

Субклітинна локалізація адаптерного білка Ruk₁ у клітинах HEK293

В. Р. Дрель, О. Ю. Паливода, Г. Ю. Шуваєва, Н. І. Ігуменцева,
Ю. Я. Кіт, І. Т. Гут^{1, 2}, В. Л. Бухман³, Л. Б. Дробот

Інститут біології клітини НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, 79005, Україна

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

²Інститут Людвіга з вивчення раку
W1P8BP, Лондон, 91, Райдинг Хаус Стрит, Велика Британія

Едінбургський університет
EH9 1QH, Едінбург, Велика Британія

E-mail: drobot@biochem.lviv.ua

Субклітинну локалізацію адаптерного білка Ruk₁ досліджували в клітинах ембріональної нирки людини лінії HEK293, трансфікованих вектором pRc/CMV2/Ruk₁-Glu-tag. Імунофлуоресцентним аналізом показано, що рекомбінантний білок дифузно розподілений в цитоплазмі і ядрі трансфікованих клітин HEK293 з формуванням чітких пунктів, локалізованих в ядрі, які, найімовірніше, відповідають ядерцям. Ядерна локалізація Ruk₁ підтверджена імуноблотингом екстрактів ізольованих ядер трансфікованих клітин HEK293 з використанням моноклональних анти-Glu-tag антитіл, а також нетрансфікованих клітин HEK293 і клітин U937 з використанням поліклональних анти-Ruk₁ антитіл. Імунодот-блот аналізом виявлено здатність афінно очищеного препарату Ruk₁ Glu-tagged взаємодіяти з ДНК тижусу теляти, але не з ДНК Escherichia coli. Ядерна локалізація Ruk₁ дозволяє передбачити виконання адаптерним білком нових, поки що не з'ясованих функцій, в ядрі еукаріотичної клітини.

Вступ. Src-гомологічні домени типу 3 (SH3) вперше ідентифіковано як некаталітичні структурні компоненти протеїнкінази родини Src [1]. Наступними дослідженнями встановлено, що згадані домени представляють собою невеликі білкові модулі довжиною 50—70 амінокислотних залишків, які опосередковують білково-білкові взаємодії шляхом селективного зв'язування Pro-збагачених послідовностей у складі внутрішньоклітинних сигнальних білків-мішеней [2—4]. SH3 домени виявлено в структурі як ензимів, тирозинових протеїнкіназ, фосфатаз, ліпаз [5, 6], так і цитоскелетних білків та різноманітних адаптерів [7—9]. Показано, що SH3 домени регулюють ферментативну активність

асоційованих білків [10, 11], модулюють GTPазну активність високоафінних GTPаз [12], визначають внутрішньоклітинну локалізацію комплексів сигнальних білків [13, 14]. Білково-білкові взаємодії, опосередковані SH3 доменами, відіграють також важливу регуляторну роль у внутрішньоклітинному транспорті везикул [15], змінах архітектури клітини, залежних від функціонального стану актинового цитоскелету [16—18], ядерних подій [19—22].

Ряд відомих на сьогоднішній день адаптерних білків включає множинні SH3 домени, що потенційно може призводити до формування кластерів лігандів з різними біологічними функціями. Одним з механізмів модулювання складу таких комплексів є фосфорилування залишків Ser і Thr, сусідніх із Pro-збагаченими послідовностями [23].

© В. Р. ДРЕЛЬ, О. Ю. ПАЛИВОДА, Г. Ю. ШУВАЄВА,
Н. І. ІГУМЕНЦЕВА, Ю. Я. КІТ, І. Т. ГУТ,
В. Л. БУХМАН, Л. Б. ДРОБОТ, 2002

Так, нещодавно клонований білок Ruk₁ включає три SH3 домени, Pro- та Ser-збагачені послідовності, C-кінцевий «coiled-coil» район і взаємодіє *in vitro* з такими сигнальними білками, як p85α регуляторна субодиниця фосфатидилінозит-3-кінази, Crk, Grb2, cCbl, Sos, p130^{Cas} [24—26]. Беручи до уваги ці дані, а також широке розповсюдження Ruk₁ у різних типах тканин і клітин в культурі, існування множинних ізоформ Ruk, які є результатом ініціації транскрипції з різних промоторів і альтернативного сплайсингу [24], можна припустити, що вказаний сигнальний білок відіграє інтегруючу роль у реалізації багатьох, поки що не з'ясованих, біологічних відповідей клітини. Результати імунофлуоресцентного аналізу та Вестерн-блотингу, наведені в даній роботі, свідчать про можливість локалізації адаптерного білка Ruk₁ не лише в цитоплазмі, але і в ядрі клітин. Показано також, що рекомбінантному білкові Ruk₁ Glu-tagged притаманна здатність взаємодіяти з ДНК *in vitro*.

Матеріали і методи. *Культивування клітин та отримання клітинних лізатів.* В експериментах використовували клітини ембріональної нирки людини лінії HEK293 та лейкемічні промонуцитарні клітини людини лінії U937, отримані з колекції клітинних культур Інституту цитології АН Росії. Клітини HEK293 культивували в середовищі DMEM, а клітини U937 — у середовищі RPMI 1610, що містило 10 % ембріональної сироватки телят («GibcoBRL», Велика Британія), 2 mM L-глутамін, 50 МО/мл пеніциліну та 50 мкг/мл стрептоміцину, у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ при температурі 37 °С. Для отримання загальних лізатів клітини двічі промивали охолодженим забуференим фізіологічним розчином (ЗФР), що містив 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄ (рН 7,3), і лізували на льодяній бані в буфері наступного складу: 10 mM трис-НСІ (рН 7,5), 150 mM NaCl, 1 %-й тритон X-100, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM фенілметансульфонілфторид (PMSF) («Fluka», Швейцарія), 5 mM бензамідин, 25 мкг/мл апротиніну («Sigma», США), 10 мкг/мл лейпептину («Sigma»), 1 мкг/мл пепстатину («Fluka») протягом 20 хв. Детергент-нерозчинну фракцію осаджували центрифугуванням при 12000 об/хв протягом 15 хв. Концентрацію білка в супернатантах визначали за методом Петерсона [27]. Зразки лізатів, зрівноважені за концентрацією білка, прогрівали в буфері для зразків Леммлі при 95 °С протягом 5 хв і розділяли електрофорезом у 5—17 %-му ПААГ за присутності SDS [28].

Конструювання вектора pRc/CMV2/Ruk₁-Glu-tag. Для субклонування Glu-tagged білка викори-

стано вектор pRc/CMV2 із вставкою повнорозмірної форми білка Ruk. Нуклоти́дну послідовність, яка кодувала C-кінцевий фрагмент білка, модифікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Сенсовий праймер включав послідовність навколо *ApaI* центра (5'-GCGACCAGTGGGCCCCA-CTGACACA-3'), а антисенсовий праймер — послідовності для ендонуклеаз рестрикції *EcoRI* і *ApaI*, стоп-кодону, Glu-tag епітопу та 3'-кінцевого фрагмента кДНК білка Ruk₁ (5'-GATGAATTCGGG-CCCTCACTCCATCGGCATGAACTCCATTTT-GATTGGATAGCTTTCTTCTT-3'). Ампліфіковану кДНК субклонували у вектор pRc/CMV2/Ruk₁ за центром упізнавання ендонуклеазою рестрикції *ApaI*. Плазмідну ДНК очищували за допомогою набору реактивів «NucleoSpin System» («NT», Велика Британія).

Тимчасова трансфекція клітин лінії HEK293. Перед трансфекцією клітини HEK293 культивували на чашках Петрі діаметром 10 см до досягнення 70 % конfluence. Клітини трансфікували плазмідною ДНК (10 мкг на чашку) з використанням ліпофектаміну («GibcoBRL») згідно з протоколом компанії.

Отримання ядерних екстрактів. Ядра клітин отримували гіпотонічним лізисом. Для цього до осаду клітин (6·10⁶ клітин) додавали охолоджений на льоду гіпотонічний буфер лізису, що містив 20 mM трис-НСІ (рН 7,4), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT та інгібітори протезаз та фосфатаз (1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10 mM β-глицерофосфат, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, пепстатин, лейпептин і апротинін по 10 мкг/мл кожного), і через 30 хв гомогенізували в гомогенізаторі Даунса. Ядра осаджували центрифугуванням гомогенату в гіпотонічному буфері за присутності 1 mM сахарози при 1600 г впродовж 15 хв і промивали цим же буфером. Ядра лізували 1 %-м нонідестом Р-40 у гіпотонічному буфері, розчинну і нерозчинну фракції розділяли центрифугуванням при 10000 г (15 хв).

Імуноблотинг білків. Білки розділяли електрофорезом в градієнтному (5—17 %) ПААГ у буферній системі Леммлі [28] і переносили на полівінілідифторидну мембрану («Whatman», Велика Британія) протягом 2 год при силі струму 250 мА в буфері, що містив 20 mM трис, 192,5 mM гліцин (рН 8,3), 0,1 %-й SDS, 20 %-й метанол. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 5 %-м сухим обезжиреним молоком в ЗФР/0,05 % твін-20. Детекцію білка Ruk₁ Glu-tagged здійснювали з використанням мноклональних анти-Glu-tag антитіл («Sigma»). Ендогенні

форми білка Ruk на блотах виявляли з використанням поліклональних моноспецифічних антитіл до унікальної С-кінцевої послідовності з 17 амінокислотних залишків білка Ruk [24]. Як другі антитіла використовували анти-мишачі або анти-кролячі IgG відповідно, кон'юговані з пероксидазою хрому («Sigma»). Імунореактивні плями виявляли за допомогою реагента для посиленої хемілюмінесценції (ECL) («Amersham», Велика Британія).

Імунофлуоресцентна мікроскопія. Для імунофлуоресцентного аналізу клітини HEK293 культивували на предметних скельцях і трансфікували, як описано вище. Фіксовані препарати обробляли за стандартним протоколом. Детекцію білка Ruk, Glu-tagged здійснювали з використанням моноклональних анти-Glu-tag антитіл. Як другі антитіла використовували анти-мишачі IgG, кон'юговані з FITC («Pierce», США). Отримані препарати аналізували під флуоресцентним мікроскопом фірми «Zeiss» (Німеччина).

Очищення рекомбінантного білка. Рекомбінантний білок Ruk, Glu-tagged очищували афінною хроматографією на білок-G-сефарозі, ковалентно кон'югованій з моноклональними анти-Glu-tag антитілами. Специфічно зв'язані білки елюювали в присутності 100 мкг/мл синтетичного Glu-tag пептиду в 50 мМ трис-НСІ (рН 7,5), 300 мМ NaCl. Отриманий елюат діалізували проти 50 мМ трис-НСІ (рН 7,5), що містив 150 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 50 %-й гліцерин.

Дот-блот аналіз. ДНК тимусу телят та ДНК *E. coli* наносили на нітроцелюлозну мембрану у вигляді дискретних зон від 0,2 до 12 мкг у точку, опромінювали ультрафіолетом при 384 нм протягом 2 хв та висушували при 60 °С 5 хв. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 5 %-м сухим обезжиреним молоком в ЗФР/0,05 % твін-20. Отриманий дот-блот інкубували з препаратом Ruk, Glu-tagged (2 мкг/мл). Детекцію Ruk, Glu-tagged здійснювали з використанням анти-Glu-tag антитіл. Як другі антитіла використовували анти-мишачі IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому. Контрольний дот-блот інкубували лише з антитілами. Імунореактивні плями виявляли реагентом для посиленої хемілюмінесценції (ECL).

Результати і обговорення. Спільними рисами структурно-функціональної організації представників нової родини адаптерних/«scaffold» білків (Ruk/CIN85, CMS, CD2AP) є наявність на N-кінці множинних SH3 доменів, а на С-кінці — суперспіралізованого «coiled-coil» району [24—26]. Білки цієї родини беруть участь у регуляції апоптозу, функціонального стану актинового цитоскелету,

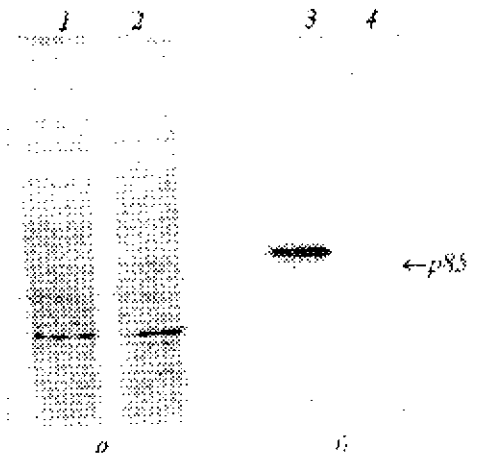


Рис. 1. Експресія адаптерного білка Ruk₁ Glu-tagged у клітинах лінії HEK293. Клітини трансфікували вектором *pRc/CMV2/Ruk₁-Glu*. Рівень експресії рекомбінантного білка визначали в загальноклітинних лізатах трансфікованих клітин методом імуноблотингу з використанням моноклональних антитіл до Glu-tag епітопу: *a* — 5–17 %-й ПААГ, зафарбований Кумасі R-250; *b* — імуноблотинг (1, 3 — клітини HEK293, трансфіковані рекомбінантним вектором; 2, 4 — клітини HEK293, трансфіковані вектором *pRc/CMV2* без вставки)

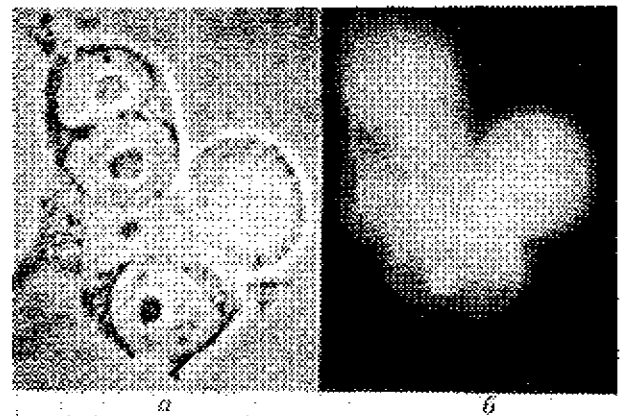


Рис. 2. Субклітинна локалізація адаптерного білка Ruk₁ у клітинах HEK293, трансфікованих вектором *pRc/CMV2/Ruk₁-Glu-tag*. Скельця, на яких вирощували клітини, обробляли, як наведено в «Матеріалах і методах». Як перші антитіла використовували анти-Glu-антитіла, як другі — анти-мишачі IgG, мічені FITC: *a* — світлова мікроскопія; *b* — флуоресцентна мікроскопія

мітогенній сигналізації. Для подальшого аналізу біологічної ролі білка Ruk₁ нами створено вектор для експресії в клітинах ссавців *pRc/CMV2/Ruk₁-Glu-tag*, що кодував на С-кінці додатково молекулярну мітку, так звану Glu-tag послідовність

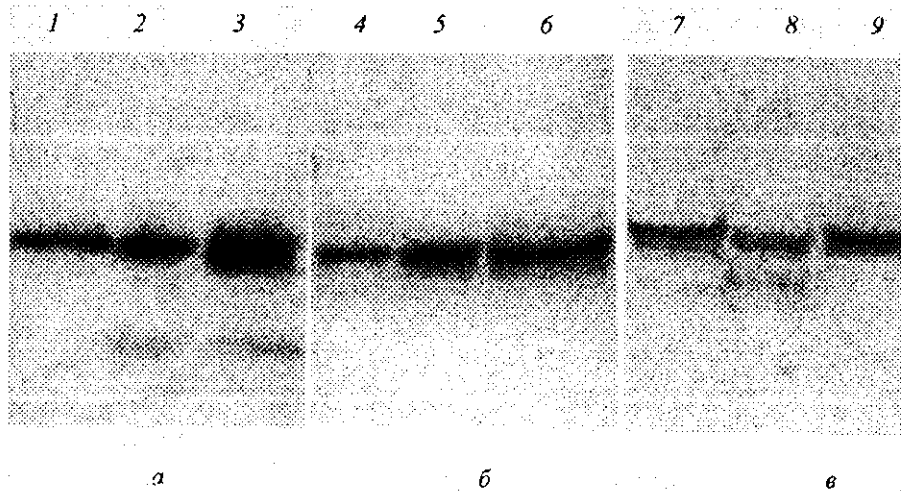


Рис. 3. Ідентифікація адаптерного білка Ruk₁ у ядерній і цитоплазматичній фракціях в клітинах HEK293, трансфікованих вектором *pRc/CMV2/Ruk₁-Glu-tag* (а), нетрансфікованих клітинах HEK293 (б) і клітинах U937 (в). Детекцію Ruk₁ здійснювали методом імуноблотингу з використанням анти-Glu-tag антитіл (а) та поліклональних анти-Ruk₁ антитіл (б, в): 1, 4, 7 — ядерні фракції; 2, 5, 8 — цитозольні фракції; 3, 6, 9 — загальноклітинні лізати

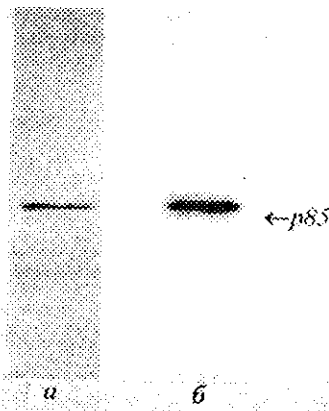


Рис. 4. Очищення Ruk₁ Glu-tagged з клітин HEK293, трансфікованих *pRc/CMV2/Ruk₁-Glu-tag*, афінною хроматографією на білок-G-сефарозі, з ковалентно пришитими моноклональними анти-Glu-tag антитілами. Специфічно зв'язані білки елюювали Glu-tag пептидом (100 мкг/мл) з наступним імуноблотингом: 1 — 5—17 %-й ПААГ, зафарбований сріблом; 2 — імуноблотинг білків елюату з використанням моноклональних анти-Glu-tag антитіл

(MEFMPME), до якої існують високоафінні антитіла. Клітини HEK293 трансфікували рекомбінантним вектором за допомогою ліпосомної техніки. Рівень експресії Glu-tagged форми білка Ruk₁ аналізували в загальноклітинних лізатах методом імуноблотингу з використанням моноклональних анти-Glu-tag антитіл. Як видно з даних рис. 1, б, Glu-tagged білок з молекулярною масою близько 85 кДа, яка відповідає повнорозмірній формі досліджуваного адаптера, ефективно експресується в трансфікованих клітинах HEK293.

Субклітинну локалізацію Ruk₁ Glu-tagged вивчали імунофлуоресцентним методом. Як другі антитіла використовували анти-мишачі антитіла, мічені флуоресцеїном. За результатами імунофлуоресцентної мікроскопії (рис. 2, б), Ruk₁ дифузно розподілений як у цитоплазмі, так і в ядрах клітин HEK293 з формуванням чітких пунктів, локалізованих в ядрі, які, найімовірніше, відповідають ядрцям (рис. 2, а).

Для підтвердження можливої локалізації Ruk₁ в ядрі клітин нами було ізольовано ядра з клітин HEK293 (трансфікованих *pRc/CMV2/Ruk₁-Glu-tag* і не трансфікованих) та клітин U937 з наступним імуноблотингом ядерних екстрактів (рис. 3). Проведені експерименти свідчать, що рекомбінантна і ендогенна форми Ruk₁ з молекулярною масою 85 кДа детектуються як в ядерній, так і в цитоплазматичній фракціях досліджуваних клітин, що узгоджується з даними імунофлуоресцентного аналізу. Слід, однак, відмітити, що в ядрі переважно виявляється форма з меншою електрофоретичною рухливістю в порівнянні зі спектром смуг, характерним для загальноклітинних лізатів і цитоплазматичної фракції. Згідно з численними даними літератури, поява менш рухливих форм сигнальних білків при електрофорезі в ПААГ за присутності SDS є результатом, як правило, їхньої посттрансляційної модифікації шляхом фосфорилування. Групою американських дослідників, яка незалежно відклонувала ортолог Ruk₁ людини, білок CIN85, було показано, що делеційний мутант CIN85 без С-кінцевого «coiled-coil» району при експресії в клітинах HeLa виявляється винятково в ядрі клітин, у той час як присутність останнього визначає цитоплазматичну локалізацію вказаного адаптера

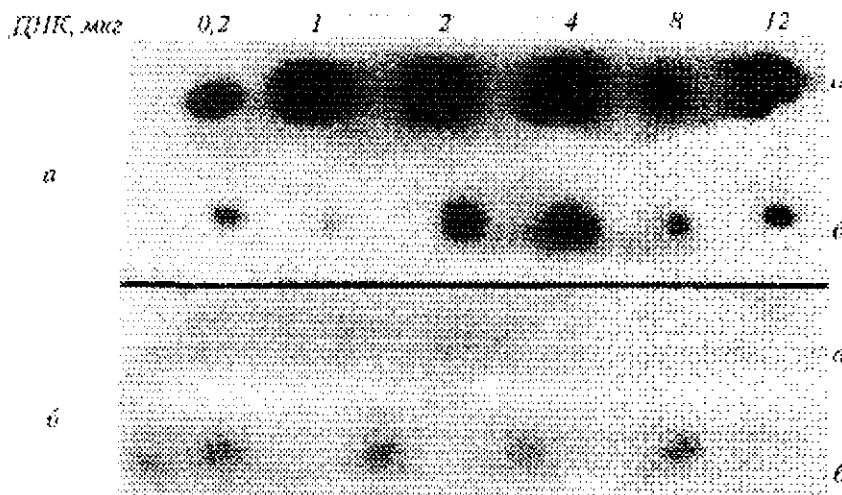


Рис. 5. Імунодот-блот аналіз специфічності афінно очищеного препарату Ruk₁ Glu-tagged до ДНК з використанням моноклональних анти-Glu-tag антитіл. Дот-блот (А) інкубували з Ruk₁ Glu-tagged (2 мкг/мл) з наступним імуоблотингом. Контрольний дот-блот (Б) інкубували лише з антитілами: а — ДНК тимусу теляти; б — ДНК *E. coli*

[29]. Беручи до уваги отримані нами дані щодо виявлення в ядерних екстрактах електрофоретично менш рухливої форми Ruk₁ у порівнянні з цитоплазматичною фракцією і загальноклітинними лізатами, не виключено, що зміни конформації білка, індуковані фосфорилуванням у специфічних фізіологічних ситуаціях, можуть спричинювати екранування одних районів і експонування інших та, як наслідок, зміну внутрішньоклітинної локалізації адаптерного білка залежно від клітинного контексту.

Локалізація рекомбінантного білка в ядрі клітин HEK293, а також наявність у структурі Ruk₁ кластеру позитивно заряджених амінокислотних залишків, до складу якого входять п'ять залишків Arg (N-97RRRRR-C), дозволяють також припустити, що досліджуваний білок може прямо або опосередковано утворювати надмолекулярні комплекси не лише з білками, а й з нуклеїновими кислотами.

Для дослідження білково-нуклеїнової взаємодії в умовах *in vitro* нами отримано афінно очищений препарат Ruk₁ Glu-tagged за допомогою хроматографії лізатів трансфікованих клітин HEK293 на білок-G-сефарозі з ковалентно кон'югованими моноклональними анти-Glu-tag антитілами. За результатами електрофоретичного аналізу (рис. 4, доріжка 1), очищений препарат рекомбінантного білка містить незначні кількості інших білків, які, не виключено, є специфічними сфекторними мішенями досліджуваного адаптера в умовах *in vivo*, у той час як методом імуоблотингу виявляється лише смуга з молекулярною масою близько 85 кДа (рис. 4, доріжка 2). Отриманий препарат Ruk₁ Glu-tagged інкубували з нітроцелюлозною мембра-

ною, на яку було нанесено у вигляді дискретних концентричних зон різні кількості ДНК тимусу теляти та ДНК *E. coli* (рис. 5). Після імуоблотингу з використанням анти-Glu-tag антитіл виявилось, що рекомбінантний білок специфічно і дозозалежно зв'язується з ДНК вищих еукаріотів і лише в незначному ступені — з ДНК бактерій. На даному етапі досліджень неможливо поки що зробити висновок, чи притаманна адаптерному білку Ruk₁ і/або білкам, які виділяються разом з ним у процесі афінного очищення, здатність до асоціації з ДНК.

У низці публікацій останніх років наведено свідчення того, що SH3-вмісні білки можуть бути залучені до виконання різноманітних сигнальних функцій в ядрі клітин. Так, SH3 домен аргінін-метилтрансферази людини HRMT1L1 опосередковує взаємодію з недавно ідентифікованим представником (E1B-AP5) родини гетерогенних ядерних рибонуклеопротеїнів, які діють на різних стадіях метаболізму РНК [30], а ядерний SH3-зв'язуючий білок SNP70 співлокалізується з факторами сплайсингу РНК [31]. Адаптерний білок Grb4, до складу якого входять три SH3 домени і один SH2 домен, функціонує як ядерний репресор *v-Abl*-індукованої транскрипції з *c-jun/c-fos* промоторних елементів [32]. Цікаво, що Pго-збагачений домен p53, який має потенціал для взаємодії з SH3 доментами сигнальних білків, опосередковує зв'язування p53 з ядерним матриксом і рівень цього зв'язування зростає в результаті генотоксичного стресу [21]. На якому з рівнів ядерної сигналізації може функціонувати адаптерний білок Ruk₁ та механізми його взаємодії із ДНК, покажуть наступні дослідження.

V. R. Drel, Yu. Ya. Kit, O. Yu. Danyluk, G. Yu. Shuvajeva,
N. I. Ihumenceva, I. T. Gout, L. B. Drobot

Subcellular localization of adapter protein Ruk₁ in HEK293 cells

Summary

Subcellular localization of adapter protein Ruk₁ has been investigated in human embryonic kidney HEK293 cells transfected with pRc/CMV2/Ruk₁-Glu-tag. Using immunofluorescence microscopy, it was shown that the recombinant protein was distributed diffusely in both cytoplasm and nucleus, but with punctated structures in the nucleus, which correspond in all probability to the nucleolus. The Ruk₁ localization in the nucleus was confirmed by Western blotting of nucleic extracts prepared from transfected HEK293 cells using monoclonal anti-Glu-tag antibodies, as well as from nontransfected HEK293 and U937 cells using polyclonal anti-Ruk antibodies. The ability of affine purified Ruk₁ Glu-tagged preparation to bind to DNA from calf thymus, but not to *Escherichia coli* DNA, was revealed by the immunodot-blot analysis. The nuclear localization of Ruk₁ suggests that this adapter protein is involved in some new, yet unrecognized functions, in the eukaryotic cell nucleus.

В. Р. Дрель, Е. Ю. Паливода, Г. Ю. Шуваева, Н. И. Изуменцева, Ю. Я. Кит, И. Т. Гут, В. Л. Бухман, Л. Б. Дробот

Субклеточная локализация адаптерного белка Ruk₁
в клетках HEK293

Резюме

Субклеточную локализацию адаптерного белка Ruk₁ исследовали в клетках эмбриональной почки человека линии HEK293, трансфицированных вектором pRc/CMV2/Ruk₁-Glu-tag. Иммунофлуоресцентным анализом показано, что рекомбинантный белок диффузно распределен в цитоплазме и ядре трансфицированных клеток HEK293 с формированием четких пунктатов, локализованных в ядре, наиболее вероятно соответствующих ядрышкам. Ядерная локализация Ruk₁ подтверждена иммуноблотингом экстрактов изолированных ядер трансфицированных клеток HEK293 с использованием моноклональных анти-Glu-tag антител, а также нетрансфицированных клеток HEK293 и клеток U937 с использованием поликлональных анти-Ruk антител. Иммунодот-блот анализом выявлена способность аффинно очищенного препарата Ruk₁ Glu-tagged взаимодействовать с ДНК тимуса телят, но не с ДНК *Escherichia coli*. Ядерная локализация Ruk₁ позволяет предположить выполнение адаптерным белком новых, пока еще не выясненных, функций в ядре эукариотической клетки.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Pawson T., Schlessinger J. SH2 and SH3 domains // *Curr. Biol.*—1993.—3, N 5.—P. 434—442.
- Cicchetti P., Mayer B. J., Thiel G., Baltimore D. Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho // *Science.*—1992.—257, N 5071.—P. 803—806.
- Rickles R. J., Botfield M. C., Weng Z., Taylor J. A., Green O. M., Brugge J. S., Zoller M. J. Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries // *EMBO J.*—1994.—13, N 23.—P. 5598—5604.
- Sparks A. B., Rider J. E., Hoffman N. G., Fowlkes D. M., Quillam L. A., Kay B. K. Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93, N 4.—P. 1540—1544.
- Pawson T. Protein modules and signalling networks // *Nature.*—1995.—373, N 6515.—P. 573—580.
- Cohen G. B., Ren R., Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins // *Cell.*—1995.—80, N 2.—P. 237—248.
- Sahr K. E., Laurila P., Kotula L., Scarpa A. L., Coupal E., Leto T. L., Linnenbach A. J., Winkelmann J. C., Speicher D. W., Marchesi V. T., Curtis P. G., Forget B. G. The complete cDNA and polypeptide sequences of human erythroid alpha-spectrin // *J. Biol. Chem.*—1990.—265, N 8.—P. 4434—4443.
- Wu H., Parsons J. T. Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex // *J. Cell. Biol.*—1993.—120, N 6.—P. 1417—1426.
- Pawson T., Scott J. D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins // *Science.*—1997.—278, N 5346.—P. 2075—2080.
- Pleiman C. M., Hertz W. M., Cambier J. C. Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit // *Science.*—1994.—263, N 5153.—P. 1609—1612.
- de Mendez I., Homayounpour N., Leto T. L. Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation // *Mol. and Cell. Biol.*—1997.—17, N 4.—P. 2177—2185.
- Gout I., Dhand R., Hiles I. D., Fry M. J., Panayotou G., Das P., Truong O., Totty N. F., Hsuan J., Booker G. W., Cambell I. D., Waterfield M. D. The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains // *Cell.*—1993.—75, N 1.—P. 25—36.
- Bar-Sagi D., Rotin D., Batzer A., Mandiyan V., Schlessinger J. SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules // *Cell.*—1993.—74, N 1.—P. 83—91.
- Galisteo M. L., Chernoff J., Su Y. C., Skolnik E. Y., Schlessinger J. The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1 // *J. Biol. Chem.*—1996.—271, N 35.—P. 20997—21000.
- McPherson P. S. Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis // *Cell. Signal.*—1999.—11, N 4.—P. 229—238.
- Ribon V., Herrera R., Kay B. K., Saltiel A. R. A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions // *J. Biol. Chem.*—1998.—273, N 7.—P. 4073—4080.
- Dustin M. L., Olszowy M. W., Holdorf A. D., Li J., Bromley S., Desai N., Widder P., Rosenberger F., van der Merwe P. A., Allen P. M., Shaw A. S. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts // *Cell.*—1998.—94, N 5.—P. 667—677.
- Kirsch K. H., Georgescu M. M., Ishimaru S., Hanafusa H. CMS: an adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—96, N 11.—P. 6211—6216.
- Perez-Villar J. J., O'Day K., Hewgill D. H., Nadler S. G., Kanner S. B. Nuclear localization of the tyrosine kinase Itk and interaction of its SH3 domain with karyopherin alpha (Rch1alpha) // *Int. Immunol.*—2001.—13, N 10.—P. 1265—1274.
- Zhou D., Chen S. PNRC2 is a 16 kDa coactivator that interacts with nuclear receptors through an SH3-binding motif // *Nucl. Acids Res.*—2001.—29, N 19.—P. 3939—3948.
- Jiang M., Axe T., Holgate R., Rubbi C. P., Okorokov A. L., Mee T., Milner J. p53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress // *Oncogene.*—2001.—20, N 39.—P. 5449—5458.
- Grishin A. V., Azhpa O., Semenov I., Corey S. J. Interaction

- between growth arrest-DNA damage protein 34 and Src kinase Lyn negatively regulates genotoxic apoptosis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2001.—98, N 18.—P. 10172—10177.
23. *Chen D., Steven B. W., Kathleen H. H., Jeffrey E. Pessin* SOS phosphorylation and dissociation of the Grb2-SOS complex by the ERK and JNK signaling pathways // *J. Biol. Chem.*—1996.—271, N 11.—P. 6328—6332.
 24. *Gout I., Middleton G., Adu J., Ninkina N. N., Drobot L. B., Filonenko V. V., Matsuka G. Kh, Davies A. M., Waterfield M., Buchman V. L.* Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein // *EMBO J.*—2000.—19, N 15.—P. 4015—4025.
 25. *Take H., Watanabe S., Takeda K., Yu Zu-Xi, Iwata N., Kajigaya S.* Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—2000.—268, N 2.—P. 321—328.
 26. *Horinstein S. C., Hyatt M. A., Sykes V. W., Straub R. E., Lipkowitz S., Boulter J., Bogler O.* SETA is a multifunctional adapter protein with three SH3 domains that binds Grb2, Cbl, and the novel SB1 proteins // *Cell. Signal.*—2000.—12, N 11.—P. 769—779.
 27. *Peterson G. L.* A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // *Anal. Biochem.*—1977.—83, N 2.—P. 346—356.
 28. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227, N 5259.—P. 680—684.
 29. *Watanabe S., Take H., Takeda K., Yu Zu-Xi, Iwata N., Kajigaya S.* Characterization of CIN85 adaptor protein and identification of components involved in CIN85 complexes // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—2000.—278.—P. 167—174.
 30. *Kzhyshkowska J., Schutt H., Liss M., Kremmer E., Stauber R., Wolf H., Dobner T.* Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is methylated in its Arg-GlyGly (RGG) box and interacts with human arginine methyltransferase HRMT1L1 // *Biochem. J.*—2001.—358, pt 2.—P. 305—314.
 31. *Craggs G., Finan P. M., Lawson D., Wingfield J., Perrera T., Gadher S., Totty N. F., Kellie S.* A nuclear SH3 domain-binding protein that colocalizes with mRNA splicing factors and intermediate filament-containing perinuclear networks // *J. Biol. Chem.*—2001.—276, N 32.—P. 30552—30560.
 32. *Jahn T., Seipel P., Coutinho S., Miething C., Duyster J.* Grb4/Nckbeta acts as nuclear repressor of *v-Abl*-induced transcription from *c-jun/c-fos* promoter elements // *J. Biol. Chem.*—2001.—276, N 46.—P. 43419—43427.

УДК 577.112.7:616.155
Падійшла до редакції 29.06.2000