

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АППАРАТА ГОЛЬДЖИ ПРИ СИНДРОМЕ ААРСКОГО – СКОТТА

Егоров М. В., кандидат медицинских наук,
Полищук Р. С.*, кандидат биологических наук

Кафедра патологической анатомии с секционным курсом ГБОУ ВПО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, 153012, Иваново, ул. Ф. Энгельса, д. 8
TIGEM (Telethon Institute of Genetics and Medicine), 80131, Italy, Naples, via Pietro Castellino, 111.

РЕЗЮМЕ Проанализирована ультраструктурная организация аппарата Гольджи модельной клеточной системы при синдроме Аарского – Скотта. Установлено, что дефицит активности FGD1 в патогенезе фациогенитальной дисплазии приводит к структурным изменениям аппарата Гольджи в виде увеличения количества цистерн транс Гольджи компартмента, накоплению тубулярных мембранных профилей и локальных расширений цистерн. Полученные данные подтверждают значение FGD1 в регуляции пост-Гольджи транспорта.

Ключевые слова: синдром Аарского – Скотта, FGD1, аппарат Гольджи, электронная микроскопия.

* Ответственный за переписку (corresponding author): тел.: (4932) 30-02-28

Мутации гена FGD1 (faciogenital dysplasia 1) вызывают множественные аномалии скелета в виде непропорционально короткого роста, син-, полидактилии, а также дефекты урогенитальной системы и задержку умственного развития [2, 3, 5]. Описанная патология известна в специализированной литературе как синдром Аарского – Скотта, или фациогенитальная дисплазия. FGD1 кодирует GEF (guanine exchange factor, фактор обмена гуаниновых нуклеотидов), который специфически активирует ГТФазу CDC42. В свою очередь активная форма CDC42 регулирует множество внутриклеточных процессов, включая организацию цитоскелета, поляризованный транспорт протеинов и т. д. [4]. Наличие в структуре протеина FGD1 PH домейнов, отвечающих за связывание с фосфатидилинозитолами, обеспечивает его концентрацию на мембранах комплекса Гольджи, элементах эндосомальной системы и плазматической мембране. Поскольку дефицит FGD1 вызывает задержку транспорта протеинов на уровне комплекса Гольджи, то представляется весьма интересным оценить организацию этой органеллы на ультраструктурном уровне при отсутствии функционального FGD1.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клеточная культура. Клетки линии HeLa (раковые эпителиальные клетки) и MC3T3-E1 (остеобласты) выращивались в питательной среде DMEM с содержанием 10%-ной эмбриональной сыворотки.

РНК интерференция (RNA interference, RNAi). Последовательности siRNA (Small interfering RNA, 20 мкм) были произведены компанией Dharmacon (CO, USA) и использовались для подавления трансляции гена FGD1. Трансфекция siRNA проводилась с использованием 4-х дуплексов siRNA против человеческого гена FGD1 для линии HeLa и 4-х дуплексов siRNA против мышинного гена FGD1 для линии MC3T3-E1. Через 2 дня после начала эксперимента клетки трансфектировались рекомбинантной ДНК, кодирующей TGN38-HRP.

Электронная микроскопия. После фиксации в 1%-ном глютаральдегиде TGN38-HRP проявлялся с использованием диаминобензидиновой реакции. Образцы постфиксировались OsO₄ и заключались в эпоксидную смолу Epon 812. Ультратонкие срезы были получены с помощью ультрамикротомы UCT («Leica») и анализировались в электронном микроскопе Tecnai 12 («Philips FEI»).

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF CANALICULAR APPARATUS IN AARSKOG – SCOTT SYNDROME

Egorov M. V., Polishchuk R. S.

ABSTRACT Authors analyzed the ultrastructural organization of canalicular apparatus in model cellular system in Aarskog – Scott syndrome. It was determined that FGD1 activity deficiency in the pathogenesis of faciogenital dysplasia resulted in structural alterations of canalicular apparatus namely to the increasing number of cisterns in transcanalicular apparatus compartment, to the accumulation of tubular membrane profiles and cistern local dilation. The data obtained confirmed FGD1 significance in the regulation of postcanalicular apparatus transport.

Key words: Aarskog-Scott syndrome, FGD1, canalicular apparatus, electronic microscopy.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Упаковка и транспорт протеинов от комплекса Гольджи к плазматической мембране включает в себя несколько этапов: 1) формирование тубулярного экспортного домейна в наиболее дистальном компартменте Гольджи, называемом транс-Гольджи-ретикуломом (ТГР); 2) закоривание и вытягивание этого тубулярного мембранного домейна вдоль микротрубочки; 3) отрыв и движение сформированной тубулярной транспортной органеллы (содержащей секреторные протеины) до плазматической мембраны [7]. Как было показано, дефицит FGD1 вызывает задержку выхода из комплекса Гольджи таких протеинов, как трансмембранный VSVG и проколлаген I типа [1]. Чтобы понять, какой этап формирования пост-Гольджи-транспортных органелл контролируется FGD1, клетки трансфектировались TGN38-HRP, который специфично маркирует мембраны ТГР. Ультраструктура комплекса Гольджи оценивалась в контрольных и FGD1-интерферированных клетках. В клетках линии HeLa TGN38 как маркер ТГР определялся в виде преципитата в цистернах стопок Гольджи, в округлых и тубулярных мембранных профилях (рис. 1 а). Дефицит FGD1

(рис. 1 в), вызывает увеличение количества TGN38-позитивных цистерн, тубулярных структур и мембранных пузырьков (рис. 1 б). Обнаруженные нами короткие тубулярные профили наглядно демонстрируют, что формирование тубулярного экспортного домейна в ТГР не нарушается. К примеру, нарушение активности протеинов, регулирующих отщепление тубул от мембран Гольджи, таких как BARS1 или Dynamin, приводит к появлению длинных тубулярных структур [7]. По-видимому, FGD1 регулирует взаимодействие между микротрубочками и формируемыми тубулярными транспортными органеллами, что и определяет накопление и задержку карго на уровне TNG, морфологическим выражением которого является увеличение этого компартмента.

В контрольных остеобластах (клетки линии MC3T3-E1) мы отмечали единичные расширения (дистенжены) в цистернах стэков (рис. 2 а). Выключение FGD1 дуплексами siRNA (рис. 2 в) приводило к появлению множественных расширений даже в пределах одной цистерны. Следует подчеркнуть, что дистенжены в TNG имели большие размеры в сравнении с контрольной группой (рис. 2 а). Задержка транспорта в остеобластах протеинов,

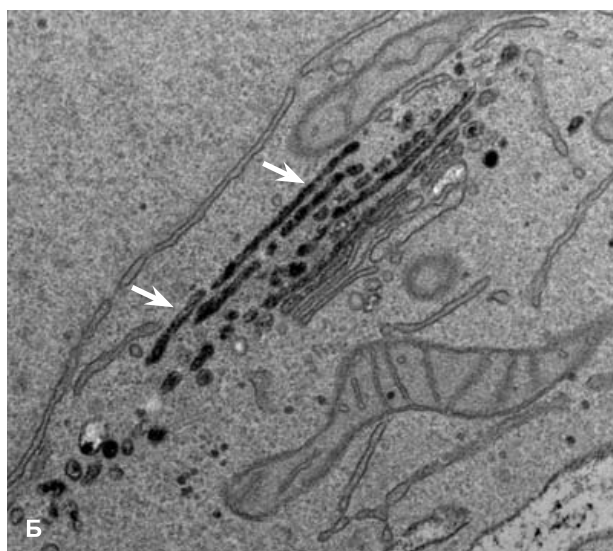
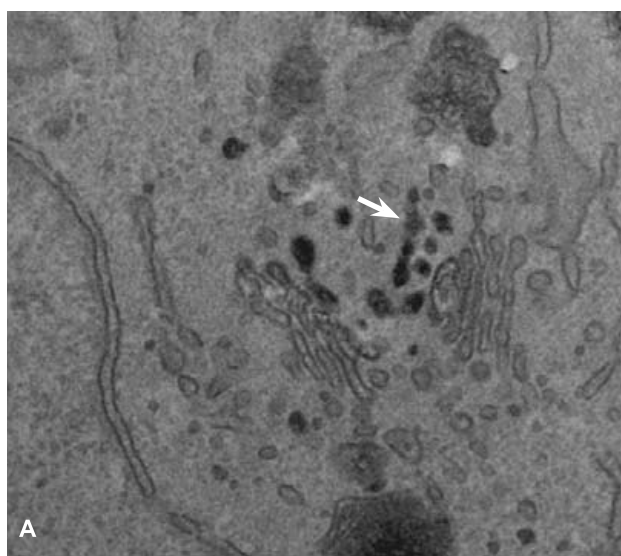
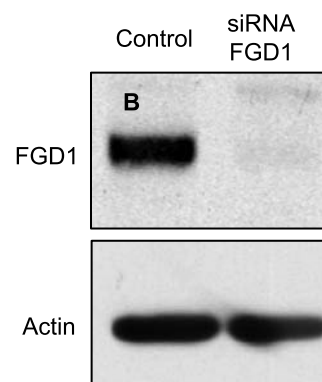


Рис. 1. Клетки HeLa, трансфектированные рекомбинантной ДНК TGN38-HRP:

а – в контрольных клетках TGN (указано чёрными стрелками) представлен в виде округлых профилей и единичных цистерн. ТЭМ ув. 1 x 32000;

б – в клетках, где FGD1 нокаутирован, TGN38 (преципитат чёрного цвета) определяется в просвете нескольких цистерн и округлых профилей (указано чёрными стрелками). ТЭМ ув. 1 x 26000;

в – уровень FGD1 показан с использованием Western blotting в контрольных и клетках трансфектированных с siRNA FGD1.



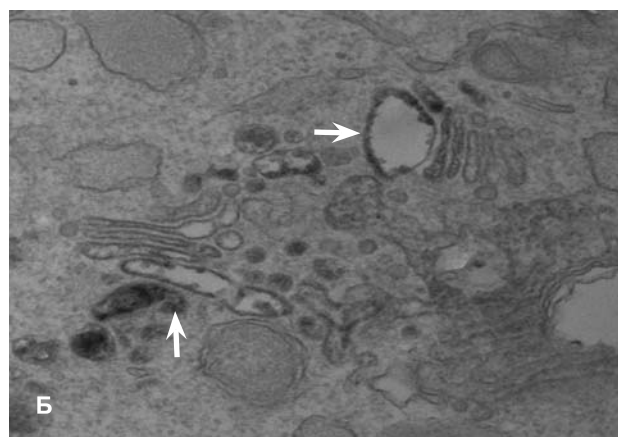
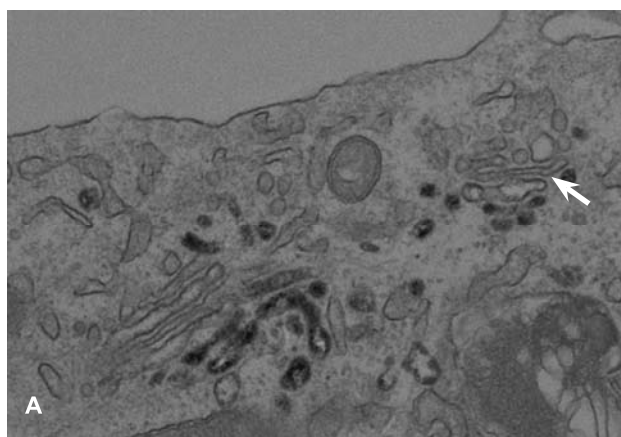
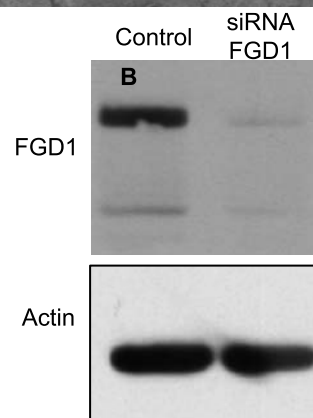


Рис. 2. Клетки MC3T3, трансфектированные рекомбинантной ДНК TGN38-HRP:

а – в контрольных клетках отмечались единичные расширения (дистенжены) в TGN (указано чёрными стрелками). ТЭМ ув. $\times 32000$;

б – в клетках, где FGD1 нокаутирован, в TGN определялись множественные расширения (указано чёрными стрелками). ТЭМ ув. 1×32000 ;

в – уровень FGD1 показан с использованием Western blotting в контрольных и клетках, трансфектированных с siRNA FGD1.



предназначенных для выполнения специализированных функций, таких как проколлаген I типа, остеокальцин и остеоонектин, может приводить к нарушению роста и формирования костей.

ВЫВОДЫ

Таким образом, проведенный нами анализ структурной организации комплекса Гольджи при синдроме Аарскога выявил существенные изменения его транс-компартамента в виде увеличения количества цистерн и появления коротких тубулярных профайлов. В остеобластах мы отмечали увеличение размера и количества дистенженов

в цистернах, что указывает на задержку выхода проколлагена I типа. Следует подчеркнуть, что дефицит активности FGD1 на Гольджи приводит к нарушению формирования транспортных переносчиков на этапе их взаимодействия с элементами цитоскелета. Точный механизм координации между формирующимися тубулярными структурами и цитоскелетом, который, возможно, регулируется FGD1, является предметом будущих исследований. Выявление ключевых регуляторных протеинов в цепи FGD1-зависимого сигнального пути может определить применение «точной» медикаментозной терапии и улучшить качество жизни больных с синдромом Аарскога – Скотта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронцова О. А., Егоров М. В., Полищук Р. С. Мутации гена FGD1, выявленные при синдроме Аарскога, вызывают замедление транспорта белков через секреторный аппарат фибробластов // Материалы научно-практической конференции студентов и молодых ученых ИвГМА «Неделя науки – 2006». – Иваново, 2006. – С. 52–54.
2. Aarskog D. A familial syndrome of short stature associated with facial dysplasia and genital anomalies // J. Pediatr. – 1970. – Vol. 77. – P. 864–861.
3. A mutation in the pleckstrin homology (PH) domain of the FGD1 gene in an Italian family with faciogenital dysplasia (Aarskog – Scott syndrome) / A. Orrico [et al.] // FEBS Lett. – 2000. – Vol. 478. – P. 216–220.
4. Egea G., Lazaro-Dieguez F., Vilella M. Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells // Curr. Opin. Cell. Biol. – 2006. – Vol. 18, № 2. – P. 168–179.
5. Skeletal-specific expression of FGD1 during bone formation and skeletal defects in faciogenital dysplasia (FGDY; Aarskog syndrome) / J. L. Gorski [et al.] // Dev. Dyn. – 2000. – Vol. 218. – P. 573–586.
6. Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog – Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor / N. G. Pasteris [et al.] // Cell. – 1994. – Vol. 79. – P. 669–678.
7. Polishchuk R. S., Capestrano M., Polishchuk E. V. Shaping tubular carriers for intracellular membrane transport. // FEBS Lett. – 2009. – Vol. 583. – P. 3847–3856.