

## АНАЛИЗ ЛОКАЛИЗАЦИИ ПРОДУКТА ГЕНА FGD1, УЧАСТВУЮЩЕГО В ПАТОГЕНЕЗЕ СИНДРОМА ААРСКОГА

Егоров М.В., Воронцова О.А., Курючкин В.А., Полищук Е.В., Полищук Р.С.

Лаборатория мембранного сортирования, консорциум Mario Negri Sud. (Италия)

ГОУ ВПО ИвГУ

Кафедра общей биологии и ботаники

ГОУ ВПО ИвГМА Росздрава

Кафедра патологической анатомии

**РЕЗЮМЕ** Проведен анализ внутриклеточного распределения протеина FGD1, являющегося продуктом гена, который подвержен мутагенезу при синдроме Аарскога. Выявлена концентрация исследуемого протеина на мембранах аппарата Гольджи и структурах эндосомальной системы клетки. Полученные результаты указывают на то, что FGD1 может служить регулятором мембранного транспорта и эндоцитоза.

**Ключевые слова:** FGD1, Аарскога синдром, патология костей.

Синдром Аарскога является генетической болезнью роста, связанной с X-хромосомой, характеризуется дефектами скелета и урогенитальной системы и в большинстве случаев сопровождается задержкой умственного развития [1]. FGD1-ген (мутированный у пациентов с синдромом Аарскога) был идентифицирован недавно. Он кодирует одноименный белок, состоящий из 961 аминокислоты, и является активатором ГТФазы Cdc42, которая в свою очередь отвечает за организацию цитоскелета и мембранного транспорта [2, 8]. FGD1 состоит из нескольких участков (называемых также доменами). На N-конце белка имеется участок, насыщенный пролином, за ним по порядку располагаются следующие домены: «Dbl homology» (DH), «pleckstrin homology» (PH), FIVE и PH2 [8]. Известно, что такие структурные компоненты белков играют важную роль в их локализации и функциональной активности [4]. Важно заметить, что большинство мутаций, связанных с синдромом Аарскога, были выявлены в DH/PH-

домейнах, ответственных за активацию Cdc42 (DH) и присоединение к внутриклеточным мембранам (PH) [7]. Однако, несмотря на то, что локализация FGD1, возможно, играет важную роль в активности этого белка и патогенезе синдрома Аарскога, внутриклеточное распределение FGD1 до сих пор не было детально изучено.

Основной целью нашей работы является определение локализации FGD1 в различных внутриклеточных компартаментах и ее связи с функциональной активностью белка.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

*Клеточная культура.* Клетки линии Cos7 выращивались *in vitro* в модифицированной среде Дюльбекко (DMEM), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1мМ L-глутамин.

*Трансфекция ДНК.* Выявление FGD1 проводилось с помощью экспрессии рекомбинантной ДНК, кодирующей дикую форму белка,

Egorov M.V., Vorontsova O.A., Kuryuchkin V.A., Polishchuk E.V., Polishchuk R.S.

## PRODUCT LOCALIZATION ANALYSIS OF FGD1-GENE PARTICIPATING IN AARSKOG SYNDROME PATHOGENESIS

**ABSTRACT** Intracellular distribution of FGD1-protein, the product of the gene exposed to mutagenesis in Aarskog syndrome, is analysed. Examined protein concentration on Golgi apparatus membranes demonstrates that FGD1 may be the regulator of membrane transport and endocytosis.

**Key words:** FGD1, Aarskog syndrome, bone disease.

связанную с зеленым флюоресцентным протеином (GFP). ДНК была получена из отдела генетики человека университета штата Мичиган (США). LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, США) был использован для трансфекции ДНК в Cos7-клетки. Трансфектированные клетки были затем приготовлены для флюоресцентной микроскопии.

*Иммуноцитохимия.* Для определения внутриклеточных компартментов были использованы первичные антитела против следующих белков: TGN-46 (Transduction Labs, США), giantin (Transduction Labs, США), GM130 (Transduction Labs, США) и EEA1 (Transduction Labs, Великобритания). Фиксированные клетки, экспрессирующие FGD1-GFP, были инкубированы с вышеупомянутыми антителами. Первичные антитела были выявлены с помощью видоспецифичных антител, конъюгированных с флюорохромом Alexa546 (Molecular Probes, Нидерланды).

*Эндоцитоз трансферрина.* Для выявления мембранных структур, участвующих в эндоцитозе, клетки, экспрессирующие FGD1-GFP, были инкубированы на льду с трансферрином (5 мкг/мл), конъюгированным с флюорохромом TRITC (Molecular Probes, Нидерланды). Затем клетки промывали несколько раз свежей средой и фиксировали после 30-минутной инкубации при 37°C.

*Флюоресцентная микроскопия.* Изучение фиксированных клеток проводилось под конфокальным микроскопом Zeiss LSM-510 (Zeiss, Германия) с помощью объектива x 63 и фильтров, соответствующих спектральным характеристикам использованных флюоресцентных маркеров.

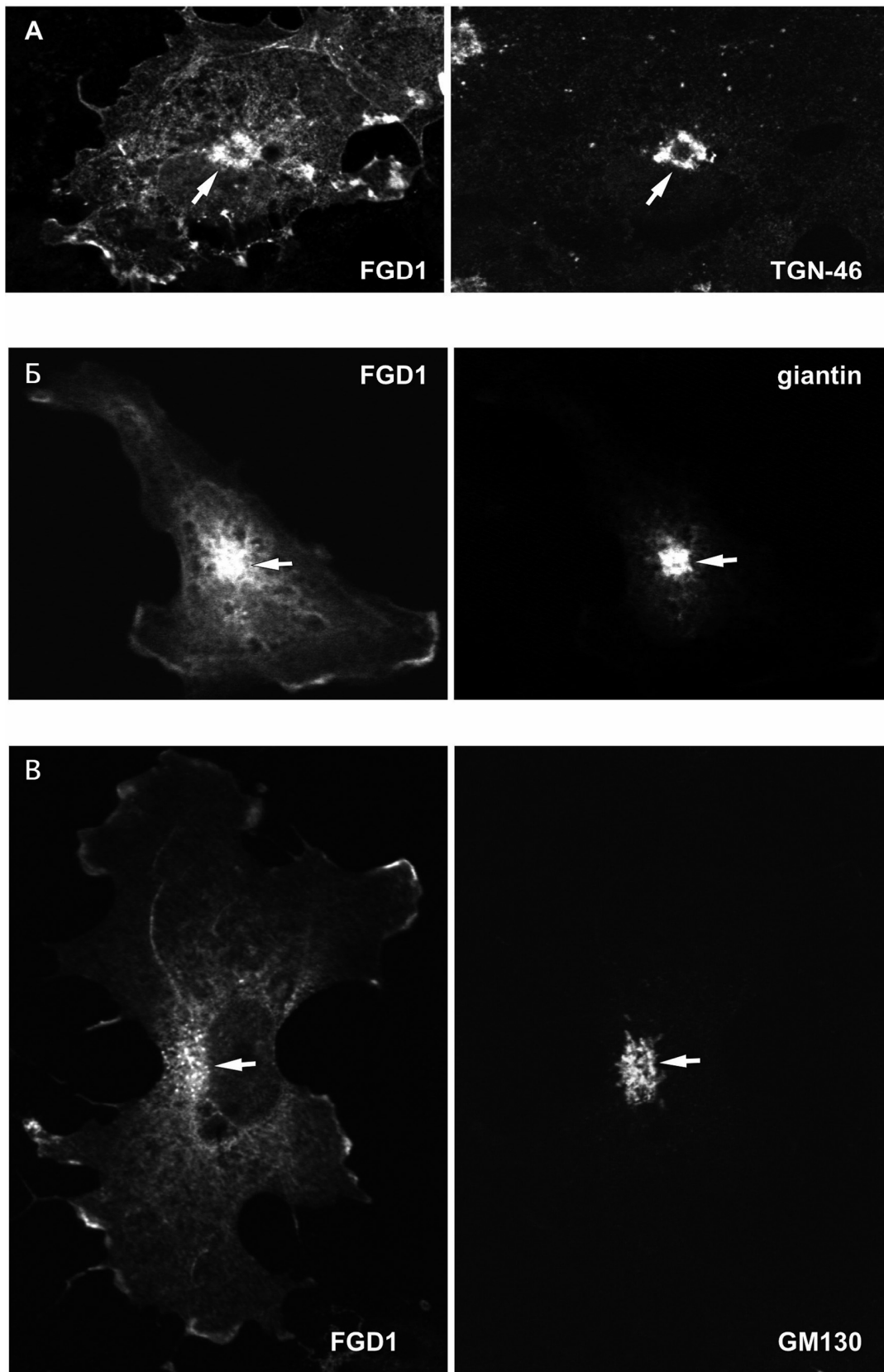
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунофлюоресцентная микроскопия Cos7-клеток показала, что экспрессия GFP-FGD1 в значительной мере вызывает его накопление в аппарате Гольджи и других структурах клетки, включая плазматическую мембрану. Прежде всего, анализируя трансфектированные клетки, мы отметили соположение FGD1-GFP и некоторых маркеров аппарата Гольджи. При этом наблюдалась оптимальная локализация FGD1-GFP с TGN-46 (рис. 1, А). Оба белка располагались в компактных структурах, находящихся в центральной части клетки. Большая часть TGN-46-позитивных структур содержала также значительное количество FGD1-GFP. TGN-46 является трансмембранным

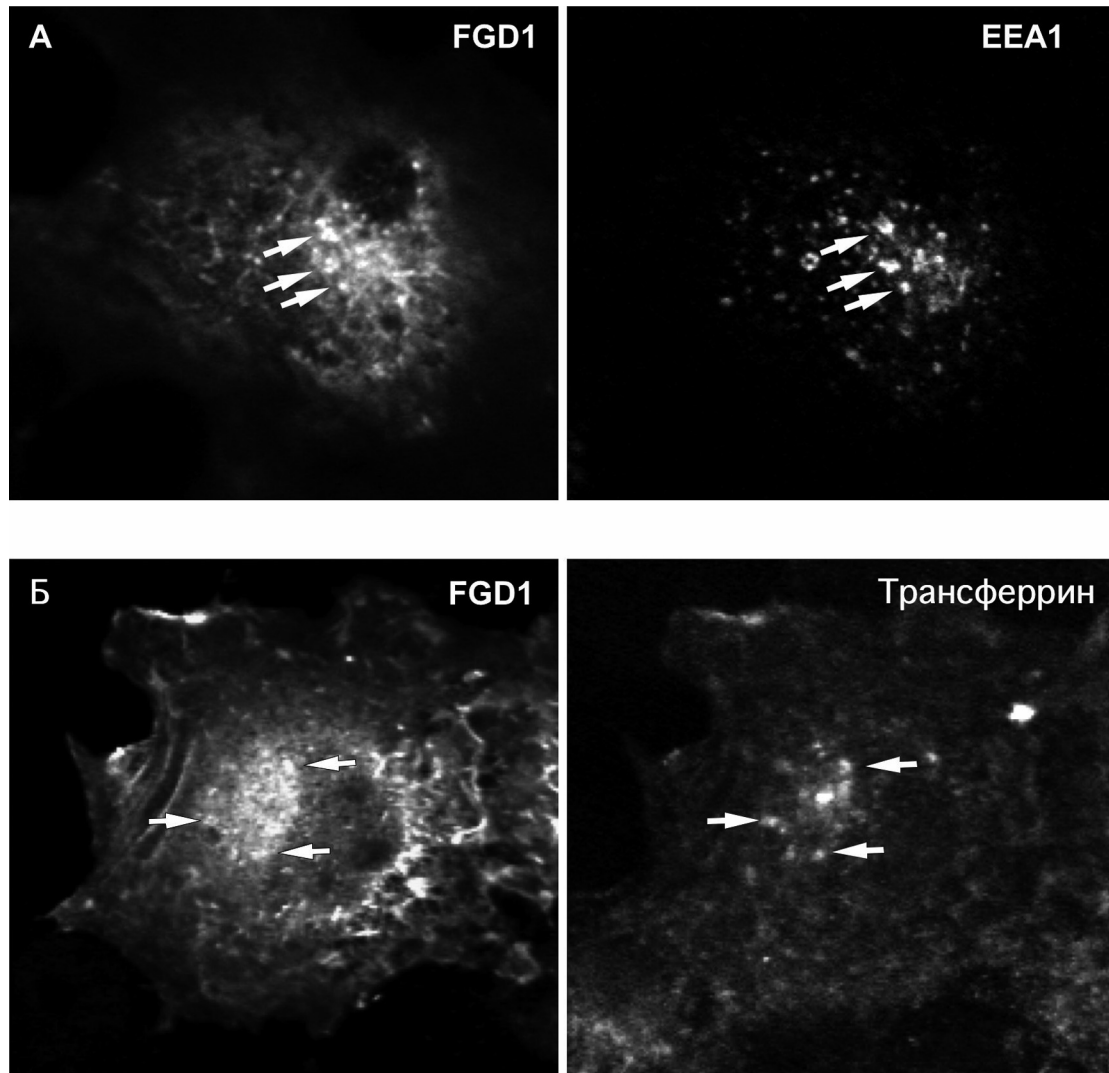
белком первого типа и находится обычно в транс-части аппарата Гольджи, где проходит сортировка секреторных протеинов и их упаковка в транспортные органеллы [9]. FGD1-GFP был также обнаружен на мембранных структурах аппарата Гольджи, меченных антителом против giantin (рис. 1, Б). Giantin обычно рассматривается как маркер центральной части аппарата Гольджи. Предполагают, что он может быть связан с поддержанием уникальной архитектуры мембран комплекса Гольджи [6]. В отличие от упомянутых выше маркеров локализация GM130 не совпадала с FGD1-GFP (рис. 1, В). GM130 располагается на мембранах цискомпартамента аппарата Гольджи, который участвует в приеме секреторного материала, поступающего из эндоплазматического ретикулула.

Таким образом, FGD1 предпочтительно связывается с мембранами транс-Гольджи. Это указывает на потенциальную роль, которую FGD1 может играть в процессе транспорта белков. FGD1 экспрессируется в основном в костной ткани и клетках остеогенного происхождения [3]. Возможно, FGD1, занимая ключевые позиции на выходе из аппарата Гольджи и на плазматической мембране, вовлечен в регуляцию доставки протеинов костной ткани (таких, например, как проколлаген) к поверхности клетки. Ассоциация FGD1 с аппаратом Гольджи, по-видимому, зависит от РН-участка протеина. РН-домейны различных белков связываются с фосфатидилинозитол-4-фосфатом, который содержится в аппарате Гольджи в относительно высокой концентрации [4]. Мутации в РН-домейне FGD1, сопряженные с синдромом Аарскога, возможно, нарушают ассоциацию белка с мембранами аппарата Гольджи. Таким образом, способность FGD1 контролировать внутриклеточные транспортные потоки может быть нарушена.

В дополнение к регуляторной роли в аппарате Гольджи, FGD1, по-видимому, может быть вовлечен в процесс эндоцитоза. Часть FGD1-GFP, находящегося в центральной части клетки, была выявлена на EEA1-позитивных структурах (рис. 2, А). Довольно крупные размеры и наличие такого эндосомального маркера, как EEA1 позволяют определить эти структуры как эндосомы. Эндосомальное происхождение FGD1-GFP-позитивных структур было подтверждено также экспериментами с использованием флюоресцентного трансферрина. Инкубация клеток с TRITC-трансферрином стимулировала



**Рис. 1.** Локализация FGD1 совместно с различными маркерами аппарата Гольджи. Клетки линии Cos7 были трансфектированы ДНК, кодирующей FGD1-GFP, и затем окрашены на TGN-46 (А), giantin (Б) и GM130 (В). FGD1-GFP довольно хорошо совпадает с TGN-46 (А, стрелки) и giantin (Б, стрелки), однако демонстрирует отличное от GM130 распределение в центральной части клетки (В, стрелки). Увеличение  $\times 850$ .



**Рис. 2.** Локализация FGD1 совместно с различными эндосомальными маркерами. Клетки линии *Cos7* были трансфектированы ДНК, кодирующей FGD1-GFP, затем окрашены на EEA1 (А) или инкубированы с флюоресцентным трансферрином (Б). Многочисленные FGD1-GFP-позитивные структуры содержат как EEA1 (А, стрелки), так и трансферрин (Б, стрелки). Увеличение  $\times 850$ .

его эндоцитоз и накопление во внутриклеточных структурах, содержащих также FGD1 (рис. 2, Б) и сходных по морфологии с EEA1-позитивными эндосомами. Ассоциация FGD1 с эндосомальными мембранами скорее всего связана с наличием у этого белка FIVE-домейна. FIVE-домейны различных белков демонстрируют высокую афинность к фосфатидилинозитол-3-фосфату и к фосфатидилинозитол-3,5-бифосфату, которые содержатся в органеллах эндосомальной системы в довольно высоких концентрациях [4]. Однако каким образом взаимодействие FGD1 с эндосомами может быть вовлечено в патогенез синдрома Аарскога, не совсем понятно. Это связано с тем, что FIVE-домейн FGD1 обычно не подвергается мутагенезу во время развития

болезни. Возможно, что мутанты FGD1 сохраняют способность связываться с эндосомами, однако не могут активировать Cdc42 (из-за повреждения ДН-домейна). Известно, что Cdc42 способна контролировать формирование тканей через регуляцию эндоцитоза молекул клеточной адгезии [5]. Этот регуляторный механизм может быть нарушен при экспрессии мутантов, которые не имеют аминокислот, играющих ключевую роль в активации Cdc42.

### Выводы

Экспрессия FGD1-GFP показала концентрацию искомого протеина, вовлеченного в патогенез синдрома Аарскога, в аппарате Гольджи, плазматической мембране и элементах эндосомального пути. Такое распределение FGD1

указывает на его возможную роль в регуляции процессов транспорта белков и эндоцитоза. Дальнейшее изучение влияния FGD1 на различные транспортные пути открывает широкие

возможности для многостороннего изучения сложных механизмов патогенеза синдрома Аарскога и закладывает основу разработки эффективных методов лечения этой патологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Aarskog D. A familial syndrome of short stature associated with facial dysplasia and genital anomalies // *J. Pediat.* — 1970. — Vol. 77. — P. 856—861.
2. Erickson J.W., Cerione R.A. Multiple roles for Cdc42 in cell regulation // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2001. — Vol. 13. — P. 153—157.
3. Gorski J.L., Estrada L., Hu C., Liu Z. Skeletal-specific expression of Fgd1 during bone formation and skeletal defects in faciogenital dysplasia (FGDY; Aarskog syndrome) // *Dev. Dyn.* — 2000. — Vol. 218. — P. 573—586.
4. Itoh T., Takenawa T. Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling // *Cell Signal.* — 2002. — Vol. 14. — P. 733—743.
5. Izumi G., Sakisaka T., Baba T., Tanaka S., Morimoto K., Takai Y. Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G-proteins through IQGAP1 and actin filaments // *J. Cell Biol.* — 2004. — Vol. 166. — P. 237—248.
6. Linstedt A.D., Hauri H.P. Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa // *Mol. Biol. Cell.* — 1993. — Vol. 4. — P. 679—693.
7. Orrico A., Galli L., Falciani M., Bracci M., Cavaliere M.L., Rinaldi M.M., Musacchio A., Sorrentino V. A mutation in the pleckstrin homology (PH) domain of the FGD1 gene in an Italian family with faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) // *FEBS Lett.* — 2000. — Vol. 478. — P. 216—220.
8. Pasteris N.G., Cadle A., Logie L.J., Porteous M.E., Schwartz C.E., Stevenson R.E., Glover T.W., Wilroy R.S., Gorski J.L. Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor // *Cell.* — 1994. — Vol. 79. — P. 669—678.
9. Prescott A.R., Lucocq J.M., James J., Lister J.M., Ponnambalam S. Distinct compartmentalization of TGN46 and beta-1,4-galactosyltransferase in HeLa cells // *Eur. J. Cell Biol.* — 1997. — Vol. 72. — P. 238—246.

Поступила 16.10.2006 г.