

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»  
Кафедра біохімії

Завідувач кафедри проф. Олексій САВЧУК

Протокол № \_\_\_\_ засідання кафедри

від “ \_\_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ р.

**ЗВ'ЯЗОК СКАФOLDНОГО ПРОТЕЇНУ ITSН1 ІЗ СИСТЕМОЮ  
SUMO-МОДИФІКАЦІЇ**

Випускна кваліфікаційна робота  
студента денної форми навчання  
за спеціальністю Біологія та біохімія  
Білодіда Данила Тарасовича

Науковий керівник від кафедри  
канд. біол. наук, доц. Юет А.С.

Робота виконана у відділі функціональної геноміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України під керівництвом ст. наук. співроб. відділу, канд. біол. наук, ст. наук. співроб. Грязнової Тетяни Анатоліївни

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2026 р.**

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДСН	– додецилсульфат натрію;
ЕДТА	– етилендіамінтетраоцтова кислота;
ЕМТ	– епітеліально-мезенхімальний перехід;
ЕФР	– епідермальний фактор росту;
МАПК	– активована мітогеном протеїнкіназа;
ПААГ	– поліакриламідний гель;
РМЗ	– рак молочної залози;
СД	– синдром Дауна;
ТЕМЕД	– тетраметилетилендіамін;
Трис	– трис(гідроксиметил)аміноетан;
ФМСФ	– фенілметилсульфоніл фторид;
ХА	– хвороба Альцгеймера;
ЦГІ	– циклогексимід;
BCR	– B-cell receptor (рецептор В-клітин);
Cbl	– casitas B-cell lymphoma (протеїн лімфоми В-клітин Касітас);
CCR	– coiled coil region ( $\alpha$ -спіральний регіон);
DH	– Dbl homology (Dbl гомологічний домен);
EGFR	– epidermal growth factor receptor (рецептор епідермального фактора росту);
EH	– Eps15 homology (Eps15 гомологічний домен);
FBS	– Fetal Bovine Serum (ембріональна сироватка теляти);
GEF	– guanine nucleotide exchange factor (гуанін-нуклеотид обмінний фактор);
ITSN	– intersectin (інтерсектин);
NEM	– N-Ethylmaleimide (N-етилмалеїмід);

PBS	– phosphate buffered saline (натрій-фосфатний буферний розчин);
PH	– pleckstrin homology (плекстрин гомологічний домен);
PI3K $\alpha$ 2 $\beta$	– phosphatidylinositol 3-kinase, class 2 beta (фосфатидилінозитол 3-кіназа, 2 класу бета);
PIAS	– protein inhibitor of activated STAT (інгібітор активованого STAT);
SAE	– SUMO activating enzyme (ензим, що активує SUMO);
SH3	– Src homology 3 (гомологічний до Src домен 3);
SUMO	– small ubiquitin-like modifier (малий убіквітиноподібний модифікатор);
TBST	– Tris-buffered saline with Tween 20 (Трис-сольовий буферний розчин з додаванням твін 20);
TGF $\beta$	– transforming growth factor beta (ростовий фактор трансформації бета);
UBC9	– ubiquitin conjugating protein (убіквітин-кон'югувальний протеїн);
WASP	– Wiskott-Aldrich Syndrome protein (протеїн синдрому Віскотта-Ольдрича).

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	6
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Родина скафолдних протеїнів інтерсектинів. Характеристика посттрансляційної модифікації SUMO.....	8
1.1. Характеристика інтерсектинів. Молекулярна структура протеїнів ITSN.....	8
1.1.1. Загальна характеристика та структура протеїну ITSN .....	8
1.1.2. Альтернативний сплайсинг транскриптів генів <i>ITSN</i> .....	10
1.1.3. Функціональне значення ITSNs у клітині .....	12
1.1.4. Асоціація інтерсектинів з патологічними станами.....	15
1.1.5. Посттрансляційні модифікації ITSN .....	18
1.2. Характеристика посттрансляційної модифікації SUMO.....	19
1.2.1. Характеристика протеїнів родини SUMO. Біохімія сумоїлування..	19
1.2.2. Функції SUMO в клітині.....	21
1.2.3. SUMO та пов'язані з ним розлади.....	22
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Матеріали та методи досліджень.....	24
2.1. Матеріали та реактиви .....	24
2.2. Біологічний матеріал.....	25
2.3. Культивування клітин .....	25
2.4. Трансфекція клітин лінії MCF7 .....	26
2.5. Отримання лізатів клітин.....	26
2.6. Приготування лізатів головного мозку мишей лінії BALB/c .....	27
2.7. Імунопреципітація протеїнових комплексів .....	27
2.8. Обробка клітин циклогексїмідом .....	28
2.9. Диск-електрофорез протеїнів в ПААГ за денатуруючих умов.....	28
2.10. Вестерн-блот аналіз.....	29
2.11. Повторна детекція імуноблотограм.....	30
2.12. Імунофлуоресцентний аналіз.....	30

2.13. Статистичний аналіз.....	31
<b>РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення.....</b>	<b>32</b>
3.1. Виявлення сумоїльованного ITSN1 за фізіологічних та патологічних умов.....	32
3.1.1. Детекція ITSN1-SUMO кон'югантів у мозку миші.....	36
3.1.2. Виявлення ITSN1-SUMO2/3 кон'югантів у клітинах нейробластоми лінії SH-SY5Y.....	39
3.2. Визначення специфічності модифікації ITSN1 різними ізоформами SUMO.....	40
3.3. Аналіз впливу нокауту гена <i>ITSN1</i> на сумоїлування SAM68 .....	44
3.4. Аналіз впливу протеїнів системи SUMO-модифікації на стабільність ITSN1.....	47
3.5. Аналіз впливу протеїну SUMO3 на внутрішньоклітинне розташування ITSN1.....	51
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>54</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>55</b>

## ВСТУП

Внутрішньоклітинні процеси потребують чіткої координації, яка значною мірою забезпечується скафолдними протеїнами. Вони діють як молекулярні платформи, що об'єднують різноманітні протеїни у функціональні мультипротеїнові комплекси. До цієї групи належать еволюційно консервативні протеїни – інтерсектини (ITSN1 та ITSN2), чия роль полягає в регуляції клітинного сигналіngu, контролі ендоцитозу та ремоделюванні актинового цитоскелету [1-4]. У клітинах хребетних домінують дві основні ізоформи ITSNs: коротка (ITSN-S) та довга (ITSN-L). Водночас процеси альтернативного сплайсингу генерують низку тканиннospецифічних транскриптів, експресія яких залежить від стадії онтогенезу або типу клітин [1].

Порушення експресії *ITSN1* асоційовано зі злоякісною трансформацією клітин [2] та розвитком нейродегенеративних патологій [1]. Зокрема, у тканинах раку молочної залози (PM3) спостерігається суттєве зниження рівнів мРНК *ITSN1* та відповідного протеїну порівняно з прилеглими здоровими ділянками [5]. Низькі рівні експресії *ITSN1* сприяють проліферації ракових клітин та пригнічують апоптоз, тоді як його надмірна експресія може мати протилежний ефект. Крім того, коротка ізоформа *ITSN1-S* може переміщуватися в ядро, де вона пригнічує реплікацію ДНК та проліферацію клітин PM3 [6]. Ці дані дозволяють розглядати *ITSN1* як перспективний біомаркер сприятливого прогнозу для пацієнтів, проте конкретні механізми його ядерного транспорту та подальша функціональна роль у внутрішньоклітинних сигнальних шляхах залишаються недостатньо вивченими. Інтерсектини широко зазнають посттрансляційної регуляції, що значно впливає на їхню функціональну активність у клітині [7-10].

Відомо, що ядерно-цитоплазматичний трансфер протеїнів може, зокрема, регулюватися за допомогою посттрансляційної модифікації – сумоїлування (SUMO-модифікація). SUMO – невеликий убіквітин-подібний протеїн,

компонент оборотної посттрансляційної модифікації протеїнів за залишком лізину [11]. SUMO-модифікація регулює функцію, стабільність, внутрішньоклітинну локалізацію протеїнів, залучених у проліферацію, диференціацію, інвазію, апоптоз, репарацію ДНК та інші клітинні процеси [12]. Компоненти сумоїлування (SUMO-протеїни, E2-кон'югуючий фермент UBC9, E3-лігази) є потенційними мішенями для лікування раку, оскільки вплив на їх експресію може пригнічувати розвиток онкологічних захворювань.

Враховуючи важливу роль ITSN1 як скафолда для збірки мультипротеїнових комплексів та здатність SUMO-протеїнів впливати на внутрішньоклітинний транспорт та патологічні процеси, виникає нагальна потреба у дослідженні взаємодій між компонентами сумоїлування та ITSN1. Це питання є важливим як у контексті з'ясування, чи може сам ITSN1 зазнавати сумоїлування, так і з точки зору визначення, чи його потенційна співлокалізація та/або взаємодія з протеїнами системи сумоїлування може забезпечувати модифікацію інших клітинних протеїнів.

З огляду на вищезазначене, метою роботи було проаналізувати зв'язок скафолдного протеїну ITSN1 із системою SUMO-модифікації.

Для досягнення цієї мети було поставлено наступні завдання:

1. Перевірити можливість сумоїлування ендogenous ITSN1 за фізіологічних та патологічних умов.
2. Визначити основні SUMO-модифікатори для сумоїлування ITSN1 серед SUMO1, SUMO2 та SUMO3.
3. Перевірити можливий вплив скафолдного протеїна ITSN1 на сумоїлування своїх протеїнових партнерів.
4. Виявити потенційний вплив компонентів системи SUMO-модифікації на стабільність ITSN1.
5. Проаналізувати ймовірний вплив SUMO-протеїнів на ядерно-цитоплазматичне розташування ITSN1 в клітинах лінії MCF7.

# РОЗДІЛ 1

## РОДИНА СКАФОЛДНИХ ПРОТЕЇНІВ ІНТЕРСЕКТИНІВ. ХАРАКТЕРИСТИКА ПОСТТРАНСЛЯЦІЙНОЇ МОДИФІКАЦІЇ SUMO

### 1.1. Скафолдні протеїни родини ITSN

#### 1.1.1. Характеристика інтерсектинів. Молекулярна структура протеїну ITSN

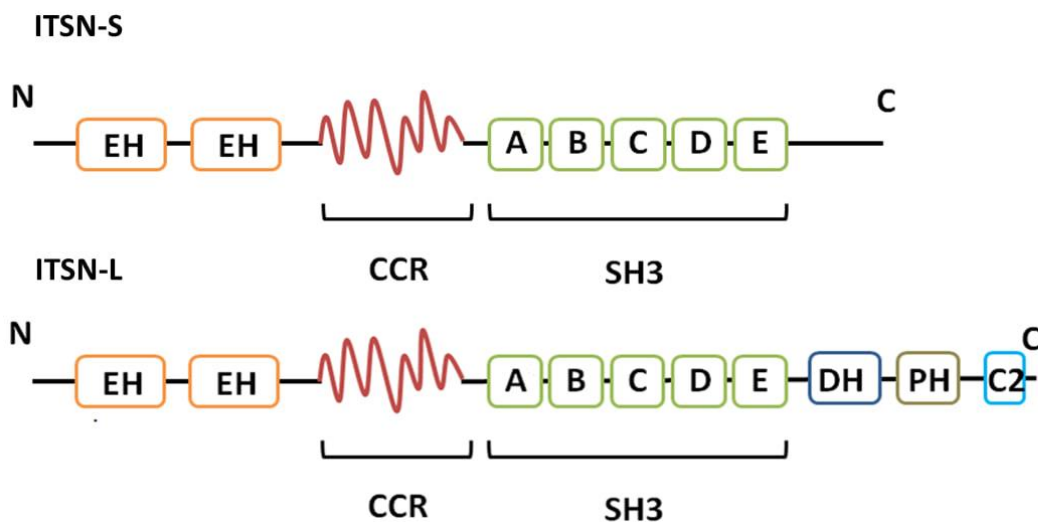
Сигнальні каскади кілтин, що забезпечують міграцію, виживання, контроль клітинного циклу, диференціацію та проліферацію, зазнають тонко налагодженої регуляції з боку скафолдних протеїнів [1]. Ключова функція цих макромолекул зводиться до просторової організації протеїнів, що залучаються у ці сигнальні шляхи. Варіюючи свою присутність у різних субклітинних компартментах, скафолди здатні виступати як інгібіторами, так і каталізаторами передачі сигналу, гарантуючи необхідну специфічність, силу та тривалість клітинної відповіді [7].

Родина інтерсектинів (ITSNs) об'єднує консервативні мультидоменні протеїни, які у взаємодії зі своїми лігандами створюють динамічні платформи для регуляції внутрішньоклітинного сигналіngu, актинового цитоскелету, а також кавеолін- та клатрин-опосередкованого ендоцитозу.

В людському організмі ця родина представлена двома паралогами – ITSN1 та ITSN2, кодовані генами, що локалізовані на 21-й та 2-й хромосомах відповідно. Обидва представники мають споріднену модульну архітектуру. Внаслідок альтернативного сплайсингу мРНК у хребетних формуються дві основні ізоформи: коротка (ITSN-S) та довга (ITSN-L) [8].

Структура короткої ізоформи включає центральний  $\alpha$ -спіральний регіон (CCR), п'ять SH3-доменів (SH3A-E) на С-кінці та два EH-домени (EH1,

EH2) на N-кінці [1] (рис. 1.1). Здатність EH-доменів розпізнавати амінокислотні мотиви Asn-Pro-Phe є типовою для протеїнів, залучених до везикулярного транспорту та ендоцитозних процесів [15]. Своєю чергою, SH3-домени специфічно зв'язуються з пролін-збагаченими ділянками протеїнів, що беруть участь у ремоделюванні плазмолемі, перебудовах цитоскелету та сигналінгу [16].



**Рис. 1.1.** Доменна будова інтерсектинів

Довга форма (ITSN1-L) вирізняється наявністю трьох додаткових доменів на карбоксильному кінці: DH, PH та C2 [1]. Присутність доменів DH та PH дозволяє віднести ITSN1-L до родини Dbl-факторів обміну гуанінових нуклеотидів (GEF), що обумовлює їхню здатність активувати малі ГТФази Rho-типу [17]. Зокрема, DH-домен виявляє високу специфічність до активації Cdc42 [16]. Домен PH забезпечує зв'язування з фосфатидилінозитолами, а С-кінцевий домен C2 відповідає за асоціацію з фосфоліпідами мембран у  $\text{Ca}^{2+}$ -залежний або  $\text{Ca}^{2+}$ -незалежний спосіб. Така складна просторова конфігурація дозволяє інтерсектинам координувати роботу величезної кількості молекул: наразі ідентифіковано понад 50 прямих протеїнових партнерів, і їхня кількість постійно зростає [19].

Профіль експресії інтерсектинів у різних типах клітин і тканин відзначається чіткою специфічністю. Коротка ізоформа ITSN1-S присутня у більшості тканин, де вона розподіляється по цитоплазмі, ядрі та перинуклеарних зонах. Разом із ITSN2-S вона локалізується у везикулах, облямованих клатрином, проте лише ITSN1-S додатково асоціюється з кавеолами – інвагінаціями плазмолемі. Довга форма ITSN1-L є специфічною переважно для клітин нервового походження й відіграє ключову роль у морфогенезі дендритних шипиків, Натомість ITSN2-L має ширший тканинний розподіл і часто асоціюється з везикулами в ендотеліоцитах [20].

### **1.1.2. Альтернативний сплайсинг транскриптів генів *ITSN***

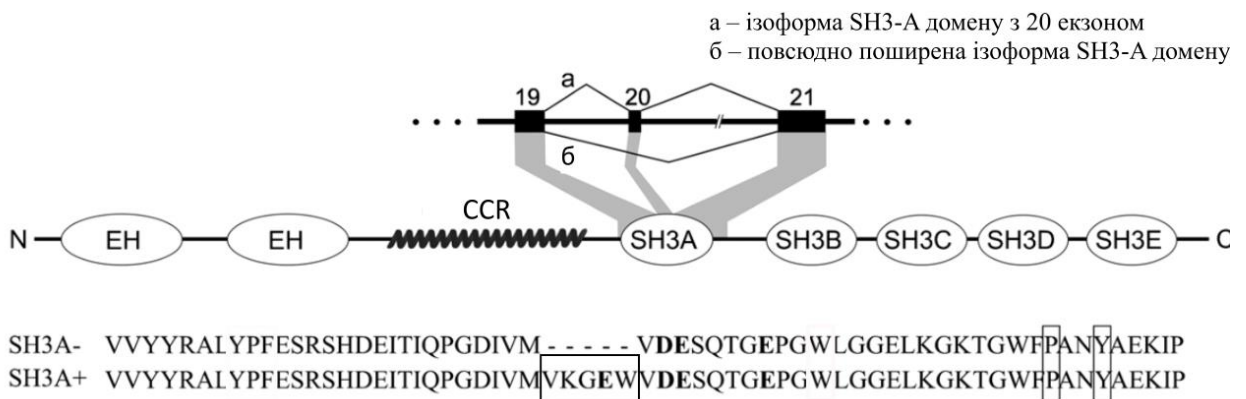
Процеси альтернативного сплайсингу є визначальними для регуляції функціонального різноманіття продуктів генів *ITSN*. Формування двох основних ізоформ (як для ITSN1, так і для ITSN2) пов'язане зі сплайсингом 30-го екзону, де розташований стоп-кодон короткої ізоформи. Вилучення цього екзону призводить до заміни термінаційного кодону на триптофановий залишок після приєднання 31-го екзону, що подовжує кодуючу послідовність на 3'-кінці [1].

Також для обох паралогів інтерсектину виявлено цілий перелік еволюційно консервативних подій альтернативного сплайсингу, що чинять вплив на транскрипти генів *ITSN*. Для ITSN2 їх виявлено менше, аніж для ITSN1 і, за винятком сплайсингу екзону 30, відомо про три додаткові альтернативні події сплайсингу, які не вводять кодони передчасної термінації. Сплайсинг 19 екзону та специфічне для мозку включення екзону 17 змінює структуру CCR-домену ITSN2, тоді як вилучення екзонів 27 і 28 призводить до видалення домену SH3D в амінокислотній послідовності інтерсектину 2 [1].

У випадку з ITSN1 сплайсинг 6-го екзону елімінує 37 амінокислот між EH-доменами, а втрата екзонів 25-26 модифікує структуру домену SH3C.

Делеція 35-го екзону в мРНК ITSN1 призводить до скорочення DH-домену та міждоменного проміжку DH-PH. Інсерція екзону 22а призводить до утворення найкоротшої сплайсоформи ITSN1: цей транскрипт кодує лише EH-домени, CCR, SH3A та унікальний для цієї сплайсоформи С-кінцевий домен [8].

Серед біологічно активних продуктів альтернативного сплайсингу, особливу увагу привертає ізоформа ITSN1, що виникає внаслідок інсерції 20-го екзону, який кодує пентапептид (VKGEW) всередині SH3A-домену (рис. 1.2). Рівень експресії цього варіанту мРНК гена ITSN1 варіює під час індивідуального розвитку, досягаючи максимальних значень у період активного ембріогенезу головного мозку людини [21].



**Рис. 1.2.** Схематичне представлення продукту гена ITSN1, що містить включений 20 екзон у послідовності, яка відповідає SH3A-домену. Адаптовано з [22]

Наразі було встановлено, що специфічна ізоформа ITSN1(+VKGEW) функціонує винятково в нервовій системі. Головна відмінність цієї форми від класичної ITSN1-S полягає у здатності зв'язувати протеїн TKS5 (субстрат кінази Src). Цей партнер є критично необхідним компонентом для утворення інвадоподій – актинових виростів, які чинять деградацію позаклітинного матриксу й тим самим сприяють клітинній інвазії та метастазуванню [22]. Більше того, поява пептиду VKGEW радикально змінює лігандну афінність SH3A-домену, значно посилюючи його взаємодію з адаптером RUK/CIN85,

факторами ендоцитозу (синаптояніном 1, динаміном 1) та модуляторами цитоскелету (CR16 та CdGAP) [23].

Таким чином, пре-мРНК генів *ITSN* здатна зазнавати множинних подій альтернативного сплайсингу, що забезпечує тонку регуляцію функцій цих скафолдів у процесах внутрішньоклітинної комунікації, екзоцитозу, ендоцитозу та динаміки цитоскелету.

### 1.1.3. Функціональне значення ITSNs у клітині

Аналіз численних експериментальних даних беззаперечно доводить, що молекули ITSN виконують фундаментальну каркасну функцію, формуючи просторову організацію протеїнових комплексів у ході синаптичної передачі, везикулярного транспортування та ремоделювання актинових філаментів.

Поза цими основними функціями, родина ITSN активно модулює процеси життєдіяльності та апоптозу, контролює клітинну полярність, а також виступає необхідним компонентом для утворення таких спеціалізованих структур, як дендритні шипики у нейронах та інвадоподії в клітинах пухлин [1].

Наявність різних функціональних доменів у послідовності ITSN забезпечує взаємодію з низкою протеїнових лігандів. Хоча й ITSN1 та ITSN2 мають відмінності у ліганд-зв'язуючих ділянках доменів SH3, дані, отримані з експериментів зі зв'язування *in vitro*, свідчать про те, що домени SH3 ITSN зв'язують переважно подібні ліганди [8]. Для обох паралогів доведено, що домени SH3 здатні регулювати пряму взаємодію з фосфатазою синаптояніном 1, ГТФазою динаміном 1, убіквітин-лігазою c-Cbl, а також регуляторними молекулами CdGAP – GAP-фактором ГТФази Cdc42 та SOS1 – GEF-фактором для Ras [18].

Дані досліджень встановили здатність ITSNs рекрутувати протеїни ендоцитозного апарату, серед яких Numb, Stonin2, Epsin, Dab2 та

динамін [24, 25]. Зокрема, зв'язування з Epsin дозволяє інтегрувати інтерсектин у масштабний комплекс разом із трансмембранним синаптотагміном та адаптером AP2, що відіграє визначальну роль у згинанні плазмолемі під час формування везикул [1].

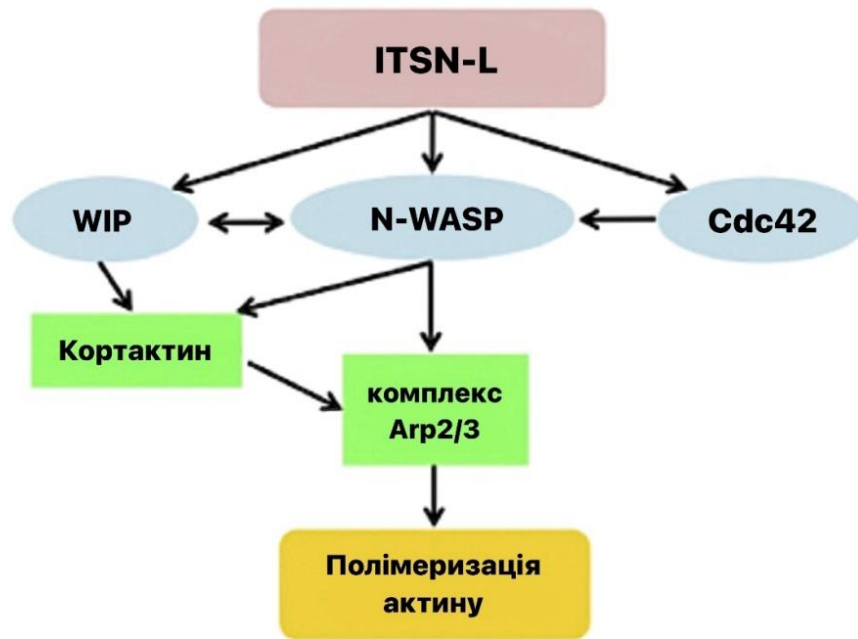
Оскільки довга ізоформа ITSN1 експресується переважно в нервових клітинах, вона розглядається як фундаментальний компонент механізмів рециркуляції нейротрансмітерів, що має велике значення для розуміння патогенезу порушень та розладів, пов'язаних з нервовою системою [9].

У процесах екзоцитозу інтерсектини взаємодіють із протеїном SNAP-25, протеїном, що є представником родини SNARE, і, таким чином регулюють процес вивільнення пулу готових до вивільнення синаптичних везикул. GEF-активність довгих ізоформ ITSN виявляється необхідною для перебудови актинових філаментів, що передують секреції в нейроендокринних клітинах [26].

Регуляція актинового каркасу інтерсектинами відбувається через пряме стимулювання ГТФази Cdc42, а також через фізичний контакт з ефекторами цієї ГТФази – протеїнами N-WASP та WASP (рис. 1.3).

Загальновідомо, що ГТФази Rho-типу виступають майстер-регуляторами динаміки актину. Здатність діяти як GEF для Cdc42 притаманна лише довгим транскриптам ITSN завдяки наявності DH-домену. Важливими ефекторами Cdc42 під час росту філоподій є фактори нуклеації: N-WASP, що експресується повсюдно, та WASP, локалізований у гемопоетичних стовбурових клітинах [24]. Ці протеїни не лише зв'язуються зі скафолдами родини ITSN [20], але й взаємодіють із WIP (WASP-інтерактуючим протеїном). WIP, своєю чергою, відповідає за функціональну активність, позиціонування та стійкість N-WASP і WASP до деградації (рис. 1.3).

Крім цього, доведено, що взаємодія пролін-вмісних ділянок N-WASP із доменами SH3 скафолду ITSN1-L знімає автоінгібіторний блок із DH-домену. Це полегшує його асоціацію зі станом Cdc42-ГДФ та стимулює обмін нуклеотидів на ГТФ.



**Рис. 1.3.** Схематичне зображення молекулярних механізмів полімеризації актину при взаємодії з ITSN-L. Адаптовано з [18]

Аналогічна активація спостерігається і в нейронах: контакт SH3-доменів із регулятором нейрогенезу Numb значно підсилює GEF-функцію ITSN1-L щодо Cdc42 *in vivo*. З іншого боку, зниження каталітичної активності ITSN1-L здійснюється за рахунок автоінгібування, коли С-термінальна частина DH-домену блокується власним SH3E-доменом. У цьому контексті SH3E розглядається як головний супресор активності обмінного фактора [28].

На відміну від детально вивченого ITSN1, дані про контакти ITSN2 з WASP, N-WASP та WIP на сьогодні лише констатують наявність такої взаємодії *in vivo*, проте механізми та функціональне значення цих взаємодій залишаються нез'ясованими й потребують детальнішого аналізу.

Інтерсектини суттєво регулюють різноманітні сигнальні каскади клітини. Коротка ізоформа ITSN1-S посилює активацію ГТФази Ras на везикулах через взаємодію з фосфатидилінозитол-3-кіназою PI3KC2 $\beta$  [29]. Ця взаємодія руйнує інгібіторний комплекс аро-Ras/PI3KC2 $\beta$ , що знімає взаємне пригнічення протеїнів і призводить до активації Ras [30, 31]. ITSN1 також

визначає вектор сигналіngu TGF $\beta$ : через формування комплексу з GEF-протеїном SOS він знижує активацію Ras, зміщуючи баланс у бік SMAD-незалежного шляху [32, 33]. Це має значення для процесів EMT, оскільки саме SMAD-залежний шлях модулює синтез епітеліальних та мезенхімальних маркерів [34]. Крім того, ITSN1 впливає на мітогенну передачу сигналів, регулюючи через протеїн Cbl убіквітування та інтерналізацію EGFR, що важливо для синтезу цикліну D та активації JNK- і ERK-шляхів MAPK [35, 36].

Важливу роль інтерсектин відіграє в рекрутуванні фосфатази SHIP2 до клатринових ділянок, де вона регулює рівні фосфорильованих інозитолів PI(4,5)P<sub>2</sub> і PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Це критично для диференційованої активації ізоформ Akt: SHIP2 генерує PI(3,4)P<sub>2</sub> для специфічної активації Akt2, тоді як PI(3,4,5)P<sub>3</sub> активує Akt1 та Akt3 на мембрані [37]. Також ITSN1-S взаємодіє з PIK3C2A, пригнічуючи шлях Akt, що, в свою чергу, могло бути пов'язано зі зниженням міграції клітин раку молочної залози [6, 38]. У нервовій системі ITSN1 є ключовим компонентом передачі рилінового сигналу через рецептори VLDLR/ArpER2 та адаптер Dab1, що підтримує міграцію нейронів кори й гіпокампа та синаптичну пластичність [4, 39]. Нокаут ITSN1 пригнічує довготривалу потенціацію та порушує стабілізацію актинової мережі через шлях LIMK1/кофілін, а також сповільнює ріст дендритів через Akt-залежну активацію mTOR [40-42].

#### **1.1.4. Асоціація інтерсектинів з патологічними станами**

Перш за все, інтерсектин 1 відіграє важливу роль у підтримці нормального функціонування нейрональних клітин. За дефіциту експресії або повної втрати гена *Dap160* (функціонального гомолога інтерсектину дрозофіли), це спричиняє глибокі морфологічні дефекти аксональних

терміналей та призводить до аномальної структури пресинапсів у нервово-м'язових з'єднаннях. Що стосується ссавців, то тут *ITSN1-L*, кооперуючись із рецепторами *EphB* та молекулою *Numb*, відповідає за розростання дендритних шипиків гіпокампальних нейронів та забезпечує проліферативний потенціал нервових стовбурових клітин [42].

Важливим аспектом у вивченні асоціацій *ITSN1* з порушеннями нервової системи є його залучення до регуляції апарату мікротрубочок, що додатково відіграє роль у контролі життєздатності нейронів. Нормальний внутрішньоклітинний транспорт уздовж мікротрубочок лежить в основі збереження аксональних зв'язків, а дефекти в цій системі часто стають причиною розвитку нейродегенеративних патологій [43]. Асоціація скафолду *ITSN1* з ключовими модуляторами тубулінової динаміки (*CLIP-115*, *PDE4DIP*, *DISC1*, *STOP*) вказує на те, що мутації або зміна концентрації інтерсектину неминуче відбиваються на функціональному стані нейронів. Дослідження на піддослідних мишах підтверджують цю гіпотезу: як сайленсинг, так і повне вилучення гена *ITSN1* зумовлює масивний дефіцит механізмів екзоцитозу та блокує рециркуляцію синаптичних везикул [43].

Серед найважчих неврологічних патологій окреме місце посідає синдром Дауна (СД), який є найчастішою життєздатною хромосомною трисомією, що виникає через часткову або повну дуплікацію 21-ї хромосоми (*HSA21*) [44]. Класична клінічна картина пацієнтів із цим синдромом охоплює вади серця, відхилення в роботі опорно-рухової системи, розумову відсталість та, що особливо важливо, передчасний розвиток невропатологічних змін, подібних до хвороби Альцгеймера (ХА).

Встановлено, що важливу роль у розвитку обох станів відіграє ген *ITSN1* [1], рівень мРНК та протеїнового продукту якого є значно вищим у зразках, отриманих від пацієнтів із СД [45]. Наукові дані вказують і на те, що обсяг транскриптів *ITSN1* також суттєво зростає в тканинах головного мозку при хворобі Альцгеймера. Окрім цього, до ранніх ознак фенотипових змін мозку при СД та ХА належить розширення раннього ендосомного

компарменту, при цьому зсуви в експресії *ITSN1* у модельних системах безпосередньо пов'язані з порушеннями процесів ендоцитозу та транспорту, що здійснюється за участю рецепторів [45]. Дослідження впливу надмірної експресії трьох специфічних генів 21-ї хромосоми людини, а саме *ITSN1*, *DSCR1* та *synj1*, на моделі дрозофіл продемонстрували, що як індивідуальна, так і спільна надекспресія цих генів негативно впливає на формування синаптичних структур, їхню активність та процеси рециркуляції везикул [46].

Важливим є і той факт, що ген *ITSN1* локалізується у так званому критичному регіоні (HSA21, 21q22.1–q22.2), що є фундаментальним фактором для формування фенотипу СД [42].

Інтерсектини відіграють значну роль у процесах злоякісного переродження клітин, демонструючи здатність впливати на ключові етапи канцерогенезу. Зокрема, зниження експресії ізоформи *ITSN1-S* призводить до посилення проліферації клітин з одночасним пригніченням апоптозу. Надмірна ж експресія *ITSN1-S* зумовлює протилежний ефект, пригнічуючи поділ клітин і стимулюючи їхню загибель шляхом регуляції *Ki-67*, активації каспази-3 та залучення проапоптозних протеїнів родини *Bcl*. Аналіз біоматеріалів при РМЗ показав, що рівень *ITSN1-S* у пухлинах значно нижчий порівняно зі здоровими тканинами, що дозволяє розглядати цей протеїн як потенційний онкосупресор при даній патології [5, 47].

Аналогічна супресорна функція інтерсектину 1 підтверджується і на моделях раку легень: високий рівень *ITSN1-S* у клітинах лінії A549 обмежує їхню проліферацію та загальну пухлиногенність. Проте дефіцит цієї ізоформи активує взаємодію комплексу *Eps8-SOS1*, що тягне за собою стимуляцію *Rac1*. Наслідком цього стає посилення міграції, метастазування та швидкого поділу ракових клітин [48].

Водночас при гліобластомі ситуація є кардинально іншою, адже тут фіксується зворотна кореляція. Зростання рівня *ITSN1-S* спостерігається у 67% хворих і безпосередньо асоціюється з несприятливим прогнозом. Встановлено, що *ITSN1-S* є критичним елементом для мітотичної активності

пухлини, модулюючи каскад сигналізації RAF/MEK/ERK [49]. Парадокс у випадку гліобластоми полягає у функціональному антагонізмі двох ізоформ: тоді як ITSN1-S активно сприяє інвазивності, проліферації та міграції пухлини, ITSN1-L бере на себе роль інгібітора цих процесів, що було доведено як *in vitro*, так і на моделях *in vivo* [49-51].

Таким чином, можна стверджувати, що будь-які порушення в експресії інтерсектинів провокують широкий спектр наслідків через зміну стехіометрії в макромолекулярних комплексах. Отже, подальше вивчення механізмів дії ізоформ ITSN1 під час злоякісної трансформації та індивідуального розвитку має колосальні перспективи.

### 1.1.5. Посттрансляційні модифікації ITSN

Скафолдні протеїни характеризуються модульною архітектурою з наявністю кількох протеїн/ліпід-зв'язувальних доменів, та ділянок для індукованих посттрансляційних модифікацій. Наразі виявлено, що інтерсектин може зазнавати фосфорилування та убіквітинування. Сайти фосфорилування серину, треоніну та тирозину для ITSN1 знаходяться переважно у власних неупорядкованих областях протеїнів [1].

Більшість з цих сайтів розташовані в межах міждоменних ділянок, всі виявлені фосфорильовані тирозини належать виключно доменам SH3. Фосфорилування залишків треоніну в CCR може дестабілізувати спіралі, тоді як фосфорилування залишків серину може як стабілізувати, так і дестабілізувати їх залежно від положення [9].

Також, наявні дані про протеїнові модифікації, що зазнає ITSN, зокрема убіквітинування. Так, дослідження виявили, що ізоформи ITSN1-S та ITSN1-22a можуть зазнавати одиничного та олігоубіквітинування в CCR та CTD (C-terminal domain, С-кінцевий домен) регіонах, відповідно. У випадку з ITSN1-S, дана модифікація сприятиме підвищенню стабільності протеїна, а

ITSN1-22a таким чином мітиться до протеасомної деградації. Слід зазначити, що ізоформа ITSN1-22a є негативним варіантом ITSN1 і здатна зв'язувати SH3 регіони, перешкоджаючи взаємодії інших протеїнів з ними [10].

## **1.2. Характеристика посттрансляційної модифікації SUMO**

### **1.2.1. Характеристика протеїнів родини SUMO. Біохімія сумоїлування**

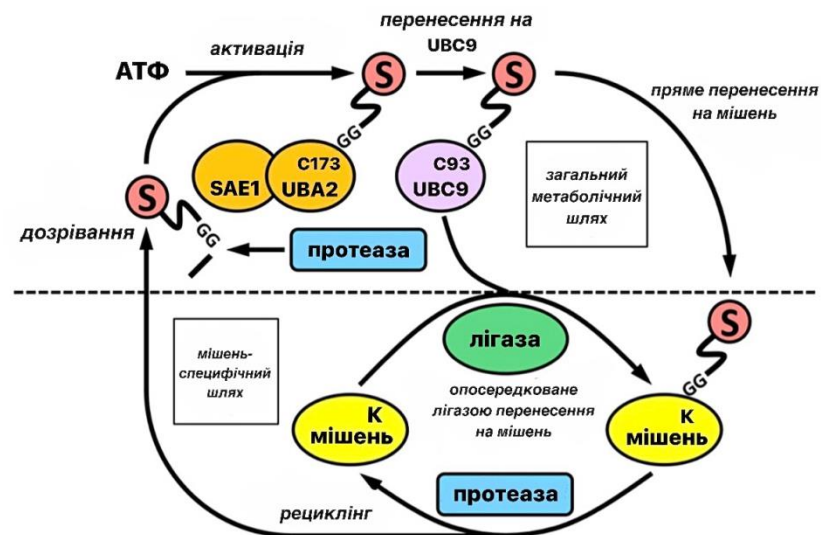
Малий убіквітиноподібний модифікатор (SUMO) – це невеликий (12 кДа) протеїн, який зустрічається в усіх еукаріотичних організмах і бере участь у оборотній посттрансляційній модифікації протеїнів. Тривимірні структури SUMO та убіквітину повністю збігаються, хоча їхні амінокислотні послідовності ідентичні лише на 18 %. Кон'югація та декон'югація убіквітину й SUMO в клітині також відбувається одним і тим самим шляхом і за участі одних і тих самих специфічних ензимів [52].

Загалом, відомо про 5 ізоформ SUMO, що експресуються в клітинах людини: SUMO 1, 2, 3, 4 та 5. До того ж, SUMO 2 та 3 практично ідентичні між собою та відрізняються один від одного лише трьома N-кінцевими залишками. Тому, досить часто вказується назва SUMO 2/3, без їхнього розділення. Разом з тим, SUMO 1 подібний їм приблизно на 45%. Незважаючи на низьку гомологію в послідовностях, SUMO 1 і SUMO 2/3 мають дуже схожі тривимірні структури [32]. SUMO 4 та 5 є найгірш вивченими ізоформами SUMO. Так, наприклад, ген, що кодує ізоформу 4, було ідентифіковано за допомогою аналізу однонуклеотидних поліморфізмів, пов'язаних з діабетом 1 типу [53].

Біохімічний процес сумоїлування протеїна тісно пов'язаний з убіквітуванням. Убіквітин і SUMO, найбільш відомі представники родини консервативних протеїнів убіквітиноподібних протеїнів, що приєднуються до

залишків Lys протеїнів-мішеней ізопептидним зв'язком [12]. Убіквітиноподібні модифікації здійснюються у три етапи та вимагають послідовної дії активувальних ензимів (E1s), кон'югвальних ферментів (E2s) і лігаз (E3s). У клітинах людини убіквітинування опосередковується двома ферментами: активаторами убіквітину E1 (приблизно 35 видів ферментів) та тими, що кон'югують убіквітин E2. Іноді, але не обов'язково, залучаються й різні убіквітинлігази E3. Убіквітиновані протеїни розпізнаються рецепторами, що містять убіквітинові домени, тоді як деубіквітази, спеціалізоване сімейство протеаз, видаляють модифікацію з протеїнів [54].

Подібним чином відбувається сумоїлування (рис. 1.4): таким самим шляхом із залученням ензимів E1, E2 і E3 [12]. SUMO синтезується як пропептид, що розщеплюється цистеїновою протеазою SENP для відкриття С-кінцевих дигліцинових мотивів [52]. Далі SUMO активується АТФ-залежним гетеродимером E1 (SAE1/SAE2) [55] і шляхом трансетерифікації передається на кон'югвальний фермент E2 (Ubc9), утворюючи тіоефірний зв'язок [52].



**Рис. 1.4.** Схематичне представлення процесу сумоїлування та десумоїлування. Адаптовано з [56]

Ubc9 самостійно або за допомогою E3-лігаз (RanBP2, Pc2, родини PIAS) формує ізопептидний зв'язок між С-кінцем SUMO та  $\epsilon$ -аміногрупою Lys цільового протеїну [55-57]. Зворотний процес десумоїлування та дозрівання SUMO здійснюють ізопептидази родин SENP, DeSI та USPL1 [35]. Варто також зазначити, що модифікація зазвичай вимагає консенсусних мотивів в амінокислотній послідовності протеїна-мішені. Найбільш поширеним є мотив  $\psi$ -K-X-E або  $\psi$ -K-X-E/D (де  $\psi$  є гідрофобною амінокислотою, K – власне Lys, X є будь-якою амінокислотою, а D/E – відповідає Asp або Glu [2], проте існують також мотиви, залежні від фосфорилування (PDSM) або негативного заряду (NDSM) [58].

### 1.2.2. Функції SUMO в клітині

SUMO-модифікація протеїнових субстратів регулює ключові клітинні процеси, включаючи транскрипцію, реплікацію ДНК, клітинний цикл, ядерно-цитоплазматичний транспорт та стабільність геному [59].

Рівень сумоїлування різко зростає у відповідь на осмотичний, тепловий, генотоксичний стреси та гіпоксію для підтримки гомеостазу [60, 61]. SUMO часто пригнічує експресію генів через модифікацію транскрипційних факторів (Elk-1, CREB, STAT-1) або залучення репресорних комплексів Daхх та HDAC [62, 63]. У процесах репарації ДНК сумоїлування тимін-ДНК-глікозилази знижує її спорідненість до субстрату, що необхідно для вивільнення ферменту [64]. Для нуклеоцитоплазматичного транспорту критичною є модифікація RanGAP1, яка забезпечує його взаємодію з комплексом ядерної пори RanBP2 [65]. Загалом SUMO-система забезпечує захист макромолекул і регуляцію генів репарації в умовах стресу [61]. Такий вплив може бути непрямим: наприклад, під дією активних форм кисню (АФО) підтримується активність кінази АТМ без безпосередньої кон'югації з SUMO [66]. АФО також регулюють активність десумоїлювальних ензимів

SEN1/2 через утворення захисних дисульфідних зв'язків [67]. Зокрема, стабілізація SEN3 під дією окисників і подальше десумоїлування протеїна p300 необхідні для індукції генів відповіді на гіпоксію [66, 68]. Хоча при тепловому стресі спостерігається накопичення SUMO-кон'югатів, точні механізми активації цього процесу або зниження активності SENP-протеаз наразі вивчаються [68].

### 1.2.3. SUMO та пов'язані з ним розлади

Дослідження показують, що експресія ферментів E1, E2 та лігаз SUMO E3 значно посилюється при багатьох видах раку [69]. Зокрема, рівень Ubc9 (E2) підвищується при аденокарциномі та раку яєчників, а PIAS3 (E3) – при прогресуванні раку легень, молочної залози, простати та колоректального раку [70, 71]. У пацієнтів із гепатоцелюлярною карциномою зафіксовано підвищену експресію SAE1/2 [52], тоді як ізопептидаза SENP2 може пригнічувати проліферацію ракових клітин [72]. Сумоїлування також відіграє роль у розвитку резистентності до ліків [73, 74] та підтримці самовідновлення пухлинних клітин. Наприклад, сумоїловані форми MAFB або Akt сприяють пухлиногенезу через регуляцію клітинного циклу, а нокдаун ферментів E1 або E2 пригнічує ці процеси [75, 76].

У серцево-судинній системі збалансований цикл сумоїлування необхідний для розвитку серця та його адаптації до стресу [77]. Збільшення Ubc9-опосередкованого сумоїлування розглядається як стратегія для посилення аутофагічного потоку при протеотоксичних патологіях, а вісь Ubc9/PML/RNF4 може стати важливою терапевтичною цілью при серцевому фіброзі [77]. Значний внесок SUMO робить у патогенез нейродегенеративних розладів, де порушення сумоїлування призводять до утворення токсичних агрегатів [78]. При хворобі Гантінгтона модифікація протеїна HTT (SUMO-1/2) за участі лігази PIAS1 посилює нейродегенерацію та інгібує

убіквітин-протеасомний шлях [79]. При хворобі Паркінсона сумоїлуванню піддаються  $\alpha$ -синуклеїн та протеїн DJ-1, який у взаємодії з PIAS бере участь у відповіді на окисний стрес [52, 80]. У випадку хвороби Альцгеймера надмірна експресія SUMO-3 та вплив SUMO-1 на накопичення  $\beta$ -секретази BACE1 модулюють утворення амілоїдних бляшок [52, 81].

Таким чином, оскільки процес сумоїлування регулює цілу низку функцій, включаючи локалізацію протеїнів, їхню стабільність та взаємодії з іншими протеїнами, дослідження асоціації ITSN1 із системою SUMO-модифікації з огляду на його скафолодну природу є важливими й значно розширюють уявлення про молекулярні механізми, що лежать в основі низки клітинних процесів, до яких залучаються інтерсектини.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1. Матеріали та реактиви

Під час роботи було використано неорганічні та органічні хімічні реактиви виробництва компаній «Sigma-Aldrich» (Німеччина), «Fluka», «Merck», «Bio-Rad» та «Thermo Fisher Scientific» (США) або реактиви українського виробництва типу «хч» і «осч».

Для культивування досліджуваних ліній клітин ссавців використано поживне середовище DMEM (модифіковане Дульбекко середовищі Ігла) в суміші з ембріональною телячою сироваткою (FBS), які отримано від компанії «Sigma-Aldrich» (Німеччина).

Молекулярні маси протеїнів аналізували використовуючи протеїновий маркер молекулярних мас «Page Ruler Prestained Protein Ladder» («Thermo Scientific», США).

Для аналізу стабільності протеїнів використано циклогексимід виробництва «Sigma» (США).

Для проведення преципітації протеїнових комплексів або вестерн-блот аналізів було використано первинні антитіла: моноклональні антитіла анти-ITSN1, анти-SUMO1, анти-SUMO2/3, анти-V5, анти-Мус, анти-Omni, що придбані в компанії «Santa-Cruz Biotechnology» (США). Анти-GFP та анти-Flag антитіла отримано у «Sigma» (США). Вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому, що специфічні до імуноглобулінів миші та кроля придбано у компанії «Promega» (США).

Для флуоресцентного аналізу також використовували вторинні антитіла проти імуноглобулінів миші, кон'юговані з TexasRed від компанії «Invitrogen» (США).

## 2.2. Біологічний матеріал

У роботі використовували еукаріотичні клітинні лінії: неінвазивну аденокарциному молочної залози MCF7 та клітини нейробластоми SH-SY5Y. Крім того, аналізували зразки тканин головного мозку, вилучені у мишей лінії BALB/c. До того ж, використовували модифіковані клітини лінії MCF7: клітини з нокаутом гена інтерсектину 1 (MCF7-KO\_*ITSN1*), а також лінії зі стабільною надекспресією його ізоформ – повсюдної короткої (MCF7-*ITSN1-S*) та специфічної (MCF7-*ITSN1-S(+VKGEW)*).

## 2.3. Культивування клітин

Умови *in vitro* підтримання життєздатності досліджуваних культур клітин передбачали використання модифікованого середовища DMEM. До нього вносили 10% ембріональної сироватки теляти та антибіотики для запобігання бактеріальній контамінації (0,25 мкг/мл стрептоміцину та 10 мкг/мл пеніциліну). Інкубацію проводили у термостаті за стандартизованих умов: температура 37°C та насичення атмосфери 5% CO<sub>2</sub>.

Процедуру пасажування здійснювали при досягненні моношаром клітин 80-90% конфлюентності. Робочий розчин середовища видаляли, моношар промивали натрій-фосфатним буфером (PBS: 150 мМ NaCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 мМ KCl, 1,8 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 7.3). Відкріплення клітин від чашки досягали шляхом їхньої інкубації у 0,05% розчині трипсину з додаванням 0,053 мМ ЕДТА впродовж 5 хв при 37°C. Після цього клітинну суспензію розводили у співвідношенні 1:10 та переносили у свіжі культуральні чашки.

## 2.4. Трансфекція клітин лінії MCF7

Трансфекцію досліджуваних клітин проводили за допомогою поліетиленіміну (ПЕІ) від «Sigma-Aldrich» (Німеччина). Процедура передбачала розчинення плазмідних векторів та ПЕІ в рівних об'ємах 150 мМ NaCl з подальшим змішуванням та інкубацією 20 хв для формування нуклеопротейдних комплексів. Отриману суміш додавали до моношару конфлюентних клітин. За 24 год культивування клітини піддавали лізису, використовуючи буферні розчини для імунопреципітації або для нанесення зразків Лемлі.

## 2.5. Отримання лізатів клітин

З чашок Петрі з моношаром досліджуваних клітин видаляли культуральне середовище та промивали натрій-фосфатним буферним розчином. Чашки без середовища одразу поміщали на крижану баню. Далі додавали 0,8-1 мл модифікованого буферного розчину для ІІ (50 мМ Трис-НСl, 1% NP-40, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин, 0,1% ДСН, 1 мМ ЕДТА, 1 мМ ФМСФ, 50 мМ N-етилmaleїмід (NEM) та коктейль інгібіторів протеаз «Roche», рН 7.5). Після лізису отриманий розчин із клітинним матеріалом збирали та переносили у мікроцентрифужні пробірки об'ємом 1,5 мл для подальшого розділення фракцій шляхом центрифугування протягом 15 хв на максимальній швидкості за умови підтримання температури 4°C. Отриману надосадову рідину акуратно переміщували у чисті 1,5 мл мікропробірки. Якщо клітини перед цим зазнавали транз'єнтної трансфекції, з надосадової рідини також відбирали аліквоту об'ємом 40 мкл у окрему пробірку аналогічної місткості та змішували її з 20 мкл буферного розчину для нанесення за Лемлі. Отриману суміш інкубували протягом 7-10 хв при температурі 95 °С для наступної перевірки якості трансфекції, за допомогою

вестерн-блот аналізу, тоді як решту лізату залишали на зберігання при  $-70^{\circ}\text{C}$  до моменту проведення процедури імунопреципітації.

## **2.6. Приготування лізатів головного мозку мишей лінії BALB/c**

Приготування лізатів досліджуваних зразків розпочинали з механічної гомогенізації 0,5 г попередньо замороженої тканини мозку миші, яку здійснювали у 5 мл буферного розчину для лізису (20 мМ Трис-НСІ, 1% NP-40, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин, коктейль інгібіторів протеаз «Roche», 0,5% DCH, 20 мМ NEM 2 мМ EDTA та 2 мМ ФМСФ, рН 7.5). Для зниження в'язкості та щільності отриманих розчинів застосовували обробку ультразвуком тривалістю 5 с. Очищення зразків від нерозчинної фракції забезпечували шляхом центрифугування протягом 20 хв за максимальної швидкості при температурі  $4^{\circ}\text{C}$ . Отриману надосадову рідину розфасовували в рівних об'ємах у чисті 1,5 мл мікропробірки та зберігали в умовах глибокого заморожування за температури  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **2.7. Імунопреципітація протеїнових комплексів**

Для проведення імунопреципітації лізати, отримані з культур еукаріотичних клітин або тканин мозку миші, попередньо розморожували на крижаній бані після чого піддавали центрифугуванню протягом 15 хв за максимальної швидкості. Далі, до підготовлених таким чином розчинів додавали 15 мкл 30% суспензії заздалегідь промитої A/G-агарози («Santa-Cruz Biotechnology», (США)) та вносили необхідні, відповідно до експерименту, антитіла у кількості 2 мкг, забезпечуючи подальшу інкубацію суміші протягом 4 год за температури  $4^{\circ}\text{C}$  в умовах постійного активного перемішування.

Після інкубації преципітовані комплекси тричі промивали

з використанням буферного розчину для імунопреципітації, де кожне осадження частинок агарози здійснювалося шляхом центрифугування при 500 g упродовж 1 хв. На завершення до отриманого осаду додавали буферний розчин для нанесення за Леммлі та витримували зразки при температурі 95°C протягом 10 хв для повної денатурації протеїнів. Готові зразки залишали на зберігання за температури -20°C до моменту проведення подальшого аналізу.

## **2.8. Обробка клітин циклогексїмідом**

Кожну лінію клітин, що досліджувалась, було висіяно на окремі 6-лункові планшети. Наступної доби, після прикріплення клітин, було здійснено транзїєнтну трансфекцію клітин плїзмїдними векторами, що кодують досліджуванї протеїни відповідно до умов експерименту. Через 24 год середовище з трансфекційною сумїшшю замїнювали на нове й до групи клітин, що були визначенї як точка 24 год, додавали циклогексїмїд у концентрації 100 мкг/мл культурального середовища. Наостанок, через добу забирали середовище з усїх досліджуваних клітин, промивали натрїй-фосфатним буферним розчином та лїзували клітини буферним розчином для нанесення проб Леммлі. Лїзати клітин було проїнкубовано за температури 95°C протягом 10 хв. Зразки зберїгали за температури -20°C до подальшого аналізу.

## **2.9. Диск-електрофорез протеїнів в ПААГ за денатуруючих умов**

Роздїлення сумїші протеїнів у денатуруючих умовах виконували методом електрофорезу, застосовуючи спеціалїзованї системи компанії «Bio-Rad» (США) згідно з фірмовими протоколами. Гелева система

складалася з двох шарів: 4% концентруючого та 7,5% або 9% розділяючого (залежно від молекулярної маси цільових протеїнів).

Для приготування розділяючого шару змішували 30% стоковий розчин акриламід/біс-акриламід (пропорція 29:1) із 1,5 М буферного розчину Трис-НСІ (рН 8.8), дистильованою водою, 0,4% ДСН та 0,1% персульфатом амонію. Концентруючий шар готували аналогічно, але на базі 0,5 М Трис-НСІ (рН 6.8). Полімеризацію ініціювали додаванням каталізатора ТЕМЕД. Розділення зразків проходило в класичному трис-гліциновому електродному буфері (25 мМ Трис-НСІ (рН 8.3), 195 мМ гліцин, 0,01% ДСН) за підтримки стабільної сили струму на рівні 36 мА на один гель [81].

## 2.10. Вестерн-блот аналіз

Після електрофоретичного розділення протеїни переносили з гелю на нітроцелюлозні мембрани. Процес мокрого переносу здійснювали в спеціалізованому буфері (25 мМ Трис-НСІ, 192 мМ гліцин, 20% метанол) за допомогою системи «Amersham Biosciences» (Швеція) при силі струму 250 мА впродовж 90 хв.

З метою мінімізації фонового неспецифічного сигналу під час детекції, мембрани блокували у 5% розчині сухого знежиреного молока, розведеного у буферному розчині TBST (20 мМ Трис-НСІ, 150 мМ NaCl, 0,1% Тритон X-100, рН 8.0). Наступним етапом була нічна інкубація з робочими розчинами первинних антитіл. Залишки незв'язаних молекул видаляли потрійним промиванням мембрани у TBST (по 4 хв кожне). Після цього слідувала інкубація протягом 40 хв з видоспецифічними вторинними антитілами та повторний цикл відмивання.

Розташування протеїнових смуг на нітроцелюлозній мембрані детектували методом посиленої хемолюмінесценції. Реакційна суміш для детекції складалася з 100 мМ Трис-НСІ (рН 8.5), що містив 0,4 мМ кумарової

кислоти, 2,5 мМ люмінолу та 0,023% пероксиду водню. Після хвилинної інкубації інтенсивність сигналу від вторинних антитіл реєстрували на приладі для детекції «Molecular Imager ChemiDoc XRS+» («BioRad», США). Денситометричний аналіз отриманих блотограм здійснювали автоматично за допомогою пакету «ImageLab» («BioRad», США) [82].

### **2.11. Повторна детекція імуноблотограм**

З метою детекції хемолюмінісцентного сигналу одних і тих самих зразків на одній імуноблотограмі й уникнення сумачії сигналів для подальшого порівняння інтенсивностей виявлених смуг після першого циклу детекції мембрану було проінкубовано в 30% розчині  $H_2O_2$  протягом 15 хв за температури 37°C. За тим мембрани було тричі промито TBST по 4 хв та повторно заблоковано в розчині 5% знежиреного молока в TBST протягом 1 год.

### **2.12. Імунофлуоресцентний аналіз**

Досліджувані клітини пересіювали на покривні скельця та здійснювали транз'єнту трансфекцію за протоколом, описаним вище. За 24 год клітини фіксували 4% розчином формальдегіду в PBS за кімнатної температури протягом 15 хв. Після цього видаляли залишки формальдегіду трикратними промиваннями розчином 0,2% Triton X-100 в PBS (буферний розчин А) протягом 5 хв кожне для перфорації клітинних мембран. Далі фіксовані клітини блокували 2% розчином бичачого сироваткового альбуміну в буферному розчині А протягом 30 хв. Потім препарати інкубували в розчині відповідних первинних антитіл протягом 1 год, тричі промивали по 5 хв буферним розчином А та додавали вторинні анти-видові антитіла, мічені

флуорохромом. Через 1 год вторинні антитіла видаляли, а препарати знову промивали за аналогічною схемою. Ядра клітин специфічно фарбувались реактивом Хьохста протягом 1,5 хв. Наостанок мікропрепарати полімеризували на предметних скельцях за допомогою гідрофільного середовища Mowiol («Sigma», США). Аналіз отриманих препаратів здійснювали на лазерному сканувальному конфокальному мікроскопі «Zeiss LSM 510 Meta» (Німеччина) з масляним об'єктивом 63x 1.40 N.A. Фотографії мікропрепаратів оброблялись за допомогою програмного забезпечення від виробника мікроскопа.

### 2.13. Статистичний аналіз

Усі числові значення, що були отримані протягом роботи, є результатами щонайменше трьох незалежних експериментів. Математичну обробку та статистичну оцінку отриманих масивів даних проводили у середовищі «MS Excel 2016» («Microsoft Corporation», США).

На першому етапі вибірки перевіряли на відповідність критеріям нормального розподілу за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Для визначення статистичної значущості розбіжностей між порівнюваними групами застосовували двовибірковий t-критерій Стьюдента. Різницю вважали статистично значущою за умови досягнення рівня  $p < 0,05$ .

На графіках результати експериментів візуалізовані у вигляді середнього арифметичного значення  $\pm$  стандартне відхилення.

## РОЗДІЛ 3

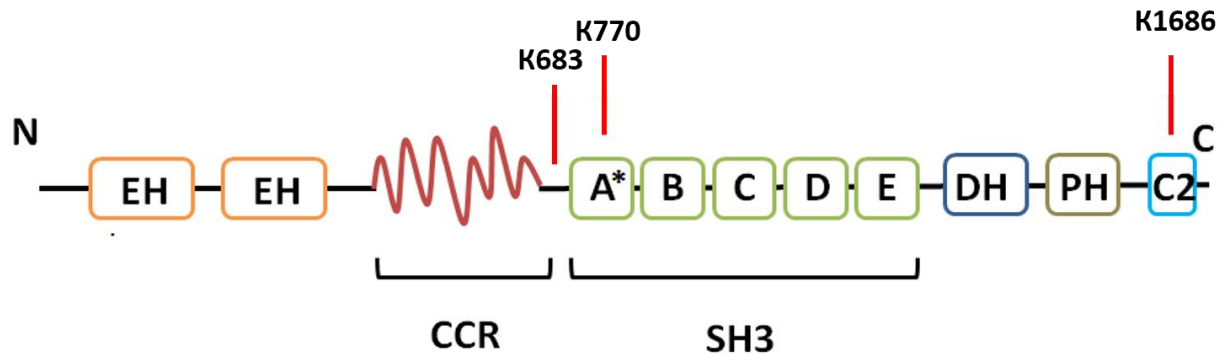
### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Виявлення сумоїльованого ITSN1 за фізіологічних та патологічних умов

Найбільш актуальними темами в дослідженні інтерсектинів як скафолдних протеїнів залишаються його субклітинна локалізація, профіль взаємодій з протеїновими партнерами та чинники, що здатні регулювати дані процеси. До чинників відносяться різноманітні посттрансляційні модифікації, зокрема SUMO-модифікація, яка, може регулювати функцію, стабільність, субклітинну локалізацію протеїнів, що залучені в проліферацію, диференціацію, інвазію, апоптоз, репарацію ДНК та інші клітинні процеси. Взаємодія між інтерсектинами та протеїнами системи SUMO-модифікації може складати складну регуляторну вісь, порушення якої лежить в основі розвитку низки патологій.

Оскільки як інтерсектини так і процес сумоїлування окремо виступають регуляторами клітинного циклу, їхня синергічна дисфункція може призводити до втрати контролю над клітинним поділом, що є фундаментальним чинником, який сприяє канцерогенезу. Також паралельно з цим, ITSNs та SUMO-модифікація беруть участь у процесах ендоцитозу та рециклінгу синаптичних везикул. Відповідно, спільні порушення цих процесів корелюють із розвитком нейродегенеративних станів та виникненням глибоких когнітивних порушень, що спостерігаються при таких патологіях, як хвороба Альцгеймера або синдром Дауна. Саме тому є важливим як з'ясування, чи може сам ITSN1 зазнавати сумоїлування, так і визначення, з огляду на його скафолдну природу через потенційну співлокалізацію та/або взаємодію з протеїнами системи SUMO-модифікації може забезпечувати сумоїлування інших клітинних протеїнів.

Раніше нами за допомогою ресурсів SUMOgo, GPS-SUMO та JASSA було проведено біоінформатичне дослідження послідовності повнорозмірної ізоформи ITSN1-L на наявність потенційних сайтів, що можуть зазнавати сумоїлування. В результаті було виявлено три потенційні сайти сумоїлування, що локалізовано в доменах SH3, C2 та в інтердоменному просторі між доменами CCR та SH3 інтерсектину 1 (рис. 3.1).



**Рис. 3.1.** Схематичне представлення передбачених сайтів сумоїлування в послідовності ITSN1-L

Встановлено, що потенційні сайти в інтердоменному просторі та домені SH3A є консенсусними, а сайт у C2-домені – залежним від фосфорилування (табл. 3.1).

Варто також зазначити, що залишок лізину в позиції 770 домену SH3-A (K770) локалізується в межах консервативної, нейронспецифічної інсерції 5 амінокислот VKGEW.

Таблиця 3.1

Залишки лізину в складі ITSN1-L, що можуть зазнавати сумоїлування

Позиція лізину	Послідовність амінокислот (підкреслено)	Тип мотиву	Домен
683	LHEEEK <u>LKREESV</u> KK	Консенсусний мотив сумоїлування	Послідовність між доменами CCR та SH3
770	PGDIVM <u>VKGEW</u> VDES	Консенсусний мотив сумоїлування	SH3A
1686	EIRVAD <u>IKKDOGS</u> KG	Мотив сумоїлування, що залежить від фосфорилування	C2

Крім сайтів сумоїлування, що передбачають безпосереднє ковалентне приєднання SUMO-протеїнів, також в амінокислотній послідовності ITSN1-L було виявлено низку мотивів, що забезпечують нековалентну взаємодію з SUMO-протеїнам, так званих SIM (SUMO-interacting motifs, мотиви взаємодії з SUMO)-мотивів (рис. 3.1).

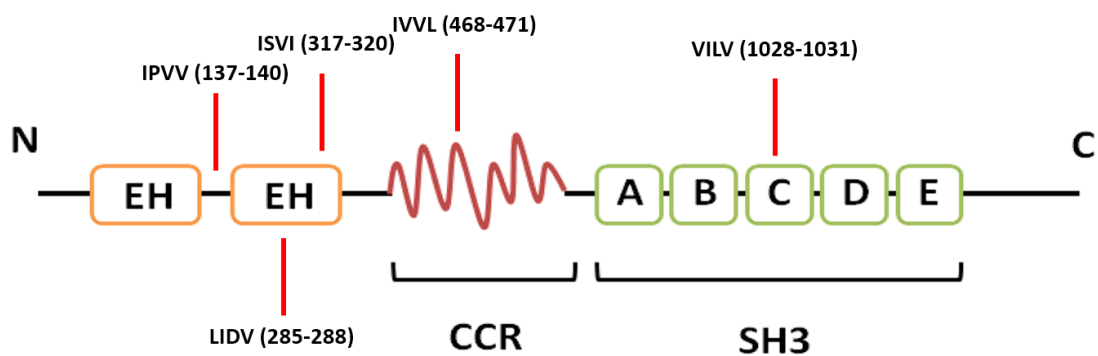


Рис. 3.2. Схематичне представлення передбачених SIM-мотивів в амінокислотній послідовності ITSN1

У послідовності ITSN1 виявлено три типи SIM-мотивів: паралельний, антипаралельний та альфа-спіральний (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

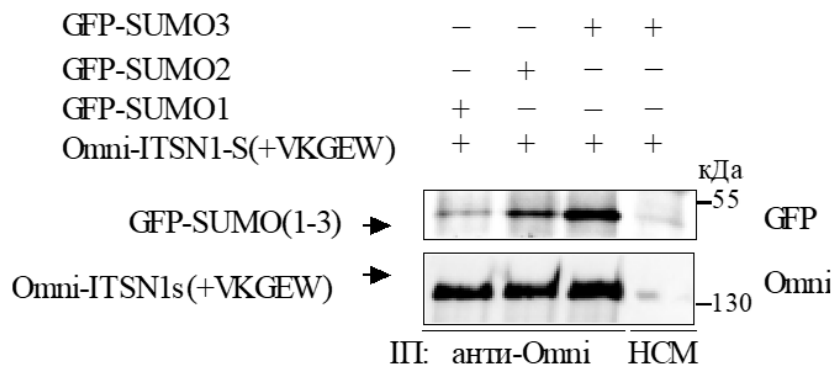
**Мотиви ITSN1, що потенційно можуть взаємодіяти з SUMO-протеїнами**

Позиція	Послідовність	Тип	Домен
137-141	APVPMGS <u>IPVVG</u> MSPTLVS	паралельний	EH
285-289	EFILAMH <u>LIDV</u> AMSGQPLP	альфа-спіральний	EH
317-321	RVRSGSG <u>ISVIS</u> STSVDQR	паралельний	EH
468-472	RNKEQED <u>IVVLK</u> AKKKTLE	антипаралельний	CCR
1028-1032	LTFQQGD <u>VILVT</u> KKDGDWW	антипаралельний	SH3C

Відомо, що паралельний та альфа-спіральний підтип SIM найчастіше виявляють підвищену спорідненість до SUMO1, оскільки містять розгалужені гідрофобні основи, фланковані кластерами негативно заряджених амінокислотних залишків, які взаємодіють із позитивно зарядженою поверхнею SUMO1. Антипаралельний підтип SIM має вищу спорідненість до SUMO2/3, що часто модифікують протеїни у вигляді полімерних ланцюгів, і наявність основи з гідрофобних амінокислот, що слідує за кластером негативно заряджених, забезпечує вибірковість взаємодії проти одиничних модифікацій протеїнів з SUMO1 [83]. Наявність різних підтипів SIM-мотивів з різною специфічністю до ізоформ SUMO дало змогу припустити, що інтерсектин 1 однаково ефективно може формувати комплекси як і з SUMO1, так і з SUMO2/3.

Варто також зазначити, що всі потенційні SIM-мотиви розташовуються виключно в межах амінокислотної послідовності короткої ізоформи інтерсектину ITSN1-S.

Результати біоінформатичного передбачення були підтверджені експериментальними даними. За допомогою ко-імунопреципітації було показано, що коротка ізоформа інтерсектину 1 утворює комплекси з рекомбінантними протеїнами SUMO1, SUMO2 та SUMO3 в клітинах лінії MCF7 (рис. 3.3).



**Рис. 3.3.** Блотограма комплексів ITSN1-S із рекомбінантними SUMO: ІІ – імунопреципітація, НСМ – нормальна сироватка миші, GFP – зелений флуоресцентний білок, Omni – таг, ITSN1-S(+VKGEW) – специфічна ізоформа ITSN1

Таким чином, з огляду на отримані результати досліджень *in silico* та *in vitro*, подальше вивчення асоціації ITSN1 із системою SUMO-модифікації є цілком обґрунтованим.

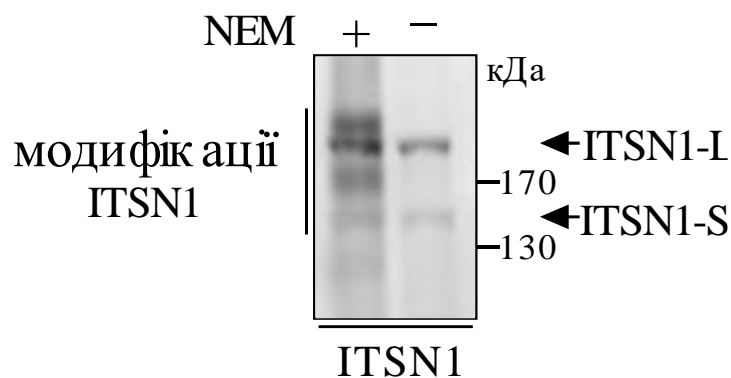
### 3.1.1. Детекція ITSN1-SUMO кон'югантів у мозку миші

Для того, щоб підтвердити результати біоінформатичного дослідження щодо можливості сумоїлування залишків лізину ITSN1 у фізіологічних умовах

в клітинах центральної нервової системи ссавців, було здійснено імунопреципітацію ендogenous протеїнів із лізату мозку миші лінії BALB/c за допомогою антитіл проти C2-домена ITSN1 (анти-C2). Як було згадано, в мозку широко експресується довга ізоформа інтерсектину ITSN1-L з інсерцією додаткових п'яти амінокислотних залишків VKGEW у SH3A-домені. Таким чином використання антитіл проти C2-домену дало змогу преципітувати довгу ізоформу інтерсектину 1, що містить усі три потенційні сайти, які можуть зазнавати сумоїлування.

Варто зазначити, що лізис тканин мозку та імунопреципітація здійснювалися в буферному розчині, що містить N-етилmaleїмід (NEM). NEM – похідне maleїнової кислоти, сполука, що здатна зв'язувати тіольну групу амінокислотного залишку цистеїну й формувати з ним тіоестерний зв'язок. Таким чином NEM є необоротним інгібітором цистеїнових протеаз, серед яких є й ензими десумоїлування родини SENP.

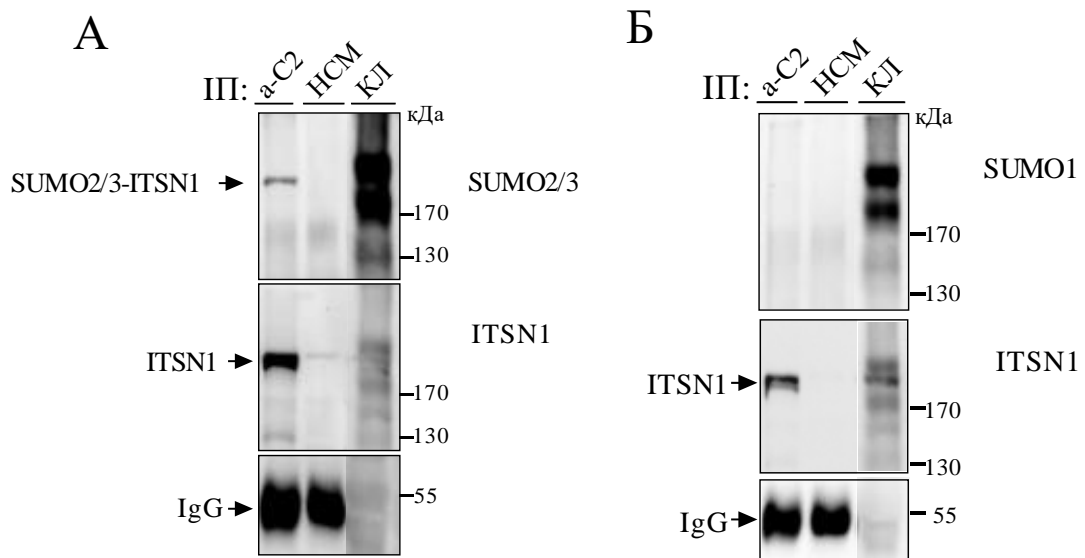
Попередньо нами було порівняно зразки лізатів мозку миші, приготовлені з використанням буферних розчинів, що відрізнялися лише наявністю NEM у їхньому складі. вестерн-блот аналіз лізатів, із застосуванням антитіл проти ITSN1, виявив відмінності у профілі та кількості детектованих смуг за умов додавання NEM (рис. 3.4).



**Рис. 3.4.** Блотограма лізатів мозку миші, приготовлених у буферних розчинах, що відрізнялись наявністю N-етилmaleїмїду (NEM) в їхньому складі: ITSN1-S – коротка ізоформа ITSN1, ITSN1-L – довга ізоформа ITSN1

Отримані результати свідчать, що пригнічення процесів десумоїлування або деубіквітування зумовлює появу різноманітних форм посттрансляційних модифікацій інтерсектину 1.

Результати подальшої імунопреципітації виявили смугу, яка може відповідати потенційній SUMO2/3 модифікації інтерсектину 1 (рис. 3.5 А). За тих самих умов кон'югатів ITSN1 з протеїном SUMO1 не було виявлено (рис. 3.5 Б).



**Рис. 3.5.** Блотограма продуктів преципітації ITSN1-L з лізатів мозку миші за допомогою антитіл проти C2-домену. Детекцію кон'югатів інтерсектину 1 з SUMO-протеїнами проводили за допомогою антитіл проти SUMO2/3 (А) або SUMO1 (Б): ІП – імунопреципітація, НСМ – нормальна сироватка миші, КЛ – клітинний лізат, α-C2 – антитіла проти C2-домену

Отже, отримані результати свідчать, що ендогенний ITSN1, ймовірно, може зазнавати сумоїлування SUMO2/3-модифікаторами за фізіологічних умов, однак ці дані потребують подальшої перевірки.

Це є важливою знахідкою, оскільки SUMO1 та SUMO2/3 модифікатори мають різну субстрат-специфічність. Класичним прикладом є GAP-фактор RanGAP1, який за фізіологічних умов модифікується переважно протеїном

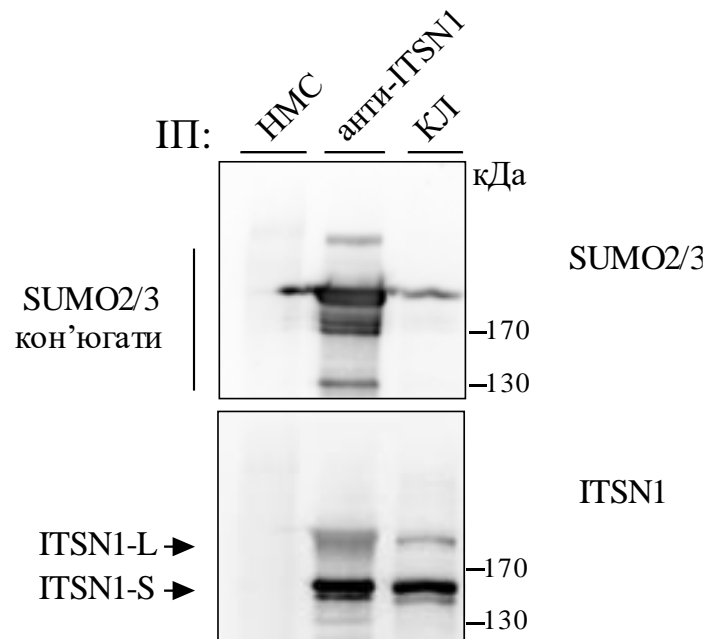
SUMO1, що є критично важливим для його локалізації в ядерних порах [84]. Натомість встановлено, що кон'югація топоізомерази II саме з SUMO2/3 здатна інгібувати нуклеазну активність ензиму, впливати на його взаємодію з іншими протеїнами, залученими в клітинний поділ і, таким чином, здійснювати тотальну регуляцію клітинного циклу [85].

### **3.1.2. Виявлення ITSN1-SUMO2/3 кон'югантів у клітинах нейробластоми лінії SH-SY5Y**

Дисрегуляція процесу сумоїлування прямо асоційована з розвитком ряду патологічних станів такими як злоякісна трансформація клітин, нейродегенеративні розлади та захворювання серцево-судинної системи. Порушення, пов'язані зі системою SUMO-модифікації, в кожному окремому випадку можуть мати різний характер і протилежний вплив: у випадку раку яєчників та РМЗ спостерігається підвищення експресії ензимів UBC9 та родини PIAS [70, 71], що сприяють процесу сумоїлування протеїнових мішеней, однак у випадку гепатоцелюлярної карциноми, навпаки, було виявлено підвищену експресію протеаз SENP, що каталізують процес десумоїлування [73].

Після того, як ми виявили ITSN1-SUMO2/3 кон'югати в клітинах центральної нервової системи миші за фізіологічних умов, нашим наступним завданням стало перевірити можливість сумоїлування ITSN1 у ракових клітинних лініях нервового походження.

Для цього ми використали лінію клітин нейробластоми людини SH-SY5Y, з лізатів яких було преципітовано ендогенні протеїни з використанням антитіл до ITSN1. Подальший вестерн-блот аналіз з використанням антитіл до SUMO2/3 та ITSN1 підтвердив можливість утворення ITSN1-SUMO2/3 кон'югантів в клітинах нейробластоми (рис. 3.6).



**Рис. 3.6.** Блотограма продуктів преципітації протеїнів антитілами проти ІТСN1 з лізатів клітин лінії SH-SY5Y: ІІІ – імунопреципітація, НМС – нормальна сироватка миші, КЛ – клітинний лізат, ІТСN1-S – коротка ізоформа ІТСN1, ІТСN1-L – довга ізоформа ІТСN1

Отже, отримані результати свідчать про існування ендогенних SUMO2/3-ІТСN1 кон'югатів у клітинах нервової системи за фізіологічних та патологічних умов.

### 3.2. Визначення специфічності модифікації ІТСN1 різними ізоформами SUMO

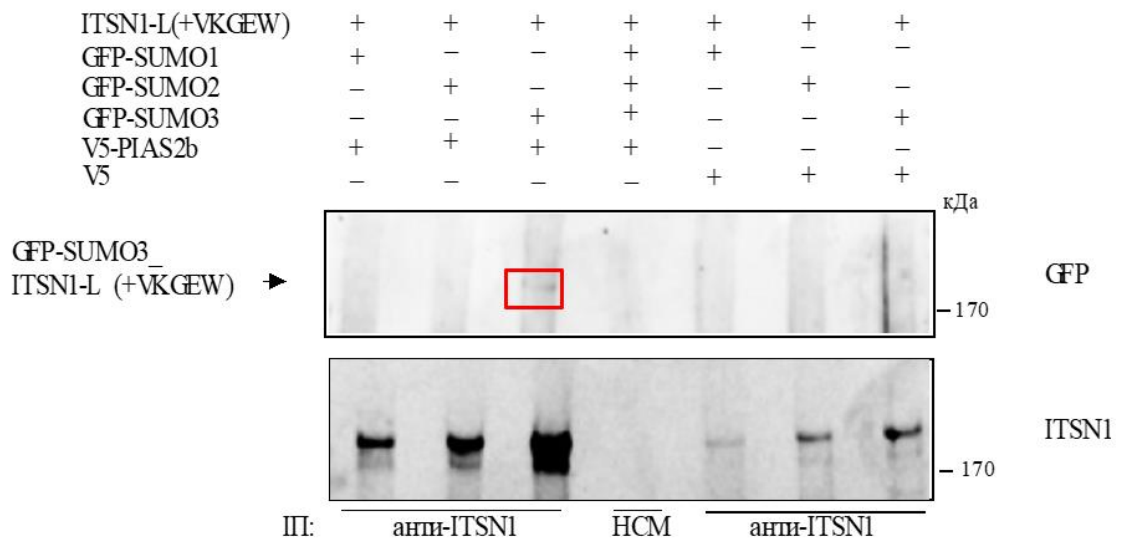
Відомо, що структури ізоформ SUMO2 та SUMO3 мають високий рівень гомології та відрізняються один від одного лише трьома N-кінцевими амінокислотними залишками, тому антитіла, які ми використовували в попередніх експериментах детектували одночасно ендогенні SUMO2- та SUMO3-кон'югати інтерсектину 1.

Однак, дані літератури свідчать, що попри таку структурну подібність, рівні експресії генів та біологічні функції обох ізоформ можуть суттєво відрізнятися між собою. Зокрема, у більшості тканин миші SUMO2 є значно поширенішою ізоформою, ніж SUMO3. Делеція гена *Sumo2* у миші призводить до загибелі ембріонів, тоді як миші без гена *Sumo3* залишаються життєздатними та фертильними [86].

Оскільки нами було встановлено, що інтерсектин 1, імовірно, може сумоїлуватися протеїнами SUMO2/3 в умовах *in vivo*, нашим наступним завданням стало ідентифікувати конкретну ізоформу SUMO з якою ITSN1 може зазнавати даної посттрансляційної модифікації.

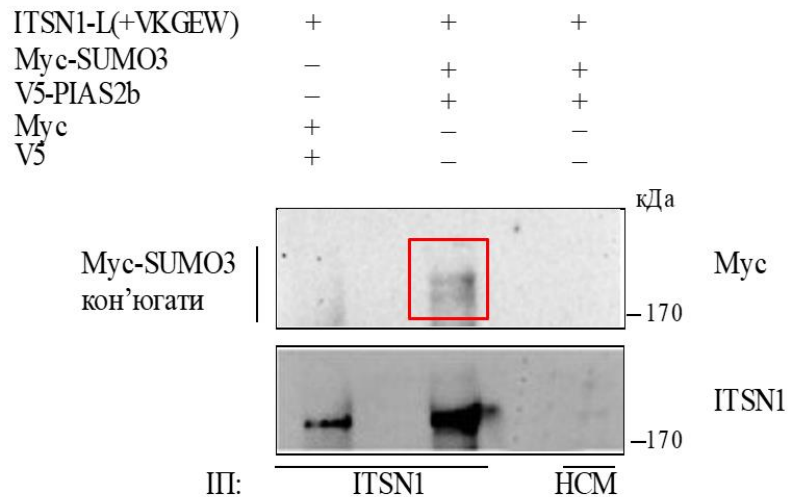
Для цього ми використали створену раніше клітинну лінію MCF7 з нокаутом гена *ITSN1* (MCF7\_KO-*ITSN1*) та рекомбінантні протеїни системи сумоїлування. Шляхом транз'єнтної трансфекції коекспресували довгу ізоформу ITSN1-L зі специфічною інсерцією 5 амінокислот VKGEW (ITSN1-L(+VKGEW)) з Omni-тагом, і протеїни SUMO1, SUMO2 та SUMO3, які були злиті з GFP-тагом. Оскільки раніше нами було показано взаємодію інтерсектину 1 з лігазою сумоїлування PIAS, яка може сприяти сумоїлуванню протеїнів, ми вирішили додатково проаналізувати її участь у цьому процесі.

Нами було використано потрібні ко-трансфекції GFP-SUMO(1-3)/Omni-ITSN/V5-PIAS та ко-трансфекції з пустим вектором V5 – GFP-SUMO(1-3)/Omni-ITSN/V5. Отримані клітинні лізати з рекомбінантними протеїнами використали для ко-імунопреципітації інтерсектину 1 за допомогою антитіл проти ITSN1. За допомогою вестерн-блот аналізу встановили, що інтерсектин 1 може зазнавати сумоїлування саме з SUMO3, а не SUMO2. До того ж, цікавим спостереженням став той факт, що ITSN1-L-SUMO3 кон'югати були виявлені тільки в умовах надекспресії лігази PIAS (рис. 3.7).



**Рис. 3.7.** Блотограма продуктів преципітації антитілами проти ITSN1 з лізатів клітин MCF7\_KO-*ITSN1* з надекспресією ITSN1-L(+VKGEW) та GFP-SUMO(1-3), з лігазою V5-PIAS2b або пустим вектором V-5: IP – імунопреципітація, HCM – нормальна сироватка миші, GFP – зелений флуоресцентний білок, ITSN1-L(+VKGEW) – специфічна ізоформа ITSN1

Даний результат було підтверджено ко-імунопреципітацією з використанням іншої генно-інженерної конструкції SUMO3, яка містить Мус-таг замість GFP, зі збереженням усіх інших умов експерименту. Вестерн-блот аналіз отриманих зразків з антитілами проти Мус та ITSN1 підтвердив можливість сумоїлування молекули ITSN1 за умов надекспресії SUMO3 та лігази PIAS в клітинах лінії MCF7. За допомогою анти-Мус антитіл було детектовано декілька смуг, які можуть відповідати потенційним ITSN1-SUMO3 кон'югатам. Це узгоджується з наявними даними про те, що модифікація протеїнів з SUMO2/3 відбувається здебільшого у вигляді полімерних ланцюгів (рис. 3.8)



**Рис. 3.8.** Блотограма продуктів преципітації ITSN1L(+VKGEW) за допомогою антитіл проти ITSN1 з лізатів клітин MCF7\_KO-*ITSN1*, що містили ITSN1-L(+VKGEW), Мус-SUMO3 та V5-PIAS2b або ITSN1-L(+VKGEW) з відповідними інтактними векторами: III – імунопреципітація, HCM – нормальна сироватка миші, V5 – вектор, Мус – таг, ITSN1-L(+VKGEW) – специфічна ізоформа ITSN1

Таким чином нами було встановлено, що саме SUMO3 виступає модифікатором молекули інтерсектину 1 у процесі сумоїлування. Також важливо підкреслити, що ефективність цього процесу може опосередковуватись E3-лігазою PIAS, яка, імовірно, виступає регуляторним ензимом, що визначає інтенсивність та спрямованість даної модифікації. Відомо, що гени, *ITSN1* і *SUMO3* розташовані в безпосередній близькості в критичній ділянці 21q22.11 21-ої хромосоми, і збільшення їх експресії призводить до патологій. Крім того, сумоїлування протеїнів асоційоване з нейродегенеративними процесами [79]. Тому отримані нами дані, а саме регуляція активності ITSN1 сумоїлуванням, дають змогу припустити участь комплексу ITSN1/SUMO3 у низці патологічних станів, зокрема когнітивних та нейродегенеративних порушень, наприклад для трисомії 21, характерної для синдрому Дауна.

### 3.3. Аналіз впливу нокауту гена *ITSN1* на сумоїлування SAM68

SUMO-модифікація, як зазначалося, досить поширений тип посттрансляційної модифікації, якої може зазнавати широке коло протеїнів клітини. Даний тип модифікації притаманний і деяким протеїновим партнерам *ITSN1*. Зокрема, до переліку встановлених раніше субстратів шляху сумоїлування належить РНК-зв'язувальний протеїн SAM68.

SAM68 – багатофункціональний РНК-зв'язувальний протеїн, що виступає ключовим регулятором альтернативного сплайсингу, транспорту РНК та клітинного циклу. Роль SAM68 у патологічних процесах добре вивчена, зокрема це стосується злоякісної трансформації клітин. Встановлено, що надерекспресія SAM68 характерна для РМЗ, раку передміхурової залози та товстої кишки, де даний протеїн сприяє виживанню пухлинних клітин, їхній проліферації та метастазуванню [87]. Крім онкології, SAM68 може бути залучений і в розвиток нейродегенеративних захворювань, оскільки його дисфункція порушує нормальний метаболізм РНК у нейронах [88].

Відомо, що *ITSN1* відіграє роль специфічного шаперона для SAM68. Взаємодія SH3-доменів *ITSN1* з пролін-збагаченими мотивами SAM68 сприяє підвищенню розчинності останнього та зумовлює дисоціацію безмембранних ядерних тілець. Такий механізм регуляції, що залучає синергічну дію *ITSN1* та мРНК, є критичним для контролю SAM68-залежного сплайсингу, пов'язаного з нейродегенеративними захворюваннями та злоякісною трансформацією клітин [89].

Встановлено, що SAM68 може зазнавати низки посттрансляційних модифікацій, зокрема модифікації з SUMO1, що впливає на його субклітинну локалізацію та активність [90].

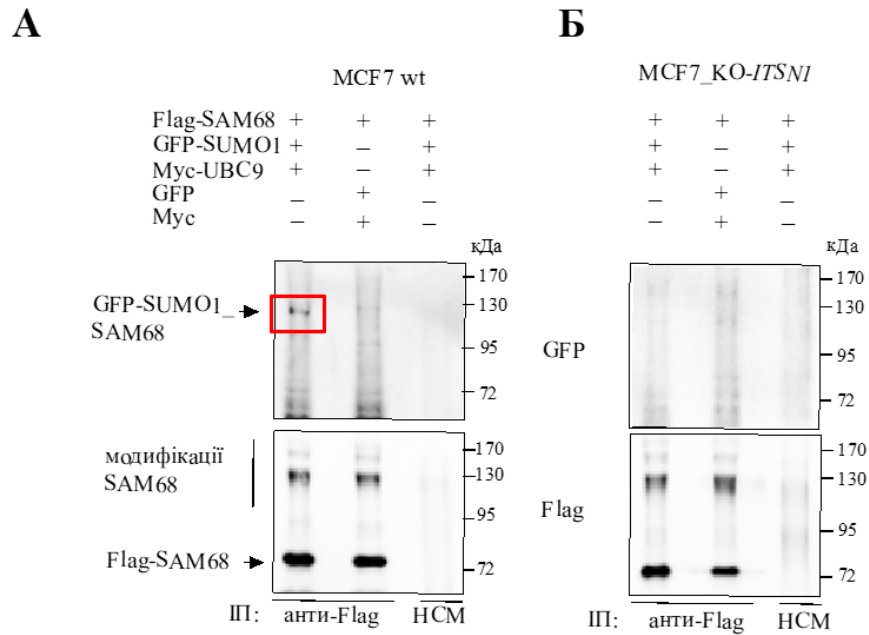
Оскільки *ITSN1* утворює комплекси із протеїнами SUMO, лігазою PIAS, UBC9 і як скафолд може збирати компоненти SUMO-модифікації, нашим

наступним завданням стало перевірити чи може інтерсектин 1 впливати на сумоїлювання SAM68.

Для аналізу впливу інтерсектину 1 на сумоїлювання SAM68 було використано клітини лінії MCF7 з нокаутом інтерсектину 1 (MCF7\_KO-*ITSN1*) та дикого типу (MCF7 wt).

Раніше у відділі було клоновано у векторах для експресії в клітинах еукаріотів послідовності повнорозмірного SAM68 із Flag-тагом, а також UBC9 із Мус-тагом. Конструкції, що кодували SAM68/UBC9/SUMO1 було експресовано в клітинах ліній MCF7 wt та MCF7\_KO-*ITSN1*. Також, у якості контролю, було експресовано конструкції SAM68 разом з інтактними векторами рEGFP та рCMV-Мус відповідно, що не містили кодуючої вставки.

Результати імунопреципітації з використанням анти-Flag антитіл та лізатів клітин MCF7 wt, що містили протеїни SAM68, UBC9 і SUMO1 та подальшим вестерн-блот аналізом антитілами проти GFP і Flag показали наявність смуги розміром приблизно 120 кДа, яка може відповідати сумоїльованому SAM68 (рис. 3.9 А). В той час за допомогою вестерн-блот аналізу преципітації з використанням анти-Flag антитіл та лізатів клітин MCF7\_KO-*ITSN1* із трансфекцією SAM68, UBC9 та SUMO1 не було детектовано подібних смуг (рис. 3.9 Б).



**Рис. 3.9.** Блотограма продуктів преципітації SAM68 антитілами проти Flag з лізатів клітин MCF7 дикого типу (А) та MCF7\_KO-ITSN1 (Б), що містили SAM68, UBC9 і SUMO1 або SAM68 разом з пустими векторами в якості контролю: ІП – імунопреципітація, HCM – нормальна сироватка миші, GFP – зелений флуоресцентний білок, Myc – таг, Flag – таг, wt – клітини MCF7 дикого типу

Отже, результати преципітації вказують що ITSN1 може впливати на сумоїлювання SAM68 в клітинах лінії MCF7. Оскільки сумоїлювання SAM68 може призводити, зокрема, до репресування експресії цикліну D1 [90], можемо припустити додатковий механізм, пов'язаний з посиленням проліферації та пригніченням апоптозу клітин РМЗ у яких знижено експресію ITSN1. Таким чином асоціація інтерсектину 1 із системою SUMO-модифікації може виступати важливим чинником у процесах регуляції клітинного циклу, забезпечуючи сумоїлювання протеїнових партнерів ITSN1, безпосередньо залучених у поділ клітин.

### 3.4. Аналіз впливу протеїнів системи SUMO-модифікації на стабільність ITSN1

Поміж широкого кола функцій, що забезпечується системою SUMO-модифікації, особливої уваги заслуговує її здатність регулювати стабільність протеїнів. Основним механізмом, що забезпечує цей ефект, є здатність SUMO виступати в ролі внутрішньомолекулярного шаперона. Завдяки високій гідрофільності та стабільності самої молекули SUMO, її кон'югація з нестабільними або схильними до агрегації протеїнами сприяє підвищенню їхньої розчинності та перешкоджає денатурації в умовах клітинного стресу. Також як і взаємодія, так і власне приєднання SUMO може індукувати конформаційні зміни, що приховують гідрофобні ділянки протеїна-мішені, тим самим запобігаючи неспецифічним протеїн-протеїновим взаємодіям і формуванню токсичних агрегатів [91]. Важливим аспектом спостережуваної стабілізації є антагоністична взаємодія між системами сумоїлування та убіквітинування. Оскільки обидва типи модифікацій часто відбуваються за одними і тими ж залишками лізину, SUMO-модифікація може фізично блокувати сайти, призначені для приєднання поліубіквітинових ланцюгів. Це, у свою чергу, захищає цільовий протеїн від розпізнавання системою 26S-протеасомної деградації, значно подовжуючи термін його напівжиття в цитоплазмі або ядрі [92].

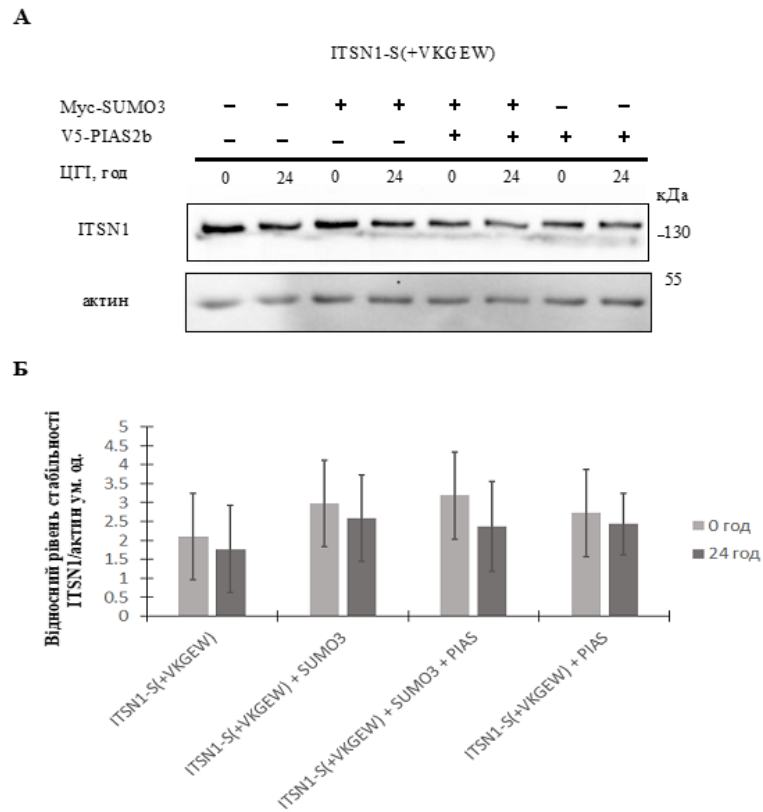
З огляду на отримані нами дані, що встановили взаємодію ITSN1 із протеїнами, які безпосередньо беруть участь у процесі сумоїлування, а також його імовірну кон'югацію з SUMO3, нами було перевірено чи здатна система SUMO-модифікації чинити стабілізуючий вплив на молекулу інтерсектину 1.

Для визначення стабільності ITSN1 нами було використано метод обробки циклогексїмдом (ЦГІ) – речовини, що повністю пригнічує трансляцію в еукаріотичних клітинах, шляхом зв'язування з 60S субодиницею рибосоми та зупиняє таким чином подовження поліпептидного ланцюга. Після обробки

ЦГІ трансляція нових протеїнів повністю припиняється, що дозволяє спостерігати за стабільністю вже існуючого пулу конкретного протеїна в часі.

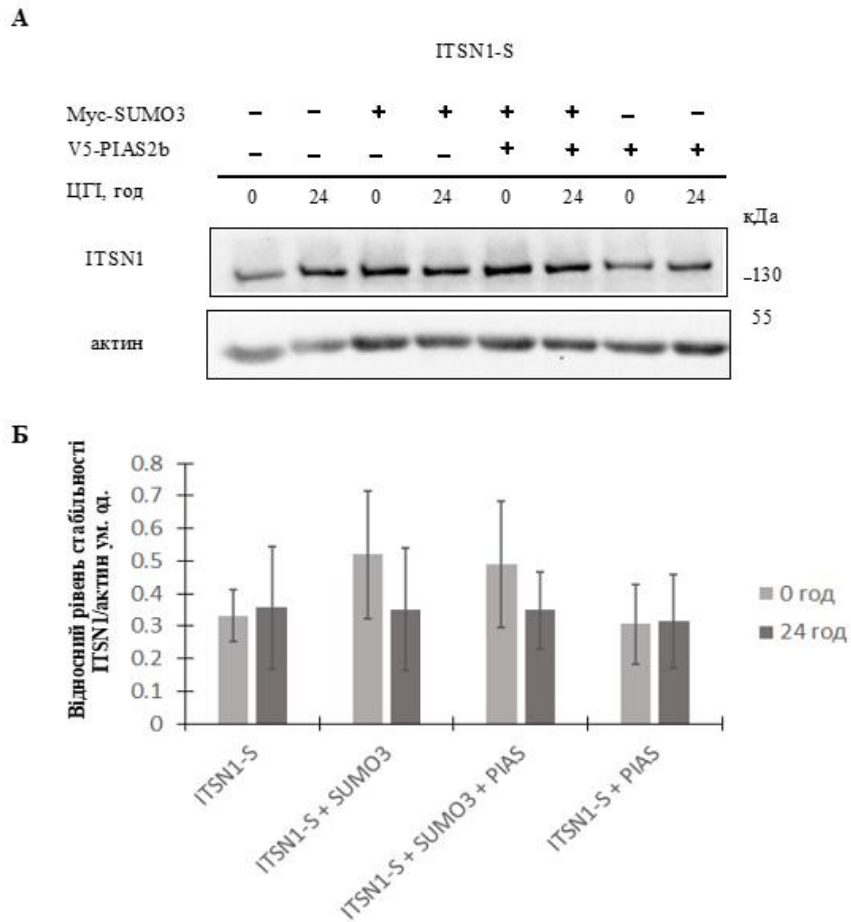
Для цього ми використали створені стабільні клітинні лінії MCF7, що експресують повсюдно поширену ізоформу (MCF7\_ITSN1-S) або специфічну MCF7\_ITSN1-S(+VKGEW). Дві групи клітин, що культивувались за стандартних умов, здійснювали транз'єнтну трансфекцію плазмідними конструкціями, що кодують гени протеїнів системи сумоїлування: SUMO3, PIAS або обома конструкціями одночасно. Через добу до культурального середовища додавали 100 мкг/мл ЦГІ й культивували протягом наступних 24 год. Лізати необроблених й оброблених ЦГІ клітин аналізували за допомогою вестерн-блот аналізу антитілами проти інтерсектину 1 та актину. Актин було обрано як контроль нанесення, оскільки він належить до протеїнів домашнього господарства та тривалий час зберігає стабільність навіть за умов обробки клітин ЦГІ. Це дозволило нормалізувати рівень інтерсектину 1 відносно загальної кількості лізату в кожному зразку.

Порівняння співвідношення інтенсивності смуг, що відповідають ITSN1 та актину в клітинах лінії MCF7\_ITSN1-S(+VKGEW), не виявило статистично значущої різниці в кількостях протеїну за умов наявності чи відсутності надекспресії SUMO3 та PIAS або їхньої ко-експресії (рис. 3.10). Цікавим є спостереження, що ITSN1-S(+VKGEW), є досить стабільним і практично не зазнає деградації за умов 24-годинної дії ЦГІ на клітини.



**Рис. 3.10.** Блотограма (А) впливу SUMO3 та PIAS2b на стабільність ITSN1-S(+VKGEW) та гістограма відносного рівня стабільності ITSN1: Мус – таг, V5 – вектор, ЦГІ – циклогексимід, ITSN1-S(+VKGEW) – специфічна ізоформа ITSN1

Для клітин лінії MCF7\_ITSN1-S спостерігалась аналогічна ситуація: надекспресія компонентів системи SUMO-модифікації не вплинула на стабільність ITSN1-S (рис. 3.11)



**Рис. 3.11.** Блотограма (А) впливу SUMO3 та PIAS2 на стабільність ITSN1-S та гістограма відносного рівня стабільності ITSN1: Мус – таг, V5 – вектор, ЦГІ – циклогексимід, ITSN1-S – коротка ізоформа ITSN1

Таким чином, надмірна експресія SUMO3 та PIAS2 не впливала на стабільність протеїнів ITSN1S та ITSN1-S(+VKGEW).

### 3.5. Аналіз впливу протеїну SUMO3 на внутрішньоклітинне розташування ITSN1

Раніше було показано, що інтерсектин 1, який переважно знаходиться на плазматичній мембрані та везикулах в цитозолі, може переміщуватися в ядро. Так, було встановлено, що взаємодія між СС-доменом ядерного ITSN1-S та NT-доменом ядерної ДНК-гелікази II безпосередньо пригнічує реплікацію та синтез ДНК, шляхом інгібування розділення R-петель у клітинах РМЗ. Цікаво, що ядерна локалізація ITSN1 корелює з кращим прогнозом для пацієнтів з РМЗ [6]. Попри це, механізми ядерного транспорту ITSN1 досі залишаються недостатньо вивченими.

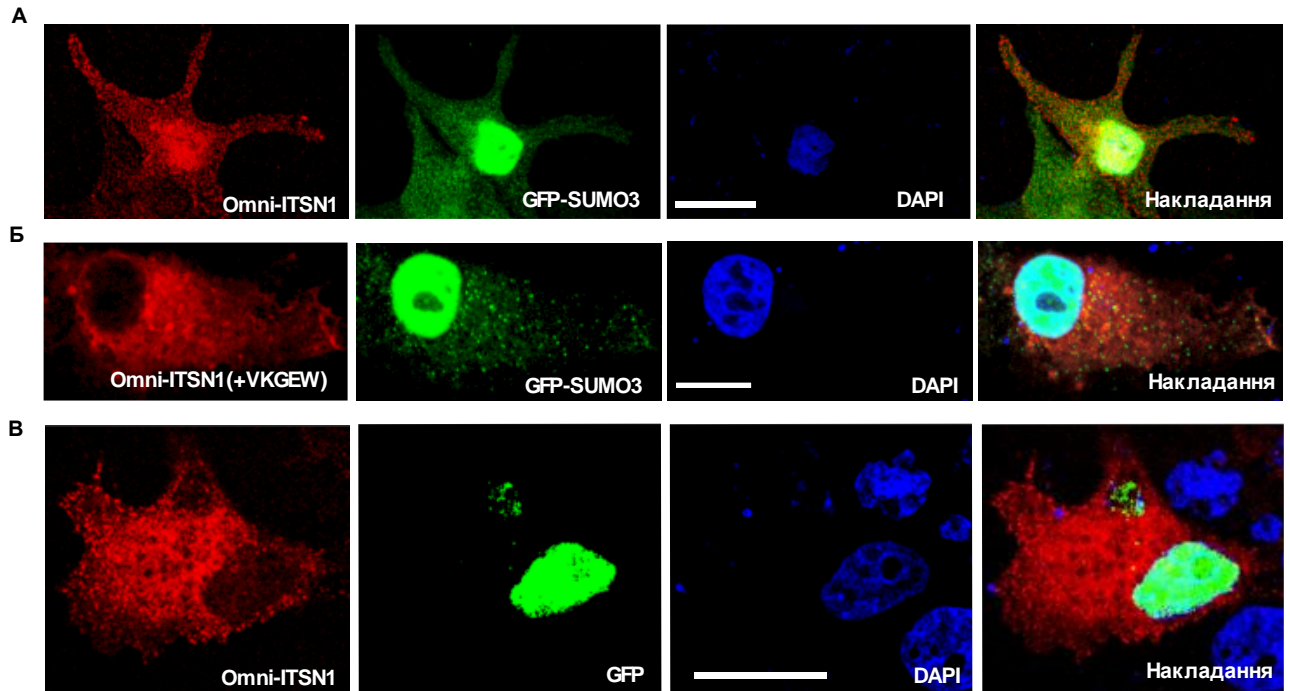
Оскільки відомо, що SUMO-модифікація протеїнів може регулювати їхню ядерно-цитоплазматичну локалізацію, а наші попередні дані свідчать, що ITSN1 може сам зазнавати сумоїлування із SUMO3 та утворювати комплекси з компонентами сумоїлування загалом, нами було проаналізовано вплив SUMO3 на ядерно-цитоплазматичне розташування ITSN1.

Модельною клітинною системою для цього експерименту були обрані клітини лінії MCF7 та дві ізоформи ITSN1 (повсюдна ізоформа (ITSN1) та специфічна ізоформа (ITSN1(+VKGEW)). Клітини були тимчасово котрансфіковано наступними плазмідними векторами, що кодували: 1) Omni-ITSN1 і GFP-SUMO3; 2) Omni-ITSN1(+VKGEW) і GFP-SUMO3; 3) Omni-ITSN1 та інтактний вектор pEGFP, що не містив кодуючої вставки.

Далі клітини фіксували, обробляли первинними (проти ITSN1) та вторинними (кон'югованими з TexasRed) антитілами та аналізували за допомогою конфокальної мікроскопії. У якості контролю використовували клітини, у яких ко-експресували Omni-ITSN1 та інтактний вектор pEGFP, що не містив кодуючої вставки.

Результати імуофлуоресцентного аналізу мікроскопічних препаратів продемонстрували значні відмінності в ядерно-цитоплазматичній локалізації ізоформ ITSN1 та ITSN1(+VKGEW) за умов надекспресії SUMO3.

Надекспресія GFP-SUMO3 сприяла ядерній локалізації ITSN1 (рис. 3.12 А), порівняно з GFP (рис. 3.12 В). Цікаво, що ITSN1(+VKGEW) за умов надекспресії SUMO3 переміщується з ядерного компартменту клітини до цитоплазми (рис. 3.12 Б).



**Рис. 3.12.** Імунофлуоресцентний аналіз впливу протеїну SUMO3 на ядерно-цитоплазматичну локалізацію ITSN1: ITSN1 (червоний), SUMO3 (зелений), ядра (сині), DAPI – барвник, GFP – зелений флуоресцентний білок, Omni – таг, ITSN1(+VKGEW) – специфічна ізоформа ITSN1. Масштабний відрізок – 20 мкм

Отже, отримані результати свідчать про те, що SUMO3 може модулювати субклітинну локалізацію ізоформ інтерсектину 1 у клітинах РМЗ. Зокрема, SUMO3, сприяє ядерному імпорту ITSN1, водночас пригнічуючи транспортування в ядро ізоформи ITSN1(+VKGEW).

Ці спостереження доцільно розглядати у контексті функціональних відмінностей між повсюдно експресованою ізоформою ITSN1 та варіантом, що містить інсерцію VKGEW. Раніше нами було показано що, надекспресія

ITSN1-S(+VKGGEW) у клітинах MCF-7 асоціювалася з підвищенням рівня маркерів епітеліально-мезенхімального переходу, зростанням швидкості клітинної міграції та посиленням активації сигнального шляху ERK порівняно з повсюдно експресованою ізоформою ITSN1. Варто також пов'язати отримані нами дані з результатами інших досліджень, які встановили, що надерекспресія SUMO2/3 та аномальна кон'югація цих ізоформ із низкою протеїнів характерна для інвазивних клітин РМЗ та сприяє суттєвому підвищенню метастатичного потенціалу клітин РМЗ загалом [93].

З огляду на те, що ядерна локалізація ITSN1 корелює з більш сприятливим прогнозом у пацієнтів з раком молочної залози, а інсерція VKGGEW у SH3A-домени ITSN1 відповідає консенсусному сайту сумоїлування, сукупність отриманих даних дозволяє припустити синергічну роль альтернативного сплайсингу пре-мРНК *ITSN1* та SUMO-залежної посттрансляційної модифікації в регуляції функцій інтерсектину 1, що може бути пов'язано з розвитком патологічних станів.

## ВИСНОВКИ

Таким чином, у роботі було вперше проаналізовано функціональні наслідки утворення макромолекулярних комплексів між скафолдним протеїном ITSN1 та компонентами системи SUMO-модифікації.

1. Встановлено можливість SUMO2/3-опосередкованого сумоїлування ендogenous ITSN1 за фізіологічних (у клітинах центральної нервової системи миші) та патологічних (у клітинах лінії нейробластоми SH-SY5Y) умов.

2. Визначено, що SUMO3 є основним модифікатором серед SUMO1, SUMO2 та SUMO3 для сумоїлування ITSN1.

3. З'ясовано, що ITSN1 може залучатися в процес сумоїлування РНК-зв'язувального протеїна SAM68.

4. Показано, що компоненти системи SUMO-модифікації не впливають на стабільність ITSN1 за умов тотального пригнічення трансляції.

5. Визначено, що надекспресія SUMO3 сприяє ядерній локалізації повсюдно поширеної ізоформи ITSN1 та цитоплазматичній ретенції специфічної ізоформи ITSN1(+VKGEW) у клітинах лінії MCF7.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Tsyba, L., Nikolaienko, O., Dergai, O., Dergai, M., Novokhatska, O. and Skrypkinia, I. (2011). Intersectin multidomain adaptor proteins: Regulation of functional diversity. *Gene*, 473(2), pp. 67–75.
2. Herrero-Garcia, E. and O’Bryan, J. (2017). Intersectin scaffold proteins and their role in cell signaling and endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.*, 1864(1), pp. 23–30.
3. Das, M., Scappini, E., Martin, N.P., Wong, K.A., Dunn, S., Chen, Y.-J., Miller, S.L.H., Domin, J. and O’Bryan, J.P. (2007). Regulation of Neuron Survival through an Intersectin-Phosphoinositide 3’-Kinase C2 $\beta$ -AKT Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 27(22), pp. 7906–7917.
4. Jakob, B., Kochlamazashvili, G., Jäpel, M., Gauhar, A., Bock, H.H. and Maritzen, T. (2017). Intersectin 1 is a component of the Reelin pathway to regulate neuronal migration and synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 114, pp. 5533–5538.
5. Xie, C., Xiong, W., Li, J., Wang, X., Xu, C. and Yang, L. (2019). Intersectin 1 (ITSN1) identified by comprehensive bioinformatic analysis and experimental validation as a key candidate biological target in breast cancer. *Oncotargets and Therapy*, Volume 12, pp. 7079–7093.
6. Zhang, H., Guo, Z., Liu, X., Zhao, Y., Chen, Y., Zhang, M., Fu, L., Gu, F. and Ma, Y. (2021). Endocytic protein intersectin1-S shuttles into nucleus to suppress the DNA replication in breast cancer. *Cell Death and Disease*, 12(10), pp. 9–22.
7. Martínez-Cué, C. and Rueda, N. (2020). Signalling Pathways Implicated in Alzheimer’s Disease Neurodegeneration in Individuals with and without Down Syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] Volume 21(18), pp. 6906. Available at: [10.3390/ijms21186906](https://doi.org/10.3390/ijms21186906) [Accessed 3 Feb. 2020].
8. Pucharcos, C., Casas, C., Nadal, M., Estivill, X. and de la Luna, S. (2001). The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed. *Biochim. Biophys. Acta – Gene Struct. Expr.*, 1521(1–3), pp. 1–11.

9. Kropyvko, S., Gubar, O., Gryaznova, T., Morderer, D., Gerasymchuk, D. and Syvak, L. (2016). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the adaptor/scaffold protein gene *ITSN1*. *Biopolym. Cell*, 32(3), pp. 203–221.
10. Dergai O., Dergai M. and Rynditch A. (2018). Ubiquitin-ligase AIP4 controls differential ubiquitination and stability of isoforms of the scaffold protein *ITSN1*. *FEBS Letters*, 592, pp. 2259–2267.
11. Huang, C.H., Yang, T.T. and Lin, K.I. (2024). Mechanisms and functions of SUMOylation in health and disease: a review focusing on immune cells. *Journal of Biomedical Science*, [online] Volume 31(1), p. 16. Available at: doi: 10.1186/s12929-024-01003-y [Accessed 27 Jan. 2024].
12. Wilson, V. (2017). Introduction to Sumoylation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 963, pp. 1–12.
13. Chen, X., Zhang, Y. and Wang, Q. (2021). The function of SUMOylation and its crucial roles in the development of neurological diseases. *The FASEB Journal*, [online] Volume 35, p. e21510. Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.202002702R> [Accessed 1 Apr. 2021].
14. Lee, J., Choi, H. and Baek, S. (2017). Sumoylation and Its Contribution to Cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 963, pp. 283–298.
15. Matthew, C. G., Jesse, G. Z., and Wendell, A. L. (2011). Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information. *Science*, 332, pp. 680–686.
16. Kovermann, M., Weininger, U. and Löw, C. (2021). Completing the family of human Eps15 homology domains: Solution structure of the internal Eps15 homology domain of  $\gamma$ -synergin. *Protein Science*, 31(4), pp. 811–821.
17. Malagrino, F., Troilo, F., Bonetti, D., Toto, A. and Gianni, S. (2019). Mapping the allosteric network within a SH3 domain. *Sci Rep.*, 9(1), pp. 1–6.
18. Niloufar M, and Ahmadian, M. R. (2021). The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling. *Cells*, Volume 10(7), pp. 18–31.

19. Li, X., Gao, M., He, Y., Xiong, B., Liu, H. and Gu, L. (2019). Intersectin-Cdc42 interaction is required for orderly meiosis in porcine oocytes. *J. Cell Physiol.*, 234(5), pp. 7492–7497.
20. Pruitt, W., Karnoub, A., Rakauskas, A., Guipponi, M., Antonarakis, S. and Kurakin, A. (2003). Role of the pleckstrin homology domain in intersectin-L Dbl homology domain activation of Cdc42 and signaling. *Biochim Biophys Acta – Mol. Cell Res.*, 1640(1), pp. 61–68.
21. Tsyba, L., Skrypkina, I., Rynditch, A. and Nikolaienko, O. (2004). Alternative splicing of mammalian Intersectin 1: domain associations and tissue specificities. *Genomics*, 84(1), pp.106–113.
22. Tsyba, L., Gryaznova, T., Dergai, O., Dergai, M., Skrypkina, I., Kropyvko, S., Boldyryev, O., Nikolaienko, O., Novokhatska, O. and Rynditch, A. (2008). Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(4), pp. 929–934.
23. Kropyvko, S. (2015). Interactome of invadopodia scaffold protein TKS5. *Biopolymers and Cell*, 31(6), pp. 417–421.
24. Wong, A., Wilson, J., Russo, A., Wang, L., Okur, M.N. and Wang, X. (2012). Intersectin (ITSN) family of scaffolds function as molecular hubs in protein interaction networks. *PLoS One*, 7(4), pp. 1–9.
25. Rópolo, S., Feliziani, C. and Touz, M. (2019). Unusual proteins in *Giardia duodenalis* and their role in survival. *Advances in parasitology*, 106, pp. 1–50.
26. Gubar, O., Morderer, D., Tsyba, L., Croisé, P., Houy, S. and Ory, S. (2013). Intersectin: The crossroad between vesicle exocytosis and endocytosis. *Front Endocrinol.*, 4, pp. 1–6.
27. Wu, X., Zhao, X., Puertollano, R., Bonifacino, J., Eisenberg, E. and Green L. (2003). Adaptor and Clathrin Exchange at the Plasma Membrane and trans-Golgi Network. *Mol. Biol. Cell*, 14, pp. 516–528.

28. Ahmad, K. and Lim, W. (2010). The minimal autoinhibited unit of the guanine nucleotide exchange factor intersectin. *PLoS One*, 5(6), pp. 123–128.
29. Das, M., Scappini, E., Martin, N., Wong, K., Dunn, S., Chen, Y.-J., Miller, S., Domin, J. and O'Bryan, J. (2007). Regulation of Neuron Survival through an Intersectin-Phosphoinositide 3'-Kinase C2 $\beta$ -AKT Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 27(22), pp. 7906–7917.
30. Yan, E. and Maffucci, T. (2022). An Overview of Class II Phosphoinositide 3-Kinases. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 436, pp. 51–68.
31. Khan, I., Koide, A., Zuberi, M., Ketavarapu, G., Denbaum, E., Teng, K., Rhett, M., Spencer-Smith, R., Hobbs, A., Camp, E., Koide, S. and O'Bryan, J.P. (2022). Identification of the nucleotide-free state as a therapeutic vulnerability for inhibition of selected oncogenic RAS mutants. *Cell Reports*, 38(6), pp. 110322–110322.
32. Liu, S., Chen, S. and Zeng, J. (2017). TGF- $\beta$  signaling: A complex role in tumorigenesis (Review). *Molecular Medicine Reports*, 17(1), pp. 699–704.
33. Bardita, C., Predescu, D., Sha, F., Patel, M., Balaji, G. and Predescu, S. (2015). Endocytic deficiency induced by intersectin-1s knockdown alters the Smad2/3-ERK1/2 signaling balance downstream of Alk5. *Journal of cell science*, Volume 128(8), pp. 1528–1541.
34. Hao, Y., Baker, D. and ten Dijke, P. (2019). TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), pp. 27–67.
35. Wang, S. and Hung, M. (2009). Nuclear Translocation of the EGFR family Membrane Tyrosine Kinase Receptors. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(21), pp. 6484–6489.
36. Martin, N.P., Mohny, R.P., Dunn, S., Das, M., Scappini, E. and O'Bryan, J.P. (2006). Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling. *Mol. Pharmacol.*, 70, pp. 1643–1653.

37. Liu, S.-L., Wang, Z.-G., Hu, Y., Xin, Y., Singaram, I. and Gorai, S. (2018). Quantitative lipid imaging reveals a new signaling function of phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate: isoform- and site-specific activation of Akt. *Mol. Cell*, 71, pp. 1092–1104.
38. Mintoo, M., Rajagopalan V. and O'Bryan J. (2024). Intersectin – many facets of a scaffold protein. *Biochem. Soc. Trans.*, 52 (1), pp. 1–13.
39. Jossin, Y. (2020). Reelin functions, mechanisms of action and signaling pathways during brain development and maturation. *Biomolecules*, 10(6), p.964.
40. Doehner, J. and Knuesel, I. (2010). Reelin-mediated signaling during normal and pathological forms of aging. *Aging Dis.*, 1, pp. 12–29.
41. Wasser, C.R. and Herz, J. (2017). Reelin: neurodevelopmental architect and homeostatic regulator of excitatory synapses. *J. Biol. Chem.* 292, pp. 1330–1338.
42. Hunter, M., Russo, A. and O'Bryan J. (2013). Emerging roles for intersectin (ITSN) in regulating signaling and disease pathways. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(4), pp. 7829–7852.
43. Morfini, G., Burns, M., Binder, L., Kanaan, N., Lapointe, N. and Bosco, D. (2009). Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J. Neurosci.*, 29(41), pp. 12776–12786.
44. Van der Crabben, S., van Binsbergen, E., Ausems, M., Poot, M., Bierings, M. and Buijs, A. (2010). Constitutional RUNX1 deletion presenting as non-syndromic thrombocytopenia with myelodysplasia: 21q22 ITSN1 as a candidate gene in mental retardation. *Leuk. Res.*, 34(1), p. 8.
45. Rafii, M., Kleschevnikov, A., Sawa, M. and Mobley, W. (2019). Down syndrome, *Handbook of Clinical Neurology*, [online], p. 321. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00017-0> [Accessed 15 Feb. 2019].
46. Hunter, M., Nelson, M., Kurzer, M., Wang, X., Kryscio, R. and Head, E. (2011). Intersectin 1 contributes to phenotypes in vivo: Implications for Down's syndrome. *Neuroreport*, 22(15), pp. 767–772.

47. Manupati, K., Hao, M., Li S., Maharjan, S. and Guan JL. (2025). Novel Metastasis Suppressor PI3KC2 $\beta$  Is Mediated by mTORC1 Signaling in Breast Cancer. *Mol. Cancer Res.*, 23(9), pp. 765–778.
48. Jeganathan, N., Predescu, D., Zhang, J., Sha, F., Bardita, C., Patel, M., Wood, S., Borgia, J.A., Balk, R.A. and Predescu, S. (2016). Rac1-mediated cytoskeleton rearrangements induced by intersectin-1s deficiency promotes lung cancer cell proliferation, migration and metastasis. *Molecular Cancer*, [online] Volume 15(1), p. 59. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0543-1> [Accessed 10 Feb. 2016].
49. Gu, F., Zhang, H., Qin, F., Liu, X., Li, W., Fu, L., Ying, G., Li, B., Zhang, M. and Ma, Y. (2015). Intersectin1-s, A multidomain adapter protein, Is essential for malignant glioma proliferation. *GLIA*, 63(9), pp.1595–1605.
50. Shao, Y., Chong, W., Liu, X., Xu, Y., Zhang, H., Xu, Q., Guo, Z., Zhao, Y., Zhang, M., Ma, Y. and Gu, F. (2019). Alternative splicing-derived intersectin1-L and intersectin1-S exert opposite function in glioma progression. *Cell Death & Disease*, [online] Volume 10(6), p. 431. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1668-0> [Accessed 10 Feb. 2019].
51. Dergai M., Skrypkina I., Dergai Ol., Tsyba L., Novokhatska, O., Filonenko, V., Drobot, L. and Rynditch, A. (2011). Identification and characterization of a novel mammalian isoform of the endocytic adaptor ITSN1. *Gene*, 485, pp. 120–129.
52. Hee, J. P., and Dae-Jin, Y. (2013). New Insights into the Role of the Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) in Plants. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 300, pp. 161–209.
53. Yanfang, Y., Yu, H., Xixi, W., Ziwei, l., Gu, H., Peng, Z., Hongxia, Z., Ningzhi, X. and Shufang, L. (2017). Protein SUMOylation modification and its associations with disease. *Open Biology*, [online] Volume 7(10), 170167. Available at: <https://doi.org/10.1098/rsob.170167> [Accessed 1 Oct. 2017].
54. Guo, D., Li, M., Zhang, Y., Yang, P., Eckenrode, S., Hopkins, D., Zheng, W., Purohit, S., Podolsky, R., Muir, A., Wang, J. and Dong, Z. (2004). A functional

- variant of SUMO4, a new I $\kappa$ B $\alpha$  modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nature Genetics*, 36(8), pp. 837–841.
55. Swatek, K. and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res*, 26, pp. 399–422.
56. Nieves, L., Vahid, J. and García-Domínguez, M. (2022). Cancer-Associated Dysregulation of Sumo Regulators: Proteases and Ligases. *Int. J. Mol. Sci*, [online] Volume 23(14), 8012. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23148012> [Accessed 1 Jul. 2022].
57. Sarge, K. and Park-Sarge, O. (2009). Sumoylation and human disease pathogenesis. *Trends Biochem. Sci*, 34, pp. 200–205.
58. Zahra, S., Figueiredo, M., Hleihil, M., Gill, R., Bosshard, G., R McKinney, A. and Tyagarajan S. (2022). Trophic factor BDNF inhibits GABAergic signaling by facilitating dendritic enrichment of SUMO E3 ligase PIAS3 and altering gephyrin scaffold. *J. Biol. Chem.*, [online] Volume 298(5), 101840. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101840> [Accessed 1 May. 2022].
59. Trulsson, F. and Vertegaal, A. (2022). Site-specific proteomic strategies to identify ubiquitin and SUMO modifications: Challenges and opportunities. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 132, pp. 97–108.
60. Hong-Yeoul, R., Seong, H. and Hochstrasser, M. (2020). SUMO and cellular adaptive mechanisms. *Exp. Mol. Med.*, 52(6), pp. 931–939.
61. Yin, R., Song, J., Esquela-Kerscher, A. and Kerscher, O. (2021). Detection of Rapidly Accumulating Stress-Induced SUMO in Prostate Cancer Cells by a Fluorescent SUMO Biosensor. *Mol. Carcinog*, 60(12), pp. 886–897.
62. Jorrit, M. (2015). Sumo and the cellular stress response. *Cell Division*, [online] Volume 10, p. 4. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13008-015-0010-1> [Accessed 1 Jun. 2015].
63. Thiel, G., Backes, T., Guethlein, L. and Rössler, O. (2021). Critical Protein-Protein Interactions Determine the Biological Activity of Elk-1, a Master Regulator of Stimulus-Induced Gene Transcription. *Molecules*, [online] Volume

- 26(20), p. 6125. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules26206125> [Accessed 11 Oct. 2021].
64. Yuan-Dong, C., Jiang-Yan, L., Yan-Min, L., Hai-Tao, Z., Wei, T., Qiu-Xia, W. and Hong-Yan, L. (2017). Functional roles of C/EBP $\alpha$  and SUMO-modification in lung development. *Int. J. Mol. Med.*, 40(4), pp. 1037–1046.
65. Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. and Schär, P. (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *The EMBO Journal*, 21, pp. 1456–1464.
66. Vertegeal, A. (2022). Signalling mechanisms and cellular functions of SUMO. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 23, pp. 715–731.
67. Stankovic-Valentin, N., Drzewicka, K., Konig, C., Schiebel, E. and Melchior, F. (2016). Redox regulation of SUMO enzymes is required for ATM activity and survival in oxidative stress. *The EMBO Journal*, 35, pp. 1312–1329.
68. Xu, Z., Lam, L. S., Lam, L. H., Chau, S. F., Ng, T. B. and Au, S. W. (2008). Molecular basis of the redox regulation of SUMO proteases: a protective mechanism of intermolecular disulfide linkage against irreversible sulfhydryl oxidation. *FASEB Journal*, 22(1), pp. 127–137.
69. Shan, Y., Xuxu, S., Binggang, X., Hui, C., Xunlei, K., Yuying, C., Hui, L., Guiying, S., Yeh, Edward, T., Beilei, W., Xiangrui, W. and Jing, Y. (2010). Redox regulation of the stability of the SUMO protease SENP3 via interactions with CHIP and Hsp90. *EMBO Journal*, 29(22), pp. 3773–3786.
70. Pintoa, M., Carvalho, A., GrouaJosé, C., Rodríguez-Borgesb, E., Sá-Mirandaa, C. and Azevedo, J. (2012). Heat shock induces a massive but differential inactivation of SUMO-specific proteases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1823(10), pp. 1958–1960.
71. Seeler, J. and Dejean, A. (2017). SUMO and the robustness of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, Volume 17(3), pp. 184–197.
72. Bellail, A., Olson, J. and Hao, C. (2014). SUMO1 modification stabilizes CDK6 protein and drives the cell cycle and glioblastoma progression. *Nat. Commun.*

- [online] Volume 5, p. 4234. Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms5234> [Accessed 23 Jun. 2014].
73. Jiang, Q., Tian, Y., Shen, Q., Xue, H. and Li, K. (2014). SENP2 regulated the stability of beta-catenin through WWOX in hepatocellular carcinoma cell. *Tumor Biol.*, 35, pp. 9677–9682.
  74. Qin, Y., Bao, H., Pan, Y., Yin, M., Liu, Y., Wu, S. and Li, H. (2014). SUMOylation alterations are associated with multidrug resistance in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep*, 9(3), pp. 877–881.
  75. Yang, L., Zhang, X., Xie, Y., Sun, X., Zhao, R. and Huang, Q. (2016). SUMOylated MAFB promotes colorectal cancer tumorigenesis. *Oncotarget*, 7, pp. 83488–83501.
  76. Li, R., Wei, J., Jiang, C., Liu, D., Deng, L., Zhang, K. and Wang, P. (2013). Akt SUMOylation regulates cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Res.*, 73(18), pp. 5742–5753.
  77. Da Silva-Ferrada, E., Ribeiro-Rodrigues, T., Rodriguez, M. and Girao, H. (2016). Proteostasis and SUMO in the heart. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 79, pp. 443–450.
  78. Martins, W., Tasca, C. and Cimarosti, H. (2016). Battling alzheimer's disease: targeting SUMOylation-mediated pathways. *Neurochem. Res.*, 41, pp. 568–578.
  79. Ochaba, J., Monteys, A., O'Rourke, J., Reidling, J., Steffan, J., Davidson, B. and Thompson, L. (2016). PIAS1 regulates mutant huntingtin accumulation and Huntington's disease-associated phenotypes in vivo. *Neuron*, 90(3), pp. 507–520.
  80. de Souza, A., Prediger, R. and Cimarosti, H. (2016). SUMO-regulated mitochondrial function in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 137(5), pp. 673–686.
  81. Yun, S. (2013). SUMO1 modulates Abeta generation via BACE1 accumulation. *Neurobiol. Aging*, 34(3), pp. 650–662.
  82. *A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection* (no date) *Bio-Rad Laboratories*. Available at: <https://www.bio->

rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\_6040.pdf [Accessed: 04 December 2024].

83. Hecker, C., Rabiller, M., Haglund, K., Bayer, P. and Dikic I. (2006). Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs. *J Biol Chem.*, 281(23), pp. 16117–16127.
84. Matunis, M., Wu, J. and Blobel G. (1998). SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol.*, 140(3), pp. 499–509.
85. Pandey, N., Keifenheim, D., Yoshida, M. and Clarke, D. (2020). Topoisomerase II SUMOylation activates a metaphase checkpoint via Haspin and Aurora B kinases. *J Cell Biol.* [online] 219(1), e201807189. Available at: 10.1083/jcb.201807189 [Accessed 6 Jan. 2020].
86. Wang, L., Wansleben, C., Zhao, S., Miao, P., Paschen, W. and Yang W. (2014). SUMO2 is essential while SUMO3 is dispensable for mouse embryonic development. *EMBO Rep.*, 15(8), pp. 878–85.
87. Khudhair, M., Mohammed, N. and Zabibah, R. (2023). Validating Sam68 expression and protein level in breast cancer. *J Med Life*, 16(7), pp. 1136–1139.
88. Vogel, G. and Richard, S. (2012). Emerging roles for Sam68 in adipogenesis and neuronal development. *RNA Biol.*, 9(9), pp. 1129–1133.
89. Pankivskyi, S., Pastré, D., Steiner, E., Joshi, V., Rynditch, A. and Hamon L. (2021). ITSN1 regulates SAM68 solubility through SH3 domain interactions with SAM68 proline-rich motifs. *Cell Mol Life Sci.*, 78(4), pp. 1745–1763.
90. Babic, I., Cherry, E. and Fujita, D. (2006). SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis. *Oncogene*, 25(36), pp. 4955–4964.
91. Steffan, J., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E. and Marsh, J. (2004). SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science*, 304(5667), pp. 100–104.
92. Desterro, J., Rodriguez, M. and Hay, R. (1998). SUMO-1 modification of IkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell.*, 2(2), pp. 233–239.

93. Subramonian, D., Raghunayakula, S., Olsen, J., Beningo, K., Paschen, W. and Zhang, X. (2014). Analysis of changes in SUMO-2/3 modification during breast cancer progression and metastasis. *J Proteome Res.*, 13(9), pp. 3905–3918.