

**На правах рукописи**



003 166897

**Игнатъев Александр Валентинович**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ  
ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ RAB-GTPаз С ИХ  
МОЛЕКУЛЯРНЫМ ПАРТНЕРОМ, БЕЛКОМ GDI**

**03.00.02 –биофизика**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**

16 АПР 2008

**Пушино 2008**

Работа выполнена в институте молекулярной физиологии им.  
Макса-Планка, Дортмунд, Германия

Научный руководитель кандидат биологических наук  
**Рак Алексей Владимирович**

Официальные оппоненты доктор биологических наук  
**Орлов Николай Яковлевич**  
кандидат химических наук  
**Никулин Алексей Донатович**

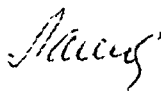
**ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Институт Биофизики Клетки  
РАН**

Защита состоится «23» апреля 2008 г. В 15<sup>30</sup> часов на  
заседании диссертационного совета Д-002.093.01 при  
Институте Теоретической и Экспериментальной Биофизики  
РАН, по адресу 142290, Московская обл., г. Пущино, ул.  
Институтская, 3

С диссертацией можно ознакомиться в центральной  
библиотеке ИЦБИ РАН, г. Пущино

Автореферат разослан «24» марта 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук  
Ланина



Н.Ф.

# ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

## Актуальность темы

Внутриклеточный транспорт молекул и частиц, обеспечивающих жизнедеятельность клеток тесно связан с транспортом везикул- мембранных структур, выполняющих роль переносчиков. Для регуляции каждого этапа везикулярного транспорта в клетках существуют специфические факторы- семейство Rab белков (RabГТФазы) и их эффекторы. Регулирующая функция Rab основана на их способности функционировать в качестве молекулярных переключателей, индуцируемых внешним сигналом и ответственных за передачу сигнала в определенном месте и в определенное время, взаимодействуя со специфическими эффекторами. При этом Rab белки могут существовать в активном (ГТФ-связанным) и неактивном (ГДФ-связанным) состоянии. Активное состояние характеризуется способностью взаимодействовать с эффекторными молекулами, тогда как в неактивном состоянии Rab белки взаимодействуют в основном с регуляторными молекулами. В свою очередь цикл замены нуклеотида регулируется активирующими факторами GEF (GTP/GDP Exchange Factors) и GAP (GTPase Activating Proteins) и сопряжен с циклом обратимого перемещения Rab между мембранами донорных и акцепторных внутриклеточных компартментов.

Локализация Rab на мембранах обеспечивается наличием в их составе геранилгеранильных групп, присоединение которых к С-концевым цистеинам белков (реакция пренилирования) происходит в процессе посттрансляционной модификации в присутствии Rab-геранилгеранил трансферазы (RabГТФаза).

Транспорт Rab белков в цитозоле осуществляется посредством белковых факторов семейства REP (Rab Escort Protein)/ GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor). REP

транспортирует только новосинтезированный Rab белок и участвует в процессе его посттрансляционной модификации. В дальнейшем, в транспорте Rab участвует только GDI. На основании некоторых структурных и биохимических исследований показано, что GDI также участвует в экстракции Rab из мембран внутриклеточных компартментов. Однако механизм данного процесса изучен недостаточно. Тем не менее, этот процесс является необходимым для осуществления жизненного цикла и регуляции активности Rab белков, а его нарушения могут быть причинами целого ряда заболеваний.

### **Цель исследования**

Целью данной работы является изучение молекулярного механизма взаимодействия RabГТФаз с молекулярными партнерами, и в частности, с молекулой GDI- фактора, ответственного за экстракцию из мембран и транспорт RabГТФаз в клетках.

### **Задачи исследования**

1. получение белковых комплексов как пренилированного, так и непренилированного Rab с GDI
2. определение структуры белковых комплексов, используя рентгеноструктурный анализ
3. определение влияния каждого из предполагаемых участков контакта на взаимодействие двух белковых партнеров с использованием мутагенеза в комбинации с биохимическими и биофизическими экспериментами
4. изучение молекулярного механизма формирования белкового комплекса Rab-GDI и механизма экстракции Rab/ГТФ из мембран

## Научная новизна и практическая ценность работы.

Рентгеноструктурными исследованиями определены кристаллические структуры комплексов GDI-Ypt31(GG) и GDI-Ypt31. Сравнение структур показало, что формирование липидсвязывающего “кармана” в молекуле GDI, необходимого для укрытия гидрофобных геранилгеранильных групп Rab/Ypt белка от водного окружения цитозоля, индуцируется конформационными изменениями, вызванными взаимодействием других участков связывания молекул.

С использованием энзиматического фарнезилирования в присутствии фарнезилтрансферазы отработана методика получения растворимых пренилированных Rab белков, которые могут быть использованы для многих *in vitro* исследований.

Определены аффинности взаимодействия GDI с различными формами некоторых дрожжевых Rab белков, в том числе непренилированных, пренилированных и мутантных. Установлено, что при отсутствии пренильных групп, делеции С-концевых аминокислот и мутациях пары алифатических аминокислот в молекуле Rab/Ypt, участвующих в образовании связей с GDI, аффинность взаимодействия этих молекул снижается, тогда как пренилированный немутантный белок формирует высокоаффинный комплекс с GDI.

Предложены механизм формирования комплекса Rab-GDI и модель, описывающая этапы GDI-индуцируемой экстракции Rab белков из внутриклеточных мембран, которая является одним из этапов регуляции активности Rab/Ypt в клетках.

## Апробация работы

Работа прошла апробацию на открытом заседании секции «Молекулярная Биофизика» ученого совета ИТЭБ РАН

## Публикации

По теме диссертации опубликовано и находится в печати 3 статьи и 2 тезисов конференций.

## Структура и объем диссертации

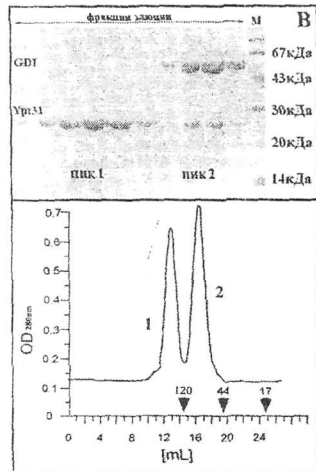
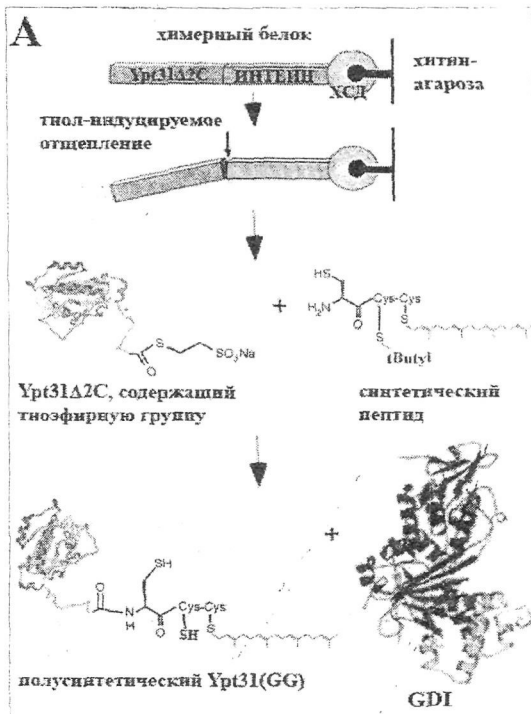
Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 92 страницах, включает **3** таблицы и 24 рисунка. Список литературы включает 120 наименований.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

**Получение белковых комплексов GDI с пренилированным и непренилированным Rab/Ypt.** В качестве объекта исследований нами были выбраны дрожжевой GDI и дрожжевой Rab белок, Ypt31, участвующий в транспорте везикул внутри комплекса Гольджи и отпочковывании секреторных везикул от комплекса Гольджи (Benli et al., 1996; Jedd et al., 1997)

Для формирования комплекса GDI с геранилгеранилированным белком использовался Ypt31, полученный полухимическим способом, основанном на химическом ковалентном соединении рекомбинантного белка, содержащего реактивную тиоэфирную группу, и химически синтезированного дипептида, содержащего два остатка цистеина, один из которых ковалентно связан с геранилгеранилом (Cys(StBu)-Cys(GG)) (Dureck et al., 2004)

Комплекс отделяли от несвязавшихся белков гельфильтрацией на колонке Superdex200 (Amersham Biosciences) (Рис1). Фракции, содержащие комплекс GDI-Ypt31(GG) (второй пик элюции на рис.1B), были собраны и сконцентрированы до концентрации 10 мг/мл.

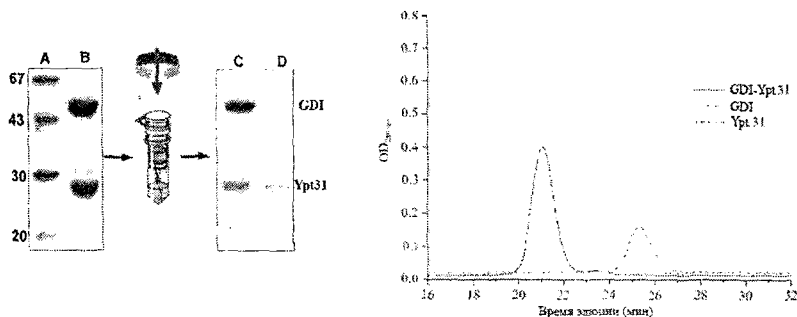


**Рис.1** Получение комплекса GDI-Yrp31(GG). А- Общая схема. Yrp31, в виде

химеры с интеином и хитинсвязывающим доменом аффинно связывается с хитин-агарозой. При добавлении тиолового агента происходит отщепление Yrp31, который содержит тиоэфирную группу, взаимодействующую с синтетическим пептидом. GDI добавляется во время ренатурации растворенного в гуанидингидрохлориде геранилгеранилированного белка. В- Гель-фильтрация комплекса на колонке с носителем Superdex200 и SDS-ПААГ электрофорез фракций. Комплекс элюировался в соответствии с молекулярной массой 75 кДа. Цифрами обозначены пики, соответствующие 1- молекулярным агрегатам Yrp31, несвязавшимся с GDI и элюирующимся с свободном объеме, 2- комплексу GDI-Yrp31(GG).

Для получения комплекса GDI с непренилированным Yrp31 использовался метод концентрирования и ультрафильтрация смеси очищенных белков (Ignatev A. *et al.*, 2007) (Рис2). Полученный комплекс GDI-Yrp31 в

концентрации 8 мг/мл использовался для получения кристаллов аналогично комплексу GDI-Ypt31(GG).



**Рис.2** Получение комплекса GDI-Ypt31. Смесь белков GDI и Ypt31, взятых в эквимольных количествах (1) концентрировали через мембрану с размером пор 50 кДа. Комплекс белков, сформировавшийся в стехиометрическом соотношении 1:1, идентифицирован в супернатанте (2); Ypt31, не связавшийся с GDI- в растворе, прошедшем через мембрану (3). Формирование комплекса подтверждено гельфильтрацией. Время элюции смеси белков отличалось от времени элюции белков, нанесенных отдельно, и соотносилось с элюцией маркера молекулярной массы 75 кДа, что соответствует теоретической массе комплекса этих белков.

**Рентгено-структурные исследования.** Дифракционные данные были собраны на синхротроне в Paul Scherrer Institute (Швейцария) с использованием источника излучения X10SA и обработаны с использованием программного обеспечения XDS (Kabsch, 1993). Некоторая статистика сбора данных представлена в таблице 1.

Для определения структур комплексов использовался метод молекулярного замещения, где структура GDI из комплекса GDI-Ypt1(GG) (номер в базе данных 1GND) была использована в качестве модели для поиска решения. Структура Ypt31 смоделирована с использованием структуры Rab8, белка с высокой гомологией аминокислотной последовательности к Ypt31.

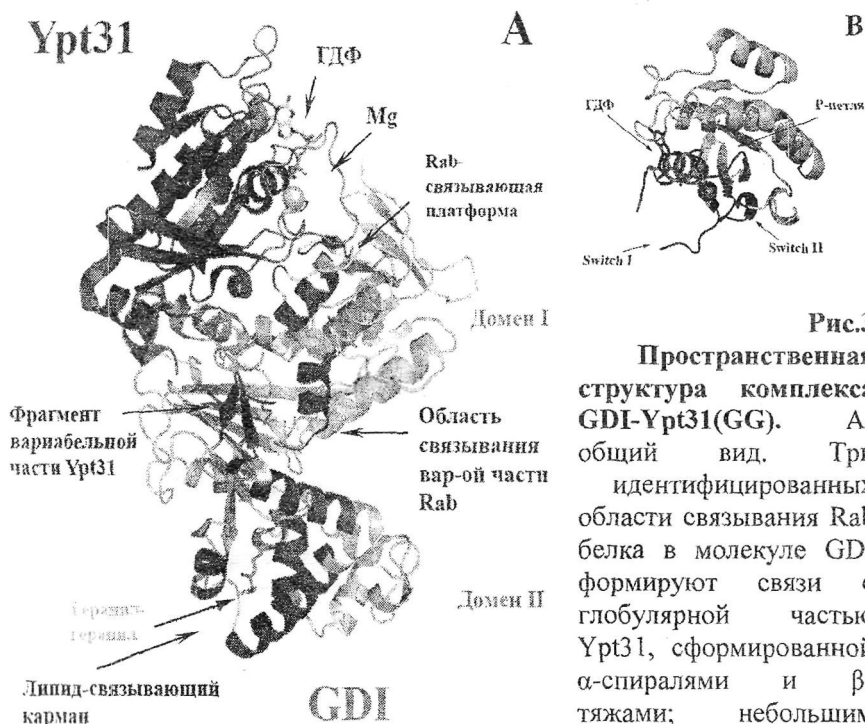
Анализ собранных данных показал, что в кристаллах белки находятся в комплексе Комплексы в структурах имеют похожую цилиндрическую форму (Рис 3). GDI имеет двухдоменную структуру, в которой домен I сформирован  $\beta$ -листами и  $\alpha$ -спиралями, а домен II - четырьмя  $\alpha$ -спиралями. Структуры Ypt31 соотносятся с ранее определенными структурами Rab/Ypt (Dumas *et al*, 1999, Ostermeier and Brunger, 1999, Chattopadhyay *et al.*, 2000, Esters *et al*, 2000, Stroupe *et al*, 2000) и состоят из глобулярного домена и переменного участка. Ион магния и ГДФ формируют координационные связи с молекулами воды и атомами аминокислотных остатков специфических регионов Rab белка (Switch I, Switch II, P- петля), ответственных за связывание нуклеотида.

Таблица 1. Основные характеристики наборов дифракционных данных и показатели уточнения моделей

	GDI-Ypt31(GG)	GDI-Ypt31
X-гау источник	SLS X10SA	SLS X10SA
Длина волны, [Å]	0 931	0 979
Разрешение, [Å]	20 – 2 35	20-3.1
Пространственная группа	P21	P212121
Параметры ячейки [Å, °]	a=66 28, b=61 72, c=93 11, $\alpha=\gamma=90$ , $\beta=103 72$	a=64 67, b=91 55, c=138.36, $\alpha=\beta=\gamma=90$ ,
Полнота набора, %	99 7	94 8
I/ $\sigma$ (I)	12 97	16 75
Уточнение моделей		
Разрешение, [Å]	20 – 2 35	20-3 1
R-work, R-free (%)	18 2, 24 3	23 5, 29.9

Контакты между белками в комплексах сформированы комбинацией гидрофобных и полярных взаимодействий. В определенных нами структурах

детектируются аналогичные комплексу GDI-Ypt1(GG) участки связывания молекул. Со стороны GDI во взаимодействие вовлечены Rab-связывающая платформа (RBP- Rab Binding Platform); область, координирующая переменную часть Rab/Ypt (CCR- C-terminus Coordinating Region), а также липид-связывающий “карман” (Lipid Binding Pocket).



**Рис.3**  
**Пространственная структура комплекса GDI-Ypt31(GG).** А-общий вид. Три идентифицированных области связывания Rab белка в молекуле GDI формируют связи с глобулярной частью Ypt31, сформированной  $\alpha$ -спиралями и  $\beta$ -тяжами; небольшим фрагментом

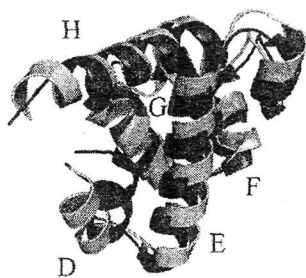
переменной части Rab белка; и геранилгеранильным остатком. Часть переменной последовательности Rab белка не идентифицирована, что объясняется большой подвижностью этого фрагмента. Геранилгеранил находится в углублении, сформированном спиральями малого домена GDI. В- нуклеотидсвязывающая область Ypt31. Область связывания нуклеотида образована регионами SwitchI, SwitchII, P-петлей, которые ответственны за связи с ионом Mg, нуклеотидным основанием и фосфатами ГДФ/ГТФ.

Со стороны Ypt31 во взаимодействии участвуют Switch I и Switch II регионы глобулярного домена, а также небольшой участок варибельной части, содержащий пару алифатических аминокислот. Для Ypt31(GG) детектируется образование связей геранилгеранильной группы с липид-связывающим „карман”ом молекулы GDI

**Связывание геранилгеранильных групп и липид-связывающего „кармана“.** Ранее было показано, что в комплексе с пренилированным Rab белком липид-связывающий „карман” молекулы GDI находится в открытом состоянии, тогда как в случае GDI, несвязанным с каким-либо белком, липид-связывающий „карман” закрыт. Открытое состояние „кармана” соотносится со смещением  $\alpha$ -спирали D в малом домене GDI и формированием гидрофобного углубления, в которое способны проникать геранилгеранильные группы Rab белка (Goody *et al.*, 2005) (Рис4). При анализе определенных нами структур обнаружено, что в комплексе GDI с непренилированным Ypt31, липид-связывающий „карман” молекулы GDI находится в открытом состоянии. Данный результат позволил нам сделать важное заключение: присутствие геранилгеранильных групп вблизи области связывания липида само по себе не индуцирует конформационные изменения в домене II GDI и не является причиной формирования липидсвязывающего „кармана“ Липидсвязывающий „карман“ принимает свою открытую конформацию после связывания глобулярной части Rab белка с Rab-связывающей платформой GDI, либо после взаимодействия варибельной части Rab белка с областью ее связывания на молекуле GDI

Кроме того, ранее было известно, что GDI связывает пренилированные Rab белки с высокой аффинностью, обуславливающей его роль как белка, экстрагирующего Rab

из мембраны (Alexandrov *et al.*, 1999, Shapiro and Pfeffer, 1995).



**Рис.4 Наложение структур малого домена свободного GDI и GDI, связанного с пренилированным Rab белком.** Липидсвязывающий “карман” GDI, связанного с пренилированным Rab белком (серым) находится в открытом состоянии, в сравнение с липидсвязывающим “карманом” свободного GDI (черным).

Формирование “кармана” соотносится с конформационными изменениями, вызванными смещением спирали D малого домена.

Кроме того, ранее было известно, что GDI связывает пренилированные Rab белки с высокой аффинностью, обуславливающей его роль как белка, экстрагирующего Rab из мембраны (Alexandrov *et al.*, 1999, Shapiro and Pfeffer, 1995). Нами показано, что непренилированный Rab белок также способен взаимодействовать с GDI с аффинностью достаточной для формирования комплекса. Такое взаимодействие возможно, так как точек связывания между этими молекулами несколько.

Для подтверждения структурных данных были определены аффинности взаимодействия GDI с некоторыми полноразмерными (Ypt6, Ypt31, Ypt32, Ypt51), либо укороченными на две С-концевые аминокислоты (Ypt1Δ2C, Ypt7Δ2C, Ypt31Δ2C), дрожжевыми непренилированными Rab белками. Предположительно уменьшение полипептидных цепей Ypt белков на две аминокислоты при отсутствующих геранилгеранильных группах не будет влиять на значение констант диссоциации. В данной работе аффинности взаимодействия белков определялись с использованием метода калориметрии изотермического титрования, в котором GDI титровался увеличивающимся

концентрациями различных Ypt белков при постоянной температуре 25°C. Константы диссоциации определялись из кривых титрования с помощью программы Origin 7.0 (MicroCal) на основании модели взаимодействия с одним сайтом связывания и согласно уравнению

$$q = \Delta H^0(T)V[PL] = \Delta H^0(T)V[P] \frac{K_a[L]}{1 + K_a[L]},$$

где  $\Delta H$ - энтальпия связывания,  $[PL]$ - концентрация комплекса,  $[P]_t$ - общая концентрация GDI, включая как свободный, так и связанный белок,  $[L]$ - концентрация свободного Ypt белка,  $V$ - объем ячейки измерения,  $K_a$ - константа связывания,

Аффинности связывания для этих белков соответствовали микромолярным значениям, что оказывается достаточным для формирования низкоаффинного комплекса (Таблица2). Тем не менее эти аффинности на 2-3 порядка ниже, чем определенная ранее косвенным методом аффинность связывания GDI с геранилгеранилированным Ypt1

Таким образом, присутствие геранилгеранильных групп, безусловно, необходимо для формирования комплекса, но не является критичным

	Kd, мкМ
Ypt1Δ2C	12.2±1.7
Ypt6	25±3.1
Ypt7Δ2C	2.3±0.2
Ypt31Δ2C	5.8±0.5
Ypt31	18.9±2
Ypt32	1.5±0.2
Ypt51	5.9±0.3
Ypt1(GG)	0.01±0.001

Таблица2. Константы диссоциации комплексов GDI с некоторыми полноразмерными или укороченными на 2 аминокислоты Ypt белками.

**Связывание области, координирующей переменную часть Rab белка, молекулы GDI с парой алифатических аминокислот Rab белка.** Для характеристики взаимодействия небольшого участка переменной части Rab белка, содержащего пару алифатических аминокислот, и области связывания и координации переменной части Rab белков в молекуле GDI, было необходимо получить пренилированные Rab белки с мутациями в этом участке. Однако, основной из проблем исследования Rab белков и их функций *in vitro* в их нативном и физиологическом состоянии, т.е. в геранилгеранилированном виде, является их не растворимость в водных растворах. Присутствие же агентов, повышающих растворимость может приводить либо к потере биологической активности, либо к искажению истинных механизмов взаимодействий.

Эксперименты по исследованию взаимодействия Rab белков с GDI, проводимые ранее, основывались на косвенных методах. Так, аффинности взаимодействия геранил-геранилированных Rab белков рассчитывались из эффективности их экстракции из мембран (Araki *et al.*, 1990, Alexandrov *et al.*, 1999). Однако, этот метод исследования требует получения клеточных мембран, содержащих Rab белки, и использования дополнительных методов детекции. Решение проблемы растворимости Rab белков можно найти в использовании вместо геранилгеранила другого полимера изопреноидной группы-фарнезила. Фарнезил по строению напоминает геранилгеранил и содержит 15 атомов углерода в основной цепи, в то время как геранилгеранил содержит 20 атомов углерода. Меньшая длина пренильной группы обеспечивает сравнительную растворимость модифицированного ею белка.

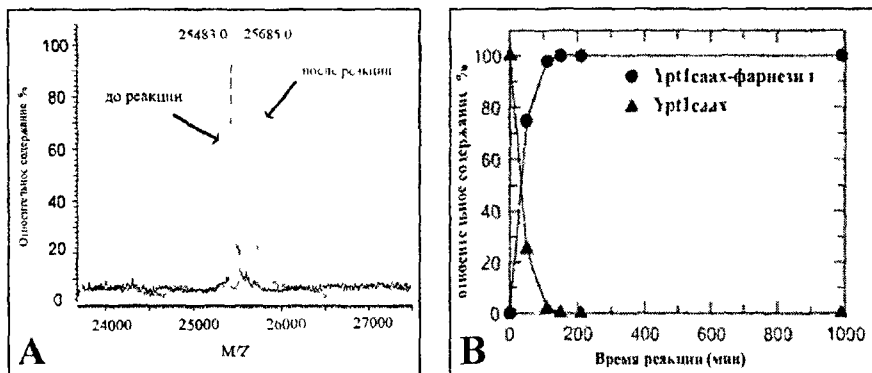
Фарнезелирование осуществляется ферментом, фарнезилтрансферазой, которая модифицирует цистеин СААХ последовательности на С-конце полипептидной цепи

(где С-цистеин, А-алифатическая аминокислота, Х-метионин, глутамин, серин, треонин или цистеин), и модифицирует Ras/Rho ГТФазы (Casey and Seabra, 1996, Alogy and Balch, 2000) Однако Rab белки не содержат СААХ аминокислотной последовательности. Тем не менее, она может быть введена искусственно В данной работе предложена методика получения пренилированного растворимого Rab белка с использованием энзиматического фарнезилрования генетически модифицированного белка

*Энзиматическое фарнезилрование* В качестве объекта модификации был выбран Ypt1 белок, как наиболее охарактеризованный к настоящему времени дрожжевой Rab белок, участвующий в регуляции транспорта везикул от ЭПР к аппарату Гольджи (Segev *et al*, 1988) кДНК Ypt1 была модифицирована с использованием специфических праймеров, содержащих нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислоты цистеин - изолейцин - изолейцин- метионин (СААХ последовательность) на С-конце белка и клонирована в экспрессионный вектор pET19 Экспрессия проводилась в экспрессионном штамме *E Coli* BL21(DE3) при 20°. Белок, содержащий СААХ последовательность, был очищен с использованием аффинной хроматографии Для модификации, очищенный белок инкубировали с фарнезилпирофосфатом и фарнезилтрансферазой (Sigma-Aldrich) Контроль реакции фарнезилрования и ее эффективность осуществлялись путем отбора проб из инкубационной смеси каждые 30 минут и определением молекулярной массы белка с помощью масс-спектрометрии (ESI-MS)

Модификация белка соответствует увеличению молекулярной массы белка на 200 Да, что соотносится с массой фарнезила Через 2 часа инкубации 100% белка подвергаются модификации (Рис 5А,В) Для сравнения, Ypt1 белок дикого типа, не содержащий СААХ

последовательность на С-конце, не подверглась фарнезилированию



**Рис.5 Контроль реакции фарнезилирования.** А- сравнение масс-спектров до реакции и после. Увеличение массы белка на 200 Да соответствует включению фарнезила в состав белка В- Кинетика реакции фарнезилирования на основе процентного содержания модифицированной и не модифицированной форм белка в инкубационной смеси В течение 2 часов фарнезилированию подвергается 100 % Ypt1саах белка

Таким образом, методика энзиматического фарнезилирования Rab белков с введением СААХ последовательности может быть использована для получения растворимого пренилированного Rab белка, который впоследствии может использоваться в исследованиях *in vitro*, в том числе, для определения аффинности взаимодействия

*Получение мутантных пренилированных белков.* В структуре комплекса GDI-Ypt1 (Rak et al., 2003) показано, что со стороны Ypt1 во взаимодействии участвуют валин (V191) и лейцин (L193) вариабельной части белка. С использованием набора для точечных мутаций в кДНК Ypt1саах мы осуществили замены нуклеотидов, кодирующих эти аминокислоты на кодоны, кодирующие аланин, либо гистидин, и получили рекомбинантные белки с

заменами соответствующих аминокислот. Полученные мутантные белки модифицировали с использованием описанной выше методики энзиматического фарнезилирования.

*Константы связывания*. При помощи calorиметрического титрования определены аффинности взаимодействия этих мутантов с GDI (Таблица 3). Аффинность взаимодействия фарнезилированного Ypt1 (Ypt1caax-farnesyl) с GDI на два порядка выше в сравнении с белком, не подвергавшимся модификации (Ypt1caax), и соотносится с аффинностью пренилированных белков, определенной ранее косвенными методами.

**Таблица 3. Константы диссоциации комплексов GDI с различными формами Ypt1caax.**

	Kd, мкМ
Ypt1caax	30±2.2
Ypt1caax-farnesyl	0.1±0.02
Ypt1-V191A-caax-farnesyl	0.7±0.1
Ypt1-L193A-caax-farnesyl	10±0.9
Ypt1-V191H-caax-farnesyl	20±2
Ypt1-L193H-caax-farnesyl	18±1.7

Замены алифатических гидрофобных аминокислот на более объемный и к тому же полярный гистидин (V191H, L193H) приводят к аффинности связывания с GDI сравнимой с аффинностью связывания непренилированного Ypt1caax белка. При замене лейцина на аланин, аффинность также была сравнима с аффинностью непренилированного белка. Незначительное снижение аффинности связывания (в 7 раз) при замене V191A объяснимо тем, что структура аланина близка к структуре валина, и при отсутствии только лишь метильной группы сохраняются достаточно сильные связи. В случае же замены лейцина (структура которого гораздо объемнее) связей, образуемых атомами аланина с GDI недостаточно для сильного связывания молекул.

Таким образом, показано, что взаимодействия в области связывания участка, содержащего алифатические аминокислоты и в области связывания пренильных групп вносят значительный вклад в связывание молекул Rab белков и GDI, увеличивая аффинность связывания.

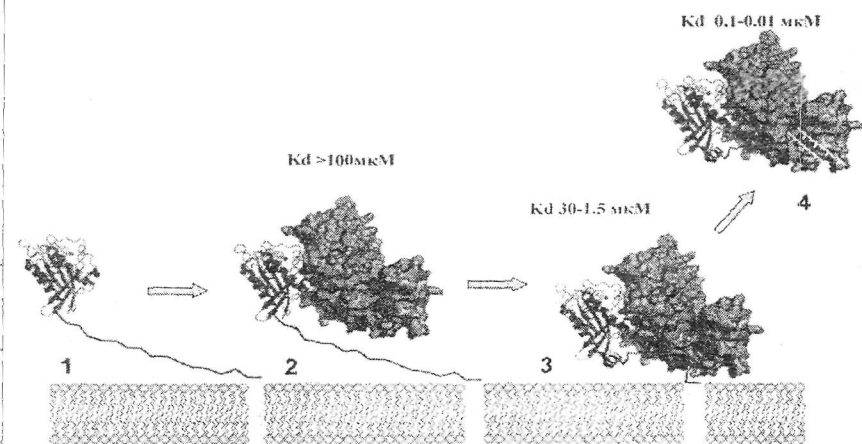
**Связывание Rab-связывающей платформы GDI и глобулярного домена Rab.** Влияние взаимодействий глобулярной части Rab белков и Rab-связывающей платформы GDI на связывание этих молекул ранее было показано мутационным анализом. При мутациях аминокислот Rab- связывающей платформы молекулы GDI белки не формировали комплексов. При калориметрическом титровании GDI некоторыми Ypt белками, с deletированными переменными частями и содержащими только глобулярные домены, аффинности взаимодействия либо не детектировались, либо находились в области миллимолярных значений. Такой аффинности недостаточно для формирования стабильного комплекса.

**Механизм формирования комплекса и экстракции Rab белка из мембран.** Как упоминалось выше, GDI функционирует в клетках как транспортер Rab белков между мембранами внутриклеточных компартментов. Транспортная функция GDI тесно связана с его способностью экстрагировать Rab белки из акцепторной мембраны для их доставки к донорной мембране, где последний переходит в активное состояние. Механизм экстракции Rab белка из мембраны мало изучен.

Основываясь на определенных в данной работе константах связывания и рентгено-структурных данных, а также работ других авторов, нами предложено описание механизма взаимодействия Rab белков с GDI, а также модель описывающая этапы GDI-опосредованной экстракции Rab белков из мембраны, основанной на механизме формирования белкового комплекса (Рис.6).

На первом этапе после гидролиза ГТФ Rab белок заякорен посредством липидных групп на акцепторной мембране и находится в ГДФ-связанной форме. Ранее было показано, что некоторые аминокислоты гипервариабельного участка Rab белка образуют связи с фосфолипидами мембран. Таким образом, этот участок Rab белка упорядочен и белок зафиксирован на мембране.

На следующем этапе, при сближении GDI и Rab белков осуществляется первичное узнавание. GDI, посредством Rab-связывающей платформы связывает глобулярную часть Rab белка с образованием низкоаффинного комплекса. Определенные константы связывания такого комплекса приближаются к миллимолярным значениям. На данном этапе экстракция геранилгеранильных групп Rab белка еще невозможна, так как они находятся на расстоянии от липидсвязывающего "кармана" GDI, который на данном этапе еще „не готов“ принять липидные группы Rab белка.



**Рис.6 Модель экстракции Rab белка из мембраны, индуцированной GDI.** При сближении GDI (зеленым) с интегрированным в мембрану (1) за счет геранилгеранильных групп Rab белком происходит формирование низкоаффинного комплекса (2). Контакты образованы

только Rab-связывающей платформой GDI и глобулярной частью Rab белка. На следующем этапе область координации вариабельного окончания взаимодействует с парой алифатических аминокислот Rab (3). Общая аффинность взаимодействия белков при этом составляет 1 5-30 мкМ. Происходит формирование липид-связывающего „кармана“ молекулы GDI, который сближается с геранилгеранилом. Данные условия благоприятны для экстракции геранилгеранильной группы из мембраны. На заключительном этапе формируется комплекс GDI-Rab(GG) с высокой ( $K_d \leq 0.1$  мкМ) аффинностью, который перемещается к донорной мембране для дальнейшей активации Rab белка (4).

Третий этап характеризуется связыванием небольшого участка вариабельной части Rab белка, содержащего пару алифатических аминокислот, с регионом GDI, ответственным за его связывание. Данное взаимодействие обеспечивает сближение малого домена GDI и сайта пренилирования Rab белка. Конформационные изменения в молекуле GDI, вызванные взаимодействием глобулярного домена Rab белка и Rab-связывающей платформы GDI, а также участка, содержащего алифатические аминокислоты и области связывания вариабельной части Rab белка, приводят к открытию липид-связывающего „кармана“. Его формирование соответствует готовности GDI принять геранилгеранильные группы экстрагированного Rab белка.

При анализе полипептидных последовательностей Rab белков обнаружено, что длины участков цепи между глобулярной частью Rab белка до фрагмента, содержащего гидрофобные аминокислоты, различаются от одного Rab-белка к другому. В то время как длины участков от фрагмента, содержащего алифатические аминокислоты до сайта пренилирования приблизительно одинаковы у всех Rab белков. Кроме того, длина этого участка соотносится с расстоянием между липид-связывающим „карманом“ и регионом молекулы GDI, координирующим вариабельную часть Rab белка.

Определенная в данной работе аффинность этого взаимодействия на порядок выше ( $K_d \sim 1.5-30$  мкМ) по сравнению с аффинностью взаимодействия Rab-связывающей платформы с глобулярным доменом Rab белка. На этом этапе формируются условия благоприятные для экстракции липидных групп из мембраны.

На последнем этапе происходит перенос липидной группы из мембраны к липидсвязывающему “карману” и формируется комплекс GDI-Rab(GG) с высокой аффинностью ( $K_d \leq 0.1$  мкМ), который переносится к донорной мембране, где Rab белок вовлекается в новый цикл регуляции.

### Выводы

1. Получены и очищены до гомогенного состояния белковые комплексы между GDI и непренилированным и пренилированным белком Rab/Ypt (GDI-Rab/Ypt31 и GDI-Rab/Ypt 31(GG)).
2. Методом рентгеноструктурного анализа определены пространственные структуры белковых комплексов GDI и Ypt31, полученных как в присутствии, так и в отсутствие геранилгеранильных групп. Выполнено детальное сравнение полученных структур со структурами гомологичных белков и комплексов, полученных ранее. Сравнение структур непренилированных и пренилированных комплексов GDI-Rab/Ypt31 и GDI-Rab/Ypt 31(GG) позволило сделать вывод о том, что присутствие геранилгеранильных групп, безусловно, необходимо для формирования комплекса, но не является критичным.
3. Впервые методом микрокалориметрического титрования выполнены прямые измерения констант взаимодействия GDI с 1) некоторыми

непренилированными Rab, 2) фарнезилированным Rab и 3) их производными, содержащими замены пары алифатических аминокислот в переменной части Rab белка. Замена или делеция алифатических аминокислот приводят к значительному снижению аффинности взаимодействия. Отсутствие геранилгеранильной группы также снижает аффинность взаимодействия.

4. Предложена модель, описывающая механизм формирования комплекса и экстракции Rab белков из мембран посредством GDI, основанная на вкладе каждого из вовлеченных во взаимодействие участков молекул.

#### **Список опубликованных работ по теме диссертации**

1. Alexander Ignatev, Konstantin Piatkov, Olena Pylypenko and Alexey Rak (2007) A size filtration approach to purify low affinity complexes for crystallization *J Struct Biol.*, 159 (1).154-7.
2. Sergey Kravchenko, Alexander Ignatev, Alexey Rak, Roger S. Goody and Olena Pylypenko. Structural model of the GDI Rab membrane extraction mechanism. *J Biol. Chem* (In Press)
3. Использование энзиматического фарнезилирования для получения пренилированного Rab белка в растворимой форме. *Биотехнология*, (В печати)
4. Игнатьев А В , Рак А.В. Структурно-функциональные исследования взаимодействия RabГТФаз с GDI Биология-наука XXI века, Пущино, ОНТИ ПНЦ РАН, 2007,стр.86
5. Ignatev A , Rak A Purification and crystallization of complexes GDI-Ypt31(GG) and GDI-Ypt31. In book of the abstracts of Annual Meeting of German Crystallization Society, Cologne, Germany, 2006, p.127

***Отпечатано: Типография  
г. Серпухов, Борисовское шоссе, 18  
Подписано в печать: 21.03.2008 г. Тираж 80 экз.***