

УДК 577.22

НОВІ ВЗАЄМОДІЇ СКАФОЛДНОГО БІЛКА ІНВАДОПОДІЙ TKS5 З БІЛКАМИ ПЕРЕБУДОВИ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТУ, ЕНДО-/ЕКЗОЦИТОЗУ ТА РЕМОДЕЛЮВАННЯ КЛІТИННОЇ МЕМБРАНИ

Я. М. НЕМЕШ, С. В. КРОПИВКО

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
 Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
 e-mail: yariknemesh@gmail.com

Мета. TKS5 — скафолдний білок, основною функцією якого є ініціація формування злякнісними клітинами інвадоподій в процесі інвазії. Вивчення TKS5 та інших ключових компонентів інвадоподій дозволить у майбутньому краще зрозуміти молекулярну основу канцерогенезу, а також визначити основні мішені протиракової терапії. Проте залишається відкритим питання про функції TKS5 у нормально функціонуючих клітинах організму. Тому ми вирішили перевірити його взаємодію з білками, які беруть участь у сигнальній трансдукції: PLC γ 1, SRC, CRK, CSK; ремоделюванні мембрани та ендо-/екзоцитозі: AMPH1, BIN1, CIN85, ITSN1 та ITSN2; та перебудовах актинового цитоскелету: CTTN. **Методи.** Білок-білкові взаємодії ідентифікували за допомогою методу GST Pull-down. **Результати.** Ми дослідили, що SH3-домени TKS5 взаємодіють з CIN85, та ідентифікували взаємодію TKS5 з SH3-доменами CTTN, ITSN1, ITSN2, AMPH1 та BIN1. **Висновки.** TKS5 взаємодіє з CIN85, CTTN, ITSN1 та ITSN2, AMPH1 та BIN1, що беруть участь у ремоделюванні мембрани, ендо-/екзоцитозі та перебудові актинового цитоскелету.

Ключові слова: TKS5, скафолдні білки, актиновий цитоскелет, плазматична мембрана.

Вступ. Клітинна інвазія відіграє центральну роль у різних біологічних явищах та є основою онкологічного росту та метастазування (Orient et al., 2011; Courtneidge, 2012). Подосоми та інвадоподії — це спеціалізовані мембранні структури, що представлені у клітинах з фізіологічною чи патологічною інвазивною поведінкою та локалізуються на вентральній поверхні клітини (Linder, 2009). Вони забезпечують клітинно-субстратну адгезію, викликають деградацію компонентів позаклітинного матриксу і таким чином забезпечують міграцію та інвазію клітин в оточуючі тканини (Courtneidge, 2012).

Скафолдні білки є важливими компонентами сигнальних каскадів клітини (Flynn, 2001; Orient et al., 2011). TKS5 — скафолдний білок, який складається з одного PX, п'яти SH3-доменів, пролін-збагачених мотивів і трьох сайтів фосфорилування SRC-кіназою. TKS5 критично необхідний для формування інвадоподій та подосом (Courtneidge, 2012). Він бере участь у процесі полімеризації актину та формуванні вгвинів мембрани, взаємодіє з мембранними металопротеїназами, які спричиняють деградацію позаклітинного матриксу (Linder, 2009; Courtneidge, 2012). Крім того, цей білок впливає на продукцію клітиною активних форм кисню. Перелічені процеси взаємопов'язані та необхідні для формування інвадоподій та подосом (Weaver, 2011; Diaz et al., 2011; Courtneidge, 2012).

Подальше вивчення ключових компонентів інвадоподій та подосом дозволить у майбутньому краще зрозуміти молекулярну основу канцерогенезу, а також визначити основні мішені протиракової терапії (Courtneidge, 2012). Проте залишається відкритим питання про функції TKS5 у нормально функціонуючих клітинах організму.

Тому для перевірки взаємодії ми обрали білки, які беруть участь у сигнальній трансдукції: PLCg1, SRC, CRK, CSK; ремодельованні плазматичної мембрани: AMPH1 (амфіфізін 1), BIN1 (Bridging integrator 1/амфіфізін 2); ендо-/екзоцитозі: CIN85, ITSN1 (інтерсектин 1), ITSN2 (інтерсектин 2); та перебудові актинового цитоскелету: CTTN (кортактин).

Матеріали і методи

Експресія рекомбінантних GST-злитих білків в клітинах бактерій та приготування лізатів. Рекомбінантні домени TKS5 GST-SH3(1-5), ITSN1 та ITSN2 SH3A-E, nSRC (нейрональний SRC), SRC, PLCg1, GRB2, CRK, AMPH1, BIN1, CTTN та CSK були отримані з бактеріальних лізатів *E. coli* TOP10A, що були трансформовані відповідними конструкціями та індуквані за стандартним протоколом фірми «Amersham Biosciences».

Антитіла. Моноклональні anti-Myc (9E10, sc-40) («Santa Cruz Biotechnology», США), anti-Flag (клон M2) антитіла («Sigma», США), anti-CIN85 антитіла, anti-TKS5 антитіла люб'язно надані Л. Б. Дробот та В. В. Філоненко. Вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому anti-mouse та anti-rabbit («Promega», США).

Клітинні лінії та трансфекція. Клітини лінії MDA-MB-231 були культивовані у стандартному ростовому середовищі (DMEM), що було доповнене 10 % бичачим сироватковим альбуміном, 50 од/мл пеніциліном та 100 мг/мл стрептоміцином. Клітини були транз'єнтно трансфіковані за допомогою PEI (поліетиленімін) («Sigma», США), як зазначено в інструкції виробника, та культивувалися 24 год.

GST pull-down та Western blot аналізу. Рекомбінантні GST-злиті SH3-домени були отримані з лізатів бактеріальних клітин *Escherichia coli* Top10A та афінноочищені за допомогою глутатіон-сефарози 4B (GE Healthcare) згідно інструкції виробника. Лізати транз'єнтно трансфікованих клітин MDA-MB-231 були отримані екстракцією в буфері, що містив 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM фенілметилсульфонілфлуорид (PMSF) та коктейль інгібіторів протеаз («Roche»). Лізат еукаріотичних клітин центрифугували 10 хв при 12 000 g при +4 °C. Для Pull-down експериментів, 5–10 мкг GST або GST-злитих доменів кон'югували з 30 мкг 50 % кульок глутатіон-сефарози 4B та інкубували з клітинним лізатом протягом 1 год при +4 °C. Кульки екстенсивно промивали та кип'ятили у буфері Леммлі. Білки розділяли за

допомогою ДСН-ПААГ, після чого переносили на нітроцелюлозну мембрану («Bio-Rad»), блокуючи вільні від білків ділянки 5 % знежиреним молоком. Мембрани інкубували з первинними антитілами протягом 1 год, після чого промивали та інкубували з вторинними видоспецифічними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому протягом 40 хв. Імунореактивні ділянки детектували ECL (enhanced chemiluminescence) реагентом. Візуалізацію здійснювали на приладі Molecular Imager ChemiDoc™ XRS + («Bio-Rad»).

Результати та обговорення

За допомогою методу GST Pull-down перевіряли *in vitro* взаємодію SH3-доменів обраних білків з TKS5. Для аналізу ми вибрали білки, які залучені до трансдукції клітинного сигналу: SRC, PLCg1, CRK, CSK; білки, які беруть участь у процесах, пов'язаних з ремодельованням плазматичної мембрани та ендо-/екзоцитозі: AMPH1, BIN1, CIN85, ITSN1 та ITSN2; а також білок, який залучений до реорганізації актинового цитоскелету: CTTN.

Рекомбінантні GST-злиті SH3-домени іммобілізували на глутатіон-сефарозі та інкубували з лізатами клітин MDA-MB-231 з надекспресованим TKS5. У якості негативного контролю для оцінки чистоти зв'язування використовували GST. Кількість GST-злитих SH3-доменів та GST детектували фарбуванням Кумассі. Преципітовані білки детектували Вестерн-блот аналізом.

TKS5 — ключовий білок інвадоподій, оскільки ініціює їх формування. Було показано, що за відсутності TKS5 інвадоподії не утворюються, оскільки ініціація їх утворення відбувається шляхом залучення TKS5 до плазматичної мембрани та збірки білкових комплексів, що сприяють перебудові актинового цитоскелету, утворенню вигину плазматичної мембрани та розщепленню позаклітинного матриксу (Кропивко, 2015). Тому ми вирішили перевірити взаємодію TKS5 з білками, що залучені до ремодельовання плазматичної мембрани та реорганізації актинового цитоскелету. Оскільки TKS5 може взаємодіяти із фосфоінзитидами, що залучені до передачі сигналу, ми вирішили також визначити наявність взаємодії TKS5 з білками клітинного сигналіngu.

У результаті було виявлено, що TKS5 взаємодіє з SH3-доменами CTTN, AMPH1 та BIN1 (Рис. 1). У цьому експерименті в якості позитивного контролю використовували GRB2, з яким вже була відома взаємодія з TKS5 (Oikawa et al., 2008).

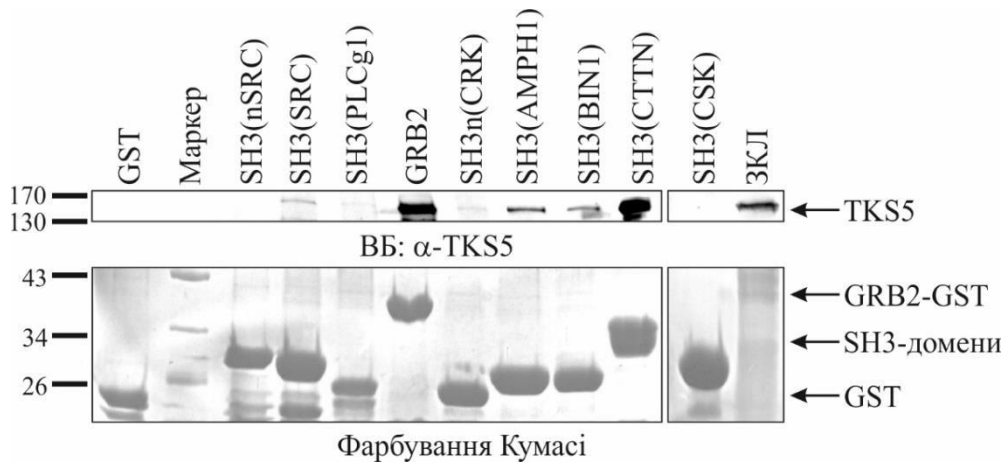


Рис. 1. Перевірка взаємодії SH3-доменів SRC, nSRC, PLCg1, CRK, CSK, AMPH1, BIN1, CTTN та білком GRB2 з надекспресованим TKS5. 3КЛ — загальний клітинний лізат. ВБ — вестерн блот.

В інших дослідженнях було показано колокалізацію TKS5 та CTTN під час утворення інвадоподій, проте Stylli et al. не виявили взаємодію TKS5 та CTTN методом імунопреципітації, хоча необхідно відмітити, що під час досліду використовувалася клітинна лінія 293Т, що не відзначається високою інвазивністю (Stylli et al., 2009; Murphy, Courtneidge, 2011; Sharma et al., 2013).

Кортактин (CTTN) — актин-зв'язуючий білок, який бере участь у таких процесах, як регуляція перебудов актинового цитоскелету, везикулярний транспорт та ендоцитоз, формування подосом і ламеллоподій, управлінні розташування аксонів та поляризацією нейронів. Кортактин також бере участь в утворенні метастаз пухлин і в клітинній інвазії (Kirkbride et al., 2011).

Отже, беручи до уваги вище перелічені факти, ми припускаємо, що взаємодія між CTTN та TKS5 може реалізуватися саме під час формування інвадоподій у злоскісних клітинах агресивних видів ракових пухлин.

Амфіфізини (AMPH1 та AMPH2/BIN1) опосередковують формування клатринобламованих ділянок під час ендоцитозу та сприяють створенню ліпідної трубки між мембраною та новоствореною везикулою. Амфіфізини можуть виступати у ролі скафолдних білків для регуляторів актинового цитоскелету, щоб об'єднати їх з білками ендоцитозу для забезпечення інтерналізації новосформованої везикули (Quiñones, Oro, 2010).

Було відмічено високу концентрацію амфіфізину 1 (AMPH1) у нервових закінченнях та його ключову роль в ендоцитозі синаптичних везикул (Wu et al., 2009; Chen et al., 2018). Не-

щодавно Chen et al. виявили збільшення експресії *AMPH1* у тканинах раку молочної залози порівняно з нормою, також вони ідентифікували наявність AMPH1 у клітинних лініях раку молочної залози: MDA-MB-231 та MCF-7. Отримані дані свідчать, що AMPH1 виконує важливу роль під час розвитку раку та виконує функції, що не пов'язані з рециклінгом синаптичних везикул нейронів (Chen et al., 2018).

AMPH1 відіграє важливу роль у супресії росту ракових клітин, оскільки під час нокауту гену *AMPH1* спостерігалася підвищена проліферація клітин та виживання. За відсутності AMPH1 клітини MDA-MB-231 та MCF-7 набули здатності до активної міграції, що може свідчити про потенційну антиміграційну функцію AMPH1 у клітинах раку молочної залози (Chen et al., 2018).

Амфіфізин 2 (AMPH2/BIN1) є регулятором багатьох клітинних функцій: ендоцитозу і рециклінгу мембран, регуляції цитоскелету, репарації ДНК, клітинного циклу та апоптозу. BIN1 приймає участь у розвитку раку, деяких міопатій, серцевої недостатності, хвороби Альцгеймера (Prokic et al., 2014).

У результаті GST Pull-down аналізу ми виявили взаємодію SH3-доменів AMPH1 та BIN1 з TKS5. Дана взаємодія свідчить про потенційну участь TKS5 в ендоцитозі, оскільки амфіфізини відіграють важливу роль у цьому процесі. TKS5 — ключовий білок інвадоподій, структур плазматичної мембрани, які забезпечують міграцію та інвазію ракових клітин. Отже, можливо, амфіфізини виступають регуляторами TKS5 шляхом взаємодії з його проліновими мотива-

ми, що запобігає зв'язуванню TKS5 з плазматичною мембраною і подальшій ініціації. Іншим можливим механізмом є взаємодія амфіфізінів з TKS5 після його зв'язування з мембраною, що перешкоджає залученню інших партнерів до білкового комплексу, який необхідний для ініціації утворення інвадоподій. Можливо, саме за таким механізмом за відсутності AMPH1 у ракових клітинах молочної залози збільшується рівень міграції.

Інтерсектини (ITSN1 та ITSN2) — еволюційно консервативні адаптерні білки з унікальною багатодоменною структурою. Взаємодіючи з великою кількістю білків, вони збирають багатокомпонентні комплекси, які беруть участь у перебудовах актинового цитоскелету, беруть участь у клатрин- та кавеолінопосередкованому ендоцитозі, утворенні дендритних шипиків, передачі клітинного сигналу, поляризації, життєздатності й апоптозі клітини. Адаптерна функція інтерсектинів була досліджена в різних типах клітин та різних організмах. Було виявлено, що інтерсектини є невід'ємною частиною клатриноблямованих везикул (Tsyba et al., 2011). Більшість описаних у ссавців транскриптів *ITSN1* мають дві ізоформи: коротку *ITSN1-S*, що ек-

пресується у всіх тканинах організму, та нейронспецифічну довгу *ITSN-L* (Tsyba et al., 2004). Альтернативний сплайсинг 20 екзону *ITSN1*, що кодує VKGEW амінокислоти SH3A-домени, відбувається лише у нейронах (Tsyba et al., 2004). До того ж під час нейрогенезу кількість сплайс-варіантів з включенням 20 екзону збільшується порівняно з сплайс-варіантом, у якому відсутній 20-й екзон (Tsyba et al., 2008).

Інтерсектини відіграють важливу роль у нормальному функціонуванні клітин, проте також беруть участь у канцерогенезі, зокрема *ITSN1* є необхідним для розвитку нейробластоми (Russo, O'Bryan, 2012).

Взаємодію між SH3-доменами *ITSN1* та скафолдним білком інвадоподій TKS5 перевіряли за допомогою GST Pull-down аналізу. Для цього використовували рекомбінантні GST-злиті SH3-домени *ITSN1* та лізати клітин MDA-MB-231 з надекспресованим TKS5. У результаті експерименту було виявлено взаємодію TKS5 з нейронспецифічною формою SH3A-домени *ITSN1* (SH3An), що містить додаткові амінокислоти у результаті альтернативного сплайсингу 20 екзону (Рис. 2А).

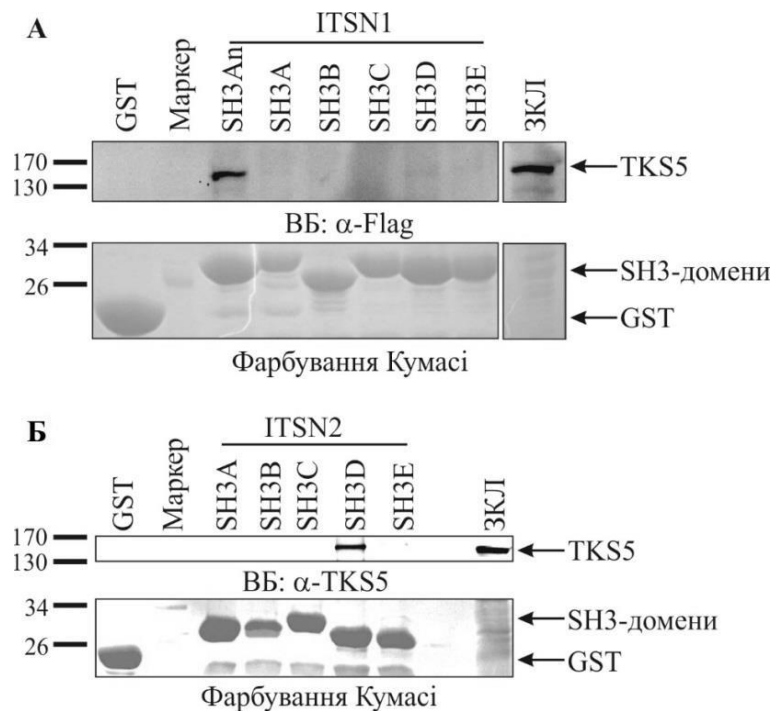


Рис. 2. Перевірка взаємодії SH3-доменив *ITSN1* (А) та *ITSN2* (Б) з надекспресованим TKS5. ЗКЛ — загальний клітинний лізат. ВБ — вестерн блот.

Варто відзначити, що для нейронів людини характерні дві специфічні ізоформи: коротка ізоформа ITSN1-S та довга ізоформа ITSN1-L, котра має у своєму складі додаткові домени: DH, PH та C2, які відповідно забезпечують активацію Cdc42 ГТФази, приєднання до фосфоінозитидів та Ca-залежне/незалежне приєднання до фосфоліпідів; окрім цього, для обох ізоформ можливий сплайсинг 20 екзону в SH3A-домени, що забезпечує специфічність взаємодії з білками партнерами ITSN1 (Tsyba et al., 2011). Було виявлено, що ITSN1-L бере участь у формуванні дендритних шипиків шляхом активації Cdc42. До того ж GEF-активність ITSN1-L є важливою для реорганізації актинового цитоскелету, що необхідно для екзоцитозу у нейроендокринних клітинах. Зменшення ендogenous рівня ITSN1 з використанням міРНК припиняло активацію Cdc42, що призводило до припинення секреції гормону росту. Тому було запропоновано вважати ITSN1-L адаптером, що координує екзо-/ендоцитозний мембранний трафік (Tsyba et al., 2011). Під час нейрогенезу кількість ізоформи ITSN1 з 20-м екзоном збільшується (Tsyba et al., 2011). Також було показано участь ITSN1 у формуванні нейробластоми — злоякісної пухлини, що походить з клітин нервового гребня (Russo, O'Byrne, 2012). Цікавим є те, що TKS5 є необхідним білком для правильної міграції клітин нервового гребеня та ембріогенезу (Murphy et al., 2011).

Отже, беручи до уваги наведені факти, можна припустити важливу роль взаємодії TKS5 та ITSN1 у нейробластах під час ембріогенезу. Також дана взаємодія може пояснювати механізм канцерогенезу нейробластоми, оскільки TKS5 — ключовий білок інвадоподій, що є необхідними для міграції та інвазії ракових клітин, а ITSN1 має нейронспецифічні ізоформи, які можуть забезпечувати як передачу сигналу про виживання у клітину, так і збирати білкові комплекси, необхідні для розвитку нейробластоми.

Взаємодія між нейронспецифічною ізоформою ITSN1 та TKS5 потребує подальшого вивчення.

Після серії GST Pull-down експериментів також було продемонстровано взаємодію TKS5 з SH3D-доменом другого представника цієї родини — ITSN2, функції якого в більшості дублюють ITSN1 (Рис. 2Б). ITSN2 — широко розповсюджений білок і не характеризується особливою тканинною специфічністю. Він бере участь у клатринопосередкованому ендоцитозі (Pucharcos et al., 2000), тому взаємодія TKS5 з SH3D-доменом ITSN2 ще раз підтверджує участь TKS5 в ендоцитозі.

Варто відзначити, що TKS5 — перший виявлений партнер родини ITSN, який взаємодіє виключно з нейронспецифічною ізоформою SH3A-домени ITSN1 та другий після верпроліна CR16, який взаємодіє з різними доменами ITSN1 та ITSN2.

CIN85 — ще один з адаптерних білків ссавців, який завдяки своїй доменній структурі слугує багатоцільовою платформою для білкових комплексів. CIN85 експресується у всіх тканинах, але у сім'яниках, серці та лімфоцитах знаходяться тканино-специфічні ізоформи.

Було виявлено, що короткочасна взаємодія CIN85 з білками родини Cbl є необхідною для ініціації ендоцитозної інтерналізації декількох типів активованих RTK (рецепторних тирозинкіназ), наприклад EGFRs (epidermal growth factor receptors). CIN85 сполучає комплекс активованих RTK-Cbl з білками ендоцитозу: ендоефілінами A1, A2 та A3, що сприяє подальшому утворенню облямованих ділянок/везикул. CIN85 був знайдений у ламелоподіях та філоподіях, мембранних структурах, що сприяють міграції та адгезії клітин (Navgyllov et al., 2010).

Для перевірки взаємодії TKS5 з адаптерним білком CIN85 використовували лізати еукаріотичних клітин лінії MDA-MB-231 з ендogenous CIN85. У результаті було виявлено взаємодію CIN85 з другим SH3-доменом TKS5 (рис. 3).

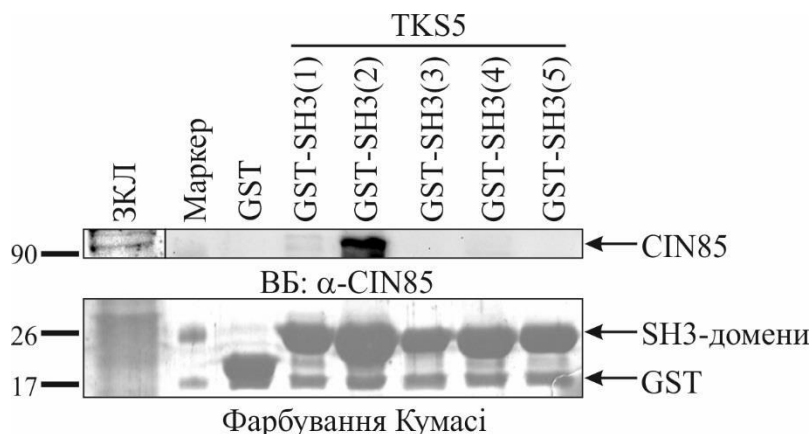


Рис. 3. Перевірка взаємодії SH3-доменив TKS5 з ендogenous CIN85. ЗКЛ — загальний клітинний лізат. ВБ — вестерн блот.

Ця взаємодія ще раз вказує на потенційну участь TKS5 в ендозитозі, оскільки нами була виявлена взаємодія TKS5 з білками родини інтерсектинів (ITSN1 та ITSN2) та амфіфізінів (AMPH1 та BIN1), які беруть участь в цьому процесі. Крім того, CIN85, ITSN1 та ITSN2 також залучені до таких клітинних процесів, як трансдукція клітинного сигналу, реорганізація актинового цитоскелету та інші. Взаємодія цих білків з TKS5 може вказувати на участь останнього у перелічених клітинних процесах як в нормі так і при паталогічних станах. Варто відзначити, що участь TKS5 в ендозитозі та ремоделюванні мембрани є новими функціями для TKS5.

Висновки

Отже, у результаті проведеної роботи виявлена взаємодія TKS5 з CTTN, що свідчить про потенційну роль скафолдного білка TKS5 у реорганізації актинового цитоскелету. Також виявлена взаємодія TKS5 з ITSN1, ITSN2, CIN85 та з родиною амфіфізінів (AMPH1 та BIN1), що вказує на участь TKS5 в ендозитозі та ремоделюванні клітинної мембрани.

Перелік літератури

1. Chen Y., Liu L., Li L., Xia H., Lin Z., Zhong T. AMPH-1 is critical for breast cancer progression. *Journal of Cancer*. 2018. Vol. 9, № 12. P. 2175–2182. doi: 10.7150/jca.25428.
2. Courtneidge S. A. Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins. *Biochemical Society Transactions*. 2012. Vol. 40, № 1. P. 129–132. doi: 10.1042/BST20110685.
3. Diaz B., Shani G., Pass I., Anderson D., Quintavalle M., Courtneidge S. A. Tks5-dependent, nox-

mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Science Signaling*. 2011. Vol. 2, № 88, ra53. doi: 10.1126/scisignal.2000368.

4. Flynn D. C. Adaptor proteins. *Oncogene*. 2001. Vol. 20, № 44. P. 6270–6272. doi: 10.1038/sj.onc.1204769.
5. Havrylov S., Redowicz M. J., Buchman V. L. Emerging roles of Ruk/CIN85 in vesicle-mediated transport, adhesion, migration and malignancy. *Traffic*. 2010. Vol. 11, № 6. P. 721–731. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01061.x.
6. Kirkbride K., Sung B., Sinha S., Weaver A. M. Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adhesion and Migration*. 2011. Vol. 5, № 2. P. 187–198.
7. Krovyvko S. V. Interactome of invadopodia scaffold protein TKS5. *Biopolymers and cell*. 2015. Vol. 31, № 6. P. 417–421. doi: 10.7124/bc.0008FE.
8. Linder S. Invadosomes at a glance. *Journal of Cell Science*. 2009. Vol. 122, № 17. P. 3009–3013. doi: 10.1242/jcs.032631.
9. Murphy D. A., Courtneidge S. A. The «ins» and «outs» of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2011. Vol. 12, № 7. P. 413–426. doi: 10.1038/nrm3141.
10. Murphy D. A., Diaz B., Bromann P. A., Tsai J. H., Kawakami Y., Maurer J., Stewart R. A., Izpisua-Belmonte J. C., Courtneidge S. A. A. Src-Tks5 pathway is required for neural crest cell migration during embryonic development. *PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 7, e22499. doi: 10.1371/journal.pone.0022499.
11. Oikawa T., Itoh T., Takenawa T. Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *The Journal of Cell Biology*. 2008. Vol. 182, № 1. P. 157–169. doi: 10.1083/jcb.200801042.
12. Orient A., Terhorst C., Kisto K. The homolog of the five SH3-domain protein (HOF1/SH3PXD2B) regulates lamellipodia formation and cell spreading.

- PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 8, e23653. doi: 10.1371/journal.pone.0023653.
13. Prokic I., Cowling B. S., Laporte J. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *Journal of Molecular Medicine (Berl)*. 2014. Vol. 92, № 5. P. 453–463. doi: 10.1007/s00109-014-1138-1.
 14. Pucharcos C., Estivill X., de la Luna S. Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS Lett*. 2000. Vol. 478, № 1–2. P. 43–51.
 15. Quiñones G. A., Oro A. E. BAR domain competition during directional cellular migration. *Cell Cycle*. 2010. Vol. 9, № 13. P. 2522–2528. doi: 10.4161/cc.9.13.12123.
 16. Russo A., O'Bryan J. P. Intersectin 1 is required for neuroblastoma tumorigenesis. *Oncogene*. 2012. Vol. 31, № 46. P. 4828–4834. doi: 10.1038/onc.2011.643.
 17. Sharma V. P., Eddy R., Entenberg D., Kai M., Gertler F. B., Condeelis J. Tks5 and SHIP2 regulate invadopodium maturation, but not initiation, in breast carcinoma cells. *Current Biology*. 2013. Vol. 23, № 21. P. 2079–2089. doi: 10.1016/j.cub.2013.08.044.
 18. Stylli S. S., Stacey T. T. I., Verhagen A. M., Xu S. S., Pass I., Courtneidge S. A., Lock P. Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation. *Journal of Cell Science*. 2009. Vol. 122, № 15. P. 2727–2740. doi: 10.1242/jcs.046680.
 19. Tsyba L., Skrypkina I., Rynditch A., Nikolaienko O., Ferenets G., Fortna A., Gardiner K. Alternative splicing of mammalian Intersectin 1: domain associations and tissue specificities. *Genomics*. 2004. Vol. 84, № 1. P. 106–113. doi: 10.1016/j.ygeno.2004.02.005.
 20. Tsyba L., Gryaznova T., Dergai O., Dergai M., Skrypkina I., Kropyvko S., Boldyryev O., Nikolaienko O., Novokhatska O., Rynditch A. Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008. Vol. 372, № 4. P. 929–934. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.156.
 21. Tsyba L., Nikolaienko O., Dergai O., Dergai M., Novokhatska O., Skrypkina I., Rynditch A. Intersectin multidomain adaptor proteins: regulation of functional diversity. *Gene*. 2011. Vol. 473, № 2. P. 67–75. doi: 10.1016/j.gene.2010.11.016.
 22. Weaver A. M. Regulation of cancer invasion by reactive oxygen species and Tks family scaffold proteins. *Science Signaling*. 2011. Vol. 2, № 88, pe56. doi: 10.1126/scisignal.288pe56.
 23. Wu Y., Matsui H., Tomizawa K. Amphiphysin I and regulation of synaptic vesicle endocytosis. *Acta Medica Okayama*. 2009. Vol. 63, № 6. P. 305–323. doi: 10.18926/AMO/31822.

Представлено В. В. Філоненком
Надійшла 06.11.2018

NEW INTERACTIONS OF INVADOPODIA SCAFFOLD PROTEIN TKS5 WITH PROTEINS THAT TAKE PART IN ACTIN CYTOSKELETON REORGANIZATION, ENDO-/EXOCYTOSIS AND MEMBRANE REMODELING

Y. M. Nemesh, S. V. Kropyvko

Institute of Molecular Biology
and Genetics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine
Ukraine, 03143, Kyiv, Akad. Zabolotnogo str., 150
e-mail: yariknemesh@gmail.com

Aim. TKS5 is a key scaffold protein of invadopodia. In its absence, the cells completely lose the ability to form invadopodia. This fact makes TKS5 a potential target for cancer cure and one of the central proteins in the investigation of cancer cell invasion. Additionally, the question remains about the function of TKS5 in normal cells. Therefore, in order to extend knowledge about TKS5 role in healthy and invasive cells, we tested the TKS5 interaction with the proteins involved in signal transduction: PLC γ 1, SRC, CRK, CSK; the proteins involved in plasma membrane remodeling: AMPH1, BIN1, CIN85, ITSN1, ITSN2; the protein involved in the actin cytoskeleton rearrangement: CTTN. **Methods.** We used the GST Pull-down assay to identify the protein-protein interaction. **Results.** We revealed that TKS5 SH3 domains interact with CIN85. There were identified TKS5 interactions with SH3 domains of CTTN, ITSN1, ITSN2, AMPH1 and BIN1. **Conclusions.** TKS5 interacts with CIN85, CTTN, ITSN1, ITSN2, AMPH1 and BIN1, which take part in membrane remodeling, endo-/exocytosis and actin cytoskeleton rearrangement.

Keywords: TKS5, scaffold proteins, actin cytoskeleton, plasma membrane.