

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

КОШЕВЕРОВА

Вера Владиславовна

**РОЛЬ ЕЕА1-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ВЕЗИКУЛ В ЭНДОЦИТОЗЕ
РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА
И ИХ БИОГЕНЕЗ**

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук, профессор
Корнилова Елена Сергеевна

Санкт-Петербург

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	13
1.1 Пути везикулярного транспорта в клетке	13
1.1.1 Антероградный путь	14
1.1.2 Ретроградный (эндоцитозный) путь	17
1.2 Общие принципы организации эндоцитозного пути	23
1.2.1 Основные компартменты эндоцитозного пути и гипотезы его организации.....	23
1.2.3 Регуляция эндоцитоза компонентами цитоскелета.....	26
1.2.2 Малые ГТФазы Rab как основные регуляторные компоненты эндоцитозного пути	33
1.3.3 Механизмы слияния эндосом.....	35
1.3 Ранние эндосомы: функции, биогенез, молекулярные маркеры	38
1.3.1 Ранняя эндосома как компартмент для сортировки поступающих в клетку грузов.....	38
1.3.2 Малая ГТФаза Rab5 и ее эффектор EEA1 как маркеры РЭ. Современные представления о биогенезе ранних эндосом.....	40
1.4. Механизмы созревания поздних эндосом	46
1.4.1 Механизмы сортировки груза во внутренние пузырьки мультивезикулярных тел. Роль ESCRT- комплексов.	46
1.4.2 Механизмы Rab5-Rab7 конверсии.....	47
1.5 Деградация компонентов клетки путем аутофагии. Взаимодействие аутофагии и эндоцитозного пути	50
1.6 Эндоцитоз рецептора эпидермального фактора роста как модель для изучения механизмов рецепторо-опосредованного эндоцитоза.....	52
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
2.1 Культивирование клеток.....	55
2.2 Лиганды и их производные	55
2.3 Стимуляция эндоцитоза.....	56
2.4 Плазмидные конструкции и трансфекция.....	56
2.5 Мечение плазматической мембраны липидом DPPE	57
2.6. Обработка клеток ингибиторами	57
2.7 Электрофорез и иммуноблоттинг	58
2.7.1 Приготовление проб для электрофоретического разделения	58
2.7.2 Электрофорез белков в полиакриламидном геле	59
2.7.4 Иммуноблоттинг	59
2.8 Двойное не прямое иммунофлуоресцентное окрашивание клеток.....	60

2.9 Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.....	61
2.10 Восстановление флуоресценции после фотовыжигания (FRAP).....	62
2.11 Анализ и обработка изображений	63
2.12 Статистическая обработка данных	65
3. РЕЗУЛЬТАТЫ	66
3.1 Количество белка EEA1 в мембранной фракции клеток не изменяется при стимуляции в клетках эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов	66
3.2 Исследование динамики ассоциации белка EEA1 с мембранами везикул в клетках, стимулированных и нестимулированных добавлением ЭФР	69
3.3 Изучение взаимодействия EEA1- и ЭФР-положительных везикул методом прижизненной съемки	74
3.4 Изучение механизмов сегрегации EEA1- и ЭФР-положительных везикул	77
3.5 Анализ сегрегации EEA1- и ЭФР-положительных везикул с точки зрения процесса Rab5-Rab7 конверсии	81
3.6 EEA1-везикулы, выявляющиеся в подверженных сывороточному голоданию клетках, не являются аутофагосомами	86
3.7 Роль эндоцитозного пути в происхождении EEA1-положительных везикул	89
3.8 Роль биосинтетического пути в биогенезе EEA1-положительных везикул	92
4. ОБСУЖДЕНИЕ	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	109
ВЫВОДЫ.....	110
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	111
БЛАГОДАРНОСТИ	131

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ-аппарат Гольджи

АТФ-аденозинтрифосфат

БСА-бычий сывороточный альбумин

БФА-Брефельдин А

бЭФР –биотинилированный ЭФР

ГДФ-гуанозиндифосфат

ГТФ-гуанозинтрифосфат

ДМЕМ - среда Игла, модифицированная Дульбекко

МВТ-мультивезикулярные тела

МТ-микротрубочки

ПМ-плазматическая мембрана

РЭФР-рецептор эпидермального фактора роста

ЦОМТ-центр организации микротрубочек

ЭДТА- этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПР-эндоплазматический ретикулум

ЭС-эмбриональная сыворотка

ЭФР- эпидермальный фактор роста

AP - adaptor protein

APPL- **a**myloid **p**rotein **p**recursor-**l**ike protein

DABCO-1,4 диазабицикло[2.2.2] октан

DPPE-Rhod B – 1,2-дипалмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин, связанный с родамином B

EEA1-**e**arly **e**ndosomal **a**ntigen 1

EGFP-**E**nhanced **G**reen **F**luorescent **P**rotein

ERGIC- **ER**-**G**olgi **i**ntermediate **c**ompartment

ESCRT- **e**ndosomal **s**orting **c**omplex **r**equired for **t**ransport

FRAP- **F**luorescent **r**ecovery **a**fter **p**hotobleaching

FYVE- **F**ab 1, **Y**OTB, **V**ac 1 and **E**EA1 (zinc finger domain)

GAM- goat anti mouse antibody

GAP - **GTPase-Activating Protein**

GAPDH- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GAR-goat anti rabbit (antibodies)

GDF- **GDI displacement factor**

GDI- **GDP dissociation inhibitor**

GEF- **Guanine nucleotide exchange factor**

HB-EGF- **Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor**

LC3- microtubule-associated protein **light chain 3**

LDL- low density lipoprotein

MDCK- Madin–Darby canine kidney (cells)

NSF- **N-ethylmaleimide-sensitive factor**

PBS- фосфатно-солевой буфер

PI(3,5)P2- Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate

PI3P- phosphatidylinositol-3-monophosphate

pY- фосфотирозин

Qds-(quantum dots)-квантовые точки

RBD- Rab-binding domain

REP- Rab escort protein

RILP- Rab-interacting lysosomal protein

ROI-region of interest

sav-Qds – квантовые точки, конъюгированные со стрептавидином

SDS- додецилсульфат натрия

SFV- Semliki forest virus

SNAP- **soluble NSF attachment protein**

SNARE-SNAP receptor

SNX- sorting nexin

TGF α -transforming growth factor α

TTBS- фосфатно-солевой буфер с Tween 20

WASP - Wiskott–Aldrich Syndrome Protein

WAVE - WASP-family verprolin-homologous protein

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Везикулярный транспорт – один из базовых клеточных процессов, обеспечивающий биогенез и поддержание специфичности мембран большинства клеточных компартментов, секрецию, а также адаптацию клетки к сигналам внешней среды. По определению, везикулярный транспорт заключается в переносе молекул-грузов от компартмента к компартменту с помощью транспортных везикул. В клетке выделяют два основных транспортных потока: биосинтетический/экзоцитозный, или антероградный, путь (АП) и эндоцитозный путь (ЭП). АП осуществляет доставку вновь синтезированных липидов и мембранных белков к внутренним органеллам клетки и плазматической мембране (ПМ), тогда как ЭП обеспечивает проникновение в клетку извне грузов различной природы (в основном макромолекулярных) в составе мембранных везикул, традиционно называемых эндосомами.

Основными компартментами АП являются ЭПР и Аппарат Гольджи (АГ). Несмотря на высокую динамичность, эти органеллы обладают характерной локализацией и морфологией, а перенос грузов между ними осуществляется в основном с помощью транспортных везикул. Гораздо более сложным является вопрос определения компартментов ЭП, поскольку на эндоцитозном пути отсутствуют структуры, которые бы могли претендовать на роль эндоцитозных компартментов в их современном понимании (т.е. долгоживущих мембранных структур с характерной морфологией, локализацией и функцией). Фактически, все эндоцитозные структуры представляют собой набор везикул размером от 100 до 600 нм.

Традиционно принято классифицировать эндосомы по времени появления в них интернализированного груза на ранние периферические (РЭ) и поздние околядерные (ПЭ), рециклирующие эндосомы и лизосомы (как конечный пункт деградационного пути). Очевидно, что при таком подходе невозможно точно определить границу между РЭ и ПЭ и, следовательно, понять механизм переноса грузов между ними и основные принципы их функционирования. Между тем, эндоцитоз – это процесс, участвующий не только в регуляции числа транспортеров и ионных каналов на ПМ, но и вовлеченный в регуляцию внутриклеточной сигнализации, поскольку многие пептидные гормоны и ростовые факторы, попадая в клетку через рецептор-опосредованный эндоцитоз, генерируют сигналы на определенных стадиях ЭП. Эндоцитоз – это также путь попадания в клетку ряда инфекционных агентов и токсинов. В связи с этим очевидна высокая степень актуальности понимания принципов организации и механизмов функционирования ЭП.

Классической моделью для изучения ЭП является эндоцитоз рецептора эпидермального фактора роста (РЭФР), представляющий собой наиболее специфический тип эндоцитоза – лиганд-стимулируемый рецептор-опосредованный эндоцитоз. Взаимодействие РЭФР со своим лигандом ЭФР на ПМ приводит к димеризации ЭФР-рецепторных комплексов и активации цитоплазматических тирозинкиназных доменов рецептора (Jorissen et al., 2003). В свою очередь рецепторная тирозинкиназа фосфорилирует определенные сайты на С-терминальном участке рецептора, что стимулирует ЭФР-зависимые сигнальные каскады. Кроме того, димеризация ЭФР-РЭФР комплексов инициирует процесс интернализации (Wang et al., 2005). Димеры ЭФР-РЭФР комплексов рекрутируются в окаймленные клатрином ямки на ПМ, после чего клатрин-окаймленные пузырьки (везикулы) отсоединяется от ПМ и клатриновое окаймление снимается (Vieira et al., 1996; Grandal, Madhus, 2008).

Согласно существующим представлениям, сформированные таким образом транспортные везикулы, содержащие ЭФР-рецепторные комплексы, сливаясь друг с другом, становятся РЭ, в пределах которых происходит сортировка груза: часть комплексов может рециклировать обратно в ПМ, тогда как основная часть направляется на путь деградации в лизосомы. Многочисленные безуспешные поиски стабильных предсуществующих компартментов наряду с большим массивом экспериментальных данных привели к созданию гипотезы созревания эндосом, которая в настоящее время является общепринятой. Согласно этой гипотезе, в ходе эндоцитоза за счет рециклирования часть мембраны определенного состава удаляется из несущей груз эндосомы, тогда как везикулы, происходящие из транс-сети АГ, приносят новые липиды, в результате чего белково-липидный состав мембраны эндосомы постепенно изменяется. Созревание включает в себя также процесс слияний РЭ друг с другом, в результате чего площадь поверхности мембран увеличивается, что является необходимым условием для формирования инвагинаций мембраны внутрь эндосомы с образованием внутренних пузырьков (Piper, Katzmann, 2007). Именно такие структуры называются мультивезикулярные тела (МВТ). При взаимодействии МВТ с лизосомами ЭФР-рецепторные комплексы, упакованные во внутренние пузырьки, становятся мишенями лизосомных ферментов. В настоящее время именно МВТ рассматривают как поздние эндосомы. Следуя этой гипотезе, невозможно разделить эндоцитозные компартменты и транспортные пузырьки, и кроме того, сложно объяснить механизмы изменения набора основных регуляторных белков, наблюдаемые в эксперименте.

Ключевыми регуляторами описанных выше процессов являются малые ГТФазы семейства Rab. Считается, что при стимуляции эндоцитоза из цитоплазмы на поверхность

вновь сформированных РЭ привлекается Rab5. В ГТФ-связанном, активированном, состоянии он рекрутирует из цитоплазмы все компоненты, необходимые для протекания ранних стадий эндоцитоза (Spang, 2009; Jovic et al., 2010). Rab5-зависимая ассоциация фосфатидилинозитол-3-киназы Vps34 позволяет создать на мембране эндосомы домены, обогащенные фосфатидилинозитол-3-монофосфатом (PI3P) (Christoforidis et al., 1999), который совместно с Rab5 способствует связыванию аутоантигена ранних эндосом EEA1, – белка, необходимого для заякоривания гомотипических эндосом на первой стадии слияния (Stenmark et al., 1996). Таким образом, согласно общепринятым представлениям, EEA1 также привлекается из цитоплазмы на поверхность эндосом при стимуляции эндоцитоза (Simonsen et al., 1998; Spang, 2009; Jovic et al., 2010) и считается, наряду с Rab5, маркером РЭ (Rubino et al., 2000).

Вторым ключевым регулятором эндоцитозного пути является малая ГТФаза Rab7, которая считается маркером ПЭ. Предполагается, что замена Rab5 на Rab7 на мембране эндосом происходит путем так называемой «Rab5/Rab7-конверсии», механизм которой изучен слабо. Наиболее распространена гипотеза о том, что процесс замены Rab5 на Rab7 в ходе созревания осуществляется путем постепенного ухода инактивированного Rab5 в цитоплазму и рекрутирования Rab7 из цитоплазмы на поверхность эндосом на места, освобожденные Rab5 (Rink et al., 2005). Согласно этой гипотезе, при инактивации Rab5 белок EEA1 должен также уходить в цитоплазму с поверхности эндосом, и в отсутствии большого эндоцитозного потока преимущественно локализоваться в цитоплазме.

Однако целый ряд данных противоречит этим представлениям. Так, было обнаружено, что в клетках, культивируемых в течение нескольких часов в среде с недостатком компонентов сыворотки, то есть в условиях минимальной эндоцитозной активности, EEA1 локализуется преимущественно на поверхности везикул, а не в цитоплазме (Beas et al., 2012; Злобина и др., 2014; Verma et al., 2015). Кроме того, в нашей лаборатории было продемонстрировано, что после стимуляции эндоцитоза РЭФР в клетках выявляются сначала одиночные гибридные везикулы, состоящие из EEA1- и РЭФР-положительных доменов, а затем и кластеры этих везикул. На поздних этапах эндоцитоза в клетках наблюдались отдельные рецептор-содержащие структуры и EEA1-везикулы (Злобина и др., 2013). Эти результаты позволили предположить, что EEA1-везикулы могут представлять собой долгоживущий раннеэндосомальный везикулярный компартмент, временно взаимодействующий с интернализирующимися с ПМ транспортными везикулами, несущими груз. В связи с этим ставится под сомнение существующая модель функционирования ЭП. Для доказательства этого предположения необходимо выяснить, каким образом протекают начальные этапы взаимодействия

рецептор-содержащих сформированных de novo везикул с EEA1, как формируются EEA1-положительные структуры и каким образом происходит разделение гибридных эндосом.

Цель работы: проверить предположение о том, что EEA1-положительные везикулы можно рассматривать как постоянно существующий везикулярный компартмент, обеспечивающий ранние этапы эндоцитозного пути мембранных белков, направляемых на лизосомную деградацию.

В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Выяснить, изменяется ли количество ассоциированного с мембранами белка EEA1 при стимуляции эндоцитоза РЭФР.
2. Оценить характер взаимодействия белка EEA1 с мембранами везикул в контроле и при стимуляции эндоцитоза РЭФР.
3. Изучить в реальном времени поведение ЭФР-содержащих структур и EEA1-везикул на начальных и конечных этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.
4. Проанализировать процесс Rab5-Rab7 конверсии в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.
5. Выяснить пути биогенеза EEA1-везикул.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Стимуляция в клетках эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов приводит к увеличению времени жизни части популяции EEA1 на мембране, не изменяя при этом общее количество EEA1, ассоциированного с мембранами везикул.
2. На ранних этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в примембранном пространстве происходит слияние вновь образованных транспортных везикул, содержащих ЭФР-рецепторные комплексы, с предсуществующими EEA1-везикулами. На поздних стадиях именно рецепторный домен вместе с внутренними пузырьками выделяется (сегрегируется) из состава гибридной везикулы. Рецепторный домен выделяется из состава гибридной везикулы при участии атипичной ГТФазы динамина и Arp2/3-зависимой актиновой сети.
3. Процесс Rab5-Rab7 конверсии не связан с заменой Rab5 на Rab7 на одних и тех же участках мембраны. В ходе сегрегации Rab7 привлекается к рецептор-содержащему домену гибридной эндосомы, в то время как EEA1 и Rab5 отделяются в составе единой везикулы.

4. ЕЕА1-везикулы не являются аутофагосомами и производными эндоцитозного пути. Популяция ЕЕА1-везикул поддерживается за счет функционирования биосинтетического пути, что характерно именно для предсуществующих компартментов, но не транспортных везикул.

Научная новизна

В данной работе впервые методом прижизненной съемки визуализированы процессы слияния и сегрегации ЕЕА1- и РЭФР-содержащих везикул в ходе эндоцитоза ЭФР. Получены приоритетные данные об участии биосинтетического пути в биогенезе ЕЕА1-положительных везикул. Впервые продемонстрировано, что стимуляция эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов приводит к увеличению времени жизни части ЕЕА1 на мембране везикул. Предложен новый механизм Rab5-Rab7 конверсии. Полученные данные существенно изменяют представления об организации и механизмах функционирования эндоцитозного пути сигнальных рецепторов.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные позволяют существенно скорректировать существующие представления о механизмах организации эндоцитозного пути, и, в частности, прояснить некоторые аспекты прохождения эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Изучение процесса эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов представляется важным для понимания механизмов регуляции сигнальных путей, активируемых рецептором ЭФР. Понимание фундаментальных принципов организации эндоцитозного пути открывает перспективы для разработки фармакологических препаратов, модулирующих различные этапы эндоцитоза с целью подавления проонкогенных сигнальных путей, предотвращения интернализации различных инфекционных агентов в клетки и т.д. Материал диссертации может быть использован в курсах лекций по клеточной и молекулярной биологии и биофизики на биологических факультетах университетов и медицинских ВУЗов.

Личный вклад автора

Все эксперименты были выполнены автором лично. Материалы, вошедшие в работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Апробация работы

Основные результаты были доложены и обсуждались на XVIII международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и

клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2015 г.), на международной конференции «Super-resolution in different dimensions» (Москва, 2015 г.), на II Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 2015 г.) и на V Молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2016 г.).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК МОН России:

1. **Kosheverova V.V.**, Kamentseva R.S., Gonchar I.V., Kharchenko M.V., Kornilova E.S. 2016. Mobility of tethering factor EEA1 on endosomes is decreased upon stimulation of EGF receptor endocytosis in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 473(1), p. 17-22.
2. **Кошеверова В.В.**, Каменцева Р.С., Харченко М.В., Корнилова Е.С. 2016. Везикулы, несущие EEA1, не являются аутофагосомами в клетках HeLa, культивируемых в условиях сывороточного голодания. *Цитология*. 58(5), стр. 370-377.
3. Каменцева Р.С., **Кошеверова В.В.**, Харченко М.В., Корнилова Е.С. 2016. Механизм Rab5-Rab7-конверсии в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. *Медицинский Академический журнал*. 16(4), стр. 212-213.

Публикации в других изданиях:

4. Харченко М.В., Каменцева Р.С., **Кошеверова В.В.**, Корнилова Е.С. 2015. Механизмы биогенеза EEA1-положительных везикул в клетке. Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». *Сборник статей* (Том 1), стр. 136-141.
5. **Кошеверова В.В.**, Каменцева Р.С., Злобина М.В., Харченко М.В., Корнилова Е.С. 2015. Мембранная локализация фактора дистанционного взаимодействия EEA1 в культивируемых клетках HeLa с минимальной эндоцитозной активностью. Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». *Сборник статей* (Том 1), стр. 28-33.

Список тезисов:

6. Каменцева Р.С., **Кошеверова В.В.**, Харченко М.В. 2015. Биосинтетический путь участвует в биогенезе везикул, обогащенных белком слияния EEA1. Тезисы XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье», (Санкт-Петербург, 18 апреля): Издательство СПбГУ, стр. 226-227.
7. **Кошеверова В.В.**, Каменцева Р.С., Харченко М.В. 2015. Ассоциация с мембранами фактора дистанционного взаимодействия EEA1, опосредующего заякоривание гомотипических ранних эндосом, не меняется в ходе эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста. Тезисы XVIII Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье», (Санкт-Петербург, 18 апреля): Издательство СПбГУ, стр. 267-268.
8. **Кошеверова В.В.**, Злобина М.В., Харченко М.В., Каменцева Р.С., Корнилова Е.С. 2015. Исследование динамики везикул, несущих белок слияния EEA1, в ходе эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста. Тезисы докладов и сообщений, представленных на II Всероссийскую конференцию «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 20-22 октября). Цитология, 57(9), стр. 635.
9. Kharchenko M.V., Zlobina M.V., **Kosheverova V.V.**, Kamentseva R.S., Kornilova E.S. 2015. Microscopic studies of early endosomal autoantigene 1-vesicles on live and fixated cells. Super-resolution in different dimensions, Advanced Microscopy Meeting, (Moscow, 2-3 June). Program and Abstracts, p. 34.
10. **Kosheverova V.V.**, Kharchenko M.V., Kamentseva R.S., Salova A.V., Belyaeva T.N., Kornilova E.S. 2015. Quantum Dots as a Tool for Detection of Fusion of Endosomal Vesicles with the Size Below Resolution Limits of Conventional Confocal Microscopy. Super-resolution in different dimensions, Advanced Microscopy Meeting, (Moscow, 2-3 June). Program and Abstracts, p. 40.
11. **Кошеверова В.В.**, Каменцева Р.С., Харченко М.В., Корнилова Е.С. 2016. Связь белка EEA1 с мембранами эндосом стабилизируется при стимуляции эндоцитоза рецептора ЭФР. Тезисы V Всероссийской молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии (Санкт-Петербург, 18-21 сентября), стр. 32-33.
12. Каменцева Р.С., **Кошеверова В.В.**, Харченко М.В., Корнилова Е.С. 2016. Rab5-Rab7 конверсия путем сегрегации мембранных доменов в ходе эндоцитоза рецептора ЭФР. Тезисы V Всероссийской молодежной конференции по молекулярной и клеточной биологии (Санкт-Петербург, 18-21 сентября), стр. 25.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Пути везикулярного транспорта в клетке

Необходимыми условиями оптимального функционирования эукариотической клетки является ее способность взаимодействовать с внешней средой и кооперировать работу внутриклеточных органелл. Для выполнения этих условий клетка должна обладать регулируемой системой адресной доставки веществ к месту их предназначения. Такой системой в клетке является система везикулярного транспорта, осуществляющая транспорт макромолекул (белков и липидов) от донорного к акцепторному компартменту посредством небольших мембранных пузырьков, называемых транспортными везикулами.

Основными путями везикулярного транспорта макромолекул являются anterograde путь, осуществляющий доставку вновь синтезированных в клетке белков и липидов через ЭПР и АГ к плазматической мембране или другим внутриклеточным органеллам (эндосомам, лизосомам), и противоположный ему по направлению retrograde (эндцитозный) путь. По эндцитозному пути осуществляется транспорт интернализованных с ПМ макромолекул различной природы к месту их деградации в лизосомах, либо грузы могут возвращаться к обратно ПМ (путь рециклирования), либо доставляться к ПМ на противоположный конец клетки (транскитозный путь).

Везикулы, транспортирующие макромолекулы (грузы) как по anterograde, так и по retrograde путям, образуются путем деформации части мембраны-донора с образованием инвагинации или так называемой «почки», что сопровождается избирательным привлечением груза к этим областям. Как процесс образования инвагинаций, так и привлечение груза к месту формирования транспортных везикул опосредуются особыми белками окаймления. Белки окаймления рекрутируются из цитозоля на мембраны вновь образующихся транспортных везикул, деформируют участки мембраны-донора, приводя к отщеплению везикулы, а также узнают сортирующие сигналы цитоплазматических доменов трансмембранных рецепторов-грузов (Bonifacino, Glick, 2004). В общем случае процесс сборки окаймления инициируется малой ГТФазой. Снятие окаймления также регулируется малой ГТФазой и осуществляется при гидролизе на ней ГТФ уже после отделения везикулы от донорной мембраны. Сформировавшиеся везикулы транспортируются к акцепторной мембране при участии компонентов цитоскелета и заякориваются на ней при помощи факторов дистанционного взаимодействия. Компоненты SNARE системы осуществляют конечную стадию слияния мембраны транспортной везикулы с акцепторной мембраной (Рис.1).

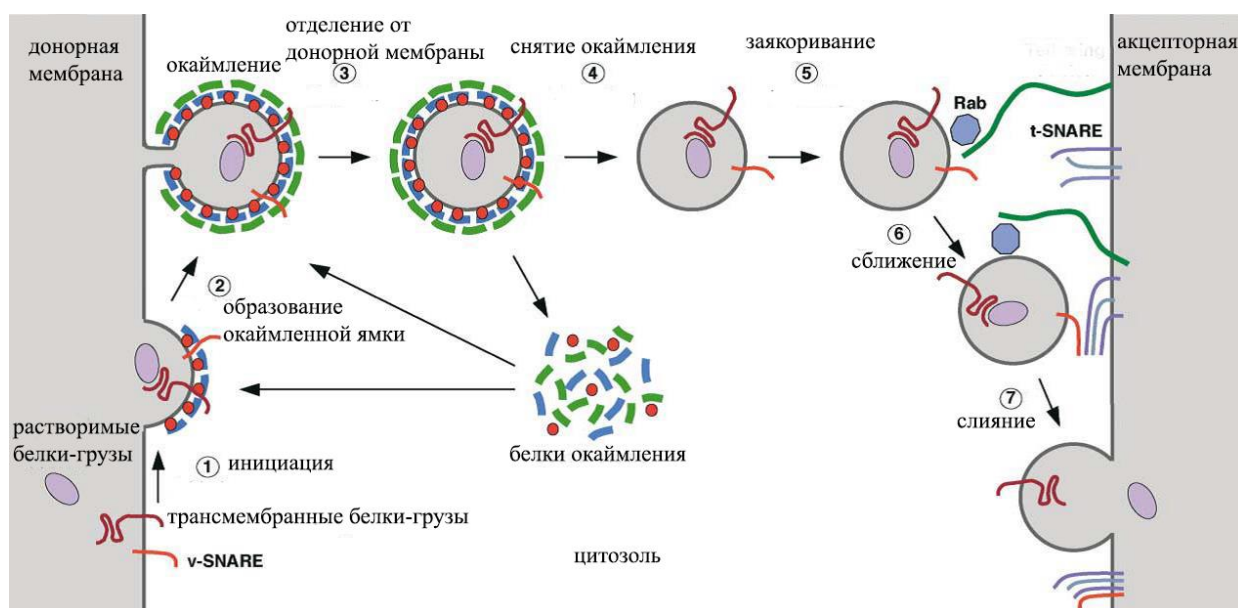


Рис. 1 Основные стадии транспорта веществ в клетке с помощью везикул-переносчиков. По: Bonifacino J. S., Glick B. S., 2004.

Хотя сами принципы организации везикулярного транспорта в клетке универсальны, отдельные стадии этого транспорта высокоспецифичны. Специфичность доставки груза к месту назначения осуществляется за счет того, что на каждом участке везикулярного транспорта работают свои уникальные белковые комплексы, обеспечивающие определенную стадию транспортного процесса. Так, процессы формирования транспортных везикул и концентрирования грузов в этих областях на разных участках антероградного и эндоцитозного путей опосредуются различными типами окаймлений. Ниже в этой главе будут рассмотрены основные черты и особенности антероградного и эндоцитозного путей, а также типы окаймлений, характерные для разных участков везикулярного транспорта.

1.1.1 Антероградный путь

Одними из первых работ, посвященных не только изучению антероградного пути, но и везикулярного транспорта в целом, являлись работы Джеймса Джеймсона и Джорджа Палада. Так, в 1971 году, используя новый для того времени метод радиоавтографии в сочетании с электронной микроскопией, а также метод внутриклеточного фракционирования, они продемонстрировали различные стадии синтеза и выделения секрета клетками ацинуса поджелудочной железы (Jamieson, Palade, 1971). Проведенные исследования впервые показали, что синтезируемые клеткой белки вначале выявляются в области ЭПР, затем обнаруживаются в АГ, концентрируются в секреторных гранулах и высвобождаются из клеток путем слияния

гранул с ПМ. Эти наблюдения позволили в дальнейшем предположить, что транспорт между компартментами осуществляется с помощью транспортных везикул (Palade, 1975), что во многом стало определяющим для начала интенсивного изучения процессов везикулярного транспорта в клетке (Mellman, Warren, 2000).

В настоящее время механизмы антероградного транспорта изучены достаточно хорошо. Антероградный транспорт в клетке начинается на мембране ЭПР, откуда значительная часть синтезированных трансмембранных и секреторных белков направляется в аппарат Гольджи. Эту часть антероградного пути до попадания груза в транспортные везикулы, отходящие от транс-цистерны Гольджи, принято называть биосинтетическим путем. На выходе из ЭПР принявшие правильную конформацию и частично модифицированные белки концентрируются в особых областях ЭПР - так называемых в «сайтах выхода» (Hammond, Glick, 2000), где происходит сборка COPII окаймления, характерного исключительно для этого участка везикулярного транспорта. Известно, что сборка COPII окаймления инициируется малой ГТФазой SAR1, которая, в свою очередь, активируется заякоренным в мембране ЭПР фактором обмена нуклеотидов (GEF-guanine nucleotide exchange factor) SEC12 (Barlowe et al., 1993). Активированная SAR1 встраивается в мембрану ЭПР с помощью своего N-концевого α -спирального участка (Huang et al., 2001) и рекрутирует гетеродимеры SEC23-SEC24 за счет взаимодействия с SEC23 субъединицей (Bi et al., 2002). Показано, что SEC24 играет важную роль в концентрировании груза в «сайтах выхода», узнавая специфические сигналы экспорта мембранных белков-грузов (Wendeler et al., 2007). Сформировавшийся комплекс, состоящий из малой ГТФазы SAR1 и SEC23-SEC24 гетеродимеров, рекрутирует гетеродимеры SEC13-SEC31, которые будут составлять внешний по отношению к мембране ЭПР слой COPII окаймления (Lederkremer et al., 2001). SEC13-SEC31 полимеризуется и образует скэффлд, что приводит к искривлению мембраны ЭПР и отделению от нее везикулы. SEC23 выступает в качестве белка-активатора ГТФазной активности (GAP-GTPase activating protein), чья активность многократно увеличивается за счет присоединения SEC13-SEC31 (Antonny, Schekman, 2001), что приводит к разборке окаймления.

Образовавшиеся транспортные везикулы транспортируются к цис-компартменту аппарата Гольджи. В клетках млекопитающих между цис-цистерной и ЭПР имеется также тубуло-везикулярный кластер цис-Гольджи (ERGIC- ER-Golgi intermediate compartment), который некоторые исследователи рассматривают в качестве самостоятельного компартмента (Appenzeller-Herzog et al., 2006). Груз далее транспортируется через цистерны Гольджи к транс-цистерне, которая выполняет роль субкомпартмента,

осуществляющего сортировку груза к месту назначения. Так, груз в зависимости от своего предназначения может транспортироваться к ПМ и встраиваться в нее (экзоцитозный путь) или, в случае белков, которые должны секретироваться во внешнюю среду, упаковываться в секреторные гранулы, также направляющиеся к ПМ (секреторный участок антероградного пути). В некоторых случаях (лизосомальные гидролазы, кислая фосфатаза) грузы могут направляться во внутриклеточные органеллы - эндосомы и лизосомы.

Транспорт между цистернами АГ и от АГ к ЭПР с участием другого окаймления - COPI. Иницирующей малой ГТФазой для сборки COPI окаймления является Arf1 (Helms, Rothman, 1992). В отличие от COPII окаймления, при сборке которого происходит последовательное привлечение элементов окаймления к месту формирования транспортной везикулы, активация Arf1 приводит к одновременному рекрутированию проксимального по отношению к мембране везикулы комплекса, состоящего из β -, γ -, δ -, ζ - субъединиц и дистального $\alpha\beta'$ ε комплекса (Hara-Kuge et al., 1994).

Несмотря на многочисленные исследования, вопрос о механизмах функционирования биосинтетического пути и, в особенности, механизмах транспорта грузов в АГ остается открытым. Согласно первой гипотезе, известной как гипотеза стабильных компартментов, перемещающиеся по направлению к транс-цистерне АГ COPI везикулы содержат белки-грузы, а при формировании везикулы резидентные белки цистерны-донора исключаются из ее состава (Rothman, Wieland, 1996). Согласно противоположной модели, модели созревания цистерн АГ, резидентные белки транспортируются по ретроградному пути по направлению к предыдущей, более ранней, цистерне, где располагается груз (Glick, Malhotra, 1998). Таким образом, обогащенная другим набором резидентных белков, цистерна приобретает свойства более «зрелой» цистерны. По отношению к каждой из гипотез в литературе имеются и подтверждающие, и опровергающие ее факты. Так, известны примеры грузов, транспортирующихся через АГ, размер которых значительно превышает размер COPI везикул, что противоречит гипотезе стабильных компартментов. Одним из таких грузов является молекула проколлагена в фибробластах млекопитающих (Bonfanti et al., 1998). С другой стороны, обнаружение проинсулина и некоторых других грузов в составе COPI везикул свидетельствует против гипотезы созревания (Orci et al., 1997). Таким образом, возможно, в биосинтетическом пути реализуются обе модели, а способ транспортировки груза – в составе COPI везикул или внутри цистерн АГ – зависит от самой природы груза.

1.1.2 Ретроградный (эндоцитозный) путь

Термин «эндоцитоз» был впервые использован Кристианом де Дювом в 1963 году для обозначения всех способов интернализации веществ в клетку путем инвагинации ПМ с образованием транспортной везикулы. Эндоцитоз традиционно разделяют на клатрин-зависимый, в ходе которого образование везикул происходит с участием клатринового окаймления, и клатрин-независимый, объединяющий в себя множество различных вариантов поступления веществ в клетку.

1.1.2.1 Клатрин-зависимый эндоцитоз

Клатрин-зависимый эндоцитоз выполняет в клетке множество функций. Так, являясь основным путем интернализации в клетку рецепторов ПМ, он опосредует взаимодействие клетки с окружающей средой, поставляет в клетку питательные вещества, участвует в активации определенных сигнальных путей.

Клатрин-окаймленные везикулы были впервые обнаружены в 1964 году при изучении эндоцитоза белков желтка в ооцитах москитов и охарактеризованы авторами как ямки, покрытые щетинистоподобной оболочкой (Roth, Porter, 1964). Сам клатрин, являющийся основным компонентом клатринового окаймления, был открыт в 1975 году (Pearse, 1975). Клатрин существует в клетке в виде тримера, или трискелиона. Трискелион состоит из трех тяжелых цепей молекулярной массой около 192 кДа каждая, соединенных между собой С-концами, и трех легких цепей, представленных у высших эукариот в виде LCa и LCb изомеров (36 кДа и 33 кДа, соответственно) (Pearse, 1978; Kirchhausen, Harrison, 1981). Каждая из легких цепей в трискелионе соединяется с одной из тяжелых цепей (Kirchhausen, Harrison, 1981). В условиях *in vitro* в слабо кислой среде в присутствии ионов Ca^{2+} трискелионы клатрина способны к самосборке с образованием решеток, состоящих из гексагонов и пентагонов, называемых корзинками (Woodward, Roth, 1978).

Поскольку клатрин не может напрямую связываться с грузом и мембраной формирующейся везикулы, для формирования клатринового опушения требуется наличие адаптерных комплексов, а также некоторых вспомогательных белков, которые играют роль посредников в привлечении клатрина к месту образования инвагинации. Адаптерные комплексы, участвующие в сборке клатринового окаймления, подразделяются на два класса: тетрамерные адаптерные белки семейства AP (AP1, AP2, AP3, AP4) и мономерные белки семейства GGA.

Адаптерные белки семейства AP представлены в виде коровой части, связанной подвижными линкерами с двумя небольшими придаточными доменами, или «ушами». Все адаптерные комплексы этого семейства состоят из четырех субъединиц: двух больших: вариабельной (различающейся у разных представителей AP семейства) и невариабельной (100-130 кДа, обозначаемой как β 1-4), одной средней (50 кДа, μ 1-4) и одной малой субъединицы (17-20 кДа, σ 1-4) (Collins et al., 2002). Большие субъединицы имеют коровую часть и придаточные домены, образующие «уши» AP комплексов. Следует отметить, что из всех разновидностей адаптерных комплексов, работающих с клатриновым окаймлением, только AP2 комплекс участвует в образовании клатрин-окаймленных ямок на ПМ. Так, адаптерные комплексы AP1 и GGA 1-3 участвуют в транспорте лизосомальных ферментов между транс-Гольджи и поздними эндосомами (Robinson et al., 2010), AP3 опосредует транспорт между транс-Гольджи и лизосомами (Ihrke et al., 2004), AP4 также вовлечен в транспорт между сетью транс-Гольджи и поздними эндосомами (Burgos et al., 2010). В настоящее время в литературе появились сообщения об обнаружении еще одного AP комплекса - AP5, который, как предполагается, работает на поздних эндосомах и/или лизосомах (Hirst et al., 2011).

Процесс образования клатрин-окаймленных везикул разделяется на несколько стадий: инициация (нуклеация), стадия рекрутирования груза, сборка окаймления, отделение везикулы от донорной мембраны и снятие окаймления.

Образование клатрин-окаймленного пузырька в ходе эндоцитоза с морфологической точки зрения начинается с формирования инвагинации ПМ, называемой ямкой. Важно отметить, что появление такой инвагинации может происходить только в особых зонах ПМ, лишенной субмембранного слоя кортикального актина (Gaidarov et al., 1999). Значительную роль в процессе инициации образования окаймленной ямки играет липид фосфатидилинозитол (4,5)-бифосфат (Jost et al., 1998), наличие которого характерно для ПМ клетки и определяется работой фосфатидилинозитол 4-киназы и фосфатидилинозитол 4- фосфат 5-киназы. Именно фосфатидилинозитол (4,5)-бифосфат является платформой для привлечения адаптерного комплекса AP2 на ПМ. Было показано, что коровая часть вариабельной α субъединицы и невариабельная μ_2 субъединица AP2 комплекса имеют сайты связывания с этим липидом (Gaidarov, Keen, 1999; Collins et al., 2002). μ_2 наряду с β_2 субъединицей взаимодействуют также с определенными последовательностями, расположенными на цитоплазматической части трансмембранных рецепторов (Ohno et al., 1995; Rapoport et al., 1998), а β_2 субъединица имеет участки связывания с клатрином (ter Haar et al., 2000). Важно подчеркнуть, что для AP2 окаймления ГТФаза, иницирующая его сборку неизвестна, поэтому считается, что

основными иницирующими факторами, ответственными за его сборку, являются фосфатидилинозитол (4, 5)-бифосфат и последовательности цитоплазматической части трансмембранных рецепторов.

Известно, что на стадии нуклеации важную роль играют также дополнительные факторы, определяющие места образования окаймленных ямок. Такими факторами нуклеации считается AP180 (Ford et al., 2001), имеющий домены связывания с фосфатидилинозитол (4,5)-бифосфатом и клатрином, Eps15, FCHо белки и некоторые другие. Так, было показано, что белки FCHо $\frac{1}{2}$ имеют F-BAR домены, которые узнают минимальные искривления ПМ и тем самым маркируют «горячие точки», где будет идти образование окаймленной ямки (Henne et al., 2010).

Сборка клатринового окаймления с образованием окаймленной ямки сопровождается постепенной инвагинацией ПМ. Согласно общепринятой концепции, ведущую роль в искривлении мембраны формирующейся везикулы играет клатрин, претерпевая конверсию из гексагональной формы в пентагональную, за счет чего искривление мембраны возрастает. Однако в настоящее время становится очевидным, что клатриновая перестройка сама по себе недостаточна для необходимого искривления мембраны (Nossal, 2001; McMahon, Boucrot, 2011). Было высказано предположение о том, что полимеризация клатрина способствует перемещению некоторых вспомогательных адапторных белков, таких как Eps15, участвующих в искривлении мембраны, на перешеек формирующейся везикулы (Tebar et al., 1996). Еще одним вспомогательным белком в этом случае может быть эпсин, связывающийся с ПМ посредством взаимодействия с фосфатидилинозитол (4,5)-бифосфатом и способствующий ее искривлению (Ford et al., 2002).

На более поздних этапах к месту формирования окаймленной ямки привлекаются белки, содержащие в своей структуре BAR домен: амфифизин, сортирующий нексин 9 (SNX9), эндофилин и некоторые другие. Эти белки чувствительны к искривлению ПМ и, как предполагается, способны стабилизировать это искривление (Ramachandran, 2011). Еще одной важнейшей функцией этих белков является привлечение динамина, связывание с которым осуществляется через их SH3-домен (Itoh et al., 2005). Динамин является атипичной ГТФазой, осуществляющей процесс сегрегации клатрин-окаймленного пузырька от ПМ. Динамин имеет пять основных доменов: N-концевой G-домен, связывающийся с ГТФ и гидролизующий его; средний домен, участвующий в сборке мономеров динамина; РН-домен плекстриновой гомологии, взаимодействующий с фосфоинозитидами мембраны; внутренний GAP-домен, который, предположительно, активирует гидролиз ГТФ на динамине и С-терминальный пролин-богатый домен (PRD),

узнающий SH3 домены белков, что способствует связыванию динамина с сайтами его действия в клетке. Механизм действия динамина до конца непонятен. Предполагается, что динамин существует в клетке в виде тетрамера, а его связывание с мембраной приводит к полимеризации тетрамеров с образованием спирального «воротника» вокруг горлышка окаймленной ямки, что не требует энергии гидролиза ГТФ (Sweitzer, Hinshaw, 1998).

Было предложено несколько моделей действия динамина. Согласно первой, механохимической, модели гидролиз ГТФ на динамине вызывает конформационные изменения в молекуле, что, согласно одним данным, приводит или к сжатию спирального воротника с последующей дестабилизацией участка мембраны, или, наоборот, к резкому увеличению шага спирали динамина и последующему разрыву мембраны (Stowell et al., 1999). Согласно другой модели, рекрутирование динамина в область горлышка формирующейся везикулы приводит к концентрированию в этих участках фосфатидилинозитол (4,5)-бифосфата, что способствует дестабилизации мембраны. Так, было показано, что наличие динамина в определенных областях липосом в условиях *in vitro* приводило к накоплению в этих участках фосфатидилинозитол (4, 5)-бифосфата (Bethoney et al., 2009).

Отделение везикулы от ПМ является необходимым условием разборки клатринового окаймления, которое происходит сразу после этого. Разборка клатринового окаймления осуществляется с помощью АТФазы HSC70 (heat shock cognate 70) (DeLuca-Flaherty et al., 1990).

1.1.2.2. Клатрин-независимый эндоцитоз

Помимо клатрин-зависимого эндоцитоза поступление веществ в клетку может осуществляться за счет не связанных с формированием клатринового окаймления механизмов, объединенных под названием клатрин-независимый эндоцитоз. Независимые от клатрина способы интернализации веществ в клетку очень гетерогенны и изучены плохо, поэтому нет четкой классификации разновидностей клатрин-независимого эндоцитоза. В литературе выделяют собственно пиноцитоз и его разновидность- макропиноцитоз, объединенных тем, что в ходе этих процессов в клетку неспецифически поступает значительное количество растворенных в окружающей среде веществ. Образование пиносом в большинстве случаев приводит к их рециклированию, что обеспечивает гомеостаз ПМ. Несмотря на функциональное сходство, эти два процесса отличаются не только по размеру формирующихся везикул, но и, как минимум, по способам их формирования. Так, пиноцитоз осуществляется путем инвагинаций ПМ с

образованием мелких везикул диаметром порядка 90 нм и происходит конститутивно. Макропиноцитоз, напротив, образуется в результате так называемого процесса раффления-образования специфических искривлений ПМ, что приводит к формированию выростов, напоминающих ламеллоподии, которые замыкаются с образованием макропиносом, достигающих 5 мкм в диаметре (Hansen, Nichols, 2009). Известно, что в определенных типах клеток, в таких, как дендритные, макропиноцитоз является конститутивным процессом (Norbury et al., 1997), в то время как в других формирование макропиносом необходимо индуцировать. Так, имеются данные о том, что макропиноцитоз в клетках эпидермоидной карциномы A431 индуцируется добавлением ЭФР, что, однако, не влияет на интернализацию самого рецептора ЭФР клатрин-зависимым путем (Hewlett et al., 1994). Было показано, что образование макропиносом в клетках опосредуется малыми ГТФазами Ras, а также активацией Arf6, Rac1, Cdc42 (Kerr et al., 2009), что индуцирует процессы раффления и формирования макропиносом.

Было показано, что макропиносомы через 5 мин после интернализации в клетку становятся положительными по фактору дистанционного взаимодействия EEA1 (Hamasaki et al., 2004). Также была показана колокализация макропиносом одновременно с EEA1 белком и рецептором трансферрина, который поступает в клетку клатрин-опосредованным путем (Falcone et al., 2006). Эти данные указывают на то, что, хотя интернализация в процессе клатрин-опосредованного эндоцитоза и макропиноцитоза осуществляется с помощью различных механизмов, эти пути в клетке могут взаимодействовать.

Другими путями клатрин-независимого эндоцитоза считаются кавеолин- и флоттилин-зависимые пути. Оба эти пути ассоциированы с рафтами. Флоттилин-зависимый путь опосредуется белками флоттилин-1 и флоттилин-2. Показано, что флоттилин-зависимым путем могут проникать в клетку GPI-заякоренные белки и холерный токсин В (Glebov et al., 2006). Кавеолы представляют собой специализированную форму липидного рафта в виде флаконообразного впячивания ПМ, содержащую кавеолин. Вопрос о том, играют ли кавеолы определенную роль в интернализации веществ в клетки, остается открытым. Так, кавеолы обнаруживаются лишь в некоторых типах клеток, а предполагаемые кавеосомы, как было показано с помощью электронной микроскопии, остаются связанными с ПМ (Sandvig et al., 2011).

Еще одной разновидностью клатрин-независимого эндоцитоза считается фагоцитоз, который характерен только для специализированных клеток-фагоцитов. Фагоцитоз характеризуется захватом клеткой крупных частиц (диаметром не менее 0,5

мкм) и, в отличие от пиноцитоза, является рецепторо-опосредованным процессом (Flannagan et al., 2012).

1.2 Общие принципы организации эндоцитозного пути

1.2.1 Основные компартменты эндоцитозного пути и гипотезы его организации

Как было описано выше, молекулы могут попадать в клетку различными путями. Еще в 1980-х годах было показано, что интернализуемый груз в течение нескольких минут обнаруживается в составе мембранного компартмента тубуло-везикулярной морфологии, локализованного на периферии клетки (Helenius et al., 1983; Gruenberg et al., 1989). На электронной микрофотографии они имеют электронно-светлое содержимое, средний диаметр везикулярной части составляет около 400 нм, а диаметр тубулярных выростов – порядка 60 нм (Helenius et al., 1983). На более поздних этапах груз может или рециклировать в составе тубулярных выростов обратно на ПМ (Mayor et al., 1993), или оказывается в составе везикулярных структур, локализованных в околоядерной части клетки. Как показали ранние исследования, эти околоядерные эндосомальные структуры диаметром около 250-1000 нм имеют округлую или овальную форму, не содержат выраженных тубулярных отростков, а в их люмене выявляются многочисленные внутренние пузырьки диаметром порядка 50-100 нм (Helenius et al., 1983). Благодаря наличию внутренних пузырьков эти везикулы получили название мультивезикулярных тел или мультивезикулярных эндосом (MBT, MBE). Мультивезикулярные тела, содержащие груз, сливаются с лизосомами – везикулами диаметром около 100 нм, с образованием гибридных эндолизосом. Известно, что в ходе эндоцитоза происходит закисление внутреннего люмена эндосом благодаря работе белкового комплекса – вакуолярной H^+ -АТФазы (или вакуолярной протонной помпы), которая встраивается в мембрану эндосом. В результате значения pH в эндосомах постепенно снижаются и в поздних эндосомах достигают 4,5-5,5. Закисление люмена поздних эндосом при их слиянии с лизосомами приводит к активации ферментов – лизосомных гидролаз, расщепляющих грузы MBT. Процесс завершается сегрегацией лизосомы от бывшей мультивезикулярной эндосомы (называемой в литературе вторичной лизосомой), содержащей продукты деградации (Maxfield, McGraw, 2004).

Поскольку эндоцитозные везикулы не имеют четких морфологических отличий от других везикулярных структур клетки, вначале исследователи определяли их по наличию интернализованного груза, а исходя из времени попадания в них груза и локализации в клетке эндосомальные везикулы разделили на «ранние» или «периферические» и поздние (мультивезикулярные тела) (Helenius et al., 1983). Позднее было показано, что ранние и

поздние эндосомы также отличаются друг от друга по значениям pH в люмене везикул (показатель pH в ранних эндосомах варьирует в пределах 6.0-6.2; pH в поздних эндосомах равен 5.5 – 6.0) (Gruenberg et al., 1989). Трудность идентификации ранних и поздних эндосом в дальнейшем способствовала активному поиску молекулярных маркеров, специфичных для этих компартментов. Это также послужило одной из причин того, что до настоящего времени не существует однозначной концепции организации эндоцитозного пути.

В конце 1980-х - начале 1990-х годов были сформулированы две альтернативные гипотезы организации эндоцитозного пути, которые, по сути, были схожи с двумя концепциями организации транспорта в пределах биосинтетического пути между цистернами АГ: гипотеза стабильных компартментов (или эндосомальных везикул-переносчиков) (Griffiths, Gruenberg, 1991; Gu, Gruenberg; 1999) и гипотеза созревания эндосом (Murphy, 1991; Dunn, Maxfield, 1992).

Согласно концепции стабильных компартментов, предложенной Гриффитсом и Гринбергом (Griffiths, Gruenberg, 1991), в процессе эндоцитоза груз, поступающий в клетку в составе окаймленных везикул, после снятия окаймления сливается с предсуществующим тубуло-везикулярным компартментом – ранней эндосомой. После этого груз, направляемый на деградацию, распределяется в определенные домены ранней эндосомы, из которых формируются транспортные везикулы. Транспортные везикулы, в свою очередь, перемещаются из периферической в околядерную часть клетки, где располагается другой предсуществующий компартмент - поздняя эндосома. В рамках этой гипотезы в качестве транспортных везикул часто рассматривались MBT (Gruenberg, Maxfield, 1995; Gruenberg, Stenmark, 2004). На основе данных оптической микроскопии того времени предполагалось, что поздняя эндосома представлена единой структурой, хотя с помощью электронной микроскопии обнаружить подобную структуру не удалось (Gruenberg et al., 1989). В некоторых работах авторы также высказывали предположение о том, что ранняя сортирующая эндосома не является единым компартментом, а подразделяется на собственно сортирующую эндосому и отдельный эндоцитозный рециклирующий компартмент (Maxfield, McGraw, 2004).

Согласно второй гипотезе - созревания (Murphy, 1991), клатрин-окаймленные пузырьки, сформированные путем инвагинаций ПМ и несущие груз, после снятия окаймления сливаются друг с другом с образованием ранней эндосомы. Ранняя эндосома претерпевает процесс постепенного «созревания», в ходе которого меняется ее белково-липидный состав, и становится поздней эндосомой. В качестве поздней эндосомы сторонники этой теории рассматривали MBT.

Следует подчеркнуть, что эти гипотезы появились на начальных этапах развития представлений о везикулярном транспорте, и молекулярные механизмы, вовлеченные в процесс эндоцитоза, были изучены мало. Поэтому появление этих концепций основано на небольшом наборе экспериментальных данных, которые часто рассматривались авторами в пользу выдвигаемой гипотезы, но в действительности во многих случаях могли трактоваться в пользу обеих точек зрения.

Так, в своей статье 1991 года Гриффитс и Гринберг (Griffiths, Gruenberg, 1991) привели аргументы в пользу своей гипотезы стабильных компартментов. Авторы выдвинули аргумент о том, что ранние и поздние эндосомальные компартменты отличаются по своему биохимическому составу. В частности, методом субклеточного фракционирования в ступенчатом градиенте плотности было установлено, что малая ГТФаза Rab5 обнаруживается в раннеэндосомальной фракции, в то время как Rab7 ГТФаза характерна для фракции поздних эндосом. Авторы предположили, что гипотеза созревания эндосом менее вероятна, поскольку для этого требуется, чтобы в процессе созревания органеллы постепенно менялась ее транспортная машинерия и белково-липидный состав, характерные для определенной стадии «зрелости» везикулы. Еще одним аргументом, представленным авторами, являются экспериментальные данные о том, что в условиях *in vitro* происходят множественные эффективные слияния между эндосомами, выделенными через 5 мин после стимуляции эндоцитоза (ранние эндосомы), в то время как везикулы, выделенные через больший промежуток времени (30 мин), практически не сливались с ранними эндосомами (Gruenberg et al., 1989). Схожие результаты были получены и *in vivo* путем последовательной стимуляции эндоцитоза по-разному меченым лигандом методом pulse-chase-pulse (запуск-отмывка-запуск) (Dunn, Maxfield, 1992). Таким образом, было обнаружено, что со временем эндосомы теряют способность к слиянию с вновь формируемыми везикулами, несущими груз. Стало понятно, что это свойство эндосом определяется тем, что их белково-липидный состав различен. Этот аргумент использовался как сторонниками теории стабильных компартментов (Griffiths, Gruenberg, 1991), так и теории созревания (Dunn, Maxfield, 1992). Сторонники теории стабильных компартментов полагали, что различие в белково-липидном составе эндосом доказывает то, что они представляют собой различные компартменты. Сторонники теории созревания указывали на то, что белково-липидный состав эндосом, как и их способность к слиянию друг с другом могут изменяться в ходе эндоцитоза постепенно (Murphy, 1991; Dunn, Maxfield, 1992).

В настоящее время накопилось большое количество данных о молекулярных механизмах, регулирующих транспорт грузов по эндоцитозному пути. Большинство

исследователей поддерживают гипотезу созревания эндосом. Действительно, в настоящее время во многом понятен механизм образования внутренних везикул МВТ, также активно изучаются механизмы замены молекулярных комплексов в ходе созревания эндосомы. Становится очевидным, что гипотеза стабильных компартментов в ее первоначальном виде не находит своего подтверждения. Тем не менее, вопрос о биогенезе ранних эндосом, а также вопросы о том, где проходит граница между ранними и поздними эндосомами и есть ли она вообще, остаются открытыми.

1.2.3 Регуляция эндоцитоза компонентами цитоскелета

Клетка содержит три основных разновидности компонентов цитоскелета: микротрубочки (МТ), промежуточные филаменты и микрофиламенты, которые взаимодействуют между собой и образуют единую сеть. Компоненты цитоскелета выполняют механическую функцию поддержания формы клетки, вовлечены в процессы деления клетки и ее подвижности, обеспечивают позиционирование органелл. Кроме того, компоненты цитоскелета принимают активное участие в везикулярном транспорте, осуществляя и регулируя перемещение транспортных везикул, что также увеличивает вероятность их взаимодействий и слияний друг с другом. Считается, что в клетках животных микротрубочки обеспечивают транспорт везикул на большие расстояния, в то время как микрофиламенты обслуживают везикулярный транспорт на коротких дистанциях. Роль промежуточных филаментов в везикулярном транспорте изучена гораздо хуже, однако предполагается, что они могут регулировать перемещение везикул опосредованно через взаимодействие с другими компонентами цитоскелета. Ниже будут рассмотрены основные свойства компонентов цитоскелета, а также их роль в транспорте везикул по эндоцитозному пути.

1.2.3.1 Микротрубочки

Микротрубочки представляют собой полимеры, состоящие из нековалентно связанных между собой димеров α - и β - тубулина молекулярной массой около 100 кДа (молекулярная масса каждого мономера - около 50 кДа), которые взаимодействуют друг с другом по принципу «голова к хвосту» с образованием протофиламентов. Тубулин является ГТФазой. В процессе полимеризации молекула ГТФ, связанная с β -тубулином в области его Е-сайта (nucleotide exchange site - сайт, где происходит обмен нуклеотидов), гидролизует, а образовавшийся ГДФ не заменяется на ГТФ до того момента, пока β -

тубулин остается в составе МТ. После высвобождения димера $\alpha\beta$ -тубулина из состава МТ в результате ее деполимеризации ГДФ, находящийся в Е-сайте, может заменяться на ГТФ, в результате чего димер вновь может включиться в состав МТ (Desai, Mitchison, 1997). МТ имеет диаметр 25 нм и, как правило, состоит из 13 рядов протофиламентов, ассоциированных между собой за счет латеральных взаимодействий (Evans et al., 1985).

Организация димеров $\alpha\beta$ -тубулина по принципу «голова к хвосту» в МТ определяет их важнейшее свойство – полярность. Следствием этого является различие в скорости полимеризации двух их противоположных концов: быстрорастущий конец обозначается как плюс-конец, медленно растущий – минус-конец (Desai, Mitchison, 1997), на котором преобладает процесс разборки МТ. В клетках, как правило, МТ располагаются радиально, при этом плюс-концы направлены к периферии клетки, а минус-концы собираются в области центра организации микротрубочек (ЦОМТ), где происходит процесс нуклеации их полимеризации. Однако существуют и другие виды пространственной организации (параллельная, линейная) (Schroer, Sheetz, 1991).

Полярность МТ определяет возможность осуществлять по ним направленный транспорт. Транспорт везикул и органелл по МТ осуществляется с помощью так называемых моторов, подразделяющихся на два суперсемейства – кинезинов и динеинов. Моторы МТ представляют собой белковые комплексы, гидролизующие АТФ и использующие эту энергию для перемещения по МТ.

Кинезины составляют большое суперсемейство белков, 45 представителей которого найдены в клетках млекопитающих (Caviston, Holzbaur, 2006). Кинезины обладают консервативным глобулярным моторным доменом («голова»), содержащим последовательности связывания с АТФ и МТ. Структура кинезинов также включает в себя стержневой участок, связывающийся с одной стороны с моторным доменом, а с другой – с «хвостовым» глобулярным доменом. Стержневой участок необходим для димеризации мономеров кинезина. Встречаются гомо- и гетеродимеры, а некоторые кинезины, обладая коротким стержневым участком, могут существовать в виде мономеров. Вариабельные «хвостовые» участки служат для связывания с грузом, а также иногда соединены с легкими цепями или дополнительными белками, которые могут опосредовать взаимодействие кинезинов с грузами (Hirokawa, Noda, 2008).

Динеин представляет собой большой комплекс, состоящий из двух тяжелых цепей, двух промежуточных цепей, двух дополнительных промежуточных легких цепей и легких цепей. Тяжелая цепь динеина принадлежит к семейству AAA- АТФаз и существует в виде гептамерного кольца, содержащего небольшой выступ, отвечающий за связывание с МТ. Связывание динеином груза может осуществляться напрямую за счет взаимодействия с

легкими цепями или опосредованно через связывание с динактиновым комплексом. Динактиновый комплекс состоит из одиннадцати субъединиц. Связывание с динеином и микротрубочками осуществляется с помощью субъединицы динактина p150^{glued}. Считается, что связывание с динактином способствует увеличению процессивности динеина (Caviston, Holzbaaur, 2006).

Установлено, что кинезины осуществляют транспорт грузов по МТ по направлению от минус-конца к плюс-концу, в то время как динеины работают в противоположном направлении. Согласно одной из гипотез, направление транспорта везикул по МТ может определяться балансом связывания моторных белков с везикулами. Так, известно, что кинезин-2 и динеин могут конкурировать за связывание с субъединицей динактина p150^{glued} (Deacon et al., 2003).

Разные части везикул могут связываться с различными моторными белками, что будет определять дальнейшее направление их транспорта. Направление грузов на путь деградации сопровождается перемещением эндосом от периферии клетки к околоядерной области. Считается, что транспорт в этом направлении опосредуется преимущественно МТ и связан с работой динеиновых моторов. В то же время рециклирующие части ранних эндосом преимущественно связаны с кинезиновыми моторами (Hoepfner et al., 2005). Как осуществляется первичная ассоциация эндосом с МТ? Считается, что первичная «посадка» эндосомы на МТ опосредуется целым комплексом белков. Показано, что важную роль играют плюс-концевые белки микротрубочек, обозначаемые как +TIPs и принадлежащие группе MAP белков. Среди +TIPs белков выделяют тубулин-связывающие белки семейства EB (End-Binding), а также белки семейства CLIP, в особенности CLIP170, взаимодействующий, с одной стороны, с EB-белками, а с другой – с эндосомами (Pierre et al., 1992). +TIPs, в свою очередь, имеют сродство к ГТФ-обогащенным концам МТ. Первичное связывание груза осуществляется за счет CLIP170 и динактина, а связывание динеина с МТ осуществляется, по-видимому, за счет +TIPs-комплекса (Надеждина и др., 2013).

В настоящее время известно, что одними из основных белков, регулирующих привлечение моторных белков к эндосомам, являются Rab-белки. Специфичность Rab-белков к различным доменам эндосом определяет точную пространственно-временную регуляцию транспорта везикул. Показано, что локализация кинезина KIF16B на ранних эндосомах косвенно опосредована Rab5. KIF16B привлекается на ранние эндосомы путем своего взаимодействия PI3P, который, как считается, появляется на ранней эндосоме за счет активации Rab5 (Caviston, Holzbaaur, 2006). Согласно литературным данным, активированная малая ГТФаза Rab7, локализованная на поздних эндосомах, связывается

со своим эффекторным белком RILP (Rab-interacting lysosomal protein), который поддерживает ее в активном состоянии и привлекает динеин и динактин на поверхность поздних эндосом (Cantalupo et al., 2001).

По-видимому, Rab-белки регулируют также переключение эндосом с актин-зависимого транспорта на тубулин-зависимый. Было показано, что Rab5 привлекает к ранним эндосомам белок HAP40, связывающий фактор Htt, что способствует взаимодействию ранних эндосом с фибриллярным актином. Инактивация Rab5 вследствие гидролиза ГТФ приводит к диссоциации HAP40 с поверхности ранних эндосом, в то время как Htt остается с ними связан. Htt рекрутирует ряд белков, в том числе HAP1, связывающийся напрямую с кинезином и динактином, что приводит к «посадке» эндосомы на МТ (Caviston, Holzbaur, 2006).

1.2.3.2 Промежуточные филаменты

Промежуточные филаменты имеют диаметр 10-12 нм и по ряду структурных особенностей отличаются от других компонентов цитоскелета. Так, в отличие от МТ и актинового цитоскелета, промежуточные филаменты состоят не из глобулярных мономеров, а из Rod-подобных димеров, имеющих длину порядка 45 нм и диаметр 2-3 нм. В процессе сборки промежуточных филаментов эти димеры ориентируются антипараллельно и ассоциируются между собой за счет латеральных взаимодействий. Антипараллельная ориентация димеров в филаментах делает их неполярными. Важной особенностью промежуточных филаментов является их способность к самосборке без дополнительных источников энергии в виде энергии гидролиза ГТФ или АТФ (Черноиваненко, Минин, 2013). Промежуточные филаменты являются самыми динамически нестабильными компонентами цитоскелета, поскольку их сборка и разборка могут происходить в любой части филамента (Strelkov et al., 2003).

Помимо механической функции поддержания формы клетки промежуточные филаменты участвуют в формировании клеточных контактов, могут выступать в качестве сигнальных молекул, а также регулируют транспорт внутриклеточных органелл (Черноиваненко, Минин, 2013). Показано, что некоторые промежуточные филаменты могут напрямую взаимодействовать с МТ и актиновыми филаментами, а также с моторными белками кинезинового и динеинового ряда (Styers et al., 2005).

Роль промежуточных филаментов в везикулярном транспорте изучена мало. Известно, что виментин может взаимодействовать с компонентами адаптерного комплекса AP3, вовлеченного в транспорт грузов между эндосомами и лизосомами, хотя точная роль

виментина пока непонятна (Styers et al., 2005). Недавние исследования показали, что виментин и глиальный фибриллярный белок влияет на подвижность эндосом и лизосом в астроцитах (Potokar et al., 2010).

1.2.3.2. Актиновые микрофиламенты

Актин является одним из наиболее распространенных белков эукариотических клеток. У позвоночных обнаружено три основных изоформ актина: три α -изоформы найдены в клетках скелетной, гладкой мускулатуры, а также в кардиомиоцитах; β - и γ -изоформы экспрессируются в немышечных и мышечных клетках (Dominguez, Holmes, 2011).

Актин существует в клетках в мономерной форме (глобулярный или G-актин), а также в форме филаментов (фибриллярный или F-актин) диаметром порядка 5-9 нм, образованных путем полимеризации мономеров актина. Мономер актина представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 375 аминокислот, которая образует двудоменную структуру. Зона контакта между этими доменами относительно небольшая, и они разделены между собой двумя щелями. В области верхней щели имеются сайты связывания с двувалентными катионами (Ca^{2+} или Mg^{2+}) и нуклеотидом (АТФ или АДФ), в области нижней щели – сайты связывания с актин-связывающими белками и другими мономерами актина (Dominguez, Holmes, 2011). В процессе полимеризации момеры актина присоединяются к растущему филаменту в АТФ-связанной форме, после чего АТФ на присоединенном мономере гидролизует с образованием АДФ-фосфата. На противоположном конце актинового филамента преобладает процесс отсоединения АДФ-связанных мономеров актина. Показано, что фосфат остается какое-то время связан с молекулой АДФ в составе филамента и высвобождается в цитоплазму после относительно длительной задержки. В результате на растущем конце актинового филамента образуются АТФ-кэп и АДФ-фосфат-кэп. Считается, что соотношение кэпов в актиновом филаменте регулирует его связывание с актин-связывающими белками (Vavylonis et al., 2005).

Структура актиновых филаментов придает им свойство полярности, что, в свою очередь, делает возможным направленный транспорт грузов вдоль филаментов с помощью моторных белков семейства миозинов, имеющих АТФ-азную активность. Миозины по своей структуре напоминают моторные белки микротрубочек кинезины – на своем N-конце они образуют глобулярный домен, соединенный с удлинённым α -спиральным участком, за которым следует глобулярный хвостовой домен. Миозины подразделяются на несколько классов, включая миозины II класса, входящие в состав

саркомеров мышечных клеток, и миозины V класса, вовлеченные в процесс везикулярного транспорта. Как правило, миозины перемещаются вдоль актинового филамента по направлению к его растущему концу. Однако, известно, что миозин VI транспортирует грузы в обратном направлении (Murray, Wolkoff, 2003).

Актин образует в неммышечных клетках различные фибриллярные структуры. Так, в подмембранной области клетки присутствует так называемый кортикальный актин. Филаменты актина выявляются в составе микроворсинок и филоподий. Актиновые фибриллы могут быть также связаны с молекулами клеточной адгезии (интегринами) и направляться от них к центру клетки, образуя протяженные пучки, называемые стресс-фибриллами (Пинаев, 2009). Указанные актиновые структуры выполняют в клетке различные функции: поддержание формы клетки, движение клеток и их деление (Хайтлина, 2013).

Помимо этих структур, актин может формировать тонкую высокодинамичную сеть актиновых филаментов. Известно, что формирование подобных актиновых сетей необходимо для нормального прохождения различных этапов эндоцитоза, таких, как инвагинация ПМ внутрь клетки, отделение транспортных везикул от ПМ, а также в перемещение эндосом в клетке на небольшие расстояния (Mooren et al., 2012).

Регуляция полимеризации/деполимеризации сети актиновых филаментов на различных участках эндоцитозного пути осуществляется под контролем факторов, стимулирующих нуклеацию (NPF – nucleation promoting factors), а также факторов деполимеризации актиновых филаментов (например, кофилина) (Galleta, Cooper, 2009).

Единственным известным на сегодняшний день нуклеатором актиновых филаментов, работающим на эндоцитозном пути, является Arp2/3 комплекс (Mooren et al., 2012). Arp2/3 комплекс состоит из семи субъединиц, включая Arp2 и Arp3, а также субъединицы ARPC1-5. Сам по себе Arp2/3 комплекс биохимически почти неактивен, однако его связывание с NPF-факторами приводит к изменению его конформации и активации. В активном состоянии Arp2/3 комплекс связывается с филаментами актина и приводит к формированию нового (дочернего) бокового филамента, отходящего от материнского под углом 70° (Amann, Pollar, 2001). Предполагается, что Arp 2/3 комплекс, присоединяясь к актиновому филаменту, имитирует актиновый димер или тример и играет роль «шаблона» для дальнейшей сборки филамента (Goley, Welch, 2006). Более того, Arp2/3 комплекс блокирует медленный конец микрофиламента, где должна происходить его разборка, тем самым стабилизируя его.

Факторы, активирующие Arp2/3 комплекс, подразделяют на два класса. Наиболее известными представителями первого класса являются WASP (Wiskott–Aldrich Syndrome

Protein) и WAVE (WASP-family verprolin-homologous protein) белки. Предполагается, что они присоединяются к Arp2/3 комплексу и изменяют его конформацию, сближая между собой Arp2 и Arp3 субъединицы, а также доставляют мономер актина к нуклеаторному комплексу, представляющему собой тример Arp2, Arp3 и актина (Goley, Welch, 2006). Ко второму классу белков, активирующих Arp2/3 комплекс, относят кортактин (Cosen-Binker, Karus, 2006). В отличие от факторов первого класса, белки этой группы связываются не с глобулярным, а с фибриллярным актином. Интересно также, что у представителей второго класса отсутствует домен, ответственный за конформационные изменения и, соответственно, активацию Arp2/3 комплекса (Goley et al., 2004). Показано, что после образования бокового актинового филамента N-WASP высвобождается в цитоплазму, в то время как кортактин остается связан с Arp2/3 комплексом (Egile et al., 2005). Таким образом, предполагается, что кортактин служит для стабилизации бокового актинового филамента (Goley, Welch, 2006).

Известно, что в клетках млекопитающих кортактин, Arp2/3 комплекс и N-WASP локализуются в области клатрин-окаймленных везикул (Merrifield et al., 2004). Показано, что кортактин постепенно накапливается на формирующейся окаймленной ямке, а пик его накопления в этой области коррелирует с отделением транспортной везикулы от ПМ (Рис.2, Merrifield et al., 2005). С этой точки зрения интересен тот факт, что кортактин может напрямую взаимодействовать с динамином (McNiven et al., 2000).

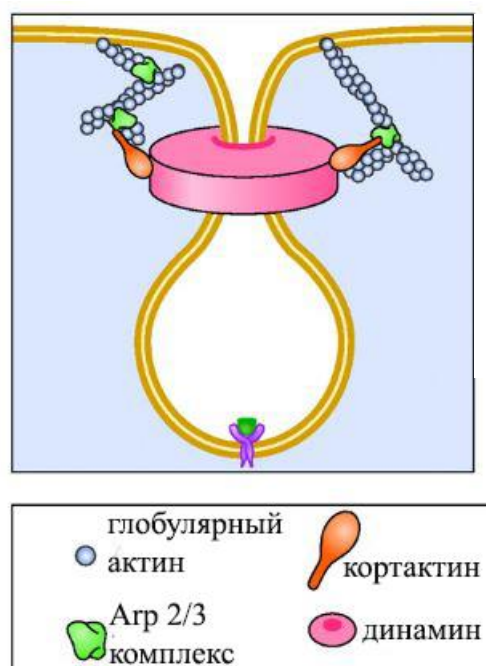


Рис. 2 Отделение транспортной везикулы от плазматической мембраны с участием динамина, кортактина, Arp2/3 комплекса и актиновых филаментов. По: Cosen-Binker L. I., Karus A., 2006.

Более того, известно, что WASH (представитель семейства WASP белков), Arp2/3, динамин и актин участвуют в процессе сегрегации рециклирующих тубул от ранних

эндосом (Derivery et al., 2009; Ohashi et al., 2011). Показано, что WASH обнаруживается на поверхности везикул, положительных по фактору дистанционного взаимодействия EEA1, который рассматривается многими исследователями в качестве маркера ранних эндосом. Ингибирование WASH и динамина приводит к появлению в клетке длинных тубулярных выростов эндосом. Коиммунопреципитация позволила выявить взаимодействие WASH и динамина, а также предположить, что WASH появляется на эндосоме первым и привлекает к месту сегрегации рециклирующей тубулы динамин (Derivery et al., 2009). Влияние динамина, как предполагается, определяется последовательным привлечением на эндосому кортактина, Arp2/3, актина (Хайтлина, 2013). Таким образом, имеющиеся в литературе данные указывают на то, что актиновые филаменты при участии Arp2/3 комплекса и его партнеров могут принимать участие в процессе сегрегации везикул в ходе эндоцитоза.

1.2.2 Малые ГТФазы Rab как основные регуляторные компоненты эндоцитозного пути

Как отмечалось выше, для правильного функционирования клетка должна обладать системой адресной доставки веществ к местам их предназначения. Одними из основных агентов в клетке, регулирующих специфичность везикулярного транспорта, являются малые ГТФазы суперсемейства Ras. Суперсемейство малых ГТФаз Ras представлено небольшими белками молекулярной массой 20-30 кДа и включает в себя несколько семейств, представители которых задействованы на определенных участках везикулярного транспорта. Так, семейства малых ГТФаз Arf и Sar участвуют в выборе груза и сборке, соответственно, COPI- и COPII-окаймлений, функционирующих в основном на участке везикулярного транспорта между ЭПР и АГ (Helms, Rothman, 1992; Barlowe et al., 1993). Представители семейства малых ГТФаз Rho регулируют транспортные процессы в первую очередь через воздействие на цитоскелет клетки. Показано, что Rho ГТФазы регулируют полимеризацию актина, активируя белки семейства WASP, которые, в свою очередь, индуцируют формирование Arp 2/3 комплекса (Rohatgi et al., 1999). Также известно, что представитель этого семейства Cdc 42 ингибирует транспорт везикул в АГ, предотвращая привлечение к ним моторного белка МТ динеина (Chen et al., 2005).

Наиболее обширным семейством Ras-подобных ГТФаз является семейство Rab-белков. Rab-белки являются ключевыми регуляторными компонентами, контролирующими все стадии везикулярного транспорта в целом и играющими ведущую

роль в определении специализированных доменов на мембранах органелл, обеспечивая сегрегацию функционально различных белков на поверхности одной и той же органеллы.

Каждый Rab-белок обладает своим набором эффекторов, рекрутирование которых к месту действия Rab-белка определяет функциональные свойства транспортной везикулы: регулирует ее образование, время ее отделения от донорной мембраны, способность заякориваться и сливаться с мембраной-акцептором и т. д. У человека найдено около 60 представителей этого семейства (Stenmark, Olkkonen, 2001).

Подобно остальным представителям суперсемейства Ras-подобных белков, функциональная активность Rab-белков регулируется их взаимодействием с гуанозиндифосфатом (ГДФ и ГТФ, соответственно). Присоединение ГТФ приводит к активации Rab-белков, в то время как связывание с ГДФ поддерживает ГТФазу в неактивном состоянии. Rab-белки содержат консервативный ГТФазный домен, общий для всех представителей суперсемейства Ras. Рядом с ГТФазным доменом располагается С-терминальная часть, имеющая в своем составе гипервариабельный участок. Этот участок включает в себя два остатка цистеина, к которым ковалентно присоединяются остатки геранилгеранила. Остатки геранилгеранила служат «якорем» для встраивания Rab-белка в мембрану (Hutagalung, Novick, 2011). Также было показано, что в структуре Rab-белков имеются последовательности SF1-4, которые консервативны внутри Rab семейства и служат для присоединения эффекторов (Pereira-Leal, Seabra, 2000).

Переход Rab-белков из ГДФ- в ГТФ-связанное состояние контролируется специальными факторами GEF (Guanine nucleotide exchange factors), в то время как инактивация Rab-белков стимулируется факторами GAP (GTPase activating protein). В настоящее время считается, что цикл функционирования Rab-белков осуществляется следующим образом. К вновь синтезированному Rab-белку присоединяется фактор REP (Rab escort protein), который представляет Rab-белок геранилгеранилтрансферазе, катализирующей присоединение к нему гидрофобных геранилгеранильных групп (Alexandrov et al., 1994). После этого Rab-белок, находящийся в ГДФ-связанном, неактивном состоянии, встраивается за счет своего гидрофобного хвоста в донорную мембрану. Считается, что фактор GDI (GDP dissociation inhibitor) способствует встраиванию Rab в мембрану. Затем мембран-ассоциированный фактор GDF (GDI displacement factor) отсоединяет Rab-белок от GDI, что делает его доступным для GEF и тем самым способствует его переходу в ГТФ-связанное состояние. В активном состоянии Rab-белок всегда связан с мембраной и способен выполнять свою функцию, рекрутируя эффекторные белки. Инактивация Rab-белка связана с работой GAP. После гидролиза ГТФ Rab-белок становится субстратом для GDI, который экстрагирует его из мембраны в

цитозоль, после чего Rab-белок снова может встраиваться в мембрану (Hutagalung, Novick, 2011; Mizuno-Yamasaki et al., 2012).

В случае гомотипических слияний Rab-белок (этот вариант характерен, в том числе, для Rab5-белка) может претерпевать множество циклов гидролиза ГТФ и его присоединения без связывания с GDI и высвобождения из мембран-связанного состояния в цитозоль. В случае участия Rab-белка в гетеротипических слияниях считается, что GDI необходим после каждого слияния везикул для возвращения Rab-белка на мембрану донорного компартмента. При этом неизвестно, претерпевает ли Rab-белок подобные циклы гидролиза ГТФ и его присоединения, находясь на мембране транспортной везикулы (Pfeffer, 2001). Известно, что некоторые белки могут поддерживать Rab ГТФазы в активном состоянии. Например, показано, что для Rab5-белка на мембране ранних эндосом такую функцию осуществляет Rabaptin 5 (Horiuchi et al., 1997).

1.3.3 Механизмы слияния эндосом

Как уже упоминалось выше, основные стадии транспортного процесса универсальны. Конечной стадией любого транспортного процесса в клетке, как в пределах антероградного, так и в пределах эндоцитозного пути, является слияние транспортной везикулы с акцепторной мембраной. Этот этап регулируется 3 системами белков: ГТФазами Rab, факторами дистанционного взаимодействия и системой SNARE-белков. Основная регуляторная роль Rab-белков в этом процессе заключается в том, что они, как считается, определяют время появления и длительность нахождения на мембране везикул своих эффекторов – факторов дистанционного взаимодействия (Yu, Hughson, 2010). Факторы дистанционного взаимодействия или тетеринг-факторы («тетеринг» - от англ. tether-привязь, трос) обеспечивают первичное заякоривание мембран на расстояние порядка 25 нм. В пределах эндоцитозного пути наиболее изученным фактором дистанционного взаимодействия считается белок EEA1, участвующий в гомотипических слияниях ранних эндосом. Также в клетках дрожжей были найдены два гомологичных комплекса белков, обеспечивающих первичные заякоривания эндосом – CORVET (class C core vacuole/endosome tethering) и HOPS (homotypic fusion and protein sorting), специфичные для ранних и поздних эндосом, соответственно (Balderhaar, Ungermann, 2013).

Для успешного слияния двух мембран необходимо дальнейшее сближение двух везикул на расстояние порядка 10 нм. Этот вторичный этап слияния осуществляется с помощью системы SNARE белков. Основными компонентами SNARE системы являются

NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor), SNAP (soluble NSF attachment protein) и, собственно, SNARE (SNAP receptors) белки. В клетках млекопитающих найдено более 30 представителей семейства SNARE белков, опосредующих слияние везикул на различных участках везикулярного транспорта. Изначально SNARE белки подразделяли на 2 класса – v-SNARE (от англ. vesicular- везикулярный), и t-SNARE (от англ. target – мишень), в зависимости от их локализации. Так, считалось, что v-SNARE (к ним относятся синтаксины и SNAP-25) локализованы на мембране транспортной везикулы, в то время как t-SNARE находятся на мембране-мишени (к ним относится семейство белков VAMP). Комплементарное взаимодействие между v-SNARE и t-SNARE, как предполагалось, приводило к слиянию двух мембран (Söllner et al., 1993). Однако исследование структуры SNARE белков привело к появлению другой классификации.

Оказалось, что SNARE белки по своей структуре очень консервативны. Они закорены в мембране за счет С-терминального трансмембранного домена. Их общей чертой является наличие в С-концевой части одного, что чаще, или двух (в случае SNAP-белков) суперскрученных мотивов, состоящих из 60-70 аминокислотных остатков (Südhof, Rothman, 2009). В процессе взаимодействия четырех суперскрученных мотивов SNARE белки формируют крайне стабильный комплекс (Sutton et al., 1998). Центральная часть этого комплекса гидрофобна, за исключением трех остатков глутамина (Q) и одного остатка аргинина (R). SNARE белки, в составе суперскрученного мотива которых находится глутамин, стали относить к группе Q-SNARE, а SNARE белки, содержащие в этом домене аргинин – к R-SNARE (Fasshauer et al., 1998). Таким образом, собранный SNARE комплекс, как правило, представлен не двумя SNARE, а состоит из четырех SNARE белков. Однако, в том случае, если один или несколько SNARE в комплексе содержат по два суперскрученных участка, количество SNARE, необходимых для создания комплекса, уменьшается. Позже выяснилось, что R-SNARE, как правило, являются v-SNARE, а Q-SNARE соответствуют t-SNARE, что позволило применять, наряду с новой, первоначальную классификацию SNARE белков.

Каков же конкретный механизм SNARE-зависимого слияния мембран? Этот вопрос до конца еще не решен, однако общие принципы стали понятны. Считается, что Ca^{2+} необходим для стабильной ассоциации SNARE-комплекса (Chen, Scheller, 2001). Суперскрученные мотивы SNARE-белков в комплексе располагаются параллельно друг другу вдоль мембраны-мишени, формируя так называемый транс-SNARE комплекс. Формирование стабильного комплекса помогает преодолеть энергетический барьер для реорганизации билипидного слоя. Предполагается, что SNARE комплекс также увеличивает изгиб мембран и создает тем самым в них напряжение, что приводит к

спонтанному полуслиянию – реорганизации внешних слоев мембран и, впоследствии, полному слиянию (Chen, Scheller, 2001). Реорганизация липидных бислоев приводит к образованию цис-комплекса, при этом все SNARE белки, входящие в этот комплекс, располагаются на мембране акцепторного компартмента. SNAP белки привлекают к SNARE комплексу NSF, который является АТФазой. Гидролиз АТФ на нем, как предполагается, приводит к диссоциации высокостабильного SNARE-комплекса (Südhof, Rothman, 2009).

Недавно было показано, что дополнительные белки регулируют слияние мембран. К таким белкам относят SM белки, которые могут взаимодействовать с синтаксинами. Точный механизм их работы пока непонятен, но предполагается, что они препятствуют диффузии SNARE и помогают им концентрироваться в нужных участках мембраны (Südhof, Rothman, 2009). Вакуолярная АТФаза, выполняющая на эндосомах роль протонной помпы, также, по-видимому, принимает участие в слиянии мембран. Вакуолярная АТФаза состоит из двух субъединиц – периферической V1 и V0, последняя из которых представляет собой трансмембранный канал для транспорта протонов. В полностью собранном состоянии вакуолярная АТФаза катализирует АТФ-зависимый транспорт протонов внутрь эндосомы, что приводит к закислению ее люмена. Сама по себе V0 субъединица, не формирующая комплекс с V1, имеет дополнительную функцию. Центральный элемент V0 представлен пороподобным протеолипидным кольцом. Согласно недавно предложенной модели, ассоциация SN белка и теттеринг факторов со SNARE белками может ограничивать подвижность SNARE, тем самым еще более усиливая мембранное напряжение, вызванное формированием транс-комплекса. Это, в свою очередь, приводит к реорганизации протеолипидного кольца внутри V0 субъединицы и способствует полуслиянию мембран (Pieren et al., 2010; Strasser et al., 2011).

Следует отметить, что одни и те же SNARE белки могут работать на различных участках везикулярного транспорта, а специфичность слияния, как предполагается, может обеспечиваться различной комбинацией SNARE-белков. Так, было показано, что гомотипическое слияние ранних эндосом опосредуется комплексом, состоящим из v-SNARE белков синтаксина 13, синтаксина 6, vti1a и t-SNARE белка VAMP4 (Mills et al., 2001; Brandhorst et al., 2006; Zwilling et al., 2007). Результаты других исследований позволили предполагать, что слияния ранних эндосом могут быть опосредованы также VAMP8 (Antonin et al., 2000), VAMP2 и SNAP25 (Sun et al., 2003). Необходимо отметить, что регуляция слияния, по-видимому, может осуществляться также благодаря прямому взаимодействию теттеринг-факторов с компонентами SNARE системы. Так, показано, что

EEA1 может напрямую взаимодействовать с синтаксином 13 и синтаксином 6 (Mills et al., 2001). Предполагается, что факторы дистанционного взаимодействия могут также ускорять сборку SNARE комплексов (Balderhaar, Ungermann, 2013).

1.3 Ранние эндосомы: функции, биогенез, молекулярные маркеры

1.3.1 Ранняя эндосома как компартмент для сортировки поступающих в клетку грузов

Как было сказано выше, в первых исследованиях ранние эндосомы были описаны как компартмент тубуло-везикулярной морфологии, который на начальных этапах эндоцитоза включает в себя поступивший в клетку груз. Исследование путей эндоцитоза различных грузов привело к представлению о ранних эндосомах как о сортировочных платформах, внутри которых в зависимости от природы груза он распределяется по различным направлениям, основными из которых являются путь деградации в лизосомах и путь рециклирования на ПМ (Yamashiro, Maxfield, 1987; Mellman, 1996). Так, было показано, что эпидермальный фактор роста и его рецептор, липопротеин низкой плотности (LDL), α -макроглобулин преимущественно направляются по пути деградации в лизосомы (Carpenter, Cohen, 1979; Anderson et al., 1977; van Leuven et al., 1980). В то же время рецептор LDL, а также трансферрин и его рецептор сортируются в тубулярную часть ранних эндосом и рециклируют на поверхность клетки (Brown et al., 1982; Harding et al., 1983).

Какие же механизмы регулируют сортировку грузов по различным направлениям? Один из наиболее простых и очевидных механизмов заключается в сортировке грузов в соответствии с тубуло-везикулярной морфологией ранних эндосом. Известно, что закисление люмена ранних эндосом до значений $\text{pH}=6.0$ приводит к диссоциации некоторых мембранно-связанных рецепторов со своими лигандами. Поскольку соотношение площади поверхности ранней эндосомы к ее объему выше в ее тубулярной части по сравнению с везикулярной, при условии равномерного распределения рецептора в плоскости мембраны рецептор будет преимущественно распределяться в тубулярную часть эндосомы, в то время как лиганд окажется в везикулярной части. Груз, находящийся в везикулярной части эндосомы, будет направляться на деградацию, в то время рецептор, распределенный в тубулярную часть эндосомы, рециклирует на клеточную поверхность. Считается, что такой способ сортировки характерен, например, для LDL и его рецептора (Maxfield, McGraw, 2004).

Однако в клетке существуют и более специфичные механизмы сортировки грузов в ходе эндоцитоза. Известно, что сортировка грузов на путь деградации зависит от наличия сортирующих сигналов в цитоплазматическом домене рецепторов. Наиболее изученным механизмом является убиквитинирование рецептора эпидермального фактора роста. При взаимодействии со своим лигандом на поверхности клетки рецептор димеризуется и фосфорилируется по Tyr1045, который расположен в его цитоплазматической части. Предполагается, что данный фосфорилированный остаток тирозина является мишенью для убиквитинирования убиквитин-лигазой 3 класса c-Cbl, которая производит мультиубиквитинирование РЭФР (de Melker et al., 2004). В ходе эндоцитоза убиквитинирование претерпевают и другие рецепторы, включая рецепторы факторов роста тромбоцитов, гепатоцитов, эндотелиального фактора роста и др., что также является для них сигналом, направляющим их на деградацию в лизосомы (Haglund, Dikic, 2012). Первичное узнавание убиквитинированного груза осуществляется белком Hrs (hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate), который также узнает плоские решетки клатрина на участках ранних эндосом (Raiborg et al., 2002). Таким образом, Hrs концентрирует груз в определенных участках ранних эндосом. Hrs является компонентом комплекса ESCRT-0, который участвует на ранних этапах сортировки грузов на путь деградации (Williams, Urbé, 2007).

Важные регуляторы сортировки груза на ранних эндосомах – малые ГТФазы Rab. Основными Rab-белками, найденными на ранних эндосомах, являются Rab5 и Rab4. Rab5 и Rab4 локализуются на поверхности ранних эндосом не гомогенно, а организованы в отдельные Rab4- и Rab5-положительные домены. Так, Rab4 преимущественно располагается в области тубулярных выростов, а Rab5 маркирует везикулярную часть ранних эндосом. Считается, что Rab4 регулирует сортировку груза на путь рециклирования. Показано, что экспрессия в клетках мутантной конститутивно неактивной ГДФ-связанной формы Rab4 приводила к подавлению рециклирования трансферрина и его накоплению в ранних эндосомах. Напротив, в клетках, гиперэкспрессирующих конститутивно активную мутантную форму Rab4, трансферрин локализовался в тубулярных рециклирующих частях эндосом (McCaffrey et al., 2001).

Функции белка Rab5 на ранних эндосомах намного шире. Помимо того, что Rab5 напрямую или опосредованно через действие своих эффекторов регулирует сортировку грузов в ранних эндосомах, он также опосредует гомотипическое слияние ранних эндосом – один из ключевых процессов, происходящих в ходе эндоцитоза. Благодаря гомотипическим слияниям увеличивается площадь поверхности ранних эндосом и создается избыток мембраны, что необходимо для образования инвагинаций мембраны в

люмен эндосомы с образованием внутренних везикул MBT, в которых накапливается и концентрируется груз. Кроме того, Rab5 опосредует взаимодействие ранних эндосом с компонентами цитоскелета, а также вовлечен в сигнальные каскады, начинающиеся в ранних эндосомах (Jovic et al., 2010). В следующей главе будут рассмотрены современные представления о том, как малая ГТФаза Rab5 регулирует и определяет функции ранних эндосом в клетке, а также представления о биогенезе ранних эндосом.

1.3.2 Малая ГТФаза Rab5 и ее эффектор EEA1 как маркеры РЭ. Современные представления о биогенезе ранних эндосом.

В соответствии с современными представлениями, биогенез ранних эндосом связан с появлением на их мембране активированной формы малой ГТФазы Rab5. Активация Rab5 осуществляется благодаря работе факторов обмена нуклеотидов GEF, таких как Rabex 5 (Horiuchi et al., 1997), факторов RIN (Tall et al., 2001; Kajiho et al., 2003), а также GAPex5 (Su et al., 2007). Показано, что Rab5 присутствует не только на мембране ранних эндосом, но и выявляется в составе клатрин-окаймленных везикул (Rubino et al., 2000).

Активированный Rab5 привлекает на мембрану ранних эндосом целый ряд эффекторов, выполняющих разнообразные функции. Rab5-эффектор Rabaptin-5 связывается с Rab5, а также рекрутирует Rabex 5, стабилизируя нахождение Rab5 на мембране в активированном виде (Stenmark et al., 1995; Horiuchi et al., 1997). Кроме того, Rabaptin5 участвует в формировании функциональных доменов на мембране ранней эндосомы. Помимо Rab5-связывающего домена Rabaptin5 содержит также Rab4-связывающий участок. Подобная структура позволяет этому белку выполнять роль линкера, разграничивающего Rab5- и Rab4-зависимые участки ранних эндосом, тем самым физически разделяя рециклирующие части эндосомы от везикулярной части, в которой содержится груз, предназначенный для деградации (Vitale et al., 1998). Rab5 также может опосредовать активацию сигнальных путей, связанную с эндоцитозом. Так, было показано, что эффекторами Rab5 являются белки APPL1 и APPL2 (Adaptor protein containing PH domain) (Miaczynska et al., 2004). При стимуляции эндоцитоза рецептора ЭФР белки APPL1 и APPL2 могут транспортироваться в ядро клетки и взаимодействовать с комплексом гистоновых деацетилаз NuRD/MeCP1, участвующим в ремоделировании структуры хроматина и регуляции экспрессии генов (Miaczynska et al., 2004).

Главным эффектором Rab5 является фосфатидилинозитол-3-киназа Vps34, которая, как считается, рекрутируется на мембрану ранних эндосом в присутствии активированного Rab5. Взаимодействие Rab5 с Vps34 опосредуется за счет

взаимодействия ГТФазы с серин-треониновой протеинкиназой p150, образующей, в свою очередь, комплекс с Vps34 (Christoforidis et al., 1999). Vps34 является фосфатидилинозитол-3-киназой III класса и катализирует фосфорилирование фосфатидилинозитолов мембраны с образованием фосфатидилинозитол-3-монофосфата (PI3P) (Botelho, 2009), тем самым создавая на мембране ранней эндосомы домены, обогащенные этим липидом.

Создание PI3P-обогащенных участков рассматривается как одно из основных событий в биогенезе ранних эндосом, поскольку PI3P служит сайтом связывания для многих белков, характерных для этого компартмента. Белки, специфичные к PI3P, связываются с ним, как правило, за счет своих PX или FYVE доменов. Так, сортирующие нексины имеют в своем составе PX домен. Известно, что ретромерный комплекс, состоящий из SNX1, SNX2, SNX5, SNX6, ассоциируется с эндосомами за счет связывания с PI3P и опосредует возвращение рецептора к маннозо-6-фосфату из эндосом в транс-Гольджи (Bonifacino et al., 2008). С PI3P также могут взаимодействовать компоненты ESCRT машинерии. Так, упоминавшийся ранее компонент ESCRT-0 Hrs связывается с PI3P за счет своего FYVE домена (Raiborg et al., 2001). Еще одним ключевым белком ранних эндосом, который обладает FYVE доменом, является EEA1.

Белок EEA1 впервые был идентифицирован как аутоантиген у больного системной красной волчанкой (Mu et al., 1995). Антитела к данному антигену маркировали многочисленные везикулярные структуры в цитоплазме клеточных линий человека, мыши и курицы. Колокализация EEA1 с уже общепринятым в то время маркером ранних эндосом ГТФазой Rab5 на иммунофлуоресцентных препаратах, данные иммуноэлектронной микроскопии, а также результаты секвенирования гена, кодирующего этот белок, позволили предполагать, что он играет определенную роль в процессе везикулярного транспорта в ранних эндосомах (Mu et al., 1995). Анализ способности слияния эндосом в условиях *in vitro* как в присутствии антител к EEA1 белку, так и в условиях отсутствия EEA1 приводил к блокированию этого процесса, что указывало на участие белка в гомотипическом слиянии ранних эндосом (Mills et al., 1998).

В настоящее время известно, что EEA1 белок обеспечивает первичное заякоривание ранних эндосом и является фактором дистанционного взаимодействия. EEA1 белок имеет молекулярную массу порядка 170 кДа. На N-конце EEA1 содержит C₂H₂ домен типа «цинковые пальцы» и четыре гептадных повтора, в С-концевой части - кальмодулин-связывающий (IQ) мотив, Rab5-связывающий участок (RBD домен), а также FYVE домен (Mu et al., 1995; Stenmark et al., 1996; Patki et al., 1998). Показано, что N-концевой C₂H₂ домен, помимо RBD домена в С-концевой части, также может связываться

с Rab5 (Рис.3, Merithew et al., 2003). Связывание EEA1 с эндосомой может осуществляться также за счет связывания с кальмодулином посредством IQ мотива. Интересно, что подавление связывания через IQ мотив полностью ингибирует связывание EEA1 с мембраной (Mills et al., 2001).



Рис. 3 Расположение сайтов связывания белка EEA1 с фосфатидилинозитол 3-фосфатом и Rab5. По: *Callaghan, et al., 1999*.

Таким образом, EEA1 белок в своей структуре не содержит трансмембранных доменов. В клетках EEA1 локализуется в цитоплазме и на поверхности ранних эндосом. Однако, данные относительно того, каково соотношение цитоплазматической и мембранной фракции EEA1 в клетках, противоречивы. Так, при оценке количества EEA1 в цитоплазме и в мембранной фракции методом иммуноблоттинга в одних исследованиях EEA1 выявляется преимущественно в мембранной фракции (Lawe et al., 2003), в то время как в других – в цитоплазматической (Simonsen et al., 1998). При этом в большинстве иммунофлуоресцентных исследований показано, что EEA1 локализуется преимущественно на мембранах везикул, причем даже в клетках, культивируемых продолжительное время в среде с пониженным содержанием сыворотки (Verma et al., 2015), что минимизирует в них эндоцитоз.

Показано, что связывание EEA1 с мембраной ранних эндосом осуществляется С-концевой частью белка за счет RBD домена, взаимодействующего с Rab5, а также за счет FYVE домена, взаимодействующего с PI3P (Stenmark et al., 1996). Нарушение функционирования в FYVE домене вследствие делеции приводит к исключительно цитоплазматической локализации EEA1 (Stenmark et al., 1996; Gaullier et al., 2000), в то время как точечные мутации в RBD домене не уменьшали долю мембран-ассоциированного EEA1 (Lawe et al., 2002). Тем не менее, афинность связывания FYVE домена EEA1 с PI3P не высока и не может объяснить преимущественно мембранную локализацию EEA1 в клетках (Patki et al., 1998; Gaullier et al., 2000). Разрешить это несоответствие удалось путем изучения пространственной структуры молекулы. Было обнаружено, что в клетках EEA1 существует в виде гомодимера, причем в димере они располагаются параллельно друг другу (Callaghan et al., 1999). Предполагается, что

определенная ориентация доменов EEA1 на эндосоме и димеризация вносят дополнительный вклад в силу связывания EEA1 с мембраной, что в совокупности со связыванием через FYVE и RBD-домены приводит к стабильной ассоциации белка с эндосомой (Dumas et al., 2001).

Каким же образом фактор дистанционного взаимодействия EEA1 осуществляет свою функцию? Считается, что EEA1 ориентирован перпендикулярно мембране эндосомы. Связываясь с эндосомой своим С-концом, N-конец оказывается на расстоянии около 160-180 нм от поверхности мембраны. N-конец может взаимодействовать через свой C₂H₂ домен с Rab5, локализованным на мембране другой ранней эндосомы (Dumas et al., 2001). Таким образом, EEA1 выполняет роль линкера, закоривая везикулы на определенном расстоянии друг от друга (порядка 25 нм), что необходимо для их последующего слияния.

На основании накапливающихся данных сложилась на первый взгляд ясная картина биогенеза и функционирования ранних эндосом. Считается, что интернализация груза приводит к активации Rabex5 и Rab5 и их рекрутированию на мембрану клатрин-окаймленных везикул и вновь сформированных ранних эндосом. Rab5, в свою очередь, «организует» вокруг себя молекулярную машинерию, привлекая на мембрану эндосомы свои эффекторы – белки и белковые комплексы, обеспечивающие выполнение ранними эндосомами своих функций. Rab5-эффектор EEA1 является ключевым белком, осуществляющим гомотипические слияния ранних эндосом, что необходимо для их дальнейшего созревания в поздние эндосомы. Согласно этой модели, в отсутствие в клетках эндоцитоза EEA1 локализован в цитоплазме, в то время как его стимуляция приводит к рекрутированию белка на поверхность ранних эндосом (Liu et al., 2007). Было показано, что EEA1 также взаимодействует со SNARE-белками на ранних эндосомах, которые опосредуют непосредственно этап слияния эндосомальных мембран друг с другом (Mills et al., 2001). На поздних этапах эндоцитоза активируются GAP для Rab5 – RN-Tre и RabGAP-5 (Martinu et al., 2002; Haas et al., 2005), Rab5 заменяется на Rab7, вследствие чего на мембране поздней эндосомы эффекторные белки Rab5 ГТФазы заменяются на белки, рекрутируемые Rab7. В пользу гипотезы о рекрутировании Rab5 в ответ на интернализацию груза свидетельствуют ряд исследований, согласно которым стимуляция в клетках эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов приводит к активации Rab5 (Barbieri et al., 2000), а также может опосредованно регулировать его инактивацию с помощью RN-Tre (Lanzetti et al., 2000).

Таким образом, сложилось представление о том, что в ответ на стимуляцию эндоцитоза на интернализуемой в клетку везикуле собирается вся транспортная

машинерия, обеспечивающая транспорт груза. В рамках этой гипотезы Rab5 и EEA1 белки рассматриваются как основные молекулярные маркеры ранних эндосом (Rubino et al., 2000; Petiot et al., 2003). Однако следует признать, что в настоящее время не существует неопровержимых доказательств того, что путем биогенеза ранних эндосом (т.е. везикул, положительных по белку EEA1) является эндоцитозный путь.

Во-первых, механизмы регуляции активности резидентных белков ранних эндосом изучены мало, т. о., нельзя утверждать, что Rab5 и, в особенности, EEA1, привлекаются к мембране ранних эндосом исключительно в ответ на стимуляцию эндоцитоза. Имеющиеся в литературе данные косвенно указывают на то, что их мембранная локализация может контролироваться различными механизмами. Так, показано, оверэкспрессия Rabex5 дикого типа в клетках приводит к мембранной локализации конститутивно неактивной формы Rab5 S34N (Mattera et al., 2008), что противоречит гипотезе о том, что Rab5 может находиться на мембране ранних эндосом только в ГТФ-связанной форме. Интересно, что EEA1 может подвергаться убиквитинированию. Функциональное значение этой модификации пока непонятно, но предполагается, что оно может регулировать процессы слияния и сегрегации ранних эндосом (Ramanathan et al., 2013).

Во-вторых, вопрос о том, как регулируется пул PI3P на ранних эндосомах, также остается открытым. До последнего времени считалось, что Vps34 является единственной киназой в клетке, опосредующей создание PI3P-обогащенных доменов. Однако, было показано, что подавление экспрессии с помощью siRNA гена, кодирующего Vps34, не вызывало снижение доли EEA1 белка, ассоциированного с мембранами эндосом, в то время как действие вортманнина, традиционного используемого как специфический ингибитор Vps34, приводило к перераспределению EEA1 в цитоплазматический пул (Jonson et al., 2006). Эти данные позволили предположить, что поддержание пула PI3P на мембранах ранних эндосом осуществляется также за счет других киназ, отличных от Vps34, и чувствительных к действию вортманнина. Также было обнаружено, что фосфатидилинозитол-4- и 5-фосфатазы участвуют в генерации PI3P на мембране ранней эндосомы (Shin et al., 2005). Более того, показано, что PI3P может появляться на мембране ранней эндосомы за счет дефосфорилирования фосфатидилинозитол 3,4-бифосфата полифосфат-4-фосфатазой (Ivetac et al., 2005).

Все эти предпосылки косвенно указывают на то, что нахождение Rab5 и EEA1 на мембранах везикул может не означать, что в этих везикулах находится интернализованный груз. Более того, можно предполагать, что наличие Rab5 на мембране эндосом не определяет локализацию на них EEA1. Так, в подтверждении последнего предположения в литературе имеется ряд данных. Показано, что в поляризованных

нейронах гиппокампа имеются две популяции ранних эндосом — аксональная и соматодендритная. В то время как Rab5 обнаруживается на эндосомах обеих популяций, EEA1 присутствует только на поверхности везикул соматодендритного пула (Wilson et al., 2000). Более того, и в неполяризованных клетках были обнаружены EEA1-положительные и EEA1-негативные популяции везикул, несущие Rab5. Было показано, что EEA1⁻ Rab5⁺ везикулы были положительны по APPL1 и APPL2 (Miaczynska et al., 2004). Первоначально предполагалось, что EEA1⁻APPL⁺Rab5⁺ везикулы образуются из клатрин-окаймленных везикул и созревают в EEA1⁺ Rab5⁺ везикулы, постепенно теряя APPL и рекрутируя EEA1 (Zoncu et al., 2009). Однако недавние исследования продемонстрировали, что большинство EEA1⁻APPL⁺Rab5⁺ везикул не созревают в EEA1-положительные везикулы в ходе эндоцитоза, а являются отдельной субпопуляцией ранних эндосом, участвующей в сортировке и транспорте груза. Предполагается также, что EEA1⁻APPL⁺ Rab5⁺ эндосомы могут обмениваться с EEA1⁺ Rab5⁺ везикулами грузом (Kalaidzidis et al., 2015).

1.4. Механизмы созревания поздних эндосом

1.4.1 Механизмы сортировки груза во внутренние пузырьки мультивезикулярных тел.

Роль ESCRT- комплексов.

Формирование внутренних везикул является необходимым этапом созревания ранних эндосом в поздние эндосомы, последние из которых, согласно гипотезе созревания, и представляют собой мультивезикулярные тела. Как было сказано выше, убиквитинилирование груза в процессе эндоцитоза является сигналом, направляющим груз на деградацию в лизосомах. Концентрирование груза, несущего убиквитиновую метку, в определенных участках эндосомальной мембраны и его сортировка во внутренние пузырьки MBT осуществляется за счет работы ESCRT-комплексов (Endosomal Sorting Complex Required for Transport).

Четыре ESCRT-комплекса, ESCRT-0, -I, -II, -III, последовательно привлекаются на эндосомы за счет взаимодействия с белками и липидами. Первым ESCRT-комплексом, взаимодействующим с грузом в ходе эндоцитоза, является ESCRT-0. ESCRT-0 состоит из двух субъединиц - Hrs и STAM. ESCRT-0 связывается с эндосомой за счет Hrs, который содержит FYVE домен, узнающий PI3P. Hrs также взаимодействует с убиквитином и привлекает клатрин, концентрируя груз в клатрин-окаймленных доменах ранней эндосомы. Более того, Hrs напрямую связывается с TSG101-компонентом ESCRT-I машинерии. ESCRT-I, в отличие от ESCRT-0, имеет низкую афинность к фосфатидилинозитолам мембраны и связывается с эндосомой прежде всего за счет взаимодействия с ESCRT-0 (Williams, Urbé, 2007). Субъединицы ESCRT-I также содержат убиквитин-связывающие домены и домены, взаимодействующие с ESCRT-II. Компоненты ESCRT-II комплекса имеют GLUE домены, обладающие афинностью к PI3P, и также концентрируют груз в области PI3P-обогащенных доменов эндосомы за счет убиквитин-связывающих сайтов (Hurley, 2010).

ESCRT-III привлекается ESCRT-II комплексом и задействован уже на поздних стадиях созревания эндосомы. ESCRT-III не имеет специфической афинности к PI3P и может связываться с кислыми мембранными липидами. ESCRT-III находится в цитоплазме в виде мономеров, а его рекрутирование на мембрану эндосомы приводит к полимеризации. Важной особенностью ESCRT-III комплекса является то, что он не имеет убиквитин-связывающих доменов (Henne et al., 2011). Его основными функциями являются привлечение де-убиквитинилирующих ферментов, которые снимают убиквитинилирование с груза непосредственно перед его попаданием во внутренние

пузырьки MBT. Более того, ESCRT-III привлекает также АТФазу Vps4, которая убирает ESCRT-комплексы с эндосомальной мембраны и возвращает их в цитоплазматический пул (Scott et al., 2005). Считается, что ESCRT-III является главным компонентом ESCRT-машинерии, осуществляющим искривление мембраны эндосомы и формирующим внутренние пузырьки. Точный механизм искривления непонятен, однако предполагается, что ESCRT-III полимеризуется на цитоплазматической стороне эндосомы в виде спирального филамента, а его реорганизация необходима для отделения мембраны пузырька от мембраны эндосомы (Olmos, Carlton, 2016).

1.4.2 Механизмы Rab5-Rab7 конверсии

Одним из ключевых событий в процессе созревания ранних эндосом в поздние является замена Rab5 на Rab7 на мембране эндосом, так называемая Rab5-Rab7 конверсия. Малая ГТФаза Rab7 является общепринятым молекулярным маркером поздних эндосом. Показано, что экспрессия в клетках конститутивно неактивного Rab7 блокирует транспорт груза из поздних эндосом в лизосомы, а также может приводить к накоплению груза в ранних эндосомах, т.е. ингибировать транспорт из ранних эндосом в поздние (Vonderheit, Helenius, 2005; Girard et al., 2014). Rab7 также координирует транспорт поздних эндосом по МТ. Известно, что Rab7 привлекает на мембрану поздних эндосом белок RILP (Rab Interacting Lysosomal Protein) (Cantalupo et al., 2001). RILP связывается на мембране поздних эндосом с Rab7, а также с динеин-динактиновым моторным комплексом, что способствует транспорту поздней эндосомы в околядерную область клетки (McDermott, Kim, 2015). Rab7 также взаимодействует со своим эффекторным белком FYCO1 (FYVE and coiled-coil domain containing 1), который образует комплекс с кинезином, обеспечивая возможность перемещения поздней эндосомы по направлению к периферической части клетки (Hytinen et al., 2013).

Rab7 также регулирует наличие PI3P-обогащенных доменов на мембране поздних эндосом, вызывая локальную активацию Vps34 (Stein et al., 2003). Было высказано предположение, согласно которому увеличение количества PI3P на мембране за счет работы Rab7 необходимо для привлечения PIKfyve (Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase), которая имеет FYVE домен (Stein et al., 2003). PIKfyve киназа определяет еще одно важное событие, происходящее в ходе созревания эндосом — конверсию фосфатидилинозитидов мембраны эндосом. PIKfyve фосфорилирует PI3P с образованием фосфатидилинозитол 3,5-бифосфата (PI(3,5)P₂), в результате чего количество PI3P на мембране эндосом уменьшается. Точное значение этого преобразование неизвестно,

однако считается, что PIKfyve может изменять активность Ca^{2+} -каналов эндосом и тем самым регулировать гомо- и гетеротипические слияния эндосом друг с другом и с лизосомами (McDermott, Kim, 2015).

Таким образом, аналогично малой ГТФазе Rab5 на ранних эндосомах, малая ГТФаза Rab7, работая на поздних эндосомах, регулирует основные этапы транспорта груза к месту его назначения.

Каков же механизм замены Rab5 на Rab7 в ходе созревания эндосом? В литературе существуют две основные гипотезы о механизмах этого процесса (Рис.4), однако вопрос остается до конца неразрешенным.

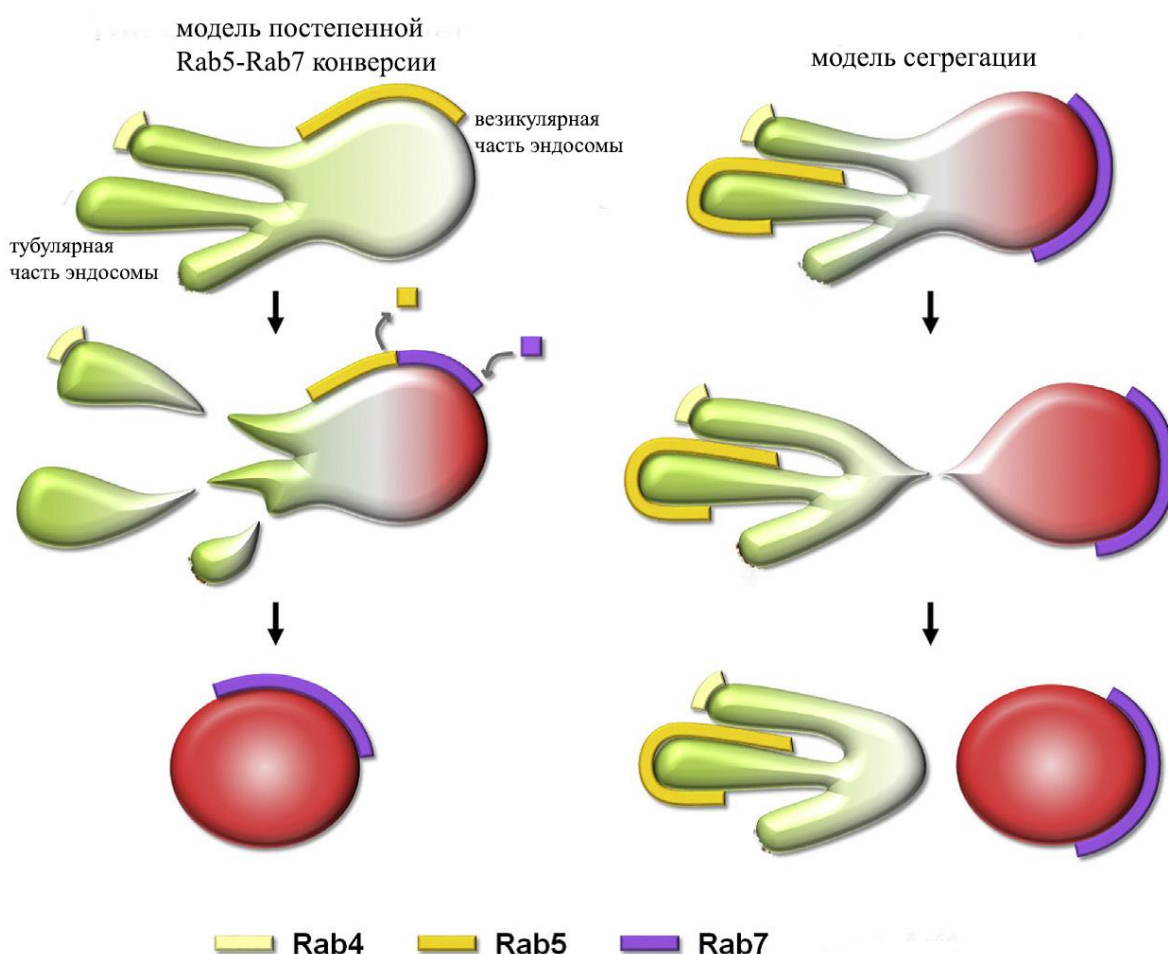


Рис. 4 Модели Rab5 - Rab7 конверсии (Из: McDermott, H., Kim, K., 2015).

Согласно первой гипотезе, Rab5 на мембране эндосом инактивируется вследствие гидролиза ГТФ на ГДФ и постепенно уходит с мембраны в цитоплазматический пул, заменяясь на Rab7, рекрутирующийся на мембрану эндосомы из цитоплазмы (Rink et al., 2005; Poteryaev et al., 2010). Эта модель основана на мониторинге эндоцитоза LDL в клетках млекопитающих в ходе прижизненной съемки. В этих клетках на ранних стадиях

эндоцитоза исследователи наблюдали накопление LDL в Rab5-позитивных структурах, после чего Rab5 сигнал постепенно исчезал, заменяясь на Rab7, при этом часть везикул на промежуточном этапе конверсии содержала как Rab5, так и Rab7. Экспрессия конститутивно активного Rab5 вызывала накопление в клетке эндосом, содержащих оба сигнала (Rink et al., 2005). Эта модель предполагает существование дополнительных факторов, которые регулируют замещение одной малой ГТФазы на другую. Такими факторами, как предполагается, является Sand1/Mon комплекс, который высоко консервативен и представлен от дрожжей до млекопитающих. Показано, что он убирает GEF Rab5 Rabex5 с эндосомальных мембран, а также связывается с Rab7 и тем самым привлекает Rab7 на мембрану эндосомы (Poteryaev et al., 2010; Yousefian et al., 2013). Также Sand1/Mon комплекс взаимодействует с VPS39, который служит GEF для Rab7 (Rink et al., 2005). Было также показано, что Sand1/Mon комплекс сам по себе является GEF для Rab7 ГТФазы (Nordmann et al., 2010) и активирует Rab7 на мембране эндосом (Yasuda et al., 2016).

Согласно второй гипотезе, в процессе созревания эндосомы замена Rab5 на Rab7 не происходит постепенно. Напротив, Rab7-положительный домен эндосомы, содержащий груз, полностью отделяется от Rab5-положительного домена, т.е. происходит процесс сегрегации доменов эндосом. Такой процесс наблюдался в клетках линии Vero в ходе эндоцитоза вируса леса Семлики (SFV, Semliki forest virus), который проникает в клетку классическим клатрин-опосредованным путем (Vonderheit, Helenius, 2005). В этих экспериментах Rab7-положительные везикулы, несущие груз, сегрегировали от эндосомы, положительной по Rab5, EEA1, Rab4 и Arf1. Было показано, что этот процесс зависит от микротрубочек, поскольку добавление разрушающего микротрубочки агента нокодазола приводило к накоплению в клетке эндосом, положительных по Rab5 и Rab7 (Vonderheit, Helenius, 2005).

1.5 Деградация компонентов клетки путем аутофагии. Взаимодействие аутофагии и эндоцитозного пути

Аутофагия – процесс, в ходе которого осуществляется лизосомальная деградация компонентов цитоплазмы. В отличие от деградации в протеасомах, при которой происходит расщепление короткоживущих белков, аутофагия вовлечена в процесс деградации долгоживущих белков, крупных белковых агрегатов и целых внутриклеточных органелл (Fader, Colombo, 2009). Процесс аутофагии инициируется при различных стрессовых воздействиях, а также в условиях недостатка питательных веществ, получаемых клеткой извне. Недостаток питательных веществ может быть вызван в том числе дефицитом компонентов сыворотки в среде для культивирования, а также дефицитом некоторых аминокислот (лейцина, тирозина, аланина, фенилаланина и др.) (Seglen et al., 1980).

Процесс образования фагосом условно разделяют на 3 стадии: инициация, нуклеация и элонгация и завершение синтеза мембраны аутофагосом (Пупышев и др., 2014). У дрожжей этот процесс изучен достаточно хорошо. Известно, что у них он регулируется эволюционно консервативной группой Atg белков. Основным регулятором процесса инициации аутофагии у млекопитающих является ULK комплекс (Atg 1 у дрожжей) (Akers et al., 2012). Белки ULK1 и ULK2 активируются при клеточном голодании и стрессе (McAlpine et al., 2013), что приводит к их рекрутированию на мембрану, из которой будет формироваться аутофагосома.

Источником фагосом принято считать ЭПР, но определенный вклад в формирование фагосом могут вносить также АГ, эндосомы, а также ПМ (Lamb et al., 2013a). ULK-1 зависящая сигнализация активирует Vps34, которая в комплексе с Beclin 1, AMBRA 1, Rubicon и некоторыми другими белками также рекрутируется на мембрану-донор (Lamb et al., 2013b). Vps34 создает на мембране участки, обогащенные PI3P. Следует отметить, что PI3P-области, созданные на мембранах при инициации аутофагии и в ходе эндоцитоза, узнаются различными эффекторами (Simonsen, Tooze, 2009). Создание PI3P-обогащенных участков приводит к рекрутированию дополнительных Atg белков и, в конце концов, к изоляции аутофагосомной мембраны от мембраны-донора в ходе нуклеации (Lamb et al., 2013b). Так, к формирующейся аутофагосомной мембране привлекается Atg12-Atg5-Atg16L1 комплекс. В то же самое время цитоплазматический белок LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) взаимодействует с Atg4, что приводит к расщеплению его С-концевой части с образованием LC3-I. Затем к LC3-I присоединяется фосфатидилэтаноламин, в результате чего LC3-II встраивается в

мембрану формирующейся аутофагосомы (Lamb et al., 2013b). Этот процесс называется в литературе LC3-конверсией. На данном этапе изолированная мембрана формирующейся аутофагосомы называется фагофором (Fader, Colombo, 2009). На конечном этапе формирования аутофагосомы Atg белки диссоциируют с мембраны, но LC3 белок остается встроен в нее. Фагофор смыкается, захватывая участок цитоплазмы, а концы фагофора сливаются друг с другом. В результате этого процесса формируется двумембранная везикула – аутофагосома. LC3 белки при этом оказываются во внутреннем пространстве аутофагосомы. Постоянная мембранная локализация LC3 позволяет их использовать в качестве надежного маркера аутофагосом (Fader, Colombo, 2009).

Аутофагия и эндоцитозный путь тесно взаимодействуют в клетке. Для того чтобы осуществить деградацию захваченного материала, аутофагосома сливается с лизосомами. Таким образом, лизосомы являются общим и необходимым компартментом эндоцитозного пути и аутофагии. Помимо этого, сформировавшаяся аутофагосома может претерпевать процесс дальнейшего созревания путем взаимодействия, в том числе, с компонентами эндоцитозного пути с образованием гибридных везикул – амфисом. Установлено, что аутофагосомы при определенных условиях (например, при клеточном голодании) могут сливаться с МВТ (Hyytinen et al., 2013). Так, на мембране аутофагосом может присутствовать маркер поздних эндосом Rab7 (Gutierrez et al., 2004). Предполагается, что Rab7 на мембране аутофагом регулирует процесс слияния аутофагосом с лизосомами, а также опосредует их транспорт по МТ, взаимодействуя с FYCO1 (Pankiv et al., 2010; Tooze et al., 2014). Также было высказано предположение о том, что определенный вклад в формирование аутофагосом могут вносить рециклирующие эндосомы. Так, ULK1 и Atg9 были найдены на мембране везикул, положительных по одному из маркеров рециклирующих эндосом Rab11 (Longatti et al., 2012).

Кроме того, было показано, что амфисомы могут быть обогащены EEA1 (Berg et al., 1998; Razi et al., 2009). Это позволяет предполагать, что аутофагосомы способны сливаться также с ранними эндосомами. Несмотря на то, что маркеры ранних и поздних эндосом обнаруживаются на мембране аутофагосом, соотношение амфисом/аутофагосом в клетках, не подвергнутых действию сильного стресса, обычно невелико (Berg et al., 1998). Таким образом, по-видимому, слияние аутофагосом с ранними и поздними эндосомами не является необходимым этапом для деградации содержимого аутофагосом в лизосомах.

1.6 Эндоцитоз рецептора эпидермального фактора роста как модель для изучения механизмов рецепторо-опосредованного эндоцитоза

Рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР) относится к erbB семейству тирозин-киназных рецепторов. Кроме РЭФР, который в литературе называется также с-erbB-1 или HER-1, в состав этого семейства входят ErbB-2 (HER2), ErbB-3 (HER3) и ErbB-4 (HER4). Рецептор эпидермального фактора роста представляет собой трансмембранный гликопротеид молекулярной массой порядка 170 кДа и имеет в своем составе 1186 аминокислотных остатков. РЭФР в значительной степени N-гликозилирован (Jorissen et al., 2003). В рецепторе выделяют экстраклеточный N-концевой участок, трансмембранный участок и цитоплазматический C-концевой участок. Экстраклеточный участок содержит четыре домена – L1, L2, CR1, CR2. Домены L1 и L2 по структуре представляют собой β -соленоид и формируют лиганд-связывающий карман. Цистеинбогатые CR1 и CR2 домены могут образовывать между собой дисульфидные связи и играют важную роль в димеризации рецептора (Шаназаров и др., 2009). Трансмембранный участок имеет форму α -спирали и продолжается в околосмембранный участок цитоплазматической части рецептора, выполняющий регуляторную функцию и имеющий сайты связывания с кальмодулином, протеинкиназой C и другими белками. Цитоплазматический участок несет также сайт связывания АТФ, а в C-концевой части имеются остатки тирозина. Протеинкиназная активность РЭФР проявляется в переносе γ -фосфата АТФ к остаткам тирозина рецептора (аутофосфорилирование) и фосфорилировании экзогенных субстратов (Jorissen et al., 2003).

В отсутствие связывания с лигандом рецептор ЭФР в норме находится на ПМ в виде мономера. Связывание с лигандом приводит к димеризации рецептора, активации его тирозинкиназной активности, фосфорилированию остатков тирозина и интернализации в клетку. Было показано, что связывание лиганда само по себе недостаточно для интернализации рецептора в клетку. Было также высказано предположение о том, что димеризация рецептора необходима и достаточна для запуска эндоцитоза РЭФР, поскольку ингибирование тирозинкиназной активности рецептора не блокирует интернализацию. Однако, отсутствие тирозинкиназной активности рецептора приводит к его рециклированию на ПМ, в то время как в норме ЭФР-рецепторные комплексы направляются на деградацию в лизосомы (Wang et al., 2005).

Важно отметить, что направление рецептора на путь деградации зависит и от лиганда, с которым связан рецептор. Помимо ЭФР, лигандами РЭФР могут быть TGF- α , ЭФР-подобный ростовой фактор, связывающий гепарин (HB-EGF), амфирегулин,

эпирегулин, эпиген и β -целлулин (Roepstorff et al., 2009). Так, связывание РЭФР с ЭФР приводит к преимущественной деградации лиганд-рецепторного комплекса, в то время как взаимодействие РЭФР с трансформирующим ростовым фактором α TGF- α вызывает рециклирование рецептора. Такой эффект связан с различной стабильностью лиганд-рецепторных комплексов в закисленном люмене ранней эндосомы. Комплекс TGF- α -РЭФР обладает меньшей стабильностью в данных условиях по сравнению с ЭФР-рецепторным комплексом. Это вызывает диссоциацию комплекса TGF- α и РЭФР, что приводит к де-убиквитинированию рецептора и его рециклированию (Roepstorff et al., 2009). Точно установлено, что РЭФР интернализуется в клетку клатрин-зависимым путем. В литературе высказывались также предположения о том, что РЭФР также может проникать в клетку макропиноцитозом (Kerr et al., 2006) или, при больших концентрациях ЭФР, через кавеолы (Sigismund et al., 2005). Однако, хотя РЭФР может локализоваться в кавеолах, активированный РЭФР не интернализуется в клетки из этих областей мембраны. Проникновение рецептора в клетку макропиноцитозом может быть характерной особенностью определенных клеточных линий или происходить при определенных физиологических условиях. Таким образом, в настоящее время нет никаких сомнений в том, что основным способом интернализации РЭФР является клатрин-зависимый путь (Grandal, Madhus, 2008). Согласно современным представлениям, РЭФР является основным регулятором собственного эндоцитозного пути. Как уже упоминалось ранее, считается, что РЭФР регулирует активность Rab5 в клетке (Barbieri et al., 2000; Lanzetti et al., 2000), которая организует основные этапы эндоцитозного пути. Один из сайтов фосфорилирования по тирозину (pY1045) С-концевой части рецептора является сайтом связывания убиквитинлигазы c-cbl, что позволяет рецептору приобрести мультиубиквитиновую метку для его последующей сортировки во внутренние пузырьки МВТ и направляет его на путь деградации в лизосомы.

Эндоцитоз РЭФР важен не только для регуляции его количества на ПМ, что обуславливает возможность клетки отвечать на стимулы в виде лигандов РЭФР, но и поддерживает активацию рецептора, что увеличивает время проведения сигнала. Фосфорилирование остатков тирозина РЭФР при его активации создает сайты, с которыми могут взаимодействовать различные сигнальные молекулы. Так, РЭФР может активировать компоненты MAP-киназного каскада путем взаимодействия фосфорилированных остатков тирозина рецептора с адапторным белком Grb2. Grb2 связывается с активированным РЭФР через свой SH2 домен, что приводит к активации G-белка Ras, MEK1 киназы и Erk1/2. Следует уточнить, что Grb2 является одним из основных, но не единственным активатором MAP-киназного каскада,

взаимодействующего с РЭФР (Prenzel et al., 2001). Помимо MAP-киназного каскада, РЭФР также стимулирует JAK- и STAT- зависимую сигнализацию и тирозин киназу c-Src, регулирующую пролиферативный потенциал клетки и организацию цитоскелета. Кроме того, РЭФР активирует фосфолипазу C γ и фосфолипазу D, регулируя тем самым метаболизм фосфолипидов в клетке и стимулируя синтез таких вторичных посредников, как 1,2-диацилглицерол и инозитол 1,3,5-трифосфат (Jorissen et al., 2003). Предполагается, что РЭФР привлекает на мембрану ранней эндосомы белки APPL1 и APPL2 (Adaptor protein containing PH domain, PTB domain and Leucine zipper motif). Помимо связывания с Rab5, APPL белки через свой PTB домен взаимодействуют напрямую с тирозинкиназным доменом РЭФР. Интернализация рецептора приводит к их диссоциации с мембраны эндосом в цитоплазматический пул и их транспорту в ядро клетки. В ядре APPL белки путем взаимодействия с гистонацетилазным комплексом способны ремодулировать структуру хроматина и регулировать экспрессию генов (Miaczynska et al., 2004).

Таким образом, эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов приводит к активации различных сигнальных путей в клетке, что позволяет РЭФР регулировать такие внутриклеточные процессы, как клеточная пролиферация, апоптоз, дифференцировка и миграция клеток. Из-за своей способности усиливать пролиферацию клеток, а также ингибировать апоптотические процессы РЭФР относят к про-онкогенам. Известно, что гиперэкспрессия РЭФР наблюдается в большей части трансформированных клеток и коррелирует с неблагоприятным прогнозом у пациентов. Все эти факты обуславливают необходимость детального изучения эндоцитоза РЭФР. В настоящее время эндоцитоз РЭФР является основной моделью для изучения механизмов рецепторо-опосредованного эндоцитоза.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Культивирование клеток

В работе использовали клетки карциномы шейки матки человека HeLa, которые были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде ДМЕМ (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭС) и 50 мкг/мл гентамицина (Пан Эко, Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В экспериментах по иммунофлуоресценции клетки культивировали в чашках Петри до достижения ими плотности 50-70 % монослоя на поверхности покровных стекол размером 10×10 мм. Для проведения прижизненных съемок клетки пересевали в закрывающиеся четырехлуночные слайд-камеры с тонким дном (Ibidi, Дания). Для инициации сывороточного голодания клетки переводили на среду, содержащую 0.25% ЭС и инкубировали их в данных условиях в течение 12 ч, если не указано иное.

2.2 Лиганды и их производные

В работе использовали мышиный ЭФР (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 12 нг/мл (2 нМ). В ряде экспериментов вместо рекомбинантного ЭФР применяли биотинилированный ЭФР (бЭФР) (Invitrogen, США) в той же концентрации, связывая его с флуоресцентной меткой. В качестве флуоресцентной метки использовали стрептавидин-связанный Cy3 (стр-Cy3, Invitrogen, США) или конъюгированные со стрептавидином квантовые точки (sav-Qds) с максимумом эмиссии 655 нм (Invitrogen, США). Квантовые точки представляют собой флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы диаметром 2-15 нм, имеют коровую часть (в нашем случае она представлена CdSe) и покрыты полимерной оболочкой. Квантовые точки отличаются высокой фотостабильностью, обладают широкой полосой возбуждения с максимумом в УФ области и узким спектром испускания, что позволяет их успешно комбинировать с другими флуорофорами в ходе экспериментов.

Для получения комплексов ЭФР-Qds и ЭФР-Cy3 бЭФР инкубировали в условиях *in vitro* в течение 30 мин, при комнатной t° и при постоянном покачивании, что позволяло осуществить связывание биотина со стрептавидином. Комплекс ЭФР-Cy3 получали, добавляя раствор бЭФР в концентрации 2 нМ к 30-кратному избытку стр-Cy3 для того,

чтобы избежать интернализации в клетки не меченного флуоресцентной меткой ЭФР. Для получения комплекса ЭФР-Qds раствор бЭФР в указанной концентрации добавляли к раствору sav-Qds в концентрации 1 нМ.

2.3 Стимуляция эндоцитоза

Эндоцитоз рецептора ЭФР стимулировали по двум схемам:

Предварительное связывание. Лиганд (ЭФР) инкубировали с клетками (предварительно охлажденными до 4° С) в среде ДМЕМ в течение 1 часа при 4°С для достижения равновесного связывания лиганда с рецепторами. После этого клетки 3 раза отмывали холодным раствором PBS от несвязавшегося лиганда. Эндоцитоз стимулировали добавлением к клеткам среды ДМЕМ, не содержащей лиганда, при 37°С на указанное время. Для визуализации в клетках меченого флуоресцентной меткой ЭФР к клеткам сначала добавляли бЭФР на 40 мин при 4°С. После трехкратной отмывки от несвязавшегося лиганда к клеткам добавляли раствор стр-Cy3 или sav-Qds в указанной выше концентрации на 20 мин при той же температуре. После отмывки от несвязавшихся Qds клетки так же переводили на среду, нагретую до 37°С. Данная схема позволила синхронизировать интернализацию ЭФР-рецепторных комплексов в клетки.

Импульсная загрузка лиганда. В соответствии с данной схемой лиганд добавляли к клеткам, культивируемым при 37°С, на 5 мин (импульс). После этого клетки 3-5 раз отмывали теплым раствором PBS от несвязавшегося лиганда и добавляли к ним среду ДМЕМ, нагретую до 37°С и не содержащую лиганда, на указанное время (время от момента добавления ЭФР к клеткам). Данная схема позволила исследовать динамику эндоцитоза в более физиологичных для клеток условиях, однако при этом интернализация лиганд-рецепторных комплексов в клетки происходила менее синхронно.

2.4 Плазмидные конструкции и трансфекция

В ряде экспериментов производили временную трансфекцию клеток плазмидными конструкциями. В работе были использованы следующие плазмиды: плазида, кодирующая EEA1 белок, слитый на N-конце с EGFP (EEA1-EGFP) была любезно предоставлена проф. Сильвия Корвера (# 42307, Addgene, США) (Lawe et al., 2000); плазида Rab5a-pmCherryC1 была любезно предоставлена Кристьеном Мэррифилдом (# 27679, Addgene, США) (Taylor et al., 2011); плазида Rab7-DsRed была любезно предоставлена Ричардом Пагано (# 12661, Addgene, США) (Choudhury et al., 2002).

Трансфекцию проводили с использованием реагента липофектамина 3000 (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя. Одновременно с липофектамино к клеткам добавляли суммарно 0.5 мкг плазмидной ДНК на $1,5 \times 10^5$ клеток. В случае ко-трансфекции клеток двумя плазмидами плазмидная ДНК добавлялась к клеткам в соотношении 2:1 (при ко-трансфекции плазмидами EEA1-EGFP и Rab5a-pmCherryC1/Rab7-DsRed) или 1:1 (при ко-трансфекции Rab5-pmCherryC1 и Rab7-DsRed) от суммарного количества плазмидной ДНК. Количество добавляемой плазмидной ДНК подбиралось экспериментально. Эксперименты проводили через 48 ч после добавления к клеткам плазмидных конструкций.

2.5 Мечение плазматической мембраны липидом DPPE

Для того чтобы визуализировать плазматические мембраны клеток, к клеткам добавляли липосомы, состоящие из связанного с флуоресцентным красителем родамином В липида 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, (DPPE, Avanti Polar Lipids, США), который был любезно предоставлен к.б.н. О.С. Остроумовой (Институт цитологии РАН). Для этого липид, предварительно растворенный в хлороформе, разводили в теплой среде для прижизненной съемки FluoroBrite DMEM media (Life Technologies, США) до достижения концентрации 20 мкг/мл. Липосомы формировали методом ультразвуковой соникации (37 кГц, 10 мин). Среду, содержащую липосомы, добавляли к клеткам на 5 мин, после чего клетки 5-7 раз промывали раствором PBS и методом прижизненной микроскопии наблюдали интернализацию участков плазматической мембраны в клетки в течение 10 мин-1,5 ч после добавления липида.

2.6. Обработка клеток ингибиторами

Для подавления жидкофазного эндоцитоза использовали 66 мкМ 5-(N,N)-гексаметиленамилорид (Sigma-Aldrich, США). Ингибитор динамина динасор (Sigma-Aldrich, США) применяли в концентрации 80 мкМ. Динасор добавляли к клеткам в среде DMEM на 6 ч для подавления динамин-зависимого эндоцитоза. Для подавления одновременно динамин-зависимого и жидкофазного эндоцитоза динасор добавляли вместе с 5-(N,N)-гексаметиленамилоридом и проводили инкубацию клеток в этой среде также в течение 6 ч. Подавление биосинтетического пути в клетках осуществляли, культивируя клетки в течение 6 ч и 24 ч в присутствии 10 мг/мл брефельдина А (ICN Biomedicals, США). Содержащую ингибиторы среду заменяли каждые 3 ч при 6 ч

инкубации с ингибиторами и 4-5 раз при 24 ч инкубации с брефельдином А для обеспечения эффективного действия ингибиторов. Все дальнейшие инкубации при стимуляции эндоцитоза проводили также при постоянном присутствии ингибиторов. Поскольку стоковые растворы указанных ингибиторов содержали DMSO, к контрольным клеткам, культивируемым в среде ДМЕМ без добавления ингибиторов, добавляли аналогичный объем DMSO для того, чтобы исключить вклад DMSO в получаемые результаты.

В экспериментах по изучению механизмов сегрегации EEA1- и РЭФР-положительных везикул динасор добавляли в указанной выше концентрации через 5 мин после стимуляции эндоцитоза. Ингибитор Atp2/3 комплекса СК666, любезно предоставленный д.б.н. А.Ю. Александровой (Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина, г. Москва) применяли в концентрации 100 мкМ и также добавляли его к клеткам через 5 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.

2.7 Электрофорез и иммуноблоттинг

2.7.1 Приготовление проб для электрофоретического разделения

Выделение мембранной фракции К клеткам добавляли ЭФР по схеме предварительного связывания, а через 15, 30, 60, 90 мин после стимуляции эндоцитоза методом ультрацентрифугирования выделяли мембранную фракцию клеток. Для этого к клеткам добавляли буфер ТЭС, рН=6,0 (20 мМ триэтаноламингидрохлорид; 0,25 М сахара; 1мМ ЭДТА), соскребали их раббером в эппендорф, пропускали 15-20 раз через иглу шприца и центрифугировали 15 мин при 10 000g для осаждения неразрушенных клеток, ядер и митохондрий. Затем супернатант центрифугировали при 100 000 g, 30 мин, для осаждения мембранной фракции клеток.

Обработка клеток дигитонином Клетки, эндоцитоз в которых стимулировали по схеме предварительного связывания в течение 30 мин, а также контрольные клетки, в которых эндоцитоз не стимулировали, подвергали обработке раствором PBS, содержащим неионный детергент дигитонин (Serva Electrophoresis, Германия) в концентрации 45 мкг/мл. Клетки инкубировали в растворе дигитонина в течение 10 мин при 4°C при постоянном помешивании на качалке. После этого клетки промывали 3 раза холодным PBS.

К пробам мембранной фракции клеток и к клеткам, обработанным дигитонином, добавляли лизирующий буфер (20 мМ Tris-HCl; 1% тритон X-100; 150 мМ NaCl; 1мМ ЭДТА; 1мМ ЭГТА). К лизирующему буферу добавляли также коктейль ингибиторов протеаз (1:300, Sigma, США) и 1мМ ортованадата натрия (NaVO_4). Затем пробы центрифугировали в течение 7 мин при 1500 g и добавляли к супернатанту 1/5 буфера для проб (10% SDS; 0,3М Tris-HCl (pH=6.8); 20% 2-меркаптоэтанол; 50% глицерин; 0.02% бромфеноловый синий).

2.7.2 Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Образцы, полученные при выделении мембранных фракций клеток и при обработке клеток раствором дигитонина, подвергали электрофоретическому разделению в 7.5% и 12.5%-ных полиакриламидных гелях в присутствии додецилсульфата натрия в модификации Лэммли (Laemmli, 1970). В форезные камеры добавляли Tris-глициновый электродный буфер (200 мМ глицин; 30 мМ Tris-HCl; 0,1 % SDS), pH=8.3. Разделение белков в геле проводили при постоянной силе тока 30 мА в течение 2-3 ч.

2.7.4 Иммуноблоттинг

Для проведения иммуноблоттинга использовали камеру для влажного переноса Bio-Rad (США). Белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) при силе тока 300 мА в присутствии Tris-глицинового буфера (50мМ Tris-HCl; 40 мМ глицин; 0,1% SDS, 17% метанол) в течение 1 час. Иммуноблоттинг проводили в соответствии с методикой ECL Western Blotting protocol (Amersham, Швеция). После переноса на нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в соответствии с инструкцией производителя в реагенте Pierce Western Blot Signal Enhancer (Thermo Scientific, США) для усиления сигнала. Затем мембрану промывали 5 раз по 5 мин буфером TTBS (20 мМ Tris-HCl; 150мМ NaCl; 0,1% Tween-20), pH=7.6 и помещали в блокирующий буфер, содержащий 5% сухое обезжиренное молоко, растворенное в TTBS. После этого мембрану инкубировали в растворе первичных антител, разведенных в буфере TTBS, содержащем 5% молоко. Время инкубации с первичными антителами варьировало от 1 ч до ночи в зависимости от используемых антител. В работе использовали следующие первичные антитела: моноклональные мышинные (mAb) антитела против белка EEA1 (Transduction Lab, США), разведенные в соотношении 1:1000 (инкубация в течение ночи, 4 °C); поликлональные антитела кролика (rAb) к

глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) (Cell Signaling, 1:1000, инкубация в течение ночи, 4 °C); поликлональные кроличьи антитела к цитоплазматическому домену рецептора ЭФР человека (rAb, Cell Signaling, США, 1:1000, ночь, 4 °C); антитела к фосфотирозин-содержащим белкам (1:500, ночь, 4°C, Santa Cruz Biotechnology, США). GAPDH использовали как маркер присутствия в пробах цитоплазматических белков.

После инкубации с первичными антителами нитроцеллюлозную мембрану 5 раз по 5 мин отмывали от не связавшихся антител в буфере TTBS и помещали ее в раствор 5%-го молока, приготовленного на TTBS, содержащего вторичные антитела (разведение 1:10 000), конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP). Мембрану инкубировали в данном растворе в течение 1 ч при t° комн. В качестве вторичных антител использовали козы антитела против иммуноглобулинов мыши (GAM-HRP, Cell Signaling, США) или кролика (GAR-HRP, Cell Signaling, США). Хемилюминесценцию вторичных антител выявляли с помощью системы ECL SuperSignal West Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, США). Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в растворе ECL в течение 1 мин и регистрировали хемилюминесценцию экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция).

2.8 Двойное не прямое иммунофлюоресцентное окрашивание клеток

Клетки фиксировали 4% раствором формалина (ICN Biomedicals, США), приготовленным на PBS при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем стекла с клетками промывали PBS 5 раз по 5 мин, после чего клетки пермеабелизовали раствором 0.5% тритона X-100 (Merck, Германия) в PBS (15 мин). При использовании в качестве флюоресцентной метки Qds пермеабелизацию проводили в 0.05% растворе Brij56 (Sigma-Aldrich, США) в PBS в течение этого же времени. Неспецифическое окрашивание блокировали инкубацией клеток в течение 30 мин при комнатной температуре в растворе PBS, содержащем 1% бычий сывороточный альбумин (БСА, BioWest, Франция). После этого клетки инкубировали с первичными антителами, растворенными в PBS с добавлением 1% БСА. В работе в ходе иммунофлюоресцентного окрашивания использовали следующие первичные антитела: моноклональные мышинные антитела против белка EEA1 (Transduction Lab, США), разведенные в соотношении 1:200 (инкубация 1 ч, t° комн.); поликлональные кроличьи антитела, узнающие белок LC3 (его цитозольную и ассоциированную с мембранами фракцию) (1:300, инкубация в течение ночи, 4°C; MBL, Япония); моноклональные антитела против маркера транс-сети аппарата Гольджи p230 (1:150, ночь, 4°C; Transduction Lab, США); кроличьи антитела, узнающие

цитоплазматический домен рецептора ЭФР человека (ночь, 4 °C; Cell Signaling, США) в разведении 1:100; поликлональные антитела против Rab5 (1:100; ночь, 4°C, Cell Signalling, США) и поликлональные кроличьи антитела против кортактина (1:50, ночь, 4°C, Santa Cruz Biotechnology, США). Затем клетки промывали 5 раз по 5 мин раствором PBS и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с раствором соответствующих вторичных антител GAR-Alexa Fluor 568 (1:200; Molecular Probes, США) или GAM-Alexa Fluor 488 (1:200; Molecular Probes, США). Вторичные антитела разводили в растворе PBS, содержащем 1 % БСА. Препараты заключали в глицериновую среду, содержащую 0.2 М DABCO (1,4 диазабицикло[2.2.2] октан) (Sigma-Aldrich, США).

2.9 Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Распределение флуоресцентно меченых белков в клетке изучали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия), используя масляный объектив HCX PL APO CS с увеличением 40×. Флуоресценцию на разных длинах волн сканировали отдельно с помощью программы Leica Confocal Software. Снимали 3-5 полей зрения в режиме XYZ, получая серию оптических срезов клеток с шагом по оси Z 0.5 мкм и разрешением кадра 1024x1024 пикселей; диаметр конфокальной диафрагмы (pinhole) составлял 1.4 единицы Эйри. Флуоресценцию Alexa Fluor 488 (диапазон детекции 500-560 нм), EGFP (диапазон детекции 490-530 нм) возбуждали аргоновым лазером (488 нм). Флуоресценцию Alexa Fluor 568 (диапазон детекции 580-660 нм), Cy3 (диапазон детекции 570-650 нм), dsRed (диапазон детекции 550-610 нм), mCherry (диапазон детекции 560-610 нм), родамина В (Rhod B, диапазон детекции 560-590 нм) возбуждали He-Ne лазером (543 нм); флуоресценцию Qds655 (диапазон детекции 610-690 нм) возбуждали 405 лазером.

Прижизненные наблюдения проводили в режиме ХУТ с использованием термостатируемой камеры, в которой поддерживалась температура 37°C. Выбирали следующие параметры съемки: разрешение кадров – 1024x1024 пикселей; частота сканирования – 400-700 Гц; частота кадров – 1.5-4.9 с. Использовали бесцветную среду (не содержащую феноловый красный) для прижизненной съемки FluoroBrite DMEM media (Life Technologies, США). Фокальную плоскость съемки выбирали в нижней трети клетки (ниже ядра), где локализована основная масса эндосом.

2.10 Восстановление флуоресценции после фотовыжигания (FRAP)

Эксперименты по восстановлению флуоресценции после фотовыжигания проводили с помощью указанного выше лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 в режиме XYT.

Выбирали разрешение 512x512 пикселей, частота сканирования составляла 400 Гц, диаметр конфокальной диафрагмы – 4 единицы Эйри. Круговая область диаметром 4 мкм (что примерно в 2 раза превосходит диаметр везикул) подвергалась фотовыжиганию (рис. 5, А). Фотовыжигание флуоресценции EGFP-EEA1 производилось 5-кратным сканированием выбранной области аргоновым лазером с 50% мощностью. После этого восстановление флуоресценции в выжигаемой области детектировали, сканируя эту область в течение 150 кадров и уменьшив мощность аргонового лазера до 1.5% для минимизации выгорания флюорофора. Временной интервал между кадрами в ходе мониторинга восстановления флуоресценции составлял 0.7 с.

Данные по восстановлению флуоресценции EGFP-EEA1 после фотовыжигания анализировали следующим образом. В расчет брали те EEA1-везикулы, которые оставались в поле зрения, а также не сливались с другими везикулами и не разделялись в течение 50-150 кадров. Полученные данные по интенсивности флуоресценции EGFP нормировали на выгорание флюорофора, случайные колебания мощности лазера, и степень выжигания как описано в статье (Ellenberg et al., 1997). Интенсивность исследуемой области (везикулы) до фотовыжигания принимали за 1 и нормировали интенсивности флуоресценции после выжигания относительно этого значения в диапазоне от 0 до 1. Модельный график восстановления флуоресценции после фотовыжигания представлен на рис. 5, Б. Полученные кривые восстановления флуоресценции после фотовыжигания сравнивали с экспоненциальными уравнениями однофазного (1) и двухфазного (2) восстановления флуоресценции (Sprague et al., 2005; Reits et al., 2001), рассчитывая коэффициент детерминации R^2 .

$$I = 1 - Ae^{-k_{off}t} \quad (1) \quad \text{и} \quad I = 1 - A_1e^{-k_{off}1t} - A_2e^{-k_{off}2t} \quad (2),$$

где t – время после выжигания, с; I – интенсивность флуоресценции в момент времени t ; k_{off} – константа диссоциации.

Затем в соответствии со значением коэффициента детерминации выбирали то экспоненциальное уравнение, которое лучше описывает данные (с большим значением R^2). Из выбранного уравнения рассчитывали время полувосстановления флуоресценции (recovery half-time, t_h) (3) и долю мобильной фракции (mobile fraction, M_f) (4) (Sprague et al., 2005; Reits et al., 2001).

$$(3) \quad \text{и} \quad Mf = \frac{I_{\infty} - I_a}{1 - I_a} \quad (4),$$

где I_{∞} – нормализованная интенсивность флюоресценции после полного восстановления; I_a – нормализованная интенсивность флюоресценции в первом кадре после выжигания.

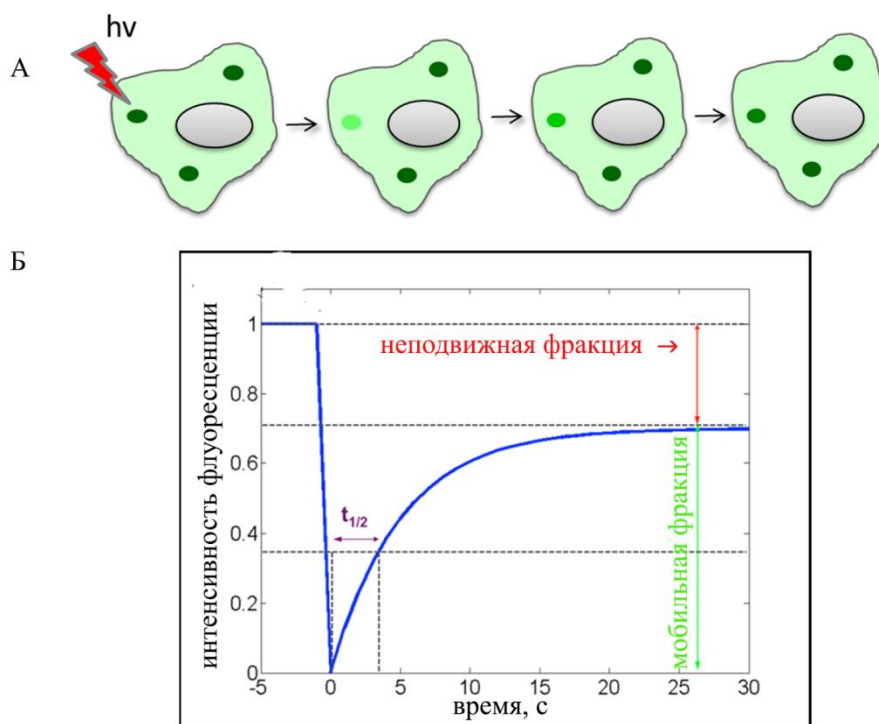


Рис. 5 Иллюстрация метода восстановления флюоресценции после фотовыжигания (FRAP).

А- схематичное изображение клетки с EEA1-везикулами. Модель показывает, что подвергалась фотовыжиганию ($h\nu$) одиночная EEA1-везикула. Б-Модельный график восстановления флуоресценции. Начальная флуоресценция объекта до фотовыжигания принята за 1. 0 - нормализованная интенсивность флуоресценции объекта на 1-м кадре после фотовыжигания. На графике отмечены мобильная и неподвижная фракции, а также время полувосстановления флуоресценции ($t_{1/2}$) (По: Chew.T-L., 2014).

2.11 Анализ и обработка изображений

Полученные изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ 1.48v (National Institute of Health, США). В ряде экспериментов с использованием клеток, трансфицированных Rab7-DsRed, или иммунофлуоресцентным мечением кортактина серия оптических срезов была подвергнута деконволюции с использованием плагина

Iterative Deconvolve 3D (Dougherty, 2005). Для получения функции распределения точки (point spread function – PSF) использовали плагин Diffraction PSF 3D.

Оценку количества везикул на клетку и вычисление их средних кажущихся размеров проводили на основе максимальных проекций оптических срезов по оси Z, представленных в 32-битном формате, по следующему алгоритму. Анализируемое изображение калибровали по размеру с использованием функции «Set Scale». Сегментацию проводили, как описано ранее, с некоторыми модификациями (Dunn et al., 2011). На изображении выделяли область, соответствующую интересующей нас клетке. На дубликате изображения применяли медианный фильтр с радиусом 6 для зеленого канала и 10 для красного, значения которого были подобраны экспериментально, и полученное изображение вычитали из исходного. В результате разница между краем везикулы и участком фона, граничащим с везикулой, была больше, чем в исходном изображении. Это позволяло избежать искусственного увеличения размеров везикул при получении бинаризованного изображения. Затем на полученном изображении выставляли пороговое значение интенсивности, исходя из максимального соответствия между исходным и бинаризованным изображением. С помощью функции «Analyze Particles» получали выделения (ROI), соответствующие везикулам, площадь которых была более 20000 нм^2 , что соответствует минимальному размеру объекта, который можно детектировать с помощью световой микроскопии. Полученные выделения затем переносились на исходное изображение и использовались для измерения на нем параметров везикул.

Для оценки колокализации выбирали одиночные оптические срезы в нижней трети клетки (ниже ядра), где локализована основная масса эндосом, и проводили аналогичную процедуру сегментации. В большинстве экспериментов использовали плагин JACoP для программы Image J (Bolte, Cordeliers, 2006), оценивая колокализацию двух сигналов с помощью коэффициентов Мандерса M1 и M2. Коэффициент M1 отражает суммарную интенсивность сигнала пикселей первого (красного) канала, содержащих и второй сигнал, по отношению к суммарной интенсивности сигналов всех пикселей первого канала. Коэффициент M2 отражает суммарную интенсивность сигнала пикселей второго (зеленого) канала, содержащих и сигнал первого канала, по отношению к суммарной интенсивности сигналов всех пикселей второго канала (Manders et al., 1993).

В ряде экспериментов, когда требовалось рассчитать степень колокализации одновременно трех сигналов, колокализацию оценивали по объектам. Степень колокализации оценивали, попарно сравнивая распределение сигнала каждого из каналов с сигналами двух других каналов. При этом подсчитывалась количество объектов в

бинаризованной маске первого канала, которые частично или полностью перекрываются с объектами в бинаризованной маске второго канала. Для этого выделенные границы объектов (ROI) одного из каналов копировали в бинаризованную маску другого. За тройную колокализацию принимали наличие перекрытия одного канала в объекте одновременно с сигналами двух других каналов.

2.12 Статистическая обработка данных

Для каждого варианта (временной точки) эксперимента анализировали 15--30 клеток. Каждый эксперимент проводили не менее трех раз. Анализ данных производили в программе SPSS statistics 19 (IBM, США), используя U-критерий Манна-Уитни. Результаты считали достоверными при $P < 0.05$. Данные представлены в виде ящичной диаграммы с указанием медианы, нижнего и верхнего квартилей, минимального и максимального значения.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Количество белка EEA1 в мембранной фракции клеток не изменяется при стимуляции в клетках эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов

Ранее в нашей лаборатории методом иммунофлуоресцентной микроскопии мы показали, что белок EEA1 выявляется в клетках, культивируемых в условиях недостатка сывороточных факторов в течение 12 ч, преимущественно на мембране везикул при минимальной локализации в цитоплазме. При добавлении ЭФР к этим клеткам на фиксированных препаратах на ранних этапах эндоцитоза наблюдаются гибридные везикулы, состоящие из EEA1- и ЭФР-положительных доменов. Было продемонстрировано, что в ходе эндоцитоза гибридные везикулы увеличиваются в размерах и формируют агрегаты, а на поздних этапах обнаруживаются отдельные EEA1- и ЭФР-содержащие везикулы. При этом стимуляция эндоцитоза не приводит к существенному увеличению количества EEA1-везикул в клетках. Таким образом, можно предположить, что EEA1-везикулы предсуществуют в клетках и проходят определенный «цикл» взаимодействия с ЭФР-содержащими везикулами, после чего восстанавливаются путем высвобождения EEA1-положительного домена из состава гибридных везикул. Однако это предположение требует доказательств.

Данные иммунофлуоресценции указывают на то, что EEA1 белок локализуется на мембране везикул постоянно вне зависимости от стимуляции эндоцитоза. Однако, в соответствии с общепринятой гипотезой, EEA1-везикулы образуются за счет рекрутирования EEA1 из цитоплазмы на поверхность интернализованных с ПМ транспортных везикул, несущих груз, что противоречит высказанному нами ранее предположению. Для разрешения этих противоречий, в первую очередь, мы оценили степень ассоциации EEA1 с внутриклеточными мембранами на различных этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Для решения этой задачи использовали два подхода: выделение мембранных фракций и экстракция цитоплазматических белков из клетки при пермеабиллизации плазматической мембраны.

Выделение мембранных фракций клеток проводили методом ультрацентрифугирования. В клетках запускали эндоцитоз РЭФР по схеме предварительного связывания лиганда, после чего определяли количество белка EEA1 в мембранных фракциях методом иммуноблоттинга в контроле и через 15, 30 и 60 мин после стимуляции эндоцитоза (рис. 6). В качестве контроля в данном опыте и в дальнейших экспериментах использовали клетки, которые предварительно

культивировали в среде с низким содержанием сыворотки (0,25%), что позволяет удалить из среды содержащиеся в ней ростовые факторы и минимизировать в клетках процесс эндоцитоза.

Для проверки наличия в мембранных фракциях примеси цитозоля пробы окрашивали антителами против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Как видно на рис. 6, GAPDH выявлялся лишь в пробах тотального лизата, но не в мембранных фракциях клеток. Для подтверждения эффективности индукции ЭФР-зависимого эндоцитоза в клетках, из которых были выделены мембранные фракции, бэнды, соответствующие молекулярной массе РЭФР 170 кДа, окрашивали антителами к фосфотирозин-содержащим белкам (pY). Увеличение фосфорилирования по тирозину белков данного размера отмечалось в стимулированных добавлением ЭФР клетках при 4°C (+ЭФР, 4°C), а также через 15, 30 и 60 мин после перевода таких клеток в физиологически оптимальные условия (+37°C). Учитывая тот факт, что РЭФР является мажорным белком данной молекулярной массы, содержащим сайты фосфорилирования по тирозину, наиболее вероятно, что увеличение сигнала от фосфотирозина в области 170 кДа обусловлено увеличением уровня фосфорилирования РЭФР. Оценив количество белка EEA1 в мембранных фракциях клеток, мы обнаружили, что оно существенно не изменялось как в ходе эндоцитоза, так и по сравнению с контрольными клетками (–ЭФР) (рис. 6).

Для подтверждения полученных данных мы оценили количество EEA1 белка в клетках, из которых предварительно экстрагировали цитоплазматические белки путем пермеабиллизации ПМ. В клетках стимулировали эндоцитоз РЭФР по схеме предварительного связывания лиганда. Затем как стимулированные, так и нестимулированные клетки инкубировали в течение 10 мин в растворе дигитонина, который селективно пермеабиллизует ПМ, не повреждая внутриклеточные мембранные структуры. Полученные пробы анализировали методом белкового электрофореза и иммуоблоттинга. Как видно на рис. 7, в пробах, полученных из обработанных дигитонином клеток, отсутствовал GAPDH, что указывает на успешное экстрагирование из клеток цитозоля.

В препаратах, полученных из стимулированных добавлением ЭФР клеток (как обработанных, так и не обработанных дигитонином), выявлялись фосфотирозин-содержащие белки молекулярной массы 170 кДа, что косвенно указывает на стимуляцию эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов вследствие добавления ЭФР. Количество белка EEA1 в лизате обработанных дигитонином клеток, стимулированных и нестимулированных добавлением ЭФР, было примерно одинаковым (рис. 7).

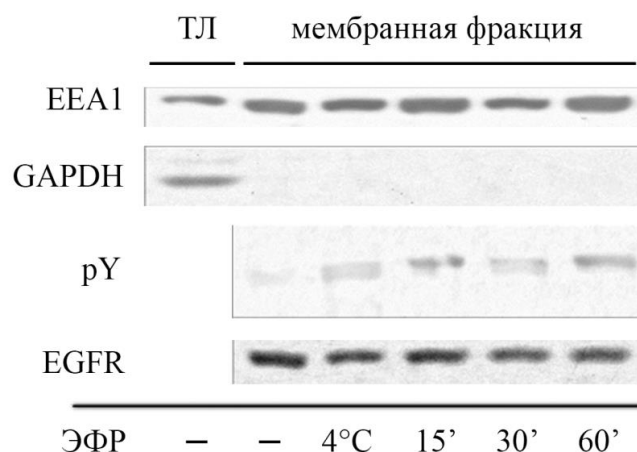


Рис. 6 Выявление белка EEA1 в мембранных фракциях клеток методом иммуноблоттинга

Методом ультрацентрифугирования выделяли мембранные фракции нестимулированных добавлением ЭФР клеток (-ЭФР), при добавлении ЭФР при 4°C (+ЭФР, 4°C) и через 15, 30, 60 мин после перевода стимулированных ЭФР клеток в физиологически оптимальные условия (+37°C). Количество EEA1, GAPDH, EGFR и фосфотирозинсодержащих белков на уровне 170 кДа (pY) оценивали методом иммуноблоттинга. В качестве контроля специфичности антител к GAPDH ими окрашивали также пробы тотального лизата (ТЛ) нестимулированных добавлением ЭФР клеток.

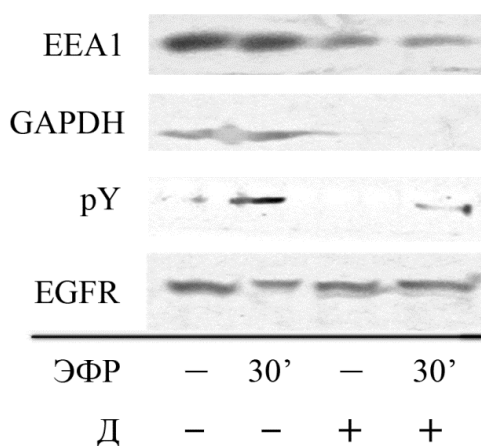


Рис. 7 Выявление белка EEA1 в клетках, обработанных детергентом дигитонином

Клетки, нестимулированные добавлением ЭФР (-ЭФР) или через 30 мин после добавления ЭФР (ЭФР, 30'), подвергали обработке детергентом дигитонином (Д). После этого методом иммуноблоттинга оценивали количество EEA1, GAPDH, EGFR и фосфотирозинсодержащих белков на уровне 170 кДа (pY) в этих клетках. Эти белки выявляли также в тотальном лизате нестимулированных и стимулированных в течение 30 мин добавлением ЭФР клеток (30'), не обработанных детергентом (-Д).

Следует отметить, что в пробах, полученных из обработанных дигитонином клеток, количество белка EEA1 было меньше, чем в пробах тотального лизата (клетки, не обработанные дигитонином), что указывает на экстрагирование части EEA1 белка из

клеток под действием дигитонина, а также позволяет предполагать наличие в клетках цитоплазматического пула EEA1 белка.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что количество белка EEA1, связанного с мембранами везикул, остается постоянным вне зависимости от того, стимулирован ли в клетках эндоцитоз РЭФР, или эндоцитозная активность в них снижена.

3.2 Исследование динамики ассоциации белка EEA1 с мембранами везикул в клетках, стимулированных и нестимулированных добавлением ЭФР

В соответствии с имеющимися данными, EEA1 взаимодействует с мембраной везикул за счет периферического связывания с Rab5 и PI3P. Очевидно, что афинность этих взаимодействий должна определять динамику его ассоциации/диссоциации с мембраной. Однако, неизвестно, как влияет стимуляция эндоцитоза на процесс обмена молекул EEA1 на мембране. К сожалению, подобного рода исследований до сих пор не проводилось. Для того, чтобы описать эту динамику, мы провели эксперименты по восстановлению флюоресценции после фотовыжигания (Fluorescent recovery after photobleaching, FRAP) EEA1-EGFP сигнала, выявляемого на EEA1-везикулах в контрольных клетках и в клетках после стимуляции в них эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.

Для проведения прижизненных наблюдений мы произвели временную трансфекцию клеток HeLa плазмидой, кодирующей раннеэндосомальный аутоантиген EEA1, слитый на N-конце с флюоресцентным белком EGFP (EEA1-EGFP). Через 48 ч после трансфекции около 30% клеток экспрессировали плазмиду EEA1-EGFP, однако степень экспрессии была различной. В ходе дальнейших прижизненных исследований мы выбирали клетки со средним уровнем экспрессии EEA1-EGFP плазмиды, что позволяло отчетливо визуализировать EEA1-везикулы. В этих клетках при стимуляции эндоцитоза наблюдались транспортные везикулы, несущие ЭФР, и видимых нарушений транспорта ЭФР-рецепторных комплексов выявлено не было. Далее, сравнив распределение в одних и тех же клетках EEA1-EGFP сигнала и белка EEA1, выявляемого с помощью антител, мы проверили, соответствуют ли структуры, обнаруживаемые с помощью данной плазмидной конструкции, EEA1-положительным везикулам (Рис. 8). Как видно на рис. 8, флюоресцентные сигналы распределены в клетке схожим образом. Ранее мы показали, что в клетках выявляются две популяции EEA1-везикул, различающиеся по количеству ассоциированного с ними EEA1 белка – яркие (обильно декорированные EEA1) и тусклые (слабо декорированные) (Злобина и др., 2014). Мы заметили, что, в то время как яркие

EEA1-везикулы содержат оба флюоресцентных сигнала, лишь около половины тусклых EEA1-везикул выявляются с помощью плазмидной конструкции (Рис. 8). Таким образом, в ходе прижизненных наблюдений мы анализировали поведение в основном ярких EEA1-везикул.

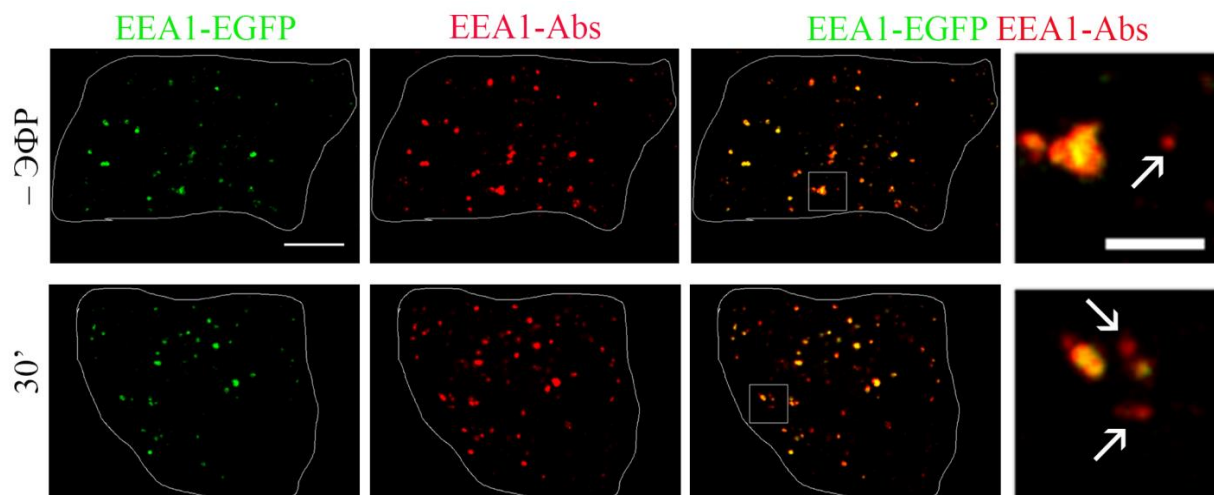


Рис. 8 Характеристика EEA1-положительных везикул, выявляемых в клетках линии *HeLa*, трансфицированных плазмидой, кодирующей EGFP-EEA1

Иммунофлуоресценция. Конфокальная микроскопия. Клетки, трансфицированные плазмидой, кодирующей EEA1-EGFP (зеленый), культивировали 12 ч в условиях дефицита сыворотки (-ЭФР, верхний ряд) и стимулировали в них эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов в течение 30 мин (30', нижний ряд). После этого клетки фиксировали и окрашивали антителами против белка EEA1 (EEA1-Abs, красный). Стрелками обозначены EEA1-положительные везикулы, выявляемые с помощью антител, но не EEA1-EGFP плазмиды. Представлены одиночные оптические срезы клеток. Масштаб: 10 мкм (изображения целых клеток); 3 мкм (изображения выделенного участка клетки).

Перед проведением экспериментов по фотовыжиганию мы охарактеризовали поведение EEA1-везикул в живых клетках. Для этого мы проследили за перемещением и преобразованиями более 100 везикул в контрольных и стимулированных добавлением ЭФР клетках. А именно, мы оценили долю EEA1-везикул, претерпевших слияние, разделение или вышедших из фокуса в течение 2 мин наблюдения (рис. 9). Мы обнаружили, что примерно третья часть из наблюдаемых EEA1-везикул переместилась по оси Z и вышла из фокуса как в контрольных (27%), так и в стимулированных добавлением ЭФР (26.9%) клетках. Доля везикул, претерпевших слияние друг с другом в течение данного промежутка времени, была несколько выше в клетках, эндоцитоз в которых был индуцирован добавлением ЭФР (32.7%), по сравнению с контрольными клетками (23.5%). Интересно, что значительная доля везикул как в контрольных (38.3%), так и в ЭФР-стимулированных клетках (28.7%) претерпевала процесс разделения (дробления). Таким

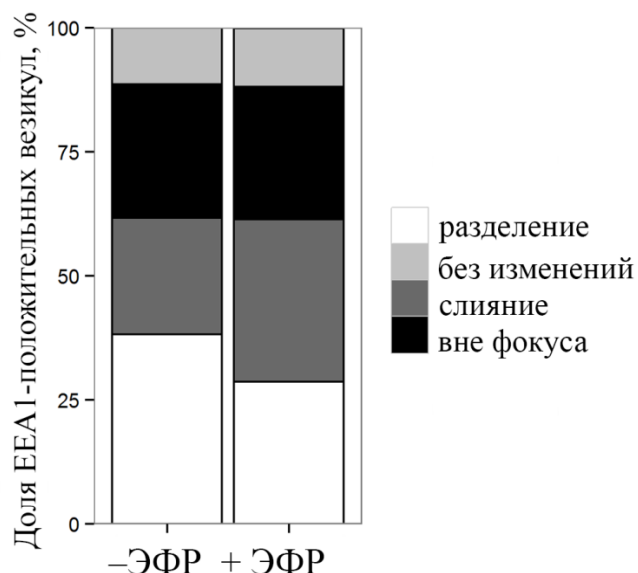


Рис. 9 Оценка частоты событий слияния и разделения EEA1-везикул в нестимулированных (-ЭФР) и стимулированных (+ЭФР) добавлением ЭФР клетках

В клетках, трансфицированных плазмидой EEA1-EGFP, производили мониторинг EEA1-везикул в течение 2 мин в ходе прижизненной съемки. Оценивали долю EEA1-везикул, претерпевших слияние, разделение, вышедших из фокуса (вне фокуса) или не претерпевших данных изменений (без изменений) за время наблюдения.

образом, лишь 11.3% EEA1-положительных везикул в контрольных и 11.9% в ЭФР-стимулированных клетках не выходило из фокуса и не претерпевало слияний или разделений в течение 2 мин наблюдения. Поскольку анализ методом FRAP требует точного измерения интенсивности флуоресценции объекта, а наблюдаемые нами перемещения EEA1-везикул по оси Z, а также их преобразования (слияния и разделения) исключают эту возможность, только EEA1-везикулы, в течение 35-105 с после фотovyжигания не претерпевавшие указанных изменений, включались в анализ. Следует подчеркнуть, что мы включали в анализ не только одиночные EEA1-везикулы, но также кластеры взаимозаякоренных гибридных EEA1- и ЭФР-содержащих везикул, которые формируются в клетках на определенной стадии эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.

Для того, чтобы оценить динамику ассоциации EEA1 белка с мембранами везикул в контрольных и ЭФР-стимулированных клетках, отдельные EEA1-везикулы (или одиночные EEA1-содержащие кластеры везикул) подвергали фотovyжиганию, после чего наблюдали восстановление их флуоресценции в течение приблизительно 2 мин (рис. 10), производя прижизненную съемку с частотой 1 кадр в 0.7 с. Интенсивности флуоресценции везикул были нормализованы на выгорание флюорофора, случайные колебания мощности лазера, и степень выжигания и представлены на рис. 11 в зависимости от времени. Полученные данные были аппроксимированы экспоненциальными кривыми однофазного и двухфазного восстановления флуоресценции, рассчитывая коэффициент детерминации R^2 .

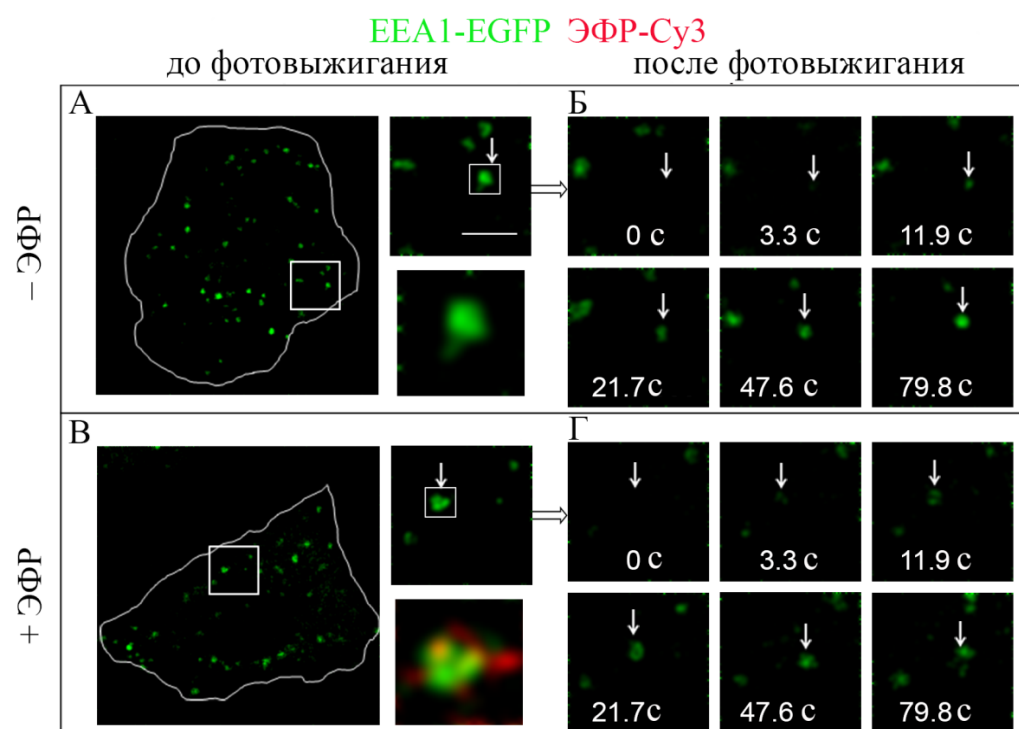


Рис. 10 Восстановление флуоресценции EEA1-везикул в ходе FRAP анализа в нестимулированных (–ЭФР) и стимулированных добавлением ЭФР (+ЭФР) клетках

Эндоцитоз был стимулирован добавлением ЭФР-Су3 (красный) по схеме импульсной загрузки лиганда. Участки клеток, выделенных белой рамкой, представлены в большем увеличении и содержат EEA1-везикулы (обозначены стрелками, зеленый) до фотовыжигания (А, В) и после фотовыжигания (Б, Г). Указано время после фотовыжигания, с. Масштаб – 3мкм.

Оказалось, что при сравнении данных, полученных на контрольных и ЭФР-стимулированных клетках, с уравнениями однофазного восстановления флуоресценции, значения критерия R^2 были равны 0.85 (рис. 11, А, В). При сравнении данных с уравнением двухфазного восстановления флуоресценции значения R^2 составили, соответственно, 0.93 и 0.95 (рис. 11, Б, Г). Таким образом, восстановление флуоресценции EEA1-EGFP лучше описывается двухфазной моделью и может быть представлено двумя кинетическими компонентами – медленной и быстрой.

Исходя из этого мы рассчитали время полувосстановления флуоресценции (t_h) для быстрой ($t_{h \text{ быстр.}}$) и медленной ($t_{h \text{ медл.}}$) кинетических компонент белка EEA1. Мы установили, что $t_{h \text{ быстр.}}$ в контрольных (1.55 ± 0.35 с) и стимулированных добавлением ЭФР клетках (2.75 ± 0.97 с) достоверно не различаются (рис. 12, Б). Напротив, оказалось, что медленная компонента $t_{h \text{ медл.}}$ флуоресценции EEA1-EGFP дольше восстанавливается в ЭФР-стимулированных клетках (99.28 ± 37.95 с) по сравнению с контрольными (21.33 ± 3.71 с) (рис. 12, В).

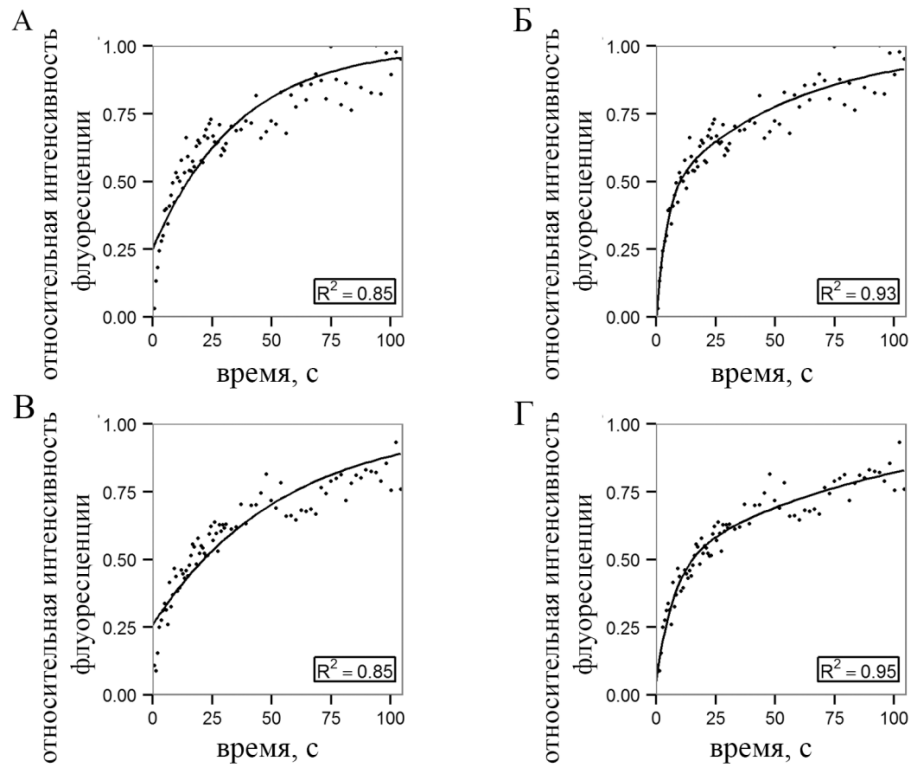


Рис. 11 Сравнение данных FRAP анализа с моделями одно- и двухфазного восстановления флуоресценции

Восстановление флуоресценции EEA1-EGFP оценивали в нестимулированных (А, Б) и стимулированных (В, Г) добавлением ЭФР клетках. Полученные данные нормировали на выгорание флуорофора, случайные колебания мощности лазера, и степень выжигания. Кривые восстановления флуоресценции сравнивали с экспоненциальными уравнениями однофазного (А, В) и двухфазного (Б, Г) восстановления, рассчитывая коэффициент детерминации R^2 .

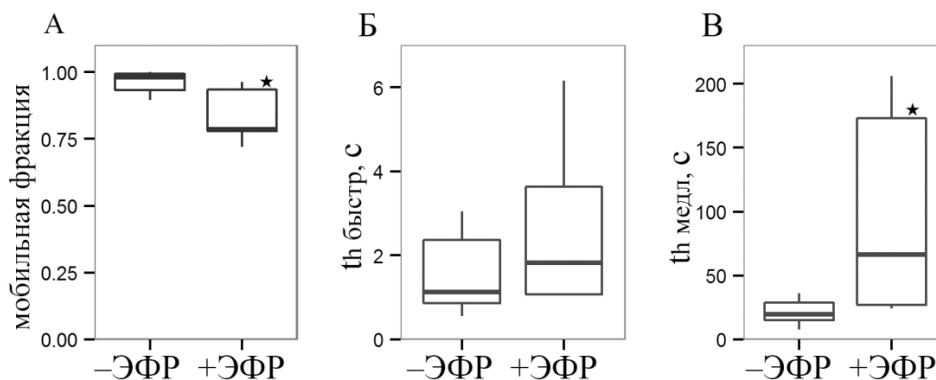


Рис. 12 Количественный анализ восстановления флуоресценции EEA1-EGFP на везикулах в нестимулированных (-ЭФР) и стимулированных добавлением ЭФР (+ЭФР) клетках

А – мобильная фракция, Б, В – время полувосстановления флуоресценции EEA1-EGFP для быстрой (t_h быстр) и медленной (t_h медл) кинетических компонент, соответственно, были рассчитаны на основе двухфазной модели для 14 кривых восстановления флуоресценции. Звездочками обозначены достоверные отличия групп друг от друга ($p < 0.05$).

Кроме того, мы показали, что мобильная фракция (Mf) также различается. Так, восстановление флуоресценции EEA1-EGFP после фотовыжигания в контрольных клетках происходило до уровня $96 \pm 1\%$ от изначальной интенсивности за 100 с, в то время как мобильная фракция в ЭФР-стимулированных клетках составляла лишь 0.84 ± 0.047 (т. е. $84 \pm 4.7\%$, рис. 12, А).

Таким образом, несмотря на то, общее количество белка EEA1 не изменяется в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов, стимуляция эндоцитоза РЭФР приводит к увеличению времени жизни на мембране части популяции EEA1 белка.

3.3 Изучение взаимодействия EEA1- и ЭФР-положительных везикул методом прижизненной съемки

Отсутствие изменений в количестве ассоциированного с везикулами EEA1 в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов свидетельствует в пользу гипотезы о том, что EEA1-везикулы являются долгоживущим компартментом, а не возникают в ходе эндоцитоза. Еще одним доказательством того, что EEA1-везикулы представляют собой предсуществующий компартмент, явилась бы демонстрация цикла взаимодействия EEA1-везикул с ЭФР-содержащими везикулами в живых клетках. Поэтому на следующем этапе нашего исследования с помощью прижизненной съемки мы проанализировали, как происходит образование и разрушение гибридных EEA1- и ЭФР-содержащих структур в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.

Для этого добавили ЭФР, меченый СуЗ-флюорофором, к клеткам, экспрессирующим плазмиду EEA1-EGFP, и наблюдали процесс эндоцитоза в живых клетках в течение 5-60 мин. Поскольку при стимуляции эндоцитоза по схеме импульсной загрузки лиганда двудоменные структуры формировались в клетках уже к началу момента съемки (сразу после 5 мин импульса), для изучения эндоцитоза методом прижизненной съемки была выбрана схема предварительного связывания лиганда. Эта схема предполагает, что клетки в течение часа поддерживаются в условиях низкой температуры ($+4^{\circ}\text{C}$). В данных условиях при добавлении к ним ЭФР происходит формирование ЭФР-рецепторных комплексов, но процесс их интернализации в клетку значительно замедляется. Последующий перевод клеток в физиологически оптимальные условия ($+37^{\circ}\text{C}$) стимулирует интернализацию ЭФР-рецепторных комплексов, которая при этом осуществляется более синхронно, чем при схеме импульсной загрузки лиганда.

На ранних этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов (10-15 мин) мы наблюдали процесс слияния EEA1-положительной везикулы, располагающейся в

околомембранной области клетки, с мелкими ЭФР-содержащими везикулами, которые отделялись от ПМ (рис. 13, А).

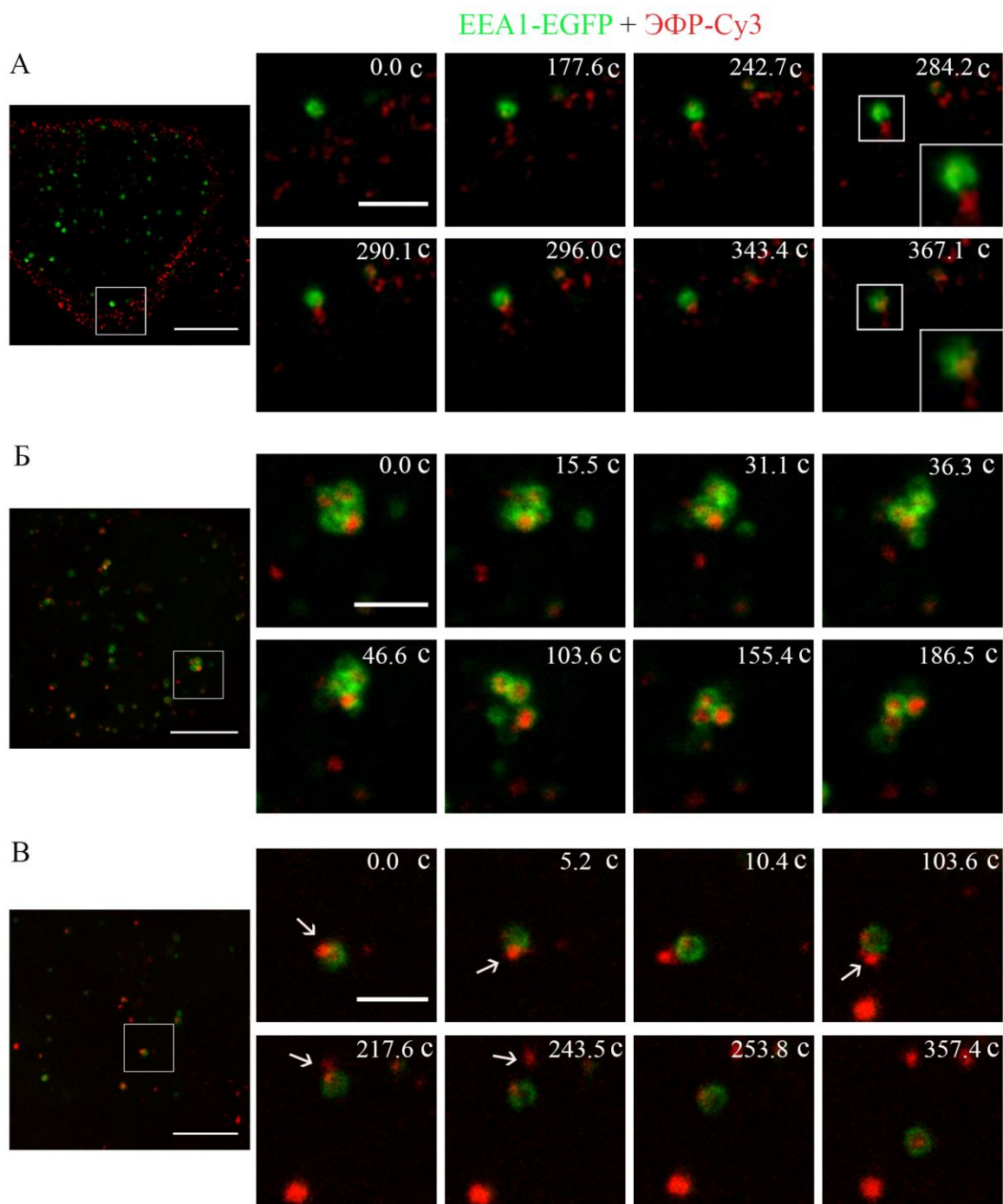


Рис. 13 Анализ взаимодействия EEA1- и ЭФР-положительных везикул методом прижизненной микроскопии

В клетках, экспрессирующих EEA1-EGFP (зеленый), запускали эндоцитоз ЭФР-Су3 (красный). Обозначено время после начала съемки, с. Масштаб 10 мкм (изображение целой клетки); 3 мкм (изображение участка клетки). А – слияние EEA1-положительной везикулы с ЭФР-содержащей везикулой на ранних этапах эндоцитоза; Б – образование агрегатов гибридными EEA1- и ЭФР-положительными везикулами на поздних стадиях эндоцитоза; В – выделение ЭФР-содержащей везикулы (обозначена стрелкой) из состава гибридной эндосомы на поздних стадиях эндоцитоза.

Появления какого-либо EEA1-EGFP сигнала на поверхности ЭФР-положительных везикул до их слияния с EEA1-везикулами отмечено не было. Важно отметить, что до взаимодействия EEA1-везикулы с ЭФР-содержащей везикулой первая не содержала видимого СуЗ-сигнала, что указывает на то, что наблюдаемое нами слияние иллюстрирует именно процесс первичного взаимодействия предсуществующей EEA1-везикулы с ЭФР-содержащей везикулой.

На более поздних этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов (30-40 мин) в клетках были обнаружены агрегаты взаимозакоренных EEA1-везикул, содержащих ЭФР (рис. 13, Б), что согласуется с описанными ранее структурами, выявленными на фиксированных клетках. Данные агрегаты перемещались в клетке как единое целое, при этом периодически от них отсоединялись отдельные EEA1-положительные везикулы, несущие ЭФР (рис. 13, Б). Таким образом, на поздних этапах эндоцитоза происходило разрушение агрегатов. Следует отметить, что гибридные везикулы в составе агрегатов никогда не сливались друг с другом, очевидно теряя способность к слиянию. На этом этапе ЭФР-СуЗ сигнал, как правило, локализовался в центре везикулы и был окружен EEA1-EGFP сигналом.

На поздних сроках эндоцитоза наблюдался также процесс выделения ЭФР-содержащих везикул из состава гибридной органеллы, т.н. процесс сегрегации (рис. 13, В), в конечном итоге приводивший к полному разделению ЭФР- и EEA1-позитивных структур. Расположение сигнала ЭФР-СуЗ относительно EEA1-EGFP на везикулах, претерпевающих сегрегацию, отличалось. В этих структурах тот ЭФР-содержащий домен везикулы, который в дальнейшем отделялся от EEA1-везикулы, локализовался не в центре везикулы, а сбоку, и лишь небольшим участком был связан с EEA1-везикулой. Интересно, что в ходе сегрегации именно ЭФР-содержащая везикула, отделялась от остальной части EEA1-эндосомы, а не наоборот.

Полученные в ходе прижизненной съемки данные подтверждают предположение о том, что формирование гибридных EEA1- и ЭФР-содержащих везикул в ходе эндоцитоза происходит за счет взаимодействия предсуществующих EEA1-везикул с интернализирующимися в клетку ЭФР-содержащими везикулами, при этом на позднем этапе эндоцитоза происходит восстановление популяции EEA1-везикул.

3.4 Изучение механизмов сегрегации ЕЕА1- и ЭФР-положительных везикул

В ходе эндоцитоза происходят многочисленные процессы слияния эндосом, а также отделения частей эндосом друг от друга. Одним из таких процессов разделения эндосомальных доменов является процесс рециклирования. Известно, что в этом процессе задействован Agr2/3 комплекс, осуществляющий нуклеацию актиновых филаментов, динамин, отщепляющий тубулярную часть ранней эндосомы от ее везикулярной части и кортактин, стабилизирующий связь фибриллярного актина с динамином. Мы предположили, что комплекс этих белков может участвовать также в сегрегации ЕЕА1- и ЭФР-положительных везикул, которая функционально схожа с процессом рециклирования.

Для того чтобы проверить, взаимодействуют ли эндосомы и ЕЕА1-везикулы с кортактином, мы оценили распределение кортактина методом иммунофлуоресценции на различных этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Степень ассоциации кортактина с эндосомами оценивали визуально, анализируя проекции максимальной яркости, полученные из трех последовательных оптических срезов в нижней трети клетки. Кортактин был распределен в клетке в виде фибриллярных образований и отдельных структур, по форме напоминающих везикулы (рис. 14). Оказалось, что в контрольных клетках, не стимулированных добавлением ЭФР, значительное количество ЕЕА1-везикул располагалось в области кортактиновых структур. Следует отметить, что ЕЕА1-везикулы и кортактиновые структуры, как правило, имели небольшую площадь перекрытия друг с другом. На 15 мин после стимуляции эндоцитоза степень ассоциации кортактина с ЕЕА1-везикулами не снижалась, при этом кортактиновые структуры, как правило, располагались со стороны ЕЕА1-, но не ЭФР-положительных доменов эндосом (рис. 14). Напротив, к 30 мин в клетках наблюдались гибридные везикулы, ассоциированные с кортактином таким образом, что он располагался между ЭФР- и ЕЕА1-положительными доменами (рис. 14). На более поздних этапах (45 и 60 мин) в клетках выявлялись в основном отдельные ЕЕА1-положительные везикулы и ЭФР-содержащие эндосомы, что говорит о том, что большая часть гибридных везикул претерпела к этому моменту процесс сегрегации. Кортактиновые структуры при этом оставались ассоциированы с ЕЕА1-везикулами, но не с ЭФР-содержащими эндосомами (рис. 14).

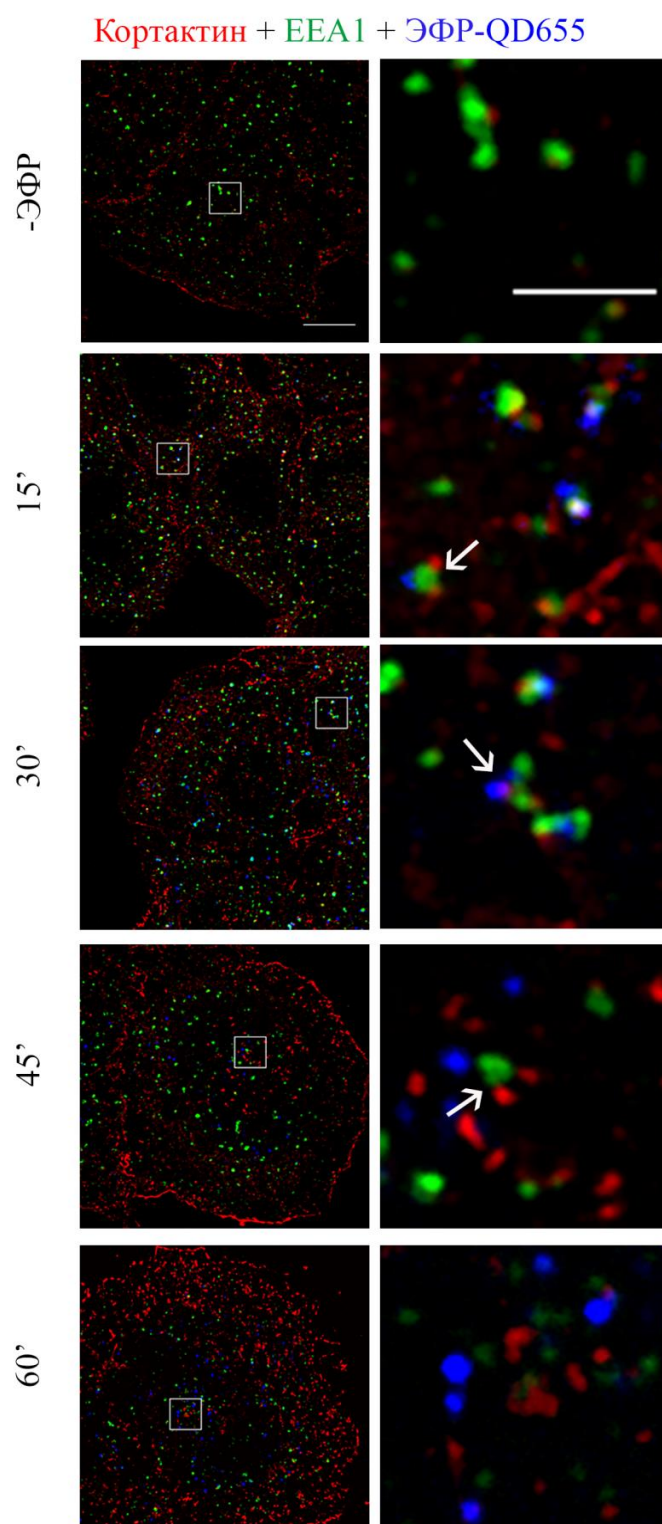


Рис. 14 Распределение кортиктин относительно EEA1- и ЭФР-положительных везикул в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.

В клетках запускали эндоцитоз ЭФР-QDs (синий) по схеме с предварительным связыванием лиганда и фиксировали их через 15, 30, 45, 60 мин после стимуляции эндоцитоза. Иммунофлуоресцентное мечение: кортиктин (красный); EEA1 (зеленый). Изображения были подвергнуты деконволюции. Масштаб: 10 мкм (изображения целых клеток); 3 мкм (изображения выделенного участка клетки). Стрелками обозначены типичные структуры, выявляемые в клетках через указанное время после стимуляции эндоцитоза.

Полученные данные позволили нам предположить, что кортактин, а также взаимодействующая с ним машинерия, включающая в себя динамин и Agr2/3 комплекс, участвуют в процессе сегрегации. Для подтверждения выдвинутого предположения мы использовали ингибитор Agr2/3 комплекса СК666 и ингибитор динамина динасор. СК666 или динасор добавляли к клеткам через 5 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов для того, чтобы ограничить действие этих ингибиторов на начальных стадиях эндоцитоза и избежать их влияние на формирование рецептор-содержащих эндосом. В качестве контроля эффективности работы динасора его добавляли к клеткам за 20 мин до стимуляции эндоцитоза, что приводило к практически полному отсутствию ЭФР-содержащих эндосом в клетках через 30 мин после стимуляции эндоцитоза (рис. 15), что указывает на подавление работы динамина в области окаймленной ямки. В качестве контроля эффективности ингибирования Agr 2/3 комплекса с помощью СК666 клетки окрашивали антителами к кортактину. Оказалось, что добавление СК666 приводило к значительному уменьшению структурированного кортактина в клетке (рис. 15). Важно отметить, что действие динасора также снижало число кортактиновых структур (рис. 15).

Как и в предыдущем эксперименте, анализировали проекции максимальной яркости, полученные из трех последовательных оптических срезов в нижней трети клетки, оценивая прохождение процесса сегрегации на разных этапах эндоцитоза. Оказалось, что в контрольных клетках без добавления ингибиторов после 45, 60 мин эндоцитоза гибридные везикулы практически не выявлялись, что свидетельствует о том, что процесс сегрегации происходил в основном между 30 и 45 мин (рис. 15). Напротив, на 45 и 60 мин эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в клетках, подвергшихся действию ингибиторов, большая часть ЭФР-содержащих везикул была ассоциирована с ЕЕА1-везикулами (рис. 15), то есть процесс сегрегации в таких клетках подавлялся. Важно отметить, что, в то время как в клетках, обработанных СК666, ЭФР- и ЕЕА1-положительные домены довольно сильно перекрывались друг с другом, динасор приводил к появлению гибридных везикул, ЭФР- и ЕЕА1-положительные домены в которых практически не перекрывались.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу того, что динамин и Agr 2/3-комплекс вовлечены в процесс сегрегации мембран ЕЕА1- и РЭФР-содержащих везикул.

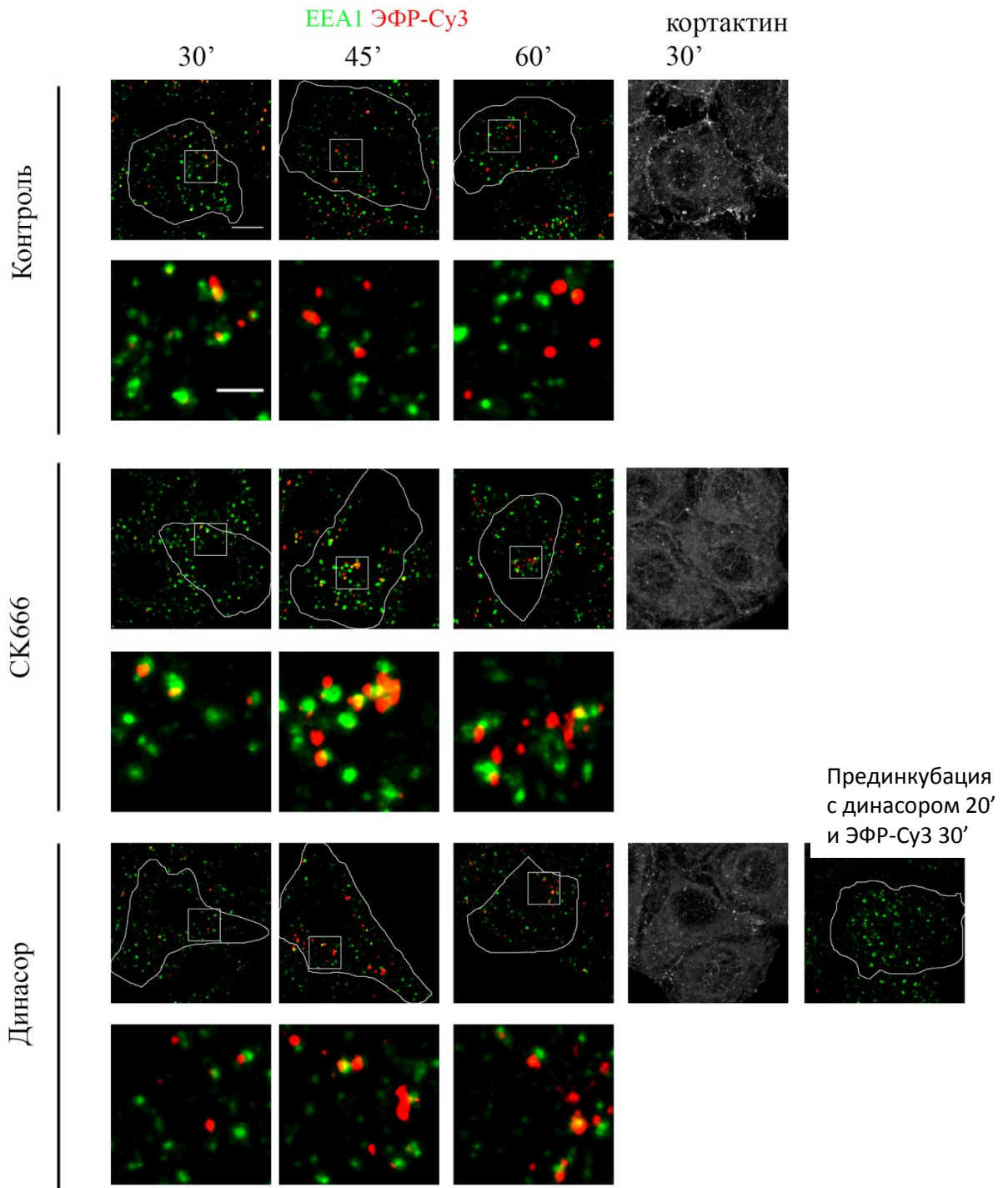


Рис. 15 Влияние СК666 и динасора на сегрегацию ЕЕА1- и ЭФР-положительных везикул

В клетках стимулировали эндоцитоз ЭФР-Су3 (красный) по схеме с предварительным связыванием лиганда. Через 5 мин после стимуляции эндоцитоза к клеткам добавляли динасор или СК666 и фиксировали их через 30, 45 и 60 мин. Клетки окрашивали антителами к ЕЕА1 (зеленый) и оценивали распределение ЕЕА1 и ЭФР-Су3 сигналов на проекциях максимальной яркости трех последовательных оптических срезов (1-3 столбцы). 4 столбец – окрашивание на кортактин (серый). Действие динасора контролировали прединкубацией за 20 минут до запуска эндоцитоза и фиксации через 30 минут после стимуляции эндоцитоза ЭФР-Су3 (5 столбец). Масштаб: 10 мкм (изображения целых клеток); 3 мкм (изображения выделенного участка клетки).

3.5 Анализ сегрегации EEA1- и ЭФР-положительных везикул с точки зрения процесса Rab5-Rab7 конверсии

Для того чтобы выяснить, каким образом происходит замена Rab5 на Rab7 на поверхности эндосомы и как этот процесс скоординирован с наблюдаемой нами сегрегацией EEA1- и ЭФР-положительных доменов гибридных эндосом в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов, мы использовали два подхода.

В первую очередь мы проанализировали степень колокализации ЭФР-содержащих эндосом с EEA1-везикулами, а также Rab5 и Rab7 на иммунофлуоресцентных препаратах клеток, фиксированных на разных этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Эндоцитоз запускали по схеме предварительного связывания лиганда и фиксировали клетки через 15, 23, 30, 45, 60 мин после их перевода в физиологически оптимальные условия. В качестве флуоресцентной метки для лиганда использовали конъюгированные со стрептавидином квантовые точки (Qds655), которые предварительно инкубировали с биотинилированным ЭФР для формирования комплексов ЭФР-Qds. Rab7 визуализировали в клетках путем их временной трансфекции плазмидой Rab7-DsRed. Rab7 был распределен как в контрольных, так и в ЭФР-стимулированных клетках схожим образом: основная часть Rab7 белка выявлялась в околядерной области в виде облака, а в остальных участках клеток обнаруживались отдельные Rab7-положительные везикулы, яркость которых значительно уступала яркости околядерных структур (рис. 16, 17). Для анализа выбирали клетки со средней степенью экспрессии плазмиды Rab7-DsRed, что позволяло визуализировать в клетках менее яркие отдельные Rab7-положительные везикулы. Степень колокализации флуоресцентных сигналов оценивали по объектам, что позволяло анализировать колокализацию ЭФР-положительных везикул одновременно с двумя другими сигналами (тройная колокализация). Как видно на графике (рис. 16, Б), максимальная колокализация ЭФР-содержащих эндосом с EEA1-везикулами наблюдалась на 15 мин после стимуляции эндоцитоза и достигала порядка 60-65%. Следует учитывать, что подобные значения колокализации могут быть несколько занижены вследствие того, что для анализа выбирались одиночные оптические срезы по оси Z. Одна EEA1-положительная везикула может выявляться в 2-4 слоях, при этом перекрываясь с ЭФР-содержащим доменом лишь в 1-2 слоях. Степень колокализации этих везикул снижалась на 45 и 60 мин по сравнению с 15 и 23 мин (рис. 16, Б). Таким образом, основная часть гибридных везикул претерпевала сегрегацию в промежутке между 30 и 45 мин. Следует отметить, что колокализация ЭФР-Qds и Rab5 также снижалась на 45 и 60 мин по сравнению с более ранними этапами эндоцитоза (рис. 17, Б).

А Rab7-DsRed + EEA1-Abs + ЭФР-QD655

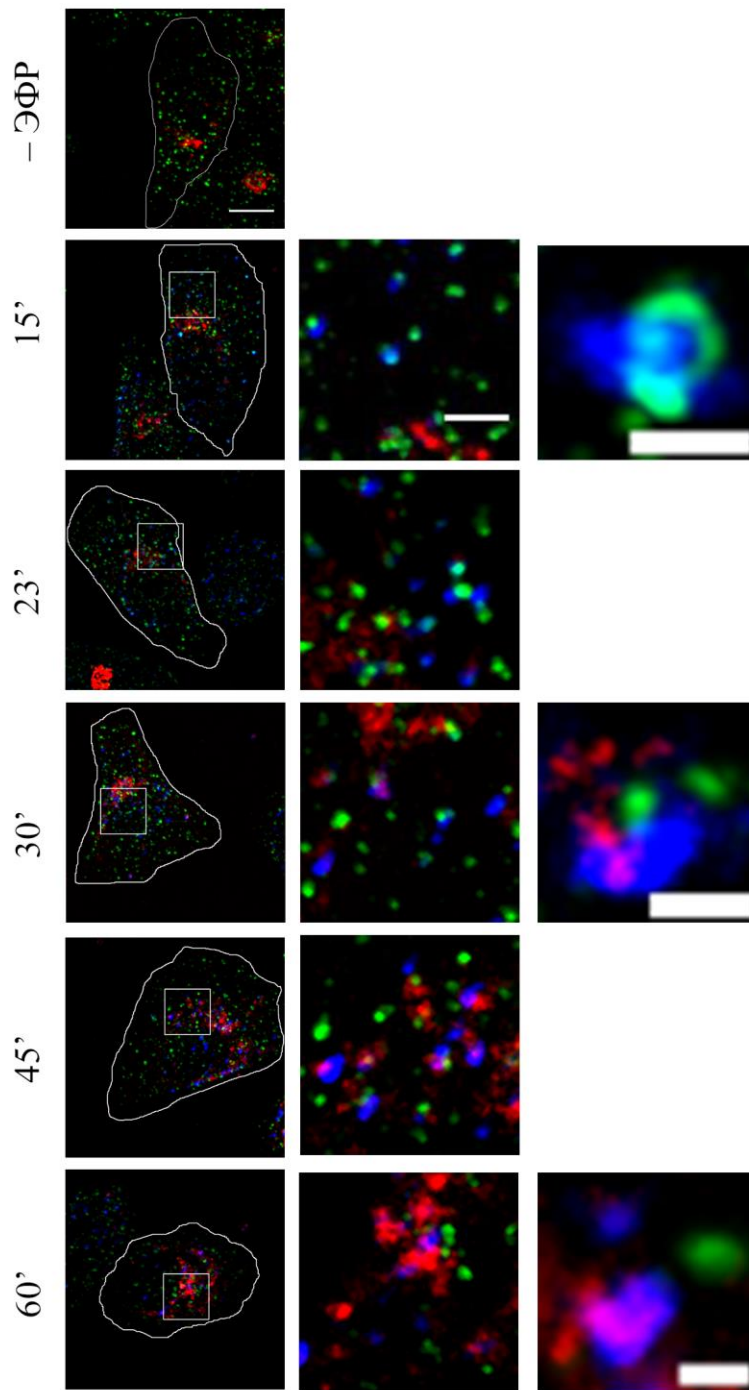
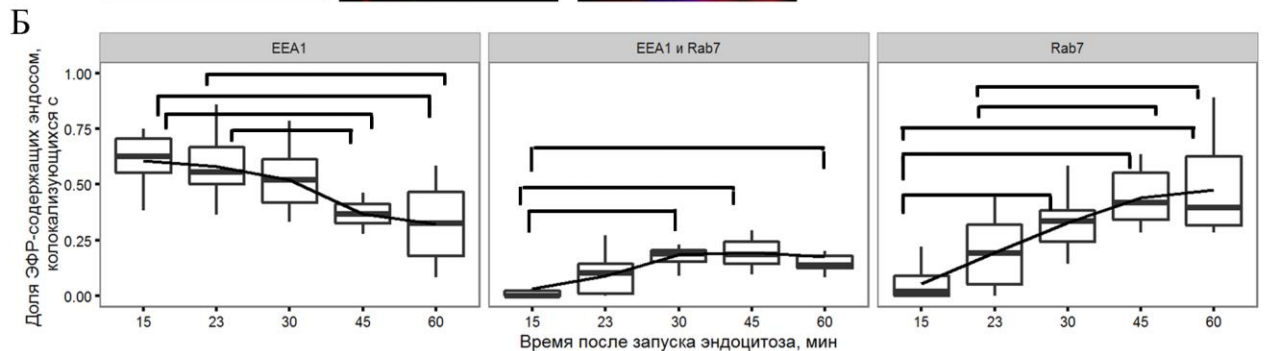
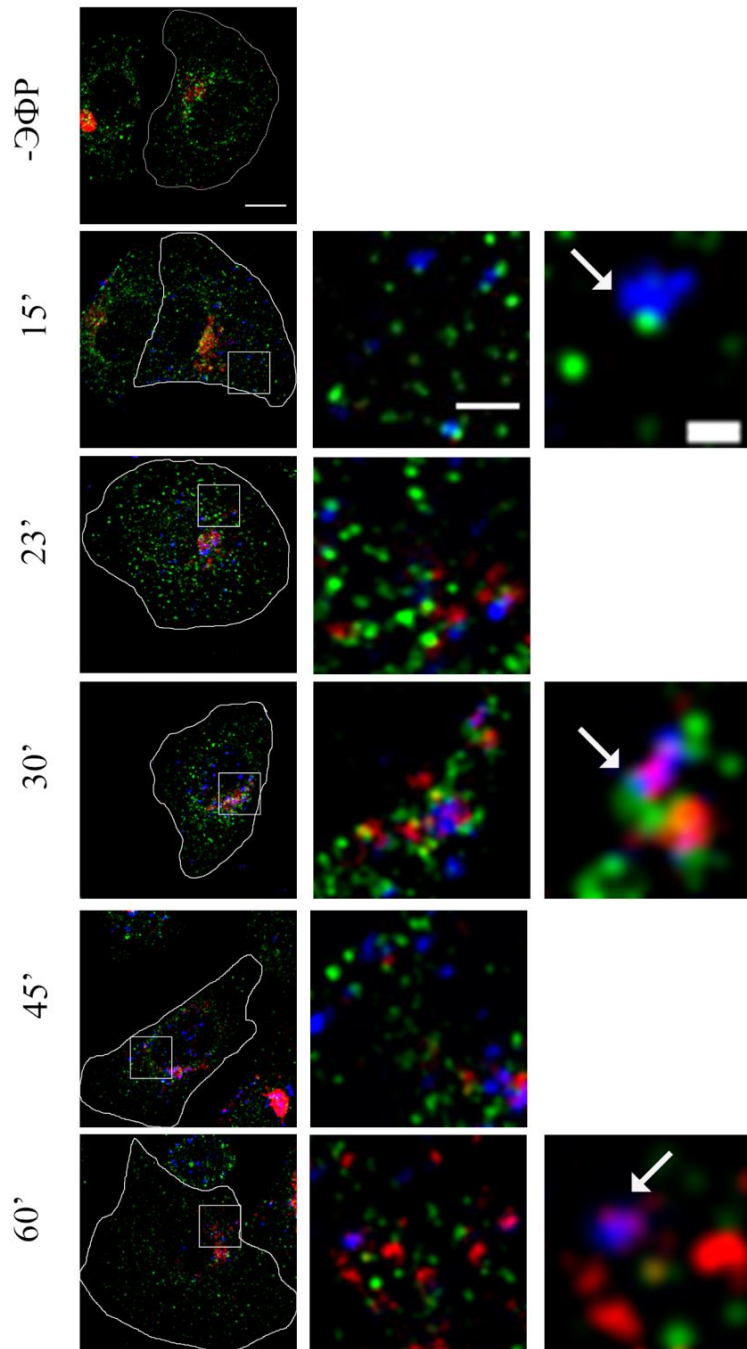


Рис. 16 Динамика колокализации ЭФР, Rab7 и EEA1 в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов

В клетках, экспрессирующих плазмиду Rab7-DsRed (красный), запускали эндоцитоз ЭФР-QDs655 (синий). А) препараты этих клеток, фиксированных через 15, 23, 30, 45, 60 мин после стимуляции эндоцитоза. Иммунофлуоресцентное мечение EEA1 (зеленый). Изображения были подвергнуты деконволюции. Масштаб: 10 мкм (изображения целых клеток); 3 мкм (изображения выделенного участка клетки); правый столбец сверху вниз: 2 мкм, 2 мкм, 1 мкм (изображения отдельных везикул). Б) оценка доли ЭФР-позитивных эндосом, колокализующихся с EEA1 или с EEA1 и Rab7 или только с Rab7 (ось ординат). Ось абсцисс – время после стимуляции эндоцитоза. Скобками обозначены достоверные различия между соответствующими временными точками ($p < 0.05$).



A Rab7-DsRed + Rab5-Abs + ЭФР-QD655



Б

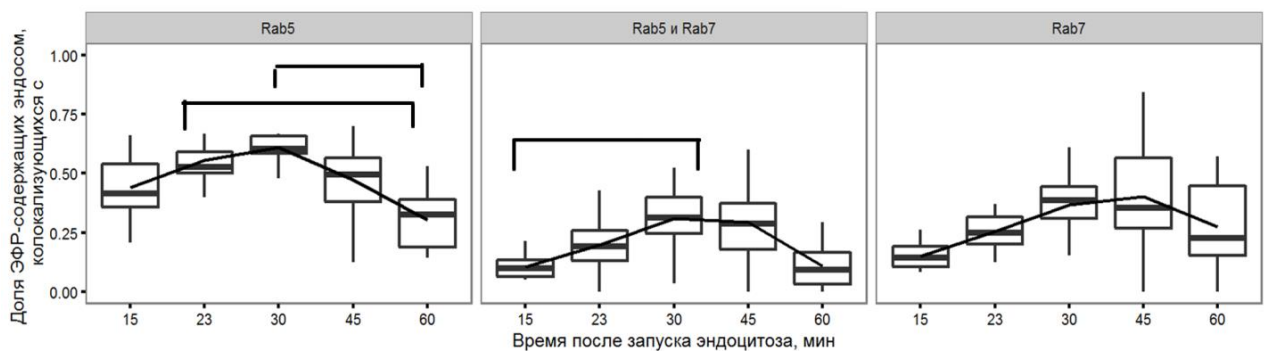


Рис. 17 Динамика колокализации ЭФР, Rab7 и Rab5 в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.

В клетках, экспрессирующих плазмиду Rab7-DsRed (красный), запускали эндоцитоз ЭФР-QDs655 (синий). А) Препараты этих клеток, фиксированных через 15, 23, 30, 45, 60 мин после стимуляции эндоцитоза. Иммунофлуоресцентное мечение Rab5 (зеленый). Изображения были подвергнуты деконволюции. Масштаб: 10 мкм (изображения целых клеток); 3 мкм (изображения выделенного участка клетки). 1 мкм (изображения отдельных везикул, которые обозначены стрелками). Б) Оценка доли ЭФР-позитивных эндосом, колокализирующихся с Rab5 или с Rab5 и Rab7 или с Rab7 (ось ординат). Ось абсцисс – время после стимуляции эндоцитоза. Скобками обозначены достоверные различия между соответствующими временными точками ($p < 0.05$).

Также нами была произведена оценка доли ЭФР-позитивных эндосом, содержащих EEA1 и Rab7. Оказалось, что на 15 мин в клетках таких везикул практически не выявлялось (рис. 16, Б). Напротив, на 30, 45, 60 мин количество везикул, содержащих все три сигнала, увеличивалось. Важно отметить, что Rab7 в составе таких везикул располагался преимущественно со стороны ЭФР-содержащего домена, но не со стороны EEA1 (рис. 16, А). При этом на 30 мин по сравнению с 15 мин возрастала также тройная колокализация ЭФР-Qds, Rab5 и Rab7 (рис. 17, Б). Начиная с 30 мин, по сравнению с 15 мин, возрастало также количество ЭФР-положительных везикул, содержащих Rab7, но не колокализованных с EEA1 (рис. 16, Б).

Эти данные указывают на то, что Rab7 привлекается к ЭФР-содержащим эндосомам еще до стадии их сегрегации от EEA1-положительных везикул. Возрастание колокации ЭФР-положительных везикул (не содержащих EEA1) и Rab7 уже на 30 мин после стимуляции эндоцитоза позволяет предположить, что Rab7 не присутствует долгое время на поверхности гибридных везикул, а сегрегирует достаточно быстро от гибридной везикулы в составе ЭФР-содержащей эндосомы.

Для подтверждения данных, полученных в ходе анализа фиксированных клеток, а также для изучения механики процесса Rab7-опосредованной сегрегации мы использовали прижизненную съемку.

Для прижизненного анализа клетки временно ко-трансфицировали плазмидами EEA1-EGFP и Rab7-DsRed или EEA1-EGFP и Rab5a-pmCherryC1, после чего эндоцитоз в этих клетках стимулировали добавлением комплексов ЭФР-Qds655 (рис. 18, 19). Оказалось, что в процессе сегрегации гибридные везикулы располагались преимущественно в околоядерной части клетки рядом с Rab7-областью (рис. 18). В ходе сегрегации гибридная везикула ориентировалась ЭФР-содержащим доменом в сторону Rab7-области. ЭФР-содержащий домен привлекался в Rab7-область, отсоединяясь при этом от EEA1-везикулы (рис. 18). ЭФР-положительная эндосома содержала оба сигнала (EEA1 и Rab7) очень непродолжительное время, что подтверждает данные, полученные с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии фиксированных клеток.

Также оставалось выяснить, на каком этапе происходит уход Rab5 с поверхности эндосом и как он осуществляется. Прижизненные эксперименты на клетках, ко-трансфицированных плазмидами EEA1-EGFP и Rab5a-pmCherryC1, помогли прояснить этот вопрос. Оказалось, что Rab5 не постепенно уходил с мембраны ЭФР-содержащих везикул. Напротив, в процессе сегрегации Rab5 отделялся в составе EEA1-положительных везикул от ЭФР-содержащего домена (рис. 19).

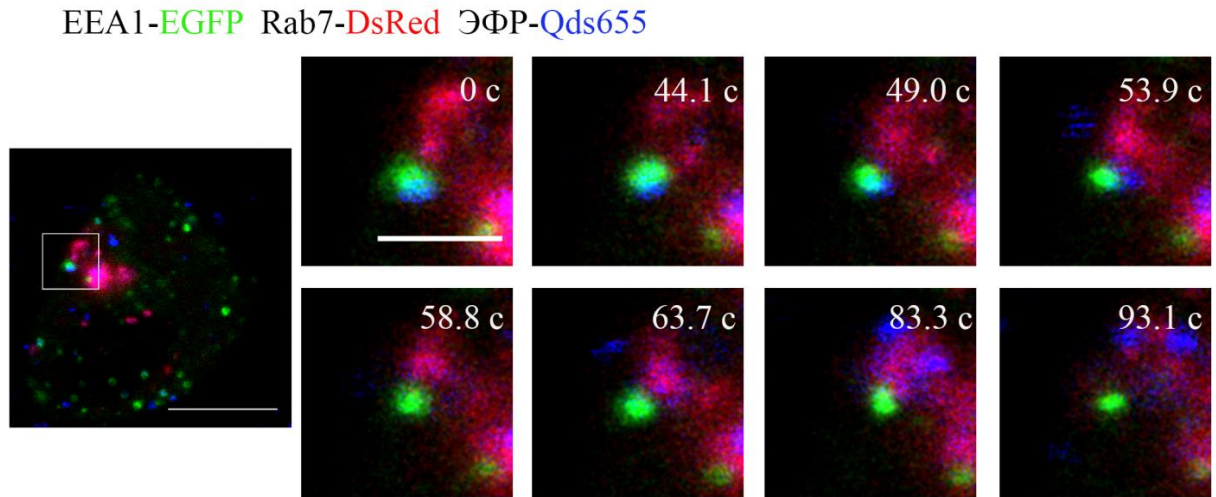


Рис. 18 Сегрегация EEA1-везикул от ЭФР и Rab7-содержащих эндосом

В клетках, экспрессирующих плазмиды EEA1-EGFP (зеленый) и Rab7-DsRed (красный), запускали в них эндоцитоз добавлением ЭФР-Qds655 (синий) на 5 мин при 37°C. Прижизненная микроскопия. Обозначено время после начала съемки, с. Масштаб— 10 мкм (изображение целой клетки); 3 мкм (изображение участка клетки).

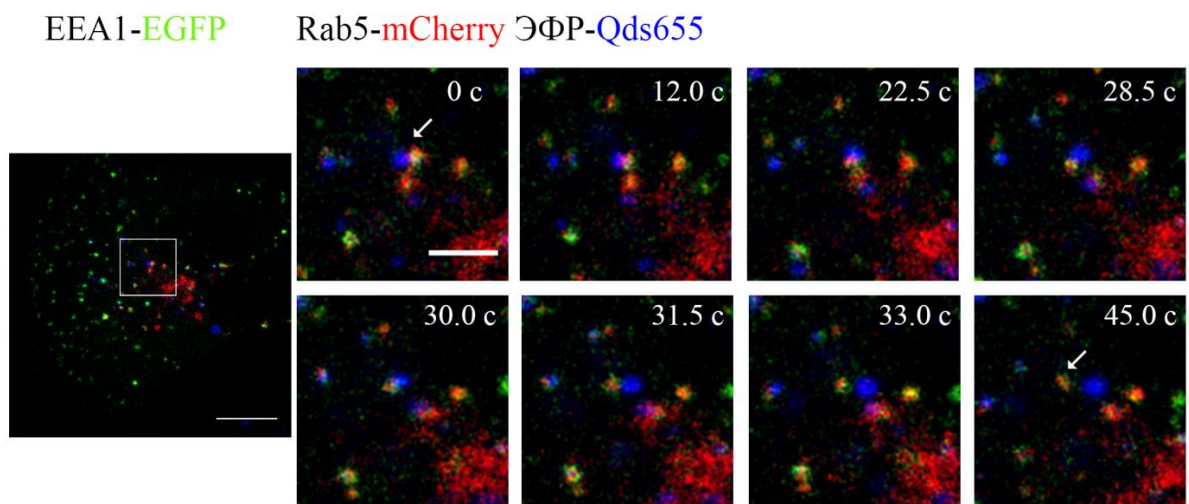


Рис. 19 Сегрегация EEA1- и Rab5-положительных везикул от ЭФР-содержащих эндосом

В клетках, экспрессирующих плазмиды EEA1-EGFP (зеленый) и Rab5-mCherry (красный), запускали в них эндоцитоз добавлением ЭФР-Qds655 (синий) на 5 мин при 37°C. Прижизненная микроскопия. Обозначено время после начала съемки, с. Масштаб— 10 мкм (изображение целой клетки); 3 мкм (изображение участка клетки).

Таким образом, полученные данные показывают, что в ходе конверсии Rab7 и Rab5 не замещают друг друга на одних и тех же местах связывания, а привлекаются к разным доменам гибридной органеллы. При этом именно в ходе сегрегации ЭФР-содержащая эндосома, уже несущая на своей поверхности Rab7, теряет Rab5 и EEA1. В связи с этим процесс сегрегации может рассматриваться как механизм Rab5-Rab7 конверсии.

3.6 EEA1-везикулы, выявляющиеся в подверженных сывороточному голоданию клетках, не являются аутофагосомами

Результаты, описанные в предыдущих главах, показывают, что EEA1-везикулы в клетке играют роль предсуществующего эндоцитозного компартмента, обеспечивающего эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов. Однако, вопрос о происхождении EEA1-положительных везикул остается открытым.

Следует учесть, что недостаток сывороточных факторов может приводить к индукции в клетках процесса аутофагии. Известно, что в процессе своего созревания аутофагосома может взаимодействовать с компонентами эндоцитозного пути, в т. ч. с ранними эндосомами, и может быть обогащена белком EEA1. Таким образом, нельзя исключать того, что наблюдаемые нами в контрольных (подверженных сывороточному голоданию) клетках EEA1-везикулы могут представлять собой аутофагосомы.

Для того, чтобы это проверить, мы проанализировали колокализацию везикул, несущих EEA1, с маркером аутофагосом LC3. Мы также оценили количество и средний размер EEA1- и LC3-положительных везикул в клетках, культивируемых в среде с пониженным содержанием сыворотки на протяжении 12-36 ч.

На рис. 20 представлены проекции максимальной яркости клеток, флуоресцентно меченых антителами против EEA1 и LC3. Мы обнаружили, что в контрольных клетках, культивируемых в среде с оптимальным содержанием сыворотки (10 %), выявляется около 30-40 LC3-положительных везикул (рис. 21, А). Примерно такое же количество везикул выявляется и в клетках, подверженных сывороточному голоданию на протяжении 12-18 ч (рис. 21, А). Число LC3-везикул увеличивалось лишь в клетках, культивируемых в бессывороточных условиях в течение 36 ч, и варьировало в пределах 40-60 шт на клетку (рис. 21, А), что меньше числа EEA1-везикул (100-150 шт). Напротив, средний размер LC3-везикул при индукции сывороточного голодания достоверно не изменялся (рис. 21, Б). EEA1-везикулы при этом не претерпевали никаких изменений: их количество и размер

оставались такими же, как в контроле даже в клетках, подвергнутых сывороточному голоданию в течение 36 ч (рис. 21, А, Б).

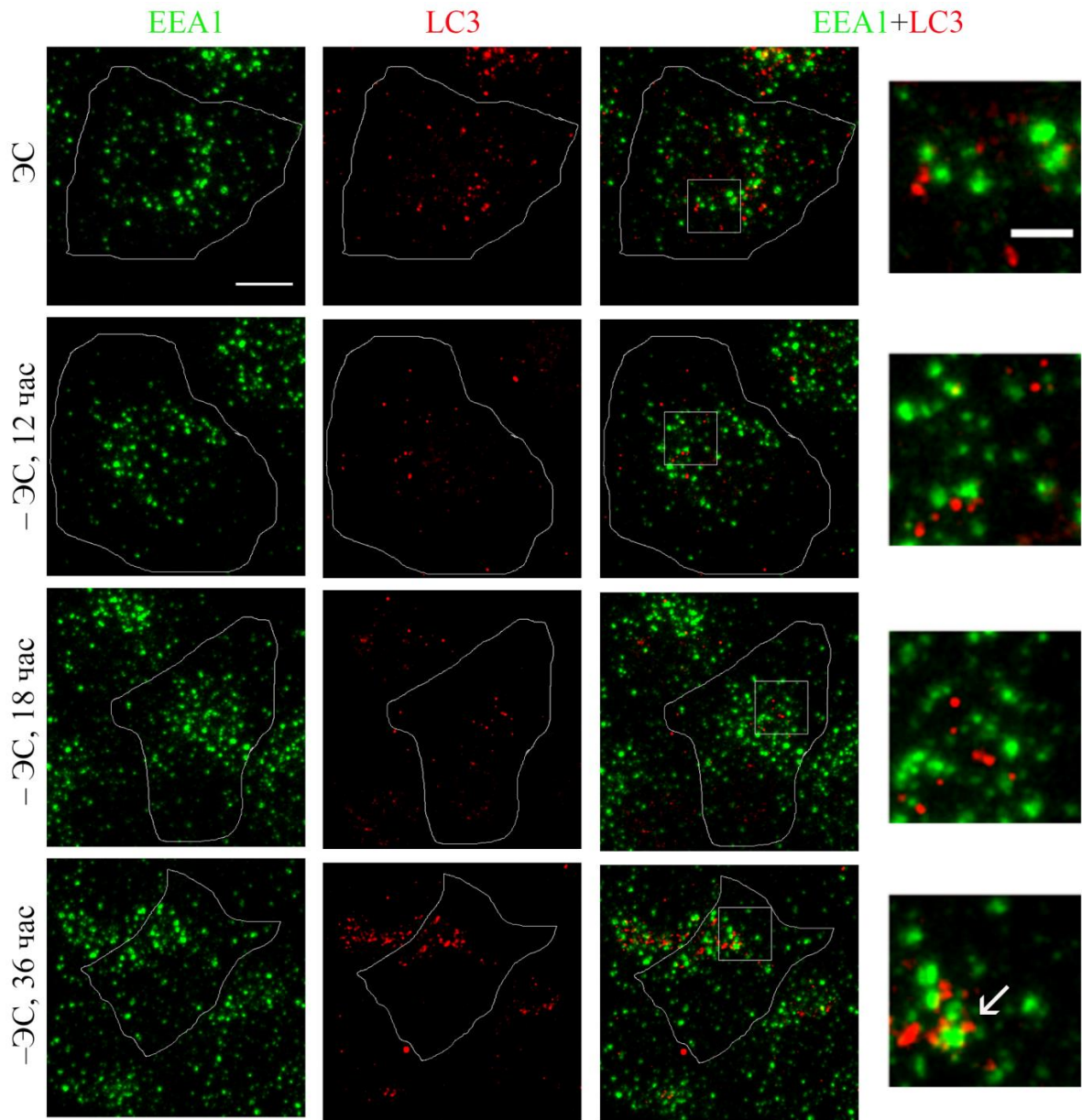


Рис. 20 Везикулы, несущие EEA1 и LC3, в клетках после стимуляции сывороточного голодания

Клетки культивировали в присутствии 10% эмбриональной сыворотки (ЭС, контроль), в ее отсутствии (-ЭС) в течение 12, 18 и 36 ч. Иммунофлуоресцентное мечение: EEA1 (зеленый); LC3 (красный). Масштаб: 10 мкм (изображения целых клеток); 3 мкм (изображения выделенного участка клетки). Стрелкой отмечена структура, содержащая одновременно сигналы EEA1 и LC3.

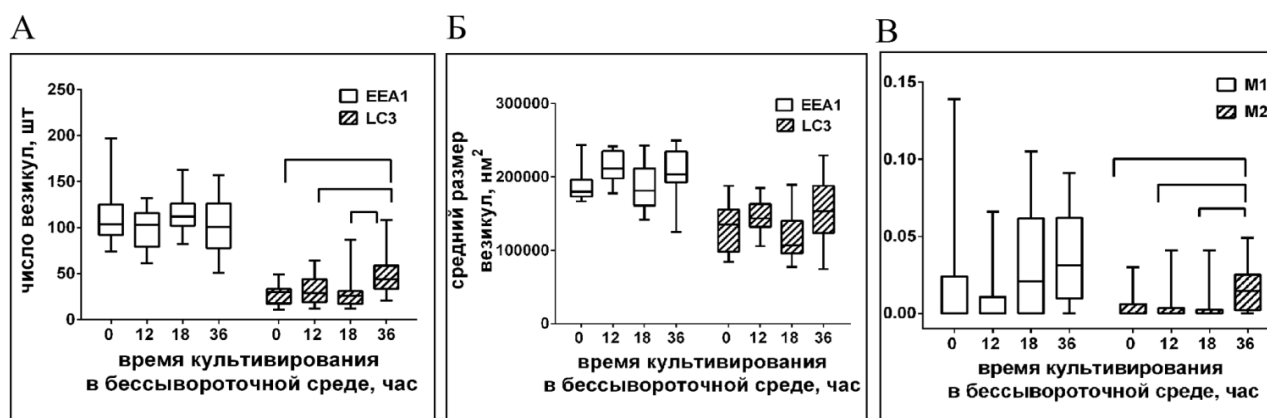


Рис. 21 Влияние сывороточного голодания на число, средний размер и степень колокализации EEA1- и LC3-везикул в клетках

Число (А) и средний размер (Б) везикул, несущих EEA1 (белые столбцы) и LC3 (столбцы со штриховкой), оценивали в клетках, культивируемых в течение 12, 18 и 36 ч в отсутствие ЭС. Колокализацию LC3 с EEA1 (В) оценивали с помощью расчета коэффициентов Мандерса M1 и M2. Скобками обозначены достоверные отличия ($p < 0.05$) между параметрами везикул или степенью их колокализации.

Колокализацию EEA1 с LC3-везикулами оценивали с помощью коэффициентов Мандерса M1 и M2. Коэффициент M1 выражает отношение суммарной интенсивности пикселей первого канала (LC3), содержащих и сигнал второго канала (EEA1), к суммарной интенсивности всех пикселей первого канала. Аналогично, M1 коэффициент M2 выражает отношение интенсивностей сигнала второго канала, содержащего первый сигнал, по отношению к суммарной интенсивности сигнала второго канала. Оказалось, что медианное значение коэффициентов колокализации M1 и M2 в контрольных клетках было менее 0.05 и не изменялось после 12 и 18 ч сывороточного голодания по сравнению с контролем (рис. 21, В). Только в клетках, голодающих в течение 36 ч, значение коэффициента Мандерса M2 возрастало по сравнению со значениями в остальных клетках (рис. 21, В). Однако эти значения также оставались крайне низкими (не более 0.05). В клетках, подвергавшихся голоданию в течение 36 ч, EEA1- и LC3-везикулы располагались преимущественно в околядерной области близко друг к другу (рис. 20). На изображениях участков околядерной области этих клеток видно, что только часть везикул содержала оба сигнала (рис. 20). Для сравнения на рис. 20, А в большем увеличении представлены участки околядерной области контрольных клеток, и клеток, культивируемых в бессывороточных условиях в течение 12-18 ч, в которых практически не обнаруживались везикулы, содержащие одновременно EEA1 и LC3 белки.

Таким образом, в клетках, культивируемых в бессывороточных условиях в течение 12-36 ч подавляющее большинство EEA1-везикул не колокализовалось с маркером

аутофагосом LC3, что позволяет утверждать, что EEA1-везикулы не являются в этих клетках аутофагосомами.

3.7 Роль эндоцитозного пути в происхождении EEA1-положительных везикул

В соответствии с текущей точкой зрения, EEA1-везикулы формируются из ПМ в результате постоянной интернализации в клетку грузов различной природы. Чтобы это проверить, использовали 5-(N,N)-гексаметиленамилорид (далее – амилорид), который широко применяется для подавления макропиноцитоза, а также ингибитор динамина и динамин-зависимого эндоцитоза динасор. Клетки инкубировали в присутствии амилорида и динасора или только динасора в течение 6 ч, после чего методом иммунофлуоресценции оценивали число и средний размер EEA1-положительных везикул в этих клетках (рис. 22).

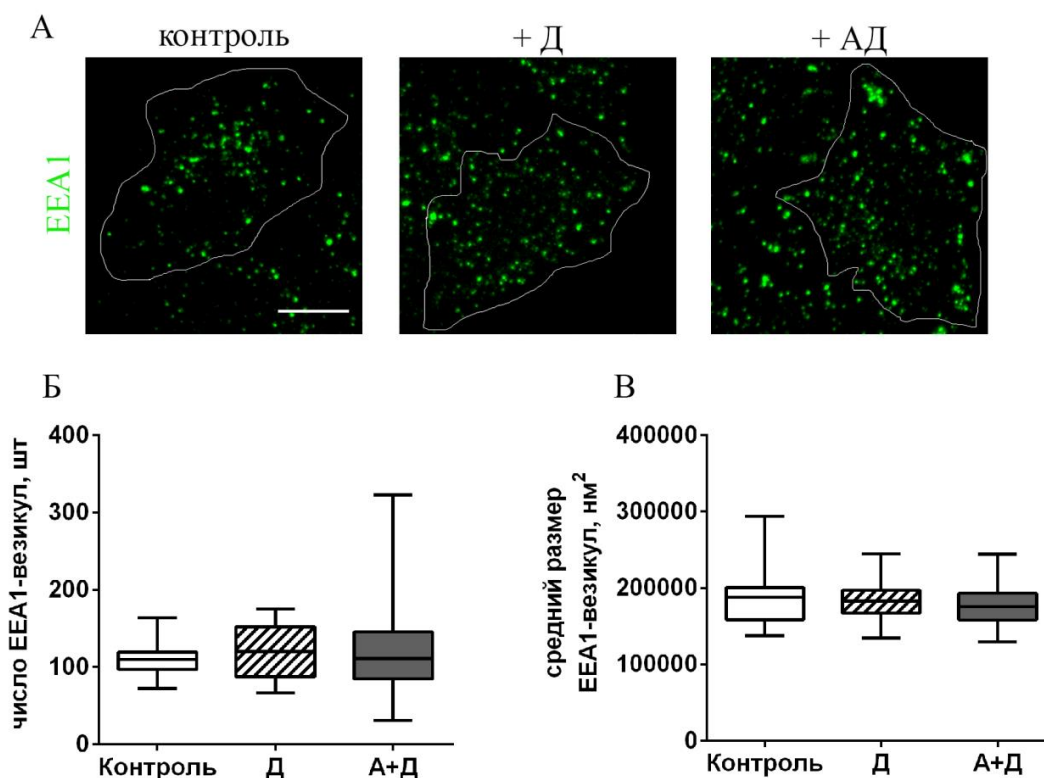


Рис. 22 Влияние амилорида и динасора на популяцию EEA1-положительных везикул

Клетки, подверженные сывороточному голоданию, культивировали в присутствии динасора (Д) или динасора и амилорида (+АД) в течение 6 ч, после чего оценивали изменение параметров EEA1-везикул в этих клетках. А – иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами против EEA1 (зеленый). Масштаб: 10 мкм. Б–число и В – средний размер EEA1-везикул.

Оказалось, что в клетках, инкубировавшихся в присутствии обоих сочетаний ингибиторов, эти показатели не изменялись по сравнению с контрольными клетками. Интересно, что действие ингибиторов приводило к некоторому изменению распределения EEA1-везикул по клетке: они в большей степени располагались на периферии и могли образовывать небольшие кластеры (рис. 22, А).

Таким образом, подавление жидкофазного и динамин-зависимого эндоцитоза не оказывало существенного влияния на популяцию EEA1-везикул в клетках.

В качестве контроля эффективности действия ингибиторов в клетках через 6 ч после их культивирования в присутствии амилорида и динасора стимулировали эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов (рис. 23). При этом через 30 мин после добавления ЭФР в клетках, подверженных действию ингибиторов, РЭФР-содержащих везикул выявлялось в 2-3 раза меньше, чем в контрольных клетках (рис. 23, Б), и их средний размер также значительно снижался (рис. 23, В). Существенное снижение числа и средних размеров РЭФР-содержащих везикул при действии ингибиторов приводило также к уменьшению коэффициентов колокализации M1 и M2, которые практически не отличались от нулевых значений (рис. 23, Г, Д).

Чтобы подтвердить, что EEA1-везикулы не являются производными ПМ, мы провели следующий эксперимент. К клеткам, культивируемым в условиях недостатка ростовых факторов сыворотки, добавляли липосомы, состоящие из искусственного липида 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина, связанного с родамином В (DPPE-Rhod В). Как видно на рис. 24, липид встраивался в ПМ клеток, что позволило ее визуализировать.

Через 10 мин после добавления липида в клетке наблюдались везикулы, положительные по DPPE-Rhod В (рис. 24). Очевидно, что эти везикулы сформировались в результате интернализации в клетку участков ПМ и были производными эндоцитозного пути. В некоторых случаях эти везикулы содержали сигнал EEA1-EGFP. Однако, наблюдаемая колокализация EEA1 и DPPE-Rhod В являлась результатом кратковременного взаимодействия EEA1-везикул с липид-содержащими везикулами, поскольку, как видно на рис. 24, уже в среднем через 50 сек после взаимодействия EEA1-везикула отсоединялась от липид-содержащей везикулы. Через 90 мин добавления липида никаких структур, положительных одновременно по EEA1 и DPPE-Rhod В, в клетках не выявлялось, а обнаруживались лишь отдельные EEA1- и DPPE-Rhod В-положительные везикулы (рис. 24).

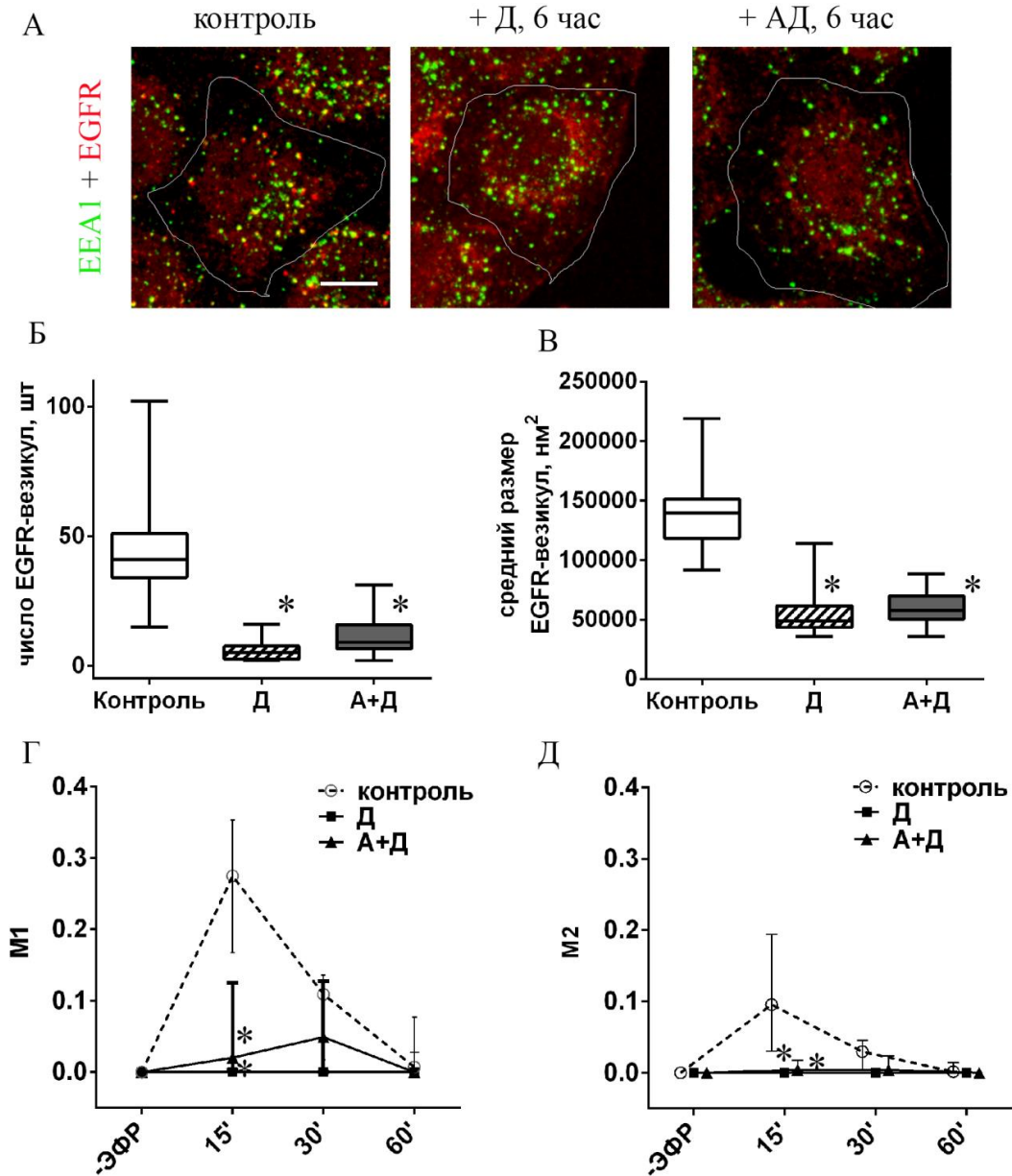


Рис. 23 Влияние амилорида и динасора на эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов

В клетках, инкубированных в присутствии динасора (Д) или динасора и амилорида (А+Д) в течение 6 ч, запускали эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов по схеме импульсной загрузки лиганда и оценивали распределение EEA1- и РЭФР-содержащих везикул через 15 мин после стимуляции эндоцитоза. А-иммунофлуоресцентное окрашивание: EEA1 (зеленый); EGFR (РЭФР, красный). Масштаб: 10 мкм. Б, В - количество и средний размер РЭФР-положительных везикул в этих клетках, соответственно. Г, Д - расчет коэффициентов колокализации М1 и М2, соответственно, в этих клетках. Звездочками обозначены достоверные отличия ($p < 0.05$) между параметрами РЭФР-содержащих везикул или их колокализацией с EEA1.

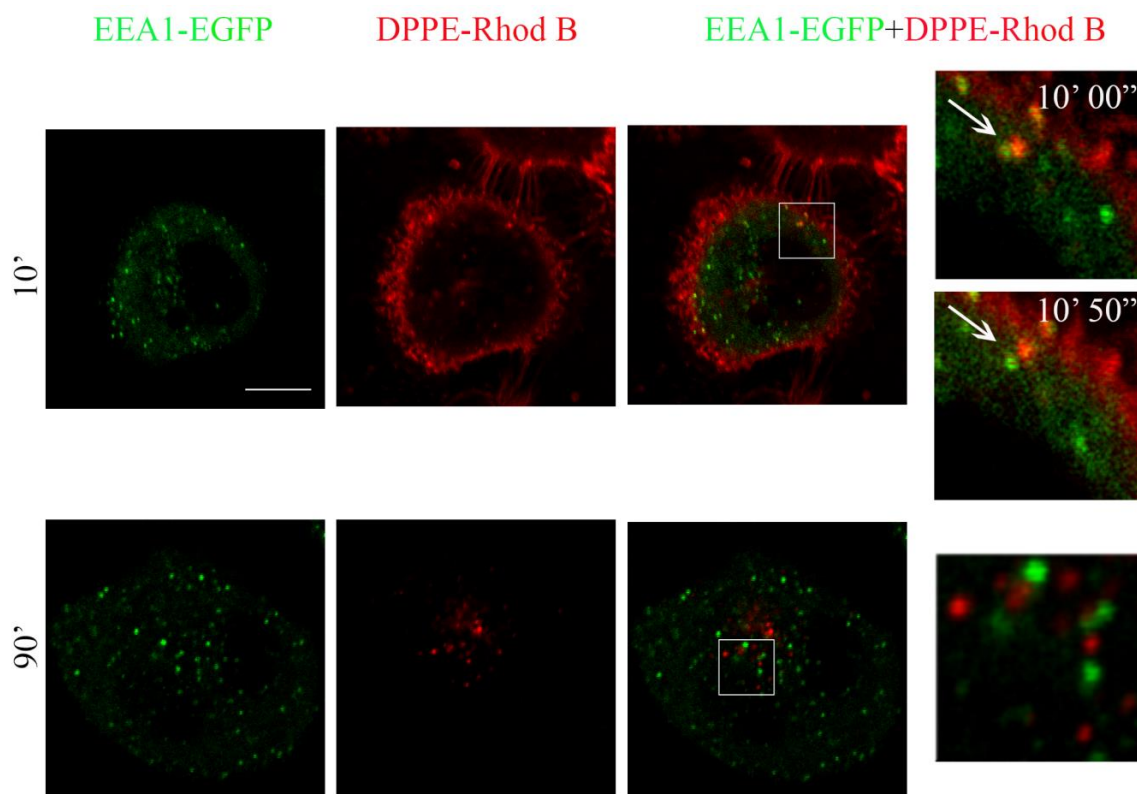


Рис. 24 Мечение клеточной мембраны липидом DPPE

Среду, содержащую липосомы, предварительно сформированные из липида 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (DPPE), меченого родамином В (Rhod В), добавляли к клеткам на 5 мин и с помощью прижизненной микроскопии наблюдали интернализацию участков ПМ в клетки в течение 10–90 мин. Правый верхний рисунок – участок клетки через 10 мин (10' 00'' – начало наблюдения) после добавления липида. Правый средний рисунок – участок той же клетки через 50 с (10' 50'') после начала наблюдения. Стрелками обозначены взаимодействующие друг с другом EEA1- и липид-содержащие везикулы. Правый нижний рисунок – участок клетки через 90 мин после добавления липида. Масштаб: 10 мкм (изображения целых клеток); 3 мкм (изображения выделенного участка клетки).

Наблюдаемое нами обособление EEA1-положительных везикул от метки ПМ через 90 мин после добавления DPPE-Rhod В-содержащих липосом противоречит гипотезе о том, что EEA-везикулы являются производными плазматической мембраны.

3.8 Роль биосинтетического пути в биогенезе EEA1-положительных везикул

Другим возможным путем происхождения EEA1-положительных везикул может являться биосинтетический путь – путь биогенеза липидов и мембранных белков всех компартментов клетки. Для проверки этой гипотезы мы использовали ингибитор биосинтетического пути брефельдин А (БФА), который блокирует путь из ЭПР в аппарат Гольджи, тем самым вызывая разрушение АГ.

Клетки предварительно культивировали в течение 12 ч в бессывороточных условиях, после чего к ним на 6 ч и 24 ч в тех же условиях добавляли Брефельдин А (рис. 25).

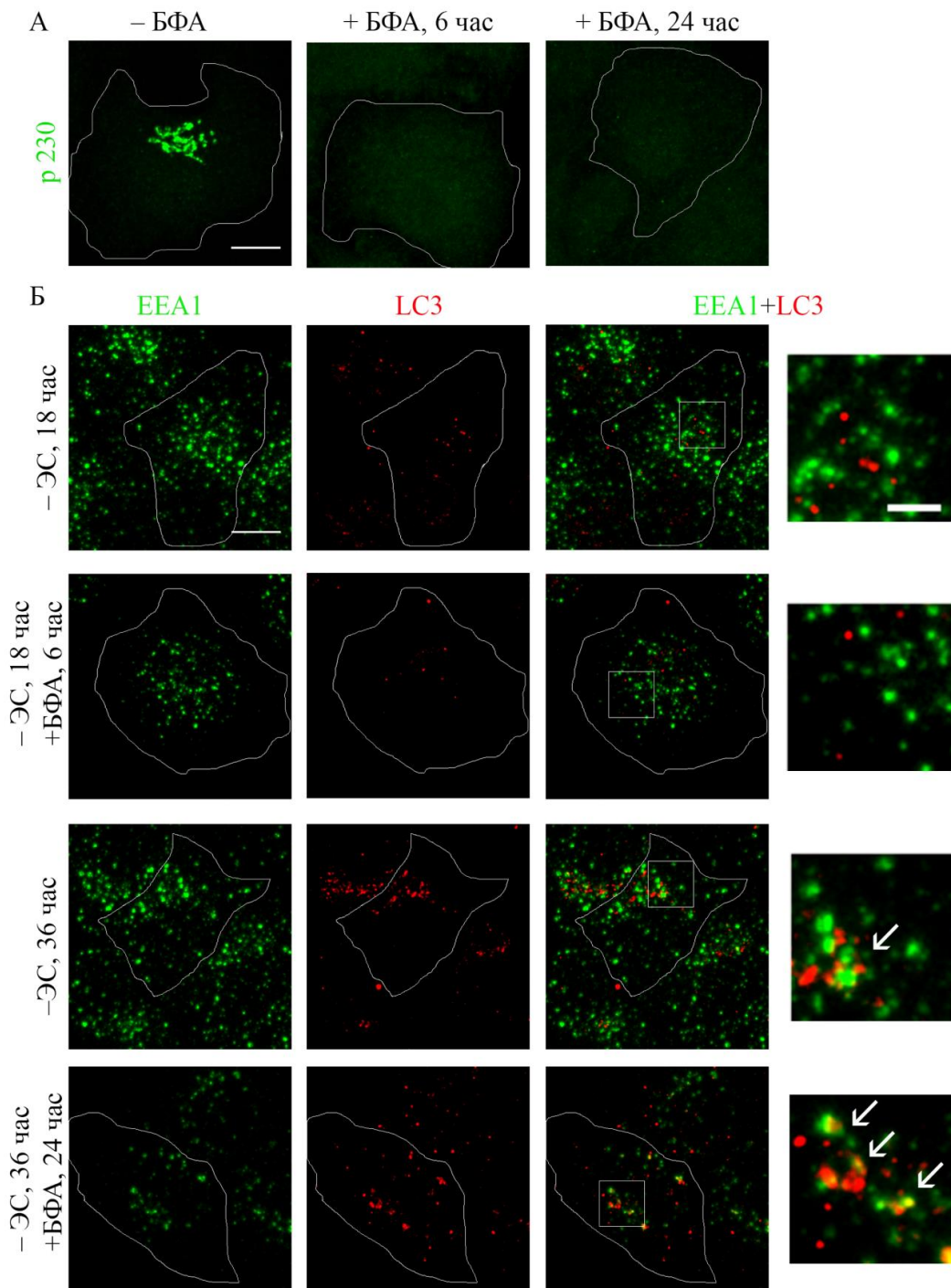


Рис. 25 Влияние брефельдина А на число и морфологию EEA1- и LC3-везикул. Иммунофлуоресценция. Конфокальная микроскопия. Клетки культивировали в условиях дефицита сыворотки (-ЭС) в присутствии брефельдина А (БФА) в среде для культивирования в течение 6 ч (+БФА, 6 ч) и 24 ч (+БФА, 24 ч) или в отсутствии ингибитора. Иммунофлуоресцентное мечение маркера транс-сети аппарата Гольджи p230 (А, зеленый); EEA1 (зеленый) и LC3 (красный) (Б) в этих клетках. Стрелками показаны структуры, содержащие одновременно сигналы EEA1 и LC3. Масштаб: 10 мкм (изображения целых клеток); 3 мкм (изображения выделенного участка клетки).

Методом иммунофлуоресценции оценивали число и средний размер EEA1-везикул. Для того чтобы проверить эффективность действия БФА, клетки окрашивали антителами против маркера транс-сети аппарата Гольджи p230. Действительно, через 6 и 24 ч после добавления Брефельдина А в клетках не выявлялась транс-сеть АГ (рис. 25, А). Мы обнаружили, что число EEA1-положительных везикул при 6 и 24 ч инкубации с БФА, а также их средний размер при 6 ч инкубации в присутствии ингибитора существенно снижались по сравнению с контрольными клетками (рис. 26, А, В).

Нельзя исключать того, что Брефельдин А может индуцировать в клетках процесс аутофагии. В связи с этим мы оценили колокализацию EEA1-положительных везикул с маркером аутофагосом LC3, а также число и средний размер LC3-везикул в клетках, инкубированных в присутствии Брефельдина А в течение 6 и 24 ч (рис. 25, Б; 26). Оказалось, что через 24 ч инкубации с БФА в клетках увеличивался средний размер LC3-везикул по сравнению с контрольными клетками, которые культивировали в бессывороточных условиях в течение 36 ч (рис. 26, Г). На этом же сроке возрастала степень колокализации EEA1 и LC3 (рис. 26, Д, Е). Напротив, при инкубации клеток в течение 6 ч в присутствии БФА никаких изменений в параметрах LC3-везикул, так же как и в степени колокализации EEA1 и LC3, выявлено не было (рис. 26, Б, Г, Д, Е).

Мы также оценили прохождение процесса эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в клетках, инкубированных в течение 6 ч в присутствии БФА (рис. 27). Оказалось, что количество РЭФР-положительных везикул в клетках несколько снижалось при действии БФА (рис. 27, В), однако в гораздо меньшей степени, чем при действии дианасора (рис. 23, Б). При этом коэффициент колокализации Мандерса М1 не отличался от контрольных значений (рис. 27, Г), хотя наблюдалось некоторое уменьшение коэффициента М2 (рис. 27, Д), что объясняется снижением общего количества РЭФР-положительных везикул в клетке.

Таким образом, мы обнаружили, что действие Брефельдина А приводило к уменьшению количества и среднего размера EEA1-положительных везикул. Этот эффект может объясняться участием биосинтетического пути в формировании и созревании EEA1-содержащих везикул.

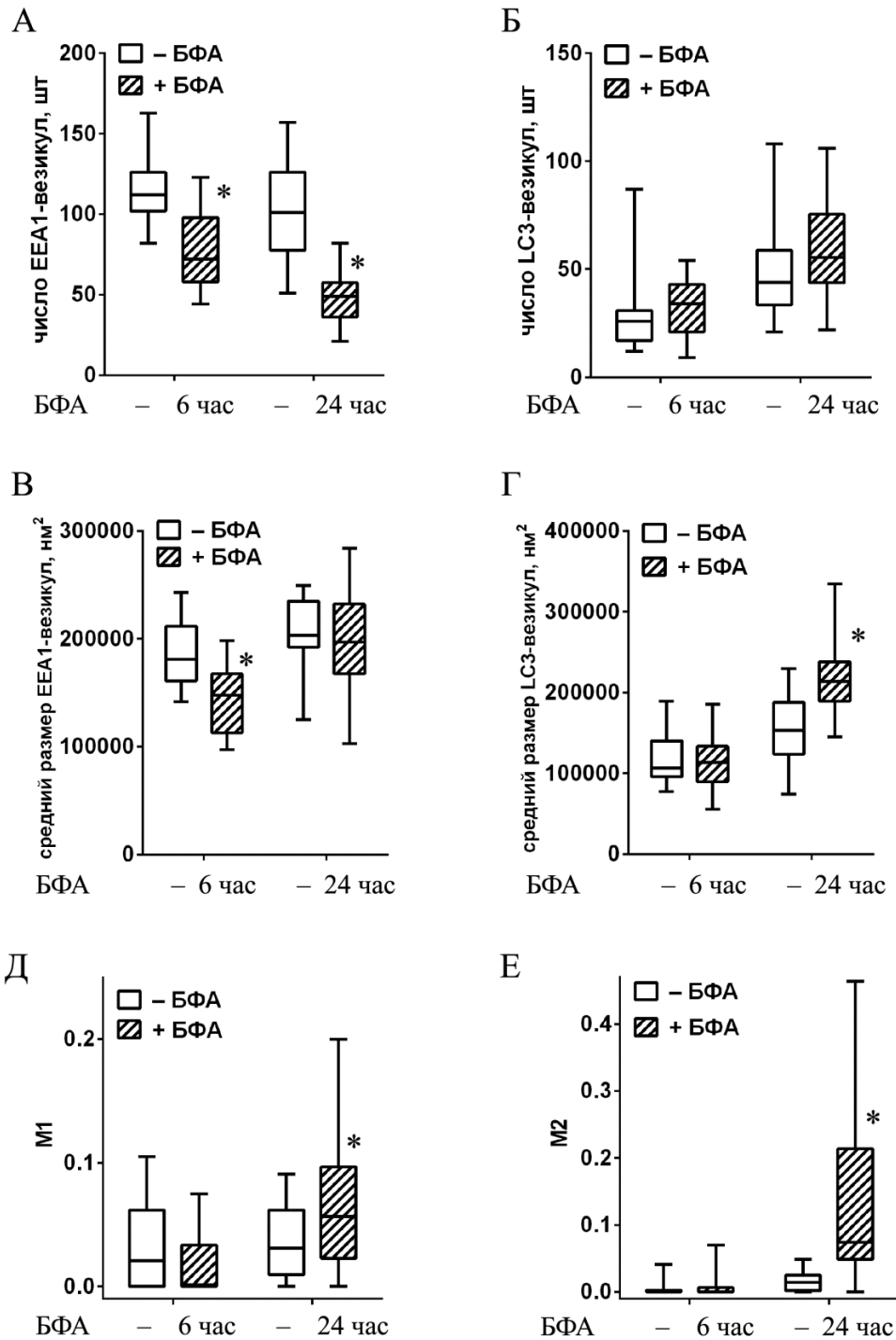


Рис. 26 Влияние брефельдина А на число, средний размер и степень колокализации EEA1- и LC3-везикул

В клетках, культивируемых в присутствии брефельдина А (БФА) в течение 6 ч или 24 ч, оценивали число (А, Б) и средний размер (В, Г) EEA1- и LC3-положительных везикул, соответственно. Оценивали также степень колокализации EEA1- и LC3-положительных везикул в этих клетках, рассчитывая коэффициенты Мандерса M1 (Д) и M2 (Е). Звездочками указаны достоверные отличия ($p < 0.05$).

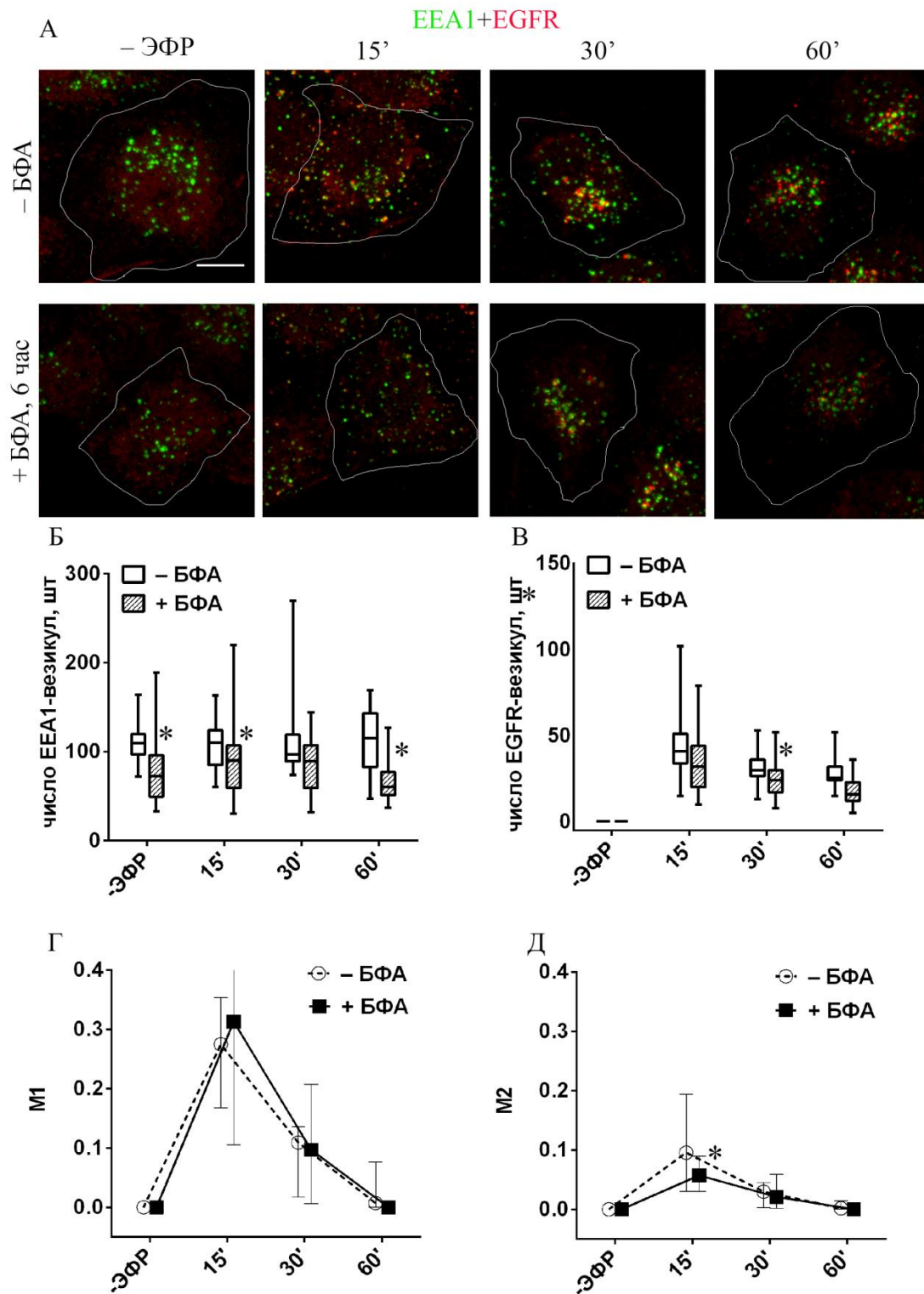


Рис. 27 Влияние брефельдина А на эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов

В клетках, культивируемых в присутствии брефельдина А (+БФА) в течение 6 ч, а также в контрольных клетках, не подвергавшихся действию ингибитора (–БФА), запускали эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов. А – иммунофлуоресцентное выявление EEA1 (зеленый) и РЭФР (красный) в этих клетках, фиксированных через 15, 30, 60 мин после добавления ЭФР. Масштаб–10 мкм. Оценивали число Б) EEA1- и В) РЭФР-содержащих везикул. Степень их колокализации оценивали, рассчитывая коэффициенты Манделера M1 (Г) и M2 (Д) в этих клетках. Звездочками указаны достоверные отличия ($p < 0.05$).

4. ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение механизмов эндоцитоза в клетках неразрывно связано с необходимостью понимания путей биогенеза эндосом. Еще в 90-х годах 20-го века были сформулированы две альтернативные точки зрения на эту проблему, которые были обобщены в гипотезе стабильных компартментов и гипотезе созревания эндосом. Гипотеза стабильных компартментов подразумевает, что груз покидает сформированную из ПМ везикулу, в составе которой он проникает в клетку, и последовательно перемещается в предсуществующие компартменты – сначала ранне-, а затем и позднеэндосомальный. Учитывая тот факт, что эти компартменты, как предполагается в соответствии с этой гипотезой, «предсуществуют», т.е. не возникают из ПМ каждый раз при интернализации груза, единственным возможным путем их формирования в клетке может быть только биосинтетический путь. Согласно альтернативной точке зрения – гипотезе созревания, – груз за время своего пути в клетке от ПМ до лизосомы находится в составе одной везикулы, которая постепенно изменяет свой состав и формирует внутренние пузырьки благодаря серии гомотипических слияний. В этом случае эндосомы представляются как временные структуры, которые происходят из ПМ. Современная теория биогенеза эндосом основывается на теории созревания. Действительно, процесс формирования МВТ из мембран ранних эндосом в настоящее время достаточно хорошо изучен и не подвергается сомнению.

Гипотеза созревания предполагает, что по мере созревания эндосом происходит постоянная замена белков, характерных для определенной стадии зрелости органеллы. Так, по современным представлениям, Rab5 рекрутируется из цитоплазмы на транспортную везикулу, несущую груз, на начальном этапе эндоцитоза. Эти представления основаны на экспериментальных данных, показывающих, что GEF для Rab5 RIN1 активируется при стимуляции тирозинкиназы РЭФР, что приводит к увеличению в клетке количества активных форм Rab5 (Barbieri et al., 2003). Согласно доминирующей гипотезе Rab5-Rab7 конверсии, при созревании эндосом Rab5 постепенно инактивируется в ходе гидролиза ГТФ и возвращается в цитоплазму, замещаясь на позднеэндосомальный Rab7, который, в свою очередь, привлекает свои эффекторы на мембрану поздней эндосомы (Rink et al., 2005).

Считается, что активированный Rab5 на мембране эндосом привлекает Vps34, фосфатидилинозитол-3 киназу, создающую на мембране эндосом фосфатидилинозитол-3-фосфат-обогащенные участки (Christoforidis et al., 1999). Наряду с Rab5, еще одним маркером ранних эндосом принято считать его эффектор EEA1, который выполняет функцию фактора дистанционного взаимодействия и опосредует первичное заякоривание

ранних эндосом, процесс, предшествующий SNARE-опосредованному слиянию. Тот факт, что основными мишенями связывания EEA1 на мембране эндосом является сам Rab5 и фосфатидилинозитол-3-фосфат (Stenmark et al., 1996), позволило предполагать, что EEA1 также привлекается на мембрану ранних эндосом из цитоплазмы при стимуляции эндоцитоза (Simonsen et al., 1998).

Таким образом, в том случае, если эти механизмы формирования ранней эндосомы и созревания из ранней эндосомы в позднюю верны, в клетках в ходе эндоцитоза РЭФР должен наблюдаться определенный ряд событий. Во-первых, в клетках, культивируемых продолжительное время в условиях дефицита сыворотки, т.е. в условиях, когда эндоцитозная активность минимальна, белок EEA1 должен располагаться преимущественно в цитоплазме, в то время как стимуляция эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов приводила бы к существенному увеличению доли EEA1, ассоциированного с мембраной эндосом. Во-вторых, на поздних этапах эндоцитоза в ходе прижизненной съемки наблюдалось бы постепенное снижение EEA1- и Rab5-зависимой флуоресценции на эндосомах, и, одновременно, ее увеличение в цитоплазме, а при анализе фиксированных клеток на этом этапе в клетках существенно уменьшалось бы количество EEA1-положительных везикул.

Факт преимущественно мембраной локализации EEA1 на иммунофлуоресцентных препаратах клеток, культивируемых в течение 12-24 ч в бессывороточных условиях (Злобина и др., 2014; Beas et al., 2012; Verma et al., 2015), заставил нас усомниться в справедливости этих представлений. Более того, стимуляция эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в этих клетках не приводила к существенным изменениям в количестве EEA1-положительных везикул (Злобина и др., 2013). Анализ процесса эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов на фиксированных клетках показал, что на 5-30 мин после добавления лиганда в клетках наблюдаются гибридные везикулы различной морфологии, имеющие доменную организацию и состоящие из EEA1- и РЭФР-положительных доменов. Наиболее интересным наблюдением являлось то, что через 60 мин после добавления к клеткам ЭФР в них выявлялись отдельные EEA1- и ЭФР-содержащие везикулы, не колокализованные друг с другом (Злобина и др., 2013).

Эти данные могут объясняться скорее взаимодействием предсуществующих EEA1-положительных везикул с транспортными ЭФР-содержащими везикулами, нежели рекрутированием EEA1 из цитоплазмы на ЭФР-содержащие везикулы. Анализ иммунофлуоресцентных препаратов, однако, не дает основания утверждать, что существует цикл взаимодействия EEA1-везикул с ЭФР-содержащими везикулами, и, соответственно, не доказывает, что EEA1-везикулы являются предсуществующим

стабильным компартментом, обеспечивающим ранние этапы эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Для того, чтобы это доказать, мы использовали несколько подходов.

Во-первых, мы оценили количество нативного EEA1 на мембранах в контрольных и стимулированных добавлением ЭФР клетках методом иммуоблоттинга. Выделение мембранных фракций этих клеток показало, что количество EEA1 в них не изменяется на различных этапах эндоцитоза, а также по сравнению с контрольными клетками, культивируемыми в бессывороточных условиях в течение 12 ч. Наши данные согласуются с работой, в которой добавление ЭФР к клеткам трех различных линий (MDCK, BT20, SKBR-3) не приводило к изменению соотношения EEA1 в цитоплазматической и мембранной фракциях клеток (Chen, Wang., 2001). Наши результаты по оценке количества EEA1 в клетках, обработанных дигитонином, полностью согласуются с данными выделения мембранных фракций. Обработав клетки этим детергентом, пермеабилizующим исключительно ПМ в данных условиях его инкубации, мы убирали из клеток компоненты цитозоля. Таким образом, та фракция EEA1, которая выявлялась в этих пробах, была связана с мембранами везикул. Отсутствие различий в количестве EEA1 в обработанных дигитонином в клетках, нестимулированных и предварительно стимулированных добавлением ЭФР, указывает на то, что соотношение цитоплазматического и мембранного пула EEA1 в клетках относительно постоянно и не зависит от эндоцитозной активности.

Следует отметить, что данные литературы относительно количества белка EEA1 в мембранных фракциях весьма противоречивы. Так, в одних исследованиях (Simonsen et al., 1998) EEA1 присутствует преимущественно в цитоплазматической фракции, в то время как в других (Lowe et al., 2003) основной пул белка выявляется в мембранных фракциях. Такое различие в данных может объясняться целым рядом причин. Так, не имея трансмембранных доменов и связываясь с эндосомальной мембраной лишь периферически, EEA1 при воздействии различных факторов в ходе субклеточного фракционирования, по-видимому, может терять связь с мембраной и оказываться в цитоплазматической фракции. Во-первых, одним из таких факторов может быть кислотность буфера. Было показано, что аффинность FYVE домена к фосфатидилинозитол-3-фосфату зависит от значений pH и максимальна при pH=6.0-6.6 (Lee et al., 2005). Во-вторых, количество EEA1 белка в мембранной фракции может зависеть также от соотношения объема клеток к объему буфера для фракционирования и от присутствия в буфере для центрифугирования компонентов АТФ-регенерирующей системы. Так, было показано, что EEA1 выявлялся на мембране фракций ранних эндосом

в присутствии цитозоля и АТФ-регенерирующей системы, в то время как на ранних эндосомах, инкубировавшихся предварительно в отсутствии этих компонентов, ЕЕА1 не детектировался в этих фракциях (Rubino et al., 2000). Этот эффект связан, скорее всего, с тем, что разбавление проб клеточных фракций в процессе центрифугирования уменьшает концентрацию в них компонентов, поддерживающих фосфорилирование в том числе Vps34 и ее продукта фосфатидилинозитол-3-фосфата, в результате чего равновесие связывания ЕЕА1 белка с мембраной эндосомы сдвигается в сторону его диссоциации.

Этим можно объяснить противоречие между данными иммунофлуоресценции, где ЕЕА1 выявляется преимущественно на мембранах везикул и данными иммуноблоттинга, где соотношение количества ЕЕА1 в мембранной и цитоплазматической фракции различно в разных литературных источниках. Поэтому оказывается затруднительным оценивать абсолютное количество ЕЕА1 в цитоплазматической и мембранной фракциях методом иммуноблоттинга. В наших экспериментах по обработке клеток детергентом дигитонином мы также выявили значительную разницу в количестве ЕЕА1 в тотальном лизате и в клетках, обработанных дигитонитом, что можно трактовать как то, что в клетках большая часть пула ЕЕА1 присутствует в цитоплазме. Однако, учитывая данные иммунофлуоресценции, этот результат может объясняться также другими причинами. Так, при добавлении дигитонина может происходить смещение равновесия в динамике связывания ЕЕА1 с мембраной в сторону его диссоциации в цитоплазматический пул при сильном разбавлении цитоплазмы вследствие пермеабилзации ПМ.

Очевидно, что, являясь периферически связанным с эндосомальными мембранами белком, ЕЕА1 не ассоциирован с мембраной постоянно, а пребывает в динамическом равновесии, циркулируя между цитоплазматическим и мембранным пулом. В соответствии с этим, оценив динамику ассоциации/диссоциации ЕЕА1 белка в контрольных и стимулированных добавлением ЭФР клетках методом FRAP, мы подтвердили, что ЕЕА1 в этих клетках представлен в основном подвижной (мобильной) фракцией. В единственном имеющемся в литературе исследовании кинетики ЕЕА1 авторы показали, что 80% пула этого белка присутствует в клетках MDCK в качестве мобильной фракции (Bergeland et al., 2008).

Следует отметить, что в цитируемом исследовании клетки линии MDCK трансфицировали CD74 антигеном, что вызывало слияние ранних эндосом друг с другом (Bergeland et al., 2008). Это позволяло получить эндосомы большего размера и меньшей подвижности, что облегчало проведение FRAP анализа. Действительно, при проведении экспериментов мы заметили, что ЕЕА1-везикулы в клетках очень подвижны. Так, лишь 11-12% из наблюдаемых нами в течение 2 мин ЕЕА1-везикул не уходили из фокуса, не

сливались и не разделялись. Тем не менее, несмотря на то, что это CD74-зависимое слияние не было опосредовано Rab5 и PI3P, такая модификация могла привести к изменению динамического равновесия EEA1 белка между цитоплазматическим и мембранным пулом. Поэтому во избежание возможных артефактов в нашем исследовании мы не проводили никаких дополнительных модификаций клеток.

Тот факт, что наши данные лучше описываются двухфазной моделью восстановления флуоресценции, может объясняться тем, что связывание EEA1 с мембраной зависит от двух факторов – как от присутствия и активности Rab5, так и от наличия PI3P-обогащенных доменов. Данные литературы о взаимоотношении Rab5 и PI3P весьма противоречивы. Было показано, что оверэкспрессия Rab5 увеличивает аффинность EEA1 к мембране, но в ту же очередь уменьшает зависимость мембранной локализации EEA1 от связывания с PI3P (Lawe et al., 2000). С другой стороны, было показано, что оверэкспрессия мутантной конститутивно активной формы Rab5 стабилизирует ассоциацию 2xFYVE конструкции с мембраной, т.е. активная форма Rab5 стабилизирует взаимодействие EEA1 с PI3P (Bergeland et al., 2008). Тем не менее, некоторые артефакты в оценке ассоциации EEA1 с мембранами из-за оверэкспрессии Rab5 также возможны.

В работе Bergeland и соавторов восстановление флуоресценции EEA1 описывалось в виде однофазной модели и выходило на плато менее чем за 20 сек после выжигания. Авторы показали, что восстановление флуоресценции EEA1 происходило быстрее в интерфазных клетках по сравнению с клетками, находящимися в метафазе, а также в интерфазных клетках мобильная фракция была меньше. Учитывая тот факт, что в процессе митоза происходит уменьшение эндоцитозной активности клеток (Boucrot, Kirchhausen, 2007), эти данные согласуются с установленным нами снижением мобильной фракции и увеличением времени полувосстановления флуоресценции для медленной кинетической компоненты при добавлении к клеткам ЭФР.

Можно предположить, что одной из причин наблюдаемого нами увеличения жизни EEA1 на мембране при стимуляции эндоцитоза РЭФР является усиление рекрутирования Rab5-ГТФ и увеличение уровня PI3P на EEA1-везикулах. Ранее мы обнаружили, что все яркие EEA1-везикулы в контрольных клетках содержат Rab5 (Злобина и др., 2013), однако неизвестно, находится ли Rab5 в ГТФ или ГДФ-связанной форме на этих везикулах. Интересно, что оверэкспрессия мутантной конститутивно активной формы ГТФ-Rab5 в CD74-трансфицированных клетках линии MDCK приводило к увеличению времени полувосстановления флуоресценции EEA1 только в 2 раза, от 14,7 до 24,8 сек (Bergeland et al., 2008). Таким образом, вероятно, что даже в контрольных клетках на поверхности EEA1-положительных везикул присутствует значительное количество активного ГТФ-

связанного Rab5. Так или иначе, инкубация клеток в присутствии ингибитора Vps34 вортманнина приводит к перераспределению большей части EEA1 в цитоплазматический пул (Lowe et al., 2002). С точки зрения общепризнанной модели рекрутирования Vps34 на мембрану везикул при активации Rab5, эти данные предполагают наличие активированного Rab5 как в стимулированных, так и в нестимулированных добавлением ЭФР клетках, но в разных соотношениях. С другой стороны, мы показали, что общее количество EEA1, ассоциированного с мембранами, не изменяется в ходе эндоцитоза. Это противоречит гипотезе о том, что увеличение времени жизни EEA1 на мембране при стимуляции эндоцитоза связано с возрастанием количества связывающих сайтов для белка EEA1. В связи с этим, наиболее вероятно, что причина наблюдаемого эффекта иная.

Учитывая тот факт, что при стимуляции эндоцитоза происходит образование кластеров взаимозаякоренных везикул, можно предполагать, что увеличение времени жизни EEA1 на мембране связано с увеличением доли EEA1, выполняющего функцию заякоривания. Как мы наблюдали при прижизненной съемке, в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов на его определенной стадии в клетках обнаруживаются агрегаты везикул, перемещающихся в клетке как единое целое, что указывает на то, что EEA1-везикулы в составе таких агрегатов заякорены между собой. Заякоривание везикул между собой в таких структурах сохраняется в течение продолжительного времени, что превышает время заякоривания в ходе гомотипического слияния ранних эндосом. Известно, что EEA1 белок, связываясь за счет FYVE и RBD-доменов на С-конце с PI3P и Rab5, соответственно, способен связываться за счет дополнительного RBD-домена на N-конце с Rab5, находящимся на мембране соседней ранней эндосомы, тем самым выполняя свою функцию заякоривания и сближения мембран двух везикул в ходе их гомотипического слияния. В этом случае EEA1 оказывается «замкнут» между двумя мембранами, что приводит к стабилизации его ассоциации с эндосомальными мембранами и отражается в увеличении времени полувосстановления флюоресценции EEA1 и снижении мобильной фракции в ходе FRAP анализа. Очевидно, что в заякоривании принимает участие не вся поверхность EEA1-везикулы, а только ее участок. Таким образом, в части везикулы, не задействованном в слиянии, динамика ассоциации/диссоциации EEA1 не должна изменяться. Таким образом, не исключая роли других факторов, мы предполагаем, что образование этих кластеров играет решающую роль в увеличении времени жизни EEA1 на мембране EEA1-положительных везикул при стимуляции эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.

В том случае, если EEA1-везикулы действительно предсуществуют в клетках и опосредуют эндоцитоз ЭФР-рецепторных комплексов, то в клетках при стимуляции

эндоцитоза должно наблюдаться два ключевых события: слияние предсуществующих ЕЕА1-везикул с транспортными ЭФР-содержащими везикулами на ранних этапах и сегрегация ЕЕА1- и ЭФР-положительных доменов гибридных эндосом на поздних этапах эндоцитоза. Для того, чтобы выяснить, происходят ли эти процессы в клетках, мы проанализировали процесс эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в ходе прижизненных наблюдений. На ранних этапах эндоцитоза мы наблюдали слияние в примембранной части клетки ЕЕА1-положительной везикулы с ЭФР-Су3-меченой транспортной везикулой, практически сразу после интернализации последней с ПМ. Отсутствие ЭФР-Су3 сигнала в составе ЕЕА1-везикулы до ее взаимодействия с ЭФР-содержащей транспортной везикулой указывает на то, что данная ЕЕА1-везикула не сформировалась ранее в результате интернализации в клетку ЭФР-рецепторных комплексов. При этом не происходило постепенного увеличения ЕЕА1-сигнала на ЭФР-содержащей везикуле, что говорило бы о рекрутировании ЕЕА1 белка ЭФР-содержащую везикулу из цитоплазмы.

На поздних этапах эндоцитоза мы наблюдали в клетках процесс расхождения (сегрегации) доменов ЕЕА1- и ЭФР-положительных везикул. Мы заметили, что сегрегация осуществлялась путем отделения ЭФР-содержащего домена гибридной везикулы, после чего он довольно быстро перемещался в сторону от ЕЕА1-везикулы, в то время как сама ЕЕА1-везикула практически не изменяла своего местоположения, т.е. именно ЭФР-содержащий домен выделялся из состава гибридной везикулы. Очевидно, что в процессе сегрегации ЭФР-содержащий домен выделяется из состава гибридной эндосомы вместе с внутренними пузырьками, поскольку к 60 мин после стимуляции эндоцитоза в клетках ЕЕА1-везикулы не содержали ЭФР-рецепторных комплексов. В связи с этим логично предположить, что существует механизм, обеспечивающий заякоривание внутренних пузырьков с внешней мембраной МВТ. Это позволяет МВТ «собирать» все внутренние пузырьки в процессе сегрегации и высвобождать их из состава гибридной эндосомы. До последнего времени этот механизм оставался непонятным, однако недавние исследования позволяют предположить, что заякоривание внутренних пузырьков с внешней мембраной МВТ может осуществляться за счет белка тетерина (Edgar et al., 2016).

Подтверждая существование в клетках процесса сегрегации, мы противоречим гипотезе т.н. «канонической» или постепенной Rab5-Rab7 конверсии, согласно которой замена Rab5 на Rab7 осуществляется постепенно путем рекрутирования Rab7 и возвращения Rab5 в цитоплазматический пул. Поэтому нашей следующей задачей было выяснить, каким образом осуществляется замена Rab5 на Rab7 на поверхности ЭФР-

содержащей везикулы в этих клетках ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Во-первых, мы показали, что на 30 мин после добавления ЭФР по сравнению с 15 мин в клетках возрастает количество структур, содержащих одновременно Rab7/EEA1/ЭФР и Rab5/Rab7/ЭФР. Таким образом, Rab7 привлекается на гибридные везикулы еще до начала процесса сегрегации. Наличие на определенном этапе созревания одновременно Rab5 и Rab7 на мембране эндосомы согласуется также и с описанным в литературе процессом постепенной Rab5-Rab7 конверсии, согласно которому рекрутирование Rab7 происходит незадолго до потери эндосомой Rab5 (Rink et al., 2005). Увеличение количества ЭФР-содержащих эндосом, колокализированных с Rab7, но не EEA1, уже на 30 мин эндоцитоза по сравнению с 15 мин указывает на то, что к 30 мин процесс сегрегации в клетках начался, а также позволяет предполагать, что сегрегация непосредственно следует за процессом рекрутирования Rab7 или происходит параллельно с ним. Это предположение подтвердилось в ходе прижизненной съемки, когда мы наблюдали отщепление ЭФР-содержащей эндосомы от EEA1-везикулы вскоре после приобретения ЭФР-содержащей везикулой Rab7.

Наиболее важным наблюдением являлось то, что Rab5 уходил с поверхности ЭФР-содержащей эндосомы в составе EEA1-содержащей везикулы. Таким образом, именно сегрегация Rab5⁺EEA1⁺ везикул от ЭФР-содержащей эндосомы, положительной по Rab7 является тем механизмом, в ходе которого происходит смена Rab5 на Rab7 на эндосомах в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Подобный механизм замены Rab5 на Rab7 наблюдался также в ходе эндоцитоза вируса леса Семлики в клетках линии Vero (Vonderheit, Helenius, 2005). Известно, что этот вирус проникает в клетки с помощью клатрин-опосредованного эндоцитоза (DeTulleo, Kirchhausen, 1998), используя для этого ряд поверхностных гликопротеинов, таких как HLA-A и HLA-B, в качестве своих рецепторов (Helenius et al., 1978), что приводит в дальнейшем к деградации вирусных частиц в лизосомах (Dee et al., 1995). Авторы показали, что через 20 мин после интернализации вируса в клетку возрастало количество вирус-содержащих эндосом, положительных также по EEA1 и Rab7. Анализируя эндоцитоз вирусных частиц с помощью прижизненной микроскопии, авторы наблюдали процесс разделения гибридной эндосомы на Rab7-положительную эндосому, содержащую вирусные частицы и на Rab5-положительные везикулы (Vonderheit, Helenius, 2005), что было очень схоже с наблюдаемым нами процессом сегрегации.

Однако, существование механизма «канонической» Rab5-Rab7 конверсии также было убедительно показано в ряде статей (Rink et al., 2005; Poteryaev et al., 2010). Более того, был также предложен молекулярный механизм этого процесса, согласно которому

Sand1/Mon комплекс возвращает GEF для Rab5 Rabex5 в цитоплазматический пул (Poteryaev et al., 2010), и в то же самое время привлекает к эндосомальной мембране и активирует Rab7 (Yousefian et al., 2013; Yasuda et al., 2016).

Мы предполагаем, что возможной причиной таких противоречий в литературных данных может являться природа груза. Так, процесс постепенной Rab5-Rab7 конверсии наблюдался при интернализации LDL (Rink et al., 2005) или БСА (Poteryaev et al., 2010). Известно, что БСА проникает в клетку непечечного происхождения пассивно, а LDL вскоре после интернализации в составе лиганд-рецепторного комплекса диссоциирует от своего рецептора, что приводит к рециклированию рецептора LDL обратно на ПМ и деградации самого лиганда в лизосомах (Brown et al., 1982). Таким образом, эти грузы, в отличие от РЭФР и вирусных частиц, не могут регулировать собственный эндоцитоз и пассивно направляются на путь деградации. Напротив, в процессе эндоцитоза РЭФР формируется эндосома с доменной организацией, что, как мы предполагаем, в дальнейшем дает возможность для прохождения процесса сегрегации ЕЕА1 и РЭФР-содержащих доменов друг от друга.

Мы не нашли в литературе данных, которые бы описывали механизм замены Rab5 на Rab7 в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Однако наши данные косвенно подтверждаются тем фактом, что подавление функции динамина блокирует выход ЭФР-рецепторных комплексов из ранних эндосом (Driskell et al., 2007; Mesaki et al., 2011). Действительно, если в процессе эндоцитоза именно сегрегация является тем механизмом, за счет которого ЭФР-содержащая везикула теряет ЕЕА1, этот процесс должен зависеть от белков и белковых комплексов, осуществляющих разделение мембран. Наши данные также указывают на то, что ингибитор динамина динасор блокирует процесс сегрегации ЕЕА1- и ЭФР-положительных везикул. Кроме того, мы обнаружили, что помимо динамина в процессе сегрегации принимает участие Arp2/3 комплекс, поскольку добавление его ингибитора приводило к сохранению значительного количества гибридных ЕЕА1- и ЭФР-содержащих везикул даже на 60 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Кроме того, кортактин, по-видимому, также участвует в этом процессе, поскольку он часто был сопряжен с гибридными везикулами к началу момента сегрегации (30') обнаруживался между ЕЕА1 и ЭФР-содержащими доменами эндосом. Все эти белки часто работают вместе и опосредуют процессы отделения клатрин-окаймленных ямок от ПМ (Merrifield et al., 2004; Merrifield et al., 2005), а также участвуют в процессе рециклирования тубулярной части эндосом от их везикулярной части (Derivery et al., 2009; Ohashi et al., 2011). Важным результатом работы Arp2/3 комплекса и кортактина является сборка динамичной сети актиновых филаментов

в участке, где впоследствии произойдет отделение двух мембран. Показано, что полимеризация актиновых филаментов может создавать дополнительное механическое напряжение, которое приведет к реорганизации липидных бислоев, изменении кривизны мембраны и сегрегации (Römer et al., 2010). Таким образом, согласованная работа Agr2/3 комплекса, динамина, кортактина и полимеризация актиновых филаментов, по-видимому, является универсальным механизмом сегрегации мембран везикул на разных участках эндоцитозного пути.

Если EEA1-везикулы действительно являются компартментом, то они должны формироваться, как и другие компартменты клетки, из аппарата Гольджи. Для того, чтобы EEA1-везикулы можно было бы определить как компартмент, необходимо было выяснить их биогенез.

В связи с этим следует еще раз подчеркнуть, что качестве контроля при проведении экспериментов мы использовали клетки, культивируемые в условиях дефицита сыворотки в течение 12 ч. Это позволяло снизить уровень лиганд-стимулируемого рецептор-опосредованного эндоцитоза и избежать побочных эффектов компонентов сыворотки, связанных с нежелательной активацией в контрольных клетках рецепторов ростовых факторов и гормонов. Однако, известно, что истощение инкубационной среды по факторам сыворотки приводит к активации в клетках процесса аутофагии. В ходе этого процесса донорный компартмент, которым может быть ЭПР, аппарат Гольджи, а также эндосомы (Lamb et al., 2013b) дает начало мембранам аутофагосомы. Окончательное же созревание аутофагосомы может осуществляться также с участием эндосом, в том числе ранних, поскольку аутофагосомы могут быть положительны по EEA1 (Berg et al., 1998; Razi et al., 2009).

Поэтому логично было предположить, что наблюдаемые нами EEA1-положительные везикулы в контрольных клетках могут быть аутофагосомами. Однако анализ колокализации EEA1 и маркера аутофагосом LC3 в клетках, культивируемых в бессывороточных условиях в течение 12-36 ч, опроверг эту гипотезу. Действительно, небольшое увеличение количества аутофагосом и их колокализации с EEA1 наблюдалось лишь в клетках, подвергавшихся сывороточному голоданию в течение 36 ч. Однако даже в этом случае абсолютные значения критерия колокализации по Мандерсу оставались крайне низкими (не более 0.05) и могут быть интерпретированы как отсутствие колокализации (Manders et al., 1993). Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, согласно которым в клетках, культивируемых в среде с оптимальным содержанием сыворотки, EEA1 и LC3 практически не колокализуются (Schmid et al., 2007), а при индукции сывороточного голодания их колокализация

возрастает незначительно (Razi et al., 2009). Таким образом, полученные данные указывают на то, что ЕЕА1-везикулы не являются аутофагосомами и имеют иное происхождение.

Несмотря на то, что рецептор-опосредованный эндоцитоз минимизирован в клетках, культивируемых в бессывороточных условиях, остаточный эндоцитоз все же может происходить. Более того, теоретически, ЕЕА1-везикулы могут образовываться в результате конститутивного эндоцитоза. Поэтому следующим шагом для выяснения пути происхождения ЕЕА1-везикул была оценка роли эндоцитозного пути в этом процессе. Первым способом достижения этой цели было использование ингибиторов динамин-зависимого и конститутивного эндоцитоза. Для подавления конститутивного эндоцитоза мы использовали его традиционный ингибитор 5-(N,N)-гексаметиленамилорид (Koivusalo et al., 2010). Показано, что добавление амилорида блокирует работу Na⁺/H⁺-обменников на плазматической мембране, что приводит к снижению субмембранного pH и подавляет активацию Rac1 и cdc42 (Koivusalo et al., 2010), которые опосредуют образование макропиносом (Kerr et al., 2009). Для подавления динамин-зависимого эндоцитоза мы применяли динасор. Мы добавляли эти ингибиторы на 6 ч для того, чтобы те грузы, которые поступили в эндосомы до добавления ингибиторов, успели деградировать за это время в лизосомах. Таким образом, в случае, если бы ЕЕА1-везикулы были производными эндоцитозного пути, их количество должно было бы существенно уменьшаться при действии ингибиторов. Однако, инкубация клеток в присутствии динасора или комбинации двух ингибиторов в течение 6 ч не приводила к уменьшению количества и среднего размера ЕЕА1-везикул. Наши данные согласуются с другими наблюдениями, согласно которым подавление экспрессии динамина 2 на 90% не влияло на количество ЕЕА1-везикул, хотя полностью ингибировало интернализацию LDL (Zeigerer et al., 2012). Авторы предполагают, что этот эффект был связан с индукцией в клетках компенсаторных динамин-независимых механизмов эндоцитоза. Однако в нашем случае подавление жидкофазного эндоцитоза никак не влияло на популяцию ЕЕА1-везикул в клетках. Более того, интернализация липида 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина в составе ПМ в клетки не приводила к обогащению ЕЕА1-везикул этим липидом. Если бы ЕЕА1-везикулы являлись производными ПМ, через 90 мин после добавления липида они были бы практически полностью колокализированы с ним, однако этого не наблюдалось. Таким образом, мы пришли к заключению о том, что ЕЕА1-везикулы не являются продуктом эндоцитозного пути, и, соответственно с этим, не происходят из ПМ.

Еще одним из предполагаемых путей биогенеза EEA1-везикул может являться биосинтетический путь. Для подавления биосинтетического пути мы применяли Брефельдин А, добавляя его к клеткам на 6 и 24 ч. Однако, мы выяснили, что, хотя культивирование клеток в присутствии ингибитора в течение 24 ч значительно снижало число EEA1-везикул, в то же время вызывало индукцию в клетках аутофагии и приводило к появлению аутофагосом, обогащенных белком EEA1. В работах других авторов также показано, что длительное воздействие Брефельдином А является фактором стресса, приводящим к рекрутированию LC3 на поверхность формирующейся аутофагосомы (Kouroku et al., 2007).

Однако 6 ч инкубация с Брефельдином А не вызывала индукции аутофагии. При этом число и средний размер EEA1-везикул снижались по сравнению с необработанными клетками, но количество везикул изменялось не так значительно, как при 24 час инкубации с ингибитором. Таким образом, биогенез EEA1-везикул, по-видимому, опосредован транспортом из транс-сети аппарата Гольджи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с полученными данными складывается представление о ЕЕА1-положительных везикулах как об отдельном предсуществующем компартменте, который обеспечивает ранние стадии эндоцитозного пути поступающих в клетку грузов. По всей видимости, ЕЕА1-везикулы специализируются на грузе, направляемом по пути деградации. Действительно, функция такого компартмента может заключаться в обеспечении путем слияний увеличения поверхности мембраны эндосомы, необходимого для формирования внутренних пузырьков МВТ с грузом, направляемым на деградацию. Так, было показано, что ЕЕА1-везикулы очень непродолжительное время взаимодействуют с трансферрином, грузом, который конститутивно интернализуется в клетки через рецептор-опосредованный механизм, но рециклирует на ПМ, избегая деградации в лизосомах (Leonard et al., 2008). Мы полагаем, что ЕЕА1-везикулы формируются через биосинтетический путь, характерный для биогенеза всех клеточных компартментов за исключением митохондрий. Таким образом, ЕЕА1-везикулы можно рассматривать как везикулярный компартмент, который и является «истинными» ранними эндосомами», в то время как интернализирующиеся с ПМ везикулярные структуры, несущие груз, следует называть транспортными везикулами. Можно также предполагать, что Rab7-обогащенные структуры, по аналогии с ЕЕА1-везикулами, являются постоянно существующим компартментом, который обеспечивает непосредственно доставку груза в лизосомы, однако это предположение требует дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Методом прижизненной съемки впервые показано, что при стимуляции эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов вновь формируемые ЭФР-содержащие структуры сливаются с предсуществующими ЕЕА1-везикулами.
2. Кинетика ассоциации ЕЕА1 с мембраной везикул зависит от стимуляции рецептор-опосредованного эндоцитоза в клетках. При запуске эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов происходит снижение скорости обмена части молекул белка ЕЕА1 между его цитоплазматическим и мембранным пулом, при этом количество связанного с мембранами ЕЕА1 не изменяется. Изменение кинетики ассоциации ЕЕА1 с мембраной может быть связано с увеличением доли молекул ЕЕА1, вовлеченных в формирование контактов между везикулами.
3. Впервые продемонстрирован процесс сегрегации, в ходе которого ЭФР-содержащий домен выделяется из состава гибридной везикулы с участием динамина и Агр2/3-зависимой актиновой сети.
4. В процессе сегрегации Rab5 покидает гибридную эндосому в составе ЕЕА1-везикулы, тогда как Rab7 ассоциируется с ЭФР-содержащим доменом. Таким образом, процесс сегрегации может рассматриваться в качестве механизма Rab5-Rab7 конверсии.
5. ЕЕА1-везикулы не являются производными процесса аутофагии или продуктом эндоцитозного пути, тогда как подавление биосинтетического пути уменьшает количество ЕЕА1-везикул. Это позволяет предполагать, что именно биосинтетический путь является источником популяции ЕЕА1-везикул.
6. Полученные нами данные позволяют рассматривать ЕЕА1-везикулы как долгоживущий везикулярный компартмент, функция которого состоит в обеспечении слияний везикул с грузом, направляемым на деградацию в лизосомы. В этом контексте сами РЭФР-содержащие эндосомы являются транспортными везикулами, переносящими груз от плазматической мембраны к предсуществующим ранним ЕЕА1-положительным эндосомам и далее к лизосомам.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Злобина М. В., Каменцева Р. С., Корнилова Е. С., Харченко М. В. (2014). Анализ субпопуляций везикул, несущих аутоантиген ранних эндосом ЕЕА1. *Цитология*, 56(10): 741-748.
2. Злобина М.В., Харченко М.В., Корнилова Е.С. 2013. Анализ динамики эндоцитоза рецептора ЭФР на основе обработки изображений, полученных с помощью конфокальной световой микроскопии на фиксированных клетках. *Цитология*, 55(5): 348–357.
3. Надеждина Е. С., Фокин А. И., Бураков А. В. (2013). Аппарат Гольджи и его роль в организации микротрубочек в клетках. В: Роль цитоскелета в жизнедеятельности культивируемых клеток. Изд-во Политехн. Ун-та. Сборник статей. С. 116-128.
4. Пинаев, Г. П. (2009). Сократительные системы клетки: от мышечного сокращения к регуляции клеточных функций. *Цитология*, 51(3), 172-181.
5. Пупышев, А. Б. (2014). Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки. Функциональные и регуляторные аспекты. *Цитология*, 56(3), 179-196.
6. Хайтлина С. Ю. (2013). Полимеризация актина и внутриклеточный транспорт. В: Роль цитоскелета в жизнедеятельности культивируемых клеток. Изд-во Политехн. Ун-та. Сборник статей. С. 49-62.
7. Черноиваненко И. С., Минин А. А. (2013). Промежуточные филаменты. Структура и функции. В: Роль цитоскелета в жизнедеятельности культивируемых клеток. Изд-во Политехн. Ун-та. Сборник статей. С. 141-155.
8. Шаназаров, Н. А., Сабиров, А. Х., & Сироткина, С. М. (2009). Роль эпидермального фактора роста и его рецептора в канцерогенезе: молекулярные механизмы их действия. *Российский биотерапевтический журнал*, 8(4).С. 85-90.
9. Alers, S., Löffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and cellular biology*, 32(1), 2-11.
10. Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M. C., & Zerial, M. (1994). Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *The EMBO journal*, 13(22), 5262-5273.
11. Amann, K. J., & Pollard, T. D. (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15009-15013.

12. Anderson, R. G., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell*, 10(3), 351-364.
13. Antonin, W., Holroyd, C., Tikkanen, R., Höning, S., & Jahn, R. (2000). The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Molecular biology of the cell*, 11(10), 3289-3298.
14. Antonny, B., & Schekman, R. (2001). ER export: public transportation by the COPII coach. *Current opinion in cell biology*, 13(4), 438-443.
15. Appenzeller-Herzog, C., & Hauri, H. P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *Journal of cell science*, 119(11), 2173-2183.
16. Balderhaar, H. J., & Ungermann, C. (2013). CORVET and HOPS tethering complexes—coordinators of endosome and lysosome fusion. *Journal of cell science*, 126(6), 1307-1316.
17. Barbieri, M. A., Kong, C., Chen, P. I., Horazdovsky, B. F., & Stahl, P. D. (2003). The SRC homology 2 domain of RIN1 mediates its binding to the epidermal growth factor receptor and regulates receptor endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32027-32036.
18. Barbieri, M. A., Roberts, R. L., Gumusboga, A., Highfield, H., Alvarez-Dominguez, C., Wells, A., & Stahl, P. D. (2000). Epidermal growth factor and membrane trafficking Egf receptor activation of endocytosis requires Rab5a. *The Journal of cell biology*, 151(3), 539-550.
19. Barlowe, C., & Schekman, R. (1993). SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature*, 365(6444), 347-349.
20. Beas, A. O., Taupin, V., Teodorof, C., Nguyen, L. T., Garcia-Marcos, M., & Farquhar, M. G. (2012). Gas promotes EEA1 endosome maturation and shuts down proliferative signaling through interaction with GIV (Girdin). *Molecular biology of the cell*, 23(23), 4623-4634.
21. Berg, T. O., Fengsrud, M., Strømhaug, P. E., Berg, T., & Seglen, P. O. (1998). Isolation and Characterization of Rat Liver Amphisomes EVIDENCE FOR FUSION OF AUTOPHAGOSOMES WITH BOTH EARLY AND LATE ENDOSOMES. *Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 21883-21892.
22. Bergeland, T., Haugen, L., Landsverk, O. J., Stenmark, H., & Bakke, O. (2008). Cell-cycle-dependent binding kinetics for the early endosomal tethering factor EEA1. *EMBO reports*, 9(2), 171-178.

23. Bethoney, K. A., King, M. C., Hinshaw, J. E., Ostap, E. M., & Lemmon, M. A. (2009). A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(32), 13359-13364.
24. Bi, X., Corpina, R. A., & Goldberg, J. (2002). Structure of the Sec23/24–Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*, 419(6904), 271-277.
25. Bolte, S., & Cordelieres, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*, 224(3), 213-232.
26. Bonfanti, L., Mironov, A. A., Martínez-Menárguez, J. A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., ... & Luini, A. (1998). Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell*, 95(7), 993-1003.
27. Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2), 153-166.
28. Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2008). Retromer. *Current opinion in cell biology*, 20(4), 427-436.
29. Botelho, R. J. (2009). Changing phosphoinositides “on the fly”: how trafficking vesicles avoid an identity crisis. *Bioessays*, 31(10), 1127-1136.
30. Boucrot, E., & Kirchhausen, T. (2007). Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 7939-7944.
31. Brandhorst, D., Zwillig, D., Rizzoli, S. O., Lippert, U., Lang, T., & Jahn, R. (2006). Homotypic fusion of early endosomes: SNAREs do not determine fusion specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2701-2706.
32. Brown, M. S., Anderson, R. G. W., Basu, S. K., & Goldstein, J. L. (1982). Recycling of cell-surface receptors: observations from the LDL receptor system. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 46, 713-721.
33. Burgos, P. V., Mardones, G. A., Rojas, A. L., Luis, L. P., Prabhu, Y., Hurley, J. H., & Bonifacino, J. S. (2010). Sorting of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex. *Developmental cell*, 18(3), 425-436.
34. Callaghan, J., Simonsen, A., Gaullier, J. M., Ban-Hock, T. O. H., & Stenmark, H. (1999). The endosome fusion regulator early-endosomal autoantigen 1 (EEA1) is a dimer. *Biochemical Journal*, 338(2), 539-543.
35. Cantalupo, G., Alifano, P., Roberti, V., Bruni, C. B., & Bucci, C. (2001). Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *The EMBO Journal*, 20(4), 683-693.

36. Carpenter, G., & Cohen, S. (1979). Epidermal growth factor. *Annual review of biochemistry*, 48(1), 193-216.
37. Caviston, J. P., & Holzbaur, E. L. (2006). Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends in cell biology*, 16(10), 530-537.
38. Chen, J. L., Fucini, R. V., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Stamnes, M. (2005). Coatamer-bound Cdc42 regulates dynein recruitment to COPI vesicles. *The Journal of cell biology*, 169(3), 383-389.
39. Chen, Y. A., & Scheller, R. H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(2), 98-106.
40. Chen, X., & Wang, Z. (2001). Regulation of intracellular trafficking of the EGF receptor by Rab5 in the absence of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *EMBO reports*, 2(1), 68-74.
41. Chew T-L. Some Thoughts on Fluorescence Recovery Analysis (2014). [Электронный ресурс] // *Microscopy matters: Insights from the Advanced Imaging Center at Janelia*.. URL: <http://aicblog.janelia.org/?p=8> (дата обращения 1.07.2016)
42. Choudhury, A., Dominguez, M., Puri, V., Sharma, D. K., Narita, K., Wheatley, C. L., ... & Pagano, R. E. (2002). Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *The Journal of clinical investigation*, 109(12), 1541-1550.
43. Christoforidis, S., Miaczynska, M., Ashman, K., Wilm, M., Zhao, L., Yip, S. C., ... & Zerial, M. (1999). Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nature cell biology*, 1(4), 249-252.
44. Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., & Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell*, 109(4), 523-535.
45. Cosen-Binker, L. I., & Kapus, A. (2006). Cortactin: the gray eminence of the cytoskeleton. *Physiology*, 21(5), 352-361.
46. Dee, K. U., Hammer, D. A., & Shuler, M. L. (1995). A model of the binding, entry, uncoating, and RNA synthesis of Semliki Forest virus in baby hamster kidney (BHK-21) cells. *Biotechnology and bioengineering*, 46(5), 485-496.
47. de Melker, A. A., van der Horst, G., & Borst, J. (2004). Ubiquitin ligase activity of c-Cbl guides the epidermal growth factor receptor into clathrin-coated pits by two distinct modes of Eps15 recruitment. *Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55465-55473.

48. Deacon, S. W., Serpinskaya, A. S., Vaughan, P. S., Fanarraga, M. L., Vernos, I., Vaughan, K. T., & Gelfand, V. I. (2003). Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *The Journal of cell biology*, 160(3), 297-301.
49. DeLuca-Flaherty, C., McKay, D. B., Parham, P., & Hill, B. L. (1990). Uncoating protein (hsc70) binds a conformationally labile domain of clathrin light chain LC a to stimulate ATP hydrolysis. *Cell*, 62(5), 875-887.
50. Derivery, E., Sousa, C., Gautier, J. J., Lombard, B., Loew, D., & Gautreau, A. (2009). The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Developmental cell*, 17(5), 712-723.
51. Desai, A., & Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology*, 13(1), 83-117.
52. DeTulleo, L., & Kirchhausen, T. (1998). The clathrin endocytic pathway in viral infection. *The EMBO Journal*, 17(16), 4585-4593.
53. Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annual review of biophysics*, 40, 169-186.
54. Dougherty, P. (2005). Extensions of DAMAS and benefits and limitations of deconvolution in beamforming, *11th AIAA/CEAS Aeroacoustics Conference*. (doi: 10.2514/6.2005-2961).
55. Driskell, O. J., Mironov, A., Allan, V. J., & Woodman, P. G. (2007). Dynein is required for receptor sorting and the morphogenesis of early endosomes. *Nature Cell Biology*, 9(1), 113-120.
56. Dumas, J. J., Merithew, E., Sudharshan, E., Rajamani, D., Hayes, S., Lawe, D., ... & Lambright, D. G. (2001). Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Molecular cell*, 8(5), 947-958.
57. Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(4), 723-C742.
58. Dunn, K. W., & Maxfield, F. R. (1992). Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *The Journal of cell biology*, 117(2), 301-310.
59. Edgar, J. R., Manna, P. T., Nishimura, S., Banting, G., & Robinson, M. S. (2016). Tetherin is an exosomal tether. *eLife*, 5, e17180.
60. Egile, C., Rouiller, I., Xu, X. P., Volkmann, N., Li, R., & Hanein, D. (2005). Mechanism of filament nucleation and branch stability revealed by the structure of the Arp2/3 complex at actin branch junctions. *PLoS Biol*, 3(11), e383.

61. Ellenberg, J., Siggia, E. D., Moreira, J. E., Smith, C. L., Presley, J. F., Worman, H. J., & Lippincott-Schwartz, J. (1997). Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *The Journal of cell biology*, 138(6), 1193-1206.
62. Evans, L., Mitchison, T., & Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *The Journal of cell biology*, 100(4), 1185-1191.
63. Fader, C. M., & Colombo, M. I. (2009). Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death & Differentiation*, 16(1), 70-78.
64. Falcone, S., Cocucci, E., Podini, P., Kirchhausen, T., Clementi, E., & Meldolesi, J. (2006). Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J Cell Sci*, 119(22), 4758-4769.
65. Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., & Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the national academy of sciences*, 95(26), 15781-15786.
66. Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 61-98.
67. Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, 419(6905), 361-366.
68. Ford, M. G., Pearce, B. M., Higgins, M. K., Vallis, Y., Owen, D. J., Gibson, A., ... & McMahon, H. T. (2001). Simultaneous binding of PtdIns (4, 5) P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science*, 291(5506), 1051-1055.
69. Gaidarov, I., & Keen, J. H. (1999). Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *The Journal of cell biology*, 146(4), 755-764.
70. Gaidarov, I., Santini, F., Warren, R. A., & Keen, J. H. (1999). Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nature cell biology*, 1(1), 1-7.
71. Galletta, B. J., & Cooper, J. A. (2009). Actin and endocytosis: mechanisms and phylogeny. *Current opinion in cell biology*, 21(1), 20-27.
72. Gaullier, J. M., Rønning, E., Gillingham, D. J., & Stenmark, H. (2000). Interaction of the EEA1 FYVE Finger with Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Early Endosomes ROLE OF CONSERVED RESIDUES. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24595-24600.
73. Girard, E., Chmielewski, D., Fournier, N., Johannes, L., Paul, J. L., Védie, B., & Lamaze, C. (2014). Rab7 is functionally required for selective cargo sorting at the early endosome. *Traffic*, 15(3), 309-326.

74. Glebov, O. O., Bright, N. A., & Nichols, B. J. (2006). Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nature cell biology*, 8(1), 46-54.
75. Glick, B. S., & Malhotra, V. (1998). The curious status of the Golgi apparatus. *Cell*, 95(7), 883-889.
76. Goley, E. D., & Welch, M. D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(10), 713-726.
77. Goley, E. D., Rodenbusch, S. E., Martin, A. C., & Welch, M. D. (2004). Critical conformational changes in the Arp2/3 complex are induced by nucleotide and nucleation promoting factor. *Molecular cell*, 16(2), 269-279.
78. Grandal, M. V., & Madhus, I. H. (2008). Epidermal growth factor receptor and cancer: control of oncogenic signalling by endocytosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(5a), 1527-1534.
79. Griffiths, G., & Gruenberg, J. (1991). The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends in cell biology*, 1(1), 5-9.
80. Gruenberg, J., Griffiths, G., & Howell, K. E. (1989). Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 108(4), 1301-1316.
81. Gruenberg, J., & Maxfield, F. R. (1995). Membrane transport in the endocytic pathway. *Current opinion in cell biology*, 7(4), 552-563.
82. Gruenberg, J., & Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(4), 317-323.
83. Gu, F., & Gruenberg, J. (1999). Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway. *FEBS letters*, 452(1), 61-66.
84. Gutierrez, M. G., Munafó, D. B., Berón, W., & Colombo, M. I. (2004). Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *Journal of cell science*, 117(13), 2687-2697.
85. Haas, A. K., Fuchs, E., Kopajtich, R., & Barr, F. A. (2005). A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking. *Nature Cell Biology*, 7(9), 887-893.
86. Haglund, K., & Dikic, I. (2012). The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *Journal of cell science*, 125(2), 265-275.
87. Hamasaki, M., Araki, N., & Hatae, T. (2004). Association of early endosomal autoantigen 1 with macropinocytosis in EGF-stimulated A431 cells. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 277(2), 298-306.

88. Hammond, A. T., & Glick, B. S. (2000). Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Molecular Biology of the Cell*, 11(9), 3013-3030.
89. Hansen, C. G., & Nichols, B. J. (2009). Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *Journal of cell science*, 122(11), 1713-1721.
90. Hara-Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Wieland, F. T., & Rothman, J. E. (1994). En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *The Journal of cell biology*, 124(6), 883-892.
91. Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of cell biology*, 97(2), 329-339.
92. Helenius, A., Mellman, I., Wall, D., & Hubbard, A. (1983). Endosomes. *Trends in Biochemical Sciences*, 8(7), 245-250.
93. Helenius, A., Morein, B., Fries, E., Simons, K., Robinson, P., Schirmacher, V., ... & Strominger, J. L. (1978). Human (HLA-A and HLA-B) and murine (H-2K and H-2D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(8), 3846-3850.
94. Helms, J. B., & Rothman, J. E. (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature*. 360 (6402), 352 – 354.
95. Henne, W. M., Boucrot, E., Meinecke, M., Evergren, E., Vallis, Y., Mittal, R., & McMahon, H. T. (2010). FCHo proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis. *Science*, 328(5983), 1281-1284.
96. Henne, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT pathway. *Developmental cell*, 21(1), 77-91.
97. Hewlett, L. J., Prescott, A. R., & Watts, C. (1994). The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. *The Journal of cell biology*, 124(5), 689-703.
98. Hirokawa, N., & Noda, Y. (2008). Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiological reviews*, 88(3), 1089-1118.
99. Hirst, J., Barlow, L. D., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N., Dacks, J. B., & Robinson, M. S. (2011). The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol*, 9(10), e1001170.

100. Hoepfner, S., Severin, F., Cabezas, A., Habermann, B., Runge, A., Gillooly, D., ... & Zerial, M. (2005). Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell*, 121(3), 437-450.
101. Horiuchi, H., Lippé, R., McBride, H. M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., ... & Zerial, M. (1997). A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell*, 90(6), 1149-1159.
102. Huang, M., Weissman, J. T., Béraud-Dufour, S., Luan, P., Wang, C., Chen, W., ... & Balch, W. E. (2001). Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *The Journal of cell biology*, 155(6), 937-948.
103. Hurley, J. H. (2010). The ESCRT complexes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45(6), 463-487.
104. Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews*, 91(1), 119-149.
105. Hyttinen, J. M., Niittykoski, M., Salminen, A., & Kaarniranta, K. (2013). Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(3), 503-510.
106. Ihrke, G., Kytälä, A., Russell, M. R., Rous, B. A., & Luzio, J. P. (2004). Differential use of two AP-3-mediated pathways by lysosomal membrane proteins. *Traffic*, 5(12), 946-962.
107. Itoh, T., Erdmann, K. S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., & De Camilli, P. (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Developmental cell*, 9(6), 791-804.
108. Ivetac, I., Munday, A. D., Kisseleva, M. V., Zhang, X. M., Luff, S., Tiganis, T., ... & Mitchell, C. A. (2005). The type Ia inositol polyphosphate 4-phosphatase generates and terminates phosphoinositide 3-kinase signals on endosomes and the plasma membrane. *Molecular biology of the cell*, 16(5), 2218-2233.
109. Jamieson, J. D., & Palade, G. E. (1971). Condensing vacuole conversion and zymogen granule discharge in pancreatic exocrine cells: metabolic studies. *The Journal of cell biology*, 48(3), 503-522.
110. Johnson, E. E., Overmeyer, J. H., Gunning, W. T., & Maltese, W. A. (2006). Gene silencing reveals a specific function of hVps34 phosphatidylinositol 3-kinase in late versus early endosomes. *Journal of Cell Science*, 119(7), 1219-1232.

111. Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W., & Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental cell research*, 284(1), 31-53.
112. Jost, M., Simpson, F., Kavran, J. M., Lemmon, M. A., & Schmid, S. L. (1998). Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Current biology*, 8(25), 1399-1404.
113. Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J., & Caplan, S. (2010). The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and histopathology*, 25(1), 99-112.
114. Kajiho, H., Saito, K., Tsujita, K., Kontani, K., Araki, Y., Kurosu, H., & Katada, T. (2003). RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *Journal of Cell Science*, 116(20), 4159-4168.
115. Kalaidzidis, I., Miaczynska, M., Brewińska-Olchowik, M., Hupalowska, A., Ferguson, C., Parton, R. G., ... & Zerial, M. (2015). APPL endosomes are not obligatory endocytic intermediates but act as stable cargo-sorting compartments. *The Journal of cell biology*, 211(1), 123-144.
116. Kerr, M. C., & Teasdale, R. D. (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic*, 10(4), 364-371.
117. Kerr, M. C., Lindsay, M. R., Luetterforst, R., Hamilton, N., Simpson, F., Parton, R. G., ... & Teasdale, R. D. (2006). Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *Journal of cell science*, 119(19), 3967-3980.
118. Kirchhausen, T., & Harrison, S. C. (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell*, 23(3), 755-761.
119. Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C. C., Kim, M., Alexander, T., ... & Grinstein, S. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *The Journal of cell biology*, 188(4), 547-563.
120. Kouroku Y., Fujita E., Tanida I., Ueno T., Isoai A., Kumagai H., Momoi T. (2007). ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 14: 230-239.
121. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
122. Lamb, C. A., Dooley, H. C., & Tooze, S. A. (2013a). Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation. *Bioessays*, 35(1), 34-45.

123. Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013b). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(12), 759-774.
124. Lanzetti, L., Rybin, V., Malabarba, M. G., Christoforidis, S., Scita, G., Zerial, M., & Di Fiore, P. P. (2000). The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature*, 408(6810), 374-377.
125. Lawe, D. C., Chawla, A., Merithew, E., Dumas, J., Carrington, W., Fogarty, K., ... & Corvera, S. (2002). Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8611-8617.
126. Lawe, D. C., Patki, V., Heller-Harrison, R., Lambright, D., & Corvera, S. (2000). The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding critical role of this dual interaction for endosomal localization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3699-3705.
127. Lawe, D. C., Sitouah, N., Hayes, S., Chawla, A., Virbasius, J. V., Tuft, R., ... & Corvera, S. (2003). Essential role of Ca²⁺/calmodulin in Early Endosome Antigen-1 localization. *Molecular biology of the cell*, 14(7), 2935-2945.
128. Lederkremer, G. Z., Cheng, Y., Petre, B. M., Vogan, E., Springer, S., Schekman, R., ... & Kirchhausen, T. (2001). Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(19), 10704-10709.
129. Lee, S. A., Eyeson, R., Cheever, M. L., Geng, J., Verkhusha, V. V., Burd, C., ... & Kutateladze, T. G. (2005). Targeting of the FYVE domain to endosomal membranes is regulated by a histidine switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37), 13052-13057.
130. Leonard, D., Hayakawa, A., Lawe, D., Lambright, D., Bellve, K. D., Standley, C., ... & Corvera, S. (2008). Sorting of EGF and transferrin at the plasma membrane and by cargo-specific signaling to EEA1-enriched endosomes. *Journal of cell science*, 121(20), 3445-3458.
131. Liu, P., Bartz, R., Zehmer, J. K., Ying, Y. S., Zhu, M., Serrero, G., & Anderson, R. G. (2007). Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(6), 784-793.
132. Longatti, A., Lamb, C. A., Razi, M., Yoshimura, S. I., Barr, F. A., & Tooze, S. A. (2012). TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11-and ULK1-positive recycling endosomes. *The Journal of cell biology*, 197(5), 659-675.

133. Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., & Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy*, 169(3), 375-382.
134. Martinu, L., Santiago-Walker, A., Qi, H., & Chou, M. M. (2002). Endocytosis of epidermal growth factor receptor regulated by Grb2-mediated recruitment of the Rab5 GTPase-activating protein RN-tre. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50996-51002.
135. Mattera, R., & Bonifacino, J. S. (2008). Ubiquitin binding and conjugation regulate the recruitment of Rabex-5 to early endosomes. *The EMBO journal*, 27(19), 2484-2494.
136. Maxfield, F. R., & McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(2), 121-132.
137. Mayor, S., Presley, J. F., & Maxfield, F. R. (1993). Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *The Journal of cell biology*, 121(6), 1257-1269.
138. McAlpine, F., Williamson, L. E., Tooze, S. A., & Chan, E. Y. (2013). Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy*, 9(3), 361-373.
139. McCaffrey, M. W., Bielli, A., Cantalupo, G., Mora, S., Roberti, V., Santillo, M., ... & Bucci, C. (2001). Rab4 affects both recycling and degradative endosomal trafficking. *FEBS letters*, 495(1), 21-30.
140. McDermott, H., & Kim, K. (2015). Molecular dynamics at the endocytic portal and regulations of endocytic and recycling traffics. *European journal of cell biology*, 94(6), 235-248.
141. McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(8), 517-533.
142. McNiven, M. A., Kim, L., Krueger, E. W., Orth, J. D., Cao, H., & Wong, T. W. (2000). Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *The Journal of cell biology*, 151(1), 187-198.
143. Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annual review of cell and developmental biology*, 12(1), 575-625.
144. Mellman, I., & Warren, G. (2000). The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell*, 100(1), 99-112.

145. Merithew, E., Stone, C., Eathiraj, S., & Lambright, D. G. (2003). Determinants of Rab5 interaction with the N terminus of early endosome antigen 1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8494-8500.
146. Merrifield, C. J., Perrais, D., & Zenisek, D. (2005). Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell*, 121(4), 593-606.
147. Merrifield, C. J., Qualmann, B., Kessels, M. M., & Almers, W. (2004). Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *European journal of cell biology*, 83(1), 13-18.
148. Mesaki, K., Tanabe, K., Obayashi, M., Oe, N., & Takei, K. (2011). Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PloS one*, 6(5), e19764.
149. Miaczynska, M., Christoforidis, S., Giner, A., Shevchenko, A., Uttenweiler-Joseph, S., Habermann, B., ... & Zerial, M. (2004). APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*, 116(3), 445-456.
150. Mills, I. G., Jones, A. T., & Clague, M. J. (1998). Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Current Biology*, 8(15), 881-884.
151. Mills, I. G., Urbé, S., & Clague, M. J. (2001). Relationships between EEA1 binding partners and their role in endosome fusion. *Journal of Cell Science*, 114(10), 1959-1965.
152. Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., & Novick, P. (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annual review of biochemistry*, 81, 637-659.
153. Mooren, O. L., Galletta, B. J., & Cooper, J. A. (2012). Roles for actin assembly in endocytosis. *Biochemistry*, 81(1), 661-686.
154. Mu, F. T., Callaghan, J. M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R. G., Campbell, P. L., ... & Toh, B. H. (1995). EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved α -helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13503-13511.
155. Murphy, R. F. (1991). Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends in cell biology*, 1(4), 77-82.
156. Murray, J. W., & Wolkoff, A. W. (2003). Roles of the cytoskeleton and motor proteins in endocytic sorting. *Advanced drug delivery reviews*, 55(11), 1385-1403.

157. Norbury, C. C., Chambers, B. J., Prescott, A. R., Ljunggren, H. G., & Watts, C. (1997). Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *European journal of immunology*, 27(1), 280-288.
158. Nordmann, M., Cabrera, M., Perz, A., Bröcker, C., Ostrowicz, C., Engelbrecht-Vandré, S., & Ungermann, C. (2010). The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Current Biology*, 20(18), 1654-1659.
159. Nossal, R. (2001). Energetics of clathrin basket assembly. *Traffic*, 2(2), 138-147.
160. Ohashi, E., Tanabe, K., Henmi, Y., Mesaki, K., Kobayashi, Y., & Takei, K. (2011). Receptor sorting within endosomal trafficking pathway is facilitated by dynamic actin filaments. *PLoS One*, 6(5), e19942.
161. Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., ... & Bonifacino, J. S. (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*, 269(5232), 1872-1875.
162. Olmos, Y., & Carlton, J. G. (2016). The ESCRT machinery: new roles at new holes. *Current Opinion in Cell Biology*, 38, 1-11.
163. Orci, L., Stannnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Söllner, T. H., & Rothman, J. E. (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell*, 90(2), 335-349.
164. Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189(4200), 347-358.
165. Pankiv, S., Alemu, E. A., Brech, A., Bruun, J. A., Lamark, T., Øvervatn, A., ... & Johansen, T. (2010). FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *The Journal of cell biology*, 188(2), 253-269.
166. Patki, V., Lawe, D. C., Corvera, S., Virbasius, J. V., & Chawla, A. (1998). A functional PtdIns (3) P-binding motif. *Nature*, 394(6692), 433-434.
167. Pearse, B. M. (1975). Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *Journal of molecular biology*, 97(1), 93IN1197-96IN1398.
168. Pearse, B. M. F. (1978). On the structural and functional components of coated vesicles. *Journal of molecular biology*, 126(4), 803-812.
169. Pereira-Leal, J. B., & Seabra, M. C. (2000). The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *Journal of molecular biology*, 301(4), 1077-1087.

170. Petiot, A., Fauré, J., Stenmark, H., & Gruenberg, J. (2003). PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. *The Journal of cell biology*, 162(6), 971-979.
171. Pfeffer, S. R. (2001). Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends in cell biology*, 11(12), 487-491.
172. Pieren, M., Schmidt, A., & Mayer, A. (2010). The SM protein Vps33 and the t-SNARE Habc domain promote fusion pore opening. *Nature structural & molecular biology*, 17(6), 710-717.
173. Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J. E., & Kreis, T. E. (1992). CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell*, 70(6), 887-900.
174. Piper, R. C., & Katzmann, D. J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annual review of cell and developmental biology*, 23, 519-547.
175. Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., & Spang, A. (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell*, 141(3), 497-508.
176. Potokar, M., Stenovec, M., Gabrijel, M., Li, L., Kreft, M., Grilc, S., ... & Zorec, R. (2010). Intermediate filaments attenuate stimulation-dependent mobility of endosomes/lysosomes in astrocytes. *Glia*, 58(10), 1208-1219.
177. Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S., & Ullrich, A. (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-related cancer*, 8(1), 11-31.
178. Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madhus, I. H., Stang, E., & Stenmark, H. (2002). Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nature cell biology*, 4(5), 394-398.
179. Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D. J., D'Arrigo, A., Stang, E., & Stenmark, H. (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *Journal of cell science*, 114(12), 2255-2263.
180. Ramachandran, R. (2011). Vesicle scission: dynamin. *Seminars in cell & developmental biology*, 22(1), 10-17.
181. Ramanathan, H. N., Zhang, G., & Ye, Y. (2013). Monoubiquitination of EEA1 regulates endosome fusion and trafficking. *Cell & bioscience*, 3(1), 24.
182. Rapoport, I., Chen, Y. C., Cupers, P., Shoelson, S. E., & Kirchhausen, T. (1998). Dileucine-based sorting signals bind to the β chain of AP1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *The EMBO Journal*, 17(8), 2148-2155.

183. Razi M., Chan E. Y., Tooze S. A. 2009. Early endosomes and endosomal coatome are required for autophagy. *J. Cell Biol.* 185(2), 305-321.
184. Reits, E. A., & Neefjes, J. J. (2001). From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells. *Nature cell biology*, 3(6), E145-E147.
185. Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122(5), 735-749.
186. Robinson, M. S., Sahlender, D. A., & Foster, S. D. (2010). Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria. *Developmental cell*, 18(2), 324-331.
187. Roepstorff, K., Grandal, M. V., Henriksen, L., Knudsen, S. L. J., Lerdrup, M., Grøvdal, L., ... & Van Deurs, B. (2009). Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic*, 10(8), 1115-1127.
188. Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., & Kirschner, M. W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 97(2), 221-231.
189. Römer, W., Pontani, L. L., Sorre, B., Rentero, C., Berland, L., Chambon, V., ... & Johannes, L. (2010). Actin dynamics drive membrane reorganization and scission in clathrin-independent endocytosis. *Cell*, 140(4), 540-553.
190. Roth, T. F., & Porter, K. R. (1964). Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. L. *The Journal of cell biology*, 20(2), 313-332.
191. Rothman, J. E., & Wieland, F. T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science*, 272(5259), 227-234.
192. Rubino, M., Miaczynska, M., Lippé, R., & Zerial, M. (2000). Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 3745-3748.
193. Sandvig, K., Pust, S., Skotland, T., & van Deurs, B. (2011). Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Current opinion in cell biology*, 23(4), 413-420.
194. Schmid D., Pypaert M., Münz C. 2007. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*. 26, 79-92.
195. Schroer, T. A., & Sheetz, M. P. (1991). Functions of microtubule-based motors. *Annual review of physiology*, 53(1), 629-652.
196. Scott, A., Gaspar, J., Stuchell-Brereton, M. D., Alam, S. L., Skalicky, J. J., & Sundquist, W. I. (2005). Structure and ESCRT-III protein interactions of the MIT domain

- of human VPS4A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13813-13818.
197. Seglen, P. O., Gordon, P. B., & Poli, A. (1980). Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 630(1), 103-118.
 198. Shin, H. W., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M. R., ... & Frankel, W. N. (2005). An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *The Journal of cell biology*, 170(4), 607-618.
 199. Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., ... & Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 2760-2765.
 200. Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., ... & Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI (3) K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, 394(6692), 494-498.
 201. Simonsen A., Tooze S. A. 2009. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* 186 (6), 773–782.
 202. Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., & Rothman, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 75(3), 409-418.
 203. Spang, A. (2009). On the fate of early endosomes. *Biological chemistry*, 390(8), 753-759.
 204. Sprague, B. L., & McNally, J. G. (2005). FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends in cell biology*, 15(2), 84-91.
 205. Stein, M. P., Feng, Y., Cooper, K. L., Welford, A. M., & Wandinger-Ness, A. (2003). Human VPS34 and p150 are Rab7 interacting partners. *Traffic*, 4(11), 754-771.
 206. Stenmark, H., & Olkkonen, V. M. (2001). The rab gtpase family. *Genome Biol*, 2(5), 3007.1–3007.7.
 207. Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B. H., & D'Arrigo, A. (1996). Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 24048-24054.
 208. Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O., & Zerial, M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell*, 83(3), 423-432.

209. Stowell, M. H., Marks, B., Wigge, P., & McMahon, H. T. (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nature cell biology*, 1(1), 27-32.
210. Strasser, B., Iwaszkiewicz, J., Michielin, O., & Mayer, A. (2011). The V-ATPase proteolipid cylinder promotes the lipid-mixing stage of SNARE-dependent fusion of yeast vacuoles. *The EMBO journal*, 30(20), 4126-4141.
211. Strelkov, S. V., Herrmann, H., & Aebi, U. (2003). Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays*, 25(3), 243-251.
212. Styers, M. L., Kowalczyk, A. P., & Faundez, V. (2005). Intermediate filaments and vesicular membrane traffic: the odd couple's first dance?. *Traffic*, 6(5), 359-365.
213. Su, X., Kong, C., & Stahl, P. D. (2007). GAPex-5 mediates ubiquitination, trafficking, and degradation of epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 282(29), 21278-21284.
214. Südhof, T. C., & Rothman, J. E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, 323(5913), 474-477.
215. Sun, W., Yan, Q., Vida, T. A., & Bean, A. J. (2003). Hrs regulates early endosome fusion by inhibiting formation of an endosomal SNARE complex. *The Journal of cell biology*, 162(1), 125-137.
216. Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., & Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700), 347-353.
217. Sweitzer, S. M., & Hinshaw, J. E. (1998). Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*, 93(6), 1021-1029.
218. Tall, G. G., Barbieri, M. A., Stahl, P. D., & Horazdovsky, B. F. (2001). Ras-activated endocytosis is mediated by the Rab5 guanine nucleotide exchange activity of RIN1. *Developmental cell*, 1(1), 73-82.
219. Taylor, M. J., Perrais, D., & Merrifield, C. J. (2011). A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol*, 9(3), e1000604.
220. Tebar, F., Sorkina, T., Sorkin, A., Ericsson, M., & Kirchhausen, T. (1996). Eps15 is a component of clathrin-coated pits and vesicles and is located at the rim of coated pits. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 28727-28730.
221. Ter Haar, E., Harrison, S. C., & Kirchhausen, T. (2000). Peptide-in-groove interactions link target proteins to the β -propeller of clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(3), 1096-1100.

222. Tooze, S. A., Abada, A., & Elazar, Z. (2014). Endocytosis and autophagy: exploitation or cooperation?. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(5), a018358.
223. Van Leuven, F., Cassiman, J. J., & Van Den Berghe, H. (1980). Primary amines inhibit recycling of α 2 M receptors in fibroblasts. *Cell*, 20(1), 37-43.
224. Vavylonis, D., Yang, Q., & O'Shaughnessy, B. (2005). Actin polymerization kinetics, cap structure, and fluctuations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(24), 8543-8548.
225. Vieira, A. V., Lamaze, C., & Schmid, S. L. (1996). Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science*, 274(5295), 2086-2089.
226. Verma N., Keinan O., Selitrennik M., Karn T., Filipits M., Lev S. 2015. PYK2 sustains endosomal-derived receptor signalling and enhances epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature Commun.* 6. DOI:10.1038/ncomms7064.
227. Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P. Ö., McCaffrey, M., Stenmark, H., & Zerial, M. (1998). Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *The EMBO Journal*, 17(7), 1941-1951.
228. Vonderheit, A., & Helenius, A. (2005). Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol*, 3(7), e233.
229. Wang, Q., Villeneuve, G., & Wang, Z. (2005). Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation. *EMBO reports*, 6(10), 942-948.
230. Wendeler, M. W., Paccaud, J. P., & Hauri, H. P. (2007). Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *EMBO reports*, 8(3), 258-264.
231. Williams, R. L., & Urbé, S. (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(5), 355-368.
232. Wilson, J. M., de Hoop, M., Zorzi, N., Toh, B. H., Dotti, C. G., & Parton, R. G. (2000). EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell*, 11(8), 2657-2671.
233. Woodward, M. P., & Roth, T. F. (1978). Coated vesicles: characterization, selective dissociation, and reassembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(9), 4394-4398.

234. Yamashiro, D. J., & Maxfield, F. R. (1987). Acidification of morphologically distinct endosomes in mutant and wild-type Chinese hamster ovary cells. *The Journal of cell biology*, 105(6), 2723-2733.
235. Yasuda, S., Morishita, S., Fujita, A., Nanao, T., Wada, N., Waguri, S., ... & Nakamura, T. (2016). Mon1–Ccz1 activates Rab7 only on late endosomes and dissociates from the lysosome in mammalian cells. *J Cell Sci*, 129(2), 329-340.
236. Yousefian, J., Troost, T., Grawe, F., Sasamura, T., Fortini, M., & Klein, T. (2013). Dmon1 controls recruitment of Rab7 to maturing endosomes in *Drosophila*. *Journal of cell science*, 126(7), 1583-1594.
237. Yu, I. M., & Hughson, F. M. (2010). Tethering factors as organizers of intracellular vesicular traffic. *Annual review of cell and developmental biology*, 26, 137-156.
238. Zeigerer, A., Gilleron, J., Bogorad, R. L., Marsico, G., Nonaka, H., Seifert, S., ... & Del Conte-Zerial, P. (2012). Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature*, 485(7399), 465-470.
239. Zoncu, R., Perera, R. M., Balkin, D. M., Pirruccello, M., Toomre, D., & De Camilli, P. (2009). A phosphoinositide switch controls the maturation and signaling properties of APPL endosomes. *Cell*, 136(6), 1110-1121.
240. Zwilling, D., Cypionka, A., Pohl, W. H., Fasshauer, D., Walla, P. J., Wahl, M. C., & Jahn, R. (2007). Early endosomal SNAREs form a structurally conserved SNARE complex and fuse liposomes with multiple topologies. *The EMBO Journal*, 26(1), 9-18.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хочу выразить огромную признательность моему научному руководителю Елене Сергеевне Корниловой за помощь, понимание и чуткое руководство. Хочу поблагодарить также всех сотрудников Лаборатории динамики внутриклеточных мембран и Отдела внутриклеточной сигнализации и транспорта, в особенности Марианну Викторовну Харченко и Римму Сергеевну Каменцеву, за помощь и поддержку.