

## Ідентифікація взаємодії переносника жирних кислот білка FABP4 з фосфатазою PTEN

О. М. Горбенко<sup>1</sup>, Д. Панайотоу<sup>2</sup>, Д. Д. Волкова, О. М. Живолуп<sup>1</sup>,  
О. П. Кухаренко<sup>1</sup>, І. Т. Гут<sup>1,3</sup>, В. В. Філоненко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup> Біомедичний науково-дослідницький центр «Олександр Флемінг»  
Варі, Греція

<sup>3</sup> Відділ біохімії і молекулярної біології університетського коледжу в Лондоні  
Лондон, Велика Британія

o.m.gorbenko@imbg.org.ua

---

*PTEN — фосфатаза з протипухлинною активністю, субстратами якої є фосфоліпіди і фосфорильовані білки. Цей білок часто делетований або мутований при багатьох типах раку. Щонайменше 20 % мутацій PTEN знайдено в С-кінцевій ділянці фосфатази. За даними літератури, PTEN також відіграє важливу роль у розвитку стійкості до інсуліну і толерантності до глюкози і відповідно може бути мішенню при лікуванні діабету другого типу та атеросклерозу. Методом двогибридної дріжджової системи з використанням як «байта» С-кінцевого пептиду PTEN при скрининганні кДНК бібліотеки 18-денного ембріона миші ідентифіковано новий PTEN-зв'язувальний партнер — FABP4, який є маркером диференціації адипоцитів. Взаємодію PTEN з FABP4 підтверджено методами статевого злиття клітин дріжджів, преципітацією білкових комплексів in vitro та V1Acore-аналізом білкових взаємодій. На основі отриманих даних зроблено припущення, що фосфатаза PTEN бере участь у регуляції формування жирової тканини через взаємодію з переносником жирних кислот FABP4.*

---

*Ключові слова: PTEN фосфатаза, FABP4, метаболізм ліпідів.*

---

**Вступ.** Ген фосфатази PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) локалізований на хромосомі 10q23 і кодує білок з молекулярною масою близько 54 кДа. N-Кінцева ділянка PTEN містить фосфатазний домен, а в С-кінцевій ділянці розташовані фосфоліпід-зв'язувальний домен C2 і PDZ-зв'язувальний мотив [1]. Досліди, проведені в багатьох лабораторіях, свідчать про те, що PTEN виконує функції пухлинного супресора та має подвійну (ліпідну і протеїнову)

фосфатазні активності [2]. Мутації в гені *pten*, які призводять до втрати фосфатазної активності, відомі при численних типах ракових захворювань людини, включаючи гліобластому, меланому, пухлини ендометрію, рак простати і рак молочної залози [3]. Мутації *pten* також знайдено у пацієнтів з рідкісним автосомальним домінантним гамартонним синдромом, при хворобі Ковдена і синдромі Баннаян-Зонана [4].

Переважає більшість так званих місенс-мутацій PTEN, виявлених у пухлинах, припадає на фосфатазний домен і спричинює втрату фосфатазної активності білка [5]. Досліди на нокаутних

мишах показали, що гомозиготні миші (*pten*<sup>-/-</sup>) гинуть на ранніх стадіях ембріонального розвитку, тоді як гетерозиготні (*pten*<sup>+/-</sup>) спочатку розвиваються без аномалій, але згодом, у дорослому віці у них активно утворюються численні пухлини [6].

Делеція PTEN у гепатоцитах печінки мишей призводить до підвищеного синтезу жирних кислот, що супроводжується гепатомегалією, фенотипом жирової печінки та формуванням пухлин. У гепатоцитах таких мишей спостерігається тенденція до підсиленої відповіді клітин на дію інсуліну і падіння рівня глюкози до фізіологічного рівня [7].

Досліди на мишах з тканинспецифічною делецією PTEN у м'язах показали, що вона захищає мишей від розвитку стійкості до інсуліну і діабету [8]. Тканинспецифічна делеція PTEN у жировій тканині також викликає зростання чутливості до інсуліну з прискореним всмоктуванням глюкози. У таких мишей відмічено пригнічення глікогеногенезу завдяки підвищеній активності AMP-кінази в печінці, що пояснюють зниженим рівнем продукції резистину в жировій тканині [9]. Експресія резистину, в свою чергу, асоційована з формуванням стійкості до інсуліну [10].

Отже, PTEN може бути потенційною мішенню не лише при терапії новоутворень, але й при лікуванні діабету другого типу та атеросклерозу.

Біохімічні дослідження фосфатази PTEN виявили, що вона, на відміну від більшості членів родини протеїнових тирозинових фосфатаз, утилізує фосфоінозитидний вторинний месенджер фосфатидилінозитолтрифосфат як фізіологічний субстрат, тобто демонструє подвійну (ліпідну і протеїнову) фосфатазну активність [11].

Фосфатидилінозитолтрифосфати відіграють важливу роль в активації PI3K/PDK1/Akt-залежного сигнального шляху, залученого до регуляції клітинного росту і розвитку [12]. Відповідно PTEN виконує функції негативного регулятора PI3K-залежного сигналювання за рахунок дефосфорилування продуктів активності PI3-кінази PtdIns-3,4-P2 і PtdIns-3,4,5-P3. Мутації, які блокують функцію PTEN, призводять до різкого зростання рівня PtdIns-3,4,5-P3 в клітинах і постійної активації Akt у сигнальному шляху, що, в свою чергу, веде до прискорення клітинної проліферації, інгібування апоптозу, гіперплазії і формування пухлин [13].

Фосфатаза PTEN має, крім ліпідної, ще й білкову тирозинову активність, для якої відомими субстратами є кіназа фокальної адгезії (FAK) та

адаптерний білок (Shc), що дефосфорилуються PTEN *in vitro* [14, 15]. Вважають, що дефосфорилування FAK і Shc є засобом пригнічення клітинної моторики фосфатазою PTEN.

Точного механізму протипухлинної активності і регуляції PTEN поки що не встановлено, але існують численні дослідження, які свідчать про важливу роль фосфорилування С-кінцевої ділянки PTEN у регуляції її активності. Протеїнкіназа CK2 і кіназа глікогенової синтази 3β (GSK3β) фосфорилують С-кінцеву ділянку PTEN, впливаючи у такий спосіб на стабільність і активність фосфатази [16].

З іншого боку, один із відомих партнерів фосфатази PTEN білок PICT-1, який кодується геном *GLTSCR2*, потенційним геном-супресором, взаємодіє з С-кінцевим доменом фосфатази і впливає на фосфорилування, стабільність і активність PTEN [17].

Серед інших відомих білків — партнерів PTEN можна назвати асоційовані з мембраною гуанілаткінази 1, 2 і 3 (MAGI-1, 2, 3). MAGI зв'язуються з PTEN за допомогою власних PDZ-доменів, запобігають його деградації і, таким чином, підсилюють здатність PTEN пригнічувати активацію Akt [18–20].

Новий зв'язувальний білок — партнер фосфатази PTEN — AEBP1 знайдено в нашій лабораторії при скринуванні кДНК бібліотеки раку кишечника методом двогибридної дріжджової системи [21]. За даними літератури, AEBP1 є транскрипційним фактором з карбоксипептидазною активністю, функція його пов'язана з передачею сигналу і ліпідним метаболізмом [22]. У трансгенних мишей з надекспресованим AEBP1 розвивається масивне ожиріння при високожировій дієті, для них характерним є зниження експресії PTEN, що супроводжується гіперактивацією клітинного виживання. Показано, що взаємодія PTEN з AEBP1 призводить до деградації PTEN [23].

У цьому повідомленні представлено дані скринування кДНК-бібліотеки 18-денного ембріона миші з використанням С-кінцевої ділянки PTEN як «байта». В результаті скринування нами ідентифіковано шість клонів, які містили послідовність кДНК для білка FABP4 (переносника жирних кислот). Виявлену взаємодію підтверджено в дріжджах методом статевого злиття клітин дріжджів та преципітацією білкових комплексів *in vitro*, а також за допомогою VІАсоге (біосенсор плазмонного резонансу поверхні) аналізу.

**Матеріали і методи.** Двогібридна дріжджова система. В роботі використано двогібридну дріжджову систему DupLexATM, розроблену OriGene Technologies Inc. (США). Клонування «байт»-конструкцій, трансформацію і селекцію рекомбінантних клонів, перевірку «байта» на здатність до самоактивації системи і транслокації до ядра, скринування бібліотеки і виявлення позитивних клонів, а також статеве злиття дріжджів проводили, як описано раніше [21].

**Клонування, експресія і очищення рекомбінантних білків у клітинах *Escherichia coli*.** Послідовності кДНК, відповідні повнорозмірним білкам FABP4 миші і людини, ампліфікували за допомогою ПЛР та клонували у вектори *pGEX4T1* і *pET28a* по сайтах рестрикції *BamHI* і *XhoI*. Отриманими плазмідами трансформували клітини *E. coli* BL21 (LysE), а експресію рекомбінантних білків індукували 1 мМ IPTG протягом 3 год за температури 28 °С. Білки GST-FABP4 і (His)<sub>6</sub>-FABP4 афінно очищували за нативних умов з використанням глутатіон-сефарози («Amersham», Велика Британія) і Ni-NTA-агарози («Qiagen», Німеччина) відповідно, згідно з рекомендаціями виробника. Якість і гомогенність очищених білків аналізували за допомогою гелі-електрофорезу в ПААГ-ДСН.

**Клонування, експресія і очищення рекомбінантного PTEN з використанням бакуловірсної системи експресії білків *Vac-to-Vac*.** Послідовність кДНК, яка відповідає білку PTEN дикого дипу, ампліфікували за допомогою ПЛР та клонували у вектор *pFASTHTb* по сайтах рестрикції *BamHI* і *EcoRI*. Гомологічну рекомбінацію послідовності PTEN у бакміді здійснювали трансформацією бактеріальних клітин MAX Efficiency DH10Bac<sup>TM</sup>. Бакмідну ДНК ізолювали за допомогою S.N.A.P.<sup>TM</sup> MidiPrep Kit («Invitrogen», Велика Британія). Вірусний сток отримували трансфекцією клітин комах Sf9 бакмідною ДНК за допомогою селфектину («Invitrogen»). Клітини Sf9 інфікували вірусним стоком у концентрації не менше 10<sup>7</sup> фагових частинок в 1 мл. Інфіковані клітини збирали через 96 год, руйнували в буфері (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, 300 мМ імідазол, рН 8,0) і рекомбінантний PTEN афінно очищували на NiNTA-агарозі згідно з рекомендаціями виробника.

**Культивування і диференціація адипоцитів.** Недиференційовані преадипоцити клітинної лінії NIH 3T3L1 культивували на чашках Петрі в середовищі DMEM, яке містило 10 % ДСТ (донорська

сироватка телят) і 1 % пеніциліну-стрептоміцину, до стану конфлюентності. Диференціацію клітин ініціювали через два дні після досягнення адипоцитами конфлюентності, замінюючи середовище на DMEM з 0,5 мкМ дексаметазоном, 0,5 мкМ 3-ізобутил-1-метилксантином, 170 нМ інсуліном і 10 % ЕСБ (ембріональна сироватка бика). Клітини руйнували в стандартному буфері (50 мМ трис-HCl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 100 мМ NaF, 2 мМ NaVO<sub>3</sub>, 2 %-й тритон X-100, 1 мМ фенілметилсульфонілфлюорид) з додаванням інгібіторів протеаз («Roche Molecular Diagnostics», Франція). Лізис клітин проводили протягом кожного з 8 днів після індукції диференціації.

**Вестерн-блот аналіз.** Лізати диференційованих і недиференційованих адипоцитів (30 мкг) розділяли електрофорезом у градієнтному (7—22 %) ПААГ-ДСН і переносили на мембрану Immobilon-P («Millipore», США). Мембрану блокували 0,5 %-ю желатиною в PBS-T (фосфатний буфер, рН 7,3, з додаванням 0,5 % твіну-20) протягом 1 год за кімнатної температури та інкубували з моноклональними антитілами проти PTEN («Cell Signaling», США), проти FABP4 або GST, отриманих в нашій лабораторії [24]. При аналізі залежності рівня експресії PTEN і FABP4 від дня диференціації антиактинові антитіла («Santa Cruz», США) використовували для контролю еквівалентності концентрацій білка на доріжках. Вторинними антитілами слугували козячі антимишачі IgG у розведенні 1:5000 («Promega», США). Мембрану візуалізували за допомогою посиленої хемілюмінесценції на радіографічній плівці OHKO RP-1C (МПТВП «ОНІКО», Україна).

**BIACore.** Аналіз проводили за стандартним методом [25]. Рекомбінантний PTEN, експресований у клітинах комах, іммобілізували на біочіпі (CM-5, BIAcore AB), зв'язуючи аміногрупи з активованими карбоксигрупами чіпа з використанням 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіїміду гідрохлориду (EDCI) і N-гідроксисукциніміду (NHS), щоб отримати не менше 12000 резонансних юнітів. На окремі чіпи також іммобілізували рекомбінантні білки GST-FABP4 і (His)<sub>6</sub>-FABP4 для негативного контролю. Всі експерименти здійснювали в буфері, що містив 20 мМ HEPES, рН 7,4, 150 мМ NaCl, 3,4 мМ ЕДТА, 0,005 %-й твін-20, 4 мМ ДТТ. Різні концентрації BSA (бичачий сироватковий альбумін), GST-FABP4 і (His)<sub>6</sub>-FABP4 наносили на поверхні з іммобілізованим PTEN та на контрольні

поверхні при швидкості потоку 10 мл/хв за температури 25 °С. Графік залежності відносної відповіді від концентрації білка будували з урахуванням відповідей від контрольних поверхонь. Рівноважну константу дисоціації вираховували за рівнянням  $R = R_{\max} \cdot C / (K_D + C)$ , де  $R$  — відповідь при рівновазі;  $R_{\max}$  — максимальна відповідь;  $C$  — концентрація білка.

**Преципітація білкових комплексів.** Розчинну фракцію бактеріальних лізатів (300 мкл) з індукцією експресії рекомбінантних GST-FABP4 миші і людини, а також GST для негативного контролю інкубували в 1 мл PBS, рН 7,4, з 30 мкл глутатіон-сефарози протягом 1 год. Далі сефарозу відмивали тричі в PBS та додавали до неї по 500 мкг лізатів адипоцитів 9-го дня диференціації. Зв'язування тривало ніч при перемішуванні за температури 4 °С. Наступного дня сефарозу відмивали п'ять разів в PBS, розділяли в градієнтному (7–22 %) ПААГ-ДСН гелі, переносили на мембрану і аналізували за допомогою моноклональних антитіл проти PTEN і GST методом Вестерн-блоту.

**Результати і обговорення.** Для скринування кДНК бібліотеки 18-денного ембріона миші нами використано «байт»-конструкцію, що містила лише С-кінцевий фрагмент PTEN, до складу якого входили С2-домен і PDZ-мотив. Секвенування кДНК відібраних позитивних клонів з наступним пошуком гомологій в базах даних GenBank дозволило ідентифікувати декілька нуклеотидних послідовностей. Шість із них кодували фрагменти білка FABP4: чотири — фрагмент FABP4, починаючи з 30-го амінокислотного залишку (а. з.) (три довжиною 550 п. н. і один — 400 п. н.), а кДНК двох інших — пептид, починаючи з 13-го а. з. (довжиною 500 п. н.) Специфічність ідентифікованих клонів підтверджено методом статевого злиття дріжджів.

FABP4 (переносник жирних кислот), відомий також як aP2-білок, належить до родини цитоплазматичних білків з молекулярною масою близько 15 кДа, здатних зв'язувати гідрофобні ліганди з високою афінністю [26]. Значний рівень експресії FABP4 знайдено в адипоцитах і макрофагах [27]. Експресія FABP4 чітко контролюється під час формування жирової тканини та у відповідь на метаболічні гормони, такі як інсулін і епінефрин [28]. Досліди різних лабораторій свідчать, що FABP4 залучений до транспорту вільних жирних кислот у різні компартменти клітини і в такий спосіб моду-

лює внутрішньоклітинний метаболізм ліпідів. Жирні кислоти впливають на експресію FABP4 на рівні транскрипції через зворотню позитивну петлю регуляції. Ця регуляція опосередкована участю PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) та його агоністів [29].

З іншого боку, відомо, що FABP4 взаємодіє з HSL (чутлива до гормонів ліпаза) і ця взаємодія відбувається лише за умов попереднього формування комплексу FABP4—жирна кислота. Активація HSL і індукція ліполізу є функціональними наслідками взаємодії HSL—FABP4—жирна кислота [30]. Зв'язування жирної кислоти з FABP4 залежить від конформаційних змін, опосередкованих фосфорилуванням Tyr19 тирозиною кіназою інсулінового рецептора [31].

Досліди на нокаутних і трансгенних мишах свідчать про важливу роль FABP4 і PTEN у механізмах, відповідальних за стійкість до інсуліну, розвиток метаболічного синдрому та, як результат, розвиток діабету типу II і атеросклерозу. Генетична нестача FABP4 у мишей робить останніх значною мірою захищеними від розвитку стійкості до інсуліну за високожирової дієти [32]. Подібні результати отримано при інгібуванні PTEN антисенсовими олігонуклеотидами, в результаті чого у діабетних мишей зникала гіперглікемія і зростала чутливість до інсуліну [33]. Цікавим є той факт, що рівень експресії FABP4 при тканиноспецифічній делеції PTEN у печінці значно підвищений порівняно з контролем [34].

Таким чином, на сьогодні існує достатньо експериментальних свідчень існування фізіологічного зв'язку між PTEN і FABP4, однак, яким чином цей зв'язок здійснюється і в чому саме полягає, невідомо. Ідентифікування FABP4 як PTEN-зв'язувального білка є першим доказом можливості безпосередньої взаємодії між цими білками в клітині. Щоб підтвердити існування взаємодії PTEN і FABP4, нами перевірено здатність цих білків до комплексоутворення *in vitro* на рівні рекомбінантних білків. Білково-білкові взаємодії аналізували за допомогою ВіАсоге і методом преципітації білкових комплексів.

У першому випадку використовували афінно очищені рекомбінантні білки. Рекомбінантний PTEN експресували в клітинах комах лінії Sf9 за допомогою бакуловірусної конструкції PTEN дико-го типу. Рекомбінантні (His) $_6$ -FABP4 і GST-FABP4 експресували в бактеріальних клітинах *E. coli* BL21

LysE. Реконбінантні білки PTEN і GST-FABP4 для контролю неспецифічного зв'язування іммобілізували на сенсорному чіпі в різних концентраціях. Формування специфічних білкових комплексів реєстрували, як це викладено в «Матеріалах і методах», додаючи різні кількості (His)<sub>6</sub>-FABP4, GST-FABP4 і BSA. Аналіз сенсограми чітко демонструє, що реконбінантні FABP4 специфічно взаємодіють з іммобілізованим PTEN. Зв'язування BSA з іммобілізованим реконбінантним PTEN не спостерігали. Незначну неспецифічну взаємодію відмічено при додаванні GST-FABP4 до іммобілізовано-

го на чіпі GST-FABP4. Подібні результати можна пояснити утворенням димерів між GST ділянками реконбінантних білків. Для комплексу (His)<sub>6</sub>-FABP4 з PTEN розраховано рівноважну константу дисоціації, яка становить близько 2,8 мкМ. Графік залежності ступеня поверхневого резонансу від білкової концентрації з урахуванням контролів наведено на рис. 1.

На користь існування взаємодії між PTEN і FABP4 вказують також результати преципітації білкових комплексів реконбінантних і нативних білків. Для цього білки GST-FABP4 і GST іммобілізували на глутатіон-сефарозі з наступною інкубацією з лізатами диференційованих адипоцитів. Дані Вестерн-блот аналізу преципітованих на сефарозі білків за допомогою моноклональних антитіл проти PTEN і GST свідчать про існування специфічної взаємодії ендогенної PTEN з диференційованих адипоцитів з реконбінантним GST-FABP4 миші (рис. 2).

З огляду на те, що, як уже зазначалося, рівень експресії FABP4 змінюється під час формування жирової тканини, а саме — збільшується в процесі диференціації адипоцитів, ми порівняли рівні експресії FABP4 і PTEN в адипоцитах на різних стадіях диференціювання. Результати, наведені на рис. 3, вказують на існування чіткої кореляції між ними. Найвищі рівні експресії для обох білків виявлено на 8-й день після індукції диференціювання адипоцитів.

Таким чином, спираючись на літературні і отримані нами дані, можна припустити, що специфічна взаємодія між PTEN і FABP4 є важливою ланкою в сигнальному шляху регуляції формування і нормального розвитку жирової тканини. Точний спосіб і біологічне значення подібної взаємодії

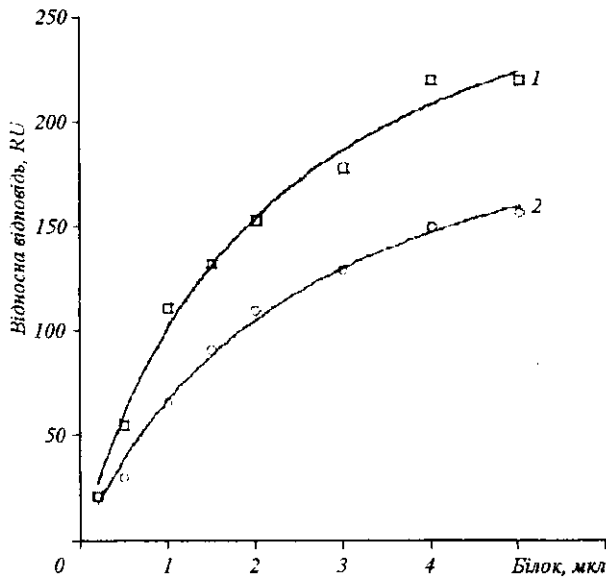


Рис. 1. ВіАсоге-аналіз взаємодії PTEN з FABP4. Графік залежності ступеня поверхневого резонансу від взаємодії різних концентрацій (His)<sub>6</sub>-FABP4 (1) і GST-FABP4 (2) з іммобілізованим на чіпі PTEN. Концентрації білків: GST-FABP4 — 1 мкг/мл; (His)<sub>6</sub>-FABP4 — 2 мкг/мл

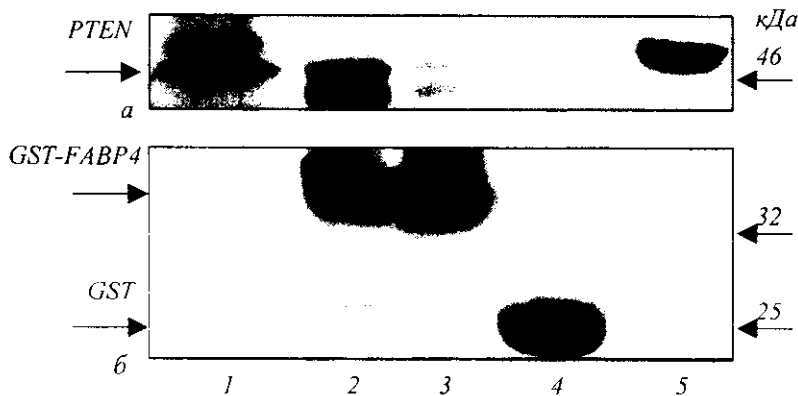


Рис. 2. Аналіз утворення білкового комплексу ендогенної PTEN з GST-FABP4 миші і людини. Вестерн-блот-аналіз білкових комплексів, преципітованих на глутатіон-сефарозі за присутності GST-FABP4 білків і лізату 3T3L1 з використанням анти-PTEN (а) та анти-GST (б) антитіл: 1 — розчинна фракція лізату диференційованих адипоцитів клітинної лінії NIH 3T3L1; 2 — GST-FABP4 миші і лізат 3T3L1; 3 — GST-FABP4 людини і лізат 3T3L1; 4 — GST і лізат 3T3L1; 5 — реконбінантна PTEN дикого типу

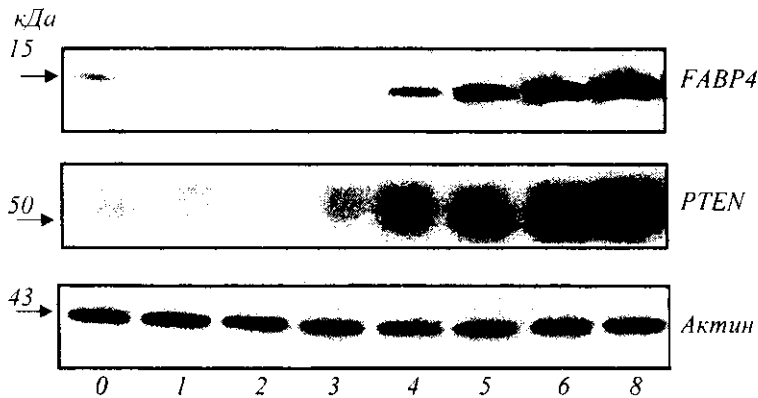


Рис. 3. Вестерн-блот аналіз експресії FABP4 і PTEN у лізатах адипоцитів на різних етапах диференціювання. Доріжки 0–8 відповідають лізатам клітин на 0–8-й день диференціювання

*in vivo* поки що лишаяються нез'ясованими, але, як впливає з аналізу активностей обох білків, можна передбачити механізм взаємодії PTEN і FABP4.

Відомо, що FABP4 фосфорилується по залишку Tyr19 тирозиною кіназою інсулінового рецептора, причому рівень фосфорилування суттєво підвищується при утворенні комплексу FABP4—жирна кислота [35]. Це пояснюють конформаційними змінами фосфорильованої молекули, в результаті яких Tyr19, що знаходиться в порожнині білкової молекули, стає доступним для тирозинової кінрази. З іншого боку, фосфорильований FABP4 втрачає спорідненість до жирних кислот і має бути дефосфорильованим для відновлення його активності [36]. Відповідно можна зробити припущення, що в дефосфорильованні FABP4 бере участь фосфатаза PTEN, яка має протейнову тирозинову активність і для якої встановлено низку тирозин-фосфорильованих білкових субстратів *in vivo*. Ми сподіваємося, що подальші досліді з використанням стабільних клітинних ліній, у яких надекспресовано PTEN і/або FABP4, допоможуть детальніше дослідити механізми регуляції диференціації адипоцитів при утворенні нормальної жирової тканини і визначити роль взаємодії PTEN з FABP4.

Роботу підтримано Федерацією європейських біохімічних товариств (FEBS) та Європейською молекулярно-біологічною організацією (EMBO), що дозволило Олені Горбенко провести частину виконаних дослідів в Університетському коледжі Лондона (Велика Британія).

O. M. Gorbenko, D. Panayotou, D. D. Volkova, O. M. Zhyvoloup, O. P. Kukhareenko, I. T. Gout, V. V. Filonenko

Interaction of fatty acid transporting protein FABP4 with phosphatase PTEN

Summary

PTEN is a tumour suppressor protein with dual protein and lipid

phosphatase activity, which is frequently deleted or mutated in many advanced cancers. At least 20 % of its mutations are found in C-terminal domain of the phosphatase. Recent studies show that PTEN also plays an important role in the development of insulin resistance and glucose tolerance, thus it may be an important target in the diabetes 2 type and atherosclerosis treatment. Using C-terminal fragment of PTEN as a bait in yeast two-hybrid screening cDNA library of 18-day mouse embryo a novel PTEN binding protein — FABP4, which is a marker of adipocyte differentiation, has been identified. PTEN-FABP4 interaction was confirmed by mating assay, *in vitro* pull-down assay and BIAcore analysis. Our results show that PTEN phosphatase may be involved into regulation of adipose tissue formation through the interaction with fatty acid transporter FABP4.

Key words: PTEN phosphatase, FABP4, lipid metabolism.

Е. Н. Горбенко, Д. Панайоту, Д. Д. Волкова, А. М. Живолуп, А. П. Кухаренко, И. Т. Гут, В. В. Филоненко

Идентификация взаимодействия переносчика жирных кислот белка FABP4 с фосфатазой PTEN

Резюме

PTEN — фосфатаза с противоопухолевой активностью, субстратами которой являются фосфолипиды и фосфорильованные белки. Этот белок часто мутирован или делетирован во многих типах опухолей. Не менее 20 % мутаций PTEN находятся в С-концевой области фосфатазы. По данным литературы, PTEN также играет важную роль в развитии устойчивости к инсулину и толерантности к глюкозе, что делает его перспективной мишенью при лечении диабета второго типа и атеросклероза. Методом двугибридной дрожжевой системы, используя в качестве «байта» С-концевой пептид PTEN, при скринировании кДНК библиотеки 18-дневного мышинного эмбриона идентифицирован новый PTEN-связывающий партнер — FABP4, являющийся маркером дифференциации адипоцитов. Взаимодействие PTEN с FABP4 подтверждено в дрожжах методом полового слияния клеток и преципитацией белковых комплексов *in vitro*, а также BIAcore-анализом белковых взаимодействий. На основании полученных данных сделано предположение, что фосфатаза PTEN участвует в регуляции формирования жировой ткани за счет взаимодействия с переносчиком жирных кислот FABP4.

Ключевые слова: PTEN фосфатаза, FABP4, метаболизм липидов.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Goberdhan D. C. I., Wilson C. PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more // Hum. Mol. Gen.—2003.—12.—P. 239—248.

2. Simpson L., Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor // *Exp. Cell Res.*—2001.—264.—P. 29—41.
3. Eng C. PTEN: one gene, many syndromes // *Hum. Mutat.*—2003.—22.—P. 183—198.
4. Marsh D. J., Coulon V., Lunetta K. L., Rocca-Serra P., Dahia P. L., Zheng Z., Liaw D., Caron S., Duboue B., Lin A. Y., Richardson A. L., Bonnetblanc J. M., Bressieux J. M., Cabarrot-Moreau A., Chompret A., Demange L., Eeles R. A., Yahanda A. M., Fearon E. R., Fricker J. P., Gorlin R. J., Hodgson S. V., Huson S., Lacombe D., Eng C. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation // *Hum. Mol. Genet.*—1998.—7.—P. 507—515.
5. Myers M. P., Pass I., Batty I. H., Van der Kaay J., Stolarov J. P., Hemmings B. A., Wigler M. H., Downes C. P., Tonks N. K. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1998.—95.—P. 13513—13518.
6. Suzuki A., de la Pompa J. L., Stambolic V., Elia A. J., Sasaki T., del Barco Barrantes I., Ho A., Wakeham A., Itie A., Khoo W., Fukumoto M., Mak T. W. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice // *Curr. Biol.*—1998.—22.—P. 1169—1178.
7. Stiles B., Wang Y., Stahl A., Bassilian S., Lee W. P., Kim Y. J., Sherwin R., Devaskar S., Lesche R., Magnuson M. A., Wu H. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity [corrected] // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2004.—101.—P. 2082—2087.
8. Wijesekara N., Konrad D., Eweida M., Jefferies C., Liadis N., Giacca A., Crackower M., Suzuki A., Mak T. W., Kahn C. R., Klip A., Woo M. Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes // *Mol. Cell. Biol.*—2005.—25.—P. 1135—1145.
9. Kurlawalla-Martinez C., Stiles B., Wang Y., Devaskar S. U., Kahn B. B., Wu H. Insulin hypersensitivity and resistance to streptozotocin-induced diabetes in mice lacking PTEN in adipose tissue // *Mol. Cell. Biol.*—2005.—25.—P. 2498—2510.
10. Chen X. D., Lei T., Xia T., Gan L., Yang Z. Q. Increased expression of resistin and tumour necrosis factor- $\alpha$  in pig adipose tissue as well as effect of feeding treatment on resistin and cAMP pathway // *Diabetes Obes. Metab.*—2004.—6.—P. 271—279.
11. Maehama T., Dixon J. E. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase // *Trends Cell. Biol.*—1999.—9.—P. 125—128.
12. Sun H., Lesche R., Li D. M., Liliental J., Zhang H., Gao J., Gavrilova N., Mueller B., Liu X., Wu H. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate and Akt/protein kinase B signalling pathway // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1999.—96.—P. 6199—6204.
13. Stambolic V., Suzuki A., de la Pompa J. L., Brothers G. M., Mirtsos C., Sasaki T., Ruland J., Penninger J. M., Siderovski D. P., Mak T. W. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN // *Cell.*—1998.—95.—P. 29—39.
14. Tamura M., Gu J., Danen E. H., Takino T., Miyamoto S., Yamada K. M. PTEN interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway // *J. Biol. Chem.*—1999.—274.—P. 20693—20703.
15. Gu J., Tamura M., Pankov R., Danen E. H., Takino T., Matsumoto K., Yamada K. M. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN // *J. Cell. Biol.*—1999.—146.—P. 389—403.
16. Al-Khouri A. M., Ma Y., Togo S. H., Williams S., Mustelin T. Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3 $\beta$  // *J. Biol. Chem.*—2005.—280.—P. 35195—35202.
17. Okahara F., Ikawa H., Kanaho Y., Maehama T. Regulation of PTEN phosphorylation and stability by a tumor suppressor candidate protein // *J. Biol. Chem.*—2004.—279.—P. 45300—45303.
18. Valiente M., Andres-Pons A., Gomar B., Torres J., Gil A., Tapparel C., Antonarakis S. E., Pulido R. Binding of PTEN to specific PDZ domains contributes to PTEN protein stability and phosphorylation by microtubule-associated serine/threonine kinases // *J. Biol. Chem.*—2005.—280.—P. 28936—28943.
19. Wu X., Hepner K., Castelino-Prabhu S., Do D., Kaye M. B., Yuan X. J., Wood J., Ross C., Sawyers C. L., Whang Y. E. Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2000.—97.—P. 4233—4238.
20. Wu Y., Dowbenko D., Spencer S., Laura R., Lee J., Gu Q., Lasky L. A. Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase // *J. Biol. Chem.*—2000.—275.—P. 21477—21485.
21. Gorbenko O., Kuznetsov V., Kukhareno O., Zhyvoloup A., Panasyuk G., Nemazanyy I., Filonenko V., Gout I. Identification of a novel binding partners for tumor suppressor PTEN by a yeast two-hybrid approach // *Eksp. Onkol.*—2004.—26.—P. 15—19.
22. Muise A. M., Ro H. S. Enzymic characterization of a novel member of the regulatory B-like carboxypeptidase with transcriptional repression function: stimulation of enzymic activity by its target DNA // *Biochem. J.*—1999.—343.—P. 341—345.
23. Zhang L., Reidy S. P., Nicholson T. E., Lee H. J., Majdalawieh A., Webber C., Stewart B. R., Dolphin P., Ro H. S. The role of AEBP1 in sex-specific diet-induced obesity // *Mol. Med.*—2005.—Nov. 23. [Epub. ahead of print].
24. Gorbenko O., Filonenko V., Gout I. Generation and characterization of monoclonal antibodies against FABP4 // *Hybridoma.*—2006.—25.—P. 86—90.
25. Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B., Johnsson B., Karlsson R., Lundh K., Lofas S., Persson B., Roos H., Ronnberg I., Sjolander S., Stenberg E., Stahlberg R., Urbaniczky C., Ostlin H., Malmquist M. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology // *Biotechniques.*—1991.—11.—P. 620—627.
26. Xu Z., Buelt M. K., Banaszak L. J., Bernlohr D. A. Expression, purification, and crystallization of the adipocyte lipid binding protein // *J. Biol. Chem.*—1991.—266.—P. 14367—14370.
27. Fu Y., Luo N., Lopes-Virella M. F., Garvey W. T. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages // *Atherosclerosis.*—2002.—165.—P. 259—269.
28. Fisher R. M., Thorne A., Hamsten A., Arner P. Fatty acid binding protein expression in different human adipose tissue depots in relation to rates of lipolysis and insulin concentration

- in obese individuals // *Mol. Cell. Biochem.*—2002.—239.—P. 95—100.
29. Amri E. Z., Bertrand B., Ailhaud G., Grimaldi P. Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression // *J. Lipid Res.*—1991.—32.—P. 1449—1456.
30. Jenkins-Kruchten A. E., Bennaars-Eiden A., Ross J. R., Shen W. J., Kraemer F. B., Bernlohr D. A. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding // *J. Biol. Chem.*—2003.—278.—P. 47636—47643.
31. Hresko R. C., Hoffman R. D., Flores-Riveros J. R., Lane M. D. Insulin receptor tyrosine kinase-catalyzed phosphorylation of 422(aP2) protein. Substrate activation by long-chain fatty acid // *J. Biol. Chem.*—1990.—265.—P. 21075—21085.
32. Scheja L., Makowski L., Uysal K. T., Wiesbrock S. M., Shimshek D. R., Meyers D. S., Morgan M., Parker R. A., Hotamisligil G. S. Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2-/-mice // *Diabetes.*—1999.—48.—P. 1987—1994.
33. Butler M., McKay R. A., Popoff I. J., Gaarde W. A., Wittchell D., Murray S. F., Dean N. M., Bhanot S., Monia B. P. Specific inhibition of PTEN expression reverses hyperglycemia in diabetic mice // *Diabetes.*—2002.—51.—P. 1028—1034.
34. Horie Y., Suzuki A., Kataoka E., Sasaki T., Hamada K., Sasaki J., Mizuno K., Hasegawa G., Kishimoto H., Iizuka M., Naito M., Enomoto K., Watanabe S., Mak T. W., Nakano T. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas // *J. Clin. Invest.*—2004.—113.—P. 1774—1783.
35. Buelt M. K., Shekels L. L., Jarvis B. W., Bernlohr D. A. *In vitro* phosphorylation of the adipocyte lipid-binding protein (p15) by the insulin receptor. Effects of fatty acid on receptor kinase and substrate phosphorylation // *J. Biol. Chem.*—1991.—266.—P. 12266—12271.
36. Buelt M. K., Xu Z., Banaszak L. J., Bernlohr D. A. Structural and functional characterization of the phosphorylated adipocyte lipid-binding protein (pp15) // *Biochemistry.*—1992.—31.—P. 3493—3499.