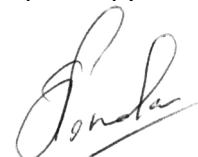


Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

на правах рукописи



Попова Надежда Викторовна

**Взаимодействие клатрина с внутриклеточным
адаптером TRIP8b**

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва 2012

Работа выполнена в лаборатории клеточной биологии рецепторов Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН)

Научный руководитель

доктор химических наук,
руководитель лаборатории
клеточной биологии рецепторов ИБХ РАН
Петренко Александр Георгиевич

кандидат физ.-мат. наук,
старший научный сотрудник лаборатории
клеточной биологии рецепторов ИБХ РАН
Деев Игорь Евгеньевич

Официальные оппоненты

доктор биологических наук, профессор,
руководитель лаборатории клеточных
взаимодействий ИБХ РАН
Сапожников Александр Михайлович

доктор биологических наук,
руководитель лаборатории молекулярной
онкогенетики ИБГ РАН
Коробко Игорь Викторович

Ведущая организация: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Защита состоится «14» марта 2012 года в 10 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.019.01 при Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу: г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан «___» февраля 2012 г.

Учёный секретарь Диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Эндоцитоз является фундаментальным процессом, обеспечивающим поступление в цитоплазму внеклеточных или расположенных на мембране макромолекул. Эндоцитоз необходим для поступления в клетку питательных веществ, регуляции активности трансмембранных рецепторов, а также рециркуляции синаптических пузырьков. Основным механизмом, по которому происходит интернализация липидов, белков и макромолекул, является клатрин-опосредованный эндоцитоз.

При передаче сигнала для обеспечения цикличности процесса требуется баланс двух явлений – экзоцитоза и эндоцитоза. Экзоцитоз необходим для выброса нейромедиатора в синаптическую щель. В свою очередь, эндоцитоз требуется как для поддержания постоянства поверхности пресинаптической мембраны и повторного заполнения синаптических пузырьков нейромедиатором, так и для повторной активации рецепторов постсинаптической мембраны. Эндоцитоз синаптических пузырьков после сильной стимуляции нейромышечного синапса происходит по клатрин-зависимому механизму.

При эндоцитозе активированных рецепторов по клатрин-зависимому механизму с рецептором взаимодействуют различные белки-адаптеры, в частности адаптерный комплекс AP-2, которые опосредуют связывание мембранных белков с молекулами клатрина, образующими оболочку пузырька. На настоящий момент известны многие адаптерные белки, принадлежащие к разным классам.

Хотя механизм эндоцитоза в общих чертах известен, постоянно появляются новые данные о регуляции этого процесса, и поиск и изучение новых адаптерных белков, которые могут обеспечивать направленность процесса, является актуальной на сегодняшний день задачей.

Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы являлся поиск и идентификация белков, взаимодействующих с адаптерным белком TRIP8b, а также дальнейшая характеристика этого взаимодействия. Первоначальный поиск показал, что мажорным белком, связывающимся с TRIP8b, является клатрин, поэтому были сформулированы следующие задачи:

1. Найти в молекуле TRIP8b структурные детерминаты, отвечающие за связывание с клатрином;
2. Получить очищенные препараты клатрина и TRIP8b, чтобы подтвердить их прямое взаимодействие;
3. Подтвердить совместную локализацию TRIP8b и клатрина с использованием живых клеток.

Научная новизна и практическая ценность работы

Были найдены и идентифицированы 16 белков и белковых комплексов, взаимодействующих с TRIP8b, и показано, что клатрин и субъединицы адаптерного комплекса AP-2 являются мажорными белками в элюатах с TRIP8b-Сефарозы. Проведены эксперименты, подтверждающие, что белок TRIP8b напрямую взаимодействует с клатрином. Так, компьютерным анализом аминокислотной последовательности TRIP8b было выявлено два потенциальных сайта связывания с тяжелой цепью клатрина, а эксперименты по связыванию очищенного клатрина и мутантов TRIP8b, в которых аминокислотные остатки этих сайтов были заменены остатками аланина, подтвердили, что такая замена приводит к нарушению связывания. Также была выделена фракция клатрин-покрытых пузырьков и обнаружено, что TRIP8b присутствует в этой фракции. Полученные данные указывают на независимое взаимодействие TRIP8b с клатрином и мембранными белками, так как это взаимодействие обеспечивается разными частями молекулы белка. Таким образом, способность TRIP8b взаимодействовать как с клатрином, так и с мембранными белками позволяет предполагать, что TRIP8b может осуществлять регуляцию поверхностной экспрессии этих белков за счет модуляции клатрин-опосредованного эндоцитоза.

Полученные в рамках настоящей работы результаты способствуют расширению представлений об участвующих в клатрин-опосредованном эндоцитозе белках-адаптерах, и результаты данной работы могут быть использованы при дальнейшем исследовании механизмов эндоцитоза.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах.

Апробация работы

Результаты настоящего исследования были представлены на следующих российских и международных конференциях: на 12-й и 13-й международной Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2008 и 2009); на XXI зимней молодежной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2009); на XVI международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «ЛОМОНОСОВ» (Москва, 2009); на Международной научной конференции, посвящённой 75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2009); на IV и V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Казань, 2009; Петрозаводск, 2011); на XVIII международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Украина, Гурзуф, 2010); на 40-й ежегодной конференции Общества по нейронаукам (США, Сан-Диего, 2010).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на ____ страницах; содержит ____ рисунков и 1 таблицу; состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и библиографического списка, включающего ____ наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Связывание TRIP8b с С-концевой частью рецептора C1RL

Ранее в нашей лаборатории был проведён поиск внутриклеточных молекулярных партнеров рецептора C1RL с помощью дрожжевой SR-системы (SOS recruitment system). Скрининг позволил выявить 17 предположительно позитивных клонов. Секвенирование их ДНК показало, что 7 из них кодируют С-концевые фрагменты белка TRIP8b (AAK38580).

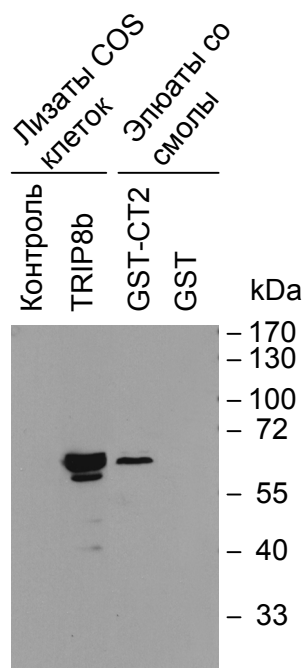


Рисунок 1. Проверка взаимодействия TRIP8b и C1RL-1. Глутатион-Сефарозу, на которой были сорбированы цитоплазматическая часть C1RL-1 (202 aa), слитого с GST (GST-CT2), или GST (контроль) инкубировали с лизатом клеток COS, экспрессирующих TRIP8b. Связавшиеся белки элюировали буфером с глутатионом. Равные части элюатов разделяли в ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану, которую инкубировали с антителами к TRIP8b.

Для подтверждения взаимодействия C1RL и TRIP8b использовали преципитацию их фрагментов, полученных искусственной экспрессией. В клетках *E. coli* экспрессировали С-концевую часть C1RL-1 (1269-1471 aa), соединенную с глутатион-S-трансферазой (GST-CT2), и GST. Затем лизат клеток наносили на глутатион-Сефарозу и промывали фосфатно-солевым буфером. Аликвоту смолы, на которой были сорбированы цитоплазматическая часть C1RL-1, слитого с GST (GST-CT2), или GST (контроль) инкубировали с лизатом клеток COS, содержащим TRIP8b. Связавшиеся белки элюировали буфером с глутатионом. Равные части элюатов разделяли электрофорезом в SDS-ПААГ, затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, и TRIP8b детектировали специфичными антителами. На представленном **рис. 1** видно, что TRIP8b отсутствует в элюате с контрольной смолы, но окрашивается в элюате со смолы, на которой сорбирован С-концевой фрагмент C1RL-1.

Поиск и идентификация белков, взаимодействующих с TRIP8b

TRIP8b (TPR-containing Rab8b interacting protein) был впервые найден и идентифицирован как белок, взаимодействующий с малой ГТФазой Rab8b. Также было показано, что TRIP8b взаимодействует с мембранным белком HCN (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-regulated channel). В то же время, физиологическое значение и детальные механизмы функционирования белка TRIP8b остаются неясными.

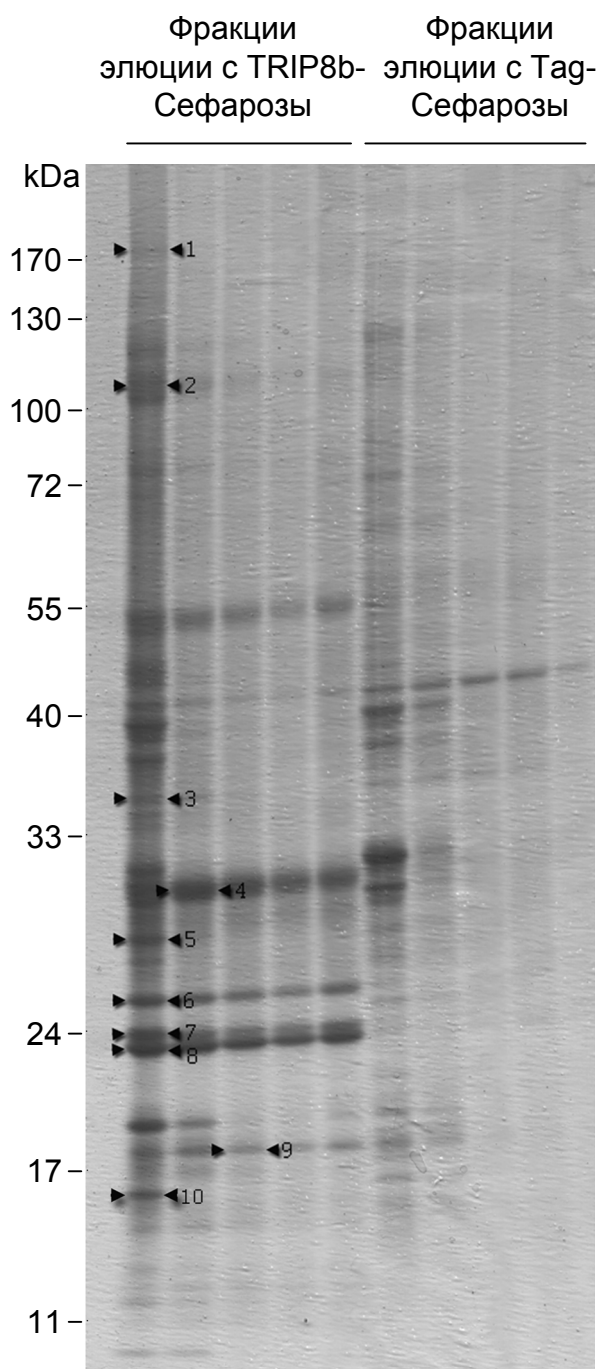


Рисунок 2. Результат хроматографии белков солюбилизата мембран мозга крысы на TRIP8b-Сефарозе.

Белки солюбилизата мембран мозга крысы наносили на TRIP8b- или Tag-Сефарозу, смолу промывали стартовым буфером, связавшиеся белки элюировали высокосолевым буфером, разделяли в градиентном ПААГ (8-20%) и детектировали окраской Кумасси R-250. Стрелками отмечены: (1) Caspr, (2) $\alpha 2$ субъединица AP-2 комплекса, (3) Ndufa9, (4) цитохром c1, (5) белок, подобный белку NipSnap2, (6) В-цепь АТФ-синтазы, (7) D-цепь АТФ-синтазы, (8) О субъединица АТФ-синтазы, (9) белок, подобный белку, ассоциированному с рецептором γ -аминомасляной кислоты.

Для получения дополнительной информации о TRIP8b мы провели поиск взаимодействующих с ним белков методом аффинной хроматографии на смоле с ковалентно пришитым TRIP8b, содержащим на N-конце Trx-таг,

His-таг и S-таг. В качестве контрольной смолы (Tag-Сефароза) использовали сорбент с пришитыми Trx-, His- и S-тагами. На смолу наносили фракцию растворимых белков мозга крысы или детергентный экстракт грубой фракции мембран, которая помимо цитоплазматических мембран содержала также ядра и митохондрии. Смолу промывали стартовым буфером, связавшиеся белки элюировали высокосолевым буфером и подвергали электрофоретическому разделению в ПААГ с SDS (рис. 2, 3).

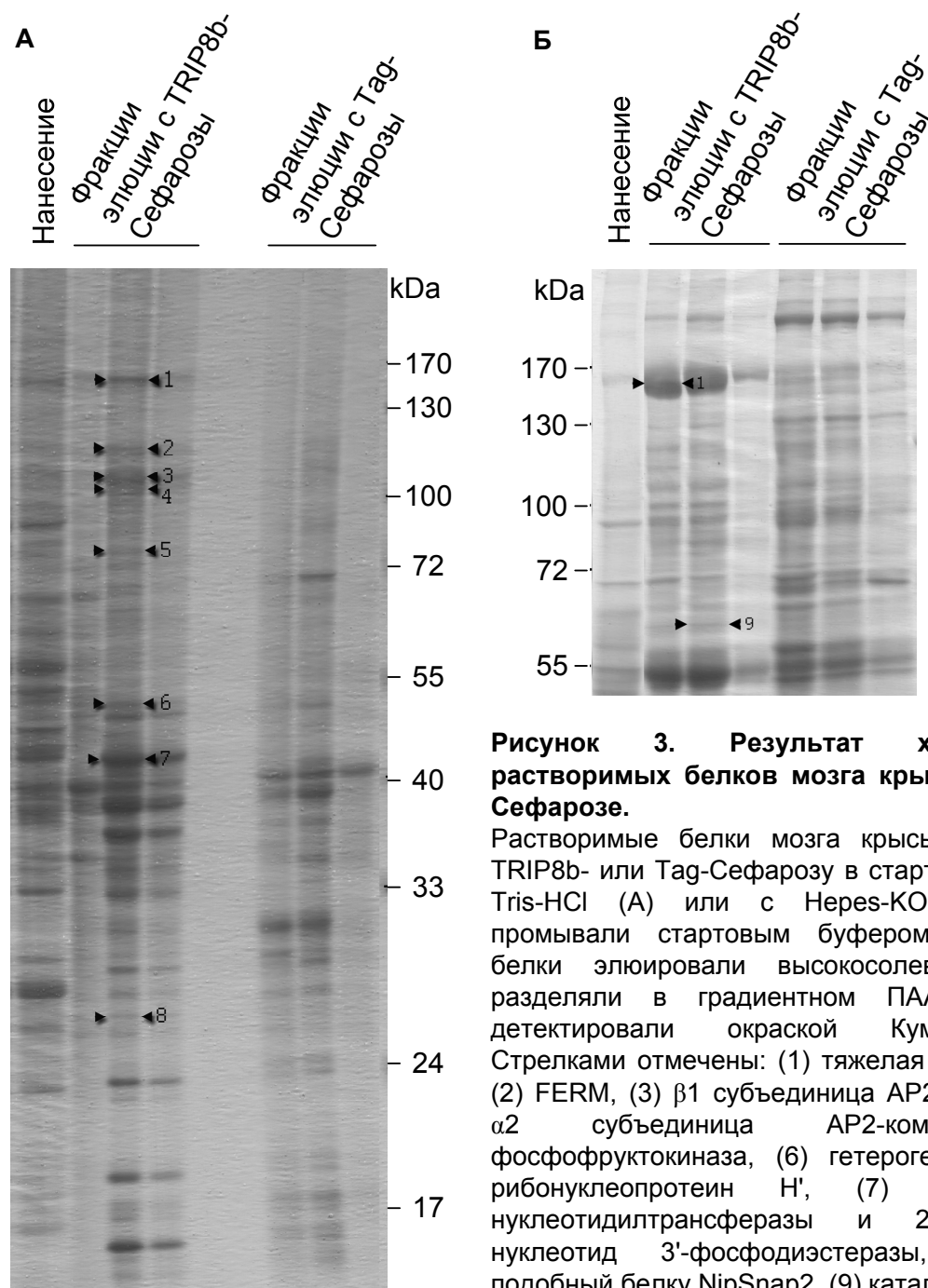


Рисунок 3. Результат хроматографии растворимых белков мозга крысы на TRIP8b-Сефарозе.

Растворимые белки мозга крысы наносили на TRIP8b- или Tag-Сефарозу в стартовом буфере с Tris-HCl (А) или с Hepes-KOH (Б), смолу промывали стартовым буфером, связавшиеся белки элюировали высокосолевым буфером, разделяли в градиентном ПААГ (8-20%) и детектировали окраской Кумасси R-250. Стрелками отмечены: (1) тяжелая цепь клатрина, (2) FERM, (3) β 1 субъединица AP2-комплекса, (4) α 2 субъединица AP2-комплекса, (5) фосфофруктокиназа, (6) гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H', (7) смесь тРНК-нуклеотидилтрансферазы и 2',3'-циклический нуклеотид 3'-фосфодиэстеразы, (8) белок, подобный белку NipSnap2, (9) каталаза.

Из геля вырезали кусочки белковых полос, присутствующих только во фракциях элюции с TRIP8b-Сефарозы, но не с контрольной смолы, и

данные образцы использовали для проведения масс-спектрометрического анализа. Список белков, которые были достоверно идентифицированы масс-спектрометрией, приведен в **табл. 1**, также эти белки указаны стрелками на **рис. 2, 3**. Нужно отметить, что в присутствии буфера, содержащего Tris, эффективность связывания клатрина с TRIP8b-Сефарозой значительно снижается (**рис. 3А и 3Б**), возможно, это объясняется тем, что Tris-буфер вызывает деполимеризацию клатрина, образующего клатриновые пузырьки. Таким образом, мы идентифицировали 16 белков и белковых комплексов, специфично сорбирующихся на TRIP8b-Сефарозе.

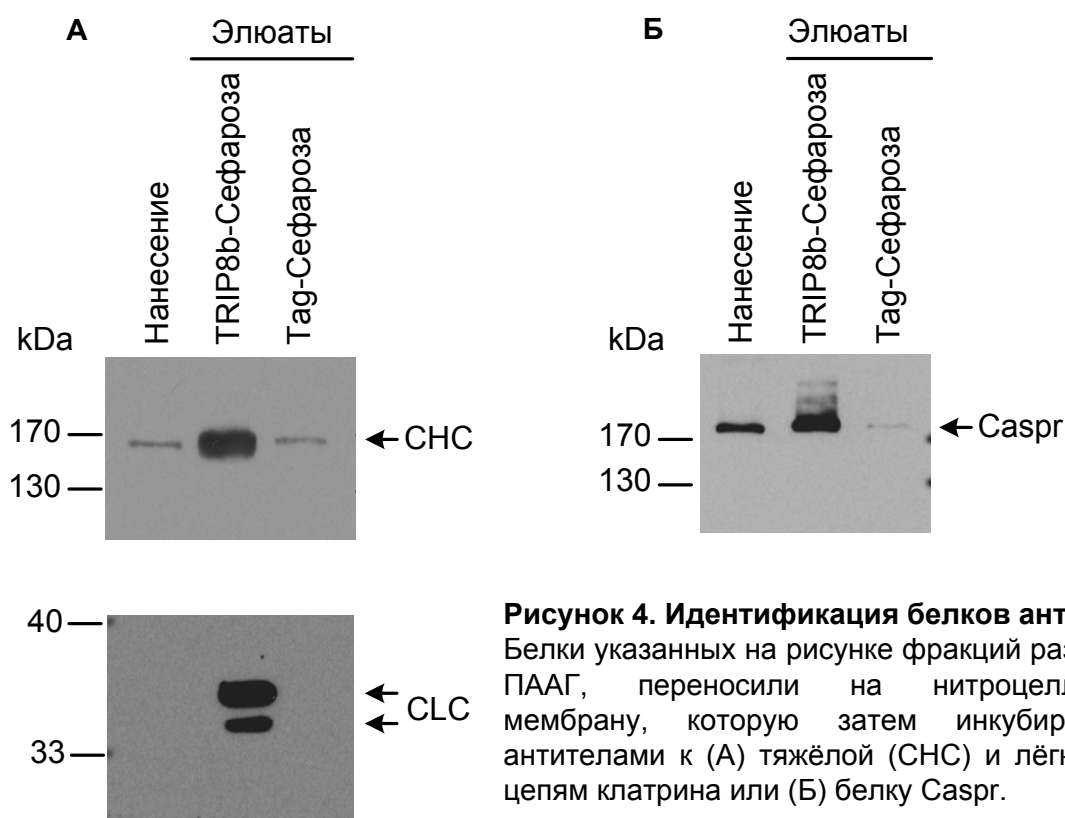
Табл. 1. Результаты масс-спектрометрического анализа белков, выделенных на TRIP8b-Сефарозе.

Название белка	Номер последовательности в PubMed	Масса, kDa	Score*
Белки клатриновых пузырьков			
Тяжелая цепь клатрина	P11442	193	380
α 2 субъединица AP2-комплекса	P18484	104	366
β 1 субъединица AP2-комплекса	NP_542150	105	268
Белки дыхательной цепи митохондрий			
митохондриальная АТФ-синтаза EC 3.6.3.14			
цепь В	P19511	29	109
цепь D	P31399	19	98
субъединица O	Q06647	23	186
Ndufa9 (субкомплекс NADH дегидрогеназы 1 альфа), EC 1.6.5.3	AAH91192	42	223
Цитохром c1	Q9D0M3	35	99
Пероксисомальные белки			
Каталаза, EC 1.11.1.6	P04762	60	194
Метаболические ферменты			
Фосфофруктокиназа, EC 2.7.1.11	Q52KS1	86	164
Мембранные белки			
Caspr1, белок, ассоциированный с контактином	P97846	157	354
Сигнальные белки			
Фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназа типа 1 γ , EC 2.7.1.68	Q3MID5	73	112
FERM – белок, содержащий плекстриновые и RhoGEF домены	Q91VS8	121	70
Другие белки			
Белок, подобный белку NipSnap2 мыши	Q5RK08	33	145
Белок, подобный белку, взаимодействующему с рецептором γ -аминомасляной кислоты	Q8R3R8	14	77
Активированной РНК полимеразы II транскрипционный коактиватор p15	Q63396	14	87

тРНК нуклеотидилтрансфераза, добавляющая последовательность ССА	Q4VBH2	50	237
hnRNP H' - Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H'	Q6AY09	49	72
2',3'-циклический нуклеотид-3'-фосфодиэстераза, ЕС 3.1.4.37	P13233	46	155

**Score – параметр, характеризующий достоверность результатов идентификации конкретного белка. В общем случае, при значении Score > 60-70, результат идентификации можно считать достоверным.*

Можно видеть, что на аффинной смоле сорбируются как белки цитоплазматической мембраны (Caspr) и митохондрий (субъединицы АТФ-синтазы, цитохром с1, NADH-дегидрогеназа), так и белки клатриновых пузырьков (клатрин, AP-2 комплекс), пероксисом (каталаза), белки цитоплазмы (например, фосфофруктокиназа, фосфатидилинозитол-4-фосфат-5-киназа), ядерные белки (транскрипционный коактиватор p15 активированной РНК-полимеразы II), белки, участвующие в процессинге тРНК (тРНК нуклеотидилтрансфераза) и некоторые другие белки. Весьма вероятно, что часть белков взаимодействует с TRIP8b опосредовано; также нельзя исключать возможность неспецифичной сорбции белков.



Так как было обнаружено взаимодействие TRIP8b с мембранными белками, а также получены данные об участии TRIP8b в регуляции поверхностной экспрессии HCN, наибольший интерес среди

идентифицированных белков представляли другие мембранные белки (Caspr), а также белки, опосредующие эндоцитоз (клатрин, AP-2).

Для подтверждения результатов масс-спектрометрического анализа, а также специфичности взаимодействия обнаруженных белков с TRIP8b, белки фракций элюции после электрофоретического разделения в ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану, которую инкубировали с антителами к легким и тяжёлой цепям клатрина или к белку Caspr (**рис. 4**). На представленном иммуноблоте видно, что антителами детектируются клатрин и Caspr, которые присутствуют только во фракциях элюции с TRIP8b-Сефарозы, но не с Tag-Сефарозы.

Определение в молекуле TRIP8b участка, отвечающего за связывание с клатрином

Для подтверждения специфичности взаимодействия TRIP8b с клатрином, а также для определения в молекуле участков, отвечающих за это взаимодействие, были сделаны несколько мутантов белка TRIP8b, содержащие GST в N-концевой части молекулы (**рис. 5**).

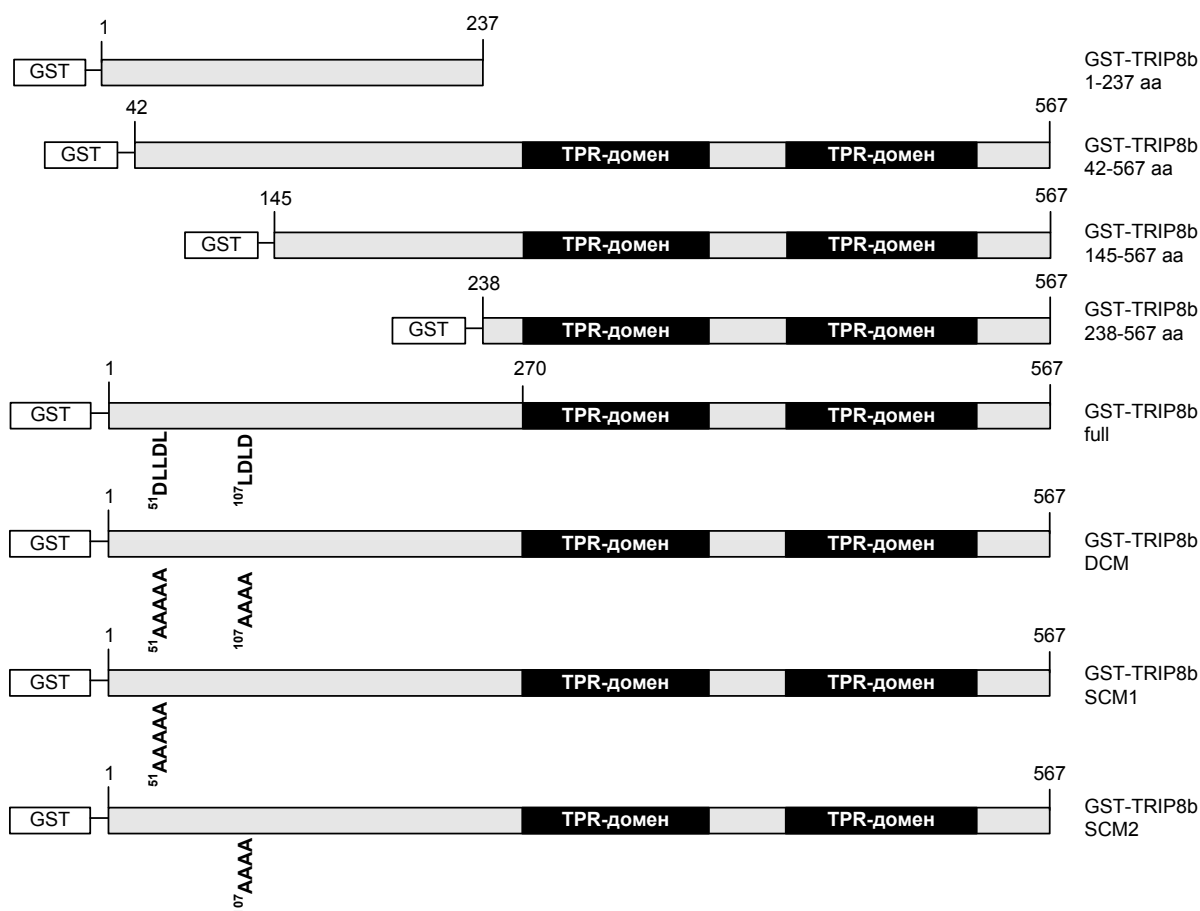


Рисунок 5. Схематическое изображение полученных мутантов белка TRIP8b.

Белки, полученные экспрессией в клетках *E. coli*, иммобилизовали на глутатион-Сефарозе. Аликвоты смолы инкубировали с фракцией растворимых белков мозга крысы, связавшиеся со смолой белки элюировали, разделяли в ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану для проведения Вестерн-блота. Видно, что полноразмерный TRIP8b, а также конструкции 1-237 и 42-567 связывают клатрин из фракции растворимых белков мозга, тогда как с конструкциями 145-567 и 238-567 он не взаимодействует (рис. 6А). Можно предположить, что сайт связывания с клатрином в молекуле TRIP8b находится между 42-м и 145-м

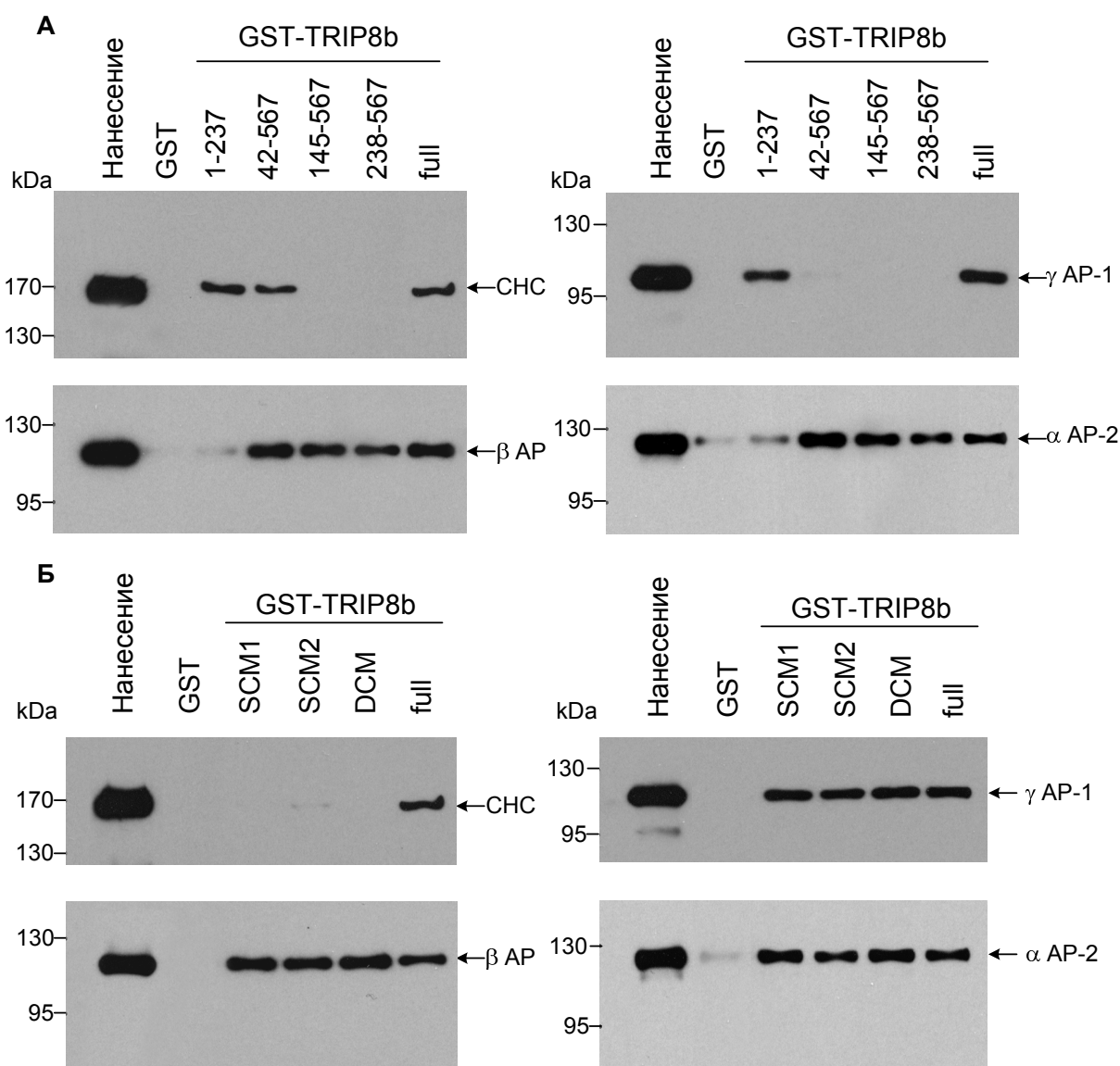


Рисунок 6. Определение в молекуле TRIP8b сайтов связывания с клатрином.

Растворимые белки мозга инкубировали с равным количеством GST, укороченных конструкций GST-TRIP8b (А) или многоточечных мутантов GST-TRIP8b (Б), сорбированных на глутатион-Сефарозе. Связавшиеся со смолой белки анализировали Вестерн-блотом с антителами к тяжёлой цепи клатрина (CHC), β-адаптину, γ-субъединице AP-1 или α-субъединице AP-2.

аминокислотным остатком. В отличие от тяжёлой цепи клатрина, субъединицы AP-комплексов присутствуют во всех элюатах, содержащих GST-TRIP8b белки, но отсутствуют в контроле с использованием GST.

Анализ аминокислотной последовательности TRIP8b выявил два потенциальных сайта связывания с тяжёлой цепью клатрина ⁵¹DLLDL и ¹⁰⁷LDLD, которые находятся в N-концевой части молекулы. Мы заменили эти аминокислотные остатки остатками аланина (**рис. 5**). Аналогичные эксперименты по связыванию клатрина из фракции растворимых белков мозга с полученными мутантами подтвердили, что такая замена приводит к нарушению связывания TRIP8b с клатрином (**рис. 6Б**). Следует отметить, что мутации этих сайтов не вызывают заметного нарушения связывания с TRIP8b субъединиц адаптерных комплексов.

Влияние мутаций сайтов связывания с клатрином в молекуле TRIP8b на поверхностную экспрессию HCN1-канала

Ранее было показано, что при совместной экспрессии в клетках эукариот TRIP8b вызывает перемещение HCN1 канала с клеточной мембраны в крупные внутриклеточные структуры, предположительно, за счёт эндоцитоза (**рис. 7Б**). С помощью антител к тяжёлой цепи клатрина мы показали, что клатрин также содержится в этих структурах (**рис. 7В**). Чтобы исследовать влияние мутаций сайтов связывания с клатрином в молекуле TRIP8b на поверхностную экспрессию HCN1 был использован белок TRIP8b, в котором аминокислоты двух найденных сайтов связывания с клатрином были заменены остатками аланина – TRIP8b DCM. Клетки HEK293 трансфецировали плазмидами, кодирующими GFP-HCN1 и TRIP8b дикого типа (WT) или TRIP8b DCM. Оказалось, что мутации сайтов связывания с клатрином в молекуле TRIP8b не блокируют эндоцитоз HCN1 (**рис. 7Г**), но приводят к исчезновению в этих структурах клатрина (**рис. 7Д**).

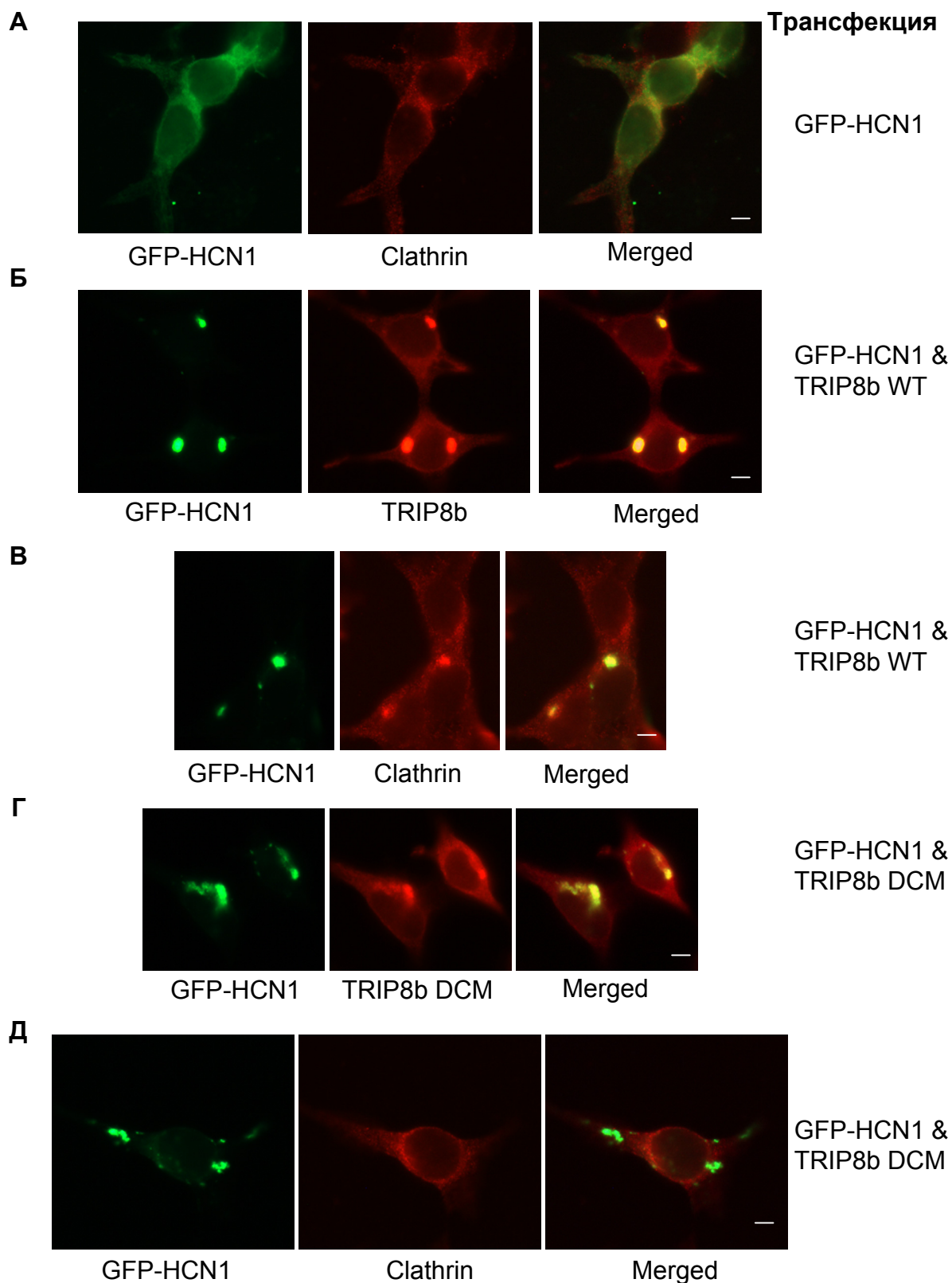


Рисунок 7. Анализ взаимодействия TRIP8b с клатрином в трансфицированных клетках HEK293.

Клетки трансфицировали плазмидами, кодирующими GFP-HCN1 (А), GFP-HCN1 и TRIP8b (Б,В), GFP-HCN1 и TRIP8b DCM (Г,Д). Клетки после фиксации окрашивали антителами к TRIP8b (Б,Г) или клатрину (А,В,Д).

Чтобы установить в каких именно структурах локализуется GFP-HCN1, мы использовали внутриклеточные маркеры ранних эндосом (EEA1) и лизосом (LysoTracker Dye). Окрашивание антителами к EEA1 выявило только частичную ко-локализацию канала с маркером ранних эндосом (рис. 8А, Б), тогда как окрашивание лизосом показало значительную ко-локализацию с HCN1-каналом (рис. 8В, Г).

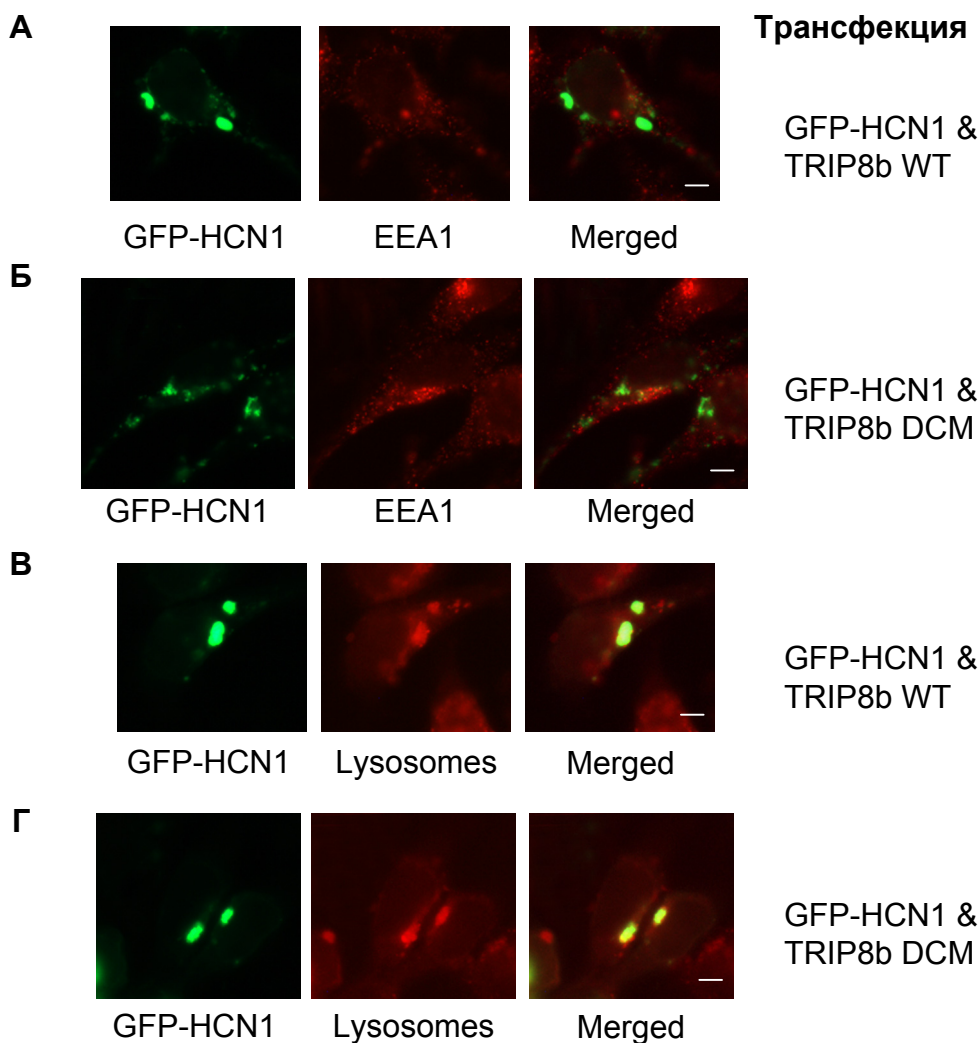


Рисунок 8. Анализ локализации GFP-HCN1 в трансфицированных клетках HEK293.

Клетки трансфицировали плазмидами, кодирующими GFP-HCN1 и TRIP8b (А,В) или GFP-HCN1 и TRIP8b DCM (Б,Д). Внутриклеточные структуры окрашивали антителами к маркеру ранних эндосом EEA1 (А,Б) или краской для детекции лизосом LysoTracker Red (В,Г).

Полученные данные указывают на независимое взаимодействие TRIP8b с клатрином и HCN1, так как это взаимодействие обеспечивается разными частями молекулы белка: с каналом TRIP8b взаимодействует TPR-содержащей С-концевой частью, а с клатрином – с помощью двух сайтов, расположенных в N-конце молекулы.

Совместная локализация TRIP8b с клатрином во внутриклеточных структурах

Методом дифференциального центрифугирования были выделены клатрин-покрытые пузырьки (clathrin-coated vesicles, CCV) (рис. 9А). Белки

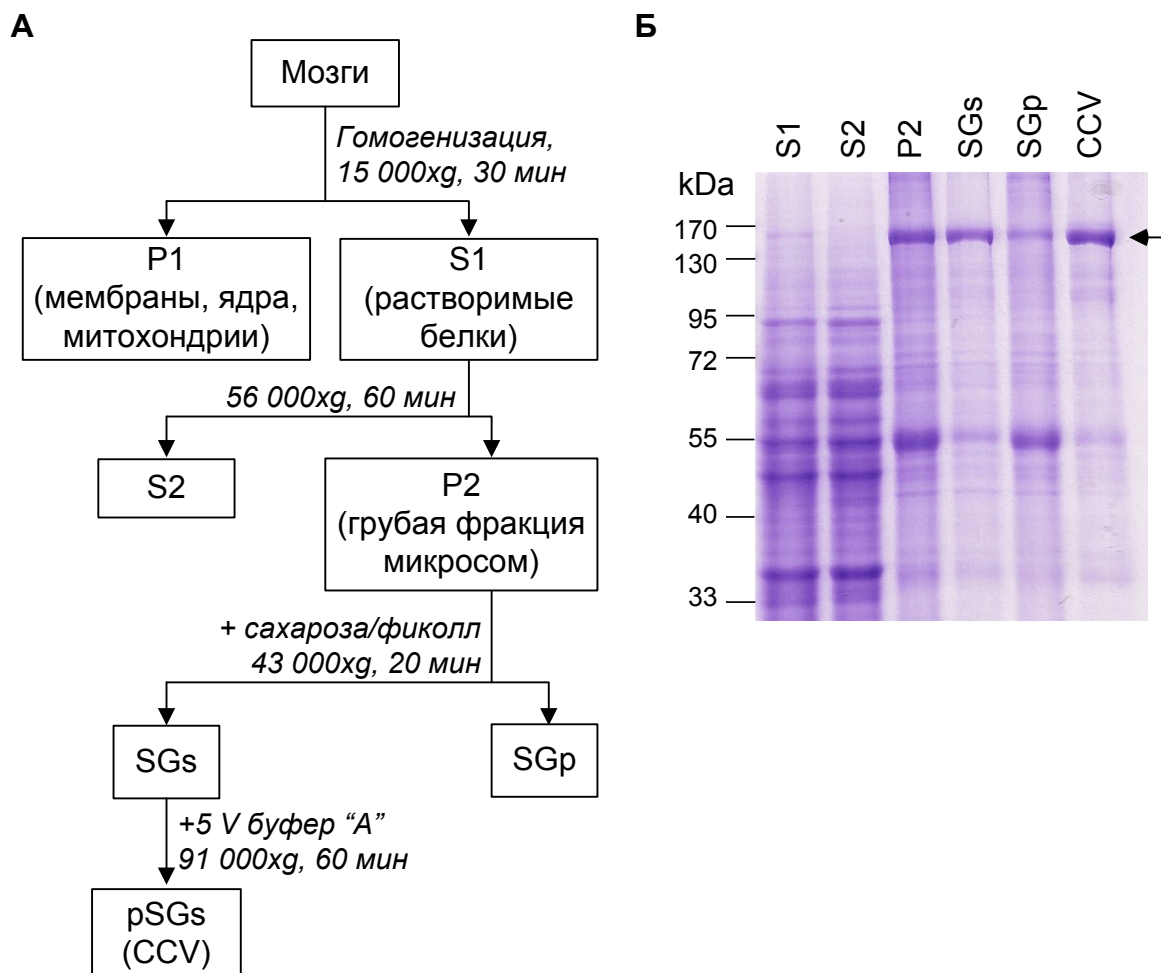


Рисунок 9. Выделение клатрин-покрытых пузырьков (CCV).

(А) Схема выделения CCV. S1 и P1 – супернатант и осадок после низкоскоростного центрифугирования; SGs и SGp – супернатант и осадок после центрифугирования в градиенте концентрации фикола/сахарозы. (Б) Аликвоты, равные по количеству белка, разделяли SDS-гель ЭФ в ПААГ и окрашивали Кумасси R-250. Стрелкой указана тяжёлая цепь клатрина.

фракций разной степени очистки разделяли в ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану, после чего TRIP8b, белки клатриновой оболочки и синаптических пузырьков детектировали соответствующими антителами. Значительная часть TRIP8b окрашивается в микросомальной фракции SGp, которая также содержит синаптотагмин и синаптофизин. Фракции SGs и CCV – фракции, обогащённые клатрином – это препараты сравнительно чистых клатрин-покрытых пузырьков (рис. 9Б), в которых TRIP8b также детектируется антителами (рис. 10).

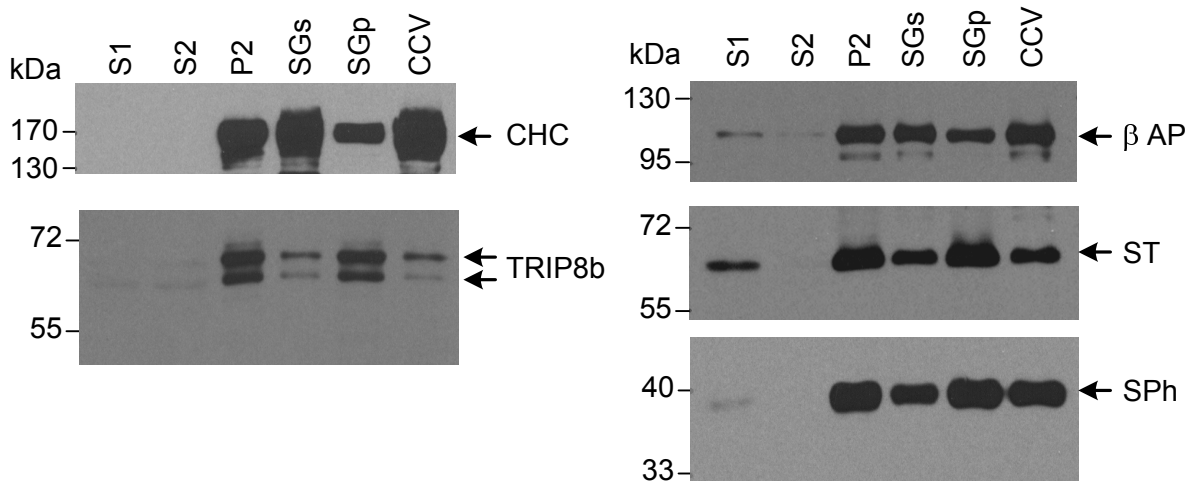


Рисунок 10. Выделение клатрин-покрытых пузырьков (CCV).

Аликвоты, равные по количеству белка, разделяли SDS-гель ЭФ в ПААГ. Белки затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали антителами к тяжёлой цепи клатрина (CHC), TRIP8b, β -адаптину, синаптотагмину (ST) или синаптофизину (SPh).

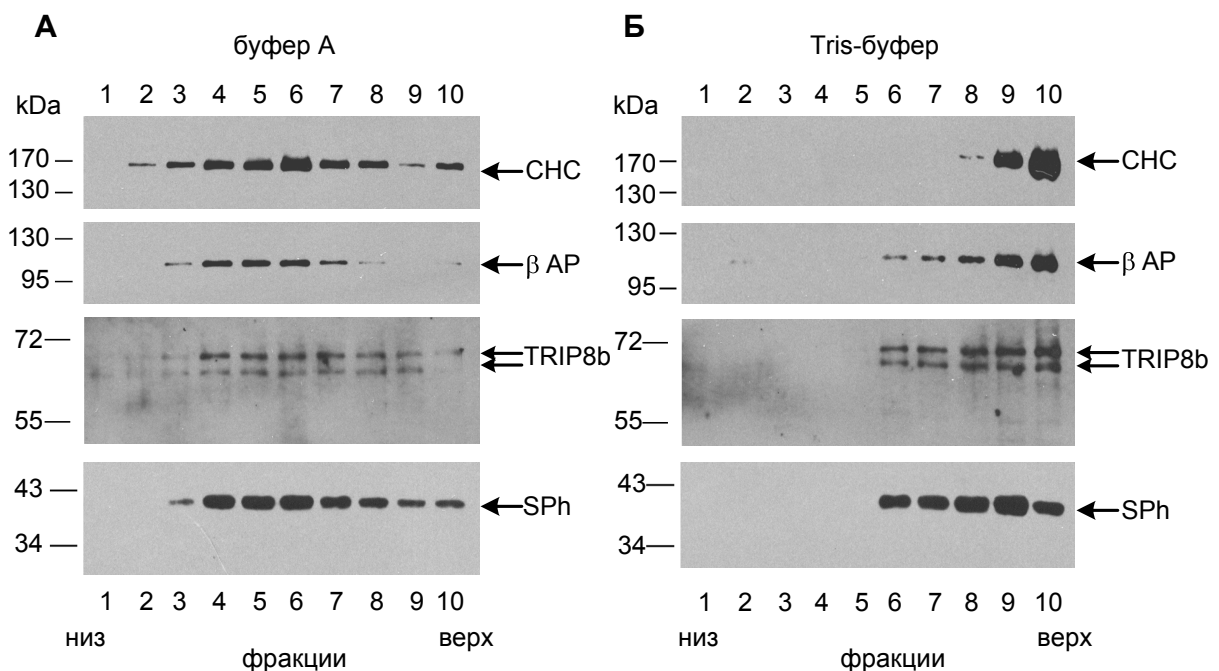


Рисунок 11. Ассоциация TRIP8b с CCV.

CCV инкубировали в буфере А или Tris-содержащем буфере, а затем разделяли в 20-50% градиенте концентрации сахарозы, приготовленной на буфере А или Tris-буфере, соответственно. Фракции собирали со дна пробирки, белки наносили на SDS-ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и анализировали Вестерн-блоттингом с антителами к тяжёлой цепи клатрина (CHC), TRIP8b, β -адаптину и синаптофизину (SPh).

Известно, что белки оболочки клатрин-покрытых пузырьков могут быть удалены с них обработкой щелочным Tris-содержащим буфером. Молекула TRIP8b не содержит гидрофобных участков, и сам белок содержится во фракции растворимых белков, то есть, связывание TRIP8b с мембраной пузырьков может быть опосредовано белок-белковыми взаимодействиями. Клатрин-покрытые пузырьки инкубировали в буфере А

с pH 6.5 (буфер, используемый при очистке CCV) или в Tris-буфере с pH 7.8, а затем разделяли в градиенте концентрации сахарозы. При седиментации CCV в «нативных» условиях (буфер А) пик клатрина и субъединиц адаптерного комплекса находится в 5-7 фракциях градиента (**рис. 11А**). Окрашивание антителами к синаптофизину выявило присутствие в этих фракциях также синаптических пузырьков. Распределение TRIP8b в сахарозном градиенте похоже на распределение синаптофизина, что указывает на возможность связывания TRIP8b как с CCV, так и с синаптическими везикулами. В условиях Tris-содержащего буфера клатрин находится в верхней части градиента (максимум во фракции 10, **рис. 11Б**). TRIP8b также перемещается в верхнюю область градиента, но значительная его часть мигрирует вместе с синаптофизинем. Полученный результат позволяет предположить, что TRIP8b может быть ассоциирован как с клатрином, так и с интегральными белками везикул.

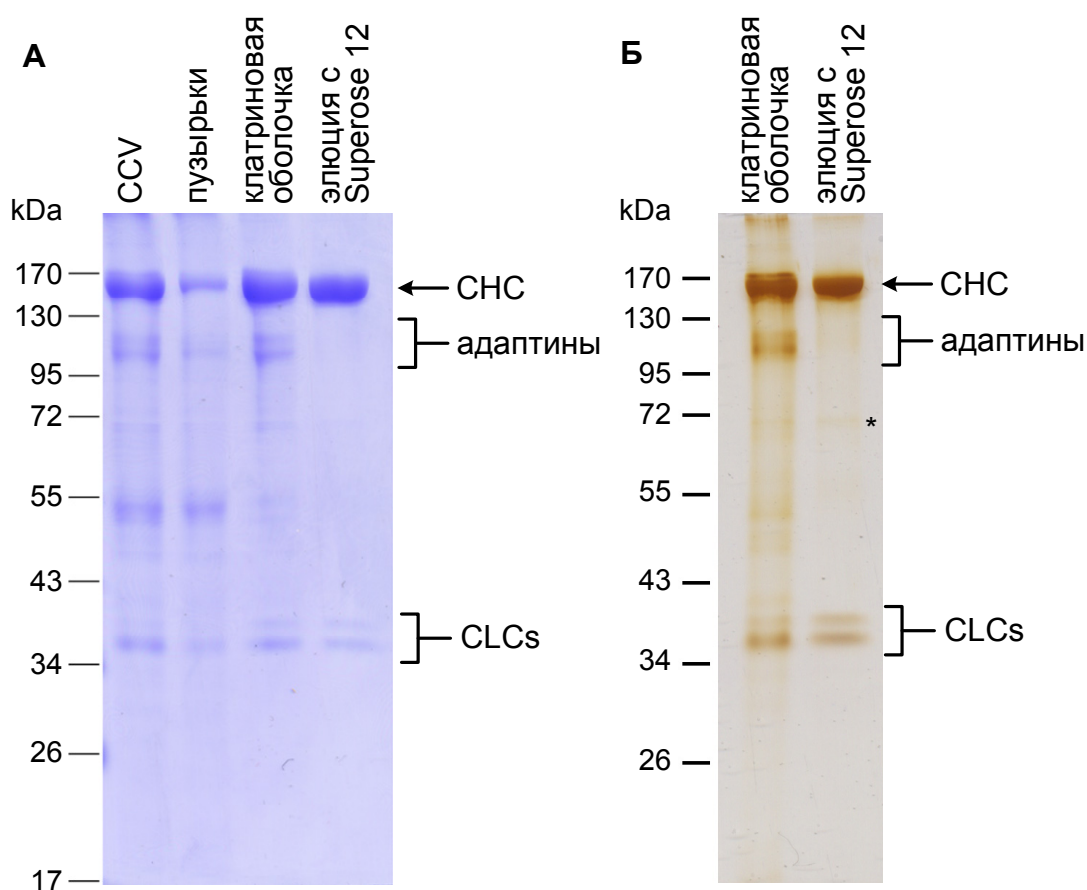


Рисунок 12. Очистка клатрина из клатрин-покрытых пузырьков.

Клатрин-покрытые пузырьки (CCV) инкубировали в буфере для диссоциации клатриновой оболочки, а затем центрифугировали для отделения от мембран пузырьков («пузырьки»). Супернатант («клатриновая оболочка») использовали для очистки клатрина на Superose 12. Аликвоты, равные по количеству белка, разделяли SDS-гель ЭФ в ПААГ и окрашивали Кумасси R-250 (А) или серебром (Б). Звездочкой отмечен Hsc70.

TRIP8b напрямую взаимодействует с очищенным клатрином

Чтобы подтвердить, что взаимодействие TRIP8b с клатрином не опосредовано другими белками, в частности, субъединицами адаптерных комплексов, методом гель-фильтрации на Superose 12 клатрин был отделен от других белков оболочки CCV. Чистоту полученного препарата клатрина определяли окрашиванием геля Кумасси R-250 или серебром после проведения ЭФ (рис. 12 А,Б), а также Вестерн-блот анализом с антителами к адаптерным белкам (рис. 13). Видно, что адаптерные белки отсутствуют в препарате очищенного клатрина, но окрашивание серебром показало наличие дополнительной белковой полосы массой примерно 70 кДа (рис. 12Б).

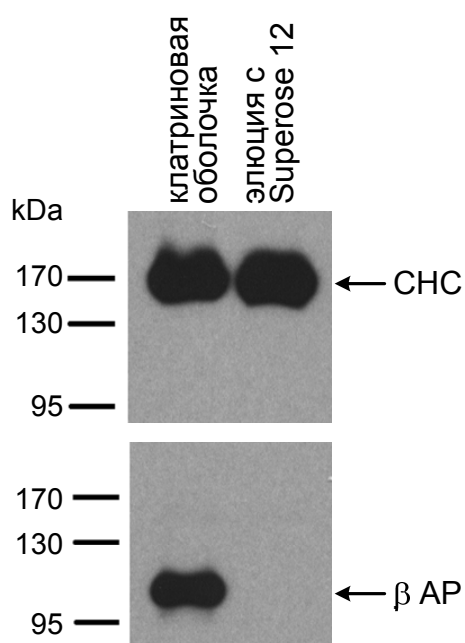


Рисунок 13. Очистка клатрина из клатрин-покрытых пузырьков.

Клатрин-покрытые пузырьки инкубировали в буфере для диссоциации клатриновой оболочки, а затем центрифугировали для отделения от мембран пузырьков. Супернатант («клатриновая оболочка») использовали для очистки клатрина на Superose 12. Аликвоты, равные по количеству белка, разделяли SDS-гель ЭФ в ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Белки детектировали указанными антителами.

Данный белок был идентифицирован масс-спектрометрией как Hsc70. Известно, что он связывается с С-концевой частью тяжёлой цепи клатрина и одной из его функций является участие в диссоциации клатриновой оболочки. Интенсивность полосы Hsc70 составляет примерно 1% от интенсивности полосы тяжёлой цепи клатрина.

Очищенный клатрин инкубировали с аликвотами смолы, на которых были сорбированы GST-TRIP8b дикого типа (WT) или GST-TRIP8b DCM, а затем связавшиеся со смолой белки детектировали Вестерн-блот анализом с антителами к клатрину. Чтобы оценить гипотетический вклад Hsc70 или других белков во взаимодействие клатрина с TRIP8b, в ПААГ

разделяли равные части нанесения, проскоков и элюатов. Примерно 2/3 клатрина, используемого в эксперименте, детектируется антителами в элюате со смолы, содержащей TRIP8b дикого типа (**рис. 14**), но не с контрольной смолы, что указывает на прямое взаимодействие TRIP8b с клатрином.

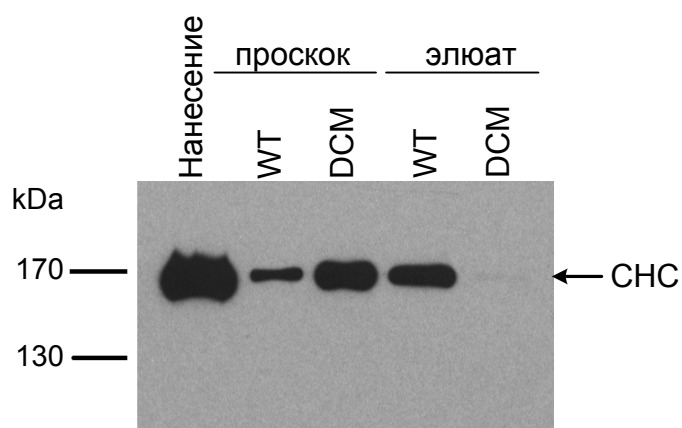


Рисунок 14. Прямое взаимодействие TRIP8b с клатрином.

Клатрин, очищенный на Superose 12, инкубировали с аликвотами смолы, с сорбированными GST-TRIP8b WT или GST-TRIP8b DCM. 1/10 части нанесения, проскоков и элюатов разделяли SDS-гель ЭФ в ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану, которую инкубировали с антителами к тяжёлой цепи клатрина (CHC).

ВЫВОДЫ

1. С помощью аффинной хроматографии обнаружено образование комплексов белка TRIP8b с клатрином.
2. Показано, что взаимодействие TRIP8b с клатрином является непосредственным.
3. Локализованы участки, определяющие взаимодействие TRIP8b с клатрином, которые находятся в N-концевой части TRIP8b.
4. В живых клетках наблюдается синхронное перемещение TRIP8b с клатрином при эндоцитозе мембранного белка HCN1.
5. Полученные данные позволяют предположить роль TRIP8b в нейрональном эндоцитозе путём его независимых взаимодействий с мембранными белками и компонентами оболочки клатрин-покрытых пузырьков.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Popova NV**, Deyev IE, Petrenko AG, "Association of adaptor protein TRIP8b with clathrin", J Neurochem., 2011, 118: 988–998.
2. **Н.В. Попова**, А.Н. Плотников, Р.Х. Зиганшин, И.Е. Деев, А.Г. Петренко, "Анализ белков, взаимодействующих с адаптером TRIP8b", Биохимия, 2008, т. 73, вып. 6, с. 804-812
3. **Н.В. Попова**, А. Плотников, И.Е. Деев, А.Г. Петренко, "Взаимодействие кальций-независимого рецептора латротоксина с внутриклеточным адаптерным белком TRIP8b", Доклады Академии наук, 2007, том 414, № 5, стр. 710-712

Тезисы докладов на конференциях

1. **Попова Н.В.**, Плотников А.Н., Зиганшин Р.Х., Деев И.Е., Петренко А.Г. «Анализ белков, взаимодействующих с адаптером TRIP8b» 12-ая международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Пущино, 10-14 ноября 2008 г.
2. **Попова Н.В.**, Деев И.Е., Петренко А.Г. «TRIP8b - новый клатрин-связывающий белок», IV Российский симпозиум «Белки и пептиды», Казань, 23-27 июня 2009 г.
3. **Попова Н.В.**, Плотников А.Н., Серова О.В., Деев И.Е., Петренко А.Г., «Анализ белков, взаимодействующих с адаптером TRIP8b», XXI зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 9-11 февраля 2009 г.
4. **Попова Н.В.** «TRIP8b: белок-адаптер, взаимодействующий с клатрином», XVI международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «ЛОМОНОСОВ», Москва, 13-18 апреля 2009 г.
5. **Popova N.V.**, Deyev I.E., Petrenko A.G., "TRIP8b is a novel clathrin-binding protein", International Conference on Biomolecular Science in honor of the 75th

anniversary of the birth of Professor Yuri Ovchinnikov, Moscow – Pushchino, September 28 – October 2, 2009.

6. **Попова Н.В.**, Деев И.Е., Петренко А.Г. «TRIP8b - новый клатрин-связывающий белок», 13-ая международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - наука XXI века», Пущино, 28 сентября - 02 октября 2009 г.
7. **Попова Н.В.**, Деев И.Е., Петренко А.Г. «Характеристика взаимодействия белка-адаптера TRIP8b с клатрином» XVIII международная конференция "Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии", Украина, Гурзуф, 31 мая - 10 июня 2010 г.
8. **N.V. Popova**, I.E. Deyev, A.G. Petrenko, "Association of brain-specific adapter protein TRIP8b with clathrin." 40th annual meeting society for neuroscience, USA, San Diego, 10-13 November 2010.
9. **Попова Н.В.**, Деев И.Е., Петренко А.Г., «Взаимодействие белка-адаптера TRIP8b с клатрином» V Российский симпозиум «Белки и пептиды», Петрозаводск, 8-12 августа 2011 г.