

UDC 577.22

ГТФазо-активуючий білок олігофренін 1 – новий партнер багатofункціонального адапторного білка інтерсектину 1

О. С. Губар^{1,2}, С. Уї², П. Білюарт³, С. В. Кропивко¹, Л. О. Циба¹,
С. Гасман², А. В. Риндич¹

¹Державна ключова лабораторія молекулярної і клітинної біології
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

²Інститут клітинних та інтегративних нейронаук (INCI), UPR 3212 CNRS – Страсбурзький університет; Центр нейрохімії
Вул. Блеза Паскаля, 5, Страсбург, Франція, 67084

³CNRS UMR 8104, Інститут Кошен
Вул. Фобур Сен-Жак, 24, Париж, Франція, 75014

ogubar@mail.ru

Інтерсектин 1 (ITSN1) – багатofункціональний адапторний білок, що бере участь в ендцитозі, екзоцитозі та передачі клітинних сигналів, а також асоційований з такими патологіями, як синдром Дауна і хвороба Альцгеймера. Мета. Виявлення нових білкових партнерів ITSN1, залучених до процесів мембранного транспорту. Методи. Аналізом in silico за допомогою програми Scansite виявлено ГТФазо-активуючий білок олігофренін 1 (OPHN1) як потенційний партнер SH3A-домену ITSN1. Для підтвердження формування комплексу між ITSN1 і OPHN1 застосовано тест на взаємодію in vitro з використанням GST-злитих білків та імунопреципітацію. Локалізацію білків у клітині визначали методами імунофлуоресценції та конфокальної мікроскопії. Результати. Показано, що мозкоспецифічна ізоформа SH3A-домену ITSN1 і SH3A-домен, який експресується в усіх тканинах, взаємодіють з OPHN1. ITSN1 і OPHN1 формують комплекси у клітинах лінії PC12 як у стані спокою, так і при стимулюванні екзоцитозу. Висновки. ГТФазо-активуючий білок OPHN1 та адапторний білок ITSN1 взаємодіють у клітинах лінії PC12 незалежно від стимулювання екзоцитозу.

Ключові слова: інтерсектин 1, олігофренін 1, PC12, екзоцитоз.

Вступ. Інтерсектин 1 (ITSN1) – мультидоменний і мультифункціональний адапторний білок, що бере участь у клатрин- і кавеолін-опосередкованому ендцитозі [1, 2] та в передачі клітинних сигналів [3, 4]. ITSN1 залучений до рециркуляції синаптичних пухирців [5], росту, розвитку та виживання нейронів [6]. Нещодавно показано, що ITSN1 причетний до прогресії гліоми та нейробластоми [7, 8].

Родина інтерсектинів є еволюційно консервативною. Личинки *Drosophila* з мутацією, яка спричиняє

втрату функції гена *Dap160* (гомолог ITSN1), не доживають до пізніх стадій розвитку [9], а у мишей, нокаутних за геном *Itsn1*, порушено ендцитоз і везикулярний трафік у нейронах [10]. Ген *ITSN1* людини локалізований на хромосомі 21, і рівень його експресії при синдромі Дауна підвищується [11]. За останніми даними, ITSN1 може бути одним із білків ендцитозу, пов'язаних з розвитком спонтанної хвороби Альцгеймера [12].

ITSN1 має дві основні ізоформи, що утворюються в результаті альтернативного сплайсингу: коротка (ITSN1-S) і довга (ITSN1-L) [13]. Коротка ізо-

форма складається з двох N-кінцевих EH (Eps15 homology)-доменів, центральної α -спіральної (або KLERQ) ділянки і п'яти послідовних C-кінцевих SH3 (src homology 3)-доменів. Цю ізоформу виявлено в усіх досліджених тканинах людини, у тому числі в ембріональних. Довга ізоформа переважно експресується в мозку і містить три додаткових C-кінцевих домени: DH (dbl homology), PH (pleckstrin homology) і C2 – два перших (тандем DH-PH-доменів) обумовлюють приналежність ITSN1-L до Dbl-родини гуаніннуклеотидобмінних факторів (GEF) і беруть участь в активації малої ГТФази Cdc42 (cell division cycle protein 42), ініціюючи заміну зв'язаного ГДФ на ГТФ [14].

На сьогодні однією з найдослідженіших функцій ITSN1 є участь у клатрин-опосередкованому ендоцитозі [1], у тому числі в компенсаторному ендоцитозі синаптичних пухирців [5, 15]. Нещодавно встановлено також залучення ITSN1-L до процесів екзоцитозу в хромафінних клітинах ссавців, зокрема, в клітинах наднирників щура лінії PC12 [16, 17]. Таким чином, ITSN1 може бути одним із білків, що об'єднують ці процеси. Як відомо, особливо тісно екзо- та ендоцитоз пов'язані в синапсах, але механізми цих подій ще вивчено недостатньо. Тому особливої актуальності набуває дослідження зв'язків між згаданими процесами і молекул, що ці зв'язки опосередковують.

У результаті аналізу *in silico* (за допомогою інтернет-ресурсу Scansite (<http://scansite.mit.edu/>) виявлено білок олігофренін 1 (OPHN1) як можливий партнер SH3A-домену ITSN1. OPHN1 є ГТФазо-активуючим білком для Rho-родини малих ГТФ-аз і бере участь в ендоцитозі [18] та екзоцитозі (Уї та ін., неопубліковане). Він складається з N-кінцевого BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs)-домену, PH-домену, ГТФазо-активуючого домену та трьох C-кінцевих пролінзбагачених ділянок. OPHN1 на високому рівні експресується у мозку, зокрема присутній у пре- та постсинаптичних сайтах, а втрата його функції призводить до розвитку X-зчепленої розумової відсталості [19, 20]. Враховуючи вищевикладене, нам вдалося доцільним дослідити його можливу взаємодію з ITSN1.

Матеріали і методи. *Антитіла.* Використовували мишачі моноклональні антитіла Omni D8 (sc-

7270) і поліклональні антитіла кози OPHN1 C-19 (sc-8374) («Santa-Cruz Biotechnology», США); кролячі поліклональні антитіла до GST («Invitrogen», США); кролячі поліклональні антитіла до GFP («Clinisciences», Франція); вторинні антитіла, мічені пероксидазою хрому, проти імуноглобулінів миші, кроля і кози («Invitrogen»). Вторинні антитіла для імунофлуоресценції з віслюка проти імуноглобулінів кози, кон'юговані з Alexa Fluor 488, та проти імуноглобулінів миші, кон'юговані з Cy3, придбано в «Invitrogen» і «Millipore» (США) відповідно. Фалоїдин, кон'югований з Atto-665, отримано із «Sigma» (США).

Плазмідні ДНК-конструкції. ДНК-конструкції SH3-доменів ITSN1 у векторі *pGEX-4T-3*, що експресують GST-злиті білки, описано в [21, 22]. кДНК повної кодуючої послідовності ITSN1-L одержано методом ЗТ-ПЛР з використанням тотальної РНК ембріонального мозку людини та клоновано у векторі *pcDNA4/HisMax* («Invitrogen»), що містить Omni-таг. ДНК конструкції OPHN1, злиті з HA- або GFP-тагами, люб'язно надано П. Білюартом [23].

Культура клітин і трансфекція. Лінію PC12 хромафінних клітин наднирників щура культивували за температури 37 °C у зволоженій атмосфері 5 % CO₂. Клітини вирощували в модифікованому Дюльбеко середовищі Ігла (DMEM) з 4,6 г/л глюкози і додаванням 5 % ембріональної сироватки теляти (FBS) та 10 % сироватки коня (HS) («Sigma»), 50 мкг/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. Трансфекцію проводили реагентом Lipofectamine 2000 («Invitrogen») згідно з протоколом виробника.

Аналіз взаємодії білків, злитих з GST, і Вестерн-блот. GST-злиті SH3-домени ITSN1 експресували в клітинах *Escherichia coli* штаму BL21, після чого іммобілізували на глутатіон-сефарозі 4B («GE Healthcare», США) згідно з протоколом виробника. Клітини PC12 з чашок діаметром 10 см, що надекспресували один із варіантів OPHN1, через 48 год після трансфекції лізували в 1 мл розчину 50 мМ трису, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 10 %-го гліцерину, 0,1 %-го NP40, 1 × PIC (суміш інгібіторів протеїназ, «Sigma»), центрифугували протягом 15 хв при 16000 g. До 2 мг тотального білка додавали зв'язані з сефарозою білки та інкубували за температури 4 °C з активним перемішуванням. Преципітат осаджували

центрифугуванням при 500 g протягом 1 хв, промивали тричі 50 мМ трисом, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 0,1 %-м NP40 та інкубували з відповідною кількістю 2 × буфера Леммлі за температури 95 °С. Білки розділяли у 4–15 %-му ПААГ і переносили на нітроцелюлозну мембрану. Фрагмент гелю, що містив GST-злиті білки, фарбували Кумасі. Блоти блокували 5 %-м розчином молока у 1 × TBS з 0,1 %-м твіном-20, інкубували упродовж 1 год з первинними антитілами, відмивали та обробляли відповідними вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому. Детекцію проводили, використовуючи реагент SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate («Thermo Scientific», США) і апарат ChemiCapt («Fischer Biobloc Scientific», США).

Імунопреципітація. Клітини PC12 з чашок діаметром 10 см через 48 год після трансфекції стимулювали до екзоцитозу, як описано нижче, відразу лізували в 1 мл розчину IP (20 мМ трис, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 10 %-й гліцерин, 0,5 %-й NP40), 1 × PIC та центрифугували протягом 15 хв при 16000 g. Імунопреципітацію здійснювали впродовж 4 год за методом [24].

Стимулювання екзоцитозу та імунофлуоресценція. Клітини висівали на покривні скельця, після 48-год трансфекції промивали тричі по 5 хв теплим буфером LOCKE (140 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 2,5 мМ CaCl₂, 1,2 мМ KH₂PO₄, 1,2 мМ MgSO₄, 10 мкМ EDTA, 15 мМ HEPES, 11 мМ глюкоза) за температури 37 °С. Після цього екзоцитоз стимулювали впродовж 5 хв (37 °С) буфером LOCKE з 300 мкМ АТФ. Контрольні клітини інкубували за тих же умов в LOCKE без додавання АТФ. Надалі клітини фіксували у 4 %-му розчині параформальдегіду в PBS протягом 15 хв на льоду. Залишки формальдегіду відмивали, мембрани пермеабілізували 8-хв інкубацією в 0,1 %-му тритоні X-100 в PBS. Клітини блокували 3 %-м розчином БСА та 10 %-м розчином сироватки віслюка в PBS протягом 30 хв. Далі інкубували з первинними антитілами (1 год), промивали тричі PBS та інкубували з відповідними вторинними антитілами (1 год) і знову промивали, як описано раніше. Слайди робили, застосовуючи середовище Mowiol («Sigma») для приготування препаратів. Одержані препарати аналізували за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа Leica SP5.

Результати і обговорення. Для перевірки взаємодії *in vitro* SH3А-домену ITSН1 з ОРН1 рекомбінантні GST-злиті ізоформи SH3А-домену (рис. 1, а) іммобілізували на глутатіон-сефарозі та інкубували з лізатом хромафінних клітин лінії PC12 наднирників щура, які надекспресували один із варіантів GFP-злитого ОРН1 (рис. 1, б). Оскільки відомо, що N-кінцева частина олігофреніну блокує його ГТФазну активність, вона, ймовірно, може блокувати і потенційний сайт зв'язування з ITSН1 [23]. Тому використано два варіанти олігофреніну: повнорозмірний і С-кінцеву частину, яка містить лише ГТФазо-активуючий домен і пролін-збагачені ділянки. Також до експерименту залучено дві ізоформи SH3А-домену ITSН1 (нейронспецифічну і форму, присутню в усіх тканинах), які утворюються в результаті альтернативного сплайсингу і різняться за специфічністю взаємодії з пролін-багатими ділянками білків-партнерів [21]. Кількість GST-злитих білків контролювали фарбуванням за Понсо, преципітовані GFP-злиті ОРН1 або ОРН1 С-ter детектували Вестерн-блот-аналізом з антитілами проти GFP.

Контролем слугували іммобілізований на глутатіон-сефарозі GST і лізат клітин лінії PC12, в яких надекспресували GFP. Виявилося, що обидва варіанти ОРН1 зв'язуються з двома SH3А-доменами. Отже, інтерсектин може взаємодіяти з олігофреніном і в аутоінгібованій формі.

Щоб довести специфічність взаємодії ОРН1 саме з SH3А-доменом ITSН1, ми провели аналогічний експеримент з перевірки взаємодії *in vitro* з кожним окремим SH3-доменом (А, В, С, D, Е) (рис. 1, в). GST-злиті SH3-домени іммобілізували на глутатіон-сефарозі та інкубували з лізатом клітин лінії PC12, у яких надекспресували гемаглютинін(НА)-злитий ОРН1. Кількість GST-злитих білків контролювали фарбуванням Кумасі, преципітований ОРН1-НА детектували Вестерн-блот-аналізом з антитілами проти ОРН1. Як контроль використано іммобілізований на глутатіон-сефарозі GST і лізат клітин лінії PC12, в яких надекспресували порожній вектор.

Згідно з передбаченням програми Scansite, лише SH3А-домени (обидва варіанти) преципітували ОРН1.

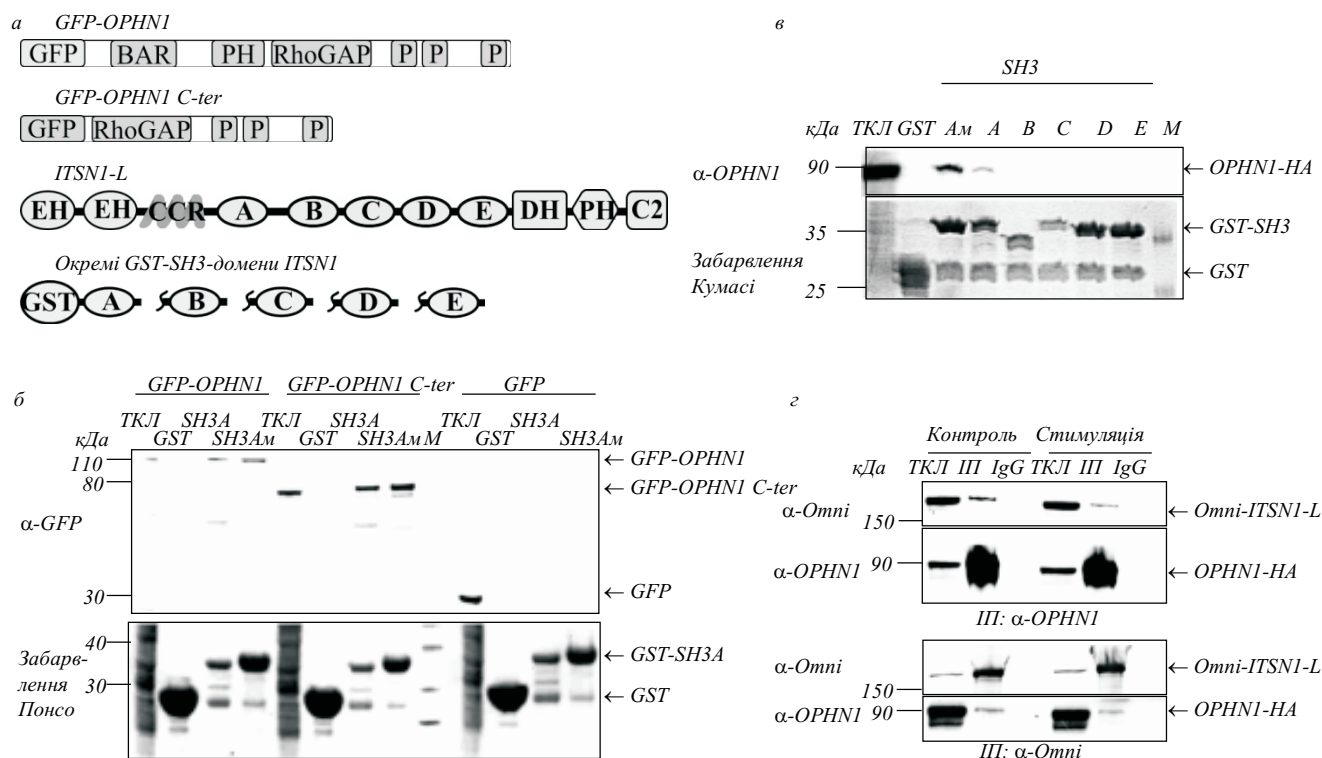


Рис. 1. ITSN1-L і OPHN1 взаємодіють *in vitro* та копреципітуються з клітинних лізатів: *а* – доменна організація повнорозмірних і делетованих форм ITSN1 і OPHN1, використаних у роботі; *б* – взаємодія SH3A-домену ITSN1 з повнорозмірним OPHN1 і його С-кінцевою частиною (OPHN1 C-ter) *in vitro* (кількість GST-злитих білків контролювали фарбуванням Понсо (нижня панель); SH3Ам – мозкоспецифічна ізоформа SH3A-домену ITSN1); *в* – SH3A-домен ITSN1 відповідає за зв'язування з OPHN1 *in vitro* (кількість GST-злитих білків контролювали фарбуванням Кумасі (нижня панель)); *г* – стимулювання екзоцитозу не впливає на формування комплексів між ITSN1-L і OPHN1 у клітинах лінії PC12 (III – імунопреципітація; IgG – імунопреципітація з контрольними імуноглобулінами; ТКЛ – тотальний клітинний лізат; М – маркер)

Наступним етапом стало дослідження наявності комплексів ITSN1 з OPHN1 у клітинах ссавців. Для цього застосовано метод імунопреципітації у клітинах лінії PC12 (рис. 1, г). Цю лінію хромафіних клітин наднирників щура обрано як робочу модель, оскільки її визнано класичною моделлю нейронального розвитку, а також нейросекреції [25]. До того ж вона експресує довгу і коротку ізоформи ITSN1.

Omni-ITSN1-L і OPHN1-НА коекспресували у клітинах лінії PC12. Для експерименту ITSN1-L обрано через те, що він експресується переважно в нейронах. Через 48 год після трансфекції клітини стимулювали до екзоцитозу, як описано в «Матеріалах і методах». Після цього їх лізували і отриманий лізат використовували для імунопреципітації з антитілами проти Omni-тагу або OPHN1. Преципітовані Omni-ITSN1-L або OPHN1-НА детектували Вестерн-блот-аналізом з відповідними антитілами.

Контроль імунопреципітації здійснювали за допомогою IgG відповідного походження. Білки копреципітувалися в обох напрямках, що дійсно підтверджує формування комплексу ITSN1 з OPHN1 у клітинах. Кількість комплексів у контрольних і стимульованих клітинах практично не відрізняється, що свідчить про незалежність взаємодії ITSN1 з OPHN1 від екзоцитозу.

Одержані дані збігаються з результатами експерименту з колокалізації в клітинах лінії PC12 (рис. 2, див. уклею). Клітини трансфікували Omni-ITSN1-L та OPHN1-НА. Через 48 год після трансфекції їх стимулювали до екзоцитозу, як описано у «Матеріалах і методах», і фіксували. Відповідні білки детектували методом імунофлуоресценції. Для кожної клітини робили два конфокальних зрізи у різних площинах: через цитоплазму та через ядро. При стимулюванні екзоцитозу OPHN1 частково релокалізується до периферії клітини (рис. 2, б), тоді як

Fig. 2 to article by Gubar O. S. et al.

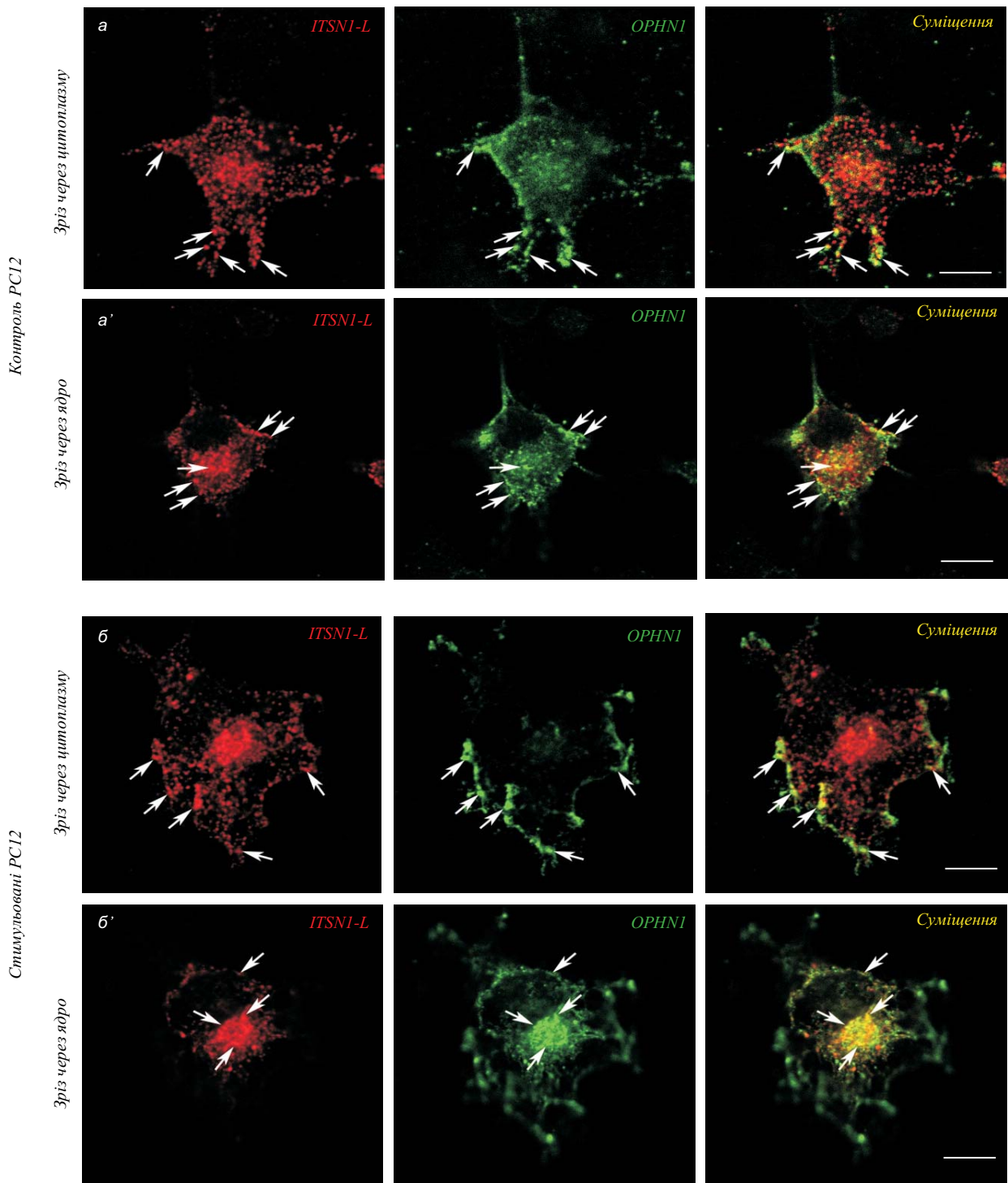


Рис. 2. ITSN1 і OPHN1 колокалізуються в клітинах наднирників щура лінії PC12. Клітини лінії PC12 трансфікували Omni-ITSN1-L і OPHN1-НА з наступним стимулюванням екзоцитозу. Білки детектували методом імунофлуоресценції (див. «Матеріали і методи»): Omni-ITSN1-L забарвлено червоним кольором, OPHN1-НА – зеленим. Для кожної клітини робили два конфокальних зрізи у різних площинах: через цитоплазму (верхній рядок, позначено літерами) і через ядро (нижній рядок, позначено тими самими літерами, але із штрихами: *a, a'* – контрольні клітини; *б, б'* – клітини, стимульовані до екзоцитозу). Масштаб відповідає 5 мкм

розташування ITSN1-L практично не змінюється. Коекспресія цих білків не впливає на їхню локалізацію у клітині. ITSN1-L і OPHN1 частково колокалізуються на периферії клітини (рис. 2, а, б), а також у приядерній частині цитоплазми (рис. 2, а', б'). Причому їхня колокалізація також не залежить від стимулювання. Структури на периферії клітини можуть бути сайтами ендоцитозу, хоча це, звичайно, потребує подальшого дослідження. Відомо, що у нейронах і нейросекреторних клітинах екзоцитоз тісно пов'язаний з компенсаторним ендоцитозом, який відбувається відразу ж після секреції (а при тривалому стимулюванні – і одночасно з нею) [26, 27]. Оскільки є дані, що і ITSN1, і OPHN1 також залучені до ендоцитозу [5, 15, 18], вищезгадані білки можуть разом брати участь у компенсаторному ендоцитозі в нейросекреторних клітинах і, можливо, нервових закінченнях. Перевірка останнього і становитиме предмет наших подальших досліджень.

Висновки. Таким чином, нами виявлено новий партнер багатofункціонального адапторного білка ITSN1 – ГТФазо-активуючий білок OPHN1, що специфічно зв'язується з SH3A-доменом ITSN1. Також уперше показано, що обидва білки формують комплекси і частково колокалізуються у секреторних клітинах лінії PC12 як у стані спокою, так і під час регульованого екзоцитозу.

O. S. Gubar, S. Houy, P. Billuart, S. V. Kropyvko, L. O. Tsyba, S. Gasman, A. V. Ryndich

GTPase-activating protein oligophrenin 1 is a new partner of multifunctional adaptor protein intersectin 1

Institut des Neurosciences Cellulaires et Integratives (INCI)
UPR 3212 CNRS -Universite de Strasbourg, Centre de Neurochimie
5, rue Blaise Pascal, Strasbourg; France, 67084

³CNRS UMR 8104, Institut Cochin
24, rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris, France, 75014

Summary

Aim. Intersectin 1 (ITSN1) is a multifunctional adaptor protein which is involved in endocytosis, exocytosis and cellular signaling and it is also associated with such pathologies as Down syndrome and Alzheimer's disease. The aim of this study was to identify new ITSN1 protein partners which are implicated in membrane trafficking. **Methods.** In silico analysis by Scansite online resource had identified a GTPase activating protein oligophrenin 1 (OPHN1) as a potential partner of ITSN1 SH3A domain. GST pull-down and immunoprecipitation were used to prove complex formation between ITSN1 and OPHN1. Subcellular protein localization was determined by immunofluorescence and confocal microscopy. **Results.** We have shown that brain-specific and

ubiquitously expressed SH3A domain isoforms of ITSN1 interact with OPHN1. ITSN1 and OPHN1 form complexes in both resting and stimulated to exocytosis PC12 cell line. **Conclusions.** GTPase activating protein OPHN1 and adaptor protein ITSN1 interact in PC12 cell line independently of exocytosis stimulation.

Keywords: intersectin 1, oligophrenin 1, PC12, exocytosis.

O. C. Губарь, С. Уи, П. Билуарт, С. В. Кропивко, Л. А. Цыба, С. Гасман, А. В. Рындич

ГТФазо-активирующий белок олигофренин 1 – новый партнер многофункционального адапторного белка интерсектина 1

Резюме

Интерсектин 1 (ITSN1) – многофункциональный адапторный белок, участвующий в эндоцитозе, экзоцитозе и передаче клеточных сигналов, а также ассоциированный с такими патологиями, как синдром Дауна и болезнь Альцгеймера. **Цель.** Выявление новых белковых партнеров ITSN1, вовлеченных в процессы мембранного транспорта. **Методы.** Анализом *in silico* с помощью программы Scansite выявлен ГТФазо-активирующий белок олигофренин 1 (OPHN1) как потенциальный партнер SH3A-домена ITSN1. Для подтверждения формирования комплекса между ITSN1 и OPHN1 применен тест на взаимодействие *in vitro* с использованием GST-слитых белков и иммунопреципитация. Локализацию белков в клетке определяли методами иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии. **Результаты.** Показано, что мозгоспецифическая изоформа SH3A-домена ITSN1 и SH3A-домен, экспрессирующийся во всех тканях, взаимодействуют с OPHN1. ITSN1 и OPHN1 формируют комплексы в клетках линии PC12 как в состоянии покоя, так и при стимулировании экзоцитоза. **Выводы.** ГТФазо-активирующий белок OPHN1 и адапторный белок ITSN1 взаимодействуют в клетках линии PC12 независимо от стимулирования экзоцитоза.

Ключевые слова: интерсектин 1, олигофренин 1, PC12, экзоцитоз.

REFERENCES

- Hussain N. K., Yamabhai M., Ramjaun A. R., Guyi A. M., Baranesi D., O'Bryan J. P., Der C. J., Kay B. K., McPherson P. S. Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells // J. Biol. Chem.–1999.–**274**, N 22.–P. 15671–15677.
- Predescu S. A., Predescu D. N., Timblin B. K., Stan R. V., Malik A. B. Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells // Mol. Biol. Cell.–2003.–**14**, N 12.–P. 4997–5010.
- Tong X. K., Hussain N. K., Adams A. G., O'Bryan J. P., McPherson P. S. Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis // J. Biol. Chem.–2000.–**275**, N 38.–P. 29894–29899.
- Adams A., Thorn J. M., Yamabhai M., Kay B. K., O'Bryan J. P. Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin-mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways // J. Biol. Chem.–2000.–**275**, N 35.–P. 27414–27420.
- Pechstein A., Bacetic J., Vahedi-Faridi A., Gromova K., Sundborger A., Tomlin N., Krainer G., Vorontsova O., Schafer J. G., Owe S. G., Cousin M. A., Saenger W., Shupliakov O., Haucke V. Regulation of synaptic vesicle recycling by complex formation between intersectin 1 and the clathrin adaptor complex AP2 // Proc. Natl Acad. Sci. USA.–2010.–**107**, N 9.–P. 4206–4211.

6. Das M., Scappini E., Martin N. P., Wong K. A., Dunn S., Chen Y. J., Miller S. L., Domin J., O'Bryan J. P. Regulation of neuron survival through an intersectin-phosphoinositide 3-Kinase C2 β -AKT pathway // *Moll. Cell. Biol.*—2007.—**27**, N 22.—P. 7906–7917.
7. Ma Y., Wang B., Li W., Liu X., Wang J., Ding T., Zhang J., Ying G., Fu L., Gu F. Intersectin1-s is involved in migration and invasion of human glioma cells // *J. Neurosci. Res.*—2011.—**89**, N 7.—P. 1079–1090.
8. Russo A., O'Bryan J. P. Intersectin 1 is required for neuroblastoma tumorigenesis // *Oncogene*.—2012.—doi: 10.1038/onc.2011.643.
9. Marie B., Sweeney S. T., Poskanzer K. E., Roos J., Kelly R. B., Davis G. W. Dap160/Intersectin scaffolds the periaxonal zone to achieve high-fidelity endocytosis and normal synaptic growth // *Neuron*.—2004.—**43**, N 2.—P. 207–219.
10. Yu Y., Chu P. Y., Bowser D. N., Keating D. J., Dubach D., Harper I., Tkalcevic J., Finkelstein D. I., Pritchard M. A. Mice deficient for the chromosome 21 ortholog Itsn1 exhibit vesicle-trafficking abnormalities // *Hum. Mol. Genet.*—2008.—**17**, N 21.—P. 3281–3290.
11. Hunter M. P., Nelson M., Kurzer M., Wang X., Kryscio R. J., Head E., Pinna G., O'Bryan J. P. Intersectin 1 contributes to phenotypes *in vivo*: implications for Down's syndrome // *Neuroreport*.—2011.—**22**, N 15.—P. 767–772.
12. Keating D. J., Chen C., Pritchard M. A. Alzheimer's disease and endocytic dysfunction: clues from the Down syndrome-related proteins, DSCR1 and ITSN1 // *Ageing Res. Rev.*—2006.—**5**, N 4.—P. 388–401.
13. Guipponi M., Scott H. S., Chen H., Schebesta A., Rossier C., Antonarakis S. E. Two isoforms of human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon // *Genomics*.—1998.—**53**, N 3.—P. 369–376.
14. Hussain N. K., Jenna S., Glogauer M., Quinn C. C., Wasiaik S., Guipponi M., Antonarakis S. E., Kay B. K., Stossel T. P., Lamarche-Vane N., McPherson P. S. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP // *Nat. Cell. Biol.*—2001.—**3**, N 10.—P. 927–932.
15. Koh T. W., Verstreken P., Bellen H. J. Dap160/intersectin acts as a stabilizing scaffold required for synaptic development and vesicle endocytosis // *Neuron*.—2004.—**43**, N 2.—P. 193–205.
16. Malacombe M., Ceridono M., Calco V., Chasserot-Golaz S., McPherson P. S., Bader M. F., Gasman S. Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42 // *EMBO J.*—2006.—**25**, N 15.—P. 3494–3503.
17. Momboisse F., Ory S., Calco V., Malacombe M., Bader M. F., Gasman S. Calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells: intersectin-1L stimulates actin polymerization and exocytosis by activating Cdc42 // *Ann. NY Acad. Sci.*—2009.—**1152**.—P. 209–214.
18. Nakano-Kobayashi A., Kasri N. N., Newey S. E., Van Aelst L. The Rho-linked mental retardation protein OPHN1 controls synaptic vesicle endocytosis via endophilin A1 // *Curr. Biol.*—2009.—**19**, N 13.—P. 1133–1139.
19. Billuart P., Bienvenu T., Ronce N., des Portes V., Vinet M. C., Zemni R., Roest Crollius H., Carrie A., Fauchereau F., Cherry M., Briault S., Hamel B., Fryns J. P., Beldjord C., Kahn A., Moraine C., Chelly J. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation // *Nature*.—1998.—**392**, N 6679.—P. 923–926.
20. Govek E. E., Newey S. E., Akerman C. J., Cross J. R., Van der Venken L., Van Aelst L. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis // *Nat. Neurosci.*—2004.—**7**, N 4.—P. 364–372.
21. Tsyba L., Gryaznova T., Dergai O., Dergai M., Skrypkinia I., Kropyvko S., Boldyryev O., Nikolaienko O., Novokhatska O., Rynditch A. Alternative splicing affecting the SH3A domain controls the binding properties of intersectin 1 in neurons // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*—2008.—**372**, N 4.—P. 929–934.
22. Nikolaienko O., Skrypkinia I., Tsyba L., Fedyshyn Y., Morderer D., Buchman V., de la Luna S., Drobot L., Rynditch A. Intersectin 1 forms a complex with adaptor protein Ruk/CIN85 *in vivo* independently of epidermal growth factor stimulation // *Cell. Signal.*—2009.—**21**, N 5.—P. 753–759.
23. Fauchereau F., Herbrand U., Chafey P., Eberth A., Koulakoff A., Vinet M. C., Ahmadian M. R., Chelly J., Billuart P. The Rho GAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain // *Mol. Cell. Neurosci.*—2003.—**23**, N 4.—P. 574–586.
24. Dergai O. V., Dergai M. V., Skrypkinia I. Ya., Tsyba L. O., Yarchuk A. M., Rynditch A. V. Amphiphysin 1 and 2 interact with membrane protein 2A of Epstein-Barr virus and regulate its exosomal secretion // *Biopolym. Cell.*—2012.—**28**, N 3.—P. 234–238.
25. Westerink R. H., Ewing A. G. The PC12 cell as model for neurosecretion // *Acta Physiol. (Oxf)*.—2008.—**192**, N 2.—P. 273–285.
26. Gundelfinger E. D., Kessels M. M., Qualmann B. Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*—2003.—**4**, N 2.—P. 127–139.
27. Jarousse N., Kelly R. B. Endocytotic mechanisms in synapses // *Curr. Opin. Cell. Biol.*—2001.—**13**, N 4.—P. 461–469.

Received 23.08.12