

На правах рукописи

Шепелев Михаил Валентинович

**Изучение свойств и молекулярных механизмов действия Rho
ГТФазы Cbp/Wrch2**

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА

2012

Работа выполнена в лаборатории молекулярной онкогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук
Коробко Игорь Викторович

Официальные оппоненты: Прасолов Владимир Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, ИМБ РАН, заведующий лабораторией

Соболев Александр Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, ИБГ РАН, заведующий лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита диссертации состоится «27» апреля 2012 года в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук по адресу: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук по адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан «27» марта 2012 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Жизнедеятельность всех клеток эукариот подвержена сложной регуляции, в которой важную роль играют внеклеточные стимулы, такие как гормоны, факторы роста, цитокины, молекулы внеклеточного матрикса и многие другие. Внеклеточные молекулы, взаимодействуя со своими рецепторами на поверхности клеток, вызывают активацию внутриклеточных сигнальных каскадов, представляющих собой цепь белок-белковых взаимодействий и биохимических реакций. В конечном итоге в результате активации определенного сигнального каскада в клетке формируется адекватный биологический ответ на поступивший внеклеточный стимул.

Представители суперсемейства Ras-подобных ГТФаз, к которым относится семейство Rho ГТФаз, являются одними из ключевых регуляторов множества сигнальных путей у эукариот. Семейство Rho ГТФаз человека насчитывает 20 белков, разделяемых на 8 подсемейств. «Атипичная» Rho ГТФаза Chr/RhoV/Wrch-2 и ее близкий гомолог Wrch-1/RhoU составляют подсемейство RhoU/V.

Rho ГТФазы реализуют свои биологические функции через специфические взаимодействия с белками-эффекторами. Очевидно, что чем шире спектр известных эффекторов ГТФазы, тем глубже наши представления о свойствах и функциях этой ГТФазы. Поэтому одним из главных подходов к изучению молекулярных механизмов действия Rho ГТФаз является поиск специфических белков-партнеров по взаимодействию. Опираясь на свойства и функции обнаруженных белков, можно ассоциировать ГТФазу с определенным клеточным процессом, в который вовлечен ее партнер по взаимодействию.

К настоящему времени был идентифицирован ряд потенциальных эффекторов ГТФазы Chr, включающий p21-активируемые киназы (Pak1, Pak2 и Pak4) и белки N-WASP, Par6 и MLK3, и выявлено участие Chr в ряде клеточных процессов. В частности, Chr может активировать протеинкиназы Pak1 и JNK, регулировать локализацию E-кадгерина на адгезионных межклеточных контактах при участии протеинкиназы Pak1 и белка β PIX, а также участвует в дифференцировке клеток нервного гребня. Тем не менее, молекулярные механизмы действия ГТФазы Chr во многом остаются неизвестными. Это определяет актуальность исследования свойств белка Chr для расширения фундаментальных представлений о биологии клеток эукариот и о сигнальных путях, регулируемых Rho ГТФазами.

Кроме того, белок Chr способен вызывать злокачественную трансформацию фибробластов мышцы. Это определяет актуальность исследования свойств ГТФазы Chr с прикладной точки зрения, так как это способствует более глубокому пониманию механизмов возникновения и прогрессии опухолей, а в перспективе - выявлению новых молекулярных мишеней для направленного воздействия.

Важно отметить, что в настоящее время находят все более широкое применение лекарственные средства направленного действия («таргетные» препараты), влияющие на различные этапы процессов внутриклеточной передачи сигнала, от лиганд-рецепторных взаимодействий до процессов, протекающих в ядре клеток. Поэтому изучение белков, участвующих во внутриклеточных сигнальных каскадах, безусловно, важно не только для расширения фундаментальных представлений о биологии клеток эукариот, но и для понимания молекулярных механизмов патогенеза различных заболеваний человека и выявления новых молекулярных мишеней для направленного воздействия на них.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось выявление и изучение новых свойств и функций атипичной Rho ГТФазы Cnr.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Исследовать взаимодействие белка Cnr с возможными эффекторами, протеинкиназами Pak5 и Pak6.
2. Провести поиск новых белков, взаимодействующих с ГТФазой Cnr, с помощью различных экспериментальных подходов.
3. Создать экспериментальную модель для изучения влияния ГТФазы Cnr на клеточные процессы.
4. Выявить и исследовать клеточные процессы, в которых принимает участие ГТФаза Cnr.
5. Изучить экспрессию гена *RHOV*, кодирующего белок Cnr, в образцах немелкоклеточного рака легких человека.

Научная новизна и практическая ценность работы

ГТФаза Cnr является одним из наименее изученных представителей семейства Rho ГТФаз человека, что определяет актуальность исследования свойств и функций Cnr с точки зрения понимания фундаментальных механизмов функционирования клеток и организма. Исследуя молекулярные механизмы действия Cnr, нами был идентифицирован ряд новых белков-партнеров по взаимодействию с ГТФазой Cnr. Это открывает дальнейшие перспективы для изучения клеточных процессов, в которых принимает участие Cnr. Выявленные в данной работе взаимодействие Cnr с белком IRSp53 и способность Cnr индуцировать формирование филоподий, вместе с ранее описанным Cnr-зависимым формированием ламеллиподий и фокальных контактов, предполагают участие Cnr в контроле адгезионных, миграционных и инвазивных свойств клеток, изменения которых лежат в основе процесса метастазирования. Кроме того, была выявлена способность Cnr взаимодействовать с β -тубулином и микротрубочками, что является механистической основой для возможной роли Cnr как регулятора координированных перестроек

актинового и микротрубочкового цитоскелетов клеток. Наконец, в результате работы впервые была выявлена способность Chr вызывать апоптотическую гибель клеток линии PC12TetOn, частично опосредованную активацией протеинкиназы JNK. Таким образом, результаты работы существенно расширяют представления о фундаментальных свойствах атипичной Rho ГТФазы Chr. Кроме того, было выявлено частое повышение уровня транскрипта гена *RHOV*, кодирующего белок Chr, при немелкоклеточном раке легких человека. Высокая специфичность экспрессии *RHOV* для опухолей легкого открывает перспективы использования уровня экспрессии гена *RHOV* в качестве молекулярного маркера рака легких. Современные тенденции в молекулярной медицине указывают на то, что персонализированная медицина будет получать все большее распространение. Статус экспрессии гена *RHOV* в перспективе может быть использован как биомаркер, используемый в диагностических и/или прогностических целях. Это определяет практическую значимость результатов работы, так как в настоящее время существуют насущная потребность в улучшении методов, как диагностики, так и лечения рака легких, одного из наиболее распространенных онкологических заболеваний человека. Полученные нами данные предполагают участие Chr как в контроле миграционных и инвазивных свойств клеток, так и в регуляции внутриклеточных сигнальных путей, гиперактивация которых наблюдается в опухолевых клетках. Результаты данной работы являются основанием для дальнейшего исследования роли Chr в процессах возникновения и прогрессии опухолей, а также позволяют рассматривать Chr как потенциальную молекулярную мишень для противоопухолевой терапии.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены на международной научной школе для молодых ученых «The EMBO / FEBS Advanced Lecture Course on the Island of Spetses - Molecular mechanisms in signal transduction and cancer» (Spetses, Greece, 15-26 August, 2005), на XVII (Москва, Россия, 10-13 Февраля, 2005) и XX (Москва, Россия, 11-15 Февраля, 2008) Международных зимних молодёжных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; на международных конференциях «International Conference on Biomolecular Science in honor of the 75th anniversary of the birth of Professor Yuri Ovchinnikov (1934-1988)» (Moscow-Pushchino, Russia, September 28-October 2, 2009), «EMBO Conference Series Microtubules – Structure, Regulation and Functions» (Heidelberg, Germany, 2-5 May, 2010); на международном симпозиуме «Control of gene expression and cancer» (Moscow, Russia, 21-25 June, 2010), на VII международном симпозиуме «Biological foundations of therapy of oncological and hematological diseases» (Moscow, Russia, 1-4 June, 2011), на международном симпозиуме «U.S.-Russia Scientific Forum Meeting» (Moscow, Russia, 16-18 November, 2011).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ. Из них статей в рецензируемых научных журналах – 3, тезисов в материалах конференций, школ и симпозиумов – 8, патентов - 1.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 158 страницах, содержит 35 рисунков, 5 таблиц и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы» (215 цитированных работ).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Идентификация протеинкиназ Pak5 и Pak6 как новых потенциальных эффекторов ГТФазы Cbp

Ранее было выявлено взаимодействие ГТФазы Cbp с протеинкиназами Pak1, Pak2 и Pak4, однако взаимодействие с другими белками семейства Pak не исследовалось. Поэтому была исследована возможность взаимодействия Cbp с протеинкиназами Pak5 и Pak6, наименее охарактеризованными на данный момент представителями семейства Pak. В результате анализа в дрожжевой двугибридной системе было обнаружено, что активная форма Cbp G40V и белок дикого типа, но не неактивная, ГДФ-связанная форма Cbp S45N, взаимодействуют с Pak5 и Pak6 (Рис. 1А и Б). Таким образом, впервые было продемонстрировано специфическое взаимодействие между ГТФазой Cbp и протеинкиназами Pak5 и Pak6.

Для более детального изучения взаимодействия была выбрана протеинкиназа Pak6. Для подтверждения возможности взаимодействия Cbp и Pak6 исследовалось их взаимодействие в лизатах клеток млекопитающих с помощью коиммунопреципитации (ко-ИП), и было обнаружено, что Pak6 копреципитируется с Cbp G40V и Cbp дикого типа (Рис. 2). Так же, как и в двугибридной системе, было установлено что, активная форма Cdc42 Q61L взаимодействует с Pak6, тогда как взаимодействие между Wrch-1 Q107L и Pak6 было значительно слабее по сравнению с Cdc42 Q61L или Cbp G40V (Рис. 2). В целом данные, полученные в дрожжевой двугибридной системе, и результаты ко-ИП указывают на то, что Cbp взаимодействует с Pak6 только в активной, ГДФ-связанной форме. Полученные результаты позволяют рассматривать протеинкиназы Pak5 и Pak6 как потенциальные эффекторы ГТФазы Cbp.

Анализ молекулярных механизмов взаимодействия Cbp и Pak6

Cdc42 связывается с последовательностью из 16 аминокислот, называемой CRIB (Cdc42/Rac1 interactive binding), которую находят у многих эффекторов Cdc42, включая белки семейства Pak. Замена консервативных остатков гистидина на лейцин в CRIB-последовательности Pak1 (Pak1 N83,86L) нарушает взаимодействие Pak1 с ГТФазами Cdc42, Rac1 и Cbp. Исследование

способности Chp взаимодействовать с протеинкиназой Pak6, содержащей гомологичные замены в CRIB-последовательности, показало, что в дрожжевой двугибридной системе Pak6 H20,23L не взаимодействует ни с Chp G40V, ни с Cdc42 Q61L (Рис. 1Б). Результаты ко-ИП показали, что мутации в CRIB-последовательности Pak6 существенно снижают связывание с активными формами ГТФаз Cdc42 и Chp по сравнению с Pak6 дикого типа (данные не приведены). Эти данные свидетельствуют о том, что CRIB-последовательность Pak6 участвует во взаимодействии с Chp.

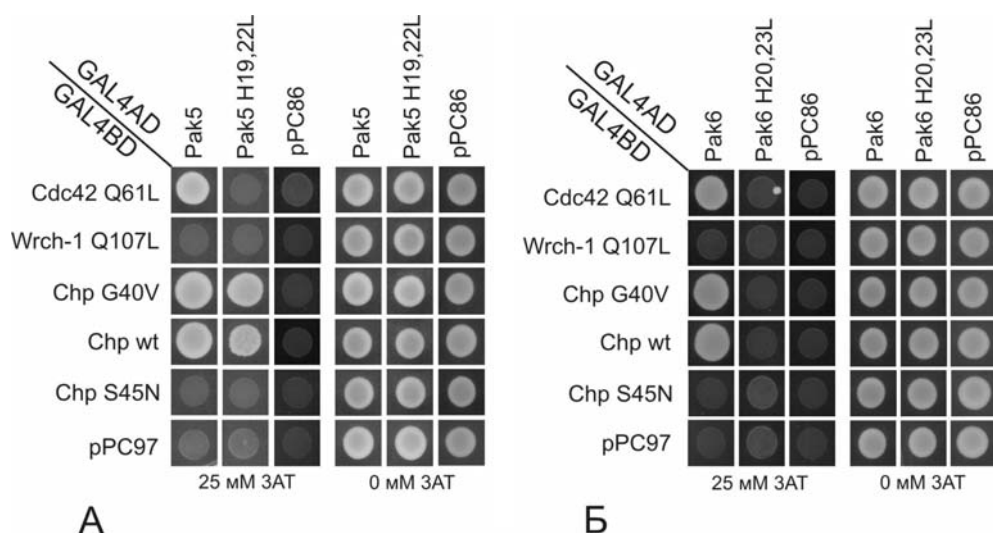


Рис. 1. Chp взаимодействует с Pak5 и Pak6 в дрожжевой двугибридной системе. Дрожжи *S.cerevisiae* штамма Y153, коэкспрессирующие Pak5 или Pak5 H19,22L (А), и Pak6 или Pak6 H20,23L (Б), слитые с активационным доменом транскрипционного фактора GAL4 (GAL4AD), или только GAL4AD (pPC86) и указанные Rho ГТФазы или их мутантные формы, слитые с ДНК-связывающим доменом транскрипционного фактора GAL4 (GAL4BD), или только GAL4BD (pPC97), росли в присутствии (25 мМ) или в отсутствии (0 мМ) 3-амино-1,2,4-триазола (3АТ). Активацию репортерного гена *HIS3* оценивали по способности дрожжей расти в присутствии 3АТ.

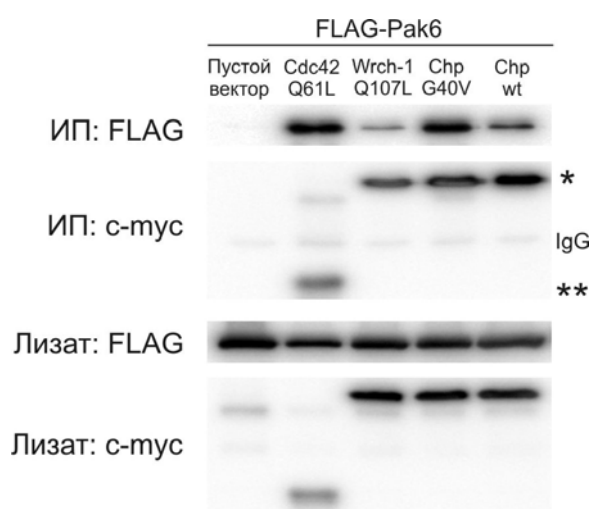


Рис. 2. Chp взаимодействует с Pak6 в лизатах клеток млекопитающих. Плазмиду для продукции Pak6 с FLAG-эпитопом трансфицировали в клетки HEK293 вместе с плазмидами для продукции активных форм ГТФаз и Chp дикого типа (wt) с мус-эпитопом или вместе с «пустым» вектором и через 48 ч после трансфекции проводили ко-ИП. Показаны результаты Вестерн-блот анализа иммунопреципитатов (ИП) и лизатов (Лизат) с использованием указанных антител. * – Chp и Wrch-1; ** – Cdc42; IgG – легкие цепи антител, использованных в ко-ИП.

Эффекторный домен Rho ГТФаз необходим для взаимодействия с эффекторами, а точечные мутации в данном домене достаточны для нарушения взаимодействия с определенным эффектором. Ранее был описан ряд мутаций в эффекторном домене Cdc42 и других ГТФаз,

которые влияли на связывание с различными эффекторами, включая протеинкиназы Pak, однако подобные мутации не были описаны для Chr. Поэтому для изучения роли эффекторного домена ГТФазы Chr во взаимодействии с Pak6 были введены эквивалентные мутации (T63A, L65A, D66A и F68C) в эффекторный домен в контексте активной формы Chr G40V, и было оценено их влияние на взаимодействие с Pak6 в ко-ИП. При этом было установлено, что мутации T63A, L65A и D66A, но не F68C, существенно нарушают взаимодействие FLAG-Pak6 с мус-Chr G40V (данные не приведены). Таким образом, впервые были охарактеризованы мутации эффекторного домена ГТФазы Chr. Полученные данные подтверждают специфичность взаимодействия Chr и Pak6, и свидетельствуют о том, что Chr связывается с Pak6 через эффекторный домен, а аминокислотные остатки T63, L65 и D66 критически важны для взаимодействия с Pak6.

Chr не влияет на уровень фосфорилирования аминокислотного остатка S560 у Pak6

Протеинкиназа Pak6, как и все протеинкиназы подсемейства Pak II, обладает высоким уровнем базальной каталитической активности, а взаимодействие с активной формой Cdc42 не увеличивает киназную активность Pak6. Было показано, что статус фосфорилирования остатка S560 в каталитическом домене Pak6 может быть использован как индикатор уровня активности Pak6. Поэтому была исследована возможность регуляции киназной активности Pak6 ГТФазой Chr посредством влияния на статус фосфорилирования остатка S560 и было установлено, что уровень фосфорилирования S560 у FLAG-Pak6, экспрессированной вместе с контрольным «пустым» вектором, был сходен с таковым у FLAG-Pak6, экспрессированной вместе с активными формами как Cdc42, так и Chr (данные не приведены). На основании этих данных можно сделать вывод, что, как и Cdc42, Chr, по-видимому, не активирует Pak6 или, по меньшей мере, не вызывает повышение уровня фосфорилирования аминокислотного остатка S560.

Chr колокализуется с Pak6 на везикулярных структурах в клетках NCI-H1299

Для дальнейшего подтверждения данных белок-белковых взаимодействий и выявления внутриклеточных структур, на которых могут быть локализованы белки Chr и Pak6, исследовали возможность колокализации Chr и Pak6 в клетках карциномы легкого NCI-H1299. Было обнаружено, что транзиторно продуцируемый белок Pak6, слитый с EGFP (EGFP-Pak6), часто локализуется на везикуло-подобных структурах в цитозоле клеток NCI-H1299 и HeLa B (данные не приведены). Далее при оценке возможной колокализации EGFP-Pak6 и FLAG-Chr было установлено, что при транзиторной продукции данные белки действительно колокализируются на везикулярных структурах (Рис. 3). При этом колокализация наблюдалась лишь в случае активной формы ГТФазы Chr G40V. Неактивная форма Chr S45N не колокализовалась с Pak6, хотя белок Chr S45N также был локализован на точечных структурах в цитозоле (Рис. 3). Таким образом, колокализация Chr и Pak6 указывает на возможность взаимодействия этих белков в клетках и

открывает перспективы дальнейшего изучения функциональных следствий их взаимодействия посредством характеристики везикулярных структур, на которых наблюдается колокализация Chp и Pak6.

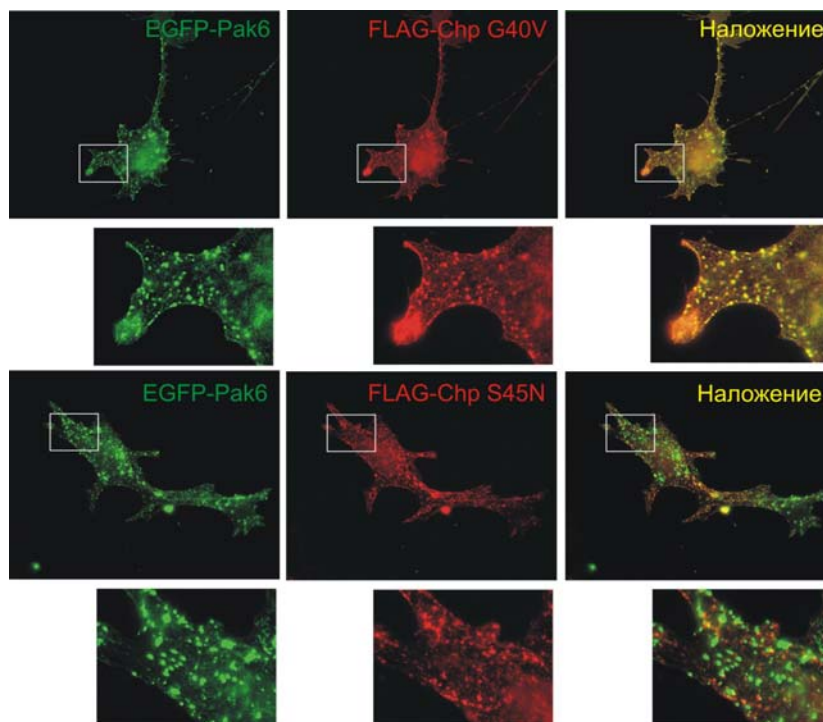


Рис. 3. Chp колокализуется с Pak6 на везикулярных структурах в клетках NCI-H1299. Клетки NCI-H1299, транзитивно трансфицированные плазмидами для продукции EGFP-Pak6 (зеленый канал, левые панели) и FLAG-Chp G40V или FLAG-Chp S45N (красный канал, центральные панели), окрашивали первичными кроличьими анти-FLAG антителами и далее вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с флуоресцентным красителем AlexaFluor546. На панелях справа (Наложение) показано наложение зеленого и красного каналов. На вставках под основными панелями показано увеличенное изображение областей, выделенных белыми прямоугольниками.

Поиск белков взаимодействующих с Chp в дрожжевой двугибридной системе

С целью поиска новых белков, взаимодействующих с ГТФазой Chp, был проведен скрининг кДНК-библиотеки мозга человека в дрожжевой двугибридной системе. В результате скрининга был выявлен ряд клонов, кодирующих белки, специфически взаимодействующие с активной формой Chp и белком дикого типа, но не с неактивной формой ГТФазы Chp. 13 клонов содержали кДНК белка IRSp53, который является эффектором Rho ГТФаз Cdc42 и Rac1, и вызывает формирование филоподий и ламеллиподий, представляющих собой богатые актиновыми микрофиламентами выпячивания плазматической мембраны, играющие важную роль в клеточной подвижности.

Картирование фрагмента IRSp53, необходимого для взаимодействия с Chp

Ранее было установлено, что Cdc42 связывается с частичной CRIB-последовательностью IRSp53 (268-280 аминокислотные остатки, а.о., Рис.4), находящейся в пределах I-BAR домена, а

мутация трех аминокислотных остатков в пределах CRIB-последовательности (I268A, S269A, P271A) блокирует связывание с Cdc42. Так как Chr является гомологом Cdc42 и взаимодействует с рядом эффекторов через CRIB-последовательность, то было исследовано влияние указанной тройной мутации на взаимодействие IRSp53 и Chr в дрожжевой двугибридной системе. При этом было установлено, что данные мутации не влияют на связывание Chr и IRSp53 (данные не приведены). Этот результат указывает на то, что CRIB-последовательность у IRSp53 не является мишенью для Chr. ГТФаза Rac1 связывается со многими эффекторами через CRIB-последовательность, однако Rac1 связывается с участком I-BAR домена IRSp53, отличным от CRIB, и включающим 180-228 а.о. Поэтому далее была исследована возможность связывания Chr с данным фрагментом IRSp53 в дрожжевой двугибридной системе. В результате анализа взаимодействия Chr с различными делеционными мутантами IRSp53 в дрожжевой двугибридной системе было установлено, что сайт взаимодействия с Chr находится в районе 180-228 а.о. IRSp53, что совпадает с результатами, полученными ранее для Rac1 (Рис.4).

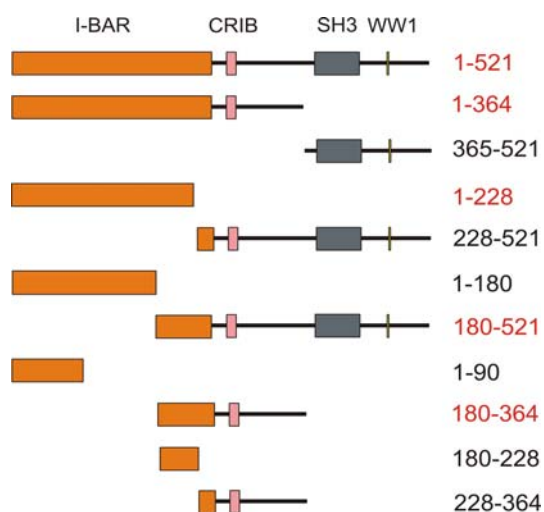


Рис. 4. Схема доменной организации белка IRSp53 и фрагментов доменов, использованных для картирования сайта взаимодействия с Chr. Цифрами справа от рисунка показаны а.о., которые включали в себя фрагменты белка IRSp53. Красным цветом выделены а.о. фрагментов, взаимодействовавших с Chr в дрожжевой двугибридной системе. Полноразмерный белок IRSp53 – 521 а.о.; I-BAR домен – 1-250 а.о.; частичный CRIB-домен – 268-280 а.о.; SH3 домен – 378-434 а.о.; сайт связывания доменов типа WW1 – 468-471 а.о.

Взаимодействие Chr и IRSp53 в лизатах клеток млекопитающих

Для подтверждения возможности взаимодействия Chr и IRSp53 в лизатах клеток млекопитающих, проводили ко-ИП. При этом было установлено, что все три формы Chr преципитируют IRSp53 (Рис. 5). В контрольном образце (дорожка «-») не наблюдалось преципитации IRSp53 в отсутствие ГТФазы Chr, что подтверждает специфичность связывания Chr и IRSp53.

Для подтверждения возможности взаимодействия Chr с IRSp53 проводили GST пул-даун анализ с использованием рекомбинантного белка Chr, слитого с глутатион-S-трансферазой (GST-Chr). В итоге было выявлено, что белок GST-Chr, нагруженный как ГТФ S (негидролизующий аналог ГТФ), так и ГДФ, преципитировал эндогенный белок IRSp53 из цитозольной фракции клеток линии HeLa В. В то же время белок GST, нагруженный как ГТФ S, так и ГДФ, не

преципитировал IRSp53 (Рис. 6). Полученные данные указывают на возможность взаимодействия ГТФазы Chp с эндогенным белком IRSp53. В данном эксперименте, как и при проведении ко-ИП, наблюдалось нуклеотид-независимое связывание GST-Chp и IRSp53. Это указывает на то, что взаимодействие между Chp и IRSp53 может не зависеть от активации Chp.

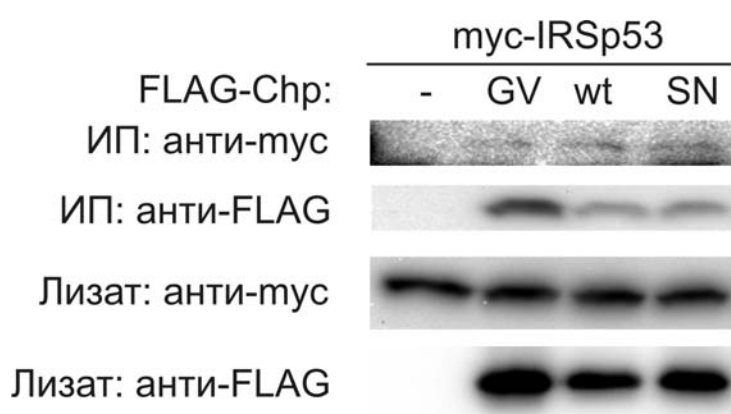


Рис. 5. Коиммунопреципитация белков Chp и IRSp53, транзитивно продуцированных в клетках HEK293.

Плазмиду для продукции IRSp53 с мус-эпитопом трансфицировали в клетки HEK293 вместе с плазмидами для продукции ГТФазы Chp с FLAG-эпитопом (GV - Chp G40V; wt - Chp дикого типа; SN – Chp S45N) или вместе с «пустым» вектором (-). Через 48 ч после трансфекции получали клеточные лизаты и белки с FLAG-эпитопом преципитировали с помощью

анти-FLAG-агарозы. Показаны результаты Вестерн-блот анализа иммунопреципитатов (ИП) и лизатов (Лизат) с использованием анти-мус и анти-FLAG-антител.

Колокализация Chp и IRSp53 на филоподиях в клетках HeLa B

Для дальнейшего подтверждения взаимодействия Chp с IRSp53 проводили иммунофлуоресцентное окрашивание клеток HeLa B, коэкспрессирующих мус-Chp и FLAG-IRSp53. Ранее было показано, что IRSp53 вызывает формирование филоподий в различных клеточных линиях и локализуется на филоподиях. Было установлено, что при транзиторной продукции Chp и IRSp53 действительно колокализуются на филоподиях (Рис. 7). При этом колокализация зависела от активационного состояния ГТФазы Chp, так как в случае Chp S45N не наблюдалось колокализации с IRSp53 на филоподиях, и количество и длина филоподий были меньше, чем при экспрессии активных форм Chp. Результаты этого эксперимента указывают на возможность взаимодействия между Chp и IRSp53 в клетках.

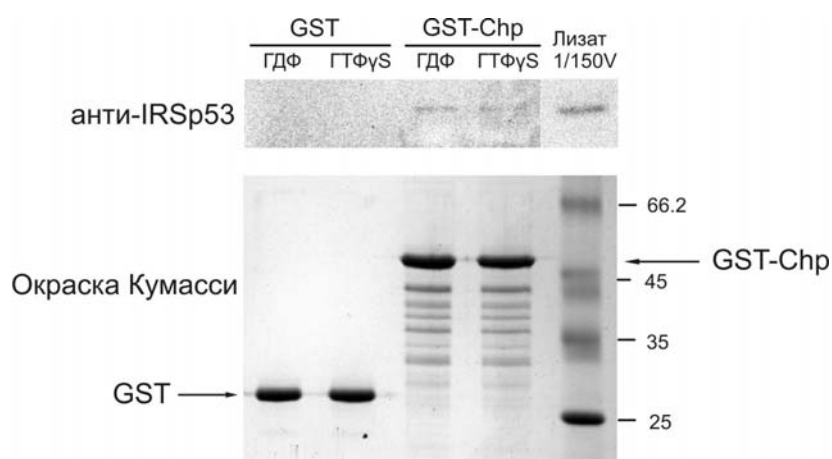


Рис. 6. GST-Chp преципитирует эндогенный белок IRSp53 из цитозольной фракции клеток HeLa B.

GST или GST-Chp нагружали указанными нуклеотидами (ГТФγS и ГДФ) и инкубировали с цитозолем клеток линии HeLa B. GST и GST-Chp осаждали с помощью глутатион-сефарозы, связавшиеся белки элюировали и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием анти-IRSp53

антител. Параллельно образцы разделяли с помощью ДСН-ПААГ и окрашивали гель с помощью красителя Кумасси для выявления рекомбинантных белков GST и GST-Chp.

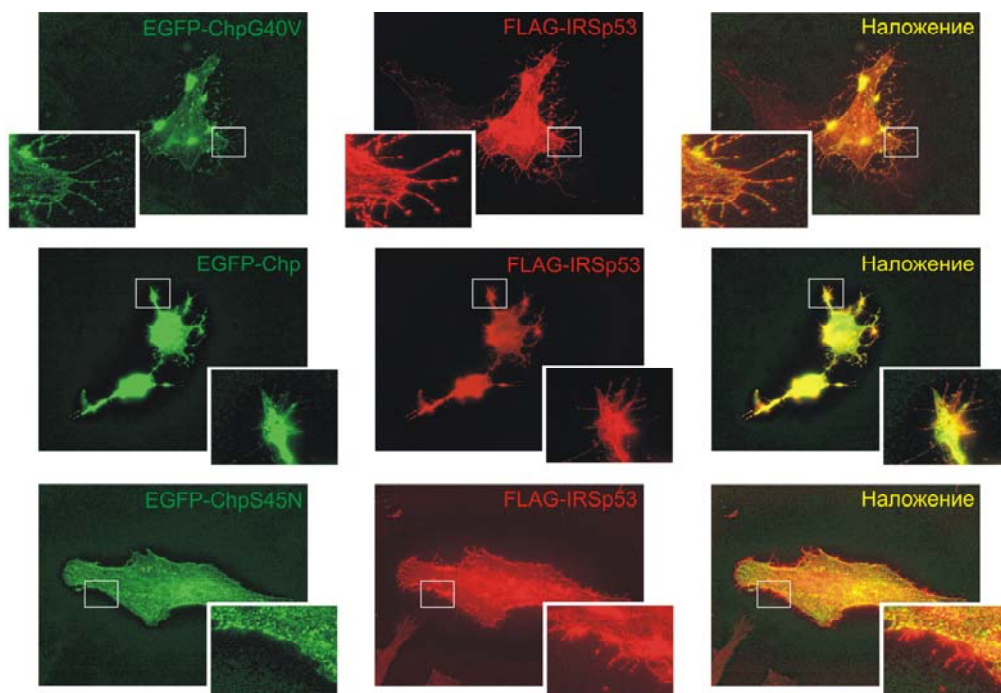


Рис. 7. Колокализация EGFP-Chp и FLAG-IRSp53 на филоподиях в клетках HeLa B. Клетки HeLa B, транзитивно экспрессирующие EGFP-Chp G40V, EGFP-Chp, EGFP-ChpS45N (зеленый канал, левые панели) и FLAG-IRSp53 (красный канал, центральные панели), окрашивали первичными кроличьими анти-FLAG антителами и вторичными антителами против иммуноглобулинов кролика, конъюгированными с флуоресцентным красителем AlexaFluor546. На панелях справа (Наложение) показано наложение зеленого и красного каналов. На вставках под основными панелями показано увеличенное изображение областей, выделенных белыми прямоугольниками.

ГТФаза Chp вызывает формирование филоподий в клеточной линии HeLa B

Так как белок IRSp53 вызывает формирование филоподий, и наблюдается колокализация Chp и IRSp53 на филоподиях, то было предположено, что Chp сам по себе также может вызывать формирование филоподий в клетках HeLa B. Для проверки данного предположения в клетках HeLa B транзитивно продуцировали различные формы ГТФазы Chp, слитые с EGFP, и оценивали формирование филоподий. При этом было обнаружено, что только активные формы Chp, но не Chp S45N, вызывают формирование филоподий (Рис. 8). Удаление С-концевого домена Chp у активной формы ГТФазы блокировало ее способность вызывать формирование филоподий (Рис. 8). Эти результаты подтверждают специфичность эффекта Chp и указывают на то, что для реализации своих биологических функций ГТФаза Chp должна находиться в активном состоянии и быть локализована на плазматической мембране.

Полученные данные позволяют выдвинуть гипотезу, согласно которой IRSp53 является эффектором, опосредующим формирование филоподий под влиянием Chp. При этом Chp и IRSp53 формируют комплекс вне зависимости от нуклеотид-связанного состояния ГТФазы, вероятно, с

участием нескольких сайтов связывания. ГТФаза Chp активируется либо в комплексе с IRSp53, либо перед формированием комплекса, и данный комплекс вызывает формирование филоподий, возможно за счет также и активации IRSp53 в этом комплексе или рекрутирования дополнительных белков, непосредственно отвечающих за полимеризацию актина и формирование филоподий.

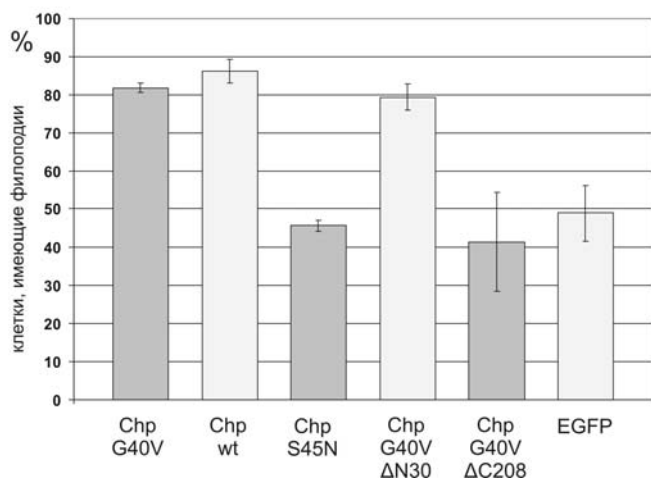


Рис. 8. Chp вызывает формирование филоподий в клетках HeLa В. Клетки HeLa В трансфицировали плазидами, для продукции EGFP или указанных форм ГТФазы Chp, слитых с EGFP. Через 18-20 ч после трансфекции клетки фиксировали и производили подсчет клеток, имеющих филоподии. Данные представлены в виде среднего значения процента трансфицированных клеток, имевших филоподии, для двух независимых экспериментов ± стандартное отклонение. Для каждого образца считалось не менее 70 трансфицированных клеток.

Идентификация α -тубулина как партнера по взаимодействию с ГТФазой Chp

Для идентификации белков, взаимодействующих с Chp, также был использован протеомный подход, заключающийся в аффинной очистке белка Chp с N-концевым FLAG эпитопом из лизатов клеток PC12TetOn с доксициклин-индуцируемой экспрессией Chp (см. ниже), и последующей масс-спектрометрической идентификацией белков, соочищающихся с Chp. При этом была идентифицирована белковая полоса с молекулярным весом около 50 кДа, которая специфически и повторяемо соочищалась с FLAG-Chp G40V, но не с контрольным матриксом (Рис. 9А). Идентификация белка в данной полосе с помощью масс-спектрометрии показала, что этим белком является α -тубулин. Результаты Вестерн-блот анализа элюатов с FLAG-агарозы с помощью антител против α -тубулина подтвердили, что α -тубулин соочищается с FLAG-Chp G40V, но не с контрольной FLAG-агарозой (Рис. 9Б). Полученные данные указывают на то, что идентифицированный с помощью масс-спектрометрии белок действительно является α -тубулином.

α -тубулин связывается с ГТФазой Chp при проведении коиммунопреципитации и GST пул-даун анализа

Для подтверждения взаимодействия Chp с α -тубулином проводили ко-ИП и GST пул-даун анализ. В результате ко-ИП было установлено, что эндогенный α -тубулин копреципитируется как с активными формами Chp, так и с неактивной формой Chp S45N, транзиторно

продуцированными в клетках HEK293 (данные не приведены). Эти результаты указывают на то, что взаимодействие с α -тубулином, по-видимому, не зависит от активности ГТФазы Chp.

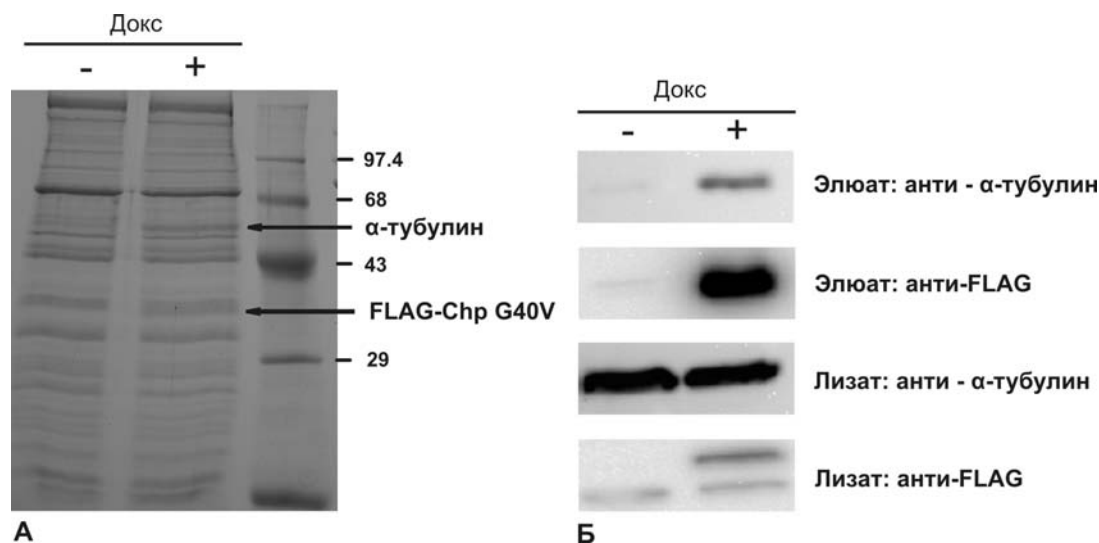


Рис. 9. Идентификация α -тубулина как партнера по взаимодействию для ГТФазы Chp. (А) Электрофоретический анализ белков, очищающихся на анти-FLAG аффинном матриксе из лизатов клеток PC12TetOn с индукцией экспрессии FLAG-Chp G40V при добавлении доксициклина (Докс+) и без индукции (Докс-). Показано изображение геля после окраски красителем Кумасси. Стрелки указывают положение в геле FLAG-Chp G40V и α -тубулина. (Б). Вестерн-блот анализ тех же образцов с помощью антител против α -тубулина и FLAG-эпитопа.

В результате проведения GST пул-даун анализа было выявлено, что белок GST-Chp, но не GST, способен преципитировать эндогенный α -тубулин из цитозольной фракции клеток линии HeLa В. При этом, как и в случае ко-ИП, было установлено, что α -тубулин связывается как с активной формой GST-Chp, нагруженной ГТФ γ S, так и с неактивной формой GST-Chp, нагруженной ГДФ (Рис.10). Результаты данных экспериментов подтверждают возможность связывания Chp с α -тубулином, и указывают на то, что, как и в случае взаимодействия Chp и IRSp53, наблюдается нуклеотид-независимое связывание между ГТФазой Chp и взаимодействующим с ней белком.

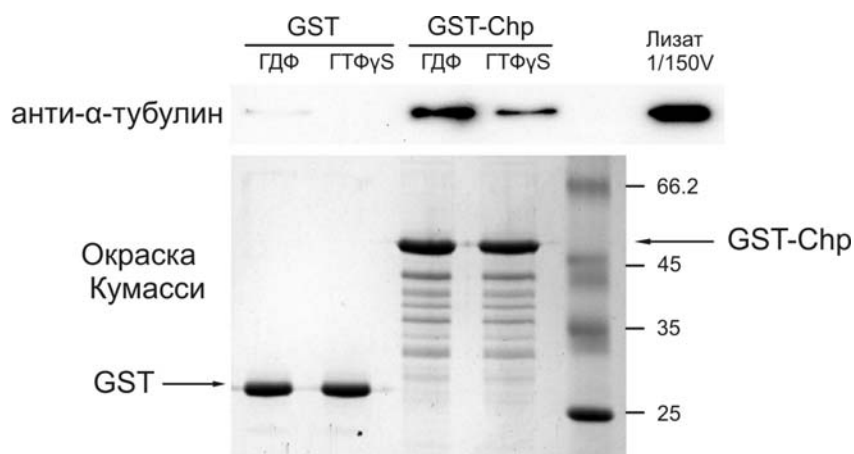


Рис. 10. GST-Chp преципитирует α -тубулин из цитозольной фракции клеток HeLa В. GST или GST-Chp нагружали соответствующими нуклеотидами (ГТФ γ S или ГДФ) и инкубировали с цитозолем клеток линии HeLa В. GST и GST-Chp преципитировали с помощью глутатион-сефарозы, связавшиеся белки элюировали и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител против α -тубулина.

Параллельно образцы разделяли с помощью ДСН-ПААГ и окрашивали гель красителем Кумасси для выявления белков GST и GST-Chp.

Взаимодействие Chp с микротрубочками

Взаимодействие с α -тубулином указывает на возможность связывания Chp с микротрубочками (MT). Поэтому далее исследовали взаимодействие рекомбинантного белка GST-Chp с MT, полимеризованными *in vitro* из препарата очищенного тубулина. В результате было обнаружено, что GST-Chp осаждает MT (α -тубулин присутствует в осадке). В контрольном образце белок GST не осаждал MT (Рис.11).

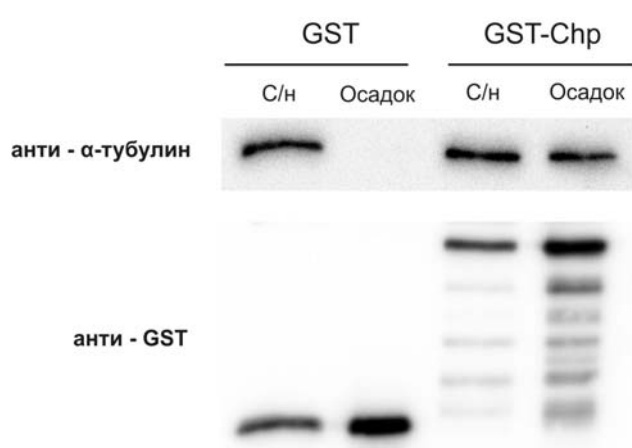


Рис. 11. Взаимодействие GST-Chp с *in vitro* полимеризованными микротрубочками. Полимеризованные микротрубочки инкубировали с белками GST или GST-Chp, связанными с глутатион-сефарозой. Связавшиеся с носителем белки элюировали и анализировали с помощью Вестерн-блоттинга с использованием антител к α -тубулину и GST. С/н – супернатант, содержащий не связавшиеся с глутатион-сефарозой белки.

Результаты эксперимента с *in vitro* полимеризованными MT указывают на возможность взаимодействия Chp с MT в клетках. Поэтому далее исследовали возможность связывания ГТФазы Chp с MT, полимеризованными из эндогенного тубулина непосредственно в клеточных лизатах. При этом было выявлено, что мус-Chp G40V и мус-Chp S45N соосаждаются с полимеризованными MT (Рис. 12, образцы MT+, осадок, панель анти-мус), но отсутствуют в осадке в образцах, где MT были деполимеризованы (Рис. 12, образцы MT-, осадок, панель анти-мус).

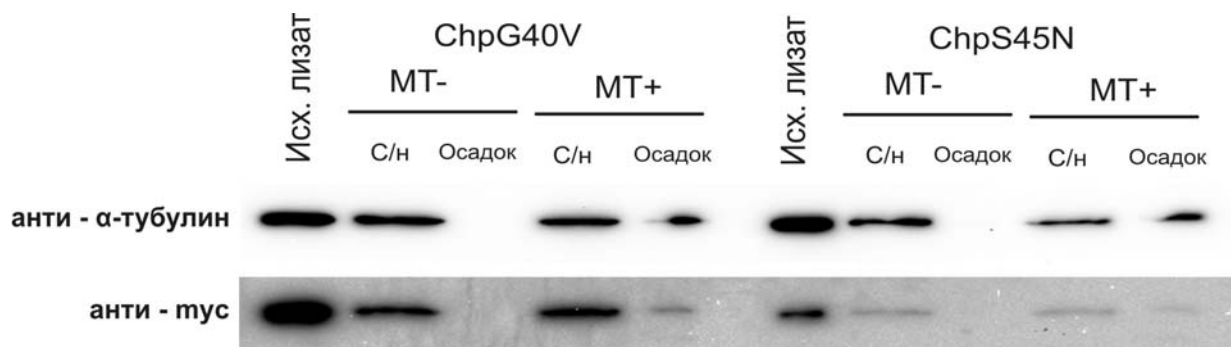


Рис. 12. Транзиторно продуцированный белок Chp соосаждается с микротрубочками. Клетки HEK293 трансфицировали плазмидами для продукции мус-Chp G40V и мус-Chp S45N. Микротрубочки в лизате полимеризовали при +37°C и стабилизировали добавлением таксола (MT+), либо инкубировали лизаты на льду для деполимеризации микротрубочек (MT-). Полимеризованные микротрубочки осаждали центрифугированием и анализировали осадки и

супернатанты (С/н), а также исходные лизаты, с помощью Вестерн-блоттинга с антителами против α -тубулина и тус-эпитопа.

Результаты данного эксперимента указывают на то, что Chp способен связываться не только с димерами тубулина, но и может быть ассоциирован с МТ. Кроме того, в подтверждение результатов ко-ИП и GST пул- даун анализа, неактивная форма ГТФазы тус-Chp S45N также соосаждалась с полимеризованными МТ. В целом, полученные данные позволяют предположить, что ГТФаза Chp способна связываться с микротрубочками независимо от активационного состояния, а активность ГТФазы может быть важна для взаимодействия с эффекторными белками, такими как протеинкиназа Pak1, которые могут быть также ассоциированы с МТ.

ГТФаза Chp напрямую связывается с β -тубулином

Во всех описанных выше экспериментах нельзя исключить возможности непрямого связывания Chp как с α -тубулином, так и с МТ. Поэтому далее исследовали возможность прямого связывания GST-Chp с тубулином с использованием метода гель-оверлей. При проведении ДСН-ПААГ в денатурирующих условиях димеры тубулина мигрируют в виде двух четко различимых полос, соответствующих α - и β -тубулинам (Рис. 13, панель СВВ). Вестерн-блот анализ выявил связывание GST-Chp с белками на мембране, соответствующими α - и β -тубулинам, однако, к удивлению, GST-Chp связывался с β -тубулином намного эффективнее по сравнению с α -тубулином. В случае GST связывание с мембраной не детектировалось (Рис. 13). Результаты данного эксперимента явно указывают на то, что Chp непосредственно взаимодействует с β -тубулином, а не с α -тубулином. В растворе при +4°C тубулин существует преимущественно в виде димеров. Следовательно, выявленное нами в ряде экспериментов связывание Chp с α -тубулином является непрямым, и скорее всего, опосредовано взаимодействием Chp с β -тубулином.

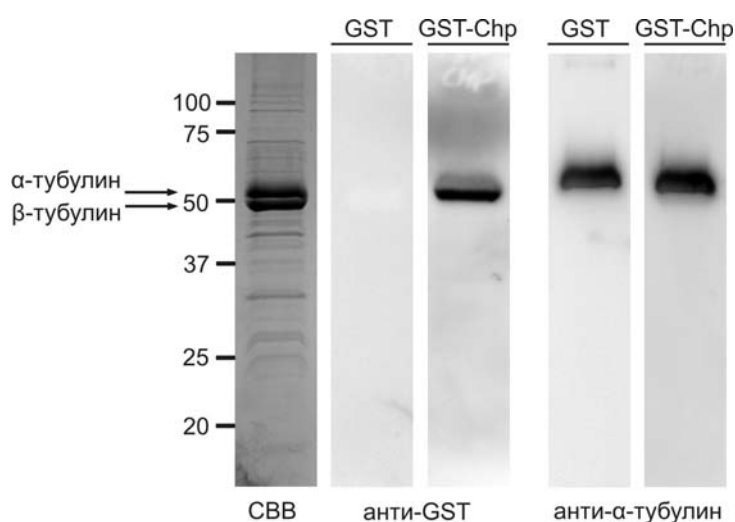


Рис. 13. Прямое связывание GST-Chp с β -тубулином при проведении гель-оверлей анализа. Препарат тубулина разделяли с помощью ДСН-ПААГ, переносили на мембраны и инкубировали их с GST или GST-Chp. Белки, связавшиеся с иммобилизованным на мембране тубулином, детектировали с помощью Вестерн-блот анализа с антителами против GST (анти-GST). Те же самые мембраны окрашивали антителами против α -тубулина для верификации одинакового количества тубулина на мембранах, инкубированных с GST и GST-Chp (анти- α -тубулин). Панель (СВВ):

ДСН-ПААГ анализ препарата тубулина, окраска геля красителем Кумасси. Видно, что димер тубулина мигрирует в геле в виде двух полос (стрелками показано положение в геле α - и β -тубулинов). Слева показано положение маркеров молекулярного веса белков в кДа.

Суммируя, в ряде экспериментов была выявлена способность ГТФазы Chp связываться с микротрубочками, которая вероятно опосредована способностью Chp взаимодействовать с β -тубулином. В свете полученных результатов можно выдвинуть гипотезу о том, что димеры тубулина или МТ могут являться платформой для сборки сигнального комплекса, включающего Chp, эффекторные белки, например Pak1, и, возможно, субстраты Pak1 или другие регуляторные белки. Поэтому можно предположить, что даже неактивная ГТФазы Chp может быть ассоциирована с МТ, а после активации под влиянием неких факторов Chp может рекрутировать на МТ протеинкиназу Pak1, которая, как было показано, способна фосфорилировать тубулин-ассоциированные субстраты. Безусловно, данная модель требует экспериментальной валидации.

Изучение влияния экспрессии ГТФазы Chp на жизнеспособность клеток PC12TetOn

Для изучения влияния ГТФазы Chp на клеточные процессы были получены стабильные клеточные линии PC12TetOn с доксициклин-индуцируемой экспрессией активной формы ГТФазы Chp G40V (клоны gv2, gv3, gv5 и gv7) или белка дикого типа (клон wt5) с N-концевым FLAG-эпитопом. При исследовании влияния экспрессии Chp на жизнеспособность клеток клонов PC12TetOn было установлено, что индукция экспрессии ГТФазы Chp приводила к статистически достоверному снижению количества живых клеток ($P < 0.005$ для всех клонов, данные не приведены). При этом максимальный эффект наблюдался в клетках, экспрессирующих активную форму Chp, по сравнению с клетками, экспрессирующими Chp дикого типа, а в исходной клеточной линии PC12TetOn при добавлении в среду доксициклина не наблюдалось снижения количества живых клеток.

Экспрессия Chp является токсичной для клеток PC12TetOn

Было выдвинуто предположение, что экспрессия Chp вызывает гибель клеток PC12TetOn. Для подтверждения данного предположения проводили измерение высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из клеток в культуральную среду, что является индикатором клеточной гибели. При этом было обнаружено, что экспрессия Chp вызывает статистически достоверное увеличение высвобождения ЛДГ во всех исследованных клонах ($P < 0.005$) по сравнению с необработанными доксициклином клетками (Рис. 14). Эти данные указывают на то, что экспрессия Chp действительно вызывает гибель клеток PC12TetOn. Максимальный цитотоксический эффект отмечался в клонах gv5 и gv7, что соответствует максимальному снижению количества живых клеток, наблюдаемому в данных клонах. Полученные данные указывают на то, что снижение количества живых клеток является следствием клеточной гибели, нежели следствием снижения пролиферативной активности клеток.

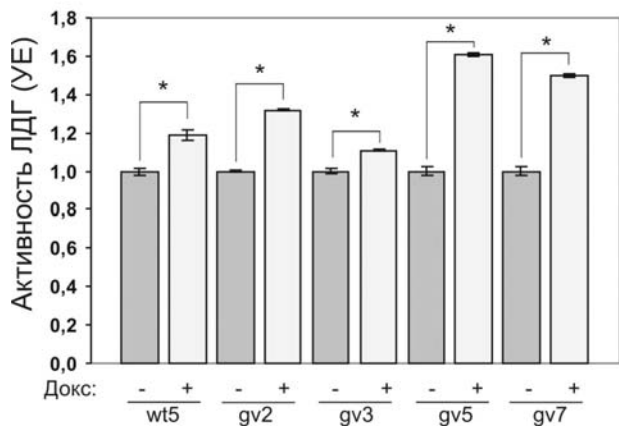


Рис. 14. Chp вызывает гибель клеток PC12TetOn. Клетки клонов PC12TetOn культивировали на коллагене IV в присутствии (Докс+) или отсутствии (Докс-) доксициклина в течение 3 дней, после чего измеряли активность ЛДГ в культуральной среде. Данные являются репрезентативными, по меньшей мере, для двух независимых экспериментов для каждого клона и представлены в виде условных единиц (УЕ) активности ЛДГ как среднее значение трех независимых измерений \pm стандартное отклонение. Активность ЛДГ в культуральной среде необработанных доксициклином клеток принята за 1. * - $P < 0.005$.

Chp вызывает апоптоз клеток PC12TetOn

Так как ГТФазы Cdc42 и Rac1 способны индуцировать апоптоз в клетках PC12, то было предположено, что Chp также может вызывать апоптотическую гибель клеток клонов PC12TetOn. Активация каспаз является характерным признаком апоптоза, поэтому была исследована активация эффекторных каспаз-3/7 при индукции экспрессии Chp. При этом было обнаружено, что индукция экспрессии Chp в клетках клонов wt5, gv5 и gv7 приводила к ~1.4-, ~3.5- и ~1.6-кратному увеличению активности каспаз-3/7, соответственно (Рис. 15А). Максимальная активация каспаз-3/7 была отмечена в клоне gv5, что соответствует максимальным снижению выживаемости клеток и высвобождению ЛДГ для этого клона. Таким образом, вероятнее всего, именно апоптоз является механизмом клеточной гибели, вызываемой ГТФазой Chp в клетках PC12TetOn при их культивации на коллагене IV. Важно отметить, что в исходной клеточной линии PC12TetOn не наблюдалось активации каспаз-3/7 при обработке клеток доксициклином (Рис. 15А). Это подтверждает специфичность данного эффекта для Chp. Помимо анализа активации каспаз также было проведено окрашивание клеток клона wt5 специфическим маркером апоптоза аннексином V, конъюгированным с флуоресцентным красителем FITC, и последующим анализом клеток с помощью проточной цитофлуориметрии. В итоге было обнаружено, что индукция экспрессии Chp вызывает увеличение окрашивания клеток клона wt5 аннексином V-FITC (Рис. 15Г). Это подтверждает то, что Chp индуцирует апоптоз клеток PC12TetOn. Кроме того, была исследована активация инициаторных каспаз-8/9 при индукции экспрессии Chp, и было выявлено, что Chp активирует каспазы-8/9 (Рис. 15Б и В). Важно отметить, что активности каспаз-8/9 не были увеличены в исходных клетках PC12TetOn, что подтверждает специфичность эффекта ГТФазы Chp (Рис. 15Б и В). Таким образом, Chp способен активировать как митохондриальный, так и опосредованный рецепторами смерти апоптотические сигнальные каскады в клетках PC12TetOn.

Сhr активирует протеинкиназу JNK в клетках PC12TetOn

Активация JNK-сигнального пути играет центральную роль в развитии апоптоза в различных типах клеток. В частности, JNK активируется под влиянием ГТФаз Cdc42 и Ras1 при индукции апоптоза в клетках PC12. Поэтому была исследована активация протеинкиназы JNK в клонах wt5 и gv7 при экспрессии Сhr. Экспрессия Сhr как дикого типа, так и активной формы, вызывала активацию JNK (увеличение уровня фосфорилирования JNK в 2 ± 0.22 и 3.79 ± 1.24 раза в клонах wt5 и gv7, соответственно) (Рис. 16). В клетках gv7 увеличение уровня фосфорилирования JNK сопровождалось ~ 2.7 -кратным увеличением фосфорилирования белка c-Jun по сайту Ser73, который является мишенью для JNK, тем самым указывая на то, что активация JNK под влиянием Сhr приводит и к активации транскрипционного фактора AP-1. При этом не было выявлено активации протеинкиназы p38 MAPK под влиянием Сhr, которая также может индуцировать апоптоз (Рис. 16А). В целом, полученные данные указывают на то, что Сhr-индуцируемый апоптоз клеток PC12TetOn сопровождается активацией про-апоптотического JNK-сигнального пути.

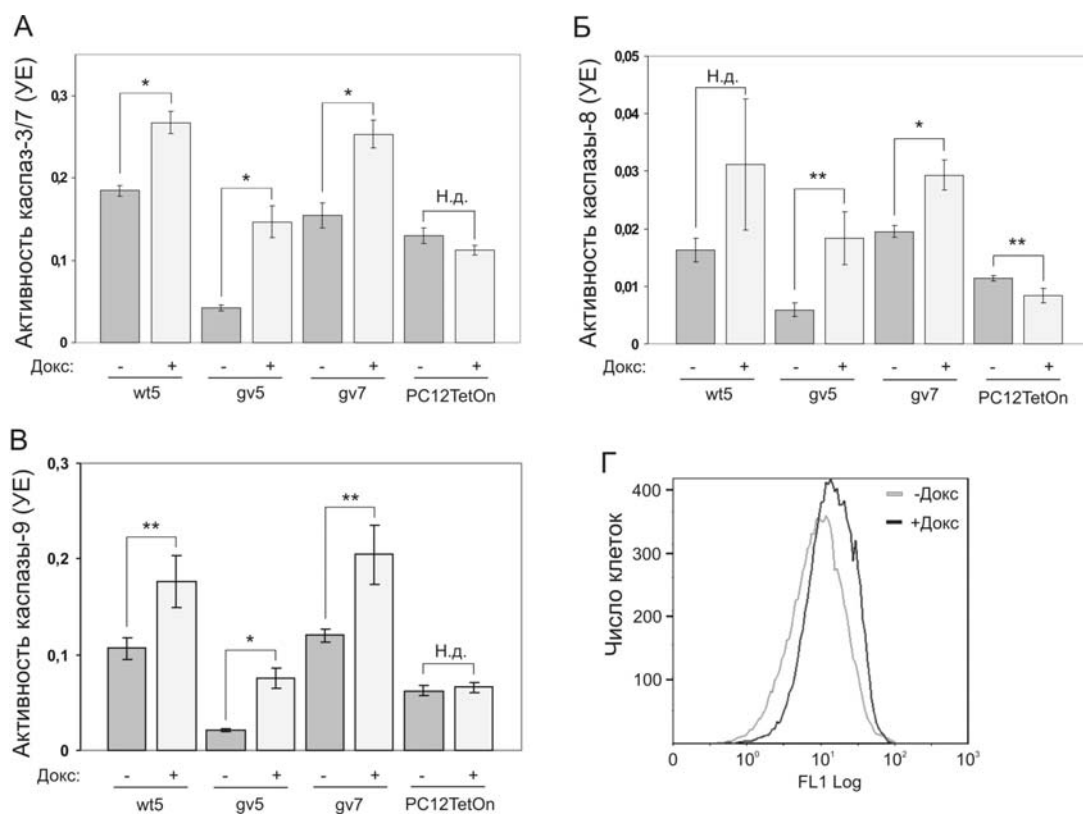


Рис.15. Сhr вызывает апоптоз клеток PC12TetOn. Показаны результаты измерения активности каспаз-3/7 (А), каспазы-8 (Б) и каспазы-9 (В) в исходных клетках PC12TetOn и в клонах wt5, gv5 и gv7, культивированных на коллагене IV в течение 48 ч в присутствии (Докс+) или отсутствии (Докс-) доксициклина. Данные являются репрезентативными для двух независимых экспериментов и представлены в виде условных единиц активности каспаз (УЕ) после нормализации на количество жизнеспособных клеток как среднее значение трех независимых измерений \pm стандартное отклонение. * - $P < 0.005$; ** - $P < 0.05$; н.д. – различия не являются статистически достоверными. (Г) Цитофлуориметрический анализ клеток клона wt5, окрашенных аннексином V-FITC. Клетки культивировали на коллагене IV в течение 72 ч в присутствии

(Докс+) или отсутствии (Докс-) доксициклина и анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии.

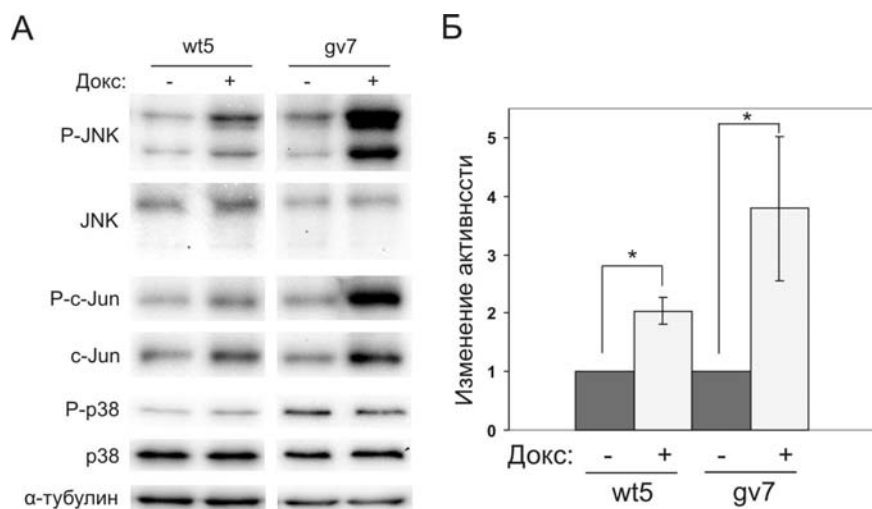


Рис. 16. Chp активирует протеинкиназу JNK в клетках PC12TetOn. (А) Клетки клонов wt5 и gv7 культивировали на коллагене IV в течение 48 ч в присутствии (Докс+) или в отсутствии (Докс-) доксициклина. Клеточные лизаты анализировали с помощью Вестерн-блоттинг с использованием указанных антител. Показаны репрезентативные результаты одного из трех независимых экспериментов. (Б) Денситометрическая обработка результатов Вестерн-блот анализа. Изменение активности JNK показано как среднее значение трех независимых измерений \pm стандартное отклонение. Активность JNK в образцах, необработанных доксициклином (Докс-) принята за 1. Приведены средние данные для обеих изоформ JNK. * - $P < 0.05$.

экспериментов. (Б) Денситометрическая обработка результатов Вестерн-блот анализа. Изменение активности JNK показано как среднее значение трех независимых измерений \pm стандартное отклонение. Активность JNK в образцах, необработанных доксициклином (Докс-) принята за 1. Приведены средние данные для обеих изоформ JNK. * - $P < 0.05$.

Для подтверждения того, что цитотоксический эффект экспрессии Chp в клетках PC12TetOn зависит от активации JNK, было проведено измерение высвобождения ЛДГ из клеток клона gv5 в присутствии различных концентраций SP600125, специфического ингибитора JNK. При этом было установлено, что SP600125 дозо-зависимым образом снижал высвобождение ЛДГ и отменял Chp-индуцированную цитотоксичность, тем самым подтверждая, что активация протеинкиназы JNK, по крайней мере частично, необходима для Chp-индуцированной апоптотической гибели клеток PC12TetOn (данные не приведены).

Для того чтобы подтвердить, что Chp-индуцированный апоптоз зависит от активации JNK, было исследовано влияние SP600125 на активацию каспаз под влиянием Chp. В результате было установлено, что обработка клеток ингибитором JNK не влияет на активацию каспазы-8 (Рис. 17Б). Напротив, активность каспазы-9 в клетках wt5 и gv5 при добавлении SP600125 снижалась. (Рис. 17В). Это указывает на то, что активация каспазы-9 под влиянием Chp зависит от активации протеинкиназы JNK. Соответственно, активность эффекторных каспаз-3/7 также снижалась при обработке клеток клонов wt5 и gv5 ингибитором SP600125 (Рис. 17А). Полученные данные, во-первых, подтверждают, что Chp-индуцированный апоптоз клеток PC12TetOn зависит от активации JNK, и, во-вторых, указывают на то, что вероятнее всего, Chp активирует два параллельных проапоптотических каскада: JNK-зависимый каскад, активирующий митохондриальный апоптотический путь и каспазу-9, и JNK-независимый каскад, приводящий к активации каспазы-8.

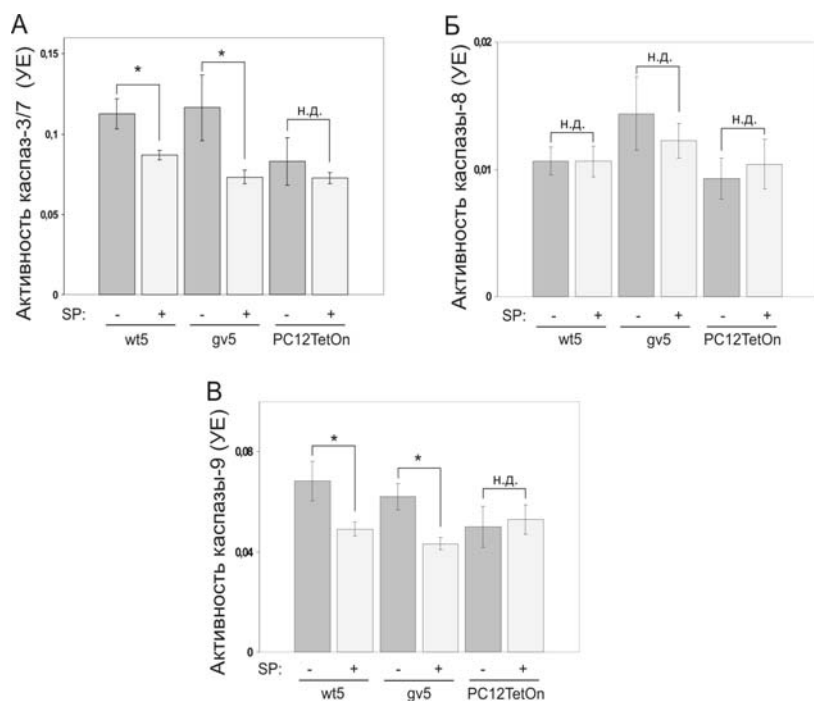


Рис. 17. Ингибитор JNK, SP600125, снижает Chp-индуцированную активацию каспаз в клетках PC12TetOn. Приведены результаты измерения активностей каспаз-3/7 (А), каспазы-8 (Б) и каспазы-9 (В) в исходных клетках PC12TetOn и в клонах wt5 и gv5 культивируемых на коллагене IV в течение 48 ч в присутствии доксициклина и в присутствии (+) или в отсутствии (-) 10 мкМ SP600125 (SP). Данные обработаны и представлены также, как описано на Рис. 15. * - $P < 0.05$; н.д. – различия не являются статистически достоверными.

Chp активирует протеинкиназу JNK и AP-1-зависимую транскрипцию в клетках HEK293

Транскрипционный фактор AP-1 является мишенью JNK, а активация AP-1-зависимой транскрипции необходима для развития JNK-индуцированного апоптоза в нейрональных клетках. Исследование активации AP-1-зависимой транскрипции в клетках HEK293 с помощью люциферазного анализа показало, что при транзиторной экспрессии в клетках HEK293 активной формы ГТФазы Chp, белка дикого типа и неактивной, ГДФ-связанной формы Chp, слитых с EGFP, наблюдается более чем 10-кратная активация ($P < 0.0001$) AP-1-зависимой транскрипции по сравнению с клетками, экспрессирующими только EGFP (Рис. 18А). Вестерн-блот анализ лизатов транзиторно трансфицированных клеток показал, что экспрессия EGFP-Chp G40V, EGFP-Chp и EGFP-Chp S45N вызывала активацию JNK (Рис. 18Б). Таким образом, полученные результаты подтверждают, что Chp действительно активирует JNK-сигнальный каскад и, как следствие, AP-1-зависимую транскрипцию в клетках HEK293.

Ингибирование JNK блокирует активацию AP-1 под влиянием Chp

Для того чтобы подтвердить, что активация AP-1 – зависимой транскрипции под влиянием ГТФазы Chp опосредована протеинкиназой JNK, проводили анализ активации AP-1-зависимого репортерного гена при обработке клеток HEK293 ингибитором JNK. При этом было установлено, что SP600125 дозо-зависимым образом ингибирует активацию AP-1-зависимой транскрипции при экспрессии EGFP-Chp в клетках HEK293 (Рис. 19). Полученные данные свидетельствуют о том, что активация транскрипционного фактора AP-1 под влиянием Chp опосредована протеинкиназой JNK.

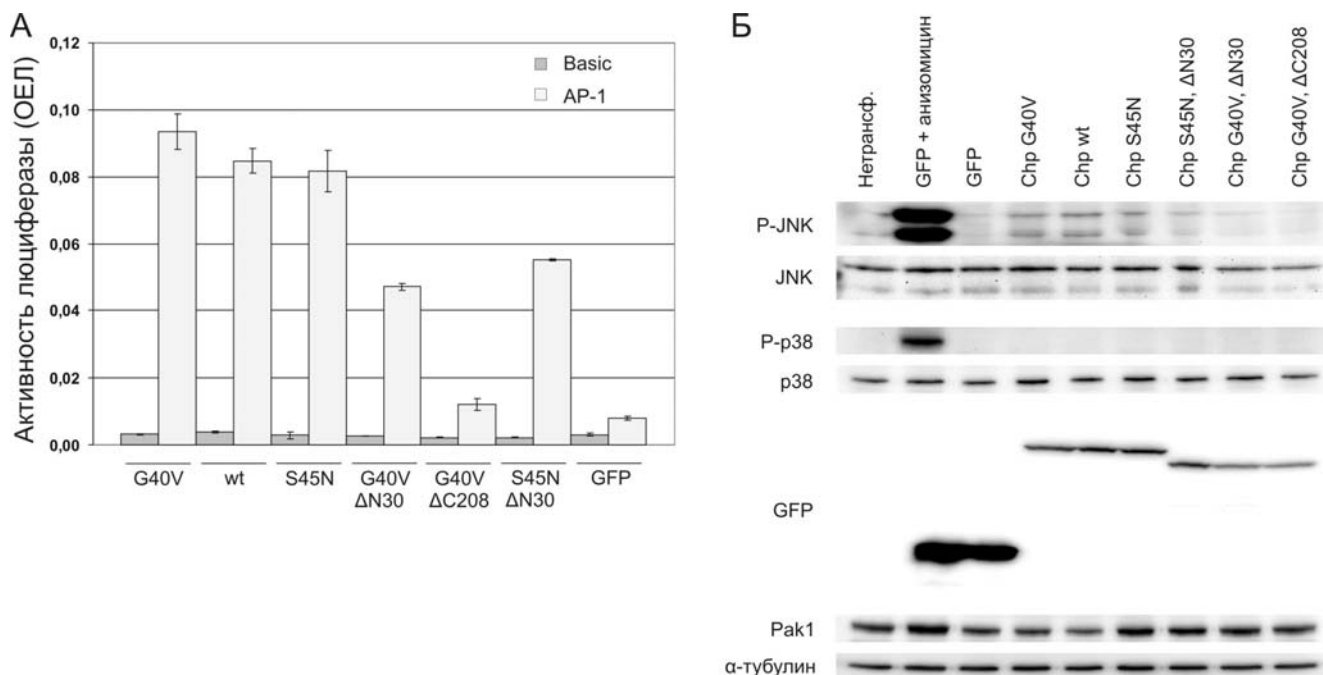


Рис. 18. Chp активнует протеинкиназу JNK и AP-1-зависимую транскрипцию в клетках HEK293. (А) Клетки HEK293 трансфицировали плазмидами для экспрессии EGFP или указанных форм ГТФазы Chp, слитых с EGFP, вместе с репортерными плазмидами, кодирующими люциферазу светлячка ('Basic' - pGL3-Basic, 'AP-1' - pLuc-AP-1) и репортерной плазмидой, кодирующей люциферазу *Renilla* под контролем конститутивно активного промотора. Через 48 ч после трансфекции проводили люциферазный анализ. Активность люциферазы светлячка нормализовали на активность люциферазы *Renilla*. Данные являются репрезентативными, по меньшей мере, для трех независимых экспериментов и представлены в виде относительных единиц люминесценции (ОЕЛ) как среднее значение трех независимых измерений ± стандартное отклонение. (Б) Клетки HEK293 транзиторно трансфицировали плазмидами, экспрессирующими указанные белки, либо оставляли нетрансфицированными (Нетрансф.), и культивировали в течение 48 ч. Перед лизисом контрольные клетки обрабатывали аннзммнцнном в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин для индукции активации JNK (GFP+аннзммнцнн). Клеточные лизаты анализировали с помощью Вестерн-блот анализа с использованием указанных антител.

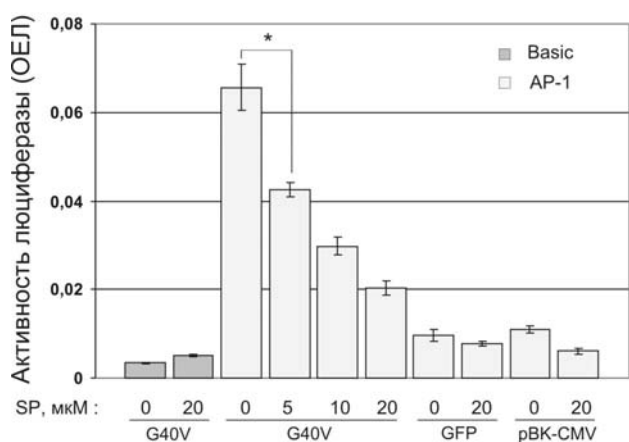


Рис.19. Ингибирование протеинкиназы JNK блокирует активацию AP-1 под влиянием Chp. Клетки HEK293 культивировали и трансфицировали, как описано в Рис. 18А. Кроме того, клетки трансфицировали репортерными плазмидами вместе с вектором pBK-CMV. После трансфекции клетки культивировали в течение 48 ч в среде, содержащей различные концентрации SP600125 (SP) (0, 5, 10 и 20 мкм), после чего проводили люциферазный анализ. Активность люциферазы светлячка нормализовали на активность люциферазы *Renilla*. Данные являются репрезентативными, по меньшей мере, для двух независимых экспериментов и представлены в виде относительных единиц люминесценции (ОЕЛ) как среднее значение трех независимых измерений ± стандартное отклонение. * - $P=0.0018$.

Мембранная локализация и N-концевой домен Cbp необходимы для активации JNK сигнального каскада

С целью анализа молекулярных механизмов активации JNK сигнального каскада под влиянием Cbp был проанализирован эффект удаления N- и С- концевых доменов Cbp (1-28 и 208-236 а.о., соответственно) на способность активировать AP-1-зависимый репортер и JNK. При этом было обнаружено, что делеция С-концевого домена Cbp блокирует активацию JNK и AP-1-зависимой транскрипции (Рис. 18А и Б). Этот результат подтверждает важность мембранной локализации для функционирования ГТФазы Cbp, которая определяется ее С-концевым доменом, и еще раз подтверждает специфичность эффекта Cbp на AP-1-зависимую транскрипцию.

К удивлению, было обнаружено, что предположительно неактивная, ГДФ-связанная форма Cbp S45N также активировала AP-1-зависимую транскрипцию (примерно 10-кратное увеличение по сравнению с EGFP, $P < 0.0001$) и вызывала активацию JNK (Рис. 18А и Б). Мутация S45N должна блокировать Cbp в ГДФ-связанном состоянии, но при этом не должна влиять на N-концевой пролин-богатый домен или мембранную локализацию. Известно, что Cbp связывается с белком POSH, SH3-домен содержащим белком-скаффолдом, который играет важную роль в активации JNK сигнального пути при развитии апоптоза в клетках PC12. Можно предположить, что мембранно-ассоциированный Cbp S45N в своем ГДФ-связанном состоянии рекрутирует эндогенный белок POSH на мембрану, который обеспечивает частичную активацию JNK каскада в клетках HEK293. Действительно, делеция N-концевого домена у Cbp G40V, который, вероятнее всего, обеспечивает взаимодействие с белком POSH, снижала примерно в два раза эффект Cbp G40V на AP-1-зависимую транскрипцию ($P = 0.0001$) и снижала активацию JNK (Рис. 18А и Б). Сходно, делеция N-концевого домена у неактивной формы Cbp S45N приводила к 1.5-кратному снижению активации AP-1-зависимой транскрипции по сравнению с полноразмерным белком Cbp S45N ($P = 0.0018$) (Рис. 18А). Эти данные говорят о том, что N-концевой пролин-богатый домен Cbp вносит вклад в активацию JNK сигнального каскада.

Изучение экспрессии гена *RHOV* в образцах немелкоклеточного рака легких человека

Ген *RHOV*, кодирующий ГТФазу Cbp, и некоторые эффекторы Cbp (протеинкиназы Pak1 и Pak4) обладают свойствами онкогенов. Показанная нами индукция формирования филоподий под влиянием Cbp указывает на то, что Cbp может влиять на инвазивные свойства клеток. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что сверхэкспрессия гена *RHOV* будет способствовать развитию и прогрессии опухолей человека. Анализ экспрессии гена *RHOV* у человека не выявил присутствия транскрипта в легких, однако экспрессия гена *RHOV* обнаруживалась в клеточной линии карциномы легкого человека A549. Анализ экспрессии *RHOV* в образцах рака легкого человека ранее не проводился. Поэтому с помощью полуколичественной ПЦР был проведен анализ экспрессии гена *RHOV* в образцах немелкоклеточного рака легких человека (НМКРЛ) по

сравнению с прилежащей неопухоловой тканью. Было проанализировано 29 пар образцов легочных тканей (опухоль - условная норма) пациентов с НМКРЛ. За условную норму принимали гистологически нормальные ткани легких, взятые из прилегающей к опухоли ткани ближе к краю резекции. В результате было установлено, что в 22 парах опухоль-норма (76%) уровень транскрипта *RHOV* повышен в опухолях по сравнению с условной нормой. В прилежащих к опухоли условно нормальной ткани легких транскрипция *RHOV* была обнаружена лишь в 2 индивидуальных образцах из 29, при этом транскрипт детектировался лишь при максимальном числе циклов амплификации. В 7 парах образцов (24%) транскрипт *RHOV* не обнаруживался ни в норме, ни в опухоли (данные не приведены). Статистический анализ с помощью точного критерия Фишера выявил, что увеличение уровня экспрессии гена *RHOV* в опухоли является статистически достоверным ($P=0.0004$).

Полученные результаты явно свидетельствуют о том, что экспрессия гена *RHOV* высокоспецифична для опухолей легкого по сравнению с условной нормой. Поэтому уровень транскрипта гена *RHOV* можно рассматривать как потенциальный молекулярный маркер НМКРЛ, который в перспективе может быть использован в диагностических и/или прогностических целях. ГТФаза Chr и ее эффекторные белки обладают свойствами онкогенов и способны вызывать злокачественную трансформацию. Учитывая биологические свойства ГТФазы Chr, увеличение экспрессии транскрипта *RHOV* представляется перспективным молекулярным маркером опухолей легкого.

Выводы

1. Анализ взаимодействия белков в дрожжевой двугибридной системе выявил протеинкиназу Pak5 как новый потенциальный эффектор ГТФазы Chr.
2. С использованием анализа взаимодействия белков в дрожжевой двугибридной системе и коиммунопреципитации экзогенно продуцированных белков выявлено взаимодействие протеинкиназы Pak6 и ГТФазы Chr, которое опосредовано эффекторным доменом ГТФазы Chr и CRIB-доменом протеинкиназы Pak6, и зависит от активации ГТФазы Chr. Продемонстрирована колокализация Chr и Pak6 на везикуло-подобных структурах при их совместной продукции в клетках линии NCI-H1299.
3. Выявлена способность ГТФазы Chr взаимодействовать с белком IRSp53 в дрожжевой двугибридной системе и при проведении коиммунопреципитации экзогенно продуцированных белков, картирован сайт взаимодействия в белке IRSp53. Было выявлено, что ГТФаза Chr при транзитной продукции в клетках линии HeLa В индуцирует формирование филоподий, а при совместной продукции колокализуется с белком IRSp53 на филоподиях.

4. Показана способность ГТФазы Chp взаимодействовать с β -тубулином и с микротрубочками.
5. Установлено, что ГТФаза Chp индуцирует апоптотическую гибель клеток линии PC12TetOn, которая частично опосредована активацией протеинкиназы JNK.
6. Выявлено частое повышение уровня транскрипта гена *RHOV*, кодирующего белок Chp, в образцах немелкоклеточного рака легких человека по сравнению с условной нормой, которое потенциально может использоваться как молекулярный маркер немелкоклеточного рака легких человека.

Личный вклад автора

Основные результаты работы получены автором лично. Масс-спектрометрический анализ белков проводился Р. Зиганшиным (ИБХ РАН, г. Москва), образцы кДНК опухолей легкого человека и прилежащей нормальной ткани были получены от Е.Д. Свердлова, Т.В. Виноградовой, Е.П. Копанцева (ИБХ РАН, г. Москва). Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. Hofmann C, Shepelev M, Chernoff J. "The genetics of Pak." *Journal of Cell Science*. 2004; 117(19):4343-54.
2. Shepelev MV, Chernoff J, Korobko IV. "Rho family GTPase Chp/RhoV induces PC12 apoptotic cell death via JNK activation". *Small GTPases*. 2011; 2(1):17-26.
3. Шепелев MB, Коробко ИВ. «Протеинкиназа Pak6 – новый эффектор атипичной Rho ГТФазы Chp/RhoV». *Биохимия*. 2012; 77(1):34-42.

Тезисы конференций

1. Shepelev MV, Chernoff J. "Cdc42– like GTPase Chp interacts with Pak kinases". "Molecular mechanisms in signal transduction and cancer", The EMBO / FEBS Advanced Lecture Course on the Island of Spetses, Greece, August 15 - 26, 2005, p.92.
2. М.В. Шепелев, Д. Чернофф. «Взаимодействие Cdc42 – подобных ГТФаз Chp и Wrch-1 с РАК В киназами». Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. XVII Международная зимняя молодёжная научная школа. Институт Биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, Февраль 10-13, 2005, с.17.
3. М.В. Шепелев, Д.Чернофф, И.В. Коробко. «Rho ГТФаза Chp/Wrch2 взаимодействует с α -тубулином». Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. XX Международная зимняя молодёжная научная школа. Институт Биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, Февраль 11-15, 2008, с.26.

4. Shepelev MV, Chernoff J, Korobko IV. “Rho family GTPase Chp/Wrch2 induces PC12 apoptotic cell death accompanied by JNK activation and suppression of Akt”. International Conference on Biomolecular Science in honor of the 75th anniversary of the birth of Professor Yuri Ovchinnikov (1934-1988), Moscow-Pushchino, September 28-October 2, 2009, p.418-420.
5. Shepelev MV, Korobko IV. «The Rho family GTPase Chp/Wrch2 associates with microtubules». “EMBO Conference Series Microtubules – Structure, Regulation and Functions”, 2-5 May, 2010, Heidelberg, Germany. p.217.
6. Shepelev MV, Korobko IV. “Rho GTPase Chp/RhoV as a regulator of cytoskeleton: implications for cancer cell biology”. International symposium “Control of gene expression and cancer”, June 21-25, 2010, Moscow, Russia, p.45-46.
7. Шепелев М.В., Коробко И.В. «Атипичная Rho ГТФаза Chp/RhoV: новый участник канцерогенеза?». Материалы VII Российского симпозиума «Биологические основы терапии онкологических и гематологических заболеваний», Москва, 1-4 Июня, 2011. Онкогематология. 2011. (2). с.56.
8. Shepelev MV. “Elucidating the function and regulation of the atypical Rho GTPase Chp/RhoV in epithelial and fibroblastic cells”. U.S.-Russia Scientific Forum Meeting. November 16-18, 2011. Moscow, Russia. p.27.

Патент

1. М.В. Шепелев, Н.В. Гнучев, Г.П. Георгиев, И.В. Коробко. «Способ диагностики немелкоклеточного рака легких и набор для его осуществления». (Заявление о выдаче патента Российской Федерации на изобретение в Федеральную службу по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам №2010136681 от 02.09.2010; принято решение о выдаче патента на изобретение).