

На правах рукописи

УДК 577.2, 576.314, 576.342

Пальгова Ирина Викторовна

**ХАРАКТЕРИСТИКА СВОЙСТВ И ФУНКЦИЙ БЕЛКОВ-
УЧАСТНИКОВ ЭНДОСОМАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА РАБАПТИНА-5,
ЕГО ИЗОФОРМ И VARP**

Специальность 03.00.26 – “молекулярная генетика”

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

МОСКВА

2007

Работа выполнена в лаборатории молекулярной онкогенетики
Института биологии гена РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Коробко Игорь Викторович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Набирочкина Елена Николаевна

кандидат биологических наук Зиновкин Роман Алексеевич

Ведущая организация:

Центр “Биоинженерия” Российской академии наук

Защита диссертации состоится « 19 » декабря 2007 года в 11 часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН
по адресу: 119334, г. Москва, ул. Вавилова д. 34/5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу:
119991, г. Москва, ул. Вавилова д. 32

Автореферат разослан «___» ноября 2007 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Одним из фундаментальных процессов, протекающих во всех эукариотических клетках, является транспорт мембран. Он затрагивает и влияет на самые различные аспекты жизнедеятельности клетки, такие как обмен веществ с окружающей средой, поддержание клеточного гомеостаза, секрецию, передачу сигналов и т.д. Тесная взаимосвязь мембранного транспорта с различными клеточными процессами определяет актуальность исследования его молекулярных основ. Для полноценной и нормальной работы клеток необходимо, чтобы процессы внутриклеточного мембранного транспорта были четко и тонко сбалансированы. Молекулярные основы везикулярного транспорта являются предметом исследования на протяжении длительного времени, однако расшифровка и характеристика всех участников этого многостороннего и сложного процесса еще далека от завершения.

Представления о молекулярных механизмах внутриклеточного мембранного транспорта является необходимым не только для понимания этого фундаментального процесса самого по себе, но и сопряженных с ним событий. Это, в свою очередь, создает основу для практического использования фундаментальных знаний в различных приложениях.

Rab ГТФазы являются одним из основных классов молекул, регулирующих внутриклеточный мембранный транспорт. Регуляторные функции Rab ГТФаз осуществляются посредством их специфического взаимодействия с различными белками, называемыми эффекторами. Эффекторные молекулы – очень обширная и во многом еще неизученная группа белков.

ГТФаза Rab5 играет ключевую роль в регуляции ранних этапов эндоцитоза – мембранного транспорта от поверхности клетки. К настоящему времени охарактеризовано большое количество эффекторов ГТФазы Rab5, однако

молекулярные механизмы их действия исследованы не полностью или остаются до сих пор неизвестными. Кроме того, спектр этих молекул значительно шире, чем известно в настоящее время.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось исследование новых свойств и функций эффекторных молекул ГТФазы Rab5 – белков Рабаптин-5, его изоформ и белка Varp. Для достижения указанной цели были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Исследовать новые функции Рабаптина-5 и его изоформ в процессе слияния ранних эндосом.
2. Исследовать способность белка Varp, нового потенциального фактора обмена гуаниновых нуклеотидов ГТФазы Rab5, взаимодействовать с ГТФазой Rab5.
3. Провести поиск белков, взаимодействующих с Varp.

Научная новизна и практическая ценность работы

В ходе выполнения работы были проведены исследования новых свойств белка Рабаптина-5, который является эффекторной молекулой ГТФаз Rab5 и Rab4. В результате проведенных исследований был обнаружен и картирован новый дополнительный сайт связывания ГТФазы Rab5, присутствующий в белке Рабаптин-5. Этот результат имеет фундаментальное значение для понимания молекулярных процессов слияния ранних эндосом, в котором Рабаптин-5 играет одну из ключевых ролей. Полученные результаты позволили предложить абсолютно новую дополнительную роль белка Рабаптина-5 в процессе слияния ранних эндосом как гомобифункциональной Rab5-связывающей молекулы. В рамках новой модели слияния ранних эндосом, предложенной на основании полученных нами результатов, становится возможным объяснение ряда

известных и ранее необъяснимых экспериментальных фактов. В работе также было впервые показано, что обнаруженный новый сайт связывания ГТФазы Rab5 присутствует и в изоформах Рабаптина-5, Рабаптине-5 δ и Рабаптине-5 γ .

Факторы обмена гуаниновых нуклеотидов ГТФаз Rab семейства играют ключевую роль в их активации, что определяет важность исследования молекулярных механизмов их действия для понимания регуляции мембранного транспорта, осуществляемого Rab ГТФазами.

В результате изучения свойств потенциального фактора обмена гуаниновых нуклеотидов ГТФазы Rab5, белка Varp, было установлено, что Varp способен взаимодействовать с ГТФазой Rab5, и это взаимодействие происходит преимущественно с Rab5 в неактивном, ГДФ-связанном состоянии. Также было показано, что Varp ко-локализуется с ГТФазой Rab5 в клетках. Эти данные подтверждают участие Varp в процессе раннего эндоцитоза. С использованием метода двугибридного клонирования в дрожжах были выявлены возможные партнеры по взаимодействию с Varp – белки семейства 4.1 и Ran9BP, и проведено картирование сайтов взаимодействия Varp с белком 4.1G.

Результаты работы имеют существенное практическое значение для решения фундаментальной проблемы – понимания молекулярных механизмов внутриклеточного мембранного транспорта, и могут быть использованы в этой области молекулярной и клеточной биологии. Кроме того, прогресс в исследованиях в последнее время показал, что процессы раннего эндоцитоза влияют на передачу сигналов от клеточной поверхности, адгезивные свойства клеток и их подвижность, которые нарушаются при различных патологиях человека, в частности, в опухолевых клетках. Поэтому детальное понимание механизмов раннего эндоцитоза и его регуляции может привести к идентификации новых мишеней для терапии опухолей, а также других патологий, например, нейродегенеративных заболеваний, при которых процессы раннего эндоцитоза претерпевают существенные изменения.

Апробация работы

Работа была апробирована на совместном семинаре лаборатории генной терапии и лаборатории молекулярной онкогенетики ИБГ РАН. Данные, представленные в работе, докладывались на конференциях: “Intracellular transport and signal transduction in cancer biomedicine” (Stalheim, Norway, 2007), “XII международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005»” (Москва, 2005), “VI международная конференция Молекулярная генетика соматических клеток” (Москва, 2005).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на __ страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Библиография включает в себя __ источников. Работа иллюстрирована _ рисунками и _ таблицами.

Публикации

Основные положения диссертации изложены в 4 печатных работах, из которых – две статьи в ведущих рецензируемых журналах и двое тезисов материалов конференций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Взаимодействие Рабаптина-5 с малой ГТФазой Rab5.

Несмотря на успехи в функциональной характеристике Рабаптина-5, достигнутые к настоящему времени, исчерпывающая модель его действия остается до конца неясной. В частности, это относится к процессу слияния ранних эндосом, в котором функция Рабаптина-5 состоит в образовании

комплекса с Rabex-5 и доставки Rabex-5 к Rab5-позитивным мембранам ранних эндосом. Однако существуют экспериментальные факты, которые не могут быть объяснены в рамках этой модели, что указывает на ее неполноту. Так, ранее было продемонстрировано, что в клетках, претерпевающих апоптотическую гибель, происходит ингибирование слияния ранних эндосом, обусловленное протеолитическим расщеплением Рабаптина-5. При этом С-концевой апоптотический фрагмент сохраняет способность взаимодействовать с Rab5 и образовывать комплекс с Rabex-5, что в соответствии с существующей моделью функционирования Рабаптина-5 является достаточным для поддержания слияния ранних эндосом. Подобное несоответствие предполагает, что для функционирования в процессе гомотипического слияния ранних эндосом необходимо наличие интактного Рабаптина-5, содержащего как С-концевой, так и N-концевой домены. Эти наблюдения позволяют предположить, что существует неизвестный молекулярный механизм, лежащий в основе функционирования Рабаптина-5 в процессе гомотипического слияния ранних эндосом, требующий присутствие его N-концевого домена.

N-концевой домен Рабаптина-5 способен образовывать гомодимеры.

Гомодимеризация С-концевых участков coiled-coil Рабаптина-5 является существенным для формирования интерфейса взаимодействия с белками, в частности с ГТФазой Rab5. N-концевой и С-концевой апоптотические фрагменты Рабаптина-5 имеют схожее строение, и каждый из этих фрагментов содержит по два участка coiled-coil. Ввиду потенциальной важности димеризации Рабаптина-5 для его функций была исследована способность N-концевого фрагмента Рабаптина-5, по размеру соответствующего N-концевому апоптотическому фрагменту Рабаптина-5, образовывать гомодимеры. В результате анализа в двугибридной системе в дрожжах было установлено, что

N-концевой фрагмент Рабаптина-5 (аминокислоты с 1 по 388) действительно способен образовывать гомодимеры (Рис.1).

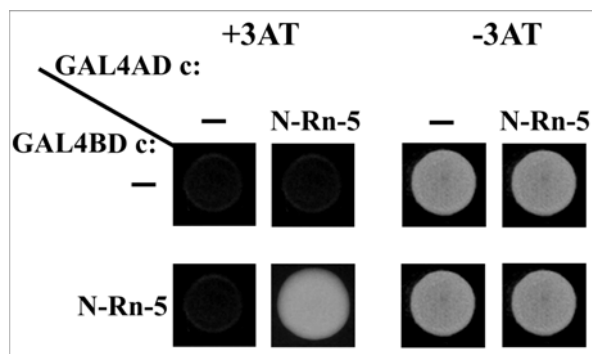


Рис.1. N-концевой фрагмент Рабаптина-5 способен образовывать гомодимеры.

Анализ димеризации N-концевого фрагмента Рабаптина-5 (N-Rn-5) в двугибридной дрожжевой системе. Взаимодействие белков оценивали по способности дрожжей к росту на селективной среде, содержащей 25мМ 3-амино-(1,2,4)-триазол (+3AT). Контролем служил рост дрожжей на среде, не содержащей 3AT (-3AT).

Идентификация и картирование нового сайта связывания ГТФазы Rab5 в N-концевых доменах Рабаптина-5, Рабаптина-5δ и Рабаптина-5γ.

N-концевой фрагмент Рабаптина-5, имеющий, как и С-концевой фрагмент, 2 участка coiled-coil и способный к образованию гомодимера, также потенциально может служить платформой для взаимодействия с молекулами, существенными для функционирования Рабаптина-5.

В работе Денека с соавторами было отмечено, что N-концевой фрагмент родственного Рабаптину-5 белка, Рабаптина-4/5α, также способен связываться с ГТФазой Rab5 в ее активном, ГТФ-связанном состоянии. Этот факт послужил основанием для того, чтобы провести исследование взаимодействия ГТФазы Rab5 с N-концевым фрагментом Рабаптина-5. Для этого был использован анализ взаимодействия белков в двугибридной системе в дрожжах. В результате проведенного анализа было установлено, что N-концевой фрагмент Рабаптина-5, лишенный С-концевого сайта связывания ГТФазы Rab5, способен взаимодействовать с дефицитным по ГТФазной активности мутантом ГТФазы Rab5, Rab5Q79L (Рис.2). При этом взаимодействие с Рабаптином-5 является

специфичным для ГТФ-связанной формы Rab5, так как при экспрессии N-концевого фрагмента Рабаптина-5 и ГДФ-связанного мутанта Rab5, Rab5S34N, взаимодействие отсутствовало. Полученные результаты указывают на присутствие в N-концевой области белка Рабаптина-5 ранее неизвестного сайта связывания с ГТФазой Rab5.

Далее было проведено картирование обнаруженного нами нового, N-концевого сайта связывания ГТФазы Rab5 в белке Рабаптин-5. Для этого были использованы как искусственно полученные N-концевые делеционные мутанты Рабаптина-5, так и фрагменты Рабаптин-5-подобных белков (изоформ Рабаптина-5) Рабаптина-5 δ и Рабаптина-5 γ , содержащие эндогенные делеции с 176 по 216 и с 21 по 64 аминокислоту соответственно. В результате анализа взаимодействия N-концевых фрагментов Рабаптина-5 δ и Рабаптина-5 γ с ГТФазой Rab5, проведенного с использованием двугибридной дрожжевой системы, было установлено, что N-концевые фрагменты Рабаптина-5 δ и Рабаптина-5 γ , как и Рабаптина-5, способны специфически взаимодействовать с мутантом ГТФазы Rab5, дефицитным по ГТФазной активности (Рис.2).

Полученные нами данные о способности N-концевых фрагментов Рабаптина-5 δ и Рабаптина-5 γ взаимодействовать с ГТФазой Rab5, предполагают, что обнаруженный нами новый сайт связывания Рабаптина-5 с ГТФазой Rab5 в N-концевой части белка находится вне областей, делетированных в белках Рабаптина-5 δ и Рабаптина-5 γ .

Дальнейшее картирование положения нового N-концевого сайта связывания ГТФазы Rab5 проводилось с использованием искусственных делеционных мутантов Рабаптина-5 и показало, что минимальный фрагмент Рабаптина-5, сохраняющий способность к взаимодействию с ГТФазой Rab5, имеет размер около 100 аминокислот и находится между аминокислотами 217 и 318 белка Рабаптина-5 (Рис.2).

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что Рабаптин-5 и его δ и γ изоформы, в дополнение к ранее обнаруженному сайту

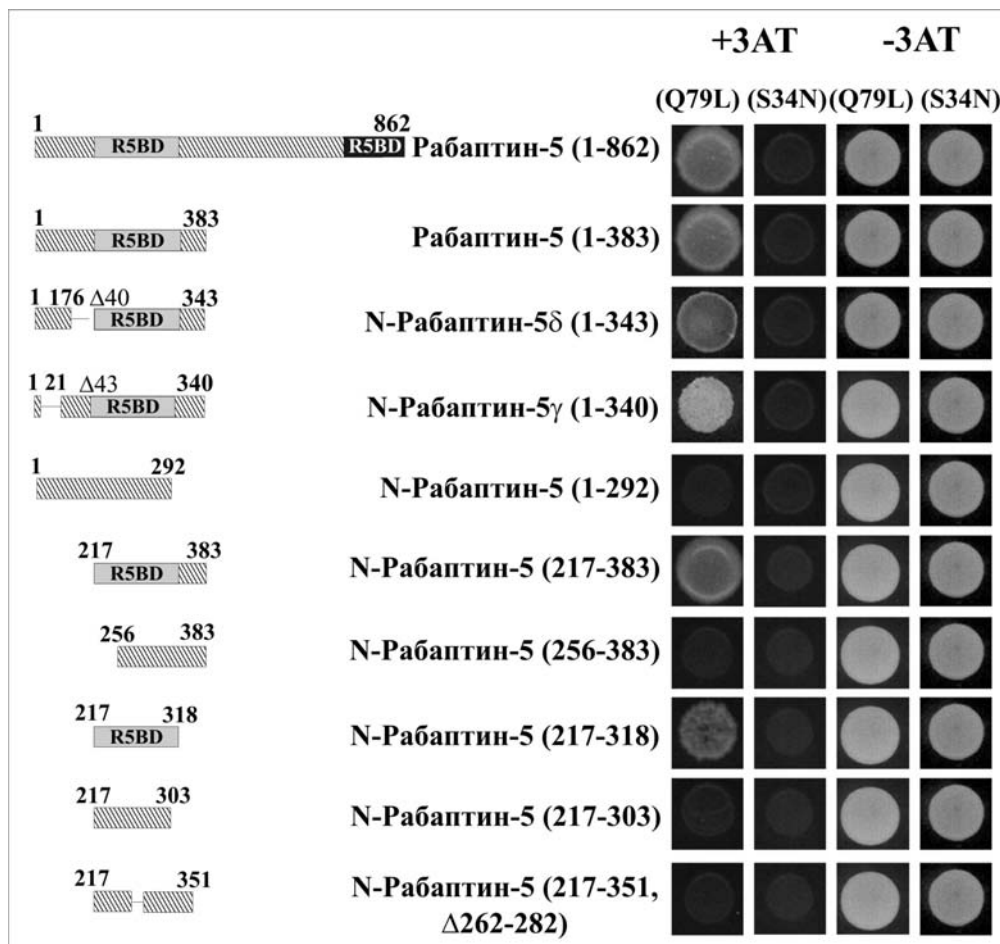


Рис.2. Картирование нового N-концевого сайта связывания ГТфазы Rab5 в белках Рабаптин-5, Рабаптин-5 δ и Рабаптин-5 γ . Слева схематически представлены различные N-концевые делеционные мутанты Рабаптина-5, его δ и γ изоформ. Справа показаны результаты анализа взаимодействия соответствующих белков с ГТФ-связанным (Q79L) и ГДФ-связанным (S34N) мутантами Rab5 в двугибридной дрожжевой системе. Взаимодействие белков оценивали по росту дрожжей на селективной среде, содержащей 25мМ 3АТ (+3АТ). Контролем служил рост дрожжей на среде, не содержащей 3АТ (-3АТ). Минимальный фрагмент Рабаптина-5, способный взаимодействовать с Rab5-ГТФ (Rab5 связывающий домен, R5BD), обозначен серым цветом. С-концевой Rab5-связывающий сайт обозначен черным цветом. Приведены размеры используемых фрагментов в аминокислотных остатках, а также положения и размеры делеций.

связывания Rab5 на С-конце, имеют второй сайт связывания для этой ГТФазы, расположенный в N-концевой области и обеспечивающий специфическое взаимодействие с Rab5 в ГТФ-связанной форме.

Несмотря на выявленную специфичность взаимодействия Rab5 с N-концевым фрагментом Рабаптина-5 и его δ и γ изоформ, были предприняты попытки продемонстрировать существование этого взаимодействия с помощью других методов. Для этого был проведен анализ ко-локализации N-концевого

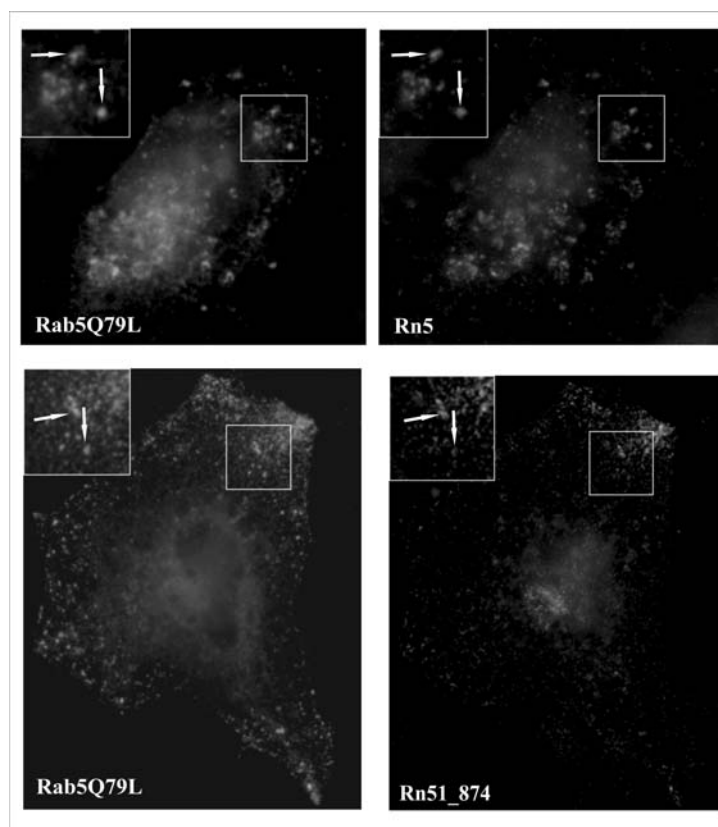


Рис.3. Иммунофлуоресцентный анализ клеток линии HeLa B, ко-экспрессирующих FLAG-Рабаптин-5, или FLAG-Рабаптин-5 с 1 по 784 аминокислоту, и *тус*-Rab5Q79L. Стрелками в увеличенных вставках отмечены примеры структур, позитивных по обоим белкам.

фрагмента Рабаптина-5 с дефектным по гидролизу ГТФ мутантом ГТФазы Rab5 (Rab5Q79L) в клетках HeLa B. Известно, что экспрессия Rab5Q79L в клетках приводит к образованию увеличенных ранних эндосом, на которых локализуется Рабаптин-5. Для анализа ко-локализации с Rab5Q79L был

использован делеционный мутант Рабаптина-5, лишенный С-концевого сайта связывания с Rab5 (фрагмент Рабаптина-5 с 1 по 784 аминокислоту). При этом сайт связывания с Rabex-5, образование комплекса с которым может быть существенна для взаимодействия с Rab5, присутствует в этом делеционном мутанте. В качестве положительного контроля использовали полноразмерный Рабаптин-5. Плазмидные конструкции, экспрессирующие либо полноразмерный Рабаптин-5, либо фрагмент Рабаптина 5 (1-784), несущие N-концевой FLAG-эпитоп, были ко-трансфецированы с плазмидами для экспрессии Rab5Q79L с N-концевым *тус*-эпитопом в клетки линии HeLa В. Продуцируемые белки в клетке выявлены с помощью анти-*тус* и анти-FLAG антител.

В результате проведенного анализа было установлено, что фрагмент Рабаптина-5, лишенный С-концевого сайта связывания с ГТФазой Rab5, частично ко-локализуется с Rab5-позитивными мембранными структурами (Рис.3). Ко-локализация с ГТФазой Rab5 в отсутствие С-концевого сайта связывания с Rab5 в белке Рабаптин-5 подтверждает наличие альтернативного сайта связывания Rab5. При этом, в отличие от полноразмерного Рабаптина-5, экспрессия его делеционного мутанта приводила к значительной супрессии образования увеличенных ранних эндосом (Рис.3), что может быть следствием отсутствия необходимого для слияния ранних эндосом С-концевого сайта связывания с Rab5.

Суммируя, с помощью двугибридной дрожжевой системы был обнаружен новый сайт связывания Рабаптина-5 с ГТФазой Rab5, расположенный в N-концевой области белка, и его существование подтверждается ко-локализацией Rab5 с фрагментом Рабаптина-5, лишенного С-концевого Rab5-связывающего сайта.

Новая функциональная роль Рабаптина-5 в процессе слияния ранних эндосом.

Обнаруженный нами новый N-концевой сайт связывания Rab5 в белке Рабаптин-5 позволяет пересмотреть механизм взаимодействия этих белков, а также предложить новую модель участия Рабаптина-5 в процессе слияния ранних эндосом, в которой Рабаптин-5 выступает в новом качестве - как стыковочная молекула, удерживающая две ранние эндосомы перед их слиянием благодаря бивалентному взаимодействию с двумя молекулами Rab5 в ГТФ-связанной конформации на различных эндосомах (Рис.4А).

До настоящего времени функция удерживающей молекулы при слиянии ранних эндосом приписывалась исключительно белку EEA1. Однако известно, что в определенных случаях EEA1 не является необходимым для слияния ранних эндосом, причем процесс слияния зависит от присутствия Rab5 и Рабаптина-5. Такой ранее необъяснимый факт находит свое объяснение в рамках предложенной модели, где Рабаптин-5 может выступать в качестве удерживающей молекулы. Также предложенная модель дает механистическое объяснение функциональной инактивации Рабаптина-5 при его апоптотическом расщеплении, приводящему к ингибированию слияния ранних эндосом (Рис. 4Б).

Суммируя, в результате проведенных исследований было показано, что N-концевой апоптотический фрагмент Рабаптина-5 способен образовывать гомодимеры. Гомодимеризация N-концевой области Рабаптина-5 может быть необходима для ее взаимодействия с белками-партнерами. Было показано, что одним из таких белков является ГТФаза Rab5, которая специфически взаимодействует в ГТФ-связанной форме с N-концевой областью Рабаптина-5. Дальнейший анализ выявил, что новый N-концевой сайт связывания Rab5 находится между аминокислотами 217 и 318 Рабаптина-5, и также присутствует в его δ и γ изоформах. На основании полученных результатов была предложена новая роль Рабаптина-5 в слиянии ранних эндосом как удерживающей молекулы и новая модель слияния ранних эндосом, в рамках которой

объясняется существование EEA1-независимого слияния ранних эндосом и функциональная инактивация Рабаптина-5 в результате его апоптотического расщепления.

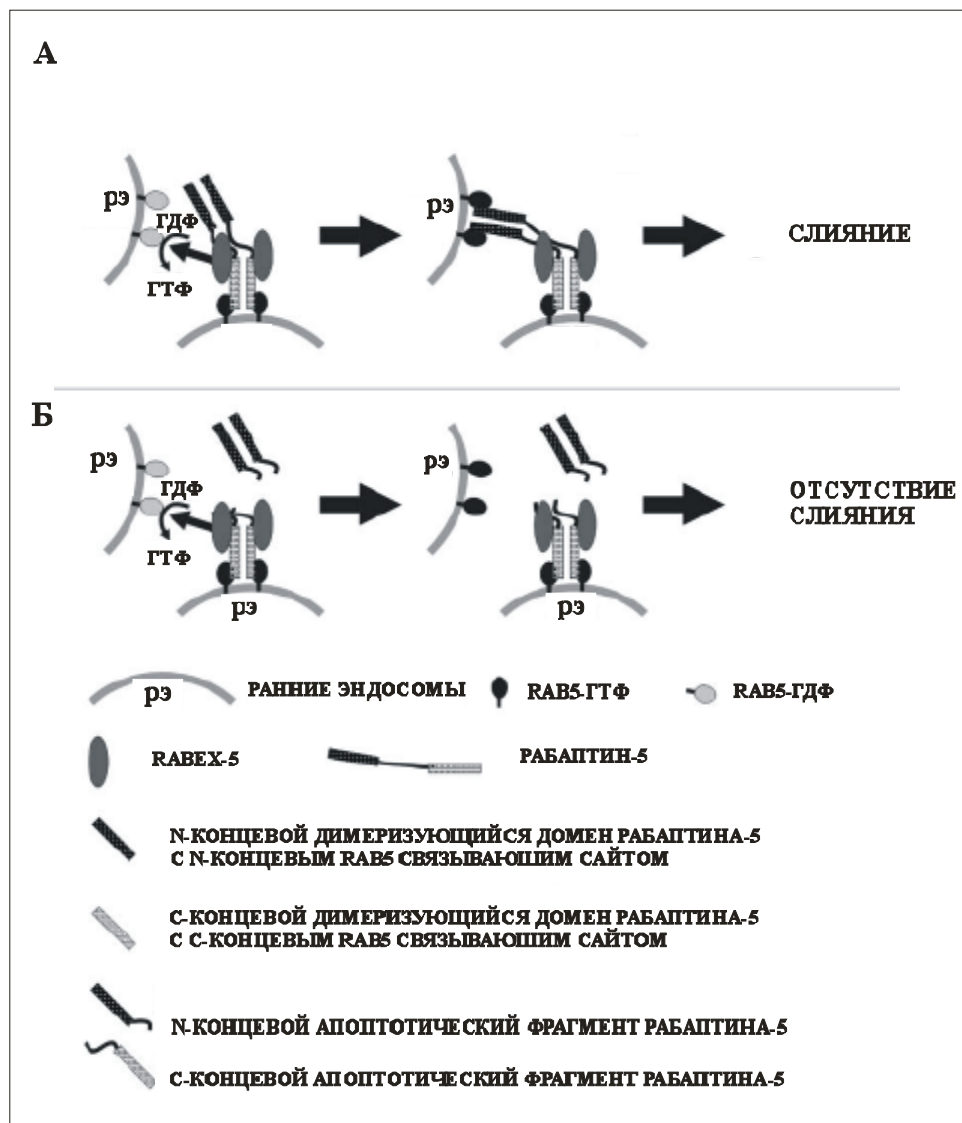


Рис.4. Модель участия Рабаптина-5 в слиянии ранних эндосом как удерживающей эндосомы молекулы (А) и инактивация Рабаптина-5 в результате его протеолитического расщепления (Б). (А) Комплекс Рабаптин-5/Rabex-5 сначала доставляется к мембранам ранних эндосом за счет взаимодействия С-концевого сайта связывания Рабаптина-5 с ГТФазой Rab5. После этого Rabex-5 индуцирует нуклеотидный обмен ГДФ на ГТФ молекулы Rab5 на соседней мембране ранних эндосом (а). Затем активированная Rab5-ГТФ на соседней мембране связывается с Рабаптином-5 через его N-концевой сайт, в результате чего ранние эндосомы оказываются связанными с помощью гомодимера Рабаптина-5, благодаря чему становятся возможными дальнейшие процессы, приводящие к слиянию мембран ранних эндосом (б). (Б) После протеолитического расщепления Рабаптина-5 его С-концевой фрагмент остается в комплексе с Rabex-5 и может быть доставлен к мембранам ранних эндосом за счет взаимодействия с Rab5-ГТФ. Rabex-5 может индуцирует нуклеотидный обмен ГДФ на ГТФ молекулы Rab5 на соседней мембране ранних эндосом (а). Однако N-концевой фрагмент Рабаптина-5 отделен от С-концевого фрагмента, поэтому необходимого для слияния взаимодействия N-концевого фрагмента со второй молекулой Rab5-ГТФ не происходит (б).

2. Изучение свойств белка Varp

Взаимодействие Varp с малой ГТФазой Rab5.

Белок Varp содержит в своем составе Vps9-домен, который обладает специфичной гуанин-нуклеотидной активностью для ГТФазы Rab5. Кроме того, в С-концевой части Varp расположены 2 кластера анкириновых повторов, которые часто опосредуют белок-белковые взаимодействия (Рис.5).

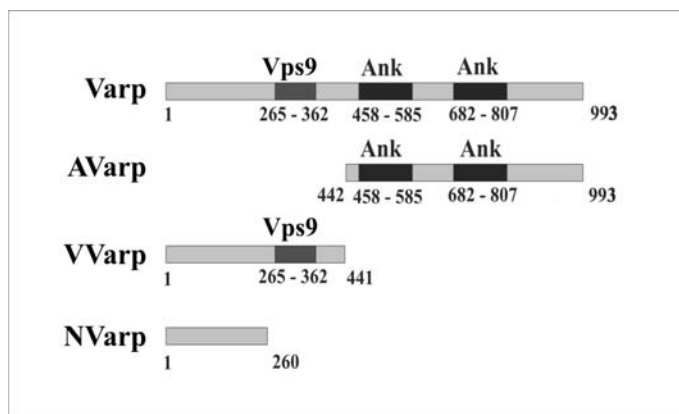


Рис.5. Схема строения белка Varp и использованных в работе делеционных мутантов AVarp, VVarp, NVarp. Показаны границы Vps9-домена и кластеров анкириновых повторов (Ank). Ниже схематически представлены делеционные мутанты Varp (AVarp, VVarp и NVarp) с указанием мест делеций в аминокислотных остатках.

Н-концевая часть белка Varp, содержащая Vps9-домен, связывается с ГТФазой Rab5 в ее неактивном, ГДФ-связанном состоянии.

Наличие Vps9-домена делает Varp потенциальным фактором обмена гуаниновых нуклеотидов для ГТФазы Rab5. Поэтому был проведен анализ способности Varp непосредственно взаимодействовать с Rab5. Так как прямое взаимодействие других (RIN1, Rap6, Алсин) факторов обмена нуклеотидов с Rab5 обусловлено их Vps9-доменами, была исследована способность N-концевой части белка Varp, содержащей Vps9-домен (VVarp, Рис. 5), взаимодействовать с Rab5. В результате анализа, проведенного в двугибридной дрожжевой системе, было установлено, что VVarp способен непосредственно

взаимодействовать с Rab5 в ее неактивном ГДФ-связанном состоянии (мутант Rab5S34N) (Рис.6). Полученные результаты полностью совпали с появившимися во время выполнения работы данными о взаимодействии N-концевой части белкового продукта альтернативного сплайсинга пре-мРНК *Varp* с ГДФ-связанными формами ГТФаз Rab5 и Rab21, выявленные в GST pull-down анализе. Таким образом, *Varp* относится к группе Vps9-содержащих белков, взаимодействующих с ГТФазой Rab5 в ее ГДФ-связанном состоянии, то есть, принимая во внимание показанную гуанин-нуклеотидную активность Vps9-домена *Varp* для Rab5, взаимодействующих с неактивным белком Rab5 с его последующей активацией.

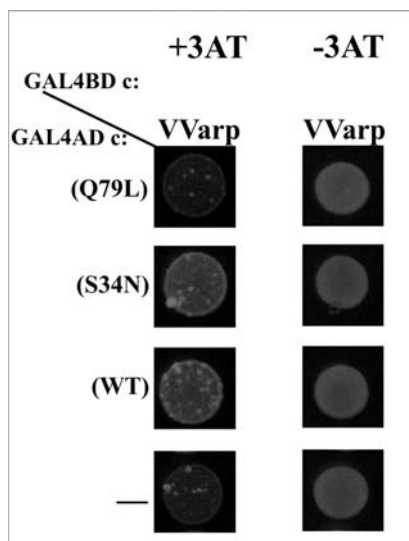


Рис. 6. Взаимодействие N-концевой части белка *Varp* (VVarp) с ГТФазой Rab5 в двугибридной дрожжевой системе. Взаимодействие белков VVarp с Rab5 ГТФ не гидролизующим мутантом (Q79L), или с Rab5 ГДФ-связанным мутантам (S34N) или диким типом белка Rab5 (WT) оценивали по росту дрожжей на селективной среде, содержащей 25мМ 3АТ (+3АТ). Контролем служил рост дрожжей на среде, не содержащей 3АТ (-3АТ).

Для подтверждения результатов по взаимодействию *Varp* с Rab5, полученных в двугибридной дрожжевой системе, был проведен анализ ко-локализации полноразмерного белка *Varp* и его N-концевого фрагмента с ГТФазой Rab5 в клетках. Проведенный флуоресцентный иммуноцитохимический анализ показал, что оба белка, ко-продуцируемые в

клетках линии HeLa В с ГТФазой Rab5, локализуются с Rab5 на характерных везикулярных структурах (Рис.7). При этом С-концевая часть белка Varp, содержащая анкириновые повторы и лишенная Vps9-домена (AVarp, Рис.5), не обладала способностью ко-локализоваться с ГТФазой Rab5 на мембранных структурах (данные не приведены). Полученные результаты иммунофлуоресцентного анализа подтверждают существование взаимодействия Varp с ГТФазой Rab5, опосредованное N-концевой частью белка, содержащей Vps9-домен, и предполагает непосредственное участие белка Varp в Rab5-регулируемых процессах.

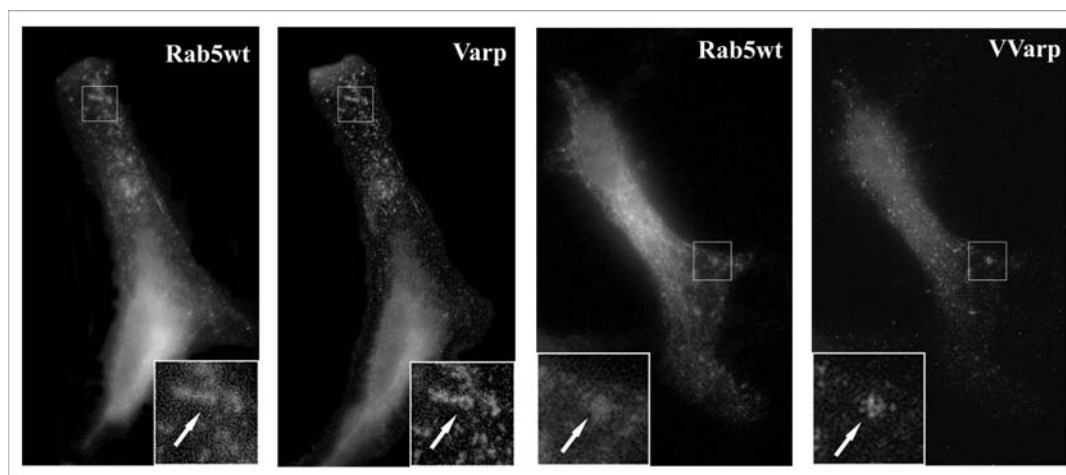


Рис.7. Иммунофлуоресцентный анализ клеток линии HeLa В, ко-экспрессирующих FLAG-Varp, FLAG-VVarp, и *myc-Rab5*. Стрелками в увеличенных вставках отмечены примеры структур, позитивных по обоим белкам.

Поиск белков, взаимодействующих с Varp.

В настоящее время известно 8 различных факторов обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF-факторы) для ГТФазы Rab5, действующих в разнообразных цепях молекулярных событий и приводящих к активации Rab5. Специфические взаимодействия различных GEF-факторов обуславливают их корректную временную и пространственную локализацию и, как следствие, корректную активацию Rab5. Это определяет важность идентификации молекул, которые опосредуют специфические взаимодействия с GEF-факторами. В качестве

первого шага по выявлению белков, которые могут обуславливать специфическую локализацию Varp внутри клетки, был проведен поиск белков, взаимодействующих с Varp, с помощью двугибридной дрожжевой системы.

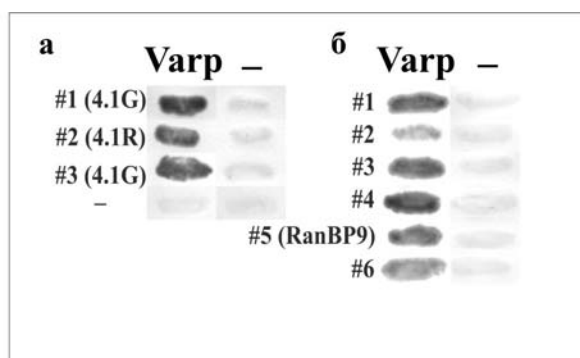


Рис.8. Взаимодействие белка Varp с белками, кодируемыми изолированными в результате скрининга кДНК, в двугибридной системе в дрожжах. Анализ активации репортерного гена *LacZ* в дрожжах при трансформации: а - отобранными нами кДНК в векторе рРС86 (клоны #1-3) или вектором рРС86 (указаны слева) и плазмидой рРС97-Varp (Varp) или рРС97 (указаны сверху); б - отобранными кДНК в векторе рACT2 (клоны #1-6) (указаны слева) и плазмидой рAS-Varp (Varp) или рAS2-1 (указаны сверху). Обозначены клоны, кодирующие химеры GAL4AD с фрагментами белков 4.1G, 4.1R (а) и RanBP9 (б).

Был проведен скрининг 13.5-14.5-дневной эмбриональной кДНК-библиотеки мыши в системе на основе векторов рРС86, рРС97 и дрожжей Y153 с белком Varp в качестве “приманки”. В результате скрининга и дальнейшего анализа было выявлено три клона, в которых наблюдалось специфическое взаимодействие белков (Рис. 8а). Определение нуклеотидных последовательностей изолированных кДНК показало, что клоны #1 и #3 содержат фрагменты кДНК белка 4.1G (GeneBank Acc. No. NM_013511) с 2430 нуклеотида, что приводит к экспрессии в дрожжах химерного белка, содержащего С-концевой фрагмент белка 4.1G начиная с 811 аминокислоты (Рис.9). Клон #2 содержит фрагмент кДНК другого представителя семейства белков 4.1, 4.1R (GeneBank Acc. No. NM_183428), начиная с нуклеотида 3487, экспрессирующего фрагмент белка 4.1R с 673 аминокислоты (Рис.9).

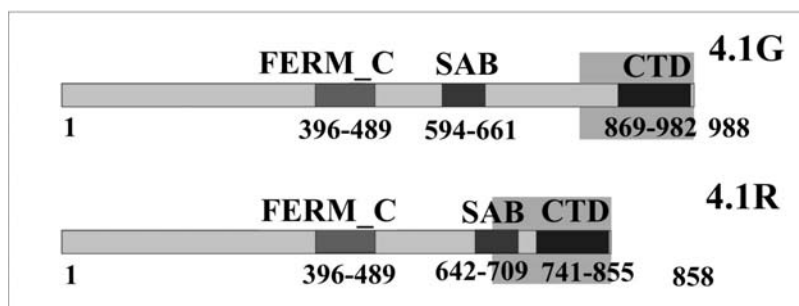


Рис.9. Доменная структура белков семейства 4.1G и 4.1R. Показаны границы FERM_C- (FERM_C), спектрин/актин-связывающего (SAB) и С-концевого (CTD) доменов белков 4.1G и 4.1R. Фрагменты белков 4.1G и 4.1R, взаимодействующие с Varp в двугибридной системе в дрожжах, показаны на сером фоне.

Белки семейства 4.1, включающего 4 представителя, каждый из которых имеет несколько изоформ благодаря альтернативному сплайсингу, характеризуются общей доменной структурой, и содержат FERM_C-домен, спектрин/актин-связывающий SAB-домен и С-концевой CTD-домены (Рис.9). Эти белки в клетке выполняют функции платформы для сборки различных комплексов, локализованных в примембранном пространстве. Анализ изолированных фрагментов белков 4.1R и 4.1G указывает на то, что Varp взаимодействует именно с CTD доменом, который опосредует мембранную локализацию и многочисленные белок-белковые взаимодействия белков семейства 4.1 (Рис. 9).

Далее нами было проведено картирование фрагмента белка Varp, ответственного за взаимодействие с CTD-доменами белков 4.1. В результате анализа было установлено, что N-концевая часть сохраняет способность взаимодействовать с CTD-доменом белка 4.1G и дальнейшая делеция Vps9 домена не оказала влияния на это взаимодействие (Рис.10). Это позволяет сделать вывод о том, что взаимодействие белка Varp с CTD-доменом белка 4.1G определяется детерминантами в N-концевой части белка Varp, предшествующей Vps9-домену.

Каковы могут быть функциональные следствия взаимодействия Varp и белков 4.1? Так как белки 4.1 ассоциируются с мембранами и различными рецепторами, взаимодействие с белками 4.1 может являться фактором для корректной пространственной и временной активации мишеней Varp – ГТФаз Rab5 и Rab21, и являться существенным для функционирования Varp в мембранном транспорте от клеточной поверхности.

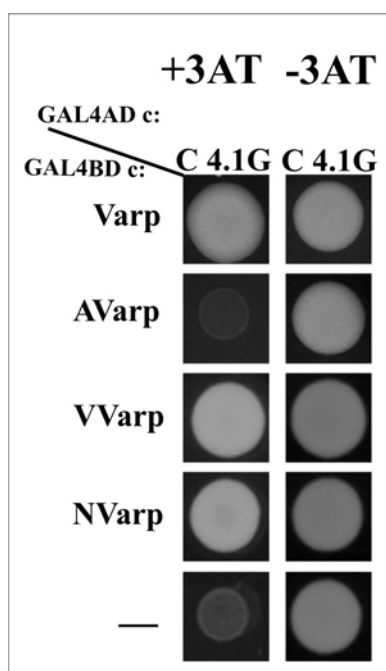


Рис.10. Картирование области белка Varp, взаимодействующей с CTD-доменом белка 4.1G. Взаимодействие экспрессирующихся белков Varp, AVarp, VVarp, NVarp с CTD-доменом белка 4.1G (C 4.1G) выявлялась по способности дрожжей расти на среде, содержащей 25 мМ (+3AT). Контролем служил рост дрожжей на среде, не содержащей 3AT (-3AT)

Известно, что из-за возможных стерических препятствий использование различных двугибридных систем с одним и тем же белком-“приманкой” часто позволяет обнаружить более полный спектр потенциальных партнеров по взаимодействию. Поэтому был проведен аналогичный поиск белков, взаимодействующих с Varp, в двугибридной дрожжевой системы Matchmaker (Clontech) с использованием кДНК-библиотеки головного мозга человека. В

результате скрининга был изолирован один клон, кодирующий белок, специфически взаимодействующий с Varp. Анализ последовательности изолированной кДНК клона #5 (Рис.8б) показал, что он содержит фрагмент кДНК белка RanBP9 (GenBank Acc. No. NM_005493) начиная с нуклеотида 465, что приводит к продукции белка RanBP9, лишенного 134 N-концевых аминокислот.

RanBP9, как и белки семейства 4.1, служат платформой для взаимодействия с различными белками, многие из которых были обнаружены в двугибридной дрожжевой системе. В частности, партнерами по взаимодействию с RanBP9 являются рецепторные тирозиновые киназы, а также молекулы клеточной адгезии. Обнаруженное нами взаимодействие RanBP9 с Varp потенциально связывает активацию ГТФаз - регуляторов раннего эндоцитоза, Rab5 и Rab21, с процессами передачи сигналов от рецепторных тирозиновых киназ и молекул адгезии, в котором существенную роль играет их корректная интернализация и дальнейший внутриклеточный транспорт.

Суммируя, нами обнаружены в двугибридной дрожжевой системе взаимодействия Varp с белками семейства 4.1 и RanBP9. Взаимодействия Varp с адапторными мультифункциональными белками, которыми являются белки семейства 4.1 и RanBP9, представляют механистическую основу для локализации Varp в примембранном пространстве, что потенциально делает возможным координацию эндоцитоза мембранных рецепторов и молекул адгезии, с которыми взаимодействуют белки семейства 4.1 и RanBP9, и активацию ГТФаз Rab21 и Rab5, регулирующих этот процесс. Дальнейшие исследования, направленные на подтверждение существования обнаруженных нами межбелковых взаимодействий *in vivo* и выявление их функциональной значимости, позволят установить существенность обнаруженных нами взаимодействий в процессе раннего эндоцитоза.

ВЫВОДЫ

1. Впервые продемонстрировано взаимодействие N-концевой части белка Рабаптин-5, а также его δ и γ изоформ, с ГТФазой Rab5 в активном, ГТФ-связанном состоянии.
2. Новый N-концевой сайт связывания ГТФазы Rab5 локализован между аминокислотными остатками 217 и 318 Рабаптина-5.
3. Предложена новая модель слияния ранних эндосом, в которой Рабаптин-5, благодаря взаимодействию с двумя молекулами Rab5, выступает в новой роли молекулы, удерживающей Rab5-позитивные мембраны перед их слиянием.
4. Показано, что Vap ρ взаимодействует с ГТФазой Rab5 в неактивном, ГДФ-связанном состоянии, и ко-локализуется с Rab5 на ранних эндосомах в клетке.
5. Белки семейства 4.1 и RanBP9 впервые выявлены как потенциальные партнеры по взаимодействию с белком Vap ρ .
6. Показано, что взаимодействие Vap ρ и белков семейства 4.1 обусловлено N-концевой областью Vap ρ , предшествующей Vps9 домену, и C-концевым доменом белков 4.1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. И.В. Пальгова, Е.В. Коробко, И.В. Коробко. Мультиадапторные белки семейства 4.1 и RanBP9 как потенциальные партнеры по взаимодействию с Varp, фактором обмена гуаниновых нуклеотидов ГТФазы Rab21. Молекулярная биология, 2007, том 41, №6, с. 1009-1013.
2. Korobko EV, Palgova IV, Kiselev SL, Korobko IV. Apoptotic cleavage of Rabaptin-5-like proteins and a model for Rabaptin-5 inactivation in apoptosis. Cell Cycle, 2006, 15;5(16), p. 1854-1858.
3. И.В. Пальгова, Е.В. Коробко, С.Л. Киселев. Идентификация нового сайта связывания малой ГТФазы Rab5 в белке Рабаптин-5. XII международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005». Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, апрель 12-15, 2005, с.170.
4. И.В. Пальгова, И.В. Коробко, С.Л. Киселев, Е.В. Коробко. Рабаптин-5 как гомобифункциональный эффектор малой ГТФазы Rab5. VI международная конференция «Молекулярная генетика соматических клеток» Звенигород, Москва, Россия, декабрь 12-16, 2005, с. 47.