

7. Юзенчук С.В. Льновыє-*Linaceae* // Флора ССРСР Под ред. Шишкина Б.К., М. - Л.: Наука, 1949. -Т. 14. -С. 92-145.
8. Armbruster WS, Pérez-Barrales R, Arroyo J, Edwards ME, Vargas P. Three-dimensional reciprocity of floral morphs in wild flax (*Linum suffruticosum*): a new twist on heterostyly. // New Phytol. -2006.-vol.171.-n 3.-p. 581-90.
9. Chennaveeraiah M.S., Joshi K.K. Karyotypes in cultivated and wild species of *Linum* // Cytologia. 1983. vol. -48. -P. 833-841.
10. Cullis C.A. Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax // Annals Botany. - 2005. -vol. -95. P. -201–206.
11. Harris B.D. Chromosome numbers and evolution in North American species of *Linum* // Amer. J. Bot. 1968. vol. 55.-n 10.- P.1197-1204.
12. Fu Yong-Bi, G.Peterson, A.Diederichsen, K.W.Richards RAPD analysis of genetic relationships of seven flax species in the genus *Linum* L. // Genetic Resources and Crop Evolution. 2002. -vol.49. -P.253-259.
13. O.V. Muravenko, A.V. Amosova, T.E. Samatadze, K. V. Popov, A.I. Poletaev, Zelenin A. V. 9-aminoacridin- an efficient reagent to improve human and plant chromosome banding patterns and to standardize chromosome image analysis. // Cytometry.- 2003. vol. 51.- p.52 – 57.
14. Ray C. Cytological studies on the flax genus (*Linum*) // Amer. J. Bot. 1944. V.31. P.241-248.

Резюме.

Сравнение хромосом видів льна секцій *Syllinum*, *Dasylinum*, *Adenolinum*, *Stellerolinum* и *Linum* показало, що види секцій *Adenolinum*, *Stellerolinum* и *Linum* мають спільний предковий геном, який дивергував одночасно (радіальна дивергенція) з геномами видів із секцій *Syllinum*, *Dasylinum*, *Adenolinum* від предкової форми *Protolinum*.

Chromosome comparison of species from sections *Syllinum*, *Dasylinum*, *Adenolinum*, *Stellerolinum* and *Linum* was shown that species from sections *Adenolinum*, *Stellerolinum* and *Linum* have common ancestor which simultaneously radiated with species of sections *Syllinum*, *Dasylinum*, *Adenolinum* from common progenitor *Protolinum*.

НОВОХАЦЬКА О.В., ЦИБА Л.О., СКРИПКІНА І.Я., НІКОЛАЄНКО О.В., ДЕРГАЙ О.В., РИНДИЧ А.В.

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України

03143, м. Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: olga.novokhatska@gmail.com

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ АДАПТОРНОГО БІЛКА ІНТЕРСЕКТИНУ 2 З БІЛКАМИ-ПАРТНЕРАМИ

Інтерсектин 1 та 2 (ITSN1 та ITSN2) належать до еволюційно консервативної родини білків представлених у людини, гризунів, земноводних та риб. Обидва гени характеризуються подібною екзон-інтронною будовою, а білки, які вони кодують, мають однакову доменну структуру. У ссавців було виявлено дві основні ізоформи інтерсектину, які утворюються в результаті альтернативного сплайсингу: коротка ізоформа складається з двох ЕН-доменів, α -спірального регіону, п'яти SH3-доменів (А-Е); довга форма містить три додаткові С-кінцеві домени (DH, PH і C2) [1]. ITSN1 є адапторним білком, який взаємно локалізує та модулює активність білків задіяних в

ендоцитозі, передачі клітинного сигналу, перебудовах цитоскелету та апоптозі; на сьогодні виявлено близько двадцяти його білків-партнерів.

Відомо, що більшість білків задіяних в ендоцитозі належать до родин білків, що кодуються групами паралогічних генів. Паралогічні гени утворюються внаслідок дуплікації ділянок геному і в ході еволюції можуть набувати відмінних функцій. Свого часу було висунуто дві теорії стосовно еволюції паралогічних генів [2]. Згідно з теорією субфункціоналізації одразу після події дуплікації відбувається зниження тиску природного добору на один із паралогів, який починає швидко еволюціонувати і набуває нових функцій. Функція ITSN2 не відома, встановлено лише, що його локалізація в клітині подібна до інших компонентів апарату ендоцитозу, а підвищена експресія ITSN2, подібно до ITSN1, інгібує інтерналізацію трансферину [3]; серед відомих на сьогодні партнерів – ГТФаза Cdc42 та білок WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome protein), які беруть участь в перебудовах цитоскелету [4] та білок вірусу саркоми Капоші K15. Враховуючи мультидоменну структуру ITSN2, можна припустити існування значно більшої кількості білків, з якими він утворює комплекси, що можуть бути спільними партнерами з ITSN1 або відрізнятися.

Матеріали і методи

Створення плазмідних конструкцій. кДНК послідовності, що відповідають SH3A-, B-, C-, D- та E-доменам ITSN2 одержували за допомогою PCR використовуючи кДНК ITSN2, люб'язно надану Др. де ла Луна (Центр досліджень геномної регуляції, м. Барселона, Іспанія). Продукти PCR клонували за сайтами EcoRI and XhoI у вектор для експресії в бактеріальних клітинах рGEX-4T-3. Всі конструкції були перевірені сиквенуванням.

Експресія рекомбінантних білків, pull-down та Вестерн-блот аналіз. Рекомбінантні GST-злиті білки експресували в клітинах *E. coli* BL21(DE3)pLysE та очищували використовуючи глутатіон сефарозу 4B ("GE Healthcare") згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Білок с-CBL у векторі pсDNA4/HisMaxС експресували у клітинах лінії MCF7 використовуючи реагент для трансфекції jetPEI відповідно до вимог виробника ("Polyplus-transfection", США). Лінія клітин MCF7, де білок CIN85/Ruk у векторі pEGFP-N1 експресувався постійно, була люб'язно надана Л.Б. Дробот (Інститут біохімії ім. Паладіна, м. Київ).

Лізати готували у буфері (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, суміш протеазних інгібіторів ("Roche", Німеччина)) та центрифугували 20 хв при 12000g та 4°C. Для проведення pull-down експериментів лізат інкубували з 3-10 µg GST та GST-злитих білків, іммобілізованих на глутатіон сефарозу, 1 год при 4°C, сефарозу промивали 4 рази, зв'язані білки елюювали кип'ятінням в буфері Лемлі та переносили на нітроцелюлозну мембрану ("Bio-Rad", США). Мембрану блокували 1 год в 5% (w/w) розчині знежиреного молока, 1xTBS, 0,1% Triton X-100, інкубували з відповідними первинними антитілами 1 год та відмивали. Для Вестерн-блот аналізу використовували антитіла до динаміну 1 (C-16): sc-16, SOS1(C-23): sc-256, Omni-probe (M-21): sc-499 ("Santa Cruz", США), та моноклональні антитіла до SH3A-домену GFP-CIN85/Ruk люб'язно надані Л.Б. Дробот. Детекцію проводили видоспецифічними вторинними антитілами кон'югованими з пероксидазою хрому ("Promega", США).

Результати і обговорення

Насьогодні відомо близько двадцяти білків, з якими взаємодіє ITSN1, серед них білки, що беруть участь в ендоцитозі, регуляції перебудов актинового цитоскелету, клітинному сигналінгу та апоптозі. З метою виявлення білків, з якими взаємодіє інтерсектин 2, у вектор для експресії в бактеріальних клітинах рGEX-4T-3 було клоновано фрагменти кДНК інтерсектину 2, які кодують SH3-домени (A-E) та одержані відповідні GST-злиті рекомбінантні білки, а також GST-злиті SH3A- та SH3C-домени інтерсектину 1, які в подальшому використовували у GST-pull-down експериментах.

Насамперед взаємодію інтерсектину 2 було перевірено з динаміном 1, мозкоспецифічною ГТФазою, яка є ключовим білком на пізніх стадіях ендоцитозу [5]. Pull-down експерименти проводили на лізатах мозку миші, динамін 1 детектували Вестерн-блот аналізом з використанням специфічних антитіл. В результаті було показано, що ITSN2 взаємодіє з динаміном 1 *in vitro*, у зв'язуванні беруть участь SH3A-, SH3C- та SH3E-домени (Рис.1). SH3B- і SH3D-домени інтерсектину 2 динамін 1 не преципітували. Подібні взаємодії було виявлено і для ITSN1, SH3A-, SH3C- та SH3E-домени якого зв'язували динамін 1. Істотних відмінностей у силі взаємодії доменів ITSN1 та ITSN2 не було виявлено, варто лише відмітити вищу афінність SH3E-домену ITSN2 до динаміну. Здатність декількох SH3-доменів інтерсектину 2 зв'язувати динамін 1 припускає можливість кластеризації молекул ГТФази під час ендоцитозу.

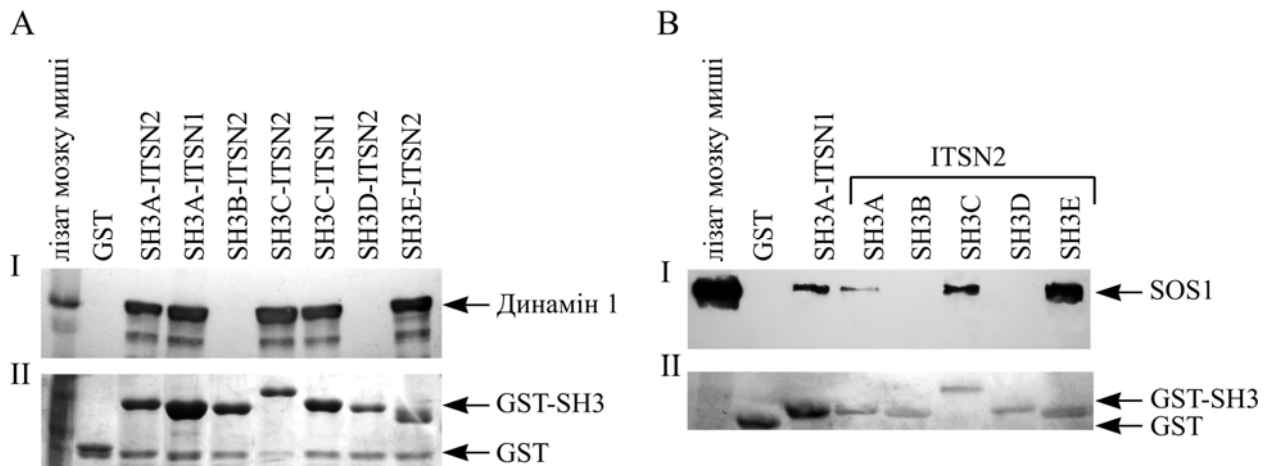


Рис. 1. Інтерсектин 2 взаємодіє з динаміном 1 (А) та SOS1 (В) через SH3A-, SH3C- та SH3E-домени *in vitro* (I – детекція динаміну 1 та SOS1 за допомогою Вестерн-блот-аналізу антитілами до кожного з білків; II – нижня частина гелю пофарбована Кумассі для оцінки кількості GST-злитих білків у експерименті).

Існує ряд свідчень щодо участі ITSN1 в регуляції активації Ras через взаємодію з SOS1. Показано, що ITSN1 утворює комплекси з Ras на внутрішньоклітинних везикулах та стимулює рівень RasGTP через зв'язування SOS1 з SH3A, -C та -E доменами ITSN1. Відомо також, що експресія інтерсектину 1 і 2 у мозку миші є подібною, за винятком зон проліферації, де було виявлено лише ITSN1 [3]. Нами було досліджено участь ITSN2 у сигнальних шляхах клітини через взаємодію ITSN2 з білком SOS1, який є гуанін-нуклеотид обмінним фактором для Ras. Результати pull-down експериментів показали, що SH3A-, SH3C- і SH3E-домени ITSN2 здатні зв'язувати SOS1 *in vitro* (Рис. 1), проте з нижчою афінністю порівняно з SH3A-доменом ITSN1. Подібно до інтерсектину 1, SH3B- та SH3D-домени ITSN2 не взаємодіяли з SOS1. Одержані нами результати вказують на те, що і ITSN2, подібно до ITSN1, може бути одним із важливих білків, що забезпечують зв'язок ендоцитозу та передачі внутрішньоклітинного сигналу.

Взаємодію ITSN2 перевіряли також з адапторним білком CIN85/Ruk. Для GST-pull-down експериментів використовували лізати клітин MCF7, які експресували рекомбінантний білок GFP-CIN85/Ruk. Відомо про існування внутрішньомолекулярних взаємодій між власним SH3A-доменом білка CIN85/Ruk та його пролін-збагаченим регіоном (PRD), що створює умовно "закриту" конформацію і запобігає зв'язуванню з іншими білками. SH3A-домен інтерсектину 1 взаємодіє з PRD білка CIN85/Ruk, ймовірно, внаслідок конкурентного витіснення власного SH3A-домену цього білка і таким чином переводить останній в умовно "відкриту" конформацію, що було показано нами раніше. Результати експериментів показали, що подібне не спостерігалось в

присутності доменів ITSN2. Цей факт може пояснюватися тим, що SH3A-домен у інтерсектинів є найменш консервативним, до того ж у ITSN2 не було виявлено ні послідовності гомологічної до 20-го екзону паралогічного гена, ні відповідно мозкоспецифічного сплайсингу цього екзона. Це могло б відобразитися на зв'язуванні інтерсектину з білками-партнерами, що ми спостерігаємо на прикладі взаємодії з CIN85/Ruk.

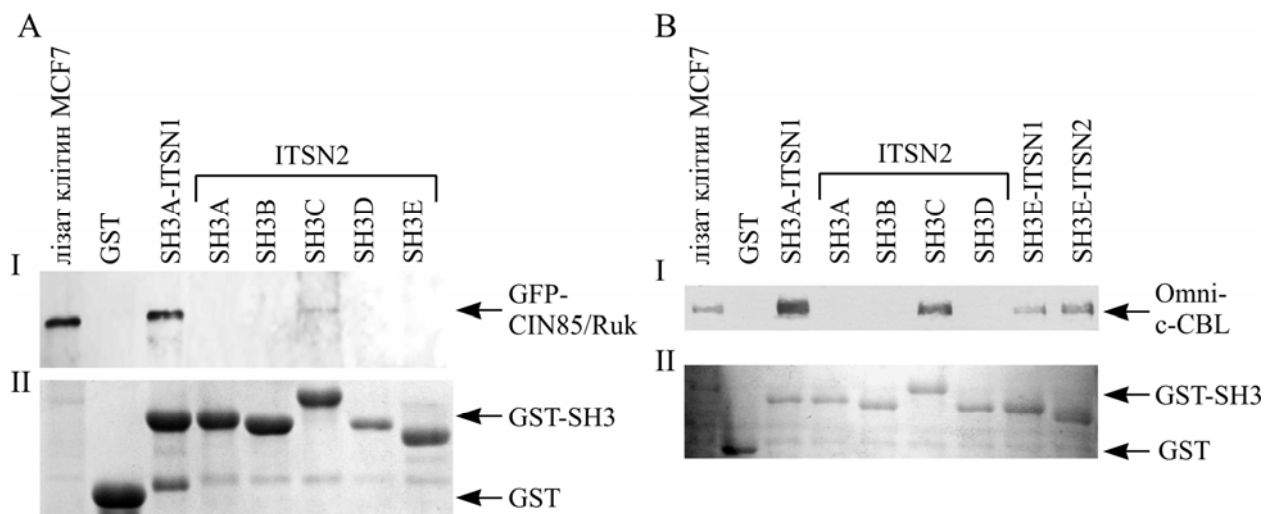


Рис. 2. Аналіз взаємодії інтерсектину 2 з CIN85/Ruk (A) та c-CBL (B) *in vitro* (I – детекція CIN85/Ruk та c-CBL за допомогою Вестерн-блот-аналізу відповідними антитілами; II – гель пофарбований Кумассі для оцінки кількості GST-злитих білків у експерименті).

Відомо, що інтерсектин 1 стимулює убіквітинілювання та деградацію активованого рецептора епідермального фактора росту (EGFR). За допомогою РНК-інтерференції було показано, що відсутність ITSN1 призводить до інгібування інтерналізації EGFR та проходження мітогенного сигналу від цього рецептора, оскільки інтерсектин 1 є риштувальним білком для утворення комплексів ендцитозних білків та, зокрема, убіквітинлігаз родини CBL. Білки родини CBL є мультидоменними адапторними білками, які беруть участь в багатьох клітинних процесах, регулюють рецептор-індуковану проліферацію, виживання клітин та їх морфологію. Взаємодію ITSN2 перевіряли з убіквітинлігазою c-CBL. Нами раніше було показано взаємодію c-CBL з SH3A-, SH3C- та SH3E-доменами інтерсектину 1, тоді як у випадку інтерсектину 2 зв'язування *in vitro* спостерігалось лише з SH3C- та SH3E-доменами, що може вказувати на специфічність регуляції убіквітинілювання та інтерналізації рецептора різними представниками родини ITSN. До того ж аналогічний вплив на EGFR було показано і для CIN85/Ruk, який також є скаффолдом для c-CBL, і може узгоджено з інтерсектином координувати та модулювати проходження сигналу в клітині.

Таким чином, нами вперше показано, що інтерсектин 2 взаємодіє з ендцитозним білком динаміном 1, гуанін-нуклеотид обмінним фактором для Ras білком SOS1, убіквітинлігазою c-CBL та адапторним білком CIN85/Ruk *in vitro*. Враховуючи значення ендцитозу для інтерналізації рецепторів, вивчення функціонального різноманіття молекул, які його контролюють, допоможе з'ясувати механізми взаємодії ендцитозу та сигнальної трансдукції. Подальші дослідження дозволять встановити, чи дублює ITSN2 функції ITSN1 та чи існують білки-партнери і відповідно процеси, специфічні для кожної з форм інтерсектину.

Дослідження були здійснені за підтримки гранту INTAS (Ref #05-1000004-7762) та гранту НАН України для молодих вчених.

Література.

1. Guipponi M., Scott H., Haiming C. et al. Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon // *Genomics*. – 1998. – Vol. 53, №7. – P. 369–376.
2. Koonin V. Eugene Orthologs, paralogs and evolutionary genomics // *The Annual Review of Genetics*. – 2005. – Vol. 39. – P. 309-338.
3. Pucharcos C., Estivill X., Luna S. et al. Intersectin 2, a new multimodular protein involved in clathrin-mediated endocytosis // *FEBS Letters*. – 2000. – Vol. 478. – P. 43-51.
4. McGavin M., Badour K., Hardy A.L. et al. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich syndrome protein (WASp)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis // *Journal of Experimental Medicine*. – 2001. – Vol. 194, №12. – P. 1777-1787.
5. Yamabhai M., Hoffman N.G., Hardison N.L. et al. Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five src homology 3 domains // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V.273. – P.31401-31407.

Резюме

Інтерсектин 1 та 2 (ITSN1 та ITSN2) людини належать до еволюційно консервативної родини адапторних білків. Показана участь інтерсектину 1 в багатьох процесах в клітині, тоді як роль інтерсектину 2 залишається не дослідженою. В даній роботі нами встановлено, що ITSN2 взаємодіє з ендоцитозним білком динаміном 1, гуанін-нуклеотид обмінним фактором для Ras білком SOS1, убіквітинлігазою c-CBL та адапторним білком CIN85/Ruk *in vitro*.

Інтерсектин 1 и 2 (ITSN1 и ITSN2) человека принадлежат к эволюционно консервативному семейству адапторных белков. Показано участие ITSN1 во многих клеточных процессах, тогда как роль ITSN2 остается неисследованной. В данной работе нами было установлено взаимодействие ITSN2 с эндоцитозным белком динамином 1, гуанин-обменным фактором для Ras белком SOS1, убиквитинлигазой c-CBL и адапторным белком CIN85/Ruk *in vitro*.

Human intersectins (ITSN1 and ITSN2) are members of a conserved family of endocytic adaptor proteins. ITSN1 is known to participate in multiple cellular processes while the function of ITSN2 is currently unknown. In this study we demonstrated *in vitro* interaction of ITSN2 with endocytic GTPase dynamin 1, guanine nucleotide exchange factor for Ras SOS1, ubiquitin ligase c-CBL and adaptor protein CIN85/Ruk and showed differences in binding properties of ITSN1 and ITSN2 with these proteins.

ОЖЕРЕДОВА И.П., КОЗЕРЕЦКАЯ И.А.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка

Украина, 01033, Киев, ул. Владимирская, 64, e-mail: ozheredova@mail.univ.kiev.ua

ПРЕДСКАЗАНИЕ ФУНКЦИИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОДУКТОВ ИЗ *DESCHAMPSIA ANTARCTICA* НА ОСНОВАНИИ ГОМОЛОГИИ С ИЗВЕСТНЫМИ БЕЛКАМИ

В настоящее время флора Морской Антарктики включает в себя два вида сосудистых растений: *Deschampsia Antarctica* Desv. (*Poaceae*) и *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*). Южная граница распространения *Colobanthus quitensis* и *Deschampsia antarctica* пролегает между 64° и 66° ю.ш. на Антарктическом материке и антарктических островах [1,2].