

### 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].

Почему только эти два вида сосудистых растений и почему именно они успешно колонизируют эти территории, тогда как в тех же широтах северного полушария произрастает около 100 различных видов сосудистых растений, является одним из открытых научных вопросов [3].

В настоящее время большой интерес представляют исследования, направленные на изучение механизмов адаптации высших растений к длительному воздействию экстремальных абиотических факторов. В связи с этим, использование в качестве модельных объектов *Deschampsia antarctica* и *Colobanthus quitensis* представляет особый интерес. Показано, что активность основных метаболических процессов этих растений зависит от условий произрастания, что, возможно, и обеспечивает выживание растений в экстремальных условиях [4]. Исследования ультраструктурной организации органелл клеток тканей листа не выявили наличие выраженных адаптационных механизмов на данном уровне [5]. Таким образом, можно предположить, что адаптация данных видов имеет молекулярно-генетическую природу и детерминирована генотипом [6]. Данное предположение может быть подтверждено с помощью анализа геномов и протеомов данных видов.

Целью нашего исследования была систематизация имеющихся в базах данных (БД) последовательностей *D.antarctica* с последующим анализом их гомологии к последовательностям *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare.

#### **Материалы и методы**

Поиск последовательностей *D.antarctica* проводился в открытых БД Swiss-Prot / TrEMBL ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) [7], GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [8].

Предсказание функции представленных в базах данных последовательностей выполнялось путем сравнения с потенциальными гомологами из *A.thaliana* и *O.sativa* [9,10]. Сравнение последовательностей белков выполнялось при помощи инструмента BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) [11]. Выравнивание последовательностей белков проводилось с помощью локального пакета ClustalW [12] с использованием матриц BLOSUM [13].

При отборе гомологичных последовательностей для дальнейшего анализа, в соответствии с принятой методикой, белки отмечались как гомологичные, если их идентичность была не ниже 25% при E-value  $> 10^{-3}$ .

#### **Результаты и обсуждение**

В настоящее время (март 2008 года) для *D.antarctica* представлено 37 последовательностей потенциальных генов которые располагались в БД GenBank, TrEMBL и Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/>; Приложение 2).

Исходя из результатов поиска в БД можно сказать, что анотирование генома *D.antarctica* находится на начальном этапе, и функции практически всех потенциальных белков имеющихся в БД окончательно не определены. Данные о потенциальной роли каждого из представленных продуктов могут быть получены с помощью анализа таких показателей, как сходство и идентичность аминокислотных последовательностей с известными белками, для которых структура и функция уже доказаны экспериментально. Подобный анализ с довольно высокой степенью дает возможность предсказать функцию имеющихся в БД гипотетических продуктов на основании их гомологии с ранее известными белками из других видов.

Для выяснения функций представленных в БД потенциальных белков *D.antarctica* нами был проведен поиск потенциальных гомологов с использованием программы NCBI BLAST. В результате было выделено 12 последовательностей *A.thaliana* и 9 последовательностей *O.sativa* которые соответствовали намеченным критериям отбора.

Для оценки дистанции между найденными аминокислотными последовательностями были выполнены множественные выравнивания и построены

филогенетические древа. На основании полученных результатов выравниваний и анализа кладограмм были выделены потенциальные гомологичные белки *A.thaliana* и *O.sativa* (табл.1)

Таблица 1

Потенциальные белки *D.antarctica* и их ближайшие гомологи из *A.thaliana* и *O.sativa*

№ н/п	Растительный объект	Белковая последовательность	Авторы
1.	<i>D.antarctica</i>	AAK53442.2	14
	<i>A.thaliana</i>	NP 195030.1; NP 174170.1	15,16
	<i>O.sativa</i>	NP001062537.1; NP001058265.1	17
2.	<i>D.antarctica</i>	AAM22748	14
	<i>A.thaliana</i>	NP566076; NP197812	18
	<i>O.sativa</i>	NP001061149, NP001046591, NP001056486	
3.	<i>D.antarctica</i>	AAM11915	19
	<i>A.thaliana</i>	NP199836.1, NP194208.1, NP190914.1, NP850692.1, NP181259.1	20,21,22,23,24
	<i>O.sativa</i>	NP001062073.1; NP001053710.1; NP001058927	
4.	<i>D.antarctica</i>	AAM22752	19
	<i>A.thaliana</i>	NP001077723, NP175929, NP197696	
	<i>O.sativa</i>	NP001060922	

Полученные результаты свидетельствуют, что для белка AAK53442.2 из *D.antarctica* наиболее близкими являются белки *A.thaliana* выполняющие функцию обменного промежуточного звена в тиол-дисульфатных обменных реакциях [25,26]

Белки *A.thaliana*, которые согласно сходству последовательностей гомологичные белку AAM22748 *D.antarctica*, отвечают за обратимое взаимодействие протеосомных субъединиц с белком путем активации инозитол или фосфатидилинозитол киназ [18], Функция белка NP\_176628 *A.thaliana* пока еще не определена [27].

Белок AAM11915 *D.antarctica* обладает высокой гомологией с белками *A.thaliana* выполняющими функцию избирательного взаимодействия с РНК [20, 21, 22, 23, 24].

AAM22752 соответствуют белки *A.thaliana* выполняющие функцию активной лигазы. Лигазы – ферменты, принадлежащие согласно номенклатуре ЕС к классу 6. Лигазы выполняют функцию катализа процесса лигирования двух веществ с сопутствующим расщеплением дифосфатных связей и, например, играют важную роль в образовании нуклеозидтрифосфатов.

POC072 выполняет функцию белка-модификатора, образующего ковалентную связь с лизином, находящимся в мономерном или полимерном состоянии. Так, его взаимодействие с полимером Lys-48, вызывает протеосомальную деградацию, а соединение с мономерным лизином или с альтернативно связанным полимером лизина деградацию не вызывает. Это, вероятно, необходимо для осуществления целого ряда процессов, таких как поддержка структуры хроматина, ген-регуляция, стрессовый ответ, рибосомальный биогенез и репарация ДНК. Так же возможно POC073 и POC072 вовлечены в процесс холодной адаптации [14].

#### Выводы

Таким образом, выполненное нами исследование 37 потенциальных белков из *D.antarctica* позволило сделать предварительные выводы о их функции. На основании сходства первичных последовательностей нами предсказана функция 4 потенциальных продуктов из *D.antarctica*. Наши выводы основывались на их гомологи с белками

*A.thaliana*, так как все гомологичные белки из *O.sativa*, имели неизвестную функцию. Несомненно, полученные нами данные носят предварительный характер и требуют дальнейшего уточнения как *in silico* так *in situ*. Однако, полученные результаты позволяют значительно сократить объем экспериментальной работы необходимой для окончательной идентификации анализировавшихся последовательностей и целых продуктов.

### Литература

1. Greene D.M. and Holtom A., Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth.) Bartle and *Deschampsia antarctica* Desv. III. Distribution, Habitats and Performance in the Antarctic Botanical Zone, *Brit. Antarc. Surv. Bull.* , 1971, vol. 26, № 1, P.1–29.
2. Kappen L. and Schroeter B., 18 Plants and Lichens in the Antarctic, Their Way of Life and Their Relevance to Soil Formation, *Geoecology of Antarctic Ice-Free Coastal Landscapes, Ecological Studies*, Springer-Verlag, 2002, vol. 154, P.327–374.
3. Lewis Smith, R.I., The Enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica, *Antarctic Biology in Global Context* , Huiskes, A.H.L., Ed., Leiden: Backhuys Publ., 2003, P.234–239.
4. Н.Ю. Таран, Л.М. Бацманова, О.А. Оканенко, Адапційні реакції *Deschampsia Antarctica* Desv. За умов Антарктиди на дію оксидного стресу, *Укр.ботан.журн.*, 2007, т.64, №2, С.279-289
5. I.Gielwanowska - Ewa Szczuka, New ultrastructural features of organelles in leaf cells of *Deschampsia antarctica* Desv. *Polar Biol* 2005 28, P.951–955
6. Киряченко С.С., Козерецкая И.А., Ракуса-Сушевски С. Цитология и генетика 2005, №4, С. 75-80
7. Bairoch A., B. Boeckmann, S. Ferro and E. Gasteiger. Swiss-Prot: Juggling between evolution and stability. Briefings in Bioinformatics. - 2004. - V.5. № 1, P.39–55
8. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL., “GenBank”, *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan;35(Database issue), P.21-25.
9. Poole RL., The TAIR Database, *Methods Mol Biol.* 2007, 406, P.179-212.
10. Chan AP, Rabinowicz PD, Quackenbush J, Buell CR, Town CD., Plant database resources at the institute for genomic research, *Methods Mol Biol.* 2007; 406, P.113-136
11. Jian Ye, Scott McGinnis and Thomas L. Madden BLAST: improvements for better sequence analysis March 20, 2006
12. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG., The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997 Dec 15; 25-24, P.4876-4882
13. Henikoff, S. and Henikoff, J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89, P.10915-10919.
14. Gidekel M., Destefano-Beltran L., Garcia P., Mujica L., Leal P., Cuba M., Fuentes L., Bravo L.A., Corcuera L.J., Alberdi M., Concha I., Gutierrez A.; "Identification and characterization of three novel cold acclimation-responsive genes from the extremophile hair grass *Deschampsia antarctica* Desv."; *Extremophiles* 2003, 7, P.459-469.
15. Chung HT, Ma R, Toyota B, Clark B, Robar J, McKenzie M. Audiologic and treatment outcomes after linear accelerator-based stereotactic irradiation for acoustic neuroma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004, 59(4), P.1116-1121.
16. Spadaro SE, Luciano WJ, Jennings DE. DENCOT trains EFDAs. *Dent Assist.* 2004 May-Jun; 73(3), P.30-32.
17. Ohyanagi,H., Tanaka,T., Sakai,H., Shigemoto,Y., Yamaguchi,K., Habara,T., Fujii,Y., Antonio,B.A., Nagamura,Y., Imanishi,T., Ikeo,K., Itoh,T., Gojobori,T. and Sasaki,T. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. *japonica* genome information, *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, P. 741-744.

18. Felley-Bosco E, André M. Proteomics and chronic inflammatory bowel diseases. *Pathol Res Pract.* 2004;200(2), P.129-133
19. Gidekel M., Destefano-Beltran L., Garcia P., Fuentes L., Alberdi M., Bravo L., Corcuera L., Gutierrez A.; "Deschampsia antarctica a unique source of genes during cold acclimation."; Submitted (MAR-2002)
20. Jimenez C, Dang GT, Schultz PN, El-Naggar A, Shapiro S, Barnes EA, Evans DB, Vassilopoulou-Sellin R, Gagel RF, Cote GJ, Hoff AO. A novel point mutation of the RET protooncogene involving the second intracellular tyrosine kinase domain in a family with medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7), P.3521-3526.
21. Reims HM, Fossum E, Hieggen A, Moan A, Eide I, Kjeldsen SE. Adrenal medullary overactivity in lean, borderline hypertensive young men. *Am J Hypertens.* 2004 Jul;17(7), P.611-618.
22. Atomi H, Matsumi R, Imanaka T. Reverse gyrase is not a prerequisite for hyperthermophilic life. *J Bacteriol.* 2004 Jul;186(14), P.4829-4833.
23. Ohta M, Sugita M, Sugiura M. Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31 and cp33) are present in *Arabidopsis thaliana*: presence of cp31 in chloroplasts and its homologue in nuclei/cytoplasm. *Plant Mol Biol.* 1995 Feb; 27(3), P.529-539,
24. Iles MM, Cannings C. Sequential genotyping within TDT families. *Math Med Biol.* 2004 Jun;21(2), P.115-127.
25. Chung HT, Ma R, Toyota B, Clark B, Robar J, McKenzie M. Audiologic and treatment outcomes after linear accelerator-based stereotactic irradiation for acoustic neuroma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004 Jul 15; 59(4), P.1116-1121.
26. Spadaro SE, Luciano WJ, Jennings DE. DENCOT trains EFDA's. *Dent Assist.* 2004 May-Jun; 73(3), P.30-32.
27. Bauer KP, Dom PM, Ramirez AM, O'Flaherty JE. Preoperative intravenous midazolam: benefits beyond anxiolysis. *J Clin Anesth.* 2004 May; 16(3), P.177-183.

### Резюме

В работе сделан обзор и проведена систематизация последовательностей *Deschampsia antarctica* представленных в базах данных, доступных для общего использования. Проведён поиск гомологичных последовательностей в протеомах *Arabidopsis thaliana* и *Oryza sativa japonica*. На основании проведённого анализа предсказаны функции для 4 потенциальных продуктов генома *Deschampsia antarctica*.

У роботі приведені результати огляду та систематизації послідовностей *Deschampsia antarctica*, які присутні у базах даних, доступних для загального користування. Також представлені результати пошуку гомологічних послідовностей в протеомах *Arabidopsis thaliana* і *Oryza sativa japonica*. На підставі проведеного аналізу передбачені функції для 4 потенційних продуктів генома *Deschampsia antarctica*.

The results of an analysis sequences of *Deschampsia antarctica* from available databases are presented together with the results of the search of homologous sequences in proteomes of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa japonica*. We predicted the function of 4 potential products of the genome of *Deschampsia antarctica* on the basis of our analysis.

**ПІДПАЛА О.В., ЯЦИШИНА А.П., ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,*

*Україна, 03680, Київ, вул.Заболотного, 150, e-mail:specrada@imbg.org.ua*