

IZOFORMY I IZOTYPY BIAŁEK Rab W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH I ZWIERZĘCYCH*

ISOFORMS AND ISOTYPES OF Rab PROTEINS IN PLANT AND ANIMAL CELLS

Magdalena OSIŃSKA, Kamil KOBYLECKI, Jolanta WIEJAK,
Elżbieta WYROBA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
PAN, Warszawa

Streszczenie: W tym artykule opisano wybrane białka Rab z ośmiu ich podrodzin (Rab1, Rab3, Rab4, Rab5, Rab6, Rab7, Rab9 and Rab11) z różnych typów komórek. Szeroki przegląd literatury pozwolił zebrać informacje dotyczące ekspresji i lokalizacji kilkudziesięciu izoform i izotypów Rab – produktów paralogicznych genów będących wynikiem duplikacji genomów. Są one zaangażowane w endo- i egzocytozie, transporcie między poszczególnymi kompartmentami, przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych, proliferacji i różnicowaniu dzięki oddziaływaniu z różnymi efektorami i białkami motorycznymi. Izoformy i izotypy niektórych białek Rab współdziałają w regulacji tych procesów, podczas gdy inne wykazują odmienne funkcje, często zależne albo od typu komórek albo od fazy cyklu życiowego, jak w przypadku gatunków pasożytniczych, w których występują ponadto znaczne zmiany w strukturze Rab GTPaz opisane przez wielu autorów. Wielka ekspansja białek Rab związana jest z różnorodnością szlaków transportu wewnątrzkomórkowego, co przedyskutowano w aspekcie ewolucyjnym. Szczególną uwagę poświęcono Rab7 ze względu na jego rolę w neuropatiach i zaburzeniach metabolicznych. Co ciekawe, u roślin funkcje poszczególnych białek Rab są odmienne niż w innych typach komórek, co dotyczy przede wszystkim Rab3, Rab7 i Rab11.

Słowa kluczowe: białka Rab, izoformy, izotypy, ekspresja, endocytoza, egzocytoza, lokalizacja, funkcje, neuropatie, zaburzenia metaboliczne, pasożyty.

Summary: The selected members of Rab subfamilies (Rab1, Rab3, Rab4, Rab5, Rab6, Rab7, Rab9 and Rab11) from different cell types were described in this review. Extensive search of literature enabled to collect the data on expression and localization of many Rab isoforms and Rab isotypes – products of paralogous genes deriving from duplication events. They are involved in endo- and exocytosis, transport, signaling, proliferation and differentiation interacting with the specific effectors and motor proteins. Isoforms and isotypes of some Rab proteins were found to cooperate in the regulation of these processes, whereas others have distinct functions that may be correlated either with the cell type or with the life

*Badania autorów pracy finansowane z projektów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego 2 P04A 020 29 i N N301 256836.

cycle stage as in the case of parasitic species in which some peculiarities both in the structure and function of their respective Rab GTP-ases were observed by many authors. A great expansion of Rabs is correlated with diversification of trafficking machinery and some evolutionary aspects are discussed. Involvement of Rab7 GTPases in neuropathies and metabolic disorders was emphasized. Interestingly, distinct functions of the particular Rab proteins were found in plants in comparison with other cell types, especially for Rab3, Rab7 and Rab11.

Key words: Rab proteins, isoforms, isotypes, endocytosis, exocytosis, expression, localization, function, neuropathies, metabolic disorders, parasites.

WSTĘP

Historia badań nad białkami Rab sięga roku 1983, kiedy Gallwitz i współpracownicy [14] przypadkowo wykryli u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* gen *YPT* o wysokiej homologii do ludzkich genów *Ras*. W roku 1987 zidentyfikowano w mózgu szczura pierwsze ssacze homologii *Ypt* i nadano im nazwę Rab: „*Ras-related in brain*” [70].

Białka Rab stanowią największą rodzinę małych monomerycznych GTP-az w komórkach Eukaryota. Wielka ich ekspansja związana jest z różnorodnością szlaków transportu pęcherzykowego: w komórkach człowieka jest około 70 białek Rab [51, 53, 66], a u *Entamoeba histolytica* aż 91, w tym 39 unikalnych dla tego gatunku [57]. Wiele izoform i izotypów Rab – produktów paralogicznych genów będących wynikiem duplikacji genomów [35] – odgrywa istotną rolę na różnych szlakach endo- i egzocytotycznych, w proliferacji, przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych oraz różnicowaniu [2, 8, 30, 37, 52, 54, 56, 58, 59, 61, 71].

W komórkach roślinnych wykazano znaczną ekspresję białek Rab w procesach, takich jak: wzrost włosków korzeniowych i łagiewki pyłkowej, czy zmiękczenie ściany komórkowej owoców [33, 34, 58].

Rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*) ma 57 GTPaz Rab, homologicznych do jedynie ośmiu typów tych białek zidentyfikowanych u ssaków [34]. Te same osiem grup znaleziono w innych roślinach, choć całkowita liczba białek Rab winorośli (*Vitis* L.) to w przybliżeniu połowa ich liczby u rzodkiewnika. Ponieważ wymienione osiem grup ma jednak znacznie więcej przedstawicieli niż podobne grupy ssacze nazwano je odpowiednio: RabA, RabB, RabC, RabD, RabE, RabF, RabG i RabH oraz podzielono je następnie na podklasy. Warto zauważyć, że grupa *Arabidopsis* RabA, mająca 26 członków i odpowiadająca dwóm ssaczym białkom Rab11, podzielona została na sześć podgrup: RabA1–RabA6 [34].

Białka Rab oscylują w komórce między stanem nieaktywnym, gdy są związane z GDP, a stanem aktywnym – będąc w kompleksie z GTP – gdy znajdują się na błonach różnych organelli/pęcherzyków [53]. Zdecydowana większość tych białek ulega modyfikacji potranslacyjnej polegającej na przyłączeniu 1 lub 2 grup geranylgeranylowych do C-końcowych cystein [51]. Modyfikacja ta jest niezbędna do związania białek z błonami docelowymi. Zaburzenia w maszynerii kontrolowanej przez białka Rab prowadzą do wielu chorób dziedzicznych oraz metabolicznych, w związku z czym prowadzi się obecnie badania nad ustaleniem odpowiedniej terapii genowej

[10]. Przykładowo nieprawidłowości w procesie prenylacji są przyczyną choroide-remii – postępującej ślepoty zmierzchowej prowadzącej do całkowitej utraty wzroku u ludzi, występującej na skutek kumulacji nieprenylowanych białek w komórce [51].

Białka Rab nazywane '*membrane organizers*' lub też '*master regulators of membrane trafficking*' [52, 80] pełnią w komórce kluczową rolę w takich procesach, jak:

- (1) tworzenie pęcherzyków, rozpoznawanie błony docelowej i zakotwiczenie w niej oraz fuzja pęcherzyków w transporcie wewnątrzkomórkowym [16, 36, 53, 65, 80];
- (2) poruszanie się pęcherzyków, jeżeli kompleks efektorowy zawiera motory molekularne [19, 27, 62];
- (3) organizacja funkcjonalnie odrębnych mikrodomen błonowych w poszczególnych organellach, np. na powierzchni tego samego endosomu wykryto Rab 4 i Rab5 [81] lub Rab 5 i Rab5 [61] oraz białek z nimi współdziałających [38, 45, 81];
- (4) dojrzewanie organelli na szlaku transportu pęcherzykowego, kiedy kompleks Rab-efektor zawiera odpowiedni czynnik wymiany nukleotydu (GEF) dla białka Rab zaangażowanego w następnym etapie tego transportu. Zjawisko to – nazwane konwersją Rab – umożliwia ukierunkowanie transportu pęcherzykowego przez sprzęgnięcie kolejnych jego etapów na danym szlaku [15];
- (5) kontrola ścieżki sygnalizacyjnej, ponieważ niektóre efekторы Rab działają jak cząsteczki sygnałowe np. aktywny Rab8 współdziała z kinazą aktywowaną stresem [54], a białko APPL – (ang. *Adaptor protein containing PH domain PhosphoTyrosine Binding domain and Leucine zipper motif*) jako efektor Rab5 jest zlokalizowane we wczesnych endosomach i ulega translokacji z cytozolu do jądra w wyniku stymulacji/stresu oksydacyjnego, przekazując w ten sposób sygnał mitogenny z błony komórkowej [38, 45].

Na podstawie analizy konserwowanych sekwencji białek Rab u ssaków wykazano istnienie:

- motywów specyficznych dla rodziny Rab (ang. *Rab Family motifs*) otaczających tzw. regiony przełącznikowe (których konformacja bardzo znacznie zmienia się po wymianie nukleotydu) i determinują interakcje z białkami regulatorowymi,
- motywów podrodzin Rab (ang. *Rab SubFamily motifs*), które są zaangażowane w przyłączanie specyficznych białek efektorowych. Motywy te opisane uprzednio tylko u ssaków są konserwowane u innych gatunków. Aby lepiej zrozumieć ewolucję Rab w transporcie pęcherzykowym, białka te podzielono na 8 grup funkcjonalnych, które odzwierciedlają podobieństwa w ich sekwencji, lokalizacji i funkcji [51, 65].

Co ciekawe, niektóre podrodziny Rab występują tylko w określonych grupach zwierząt czy roślin, na co wskazuje nasza analiza bioinformatyczna 210 tych GTPaz z grupy funkcjonalnej VII, obejmującej białka Rab7 i Rab9. Białka Rab9 można znaleźć tylko u przedstawicieli Metazoa, a Rab7b tylko u kręgowców lądowych. Rab9 najprawdopodobniej oddzieliły się od typowych Rab7 jeszcze przed zróżnicowaniem zwierząt tkankowych, a Rab7b pochodzą z duplikacji typowych Rab7 przed radiacją lądowych kręgowców [35].

Powodem zachowania zduplikowanych genów może być ich funkcjonalne zróżnicowanie lub duże zapotrzebowanie na ich białkowe produkty [24]. Delecje genu często pociągają

za sobą jedynie drobne zmiany fenotypowe w wyniku dwóch mechanizmów kompensacji: istnienia zduplikowanego genu lub występowania alternatywnej ścieżki metabolicznej czy sieci regulacyjnej. Najbardziej spektakularne rezultaty przyniosły badania nad *Saccharomyces cerevisiae*, gdzie około 25% delecji genów nie ma efektu fenotypowego wskutek obecności zduplikowanych kopii [16]. Co ciekawe, czasem kompensacja taka zachodzić może tylko w określonych warunkach środowiskowych, czego najlepiej opisanym przykładem są trzy izoformy drożdżowej kinazy A: *tpk1-tpk3*. Jakakolwiek z nich jest wystarczająca do podtrzymania wzrostu w bogatym medium. Natomiast w medium ubogim w azot funkcje tych kinaz są odmienne: *tpk2* jest niezbędna, *tpk3* hamuje wzrost, a rola *tpk1* jest jeszcze niewyjaśniona [55].

W tym artykule omawiamy izoformy i izotypy wybranych 8 podrodziny białek Rab, których funkcje, lokalizacja i ekspresja są często odmienne w komórkach zwierzęcych i roślinnych.

Rab1

GTPazy Rab1 (Rab1a i Rab1b) regulują transport nowo zsyntetyzowanych białek z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego [61]. Ostatnio wykazano również istotną rolę Rab1 w dimeryzacji receptora angiotensyny typu 2 (AT2R) podczas jego biosyntezy [82]. Badania z zastosowaniem dominujących negatywnych mutantów Rab1 oraz wyciszania (RNAi) genu kodującego to białko wykazały jego rolę w kierowaniu AT2R do powierzchni komórki oraz przekazywaniu sygnałów przez ten receptor. Rab1 zwiększał ekspresję tego receptora zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, natomiast zmutowany Rab1 obniżał ekspresję AT2R oraz przyspieszał jego degradację zależną od ubiquityny. Utworzenie heterodimeru ze zmutowanego receptora AT1R, niezdolnego do przemieszczenia się z siateczki śródplazmatycznej i receptora AT2R blokowało transport AT2R do powierzchni komórki, wskazując na występowanie konstytutywnej dimeryzacji obu receptorów oraz jej istotną rolę w ich eksporcie z siateczki śródplazmatycznej [82].

U roślin Rab1 jest zaangażowany głównie w proces dojrzewania owoców. W owocach pomidora trzy białka Rab1 ulegają silnej ekspresji, przy czym jedno z nich (LeRab1C) najsilniej w rosnących, zielonych owocach, a dwa pozostałe (LeRab1A i LeRab1B) w owocach dojrzałych [32]. Stwierdzono jednak, że pomimo dużego podobieństwa, białka te różnią się zdolnością do oddziaływania z transferazą geranylgeranylową, wprowadzającą modyfikację niezbędną do prawidłowego funkcjonowania białek Rab.

Rab3

W komórkach ssaczy do podrodziny Rab3 należą aż 4 białka: Rab3A, Rab3B, Rab3C i Rab3D. Wykazują one około 80% identyczności na poziomie sekwencji aminokwasowej i pełnią kluczową rolę w regulacji egzocytozy. Wykazano, że w komórkach neuroendokrynych przysadki mózgowej szczura ekspresjonowane są zarówno Rab3A, jak i Rab3B, jednakże tylko pierwsze z tych białek jest niezbędne w sekrecji zależnej od jonów wapnia [56].

Zupełnie odmienną funkcję pełni Rab3 u niższych organizmów – badania wykazały jego zaangażowanie w tworzeniu symbiosomów – specyficznych, podobnych do fagosomów organelli u parzydełkowców. W strukturach tych lokalizują się bruzdnice, które wchodzą w endosymbiozę ze swoim gospodarzem i pełnią ważną funkcję w ich przetrwaniu i proliferacji [20]. Białko ApRab3 ukwiału szklistego (*Aiptasia pulchella*), w 78% identyczne z ludzkim Rab3C i zawierające wszystkie specyficzne dla Rab3 motywy, jest nowym przedstawicielem podrodziny Rab3, a biogeneza symbiosomu wymaga interakcji z pęcherzykami zawierającymi tę GTP-zę [20].

Rab4

W komórkach ssaczy zidentyfikowano trzy izoformy białka Rab4: Rab4a, Rab4b oraz Rab4c [61]. Białka te zaangażowane są w regulację szybkiej endocytozy recyrkulacyjnej z endosomów wczesnych do błony cytoplazmatycznej [64, 81].

Izoforma Rab4a, homologiczna w 93% do Rab4b, pełni także rolę w transporcie insulinozależnego transportera glukozy 4 (GLUT4), niezbędnego do utrzymania odpowiedniego poziomu glukozy w komórce. Najnowsze badania wykazały również obecność Rab4b w adypocytach, którego ekspresja malała w ludzkich i mysich modelach otyłości cukrzycowej. GLUT4 magazynowany jest wewnątrzkomórkowo i pod wpływem działania insuliny ulega przemieszczeniu do błony plazmatycznej. U pacjentów z cukrzycą typu 2 występują zaburzenia w tym procesie translokacji w wyniku defektów w przekazywaniu 'sygnału' insulinowego i ekspresji GLUT 4. Sugeruje się zatem, że w przypadku tego schorzenia różnice w ekspresji genu rab4b mogą minimalizować zaburzenia w transporcie glukozy w adypocytach [29].

Rab5

Rab 5, które jest niezbędne podczas wczesnych etapów endocytozy, spełnia swoją funkcję współdziałając z wieloma różnymi białkami efektorowymi, co zostało szeroko opisane ostatnio w pracy przeglądowej Olchowik i Miączyńskiej [45]. Bucci i współpracownicy [8] scharakteryzowali uprzednio dwa wysoce pokrewne białka Rab5b i Rab5c w komórkach ssaczy. Wykazują one strukturalne podobieństwo do Rab5a umożliwiające im współdziałanie w regulacji procesu endocytozy. Izoformy Rab5b i Rab5c kolokalizują się zarówno z receptorem transferyny, jak i z Rab5a, stymulując homotypową fuzję pomiędzy endosomami wczesnymi *in vitro*, a nadekspresjonowane *in vivo* zwiększają poziom internalizacji [8].

Natomiast w komórkach *Trypanosoma brucei* dwie izoformy Rab 5 kolokalizują się w stadium procyklicznym, ale wykazują odmienne funkcje u wiciowców żyjących w krwiobiegu. TbRAB5B, w przeciwieństwie do TbRAB5A, nie jest zaangażowane w endocytozę lipoprotein o małej gęstości (LDL), jednak oba białka uczestniczą w pobieraniu fazy płynnej [50].

Endosomy z TbAB5B transportują białko transbłonowe ISG (*invariant surface glycoprotein*), czyli niezmienną glikoproteinę powierzchniową [50]. Natomiast endosomy z TbRAB5A zawierają transferynę (pobieraną z krwi gospodarza) i wariantową glikoproteinę powierzchniową (VSG), które internalizowane są przez receptor transferyny

(nie ma go w stadium procyklicznym) zakotwiczony w błonie *Trypanosoma* dzięki obecności glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI). Tak samo zakotwiczony jest VSG, którego 10^7 kopii znajduje się na powierzchni błony, by uniknąć odpowiedzi immunologicznej gospodarza [50], co stanowi jedną ze strategii patogenów [31].

Białko roślinne Ara6 *A. thaliana*, podobne do Rab5 i też funkcjonujące na szlaku endocytotycznym, ma z kolei unikalne cechy strukturalne [71]. Nie zawiera ono dużej części wysoce zmiennego, C-końcowego fragmentu ani końcowej reszty cysteinowej, jednakże w jego sekwencji można wyróżnić N-terminalne motywy ulegające mirystylacji i palmitylacji, a takie modyfikacje potranslacyjne są niezbędne dla endosomalnej lokalizacji tego białka. Co ciekawe, Ara6 ulega konstytutywnej ekspresji, w przeciwieństwie do Ara7, będącego konwencjonalnym ortologiem Rab5, który jest ekspresjonowany tylko w komórkach dzielących się. Ueda i współpracownicy [71] postulują, że białko Ara6, które występuje tylko u roślin wyższych, reprezentuje nową klasę GTPaz Rab.

Rab6

U człowieka zidentyfikowano dotąd trzy izoformy białka Rab6: Rab6A, Rab6A' oraz Rab6B. Podczas gdy Rab6B ulega ekspresji tylko w niektórych komórkach nerwowych, pozostałe dwie izoformy są ekspresjonowane powszechnie i co więcej różnią się jedynie trzema resztami aminokwasowymi zlokalizowanymi blisko domen wiążących GTP [12]. Białka te regulują transport pęcherzykowy w obrębie aparatu Golgiego oraz w kompartmentie post Golgi, a specyficzne wyciszenie pojedynczych izoform (RNAi) wykazało znaczące różnice w ich funkcji. Wyciszenie Rab6A nie wpływa na transport wewnątrzkomórkowy, podczas gdy zahamowanie ekspresji genu kodującego Rab6A' zaburza transport zwrotny na szlaku endocytotycznym oraz recyrkulację z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego [13]. Ponadto wykazano, że Rab6A' jest niezbędne w procesie mitozy, gdyż odgrywa istotną rolę w dynamice kompleksu dyneina-dynaktyna w obrębie kinetochoru i przy braku jego aktywności dochodzi do zatrzymania cyklu w metafazie. Zidentyfikowano również resztę aminokwasową Ile⁶² jako kluczową dla funkcji tego białka w transporcie wstecznym.

W komórkach *A. thaliana* AtRAB-H1b oraz AtRAB-H1c, homologi drożdżowych białek Ypt6, lokalizują się w obrębie aparatu Golgiego i cytoplazmy. AtRAB-H1b zostało ponadto wykryte w niezidentyfikowanym jeszcze kompartmentie, nieznakującym się markerami aparatu Golgiego [25].

Rab7

Nasza analiza filogenetyczna – oparta zarówno na sekwencjach nukleotydowych, jak i aminokwasowych – wykazała, że Rab7 pojawiło się wcześniej w ewolucji, przed rozdzieleniem się głównych królestw eukariotycznych [35]. Rab7 reguluje etap transportu wewnątrzkomórkowego z endosomów wczesnych do późnych oraz lizosomów i tak jak wszystkie GTPazy Rab, spełnia swoją funkcję w komórce współdziałając ze specyficznymi białkami efektorowymi. Typowymi efektorami Rab7 jest białko RILP (ang. *Rab-interacting lysosomal protein*) [27] oraz ORP1L (ang.

oxysterol-binding protein-related protein), które są niezbędne do rekrutacji kompleksu dyneino-dynaktynowego do endosomów późnych umożliwiając ich ruch wzdłuż mikrotubul [26]. Trzecim – opisanym dotąd – efektem Rab7 jest Rabring 7 (ang. *Rab7-interacting ring finger protein*) indukujące agregację lizosomów oraz zwiększające poziom ich zakwaszenia [40].

Rab7 u ssaków

W komórkach ssacych białko Rab7 lokalizuje się głównie w obrębie endosomów późnych oraz lizosomów, a także fagosomów [21, 27, 52, 61, 64, 67, 81]. Ostatnio stwierdzono obecność Rab7 na 10% wczesnych endosomów [75]. Odgrywa ono istotną rolę w ukierunkowaniu internalizowanych substancji na szlak degradacyjny, wnikaniu bakterii i wirusów do komórek, dojrzewaniu fagosomów oraz biogenezie lizosomów [27, 52, 61, 64, 81].

Mutacje w genach kodujących białka Rab7 zidentyfikowano u pacjentów cierpiących na dziedziczne polineuropatie, takie jak np. neuropatia ruchowa i czuciowa Charcot-Marie-Tooth typu II B. U osób cierpiących na to schorzenie stwierdzono obecność czterech mutacji nonsensownych w wysoce konserwowanym regionie wiążącym GTP w tzw. 'gorącym miejscu mutacji' w Rab7: Asp161/Thr i Val162/Met [74]. Wszystkie zmutowane białka wykazują obniżone powinowactwo do wiązania GDP, w związku z czym wydaje się, że aktywna forma białka, związana z GTP, jest odpowiedzialna za występowanie tej choroby [11].

Białka Rab7 okazały się także istotne w transporcie wstecznym receptora neurotrofin w aksonach. Czynnikiem wzrostu nerwu pełni niezwykle ważną funkcję w procesie wzrostu i przeżywalności neurytów [59]. Aktywny receptor TrkA, lokalizuje się na powierzchni komórki oraz w endosomach sygnalizujących, a zinternalizowany pełni istotną rolę w stymulacji wzrostu neurytów. Badania z zastosowaniem dominującego, negatywnego mutanta białka Rab7 powodowały gromadzenie się TrkA w takich endosomach, co wskazywać może na rolę tej GTPazy w regulacji szlaku internalizacji/sygnalizacji TrkA. Wydaje się zatem, że zaburzenia w funkcji Rab7 mogą przyczyniać się do powstawania zmian neurodegeneracyjnych wpływając na transport pęcherzykowy neurotrofin [59].

W 2004 roku Yang i współpracownicy [80] scharakteryzowali nowe ludzkie białko Rab7b, które może odgrywać rolę w różnicowaniu monocytów ostrej białaczki promieloblastycznej. W późniejszych badaniach stwierdzono, że białko to przyspiesza degradację lizosomalną receptora Toll-podobnego 4 (TLR4), który jest istotny w pobudzeniu wydzielania interleukin przeciwzapalnych i tym samym m.in. zwalczaniu patogenów [76].

Rab7 u roślin

Nasze badania bioinformatyczne oparte zarówno na sekwencjach nukleotydowych, jak i białkowych wskazują, że trzykrotne duplikacje genów *rab7* u roślin wyższych nastąpiły przed rozdzieleniem się jedno- i dwuliściennych, dając 3 odmienne linie filogenetyczne białek Rab7. Ponadto niezależne, kolejne duplikacje musiały nastąpić w obrębie obu tych grup, ponieważ dodatkowe kopie *rab7* stwierdzono w genomach

np. rzodkiewnika (osiem) oraz po cztery u ryżu i komonicy zwyczajnej zwanej rożkową (*Lotus corniculatus* L.) [35].

W roślinach Rab7 jest prawdopodobnie odpowiedzialne za tolerancję na odwodnienie i zasolenie [1,41]. Nadekspresja cDNA kodującego Rab7 *Pennisetum glaucum* (PgRab7) w *E. coli* prowadzi do syntezy rekombinowanego białka wiążącego GTP oraz wykazującego aktywność GTPazy. Dodatkowo, ekspresja tego genu podlega regulacji przez czynniki środowiskowe, takie jak: obniżenie temperatury, odwodnienie, chlorek sodu czy hormon roślinny IAA (kwas indolilo-3-octowy, najważniejsza auksyna naturalna). Natomiast nadekspresja PgRab7 w tytoniu zwiększa tolerancję rośliny na chlorek sodu oraz mannitol [1]. Homolog Rab7 u ryżu (OsRab7) bierze udział w transporcie pęcherzykowym do wakuoli i również jego ekspresja jest regulowana przez czynniki środowiskowe [41].

Zduplikowane geny *rab7* są istotne w adaptacji roślin do różnych warunków środowiska, a poszczególne kopie tych genów uzyskały w toku ewolucji nowe funkcje przestrzenno-czasowe oraz profil ekspresji. Borg i współpracownicy [7] zidentyfikowali w komórkach *Lotus japonicus* cztery geny kodujące Rab7. Dwa z nich (*rab7A* i *rab7B*) ulegają ekspresji głównie w liściach, *rab7C* w guzkach korzeniowych, szczególnie w środkowej fazie rozwoju, a czwarty gen (*rab7D*) wykazuje ekspresję konstytutywną.

Uważa się, że u rzodkiewnika białka RabF (odpowiadające Rab5) i RabG (Rab7) są związane z procesami endocytozy. Istnieje dowód wskazujący, iż RabG jest zaangażowany w internalizację barwnika do wakuoli, jakkolwiek proces ten wymaga transportu pęcherzykowego przez kilka kompartmentów. Podobnie inne białka RabF mogą brać udział albo w endocytozie albo transporcie wakuolarnym [37].

Rab7 u niższych eukariontów pasożytniczych

Różnice w strukturze, funkcji i lokalizacji białek Rab występują w przypadku niższych eukaryota, takich jak *Entamoeba histolytica* [44, 57], mająca około 90 potencjalnych genów kodujących te białka. Analiza filogenetyczna i porównawcza wykazała, że ponad 70% z nich ma introny, a około 20% nie zawiera jednego lub obu typowych dla GTPaz Rab regionów przełącznikowych. Większość amebowych białek Rab ma, charakterystyczne dla tej nadrodziny, dwie cysteiny na końcu karboksylowym, jednak 13% ma tylko jedną taką resztę, kilka nie ma żadnej, a kolejne mają unikalny typ C-końca, niescharakteryzowany dotąd w białkach Rab człowieka [57].

Genom *E. histolytica* koduje aż dziewięć izotypów białka Rab7, w tym EhRab7A, które w przeciwieństwie do ssaczego Rab7 nie lokalizuje się ani w późnych endosomach, ani w lizosomach, lecz w bliżej niezidentyfikowanych pęcherzykach fuzujących z lizosomami w celu utworzenia tzw. wakuoli pefagosomalnych [57]. Przynajmniej pięć izotypów Rab7 (Eh Rab7A-7E) zostało wykrytych dzięki analizie proteomicznej fagosomów zawierających kulki lateksowe, wskazując na udział tych białek w biogenezie wakuol fagocytarnych [43]. Poszczególne białka Rab7 pojawiają się w różnych fazach fagocytozy, np. Rab7B i 7C wykrywane są we wczesnej i pośredniej fazie internalizacji (0–60 i 0–30 min, kolejno), Rab7E konstytutywnie

asocjuje z fagosomami, a Rab7A i Rab7D obecne są w początkowej i końcowej fazie tego procesu.

Stwierdzono także, że u *E. histolytica* występuje unikalny efektor Rab7 o charakterze retromeru. Typowy retromer jest kompleksem wieloskładnikowym zawierającym m.in. wakuolarne białka sortujące (ang. *VPS*). Jest on zasocjowany z cytozolemą powierzchnią endosomów i pośredniczy w transporcie wstecznym białek transbłonowych z endosomów do TGN [6]. U *E. histolytica* pełni on rolę w transporcie receptorów hydrolaz z wakuoli prefagosomalnych i fagosomów do TGN. Kompleks ten oddziałuje z białkiem Rab7A, które w ten sposób reguluje recyrkulację receptora i tym samym aktywność proteaz [44]. Ponadto, u *E. histolytica* brak jest homologów ssaczych efektorów Rab7 – RILP i Rabring7 [42].

Ogromna liczba białek Rab kodowanych w genomie tej ameby, połączona z funkcjonalnym zróżnicowaniem występującym między homologami EhRab i ssaczymi, sugeruje, że w *E. histolytica* istnieje odrębny system transportu pęcherzykowego prowadzący do powstania fagosomu [42, 44].

Rab7 *Paramecium*

Analiza filogenetyczna i ewolucyjna Rab7 wskazała, że duplikacja genów, która zaszła w tej podrodzynie, spowodowała powstanie kilku ich kopii u niektórych przedstawicieli *Excavata*, *Ciliata* i *Amoebozoa* [35]. Przykładem zachowania zduplikowanych genów jest jednokomórkowy eukariont *Paramecium octaurelia*, u którego sklonowaliśmy m.in. dwa paralogiczne geny kodujące białka Rab7: *rab7a* i *rab7b* [68]. Wydedukowane sekwencje aminokwasowe (206 reszt) tych dwóch izotypów zawierają wszystkie domeny charakterystyczne dla białek Rab7 i wykazują 62,3–63,3% identyczności do Rab7 człowieka oraz 48,1–52,4% do Ypt7 z drożdży (*S. cerevisiae*). Rekonstrukcja struktury 3D białek w programie PyMOL wykazała, że struktura obu izotypów białek Rab7 *Paramecium* pokrywa się ze strukturą homologicznego białka u człowieka i innych ssaków oraz ryżu, rzodkiewnika, *Dictyostelium* i *Tetrahymena*. Jednocześnie porównanie z białkiem TcRab7 z *Trypanosoma cruzi* [68] wskazało na 21-aminokwasową insercję w sekwencji białka (ryc. 1) tego pasożytniczego wiciowca wywołującego chorobę Chagasa. Co ciekawe, insercja ta może mieć wpływ na nietypową dla białek Rab7 lokalizację tej GTP-azy w obrębie aparatu Golgiego [3]. Jak dotąd *Paramecium* jest najstarszym filogenetycznie gatunkiem niższych eukaryota niewykazującym powyższej insercji typowej dla Kinetoplastida [13].

Izotypy Rab7 *P. octaurelia* różnią się między sobą jedynie 5 resztami aminokwasowymi, z czego cztery z nich zlokalizowane są blisko C-końca. Ten region został użyty do generacji specyficznych przeciwciał, które rozpoznają peptydy o różnej szybkości migracji w SDS-PAGE, co może wynikać z modyfikacji potranslacyjnych Rab7a i Rab7b. Analiza potencjalnych miejsc fosforylacji i glikozylacji wykazała, że obecne są 3 unikalne pozycje O-glikozylacji: Ser195 w Rab7a oraz Ser140 i Thr200 w Rab7b (ryc. 2), a dowody eksperymentalne wskazują, że taka modyfikacja izotypu Rab7b może być przyczyną różnicy w ruchliwości elektroforetycznej [78]. Badania

proteomiczne potwierdziły, że specyficzne antypeptydowe przeciwciała rozpoznają produkty białkowe genów *rab7a* i *rab7b* zgodnie z ich wydedukowaną sekwencją aminokwasową [49]. Rab7 u *P. octaurelia* uczestniczy w fagocytozie [67, 79] i w trakcie tego procesu obserwowano zmiany w ekspresji obu genów [47], a wyciszenie genu *rab7a* powodowało bardzo znaczne zahamowanie internalizacji, a także zaburzenia w zakwaszaniu fagosomów [48]. Rab7b prawdopodobnie uzyskało w toku ewolucji nową funkcję [46].

W kompartmentcie fagolizosomalnym *Paramecium* wykazaliśmy także obecność homologów białek współdziałających z Rab 7 u człowieka – efektora: czyli opisanego powyżej białka RILP oraz LAMP-2 (ang. *lysosomal membrane protein 2*), które jest białkiem błonowym lizosomów niezbędnym podczas ich fuzji z fagosomami prowadzącej do powstania fagolizosomów. Zidentyfikowaliśmy fragmenty genu i transkryptu kodujące RILP1 i RILP 2 u *Paramecium* [79] zawierające region RILP istotny w regulacji morfologii lizosomów [77] oraz rekrutacji kompleksu dyneina-dynaktyna [39]. Rezultaty te wskazują, że kompleks składający się z Rab7 oraz homologów RILP i LAMP-2 może być zaangażowany w proces dojrzewania fagosomów u *Paramecium* [79], podobnie jak w komórkach ssaków [21]. Są to – jak dotąd – jedyne dane o Rab7 dotyczące wolnożyjącego jednokomórkowego eukariontu.

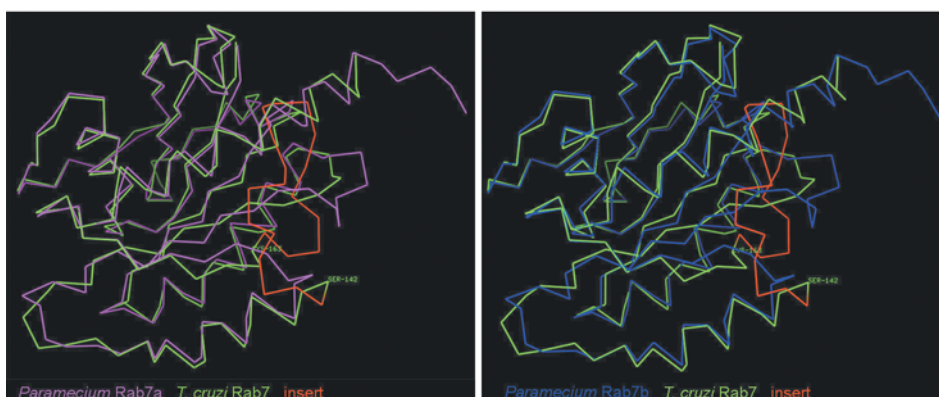
Opisane powyżej białka Rab7 *Paramecium octaurelia* wykazują znaczną homologię do niescharakteryzowanych funkcjonalnie sekwencji „*Rab-like proteins*” otrzymanych metodą *shotgun* z bazy danych dotyczącej innego gatunku *Paramecium* – *P. tetraurelia* (<http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr>). Analiza tego genomu wskazuje, że on uległ 3- lub 4-krotnym duplikacjom, z których ostatnia nastąpiła przed rozdzieleniem się *P. tetraurelia* i *P. octaurelia* [4]. Różnica pomiędzy „*Rab-like proteins*” z *P. tetraurelia*, a naszymi sekwencjami wynosi nawet ~3%, czyli więcej niż różnica między genomem człowieka i szympansa.

Rab9

Rab9 reguluje transport pomiędzy endosomami późnymi a cysternami trans aparatu Golgiego, a także recyrkulację receptorów błonowych, takich jak receptory mannozo-6-fosforanu (MPR) z endosomów wczesnych do TGN [2, 61, 64]. MPR wiążą nowosyntetyzowane enzymy lizosomalne i dostarczają je do prelizosomów, a następnie ulegają recyrkulacji do TGN. W procesie tym niezbędne jest białko TIP47 (*tail-interacting protein*) wiążące Rab9 i domenę cytoplazmatyczną MPR. TIP47 jest kluczowym efektem Rab9 i kontroluje jego stabilność oraz lokalizację [2].

Ostatnie badania wskazują, że GTPaza ta jest kluczowym, komórkowym komponentem zaangażowanym w proces replikacji takich wirusów, jak: HIV-1 i Ebola, przez co stanowić może nowy cel działania leków antywirusowych [9].

W roku 2000 sklonowano gen '*Rab9-like*' i stwierdzono jego ekspresję w różnych tkankach człowieka [63]. Wykazano, że w niektórych przypadkach choroby Pelizaeus-Merzbacher (rzadkiej, dziedzicznej leukodystrofii atakującej przede wszystkim substancję białą w ośrodkowym systemie nerwowym), powodowanej mutacjami



RYCINA 1. Rekonstrukcja i porównanie struktur 3D białek Rab7a i Rab7b *Paramecium octaurelia* z Rab7 *Trypanosoma cruzi* w programie PyMOL. W sekwencji *T. cruzi* występuje 21-aminokwasowa insercja (zaznaczona na czerwono) nieobecna w białkach Rab7 *Paramecium octaurelia* i organizmów wyższych

FIGURE 1. 3D reconstruction and comparison of *Paramecium octaurelia* Rab7a and Rab 7b with Rab7 of *Trypanosoma cruzi* in PyMOL program. In *T. cruzi* Rab7 there is a 21-amino acid insertion (red) not present in Rab7 proteins in *Paramecium octaurelia* and in the higher eukaryotes

	RabF1	RabF2	
Rab7a	MASQKKQLFKIIILGDSGVGKTSIMNQV ¹⁶ NARFTQQYRATVGADFM ¹⁷ AKEVMIDDRM ¹⁸ VTLQ		60
Rab7b	MASQKKQLFKIIILGDSGVGKTSIMNQV ¹⁶ NARFTQQYRATVGADFM ¹⁷ AKEVMIDDRM ¹⁸ VTLQ		60
	. ***	** : : : : * : * : : * . **	. **
	RabF3	RabF4	RabF5
Rab7a	IWDTAGQERFQSLGGAFYRGADCCVLVYDITNPKS ¹⁹ FDS ²⁰ LD ²¹ SWRDEFLM ²² QGQPKDPEHF ²³ PF		120
Rab7b	IWDTAGQERFQSLGGAFYRGADCCVLVYDITNPKS ¹⁹ FDS ²⁰ LD ²¹ SWRDEFLM ²² QGQPKDPEHF ²³ PF		120
	**	** : *	: ****
		*****	: . * . * . * : . : * : *
Rab7a	VVLGNKLDKATERKVQESKA ²⁴ QWCKSHGNIQFFEVS ²⁵ AKDATNIEQAFQDIAKAAASQEKD		180
Rab7b	VVLGNKLDKATERKVQESK ²⁴ QWCKSHGNIQFFEVS ²⁵ AKDATNIEQAFQDIAKAAASQEKD		180
	***	. * * * . : : * :	
Rab7a	EEIFFP ²⁶ TTVTLTKQ ²⁷ SQKPKQAKGGCC		206
Rab7b	EEIFFP ²⁶ TTVTLTKQ ²⁷ DPKKQTKGGCC		206

RabF1 – RabF5 – motywy charakterystyczne dla białek Rab (ang. *Rab Family motifs*) wg Pereira-Leal, Seabra, 2000.

SF1, SF2, SF3, SF4 – motywy charakteryzujące podrodziny białek Rab (ang. *Subfamily motifs*) wg Pereira-Leal, Seabra, 2000.

ST – miejsce potencjalnej O-glikozylacji (Julenius i wsp., 2005)

STY – miejsce potencjalnej fosforylacji wg NetPhos 2.0 Server (Blom i wsp., 1999)

RYCINA 2. Motywy warunkujące przynależność do rodziny/podrodziny Rab oraz potencjalne miejsca O-glikozylacji i fosforylacji w izotypach Rab7 *Paramecium octaurelia*

FIGURE 2. The Rab Family (Rab F1-RabF5) and Rab Subfamily (SF1-SF-4) motifs (as defined according to Pereira-Leal and Seabra 2000) and the potential O-glycosylation (as defined based on Julenius et al. 2005) and phosphorylation sites (as defined by Netphos 2. Server and Blom et al. 1999) in Rab7 isotypes of *Paramecium octaurelia*

w genie kodującym PLP1 (ang. *ProteoLipid Protein 1*), delecje obejmują także gen *rab9b*. Białko PLP odgrywa główną rolę w tworzeniu osłonki mielinowej [23].

U muszki owocowej *Drosophila melanogaster* cztery z sześciu paralogów Rab9 są unikalne dla tego gatunku, w którym uległy bardzo znacznym zmianom – kodowane przez nie białka wykazują mniej niż 50% identyczności do białek kodowanych przez ich ortologi w pokrewnych gatunkach. Szybko ewoluujące paralogi Rab9 znajdują się blisko locus Hmr – gen *Hmr* koduje białko wiążące DNA, które powoduje genetyczną niezgodność w hybrydowym genotypie. Rab9D jest ostatnio powstałym paralogiem i wpływa na żywotność hybryd. Paralogi Rab9 prawdopodobnie rozwinęły funkcjonalną specjalizację białek zaangażowanych w transport makrocząsteczek pomiędzy cytoplazmą i jądrem [22].

Rab11

GTPaza Rab11 lokalizuje się na endosomach recyrkulujących i TGN w różnych typach komórek ssaczych [64, 71]. W skład podrodziny białek Rab11 u człowieka wchodzi Rab11a, Rab11b oraz Rab25. Pełnią one rolę na szlaku recyrkulacji białek z endosomów oraz cysterny trans Golgi do błony cytoplazmatycznej, w fagocytozie w makrofagach i w transporcie spolaryzowanym w komórkach nabłonkowych, przy czym białko Rab11b jest specyficzne dla komórek nerwowych [61]. Pomimo że sekwencje aminokwasowe Rab11a i Rab11b są identyczne w 90%, ich struktury krystaliczne zdecydowanie się różnią. Nieaktywna forma Rab11a (Rab11a-GDP) krystalizuje w postaci dimeru i nie zawiera jonu magnezu w miejscu wiązania nukleotydu, w przeciwieństwie do Rab11b, które krystalizuje w postaci monomeru w kompleksie z GDP i jonem magnezu. Ponadto izoformy mają nieco odmienną strukturę trzeciorzędową w obszarze przełącznika, co może wpływać na szybkość hydrolizy GTP [60].

Rab11 odgrywa kluczową rolę w transporcie receptora transferyny z endosomów sortujących do błony plazmatycznej poprzez kompartment endosomów recyrkulacyjnych [72, 73]. Regularny „powrót” internalizowanych receptorów błonowych, pomp i kanałów jonowych jest niezbędny do utrzymania składu błon zarówno w komórkach spolaryzowanych, jak i niespolaryzowanych. Wykazano, że proces ten wymaga oddziaływania Rab11a z miozyną Vb oraz białkiem efektorowym Rab11-FIP2 (*Rab11 family interacting protein 2*), a mutanty delecyjne wszystkich tych trzech białek powodowały zahamowanie szlaku recyrkulacji [17].

Badania z wykorzystaniem komórek linii neuroendokrynnej PC12 ekspresjonujących ludzki hormon wzrostu (hGH) wykazały niezwykle ciekawą funkcję białka Rab11b [30]. W komórkach tych związanie GTP lub GDP przez Rab11b hamowało egzocytozę zależną od wapnia, ale nie hamowało sekrecji konstytutywnej. Natomiast w komórkach nieneuronalnych związanie obu form nukleotydu przez Rab11b hamowało egzocytozę konstytutywną, powodując akumulację hGH. Tak więc Rab11 pełni w komórkach nerwowych dodatkową funkcję przełącznika (zależnego od GTP) pomiędzy konstytutywną i regulowaną ścieżką sekrecyjną [30].

Jak wspomniano we Wstępie, homologi ssaczego Rab11 u *Arabidopsis* to aż 26 białek [34], wśród których są RABA4B występujące we włoskach korzeniowych czy RAB11B w łagiewkach pyłkowych zlokalizowane w pęcherzykach TGN [58]. Pęcherzyki wydzielnicze TGN – akumulujące się w strefie spoczynkowej wierzchołka wzrostowego – zaangażowane są w szybki transport zwrotny, mogą także pełnić funkcję endosomów wczesnych [58]. Najnowsze badania wykazały, że inna izoforma RABA4D ulega specyficznej ekspresji w łagiewkach pyłkowych i odgrywa ważną rolę w ukierunkowaniu jej wzrostu w kierunku woreczka załączkowego [69].

Doświadczenia powodujące zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu GTPaz Rab wykazały ich niezwykle istotną rolę w procesach transportu do ściany komórkowej, przy czym rola białka RabA (lub Rab11) jest tu szczególnie interesująca [34]. W trakcie dojrzewania owoce mięknią, co następuje wskutek zmian w budowie ściany komórkowej, głównie ze względu na syntezę i sekrecję odpowiednich enzymów oraz syntezę nowych polimerów budujących ścianę. Biosynteza tych polimerów, oprócz celulozy i kalozy, które syntetyzowane są w błonie cytoplazmatycznej przez kompleks enzymatyczny krążący pomiędzy błonami wewnątrzkomórkowymi, zachodzi głównie w aparacie Golgiego [34].

Białko RabA4b *Arabidopsis* wykryto wraz kinazą β -fosfatydyloinozytolu-4 w obrębie cysterny trans aparatu Golgiego w trakcie jej przekształcania w cysterny TGN i tworzenia pęcherzyków wydzielniczych. Uważa się, że oba białka są komponentami kompleksów opłaszczających te pączkujące pęcherzyki, które zawierają polisacharydy ściany komórkowej [65].

Sugeruje się, że omawiane białka, przede wszystkim zaś białko Rab11, umożliwiają lub regulują sekrecję enzymów modyfikujących ścianę komórkową w tym procesie. Wyciszenie ortologu (LeRab11) w pomidorze (*Lycopersicon* Mill.), poprzez transformację antysensownym konstruktem powoduje, że owoce transgenicznych pomidorów zachowują twardość przez bardzo długi okres, wykazując również inne różnice fizjologiczne oraz rozwojowe [33]. Wydaje się więc, że wiele, choć nie wszystkie białka z grupy RabA *A. thaliana* pełnią ważną rolę w sekrecji do ściany komórkowej oraz są najprawdopodobniej zaangażowane w regulację wzrostu, modyfikację ściany komórkowej i syntezę nowej podczas cytokinezy [34].

UWAGI KOŃCOWE

Maszynaria transportu pęcherzykowego zależna od białek Rab wydaje się coraz bardziej skomplikowana, na co wskazują najnowsze badania nad jednym z białek zlokalizowanym w obrębie aparatu Golgiego – tzw. golginą GCC185. Wykazano, że ma ona miejsca wiążące aż dla 14 różnych Rab GTPaz niezbędnych w tej niezwykle dynamicznej organelli, w której zachodzi obróbka i sortowanie białek błonowych i wydzielniczych [18]. Cechą charakterystyczną wszystkich Rab jest oddziaływanie z licznymi białkami, wśród których są białka efektorowe [15, 26, 27, 38, 42, 45, 76], motory molekularne [17, 19, 26, 39, 62] i białka regulatorowe [66],

nadal jednak wiele procesów pozostaje niewyjaśnionych, szczególnie w przypadku licznych izoform i izotypów Rab o wysokiej homologii, lecz odmiennych funkcjach.

LITERATURA

- [1] AGARWAL PK, AGARWAL P, JAIN P, JHA B, REDDY MK, SOPORY SK. Constitutive overexpression of a stress-inducible small GTP-binding protein PgRab7 from *Pennisetum glaucum* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* 2008; **27**: 105–115.
- [2] AIVAZIAN D, SERRANO RL, PFEFFER S. TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J Cell Biol* 2006 **173**: 917–926.
- [3] ARARIPE JR, CUNHA E SILVA NL, LEAL ST, DE SOUZA W, RONDINELLI E. Trypanosoma cruzi: TcRAB7 protein is localised at the Golgi apparatus in epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **321**: 397–402.
- [4] AURY J-M, and >30 other authors. Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Nature* 2006; **444**: 171–178.
- [5] BLOM N, GAMMELTOFT S, BRUNAK S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999; **294**: 1351–1362.
- [6] BONIFACINO JS, HURLEY JH. Retromer. *Curr Opin Cell Biol* 2008; **20**: 427–436.
- [7] BORG S, BRANDSTRUP B, JENSEN TJ, POULSEN C. Identification of new protein species among 33 different small GTP-binding proteins encoded by cDNAs from *Lotus japonicus*, and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules. *Plant J* 1997; **11**: 237–250.
- [8] BUCCI C, LUTCKE A, STEELE-MORTIMER O, OLKKONEN VM, DUPREE P, CHIARIELLO M, BRUNI CB, SIMONS K, ZERIAL M. Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms. *FEBS Lett* 1995; **366**: 65–71.
- [9] CHEN L, DIGIAMMARINO E, ZHOU XE, WANG Y, TOH D, HODGE TW, MEEHAN EJ. High resolution crystal structure of human Rab9 GTPase: a novel antiviral drug target. *J Biol Chem* 2004; **279**: 40204–40208.
- [10] CORBEEL L, FRESON K. Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur J Pediatr* 2008; **167**: 723–729.
- [11] DE LUCAA, PROGIDA C, SPINOSA MR, ALIFANO P, BUCCI C. Characterization of the Rab7K157N mutant protein associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **372**: 283–287.
- [12] DEL NERY E, MISEREY-LENKEI S, FALGUIERES T, NIZAK C, JOHANNES L, PEREZ F, GOUD B. Rab6A and Rab6A' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic* 2006; **7**: 394–407.
- [13] DENNY PW, LEWIS S, TEMPERO JE, GOULDING D, IVENS AC, FIELD MC, SMITH DF. Leishmania RAB7: characterisation of terminal endocytic stages in an intracellular parasite. *Mol Biochem Parasitol* 2002; **123**: 105–113.
- [14] GALLWITZ D, DONATH C, SANDER C. A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-ha/bas proto-oncogene product. *Nature* 1983; **306**: 704–707.
- [15] GROSSHANS BL, ORTIZ D, NOVICK P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 11821–11827.
- [16] GU Z, STEINMETZ LM, GU X, SCHARFE C, DAVIS RW, LI WH. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 2003; **421**: 63–66.
- [17] HALES CM, VAERMAN JP, GOLDENRING JR. Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *J Biol Chem* 2002; **277**: 50415–50421.
- [18] HAYES GL, BROWN FC, HAAS AK, NOTTINGHAM RM, BARR FA, PFEFFER SR. Multiple Rab GTPase Binding Sites in GCC185 Suggest a Model for Vesicle Tethering at the Trans-Golgi. *Molec Biol Cell* 2009; **20**: 209–217.
- [19] HAMMER JA 3RD, WU XS. Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**: 69–75.
- [20] HONG MC, HUANG YS, LIN WW, FANG LS, CHEN MC. ApRab3, a biosynthetic Rab protein, accumulates on the maturing phagosomes and symbiosomes in the tropical *Sea anemone*, *Aiptasia pulchella*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2009; **152**: 249–259.

- [21] HUYNH KK, ESKELINEN EL, SCOTT CC, MALEVANETS A, SAFTIG P, GRINSTEIN S. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *EMBO J* 2007; **26**: 313–324.
- [22] HUTTER P. Rapidly evolving Rab GTPase paralogs and reproductive isolation in *Drosophila*. *Adv Genet* 2007; **58**: 1–2.
- [23] HÜBNER CA, ORTH U, SENNING A, STEGLICH C, KOHLSCHÜTTERA, KORINTHENBERG R, GAL A. Seventeen novel PLP1 mutations in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Hum Mutat* 2005; **25**: 321–322.
- [24] IHMELS J, COLLINS SR, SCHULDINER M, KROGAN NJ, WEISSMAN JS. Backup without redundancy: genetic interactions reveal the cost of duplicate gene loss. *Mol Syst Biol* 2007; **3**: 86.
- [25] JOHANSEN JN, CHOW CM, MOORE I, HAWES C. AtRAB-H1b and AtRAB-H1c GTPases, homologues of the yeast Ypt6, target reporter proteins to the Golgi when expressed in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 2009; **60**: 3179–3193.
- [26] JOHANSSON M, ROCHA N, ZWART W, JORDENS I, JANSSEN L, KUIJL C, OLKKONEN VM, NEEFJES J. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor beta III spectrin. *J Cell Biol* 2007; **176**: 459–471.
- [27] JORDENS I, FERNANDEZ-BORJA M, MARSMAN M, DUSSELJEE S, JANSSEN L, CALAFAT J, JANSSEN H, WUBBOLTS R, NEEFJES J. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol* 2001; **11**: 1680–1685.
- [28] JULENIUS K, MÅZLGAARD A, GUPTA R, BRUNAK S. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiol* 2005; **15**: 153–164.
- [29] KADDAI V, GONZALEZ T, KESLAIR F, GREMEAUX T, BONNAFOUS S, GUGENHEIM J, TRAN A, GUAL P, LE MARCHAND-BRUSTEL Y, CORMONT M. Rab4b is a small GTPase involved in the control of the glucose transporter GLUT4 localization in adipocyte. *PLoS One* 2009; **4**: e5257.
- [30] KHVOTCHEV MV, REN M, TAKAMORI S, JAHN R, SÜDHOF TC. Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca²⁺-regulated versus constitutive exocytosis. *J Neurosci* 2003; **23**: 10531–10539.
- [31] KIERCZAK M, SURMACZ L, WIEJAK J, WYROBA E. Rola adaptyn, dynaminopodobnych GTP-az i białek Rab w zaburzeniach metabolicznych oraz w przebiegu infekcji różnymi patogenami. *Post Hig Med Dośw* 2003; **57**: 727–737.
- [32] LORAINE AE, YALOVSKY S, FABRY S, GRUISSEM W. Tomato Rab1A homologs as molecular tools for studying Rab geranylgeranyl transferase in plant cells. *Plant Physiol* 1996; **110**: 1337–1347.
- [33] LU C, ZAINAL Z, TUCKER GA, LYCETT GW. Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense Rab11 GTPase gene. *Plant Cell* 2001; **13**: 1819–1833.
- [34] LYCETT G. The role of Rab GTPases in cell wall metabolism. *J Exptl Bot* 2008; **59**: 4061–4074.
- [35] MACKIEWICZ P, WYROBA E. Phylogeny and evolution of Rab7 and Rab9 proteins. *BMC Evolutionary Biology* 2009; **9**: 101–119.
- [36] MARKGRAF DF, PEPOWSKA K, UNGERMANN C. Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system. *FEBS Lett* 2007; **581**: 2125–2130.
- [37] MAZEL A, LESHEM Y, TIWARI BS, LEVINE A. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol* 2004; **134**: 118–128.
- [38] MIĄCZYŃSKA M, CHRISTOFORIDIS S, GINERA, SHEVCHENKO A, UTTENWEILER-JOSEPH S, HABERMANN B, WILM M, PARTON RG, ZERIAL M. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* 2004; **6**: 445–456.
- [39] MARSMAN M, JORDENS I, ROCHA N, KUIJL C, JANSSEN L, NEEFJES J. A splice variant of RILP induces lysosomal clustering independent of dynein recruitment. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **344**: 747–756.
- [40] MIZUNO K, KITAMURA A, SASAKI T. Rabring7, a novel Rab7 target protein with a RING finger motif. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 3741–3752.
- [41] NAHM MY, KIM SW, YUN D, LEE SY, CHO MJ, BAHK JD. Molecular and biochemical analyses of OsRab7, a rice Rab7 homolog. *Plant Cell Physiol* 2003; **44**: 1341–1349.
- [42] NAKADA-TSUKUI K, SAITO-NAKANO Y, ALI V, NOZAKI T. A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 5294–5303.
- [43] OKADA M, HUSTON CD, MANN BJ, PETRI WA JR, KITA K, NOZAKI T. Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* 2005; **4**: 827–831.

- [44] OKADA M, NOZAKI T. New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch Med Res* 2006; **37**: 244–252.
- [45] OLCHOWIK M, MIĄCZYŃSKA M. Białka efektorowe GTPazy Rab5 w regulacji endocytozy i przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych. *Post Biochem* 2009; **55**: 171–180.
- [46] OSIŃSKA M, BARTOSIEWICZ R, BILSKI H, WYROBA E. Tomographic electron microscopy and STED confocal analysis to investigate the cellular effect of RNAi of *Paramecium* duplicated *rab7* genes. *Med Biol Sci* 2009; **23**, suppl.2,22.
- [47] OSIŃSKA M, SURMACZ L, WIEJAK J, WYROBA E. A distinct pattern of Rab7 isoforms expression in single-celled eukaryote *Paramecium*. *Acta Biochim Polon* 2006; **53**: Suppl. 46, 199.
- [48] OSIŃSKA M, WYPYCH E, WIEJAK J, WYROBA E. Effect of silencing of *rab7* gene in *Paramecium*. *ELSO* 2008 (Nice) Proceedings, 104.
- [49] OSIŃSKA M, WYPYCH E, WYROBA E. Proteomic analysis of *Paramecium* Rab7 GTPases encoded by paralogous genes. *FEBS J* 2009; **276**: Suppl. 1: 380.
- [50] PALA, HALL BS, JEFFRIES TR, Field MC. Rab5 and Rab11 mediate transferrin and anti-variant surface glycoprotein antibody recycling in *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 2003; **374**: 443–451.
- [51] PEREIRA-LEAL JB, SEABRA MC. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* 2001; **313**: 889–901.
- [52] PFEFFER SR. Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 1994; **6**: 522–526.
- [53] PFEFFER S, AIVAZIAN D. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 886–896.
- [54] REN M, ZENG J, DE LEMOS-CHIARANDINI C, ROSENFELD M, ADESNIK M, SABATINI DD. In its active form, the GTP-binding protein rab8 interacts with a stress-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 5151–5155.
- [55] ROBERTSON LS, FINK GR. The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 13783–13787.
- [56] RUPNIK M, KREFT M, NOTHIAS F, GRILC S, BOBANOVIC LK, JOHANNES L, KIAUTA T, VERNIER P, DARCHEN F, ZOREC R. Distinct role of Rab3A and Rab3B in secretory activity of rat melanotrophs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; **292**: 98–105.
- [57] SAITO-NAKANO Y, LOTUS BJ, HALL N, NOZAKI T. The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 2005; **110**: 244–252.
- [58] SAMAJ J, MÜLLER J, BECK M, BÖHM N, MENZEL D. Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 594–600.
- [59] SAXENA S, BUCCI C, WEIS J, KRUTTGEN A. The small GTPase Rab7 controls the endosomal trafficking and neuritogenic signaling of the nerve growth factor receptor TrkA. *J Neurosci* 2005; **25**: 10930–10940.
- [60] SCAPIN SM, CARNEIRO FR, ALVES AC, MEDRANO FJ, GUIMAR?ES BG ZANCHIN NI. The crystal structure of the small GTPase Rab11b reveals critical differences relative to the Rab11a isoform. *J Struct Biol* 2006; **154**: 260–268.
- [61] SCHWARTZ SL, CAO C, PYLYPENKO O, RAKA, WANDINGER-NESS A. Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* 2007; **120**: 3905–3910.
- [62] SEABRA MC, COUDRIER E. Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic* 2004; **5**: 393–399.
- [63] SEKIN, AZUMA T, YOSHIKAWA T, MASUHO Y, MURAMATSU M, SAITO T. cDNA cloning of a new member of the Ras superfamily, RAB9-like, on the human chromosome Xq22.1-q22.3 region. *J Hum Genet* 2000; **45**: 318–322.
- [64] SOMSEL RODMAN J, WANDINGER-NESS A. Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* 2000; **113**: 183–192.
- [65] STAEHELIN LA, KANG BH. Nanoscale architecture of endoplasmic reticulum export sites and of Golgi membranes as determined by electron tomography. *Plant Physiol* 2008; **147**: 1454–1468.
- [66] STENMARK H, OLKKONEN VM. The Rab GTPase family. *Genome Biol* 2001; **2**: Reviews 3007.1–3007.7.
- [67] SURMACZ L, WIEJAK J, WYROBA E. Evolutionary conservancy of the endocytic machinery in the unicellular eukaryote *Paramecium*. *Biol Cell* 2003; **95**: 69–74.
- [68] SURMACZ L, WIEJAK J, WYROBA E. Cloning of two genes encoding Rab7 in *Paramecium*. *Acta Biochim Pol* 2006; **53**: 149–156.

- [69] SZUMLANSKI AL, NIELSEN E. The Rab GTPase RabA4d regulates pollen tube tip growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2009; **21**: 526–544.
- [70] TOUCHOT N, CHARDIN P, TAVITIAN A. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8210–8214.
- [71] UEDA T, YAMAGUCHI M, UCHIMIYA H, NAKANO A. Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 2001; **20**: 4730–4741.
- [72] ULLRICH O, REINSCH S, URBE S, ZERIAL M, PARTON RG. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* 1996; **135**: 913–924.
- [73] VAN DER SLUIJS P, GEREZ L. Rab GTPases as regulators of transport through endosomes. *Protoplasma* 1999; **210**: 1–10.
- [74] VERHOEVEN K, DE JONGHE P, COEN K, VERPOORTEN N, AUER-GRUMBACH M, KWON JM, FITZPATRICK D, SCHMEDDING E, DE VRIENDT E, JACOBS A, VAN GERWEN V, WAGNER K, HARTUNG HP, TIMMERMAN V. Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet* 2003; **72**: 722–727.
- [75] VONDERHEIT A, HELENIUS A. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol* 2005; **3**: e233.
- [76] WANG Y, CHEN T, HAN C, HE D, LIU H, AN H, CAI Z, CAO X. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood* 2007; **110**: 962–971.
- [77] WANG T, WONG KK, HONG W. A unique region of RILP distinguishes it from its related proteins in its regulation of lysosomal morphology and interaction with Rab7 and Rab34. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 815–826.
- [78] WYPYCH E, OSIŃSKA M, WIEJAK J, WYROBA E. Putative posttranslational modifications of *Paramecium* rab7 isoforms may result in distinct electrophoretic migration pattern. *FEBS J* 2008; **275**: Suppl. 1, 469.
- [79] WYROBA E, SURMACZ L, OSIŃSKA M, WIEJAK J. Phagosome maturation in unicellular eukaryote *Paramecium*: the presence of RILP, Rab7 and LAMP-2 homologues. *Eur J Histochem* 2007; **51**: 163–172.
- [80] YANG M, CHEN T, HAN C, LI N, WAN T, CAO X. Rab7b, a novel lysosome-associated small GTPase, is involved in monocytic differentiation of human acute promyelocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **318**: 792–799.
- [81] ZERIAL M, McBRIDE H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**: 107–117.
- [82] ZHANG X, WANG G, DUPRÉ DJ, FENG Y, ROBITAILLE M, LAZARTIGUES E, FENG YH, HÉBERT TE, WU G. Rab1 GTPase and dimerization in the cell surface expression of angiotensin II type 2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2009 **330**: 109–117.

Prof. dr hab. Elżbieta Wyroba

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa,

e-mail: e.wyroba@nencki.gov.pl