

КОШЕВЕРОВА
Вера Владиславовна

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

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Корнилова Елена Сергеевна
руководитель Лаборатории динамики внутриклеточных мембран
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Надеждина Елена Сергеевна
руководитель группы физиологии цитоскелета Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Институт белка
Российской академии наук, г. Пущино

доктор биологических наук
Шпаков Александр Олегович
руководитель Лаборатории молекулярной эндокринологии и
нейрохимии Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.
Сеченова Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии
Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский
кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства
здравоохранения Российской Федерации, г. Москва

Защита диссертации состоится «3» марта 2017 года в _____ часов на заседании Диссертационного
совета Д 002.230.01 на базе ФГБУН Институт цитологии РАН по адресу:

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4

Адрес электронной почты института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте Института

Автореферат разослан «___» _____ 2017 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 интернализованного 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, не только участвующий 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) отсоединяются от ПМ и клатриновое окаймление снимается (Vieira et al., 1996; Grandal, Madshus, 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, привносят 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 мультивезикулярными телами (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, наблюдаемого 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) (Christofordis 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 отсутствие 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. EEA1-везикулы не являются аутофагосомами и производными эндоцитозного пути. Популяция EEA1-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 EEA1- и РЭФР-содержащих везикул в ходе эндоцитоза ЭФР. Получены приоритетные данные об участии биосинтетического пути в биогенезе EEA1-положительных везикул. Впервые продемонстрировано, что стимуляция эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов приводит к увеличению времени жизни части EEA1 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.).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, список цитированной литературы, включающий 240 наименований. Материалы диссертации изложены на 131 странице машинописного текста и проиллюстрированы 27 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. В работе использовали клетки карциномы шейки матки человека HeLa, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭС) и 50 мкг/мл гентамицина 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.

Лиганды и их производные. В работе использовали мышинный ЭФР (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 12 нг/мл (2 нМ). В ряде экспериментов применяли биотинилированный ЭФР (бЭФР) (Invitrogen, США) в той же концентрации, связывая его с флуоресцентной меткой. В качестве флуоресцентной метки использовали стрептавидин-связанный Cy3 (Invitrogen, США), добавляя его в 30-кратном избытке, или стрептавидин-связанные квантовые точки (Qds) с максимумом эмиссии 655 нм (Invitrogen, США) в концентрации 1 нМ.

Стимуляция эндоцитоза. Эндоцитоз рецептора ЭФР стимулировали по двум схемам. При схеме с предварительным связыванием лиганд (ЭФР) инкубировали с клетками в среде DMEM в течение 1 ч при 4°C, после этого клетки отмывали раствором PBS от несвязавшегося лиганда и стимулировали эндоцитоз добавлением к клеткам среды DMEM, не содержащей лиганда, при 37°C на указанное время. При схеме импульсной загрузки лиганда ЭФР добавляли к клеткам, культивируемым при 37°C, на 5 мин, после этого клетки отмывали PBS и добавляли к ним среду DMEM, нагретую до 37°C и не содержащую лиганда, на указанное время.

Плазмидные конструкции и трансфекция. В работе были использованы следующие плазмиды: плазида, кодирующая EEA1 белок, слитый на N-конце с EGFP (EEA1-EGFP), была любезно предоставлена проф. Сильвией Корвера (# 42307, Addgene, США) (Lawe et al., 2000); плазида Rab5a-pmCherryC1 была любезно предоставлена Кристьяном 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 липофектаминам к клеткам добавляли суммарно 0,5 мкг плазмидной ДНК на 1,5 × 10⁵ клеток. В случае ко-трансфекции клеток двумя плазмидами плазмидная ДНК добавлялась к клеткам в соотношении 2:1 (при котрансфекции плазмидами EEA1-EGFP и Rab5a-pmCherryC1/ Rab7-DsRed) или 1:1 (при котрансфекции Rab5a-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.

Мечение плазматической мембраны липидом DPPE. Для того чтобы визуализировать ПМ 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 PBS и в живых клетках наблюдали интернализацию участков ПМ в клетки в течение 10 мин–1,5 ч после добавления липида.

Обработка клеток ингибиторами. Для подавления жидкофазного эндоцитоза использовали 66 мкМ 5-(N,N)-гексаметиленамилорид (Sigma-Aldrich, США). Ингибитор динамина динасор (Sigma-Aldrich, США) применяли для подавления динамин-зависимого эндоцитоза в концентрации 80 мкМ. Клетки инкубировали в течение 6 ч в среде DMEM, содержащей только динасор или динасор в сочетании с амилоридом. Для подавления биосинтетического пути клетки культивировали в течение 6 ч в присутствии 10 мг/мл брэфельдина А (ICN Biomedicals, США). В экспериментах по изучению механизмов сегрегации гибридных везикул использовали ингибитор Agr2/3 комплекса СК666 (любезно предоставлен д.б.н. А.Ю. Александровой (Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, г. Москва)) в концентрации 100 мкМ и динасор

в указанной выше концентрации. Оба эти ингибитора добавляли к клеткам через 5 мин после стимуляции в них эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.

Электрофорез и иммуноблоттинг.

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 триэтанолламингидрохлорид; 0,25 М сахараза; 1 мМ ЭДТА), соскребали их раббером, переносили 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.

Полученные пробы подвергали электрофоретическому разделению в 7.5% и 12.5%-ных полиакриламидных гелях в присутствии додецилсульфата натрия в модификации Лэммли (Laemmli, 1970). Иммуноблоттинг проводили в соответствии с методикой ECL Western Blotting protocol (Amersham, Швеция). 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, США, 1:1000, ночь, 4°C); поликлональные антитела к цитоплазматическому домену РЭФР человека (rAb, Cell Signaling, США, 1:1000, ночь, 4°C); антитела к фосфотирозин-содержащим белкам (Santa Cruz Biotechnology, США, 1:500, ночь, 4°C). В качестве вторичных антител использовали козы антитела против иммуноглобулинов мыши (GAR-HRP, Cell Signaling, США) или кролика (GAR-HRP, Cell Signaling, США).

Двойное не прямое иммунофлюоресцентное окрашивание клеток. Иммунофлюоресцентное окрашивание клеток производили, как описано ранее (Salova et al., 2016). В ходе иммунофлюоресцентного окрашивания использовали следующие первичные антитела: антитела против белка EEA1 (mAb, Transduction Lab, США; 1:200, инкубация 1 ч, t°комн.); поликлональные антитела, узнающие белок LC3 (его цитозольную и ассоциированную с мембранами фракцию) (rAb, 1:300, ночь, 4°C; MBL, Япония); поликлональные антитела против Rab5 (1:100; ночь, 4°C, Cell Signalling, США) и поликлональные антитела против кортактина (rAb, 1:50, ночь, 4°C, Santa Cruz Biotechnology, США). В качестве вторичных антител использовали GAR-Alexa Fluor 568 (1:200; Molecular Probes, США) или GAR-Alexa Fluor 488 (1:200; Molecular Probes, США).

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. В работе применяли лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия), используя масляный объектив HCX PL APO CS с увеличением 40x. Флюоресценцию 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 составлял 1.4 единицы Эйри. Флюоресценцию Alexa Fluor 488, EGFP возбуждали аргоновым лазером (488 нм). Флюоресценцию Alexa Fluor 568, Cy3, dsRed, mCherry, родамина В возбуждали He-Ne лазером (543 нм); флюоресценцию Qds655 возбуждали диодным лазером (405 нм). Прижизненные наблюдения проводили в режиме ХУТ (разрешение кадров – 1024x1024 пикселей; частота сканирования – 400–700 Гц; частота кадров – 1.5–4.9 с) с использованием термостатируемой камеры при 37°C.

Восстановление флюоресценции после фотовыжигания (FRAP). Эксперименты по восстановлению флюоресценции проводили с помощью микроскопа Leica TCS SP5 в режиме ХУТ с разрешением 512x512 пикселей, частотой сканирования 400 Гц и диаметром конфокальной диафрагмы 4 единицы Эйри. Круговая область диаметром 4 мкм (что примерно в 2 раза превосходит видимый диаметр везикул) подвергалась фотовыжиганию. Фотовыжигание флюоресценции EGFP-EEA1 производилось 5-кратным сканированием выбранной области аргоновым лазером с 50%-ной мощностью. Восстановление флюоресценции в выжигаемой области детектировали, сканируя ее в течение 150 кадров (мощность аргонового лазера – 1.5%) с временным интервалом между кадрами 0.7 с. Данные по восстановлению флюоресценции EGFP-EEA1 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 нормировали на выгорание флюорофора, случайные колебания мощности лазера и степень выжигания (Ellenberg et al., 1997), после чего сравнивали их с экспоненциальными уравнениями однофазного и двухфазного восстановления флюоресценции и по выбранному уравнению рассчитывали время полувосстановления флюоресценции (t_h) и долю мобильной фракции (Mf) (Sprague, McNally, 2005; Reits, Neefjies, 2001).

Анализ и обработка изображений. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы Image J. 1.48v (National Institute of Health, США). В ряде экспериментов с использованием клеток, трансфицированных Rab7-DsRed, или с иммунофлуоресцентным мечением кортактина серия оптических срезов была подвергнута деконволюции с использованием плагина Iterative Deconvolve 3D (Dougherty, 2005).

Оценку параметров везикул проводили на основе максимальных проекций оптических срезов по оси Z, представленных в 32-битном формате. 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 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. 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. Полученные выделения затем переносили на исходное изображение и использовали для измерения на нем параметров везикул.

Для оценки колокализации выбирали одиночные оптические срезы в нижней трети клетки. 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.

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Количество белка EEA1 в мембранной фракции клеток не изменяется при стимуляции в клетках эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. В соответствии с общепринятой гипотезой, EEA1-положительные везикулы (ранние эндосомы) образуются при стимуляции эндоцитоза в клетках за счет рекрутирования белка EEA1 из цитоплазмы на поверхность интернализированных с ПМ транспортных везикул, несущих груз. Таким образом, количество белка EEA1 на мембранах везикул должно различаться в клетках, находящихся в условиях различной эндоцитозной активности. Однако недавние исследования, основанные на анализе иммунофлуоресцентных препаратов, показали, что EEA1 локализуется на мембране

везикул в клетках постоянно вне зависимости от стимуляции в них эндоцитоза. Для разрешения данных 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 (МФ) и экстракцию цитоплазматических белков из клетки при пермеабиллизации ПМ.

Выделение МФ клеток проводили методом ультрацентрифугирования, как описано в главе «Материалы и методы». 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 стимулируемого рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Выявление GAPDH лишь в пробах тотального лизата, но не в МФ клеток указывает на то, что полученные МФ не содержали цитозольных белков (рис. 1).

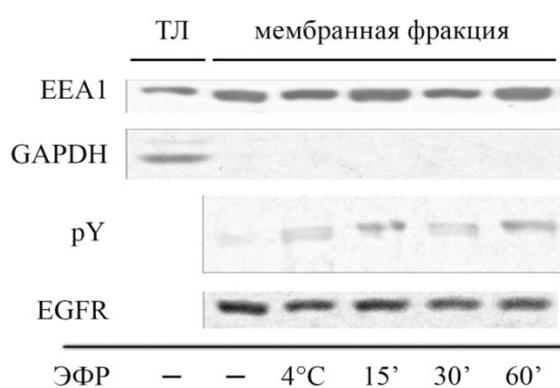


Рис.1 Выявление белка EEA1 в мембранных фракциях (МФ) клеток методом иммуноблоттинга. Оценивали количество EEA1, GAPDH, EGFR и фосфотирозинсодержащих белков на уровне 170 кДа (pY) в пробах тотального лизата (ТЛ) и в мембранных фракциях клеток через 15', 30', 60' мин после стимуляции в клетках эндоцитоза РЭФР и в нестимулированных добавлением ЭФР клетках (- ЭФР).

Увеличение фосфорилирования по тирозину (pY) белков молекулярной массы 170 кДа 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) (рис. 1), что 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. 1). Для подтверждения полученных данных мы оценили количество белка EEA1 в клетках, из которых предварительно экстрагировали цитоплазматические белки путем пермеабиллизации ПМ (рис.2).

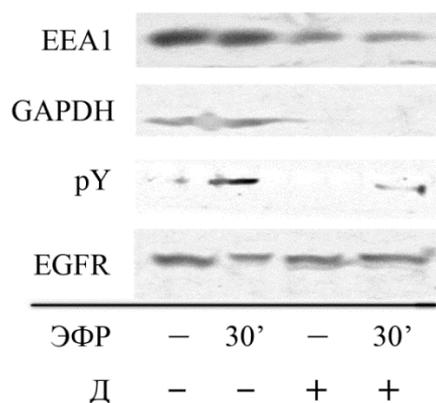


Рис.2 Выявление белка EEA1 в клетках, обработанных детергентом дигитонином. Клетки, нестимулированные добавлением ЭФР (-ЭФР) или через 30 мин после добавления ЭФР (ЭФР, 30'), подвергали обработке детергентом дигитонином (Д). Оценивали количество EEA1, GAPDH, EGFR и фосфотирозинсодержащих белков на уровне 170 кДа (pY) в этих клетках. Эти белки выявляли также в тотальном лизате нестимулированных (-ЭФР) и стимулированных в течение 30 мин добавлением ЭФР клеток (30'), не обработанных детергентом.

В клетках стимулировали эндоцитоз РЭФР по схеме предварительного связывания лиганда. Затем как стимулированные добавлением ЭФР, так и нестимулированные клетки инкубировали в течение 10 мин в растворе дигитонина, который селективно пермеабиллизует ПМ, не повреждая

внутриклеточные мембранные структуры. Оказалось, что количество белка EEA1 в лизате обработанных дигитонином клеток, стимулированных и не стимулированных добавлением ЭФР, оказалось примерно одинаковым (рис. 2).

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.

2. Исследование динамики ассоциации белка EEA1 с мембранами везикул в клетках, стимулированных и не стимулированных добавлением ЭФР. В соответствии с имеющимися данными, EEA1 взаимодействует с мембраной везикул за счет периферического связывания с Rab5 и PI3P. Очевидно, что аффинность этих взаимодействий должна определять динамику его ассоциации/диссоциации с мембраной. Однако неизвестно, как влияет стимуляция эндоцитоза на процесс обмена молекул EEA1 на мембране. Динамику ассоциации EEA1 с мембранами везикул оценивали методом FRAP (Fluorescent recovery after photobleaching). В живых клетках, экспрессирующих плазмиду EEA1-EGFP, отдельные EEA1-везикулы (или одиночные EEA1-содержащие кластеры везикул) подвергали фотовыжиганию, после чего измеряли восстановление флуоресценции EEA1-EGFP на этих везикулах в течение приблизительно 2 мин в контрольных и стимулированных добавлением ЭФР клетках (рис. 3). Полученные данные нормализовали, как описано в «Материалах и методах», после чего их аппроксимировали экспоненциальными кривыми. Расчет коэффициента детерминации R^2 показал, что восстановление флуоресценции EEA1-EGFP лучше описывается двухфазной моделью и может быть представлено двумя кинетическими компонентами – медленной и быстрой.

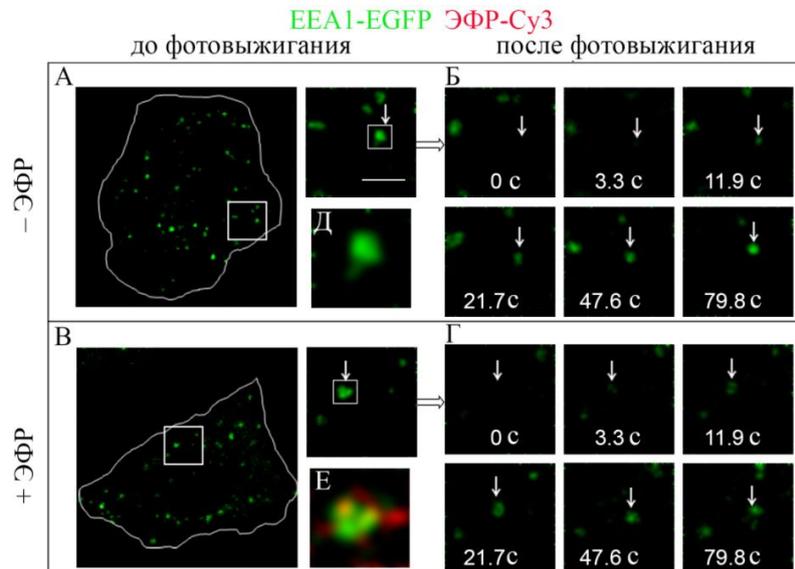


Рис. 3 Восстановление флуоресценции EEA1-везикул в ходе FRAP анализа в контрольных (–ЭФР) и стимулированных добавлением ЭФР-Су3 (+ЭФР) клетках. Участки клеток, выделенных белой рамкой, представлены в большем увеличении и содержат типичные для каждого случая EEA1-везикулы (обозначены стрелками) до фотовыжигания (А, В) и после фотовыжигания (Б, Г). Д, Е – наложение сигналов в двух каналах. Указано время после фотовыжигания, с. Масштаб – 3мкм.

Исходя из этого рассчитали время полувосстановления флуоресценции ($t_{1/2}$) для быстрой ($t_{1/2 \text{ быстр.}}$) и медленной ($t_{1/2 \text{ медл.}}$) кинетических компонент белка EEA1. Установили, что $t_{1/2 \text{ быстр}}$ в контрольных

($1,55 \pm 0,35$ с) и стимулированных добавлением ЭФР клетках ($2,75 \pm 0,97$ с) достоверно не различаются (рис. 4, Б).

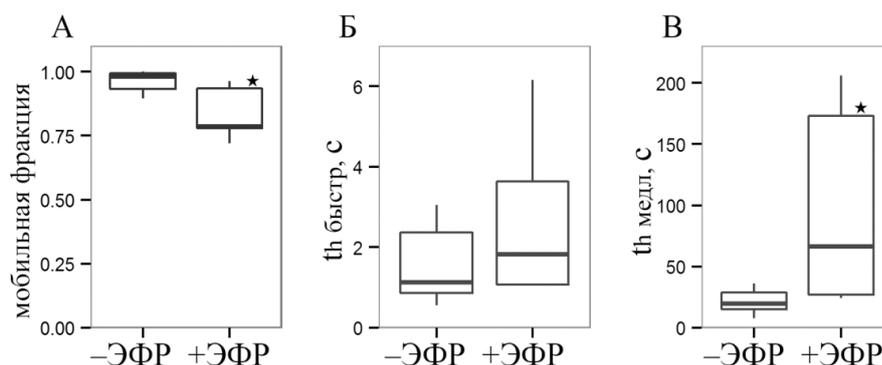


Рис. 4 Количественный анализ восстановления флюоресценции EEA1-EGFP на везикулах в контрольных (-ЭФР) и стимулированных добавлением ЭФР (+ЭФР) клетках. А – мобильная фракция, Б, В – время полувосстановления флюоресценции EEA1-EGFP для быстрой (th быстр) и медленной (th медл) кинетических компонент, соответственно, были рассчитаны на основе двухфазной модели для 14 кривых восстановления флюоресценции. Звездочками обозначены достоверные отличия групп друг от друга ($p < 0.05$).

Напротив, оказалось, что время ассоциации с мембраной медленно обменивающейся фракции EEA1 при стимуляции эндоцитоза возрастает более чем в четыре раза (рис. 4,В). Кроме того, уменьшается мобильная фракция (Mf) (рис. 4, А).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что стимуляция эндоцитоза приводит к увеличению времени жизни на мембране части популяции EEA1. Можно предполагать, что это связано с увеличением количества сайтов связывания EEA1 на мембране везикул при стимуляции эндоцитоза (т. е. с усилением рекрутирования Rab5-ГТФ и увеличением уровня PI3P). С другой стороны, мы показали, что общее количество EEA1, ассоциированного с мембранами, не изменяется в ходе эндоцитоза. Поскольку увеличение количества связывающих сайтов приводило бы к увеличению количества EEA1 на мембранах, очевидно, что нужно искать иное объяснение полученным данным. 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. При этом EEA1 оказывается «замкнут» между двумя мембранами и связывается с ними не только за счет взаимодействия с Rab5 и PI3P на С-конце, но и благодаря дополнительному Rab5-связывающему домену на N-конце.

3. Изучение взаимодействия EEA1- и ЭФР-положительных везикул методом прижизненной съемки. Для того чтобы выяснить, каким образом происходит образование и разрушение гибридных EEA1- и ЭФР-содержащих структур в ходе эндоцитоза, к клеткам, экспрессирующим EEA1-EGFP, добавляли ЭФР, меченный Су3-флюорофором, и с помощью прижизненной съемки наблюдали процесс эндоцитоза в живых клетках в течение 5–60 мин.

На ранних этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов (10–15 мин) мы наблюдали процесс слияния в околосмембранной области клетки EEA1-положительной везикулы с мелкими ЭФР-содержащими везикулами, которые отделялись от ПМ (рис. 5, А). Появления 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 Су3–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 взаимозаякоренных EEA1-везикул, содержащих ЭФР (рис. 5, Б), что согласуется с описанными ранее гибридными структурами, выявленными на фиксированных клетках.

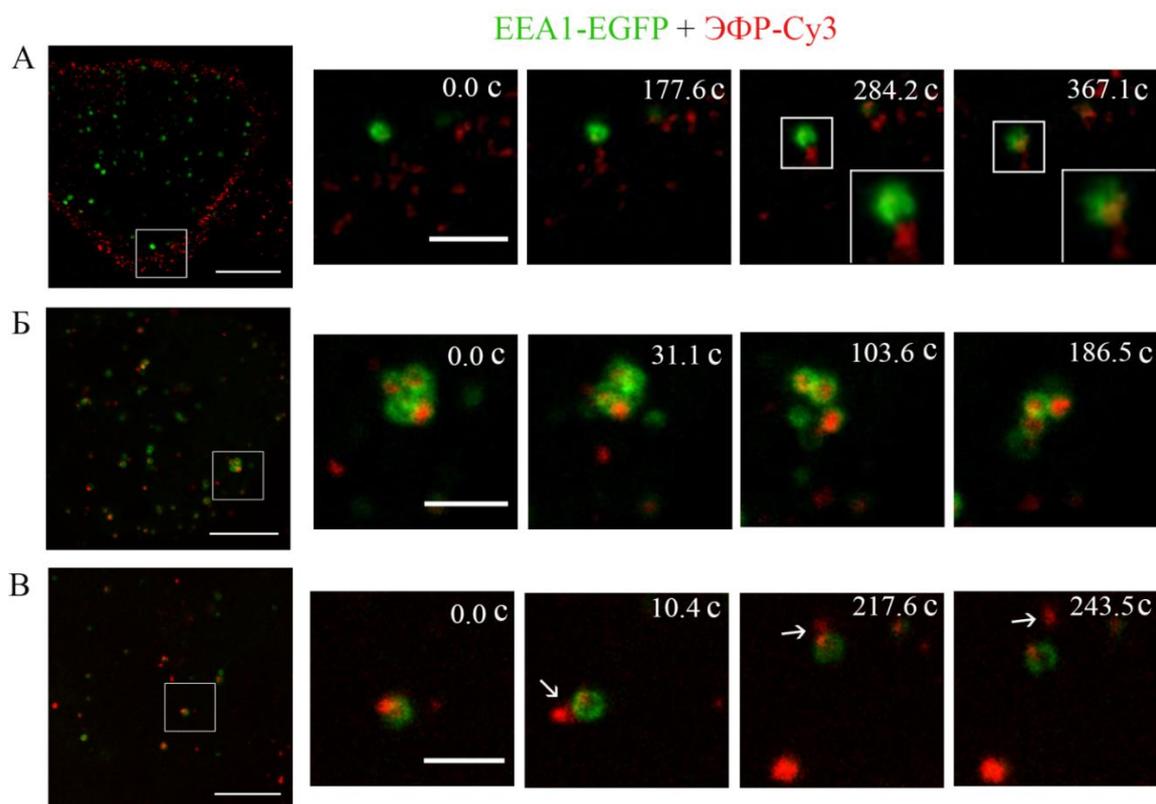


Рис. 5 Анализ взаимодействия EEA1- и ЭФР-положительных везикул методом прижизненной микроскопии. В клетках, экспрессирующих EEA1-EGFP (зеленый), запускали эндоцитоз ЭФР-Су3 (красный). Обозначено время после начала съемки, с. Масштаб 10 мкм (изображение целой клетки); 3 мкм (изображение участка клетки). А – слияние EEA1-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.

Данные агрегаты перемещались в клетке как единое целое, при этом периодически от них отсоединялись отдельные везикулы, несущие как EEA1, так и ЭФР (рис. 5, Б). Таким образом, на поздних этапах эндоцитоза происходило разрушение агрегатов. На поздних сроках эндоцитоза наблюдался также процесс выделения ЭФР-содержащих везикул из состава гибридной органеллы, так называемый процесс сегрегации (рис. 5, В), в конечном итоге приводивший к полному разделению ЭФР- и EEA1-позитивных структур. Важно отметить, что в ходе сегрегации именно ЭФР-содержащая везикула отделялась от остальной части гибридной 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 ЕЕА1-везикул.

4. Изучение механизмов сегрегации ЕЕА1- и ЭФР-положительных везикул. Известно, что многие происходящие в ходе эндоцитоза процессы разделения мембран, в том числе процесс формирования и отделения рециклирующих тубулярных выростов ранних эндосом, опосредуются атипичной ГТФазой динамином, а также кортактином и Арг2/3 комплексом, который формирует высокодинамичные сети актиновых филаментов. В связи с этим мы предположили, что эти белки и белковые комплексы могут также участвовать в процессе сегрегации. Чтобы проверить, взаимодействуют ли ЭФР-содержащие эндосомы и ЕЕА1-везикулы с кортактином, мы оценили распределение кортактина методом иммунофлюоресценции на различных этапах эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Кортактин был распределен в клетке в виде фибриллярных образований и отдельных структур, по форме напоминающих везикулы (рис. 6).

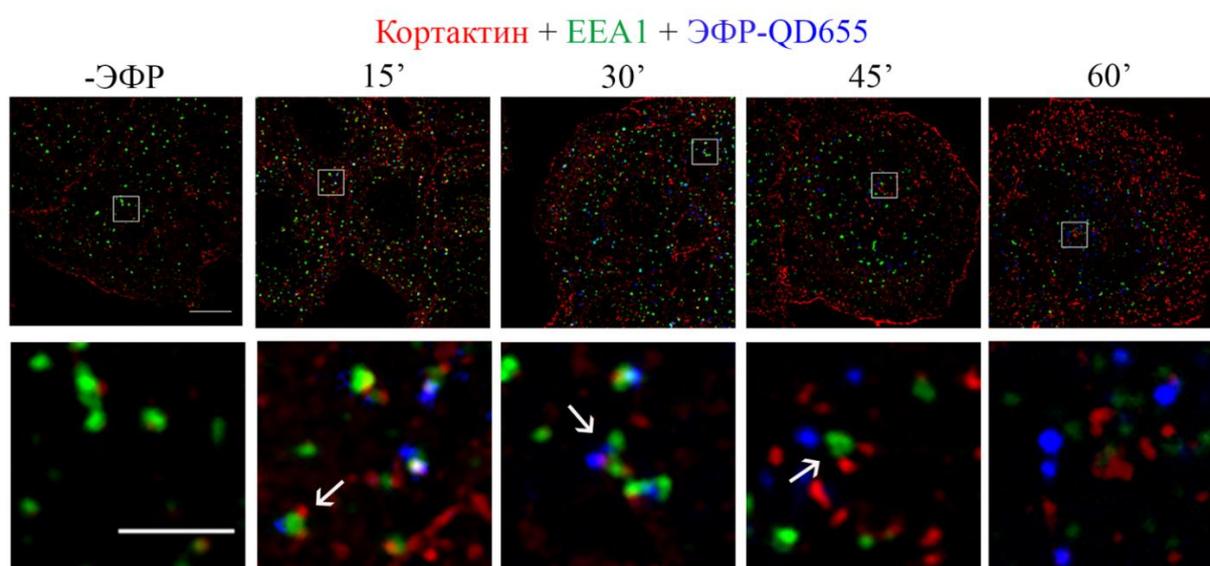


Рис. 6 Распределение кортактина относительно ЕЕА1- и ЭФР-положительных везикул в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. В клетках запускали эндоцитоз ЭФР-QDs (синий) и фиксировали их через 15, 30, 45, 60 мин после стимуляции эндоцитоза. Иммунофлюоресцентное мечение: кортактин (красный); ЕЕА1 (зеленый). 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.

Оказалось, что в клетках, не стимулированных добавлением ЭФР, значительное количество ЕЕА1-везикул располагалось в области кортактиновых структур. Через 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. 6). Напротив, к 30 мин в клетках наблюдались гибридные везикулы, ассоциированные с кортактином таким образом, что он располагался между ЭФР- и ЕЕА1-положительными доменами (рис. 6). На более поздних этапах (45 и 60 мин) в клетках выявлялись в основном отдельные ЕЕА1-везикулы и ЭФР-содержащие эндосомы, то есть 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. 6).

Полученные данные позволили нам предположить, что кортактин, а также взаимодействующая с ним машинерия, включающая в себя динамин и Arg 2/3 комплекс, участвуют в процессе сегрегации. Для подтверждения выдвинутого предположения мы использовали ингибитор Arg2/3 комплекса СК666 и ингибитор динамина динасор (рис. 7). 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 влияния на формирование рецептор-содержащих эндосом. Оказалось, что в контрольных клетках без добавления ингибиторов после 45 и 60 мин эндоцитоза гибридные везикулы практически не выявлялись, что свидетельствует о том, что процесс сегрегации происходил в основном между 30 и 45 мин (рис. 7).

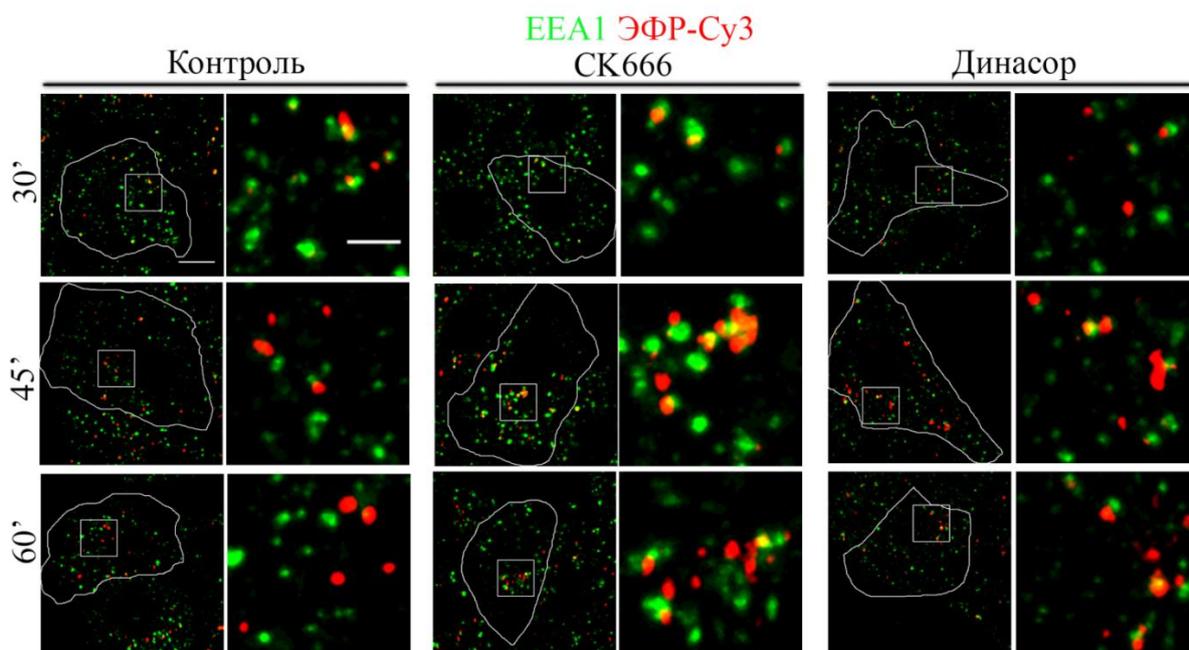


Рис. 7 Влияние СК666 и динасора на сегрегацию ЕЕА1- и ЭФР-положительных везикул. В клетках стимулировали эндоцитоз ЭФР-Су3 (красный). Через 5 мин после стимуляции эндоцитоза к клеткам добавляли динасор или СК666 и фиксировали их через 30, 45 и 60 мин. Клетки окрашивали антителами к ЕЕА1 (зеленый) и оценивали распределение ЕЕА1 и ЭФР-Су3 сигналов на проекциях максимальной яркости трех последовательных оптических срезов. Масштаб: 10 мкм (изображения целых клеток); 3 мкм (изображения выделенного участка клетки).

Напротив, к 45-ти и 60-ти минутам эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в клетках, подвергшихся действию ингибиторов, большая часть ЭФР-содержащих эндосом была ассоциирована с ЕЕА1-везикулами (рис. 7), то есть процесс сегрегации в таких клетках подавлялся. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что динамин и Arg2/3-комплекс вовлечены в процесс сегрегации мембран ЕЕА1- и РЭФР-содержащих везикул. Таким образом, согласованная работа Arg2/3 комплекса, динамина и кортактина, а также связанная с этим полимеризация актиновых филаментов, по-видимому, является универсальным механизмом сегрегации мембран везикул на разных участках эндоцитозного пути.

5. Анализ сегрегации ЕЕА1- 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. Клетки фиксировали через 15, 23, 30, 45, 60 мин после стимуляции в них эндоцитоза. 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 околоядерной области в виде облака, а в остальных участках клеток обнаруживались отдельные Rab7-положительные везикулы, яркость которых значительно уступала яркости околоядерных структур (рис. 8, А; 9, А).

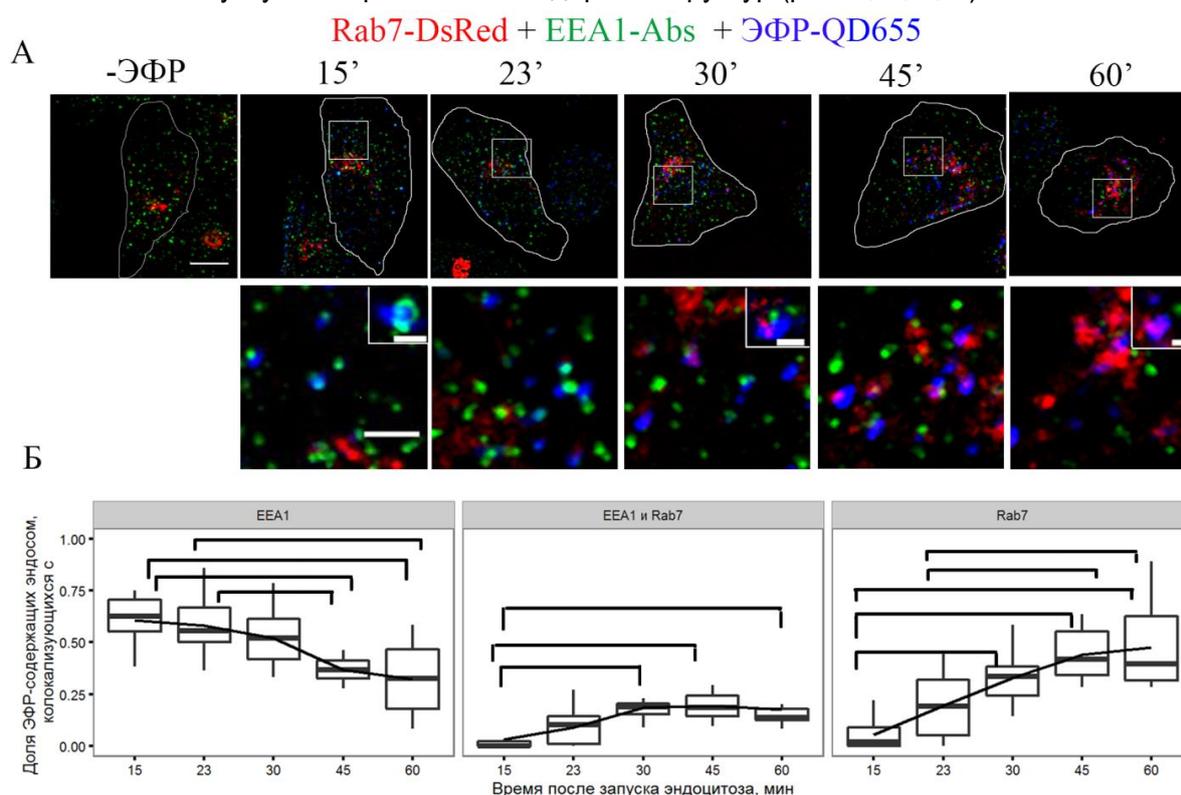


Рис. 8 Динамика колокализации ЭФР, Rab7 и EEA1 в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. В клетках, экспрессирующих плазмиду Rab7-DsRed (красный), запускали эндоцитоз ЭФР-QDs655 (синий). А) препараты этих клеток, фиксированных через 15, 23, 30, 45, 60 мин после стимуляции эндоцитоза. Иммунофлуоресцентное мечение EEA1 (зеленый). Масштаб: 10 мкм (изображения целых клеток); 3 мкм (изображения выделенного участка клетки); изображения отдельных везикул слева на право: 2 мкм, 2 мкм, 1 мкм. Б) оценка доли ЭФР-положительных эндосом, колокализирующихся 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 ($p < 0.05$).

Как видно на графике (рис. 8, Б), максимальная колокализация ЭФР-содержащих эндосом с EEA1-везикулами наблюдалась на 15 мин после стимуляции эндоцитоза и достигала порядка 60–65%. Степень колокализации этих везикул снижалась на 45 и 60 мин по сравнению с 15 и 23 мин (рис. 8, 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. 9, Б).

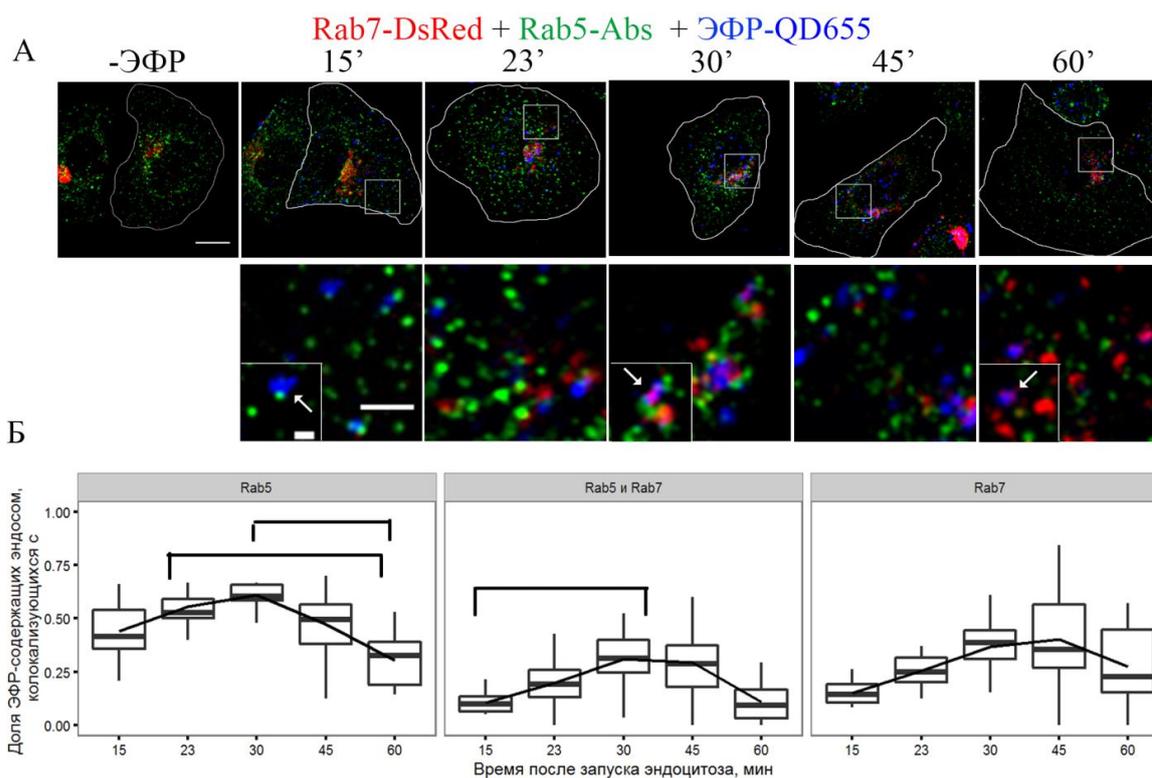


Рис. 9 **Динамика колокализации ЭФР, Rab7 и Rab5 в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов.** В клетках, экспрессирующих плазмиду Rab7-DsRed (красный), запускали эндоцитоз ЭФР-QDs655 (синий). **А)** Препараты этих клеток, фиксированных через 15, 23, 30, 45, 60 мин после стимуляции эндоцитоза. Иммунофлуоресцентное мечение Rab5 (зеленый). 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 ($p < 0.05$).

Нами также была произведена оценка доли ЭФР-позитивных эндосом, содержащих EEA1 и Rab7. Оказалось, что к 15-ти мин в клетках таких везикул практически не выявлялось (рис. 8, Б). Напротив, к 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. 8, А). При этом к 30-ти минутам по сравнению с 15 мин возрастала также тройная колокализация ЭФР-Qds, Rab5 и Rab7 (рис. 9, Б). Начиная с 30-ти минут, по сравнению с 15 мин, возрастало также количество ЭФР-положительных везикул, содержащих Rab7, но не колокализованных с EEA1 (рис. 8, Б). Эти данные указывают на то, что Rab7 привлекается к ЭФР-содержащим эндосомам еще до стадии их сегрегации от EEA1-везикул. Для подтверждения данных, полученных в ходе анализа фиксированных клеток, а также для изучения механики процесса Rab5-Rab7-конверсии мы использовали прижизненную съемку. Для прижизненного анализа клетки котрансфицировали плазмидами EEA1-EGFP и Rab7-DsRed или EEA1-EGFP и Rab5a-*pmCherryC1*, после чего эндоцитоз в этих клетках стимулировали добавлением комплексов ЭФР-Qds655 (рис. 10, 11). Оказалось, что в процессе сегрегации гибридные везикулы располагались преимущественно в околоядерной части клетки рядом с Rab7-позитивной областью (рис. 10). В ходе сегрегации гибридная везикула ориентировалась ЭФР-содержащим доменом в сторону этой области. ЭФР-содержащий домен привлекался в Rab7-область, отсоединяясь при

этом от EEA1-везикулы (рис. 10). ЭФР-положительная эндосома содержала оба сигнала (EEA1 и Rab7) очень непродолжительное время. Оставалось также выяснить, на каком этапе происходит уход Rab5 с поверхности эндосом и как он осуществляется. Прижизненные эксперименты на клетках, котрансфицированных плазмидами EEA1-EGFP и Rab5a-mCherryC1, показали, что Rab5 не уходил постепенно с мембраны ЭФР-содержащих везикул, а отделялся в составе EEA1-положительных везикул от ЭФР-содержащего домена (рис. 11).

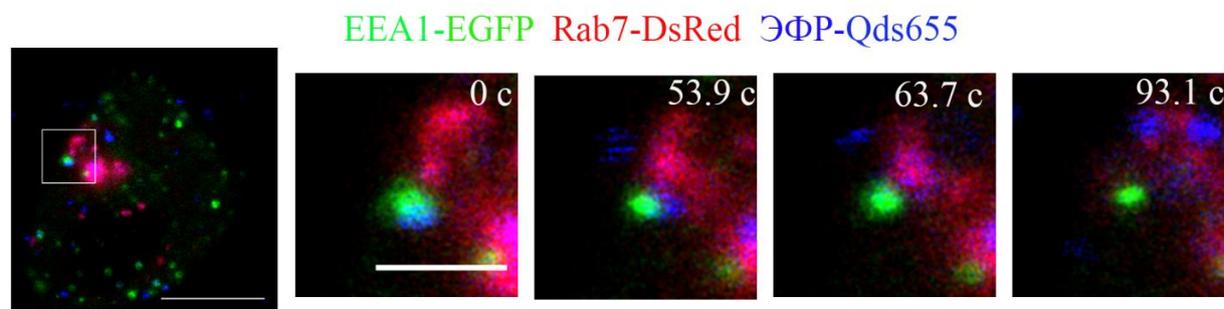


Рис. 10 Сегрегация EEA1-везикул от ЭФР- и Rab7-содержащих эндосом. В клетках, экспрессирующих плазмиды EEA1-EGFP (зеленый) и Rab7-DsRed (красный), запускали эндоцитоз добавлением ЭФР-Qds655 (синий) на 5 мин при 37°C. Прижизненная микроскопия. Обозначено время после начала съемки, с. Масштаб—10 мкм (изображение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

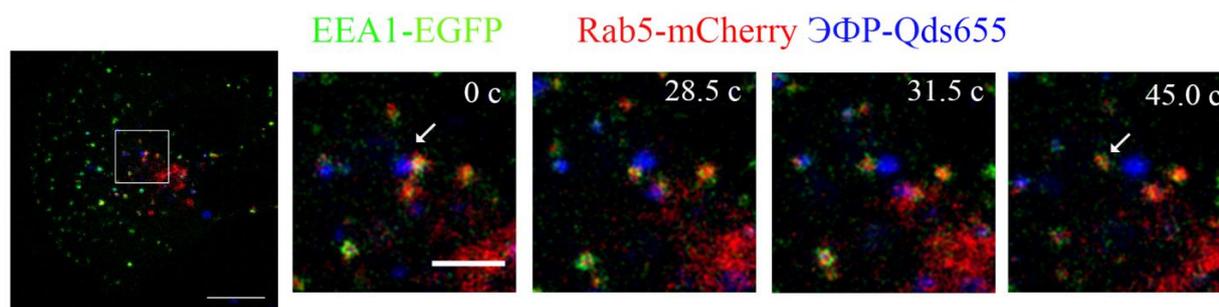


Рис. 11 Сегрегация EEA1- и Rab5-положительных везикул от ЭФР-содержащих эндосом. В клетках, экспрессирующих плазмиды EEA1-EGFP (зеленый) и Rab5-mCherry (красный), запускали эндоцитоз добавлением ЭФР-Qds655 (синий) на 5 мин при 37°C. Прижизненная микроскопия. Обозначено время после начала съемки, с. *Стрелкой* обозначена гибридная эндосома, претерпевающая процесс сегрегации. 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.

6. EEA1-везикулы, выявляющиеся в подверженных сывороточному голоданию клетках, не являются аутофагосомами. Известно, что индукция в клетках аутофагии может быть вызвана недостатком в среде для культивирования сывороточных факторов. Учитывая тот факт, что в процессе своего созревания аутофагосома может взаимодействовать с ранними эндосомами и может быть обогащена белком EEA1 (Razi et al., 2009), нельзя исключать того, что наблюдаемые нами в контрольных клетках EEA1-везикулы могут представлять собой аутофагосомы.

Чтобы это проверить, мы проанализировали колокализацию везикул, несущих EEA1, с маркером аутофагосом LC3 (рис. 12, 13). Мы также оценили количество и средний кажущийся

размер EEA1- и LC3-положительных везикул в клетках, культивируемых в среде с пониженным содержанием сыворотки на протяжении 12-36 ч.

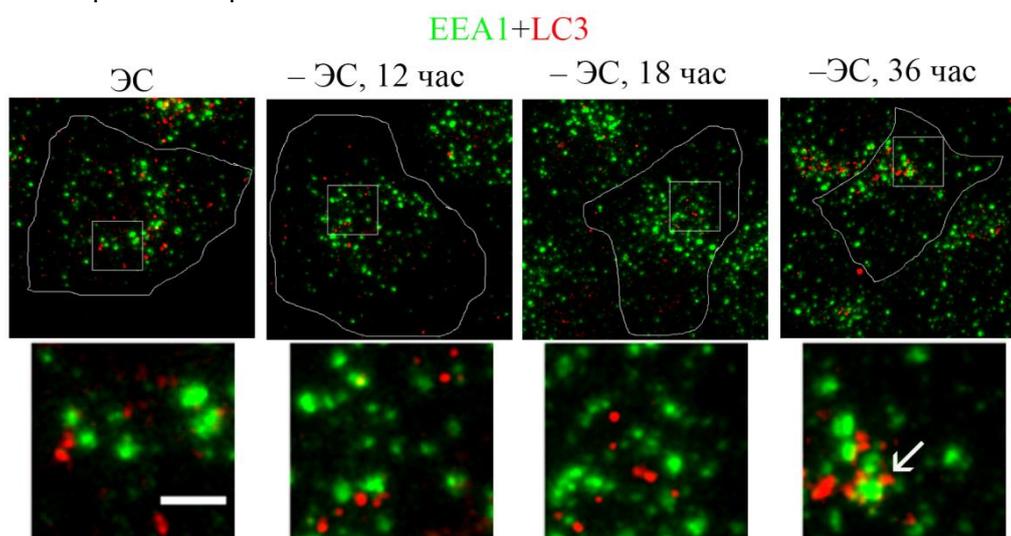


Рис. 12 Везикулы, несущие EEA1 и LC3, в клетках после индукции сывороточного голодания. Клетки культивировали в присутствии 10% эмбриональной сыворотки (ЭС, контроль), в ее отсутствие (-ЭС) в течение 12, 18 и 36 ч. Иммунофлуоресцентное мечение: EEA1 (зеленый); LC3 (красный). Масштаб: 10 мкм (изображения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

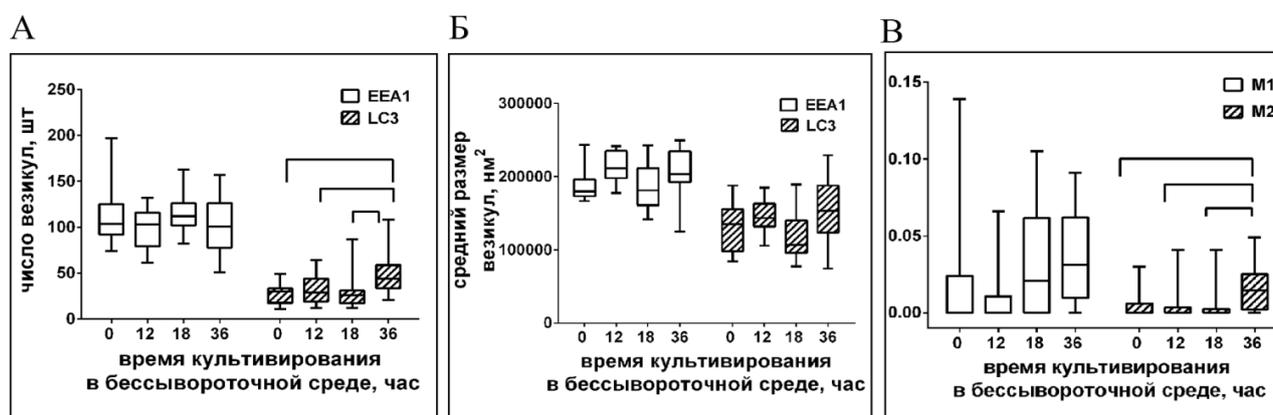


Рис. 13 Влияние сывороточного голодания на число, средний размер и степень колокализации EEA1- и LC3-положительных везикул в клетках. Число (А) и средний размер (Б) везикул, несущих EEA1 (белые столбцы) и LC3 (столбцы со штриховкой), оценивали в клетках, культивируемых в течение 12, 18 и 36 ч в отсутствие 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.

Мы обнаружили, что в контрольных клетках, культивируемых в среде с оптимальным содержанием сыворотки (10 %), выявляется около 30-40 LC3-положительных везикул (рис. 13, А), что также соответствует количеству, выявляемому и в клетках, подверженных сывороточному голоданию на протяжении 12–18 ч (рис. 13, 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. 13, А), что меньше числа EEA1-везикул (100–150 шт). Напротив, средний кажущийся размер LC3-везикул при индукции сывороточного голодания достоверно не изменялся (рис. 13, Б).

ЕЕА1-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. 13, А, Б). Колокализацию ЕЕА1 с LC3-везикулами оценивали с помощью коэффициентов Мандерса М1 и М2 (см. главу «Материалы и методы»). Оказалось, что медианное значение коэффициентов колокализации М1 и М2 в контрольных клетках было менее 0.05 и не изменялось после 12 и 18 ч сывороточного голодания по сравнению с контролем (рис. 13, В). Только в клетках, голодающих в течение 36 ч, значение коэффициента Мандерса М2 возрастало по сравнению со значениями в остальных клетках (рис. 13, В). Однако эти значения также оставались крайне низкими (не более 0.05).

Таким образом, в клетках, культивируемых в бессывороточных условиях в течение 12–36 ч подавляющее большинство ЕЕА1-везикул не колокализовалось с маркером аутофагосом LC3, что позволяет утверждать, что ЕЕА1-везикулы не являются аутофагосомами.

7. Роль эндоцитозного пути в происхождении ЕЕА1-положительных везикул. В соответствии с доминирующей точкой зрения, ЕЕА1-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 кажущийся размер ЕЕА1-везикул в этих клетках (рис. 14). Оказалось, что в клетках, инкубированных в присутствии обоих сочетаний ингибиторов, эти показатели не изменялись по сравнению с контрольными клетками (рис. 14, Б, В). Таким образом, подавление жидкофазного и динамин-зависимого эндоцитоза не оказывало существенного влияния на популяцию ЕЕА1-везикул в клетках.

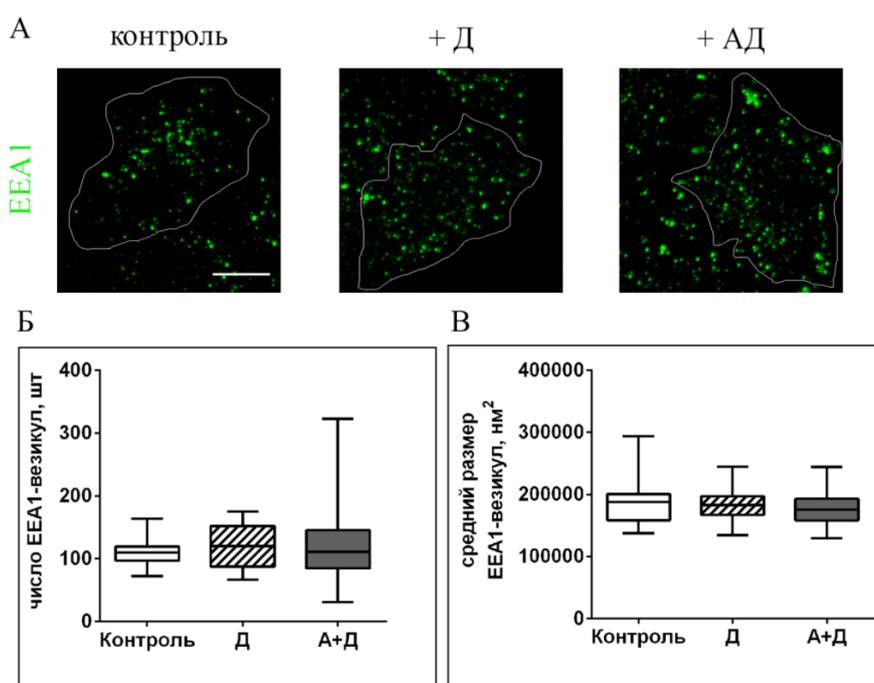


Рис. 14 Влияние амилорида и динасора на популяцию ЕЕА1-положительных везикул. Клетки, подверженные сывороточному голоданию, культивировали в присутствии динасора (Д) или динасора и амилорида (+АД) в течение 6 ч, после чего оценивали изменение параметров ЕЕА1-везикул в этих клетках. А – иммунофлуоресцентное окрашивание клеток антителами против ЕЕА1 (зеленый). Масштаб: 10 мкм. Б–число и В – средний размер ЕЕА1-везикул.

Чтобы подтвердить, что ЕЕА1-везикулы не являются производными ПМ, мы провели следующий эксперимент. К клеткам, культивируемым в условиях недостатка ростовых факторов

сыворотки, добавляли липосомы, состоящие из искусственного липида DPPE, связанного с родамином В (DPPE-Rhod В). Как видно на рис. 15, 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. 15).

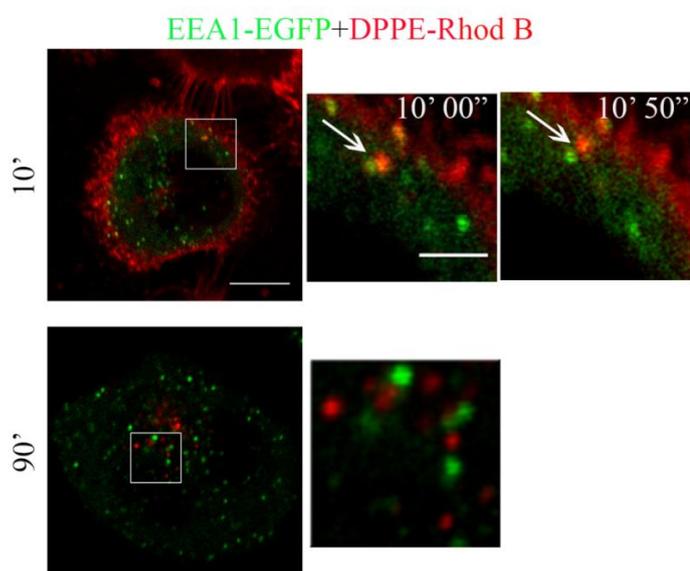


Рис. 15 Мечение клеточной мембраны липидом DPPE. Среду, содержащую липосомы, состоящие из липида DPPE, меченого родамином В (Rhod В), добавляли к клеткам на 5 мин и наблюдали интернализацию участков ПМ в клетки в течение 10–90 мин. Верхний средний рисунок – участок клетки через 10 мин (10'00" – начало наблюдения) после добавления липида. Верхний правый 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).

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 (рис. 15). Однако наблюдаемая колокализация EEA1 и DPPE-Rhod В являлась результатом кратковременного взаимодействия EEA1-везикул с липид-содержащими везикулами, поскольку, как видно на рис. 15, 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. 15). Наблюдаемое нами обособление EEA1-положительных везикул от метки плазматических мембран через 90 мин после добавления DPPE-Rhod В-содержащих липосом противоречит гипотезе о том, что EEA-везикулы являются производными ПМ.

8. Роль биосинтетического пути в биогенезе EEA1-положительных везикул. Другим возможным путем происхождения EEA1-везикул может являться биосинтетический путь – путь биогенеза липидов и мембранных белков всех компартментов клетки. Для проверки этой гипотезы мы использовали ингибитор биосинтетического пути брэфельдин 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 добавляли Брэфельдин А (рис. 16, А).

Методом иммунофлуоресценции оценивали число и средний кажущийся размер EEA1-везикул. Мы обнаружили, что оба параметра при инкубации с БФА существенно снижались по сравнению с контрольными клетками (рис. 16, Б, В). Наблюдаемое влияние БФА на популяцию EEA1-везикул может объясняться участием биосинтетического пути в формировании и созревании мембран EEA1-содержащих везикул.

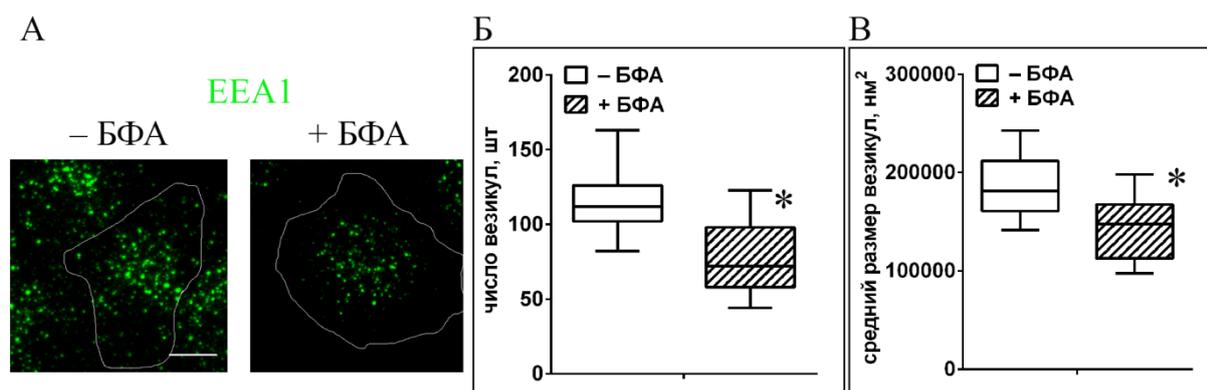


Рис. 16 Влияние брэфельдина А на число и морфологию ЕЕА1-везикул. А – иммунофлюоресцентное окрашивание ЕЕА1 (зеленый) в контрольных клетках (-БФА) и в клетках, культивируемых в присутствии БФА в течение 6 ч (+БФА). Масштаб: 10 мкм. Число (Б) и средний кажущийся размер (В) ЕЕА1-везикул в этих клетках. Звездочкой отмечены достоверные различия ($p < 0,05$).

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 EEA1 с мембраной может быть связано с увеличением доли молекул EEA1, 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 Agr2/3-зависимой актиновой сети.

4. В процессе сегрегации Rab5 покидает гибридную эндосому в составе EEA1-везикулы, тогда как Rab7 ассоциируется с ЭФР-содержащим доменом. Таким образом, процесс сегрегации может рассматриваться в качестве механизма Rab5-Rab7 конверсии.

5. EEA1-везикулы не являются производными процесса аутофагии или продуктом эндоцитозного пути, тогда как подавление биосинтетического пути уменьшает количество EEA1-везикул. Это позволяет предполагать, что именно биосинтетический путь является источником популяции EEA1-везикул.

6. Полученные нами данные позволяют рассматривать EEA1-везикулы как долгоживущий везикулярный компартмент, функция которого состоит в обеспечении слияний везикул с грузом, направляемым на деградацию в лизосомы. В этом контексте сами ЭФР-содержащие эндосомы являются транспортными везикулами, переносящими груз от плазматической мембраны к предшествующим ранним EEA1-положительным эндосомам и далее к лизосомам.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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.
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.
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.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Злобина и др. (2013) *Цитология*, 55 (5): 348–357; **Злобина и др.** (2014) *Цитология*. 56 (10): 741-748; **Beas et al.** (2012) *Molecular biology of the cell*, 23(23), 4623-4634; **Bolte, Cordelieres** (2006) *Journal of microscopy*, 224(3), 213-232; **Choudhury et al.** (2002) *The Journal of clinical investigation*, 109(12), 1541-1550; **Christoforidis et al.** (1999) *Nature cell biology*, 1(4), 249-252; **Dougherty** (2005) *11th AIAA/CEAS Aeroacoustics Conference*; **Dunn et al.** (2011) *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(4), 723-C742.; **Ellenberg et al** (1997) *The Journal of cell biology*, 138(6), 1193-1206; **Grandal, Madshus** (2008) *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(5a), 1527-1534; **Jorissen et al.** (2003) *Experimental cell research*, 284(1), 31-53; **Jovic et al.** (2010) *Histology and histopathology*, 25(1), 99-112; **Laemmli** (1970) *Nature*, 227, 680-685; **Lawe et al.** (2002) *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8611-8617; **Leonard et al.** (2008) *Journal of cell science*, 121(20), 3445-3458; **Manders et al.** (1993) *Journal of microscopy*, 169(3), 375-382; **Piper, Katzmann** (2007) *Annual review of cell and developmental biology*, 23, 519-547; **Razi et al.** (2009) *J. Cell Biol.* 185(2), 305-321; **Reits, Neefjes** (2001) *Nature cell biology*, 3(6), E145-E147; **Rink et al.** (2005) *Cell*, 122(5), 735-749; **Rubino et al.** (2000) *Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 3745-3748; **Salova et al.** (2016) *Oncotarget*, 7(5), 6029-6047; **Simonsen et al.** (1998) *Nature*, 394(6692), 494-498; **Spang** (2009) *Biological chemistry*, 390(8), 753-759; **Sprague, McNally** (2005) *Trends in cell biology*, 15(2), 84-91; **Stenmark et al.** (1996) *Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 24048-24054; **Taylor et al.** (2011) *PLoS Biol.* 9(3), e1000604; **Verma et al.** (2015) *Nature Commun.* 6. DOI:10.1038/ncomms7064; **Vieira et al.** (1996) *Science*, 274(5295), 2086-2089; **Wang et al.** (2005) *EMBO reports*, 6(10), 942-948.