

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ



ГРЯЗНОВА Тетяна Анатоліївна

УДК 577.29

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

03.00.03 – молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

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

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України  
**Мінченко Олександр Григорович,**  
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна  
НАН України,  
завідувач відділу молекулярної біології;

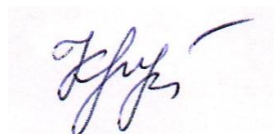
доктор біологічних наук, професор  
**Сиволоб Андрій Володимирович,**  
Київський національний університет імені  
Тараса Шевченка, Навчально-науковий центр  
«Інститут біології та медицини»,  
професор кафедри загальної та медичної  
генетики.

Захист дисертації відбудеться 28 травня 2019 року о 10.30 на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

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

Автореферат розіслано \_\_\_\_квітня\_\_ 2019 р.

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



I.V. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Перебудови актинового цитоскелету відіграють важливу роль у процесах ендоцитозу, екзоцитозу, адгезії, внутрішньоклітинному везикулярному транспорті, міграції та інвазії клітин. Порушення регуляції актинового цитоскелету спостерігається при аутоімунних захворюваннях, нейродегенеративних патологіях та злоякісній трансформації клітин (Wickramarachchi *et al.*, 2010; Cabrales Fontela *et al.*, 2017; Molinie *et al.*, 2018). Реорганізацію актинових філаментів контролюють фактори нуклеації актину, такі як N-WASP та кортактин, що асоційовані в клітині з білком WIP, який регулює їх активність та стабілізує актинові філаменти (Campellone *et al.*, 2010; Martinez-Qusles *et al.*, 2001; Kinley *et al.*, 2003).

WIP належить до родини верпролінів, що складається із трьох представників – CR16, WIP та WIRE, які є важливими регуляторами Arp2/3-залежної полімеризації актину (Anton *et al.*, 2007). Відомо, що WIP, асоційований із розвитком імунодефіциту при синдромі Віскотта-Олдрича, є одним із важливих компонентів інвадоподій та подосом – спеціалізованих мембранних структур клітинної інвазії, що забезпечують деградацію позаклітинного матриксу (Noy *et al.*, 2012; Vijayakumar *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2016). Ключову роль у формуванні подосом та інвадоподій відіграє реорганізація актинового цитоскелету, яка регулюється інтегрованими сигнальними каскадами, що передають позаклітинні стимули на актинові філаменти (Murphy *et al.*, 2011; Paterson *et al.*, 2018). Важливими компонентами сигнальних каскадів клітини є адаптерні білки, які регулюють утворення та функціонування макромолекулярних комплексів. До адаптерних білків належать інтерсектини (ITSN1 та ITSN2), що асоційовані з розвитком нейродегенеративних захворювань та злоякісною трансформацією клітин. Відомо, що за допомогою альтернативного сплайсингу утворюються дві основні ізоформи інтерсектинів, коротка (ITSN-S) та довга (ITSN-L) (Tsyba *et al.*, 2011). Довгі ізоформи інтерсектинів, додатково до адаптерних функцій, забезпечують обмін ГДФ на ГТФ на малій ГТФазі Cdc42, що призводить до утворення активної форми Cdc42-ГТФ, яка регулює організацію актинових філаментів (Hunter *et al.*, 2013; Klein *et al.*, 2009). Серед ITSN-зв'язуючих білків, що задіяні в регуляції актинового цитоскелету, відомі білок-активатор ГТФаз CdGAP та N-WASP, що є ефектором Cdc42 та активатором Arp2/3 комплексу (Herrero-Garcia *et al.*, 2017). Проте, роль інтерсектинів у перебудовах актинового цитоскелету є недостатньо вивченою.

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

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано в рамках наукових проектів відділу функціональної геноміки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України: «Молекулярні взаємодії інтерсектинів як компонентів ендоцитозу, перебудов актинового цитоскелету та підтримки вірусної латентності» (номер державної реєстрації – 0111U008918, 2012-2016 рр.); «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 досліджень.** Метою дисертаційної роботи було дослідити нові взаємодії адаптерних білків інтерсектинів із регуляторами полімеризації актину, WIP і CR16, та з'ясувати функціональне значення виявлених взаємодій у клітині.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Перевірити можливість взаємодії *in vitro* між інтерсектинами та новими потенційними партнерами, WIP та CR16, передбаченими біоінформатичними методами.
2. Виявити, які домени ITSN1 та ITSN2 забезпечують взаємодію з ідентифікованими партнерами.
3. Дослідити внутрішньоклітинну локалізацію ITSN-вмісних білкових комплексів, що беруть участь у полімеризації актину.
4. Дослідити вплив ITSN-вмісних білкових комплексів на везикулярний транспорт.
5. Проаналізувати можливості ITSN-вмісних білкових комплексів у формуванні актин-збагачених субклітинних структур (філоподій та інвадоподій).
6. Перевірити можливість участі ITSN1 та ITSN2 в клітинній інвазії.

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

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

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

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

ділянках активних перебудов кортикального актинового цитоскелету та індукують утворення філоподієподібних виступів. Показано існування потрійного комплексу між ITSN1, WIP та N-WASP, у складі якого WIP сприяє взаємодії N-WASP з ITSN1, тоді як наявність N-WASP зменшує зв'язування WIP з ITSN1. Запропоновано гіпотетичну модель, згідно з якою взаємодія ITSN з WIP дозволяє Cdc42 активувати N-WASP з подальшою активацією Arp2/3 комплексу. Продемонстровано, що в клітинах лінії раку молочної залози MDA-MB-231, ендогенні білки ITSN1 та ITSN2 локалізуються в інвадоподіях. Виявлено, що CR16 формує комплекси з нейрон-специфічною ізоформою SH3A-домена ITSN1 та SH3E-доменом ITSN2. Показано, що ITSN1, на відміну від ITSN2, зв'язує CR16, який знаходиться в комплексі з ендогенним  $\beta$ -актином, що сприяє його колокалізації з полімеризованим актином у клітинах лінії MCF-7. Вперше було виявлено наявність транскриптів *CR16* у гліобlastомах та злоякісних пухлинах молочної залози людини.

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

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

Відкриття специфічної взаємодії нейрон-специфічної ізоформи ITSN1 з CR16 дозволить детальніше вивчити механізми функціонування ITSN1, що асоційовані з нейродегенеративними патологіями, молекулярні механізми яких ще недостатньо з'ясовані.

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

**Особистий внесок здобувача.** Всі експериментальні дослідження виконувались особисто або за безпосередньої участі здобувача. Більшість представлених експериментів, а також обробку і аналіз отриманих результатів виконано особисто пошукачем. Клонування кодуєчої послідовності WIP для бактеріальної та еукаріотичної експресії; дослідження білок-білкових взаємодій за допомогою GST-злитих білків та коімунопреципітацій; дослідження локалізації ITSNs в інвадоподіях методом протеолітичної деградації позаклітинного матриксу; аналіз інтерналізації трансферину були проведені здобувачем. Плазмідні конструкції, що містять кодуєчі послідовності GST-злитих SH3-доменів ITSN1 та ITSN2, Omni-ITSN2, Muc-CR16, Cherry-ITSN1, Omni-ITSN1(+VKGW) та Omni-

ITSN1-L отримано к.б.н. С.В. Кропивком, к.б.н. О.В. Новохацькою та к.б.н. І.Я. Скрипкіною. Делеційні конструкції WIP були отримані разом з к.б.н. С.В. Кропивком. Біоінформатичний аналіз та конфокальні дослідження щодо впливу комплексу ITSN1/WIP на індукцію філоподієподібних виступів було проведено спільно з к.б.н. О.С. Губар. Дослідження прямої взаємодії між рекомбінантними афінно очищеними білками WIP і ITSN1 та картування фрагменту білка WIP, що забезпечує взаємодію з ITSN1, проводились за участі М.В. Бурдинюк. Конфокальну мікроскопію проводили спільно з к.б.н. С.О. Карахімом. Автор висловлює подяку к.б.н. Л.О. Цибі, к.б.н. О.С. Губар, к.б.н. С.В. Кропивку та к.б.н. Д.Є. Мордереру за корисні поради під час планування експериментів та обговорення отриманих результатів. Слова щирої вдячності автор висловлює науковому керівнику член-кореспонденту НАН України, д.б.н., професору А.В. Риндич за допомогу в розробці стратегії досліджень, аналізі, узагальненні та відображенні результатів експериментів у наукових публікаціях.

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

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

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, експериментальної частини, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків та списку використаних джерел, який охоплює 188 найменувань. Дисертацію викладено на 139 сторінках машинописного тексту, вона містить 44 рисунки.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

*Створення плазмідних конструкцій.* Ампліфікацію фрагментів кДНК проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням специфічних праймерів. Продукти ПЛР вбудовували у вектори для експресії в бактеріальній системі або в клітинах еукаріотів. Послідовність конструкцій

визначали за допомогою секвенування за методом Сенгера на автоматичному секвенаторі «Applied Biosystems 3130» (США).

*Клітинні лінії та трансфекція.* Клітини ліній 293 (ембріональна нирка людини), MCF-7 (аденокарцинома молочної залози людини люмінального типу) та MDA-MB-231 (аденокарцинома молочної залози людини базального типу) культивували згідно з рекомендаціями Американського банку клітин та тканин (ATCC). Трансфекцію клітин проводили за допомогою реагенту JetPEI (Fermentas, Литва).

*Експресія рекомбінантних білків.* Для експресії рекомбінантних білків у бактеріальній системі та системі клітин ссавців використовували плазмідні рЕТ28с(+) (Novagen, США), рGEX-4T (GE Healthcare, Великобританія), рCMV-NA (Clontech, США), рсDNA4/HisMax (Invitrogen, США). Рекомбінантні білки з 6xHis- та GST-последовностями експресували в клітинах *E. coli* (штам BL21-DE3) і очищували на Ni-NTA сефарозі (QIAGEN, Німеччина) у нативних умовах та глутатіон-сефарозі 4B (GE Healthcare, Великобританія) згідно з рекомендаціями виробника.

*Дослідження білок-білкових взаємодій.* Дослідження білкових взаємодій проводили за допомогою преципітації із використанням білків, злитих з GST, або коімунопреципітації з використанням протеїн-A/G-агарози (Santa Cruz Biotechnology, США) та відповідними антитілами. Отримані преципітати аналізували, використовуючи Вестерн-блот аналіз.

*Дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків.* Клітини висівали на стерильні покривні скельця за 24 год до фарбування або трансфекції. Після цього клітини фіксували 4% розчином формальдегіду та пермеабілізували за допомогою розчину Triton X-100. Неспецифічне зв'язування антитіл пригнічували, інкубуючи зразки у розчині 1% бичачого сироваткового альбуміну. Потім клітини інкубували із специфічними первинними антитілами у відповідному розведенні, промивали та додавали відповідні флуоресцентно мічені вторинні антитіла. Фарбування ядер проводили реактивом Хьохста (Molecular Probes, США). Актиновий цитоскелет візуалізували за допомогою Alexa Fluor-555- та Alexa Fluor-647-кон'югованого фалоїдину (Sigma, США). Препарат на скельцях полімеризували у середовищі Mowiol (Sigma, США). Слайди аналізували за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопу Zeiss LSM510 (Zeiss, Німеччина). Вимірювання інтенсивності флуоресценції проводили за допомогою програми «ImageJ» (США). На представлених слайдах білими прямокутниками позначені збільшені зображення ділянок, які показані на цьому ж слайді, або у рядку нижче.

*Аналіз колокалізації білків.* Для кількісної оцінки колокалізації між двома білками використовували коефіцієнт кореляції Спірмена, який розраховували за допомогою плагіну колокалізації PSC (Pearson-Spearman correlation) з використанням програмного забезпечення ImageJ 1.37c, згідно з процедурою, описаною в статті Френча та ін. (French et al., 2008). Розрахунок коефіцієнту кореляції Спірмена проводили за всією площею клітини.

*Метод протеолітичної деградації позаклітинного матриксу.* На покривне скельце з тонким шаром FITC-желатину (Invitrogen, США) висівали інвазивні клітини лінії MDA-MB-231 (30000-50000 клітин на скло). Для утворення

інвадоподій клітини культивували шість годин, фіксували розчином 4% формальдегіду та проводили імуофлуоресцентне фарбування.

*Аналіз інтерналізації трансферину.* Трансфіковані клітини лінії 293, що були культивовані на покривних скельцях, інкубували протягом 3 годин в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM) з 4,6 г/л глюкози, 10 мкг/мл пеніциліну та 0,25 мкг/мл стрептоміцину без додавання 10% ембріональної сироватки теляти (FBS), при +37°C та вмісті 5% CO<sub>2</sub>. Потім до клітин додавали кон'югований із Alexa Fluor-633 трансферин (50 мг/мл) та інкубували протягом 30 хв при +37°C. Після інкубації клітини фіксували та проводили імуофлуоресцентний аналіз.

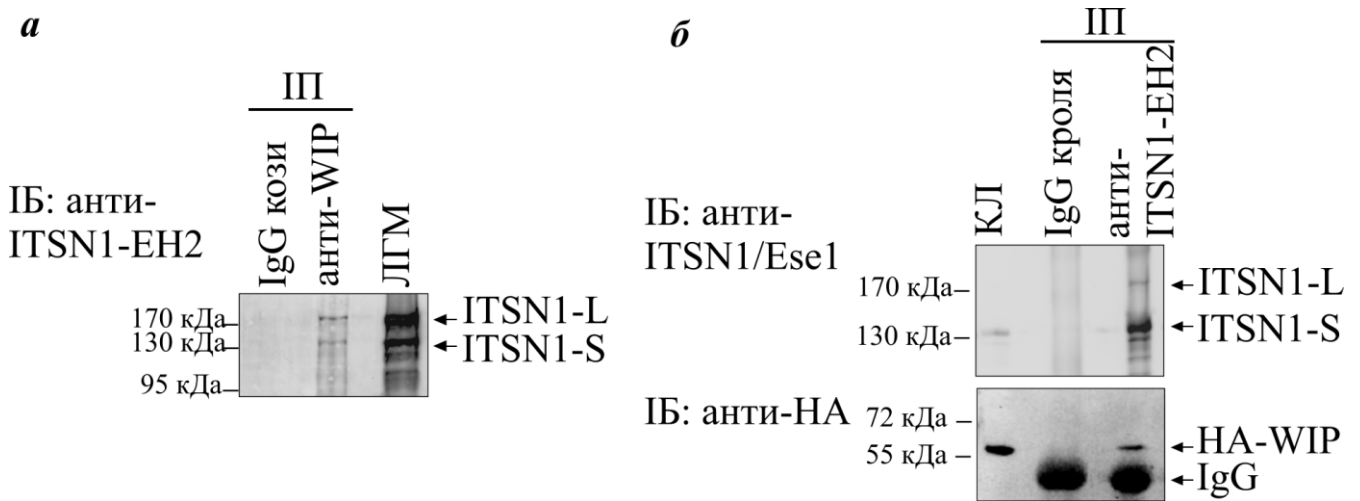
*Візуалізація та підрахунок філоподієподібних виростів.* Через 24 год трансфіковані клітини лінії 293, що були культивовані на покривних скельцях, фіксували та проводили імуофлуоресцентний аналіз. Філоподієподібні вирости візуалізували за допомогою фалоїдину, кон'югованого з Alexa Fluor-555. Кількість філоподієподібних виростів на клітину обчислювали за допомогою плагіну FiloQuant з використанням програмного забезпечення ImageJ (Jacquet *et al.*, 2017).

*Статистична обробка даних.* Всі дані наведено як середнє арифметичне значення  $\pm$  стандартне відхилення. Статистичну обробку даних проводили із використанням програмного забезпечення MS Excel (Microsoft) або OriginPro 9.1 (OriginLab, США). Для порівняння двох вибірок спочатку перевіряли їх на нормальність розподілу за *W*-критерієм Шапіро-Уїлка. Статистичний аналіз нормально розподілених двох груп проводили за допомогою *t*-тесту, трьох і більше вибірок – за допомогою One-Way ANOVA з наступним тестом Фішера. Статистичний аналіз ненормально розподілених двох вибірок проводили за допомогою критерію Манна-Уїтні. В усіх випадках достовірною вважалася різниця між групами при  $p < 0,05$ .

## Результати досліджень та їх обговорення

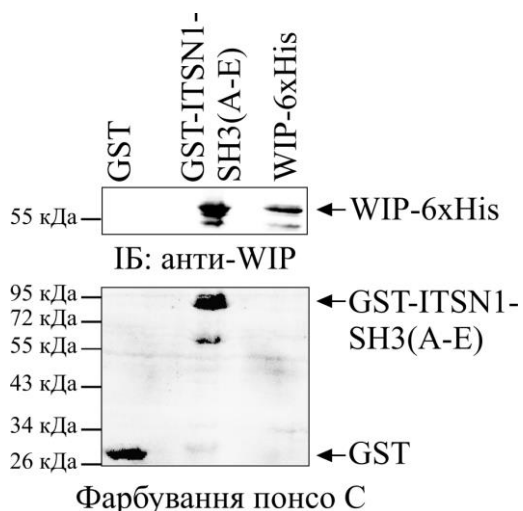
*Регулятор полімеризації актину WIP та адаптерний білок ITSN1 формують комплекс.* За допомогою сервісу Scansite ([www.scansite.mit.edu](http://www.scansite.mit.edu)) нами було передбачено взаємодію SH3-вмісного білка інтерсектину 1 з пролін-збагаченим білком WIP. Для експериментального підтвердження взаємодії між ITSN1 та WIP було проведено їх коімунопреципітацію з лізатів головного мозку миші. За допомогою антитіл проти WIP було преципітовано ендогенний ITSN1. Результати коімунопреципітації свідчать, що ендогенний WIP взаємодіє як з короткою (ITSN1-S), так і з довгою (ITSN1-L) ізоформами інтерсектину 1 (рис. 1 а). Ці дані також було підтверджено коімунопреципітацією рекомбінантного HA-WIP з ендогенним ITSN1. Білкові комплекси були преципітовані з лізатів клітин 293 з короткотривалою експресією HA-WIP за допомогою антитіл проти ITSN1. Отримані імуопреципітати містили як ендогенні ITSN1-S та ITSN1-L, так і рекомбінантний HA-WIP (рис. 1 б). Отже, ITSN1 та WIP здатні формувати білковий комплекс.





**Рис. 1.** Вестерн-блот аналіз білків, преципітованих за допомогою антитіл проти WIP з лізату головного мозку миші (*а*) або антитіл проти ITSN1 з лізату клітин 293, що експресували HA-WIP (*б*). Ендогенні WIP та ITSN1 детектували анти-WIP та анти-ITSN1-EH2 антитілами, HA-WIP детектували анти-НА антитілами. IgG кози та IgG кроля було використано як негативний контроль. ІБ – імуноблотинг, КЛ – клітинний лізат, ЛГМ – лізат головного мозку миші; ІІ – імунопреципітація

Для аналізу прямої взаємодії між WIP та ITSN1 використали преципітацію двох афінно очищених рекомбінантних білків – WIP-6xHis та GST-SH3(A-E) ITSN1. Оскільки WIP містить численні пролін-збагачені мотиви, які специфічно взаємодіють з SH3-доменами білків-партнерів, для експерименту було застосовано тандем із п'яти SH3(A-E)-доменів ITSN1. Отримані дані показали взаємодію GST-злитих SH3-доменів ITSN1 із очищеним рекомбінантним WIP-6xHis, що вказує на безпосередню, не опосередковану іншими білками-партнерами, взаємодію між досліджуваними білками (рис. 2).



**Рис. 2.** Вестерн-блот аналіз результатів преципітації двох афінно очищених рекомбінантних білків: WIP-6xHis та GST-ITSN1-SH3(A-E). Преципітовані білки детектували антитілами анти-WIP, GST-злиті білки візуалізували фарбуванням понсо С

*Картування сайтів взаємодії WIP з ITSN1.* Для визначення ділянок ITSN1, що забезпечують взаємодію з WIP, було проведено преципітацію білків за допомогою іммобілізованих GST-злитих окремих п'яти SH3-доменів ITSN1 з лізату клітин 293, трансфікованих HA-WIP. Оскільки ITSN1 має дві ізоформи SH3A-домена –

присутню у всіх тканинах (SH3A) та нейрон-специфічну (SH3A(+VKGEW)), що характеризується інсерцією п'яти додаткових амінокислотних залишків (VKGEW), які впливають на специфічність зв'язування з білками-партнерами, в експерименті були використані обидві ізоформи. Отримані результати виявили, що WIP преципітується доменами SH3A, SH3A(+VKGEW), SH3C та SH3E ITSN1 (рис. 3).

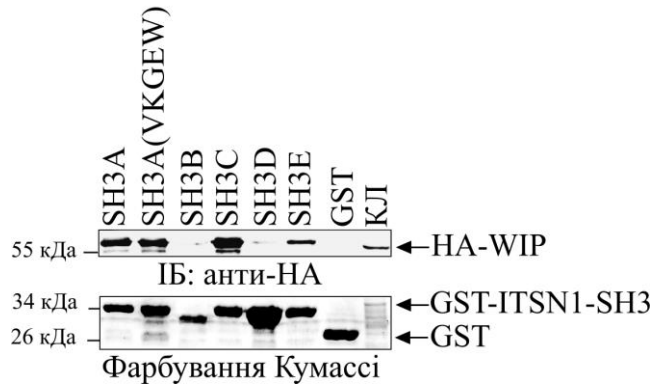


Рис. 3. Вестерн-блот аналіз результатів преципітації WIP-НА з GST-злитими SH3-доменами ITSN1. Іммобілізовані на сорбенті білки GST (контроль) або GST-SH3-домени ITSN1 інкубували з лізатом клітин 293, які експресували НА-WIP. Преципітовані білки детектували антитілами анти-НА, GST-злиті білки фарбували Кумассі

Для визначення пролін-збагачених мотивів у структурі WIP, які складають інтерфейс взаємодії з ITSN1, було створено делеційні конструкції WIP, що містили НА-таг (рис. 4 а), для подальшої трансфекції клітин лінії 293 та преципітації з GST-SH3(A-E)-доменами ITSN1.

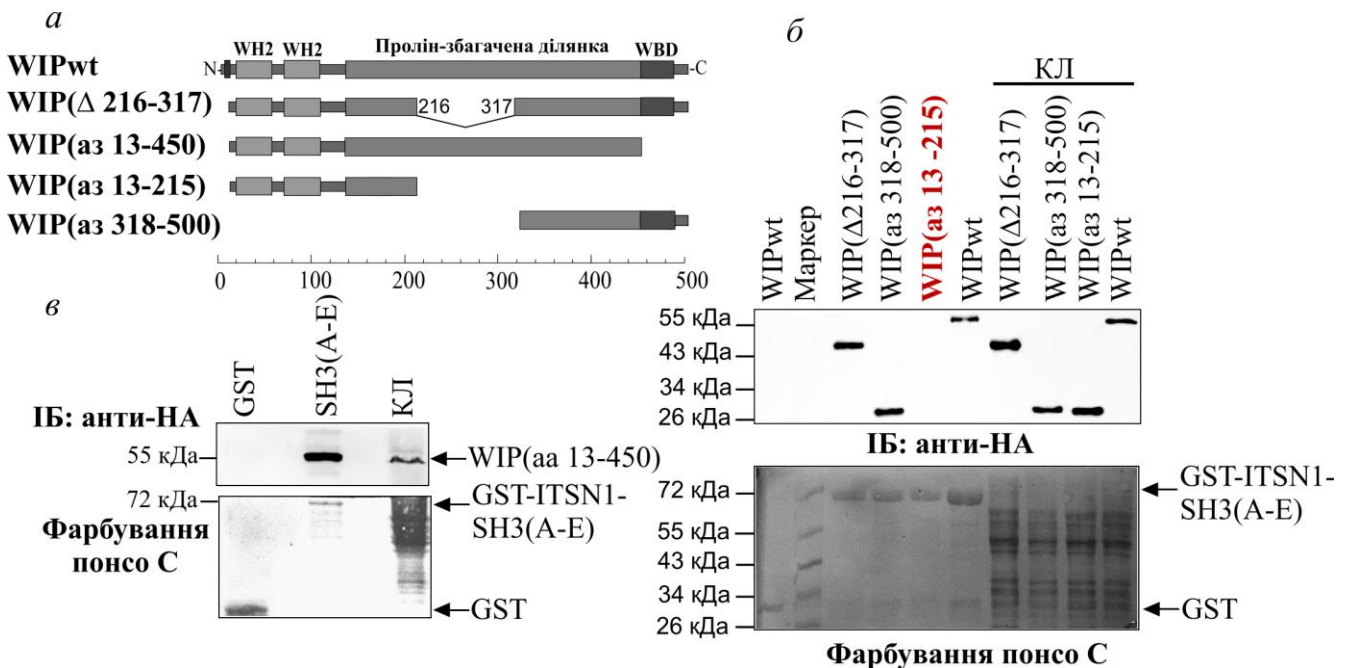


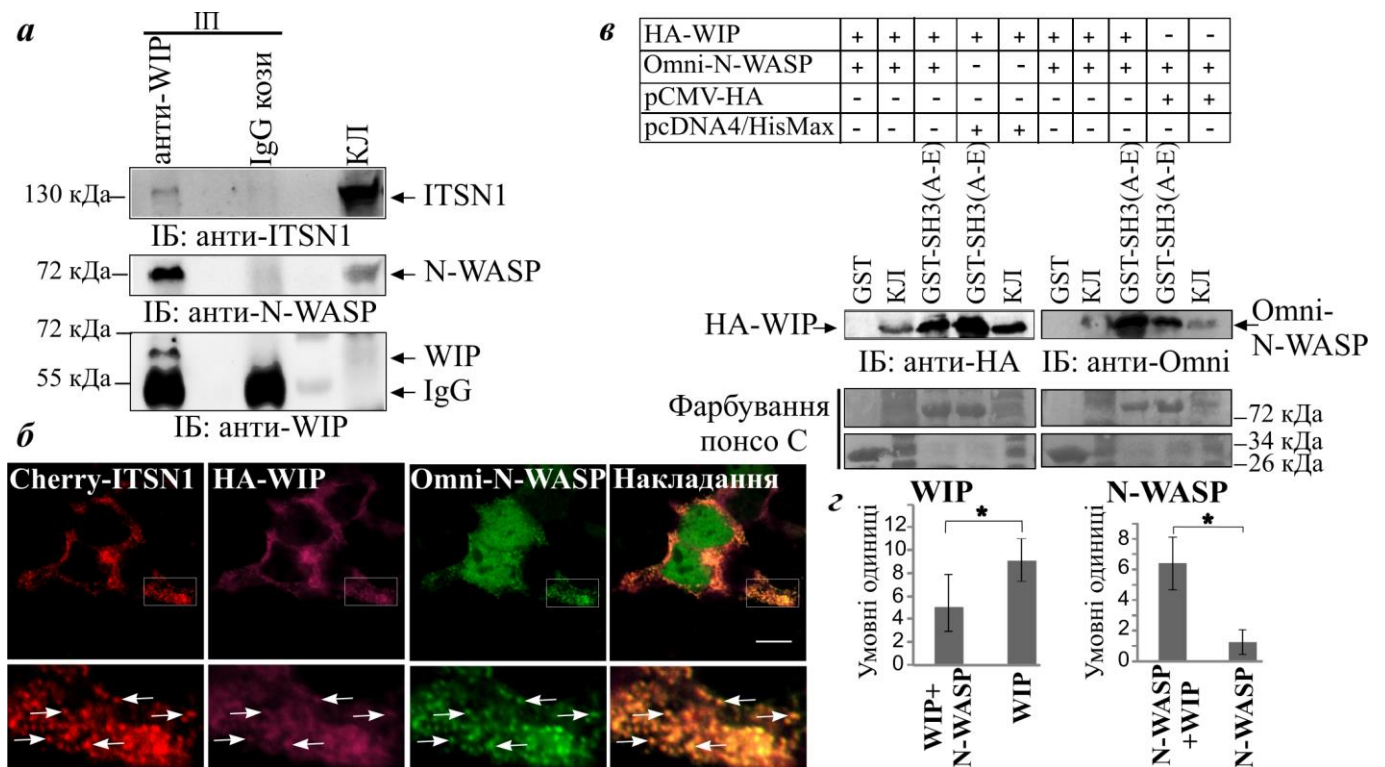
Рис. 4. Схематичне зображення структури повнорозмірного WIP (WIPwt) та делеційних конструкцій WIP (а). Вестерн-блот аналіз результатів преципітації WIP(аз 13-215), WIP(аз 318-500), WIP(Δ216-317), WIP(wt) (б) та WIP(аз 13-450) (в) з доменами SH3(A-E) ITSN1

Результати преципітації показали, що амінокислотні залишки 318-450 у структурі WIP є важливими для взаємодії з ITSN1, тоді як амінокислотні залишки 216-317 та 450-503 не є критичними для взаємодії досліджуваних білків (рис. 4 б, в).

Таким чином, отримані нами дані виявили, що для взаємодії ITSN1 з WIP важливі амінокислотні залишки 318-450 пролін-збагаченого домену WIP і SH3A-, SH3C- та SH3E-домени ITSN1.

За даними літератури, WIP регулює полімеризацію актинового цитоскелету за допомогою взаємодії з факторами нуклеації актину – кортактином та N-WASP, яка забезпечується різними частинами його пролін-збагаченої ділянки: N-кінцевою (аз 110-170) та С-кінцевою (аз 454-485), відповідно (Anton *et al.*, 2007). Картована нами ділянка білка WIP, яка необхідна для взаємодії з ITSN1, не перекривається з сайтами зв'язування факторів нуклеації актину. Оскільки ITSN1, N-WASP та кортактин взаємодіють з різними мотивами WIP, припускаємо, що ці взаємодії можуть бути реалізованими одночасно та утворювати функціональні комплекси – ITSN1/WIP/N-WASP та ITSN1/WIP/кортактин.

**Формування потрійного комплексу WIP/ITSN1/N-WASP.** Щоб перевірити існування потрійного комплексу використали коімунопреципітацію ендогенних WIP, ITSN1 та N-WASP за допомогою антитіл проти WIP (рис. 5 а).



**Рис. 5.** *а* – Вестерн-блот аналіз ITSN1, N-WASP та WIP, преципітованих за допомогою антитіл проти WIP з лізату клітин MDA-MB-231. *б* – Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації mCherry-ITSN1 (червоний), HA-WIP (пурпурний) та Omni-N-WASP (зелений) в клітинах лінії MDA-MB-231. Приклади сигналів, що перекриваються, відмічені стрілками. Масштаб 10 мкм. *в* – Імобілізовані на сорбенті білки GST-SH3(A-E)-домени ITSN1 або GST інкубували з лізатами клітин 293, які коекспресували HA-WIP/pCMV, HA-WIP/Omni-N-WASP або Omni-N-WASP/pCMV-HA. WIP та N-WASP детектували антитілами анти-HA та анти-Omni, відповідно. *г* – Кількісна оцінка результатів, відображених на (*в*). Діаграма демонструє інтенсивність сигналів WIP та N-WASP, які було нормалізовано до пулу зв'язаних з ними SH3-доменив ITSN1. Статистичний аналіз результатів проводився за допомогою *t*-тесту \* -  $p < 0,05$

Результати імунофлуоресцентного аналізу підтверджують існування потрійного комплексу (рис. 5 б).

Було встановлено, що N-WASP та WIP взаємодіють з одними і тими ж SH3-доменами ITSN1 (SH3A, SH3C та SH3E), тому цікаво було дослідити, чи конкурують білки за зв'язування з інтерсектином. Для цього GST-злиті SH3(A-E)-домени ITSN1 інкубували з лізатами клітин лінії 293, що коекспресували Omni-N-WASP та HA-WIP разом, або кожний з двох білків окремо з вектором без вставки в якості контролю. Результати преципітації виявили зменшення кількості, майже вдвічі, білку WIP, зв'язаного з ITSN1, у присутності N-WASP порівняно із WIP без N-WASP (рис. 5 в – ліва панель, з). Навпаки, кількість N-WASP, зв'язаного з ITSN1, збільшується у шість раз за наявності WIP (рис. 5 в – права панель, з).

Отже, у складі потрійного комплексу WIP сприяє взаємодії N-WASP з ITSN1, тоді як зв'язування WIP з ITSN1 зменшується за умов наявності N-WASP.

*Колокалізація між ITSN1, WIP та кортактином.* Для перевірки можливості формування комплексу між ITSN1, WIP та кортактином використали імунофлуоресцентний аналіз ендогенних білків. Кортактин є маркером ділянок, де відбуваються активні перебудови кортикального актинового цитоскелету (Artym *et al.*, 2006). Отримані результати демонструють колокалізацію ITSN1 і WIP між собою та з кортактином в інвазивних клітинах лінії гліобластоми людини U87-MG (рис. 6).

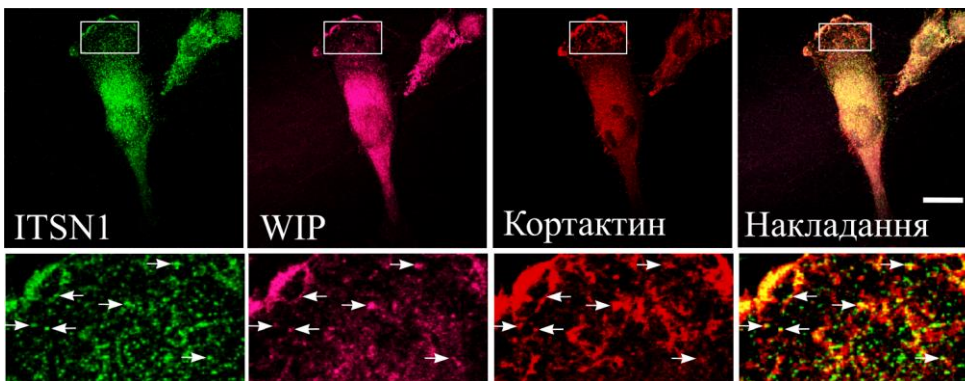


Рис. 6. Імунофлуоресцентна детекція колокалізації ендогенних ITSN1 (зелений), WIP (пурпурний) та кортактина (червоний) у клітинах лінії U87-MG. Стрілки вказують на наявність часткової колокалізації білків. Масштаб 10 мкм

Таким чином, вперше показано існування комплексів ITSN1/WIP/N-WASP та ITSN1/WIP/кортактина, що ймовірно вказує на важливу нову функцію адаптерного білка ITSN1 у локалізації та регуляції мультибілкових комплексів із факторами нуклеації актину в клітині.

*Вплив комплексу ITSN1-L/WIP на внутрішньоклітинний розподіл трансферину.* Основною функцією інтерсектинів є збирання мультибілкових комплексів на різних етапах клатрин-опосередкованого ендоцитозу. Відомо, що ITSN1 переважно локалізується в клатрин-вмісних везикулах (Pucharcos *et al.*, 2000). Для більш детального аналізу комплексу ITSN1/WIP, за допомогою імунофлуоресцентного аналізу, було виявлено колокалізацію ITSN1 та WIP з клатрином, що вказує на можливу спільну функцію досліджуваних білків у клатрин-опосередкованому ендоцитозі. З метою перевірки цього припущення, було проаналізовано вплив комплексу ITSN1/WIP на ендоцитоз за допомогою аналізу інтерналізації рецептора трансферину. Отримані дані виявили, що в клітинах 293 з надекспресованими Omni-



ITSN1-L (рис. 7 а) або HA-WIP (рис. 7 б) відбувається порушення внутрішньоклітинного розподілу рецептора трансферину порівняно з контрольними клітинами (нетрансфікованими), в яких трансферин накопичується в навколо ядерних регіонах.

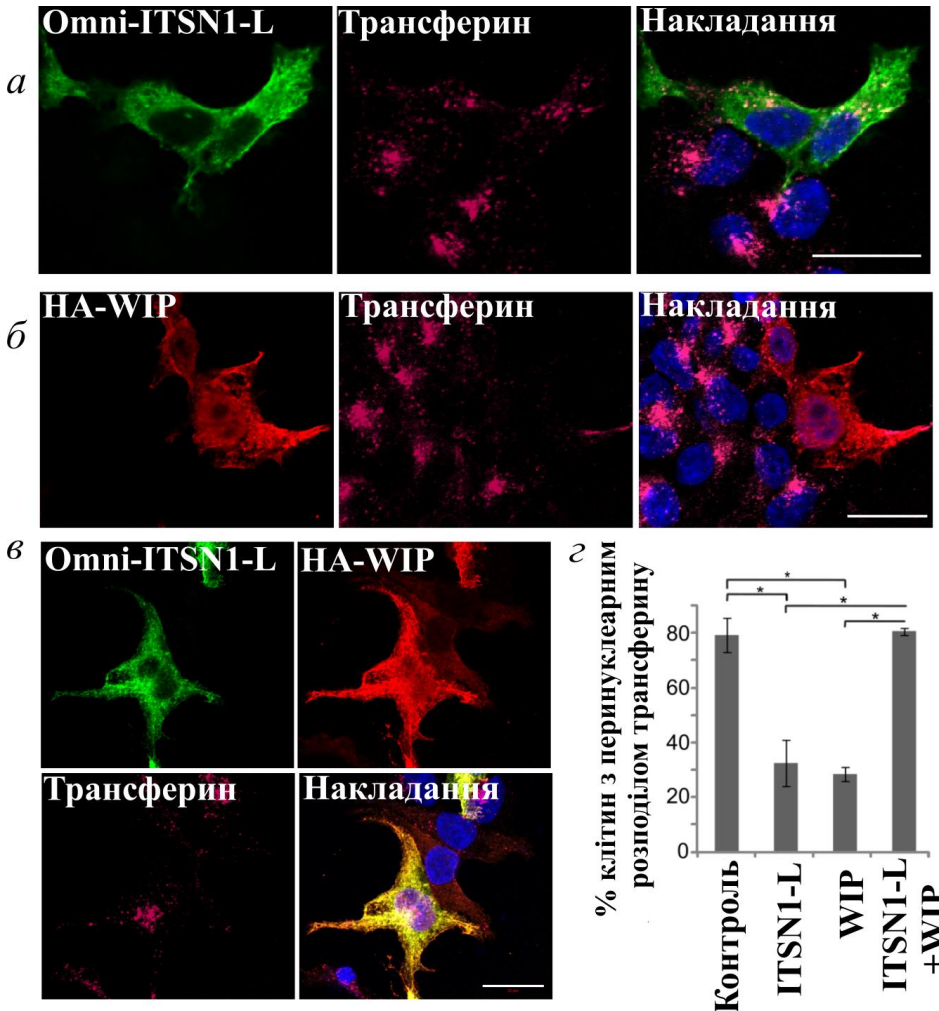


Рис. 7. Вплив комплексу ITSN1/WIP на внутрішньоклітинне розташування трансферину. Клітини лінії 293 було котрансфіковано: а – Omni-ITSN1-L; б – HA-WIP; в – Omni-ITSN1-L та HA-WIP. Білки ITSN1 (зелений) та WIP (червоний) детектували анти-Omni та анти-HA антитілами, трансферин (пурпурний) візуалізували прямою флуоресценцією. Ядра (блакитний) фарбували реактивом Хьохста. з – Графік відображає % клітин із перинуклеарним розподілом трансферину. \* -  $p < 0,05$  за One-Way ANOVA з наступним тестом Фішера

При коекспресії Omni-ITSN1-L та HA-WIP (рис. 7 в) спостерігається відновлення інтерналізації рецептора трансферину, що відповідає контрольним клітинам (рис. 7 з) і свідчить про можливу участь комплексу ITSN1/WIP в регуляції везикулярного транспорту рецептора трансферину.

*ITSN1-L рекрутує WIP до RAB4-позитивних везикул.* Внутрішньоклітинний перерозподіл трансферину відбувається кількома шляхами, одним із яких є RAB4-залежні ранні ендосоми (van der Sluijs *et al.*, 1992; Daro *et al.*, 1996). За допомогою імуофлуоресцентного аналізу було досліджено колокалізацію ITSN1 і WIP з маркером рециркулюючих ендосом ГТФазою RAB4, яка бере участь у формуванні інвадоподій, сприяючи розповсюдженню пухлини (Frittoli *et al.*, 2014). Отримані результати виявили часткову колокалізацію ендогенних білків ITSN1 та WIP з GFP-RAB4 в клітинах лінії MCF-7. Цікаво, що надекспресовані Omni-ITSN1-L або HA-WIP відрізняються відносно колокалізації з GFP-RAB4: Omni-ITSN1-L колокалізується з RAB4 (рис. 8 а), тоді як колокалізації HA-WIP з GFP-RAB4 не було детектовано (рис. 8 б).

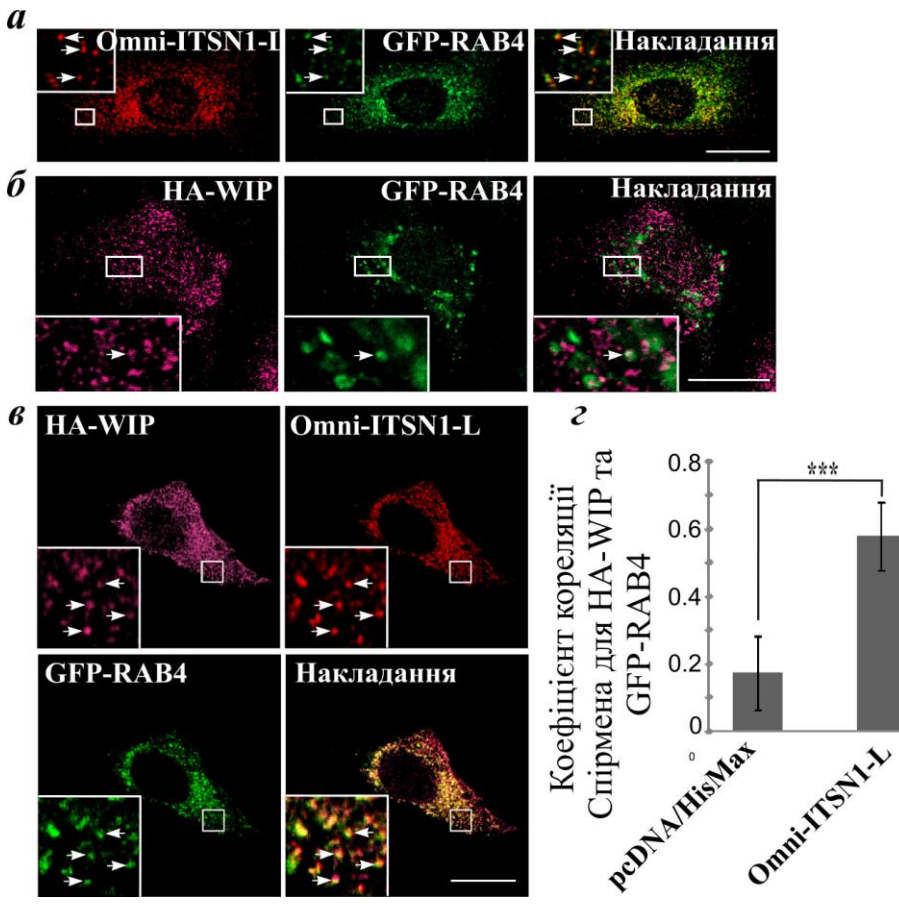
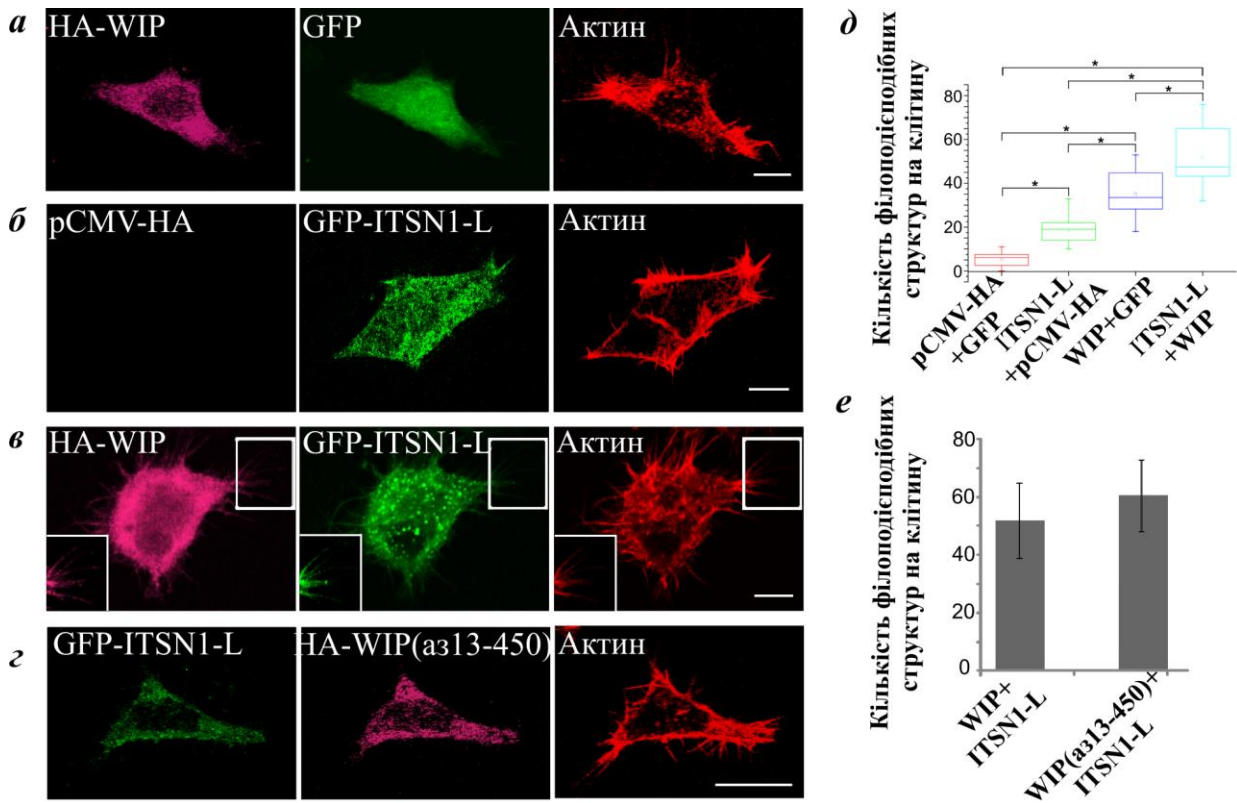


Рис. 8. Імунофлуоресцентний аналіз колокалізації ITSN1 (червоний), WIP (пурпурний) та RAB4 (зелений). Клітини лінії MCF-7 котрансфіковано: *a* – Omni-ITSN1-L та GFP-RAB4; *б* – HA-WIP та GFP-RAB4; *в* – Omni-ITSN1-L, HA-WIP та GFP-RAB4. Білими стрілками відмічені приклади сигналів, що перекриваються. Масштаб 20 мкм. *г* – Значення коефіцієнта кореляції Спірмена для колокалізації HA-WIP та GFP-RAB4 в клітинах, які додатково експресували Omni-ITSN1-L або вектор без вставки (pcDNA/HisMax). Статистичний аналіз проводився за допомогою критерію Манна-Уїтні, \*\*\* –  $p < 0,001$

Проте, надекспресований HA-WIP починає колокалізуватися з RAB4 за умов наявності Omni-ITSN1. Так, значення коефіцієнта кореляції Спірмена для білків HA-WIP та GFP-RAB4 у присутності Omni-ITSN1-L збільшується в 3,4 рази (рис. 8 *г*), що вказує на роль ITSN1 у рекрутуванні WIP до RAB4-позитивних везикул. Отже, отримані результати демонструють, що комплекс ITSN1/WIP може бути залучено до RAB4-залежного везикулярного транспорту.

Комплекс ITSN1-L/WIP індукує утворення філоподієподібних виростів. Серед спільних функцій ITSN1 та WIP відома їх участь у N-WASP-залежних перебудовах актинового цитоскелету. За даними літератури, WIP разом із N-WASP бере участь у формуванні актин-збагачених виростів клітинної мембрани, зокрема інвадоподій та філоподій (Yamaguchi *et al.*, 2005; Martinez-Quiles *et al.*, 2001). Припускаємо, що комплекс ITSN1/WIP також може бути залучено до цих процесів. Для перевірки впливу ITSN1/WIP на формування філоподій було використано імунофлуоресцентний аналіз клітин лінії MCF-7, що були котрансфіковані GFP-ITSN1-L/HA-WIP, GFP-ITSN1-L/pCMV-HA, HA-WIP/pEGFP-C1 та pCMV-HA/pEGFP-C1. Вектор без вставок було використано в якості контролю. Філоподієподібні вирости детектували за допомогою кон'югованого з Alexa Fluor-555 фалоїдину. Було встановлено, що контрольні клітини (нетрансфіковані) утворювали  $5,2 \pm 3,2$  філоподієподібних виростів, тоді як клітини з HA-WIP (рис. 9 *а*), або GFP-ITSN1-L (рис. 9 *б*) формували  $35,2 \pm 9,8$  та  $18,3 \pm 5,9$  філоподієподібних виростів, відповідно.



**Рис. 9.** Імунофлуоресцентний аналіз впливу комплексу ITSN1-L/WIP на індукцію філоподієподібних виступів. Клітини лінії MCF-7 було котрансфіковано: *а* – HA-WIP (пурпурний) та pEGFP-C; *б* – GFP-ITSN1-L (зелений) та pCMV-HA; *в* – GFP-ITSN1-L та HA-WIP; *г* – HA-WIP(Δ313-450) (пурпурний) та GFP-ITSN1-L. Актиновий цитоскелет (червоний) візуалізували за допомогою міченого фалодіну. Масштаб 20 мкм. *д* – Кількісний аналіз філоподієподібних виростів, які утворює клітина. Всього було пораховано понад 100 клітин для кожного з трьох незалежних експериментів. \* -  $p < 0,05$  за One-Way ANOVA з наступним тестом Фішера. *е* - Кількісний аналіз філоподієподібних виростів, які утворює клітина при коекспресії ITSN1-L/WIP(Δ313-450) або ITSN1-L/WIP

Клітини, що одночасно експресували GFP-ITSN1-L та HA-WIP (рис. 9 *в*) формували значно більше філоподієподібних виступів ( $51,9 \pm 12,9$ ) порівняно з клітинами, що експресували тільки WIP або ITSN1-L (рис. 9 *д*). Отже, комплекс ITSN1/WIP сприяє індукції філоподієподібних виступів.

Найбільш вивченим механізмом утворення WIP-індукованих філоподій є N-WASP-опосередкована полімеризація актину (Martinez-Quiles *et al.*, 2001). За допомогою делеційної конструкції WIP, яка не взаємодіє з N-WASP, було виявлено утворення філоподієподібних виростів як у присутності N-WASP, так і без нього (рис 9 *г*). Порівняння кількості філоподієподібних виступів, що утворюють клітини з коекспресією інтерсектина з делеційною формою WIP (GFP-ITSN1-L/HA-WIP(Δ313-450)) або диким типом WIP (GFP-ITSN1-L/HA-WIP), свідчить, що статистично достовірної різниці між ними немає (рис. 9 *е*). У випадку відсутності N-WASP філоподії можуть утворюватися альтернативним кортактин-залежним шляхом (Kinley *et al.*, 2003).

Таким чином, було показано збільшення кількості філоподієподібних виростів при коекспресії ITSN1-L та WIP у клітинах лінії MCF-7, що дозволяє припустити участь комплексу ITSN1/WIP у міграції клітин.



Ендогенні білки *ITSN1* та *ITSN2* локалізуються в інвадоподіях. Відомо, що WIP є необхідним для утворення та функціонування інвадоподій (Garcia *et al.*, 2016). Оскільки в ході дисертаційної роботи виявлено взаємодію WIP з *ITSN1*, одним із завдань було дослідити локалізацію інтерсектинів в інвадоподіях, що здатні утворювати інвазивні клітини лінії раку молочної залози MDA-MB-231. Інвадоподії було візуалізовано за специфічною деградацією желатину, міченого флуоресцеїн-5-ізотіоціанатом (FITC). У разі утворення інвадоподій, відбувається руйнування позаклітинного матриксу (желатину) та утворення чорних дір, де відсутній флуоресцентний сигнал у FITC-желатині. В якості маркера інвадоподій використовували F-актин. За допомогою аналізу протеолітичної деградації позаклітинного матриксу виявили, що ендогенні білки *ITSN1* (рис 10 *a*) та *ITSN2* (рис. 10 *б*) білки локалізуються в інвадоподіях.

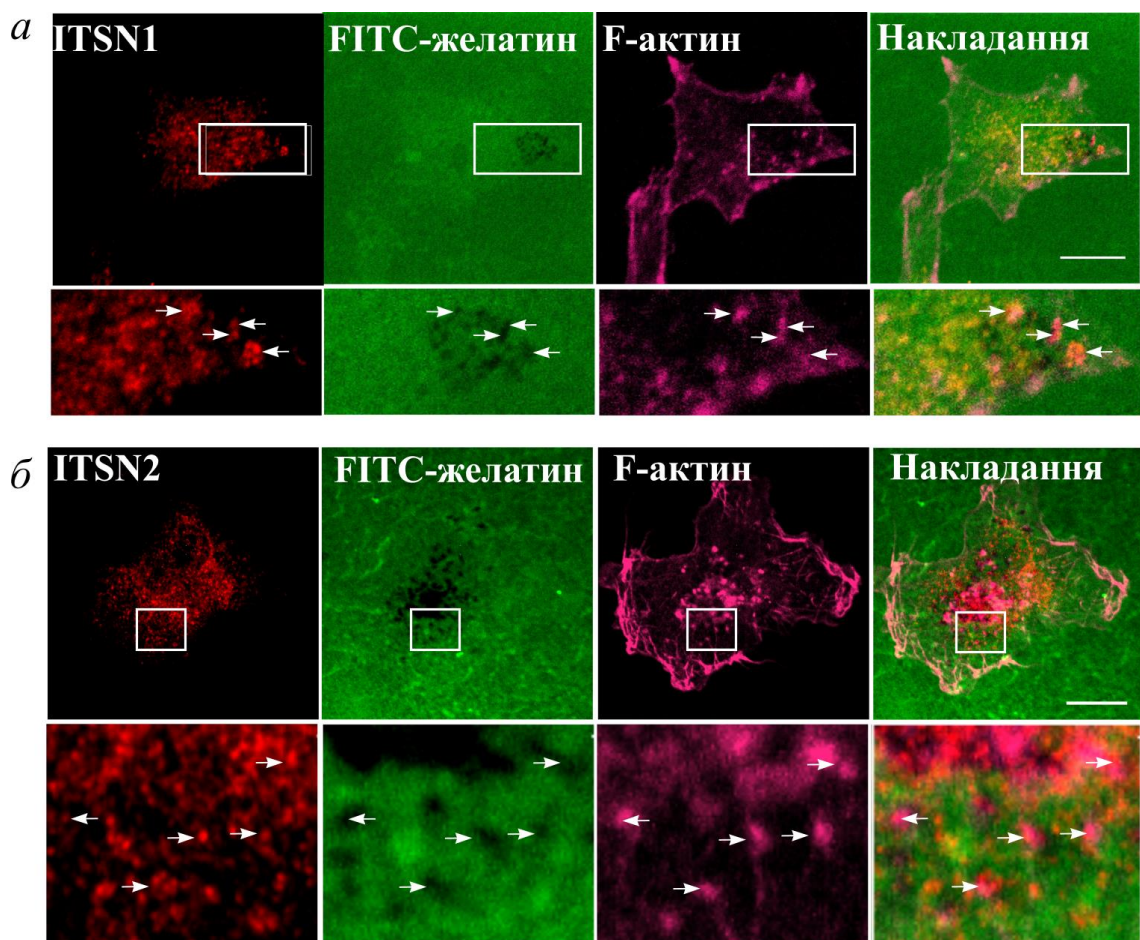


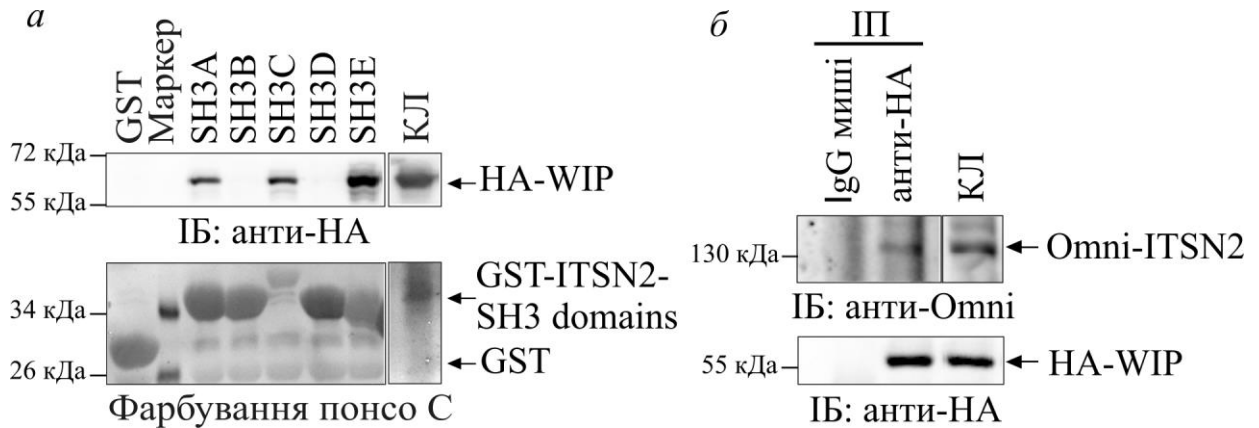
Рис. 10. Імунофлуоресцентний аналіз локалізації ендогенних інтерсектинів в інвадоподіях у клітинах лінії MDA-MB-231: *a* - *ITSN1* (червоний); *б* – *ITSN2* (червоний). F-актин (пурпурний) детектували за допомогою фалоїдину. Стрілками відмічено приклади колокалізації ITSN та F-актину з сайтами деградації желатину. Масштаб 10 мкм

Відомо, що Cdc42/N-WASP/WIP/Arp2/3-опосередкована полімеризація актину відіграє значну роль у формуванні інвадоподій (Yamaguchi *et al.*, 2005). Оскільки інтерсектини здатні специфічно активувати ГТФазу Cdc42 та зв'язувати комплекс N-WASP/WIP, тобто взаємодіяти з ключовими учасниками формування інвадоподій, а також локалізуватися в інвадоподіях, можна припустити, що вони залучені до



регуляції полімеризації актину під час утворення інвадоподій. Однак, дане питання потребує подальших досліджень.

*Дослідження взаємодії адаптерного білка ITSN2 з WIP.* Через те, що ITSN1 та ITSN2 характеризуються високим ступенем гомології, наступним із завдань було перевірити взаємодію між ITSN2 та WIP. За допомогою преципітації з використанням GST-злитих білків було встановлено, що WIP взаємодіє з доменами SH3A, SH3C та SH3E ITSN2 (рис. 11 а).

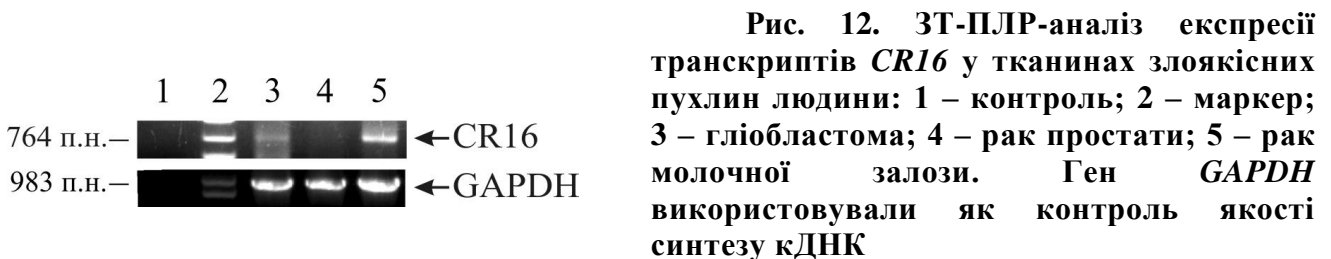


**Рис. 11.** Вестерн-блот аналіз результатів: *а* – преципітації WIP-НА з окремими GST-SH3-доменами ITSN2; *б* – імунопреципітації за допомогою анти-НА антитіл з лізату клітин MDA-MB-231, що містили рекомбінантні білки Omni-ITSN2 і HA-WIP. HA-WIP та Omni-ITSN2 детектували за допомогою антитіл анти-НА і анти-Omni, відповідно

Також результати імунопреципітації Omni-ITSN2 та HA-WIP свідчать про те, що білки є компонентами спільних білкових комплексів (рис. 11 б).

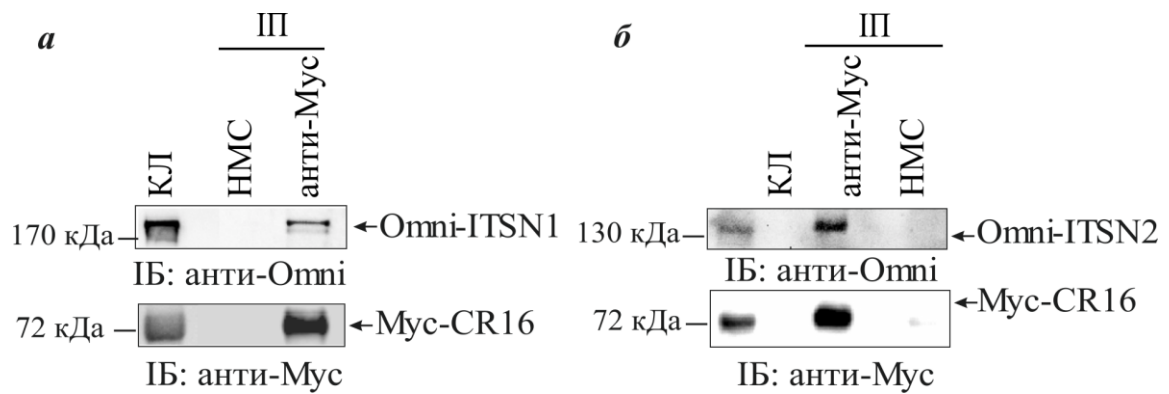
Таким чином, вперше показано, що ITSN1 та ITSN2 локалізуються в інвадоподіях і взаємодіють з одним із ключових компонентів інвадоподій – регулятором полімеризації актину WIP.

*Транскрипти CR16 експресуються в злоякісних пухлинах людини.* CR16 є найменш дослідженим представником родини верпролінів, який експресується переважно в яєчках та мозку (Ho *et al.*, 2001; Suetsugu *et al.*, 2007). Вперше було показано існування транскриптів CR16 у злоякісних пухлинах молочної залози людини та гліобластоми (рис. 12).



**Рис. 12.** ЗТ-ПЛР-аналіз експресії транскриптів CR16 у тканинах злоякісних пухлин людини: 1 – контроль; 2 – маркер; 3 – гліобластома; 4 – рак простати; 5 – рак молочної залози. Ген GAPDH використовували як контроль якості синтезу кДНК

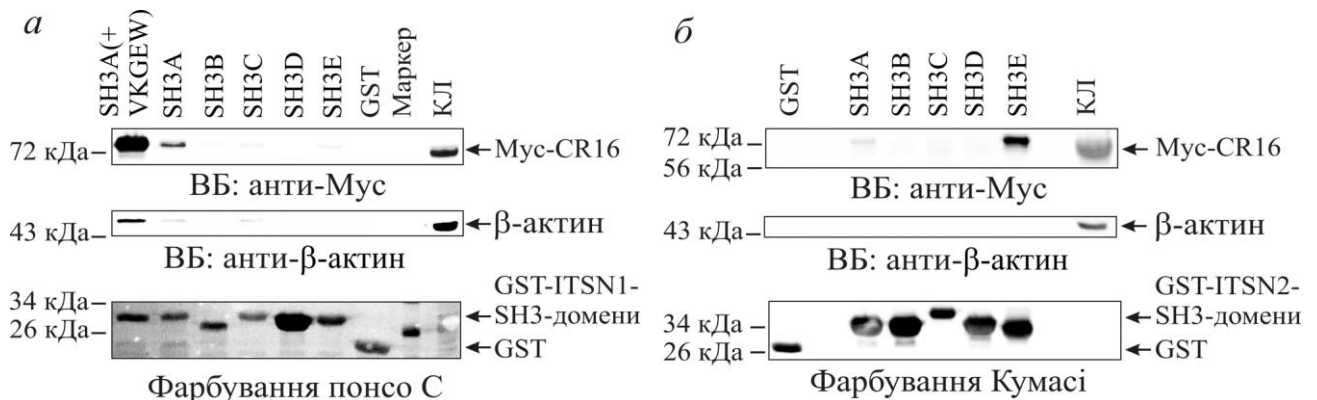
*Аналіз взаємодії CR16 із ITSN1 та ITSN2.* Для перевірки взаємодії CR16 з інтерсектинами було проведено коімунопреципітацію за допомогою анти-Мус антитіл з лізатів клітин 293, що містили рекомбінантні Мус-CR16 і Omni-ITSN1 (рис. 13 а) або Мус-CR16 і Omni-ITSN2 (рис. 13 б).



**Рис. 13.** Вестерн-блот аналіз результатів імунопреципітації з лізатів клітин лінії 293, що містили: *a* – Omni-ITSN1 і Мус-CR16; *б* – Omni-ITSN2 і Мус-CR16. Інтерсектини та CR16 детектували за допомогою антитіл анти-Omni і анти-Мус, відповідно

Результати імунопреципітації свідчать, що CR16 та інтерсектини є компонентами спільних білкових комплексів.

За допомогою преципітації з GST-злитими SH3-доменами ITSН1 і ITSН2 визначили, що CR16 взаємодіє з SH3А-доменом ITSН1 (рис. 14 *a*) та SH3Е-доменом ITSН2 (рис. 14 *б*).



**Рис. 14.** Вестерн-блот аналіз результатів преципітації доменів GST-SH3 ITSН1 (*a*) і ITSН2 (*б*) з Мус-CR16 та ендогенним  $\beta$ -актином з лізатів клітин лінії 293, які були трансфіковані Мус-CR16. Преципітовані білки детектували анти-Мус і анти- $\beta$ -актин антитілами

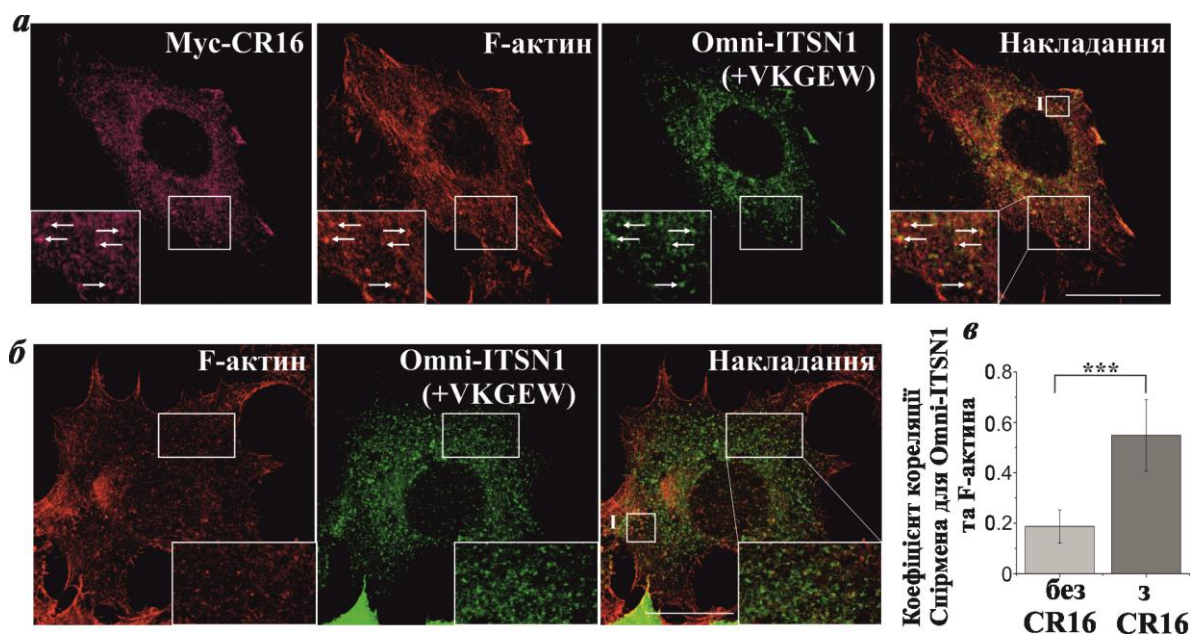
Отримані результати вперше виявили, що CR16 є специфічним білком-партнером для певних доменів SH3 ITSН1 та ITSН2. Зазвичай, через високу ступінь гомології між інтерсектинами, їхні білки-партнери преципітуються однаковим набором SH3-доменів (Novokhatska *et al.*, 2013), наприклад, як у випадку з WIP, що преципітує домени SH3А, SH3С, SH3Е ITSН1 (рис. 3) та ITSН2 (рис. 11 *a*). Також цікаво, що CR16 взаємодіє значно ефективніше з нейрон-специфічною ізоформою SH3А-домена ITSН1 порівняно з широко розповсюдженою (рис. 14 *a*), що вказує на важливість послідовності VKGEW для взаємодії між CR16 та ITSН1.

Відомо, що CR16 є актин-зв'язуючим білком (Ho *et al.*, 2001). Тому водночас з перевіркою взаємодій між інтерсектинами та CR16, методом вестерн-блот аналізу було проаналізовано зв'язування з ендогенним  $\beta$ -актином. Встановлено,

що SH3A-домен ITSN1, на відміну від SH3E-домену ITSN2, зв'язує CR16, який знаходиться у комплексі з ендogenousним  $\beta$ -актином (рис. 14).

Отже, отримані дані демонструють можливість інтерсектинів специфічно регулювати асоціацію CR16 із актином, що може призвести до різних функціональних наслідків, пов'язаних із перебудовами актинового цитоскелету.

*Надекспресія CR16 сприяє колокалізації ITSN1 із F-актином.* Щоб проаналізувати потенційний вплив CR16 на можливу зміну розподілу інтерсектину 1 по відношенню до актину в клітині, було проведено імунофлуоресцентний аналіз клітин MCF-7, котрансфікованих Omni-ITSN1(+VKGEW) та Мус-CR16 порівняно з клітинами, які було котрансфіковано Omni-ITSN1(+VKGEW) та плазмідом рCMV-Мус без вставки, з подальшою візуалізацією F-актину. Отримані результати виявили колокалізацію Omni-ITSN1(+VKGEW) із F-актином за умов наявності Мус-CR16 (рис. 15 а) та дуже слабку – за відсутності Мус-CR16 (рис. 15 б).

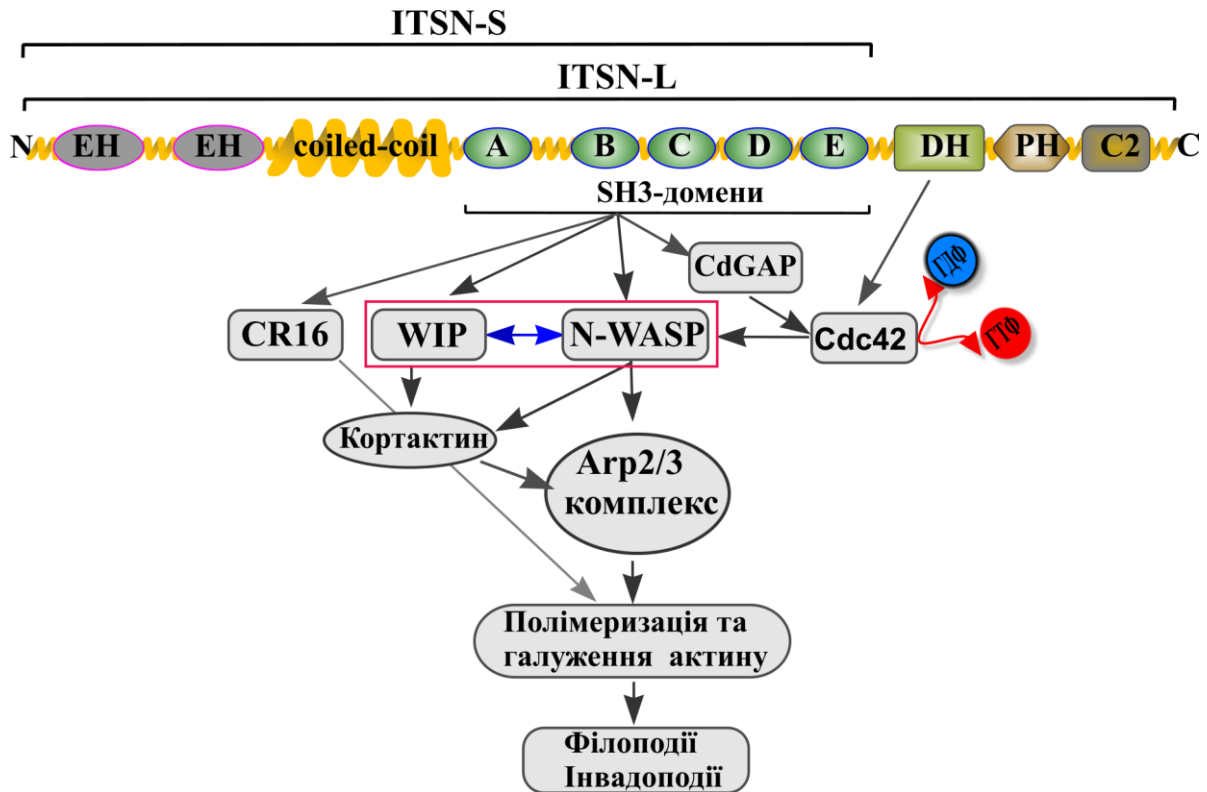


**Рис. 15.** Імунофлуоресцентний аналіз впливу CR16 (пурпурний) на колокалізацію ITSN1(+VKGEW) (зелений) з F-актином (червоний). Клітини лінії MCF-7 було котрансфіковано: *а* – Omni-ITSN1(+VKGEW) і Мус-CR16; *б* – Omni-ITSN1(+VKGEW) і рCMV-Мус. Білки ITSN1 і CR16 детектували за допомогою анти-Omni та анти-Мус антитіл, F-актин візуалізували за допомогою фалоїдину. Стрілки вказують на колокалізацію ITSN1, F-актину та CR16. Масштаб 20 мкм. *в* – Коефіцієнт кореляції Спірмена для Omni-ITSN1(+VKGEW) і F-актину в клітинах, які надекспресували Мус-CR16 або вектор без вставки (рCMV-Мус). Статистичний аналіз проводився за допомогою критерію Манна-Уїтні, \*\*\* –  $p < 0,001$

Значення коефіцієнта кореляції Спірмена для ITSN1(+VKGEW) та F-актина за умов наявності CR16 складало  $0,55 \pm 0,14$ ,  $n=33$ , тоді як за відсутності CR16 було значно нижчим і складало  $0,19 \pm 0,07$ ,  $n=30$  (рис. 15 в).

Таким чином, було виявлено зростання рівня колокалізації ITSN1(+VKGEW) із F-актином за умов надекспресії Мус-CR16, що ймовірно вказує на здатність CR16 сприяти локалізації інтерсектина 1 до сайтів полімеризованого актину в клітинах лінії MCF-7.

На основі проведених досліджень, з урахуванням даних літератури, запропоновано гіпотетичну модель Arp2/3-залежної полімеризації актину за участі ITSN, WIP та CR16 (рис. 16).



**Рис. 16.** Гіпотетична модель ITSN-залежного регулювання полімеризації актину за участі WIP та CR16

Відомо, що довгі ізоформи інтерсектинів зв'язують ГТФазу Cdc42, що призводить до дисоціації ГДФ і його заміни на ГТФ, в результаті чого утворюється активна форма Cdc42-ГТФ, що здатна активувати N-WASP, який в свою чергу активує комплекс Arp2/3 та стимулює полімеризацію актину. Проте, в клітині N-WASP знаходиться у комплексі з WIP в автоінгібованому стані, в якому він не здатний до активації. Можна припустити, що взаємодія інтерсектину з комплексом WIP/N-WASP призводить до зняття WIP-опосередкованого блокування N-WASP, що дозволяє Cdc42 активувати N-WASP та викликати полімеризацію актину. Оскільки CR16 є тканино-специфічним білком, припускаємо вплив комплексу CR16/ITSN на полімеризацію актину в нейронах, яєчках та злоякісних клітинах. Також, Arp2/3-залежна полімеризація актину може відбуватися через ITSN/WIP/кортактин. Таким чином, інтерсектини слугують платформою для збірки та локалізації компонентів, необхідних для полімеризації актину, де відбувається їх часова і просторова регуляція.

Результати представлених у даній роботі досліджень значно розширюють уявлення про WIP/N-WASP-опосередковані перебудови актинового цитоскелету, з порушенням регуляції яких пов'язаний розвиток злоякісних новоутворень, а також про нові молекулярні компоненти інвадоподій – ITSN1 та ITSN2 та їх взаємодію з регуляторами полімеризації актину WIP і CR16.

## ВИСНОВКИ

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

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

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

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

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

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

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

7. Встановлено, що CR16 формує комплекси з SH3E-доменом ITSN2 та нейрон-специфічною ізоформою SH3A-домена ITSN1, причому ITSN1 зв'язує CR16, який знаходиться в комплексі з  $\beta$ -актином і сприяє його локалізації з полімеризованим актином.

## СПИСОК РОБІТ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

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

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



3. **Gryaznova T**, Kropyvko S, Burdyniuk M, Gubar O, Kryklyva V, Tsyba L, Rynditch A. Intersectin adaptor proteins are associated with actin-regulating protein WIP in invadopodia. *Cellular Signalling*. 2015; 27: 1499-1508. *(Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, проведення імунопреципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків, робота з культурами клітин, дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків, аналіз протеолітичної деградації позаклітинного матриксу, написання рукопису).*
4. Kropyvko S, Gubar O, **Gryaznova T**, Morderer D, Gerasymchuk D, Syvak L, Grabovoy A, Rynditch A. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the adaptor/scaffold protein gene ITSN1. *Biopolymers and Cell*. 2016. 32: 203-221. *(Особистий внесок: робота з культурами клітин, проведення імунопреципітацій).*
5. Tsyba L, **Gryaznova T**, Dergai O, Dergai M, Skrypkina I, Kropyvko S, Boldyryev O, Nikolaienko O, Novokhatska O, Rynditch A. Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 372: 929-934. *(Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, робота з культурами клітин, дослідження білок-білкових взаємодій).*
6. Tsyba L, Skrypkina I, **Gryaznova T**, Dergai M, Dergai O, Kropyvko S, Novokhatska O, Drobot L, Rynditch A. Regulation of functional diversity of endocytic adaptor/scaffold proteins intersectins. 7th Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology; 2009 October 3-7, Yalta, Ukraine. *(Особистий внесок: вестерн-блот аналіз, коімунопреципітація, імунофлуоресцентний аналіз).*
7. **Gryaznova T**, Kropyvko S, Burdyniuk M, Gubar O, Kryklyva V, Tsyba L, Rynditch A. Adaptor protein ITSN1 is associated with actin-related protein WIP in invadopodia. XI Український біохімічний конгрес. Український біохімічний журнал; 2014 October 06-10, Kyiv, Ukraine. *(Особистий внесок: отримання рекомбінантних білків, проведення імунопреципітацій та преципітацій з використанням GST-зв'язаних білків, робота з культурами клітин, дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків, аналіз протеолітичної деградації позаклітинного матриксу).*
8. Kropyvko S, **Gryaznova T**, Gubar O, Kryklyva V, Burdyniuk M, Dergai M, Tsyba L, Vassetzky Y, Rynditch A. Macromolecular complexes in invadopodia formation. VII International Meeting From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies; 2015 October 18-20, Tbilisi, Georgia. *(Особистий внесок: коімунопреципітації, робота з культурами клітин, дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків).*
9. Kropyvko S, **Gryaznova T**, Kryklyva V, Burdyniuk M, Gubar O, Tsyba L, Rynditch A. New macromolecular complexes in invadopodia formation. 41th FEBS Congress «Molecular and Systems Biology for a Better Life»; 2016 September 3-8, Kusadasi, Turkey. *(Особистий внесок: коімунопреципітації, робота з культурами клітин, дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків).*
10. Kropyvko S, **Gryaznova T**, Gubar O, Kryklyva V, Burdyniuk M, Tsyba L, Rynditch A. ITSN1, TKS4 and verprolin family members WIP and CR16-containing macromolecular complexes in invadopodia. GDRI, 2016 September 19-22, Lviv, Ukraine. *(Особистий внесок: робота з культурами клітин, дослідження внутрішньоклітинної локалізації білків).*

## АНОТАЦІЯ

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

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

Дисертація присвячена виявленню нової ролі білків родини інтерсектинів (ITSN1 та ITSN2) як адаптерних білків під час N-WASP-залежної полімеризації актину. Було ідентифіковано два нових партнера інтерсектинів – WIP та CR16, які через взаємодію з факторами нуклеації, такими як N-WASP та кортактин, регулюють полімеризацію актину. У роботі найбільш охарактеризовано взаємодію інтерсектинів з одним із ключових компонентів подосом та інвадоподій – WIP. Вперше продемонстровано, що ендогенні ITSN1 та ITSN2, а також комплекс ITSN1/WIP є компонентами інвадоподій. Показано, що WIP зв'язує SH3A-, SH3C-, SH3E-домени ITSN1 та ITSN2. Доведено пряму взаємодію між ITSN1 та WIP через амінокислотні залишки 318-450 пролін-збагаченого домену WIP. Виявлено, що комплекс ITSN1/WIP є компонентом RAB4-позитивних везикул, бере участь у везикулярному транспорті рецептора трансферину та індукує утворення філоподієподібних виступів. Встановлено існування потрійного комплексу між ITSN1, WIP та N-WASP, у складі якого WIP сприяє взаємодії між N-WASP та інтерсектином.

Вперше продемонстровано наявність білок-білкового комплексу між інтерсектинами та CR16, який залучено до передачі сигналу в нейронах та сперматогенезу. Встановлено, що CR16 взаємодіє з нейрон-специфічною ізоформою SH3A-домена ITSN1 та SH3E-доменом ITSN2, причому ITSN1 зв'язує CR16, який знаходиться в комплексі з  $\beta$ -актином і сприяє локалізації інтерсектину з полімеризованим актином.

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

## АННОТАЦІЯ

**Грязнова Т.А. Комплексы белков семейства интерсектинов с верпролинами WIP и CR16 – компоненты аппарата транспорта везикул и актинового цитоскелета.** – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

*Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.03 «Молекулярная биология». – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2019.*

Работа посвящена выявлению новой роли белков семейства интерсектинов (ITSN1 и ITSN2) как адаптерных белков в N-WASP-опосредованной полимеризации актина. В ходе работы были идентифицированы два новых белка-партнёра

интерсектинов – WIP и CR16, которые через взаимодействие с факторами нуклеации, такими как N-WASP и кортактин, регулируют полимеризацию актина. В основном, охарактеризовано взаимодействие интерсектинов с ключевым компонентом инвазивных структур (подосом и инвадоподий) – белком WIP. Продемонстрировано, что ITSN1 и ITSN2 могут локализоваться в инвадоподиях. Показано, что WIP формирует комплексы с доменами SH3A, SH3C, SH3E ITSN1 и ITSN2. Доказано прямое, не опосредованное другими белками-партнёрами, взаимодействие между ITSN1 и WIP, которое осуществляется с помощью 318-450 аминокислотных остатков пролин-богатого домена WIP. Выявлено, что комплекс ITSN1/WIP является компонентом RAB4-позитивных везикул, принимает участие в интернализации рецептора трансферрина и способствует индукции филоподие-подобных отростков. Показано существование тройного комплекса между ITSN1, WIP и N-WASP, в составе которого WIP способствует взаимодействию N-WASP с интерсектином.

Впервые показано существование белковых комплексов между интерсектинами и белком CR16, который принимает участие в передаче сигнала в нейронах и сперматогенезе. Установлено, что CR16 взаимодействует с нейрон-специфической изоформой SH3A-домена ITSN1 и SH3E-доменом ITSN2, причём ITSN1 связывается с CR16, который находится в комплексе с  $\beta$ -актином и способствует его локализации с полимеризованным актином.

**Ключевые слова:** интерсектин, WIP, CR16, актиновый цитоскелет, инвадоподии, везикулярный транспорт, филоподие-подобные отростки.

## SUMMARY

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

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

Rearrangements of actin cytoskeleton are important for normal cell functioning and their deregulation leads to various pathologies (e.g. cancer cell invasiveness). The members both ITSN (ITSN1, ITSN2) and verprolin families (WIP, CR16, WIRE) play an important role in actin cytoskeleton remodeling. ITSNs serve as molecular adaptors in clathrin-mediated endocytosis and cytoskeleton rearrangements. In addition, ITSNs are associated with the progression of several neurodegenerative pathologies and are implicated in cancer cell survival and migration. Multidomain adaptor structure of ITSNs allows formation of complexes between Cdc42, N-WASP, and CdGAP, which regulate actin polymerization and take part in cytoskeleton rearrangements. However, the role of intersectins in the actin polymerization is not well studied yet. The members of the mammalian verprolin protein family are well known interactors with actin and nucleation factors such as cortactin and N-WASP, and can influence the Arp2/3-dependent actin polymerization machinery. Thus, SH3-containing ITSNs and proline-rich verprolins could



act as partner proteins because of participation in the same processes such as endocytosis and actin cytoskeleton rearrangement and possessing putative interaction motifs.

Therefore, the presented work is devoted to the study of ITSN interaction network in actin remodeling by identifying new partner proteins WIP and CR16. The best-studied verprolin is WIP that is associated with the development of immune deficiency in Wiskott-Aldrich syndrome and metastatic malignant tumors. Immunoprecipitation and *in vitro* binding experiments revealed that ITSNs bind WIP and these interactions are mediated by the SH3A, SH3C and SH3E domains of ITSNs. Our results show that interactions between ITSN1 and WIP are direct and not mediated by N-WASP, which is constitutively associated with WIP in cells. For the mapping of ITSN1-interacting regions of WIP structure, WIP deletion constructions have been used, which led to the identification of the importance of 318-450 aa of WIP proline-rich domain for the above mentioned interactions. In addition, we have demonstrated that ITSN1 forms a complex with WIP and N-WASP. The immunofluorescence analysis revealed partial co-localization of ITSN1 and ITSN2 with WIP in mammalian cells.

Recent studies denote that WIP is one of the key components of podosomes and invadopodia (actin-rich membrane protrusions with matrix degradation activity present in normal and cancer invasive cells, respectively). While analyzing proteolytic degradation of extracellular matrix, it has been shown that endogenous ITSN1 and ITSN2 as well as ITSN1/WIP complex are localized in invadopodia of MDA-MB-231 breast cancer cell line. It is known that Cdc42/N-WASP/WIP-dependent actin polymerization via the Arp2/3 complex is required for invadopodia formation. Given the ability of ITSNs to activate Cdc42 and directly interact with N-WASP and WIP, we suggest that ITSNs could be involved in actin polymerization during invadopodia formation.

In the immunofluorescence experiments, co-localization between ITSN1, WIP and clathrin has been demonstrated, indicating their possible ability to participate in clathrin-mediated endocytosis. An analysis of transferrin receptor internalization revealed defects of intracellular transferrin transport in 293 cells with overexpressed ITSN1-L or WIP whereas co-expression of ITSN1-L and WIP normalized transferrin internalization suggesting participation of the complex in the regulation of vesicular transport. Intracellular redistribution of transferrin occurs by several ways including RAB4-dependent early endosomes. Partial co-localization of WIP and ITSN1 proteins with a marker of recycling endosomes, RAB4, has been demonstrated. Moreover, overexpressed ITSN1 promoted significant co-distribution of WIP to RAB4-positive vesicles in MCF-7 cells. Together, these findings suggest that WIP/ITSN1-L complex is involved in the cytoplasmic vesicle trafficking, in particular, in the fast recycling of the transferrin receptor.

The immunofluorescence analysis revealed that both ITSN1-L and WIP co-localize at the filopodia sites and actively and synergistically induce filopodia formation.

For the first time, it has been demonstrated that both members of the ITSN family, ITSN1 and ITSN2, interact with another member of the verprolin family, CR16. *In vitro* binding experiments showed that the interaction of ITSNs with CR16 is mediated predominantly by neuron-specific isoform of ITSN1 SH3A domain and the SH3E domains of ITSN2. Moreover, overexpressed CR16 promoted the association between ITSN1 and F-actin.

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

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