

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА РАН**

на правах рукописи



Серова Оксана Викторовна

**ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССИНГА И СУБЪЕДИНИЧНОЙ СТРУКТУРЫ
АДГЕЗИОННОГО G-БЕЛОКСОПРЯЖЕННОГО РЕЦЕПТОРА CIRL**

специальность – 03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва 2012

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

Научные руководители: доктор химических наук,
Петренко Александр Георгиевич

кандидат физ.-мат. наук,
Деев Игорь Евгеньевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор,
Румш Лев Давыдович

кандидат биологических наук, доцент,
Воротников Александр Вячеславович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита состоится «14» марта 2012 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д.002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт 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 Российской академии наук.

Автореферат разослан « » февраля 2012 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. G-белоксопряженные рецепторы (G protein-coupled receptors, GPCRs) представляют один из самых больших и наиболее разнообразных классов трансмембранных белков, кодируемых геномом многоклеточных животных. Так, у человека обнаружено более 800 различных генов, кодирующих G-белоксопряженные рецепторы, среди которых выделяют пять семейств (глутаматные, родопсиновые, адгезионные, Frizzled/taste2 и секретинные). GPCRs опосредуют большое количество физиологических процессов в эукариотических организмах, нарушение работы этих рецепторов приводит к возникновению различных заболеваний. Около 40 % фармацевтических препаратов, выпускаемых на рынке, используют в качестве мишеней G-белоксопряженные рецепторы. При этом терапевтическими мишенями являются чуть меньше пятидесяти различных GPCRs, что составляет всего около 5 % от всех известных белков этого семейства. Функция около 120 рецепторов, обнаруженных в геноме человека, остаётся невыясненной, такие рецепторы называют сиротскими или орфановыми. При этом сиротскими являются практически все адгезионные GPCRs. Таким образом, исследование структуры и функций этих белков является актуальной проблемой современной физико-химической биологии.

Нейрональный рецептор C1RL1 (the calcium-independent receptor of α -latrotoxin 1) является высокоаффинным рецептором природного нейротоксина – α -латротоксина, благодаря чему он и был открыт. Ранее проведенные исследования и пресинаптическая локализация рецептора указывают на его роль в регуляции нейросекреции. Этим определяется интерес к рецептору и интенсивные исследования, направленные на его структурно-функциональную характеристику. C1RL1 принадлежит к семейству адгезионных G-белоксопряженных рецепторов. Для рецепторов данного семейства характерно наличие двухсубъединичной структуры, которая является результатом эндогенного протеолиза молекулы-предшественника. Образующиеся в результате протеолиза субъединицы рецептора, как предполагают, образуют нековалентно связанный комплекс на поверхности клетки. Однако для C1RL1 недавно была выдвинута гипотеза о независимой локализации субъединиц на клеточной мембране. Согласно этой гипотезе субъединицы рецептора диссоциируют, но остаются мембрано-связанными. Таким образом, на данный момент актуальным является исследование особенностей субъединичной структуры C1RL1, а также поиск белков, взаимодействующих с рецептором.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось исследование особенностей структурной организации адгезионного G-белоксопряженного рецептора C1RL1, а также поиск белков, взаимодействующих с рецептором. Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи: 1. Исследовать механизм диссоциации субъединиц рецептора C1RL1; 2. Определить образуют ли субъединицы рецептора нековалентный комплекс на плазматической мембране; 3. Выделить белковые комплексы, содержащие рецептор C1RL1 и идентифицировать компоненты, входящие в состав комплексов.

Научная новизна и практическая ценность работы. Показано, что на клеточной мембране рецептор C1RL1 присутствует, главным образом, в виде комплекса двух нековалентно связанных субъединиц p120 и p85. Впервые установлено, что часть субъединиц рецептора C1RL1 диссоциирует при физиологических условиях, в результате чего p120 секретируется во внеклеточную среду. Определен механизм диссоциации: диссоциация p120 субъединицы происходит при участии мембрано-ассоциированной протеазы, которая отщепляет N-концевой пептид p85 субъединицы в непосредственной близости от мембраны. В результате протеолиза p120 субъединица секретируется во внеклеточную среду в комплексе с коротким пептидным фрагментом p85.

Проведен поиск белков, способных взаимодействовать с рецептором C1RL1. Идентифицирован ряд белков, в числе которых структурные, внутриклеточные сигнальные белки, а также белки, участвующие в эндоцитозе и транспорте синаптических везикул.

В целом, результаты работы способствуют расширению представлений о структурной организации и функциональных свойствах адгезионного G-белоксопряженного рецептора C1RL1.

Апробация работы. Результаты настоящего исследования доложены на ряде российских и международных симпозиумов: на 12-ой международной Пущинской школе-конференции молодых ученых, (Пущино, 2008), на IV и V Российских симпозиумах "Белки и пептиды", (Казань, 2009; Петрозаводск, 2011), на четвертой международной конференции молодых ученых "Молекулярная биология: проблемы и перспективы", (Киев, Украина, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на _____ страницах, содержит 21 рисунок и 1 таблицу, состоит из введения, обзора

литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы, включающего _____ название.

Содержание работы

1. Особенности субъединичной структуры рецептора C1RL1

C1RL1 принадлежит к семейству адгезионных G-белоксопращенных рецепторов. Данные рецепторы являются природными гибридами двух классов белков – сигнальных рецепторов и молекул клеточной адгезии. Подобно другим членам семейства C1RL1 состоит из двух субъединиц – внеклеточной гидрофильной субъединицы p120, содержащей модули клеточной адгезии, и трансмембранной субъединицы p85, участвующей в передаче сигнала (рис. 1).

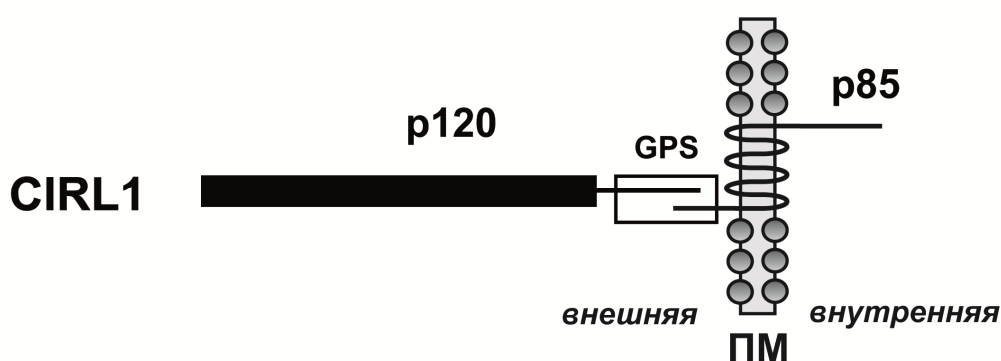


Рис. 1. Схематическое изображение белка C1RL1. Здесь и далее ПМ – плазматическая мембрана.

Двухсубъединичная структура является результатом протеолитического расщепления молекулы предшественника. Установлено, что сайт протеолиза располагается внутри консервативного домена, в непосредственной близости от первого трансмембранного сегмента. Этот домен получил название GPS (G protein-coupled receptor Proteolysis Site) и был обнаружен у всех гомологичных адгезионных G-белоксопращенных рецепторов, за исключением GPR123. Сайт протеолиза является высоко консервативным: в положении P⁻² остаток His, в положении P⁻¹ остаток Leu, в положении P⁺¹ – либо Ser, либо Thr. Кроме этого GPS-домен содержит четыре консервативных остатка Cys и два Trp. На данный момент не идентифицирована протеаза, осуществляющая гидролиз в GPS-домене. GPS-протеолиз отличается от обычного посттрансляционного протеолитического процессинга фуриновыми протеазами тем, что проходит на ранних стадиях биосинтеза, в эндоплазматическом ретикулуме, до гликозилирования рецептора.

Большинство данных свидетельствует о том, что две субъединицы адгезионных G-белоксопряженных рецепторов образуют прочный нековалентный комплекс на поверхности клетки. Одним из доказательств этому является то, что внеклеточная гидрофильная субъединица обнаруживается в мембранной фракции, тогда как при экспрессии этой субъединицы как отдельного белка, она является растворимым секретлируемым белком. Кроме того, обе субъединицы эффективно копреципитируются специфичными антителами после солюбилизации клеток детергентом.

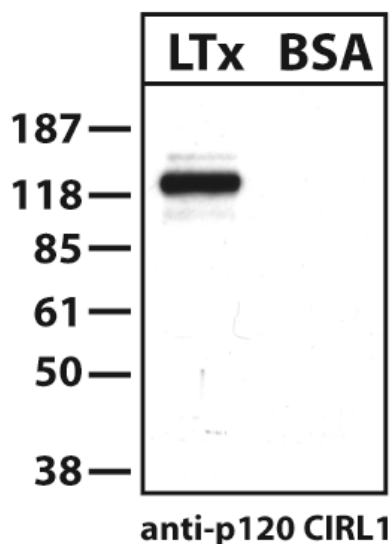
Однако анализ экспрессии и внутриклеточного транспорта рецептора C1RL1 с использованием антител, специфичных к отдельным субъединицам, указывает на то, что фрагменты C1RL1 не полностью колокализированы на поверхности клетки. В связи с этим была выдвинута гипотеза о независимой локализации субъединиц C1RL1 на клеточной мембране. Согласно этой гипотезе субъединицы рецептора диссоциируют, но остаются мембрано-связанными и ведут себя как независимые мембранные белки. Вместе с тем природа независимого расположения гидрофильной субъединицы p120 на плазматической мембране остается непонятной.

Для того чтобы согласовать выше изложенные противоположные наблюдения, мы исследовали возможность диссоциации двухсубъединичного комплекса C1RL1 при физиологических условиях.

1.1. Диссоциация субъединиц рецептора C1RL1

В случае если происходит диссоциации субъединиц C1RL1, гидрофильная субъединица p120 должна секретироваться во внеклеточную среду. Для проверки возможности существования растворимой формы C1RL1 *in vivo*, водные экстракты мозга крыс были подвергнуты хроматографии на α -латротоксин-агарозе. Сорбированные белки элюировали и анализировали с использованием Вестерн-блоттинга с последующей окраской антителами к p120-субъединице. В качестве отрицательного контроля была использована хроматография на BSA-агарозе. Этот белок, подобно α -латротоксину, имеет гидрофобные домены и близкое значение pI. Значительное количество p120 было обнаружено только в элюатах с α -латротоксин-агарозы (рис. 2).

Затем была проанализирована экспрессия растворимой и мембранной форм C1RL1 и мутанта C1RL1 T/P в трансфецированных COS-клетках. C1RL1 T/P содержит точечную замену T⁸³⁸ на P в GPS-домене рецептора, которая препятствует протеолитическому расщеплению молекулы предшественника. Ранее было показано, что эта мутация полностью блокирует протеолиз в GPS-домене рецептора, при этом полноразмерная мутантная форма рецептора на



поверхности клетки отсутствует. В случае диссоциации субъединиц, р120-субъединица мутантного рецептора не должна обнаруживаться во внеклеточной среде.

Рис. 2. Вестерн-блоттинг белков, выделенных из растворимого экстракта мозга крысы (LTx – на латротоксин-агарозе, BSA – на BSA-агарозе). Окрашивание антителами к р120-субъединице CIRL1. Слева указано положение белковых маркеров в геле.

Для преципитации внеклеточных белков среду, на которой росли трансфицированные клетки, отбирали и подвергали хроматографии на α-латротоксин-агарозе. Сорбированные белки анализировали с использованием Вестерн-блоттинга с последующей окраской антителами к р120-субъединице CIRL1. Значительное количество растворимого р120 было обнаружено в среде клеток, экспрессирующих рецептор дикого типа. Однако даже большее количество р120 присутствовало в среде клеток, экспрессирующих мутантную форму рецептора (рис. 3, левая панель), что контрастировало с данными об отсутствии полноразмерной мутантной формы CIRL1 T/P на поверхности клетки.

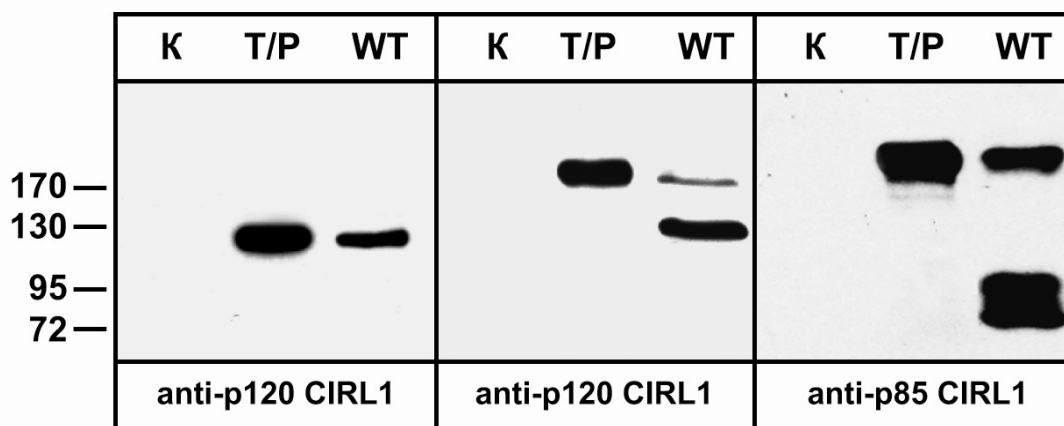


Рис. 3. Вестерн-блоттинг лизатов клеток (средняя и правая панель) и белков, преципитированных из внеклеточной среды (левая панель). К – нетрансфицированные клетки, WT – клетки, экспрессирующие CIRL1, T/P – клетки, экспрессирующие CIRL1 T/P. Снизу указаны антитела, которыми окрашены соответствующие блоты. Слева указано положение белковых маркеров в геле.

Дополнительно был проанализирован трафик растворимых делеционных мутантов C1RL1. Был экспрессирован белок ecC1RL, который представляет собой растворимый эктодомен рецептора C1RL1, состоящий из p120-субъединицы и небольшого N-концевого фрагмента p85, и содержит на C-конце Мус- и 6xHis-таги (рис. 4А). Кроме того была получена похожая конструкция, содержащая точечную замену T⁸³⁸ на Р в GPS-домене белка (ecC1RL T/P). При экспрессии в COS-клетках оба белка секретировались во внеклеточную среду. Белки из внеклеточной среды сорбировали на WGA-агарозе (Wheat germ agglutinin). Данный сорбент используется для очистки гликозилированных белков. Связавшиеся белки элюировали буфером, содержащим 0.5 М N-ацетил-D-глюкозамин и анализировали с использованием Вестерн-блоттинга. Белок ecC1RL успешно подвергался протеолизу в GPS-домене, тогда как ecC1RL T/P не расщеплялся совсем так же, как и полноразмерный белок, содержащий аналогичную мутацию в GPS-домене (рис. 4Б). Следовательно, внутриклеточный протеолиз не является необходимым условием для секреции растворимой формы C1RL1.

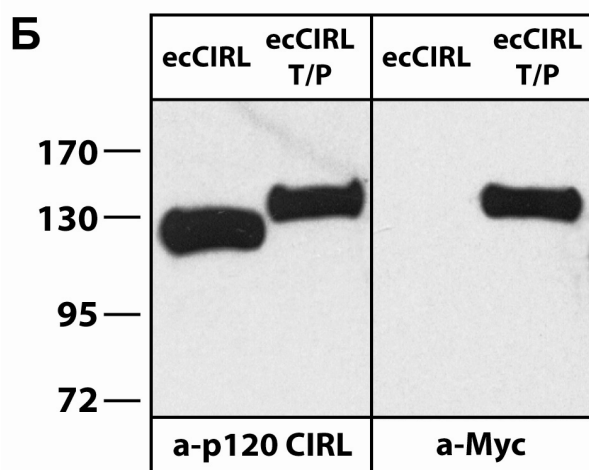
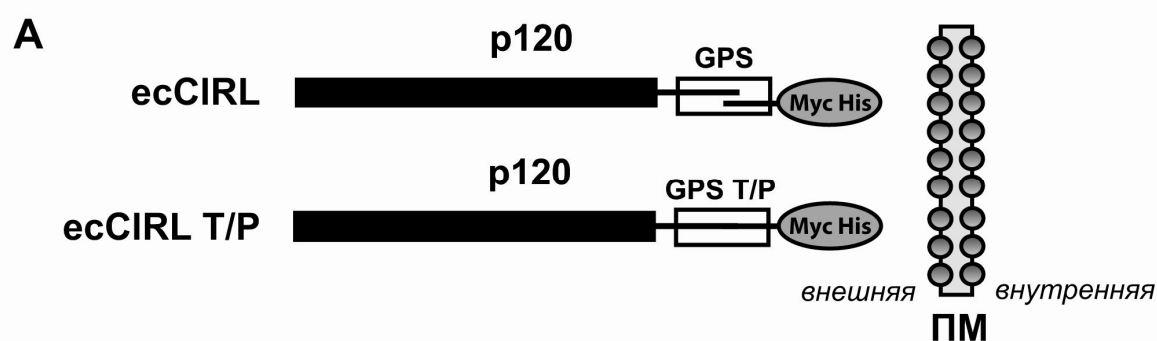


Рис. 4. А. Схематичное изображение делеционных конструкций ecC1RL и ecC1RL T/P.

Б. Вестерн-блоттинг белков, сорбированных из внеклеточной среды на WGA-агарозе, окрашенных антителами к p120-субъединице C1RL1 и к Мус-тагу.

Самым простым объяснением присутствия растворимой формы C1RL1 во внеклеточной среде могла бы быть диссоциация p120- и p85-субъединиц. Однако это не согласуется с обнаружением растворимой формы

непротеолизируемого мутантного рецептора (рис. 3, левая панель). В связи с этим было выдвинуто предположение, что C1RL1 может дополнительно подвергаться протеолизу, приводящему к диссоциации p120/p85 комплекса. Наиболее вероятным казалось предположение, что сайты первичного и вторичного протеолиза отличаются. И в том случае, если сайт вторичного протеолиза находится между сайтом первичного протеолиза и первым трансмембранным сегментом, мы должны детектировать отщепленный пептидный фрагмент, связанный с p120. Удалось обнаружить этот фрагмент, связанный с растворимой p120-субъединицей. Из внеклеточной среды COS-клеток, экспрессирующих C1RL1, на α -латротоксин-агарозе была выделена p120-субъединица, а затем полученный образец был проанализирован масс-спектрометрией. Был обнаружен пептид с m/z 1750.9 (рис. 5), что соответствует рассчитанной массе протонированного 15-ти членного пептида TNFAVLMAHREIYQG (1751.0), который мог образовываться в результате двухступенчатого протеолиза в GPS-домене, по связям L⁸³⁷-T⁸³⁸ и G⁸⁵²-R⁸⁵³.

Для того чтобы подтвердить физиологическую значимость наблюдаемого явления масс-спектрометрией был проанализирован растворимый фрагмент C1RL1, выделенный из водного экстракта крысиного мозга. Был обнаружен пептид такой же массы, его последовательность была далее подтверждена MS/MS анализом (рис. 6).

Таким образом, было установлено, что часть субъединиц рецептора C1RL1 диссоциирует при физиологических условиях, в результате чего p120 секретируется во внеклеточную среду. Диссоциация происходит при участии мембрано-ассоциированной протеазы, которая отщепляет N-концевой пептид p85-субъединицы в непосредственной близости от мембраны. В результате этого протеолиза p120-субъединица диссоциирует с поверхности клетки в комплексе с коротким пептидным фрагментом p85.

Свидетельством в пользу предложенного механизма диссоциации субъединиц C1RL1 являются также эксперименты по экспрессии в эукариотических клетках полноразмерной и мутантной форм рецептора. Ранее было показано, что мутация T⁸³⁸P в GPS-домене C1RL1 приводит к полной устойчивости рецептора к внутриклеточному протеолизу. При этом не удавалось детектировать p120-субъединицу на поверхности клеток. Присутствие p120 во внеклеточной среде клеток, экспрессирующих непротеолизируемую форму C1RL1, нельзя объяснить обычной диссоциацией субъединиц. Данное наблюдение свидетельствует в пользу предложенной гипотезы о расщеплении рецептора второй протеазой.

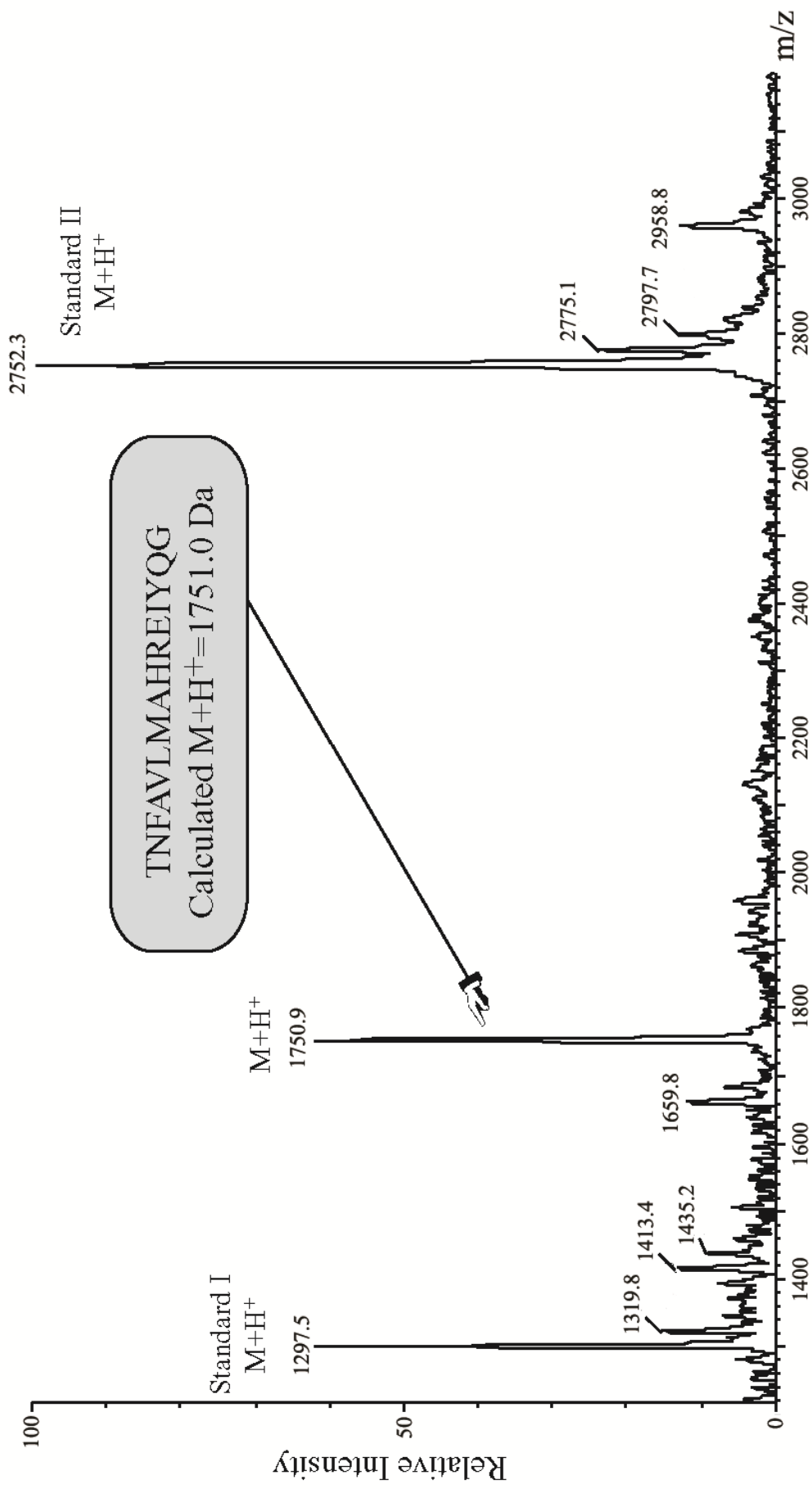


Рис. 5. MALDI-TOF спектр пептида, выделенного совместно с p120-субъединицей из внеклеточной среды COS- клеток, экспрессирующих CIRL1. В качестве внутренних стандартов были использованы ангиотензин (standard I, M + H⁺ 1297.5) и синтетический пептид (standard II, M + H⁺ 2752.3).

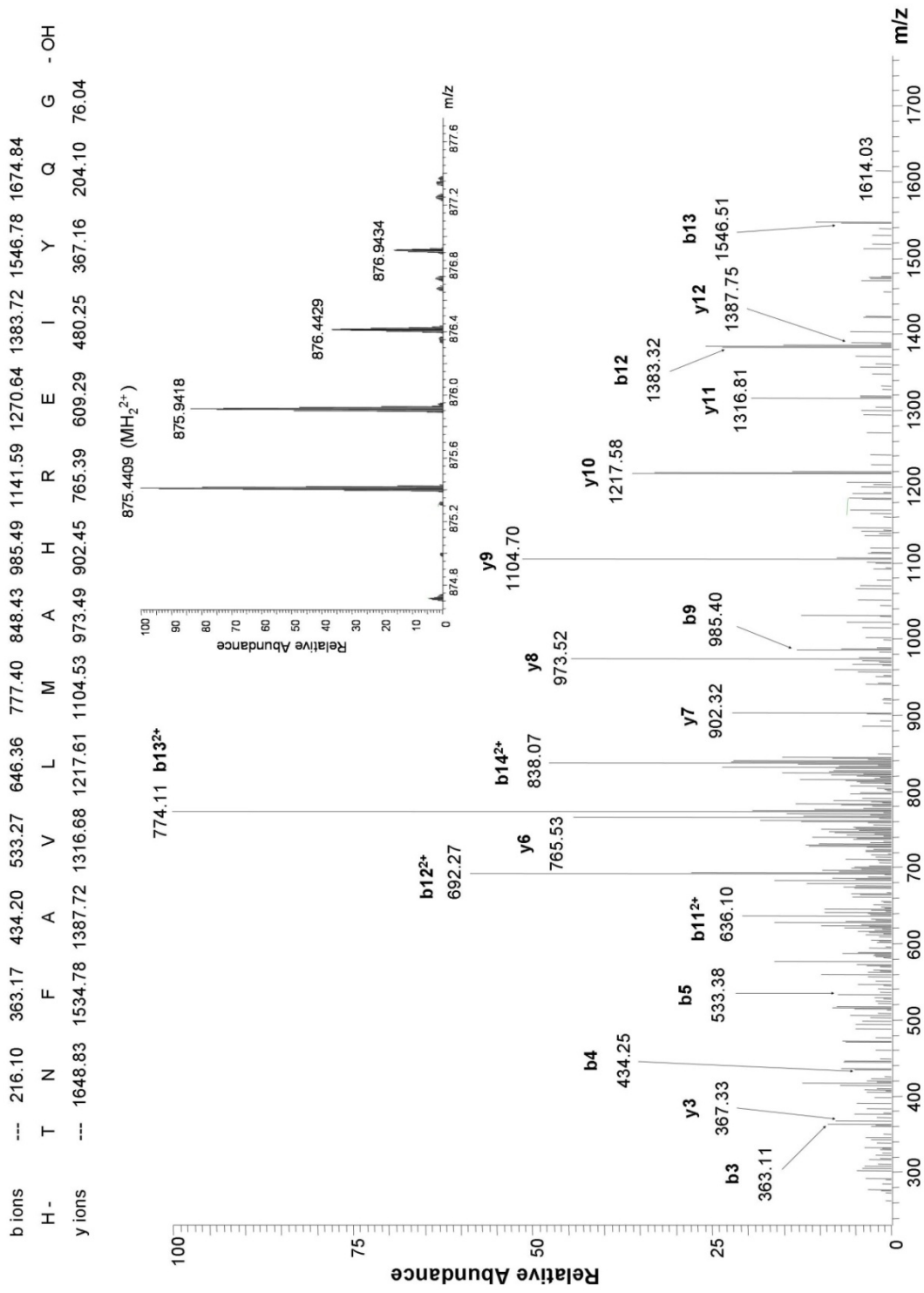


Рис. 6. LTQ-Orbitrap LC-MS/MS спектр пептида, выделенного совместно с р120-субъединицей из растворимого экстракта мозга крысы. На спектре отмечены массы b и y ионов, образующихся в результате расщепления пептида TNFAVLMAHREIYQG. В правом верхнем углу MS-спектра иона пептида-предшественника, несущего двойной заряд с m/z 875.4407.

Непосредственным доказательством вторичного протеолиза является обнаружение пептидного фрагмента, ассоциированного с p120-субъединицей рецептора. Причем один и тот же пептидный фрагмент был обнаружен как в водных экстрактах мозга, так и в среде клеток, экспрессирующих C1RL1. Сайт вторичного расщепления не является характерным для каких-либо известных протеиназ. Выравнивание аминокислотных последовательностей различных адгезионных GPCRs не выявило существенной гомологии в этой области (рис. 7).

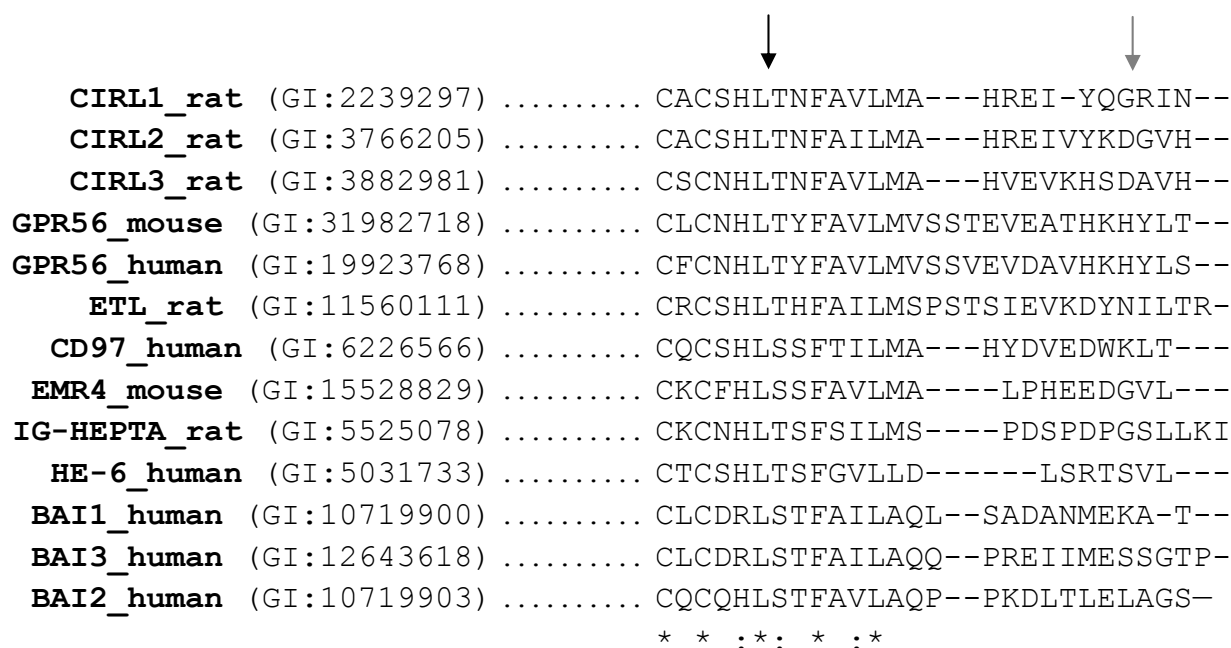


Рис. 7. Выравнивание аминокислотных последовательностей некоторых адгезионных G-белоксопряженных рецепторов в области GPS-домена. Черной стрелкой указан сайт первого протеолиза, серой стрелкой указан сайт второго протеолиза в C1RL1. В скобках указан номер доступа аминокислотной последовательности в базе данных GenBank.

1.2 Комплекс субъединиц p120/p85 C1RL1 на поверхности клеточной мембраны

Установлено, что часть субъединиц рецептора C1RL1 диссоциирует при физиологических условиях. Диссоциация происходит при участии мембрано-ассоциированной протеазы. Однако оставалось неясным, образуют ли субъединицы рецептора нековалентный комплекс на плазматической мембране или они локализованы независимо. Согласно гипотезе о независимом расположении субъединиц C1RL1 субъединицы рецептора диссоциируют, но остаются мембрано-связанными. Они ведут себя как

независимые мембранные белки, но при этом способны заново ассоциировать при взаимодействии p120 с агонистом, а также при солюбилизации в растворах, содержащих Triton X-100.

Одним из доводов в пользу независимого расположения субъединиц рецептора на мембране была различная солюбилизация белков перфтороктановой кислотой (PFO). При низких концентрациях (0.1–0.6%) PFO в растворе обнаруживался только p120, тогда как весь p85 оставался в клеточном осадке. Это объяснялось частичной солюбилизацией плазматической мембраны, а не разрушением комплекса между субъединицами рецептора. Для того чтобы исключить такую возможность был проделан эксперимент, в котором обработке PFO подвергались очищенные белки ecCIRL и ecCIRL T/P (рис. 4А). Данные белки представляют собой растворимый эктодомен рецептора CIRL1, содержат на С-конце Мус- и 6xHis-таги и экспрессируются во внеклеточную среду.

Эукариотические клетки трансфецировали плазмидами, кодирующими ecCIRL и ecCIRL T/P. На третий день после трансфекции среду отбирали и инкубировали ее с WGA-агарозой. Связавшиеся белки элюировали буфером, содержащим 0.5 М N-ацетил-D-глюкозамин. Для того чтобы проверить, не разрушаются ли рецепторные комплексы под воздействием перфтороктановой кислоты очищенные белки ecCIRL и ecCIRL T/P наносили на Ni-агарозу в присутствии и в отсутствие 0.5 % PFO. В отсутствие PFO p120-субъединица ecCIRL успешно преципитировалась на Ni-агарозе за счет взаимодействия с N-концевым фрагментом p85, тогда как присутствие в буфере PFO препятствовало преципитации p120 (рис. 8). Таким образом PFO разрушает комплекс между p120- и p85-субъединицами, не влияя на связывание белков с Ni-агарозой, что было показано в контрольном эксперименте с непротеолизируемой формой ecCIRL. Белок ecCIRL T/P успешно сорбировался на Ni-агарозе как в присутствии, так и в отсутствие PFO.

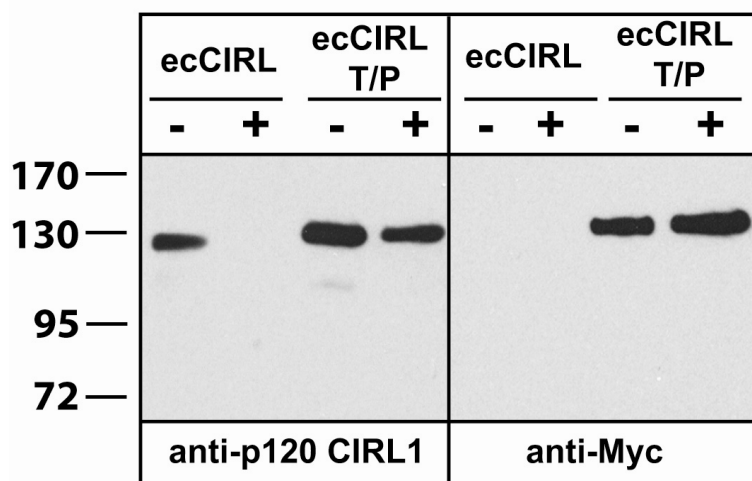


Рис 8. Обработка эктодоменов CIRL1 перфтороктановой кислотой. Вестерн-блоттинг белковых фракций, после преципитации на Ni-агарозе в присутствии (+) и в отсутствие (-) PFO, окрашенных антителами к p120-субъединице CIRL1 и к Мус-тагу.

Для прояснения данных об ассоциации независимых субъединиц p120 и p85 при солюбилизации детергентом, были получены несколько конструкций CIRL1 с субъединицами разного размера (рис. 9). Конструкция HA-CIRL1 представляет собой полноразмерный рецептор с HA-тагом на N-конце p120-субъединицы, HA-CIRL1-GFP отличается от предыдущей наличием зеленого флуоресцентного белка (GFP) на C-конце p85-субъединицы, а 7-6 CIRL1-GFP имеет укороченную p120-субъединицу. Данный подход позволяет различать эти субъединицы на одном блоте и определять количество каждой формы после иммунопреципитации.

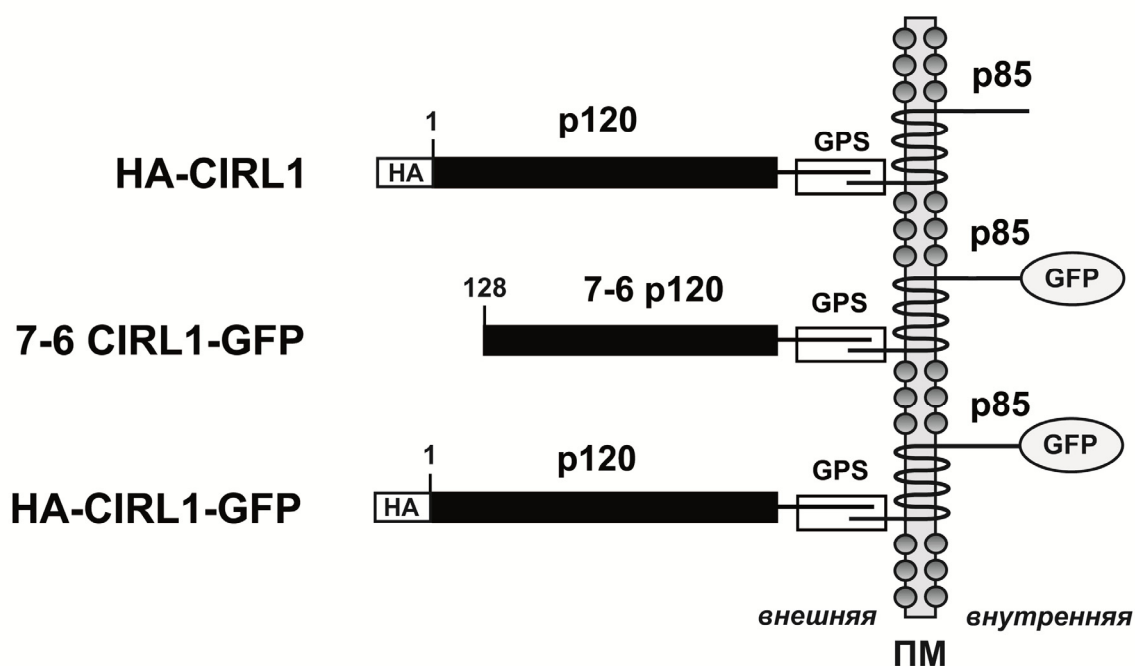


Рис. 9. Схематичное изображение химерных белков HA-CIRL1, 7-6 CIRL1-GFP, HA-CIRL1-GFP.

Эукариотические клетки трансфецировали отдельно плазмидами, кодирующими белки HA-CIRL1, 7-6 CIRL1-GFP, HA-CIRL1-GFP, а также совместно плазмидами, кодирующими HA-CIRL1 и 7-6 CIRL1-GFP. Все гибридные белки эффективно экспрессировались в COS-клетках (рис. 10А, Б).

Для детекции только поверхностных белков неразрушенные клетки обрабатывали биотином, а затем инкубировали с антителами к HA-тагу. Далее клетки лизировали в буфере, содержащем Triton X-100. Белки, связавшиеся с антителами, преципитировали на белок А-сефарозе.

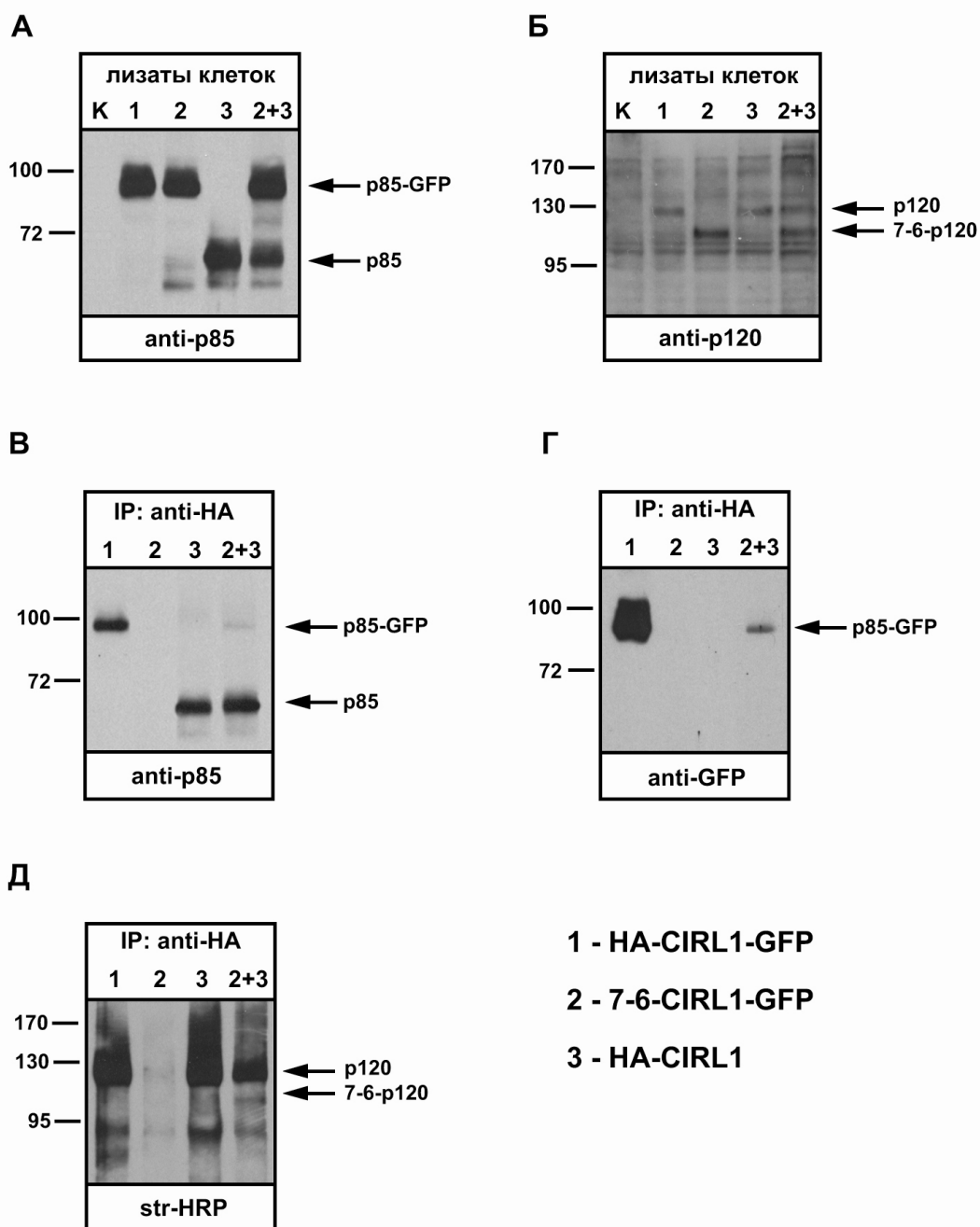


Рис. 10. Иммунопреципитация химерных конструкций CIRL. (А, Б) Вестерн-блоттинг лизатов трансфицированных COS-клеток; (В-Д) Вестерн-блоттинг белков, иммунопреципитированных на антителах к HA-тагу (IP: anti-HA). Сверху цифрами указаны конструкции, которыми трансфицировали или ко-трансфицировали COS-клетки: К – контроль, нетрансфицированные клетки; 1 – клетки, экспрессирующие HA-CIRL1-GFP; 2 – 7-6 CIRL1-GFP; 3 – HA-CIRL1. Снизу указаны антитела, которыми окрашивали вестерн-блоты; слева – положение белковых маркеров в геле. Стрелками обозначены соответствующие субъединицы рецепторов.

Если бы p120-субъединица CIRL1 была независимым мембранным белком, и солюбилизация клеток детергентом сопровождалась ассоциацией

комплементарных субъединиц, то с равной вероятностью можно было бы обнаружить в клетках, коэкспрессирующих HA-CIRL1 и 7-6 CIRL1-GFP, комплексы p120/p85 и p120/p85-GFP. И действительно антитела к HA-тагу преципитировали не только p85-субъединицу, но и p85-GFP (рис. 10В, Г), однако с очень низкой эффективностью. Если принять количество преципитированного белка p85 за 100 %, то количество преципитированного p85-GFP составит только 8 %. Возможным объяснением наблюдаемому явлению копреципитации может быть олигомеризация белков HA-CIRL1 и 7-6 CIRL1-GFP на клеточной мембране. В этом случае в соответствующем преципитате должно обнаруживаться также равное количество 7-6 p120-субъединицы. Биотинилирование клеток и последующее окрашивание иммунопреципитированных белков стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (str-HRP) позволило обнаружить субъединицу 7-6 p120 (рис. 10Д). Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что рецептор CIRL1 существует на плазматической мембране в виде нековалентного комплекса p120 и p85-субъединиц.

Для того чтобы непосредственно детектировать существование рецепторных комплексов на плазматической мембране была получена генно-инженерная конструкция, кодирующая полноразмерный рецептор CIRL1, в который ввели сайт расщепления тромбином (thr-CIRL1). Сайт протеолиза был введен во внеклеточную часть p85-субъединицы между GPS-доменом и первым трансмембранным сегментом (рис. 11).

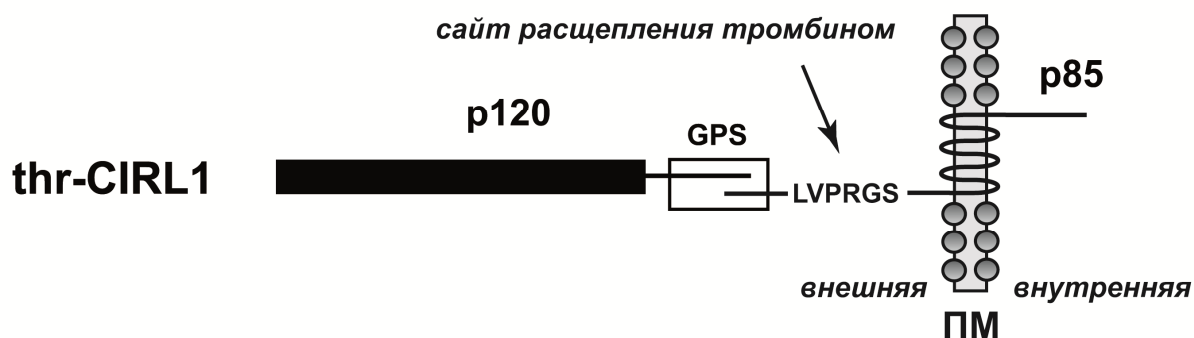


Рис. 11. Схематичное изображение химерного белка thr-CIRL1, содержащего сайт расщепления тромбином.

В том случае, если рецептор образует гетеродимерный комплекс на поверхности клетки, обработка тромбином эукариотических клеток, экспрессирующих thr-CIRL1, должна приводить к высвобождению p120-субъединицы во внеклеточную среду.

Клетки, экспрессирующие thr-CIRL1 и CIRL1, инкубировали в буфере, содержащем тромбин, в контрольном эксперименте клетки инкубировали в буфере без добавления тромбина. Затем для преципитации p120-субъединицы внеклеточную среду инкубировали с α -латротоксин-агарозой, а клетки лизировали непосредственно в буфере для нанесения на электрофорез. Далее клеточные лизаты и элюаты с α -латротоксин-агарозы подвергали Вестерн-блоттингу с последующим окрашиванием антителами к p120-субъединице CIRL1. Химерный белок thr-CIRL1 при экспрессии в COS-клетках подвергался эндогенному протеолизу подобно рецептору дикого типа (рис. 12, верхняя панель). Только в случае клеток, экспрессирующих thr-CIRL1 и обработанных тромбином, удалось выделить p120 из внеклеточной среды. Эти данные свидетельствуют о существовании гетеродимерного комплекса на плазматической мембране (рис. 12, нижняя панель).

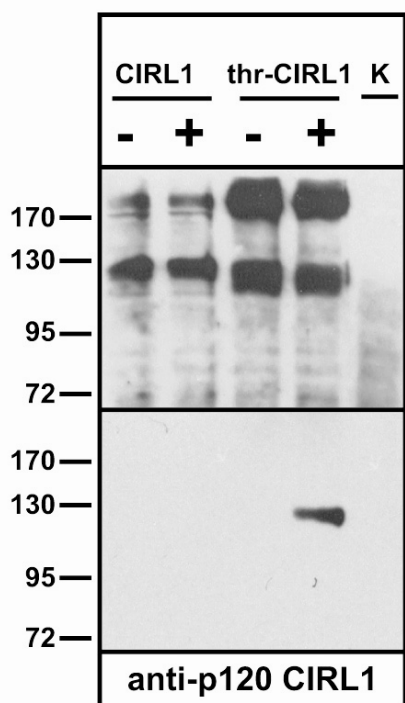


Рис. 12. Вестерн-блоттинг лизатов COS-клеток, экспрессирующих CIRL1 и thr-CIRL1 (верхняя панель) и белков, преципитированных из внеклеточной среды (нижняя панель). К – контроль, нетрансфецированные COS-клетки. Окрашивание антителами к p120-субъединице CIRL1. Слева указано положение белковых маркеров в геле.

Таким образом, в экспериментах с использованием различных химерных форм CIRL1 получено подтверждение того, что на мембране рецептор присутствует, главным образом, в виде комплекса двух нековалентно связанных субъединиц p120 и p85.

1.3 Модель биосинтеза CIRL1

Полученные результаты позволяют выдвинуть следующую модель биосинтеза CIRL1, включающую две стадии протеолитического процессинга (рис. 13). На первой стадии CIRL1 расщепляется с высокой эффективностью в эндоплазматическом ретикулуме неидентифицированной протеиназой. Сайт этого расщепления расположен в GPS-домене, находящемся во внеклеточной части и непосредственно примыкающим к первому трансмембранному сегменту рецептора. Продукты расщепления, гидрофильная субъединица p120 с модулями клеточной адгезии и трансмембранная субъединица p85, образуют

устойчивый нековалентно связанный комплекс. Далее гетеродимерный комплекс транспортируется на поверхность клетки через аппарат Гольджи, где происходит присоединение сложных углеводных цепей. На поверхности цитоплазматической мембраны другая мембрано-связанная протеиназа осуществляет дополнительное расщепление C1RL1 во внеклеточной части р85 в непосредственной близости от мембраны. Данному расщеплению подвергается лишь малая часть рецепторов. В результате вторичного протеолиза, р120 отделяется от мембраны в виде комплекса с небольшим пептидным фрагментом р85 (рис. 13, левая часть). Во внеклеточной среде данные растворимые комплексы могут независимо взаимодействовать с другими белками клеточной адгезии или мембранными рецепторами.

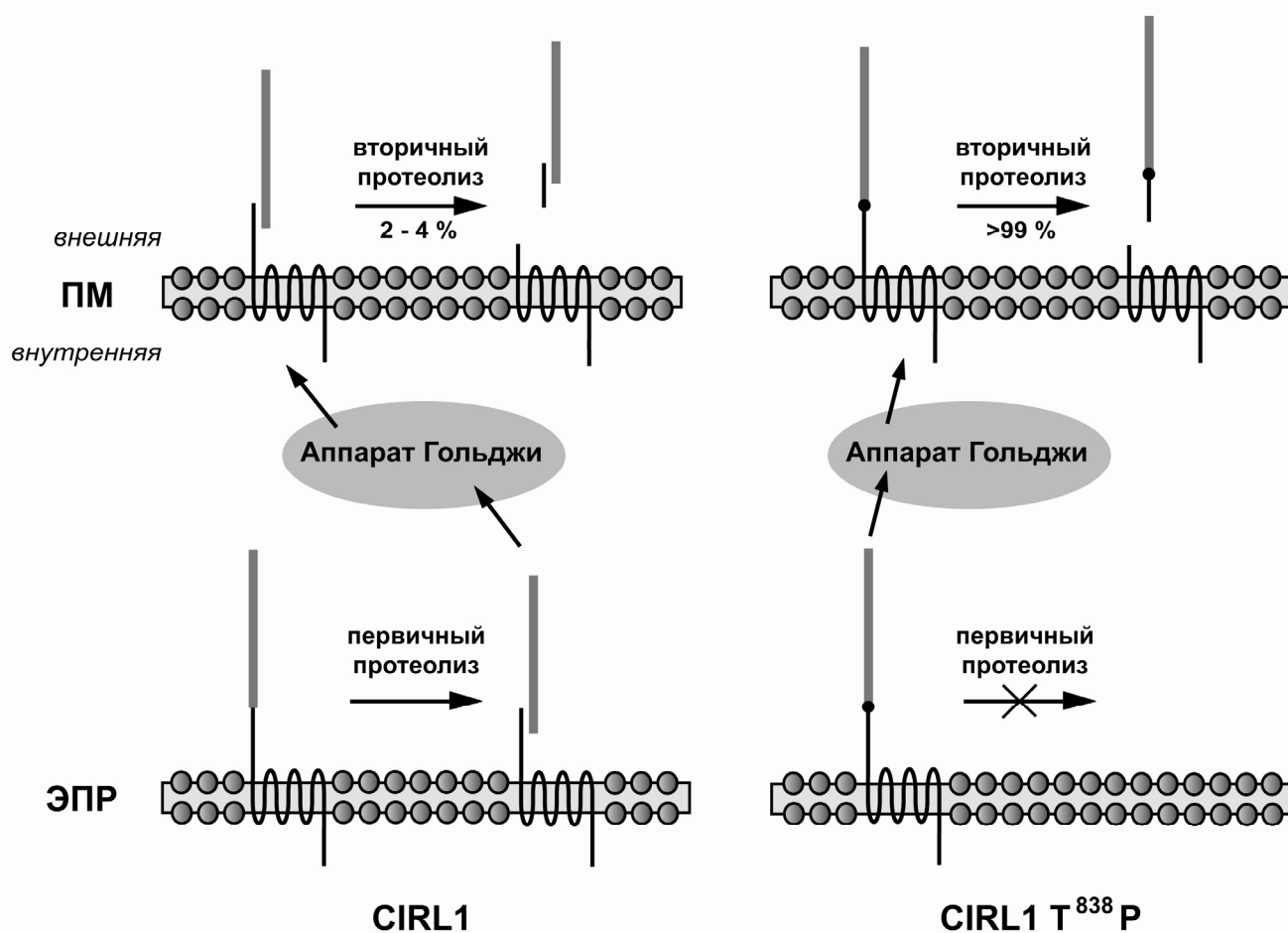


Рис. 13. Модель биосинтеза C1RL1. Серой толстой линией обозначена р120-субъединица C1RL1, черной линией – р85-субъединица. ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

Доказательством двойного специфичного расщепления C1RL1 является масс-спектрометрическая идентификация пептидного фрагмента, соответствующего по массе продукту двойного расщепления рецептора.

Поскольку данный пептид был выделен на α -латротоксин-агарозе, то очевидно он образует устойчивый комплекс с p120-субъединицей. Таким образом, наличие растворимой формы C1RL1 может быть объяснено не диссоциацией p120 и p85, а отщеплением того короткого фрагмента p85, который отвечает за взаимодействие с p120. Обнаружение пептида одинаковой массы как в среде трансфецированных COS-клеток, так и в водном экстракте мозга крысы свидетельствует о физиологической значимости наблюдаемого явления.

Проведенный ранее анализ экспрессии C1RL1 дикого типа и его T/P-мутанта, устойчивого к внутриклеточному протеолизу, показал, что полноразмерная мембранная форма мутантного рецептора практически отсутствует на поверхности клетки. В то же время удалось обнаружить растворимую форму мутантного рецептора во внеклеточной среде в более высокой концентрации, чем растворимую форму рецептора дикого типа. Эти данные в совокупности с данными об отсутствии мембранной формы рецептора на поверхности клетки свидетельствуют о полном расщеплении мутанта внеклеточной протеазой (рис. 13, правая часть).

Таким образом, C1RL1 дикого типа расщепляется с высокой эффективностью внутриклеточной протеазой и в незначительной степени второй, внеклеточной протеазой. C1RL1 T/P мутант не расщепляется первой протеазой совсем, но при этом весьма эффективно расщепляется второй внеклеточной протеазой. Можно предположить, что внеклеточный протеолиз является регулируемым процессом, и при этом существует функциональная связь между первичным и вторичным протеолизом.

Эксперименты с растворимыми делеционными мутантами C1RL1 на основе его N-концевого эктодомена служат подтверждением предлагаемой модели процессинга C1RL1. Они также предоставили дополнительную информацию о локализации двух протеаз, расщепляющих C1RL1. Так же как и полноразмерный C1RL1, его эктодомен, соединенный с тус-эпитопом, расщепляется первой внутриклеточной протеазой, в то время как растворимый T/P мутант не расщепляется совсем (рис. 4). В то же время T/P растворимый мутант не расщепляется и второй, внеклеточной протеазой. Можно заключить, что первая внутриклеточная протеаза расщепляет эффективно и мембранную и растворимую формы C1RL1, в то время как вторая внеклеточная протеаза расщепляет только мембранные белки. Характеристики второго расщепления позволяют предположить, что внеклеточная протеаза может быть одной из так называемых шеддаз, отщепляющих эктодомены трансмембранных белков. Шеддазы выполняют различные функции. Они активируют некоторые рецепторы, высвобождают

агонист, связавшийся с рецептором, что позволяет агонисту стимулировать рецепторы на поверхности других клеток. Шеддазы участвуют в секреции гормонов, образующихся из мембрано-связанных предшественников, а также в регуляции поверхностной экспрессии многих интегральных мембранных белков.

Можно предположить, что двухступенчатый протеолитический процессинг представляет собой регуляторный механизм, помогающий контролировать поверхностную экспрессию рецептора C1RL1.

2. Идентификация белков в составе комплексов с рецептором C1RL1

Функция рецептора C1RL1 неизвестна. В связи с этим на данный момент является актуальным поиск белков, взаимодействующих с рецептором. В качестве инструмента исследования был выбран α -латротоксин. Латротоксин, выделяемый из яда паука каракурта, является пресинаптическим токсином, вызывающим массовый выброс нейромедиаторов путем стимуляции экзоцитоза синаптических везикул. Действие латротоксина определяется наличием специфических белков на поверхности клетки, с которыми токсин связывается с высокой аффинностью в наномолярном диапазоне. Известны три мишени α -латротоксина в нервных тканях: нейрексин или кальцийзависимый рецептор, кальцийнезависимый рецептор C1RL1 и рецепторподобная тирозинфосфатаза σ (PTP σ). Данные белки не имеют между собой заметной структурной гомологии и принадлежат к трем различным классам интегральных мембранных рецепторов. Нейрексин является белком клеточной адгезии с одним трансмембранным сегментом, C1RL1 принадлежит семейству G-белоксопосредованных рецепторов. PTP σ является мембранной тирозинфосфатазой, состоящей из двух субъединиц p80 и p70. Все три рецептора имеют большие внеклеточные домены со структурными мотивами, характерными для белков клеточной адгезии, что и предполагает их роль в активации внутриклеточного сигнального каскада за счет прямых межклеточных контактов.

В данной работе было осуществлено выделение белковых комплексов из мозга крыс аффинной хроматографией на α -латротоксине и антителах к цитоплазматической части p85-субъединицы C1RL1.

Грубую фракцию мембран мозга крысы солюбилизировали неионным детергентом тритоном X-100 и хроматографировали на сорбенте с иммобилизованным α -латротоксином согласно двум ранее разработанным методикам. Методики различаются присутствием/отсутствием кальция в буферах для хроматографии, что позволяет выделять отдельно белковые комплексы кальцийзависимого рецептора (нейрексина) и

кальцийнезависимого рецептора (CIRL1). Были использованы оба подхода, так как взаимодействие CIRL1 с внеклеточными белками мозга может быть кальцийзависимым.

Согласно первой методике, хроматографию проводили в присутствии CaCl_2 . Элюцию белков осуществляли в три стадии буфером, содержащим: 1) 0.5 М KCl и 2 мМ CaCl_2 ; 2) 1 М KCl и 2 мМ CaCl_2 ; 3) 1 М KCl и 10 мМ EDTA . При использовании этой методики выделяются белковые комплексы как с кальцийзависимым нейрексином, так и с CIRL. При этом нейрексин элюируется с колонки при введении в буфер EDTA , тогда как CIRL и ассоциированные с ним белки распределены по всем фракциям элюции (рис. 14А).

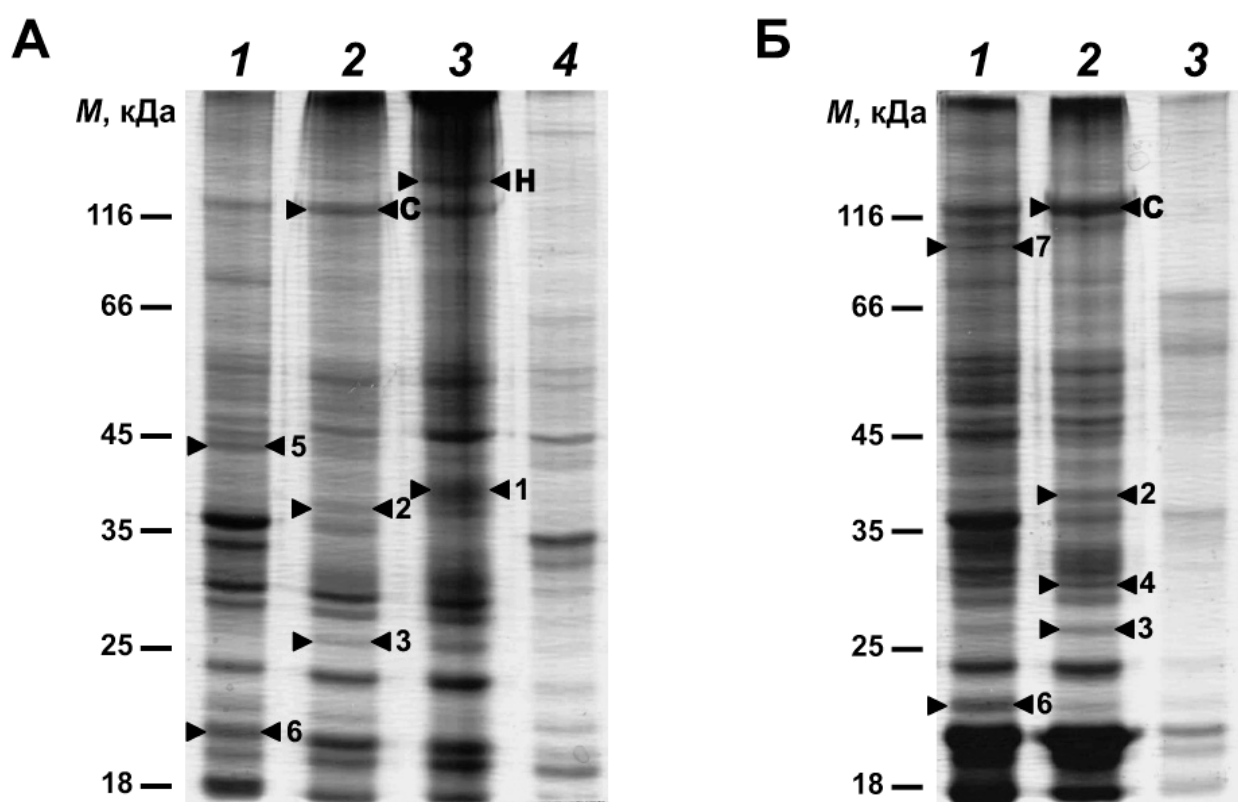
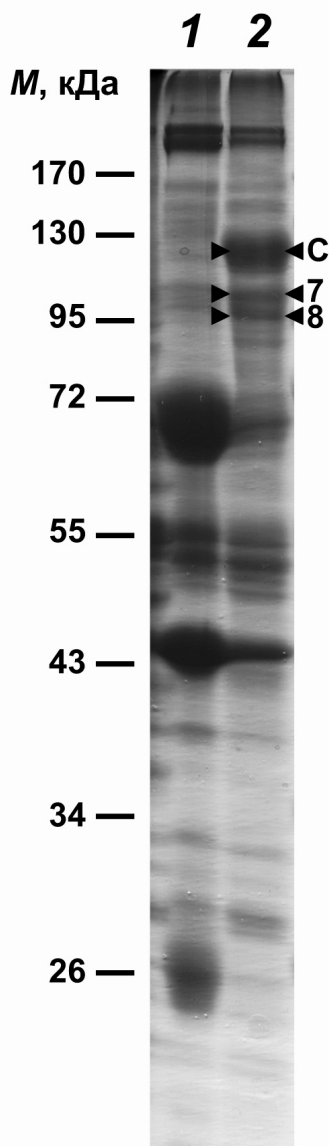


Рис. 14. Анализ белкового состава фракций с помощью SDS-электрофореза в 10% ПААГ после хроматографии экстракта мембран крысиных мозгов на α -латротоксин-сефарозе (**А**) в присутствии ионов кальция: 1 – элюция 0.5 М KCl в присутствии 2 мМ CaCl_2 , 2 – 1 М KCl в присутствии 2 мМ CaCl_2 , 3 – 1М KCl и 10 мМ EDTA , 4 – контрольная хроматография на BSA-сефарозе; (**Б**) в отсутствии ионов кальция: 1 – элюция 0.5 М KCl , 2 - элюция 1 М KCl , 3 – контрольная хроматография на BSA-сефарозе. Стрелками показаны идентифицированные белки. Цифры рядом со стрелками соответствуют нумерации белков в таблице. Буквами обозначены: С – р120-субъединица CIRL1, Н – нейрексин; слева указано положение белковых маркеров в геле.



Вторая методика была использована для выделения белковых комплексов только кальцийнезависимого рецептора. Хроматографию проводили в буферах, не содержащих ионы кальция, связавшиеся белки элюировали 0.5 и 1 М KCl в отсутствие Ca^{2+} (рис. 14Б). В качестве отрицательного контроля для обнаружения белков, неспецифически связывающихся с сорбентом за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий была использована сефароза с иммобилизованным BSA. Для того чтобы отдельно выделить белковые комплексы C1RL1, были получены также антитела, специфичные к р85-субъединице C1RL1, которые использовались в качестве лигандов. Аффинную хроматографию мембранных экстрактов на анти-р85-сефарозе проводили в отсутствие ионов кальция. Контролем служили преиммунные антитела, иммобилизованные на сефарозе (рис. 15).

Рис. 15. Анализ белкового состава фракций с помощью SDS-электрофореза в 10% ПААГ после иммуноаффинной хроматографии экстракта мембран крысиных мозгов. а – контрольная хроматография на преиммунных антителах, б – хроматография на антителах к р85-субъединице C1RL1. Элюцию белков проводили 0.1 М раствором глицина (pH 2.8).

Фракции на каждой стадии элюции объединяли, высаживали смесью метанол-хлороформа и анализировали с использованием SDS-гель-электрофореза. Для дальнейшей идентификации выбирали те белковые полосы, которые присутствовали только в элюатах после аффинной хроматографии на специфических лигандах и не наблюдались в элюатах после контрольной хроматографии. Идентификацию белков проводили согласно протеомному протоколу, который включает протеолитическое расщепление белка в геле трипсином, а затем составление его пептидной карты с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения.

Полученные результаты представлены в таблице. Были идентифицированы 8 белков, среди которых присутствуют структурные белки (актин и основной белок миелина), белки, участвующие во внутриклеточной передаче сигналов (α -субъединица казеинкиназы 2, α -субъединица G β -белка),

белки, участвующие в эндоцитозе (адаптерный белковый комплекс 2, Rab10), а также белок NipSnap1.

Актин присутствует во всех клетках эукариот (10-15% по массе от всех белков). Наличие актина и основного белка миелина во фракциях, полученных в результате аффинной хроматографии на иммобилизованном токсине, может быть обусловлено, прежде всего, неспецифичным взаимодействием этих белков с α -латротоксин-сефарозой.

Таблица. Белки крысиного мозга, идентифицированные в составе белковых комплексов с рецепторами α -латротоксина.

N	Название белка	Масса, кДа	Номер доступа в базе данных SwissProt	Условия выделения
1	GTP-связывающий белок G _o , субъединица α	39	P59215	Хроматография на α -латротоксин-сефарозе; элюция 1 М KCl и 10 мМ EDTA
2	Актин	42	P60711	Хроматография на α -латротоксин-сефарозе; элюция 1 М KCl
3	Rab10	23	P35281	
4	NipSnap1	33.5	O55125	
5	Казеинкиназа 2, субъединица α	45	P19139	Хроматография на α -латротоксин-сефарозе; элюция 0.5 М KCl
6	Основной белок миелина (МВР)	22	P02688	
7	AP2-комплекс, субъединица β -1	104.5	P62944	1. Хроматография на α -латротоксин-сефарозе; элюция 0.5 М KCl 2. Хроматография на анти-p85-сефарозе
8	AP2-комплекс, субъединица α -2	104	P18484	Хроматография на анти-p85-сефарозе

Известно, что активация G-белоксопряженных рецепторов стимулирует их эндоцитоз, что приводит к снижению чувствительности клеток к агонистам

рецепторов. В данный процесс вовлечены внутриклеточные сигнальные и адаптерные белки, такие как аррестины, протеинкиназы и клатрин. Идентификация в составе рецепторного комплекса α - и β -субъединиц адаптерного белкового комплекса 2 (AP2), а также белка Rab10 свидетельствует в пользу выдвинутого ранее предположения о вовлечении CIRL в процессы эндоцитоза.

Белки семейства Rab, принадлежащие к суперсемейству Ras малых GTP-аз, являются регуляторами внутриклеточного транспорта. Внутри семейства Rab наблюдается высокая консервативность аминокислотных последовательностей, причем, основные различия локализованы в C-концевой части, которая служит сигнальной областью для специфического взаимодействия с внутриклеточными мембранами-мишенями. Белок Rab10, идентифицированный в составе белковых комплексов, принадлежит к семейству Rab, включающему Rab8 и Rab13. Предполагается, что Rab10 участвует во внутриклеточном транспорте. Например, в поляризованных эпителиальных клетках MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Rab10 регулирует везикулярный транспорт от базолатеральных сортирующих эндосом к обычным эндосомам. Существуют также данные о том, что в клетках *Caenorhabditis elegans* Rab10 циркулирует между ранними эндосомами и синаптической мембраной.

Адаптерный белковый комплекс 2 (AP2), как было показано, вовлечен в формирование клатринпокрытых везикул, участвуя таким образом в клатринзависимом эндоцитозе. Идентификация субъединиц адаптерного белкового комплекса 2 во фракциях, полученных в ходе хроматографии на α -латротоксин-сефарозе в отсутствие ионов кальция, а также в результате хроматографии на антителах к p85-субъединице CIRL1, свидетельствует в пользу того, что с AP2 взаимодействует именно CIRL1, а не другие рецепторы α -латротоксина.

Идентификация α -субъединицы G_o -белка в составе кальцийзависимых белковых комплексов подтверждает опубликованные ранее данные о взаимодействии CIRL1 с этим G-белком, причем, необходимым условием этого взаимодействия было наличие ионов магния. Показано, что G_o -белок, экспрессирующийся, в основном, в мозге, участвует в регуляции кальциевых каналов и может образовывать с ними в присутствии синтаксина 1 тройной комплекс, функционирующий в пресинаптических окончаниях, предположительно, в местах выброса нейромедиаторов.

Фосфорилирование белков играет важную роль во многих клеточных процессах, в том числе и в передаче сигнала в клетке. Известно, что казеинкиназа 2, идентифицированная в комплексе с кальцийнезависимым

рецептором, может влиять на синаптическую активность, вероятно, посредством фосфорилирования пре- или постсинаптических субстратов. Так, при длительной потенциации синапсов наблюдается увеличение активности казеинкиназы 2. Эти данные, наряду с данными о фосфорилировании синаптотагмина, синтаксина, VAMP2 – белков, играющих ключевую роль в экзоцитозе, казеинкиназой 2, подтверждают участие этого фермента в передаче внутриклеточного сигнала от рецепторов α -латротоксина.

Предполагается, что белок NipSnap1 (4-nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like protein homolog1), обнаруженный во фракциях, полученных в результате аффинной хроматографии на α -латротоксин-сефарозе в отсутствие ионов кальция, вовлечен в транспорт везикул. NipSnap1 был обнаружен в постсинаптических уплотнениях, причем его количество зависело от синаптической активности. В связи с этим было выдвинуто предположение о том, что NipSnap1 играет важную роль в передаче сигналов или регуляции цитоскелета в постсинаптических уплотнениях.

Таким образом, в дополнение к ранее известным партнерам рецепторов α -латротоксина, нами обнаружено 8 белков. Их анализ в совокупности позволяет предположить участие рецепторов α -латротоксина в процессах эндоцитоза и передачи внутриклеточных сигналов.

Выводы

1. Показано, что на клеточной мембране рецептор CIRL1 присутствует, главным образом, в виде комплекса двух нековалентно связанных субъединиц p120 и p85.

2. Обнаружено, что малая часть комплексов рецептора CIRL1 диссоциирует с поверхности клетки с образованием растворимого эктодомена рецептора, который представляет собой комплекс p120-субъединицы и короткого внеклеточного фрагмента p85-субъединицы

3. Показано, что диссоциация субъединиц рецептора является результатом вторичного протеолиза в GPS-домене рецептора по связи, локализованной в области между сайтом первичного протеолиза и первым трансмембранным сегментом.

4. Проведен поиск белков, способных взаимодействовать с рецептором CIRL1. Идентифицирован ряд белков, в числе которых структурные белки, внутриклеточные сигнальные белки, а также белки, участвующие в эндоцитозе и транспорте синаптических везикул. Выдвинуто предположение об участии рецептора CIRL1 в процессах эндоцитоза и передачи внутриклеточных сигналов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Serova O. V., Popova N. V., Petrenko A. G., Deyev I. E. "Association of the subunits of the calcium-independent receptor of α -latrotoxin" *Biochem Biophys Res Commun.*, 2010, 402(4), 658-662.
2. Krasnoperov V., Deyev I.E., Serova O.V., Xu C., Lu Yun, Buryanovsky L., Gabibov A.G., Neubert T.A., and Petrenko A.G. "Dissociation of the Subunits of the Calcium-Independent Receptor of α -Latrotoxin as a Result of Two-Step Proteolysis", *Biochemistry*, 2009, 48(14), 3230-3238.
3. Серова О.В., Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. "Идентификация белков в составе комплексов с рецепторами альфа-латротоксина", *Биоорганическая химия*, 2008, 34(6), 747-753.

Тезисы докладов на конференциях

1. Serova O.V., Popova N.V., Deyev I.E., Petrenko A.G. "Dissociation of the subunits of the adhesion G-protein coupled receptor C1RL1", The 4th international IMBG conference for young scientists "Molecular biology: advances and perspectives", Kyiv, Ukraine, 2011, September, 14-17.
2. Серова О.В., Попова Н.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. "Особенности субъединичной структуры адгезионного G-белоксвязанного рецептора C1RL1", V Российский симпозиум "Белки и пептиды", Петрозаводск, 8-12 августа 2011 г.
3. Серова О.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. "GPS-содержащие G-белоксвязанные рецепторы из *Monosiga brevicollis*", IV Российский симпозиум "Белки и пептиды", Казань, 23-27 июня 2009
4. Серова О.В., Деев И.Е., Петренко А.Г. "Функциональное исследование гибридного G-белоксвязанного рецептора" 12-ая международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Пущино, 10-14 ноября 2008