

Альтернативний сплайсинг пре-мРНК гена інтерсектину 1: експресія транскрипційних ізоформ

Л. О. Циба, І. Я. Скрипкіна, О. В. Ніколаєнко, Г. О. Ференець,
В. В. Гордиук, К. Гардинер¹, А. В. Риндич

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

¹Інститут ім. Елеанори Рузвельт при Денверському університеті
Денвер, Колорадо, 80206, США

Проаналізовано альтернативний сплайсинг пре-мРНК гена інтерсектину 1 людини і миші, який кодує важливі компоненти ендоцитозу та сигнальних шляхів у клітині. Виявлено шість нових транскриптів гена інтерсектину 1 та охарактеризовано рівень їхньої експресії в тканинах людини та миші.

Вступ. Інтерсектин — це еволюційно консервативний мультидоменний білок, що бере участь у клатрин-асоційованому ендоцитозі та передачі клітинного сигналу за допомогою MAP-кінази [1]. Більшість виявлених у клітинах ссавців транскриптів інтерсектину 1 представлена короткою (ITSN1-S) та довгою формами (ITSN1-L). Перша експресується в усіх тканинах, другій характерна мозкопецифічна експресія [2].

Обидві форми містять з N-кінця два EH-домени (Eps15 homology), α -спірально ділянку, збагачену лізином, лейцином, глутаматом, аргініном і глутаміном (KLERQ-домени) та п'ять SH3-доменив (Src homology) — A, B, C, D, E. ITSN1-L з C-кінця містить три додаткових домени: DH (Dbl homology), PH (Pleckstrin homology) та C2. Виявлені функції ITSN1 обумовлені наявністю різних типів доменив або їхньою взаємодією. Так, експресія кДНК, що кодує обидва EH-домени, в культурі клітин активує транскрипційний фактор Elk-1, але рівень активації зменшується, якщо кДНК кодує повну форму ITSN1-S [3].

Автори роботи [4] показали, що кДНК-конструкція, яка кодує лише DH-домени (гуанін-нуклеотид-обмінний фактор для GTPази Cdc42) або DH- та PH-домени разом, має більшу активність, ніж повна форма інтерсектину. Крім того, активація Cdc42 білком ITSN1 посилюється зв'язуванням SH3-доменив з білком N-WASP (Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein). Виявлено, що SH3-домени різняться за силою взаємодії з N-WASP (SH3A > SH3E > SH3C) [4]. SH3A-, B- і D-домени ITSN1 також можуть зв'язувати білок CdGAP, який пригнічує GTPазу Cdc42. Отже, зв'язування білка CdGAP SH3-доменами інтерсектину 1 призводить до активації Cdc42 [5]. SH3A-домени конкурує з білком Grb2 за зв'язування з mSos1 (Son-of-Sevenless), який є гуанін-нуклеотид-обмінним фактором для Ras та Rac1. Завдяки цьому підвищена експресія кДНК-конструкцій, які кодують SH3-домени, блокує Ras-активацію [6, 7]. До того ж інтерсектин взаємодіє з відомими білками ендоцитозу: EH-домени можуть зв'язувати стонін, епсин 1 і 2, Ibp1 та Ibp2, RAB/Rip; SH3-домени — динамін та синаптоянін. SNAP25 (білок, що бере участь в екзоцитозі) зв'язується з KLERQ-доменом [8]; PH-домени — з фосфоінозитидами, що може

обумовлювати локалізацію ITSN1 біля клітинної мембрани [9].

Беручи до уваги мультидоменну структуру інтерсектину 1, відмінності в будові доменів та обумовлену цим специфічність їхньої взаємодії з білками-партнерами, можна зробити припущення щодо ролі альтернативного сплайсингу в регуляції функцій ITSN1. На цей час описано альтернативний сплайсинг пре-мРНК гена ITSN1, який призводить до утворення його основних форм (довгої та короткої) [10]. Раніше нами було виявлено нові форми транскриптів цього гена, що утворюються за рахунок сплайсингу ділянок, які містять 25-й та 26-й екзони (SH3C-домен) та 6—14-й екзони (другий EH-домен та частина KLERQ-домену) [11]. У цій роботі описано шість нових варіантів альтернативного сплайсингу ITSN1 у людини та миші, в результаті яких відбувається скорочення відстані між EH-доменами, вбудовування в SH3A-домен та делеція DH-домену, а також зсуви рамки зчитування, що призводять до утворення стоп-кодонів після SH3B-, SH3C- і DH-доменів.

Матеріали і методи. *Отримання препаратів РНК.* Тканини дорослих мишей BALB/c × C₅₇BL/6 віком 2, 4, 6 місяців заморожували в рідкому азоті і зберігали при температурі -70 °С. Ембріональні тканини людини надано Центром ембріональних тканин (Україна). Пухлини тканин мозку отримано з Інституту нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова (Україна). Тотальну РНК з тканин людини і миші виділяли гуанідинізоціанатним методом за допомогою реагенту TRIzol («Gibco BRL/Life Technologies», США).

Зворотна транскрипція — полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). кДНК синтезували з 5 мкг тотальної РНК за допомогою oligo(dT)-праймерів та зворотної транскриптази («Roche», Німеччина). Отриману кДНК (5 %) використовували як матрицю для ПЛР. ПЛР проводили в 50 мкл суміші, яка містила 20 пмоль кожного із специфічних праймерів, 1,5 мМ MgCl₂, dNTP кожного типу у концентрації 0,2 мМ, 2,5 од. Таq ДНК-полімерази («Roche») і відповідний буфер.

Ампліфікацію здійснювали за таких умов: денатурація — 94 °С, 40 с (у першому циклі — 2 хв); реасоціація з відповідними праймерами — 1 хв, елонгація — 72 °С, 1 хв, 35 циклів; на останньому етапі — 72 °С, 7 хв. Продукти реакцій розділяли в 1,5-му та 2 %-му агарозних гелях, переносили на мембрану (Hybond N+, «Amersham Pharmacia Biotech», Велика Британія/Швеція).

Гібридизацію проводили з відповідними фрагментами кДНК ITSN1 у жорстких умовах.

Радіоактивно мічені зонди ДНК отримували з використанням набору реагентів «Rediprime II» та [α -³²P]dCTP, згідно з рекомендаціями фірми-виробника («Amersham Pharmacia Biotech»). Відібрані продукти ПЛР виділяли з агарозного гелю за допомогою набору реактивів «Geneclean II» («BIO 101», США), клонували у вектор *pGEM-T Easy* («Promega», США) та визначали їхню нуклеотидну послідовність. Продукти ЗТ-ПЛР з праймерами до ділянки, яка кодує SH3A-домен, аналізували в 5 %-му поліакриламідному гелі.

Праймери, які використовували для ЗТ-ПЛР:

2 екзон (л) forward 268-CATGGCTCAGTTTCSAACACCT-289;

7 екзон (л) reverse 889-GGCCACATCAAATGACTGTGCC-868;

2 екзон (м) forward 3-GGCTCAGTTTCCSACACCTTTC-24;

7 екзон (м) reverse 606-TTGTGCCTTCTGTAACCTAGTG-585;

SH3A-домен, екзон 18 (л) forward 2399-CAACACCAAGAACCAGCTAAGCCA-2422;

SH3A-домен, екзон 21 (л) reverse 2719-AGTCACTGGTTTCACTGGAGCGGG-2696;

SH3A-домен, екзон 18 (м) forward 2122-CATCGCATCAGGAGCCAGCTA-2143;

SH3A-домен, екзон 22 (м) reverse 2581-CCGTTTCTGGCTTCTCGTTTGAGC-2558;

SH3C-домен, екзон 23 (л) forward 3112-GTGTGGTTTGGAGAAGTTCAAGG-3135;

SH3C-домен, екзон 23 (л) forward nested 3181-GCCATAAGGAAGTCTACAAGC-3202;

26а-екзон (л) reverse TATCAGGTGCAAATCATGGCAGGG;

35 екзон (м) forward 4158-GGAAAACACTCTGAGAACCATCC-4181;

40 екзон (м) reverse 4913-GAATTCCACTTGGGGTTTAGCGTG-4890;

31 екзон (м) forward 3687-GAAGCGGCAAGGCTACATCCATG-3709;

36 екзон (м) reverse 4401-GCTCTTGGCCTTG-TAGAGCTTCC-4739.

Позиції нуклеотидів для праймерів відповідають кДНК довгої ізоформи ITSN1 людини (реєстраційний номер у GenBank AF114487) та кДНК EseiL миші (реєстраційний номер у GenBank AF132481). Олігонуклеотиди для 26а-екзона людини підбирали відповідно до EST ut69g01 (реєстраційні номери в GenBank R93190 і R93287).

Аналіз нуклеотидних послідовностей здійснювали з використанням програмного забезпечення BLASTN, BLASTX та DNASTAR; амінокислотних послідовностей — за допомогою програм Profile Scan (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) та SMART (<http://coot.embl-heidelberg.de/SMART>). Нуклеотидні послідовності нових ізоформ інтерсектину внесено в базу даних GenBank за такими реєстраційними номерами: AF525079 (четверта ізоформа миші), AY127576 (п'ята ізоформа миші), AY129562 (шоста ізоформа миші), AY254341 (п'ята ізоформа людини), AY257970 (сьома ізоформа миші), AY340592 (восьма ізоформа людини), AY340593 (дев'ята ізоформа людини).

Результати і обговорення. Нозерн-блот-гібридизація гена інтерсектину 1 людини та миші виявила наявність додаткових сигналів, які не відповідають довгій та короткій формам транскриптів [10, 12]. Беручи також до уваги складну доменну організацію ITSN1, можна припустити існування інших варіантів альтернативного сплайсингу.

Альтернативний сплайсинг частини послідовності 6-го екзона. За допомогою ЗТ-ПЛР-аналізу мРНК з тканин дорослої миші з праймерами до 5'-ділянки гена ITSN1 знайдено два фрагменти: 604 п. н., який відповідає відомій мРНК ITSN1, та 493 п. н. (рис. 1, а). В результаті клонування та визначення нуклеотидної послідовності нового продукту ПЛР виявлено делецію 111 п. н. у 6-му екзоні, яка не призводить до порушення рамки зчитування. Цей транскрипт, названий ізоформою 4, спостерігався в усіх перевірених тканинах миші і мав низький рівень експресії. У базі даних EST людини виявлено подібний транскрипт з делецією 111 п. н. 6-го екзону (реєстраційний номер у GenBank AK027846). За допомогою ЗТ-ПЛР-аналізу тотальної РНК з ембріональних тканин людини показано присутність ізоформи 4 в усіх досліджуваних зразках (рис. 1, б).

Порівняння виявлених транскриптів з геномною ДНК людини та миші виявило, що ізоформа 4 утворюється внаслідок використання альтернативного 3'-сайта сплайсингу, локалізованого в 6-му екзоні гена ITSN1. Делеція 111 п. н. призводить до скорочення відстані між ЕН1- та ЕН2-доменами на 37 амінокислотних залишків. В табл. 1 представлено екзонно-інтронну організацію гена ITSN1 миші, визначену при аналізі геномної послідовності миші (реєстраційний номер у GenBank NT039625).

Альтернативний сплайсинг 20-го екзона. 20-й екзон гена ITSN1 людини містить 15 п. н. і кодує

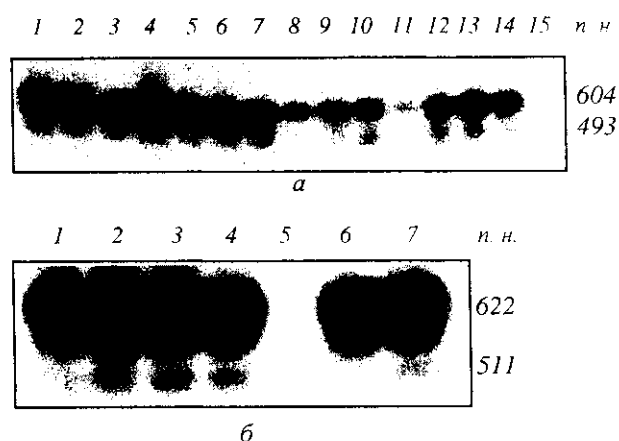


Рис. 1. Альтернативний сплайсинг 6-го екзона. В результаті ЗТ-ПЛР-аналізу з використанням праймерів до ділянок 2-го та 7-го екзонів отримано кДНК миші (а: 1 — головний мозок, 2 місяці; 2 — головний мозок, 4 місяці; 3 — головний мозок, 6 місяців; 4 — мозочок, 2 місяці; 5 — мозочок, 4 місяці; 6 — мозочок, 6 місяців; 7 — печінка, 2 місяці; 8 — печінка, 4 місяці; 9 — печінка, 6 місяців; 10 — серце; 11 — м'язи; 12 — спинний мозок, 2 місяці; 13 — нирки; 14 — легені; 15 — контроль) та людини (б: 1 — м'язи, 12 тижнів; 2 — легені, 12 тижнів; 3 — мозок, 12 тижнів; 4 — печінка, 12 тижнів; 5 — контроль; 6 — серце, 12 тижнів; 7 — нирки, 12 тижнів) з різних тканин. Продукти виявляли за допомогою гібридизації. В кожному випадку верхня смуга відповідає відомій послідовності кДНК, що містить повний 6-й екзон, а нижня — послідовності кДНК, яка вміщує 6-й екзон із скороченим 3'-кінцем. Клонування та секвенування продуктів ЗТ-ПЛР підтвердило їхню достовірність

п'ять амінокислотних залишків SH3A-домену (VKGEW). Порівняння послідовностей кДНК людини та миші виявило, що кДНК інтерсектину 1 миші не містить фрагмента, гомологічного 20-му екзону ITSN1 людини, хоча цей екзон представлений в геномі миші. Для пошуку мишачих транскриптів, які містять 20-й екзон, було здійснено ЗТ-ПЛР з праймерами до 18-го і 22-го екзонів на різних тканинах. Клонування і визначення нуклеотидної послідовності продуктів ЗТ-ПЛР продемонструвало існування транскрипта з 20-м екзоном у миші. Цей транскрипт виявлено лише в головному мозку, тоді як транскрипти без 20-го екзона були присутні в усіх досліджуваних тканинах (рис. 2, а). Транскрипти з 20-м екзоном та без нього мали однаковий рівень експресії у великих півкулях головного мозку та мозочку дорослої миші.

В ембріональних тканинах людини також було знайдено мозкоспецифічну експресію транскрипта ITSN1 з 20-м екзоном (рис. 2, б). Крім того, рівень вмісту цього транскрипта зростав з розвитком ембріона, в той час як рівень експресії транскрипта без 20-го екзона відповідно зменшувався. У зразках

Таблиця 1
Екзонно-інтронна будова гена інтерсектину 1 миші

Екзон	3'-акцепторний сайт сплайсингу	Довжина екзона, п. н.	5'-донорський сайт сплайсингу
1	GAG...	256*	...
2	tacagGCG...	60	...GTCgtaag
3	tgcagGTA...	93	...CTGgtatg
4	tacagGTG...	64	...ATGgtaag
5	tgcagGGC...	161	...TTGgtaag
6	tccagGTA...	180	...CTGgtacg
7	tatagCAG...	97	...CAGgtaag
8	cacagCGC...	10	...CAGgtatt
9	gttagGTC...	64	...ATGgtaag
10	attagGAA...	138	...CAGgtaagt
11	cgcagAAG...	113	...CTGgtgagt
12	ttaagTGA...	263	...GAGgtgag
13	cacagTGA...	148	...CTGgtgag
14	tgaagAAT...	141	...CAGgtgag
15	cctagGAA...	88	...ATAgtaggt
16	...	140	...AAGgtgac
17	tctagGAA...	128	...GAGgtgag
18	ggcagACG...	227	...CAGgtatc
19	aacagAGA...	207	...ATGgtaag
20	tggagGTT...	15	...TGGgtaag
21	cacagGTG...	248	...CACgtatg
22	tccagGTG...	160	...CAGgtagg
23	ataagGGT...	206	...AAGgtatt
24	cacagCAT...	83	...AAGgtaag
25	tccagAGT...	167	...GAGgtaaa
26	GGC...	46	CTG...
27	ttcagAAA...	122	...CAAgttagt
28	cctagGCT...	118	...CAGgtaag
29	TGT...	192	...CAT
30	GAA...	386	...TTTgctatt
31	tgcagGGT...	122	...GAGgtacca
32	tgtagATC...	107	...GAAgtaag
33	tgcagAGC...	184	...AAAgtaag
34	ttcagAGA...	99	...AACgtaag
35	tacagATC...	168	...GAGgtagc
36	tctagCAA...	213	...ACCGtaag
37	tgcagCCC...	122	...GAGgtaag
38	ccaagGAC...	83	...TGGgtatg
39	tttagTCC...	84	...ATGgtaag
40	tctagGAA...	174	...ATGgtaag
41	ttcagATT...	150	...AGCagccc

*За гомологією з відповідним екзоном людини.

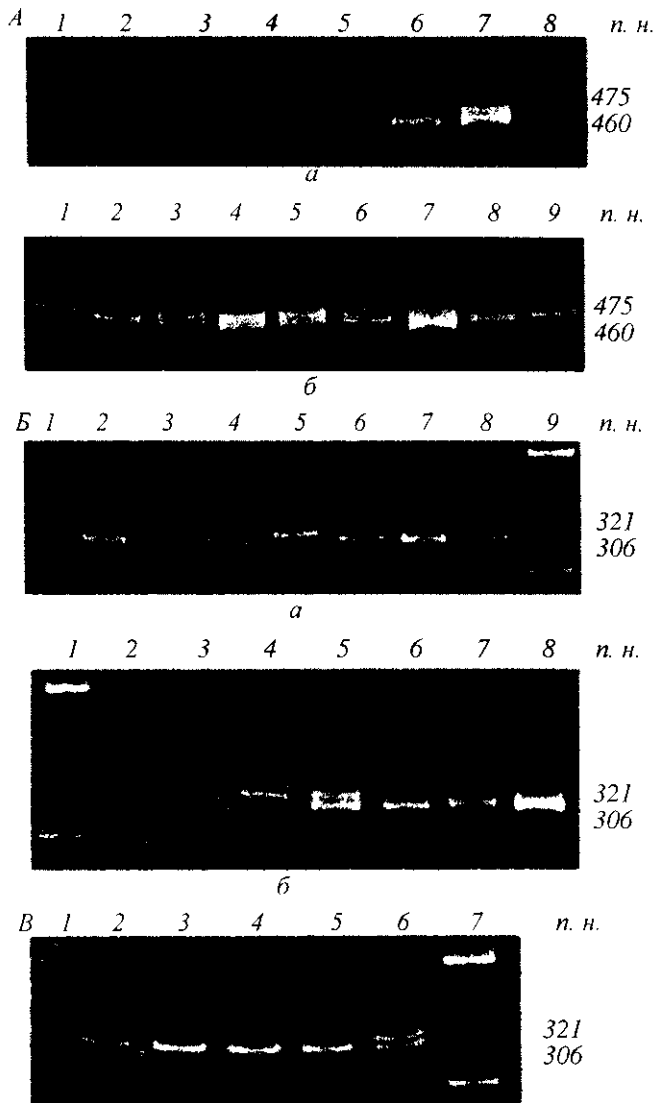


Рис. 2. Альтернативний сплайсинг 20-го ексона. Електрофорез у поліакриламідному гелі дозволив виявити в деяких тканинах 15 додаткових нуклеотидів, які відповідають 20-му екзону. Для ЗТ-ПЛР-аналізу використовували праймери до ділянок 18-го та 21-го екзонів людини, 18-го та 22-го екзонів миші: А — тканини дорослої миші (а: 1 — яєчки; 2 — м'язи; 3 — спинний мозок, 2 місяці; 4 — печінка, 2 місяці; 5 — нирки; 6 — легені; 7 — мозочок, 2 місяці; — головний мозок, 6 місяців; б: 1 — легені; 2 — нирки; 3 — головний мозок, 2 місяці; 4 — головний мозок, 4 місяці; 5 — головний мозок, 6 місяців; 6 — мозочок, 2 місяці; 7 — мозочок, 4 місяці; 8 — мозочок, 6 місяців; 9 — печінка, 2 місяці); Б — тканини ембріона людини (а: 1 — контроль; 2 — серце, 12 тижнів; 3 — м'язи, 12 тижнів; 4 — нирки, 12 тижнів; 5 — мозок, 12 тижнів; 6 — печінка, 12 тижнів; 7 — легені, 12 тижнів; 8 — ембріон, 12 тижнів; 9 — маркер; б: 1 — маркер; 2 — контроль; 3 — печінка, 12 тижнів; 4 — мозок, 12 тижнів; 5 — мозок, 9 тижнів; 6 — мозок, 8 тижнів; 7 — мозок, 7 тижнів; 8 — мозок, 6 тижнів); В — тканини дорослої людини (1 — контроль; 2 — гліобластома; 3 — астроцитоза; 4 — дорослий мозок (прилеглі до астроцитоза тканини); 5 — печінка, 12 тижнів; 6 — мозок, 9 тижнів; 7 — маркер)

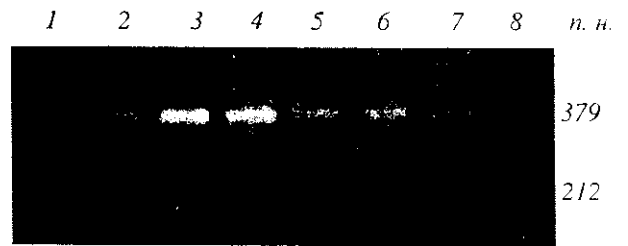


Рис. 3. Альтернативний сплайсинг 25-го та 26а-екзонів гена *ITSN1* людини. Після ЗТ-ПЛР-аналізу з використанням праймерів до ділянок 23-го та 26а-екзонів (нуклеотидна послідовність відповідає EST ut69g01 людини (реєстраційний номер у GenBank R93287)) на агарозному гелі виявлено дві смуги (379 та 212 п. н.): верхня відповідає послідовності кДНК, що містить екзони з 24-го по 26а, нижня — послідовності кДНК, яка вміщує екзони 24, 26 та 26а (1 — маркер; 2 — мозок, 12 тижнів; 3 — печінка, 12 тижнів; 4 — легені, 12 тижнів; 5 — м'язи, 12 тижнів; 6 — серце, 12 тижнів; 7 — нирки, 12 тижнів; 8 — контроль)

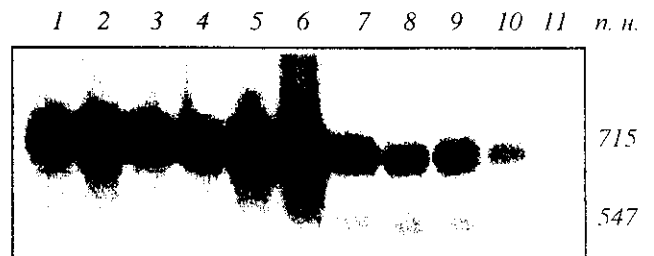


Рис. 4. Альтернативний сплайсинг 35-го екзону. ЗТ-ПЛР-аналіз кДНК миші з використанням праймерів до ділянок 31-го та 36-го екзонів дозволив виявити, крім очікуваного продукту розміром 715 п. н., додатковий продукт 547 п. н., що утворився внаслідок делеції 35-го ексона. Продукти виявлено за допомогою гібридизації та ідентифіковано шляхом клонування і секвенування (1 — головний мозок, 2 місяці; 2 — головний мозок, 4 місяці; 3 — головний мозок, 6 місяців; 4 — мозочок, 2 місяці; 5 — мозочок, 4 місяці; 6 — мозочок, 6 місяців; 7 — спинний мозок, 2 місяці; 8 — печінка, 6 місяців; 9 — нирки; 10 — легені; 11 — контроль)

мозку дорослої людини та астроцитарних пухлинах (анапластична астроцитоза, гліобластома, прилеглі тканини) виявлено лише транскрипти, які не містять 20-го ексона (рис. 2, в).

Альтернативний сплайсинг ексона 26а людини. В нуклеотидних базах даних знайдено EST людини ut69g01, які містили 23—28-й екзони та додатково 83 нуклеотиди з 26-го інтрона. Ця ділянка 26-го інтрона оточена консенсусними сайтами сплайсингу і була названа ексоном 26а. ЗТ-ПЛР-аналіз з праймерами до 24-го та 26а екзонів виявив два продукти, які присутні на низькому рівні в усіх тканинах (рис. 3). Клонування та секвенування цих продуктів дозволило встановити,

що один з них (довжиною 379 п. н.) містить екзони 24, 25, 26 та 26а; другий (довжиною 212 п. н.) — екзони 24, 26 та 26а. В обох випадках порушується рамка зчитування і утворюється стоп-кодон після ділянки, яка кодує SH3C-домен (за наявності 25-го екзона), або ділянки, що кодує SH3B-домен (при відсутності 25-го екзона).

Альтернативний сплайсинг пре-мРНК гена *ITSN1*, що впливає на DH- та PH-домени. ЗТ-

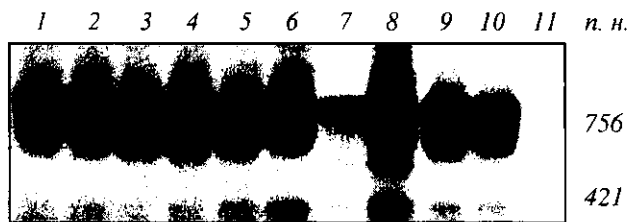


Рис. 5. Альтернативний сплайсинг 36-го та 37-го екзонів. ЗТ-ПЛР-аналіз кДНК миші з використанням праймерів до ділянок 35-го та 40-го екзонів дозволив виявити, крім очікуваного продукту розміром 756 п. н., додатковий продукт 421 п. н. Продукти визначено за допомогою гібридизації та ідентифіковані шляхом клонування та секвенування: 1 — головний мозок, 2 місяці; 2 — головний мозок, 4 місяці; 3 — головний мозок, 6 місяців; 4 — мозочок, 2 місяці; 5 — мозочок, 4 місяці; 6 — мозочок, 6 місяців; 7 — спинний мозок, 2 місяці; 8 — печінка, 6 місяців; 9 — нирки; 10 — легені; 11 — контроль

ПЛР-аналізом тканин миші з праймерами до 31-го та 36-го екзонів виявлено транскрипт (ізоформа 7), який не містить 35-го екзона. Відсутність згаданого екзона не порушує рамки зчитування, але спричинює делецію 32 амінокислотних залишків у DH-домени.

Цей варіант альтернативного сплайсингу спостерігався в усіх перевірених тканинах миші, крім мозку (рис. 4). В результаті аналізу виведеної амінокислотної послідовності ізоформи 7 за допомогою програм Profilescan (http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html) та SMART (<http://coot.embl-heidelberg.de/SMART>) показано, що делетований С-кінець DH-домену заміщується амінокислотними залишками, які розділяють домени DH та PH.

36-й та 37-й екзони гена *ITSN1* кодують PH-домен. мРНК *ITSN1* миші, що не містить цих екзонів, вперше виявлена нами у мозочку та позначена як ізоформа 6. Ця ізоформа детектується в усіх досліджуваних тканинах миші, але рівень її експресії в мозку значно нижчий (рис. 5). Делеція 36-го і 37-го екзонів веде до порушення рамки зчитування та появи стоп-кодону після DH-домену.

Визначення нуклеотидної послідовності геному людини дозволило встановити, що він містить не

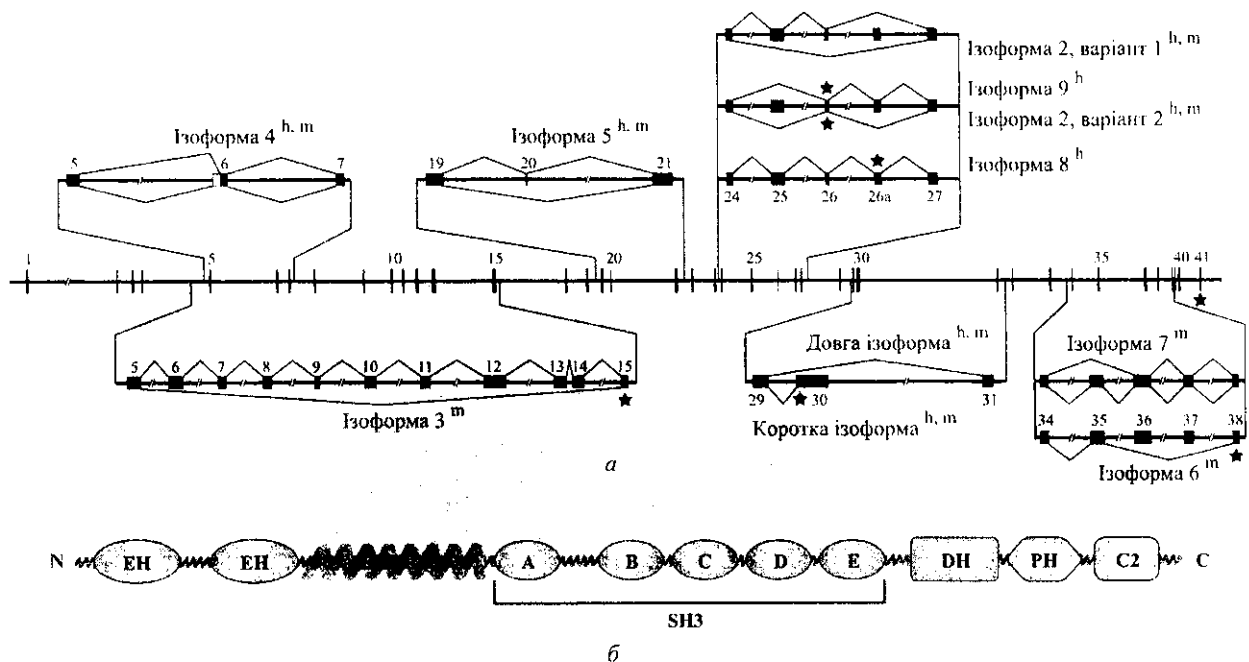


Рис. 6. Екзонно-інтронна структура гена *ITSN1* людини, варіанти альтернативного сплайсингу (а) та доменна будова довгої форми білка *ITSN1* (б). Індексми *h* або *m* позначено наявність ізоформи у людини або миші відповідно

Таблиця 2
Нові варіанти сплайсингу гена інтерсектину 1

Екзон	Вплив на РНК	Вплив на домени білка	Зсув рамки зчитування*	Рівень експресії**	Присутність у базах даних EST	Консервативність людина/миша
6	Делеція 111 н. з 5'-кінця	Скорочення відстані між ЕН1-ЕН2-доменами на 37 а. з.	Немає	Низький	Людина	Так
6—14***	Делеція 1247 н.	Обрив після ЕН1-домени (15 нових а. з.)	Так	Низький	—	Не визначено у людини
20	Вставка 15 н.	Вставка 5 а. з. в SH3A-домен	Немає	Високий, мозко-специфічний	Людина	Так
25***	Делеція 167 н.	Обрив після SH3B-домени (15 нових а. з.)	Так	Високий	Ні	Так
25, 26***	Делеція 213 н.	Делеція SH3C-домени (71 а. з.)	Немає	Високий	Ні	Так
26a	Вставка 83 н.	Обрив після SH3C-домени (7 нових а. з.)	Так	Низький	Людина	Послідовність екзона не визначено у миші
25/26a	Делеція 167 н., вставка 83 н.	Обрив після SH3B-домени (19 нових а. з.)	Так	Низький	Немає	Послідовність екзона 26a не визначено у миші
35	Делеція 168 н.	Делеція 56 а. з. всередині DN-домени	Немає	Низький	Немає	Не визначали у людини
36 + 37	Делеція 335 н.	Обрив після DN-домени (11 нових а. з.)	Так	Низький	Немає	Не визначали у людини

Примітка. *«Так» — утворення стоп-кодону за 50 нуклеотидів до кінця екзона; **«Високий» продукт можна бачити на агарозному або акриламідному гелі; «низький» — для візуалізації необхідно провести гібридизацію; ***за результатами Скрипкіної та співавт. [11]; а. з. — амінокислотні залишки.

більше 30000 кодуєчих білки генів [13]. Це значно менше, ніж очікувалося, і не набагато перевищує кількість генів таких простих організмів, як *Caenorhabditis elegans* та *Drosophila*.

Альтернативний сплайсинг може бути одним із основних механізмів, які забезпечують різноманітність білків. Дійсно, аналіз баз даних EST показав, що для більш ніж 40 % генів людини характерним є альтернативний сплайсинг [14], проте принципи створення баз даних EST не дозволяють виявляти всі його варіанти. Інтерсектин 1 з притаманною йому складною доменною організацією і різноманітними домен-специфічними взаємодіями є цікавим об'єктом для вивчення альтернативного сплайсингу.

Нами виявлено дев'ять варіантів альтернативного сплайсингу пре-мРНК гена ITSN1, три з яких описані нами раніше [11] (рис. 6), та охарактеризовано їхню експресію в тканинах людини і миші. Характеристики нових транскриптів ITSN1 підсумовано в табл. 2. Особливий інтерес викликають транскрипти, в яких не порушується рамка зчитування:

— скорочення шостого екзона призводить до зменшення відстані між двома ЕН-доменами на 37

амінокислотних залишків. ЕН-домени взаємодіють з білками, що беруть участь у клатрин-залежному ендоцитозі: стоніном 2 [15], Ibp1, Ibp2, RAB/Rip [16] та епсином 1 і 2 [12]. Зменшення відстані між ЕН1- і ЕН2-доменами може впливати на ефективність зв'язування з цими білками, зменшуючи її за рахунок стеричних перешкод або збільшуючи шляхом підсилення множинних взаємодій;

— альтернативний сплайсинг 20-го екзона призводить, за результатами комп'ютерного аналізу, до інсерції п'яти амінокислотних залишків у п-Src петлю SH3A-домени мозкоспецифічних форм ITSN1 (рис. 7). Подібний варіант сплайсингу в SH3-домени описано для мозкоспецифічної ізоформи Src: 18 нуклеотидів включаються в ділянку, що кодує п-Src петлю SH3-домени [17]. Існує припущення, що специфічність зв'язування SH3-домени з білками-мішенями залежить від амінокислотних залишків п-Src та RT петель [18, 19]. Петля п-Src амфіфізину 2 також довша на п'ять амінокислотних залишків [20], завдяки чому він здатний блокувати клатрин-асоційований ендоцитоз. Цікаво, що в роботах Ямабхаї і співавт. продемонстровано сильну взаємодію SH3A-домени ITSN1 з ди-наміном та синаптояніном [16], тоді як Окамото і

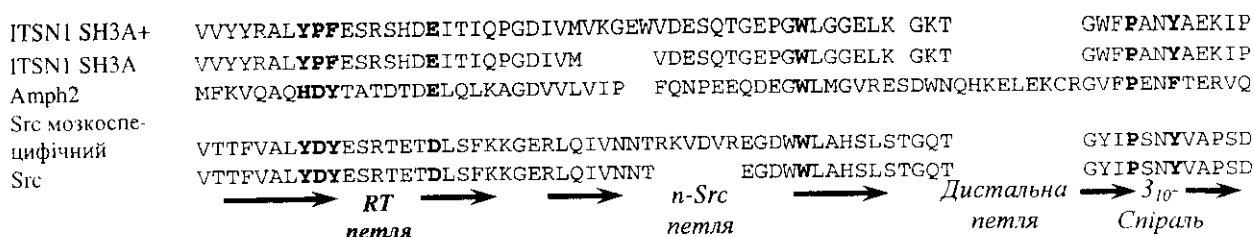


Рис. 7. Порівняння амінокислотних послідовностей SH3-домених різних білків: SH3A-домени інтерсектину 1 (з інсерцією п'яти амінокислотних залишків, що кодуються 20-м екзоном, та без неї); SH3-домени білка амфіфізину II та SH3-домени звичайної та мозкоспецифічної форм білка людини c-Src. Найконсервативніші послідовності виділено жирним шрифтом. Елементи вторинної структури SH3-домени білка c-Src ідентифіковано авторами роботи [22] (вказані під послідовністю), номенклатуру цих ділянок подано за Ноблом та співавт. [18]

співавт. показали, що SH3A- і SH3B-домени слабо взаємодіють з динаміном і не зв'язують синапто-ніну [8].

У першому випадку для експерименту використано кДНК без 20-го екзону, у другому — кДНК з 20-м екзоном. Тобто можна припустити, що альтернативний сплайсинг 20-го екзону впливає на специфічність взаємодії інтерсектину з його партнерами. Варто відзначити, що в процесі розвитку мозку ембріона людини пропорційна частка транскриптів з 20-м екзоном зростає, хоча в дорослому стані присутній лише варіант без 20-го екзона. У дорослої миші спостерігається еквімолярне співвідношення цих форм;

— в результаті делеції 35-го екзона відбувається заміна 56 С-кінцевих амінокислотних залишків ДН-домени. ДН-домени специфічно активує GTPазу Cdc42 [4] і ця активність посилюється приєднанням білка N-WASP до SH3-домених інтерсектину. Білок CdGAP, який є інгібітором Cdc42, також зв'язується з SH3-доменами. Таким чином, активність GTPазу Cdc42 регулюється цілим комплексом взаємодій SH3-домених та ДН-домени, які є об'єктами альтернативного сплайсингу.

Використання 26а екзона спричинює утворення двох транскриптів ITSN1, які кодують два (А, В) або три (А, В, С) SH3-домени. Враховуючи раніше виявлений альтернативний сплайсинг 25-го і 26-го екзонів, які кодують SH3С-домени [11], можна припустити існування ізоформ ITSN1, що містять два (А, В), три (А, В, С), чотири (А, В, D, Е) або п'ять (А, В, С, D, Е) SH3-домених. Відомо, що SH3-домени ITSN1 відрізняються за специфічністю взаємодії з білками — партнерами інтерсектину. Так, білок mSos1 зв'язується лише з SH3А-доменом [6, 7]; SH3А-, SH3С- та SH3Е-домени сильно зв'язують динамін і синаптонін [16]. Підвищена експресія SH3С- та SH3Е-домених при-

гнічує формування облямованих клатрином пухирців на 50 %, тоді як SH3А-домени повністю зупиняє цей процес, а SH3В- і SH3D-домени не впливають на нього [21]. SH3А-, SH3В- і SH3D-домени зв'язуються з білком CdGAP (інгібітором Cdc42 GTPазу) [5], а SH3А-, SH3С-, SH3Е-домени взаємодіють з білком N-WASP [4].

Утворення стоп-кодону після ДН-домени (ізоформа б) також може мати функціональне значення. Показано, що конструкція, яка містила тільки ДН-домени, мала нижчу активність по відношенню до Cdc42, ніж конструкція з ДН- та РН-доменами [4].

За останній час виявлено низку функцій ITSN1, більшість з яких здійснюється завдяки взаємодіям його доменів. Отже, регуляція сплайсингу пре-мРНК ITSN1 впливає на функціонування білка шляхом утворення різноманіття його ізоформ.

Таким чином, вивчення альтернативного сплайсингу, в тому числі і гена ITSN1, є перспективним напрямком досліджень і допомагає з'ясувати складні багаторівневі взаємодії білків у клітині.

Роботу виконано за фінансової підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень Міністерства освіти і науки. Проект 05.07/00147.

L. O. Tsyba, I. Ya. Skrypina, O. V. Nikolaienko, G. O. Ferenets, V. V. Gordiyuk, K. Gardiner, A. V. Rynditch

Alternative splicing of intersectin 1 gene pre-mRNA: expression of transcriptional isoforms

Summary

In the present work we have analyzed the alternative splicing of both mouse and human intersectin 1 gene, which encodes important components of endocytosis and signaling pathways in cell. We have found six new transcripts of intersectin 1 and characterized their expression level in human and mouse tissues.

Л. А. Цыба, И. Я. Скрипкина, А. В. Николаенко, А. А. Ференец, В. В. Гордишук, К. Гардинер, А. В. Рындиш

Альтернативный сплайсинг пре-мРНК гена интерсектина 1: экспрессия транскрипционных изоформ

Резюме

Проанализирован альтернативный сплайсинг пре-мРНК гена интерсектина 1 человека и мыши, кодирующего важные компоненты эндоцитоза и сигнальных путей в клетке. Обнаружены шесть новых транскриптов гена интерсектина 1 и охарактеризован уровень их экспрессии в тканях человека и мыши.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. McPherson P. S., Kay B. K., Hussain N. K. Signaling on the endocytic pathway // *Traffic* 2.—2001.—P. 375—384.
2. Hussain N. K., Yamabhai M., Ramjaun A. R., Guy A. M., Baranes D., O'Bryan J. P., Der C. J., Kay B. K., McPherson P. S. Splice variants of Intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells // *J. Biol. Chem.*—1999.—274.—P. 15671—15677.
3. Adams A., Thorn J. M., Yamabhai M., Kay B. K., O'Bryan J. P. Intersectin, an adaptor protein involved in clathrin mediated endocytosis, activates mitogenic signaling pathways // *J. Biol. Chem.*—2000.—275.—P. 27414—27420.
4. Hussain N., Jenna S., Glogauer M., Quinn C. Q., Wasiak S., Guipponi M., Antonarakis S. E., Kay B. K., Stossel T. P., Lamarche-Vane N., McPherson P. S. Endocytic protein Intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP // *Nat. Cell Biol.*—2001.—3.—P. 927—932.
5. Jenna S., Hussain N. K., Danek E. L., Triki I., Wasiak S., McPherson P. S., Lamarche-Vane N. The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein Intersectin // *J. Biol. Chem.*—2002.—277.—P. 6366—6372.
6. Tong X.-K., Hussain N. K., de Heuvel E., Kurakin A., Abi-Jaoude E., Quinn C. C., Olson M. F., Marais R., Baranes D., Kay B. K., McPherson P. S. The endocytic protein Intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain // *EMBO J.*—2000.—19.—P. 1263—1271.
7. Tong X.-K., Hussain N. K., Adams A. G., O'Bryan J. P., McPherson P. S. Intersectin can regulate the Ras/MAP kinase pathway independent of its role in endocytosis // *J. Biol. Chem.*—2000.—275.—P. 29892—29899.
8. Okamoto M., Schoch S., Sudhoff T. C. ESH1/Intersectin, a protein that contains EH and SH3 domains and binds to dynamin and SNAP-25 // *J. Biol. Chem.*—1999.—274.—P. 18446—18454.
9. Snyder J. T., Rossman K. L., Baumeister M. A., Pruitt W. M., Siderovski D. P., Der C. J., Lemmon M. A., Sodek J. Quantitative analysis of the effect of phosphoinositide interactions on the function of Dbp family proteins // *J. Biol. Chem.*—2001.—276.—P. 45868—45875.
10. Guipponi M., Scott H. S., Chen H. A., Schebesta A., Rossier C., Antonarakis S. E. Two isoforms of a human intersectin (ITSN) protein are produced by brain-specific alternative splicing in a stop codon // *Genomics.*—1998.—53.—P. 369—376.
11. Скрипкина И. Я., Цыба Л. А., Славов Д., Гардинер К., Рындиш А. В. Новые формы транскриптов гена интерсектина человека и мыши // *Укр. біохім. журн.*—2002.—74, № 4.—С. 33—43.
12. Sengar A. S., Wang W., Bishay J., Cohen S., Egan S. E. The EH and SH3 domain Ese proteins regulate endocytosis by linking to dynamin and Eps15 // *EMBO J.*—1999.—18.—P. 1159—1171.
13. Pennisi E. Human genome: a low number wins the GeneSweep Pool // *Science.*—2003.—300.—P. 1484—.
14. Modrek B., Lee C. A genomic view of alternative splicing // *Nat. Genet.*—2002.—30.—P. 13—19.
15. Martina J. A., Bonangelino C. J., Aguilar R. C., Bonifacino J. S. Stonin 2: An adaptor-like protein that interacts with components of the endocytic machinery // *J. Cell Biol.*—2001.—153.—P. 1111—1120.
16. Yamabhai M., Hoffman N. G., Hardison N. L., McPherson P. S., Castagnoli L., Cesareni G., Kay B. K. Intersectin, a novel adaptor protein with two Eps15 homology and five Src homology 3 domains // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 31401—31407.
17. Martinez R., Mathey-Prevot B., Bernards A., Baltimore D. Neuronal pp60c-src contains a six-amino acid insertion relative to its non-neuronal counterpart // *Science.*—1987.—237.—P. 411—415.
18. Noble M. E. M., Musacchio A., Saraste M., Courtneidge S. A., Wierenga R. K. Crystal structure of the SH3 domain in human Fyn; comparison of the three-dimensional structures of SH3 domains in tyrosine kinases and spectrin // *EMBO J.*—1993.—12.—P. 2617—2624.
19. Lim W. A., Richards F. M., Fox R. O. Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains // *Nature.*—1994.—372.—P. 375—379.
20. Owen D. J., Wigge P., Vallis Y., Moore J. D. A., Evans P. R., McMahon H. T. Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation // *EMBO J.*—1998.—17.—P. 5273—5285.
21. Simpson F., Hussain N. K., Qualmann B., Kelly, Kay B. K., McPherson P. S., Schmid S. L. SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation // *Nat. Cell Biol.*—1999.—1.—P. 119—124.
22. 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.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 05.11.03