

1. ЛІСОВЕ ТА САДОВО-ПАРКОВЕ ГОСПОДАРСТВО

УДК 581*162.6

Проф. Р.Т. Гут, д-р біол. наук – НЛТУ України, м. Львів

ЗНАЧЕННЯ ДОМЕНІВ БІЛОК-БІЛКОВИХ ВЗАЄМОДІЙ У СИГНАЛЮВАННІ

Дослідження сигнальних механізмів у рослин виявили, що незважаючи на те, що організація сигнальних шляхів у клітинах рослин та інших еукаріот подібна, існують також істотні відмінності, які виявляються також у поширеності у протеомах рослин окремих родин доменів та відмінних функціях білків, які ці домени містять.

Ключові слова: клітина, сигналювання, домени, білки,

Вступ. Переважна більшість білків, залучених до процесів переказу сигналів всередині клітин еукаріотичних організмів, утворена доменами – еволюційно консервативними ділянками амінокислотних послідовностей, що характеризуються добре визначеною структурою та наявністю власної функції, яку зберігають навіть у відділеному стані. Концепція доменної організації білків утворює основу для досліджень сигнальних процесів протягом останніх 15 років. Відкриття таких родин доменів, як SH₂, SH₃, PDZ, PH, C1 та C2, кожний з яких трапляється у сотнях сигнальних білків, та дослідження їх властивостей, дало змогу значно розширити розуміння організації процесів сигналювання в еукаріотичних організмів [10]. Якщо функція, яку виконує певний домен у одному білка, зрозуміла, це зазвичай дає змогу судити про функції інших білків, що містять такі ж домени. Тому інформація стосовно доменної організації білка є важливою, і дає найбільш корисну інформацію про функцію білка на основі його амінокислотної послідовності.

Секвенування геному *Arabidopsis* дозволило прискорити дослідження багатьох важливих механізмів переказу сигналів у клітинах рослин, проте призвело до появи ще більшої кількості питань. Відомо, що більше половини білків рослин (як і загалом усіх інших еукаріот) містить щонайменше один домен [17]. Перші кристалографічні дослідження призвели до виявлення перших кіназних доменів, а також інших каталітичних доменів із ферментативною активністю. Некаталітичні домени було виявлено лише згодом. Залежно від типу ліганду, ці домени можливо поділити на ті, що зв'язують ліпіди, ті, що взаємодіють з нуклеїновими кислотами, а також ті, які здатні взаємодіяти з ділянками пептидної послідовності в інших білках – домени білок-білкових взаємодій [26].

Два найдослідженіші на сьогодні домени білок-білкових взаємодій, SH₂ (Src-гомологічний домен типу 2) та SH₃ (Src-гомологічний домен типу 3), було виявлено ще у 80-х роках минулого століття у відомому онкобілку – тирозиновій кіназі Src [25]. Представники кожної з цих родин доменів специфічно взаємодіють з короткими консервативними ділянками пептидної послідовності у білках (центрами зв'язування). Так, SH₂ домен впізнає послідовності, що містять фосфорильований залишок тирозину, оточений кількома ін-

шими амінокислотними залишками. Ця взаємодія важлива для залучення SH₂-вмісних сигнальних ефекторів до активованих тирозинових кіназ, що містять такі центри зв'язування. Натомість SH₃ домени взаємодіють з короткими пролін-багатими пептидами, що містять RxxP послідовність. SH₃ домени присутні у великій кількості адаптерних та скаффолд білків, які також беруть участь у тирозинкіназному сигналюванні, а також у багатьох інших процесах, зокрема таких, як транспорт везикул, перебудови цитоскелету та ін. [17].

SH₃-домени утворені послідовностями, що містять близько 60 амінокислотних залишків. Структура цих доменів є зігнутою поверхнею з п'яти антипаралельних β-складчастих тяжів, що утворюють два розташовані під прямим кутом один відносно іншого β-складчасті шари [4]. Два перші та два другі β-складчасті тяжі сполучені варіабельними петлями. Перша з них, RT-петля, виявляє відмінний склад у різних SH₃ доменах та містить кілька кислих амінокислотних залишків. Друга, n-Src-петля, містить 6 амінокислотних залишків. Така тримірна структура SH₃ доменів забезпечує якнайближче взаємне розташування консервативних залишків, які утворюють на поверхні білка збагачену ароматичними амінокислотами поверхню для зв'язування лігандів.

Центри зв'язування SH₃ доменів. З'ясування структури лігандів SH₃ доменів привернуло до себе увагу та зусилля багатьох дослідників. Дослідження селективного зв'язування пептидів *in vitro* засвідчили, що переважна більшість SH₃ доменів для зв'язування вимагає наявності консервативної послідовності RxxP, у якій залишки проліну (P) оточують два будь-які амінокислотні залишки (x) [4]. Проте варто зауважити, що специфічність взаємодії кожного окремого SH₃ домену визначається послідовністю, яка крім RxxP, охоплює ще кілька прилеглих амінокислотних залишків, один з яких має основні властивості – залишок лізину (K) або аргініну (R). Так, під час перших досліджень було виявлено два основних класи таких SH₃-взаємодіючих ділянок, а саме: K/RxxPxxP та xRxxPxK/R [22]. Обидва класи лігандів впізнаються тою самою поверхнею, оскільки, як з'ясувалося пізніше, зв'язування пептидів може відбуватися у двох протилежних (N-кінцевій та C-кінцевій) орієнтаціях.

Варто зазначити, що опосередковані SH₃ доменами взаємодії є порівняно слабкими, з характерними значеннями констант дисоціації (K_d) від кількох одиниць до кількох десятків мкМ [22]. Така невисока афінність SH₃ доменів забезпечує зворотність та гнучкість опосередкованих ними взаємодій. Специфічність окремих SH₃ доменів є важливим питанням, оскільки встановлення правил визначення специфічності дасть змогу передбачати ліганди для певних білків, і можливо, створювати шляхи пригнічення специфічних взаємодій *in vivo* [22].

Сучасні дослідження показують, що в окремих випадках SH₃ домени здатні взаємодіяти з лігандами, ділянка зв'язування яких не містить класичної RxxP послідовності. Так, наприклад, було показано, що SH₃ домен білка Eps8 впізнає RxxDY послідовність, яка в четвертому та п'ятому положеннях містить залишки аспартату (D) та тирозину (Y) [23]. Ще цікавішим є приклад адаптерного білка імунних клітин FYB/SLAP, другий SH₃ домен якого впізнає RKxxYxxY, що містить два залишки тирозину. Хоча ці нетипові ліганди здатні взаємодіяти з ліганд-зв'язуючими кишнями відповідних SH₃ доменів, досі не з'ясовано, чи при цьому вони набувають РРІІ-подібної конформації.

Доречно зауважити, що хоча більшість лігандів SH₃ доменів містять класичну RxxP послідовність, самі SH₃ є еволюційно давніми доменами, і існують протягом часу достатнього, щоб розвинути структурне та функціональне різноманіття [3]. Тому спектр лігандів цих доменів може виявитися істотно ширшим за передбачуваний раніше.

SH₃-домени у білках рослин. Відразу ж після відкриття SH₃ доменів, опосередковані ними білок-білкові взаємодії стали популярним предметом досліджень. Було виявлено, що SH₃-вмісні білки відіграють важливу роль у різноманітних процесах, які відбуваються у клітинах ссавців і дріжджів. Натомість, значення SH₃-вмісних білків у функціонуванні рослинних клітин протягом тривалого часу залишалося поза увагою дослідників. Фактично, першу і дотепер єдину родину з трьох SH₃-вмісних білків було клоновано лише кілька років тому [18]. Проте секвеновані геноми рослин *Arabidopsis thaliana* та різних видів *Oryza*, за результатами пошуку різних інструментів, містять відповідно близько 12 та 4 послідовностей, що кодують SH₃-домени та значну кількість послідовностей, кодуючих пролін-багаті ділянки, здатні з цими доменами взаємодіяти. Така кількість передбачених у *Arabidopsis thaliana* SH₃-кодуючих послідовностей вдвічі менша ніж у геномі дріжджів та вшестеро менша, ніж у геномі людини, для яких передбачена кількість таких послідовностей становить 25 та 65 відповідно, і хоча вказує на менше значення SH₃ доменів у функціонуванні рослинних клітин, проте достатня для здійснення великої кількості білок-білкових взаємодій та регуляції значної кількості процесів, що залишаються переважно недослідженими.

AtSH3Ps та регуляція процесів ендоцитозу. У клітинах тварин утворення та 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 клатрин-опосередкований ендоцитоз відбувається також і в клітинах рослин, регуляція цього процесу в рослин залишається недослідженою. У тварин значна кількість білок-білкових взаємодій, залучених у регуляції роботи клітинних ендоцитичних машин, відбувається за участю SH₃ доменів.

Нещодавно з *Arabidopsis* було клоновано нову родину SH₃-вмісних білків (*AtSH3Ps*) [18], які у своїй структурі містять SH₃ та coiled-coil домени, поєднання яких зазвичай трапляється у білках, залучених у процесах утворення, транспорту та роздгання клатринізованих везикул. Незважаючи на те, що клоновані білки цієї групи мають різний розмір та істотно відрізняються за амінокислотною послідовністю (від 42 до 52 % гомології), всі вони містять N-кінцевий coiled-coil домен та C-кінцевий SH₃ домен, сполучені варіабельною ділянкою різної довжини. Виявлено, що експресія білків *AtSH3Ps* виявляє специфічний характер. Так, для першого представника родини, *AtSH3P1*, високий рівень експресії спостерігається у квітках, а для *AtSH3P2* – у проростках. Натомість, *AtSH3P3* виявлений у всіх тканинах дорослих рослин, проте відсутній у проростках [18].

Шляхом імуноцитохімічних досліджень вегетативних клітин та пилових зерен *Arabidopsis thaliana* було показано, що *AtSH3P1* локалізується

переважно на поверхні клатринізованих везикул плазматичної мембрани та транс-сторони апарату Гольджі, а також на поверхні частково клатринізованого ендоплазматичного ретикулуму та неклатринізованих везикул.

Незважаючи на те, що в структурі AtSH3Ps не виявлено ділянок зв'язування ліпідів або актину, гомологічних до тваринних, експерименти показують, що AtSH3P1 безпосередньо взаємодіє з актиновими філаментами, а також з деякими ліпідами, зокрема з фосфатиділінозитол-4-фосфатом, фосфатиділінозитол-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 у клатринізованих ямках під час ендоцитозу. Фосфоінозитиди, натомість, необхідні для підтримання стабільності комплексів білків оболонки везикул, а також можуть відігравати роль вторинних посередників у сигналюванні під час транспорту везикули. Так, наприклад, рівень фосфоінозитидів можливо впливає на взаємодію AtSH3P1 з актином, як це показано для кількох білків цитоскелету тваринних клітин, і так регулює транспорт везикул уздовж цитоскелету.

Під час пошуку білків, здатних взаємодіяти з SH₃ доменом AtSH3P1, за допомогою методу подвійного гібриду було отримано п'ять відмінних клонів кДНК, які кодували білки з щонайменше однією пролін-багатою ділянкою з RxxP послідовністю. Один з цих клонів кодував білок подібний до ауксиліну – білка, що разом з білком теплового шоку Hsc70 здійснює роздягання клатринізованих ендоцитних везикул у клітинах тварин та дріжджів. Взаємодія ауксиліну з Hsc70 призводить до полімеризації останнього та зв'язування з клатрином [18]. Інший клонований 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 подібний до ауксиліну білок стимулює опосередковане тваринним Hsc70 вивільнення клатрину з мікросомальних мембран рослин *in vitro*. Натомість присутність AtSH3P1 призводить до часткового інгібування цього процесу.

ADL₆ – можлива мішень SH₃-вмісних білків *Arabidopsis*. Динамін та динамін-подібні білки утворюють родину схожих за структурою високомолекулярних GTP-зв'язуючих білків. Усі представники цієї родини містять консервативний N-кінцевий GFP-зв'язуючий домен з GTP-азною 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'язуючу пролін-багату ділянку. Показано, що динамін I бере участь в утворенні везикул під час клатрин-опосередкованого ендоцитозу, а також інтерналізації кавеол. У клітинах дріжджів гомологічний до динаміну білок, Vps1 p, бере участь у вакуолярному транспорті білків. Встановлено, що динамін олігомеризується з утворенням мультимерних кілець навколо шийки клатринізованих везикул, що формуються, і забезпечує їх відділення від плазматичної мембрани.

У рослин дотепер виявлено кілька динамін-подібних білків, одним з яких є динамін-подібний білок *Arabidopsis thaliana* ADL₆ [11]. ADL₆ містить

N-кінцевий GTP-зв'язуючий домен, розташований у центрі плекстрин-гомологічний домен та C-кінцеву SH₃-зв'язуючу пролін-багату ділянку, що вказує на його ближчу спорідненість з динаміном I, порівняно з іншими білками родини. Шляхом імуофлуоресцентного аналізу, а також із використанням GFP-зливої форми білка показано, що ADL₆ локалізується в апараті Гольджі. Подібний характер локалізації виявляє тваринний динамін II, який локалізується на транс-стороні апарату Гольджі і відіграє важливу роль у транспорті з неї [8]. Більше того, спостережено, що як і динамін I, ADL₆ може існувати у двох різних формах – мономерній цитоплазматичній та мультимерній мембранозв'язаній [11]. Проте зауважимо, що на відміну від ADL₆, динамін I локалізується на плазматичній мембрані.

Отже, для динаміну I мутаційного підходу показано, що ADL₆ необхідний для правильного вакуолярного транспорту білків з транс-стороні апарату Гольджі до центральної вакуолі. Так, у клітинах, що експресують мутантний ADL₆ [K51E], ефективність транспорту GFP-злитих форм запасного білка батату спорами та ендосомо-зв'язуючого домену EBD до центральної вакуолі знижується вдвічі. Натомість, як це було доведено за допомогою GFP-зливої форми H⁺-АТРази, мутантний ADL₆ [K51E] не впливає на транспорт білків до плазматичної мембрани клітини.

Завдяки своїй доменній організації, ADL₆ поводить у клітині подібним чином до динамінів клітин тварин. Так, за участю власної C-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 [16].

Варте уваги те, що з усіх виявлених дотепер динамін-подібних білків рослин лише ADL₆ має C-кінцеву пролін-багату послідовність, подібну до SH₃-зв'язуючої 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 та тютюну фрагмопластин, бере участь в утворенні пластинки під час клітинного поділу [6]. Показано, що 68 кДа динамін-подібний білок *Arabidopsis thaliana* ADL₁ також асоціюється з пластинкою під час поділу і необхідний для правильного ембріогенезу, розвитку зародка та проростка [13], що проте не узгоджується з виконаними раніше дослідженнями, згідно з якими, ADL₁ бере участь у біогенезі тилакоїдних мембран (Park et al., 1998).

PX домени. PX домени (домени гомологічні фагоцитній оксидазі) є новим модулем білкових взаємодій, який містить консервативну пролін-багату ділянку. PX домени були вперше виявлені у p47phox та p40phox субодиницях NADPH-оксидази фагоцитів (Hiroaki et al., 2001). Під час пошуку білків гомологічних до C-кінцевої ділянки PI 3-кіназ класу II, було виявлено 36 білків, що містили ці домени. Згодом з'ясувалося, що PX домени містяться у понад 100 різних білках [1].

Структура PX доменів. PX домени представлені ділянками амінокислотної послідовності довжиною близько 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 [9]. Між другою і третьою α -спіралями розташована пролін-багата ділянка, що містить SH_3 -зв'язуючу послідовність.

Центри зв'язування PX доменів. Фактично, PX домени є доменами подвійної специфічності, оскільки вони містять одночасно два центри зв'язування – один для ліпідів (центр зв'язування фосфоінозитидів), другий для білків (центр зв'язування SH_3 доменів) [1]. Здатність PX доменів до зв'язування фосфоінозитидів зумовлена наявністю у них двох коротких основних амінокислотних послідовностей – RR (Y/F) (основна послідовність I) та R (R/K) (основна послідовність II), які взаємодіють із залишками фосфату в молекулі інозиту, а також розташованою неподалік варіабельною петлею. Остання містить кілька гідрофобних амінокислотних залишків здатних проникати у ліпідний бішар, і так полегшує орієнтування основних послідовностей I та II навколо залишків фосфату залишку інозиту [28]. Пролін-багата ділянка PX доменів містить RxxP послідовність та має конформацію лівозакрученої поліпролінової спіралі II типу (PPII), експонована на поверхню PX домену, і тому доступна для взаємодії з SH_3 доменами.

Функції PX доменів. PX домени були виявлені у великій кількості різноманітних білків. PX домени присутні у білках, залучених у функціонуванні нейтрофілів (зокрема фосфоліпазах D1 та D2), різноманітних білках, що опосередковують процеси транспорту везикул (зокрема у п'ятнадцяти нексинах людини SNX1 – SNX15), а також у білках морфогенезу та сортування вакуолей у дріжджів (Vps5 p, Vps17 p, Vam7 p та Mvp1 p).

PX домени були виявлені також у фосфоліпазах D ξ 1 та D ξ 2 (PLD ξ 1 та PLD ξ 2) *Arabidopsis thaliana* [27]. Хоча функція PX доменів у PLD рослин залишається малодослідженою, вважається, що вони можуть забезпечувати транслокацію цих сигнальних білків до клітинної мембрани та здійснювати збирання надмолекулярних білкових комплексів, необхідних для передачі сигналів. Варто зауважити, що загалом шляхом пошуку в базі даних PFAM, у рослинах можливо виявити 16 білків з PX доменами.

SH_3 -опосередкована регуляція PX доменів. Багато PX-вмісних білків містять також один або кілька SH_3 доменів, здатних брати участь як у внутрішньомолекулярних, так і в міжмолекулярних взаємодіях. Так, одночасна присутність PX та SH_3 доменів необхідна для PX-опосередкованого заякорювання та SH_3 -опосередкованого збирання комплексу NADPH-оксидази фагоцитів [7]. У цьому процесі утворення трифосфоінозитидів на мембрані нейтрофілів призводить до PX-опосередкованого залучення p40^{phox} та p47^{phox} субодиниць комплексу до мембрани. Надалі за участю SH_3 доменів ці субодиниці можуть взаємодіяти з p67^{phox} субодиницею та цитохромом b_{558} , і так утворюють активний комплекс. Цікаво, що SH_3 домен p47^{phox} субодиниці може взаємодіяти також з її власним SH_3 -зв'язуючим центром всередині PX домену. Така внутрішньомолекулярна взаємодія призводить до інактивації субодиниці та запобігає утворенню активного комплексу [28].

SH_2 та РТВ домени. У тварин SH_2 домени є найпоширенішими білковими модулями, що взаємодіють з фосфотирозин-вмісними білками, і так за-

безпечують нисхідну передачу сигналів, генерованих рецепторними тирозиновими кіназами (RTK) [29]. Після відкриття SH₂ доменів було виявлено також кілька інших подібних білкових модулів, зокрема фосфотирозин-зв'язуючі домени РТВ [5].

Проте у рослин, де сигналювання за участю рецепторних тирозинових кіназ не виявлене, фосфотирозин-зв'язуючі домени ймовірно не відіграють значної ролі. І дійсно, шляхом пошуку в базі даних PFAM, можливо виявити лише два білки *Arabidopsis*, які містять SH₂ домени. Натомість, за результатами такого пошуку, РТВ домени у рослин взагалі відсутні. Як з'ясувалося, обидва SH₂-вмісні білки *Arabidopsis*, AtSHA та AtSHB, є подібними до STAT білків, а саме до STAT1 білка людини, проте, на відміну від них, не містять ДНК-зв'язуючих доменів [29]. Автори вказують на можливість існування у рослин опосередкованих RTK сигнальних механізмів, подібних до тих, що трапляються у тварин [29], проте це припущення видається малоімовірним, оскільки пошуками у секвенованих геномах рослин дотепер не було виявлено жодної рецепторної тирозинової кінази. Натомість, численні дослідження показують, що аналогічні до RTK-опосередкованого сигналювання механізми переказу сигналів у рослин забезпечуються рецептор-подібними кіназами (RLK).

ФНА (форкхед-асоційовані) домени. Їх було вперше виявлено у факторах транскрипції родини форкхед (FH), проте згодом було встановлено, що ці фосфопетид-зв'язуючі модулі трапляються у найрізноманітніших сигнальних білках, зокрема кіназах, білкових фосфатазах, аденілатциклазах, протеазах, кінезинах (загалом більше ніж 100 білків), і поширені як у прокаріотичних так і в еукаріотичних групах організмів [20]. Наявність цих доменів у настільки різних білках свідчить про різноманіття виконуваних ними функцій.

Структура ФНА доменів. Усі ФНА домени містять гомологічні послідовності з 55-75 амінокислотних залишків. Кожна з таких послідовностей містить три консервативні блоки із залишками гліцину, аргініну, серину, аспарагіну та гістидину, розділені варіабельними ділянками [7]. Проте самі по собі гомологічні ділянки неактивні, та утворюють функціональні ФНА домени лише у складі 120-140 амінокислотних послідовностей [20].

Нещодавно було досліджено просторову структуру кіназо-взаємодіючого ФНА (KI ФНА) домену білкової фосфатази KAPP з *Arabidopsis*. Структура цього домену утворена двома β-складчастими шарами, розташованими паралельно один відносно одного. Один з них містить шість антипаралельних β-складчастих тяжів, інший утворений п'ятьма змішаними β-складчастими тяжами. Окремі петлі, що сполучають β-складчасті тяжі, утворюють фосфопептид-зв'язуючий центр. Цікаво, що незважаючи на те, що інші ФНА домени містять гомологічні ділянки послідовності лише у цих петлях, усі вони зберігають загальний план просторової організації [19].

Функції ФНА доменів у рослин. Загалом, шляхом пошуку в базі даних PFAM можливо виявити 47 білків рослин, які містять ФНА домени. Присутність у різноманітних білках рослин свідчить про важливу роль цих доменів у регуляції сигнальних процесів, проте специфічні мішені ФНА-вмісних білків у клітинах рослин залишаються переважно невідомими [12].

Кіназо-асоційована протеїнфосфатаза KAPP є одним з ФНА-вмісних білків рослин, що привертає до себе найбільшу увагу дослідників. Крім ФНА

домену KAPP містить також Т-кінцеву послідовність заякорювання у мембрані типу I, а також каталітичний протеїнфосфатазний домен типу 2C (PP2C). З'ясовано, що ця фосфатаза відіграє роль важливої регуляторної ланки у сигналюванні, опосередкованому рецептор-подібними кіназами рослин [21]. Дослідження показують, що KAPP здатна взаємодіяти з різноманітними RLK рослинами, і так здійснює їх дефосфорилювання та призводить до негативної регуляції переказу сигналу. Так, KAPP взаємодіє з рецептор-подібними кіназами HAESA, RLK5, RLK4, TMK1, CLV1, WAK1, FLS2, SERK1, BRI1, а також BAK1 [19]. Вважають, що за допомогою FHA домену KAPP взаємодіє з фосфорилюваними залишками серину та треоніну в цитоплазматичних доменах RLK, а за участю PP2C домену здійснює дефосфорилювання інших залишків фосфосерину та фосфотреоніну, послаблюючи так активність рецептор-подібної кінази.

На відміну від KAPP, функції інших FHA-вмісних білків рослин на сьогодні залишаються практично недослідженими. Нещодавно було клоновано ще кілька FHA-білків рослин, а саме: NtFHA1 тютюну та два гомологічні білки – AtFHA1 та AtFHA2 *Arabidopsis*, які виконують роль транскрипційних активаторів [12]. NtFHA1 – малий 209-амінокислотний білок, що містить у своїй структурі FHA домен та кислу ділянку. Було встановлено, що подібний до NtFHA1 транскрипційний активатор Fhl1 дріжджів бере участь у регуляції росту клітин та сплайсингу РНК. Цікаво, що незважаючи на доволі невисокий ступінь гомології (Fhl1 є білком з 936 амінокислотних залишків, що містить FHA домен, дві кислі ділянки на С та N кінці, а також ДНК-зв'язуючий домен форкхед), хімерний Hfl1, що містив FHA домен з NtFHA1, ектопічно експресований у клітинах дріжджів, був цілком функціональний [15]. Натомість, ектопічна експресія самого FHA домену NtFHA1, як і самого FHA домену Hfl1, призводила до порушень сплайсингу РНК та росту.

Клоновані пізніше гомологи AtFHA1 та AtFHA2 *Arabidopsis* також містять FHA домен та кислу ділянку, імовірно також є активаторами транскрипції, проте з огляду на невелику гомологію поза межами FHA домену, імовірно залучені до регуляції інших процесів. Обидва ці білки локалізуються у ядрах клітин. Цікаво, що експресія AtFHA1 та AtFHA2 виявляє відмінний характер. Тоді як рівень експресії AtFHA2 залишається конститутивно високим, рівень експресії AtFHA2 є за звичайних умов – низьким, проте експресія цього білка стимулюється різноманітними стимулами, зокрема дією таких гормонів рослин як ауксин, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота та брасиностероїди, а також чинниками абіотичного стресу, такими як гіпоксія [12]. З огляду на це, вважається, що AtFHA1 та AtFHA2 мають різну регуляторну роль. Конститутивна експресія AtFHA2 вказує на те, що цей білок є загальним регулятором активації транскрипції, натомість AtFHA1 може відігравати роль у специфічній модуляції транскрипції залежно від позаклітинних сигналів.

Висновок. Зазвичай білки, які беруть участь у сигналюванні, мають доменну організацію. Фактично, більшість залучених до процесів переказу сигналів білків утворена з доменів, що володіють каталітичною активністю (наприклад кіназних та фосфатазних доменів) а також доменів, які не мають каталітичної активності, проте опосередковують міжмолекулярні взаємодії

білків з ліпідами, іншими білками, або нуклеїновими кислотами. Часто під час переказу сигналів, білки, які містять каталітичні домени, модифікують інші ліпідні або білкові молекули, створюючи центри зв'язування для некаталітичних доменів інших сигнальних білків і утворення сигнальних комплексів.

Література

1. **Ago T.** The PX domain as a novel phosphoinositide- binding module / T. Ago, R. Takeya, H. Hiroaki, F. Kuribayashi, T. Ito, D. Kohda, H. Sumimoto // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2001. – 287(3). – P. 733-738.
2. **Babior B.M.** NADPH oxidase: an update / B.M. Babior // *Blood.* – 1999. – 93(5). – P. 1464-76. Review.
3. **Cesareni G.** Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH₃ domains? / G. Cesareni, S. Panni, G. Nardelli, L. Castagnoli // *FEBS Lett.* – 2002. – 513(1). – 38-44.
4. **Dalgarno D.C.** SH₃ domains and drug design: ligands, structure, and biological function / D.C. Dalgarno, M.C. Botfield, R.J. Rickles // *Biopolymers.* – 1997. – 43(5). – P. 383-400.
5. **Forman-Kay J.D.** Diversity in protein recognition by PTB domains / J.D. Forman-Kay, T. Pawson // *Curr Opin Struct Biol.* – 1999. – 9(6). – P. 690-5.
6. **Gu X.** Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division / X. Gu, D.P. Verma // *Plant Cell.* – 1997. – 9(2). – P. 157-69.
7. **Hammet A.** FHA domains as phospho-threonine binding modules in cell signaling / A. Hammet, B.L. Pike, C.J. McNees, L.A. Conlan, N. Tennis, J. Heierhorst // *IUBMB Life.* – 2003. – 55(1). – 23-27.
8. **Henley J.R.** Association of a dynamin-like protein with the Golgi apparatus in mammalian cells / J.R. Henley, M.A. McNiven // *J Cell Biol.* – 1996. – 133(4). – P. 761-75.
9. **Hiroaki H.** Solution structure of the PX domain, a target of the SH₃ domain / H. Hiroaki, T. Ago, T. Ito, H. Sumimoto, D. Kohda // *Nat Struct Biol.* – 2001. – 8(6). – P. 526-30.
10. **Hurley J.H.** Structural genomics and signaling domains / J.H. Hurley, D.E. Anderson, B. Beach, B. Canagarajah, Y.S. Ho, E. Jones, G. Miller, S. Misra, M. Pearson, L. Saidi, S. Suer, R. Trievel, Y. Tsujishita // *Trends Biochem Sci.* – 2002. – 27(1). – P. 48-53.
11. **Jin J.B.** A new dynamin-like protein, ADL₆, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in Arabidopsis / J.B. Jin, Y.A. Kim, S.J. Kim, S.H. Lee, D.H. Kim, G.W. Cheong, I. Hwang // *Plant Cell.* – 2001. – 13(7). – P. 1511-26.
12. **Joon-Woo A.** Molecular characteristics and differential expression of two nuclear factors containing the FHA domain in Arabidopsis / A. Joon-Woo, K. Moonil, B. Jae-Wook, P. Hyun-Sook // *Plant Sci.* – 2003. – 165. – P. 1024-32.
13. **Kang B.H.** The Arabidopsis cell plate-associated dynamin-like protein, ADL1Ap, is required for multiple stages of plant growth and development / B.H. Kang, J.S. Busse, C. Dickey, D.M. Rancour, S.Y. Bednarek // *Plant Physiol.* – 2001. – 126. – P. 47-68.
14. **Kapoor T.M.** Exploring the specificity pockets of two homologous SH₃ domains using structure-based, split-tool synthesis and affinity-based selection / T.M. Kapoor, A.H. Andreotti, S.L. Schreiber // *J Am Chem Soc.* – 1998. – 120. – P. 23-29.
15. **Kim M.** Forkhead-associated domains of the tobacco NtFHA1 transcription activator and the yeast Fhl1 forkhead transcription factor are functionally conserved / M. Kim, J.W. Ahn, K. Song, K.H. Paek, H.S. Pai // *J Biol Chem.* – 2002. – 277(41). – P. 38781-90.
16. **Lam B.C.** Domains as functional building blocks of plant proteins / B.C. Lam, E. Blumwald // *Trends Plant Sci.* – 2002. – 7(12). – P. 544-9.
17. **Lam B.C.** Regulation of ADL₆ activity by its associated molecular network / B.C. Lam, T.L. Sage, F. Bianchi, E. Blumwald // *Plant J.* – 2002. – 31(5). – P. 565-76.
18. **Lam B.C.** Role of SH₃ domain-containing proteins in clathrin-mediated vesicle trafficking in Arabidopsis / B.C. Lam, T.L. Sage, F. Bianchi, E. Blumwald // *Plant Cell.* – 2001. – 13(11). – P. 2499-512.
19. **Lee G.I.** 1H, 13C and 15N resonance assignments of the kinase-interacting FHA domain of Arabidopsis thaliana kinase-associated protein phosphatase / G.I. Lee, J. Li, J.C. Walker, S.R. Van Doren // *J Biomol NMR.* – 2003. – 25(3). – P. 253-4.
20. **Li J.** The FHA domain mediates phosphoprotein interactions / J. Li, G.I. Lee, S.R. Van Doren, J.C. Walker // *J Cell Sci.* – 2000. – 113(23). – P. 4143-9.

21. Li J. Kinase interaction domain of kinase-associated protein phosphatase, a phosphoprotein-binding domain / J. Li, G.P. Smith, J.C. Walker // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – 96. – P. 7821-6.
22. Mayer B.J. SH₃ domains: complexity in moderation // J. Cell Sci. – 2001. – 114(7). – P. 1253-63.
23. Mongiovi A.M. A novel peptide-SH₃ interaction / A.M. Mongiovi, P.R. Romano, S. Panni, M. Mendoza, W.T. Wong, A. Musacchio, G. Cesareni, P.P. Di Fiore // EMBO J. – 1999. – 18(19). – P. 5300-9.
24. Park J.M. A dynamin-like protein in *Arabidopsis thaliana* is involved in biogenesis of thylakoid membranes / J.M. Park, J.H. Cho, S.G. Kang, H.J. Jang, K.T. Pih, H.L. Piao, M.J. Cho, I. Hwang // EMBO J. – 1998. – 17(4). – P. 859-67.
25. Pawson T. Protein modules and signalling networks / T. Pawson // Nature. – 1995. – 373(6515). – P. 573-80.
26. Pawson T. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains / T. Pawson, P. Nash // Science. – 2003. – 300(5618). – P. 445-52.
27. Qin C. The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains / C. Qin, X. Wang // Plant Physiol. – 2002. – 128(3). – P. 1057-68.
28. Sato T.K. Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains / T.K. Sato, M. Overduin, S.D. Emr // Science. – 2001. – 294(5548). – P. 1881-5.
29. Williams J.G. SH₂ domains in plants imply new signalling scenarios / J.G. Williams, M. Zvelebil // Trends Plant Sci. – 2004. – 9(4). – P. 161-3.
30. Yu H. Solution structure of the SH₃ domain of Src and identification of its ligand-binding site / H. Yu, M.K. Rosen, T.B. Shin, C. Seidel-Dugan, J.S. Brugge, S.L. Schreiber // Science. – 1992. – 258 (5088). – P. 1665-8.

Гут Р.Т. Значение доменов белок-белковых взаимодействий в сигнализации

Исследования сигнальных механизмов у растений обнаружили, что несмотря на то, что организация сигнальных путей в клетках растений и других эукариот похожа, существуют также существенные отличия, которые также проявляются в пространенности в протеомах растений отдельных семейств доменов, и отличительных функциях белков, которые эти домены содержат.

Ключевые слова: клетка, сигнализирование, домены, белки.

Gout R.T. A role of domains of protein-protein's cooperations in signaling

Researches of alarm mechanisms at plants discovered, that although organization of the alarm ways in the cells of plants and other eucariot is similar, there are also fundamental differences which also appear in prevalence at the proteomes of the plants of separate domain families, and alternative functions of proteins which these domains contain.

Keywords: cell, signaling, domain, protein.

УДК 582.475:630*1(477.4)

Проф. В.П. Шлапак, д-р с.-г. наук – НДП
"Софіївка" НАН України, Умань; аспір. С.А. Макаринська –
Уманський НУС; аспір. В.В. Шлапак – НУБіП України, Київ

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МОРОЗОСТІЙКОСТІ
ОКРЕМИХ ВИДІВ РОДУ *PINUS* L.**

Досліджено стійкість до морозу чотирьох видів роду *Pinus* L. в умовах глибокого і вимушеного спокою. Визначено індекс морозного пошкодження окремих частин пагона і бруньки. Встановлено, що найвища стійкість до низьких температур спостерігається в стані органічного або глибокого спокою. В цей час можна визначити потенційну морозостійкість надземної частини рослини, що підтвердили результати досліджень, коли всі породи були найбільше пошкоджені тільки внаслідок проморожування їх пагонів за температури -35 °С.

Ключові слова: морозостійкість, проморожування, глибокий і вимушений спокій, індекс морозного пошкодження.