

Rab4: 细胞囊泡循环运输过程的重要因子*

陈辉积^{1,2)} 刘新光^{1,2,3)} 陈维春^{1,2,3)**}

⁽¹⁾ 广东医科大学衰老研究所, 东莞 523808; ⁽²⁾ 广东省医学分子诊断重点实验室, 东莞 523808;

⁽³⁾ 广东医科大学生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023)

摘要 囊泡运输是真核细胞中物质运输及信息交流的重要形式, Rab 蛋白在这个过程中发挥着重要功能. Rab4 是 Rab 蛋白家族的成员之一, 参与调控早期内体的分选与内体循环途径. Rab4 包括 Rab4A、Rab4B 和 Rab4C 3 个亚型. 本文主要阐述了 Rab4 的结构特征、主要的效应蛋白和参与运输的货物蛋白以及影响细胞自噬、葡萄糖摄取、神经调节、心脏功能及肿瘤发生方面的功能.

关键词 Rab4, 囊泡运输, 自噬, 葡萄糖摄取

学科分类号 Q71, R59

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0135

真核细胞的质膜、内部各类细胞器以及参与物质和信息交流的运输囊泡共同构成了复杂的生物膜系统. 囊泡利用驱动蛋白水解 ATP 产生的能量, 在微管或微丝细胞骨架充当的轨道上移动, 能够高效精确地将各种类型的大分子物质定向运输到相应的亚细胞结构. 囊泡运输包括囊泡的形成、分选、转运和融合等过程, 需要各种调控因子、识别蛋白、运输复合体、动力蛋白和微管等参与^[1]. 在物质运输过程中, 囊泡不断发生着形态、分子组成和功能上的变化, 其中 Rab 蛋白起着非常重要的作用.

Rab 蛋白是一种单体小分子 GTP 结合蛋白, 属于 Ras 超家族中最大的亚家族, 存在于所有的真核生物中. Rab 蛋白包括保守的 G 结构域和高度可变的 N 端与 C 端, G 结构域中存在 2 个分子开关(switch I 和 switch II), 是 Rab 蛋白与其调控因子相互作用的位点^[2]. Rab 蛋白存在 GTP 或 GDP 结合两种状态, 对应于蛋白质的激活或失活, 开关结构域的不同或突变, 以及与相应效应物的不同结合, 造成了 Rab 蛋白结构及功能的多样性^[3], 如参与囊泡形成时的货物选择、运输、在靶位点的融合, 使得 Rab 蛋白成为鉴定亚细胞膜的关键分子, 如同膜运输过程中的邮政编码^[4]. 人类基因组中目前已经发现了 70 个 Rab 蛋白基因^[5], 不同的 Rab

蛋白分布在细胞内不同的膜区室, 发挥着不同的功能. Rab4 是 Rab 蛋白家族中的重要一员, 是细胞内吞和囊泡循环运输调控的重要因子, 本文着重阐述 Rab4 的结构及功能.

1 Rab4 蛋白特征

Rab4 是一种进化上保守的 GTP 结合蛋白, 主要定位于网格包被囊泡、早期内体和循环内体, 是细胞内吞、循环过程的重要调节因子. Rab4 包括 Rab4A、Rab4B 和 Rab4C 3 个不同的亚型^[6]. 目前 Rab4C 的结构与功能尚不清楚. Rab4A 的直系同源基因存在于斑马鱼中而且进化保守^[7], 在人染色体上的位置为 1q42-q43^[8], 编码蛋白由 218 个氨基酸残基组成, 分子质量为 24 390 u; Rab4B 进化上保守, 在裂殖酵母(Ypt4)到高等多细胞生物中均存在^[7], 定位于染色体的位置为 19q13.2^[9], 蛋白质大小为 23 587 u, 由 213 个氨基酸残基组成. Rab4A 和 Rab4B 虽然由 2 个不同的基因编码, 但基因序列上有 93%的同源性. Rab4A 和 Rab4B 蛋白从早

* 国家自然科学基金资助项目(30900739).

** 通讯联系人.

Tel: 0769-22896048, E-mail: chenwchun@gdmc.edu.cn

收稿日期: 2016-08-27, 接受日期: 2016-10-31

期内体循环回到细胞膜的转运路径重叠^[10], 通过异戊烯化作用结合到膜上, 由香叶基转移酶将一个香叶基团连到 C 端的 2 个半胱氨酸区域^[11-13]. 但 Rab4A 和 Rab4B 的氨基酸序列、核苷酸结合位点和磷酸化修饰位点具有明显差异, 而且表现出不同的生物学功能^[14]. Rab4A 蛋白的第 204 个氨基酸残

基是丝氨酸, 有丝分裂激酶 P34cdc2 可以磷酸化该丝氨酸残基导致 Rab4A 在有丝分裂期间失活, 从细胞膜解离下来而积累在细胞质中. Rab4B 蛋白第 199 位是谷氨酰胺, 被认为是减少 Rab4A 磷酸化与细胞质累积的替代物, 在有丝分裂过程中处于激活状态^[15-17](图 1).

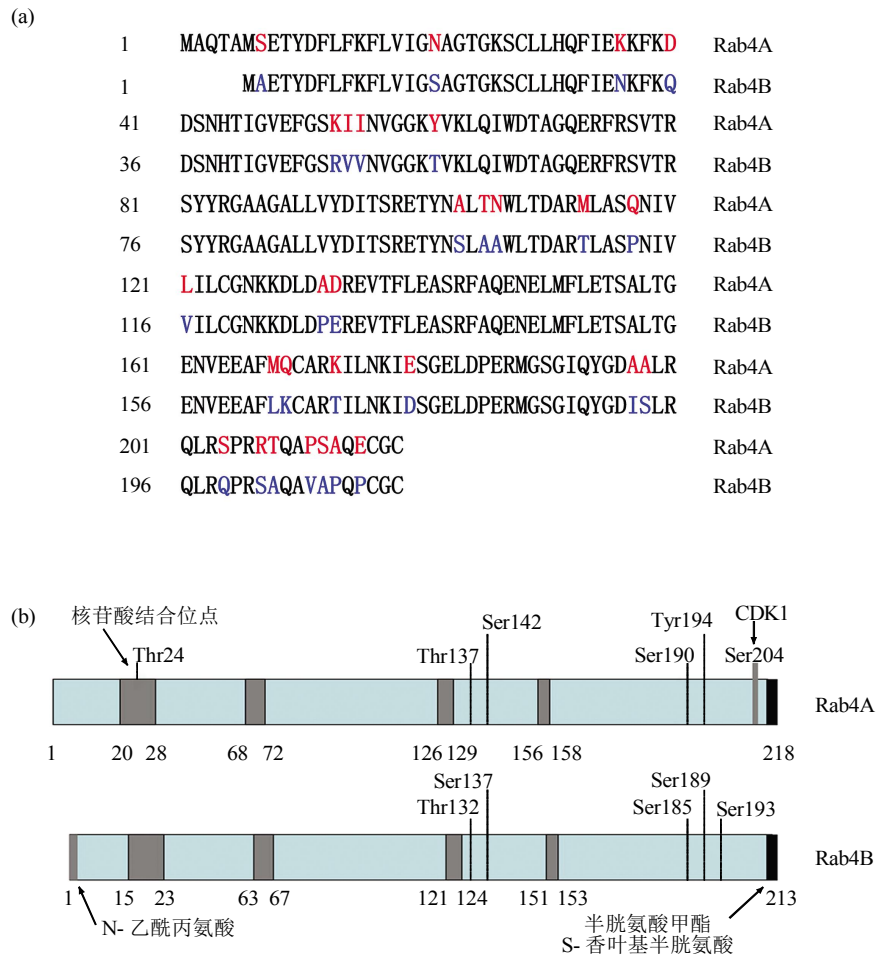


Fig. 1 The amino acid sequence alignment(a) and the secondary structure of Rab4A and Rab4B(b)

图 1 Rab4A 和 Rab4B 的氨基酸序列比对结果(a)及二级结构(b)

2 Rab4 的效应蛋白

Rab4 发挥功能需要从胞质中募集特异的效应蛋白, GTP 结合引起 Rab4 分子表面的 switch I 和 switch II 等结构域的构象改变, 从而更加有利于其他的效应物结合^[2]. 目前已被证实的效应物主要包括 AKAP10/D-AKAP2、CD2AP、GRIPAP1/GRASP1、NDRG1、RCP/RAB11FIP1、Rabaptin5/RABEP1、RUFY1/Rabip4s 和 ZFYVE20-VPS45/Rabenosyn5 等

(表 1). RUFY1/Rabip4s 与 Rab4 调节整合素运输并影响细胞的迁移和黏附^[18], 并能调节脂肪细胞中葡萄糖转运体 4(glucose transporter 4, GLUT4)的内吞、转运, 影响葡萄糖的摄取^[19]. Rabaptin5/RABEP1 是一种细胞质蛋白, 又是 Rab5 和 Rab4 共同的效应蛋白, 由 Rab4 召集到早期内体上, 参与早期内体的定位、物质转运与循环, 调节内体形态、成熟过程和功能^[20-21].

Table 1 Main effectors of Rab4
表 1 Rab4 的主要效应分子

名称 / 别名	功能	参考文献
AKAP10/D-AKAP2	通过 C 端与含有 PKA 和 PDZ 结构域的蛋白质相互作用	[22]
CD2AP	与 Rab4 相互作用并调控早期内体的形态	[23-24]
GRIPAP1/GRASP1	调节神经元 Ras 信号和 AMPA 受体	[25-26]
NDRG1	参与 E- 钙黏蛋白的囊泡循环过程	[27]
RCP/RAB11FIP1	介导囊泡循环	[28]
Rabaptin5/RABEP1	调节内体形态与功能	[21]
RUFY1/Rabip4s	调节内吞货物的循环	[29-30]
ZFYVE20-VPS45/Rabenosyn5	介导内吞作用	[31]

3 Rab4 的活性调节

Rab4 与 GTP 或 GDP 的结合及功能的发挥还直接或间接受到其他蛋白质或信号分子的调节(图 2a)。细胞内信息分子 cAMP 通过磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)非依赖途径增加 GTP 与内源性 Rab4 结合^[32], 使后者被激活。Rab4-GTP 的结合又能被 PKCΔ、牛黄胆酸钠共转运多肽(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)转移^[33]及牛黄熊去氧胆酸钠(tauroursodeoxycholate, TUDC)^[34]影响。人组氨酸结构域磷酸酪氨酸磷酸化酶(human his domain phosphotyrosine phosphatase, HDPTP)能与 Rab4 相互作用, 调节 Rab4 的空间分布和整合蛋白的运输^[35]。作为活化状态的 Rab4, Rab4-GTP 的活性受到 GDP 解离抑制因子(GDP dissociation inhibitor, GDI)和 GTP 酶活化蛋白(GTPase-activating proteins, GAPs)的调节。研究发现, GDI 第 213 处丝氨酸残基的磷酸化能促进 GDI-Rab4 复合体的形成, 加速 Rab4 功能性循环^[36], GDI 的磷酸化又受皮质酮及糖皮质激素调节。GAP 活性则受 P85 蛋白调节, 改变细胞中 Rab4 的活性, 影响血小板源生长因子受体(platelet-derived growth factor receptors, PDGFR)的运输^[37]。GAP 激动剂 TBC1D16 通过加强 Rab4A 固有的 GTP 水解作用, 可以改变 Rab4A 在胞膜的定位^[38]。可见, Rab4 GTP 结合酶的活性可以通过相关蛋白质的直接作用来抑制或激活, 也可以间接地通过影响 GDI 或 GAP 来调节。

4 Rab4 蛋白参与运输的主要蛋白

细胞外或胞膜表面大分子跨膜运输到胞内的过

程中, 首先由细胞膜内陷形成早期内体进入细胞, 早期内体经过分选, 被运输到相应的靶细胞器或循环回到细胞膜。在此过程中 Rab4 调节早期内体的分选与循环^[39-40](图 2b)。Rab4 的 GTP 酶级联反应, 促进早期内体招募 ADP 核糖基化因子样蛋白 Arl1, 利于 Rab4 依赖的内体分选位点与网格蛋白复合体的连接, 影响早期内体的分选^[41]。Rab4 在结合 GDP 或水解 GTP 之间不断转换变化, 介导胞膜表面蛋白的快速内吞、分选与循环运输, 影响囊泡定向运动所需的分子间相互作用^[42]。Rab4 内体调节细胞膜表面或内化蛋白的循环, 参与由 AP1 或网格蛋白包被的囊泡介导的受体蛋白循环途径^[43]。目前已经报道了诸多受 Rab4 影响的受体蛋白或膜表面蛋白(表 2), 涉及众多的生物学功能。转铁蛋白受体(transferrin receptors, TfR)由网格蛋白依赖的内吞作用进入细胞, 在早期内体时被分选到循环内体回到细胞膜^[44]。过表达 Rab4A 促使 Tf 由早期内体循环回到细胞膜和 TfR 在细胞膜累积, 干扰 Rab4A 则加快 TfR 的循环^[39]。Rab4B 与网格蛋白衔接复合体 1γ 亚基(γ-subunit of the clathrin adaptor complex 1, AP1γ)在网格蛋白包被的囊泡上相互作用, 调节 TfR 的循环。同时过表达 Rab4A 和 Rab4B 时, 发现 Rab4B 与 AP1γ 相互作用的效率比 Rab4A 更高, 并可以诱导 Rab4 阳性、AP1γ 阳性和早期内体抗原 1 (early endosomes antigen, EEA1)阴性外围结构的形成^[45]。此外, Rab4A 和 Rab4B 均介导 GLUT4 转运, 调节细胞摄取葡萄糖的运输过程^[46]。研究者发现: 在肥胖糖尿病患者和小鼠的脂肪组织中 Rab4B 表达降低; 在 3T3-L1 脂肪细胞中, Rab4B 与 GLUT4 共定位, 调节 GLUT4 的运输, 影响由胰岛素诱导的葡萄糖摄取过程; 而

Rab4A 与 GLUT4 的共定位很少，其表达下调不能明显改变基础的或胰岛素诱导的葡萄糖水平^[47]。由此可知，Rab4A 和 Rab4B 都参与囊泡循环运输路径，两者在功能上有一定的重叠，但各司其职。

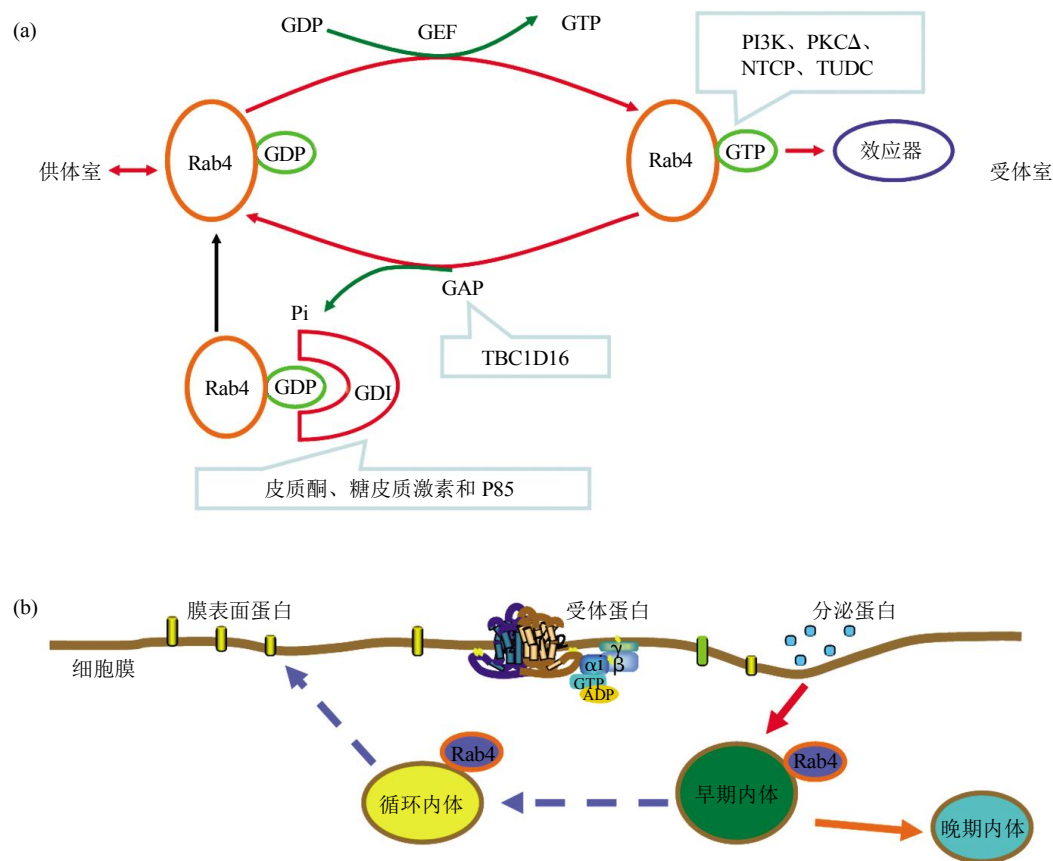


Fig. 2 Regulation of Rab4 activity(a) and its involvement of vesicular transportation (b)
图 2 Rab4 活性调节(a)及其参与的囊泡运输(b)

Table 2 Proteins transported by Rab4 endosomes and their functions
表 2 Rab4 内体运输的蛋白分子及其功能

名称	功能	参考文献
RhoGAP68F	调节小分子 Rho GTPase	[48]
Furin	参与高尔基网络的酶分泌途径	[49]
KCNQ1	调节 cAMP 相关的钾离子电压门控通道	[50]
Apelin-13	结合 G 蛋白，调节信号通路	[51]
Drosophila 14-3-3e	抗微生物多肽分泌和先天免疫	[52]
TrkA	参与神经元的生存与分化	[53]
Musk	参与神经肌肉接头的形成	[54]
β1-AR	调节细胞分化和基因表达	[55]
GR	调节葡萄糖水平	[56]
GPR40	加强胰岛素分泌	[57]
SSTR3	结合 G 蛋白并调节生长抑素信号通路	[58]
β2-AR	调节细胞分化和基因表达	[59]
ABCA1	调节多余的细胞脂质外流的转运	[60]
FVIIa	参与凝血级联反应的启动过程	[61]
TfR	调节受体介导的 Tf 内吞转运过程	[45]
GLUT4	调节胰岛素诱导的葡萄糖摄取	[47]

5 Rab4 蛋白的生物学功能

5.1 Rab4 蛋白与自噬

自噬作用是一个保守的过程, 利用双层膜囊泡包裹内容物运输至溶酶体进行处理, 是胞内特异性的一种囊泡运输, 近期研究发现 Rab4 参与其中。血管中的层流切变压力, 可以提高血管内皮细胞 Rab4 的表达水平, 进而促进细胞的自噬作用; 干扰 Rab4 表达, 导致高水平的自噬标志蛋白 Beclin1 和 LC3 II 衰减而自噬底物 P62 表达水平明显升高, 自噬减少^[62]。溶酶体是自噬过程的主要场所, 其特征蛋白为 P67。锥虫体内 Rab4 的同源蛋白 TbRAB4 缺乏时 P67 蛋白在溶酶体内分布分散; TbRAB4 激活时 P67 蛋白分布紧密, 增加溶酶体对流体相的摄取^[63]。人类 T 细胞白血病病毒(human T-cell lymphotropic virus, HTLV)相关内生序列 (HTLV-related endogenous sequence1, HRES-1) 与 Rab4 结合形成复合物, HRES-1/Rab4 促进自噬体膜组件微管相关蛋白轻链 3(light chain 3, LC3)阳性自噬体的形成和线粒体的保留来调节自噬^[64]。HRES-1/Rab4 过表达促进线粒体与 LC3 共定位, 增加外周血淋巴细胞的线粒体数量, 减少细胞中线粒体自噬引发蛋白 (dynamin-related protein 1, Drp1) 的形成, 这很可能是系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 的致病原因^[65]。可见 Rab4 能调节流体相向溶酶体的运输, 与自噬相关蛋白作用调节自噬。

5.2 Rab4 蛋白与葡萄糖调节

GLUT4 对维持葡萄糖稳态有着重要的作用^[66]。作为细胞内囊泡运输的重要调节因子, Rab4 调节 GLUT4 的运输与定位, 从而影响细胞对葡萄糖的摄取与利用^[67]。在细胞中降低 Rab4 的表达, 可抑制 GLUT4 的转运; 提高细胞中 Rab4 的转录和表达水平或 Rab4 的磷酸化水平, 均能调节 GLUT4 的运输, 促进细胞对葡萄糖摄取与利用^[68]。Rab4A 和 Rab4B 均介导 GLUT4 的转运, 调节 GLUT4 在细胞膜的分布与转位, 影响心肌细胞对葡萄糖的摄取^[66]。但研究者发现, 在肥胖糖尿病患者和小鼠的脂肪组织中 Rab4B 表达降低; 在 3T3-L1 脂肪细胞中, GLUT4 的定位与运输主要由 Rab4B 负责, 而不是 Rab4A^[47]。另有研究发现胰高血糖素受体 (glucagon receptor, GR) 与 Rab4 也能在细胞中共定位, 通过 Rab4 阳性囊泡循环运输^[56]。Rab4 还可能是胰岛素作用于脂肪细胞胞内囊泡运输的靶点, 胰

岛素通过 PI3K 依赖的信号通路来刺激 Rab4 的 GTP 交换, 促进 Rab4 囊泡运输并加快细胞对葡萄糖的摄取利用^[69]。阿托伐他汀能降低胰岛素诱导的胰岛素受体底物酪氨酸磷酸化和 Akt 丝 / 苏氨酸磷酸化, 导致 Rab4 和 RhoA 数量减少, 影响脂肪细胞对葡萄糖的摄取^[70]。昆虫体内也有类似的研究结果, 在幼虫体内干扰 Rab4B 表达则降低糖原水平, 抑制了糖原合酶的转录, 小蝇发生不正常的变态反应或幼体死亡^[71]。可见, Rab4 介导的囊泡运输过程对 GLUT4 调节, 是葡萄糖水平调控的重要影响因素。

5.3 Rab4 蛋白与神经系统

5-羟色胺 (serotonin, 5-HT) 是一种抑制性神经递质, 在大脑皮层及神经突触内含量较高, 调节神经的生理活动。5-羟色胺转运体 (serotonin transporter, SERT) 则是一种对 5-HT 有高度亲和力的跨膜转运蛋白, 是影响细胞摄取 5-HT 的主要因素。高剂量 5-HT 刺激细胞可以诱导 Rab4 的转酰胺酶作用并使 Rab4 处于激活的 Rab4-GTP 形式, 影响了 SERT 从细胞内向细胞质膜的定位与转移作用^[72]。细胞质中存在高浓度的 5-HT, 将导致 Rab4 的激活与 5-羟色胺化, 从而加强了细胞质中 SERT 与 Rab4-GTP 酶的相互联系, 促进细胞对 5-HT 的摄取^[73]。体内实验表明 Rab4 与 SERT 的共同作用有助于调节血中的 5-HT。小鼠被灌注 5-HT, 血小板表面 SERT 减少, SERT 与 Rab4 关联加强及 Rab4-GTP 升高。注射帕罗西汀后则降低血小板中的 5-HT, 阻碍了 SERT 与 Rab4 结合^[74]。可见 Rab4 通过 SERT 调节 5-HT, 影响神经活动。

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 最早出现的异常是内吞系统功能紊乱, 在轻度认知功能障碍和 AD 患者的基底前脑胆碱能神经中 Rab4 选择性地上调^[75]。暴露在慢性不可预测的压力下能引起前额皮质中 Rab4B 表达减少; 重度抑郁症患者也出现突触相关基因 Rab4B 的表达下降。Rab4B 基因的改变也可导致抑郁行为。此外, Rab4B 介导的内体循环还可以起到维护脊柱大小的关键作用^[76], 调节爪蟾视网膜神经轴突的伸长与扩展^[77]。可见 Rab4 对神经元的正常功能同样至关重要。

5.4 Rab4 蛋白与心脏功能

β -AR 是介导儿茶酚胺作用的一类组织受体, 属于 G 蛋白耦联型, 对心脏活动有重要的调节作用。Rab4 是调节 β -AR 内吞、分选和循环至胞膜的重要因子之一^[78]。研究认为, 过表达 Rab4 可以

显著促进内源性的 β -AR 蛋白从内体循环回到胞膜, 加强了由异丙肾上腺素刺激 cAMP 而产生的 β -AR 信号. Rab4 是内源性 β -AR 循环的速率限制因子, 增强 Rab4 介导的转运能加强 β -AR 在心肌细胞的功能^[79]. 在 Akt2 缺失的小鼠心肌层细胞, 在药物或 siRNA 抑制 Akt2 基因的细胞中, Rab4A mRNA 转录和蛋白质的表达均上调, 促进 β -AR 的循环运输, 导致 β -AR 对心脏肥大的刺激作用更加强^[80]. Rab4A 还可以调节 β -AR 的复敏过程来影响心脏功能^[81]. 此外, Rab4 通过调节心肌细胞钾通道相关基因 (human ether-a-go-go-related gene, hERG) 参与心肌细胞动作电位复极过程. 过表达 Rab4 导致质膜 hERG 表达水平下降, 神经前体细胞发育下调蛋白 4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down regulated 4-2, Nedd4-2) 表达升高, 后者是一种泛素连接酶, 可以靶向结合 hERG 钾通道使其泛素化和降解. 可见 Rab4 通过升高 Nedd4-2, 降解 hERG, 从而调节心脏钾通道的稳态与心肌复极化^[82]. 已有研究表明, Rab4 主要通过调节 β -AR 和 hERG 影响心脏功能.

5.5 Rab4 蛋白与肿瘤

Rab4 在肿瘤发生发展等方面的作用也有一些报道. 组织蛋白原 L 调控肿瘤的微环境, 当其分泌增加时, 可以促使人黑色素瘤细胞表型向高致瘤性和高转移性转变. 研究发现, Rab4A 突变抑制组织蛋白原 L 的分泌, 过表达野生型 Rab4A 则使组织蛋白原 L 分泌增加, Rab4A 通过调节组织蛋白原 L 分泌, 影响人黑色素细胞在裸鼠的肿瘤表型^[83]. P 糖蛋白是一种胞膜糖蛋白, 是肿瘤多抗药的主要因素. Rab4-GTP 与 P 糖蛋白形成功能复合体, 调节肿瘤细胞内 P 糖蛋白的运输. 在耐药骨髓白血病细胞 K562ADR 中过表达 Rab4 可以降低细胞表面的 P 糖蛋白, 增加了细胞内道诺霉素的累积, 从而减少了 K562ADR 细胞多抗药表型. 干扰 K562ADR 细胞内 Rab4 的表达则增加肿瘤细胞膜表面 P 糖蛋白的表达, 降低肿瘤细胞对道诺霉素的摄取^[84].

6 展 望

Rab4 蛋白的活性受许多调控因子和效应蛋白影响, 同时又参与众多蛋白质货物在细胞内的运输, 从而影响细胞内诸多生物学功能. 新的研究表明, Rab4 参与 G 蛋白耦联受体成员血管紧张素 II 受体 1 (angiotensin II type I receptor, ATR1) 的运

输及定位^[85], 能与异三聚体 G 蛋白相互作用, 并能调整 Wnt 信号通路的平面细胞极性, 深入探讨 Rab4 影响的信号通路能为揭示 Rab4 调控细胞和整体水平的生物功能提供新的机制. 然而, Rab4 如何在体内中循环利用, 如何精确调节蛋白质货物依赖的运输途径, Rab4 如何与其他 GTPase 一起调控囊泡的聚集、融合、靶向输送, 怎样调节代谢和信号途径, 发挥功能的时间和空间的控制等诸多方面的分子机理仍不明确. GDI、GAP 等调节因子的定位结合, 与效应物的相互作用能部分解释这些过程, 但完全阐明其中的机理还需要更多的研究成果来支撑. 随着实验技术的改进, 研究手段的创新, 必将发现更多 Rab4 的调控因子、效应蛋白和 Rab4 参与运输的货物蛋白, 并揭示这些蛋白质因子相互作用的网络及信号通路.

参 考 文 献

- [1] Rothman J E. The machinery and principles of vesicle transport in the cell. *Nature Medicine*, 2002, **8**(10): 1059-1062
- [2] Vetter I R, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, NY)*, 2001, **294**(5545): 1299-1304
- [3] Ostermeier C, Brunger A T. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*, 1999, **96**(3): 363-374
- [4] Barr F A. Review series: Rab GTPases and membrane identity: causal or inconsequential?. *The Journal of Cell Biology*, 2013, **202**(2): 191-199
- [5] Wandinger-Ness A, Zerial M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2014, **6**(11): a022616
- [6] Galvez T, Gilleron J, Zerial M, *et al.* SnapShot: Mammalian Rab proteins in endocytic trafficking. *Cell*, 2012, **151**(1): 234-234.e232
- [7] Pereira-Leal J B, Seabra M C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 2001, **313**(4): 889-901
- [8] Rousseau-Merck M F, Zahraoui A, Touchot N, *et al.* Chromosome assignment of four RAS-related RAB genes. *Human Genetics*, 1991, **86**(4): 350-354
- [9] Cho M H, Castaldi P J, Wan E S, *et al.* A genome-wide association study of COPD identifies a susceptibility locus on chromosome 19q13. *Human Molecular Genetics*, 2012, **21**(4): 947-957
- [10] Stenmark H. The Rabs: a family at the root of metazoan evolution. *BMC Biology*, 2012, **10**: 68-71
- [11] Casey P J, Seabra M C. Protein prenyltransferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**(10): 5289-5292
- [12] Maurer-Stroh S, Washietl S, Eisenhaber F. Protein prenyltransferases. *Genome Biology*, 2003, **4**(4): 212-220

- [13] Palsuledesai C C, Distefano M D. Protein prenylation: enzymes, therapeutics, and biotechnology applications. *ACS Chemical Biology*, 2015, **10**(1): 51–62
- [14] Gurkan C, Lapp H, Alory C, *et al.* Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: the membrome. *Molecular Biology of The Cell*, 2005, **16**(8): 3847–3864
- [15] Van Der Sluijs P, Hull M, Huber L A, *et al.* Reversible phosphorylation—dephosphorylation determines the localization of rab4 during the cell cycle. *The EMBO Journal*, 1992, **11**(12): 4379–4389
- [16] Gerez L, Mohrmann K, Van Raak M, *et al.* Accumulation of rab4GTP in the cytoplasm and association with the peptidyl-prolyl isomerase pin1 during mitosis. *Molecular Biology of The Cell*, 2000, **11**(7): 2201–2211
- [17] Krawczyk M, Leimgruber E, Seguin-Estevéz Q, *et al.* Expression of RAB4B, a protein governing endocytic recycling, is co-regulated with MHC class II genes. *Nucleic Acids Research*, 2007, **35**(2): 595–605
- [18] Vukmirica J, Monzo P, Le Marchand-Brustel Y, *et al.* The Rab4A effector protein Rabip4 is involved in migration of NIH 3T3 fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(47): 36360–36368.
- [19] Mari M, Monzo P, Kaddai V, *et al.* The Rab4 effector Rabip4 plays a role in the endocytotic trafficking of Glut 4 in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Cell Science*, 2006, **119**(Pt 7): 1297–1306
- [20] Yamamoto H, Koga H, Katoh Y, *et al.* Functional cross-talk between Rab14 and Rab4 through a dual effector, RUFY1/Rabip4. *Molecular Biology of The Cell*, 2010, **21**(15): 2746–2755
- [21] Kalin S, Hirschmann D T, Buser D P, *et al.* Rabaptin5 is recruited to endosomes by Rab4 and Rabex5 to regulate endosome maturation. *Journal of Cell Science*, 2015, **128**(22): 4126–4137
- [22] Eggers C T, Schafer J C, Goldenring J R, *et al.* D-AKAP2 interacts with Rab4 and Rab11 through its RGS domains and regulates transferrin receptor recycling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, **284**(47): 32869–32880
- [23] Fernandez D R, Telarico T, Bonilla E, *et al.* Activation of mammalian target of rapamycin controls the loss of TCRzeta in lupus T cells through HRES-1/Rab4-regulated lysosomal degradation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md:1950)*, 2009, **182**(4): 2063–2073
- [24] Cormont M, Meton I, Mari M, *et al.* CD2AP/CMS regulates endosome morphology and traffic to the degradative pathway through its interaction with Rab4 and c-Cbl. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2003, **4**(2): 97–112
- [25] Hoogenraad C C, Popa I, Futai K, *et al.* Neuron specific Rab4 effector GRASP-1 coordinates membrane specialization and maturation of recycling endosomes. *PLoS Biology*, 2010, **8**(1): e1000283
- [26] Peng H Y, Chen G D, Hsieh M C, *et al.* Spinal SGK1/GRASP-1/Rab4 is involved in complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain *via* regulating dorsal horn GluR1-containing AMPA receptor trafficking in rats. *Pain*, 2012, **153**(12): 2380–2392
- [27] Kachhap S K, Faith D, Qian D Z, *et al.* The N-Myc down regulated Gene1 (NDRG1) Is a Rab4a effector involved in vesicular recycling of E-cadherin. *PLoS One*, 2007, **2**(9): e844
- [28] Wallace D M, Lindsay A J, Hendrick A G, *et al.* The novel Rab11-FIP/Rip/RCP family of proteins displays extensive homo- and hetero-interacting abilities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **292**(4): 909–915
- [29] Takeuchi H, Takada A, Kuboniwa M, *et al.* Intracellular periodontal pathogen exploits recycling pathway to exit from infected cells. *Cellular Microbiology*, 2015, **18**(7): 928–948
- [30] Ivan V, Martinez-Sanchez E, Sima L E, *et al.* AP-3 and Rabip4 coordinately regulate spatial distribution of lysosomes. *PLoS One*, 2012, **7**(10): e48142
- [31] Stockler S, Corvera S, Lambright D, *et al.* Single point mutation in Rabenosyn-5 in a female with intractable seizures and evidence of defective endocytotic trafficking. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2014, **9**(1): 141–151
- [32] Schonhoff C M, Thankey K, Webster C R, *et al.* Rab4 facilitates cyclic adenosine monophosphate-stimulated bile acid uptake and Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide translocation. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2008, **48**(5): 1665–1670
- [33] Park S W, Schonhoff C M, Webster C R, *et al.* Protein kinase Cdelta differentially regulates cAMP-dependent translocation of NTCP and MRP2 to the plasma membrane. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2012, **303**(5): G657–665
- [34] Park S W, Schonhoff C M, Webster C R, *et al.* Rab11, but not Rab4, facilitates cyclic AMP- and taurochenodeoxycholate-induced MRP2 translocation to the plasma membrane. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2014, **307**(8): G863–870
- [35] Chen D Y, Li M Y, Wu S Y, *et al.* The Bro1-domain-containing protein Myopic/HDPTP coordinates with Rab4 to regulate cell adhesion and migration. *Journal of Cell Science*, 2012, **125**(Pt 20): 4841–4852
- [36] Liu W, Yuen E Y, Yan Z. The stress hormone corticosterone increases synaptic alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors *via* serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) regulation of the GDI-Rab4 complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(9): 6101–6108
- [37] Chamberlain M D, Oberg J C, Furber L A, *et al.* Deregulation of Rab5 and Rab4 proteins in p85R274A-expressing cells alters PDGFR trafficking. *Cellular Signalling*, 2010, **22**(10): 1562–1575
- [38] Goueli B S, Powell M B, Finger E C, *et al.* TBC1D16 is a Rab4A GTPase activating protein that regulates receptor recycling and EGF receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(39): 15787–15792
- [39] Mccaffrey M W, Bielli A, Cantalupo G, *et al.* Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS Letters*, 2001, **495**(1–2): 21–30
- [40] Van Der Sluijs P, Hull M, Webster P, *et al.* The small GTP-binding

- protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*, 1992, **70**(5): 729–740
- [41] D'souza R S, Semus R, Billings E A, *et al.* Rab4 orchestrates a small GTPase cascade for recruitment of adaptor proteins to early endosomes. *Current Biology:CB*, 2014, **24**(11): 1187–1198
- [42] Potokar M, Lacovich V, Chowdhury H H, *et al.* Rab4 and Rab5 GTPase are required for directional mobility of endocytic vesicles in astrocytes. *Glia*, 2012, **60**(4): 594–604
- [43] Pagano A, Crottet P, Prescianotto-Baschong C, *et al.* *In vitro* formation of recycling vesicles from endosomes requires adaptor protein-1/clathrin and is regulated by rab4 and the connector rabaptin-5. *Molecular Biology of The Cell*, 2004, **15**(11): 4990–5000
- [44] Grant B D, Donaldson J G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, **10**(9): 597–608
- [45] Perrin L, Lacas-Gervais S, Gilleron J, *et al.* Rab4b controls an early endosome sorting event by interacting with the gamma-subunit of the clathrin adaptor complex 1. *Journal of Cell Science*, 2013, **126**(Pt 21): 4950–4962
- [46] Chen Y, Lippincott-Schwartz J. Rab10 delivers GLUT4 storage vesicles to the plasma membrane. *Communicative & Integrative Biology*, 2013, **6**(3): e23779
- [47] Kaddai V, Gonzalez T, Keslair F, *et al.* Rab4b is a small GTPase involved in the control of the glucose transporter GLUT4 localization in adipocyte. *PloS One*, 2009, **4**(4): e5257
- [48] De Madrid B H, Greenberg L, Hatini V. RhoGAP68F controls transport of adhesion proteins in Rab4 endosomes to modulate epithelial morphogenesis of *Drosophila* leg discs. *Developmental Biology*, 2015, **399**(2): 283–295
- [49] Arsenault D, Lucien F, Dubois C M. Hypoxia enhances cancer cell invasion through relocalization of the proprotein convertase furin from the trans-Golgi network to the cell surface. *Journal of Cellular Physiology*, 2012, **227**(2): 789–800
- [50] Rapetti-Mauss R, O'mahony F, Sepulveda F V, *et al.* Oestrogen promotes KCNQ1 potassium channel endocytosis and postendocytic trafficking in colonic epithelium. *The Journal of Physiology*, 2013, **591**(Pt 11): 2813–2831
- [51] Lee D K, Ferguson S S, George S R, *et al.* The fate of the internalized apelin receptor is determined by different isoforms of apelin mediating differential interaction with beta-arrestin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, **395**(2): 185–189
- [52] Shandala T, Woodcock J M, Ng Y, *et al.* *Drosophila* 14-3-3epsilon has a crucial role in anti-microbial peptide secretion and innate immunity. *Journal of Cell Science*, 2011, **124**(Pt 13): 2165–2174
- [53] Georgieva M V, De Pablo Y, Sanchis D, *et al.* Ubiquitination of TrkA by Nedd4-2 regulates receptor lysosomal targeting and mediates receptor signaling. *Journal of Neurochemistry*, 2011, **117**(3): 479–493
- [54] Luisikandl S, Woller B, Schlauf M, *et al.* Endosomal trafficking of the receptor tyrosine kinase MuSK proceeds *via* clathrin-dependent pathways, Arf6 and actin. *The FEBS Journal*, 2013, **280**(14): 3281–3297
- [55] Gardner L A, Hajjhussein H, Frederick-Dyer K C, *et al.* Rab11a and its binding partners regulate the recycling of the $\alpha 1$ -adrenergic receptor. *Cellular Signalling*, 2011, **23**(1): 46–57
- [56] Krilov L, Nguyen A, Miyazaki T, *et al.* Glucagon receptor recycling: role of carboxyl terminus, beta-arrestins, and cytoskeleton. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2008, **295**(5): C1230–1237
- [57] Qian J, Wu C, Chen X, *et al.* Differential requirements of arrestin-3 and clathrin for ligand-dependent and -independent internalization of human G protein-coupled receptor 40. *Cellular Signalling*, 2014, **26**(11): 2412–2423
- [58] Tower-Gilchrist C, Lee E, Sztul E. Endosomal trafficking of the G protein-coupled receptor somatostatin receptor 3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, **413**(4): 555–560
- [59] Temkin P, Lauffer B, Jager S, *et al.* SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nature Cell Biology*, 2011, **13**(6): 715–721
- [60] Tanaka A R, Kano F, Yamamoto A, *et al.* Formation of cholesterol-enriched structures by aberrant intracellular accumulation of ATP-binding cassette transporter A1. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 2008, **13**(8): 889–904
- [61] Nayak R C, Keshava S, Esmon C T, *et al.* Rab GTPases regulate endothelial cell protein C receptor-mediated endocytosis and trafficking of factor VIIa. *PloS One*, 2013, **8**(3): e59304
- [62] Yao P, Zhao H, Mo W, *et al.* Laminar shear stress promotes vascular endothelial cell autophagy through upregulation with Rab4. *DNA and Cell Biology*, 2016, **35**(3): 118–123
- [63] Hall B S, Pal A, Goulding D, *et al.* Rab4 is an essential regulator of lysosomal trafficking in trypanosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(43): 45047–45056
- [64] Talaber G, Miklossy G, Oaks Z, *et al.* HRES-1/Rab4 promotes the formation of LC3 (+) autophagosomes and the accumulation of mitochondria during autophagy. *PloS One*, 2014, **9**(1): e84392
- [65] Caza T N, Fernandez D R, Talaber G, *et al.* HRES-1/Rab4-mediated depletion of Drp1 impairs mitochondrial homeostasis and represents a target for treatment in SLE. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2014, **73**(10): 1888–1897
- [66] Bryant N J, Govers R, James D E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, **3**(4): 267–277
- [67] Vollenweider P, Martin S S, Haruta T, *et al.* The small guanosine triphosphate-binding protein Rab4 is involved in insulin-induced GLUT4 translocation and actin filament rearrangement in 3T3-L1 cells. *Endocrinology*, 1997, **138**(11): 4941–4949
- [68] Lee J O, Lee S K, Jung J H, *et al.* Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*, 2011, **226**(4): 974–981
- [69] Shibata H, Omata W, Kojima I. Insulin stimulates guanine nucleotide exchange on Rab4 *via* a wortmannin-sensitive signaling pathway in rat adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*,

- 1997, **272**(23): 14542–14546
- [70] Takaguri A, Satoh K, Itagaki M, *et al.* Effects of atorvastatin and pravastatin on signal transduction related to glucose uptake in 3T3L1 adipocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2008, **107**(1): 80–89
- [71] Hou L, Cai M J, Liu W, *et al.* Small GTPase Rab4b participates in the gene transcription of 20-hydroxyecdysone and insulin pathways to regulate glycogen level and metamorphosis. *Developmental Biology*, 2012, **371**(1): 13–22
- [72] Ahmed B A, Jeffus B C, Bukhari S I, *et al.* Serotonin transamidates Rab4 and facilitates its binding to the C terminus of serotonin transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**(14): 9388–9398
- [73] Mercado C P, Kilic F. Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Molecular Interventions*, 2010, **10**(4): 231–241
- [74] Ziu E, Mercado C P, Li Y, *et al.* Down-regulation of the serotonin transporter in hyperreactive platelets counteracts the pro-thrombotic effect of serotonin. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012, **52**(5): 1112–1121
- [75] Ginsberg S D, Mufson E J, Alldred M J, *et al.* Upregulation of select rab GTPases in cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2011, **42**(2): 102–110
- [76] Kang H J, Voleti B, Hajsan T, *et al.* Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. *Nature Medicine*, 2012, **18**(9): 1413–1417
- [77] Falk J, Konopacki F A, Zivraj K H, *et al.* Rab5 and Rab4 regulate axon elongation in the *Xenopus* visual system. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2014, **34**(2): 373–391
- [78] Seachrist J L, Anborgh P H, Ferguson S S. beta 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(35): 27221–27228
- [79] Filipeanu C M, Zhou F, Lam M L, *et al.* Enhancement of the recycling and activation of beta-adrenergic receptor by Rab4 GTPase in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**(16): 11097–11103
- [80] Etzion S, Etzion Y, Debosch B, *et al.* Akt2 deficiency promotes cardiac induction of Rab4a and myocardial beta-adrenergic hypersensitivity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2010, **49**(6): 931–940
- [81] Sack M N. Rab4a signaling unmasks a pivotal link between myocardial homeostasis and metabolic remodeling in the diabetic heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2010, **49**(6): 908–910
- [82] Cui Z, Zhang S. Regulation of the human ether-a-go-go-related gene (hERG) channel by Rab4 protein through neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 4-2 (Nedd4-2). *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288**(30): 21876–21886
- [83] Barbarin A, Frade R. Procathepsin L secretion, which triggers tumour progression, is regulated by Rab4a in human melanoma cells. *The Biochemical Journal*, 2011, **437**(1): 97–107
- [84] Ferrandiz-Huertas C, Fernandez-Carvajal A, Ferrer-Montiel A. Rab4 interacts with the human P-glycoprotein and modulates its surface expression in multidrug resistant K562 cells. *International Journal of Cancer Journal International du Cancer*, 2011, **128**(1): 192–205
- [85] Esseltine J L, Dale L B, Ferguson S S. Rab GTPases bind at a common site within the angiotensin II type I receptor carboxyl-terminal tail: evidence that Rab4 regulates receptor phosphorylation, desensitization, and resensitization. *Molecular Pharmacology*, 2011, **79**(1): 175–184

Rab4: a Significant Factor in Regulating Vesicle Cycle and Transportation*

CHEN Hui-Ji^{1,2)}, LIU Xin-Guang^{1,2,3)}, CHEN Wei-Chun^{1,2,3)**}

¹⁾ Institute of Aging Research, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China;

²⁾ Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Dongguan 523808, China;

³⁾ Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China)

Abstract Vesicular trafficking is the major style for cargo transport and cell signaling in eukaryotic cells, in which Rabs play very important roles. Rab4 is one member of the Rab protein family involved in regulating early endosomal sorting and recycling pathway. Based on the different structure characteristics, Rab4 can be classified into three isoforms, including Rab4A, Rab4B and Rab4C. In this review, Rab4's biological characteristics such as their structure, effectors and cargo proteins, were summarized and its role in autophagy, glucose uptake, neuromodulation, cardiac function and tumorigenesis was discussed.

Key words Rab4, vesicular trafficking, autophagy, glucose uptake

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0135

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30900739).

**Corresponding author.

Tel: 86-769-22896048, E-mail: chenwchun@gdmc.edu.cn

Received: August 27, 2016 Accepted: October 31, 2016