нейрони, що культивувалися протягом 7 діб, з подальшим їх культивуванням протягом 5 діб. Після цього морфологія трансфікованих нейронів досліджувалась за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа. Морфологію нейрона оцінювали за загальною довжиною дендритів та їх кількістю. В результаті проведеного аналізу було виявлено, що загальна кількість дендритів у клітин, що експресували короткі шпилькові РНК, комплементарні до кодуючої послідовності *ITSN1*,

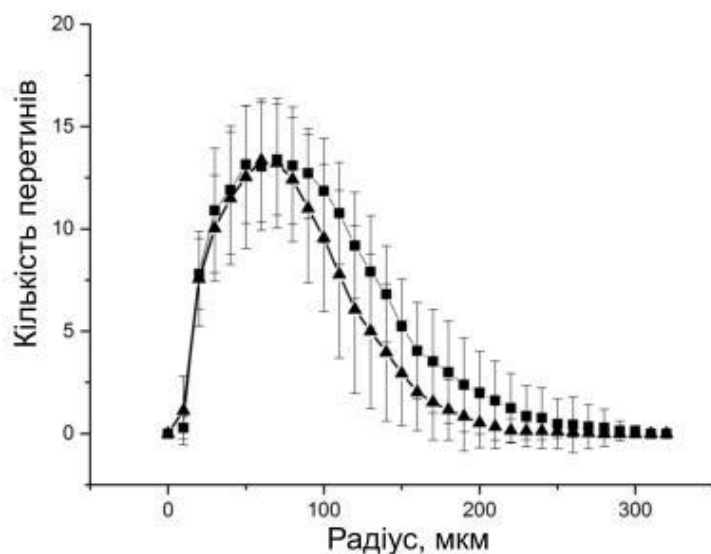
не відрізнялася від контрольних клітин. Натомість, ми спостерігали відносно невелике (10-30%), проте статистично достовірне зменшення сумарної довжини дендритів у нейронах, що експресували короткі шпилькові РНК (різниця вибірових середніх – 921 мкм, ДІ 95% різниці середніх – 442-1400 мкм) (рис.6). Таким чином, пригнічення експресії *ITSN1* не впливало на утворення дендритів, але пригнічувало їх ріст.



**Рис. 6.** Вплив пригнічення експресії *ITSN1* на морфологію дендритного дерева культивованих нейронів гіпокампу щурів: *а* - репрезентативне зображення нейронів, що були трансфіковані конструкціями pSUPER-anti-ITSN1 та pSUPER; *б* - кількісний аналіз сумарної довжини дендритів нейронів, що були трансфіковані конструкціями pSUPER-anti-ITSN1 (N=32) та pSUPER (N=21); *в* - кількісний аналіз кількості дендритних закінчень нейронів, що були трансфіковані конструкціями pSUPER-anti-ITSN1 та pSUPER. \*\*\* -  $p < 0.001$  за *t*-критерієм Стьюдента

Для порівняння ступеню складності будови дендритного дерева ми застосували аналіз Шолля (Sholl, 1953). Візуальний аналіз отриманих кривих продемонстрував, що у клітинах з пригніченою експресією *ITSN1*

максимальна кількість дендритів, що перетинаються одним колом, практично не відрізняється від такої у контрольних клітин (рис.7). Натомість, контрольні клітини характеризувались повільнішим спаданням графіку, ніж клітини, трансфіковані конструкцією pSUPER-anti-ITSN1, що відображає скорочення довжини їх дендритів і зменшення площі, що займають ці клітини. Отримані результати підтверджують те, що пригнічення експресії ITSN1 викликає скорочення довжини дендритів у нейронах гіпокампу щурів.



**Рис. 7.**  
**Визначення впливу пригнічення експресії *ITSN1* на будову дендритного дерева культивованих нейронів гіпокампу щура за допомогою аналізу Шолля:**  
**—▲—** - pSUPER-anti-ITSN1;  
**—●—** - pSUPER

*Ca<sup>2+</sup>-кальмодулін-залежне фосфорилування ITSN1.* Фосфорилування є одним з найпоширеніших видів пост-трансляційних модифікацій, що використовуються клітиною для регуляції функціонування білків. Зокрема, дія іонів кальцію часто опосередковується зв'язуванням з кальцієвими сенсорами, такими як кальмодулін, що активує ряд кіназ та фосфатаз (Kostyuk, 2007). Оскільки раніше було показано участь ITSN1 у ендоцитозі синаптичних везикул (Pechstein *et al.*, 2010), на наступному етапі нашої роботи ми перевірили здатність ITSN1 до  $Ca^{2+}$ -кальмодулін-залежного фосфорилування. Для цього ми провели біоінформатичне передбачення потенційних сайтів фосфорилування ITSN1, використовуючи онлайн-сервіси «Scansite», «NetPhos» та «KinasePhos», а також програму «GPS 2.1» (Obenauer, 2003; Vlom *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2011). Для більшості цих ресурсів, окрім «GPS 2.1», наявна можливість передбачати сайти фосфорилування лише для  $Ca^{2+}$ /кальмодулін-залежної кінази 2 (CaMK2),



тому передбачення зроблене саме для цієї кінази. Результати проведеного передбачення представлені в таблиці 2.

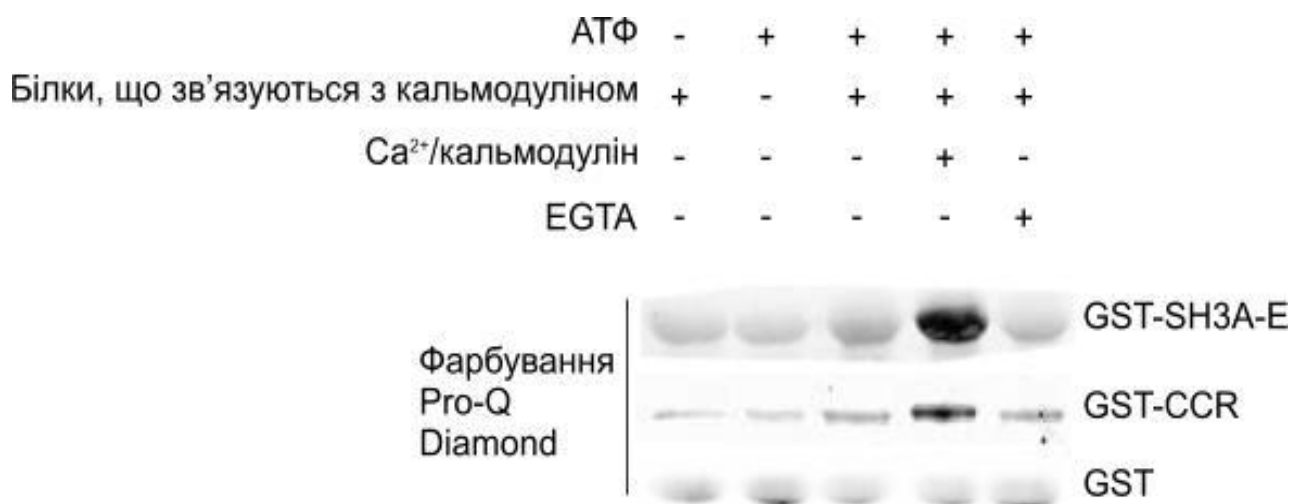
Для підтвердження наявності сайтів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування у молекулі ITSN1, було проведено *in vitro* кіназну реакцію з використанням  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних кіназ. Для цього білки, що зв'язують  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін, було очищено з лізату головного мозку миші за допомогою афінної хроматографії, використовуючи кальмодулін-агарозу («Sigma-Aldrich», США). Ефективність очищення визначали за допомогою детекції білка STOP, що зв'язується з

Таблиця 2

**Біоінформатичне передбачення сайтів фосфорилування ITSN1  
Ca<sup>2+</sup>/кальмодулін-залежною кіназою 2 (CaMK2)**

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

кальмодуліном, методом Вестерн-блот-аналізу. Отримані білки використовували для проведення *in vitro*-кіназної реакції з очищеними GST-злитими рекомбінантними фрагментами ITSN1 – надспіралізованою ділянкою (GST-CCR) та SH3-домен-вмісною ділянкою (GST-SH3A-E). Додавання до реакційної суміші іонів  $Ca^{2+}$  та кальмодуліну призводило до фосфорилування обох фрагментів, що візуалізувалося за допомогою забарвлення електрофорезного гелю барвником «Pro-Q-Diamond» («Invitrogen», США) (рис.8). Без додавання  $Ca^{2+}$  та кальмодуліну фосфорилування не спостерігалось. Таким чином, нами було показано можливість  $Ca^{2+}$ -кальмодулін-залежного фосфорилування ITSN1.



**Рис. 8.** Електрофореграма результатів *in vitro* кіназної реакції між білками, що зв'язуються з кальмодуліном, і рекомбінантними GST-злитими фрагментами ITSN1. Інтенсивне забарвлення смуг при додаванні  $Ca^{2+}$  та кальмодуліну до реакції відчить про фосфорилування білків

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

В результаті проведення мас-спектрометрії було ідентифіковано низку фосфорильованих пептидів. Отримані фосфопептиди було відсортовано за значенням «Mascot Delta Ion Score» для відбору пептидів з достовірно визначеним сайтом фосфорилування. У такий спосіб ми отримали п'ять фосфопептидів, що містили сайти фосфорилування у позиціях, відповідних до позицій T349, T567, S624, S904 та S978 у послідовності повнорозмірного ITSН1 (таблиця 3). Вторинні спектри обраних фосфопептидів було також

Таблиця 3

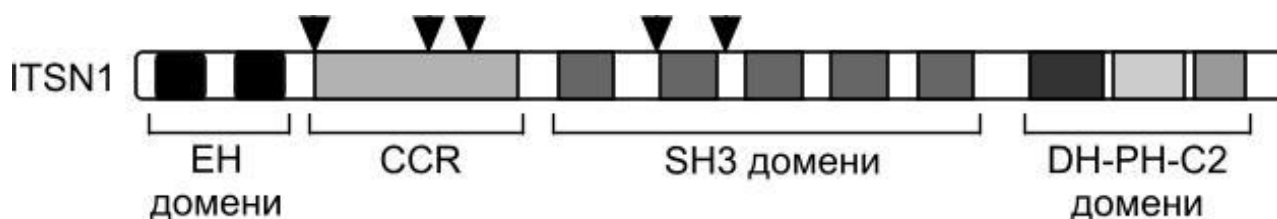
**Ідентифікація сайтів фосфорилування рекомбінантних фрагментів білка ITSН1.**

Сайт фосфорилування (номери за послідовністю Q15811 у базі даних UniProt)	Рекомбінантний фрагмент ITSН1	Іон-прекурсор	m/z	z	Відхилення від теоретичної маси, Да	Mascot Delta Ion score
T349	CCR	(K)KLPVtFEDK(K)	578,79	2	0,0014	35,3
T567	CCR	(R)DSLvtLKR(A)	506,27	2	0,00033	19,7
S624	CCR	(E)IHNKQQLQKQ-KsMEAERLKQKE(Q)	701,37	4	0,0043	35,2
S904	SH3A-E	(R)SAFTPATATGS-SPsPVLGQGEK(V)	1085,51	2	0,0027	15,0
S978	SH3A-E	(K)STsMDSGSSESP-ASLKR(V)	903,82	2	0,0053	16,4

перевірено вручну на предмет наявності фосфоспецифічних вторинних іонів для підтвердження достовірності ідентифікованих сайтів. В усіх п'яти випадках наявні піки підтверджували достовірність визначених сайтів фосфорилування. Два з ідентифікованих сайтів розташовуються у надспіралізованій ділянці ITSН1 (CCR), ще три – в міждоменних лінкерах між EH та CCR, SH3A та SH3B, а також SH3B та SH3C доменами (рис. 9).

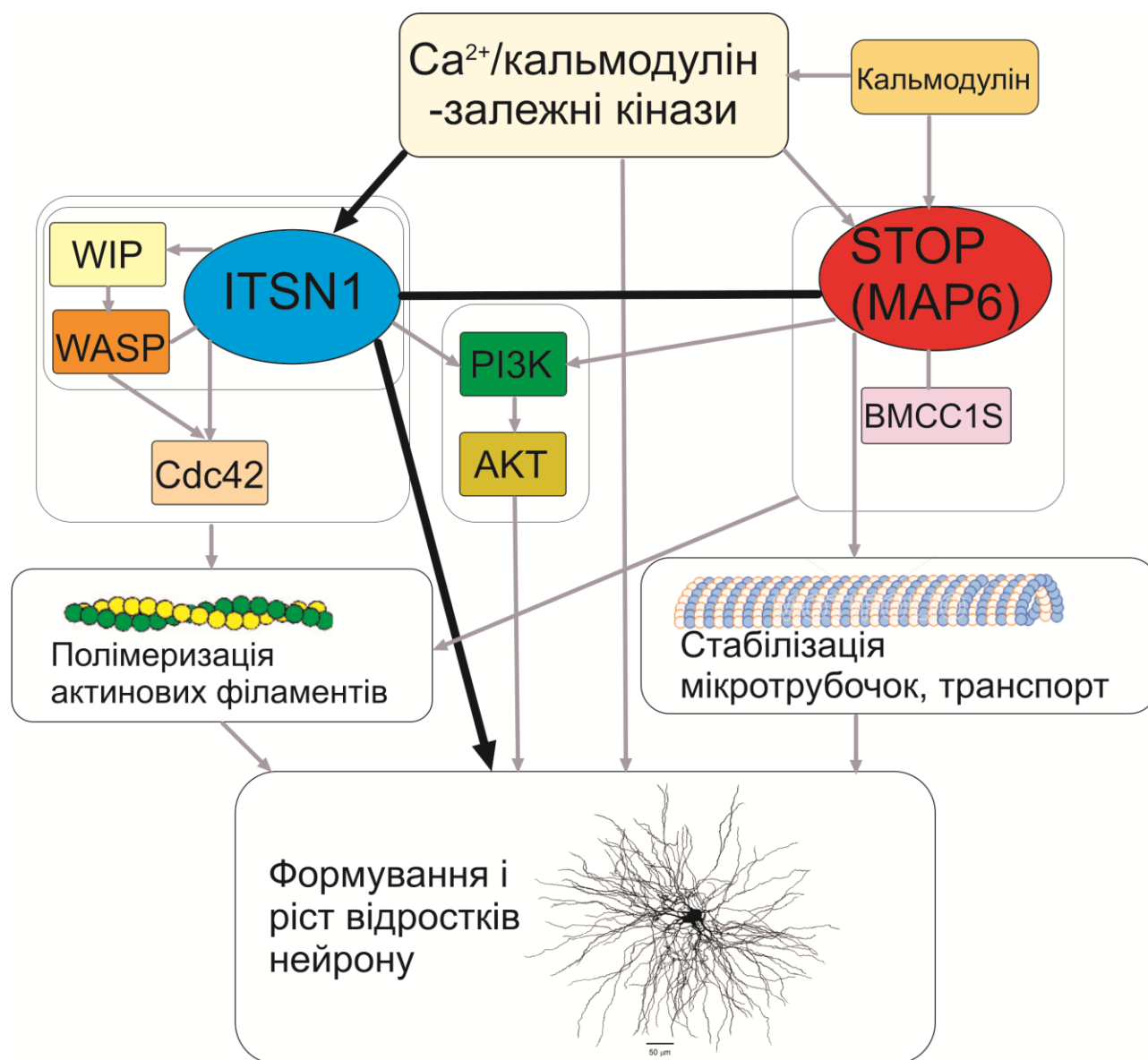
Функціональне значення виявлених сайтів фосфорилування стане предметом наших подальших досліджень. Проте, з огляду на локалізацію виявлених сайтів фосфорилування у молекулі ITSН1, ми припускаємо, що воно впливає на білок-білкові взаємодії, які здійснюються CCR- та SH3B-

доменами ITSN1. Партнерами цих доменів в основному є білки ендоцитозу, зокрема EPS15 та ендофілін (Sengar, 1999; Pechstein *et al.*, 2015). Порушення цих взаємодій внаслідок фосфорилювання може призводити до виключення



**Рис. 9. Схематичне зображення розташування ідентифікованих сайтів фосфорилювання у молекулі ITSN1. Сайти фосфорилювання позначені трикутниками**

ITSN1 зі складу ендоцитозних комплексів та його залучення до виконання інших функцій. В цій роботі ми показали, що ITSN1 формує комплекс з цитоскелетним білком STOP(MAP6) та бере участь у рості дендритів. Зазначена функція ITSN1 може бути незалежною від його ролі у ендоцитозі і обумовленою його участю у регуляції цитоскелету, в тому числі і через взаємодію зі STOP(MAP6). Цікаво, що пригнічення експресії гена *MAP6* також впливає на розвиток дендритного дерева, хоча, на відміну від ITSN1, воно активізує процеси росту та галуження дендритів (Schwenk *et al.*, 2013). Крім того, STOP(MAP6) здатний ініціювати утворення філоподій (Arama *et al.*, 2012), що є початковим етапом утворення дендритів (Georges *et al.*, 2008). ITSN1 також залучений до утворення філоподій та інвадоподій через взаємодію з актин-регулюючими білками Cdc42, WASP та WIP (Hussain *et al.*, 2001; Gryaznova *et al.*, 2015). Хоча у філоподіях відсутні мікротрубочки, STOP(MAP6) все ж локалізується в цих структурах при його надпродукції у клітинах HeLa спільно з білком VMCC1S, що залучений до регуляції рухливості клітини (Arama *et al.*, 2012). Раніше було показано, що STOP(MAP6) може від'єднуватись від мікротрубочок та приєднуватись до актинових філаментів при його фосфорилуванні  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежною кіназою 2 (Baratier *et al.*, 2006). Роль  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежних кіназ у розвитку дендритного дерева нейронів також було показано у багатьох експериментах (Redmond *et al.*, 2002; Gaudilliere *et al.*, 2004; Wayman *et al.*, 2006). Іншим можливим механізмом участі STOP(MAP6) у процесах росту нейрональних відростків є опосередкування передачі сигналу від рецепторних комплексів, які визначають напрямок цього росту, через PI3K-AKT сигнальний шлях (Deloulme *et al.*, 2015). Слід зазначити, що ITSN1 також може брати участь у функціонуванні цього сигнального шляху (Das *et al.*, 2007). Ідентифіковані в цій роботі зв'язки ITSN1 зі STOP та  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежними кіназами, а також перераховані вище можливі шляхи їх залучення до регуляції росту відростків нейрону, представлені на рисунку 10.



**Рис. 10.** Гіпотетична схема участі ITSN1 та STOP у формуванні дендритного дерева. Жирними лініями позначено зв'язки, ідентифіковані в цій роботі

## ВИСНОВКИ

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

1. За допомогою мас-спектрометрії MALDI-TOF вперше ідентифіковано новий нейрональний партнер скафолдного білка ендоцитозу ITSN1 – цитоскелетний білок STOP. Результати мас-спектрометрії підтверджено за допомогою преципітації білків з лізату головного мозку миші з використанням GST-злитих SH3-доменів ITSN1 та ко-імунопреципітації

комплексів ITSN1 та STOP з лізату головного мозку миші з подальшим Вестерн-блот аналізом білків, що зв'язалися.

2. Визначено, що ITSN1 формує комплекс зі STOP за допомогою SH3-домену.

3. Показано, що ITSN1 та STOP частково ко-локалізуються у сомі та дендритах культивованих первинних нейронів гіпокампу щурів.

4. Продемонстровано, що пригнічення експресії гена *ITSN1* не призводить до зменшення кількості дендритів культивованих первинних нейронів гіпокампу щурів.

5. Встановлено, що при пригніченні експресії гена *ITSN1* відбувається скорочення довжини дендритів культивованих первинних нейронів гіпокампу щурів.

6. За допомогою біоінформатичних методів передбачено 17 потенційних сайтів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування ITSN1.

7. Встановлено, що надспіралізована та SH3-домен-вмісна ділянки ITSN1 здатні підлягати  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежному фосфорилуванню *in vitro*.

8. З використанням тандемної мас-спектрометрії, поєднаної з рідинною хроматографією, ідентифіковано 5 сайтів  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежного фосфорилування ITSN1: для надспіралізованої ділянки ідентифіковано 3 сайти фосфорилування, а для ділянки, що містить SH3-домени, – 2 сайти.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Identification of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphorylation sites of endocytic scaffold ITSN1 by tandem mass spectrometry. / D. Ye. Morderer, O. V. Nikolaienko, A. V. Rynditch // *Biopolym. Cell.* – 2015. Vol.31. –P. 338-344. (Особистий внесок здобувача: аналіз результатів тандемної мас-спектрометрії).

2.  $\text{Ca}^{2+}$  does not affect the binding properties of ITSN1 EH domains / Morderer D. Ye., Rymarenko O. V., Skrypkina I. Ya., Rynditch A. V. // *Biopolym. Cell.* -2014. Vol. 30. N 6. –P. 481-484. (Особистий внесок здобувача: проведення преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків, культуральна робота, створення плазмідних конструкцій).

3. Ca/calmodulin-dependent phosphorylation of endocytic scaffold ITSN1 / D. Ye. Morderer, O. V. Nikolaienko, I. Ya. Skrypkina, O. V. Rymarenko, S. V. Kropyvko, L. O. Tsyba, A. V. Rynditch // *Biopolym. Cell.* – 2014. Vol.30. –P. 74-76. (Особистий внесок здобувача: проведення очищення білків за допомогою афінної хроматографії, *in vitro* кіназну реакцію та фабування білків барвником «Pro-Q-Diamond»).

4. Endocytic adaptor protein ITSN1 forms a complex with microtubule stabilizer STOP in neurons / Dmytro Morderer, Oleksii Nikolaienko, Inessa Skrypkina, Volodymyr Cherkas, Liudmyla Tsyba, Pavel Belan, Alla Rynditch // *Gene.* – 2012. – Vol.505. – P. 360-364. (Особистий внесок здобувача: проведення імунопреципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків,

культуральна робота, створення плазмідних конструкцій, одержання та забарвлення клітинних препаратів).

5. Intersectin 1 forms a complex with adaptor protein Ruk/CIN85 in vivo independently of epidermal growth factor stimulation / O. Nikolaienko, I. Skrypkina, L. Tsyba, Y. Fedyshyn, D. Morderer, V. Buchman, S. de la Luna, L. Drobot, A. Rynditch // Cellular signaling. – 2009. Vol.21. – P. 753-759. (Особистий внесок здобувача: створення плазмідних конструкцій).

6. Intersectin 1 interacts with cytoskeletal protein MTAP6 / Morderer D., Nikolaienko O., Tsyba L., Skrypkina I., Rynditch A. // RECOOP HST Consortium, Bridges in Life Scienced Annual Scientific Review, (Zagreb). – Zagreb. – 2008. – P. 23. (Особистий внесок здобувача: проведення імунопреципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків).

7. Interaction of endocytic adaptor intersectin 1 with microtubule stabilizer STOP, which is involved in synaptic transmission / Dmytro Morderer, Oleksii Nikolaienko, Inessa Skrypkina, Liudmyla Tsyba, Volodymyr Cherkas, Alla Rynditch // VIII Parnas Conference: Acta Biochimica Polonica, (Warsaw, 27-31 Aug). – Warsaw. – 2011. – P. 67. (Особистий внесок здобувача: проведення імунопреципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків, культуральна робота, створення плазмідних конструкцій, одержання та забарвлення клітинних препаратів).

8. Endocytic adaptor protein Intersectin 1 (ITSN1) interacts with cytoskeletal protein STOP in neurons / Dmytro Morderer, Oleksii Nikolaienko, Inessa Skrypkina, Lyudmyla Tsyba, Volodymyr Cherkas, Pavel Belan, Alla Rynditch // IUBMB&FEBS Young Scientists Program, (Cadiz, 1-4 September). – Cadiz. – 2012. – P. 72. (Особистий внесок здобувача: проведення імунопреципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків, культуральна робота, створення плазмідних конструкцій, одержання та забарвлення клітинних препаратів).

9. Intersectin 1 interacts with STOP protein in neurons / Morderer D., Nikolaienko O., Skrypkina I., Tsyba L., Rynditch A. // RECOOP HST Bridges in Life Sciences 7th Annual Scientific Conference, (Budapest, March 30 – April 1). – Budapest. – 2012. – P.82. (Особистий внесок здобувача: проведення імунопреципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків, культуральна робота, створення плазмідних конструкцій, одержання та забарвлення клітинних препаратів).

10. New aspects of endocytic adaptor ITSN1 functioning in neurons / Morderer D., Nikolaienko O., Skrypkina I., Rymarenko O., Tsyba L., Rynditch A. // RECOOP HST Bridges in Life Sciences 8th Annual Scientific Conference “Laugh and Be the Best in Research and Patient Care”, (Prague, April 5-7). – Prague. – 2013. – P. 77. (Особистий внесок здобувача: проведення імунопреципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків, культуральна робота, створення плазмідних конструкцій, одержання та забарвлення клітинних препаратів, проведення очищення білків за допомогою афінної хроматографії, *in vitro* кіназну реакцію та фабування білків барвником «Pro-Q-Diamond», морфометричний аналіз клітин).

11. MAP6 – новий потенційний партнер інтерсектину 1 / Мордерер Д.Є., Ніколаєнко О.В., Циба Л.О., Скрипкіна І.Я // III міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь та поступ біології», (Львів, 2007). – Львів. - С.397. (*Особистий внесок здобувача: проведення імунореципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків*)
12. Identification of novel intersectin 1 binding partner – MAP6 / Morderer D., Nikolaienko O., Tsyba L., Skrypkina I., Rynditch A. // Conference for young scientists, PhD students and students on Molecular Biology and Genetics, (Kyiv., 2007). – Kyiv. – P. 79. (*Особистий внесок здобувача: проведення імунореципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків*)
13. Endocytic scaffold ITSN1: novel connections and way of regulation in neurons / Morderer D., Nikolaienko O., Skrypkina I., Rymarenko O., Cherkas V., Belan P., Rynditch A. // VIIth Int. GDRI conf. “From Molecular to Cellular Events in Human Pathology” (Riga, Latvia). – Riga. – P. 27. (*Особистий внесок здобувача: проведення імунореципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків, культуральна робота, створення плазмідних конструкцій, одержання та забарвлення клітинних препаратів, проведення очищення білків за допомогою афінної хроматографії, in vitro кіназну реакцію та фабування білків барвником «Pro-Q-Diamond», морфометричний аналіз клітин*).

## АНОТАЦІЯ

**Мордерер Д.Є. Ідентифікація  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування скафолдного білка ITSN1 та його взаємодії з цитоскелетним білком STOP у нейронах. – Рукопис**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 – молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2016.

Дисертація присвячена пошуку нових взаємодій скафолдного білка ITSN1 з нейрональними білками, дослідженню його ролі у розвитку нейронів, а також вивченню  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування ITSN1. В ході роботи було ідентифіковано новий партнер ITSN1 – цитоскелетний білок STOP. Показано, що STOP формує комплекс з SH3A-доменом ITSN1. Продемонстровано, що пригнічення експресії *ITSN1* не призводить до зменшення кількості дендритів первинних нейронів гіпокампу щурів, але призводить до скорочення довжини дендритів первинних нейронів гіпокампу щурів. За допомогою біоінформатичних методів передбачено 17 потенційних сайтів  $\text{Ca}^{2+}$ -залежного фосфорилування ITSN1. Вперше продемонстровано фосфорилування ITSN1 у  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін-залежний спосіб *in vitro*. З використанням тандемної мас-спектрометрії, поєднаної з рідинною хроматографією, ідентифіковано 5 сайтів  $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулін-залежного фосфорилування ITSN1.

**Ключові слова.** ITSN1, нейрон, STOP, дендритне дерево,  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулін-залежне фосфорилування.



## АННОТАЦИЯ

**Мордерер Д.Е. Идентификация  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого фосфорилирования скаффолдного белка ITSN1 и его взаимодействия с цитоскелетным белком STOP в нейронах. – Рукопись**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 – молекулярная биология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена поиску новых взаимодействий скаффолдного белка ITSN1 с нейрональными белками, исследованию его роли в развитии нейронов, а также изучению  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимого фосфорилирования ITSN1. В ходе работы был идентифицирован новый партнер ITSN1 – цитоскелетный белок STOP. Показано, что STOP формирует комплекс с SH3A-доменом ITSN1. Продемонстрировано, что снижение экспрессии *ITSN1* не приводит к снижению количества дендритов в первичных нейронах гиппокампа крыс, но при этом вызывает сокращение длины дендритов в первичных нейронах гиппокампа. Впервые продемонстрировано  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин-зависимое фосфорилирование ITSN1 *in vitro*. С использованием тандемной масс-спектрометрии, комбинированной с жидкостной хроматографией, идентифицировано 5 сайтов  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин-зависимого фосфорилирования ITSN1.

**Ключевые слова.** ITSN1, нейрон, STOP, дендритное дерево,  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин-зависимое фосфорилирование.

## SUMMARY

**Morderer D.Ye. Identification of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphorylation of scaffold protein ITSN1 and its interaction with cytoskeletal protein STOP in neurons. - Manuscript.**

A dissertation submitted to acquire the Candidate degree (PhD) in Biology, speciality 03.00.03 – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

ITSN1 is a scaffold protein involved in formation of multimolecular complexes required for clathrin-mediated endocytosis, signal propagation through several intracellular signaling cascades and nucleation of actin filaments. Misregulation of *ITSN1* expression is linked to several neurodevelopmental and neurodegenerative diseases such as Down syndrome, Alzheimer's disease and Huntington disease. Increasing evidence indicates that ITSN1 can be a factor implicated in development of these disorders. In support of this, ITSN1 was found to be involved in important neuronal functions such as dendritic spine development and synaptic vesicle recycling. The aim of this work was to identify new interacting partners of ITSN1 in neurons, evaluate its effect on the formation of dendritic tree by cultivated hippocampal neurons, and to test possible ITSN1 phosphorylation by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent enzymes.

In order to find new ITSN1-interacting proteins in neurons *in vitro* binding assay of ITSN1 SH3 domains with mouse brain lysate was performed. For SH3A

domain we identified a 120 kDa band that was subjected to MALDI-TOF mass spectrometry analysis. This band was identified as STOP (stable tubule-only peptide) – microtubule-associated protein that mediates their stabilization. Interaction between ITSN1 and STOP was confirmed by in vitro binding assay of ITSN1 SH3 domains with mouse brain lysate and subsequent Western blot analysis. Furthermore, complexes of ITSN1 and STOP were precipitated from mouse brain lysate with anti-STOP and anti-ITSN1 antibodies, indicating their interaction in vivo. Using laser scanning confocal microscopy we showed that ITSN1 and STOP partially colocalize in rat primary hippocampal neurons. These findings indicate formation of complexes between ITSN1 and STOP in neurons.

Neuronal cytoskeleton plays an important role in formation and growth of neurites and establishment of synaptic contacts. Recently STOP was shown to be important for dendritic tree formation. Since ITSN1 interacts with STOP and participates in actin regulation, we studied its role in dendritic development. We show that downregulation of ITSN by shRNA does not affect number of dendrites but results in decrease of total dendritic length. Also, reduction of length of dendrites without affecting their number and complexity was revealed by Sholl analysis. Thus, ITSN1 is involved in growth of dendrites.

$\text{Ca}^{2+}$  ions play an important role in neuron functions by participation both in propagation of electric impulses and in signal transduction within neuronal cell. Therefore, many neuronal proteins are in some way regulated by  $\text{Ca}^{2+}$  signaling system. One of possible ways to mediate the  $\text{Ca}^{2+}$  regulation is phosphorylation of proteins by  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent kinases. Using several bioinformatic tools we predicted the existence of 17 potential phosphorylation sites for  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase 2 in ITSN1 molecule. Moreover, we demonstrate that particular fragments of ITSN1 can be phosphorylated in  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent manner. Using tandem mass spectrometry we identified 5 sites of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphorylation. Among them 2 were detected in CCR fragment, 1 – in EH-CCR interdomain linker, 1 – in SH3A-SH3B interdomain linker and 1 – in SH3B-SH3C interdomain linker.

**Keywords.** ITSN1, neuron, STOP, dendritic tree,  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphorylation.