

На правах рукописи

Калиниченко Светлана Викторовна

**ИЗУЧЕНИЕ ИНТЕРАКТОМА ПРОТЕИНКИНАЗЫ МАК-V С ЦЕЛЬЮ
ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ**

Специальность 03.01.03 - молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2012

Работа выполнена в лаборатории молекулярной онкогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук

Научный руководитель: Коробко Игорь Викторович,
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: Надеждина Елена Сергеевна,
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института белка Российской академии наук

Кантидзе Омар Леванович,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории
структурно-функциональной организации хромосом Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института биологии
гена Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук

Защита диссертации состоится 28 ноября 2012 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д.34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д.32.

Автореферат разослан «___» октября 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. фарм. наук

Л.С. Грабовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Протеинкиназа МАК-V является одним из наименее изученных представителей семейства АМРК-подобных серин-треониновых протеинкиназ. Однако, принимая во внимание общепризнанную роль протеинкиназ как регуляторов различных внутриклеточных процессов, не подлежит сомнению ее важность как в нормальном функционировании клетки и организма, так и при патологических состояниях. Это определяет актуальность дальнейших исследований свойств и функций протеинкиназы МАК-V. Выявление молекулярных процессов, протекающих с участием протеинкиназы МАК-V, и механизмов регуляции ее активности представляет большой научный интерес как с точки зрения фундаментальной науки, так и в перспективе - для разработки способов терапии ряда заболеваний человека.

В частности, ген *tak-v* человека расположен в локусе 21 хромосомы, ассоциированном с диабетом I типа, и по результатам транскрипционного анализа в системе, моделирующей это заболевание, протеинкиназа МАК-V потенциально может влиять на функцию β -клеток. Выяснение роли протеинкиназы МАК-V в индуцированном цитокинами разрушении β -клеток может иметь существенное значение для профилактики и сопутствующей терапии инсулин-зависимого диабета.

Помимо этого, выраженная экспрессия гена *tak-v* во всех отделах головного мозга развивающегося эмбриона и взрослого организма, а также локализация гена *tak-v* человека в локусе 21 хромосомы, ассоциированном с шизофренией, аутизмом и фенотипическими проявлениями синдрома Дауна, свидетельствуют о возможной роли протеинкиназы МАК-V в развитии и функционировании нервной системы. На основании имеющихся данных можно предполагать, что протеинкиназа МАК-V может участвовать в синаптической передаче сигналов посредством регуляции эндоцитоза. Однако функции протеинкиназы МАК-V в головном мозге на сегодняшний день остаются неизвестными. Выявление молекулярных процессов, протекающих в нейронах с участием протеинкиназы МАК-V, представляет большой научный интерес как для понимания ее роли в нормальном функционировании центральной нервной системы, так и для исследования ее возможных связей с патологическими состояниями, с которыми может быть ассоциирована протеинкиназа МАК-V, и, в случае их выявления, для поиска способов коррекции этих состояний.

Наконец, протеинкиназа МАК-V контролирует эмбриогенез путем регуляции Wnt сигнального пути. Нарушение регуляции этого сигнального каскада наблюдается при многих злокачественных новообразованиях и может происходить с участием протеинкиназы

МАК-V, уровень содержания которой в опухолевых клетках часто изменен. Особенно выражена ассоциация протеинкиназы МАК-V с возникновением и развитием опухолей молочной железы, что позволяет рассматривать ее как мишень для противоопухолевой терапии. Однако роль протеинкиназы МАК-V в канцерогенезе онкоген-специфична и, видимо, зависит от клеточного контекста. Выявление сигнальных путей с участием протеинкиназы МАК-V и понимание механизмов ее регуляции является необходимым условием для разработки методов специфического воздействия на опухоль с использованием МАК-V в качестве мишени при терапии онкологических заболеваний.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы состояла в изучении функциональных связей протеинкиназы МАК-V в клетке. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Изучить участие протеинкиназы МАК-V в некоторых сигнальных путях в клетках PC12TetOn с индуцибельной экспрессией МАК-V мыши.
2. Исследовать внутриклеточное распределение белка МАК-V.
3. Идентифицировать партнеры по взаимодействию протеинкиназы МАК-V.
4. Оценить функциональные следствия выявленных взаимодействий.

Научная новизна и практическая значимость работы

В работе было показано, что анти-апоптотическая активность протеинкиназы МАК-V мыши в клетках PC12TetOn при их контакте с коллагеном IV не связана с регуляцией фосфорилирования кофилина 1 и с регуляцией уровня активации сигнальных путей протеинкиназ Akt и ERK1/2. Полученные данные исключают участие этих молекулярных процессов в опосредованном МАК-V повышении выживаемости клеток.

Впервые было показано, что протеинкиназа МАК-V взаимодействует с синаптоподином. Учитывая роль синаптоподина в дендритных шипиках, это открывает дальнейшие перспективы для изучения роли протеинкиназы МАК-V в головном мозге в свете ее возможного участия в функционировании синапсов, процессах памяти и обучения, а также в интеллектуальном развитии человека.

В работе было впервые выявлено взаимодействие протеинкиназы МАК-V и убиквитин-лигазы Nedd4 и продемонстрирована его функциональность. Установленное влияние Nedd4 на МАК-V вместе с ранее выявленной регуляторной ролью МАК-V в Wnt сигнальном пути впервые свидетельствует о роли в этом сигнальном пути убиквитин-лигазы Nedd4. Более того, поскольку убиквитин-лигаза Nedd4 вовлечена в регуляцию Notch и IGF-1R сигнальных путей, обнаруженная взаимосвязь служит основой для интеграции не

только этих сигнальных путей, но и, в дополнение к ним, Wnt сигнального пути через взаимодействие между Nedd4 и МАК-V.

Полученные в работе данные указывают и на возможные механизмы регуляции активности протеинкиназы МАК-V. Это зависимость от убиквитин-ассоциированного домена локализация на мембране, контроль уровня белка в клетке путем протеасомной деградации, ингибирование активности МАК-V убиквитин-лигазой Nedd4 и возможная ассоциация с шипиковым аппаратом дендритных шипиков посредством связывания с синаптоподином.

Таким образом, результаты работы существенно расширяют наши представления о регуляции и функциональных связях протеинкиназы МАК-V и открывают перспективы для дальнейшего изучения роли протеинкиназы МАК-V в клетке и организме. Это, в свою очередь, является необходимой предпосылкой для установления роли протеинкиназы МАК-V в патологических процессах в организме, что абсолютно необходимо для валидации МАК-V как молекулярной мишени для терапии и, в конечном итоге, для разработки новых стратегий лечения заболеваний человека, в которых протеинкиназа МАК-V может играть существенную роль, в частности, в онкологических заболеваниях.

Личный вклад автора

Основные результаты работы получены автором лично или при его непосредственном участии. Масс-спектрометрический анализ белков проведен Р.Х. Зиганшиным (ИБХ РАН, г.Москва). Биохимическое фракционирование клеток РС12TetOn с индуцированной экспрессией протеинкиназы МАК-V мыши и анализ ее мембранной локализации в дрожжах выполнены совместно с И.В. Коробко. Иммунофлуоресцентный анализ колокализации синаптоподина и протеинкиназы МАК-V в клетках линии NCI-H1299 проведен И.В. Коробко. Фракция периферических мембран клеток головного мозга мыши была получена П.Н. Вихревой (ИБГ РАН, г.Москва). Получение клонов клеток РС12TetOn, продуцирующих микроРНК к гену *Nedd4* крысы и контрольную микроРНК, проводилось при участии И.В. Коробко. Эксперименты по трансляции мРНК генов *mak-v* и *Nedd4* в эмбрионах *X.laevis* выполнены Кейджи Ито (Mount Sinai School of Medicine, г.Нью-Йорк, США) с использованием предоставленных автором плазмидных конструкций и планом эксперимента. Имена соавторов приведены в соответствующих публикациях.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на XX зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Россия, Москва, 11-15 февраля 2008), International

Conference on Biomolecular Science in honor of the 75th anniversary of the birth of Professor Yuri Ovchinnikov (Russia, Moscow-Pushchino, September 28 - October 2, 2009), International symposium “Control of gene expression and cancer” (Russia, Moscow, June 21-25, 2010), а также на межлабораторном семинаре по апробации кандидатской диссертации в ИБГ РАН 17 октября 2012 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ. Из них 4 статьи в рецензируемых научных журналах и 3 тезиса докладов и сообщений на международных конференциях.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 122 страницах, содержит 31 рисунок и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Цели и задачи, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы (250 цитируемых источников).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1.Изучение влияния протеинкиназы МАК-V на статус фосфорилирования кофилина 1 и активацию сигнальных путей протеинкиназ ERK1/2 и Akt в клетках PC12TetOn с индуцибельной экспрессией протеинкиназы МАК-V мыши

Полученные ранее в нашей лаборатории линии клеток PC12TetOn с индуцируемой доксициклином экспрессией протеинкиназы МАК-V мыши или ее каталитически неактивного мутанта МАК-V(K91R) с С-концевым FLAG-эпитопом без индукции экспрессии трансгена подвергались апоптозу при росте на коллагене IV, но не на ламинине. Индукция МАК-V, в отличие от индукции каталитически неактивного мутанта



Рис.1. Статус фосфорилирования кофилина 1 в клетках PC12TetOn с индуцибельной экспрессией МАК-V при росте на различных субстратах при индукции экспрессии МАК-V (DOX +) или без индукции (DOX -).

МАК-V(K91R), подавляла апоптоз клеток PC12TetOn при росте на коллагене IV. В данной работе была поставлена задача исследовать роль протеинкиназы МАК-V в некоторых молекулярных процессах, которые могут обуславливать выживание клеток PC12TetOn при росте на коллагене IV.

Недавно было показано, что протеинкиназа МАК-V подавляет метастатический потенциал клеток базальноподобного рака молочной железы, поддерживая ингибирующее фосфорилирование кофилина 1, регулятора перестройки актинового цитоскелета. Поскольку контакт клеток PC12TetOn с коллагеном IV вызывает перестройку актинового цитоскелета, была исследована возможная роль МАК-V в регуляции этого процесса в клетках PC12TetOn через регуляцию фосфорилирования кофилина 1. В результате проведенных исследований было установлено, что продукция протеинкиназы МАК-V не влияет на статус фосфорилирования кофилина 1 в клетках PC12TetOn (Рис. 1).

Этот результат согласуется с ранее опубликованными данными, что функциональная активность МАК-V определяется специфическим клеточным контекстом и указывает на то, что протеинкиназа МАК-V влияет на индуцируемые контактом с коллагеном IV внутриклеточные процессы в клетках PC12TetOn через другие сигнальные каскады, не приводящие к изменению статуса фосфорилирования кофилина 1.

Контакт интегринов с внеклеточным матриксом индуцирует многочисленные внутриклеточные сигнальные каскады, в том числе и сигнальные пути протеинкиназ ERK1/2 и Akt, влияющие на рост и выживаемость клеток. Однако было обнаружено, что протеинкиназа МАК-V не влияет на уровень активации сигнальных путей протеинкиназ ERK1/2 и Akt в клетках PC12TetOn, растущих на коллагене IV (Рис. 2).

Таким образом, анализ молекулярных событий, которые могли бы опосредовать анти-апоптотическую активность протеинкиназы МАК-V в клетках PC12TetOn при их контакте с коллагеном IV, выявил отсутствие влияния МАК-V на статус фосфорилирования кофилина 1 и на уровень активации сигнальных путей протеинкиназ ERK1/2 и Akt. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что апоптоз клеток PC12TetOn, индуцированный их взаимодействием с коллагеном IV, подавляется протеинкиназой МАК-V путем воздействия на другие молекулярные пути.

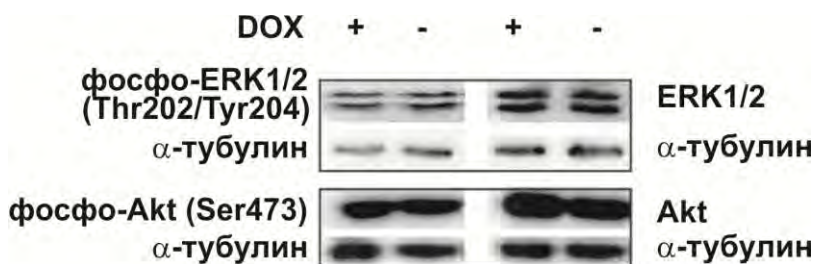


Рис.2. Активация сигнальных путей протеинкиназ ERK1/2 и Akt в клетках PC12TetOn с индуцибельной экспрессией МАК-V при росте на коллагене IV. Показаны результаты Вестерн-блот-анализа с антителами против протеинкиназы ERK1/2, Akt и их фосфорилированных форм.

2. Мембранная локализация протеинкиназы МАК-V

Локализация белков в специфическом внутриклеточном компартменте часто бывает важной составляющей в регуляции их функций. Локализация АМПК-подобной протеинкиназы MARK2 на мембране необходима для ее функционирования как регулятора клеточной полярности и подвержена контролю в клетке. Активация протеинкиназ SIK сопровождается изменением их внутриклеточной локализации: транслокацией SIK1 из ядра в цитоплазму и релокализацией SIK2 в цитоплазме. Активация протеинкиназы BRSK1 сопровождается ядерной транслокацией. Протеинкиназа MELK релокализуется в цитоплазме во время клеточного цикла. Все эти процессы обеспечивают корректную локализацию протеинкиназ относительно их субстратов, что является существенным для функций этих протеинкиназ.

2.1. Ассоциация экзогенно продуцируемого и эндогенного белка МАК-V с клеточными мембранами

Для анализа внутриклеточного распределения экзогенно продуцируемого белка МАК-V было проведено биохимическое фракционирование клеток PC12TetOn с индуцированной экспрессией МАК-V-FLAG. Аликвоты цитозольной и мембранной фракций были проанализированы Вестерн-блоттингом с помощью анти-FLAG-антител. В результате было выявлено, что существенная часть белка МАК-V локализована на мембране (Рис. 3).

Для подтверждения корректного распределения цитозольных и мембранных белков в

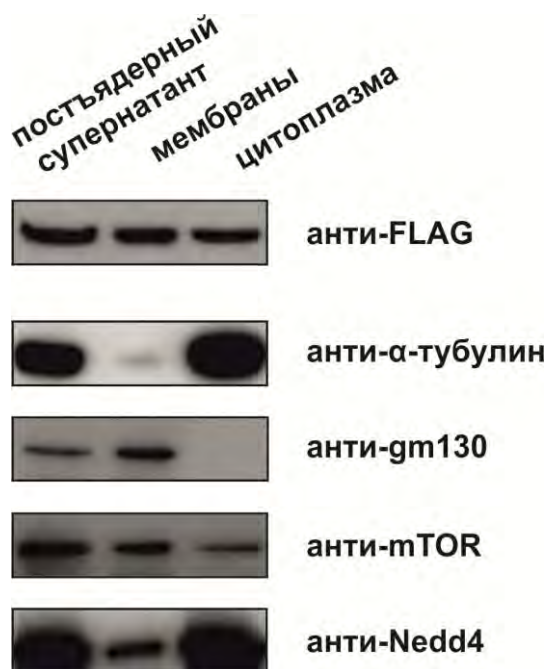


Рис.3. Экзогенно продуцируемая в клетках PC12TetOn протеинкиназа МАК-V ассоциирована с мембранной фракцией. Вестерн-блот анализ цитозольной и мембранной фракций постъядерного супернатанта клеток PC12TetOn, продуцирующих белок МАК-V-FLAG, с анти-FLAG-антителами. Мембрана также была окрашена с антителами против трансмембранного белка gm130, цитозольного белка α -тубулина и частично ассоциированных с мембранами клетки белков Nedd4 и mTOR.

полученных фракциях, фракции были проанализированы на присутствие белков α -тубулина, mTOR, Nedd4 и gm130. Результаты анализа показали, что α -тубулин, переходящий в цитозоль в результате деполимеризации микротрубочек, обнаруживается только в цитозольной фракции. Трансмембранный белок аппарата Гольджи, gm130, присутствовал только в мембранной фракции. Белки mTOR и Nedd4, часть клеточного пула которых ассоциирована с мембранами за счет межмолекулярных взаимодействий, были обнаружены как в цитозольной, так и в мембранной фракциях (Рис. 3). Таким образом, использованный способ фракционирования клеток не влияет на распределение белков с известной мембранной или цитозольной локализациями, что позволяет сделать вывод об ассоциации экзогенно продуцируемой протеинкиназы МАК-V с мембранами.

Для исключения аномальности присутствия на мембранах экзогенно продуцируемого белка МАК-V-FLAG вследствие его увеличенной продукции в клетках PC12TetOn была исследована ассоциация с клеточными мембранами эндогенного белка МАК-V. Для этого были получены антитела к полноразмерному белку МАК-V, которые детектировали белок с ожидаемой для МАК-V массой (~ 80 кДа) в лизатах клеток линии CSML-0, продуцирующей эндогенную протеинкиназу МАК-V. При этом белок отсутствовал в лизатах клеток линии CSML-100, негативных по экспрессии гена *mak-v*. Тот же белок обнаруживался и в лизатах клеток VMR-Liv, в которых также присутствует транскрипт *mak-v*, хотя и на значительно более низком уровне, чем в клетках линии CSML-0. В то же время в *mak-v*-негативных клетках VMR-0 белок отсутствовал (Рис. 4). Это позволяет сделать вывод, что полученные антитела способны специфически узнавать эндогенный белок МАК-V.

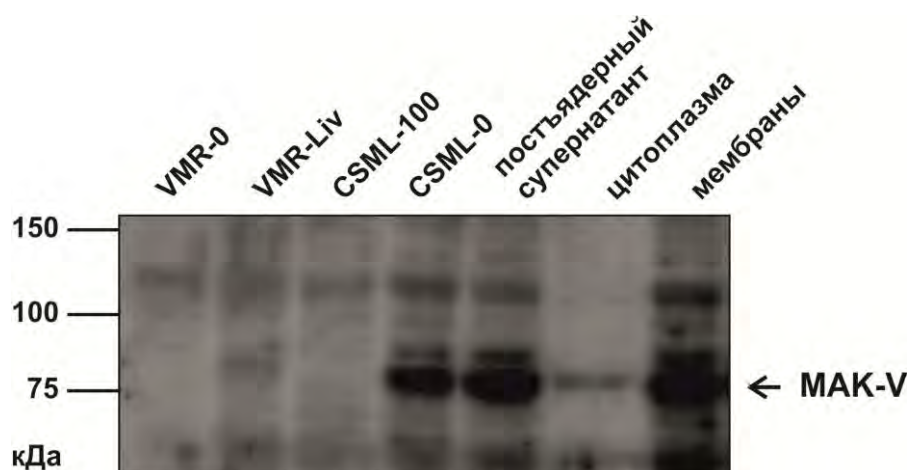


Рис. 4. Протеинкиназа МАК-V ассоциирована с мембранами в клетках линии CSML-0. Вестерн-блот анализ с антителами против белка МАК-V суммарных лизатов клеток линий CSML-0 и VMR-Liv, в которых обнаруживается транскрипт *mak-v*, CSML-100 и VMR-0, в которых транскрипт *mak-v* отсутствует, а также постъядерного супернатанта клеток линии CSML-0 и приготовленных из него мембранной и цитозольной фракций.

Далее были проведены фракционирование клеток линии CSML-0 и детекция белка МАК-V в различных фракциях с использованием полученных антител. Как и в случае экзогенно продуцируемого в клетках PC12TetOn белка, эндогенный белок МАК-V обнаруживался преимущественно в мембранной фракции (Рис. 4). Этот результат подтверждает предположение о мембранной ассоциации протеинкиназы МАК-V, сделанное на основании анализа распределения экзогенно продуцируемого белка.

2.2. Мембранная локализация протеинкиназы МАК-V в дрожжах

Для дальнейшего подтверждения ассоциации протеинкиназы МАК-V с мембранами была использована дрожжевая система, основанная на комплементации температурно-чувствительной мутации гена *cdc25*, которая блокирует рост дрожжей при 37°C, но не препятствует их росту при 25°C. Белок hSOS способен комплементировать мутацию в белке CDC25 в случае своей мембранной локализации, которая обуславливается мембранной ассоциацией исследуемого белка, продуцируемого как химера с hSOS.

При продукции химеры hSOS-МАК-V в дрожжах наблюдалась комплементация

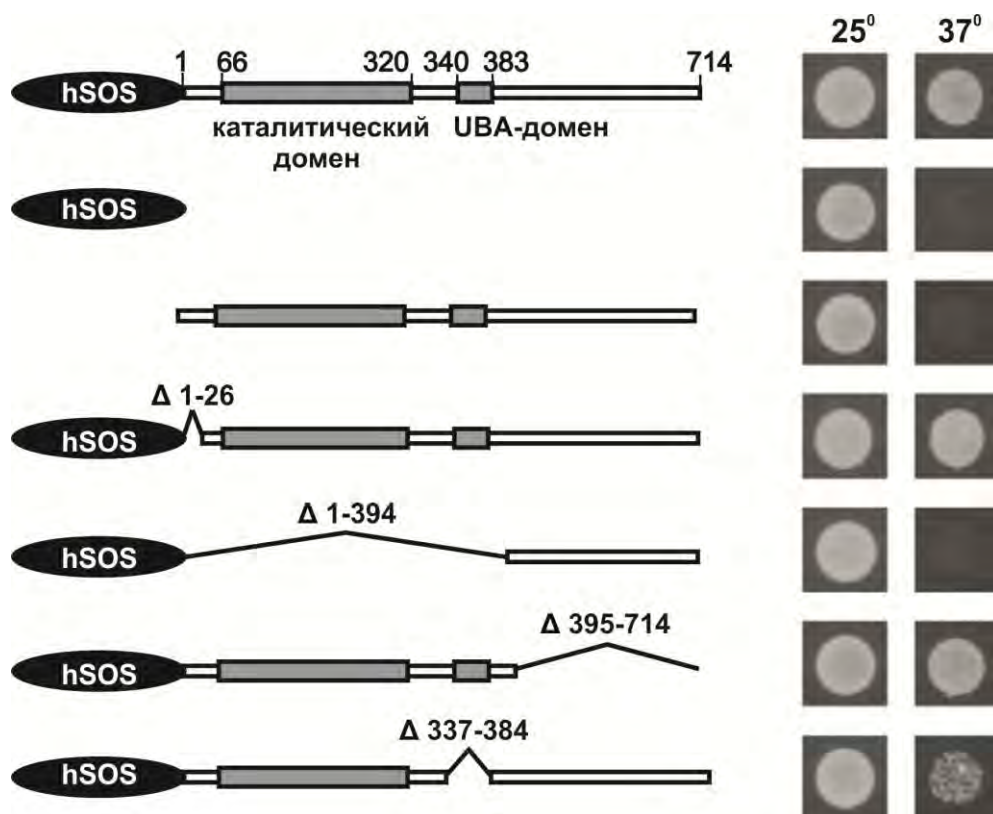


Рис. 5. Анализ мембранной локализации протеинкиназы МАК-V и ее делеционных мутантов в дрожжах. Слева схематически изображены белки, продуцируемые в дрожжах штамма *cdc25H*. Положения делеций в белке МАК-V показаны в аминокислотных остатках. Справа приведены результаты анализа комплементации температурно-чувствительной мутации при продукции в дрожжах соответствующих белков.

мутации (Рис. 5). При этом продукция одного белка hSOS или одного белка МАК-V не оказывала такого эффекта. Это позволяет сделать вывод, что протеинкиназа МАК-V сама не способна комплементировать мутацию, а наблюдаемая комплементация мутации при продукции химеры hSOS-МАК-V обусловлена именно способностью МАК-V локализоваться на мембранах.

Для определения роли структурных доменов белка МАК-V в его способности локализоваться на мембранах был проведен анализ способности химер hSOS с различными делеционными мутантами МАК-V комплементировать температурно-чувствительную мутацию. Делеция уникального С-концевого домена, как и делеция 26 N-концевых аминокислотных остатков вне каталитического домена МАК-V не влияла на способность химеры с белком hSOS комплементировать мутацию (Рис. 5). Делеция каталитического и убиквитин-ассоциированного (UBA) доменов приводила к неспособности дрожжей расти при непермиссивной температуре. Удаление только домена UBA не приводило к полному ингибированию роста, однако вызывало его значительную супрессию в непермиссивных условиях по сравнению с полноразмерным белком МАК-V в составе химеры с hSOS (Рис. 5). Этот результат указывает на необходимость присутствия домена UBA для обеспечения эффективной мембранной локализации протеинкиназы МАК-V.

Анализ первичной структуры выявил в каталитическом домене МАК-V богатую положительно заряженными аминокислотными остатками последовательность $^{91}\text{KVIDKKRAKK}$, являющуюся частным случаем консенсусной последовательности связывания фосфатидилинозитол-(4,5)-бифосфата (PI(4,5)P₂). Принимая во внимание консервативность этой Lys/Arg-богатой последовательности в протеинкиназах МАК-V человека, мыши, лягушки и рыбы, можно предположить, что именно она может опосредовать взаимодействие МАК-V с PI(4,5)P₂, определяя ассоциацию протеинкиназы с мембраной.

Анализ мембранной локализации протеинкиназы МАК-V в дрожжах показал, что для эффективной ассоциации МАК-V с мембранами необходимо присутствие UBA-домена. UBA-домены АМРК-подобных протеинкиназ играют важную конформационную роль и необходимы для их активации. Можно предположить, что удаление UBA-домена в белке МАК-V может приводить к изменению конформации и/или доступности области в каталитическом домене, содержащей мотив $^{91}\text{KVIDKKRAKK}$, тем самым влияя на способность МАК-V взаимодействовать с PI(4,5)P₂ и локализоваться на мембране.

Таким образом, было обнаружено, что часть клеточного пула протеинкиназы МАК-V ассоциирована с мембранами. Выявлена необходимость участия убиквитин-ассоциированного домена UBA для мембранной ассоциации МАК-V, что является ранее

неизвестной функцией этого домена АМРК-подобных протеинкиназ. Анализ первичной последовательности белка МАК-V выявил в каталитическом домене потенциальный сайт связывания фосфатидилинозитол-(4,5)-бифосфата. Эта последовательность предположительно может опосредовать взаимодействие протеинкиназы МАК-V с мембраной. Обнаруженная в работе ассоциация протеинкиназы МАК-V с мембранами указывает на один из возможных способов регуляции ее активности посредством пространственного контроля и может иметь существенное значение для дальнейшего изучения функций МАК-V в клетке и организме.

3. Взаимодействие протеинкиназы МАК-V с синаптоподином

3.1. Идентификация синаптоподина как белка-партнера по взаимодействию с протеинкиназой МАК-V

Для ассоциации белка МАК-V с определенными молекулярными процессами был предпринят поиск его партнеров по взаимодействию. Аффинная очистка белков из фракции периферических мембран головного мозга мыши на матриксе с иммобилизованной химерой глутатион-S-трансферазы (GST) с рекомбинантным С-концевым доменом МАК-V мыши (GST-C-МАК-V) выявила белок с подвижностью 99 кДа, который был идентифицирован с помощью времяпролетной масс-спектрометрии как синаптоподин (SYNPO).

Вестерн-блот анализ белков, очищенных на матриксе GST-C-МАК-V и на контрольном матриксе, с антителами против синаптоподина показал, что антитела детектируют белок с подвижностью 99 кДа, что соответствует экспериментально

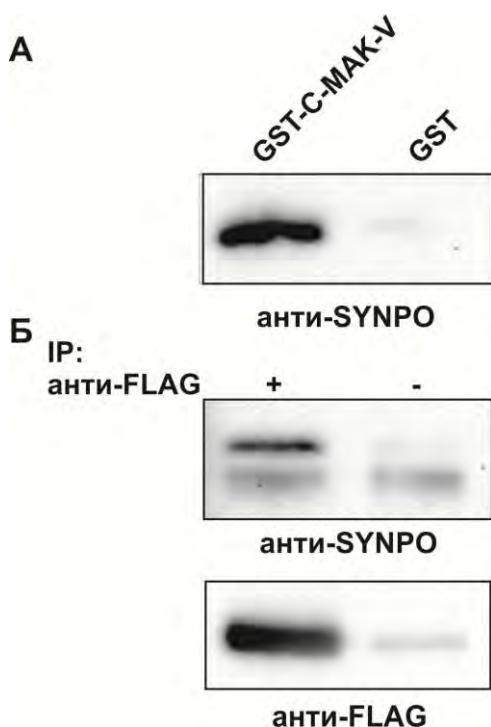


Рис. 6. Взаимодействие синаптоподина с протеинкиназой МАК-V. (А) Вестерн-блот анализ белков периферических мембран головного мозга мыши, очищенных на аффинном матриксе GST-C-МАК-V или на контрольном матриксе GST, с использованием антител против синаптоподина. (Б) Вестерн-блот анализ белков фракции периферических мембран головного мозга мыши, очищенных на иммобилизованной на анти-FLAG аффинном геле полноразмерной протеинкиназе МАК-V-FLAG (IP: анти-FLAG+) или на контрольном матриксе (IP: анти-FLAG-), с использованием антител против синаптоподина. Ниже приведены результаты Вестерн-блоттинга той же мембраны с анти-FLAG-антителами для детекции иммобилизованной на матриксе протеинкиназы МАК-V.

наблюдаемой подвижности синаптоподина, продуцируемого в головном мозге. При этом окраска синаптоподина наблюдалась только в элюате с матрикса с иммобилизованным С-концевым доменом МАК-V (Рис. 6А). Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что синаптоподин специфически взаимодействует с С-концевым доменом белка МАК-V. Для исключения артефактности выявленного взаимодействия по причине использования фрагмента протеинкиназы МАК-V, а не полноразмерного белка, было проанализировано взаимодействие синаптоподина с полноразмерным белком МАК-V. Полноразмерный белок МАК-V-FLAG был очищен на анти-FLAG аффинном геле из клеток линии PC12TetOn с индуцируемой экспрессией МАК-V-FLAG. Аффинный гель с иммобилизованной за FLAG-эпитоп протеинкиназой МАК-V был использован для преципитации синаптоподина из фракции периферических мембран головного мозга мыши. В качестве контроля специфичности взаимодействия использовался анти-FLAG аффинный гель, инкубированный с лизатом клеток, в которых не была индуцирована экспрессия МАК-V-FLAG. В результате было установлено, что синаптоподин связывается с анти-FLAG аффинным гелем только в том случае, если на нем иммобилизована протеинкиназа МАК-V (Рис. 6Б). Таким образом, синаптоподин взаимодействует не только с С-концевым фрагментом, но и с полноразмерной протеинкиназой МАК-V.

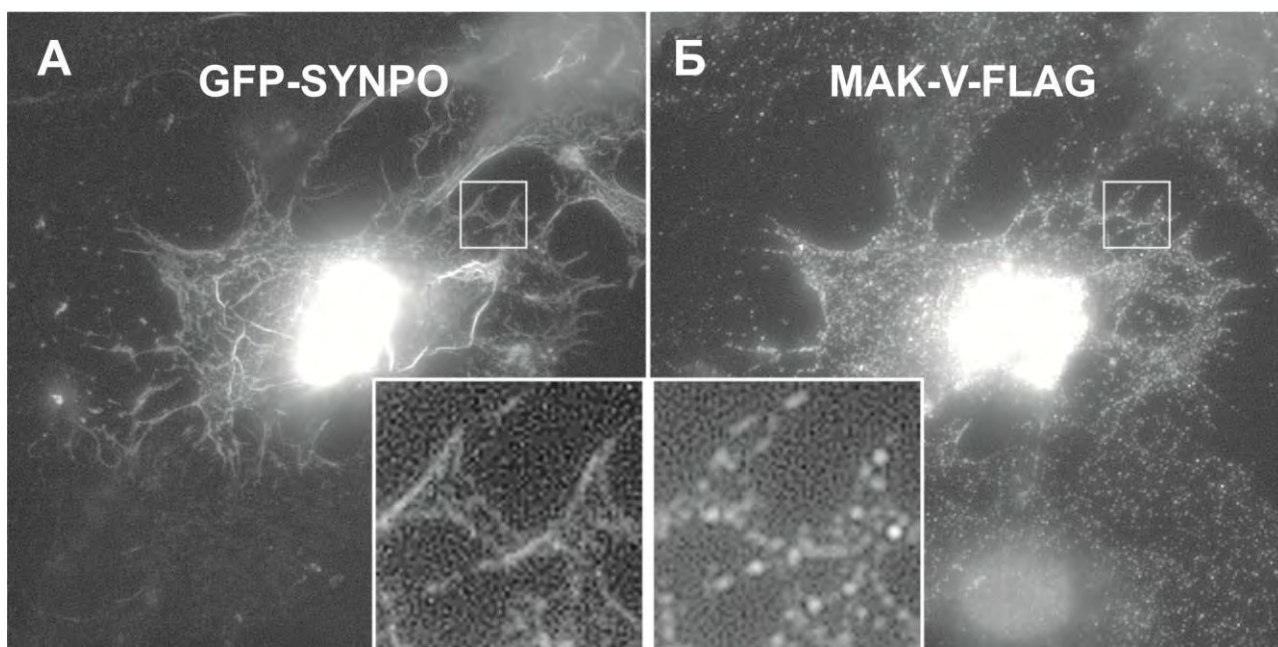


Рис.7. Колокализация протеинкиназы МАК-V и синаптоподина в клетках. Иммунофлуоресцентный анализ клеток линии NCI-H1299, транзитивно продуцирующих GFP-синаптоподин, детектированный по зеленой флуоресценции GFP (А), и протеинкиназу МАК-V с С-концевым FLAG-эпитопом, детектированную с помощью первичных анти-FLAG антител и вторичных антител, меченых красителем AlexaFluor546 (Б). На увеличенных вставках видно, что МАК-V-позитивные везикулы преимущественно располагаются вдоль синаптоподин-позитивных фибрилл.

3.2. Анализ колокализации МАК-V и синаптоподина в клетках

Для дальнейшего подтверждения взаимодействия МАК-V и синаптоподина был проведен анализ их колокализации в клетках. Клетки линии NCI-H1299 были транзиторно трансфицированы плазмидами для продукции белка МАК-V с С-концевым FLAG-эпитопом, и химеры синаптоподина с зеленым флуоресцентным белком (GFP). Синаптоподин, идентификацию которого проводили по флуоресценции GFP (Рис. 7А), локализовался в цитоплазме клеток на актиновых фибриллах, что находится в соответствии с ранее опубликованными результатами. Протеинкиназа МАК-V в клетках линии NCI-H1299 характеризовалась окраской цитоплазматических везикулярных структур (Рис. 7Б). На периферии клетки, где плотность синаптоподин-позитивных структур невелика, явно наблюдалось преимущественное расположение МАК-V-позитивных везикул вдоль синаптоподин-позитивных фибрилл. Такой характер совместной окраски косвенно подтверждает взаимодействие протеинкиназы МАК-V и синаптоподина.

3.3. Анализ взаимодействия протеинкиназы МАК-V и синаптоподина в дрожжах

Для всестороннего подтверждения взаимодействия протеинкиназы МАК-V и синаптоподина была использована двугибридная дрожжевая система. Как видно на Рис. 8, при совместной продукции в дрожжах химер ДНК-связывающего домена транскрипционного фактора GAL4 (GAL4BD) с протеинкиназой МАК-V и активационного домена GAL4 (GAL4AD) с синаптоподином наблюдалась активация репортерного гена *His3*, что подтверждало взаимодействие МАК-V и синаптоподина. В то же время при совместной продукции химеры GAL4BD с протеинкиназой МАК-V и GAL4AD, а также GAL4BD и химеры GAL4AD с синаптоподином активация *His3* отсутствовала, что свидетельствует о специфичности наблюдаемого взаимодействия.

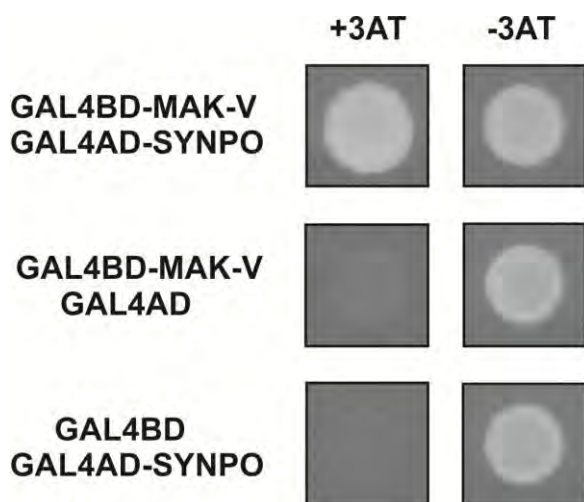


Рис. 8. Взаимодействие протеинкиназы МАК-V и синаптоподина в дрожжах. Показаны результаты анализа активации репортерного гена *His3* по способности дрожжей, продуцирующих химеру GAL4BD-МАК-V или GAL4BD и химеру GAL4AD-SYNPO или GAL4AD в указанных комбинациях, к росту в присутствии 3-амино-1,2,4-триазола (+3AT); (-3AT) – трансформанты дрожжей, выращенные на среде без 3-амино-1,2,4-триазола.

Таким образом, было выявлено взаимодействие протеинкиназы МАК-V и синаптоподина. Учитывая роль синаптоподина в установлении и поддержании долговременной потенциации синапсов, этот результат открывает дальнейшие перспективы для изучения роли протеинкиназы МАК-V в головном мозге в свете ее возможного участия в функционировании синапсов, в процессах памяти, обучения и интеллектуального развития.

4. Взаимодействие белков МАК-V и Nedd4

4.1. Идентификация убиквитин-лигазы Nedd4 как белка-партнера по взаимодействию с МАК-V

Для идентификации белков, взаимодействующих *in vivo* с полноразмерной протеинкиназой МАК-V, белковые комплексы на основе МАК-V очищались на анти-FLAG-аффинном геле из лизатов клеток PC12TetOn с индуцибельной экспрессией МАК-V-FLAG.

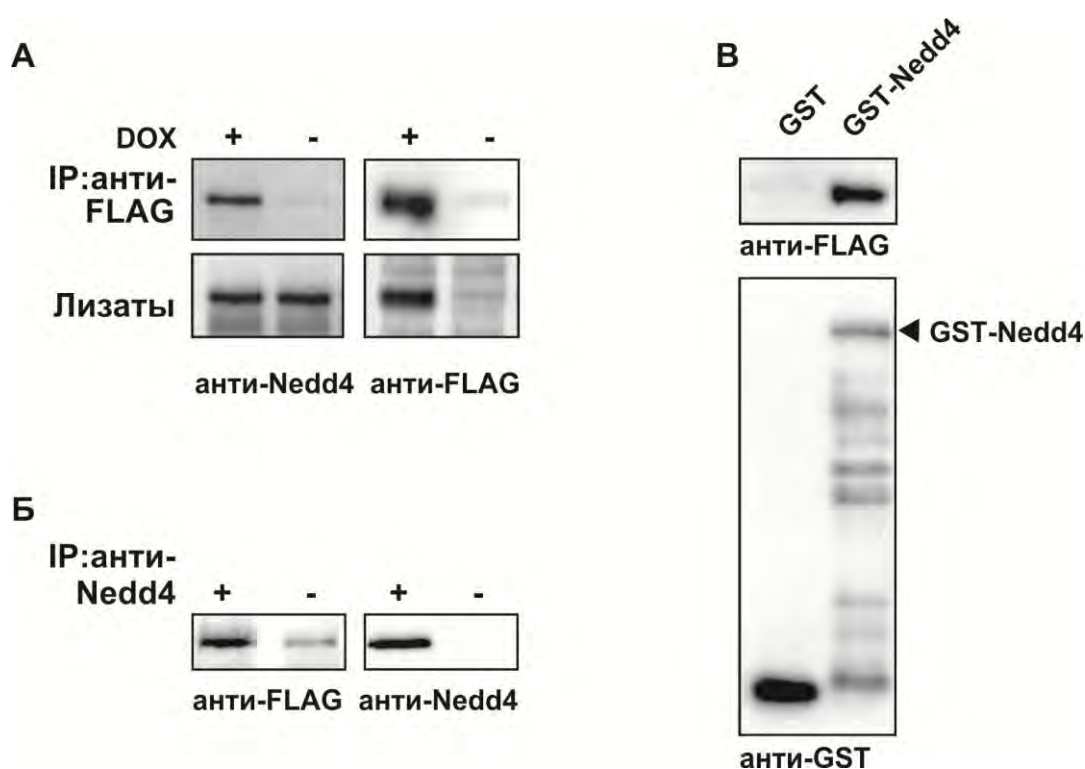


Рис. 9. Взаимодействие белков МАК-V-FLAG и Nedd4. (А) Продукты аффинной очистки (IP:анти-FLAG) и исходные лизаты клеток PC12TetOn, обработанных доксициклином для индукции МАК-V-FLAG (DOX+), и не обработанных доксициклином (DOX-), анализировались Вестерн-блоттингом с использованием анти-Nedd4 и анти-FLAG-антител. (Б) Лизаты клеток PC12TetOn, обработанных доксициклином для индукции МАК-V-FLAG, инкубировались с протеин G-сефарозой с иммобилизованными анти-Nedd4-антителами (+) или без них (-). Связавшиеся белки детектировались Вестерн-блоттингом с использованием анти-Nedd4 и анти-FLAG-антител. (В) Лизаты клеток PC12TetOn, обработанных доксициклином для индукции МАК-V-FLAG, инкубировались с глутатион-сефарозой с иммобилизованными белками GST или GST-Nedd4. Связывание протеинкиназы МАК-V-FLAG детектировалось Вестерн-блоттингом с анти-FLAG-антителами. Иммобилизация белков GST и GST-Nedd4 на глутатион-сефарозе контролировалась Вестерн-блоттингом с антителами против GST.

Белок с подвижностью 115 кД, который присутствовал только в препаратах, полученных из клеток с индуцированной экспрессией МАК-V, был идентифицирован с помощью времяпролетной масс-спектрометрии как убиквитин-лигаза Nedd4 крысы. Результат масс-спектрометрического анализа был подтвержден методом Вестерн-блоттинга с анти-Nedd4-антителами (Рис. 9А). Существование комплексов МАК-V/Nedd4 в клеточных лизатах было подтверждено с помощью обратной ко-иммунопреципитации на протеин G-сефарозе с иммобилизованными антителами против Nedd4 (Рис. 9Б), а также с помощью пулл-даун анализа, в котором лизаты клеток, продуцирующих МАК-V-FLAG, инкубировали с GST или химерой GST-Nedd4, иммобилизованными на глутатион-сефарозе (Рис. 9В).

Для доказательства взаимодействия эндогенных белков МАК-V и Nedd4 было исследовано присутствие комплексов МАК-V/Nedd4 в клетках линии CSML-0 методом ко-иммунопреципитации за анти-МАК-V и анти-Nedd4 антитела. Вестерн-блот анализ результатов ко-иммунопреципитации показал, что эндогенные белки МАК-V и Nedd4 действительно взаимодействуют друг с другом (Рис.10).

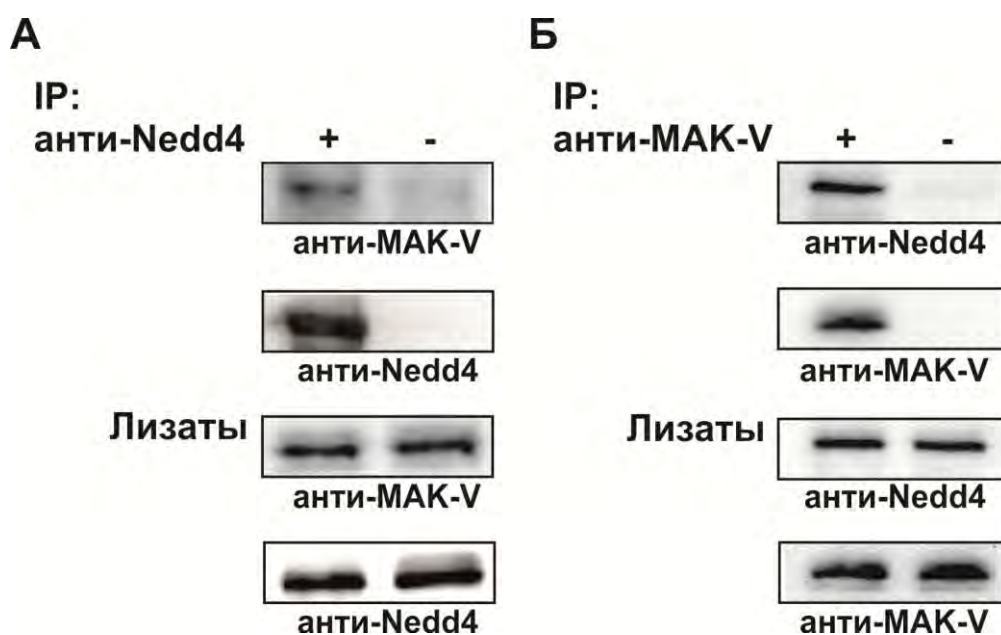


Рис.10. Взаимодействие эндогенных белков МАК-V и Nedd4. (А) Лизаты клеток линии CSML-0 инкубировались с антителами против Nedd4 (*анти-Nedd4+*) или без них (*анти-Nedd4-*), а затем с протеин G-сефарозой. Связавшиеся белки и аликвоты лизатов анализировались Вестерн-блоттингом с антителами против МАК-V и Nedd4. (Б) Лизаты клеток линии CSML-0 инкубировались с антителами против МАК-V (*анти-МАК-V+*) или без них (*анти-МАК-V-*), а затем с протеин G-сефарозой. Связавшиеся белки и аликвоты лизатов анализировались Вестерн-блоттингом с антителами против МАК-V и Nedd4.

4.2 Картирование взаимодействия МАК-V и Nedd4

Доменная организация Nedd4 грызунов типична для семейства Nedd4-подобных НЕСТ-убиквитин-лигаз и представлена N-концевым мембрана-ассоциированным доменом С2, тремя триптофановыми WW доменами и С-концевым каталитическим доменом НЕСТ (Рис.11). Связывание Nedd4-подобных убиквитин-лигаз с другими белками обычно

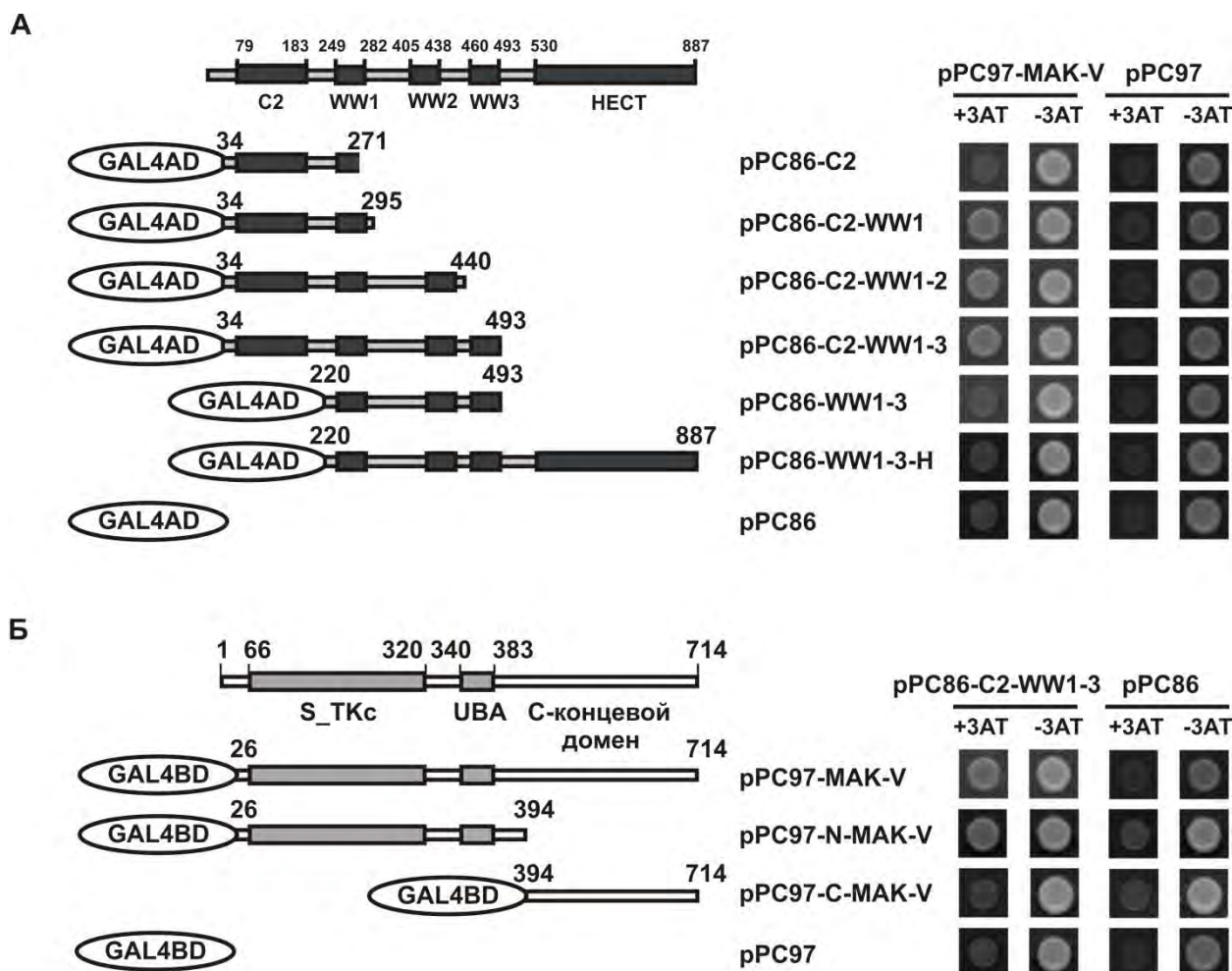


Рис. 11. Картирование взаимодействия между убиквитин-лигазой Nedd4 и протеинкиназой МАК-V в дрожжевой двугибридной системе. (А) Доменная структура Nedd4 мыши. Показаны мембрана-ассоциированный домен С2, триптофановые домены WW и каталитический домен НЕСТ. Границы доменов указаны в аминокислотных остатках. Схема ниже иллюстрирует организацию химер GAL4AD и различных фрагментов Nedd4, использованных в дрожжевом двугибридном анализе. Справа показаны результаты анализа взаимодействия между химерой GAL4BD и протеинкиназой МАК-V (pPC97-МАК-V) и химерами GAL4AD и различных фрагментов Nedd4. Взаимодействие белков детектировалось по способности дрожжей расти в присутствии 3-амино-1,2,4-триазола (+3AT); **(Б)** Доменная организация протеинкиназы МАК-V мыши. Показаны каталитический домен S_TKc, убиквитин-ассоциированный домен UBA и С-концевой домен. Схема ниже иллюстрирует организацию химер GAL4BD и протеинкиназы МАК-V, или ее N- и С-концевых фрагментов, которые были использованы в дрожжевом двугибридном анализе. Справа показаны результаты анализа взаимодействия между химерой GAL4AD и фрагментом Nedd4, состоящем из домена С2 и трех триптофановых доменов WW (pPC86-C2-WW1-3) и химерами GAL4BD и МАК-V или ее фрагментов. Взаимодействие белков детектировалось, как описано в (А).

опосредуется WW доменами убиквитин-лигаз и мотивом PY их партнеров по взаимодействию. Однако первичная последовательность белка MAK-V не содержит мотив PY, что предполагает неканонический механизм связывания Nedd4 с этой протеинкиназой. Действительно, анализ взаимодействия MAK-V с различными делеционными мутантами Nedd4 в дрожжевой двугибридной системе показал, что со стороны Nedd4 это взаимодействие опосредуется доменами C2 и WW1. При этом только WW домены не способны обеспечивать связывание с MAK-V (Рис. 11А). Эксперименты с делеционными мутантами MAK-V выявили участие N-концевого домена MAK-V, содержащего каталитический и UBA домены, но не уникального С-концевого фрагмента протеинкиназы, в связывании с Nedd4 (Рис. 11Б).

Триптофановые домены Nedd4-подобных убиквитин-лигаз обычно связываются с мотивом PY их партнеров по взаимодействию, а с более низкой аффинностью - с последовательностями фосфосерин-пролин и фосфотреонин-пролин. Иногда взаимодействие убиквитин-лигаз семейства Nedd4 с их субстратами опосредуется адапторными белками, содержащими мотив PY. Протеинкиназа MAK-V не содержит мотив PY, но домен WW1 убиквитин-лигазы Nedd4 участвует в связывании MAK-V. Тот факт, что в проведенных экспериментах делеционный мутант Nedd4, содержащий только домены WW (WW1-WW3) не связывался с MAK-V, позволяет предположить, что это взаимодействие характеризуется низкой аффинностью. Так как протеинкиназа MAK-V фосфорилирована в клетках, можно предположить, что WW1 домен убиквитин-лигазы Nedd4 может связываться с низкой аффинностью с последовательностями фосфосерин-пролин и/или фосфотреонин-пролин в белке MAK-V, а домен C2 стабилизирует комплекс MAK-V/Nedd4.

4.3. MAK-V подвергается протеасомной деградации

Обнаружение физического взаимодействия между белками MAK-V и Nedd4 дало основания предполагать, что MAK-V является субстратом убиквитин-лигазы Nedd4. Так как прямые экспериментальные доказательства убиквитинирования протеинкиназы MAK-V отсутствуют, было исследовано, подвержена ли протеинкиназа MAK-V в клетке протеасомной деградации. Клетки PC12TetOn с индуцибельной экспрессией MAK-V-FLAG были обработаны ингибитором протеасом ALLN и аликвоты суммарных клеточных лизатов были проанализированы Вестерн-блоттингом с анти-FLAG-антителами. При этом наблюдалось увеличение содержания белка MAK-V одновременно с появлением анти-FLAG-иммунореактивных полос с большим молекулярным весом, что типично для убиквитинированных белков, подверженных протеасомной деградации (Рис. 12А). Этот

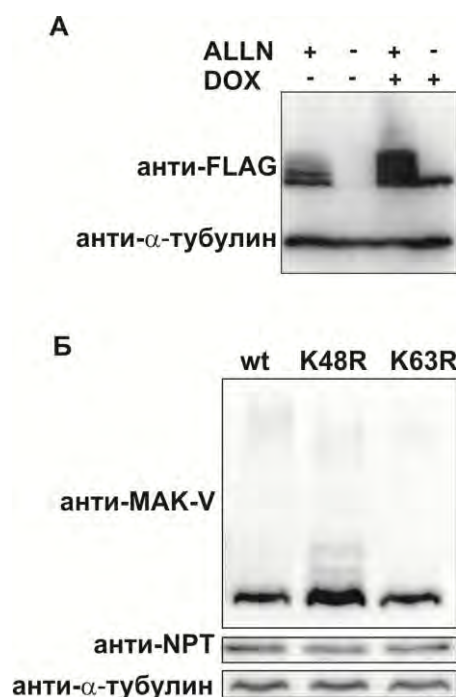


Рис. 12. Протеинкиназа МАК-V подвергается убиквитин-зависимой протеасомной деградации. (А) Обработанные (DOX+) или не обработанные доксициклином (DOX-) клетки PC12TetOn были инкубированы с ALLN (ALLN+) или без ALLN (ALLN-) в течение 8 ч. Показаны результаты Вестерн-блот анализа суммарных клеточных лизатов с анти-FLAG-антителами. (Б) Клетки линии HEK293 были котрансфицированы плазмидой, кодирующей МАК-V-FLAG и плазмидой, кодирующей убиквитин дикого типа (wt), или его мутант K48R (K48R) или его мутант K63R (K63R) с FLAG-эпитопом. Показаны результаты Вестерн-блоттинга суммарных клеточных лизатов с антителами против МАК-V. Для контроля базального уровня экспрессии МАК-V-FLAG мембрана была окрашена антителами против неомицин фосфотрансферазы II (анти-NPT), которая кодируется вектором для продукции МАК-V-FLAG.

результат указывает на то, что МАК-V подвергается протеасомной деградации в клетках. Кроме того, была проведена котрансфекция клеток линии HEK293 плазмидой, кодирующей белок МАК-V-FLAG, и плазмидой, кодирующей убиквитин дикого типа или его мутанты K48R и K63R, дефектные по формированию цепей полиубиквитина. При этом наблюдалось значительное повышение уровня белка МАК-V-FLAG только в случае его совместной продукции с убиквитином, содержащим мутацию K48R, которая оказывает доминантно-негативный эффект на убиквитинирование и протеасомную деградацию белков (Рис. 12Б). Полученные результаты указывают на то, что белок МАК-V убиквитинируется *in vivo* с образованием цепей, сформированных через Lys48 убиквитина, и подтверждают, что белок МАК-V подвержен в клетке протеасомной деградации.

4.4. Nedd4 не участвует в протеасомной деградации МАК-V

Для выяснения, является ли Nedd4 убиквитин-лигазой для протеинкиназы МАК-V, были проведены реакции убиквитинирования *in vitro* с использованием белка МАК-V-FLAG, выделенного из клеток PC12TetOn, и различных E2-убиквитин-конъюгирующих ферментов. При анализе продуктов реакций методом Вестерн-блоттинга были обнаружены высокомолекулярные анти-убиквитин-реактивные белки в продуктах реакций с участием E2-ферментов Ubc5a, 5b и 5c, специфичных для E3-убиквитин-лигазы Nedd4, которая присутствовала в препарате МАК-V-FLAG (Рис. 13А). Однако не были обнаружены анти-МАК-V или анти-FLAG-иммунореактивные полосы с молекулярным весом, соответствующим убиквитинированной протеинкиназе МАК-V (данные не приведены), что

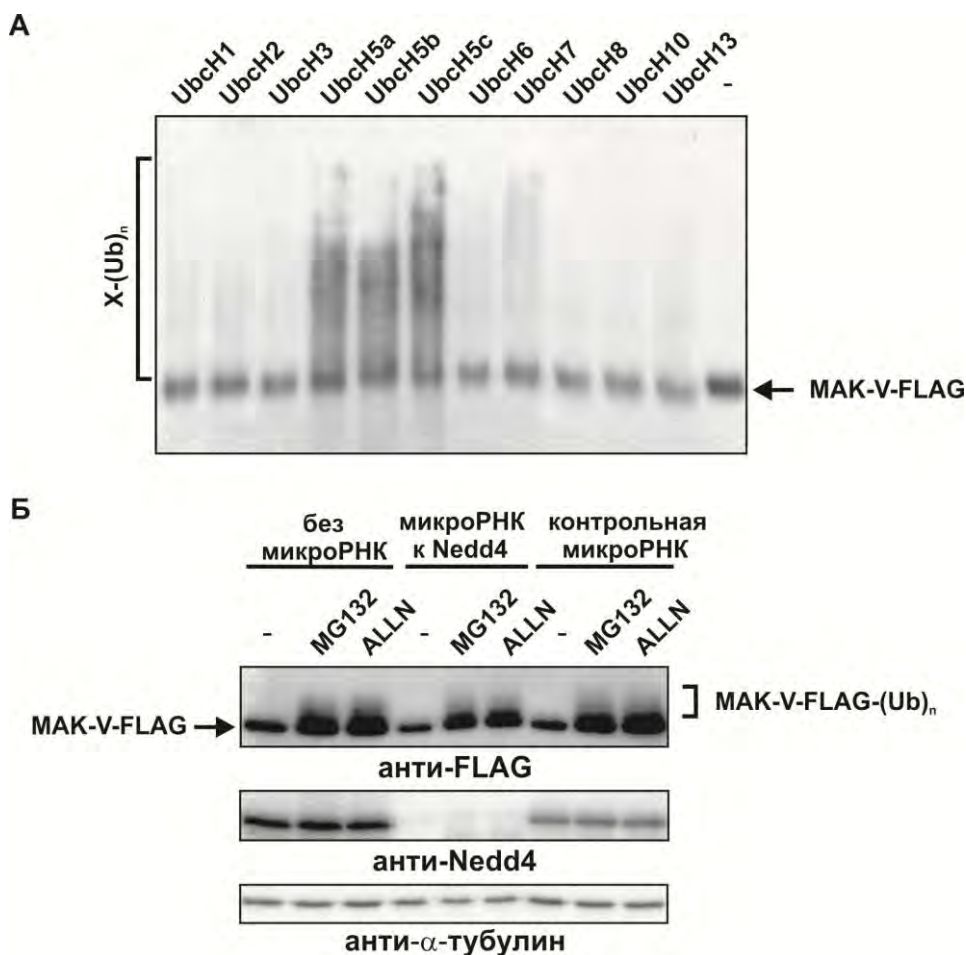


Рис.13. Nedd4 не убиквитинирует протеинкиназу МАК-V. (А) Зависимость убиквитин-лигазной активности, выделяемой в комплексе с МАК-V-FLAG, от E2-ферментов в реакциях убиквитинирования *in vitro*. Показаны результаты Вестерн-блот анализа с использованием конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена для детекции убиквитинированных белков (X-(Ub)_n). Затем эта же мембрана была окрашена анти-FLAG-антителами для детекции протеинкиназы МАК-V-FLAG. (Б) Истощение Nedd4 не влияет на стабилизацию МАК-V-FLAG в клетках при инкубации с ингибиторами протеасом. Клетки PC12TetOn с индуцибельной экспрессией МАК-V-FLAG или их клональные производные, экспрессирующие контрольную микроРНК или микроРНК к *Nedd4*, были обработаны доксициклином для индукции МАК-V-FLAG и инкубировались с ALLN или MG132 в течение 8 ч, или не инкубировались с ингибиторами протеасом (-). Показаны результаты Вестерн-блот анализа суммарных клеточных лизатов с анти-FLAG (*анти-FLAG*) и анти-Nedd4 (*анти-Nedd4*) антителами. Для контроля нагрузки образцов на гель мембрана была окрашена антителами против α-тубулина (*анти-α-тубулин*).

не позволяет связать наблюдаемое полиубиквитинирование с МАК-V-FLAG. Для подтверждения вывода о том, что МАК-V не является субстратом Nedd4, была проанализирована зависимость содержания белка МАК-V от уровня убиквитин-лигазы Nedd4 в клетках PC12TetOn. Были получены клоны продуцирующих МАК-V-FLAG клеток PC12TetOn, которые экспрессировали микроРНК к гену *Nedd4* крысы, либо контрольную микроРНК. Экспрессия микроРНК к *Nedd4*, в отличие от контрольной микроРНК, приводила к значительному понижению уровня белка Nedd4. При этом инкубация клеток с

ингибиторами протеасом MG132 и ALLN вызывала одинаковую стабилизацию белка МАК-V-FLAG независимо от наличия Nedd4 в клетках (Рис. 13Б). Таким образом, полученные экспериментальные данные также указывают на то, что протеинкиназа МАК-V не является субстратом убиквитин-лигазы Nedd4.

Далее, в результате анализа влияния избыточной продукции убиквитин-лигазы Nedd4 на стабильность белка МАК-V не было обнаружено различий в уровнях белка МАК-V, продуцируемого в транзитивно трансфицированных клетках линии НЕК293 совместно с белком Nedd4 или его дефектным по убиквитин-лигазной активности мутантом Nedd4(CS) (Рис. 14А). Также не было обнаружено изменений в кинетике деградации белка МАК-V в этих клетках после блокирования циклогексимидом белкового синтеза *de novo* (Рис. 14Б). Полученные результаты указывают на то, что Nedd4 не является убиквитин-лигазой для протеинкиназы МАК-V и не регулирует ее стабильность в клетке.

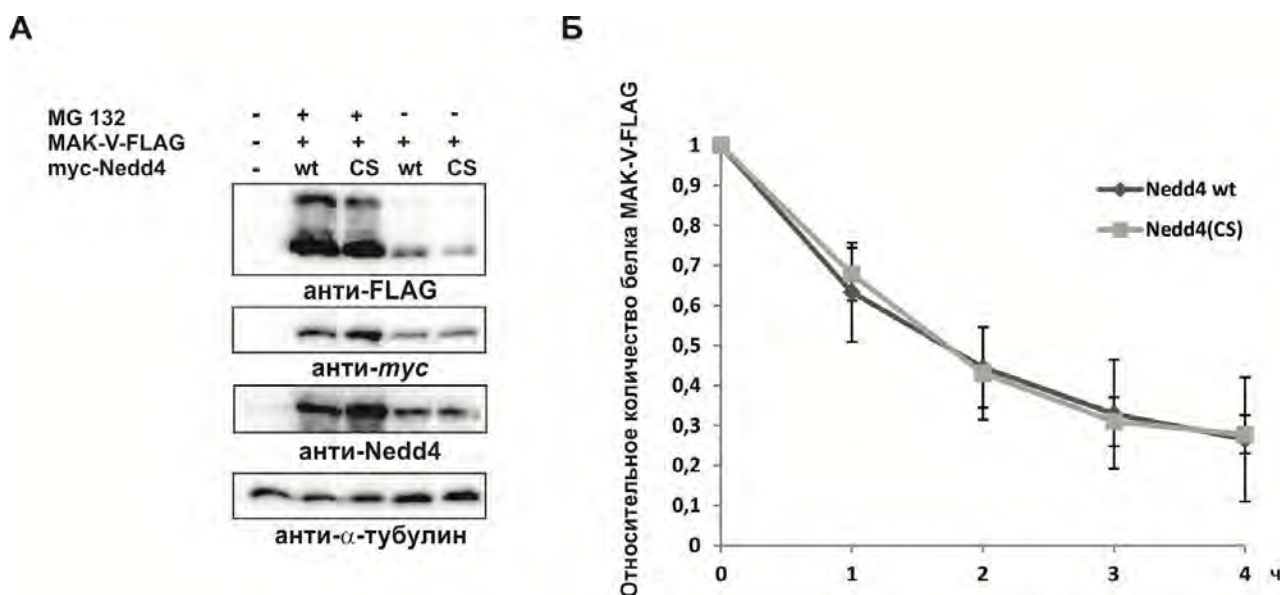


Рис.14. Nedd4 не влияет на уровень белка МАК-V. (А) Клетки линии НЕК293 были трансфицированы плазмидой для продукции МАК-V-FLAG (МАК-V-FLAG+) совместно с плазмидой для продукции белка Nedd4 с *myc*-эпитопом (*wt*), или его каталитически неактивного мутанта Nedd4(CS) с *myc*-эпитопом (*CS*). Для контроля использовались нетрансфицированные клетки (-). Клетки обрабатывались ингибитором протеасом MG132 перед лизисом (MG132+) или не обрабатывались (MG132-). Показаны результаты Вестерн-блот анализа суммарных клеточных лизатов с анти-FLAG-антителами (*анти-FLAG*). Белок Nedd4 детектировался с помощью антител против Nedd4 (*анти-Nedd4*). Экзогенно продуцируемый белок *myc*-Nedd4 детектировался с помощью анти-*myc*-антител (*анти-myc*). (Б) Количественная оценка уровня белка МАК-V-FLAG в клетках линии НЕК293, котрансфицированных плазмидой для продукции МАК-V-FLAG и плазмидой для продукции белка Nedd4 (*Nedd4 wt*) или его мутанта Nedd4(CS) (*Nedd4(CS)*) после обработки циклогексимидом в течение указанного времени в часах (ч).

4.5. *Nedd4* регулирует функции МАК-V независимо от убиквитин-лигазной активности

Ранее было установлено, что протеинкиназа МАК-V регулирует движения конвергентного удлинения и формирование глаз и мозга эмбрионов *Xenopus laevis*, подавляя канонический Wnt сигнальный путь через β -катенин и активируя неканонический Wnt сигнальный путь через протеинкиназу JNK. В соответствии с ранее опубликованными данными, инъекция мРНК *mak-v* в 2 дорсо-анимальных бластомера на стадии 4-8 клеток приводила к серьезным морфогенетическим нарушениям на стадии 38 развития (Рис. 15). Инъекция мРНК *Nedd4* или каталитически неактивного мутанта *Nedd4(CS)* не вызывала никаких явных нарушений развития. Однако совместная инъекция мРНК *mak-v* и *Nedd4* подавляла ингибирующий эффект протеинкиназы МАК-V на движения конвергентного удлинения в эмбрионах *X. laevis*. Подобный эффект наблюдался и при совместной инъекции мРНК *mak-v* и каталитически неактивного мутанта *Nedd4(CS)* (Рис.15). Таким образом, *Nedd4* регулирует функции протеинкиназы МАК-V независимо от убиквитин-лигазной активности.

Можно предположить, что *Nedd4* ингибирует активность МАК-V в результате связывания N-концевой части протеинкиназы, содержащей каталитический и UBA-домены, необходимые для активности АМПК-подобных протеинкиназ. Однако возможны и другие механизмы опосредованной *Nedd4* супрессии МАК-V, которые предстоит исследовать.

Nedd4 участвует в сигнальных каскадах Notch и IGF-1R, а МАК-V регулирует Wnt сигнальный путь. Эти сигнальные каскады тесно скоординированы и контролируют пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток как в развивающемся эмбрионе, так и

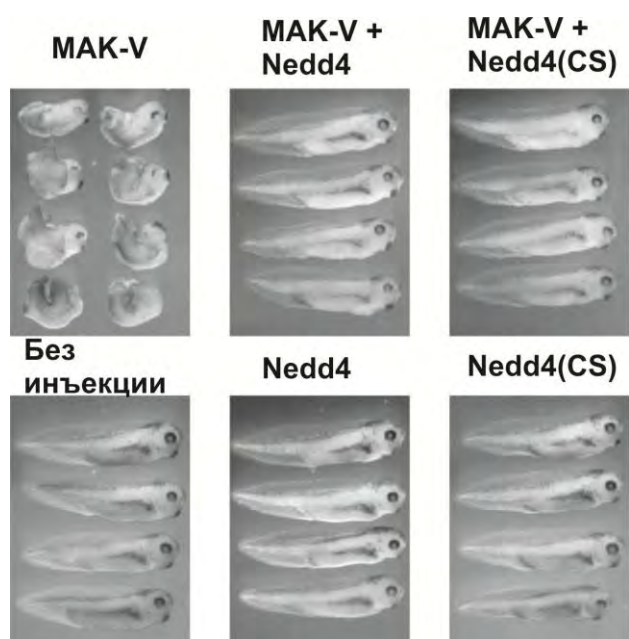


Рис. 15. *Nedd4* подавляет ингибирующее влияние увеличенной экспрессии протеинкиназы МАК-V на движения конвергентного удлинения независимо от убиквитин-лигазной активности. мРНК *mak-v*, *Nedd4*, *Nedd4(CS)* или их комбинации инъекцировали в два дорсо-анимальных бластомера на стадии 4-8 клеток. Показан внешний вид эмбрионов на стадии 38 развития.

во взрослом организме. В то же время остаются не до конца изученными молекулярные механизмы, обеспечивающие взаимодействие этих сигнальных путей. Выявленное в работе взаимодействие протеинкиназы МАК-V с убиквитин-лигазой Nedd4 не только впервые создает механистическую основу для интеграции Nedd4 в Wnt сигнальный путь, но может интегрировать сигнальные пути Wnt, Notch и IGF-1R через взаимодействие МАК-V с Nedd4. Это открывает дальнейшие перспективы для изучения роли протеинкиназы МАК-V в эмбриональном развитии позвоночных и в канцерогенезе.

ВЫВОДЫ

1. Анти-апоптотическая функция протеинкиназы МАК-V в клетках PC12TetOn с индуцибельной экспрессией МАК-V мышцы не связана с регуляцией фосфорилирования кофилина 1 и степени активации сигнальных путей протеинкиназ ERK1/2 и Akt.
2. Впервые показано, что белок МАК-V способен локализоваться на мембранах клетки, что может иметь функциональное значение.
3. Синаптоподин впервые выявлен как белок, взаимодействующий с протеинкиназой МАК-V.
4. Протеинкиназа МАК-V убиквитинируется *in vivo* с образованием цепей, сформированных через Lys48 убиквитина, и подвержена в клетке протеасомной деградации.
5. E3 убиквитин-лигаза Nedd4 впервые выявлена как партнер по взаимодействию с протеинкиназой МАК-V.
6. E3 убиквитин-лигаза Nedd4 не участвует в убиквитинировании протеинкиназы МАК-V, но регулирует ее функции *in vivo* по убиквитин-лигаза-независимому механизму.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Калиниченко СВ, Коробко ЕВ, Коробко ИВ. Мембранная локализация протеинкиназы МАК-V. *Биохимия*. 2008;73(3):342-348.
2. Korobko IV, Kalinichenko SV, Korobko EV, Ninkina NN, Kiselev SL, Buchman VL. Pro-survival activity of the MAK-V protein kinase in PC12 cells. *Cell Cycle*. 2010;9(20):4248-4249.
3. Калиниченко СВ, Вихрева ПН, Коробко ИВ. Взаимодействие протеинкиназы МАК-V и синаптоподина. *Биохимия*. 2011;76(2):238-244.
4. Kalinichenko SV, Itoh K, Korobko EV, Sokol SY, Buchman VL, Korobko IV. Identification of Nedd4 E3 ubiquitin ligase as a binding partner and regulator of MAK-V protein kinase. *PLoS One*. 2012;7(6):e39505.

Тезисы конференций:

1. Вихрева ПН, Калиниченко СВ, Коробко ИВ. Взаимодействие АМПК-подобной протеинкиназы МАК-V и убиквитин-лигазы Nedd4. XX зимняя международная молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Россия, Москва, 11-15 февраля 2008 г., сборник тезисов, с. 109.
2. Kalinichenko SV, Vikhрева PN, Korobko IV. Study of the interaction between MAK-V proteinkinase and Nedd4 ubiquitin ligase. International Conference on Biomolecular Science in honor of the 75th anniversary of the birth of Professor Yuri Ovchinnikov. Russia, Moscow-Pushchino, September 28-October 2, 2009. Abstract book, p. 230.
3. Kalinichenko SV, Vikhрева PN, Korobko IV. Study of the interaction between MAK-V proteinkinase and Nedd4 ubiquitin ligase. International symposium "Control of gene expression and cancer". Russia, Moscow, June 21th-25th, 2010. Proceedings, section "Cancer", p. 74

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю И.В. Коробко за чуткое руководство, за неоценимые научные и практические советы, а также за критическое чтение диссертации;

С.Ю. Соколу (Mount Sinai School of Medicine, г. Нью-Йорк, США) за организацию экспериментов с эмбрионами лягушки, позволивших выявить функциональность взаимодействия белков МАК-V и Nedd4;

Р.Х. Зиганшину (ИБХ РАН, г. Москва) за проведение масс-спектрометрического анализа;

Е.В. Коробко и Е.Ю. Лысюк (ИБГ РАН, г. Москва) за помощь в работе с культурами клеток; а также всем сотрудникам Отдела генной терапии рака ИБГ РАН за моральную поддержку, советы и помощь в работе, теплую и дружескую атмосферу в коллективе.