

Значення SH3-доменів у функціонуванні клітин рослин

Р. Т. Гут

Український державний лісотехнічний університет
Вул. Ген. Чупринки, 103, 97057, Львів, Україна

SH3-домени є важливими модулями білково-білкових взаємодій, що беруть участь у великій кількості різноманітних клітинних процесів. Незважаючи на те, що функції SH3-доменів у клітинах тварин та дріжджів досліджено переважно добре, значення цих доменів у функціонуванні рослинних клітин залишається практично нез'ясованим. Так, дотепер було клоновано лише одну родину з трьох SH3-вмісних білків Arabidopsis thaliana, залучених до процесів ендоцитозу. Водночас дослідження геному цієї рослини передбачає наявність близько 10 SH3-вмісних білків та значної кількості білків, які містять SH3-зв'язувальні пролін-багаті послідовності. В огляді описано вже відомі процеси, що відбуваються в клітинах рослин за участі SH3-вмісних білків, а також обговорюються можливі мішені SH3-доменів та процеси, регуляція яких, можливо, здійснюється за рахунок опосередкованих цими доменами взаємодій.

Вступ. Регуляція різноманітних клітинних процесів вимагає утворення комплексів між білками, а також комплексів білків з іншими молекулами, зокрема, з ліпідами, малими сполуками, іонами та нуклеїновими кислотами. Саме тому для більшості регуляторних білків характерна модульна організація, тобто вони містять у своїй структурі кілька доменів, які опосередковують міжмолекулярні взаємодії, або ж їм притаманна каталітична активність. Домени можуть визначати локалізацію білків у необхідних клітинних компартментах, забезпечувати впізнавання посттрансляційних модифікацій та вторинних посередників, а також опосередковувати збирання надмолекулярних білкових комплексів.

SH3-домени (Src-гомологічні домени 3-го типу) є чи не найкраще дослідженими представниками родини модулів, залучених до білково-білкових взаємодій. Ці домени здатні впізнавати поширені у різноманітних білках пролін-багаті послідовності і відіграють важливу роль у багатьох клітинних процесах, зокрема, регуляції активності ферментів за рахунок внутрішньомолекулярних взаємодій, збільшення локальних концентрацій і зміни внутрішньоклітинної локалізації сигнальних білків та збирання великих надмолекулярних комплексів.

Структура SH3-доменів. SH3-домени утворені послідовностями, які містять біля 60 амінокислотних залишків. Структура цих доменів являє собою зігнуту поверхню з п'яти антипаралельних β -складчастих тяжів, що утворюють два розташованих під прямим кутом один відносно іншого β -складчастих шари [1]. Два перших та два других β -складчастих тяжі сполучені варіабельними петлями. Перша з них, RT петля, має відмінний склад у різних SH3-доменах та містить кілька кислих амінокислотних залишків. Друга, n-Src петля, розташована між другим і третім β -складчастими шарами, може містити від 4 до 15 амінокислотних залишків [1, 2].

Така тривимірна структура SH3-доменів забезпечує якнайближче взаємне розташування консервативних залишків, які утворюють на поверхні білка збагачену ароматичними амінокислотами поверхню для зв'язування лігандів (рис. 1).

Взаємодія з лігандами. З'ясування структури лігандів SH3-доменів привернуло до себе увагу великої кількості дослідників. Дослідження селективного зв'язування пептидів *in vitro* показали, що переважна більшість SH3-доменів для зв'язування вимагає наявності консервативної послідовності RxxP, у якій залишки проліну (P) оточують два будь-яких амінокислотних залишки (x). Слід, про-

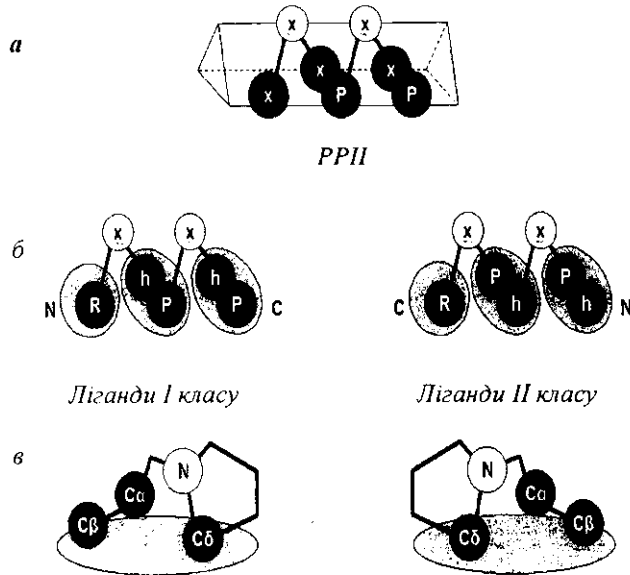


Рис. 1. Схема розташування залишків RxxPxxK/R послідовності у поліпролінової спіралі II типу (PPII) (а), взаємодія лігандів I та II класів з ліганд-зв'язувальною поверхнею SH3-доменів (б) та схематичне зображення розташування hP дипептидів лігандів I та II класів у кишнях SH3-доменів (в)

те, зауважити, що специфічність взаємодії кожного окремого SH3-домену визначається послідовністю, яка, крім RxxP, містить ще кілька прилеглих амінокислотних залишків, один з яких має основні властивості — залишок лізину (K) або аргініну (R). Так, у ході перших досліджень було виявлено два основних класи таких SH3-взаємодіючих ділянок, а саме — K/RxxPxxP та xPxxPxxK/R. Обидва класи лігандів упізнаються тією ж самою поверхнею, оскільки, як з'ясувалося пізніше, зв'язування пептидів може відбуватися в двох протилежних (N-кінцевій та C-кінцевій) орієнтаціях (рис. 1, 2).

Дослідження просторової структури комплексів SH3-доменів з пролінвмісними пептидами за допомогою ЯМР спектроскопії та рентгеноструктурного аналізу дозволили краще зрозуміти механізм упізнавання лігандів поверхнею цих доменів [3]. В усіх випадках під час зв'язування ліганди набувають конформації видовженої лівозакрученої поліпролінової спіралі другого типу (PPII). Як згадувалося вище, існують два основних класи пролінбагатих лігандів SH3-доменів: пептидні послідовності K/RxxPxxP, віднесені до першого класу, та послідовності xPxxPxxK/R, які належать до другого класу. Клас ліганду, таким чином, визначається розташуванням основного амінокислотного залишку (R або K) відносно консервативної RxxP послідовності. Класи I і II лігандів взаємодіють з SH3-доменами у протилежних орієнтаціях. Ліганди класу I взаємодіють з RT петлею домену за участі

N-кінцевої частини, а ліганди класу II — за участі C-кінцевої.

Гідрофобна ліганд-зв'язувальна поверхня SH3-доменів є відносно плоскою і утворена трьома неглибокими кишнями, у яких зібрані залишки ароматичних амінокислот [4]. Відомо, що на один виток поліпролінової спіралі другого типу припадає три амінокислотних залишки, кажучи іншими словами, на поперечному перерізі ця спіраль має форму, наближену до трикутної. Така «трикутна» спіраль однією зі своїх сторін взаємодіє з гідрофобною поверхнею SH3-домену (рис. 1). При цьому дві з трьох ліганд-зв'язувальних кишень домену займають два сусідніх дипептиди, розташованих на одному боці спіралі. Такі hP дипептиди містять залишок гідрофобної амінокислоти (h) та залишок проліну (P) і розділені в hPxhP послідовності спіралі будь-яким іншим амінокислотним залишком (x). Третю кишню ліганд-зв'язувальної поверхні домену у більшості випадків займає залишок основної амінокислоти, розташований поряд з прилеглим до hPxhP послідовності залишком основної амінокислоти (K або R), що, таким чином, визначає специфічність SH3-доменів до лігандів I (K/RxhPxhP) або II (hPxhPxK/R) класу. Зв'язування hP дипептидів забезпечується видовженою ділянкою, утвореною заміщенням (алкільованим) залишком нітрогену проліну, карбонільною групою, залишком α -карбону та бічним ланцюгом залишку гідрофобної амінокислоти. Варто зазначити, що такий hP дипептид є єдиною можливою послідовністю природних амінокислот, у якій два алкільованих атоми скелета розділені лише одним атомом вуглецю. Такий механізм взаємодії дозволяє зв'язування hP пептидів кишнями ліганд-зв'язувальної поверхні домену у двох протилежних напрямках.

Насамкінець підкреслимо, що опосередковані SH3-доменами взаємодії є порівняно слабкими, з характерними значеннями констант дисоціації (K_d) від кількох одиниць до кількох десятків мкМ [4]. Така невисока афінність SH3-доменів забезпечує зворотність та гнучкість опосередкованих ними взаємодій.

Специфічність SH3-доменів. Визначення специфічності окремих SH3-доменів є важливою проблемою, оскільки її вирішення дасть змогу передбачати ліганди для певних білків і, можливо, створювати шляхи пригнічення специфічних взаємодій *in vivo* [4].

Зрозуміло, що сама по собі послідовність hPxhP та прилеглий залишок основної амінокислоти можуть забезпечити лише обмежену специфічність. Натомість, поруч з основною ліганд-

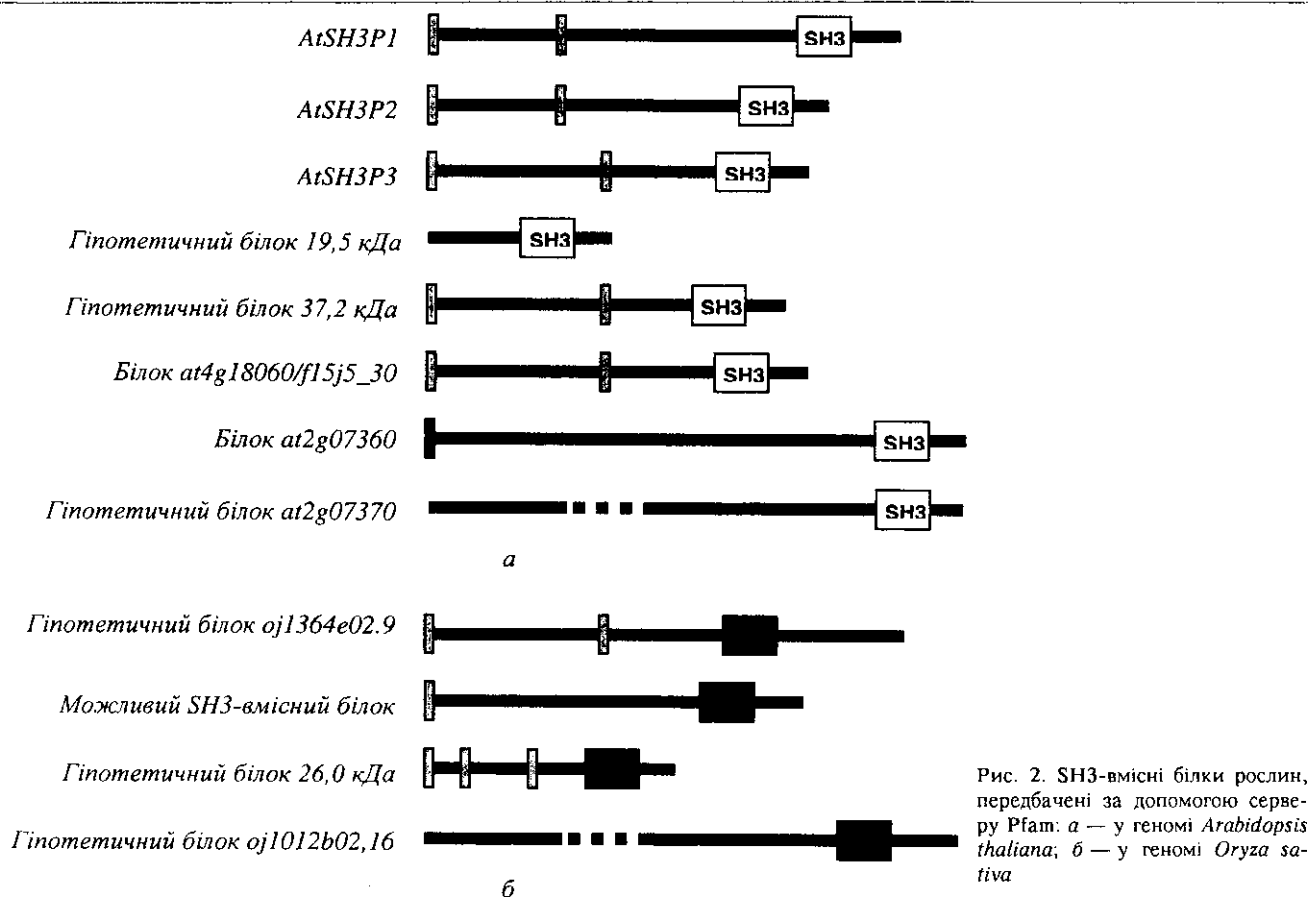


Рис. 2. SH3-вмісні білки рослин, передбачені за допомогою серверу Pfam: а — у геномі *Arabidopsis thaliana*; б — у геномі *Oryza sativa*

зв'язувальною ділянкою у SH3-доменах розташовуються RT та p-Src петлі, амінокислотні залишки яких у багатьох випадках взаємодіють з амінокислотними залишками, які знаходяться поруч з PxxP послідовністю лігандів. Таким чином, можна вважати, що ці петлі забезпечують специфічність певних SH3-доменів до відповідних конкретних лігандів [5, 6]. Так, наприклад, показано, що другий SH3-домен адаптерного білка Nck взаємодіє з лігандами II класу з послідовністю hPxhPxxRxxS, які відразу за власною С-кінцевою частиною містять залишок серину (S).

Проте специфічність опосередкованих SH3-доменами взаємодій може визначатися не лише амінокислотними залишками, прилеглими до PxxP послідовності лігандів. Відмінний механізм специфічності виявлено для взаємодії тирозинової протеїнкінази Hck та білка вірусу імунодефіциту людини Nef. У цьому разі один з амінокислотних залишків RT петлі SH3-домену Hck забезпечує афінне зв'язування з Nef, однак не з ізольованими пептидами, які містять PxxP та сусідні амінокислотні залишки.

Сучасні дослідження засвідчують, що в окре-

мих випадках SH3-домени здатні взаємодіяти з лігандами, ділянка зв'язування яких не містить класичної PxxP послідовності. Так, наприклад, показано, що SH3-домен білка Ер8 упізнає PxxDY послідовність, яка в четвертому та п'ятому положеннях містить залишки аспартату (D) і тирозину (Y) [7]. Ще цікавішим є приклад адаптерного білка імунних клітин FYB/SLAP, другий SH3-домен якого впізнає RKxxYxxY, що містить два залишки тирозину. Хоча згадані нетипові ліганди здатні взаємодіяти з ліганд-зв'язувальними кишеньками відповідних SH3-доменів, досі не з'ясовано, чи набувають вони при цьому PPII-подібної конфорації.

Доречно зауважити, що хоча більшість лігандів SH3-доменів містять класичну PxxP послідовність, самі SH3 є еволюційно давніми доменами і існують протягом часу, достатнього для розвинення структурного і функціонального різноманіття [2]. Тому спектр лігандів цих доменів може виявитися суттєво ширшим за передбачуваний раніше.

SH3-домени білків рослин. Відразу ж після відкриття SH3-доменів опосередковані ними білково-білкові взаємодії стали популярним предме-

том досліджень. Було виявлено, що SH3-вмісні білки відіграють важливу роль у різноманітних процесах, які протікають у клітинах ссавців і дріжджів. Натомість, значення SH3-вмісних білків у функціонуванні рослинних клітин упродовж тривалого часу залишалося поза увагою дослідників. Фактично першу і дотепер єдину родину з трьох SH3-вмісних білків було клоновано лише два роки тому [8]. Проте секвеновані геноми рослин *Arabidopsis thaliana* та різних видів *Oryza*, за результатами пошуку, містять відповідно біля 10 і 4 послідовностей, які кодують SH3-домени (рис. 2), та значну кількість послідовностей, кодуючих пролін-багаті ділянки, здатні з цими доменами взаємодіяти. Згадана кількість передбачених у *A. thaliana* SH3-кодуючих послідовностей вдвічі менша, ніж у геномі дріжджів, та шестеро менша, ніж у геномі людини, для яких передбачена кількість цих послідовностей складає 25 та 65 відповідно. Хоча така кількість вказує на менше значення SH3-доменив у функціонуванні рослинних клітин, однак вона достатня для здійснення численних білково-білкових взаємодій та регуляції багатьох процесів, які залишаються переважно недослідженими.

AtSH3Ps і регуляція процесів ендоцитозу. У клітинах тварин утворення і транспорт клатринізованих везикул під час ендоцитозу регулюється за допомогою збирання надмолекулярних комплексів, до складу яких входять різноманітні адаптерні та скаффолд білки, а також білки з ферментативною активністю. Хоча встановлено, що опосередкований клатрином ендоцитоз відбувається також і в клітинах рослин, регуляція цього процесу в останніх залишається невивченою.

У тварин значна кількість білково-білкових взаємодій, залучених до регуляції роботи клітинних ендоцитних машин, відбувається за участі SH3-доменив. На особливу увагу в цьому процесі заслуговує родина SH3-вмісних білків ендофілінів, які причетні до регуляції ранніх етапів ендоцитозу. Цим білкам притаманна лізофосфатидаттрансферазна активність, завдяки чому вони здатні регулювати вигинання плазматичної мембрани, необхідне для утворення ендоцитних везикул. Ендофіліни здійснюють перенесення залишків ненасиченої арахідонової кислоти на молекулу лізофосфатиду з утворенням фосфатидової кислоти, яка й обумовлює негативне вигинання мембрани. За допомогою власних SH3-доменив ендофіліни взаємодіють з іншими білками, причетними до ендоцитозу, зокрема, з динаміном, фосфоінозитидфосфатазою і синаптоджаніном.

Нещодавно також показано, що ендоцитоз деяких рецепторних тирозинових кіназ опосередко-

ується SH3-вмісним адаптерним білком CIN85, який разом з мультиадаптерною убіквітинлігазою Cbl забезпечує утворення надмолекулярного комплексу цих рецепторів з ендофілінами.

Два роки тому з *A. thaliana* клоновано нову родину SH3-вмісних білків (*AtSH3Ps*) [8], що у своїй структурі містять SH3- та «coiled-coil»-домени, поєднання яких, зазвичай, зустрічається в білках, залучених до процесів утворення, транспорту і «роздягання» клатринізованих везикул. Незважаючи на те, що клоновані білки цієї групи мають різний розмір і суттєво відрізняються за амінокислотною послідовністю (від 42 до 52 % гомології), всі вони містять N-кінцевий «coiled-coil»-домен і C-кінцевий SH3-домен та сполучені варіабельною ділянкою різної довжини. Зауважимо, що схожа структурна організація характерна для ендофілінів. Виявлено, що експресія білків *AtSH3Ps* має специфічний характер. Так, для першого представника родини, *AtSH3P1*, високий рівень експресії спостерігається у квітках, а для *AtSH3P2* — у проростках. Натомість *AtSH3P3* виявлено в усіх тканинах дорослих рослини, проте у проростках він відсутній.

За допомогою імуноцитохімічних досліджень вегетативних клітин і пилоквих зерен *A. thaliana* виявлено, що *AtSH3P1* локалізується переважно на поверхні клатринізованих везикул плазматичної мембрани, *транс*-боці апарату Гольджі та на поверхні частково клатринізованого ендоплазматичного ретикулуму і неклатринізованих везикул.

Незважаючи на те, що в структурі *AtSH3Ps* не виявлено ділянок зв'язування ліпідів або актину, гомологічних до тваринних, експерименти показують безпосередню взаємодію *AtSH3P1* з актиновими філаментами, а також з деякими ліпідами, зокрема, з фосфатидилінозитол-4-фосфатом, фосфатидилінозитол-4,5-бісфосфатом та фосфатидовою кислотою. Така афінність *AtSH3P1* до окремих ліпідів, можливо, має функціональне значення. Відомо, що фосфатидова кислота є ліпідом конічної форми і тому спричинює негативне вигинання мембрани, яке відбувається в клатринізованих ямках під час ендоцитозу [9]. Фосфоінозитиди, натомість, необхідні для підтримання стабільності комплексів білків оболонки везикул, а також можуть виконувати роль вторинних посередників у сигналюванні під час транспорту везикули. Так, наприклад, рівень фосфоінозитидів може впливати на взаємодію *AtSH3P1* з актином, як це показано для кількох білків цитоскелету тваринних клітин, і таким чином регулювати транспорт везикул уздовж цитоскелету.

Під час пошуку білків, здатних взаємодіяти з

SH3-доменом AtSH3P1, за допомогою двогибридної системи, отримано п'ять відмінних клонів кДНК, усі вони кодували білки щонайменше з однією пролін-багатою ділянкою, що містила RxxP послідовність. Один з цих клонів кодував білок, подібний до ауксиліну, — білка, що разом з білком теплового шоку Hsc70 здійснює «роздягання» клатринізованих ендочитних везикул у клітинах тварин і дріжджів. Взаємодія ауксиліну з Hsc70 призводить до полімеризації останнього та зв'язування з клатрином.

Клонований з *Arabidopsis* подібний до ауксиліну білок містить у своїй послідовності три пролін-багаті ділянки, друга з яких опосередковує взаємодію з AtSH3P1, та С-кінцевий DnaJ-домен з HPD ділянкою, необхідною для стимуляції Hsc70. Показано, що цей ауксилін-подібний білок стимулює опосередковане тваринним Hsc70 вивільнення клатрину з мікосомних мембран рослин *in vitro*. Натомість, присутність AtSH3P1 призводить до незначного пригнічення цього процесу.

ADL6 та транспорт клатринізованих везикул. В еукаріотних клітинах велика кількість різноманітних білків надходить до необхідних клітинних компартментів за допомогою транспортної системи ендомембран, утвореної еноплазматичним ретикуломом, апаратом Гольджі, плазматичною мембраною і сукупністю клітинних вакуолей. Протягом останніх двох десятиліть цей вид транспорту ретельно досліджували у клітинах тварин та дріжджів, проте не в клітинах рослин. З огляду на наявність схожої системи ендомембран, а також на результати проведених упродовж останнього часу досліджень механізми транспорту між компартментами рослинних і тваринних клітин можна вважати подібними.

Динамін і динамін-подібні білки утворюють родину схожих за структурою високомолекулярних GTP-зв'язувальних білків. Усі представники цієї родини містять консервативний N-кінцевий GFP-зв'язувальний домен з GTPазною активністю та С-кінцевий ефекторний домен GTPази (GED).

Головний білок цієї родини — динамін I, — який експресується у клітинах тварин, крім вже зазначених модулів, містить також плекстрин-гомологічний PH-домен та С-кінцеву SH3-зв'язувальну пролін-багату ділянку. Показано, що динамін I бере участь в утворенні везикул під час клатриноопосередкованого ендочитозу, а також інтерналізації кавеол. У клітинах дріжджів гомологічний до динаміну білок Vps1p причетний до вакуолярного транспорту білків. Встановлено, що динамін олігомеризується з утворенням мультимерних кілець навколо шийки клатринізованих

везикул, які формуються, і забезпечує їхнє відділення від плазматичної мембрани.

У рослин дотепер виявлено кілька динамін-подібних білків, одним з яких є білок *A. thaliana* ADL6 [10]. ADL6 містить N-кінцевий GTP-зв'язувальний домен, розташований у центрі плекстрингомологічний домен та С-кінцеву SH3-зв'язувальну пролін-багату ділянку, що вказує на його ближчу спорідненість з динаміном I порівняно з іншими білками родини.

За допомогою імунофлуоресцентного аналізу, а також з використанням GFP-зливої форми білка показано, що ADL6 локалізується в апараті Гольджі. Подібний характер локалізації виявляє тваринний динамін II, який знаходиться на *trans*-боці апарату Гольджі і відіграє важливу роль у транспорті з нього [11, 12]. Більше того, є відомості, що, як і динамін I, ADL6 може існувати у двох різних формах — мономерній цитоплазматичній та мультимерній мембранозв'язаній [10]. Слід, проте, зауважити, що на відміну від ADL6 динамін I локалізується на плазматичній мембрані.

Із застосуванням описаного раніше для динаміну I мутаційного підходу показано, що ADL6 необхідний для правильного вакуолярного транспорту білків з *trans*-боку апарату Гольджі до центральної вакуолі. Так, у клітинах, що експресують мутантний ADL6[K51E], ефективність транспорту GFP-зливих форм запасного білка батату спораміну та ендосома-зв'язувального домену EBD до центральної вакуолі знижується вдвічі. Натомість, як це показано з використанням GFP-зливої форми H⁺-АТРази, мутантний ADL6[K51E] не впливає на транспорт білків до плазматичної мембрани клітини.

Завдяки своїй доменній організації ADL6 поводить себе у клітині подібно до динамінів клітин тварин. Так, за посередництвом власної С-кінцевої ділянки ADL6 взаємодіє з адаптерним білком клатринізованих везикул γ -адаптином. Крім того, встановлено, що GTPазна активність ADL6 визначається взаємодіями білка з кислими фосфоліпідами, а також з SH3-вмісним білком [13].

Варте уваги й те, що з усіх відкритих до цього часу динамін-подібних білків рослин лише ADL6 має С-кінцеву пролін-багату послідовність, подібну до SH3-зв'язувальної ділянки динаміну I. Усі інші динамін-подібні білки рослин є коротшими, не містять пролін-багатої ділянки, виявляють іншу клітинну локалізацію і, схоже, участі у транспорті клатринізованих везикул не беруть. Так, наприклад, 68 кДа динамін-подібний білок сої і тютюну фрагмопластин причетний до утворення пластинки під час клітинного поділу [14, 15]. Показано, що

68 кДа динамін-подібний білок *A. thaliana* ADL1 також асоціюється з пластинкою під час поділу і необхідний для правильного ембріогенезу, розвитку зародка та проростка [16], що, однак, не узгоджується з проведеними раніше дослідженнями, згідно з якими ADL1 бере участь у біогенезі тилакоїдних мембран [17]. Інший динамін-подібний білок *A. thaliana* — ARC5 — утворює кільце у ділянці поділу хлоропластів і таким чином безпосередньо залучений до процесу поділу цих пластид [18].

AtCAP, актиновий цитоскелет та елонгація. У клітинах рослин елементи цитоскелету відіграють важливу роль у визначенні площини поділу під час цитокінезу, в елонгації клітин, правильному утворенні клітинних стінок, а також у великій кількості інших клітинних процесів, необхідних для належної диференціації клітин, розвитку і росту рослини. Потрібна для згаданих процесів динамічна реорганізація мережі елементів цитоскелета та пов'язана з цим перебудова цитоплазматичної архітектури клітин відбуваються у відповідь на різноманітні внутрішні і зовнішні стимули. Реорганізація актинового цитоскелета, необхідна для поділу та елонгації клітин рослин, дріжджів і тварин, опосередковується різноманітними актин-зв'язувальними білками. Більшість з останніх взаємодіє з F-актином (актином філаментів) і таким чином регулює процес збирання актинових філаментів з мономерного G-актину або ж забезпечує взаємодію з актиновими мережами інших білків [19]. Натомість, кількість актин-зв'язувальних білків, що взаємодіють з мономерним G-актином, значно менша. До останніх належать, наприклад, білки родини WASP, а також профіліни та циклазо-асоційовані білки (CAPs).

CAPs вперше відкрито у дріжджів, проте згодом їх виявлено в клітинах усіх еукаріотів [19]. У своїй структурі вони містять N-кінцеві «coiled-coil» і аденілатциклазо-зв'язувальний домен, C-кінцевий актин-зв'язувальний домен та розташовану між ними SH3-зв'язувальну пролін-багату ділянку.

Нещодавно клоновано два рослинних циклазо-асоційованих білки, GhCAP [20] і AtCAP1 [21], що експресуються відповідно у клітинах бавовнику і *A. thaliana*. У центральній частині обох білків виявлено пролін-багаті ділянки з характерними поліпроліновими та SH3-зв'язувальними послідовностями.

Так, утворена 227—237 амінокислотними залишками пролін-багата ділянка AtCAP1 містить RxxP послідовність. У CAP дріжджів пролін-багату ділянку можна поділити на дві частини — P1 і P2. Перша з них, P1, присутня в усіх циклазо-асоційо-

ваних білках, складається з 8—12 амінокислотних залишків, переважно пролінових. Ця ділянка, скоріш за все, відповідає за зв'язування CAP дріжджів з профіліном. Зауважимо, що останні є невеликими еукаріотичними білками, здатними зв'язуватися з G-актином та залученими до регуляції збирання актинових філаментів [22]. Профіліни присутні також у клітинах рослин. Так, наприклад, у геномі *A. thaliana* є п'ять генів, що кодують профіліни. Показано, що один з них, *PRF1*, необхідний для нормального розвитку проростків [23]. Всі рослинні профіліни містять домени, здатні специфічно взаємодіяти з полі-L-проліновими послідовностями (PLP). Хоча послідовності цих PLP-зв'язувальних доменів відмінні від відомих послідовностей SH3-доменів, було показано, що загальна структура та механізм опосередкованих обома типами доменів взаємодій можуть бути подібними. Цікаво, що саме рослинні профіліни є причиною алергій типу I на пилок.

Через власні пролін-багаті ділянки CAP можуть взаємодіяти з SH3-доменами інших білків. Так наприклад, CAP дріжджів взаємодіє з актин-зв'язувальним білком Ahr1p, людський CAP — з тирозиновою кіназою c-Abl [24], а CAP дрозофіли — з білком Epa, що належить до родини WASP.

Встановлено, що циклазо-асоційований білок бавовнику GhCAP відіграє важливу роль в елонгації клітин та рості рослини [20]. Найбільший рівень експресії GhCAP спостерігається в молодих клітинах бавовняних волокон. Під час утворення таких волокон окремі клітини сильно видовжуються, що потребує динамічної регуляції архітектури цитоскелета.

Циклазо-асоційований білок *A. thaliana* AtCAP1 може бути залучений до процесів поділу та елонгації клітин [21]. Він експресується в усіх тканинах та органах рослини. Виявлено, що надекспресія AtCAP1 у трансгенних проростках *Arabidopsis* призводить до порушень розвитку, які виявляються у зменшенні розмірів перших листків. Ступінь порушень при цьому корелює з рівнем надекспресії AtCAP1 у проростку. Проведення порівняльного анатомічного аналізу між листками трансгенних проростків і проростків нормальних рослин дало змогу з'ясувати, що причиною зменшення розмірів листків трансгенних проростків є одночасне зменшення розмірів та кількості клітин епідермісу та палисадної паренхіми. Показано також, що надекспресія AtCAP1 у трансгенних суспензійних клітинах тютюну лінії BY-2 спричинює пригнічення проліферації та значне зменшення кількості мітотичних клітин, що є свідченням припинення процесів клітинного поділу. Крім того, у

таких трансгенних клітинах відбувається руйнування актинових волокон. Слід, проте, зауважити, що на відміну від інших еукаріотних клітин рослинні клітини здатні ділитися навіть без наявності актинових філаментів, тому не можна виключити можливості, що порушення процесу клітинного поділу у трансгенних клітинах пов'язане не з руйнуванням актинових волокон, а зі змінами інших клітинних процесів, до яких може бути залучений АтСАР1.

РХ домени — новий тип SH3-зв'язувальних лігандів. РХ-домен (домен, гомологічний фагоцитній оксидазі) є новим модулем білкових взаємодій, який містить консервативну пролін-багату ділянку. РХ-домени вперше виявлено в р47phox і р40phox субодиницях NADPH-оксидази фагоцитів. Ці домени включають біля 150 амінокислотних залишків і мають плоску компакту форму, утворену N-кінцевим β -складчастим шаром з трьох антипаралельних β -складчастих тяжів та чотирма α -спіралями, розташованими у C-кінцевій частині послідовності. Пролін-багата ділянка, яка містить RxxP SH3-зв'язувальну послідовність, знаходиться між другою і третьою α -спіралями, та набуває конформації ліво-закрученої поліпролінової спіралі II типу (PPII). Ця ділянка експонована на поверхню РХ-домену і тому доступна для взаємодії з SH3-доменами [25].

РХ-домени знайдено у великій кількості різноманітних білків. Загалом за допомогою бази даних SMART в еукаріотних геномах вдається виявити більше 100 послідовностей РХ-доменив. РХ-домени присутні у білках, залучених до функціонування нейтрофілів (зокрема, фосфоліпазах D1 і D2), у різноманітних білках, які опосередковують процеси транспорту везикул (серед інших 15 нексинах людини SNX1—SNX15), а також у білках морфогенезу та сортування вакуолей у дріжджів (Vps5p, Vps17p, Vam7p і Mvp1p).

РХ-домени виявлено також у фосфоліпазах D ξ 1 та D ξ 2 (PLD ξ 1 та PLD ξ 2) *A. thaliana* [26]. Хоча функція РХ-доменив у PLD рослин залишається недослідженою, вважається, що вони можуть забезпечувати транслокацію цих сигнальних білків до клітинної мембрани та здійснювати збирання надмолекулярних білкових комплексів, необхідних для передачі сигналів.

Висновки. SH3-домени та SH3-вмісні білки рослин залишаються практично невивченими. Проте отримані на сьогодні результати досліджень свідчать про можливу участь цих білків у процесах регуляції ендоцитозу, транспорту клатринізованих везикул та реорганізації цитоскелета. Зауважимо, що всі гіпотетичні та вже виявлені SH3-вмісні білки рослин надзвичайно подібні за структурною

організацією (містять один C-кінцевий SH3 домен та 1—3 «coiled-coil» ділянки в N-кінцевій і центральній частинах) і тому, найімовірніше, беруть участь у регуляції подібних клітинних процесів. Безумовно, для з'ясування значення SH3-опосередкованих взаємодій у функціонуванні клітин рослин необхідне клонування усіх рослинних SH3-вмісних білків та їхнє подальше детальне дослідження.

R. T. Gout

The significance of SH3 domains in functioning of plant cells

Summary

SH3 domains are the important modules of protein-proteins interactions occurring during many cell processes. The functions of SH3 domains are well investigated in animal and yeast cells, while significance of these domains in functioning of plant cells remains practically unclear. Till now only one family has been cloned which includes three SH3-containing proteins from Arabidopsis thaliana engaged in the endocytosis processes. At the same time, study on genome of this plant presumes about ten SH3-proteins and a lot of proteins containing SH3-binding proline-rich sequences. In this review we describe already known processes which occur in the plant cells with participation of SH3-containing proteins. Probable targets of the SH3 domains action and processes the regulation of which is likely an effect of these domains are also considered.

P. T. Gut

Значение SH3-доменов в функционировании клеток растений

Резюме

SH3-домены — это важные модули белково-белковых взаимодействий, участвующие в большом количестве различных клеточных процессов. Несмотря на то, что функции SH3-доменов в клетках животных и дрожжей исследованы в основном хорошо, значение этих доменов в функционировании растительных клеток остается практически невыясненным. Так, до сегодняшнего дня клонировано лишь одно семейство из трех SH3-содержащих белков Arabidopsis thaliana, причастных к процессам эндоцитоза. В то же время изучение генома этого семейства растений предполагает наличие около 10 SH3-содержащих белков и значительного количества белков, включающих SH3-связывающие пролин-богатые последовательности. В представленном обзоре описаны уже известные процессы, происходящие в клетках растений при участии SH3-содержащих белков, а также обсуждаются возможные мишени SH3-доменов и процессы, которые, возможно, регулируются за счет опосредованных этими доменами взаимодействий.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Dalgarno D. C., Botfield M. C., Rickles R. J. SH3-domains and drug design: ligands, structure, and biological function // Biopolymers.—1997.—43, N 5.—P. 383—400.
2. Cesareni G., Panni S., Nardelli G., Castagnoli L. Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains // FEBS Lett.—2002.—513, N 1.—P. 38—44.
3. Yu H., Rosen M. K., Shin T. B., Seidel-Dugan C., Brugge J. S., Schreiber S. L. Solution structure of the SH3-domain of Src and identification of its ligand-binding site // Science.—1992.—258, N 5088.—P. 1665—1668.
4. Mayer B. J. SH3-domains: complexity in moderation // J. Cell Sci.—2001.—114, N 7.—P. 1253—1263.

5. Kapoor T. M., Andreotti A. H., Schreiber S. L. Exploring the specificity pockets of two homologous SH3-domains using structure-based, split-tool synthesis and affinity-based selection // *J. Amer. Chem. Soc.*—1998.—120.—P. 23—29.
6. Feng S., Kasahara C., Rickles R. J., Schreiber S. L. Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92, N 26.—P. 12408—12415.
7. Mongioli A. M., Romano P. R., Panni S., Mendoza M., Wong W. T., Musacchio A., Cesareni G., Di Fiore P. P. A novel peptide-SH3 interaction // *EMBO J.*—1999.—18, N 19.—P. 5300—5309.
8. Lam B. C., Sage T. L., Bianchi F., Blumwald E. Role of SH3-domain-containing proteins in clathrin-mediated vesicle trafficking in *Arabidopsis* // *Plant Cell.*—2001.—13, N 11.—P. 2499—2512.
9. Huttner W. B., Schmidt A. A. Membrane curvature: a case of endofeelin' ... // *Trends Cell Biol.*—2002.—12, N 4.—P. 155—158.
10. Jin J. B., Kim Y. A., Kim S. J., Lee S. H., Kim D. H., Cheong G. W., Hwang I. A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in *Arabidopsis* // *Plant Cell.*—2001.—13, N 7.—P. 1511—1526.
11. Henley J. R., McNiven M. A. Association of a dynamin-like protein with the Golgi apparatus in mammalian cells // *J. Cell Biol.*—1996.—133, N 4.—P. 761—775.
12. Jones S. M., Howell K. E., Henley J. R., Cao H., McNiven M. A. Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network // *Science.*—1998.—279, N 5350.—P. 573—577.
13. Lam B. C., Sage T. L., Bianchi F., Blumwald E. Regulation of ADL6 activity by its associated molecular network // *Plant J.*—2002.—31, N 5.—P. 565—576.
14. Gu X., Verma D. P. Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division // *Plant Cell.*—1997.—9, N 2.—P. 157—169.
15. Gu X., Verma D. P. Phragmoplastin, a dynamin-like protein associated with cell plate formation in plants // *EMBO J.*—1996.—15, N 4.—P. 695—704.
16. Kang B. H., Busse J. S., Dickey C., Rancour D. M., Bednarek S. Y. The *Arabidopsis* cell plate-associated dynamin-like protein, ADL1Ap, is required for multiple stages of plant growth and development // *Plant Physiol.*—2001.—126.—P. 47—68.
17. Park J. M., Cho J. H., Kang S. G., Jang H. J., Pih K. T., Piao H. L., Cho M. J., Hwang I. A dynamin-like protein in *Arabidopsis thaliana* is involved in biogenesis of thylakoid membranes // *EMBO J.*—1998.—17, N 4.—P. 859—867.
18. Gao H., Kalbach D. K., Froehlich J. E., Osteryoung K. W. ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of chloroplast division machinery // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2003.—100.—P. 4328—4333.
19. Hubberstey A. V., Mottillo E. P. Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization // *FASEB J.*—2002.—16, N 6.—P. 487—499.
20. Kawai M., Aotsuka S., Uchimiya H. Isolation of a cotton CAP gene: a homologue of adenyl cyclase-associated protein highly expressed during fiber elongation // *Plant Cell Physiol.*—1998.—39, N 12.—P. 1380—1383.
21. Barrero R. A., Umeda M., Yamamura S., Uchimiya H. *Arabidopsis* CAP regulates the actin cytoskeleton necessary for plant cell elongation and division // *Plant Cell.*—2002.—14, N 1.—P. 149—163.
22. Gibbon B. C., Zonia L. E., Kovar D. R., Hussey P. J., Staiger C. J. Pollen profilin function depends on interaction with proline-rich motifs // *Plant Cell.*—1998.—10.—P. 981—993.
23. McKinney E. C., Kandasamy M. K., Meagher R. B. Small changes in the regulation of one *Arabidopsis* profilin isovariant, PRF1, alter seedling development // *Plant Cell.*—2001.—13, N 5.—P. 1179—1191.
24. Freeman N. L., Lila T., Mintzer K. A., Chen Z., Pakh A. J., Ren R., Drubin D. G., Field J. A conserved proline-rich region of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization // *Mol. Cell. Biol.*—1996.—16, N 2.—P. 548—556.
25. Hiroaki H., Ago T., Ito T., Sumimoto H., Kohda D. Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain // *Nat. Struct. Biol.*—2001.—8, N 6.—P. 526—530.
26. Qin C., Wang X. The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains // *Plant Physiol.*—2002.—128, N 3.—P. 1057—1068.

УДК 577.112

Надійшла до редакції 17.11.03