

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ТИРФОСТИНА AG1478 НА ПОВЕДЕНИЕ ИНТЕРНАЛИЗОВАННОГО РЕЦЕПТОРА ЭФР НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЭНДОЦИТОЗА

© К. А. Кондратов,¹ А. Л. Черноурдский,^{1,2} А. П. Амосова,¹ Е. С. Корнилова^{1,3}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ²Нижегородская государственная медицинская академия;
³электронный адрес: elena.kornilova@gmail.com

В настоящей работе было проанализировано влияние тирфостина AG1478, специфического ингибитора рецепторной тирозинкиназы, на динамику поведения интернализированного рецептора на разных сроках после стимуляции эндоцитоза. Оказалось, что добавление тирфостина через 30 мин после стимуляции эндоцитоза приводит к рециклированию значительной части ¹²⁵I-ЭФР на поверхность, причем на более поздних сроках эта доля уменьшается. Рециклировавшие под действием тирфостина комплексы, однако, не диссоциируют, возможно потому, что способность AG1478 инициировать олигомеризацию рецепторов в отсутствие лигандов может влиять на константы диссоциации. Оказалось, что только часть рецепторов, локализованных в ранних эндосомах, способна рециклировать при подавлении ТК. Добавление ингибитора через 30 и 60 мин после стимуляции эндоцитоза приводит к подавлению деградации меченого ЭФР, при этом на ранних сроках интернализированные ЭФР-рецепторные комплексы блокируются в основном в РЭ, тогда как на поздних происходило их накопление в не полностью созревших ПЭ. Эти данные свидетельствуют в пользу существования поздней стадии эндоцитоза, прохождение которой зависит от ТК рецептора. Кроме того, добавление тирфостина через 90 мин приводит не к замедлению, а к ускорению деградации, что говорит о существовании механизмов, обеспечивающих временное окно, в течение которого рецепторная ТК может осуществлять функции, не связанные напрямую с эндоцитозом.

Ключевые слова: рецептор ЭФР, AG1478, тирозинкиназа, эндоцитоз, интернализация, рециклирование, компарментализация, ранние и поздние эндосомы, лизосомы, деградация, градиент Перколлы.

Принятые сокращения: ПЭ — поздние эндосомы, РЭ — ранние эндосомы, ТК — тирозинкиназа, ФВК — фосфоровольфрамовая кислота, ЭФР — эпидермальный фактор роста, AG1478 — тирфостин 4-(3-хлоанилино)-6,7-диметоксихиназолин, DSS — дисукцинилимидил суберат, PBS — фосфатносолевой буфер.

Связывание ЭФР с его трансмембранным рецептором на плазматической мембране приводит к димеризации рецепторов и активации их внутриклеточных тирозинкиназных (ТК) доменов (Cochet et al., 1988). Тирозинкиназа (ТК) димеризованных рецепторов фосфорилирует ряд остатков тирозина, локализованных в С-терминальном домене рецептора-партнера, что создает связывающие сайты для ряда белков-субстратов рецептора. После их связывания с рецептором они в свою очередь подвергаются фосфорилированию, тем самым активируясь и запуская собственные сигнальные каскады (Schlessinger, 2000). Одновременно с этим ЭФР-рецепторные комплексы поступают внутрь клетки в ходе эндоцитоза (Никольский и др., 1987). Считается, что активированные рецепторы, интернализуясь первоначально в ранние эндосомы (РЭ), способны инициировать процесс перехода в так называемые поздние эндосомы (ПЭ), имеющие мультивезикулярную структуру. Переход в ПЭ подразумевает процесс созревания эндосом, т. е. постепенное изменение их плотности, состава липидов и белков мембраны (Dunn, Maxfield, 1992). В ходе созревания ЭФР-рецепторные комплексы (и другие трансмембранные белки, направляемые на деградацию в лизосомы) переходят в состав внутренних пу-

зырьков, тогда как рецепторы, оставшиеся на внешней мембране эндосом, способны рециклировать обратно на плазматическую мембрану (Miller et al., 1986). Установлено, что рециклирование является основным путем для интернализированных неактивированных рецепторов, однако часть активированных рецепторов в ряде случаев также способна рециклировать (Sorkin et al., 1989; Соколова и др., 1995; Kornilova et al., 1996).

По существующим представлениям, процесс сортировки в ПЭ состоит из ряда последовательных взаимодействий белков-грузов с несколькими сортирующими комплексами (ESCRT0-III), рекрутируемыми на мембрану эндосомы, в результате чего грузы концентрируются в доменах эндосомальной мембраны, из которых впоследствии будут формироваться внутренние пузырьки (Teis et al., 2008). Процесс сортировки изучен недостаточно. Неясно, какие конкретно стадии процесса на молекулярном уровне опосредуют те или иные комплексы, неизвестно, какие еще белки вовлечены в сортировку и каким образом.

Кроме того, существует ряд данных, позволяющих предполагать, что ЭФР-стимулируемый сигналинг не ограничивается уровнем плазматической мембраны. Дей-

ствительно, поздние эндосомы способны собирать на своей мембране все компоненты MAP-киназного комплекса (Di Guglielmo et al., 1994). Возможно также вовлечение интернализированного рецептора и в стимуляцию иных сигнальных путей (Skarpen et al., 1998; Wunderlich et al., 2001). Учитывая, что доставка ЭФР-рецепторных комплексов в лизосомы означает также негативную регуляцию ЭФР-зависимых сигналов, взаимоотношения эндоцитоза и сигналинга являются одним из самых интригующих вопросов в данной области.

Однако существует ряд проблем, препятствующих быстрому прогрессу в этой области. Так, ингибиторы многих регуляторных белков неизвестны, а генетические манипуляции с такими белками могут приводить к нежелательным (и часто непредсказуемым) побочным результатам. Поэтому необходим поиск подходов, позволяющих манипулировать функционированием белков-сортировщиков и сигнальных белков. Одним из таких способов может быть ингибирование непосредственно ТК-активности рецептора, поскольку многие сигнальные белки, так же как и белки-регуляторы эндоцитоза (например, убиквитин-лигаза c-Cbl), стимулируются именно рецепторной ТК. Существование специфических ингибиторов ТК, в том числе тирфостина AG1478, делает возможным такой подход. Хотя ингибиторы рецепторной ТК пытаются использовать и в терапевтических целях, поскольку многие злокачественные новообразования характеризуются высоким уровнем экспрессии и активации рецепторов ЭФР, детальных исследований того, что происходит с рецептором, находящимся на разных стадиях эндоцитозного пути, при подавлении его тирозинкиназной активности, до сих пор не проводилось.

В настоящей работе, используя культивируемые клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431, мы исследовали динамику компартиментализации меченного радиоактивным иодом-125 ЭФР и влияние на этот процесс добавления тирфостина AG1478 на разных сроках после стимуляции эндоцитоза.

Материал и методика

Культивирование клеток. В работе использовали клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431, полученные из Российского банка клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки, на пластиковых чашках. В опыт брали монослойные культуры на 3-и сут после посева. За 24 ч до начала эксперимента клетки переводили на среду, содержащую 0.2 % эмбриональной сыворотки.

С т и м у л я ц и я э н д о ц и т о з а. Эксперименты по стимуляции эндоцитоза проводили, используя схему с предварительным связыванием лиганда (Благовещенская и др., 1994). Клетки инкубировали в рабочей среде (среда Игла, содержащая 0.1 % БСА, с добавлением 20 мМ HEPES, pH 7.4) при 4 °C в течение 60 мин в присутствии ¹²⁵I-ЭФР в концентрации 10 нг/мл. В этих условиях интернализации не происходит. После удаления несвязавшегося ¹²⁵I-ЭФР с помощью 3 отмывок рабочей средой эндоцитоз стимулировали переводом клеток в рабочую среду, не содержащую лиганда, при 37 °C на определенное время. По окончании инкубационного периода клетки помещали на лед, а среду (рис. 1, б) собирали в вials и использовали для определения степени деградации иодированных

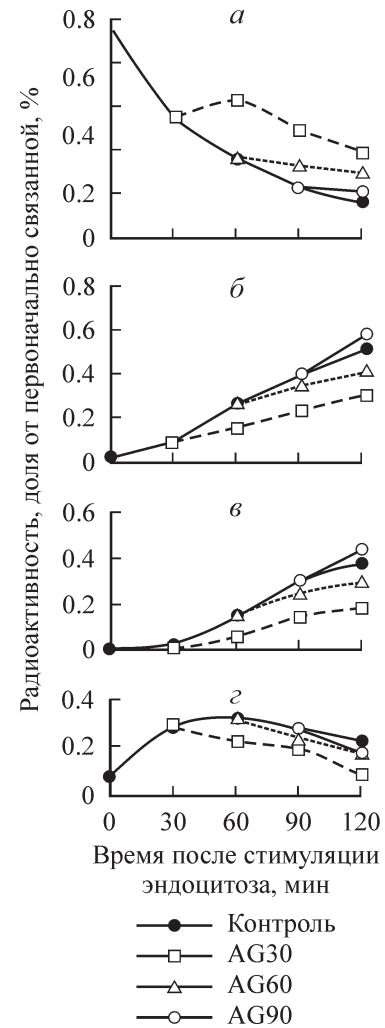


Рис. 1. Влияние тирфостина AG1478, добавленного через 30 (30AG), 60 (60AG) и 90 (90AG) мин после стимуляции эндоцитоза ¹²⁵I-ЭФР, на ассоциацию лиганда с плазматической мембраной (а), выход лиганда в инкубационную среду (б), его деградацию (в) и внутриклеточное накопление (г).

Клетки A431 инкубировали в присутствии ¹²⁵I-ЭФР (10 нг/мл) при 4 °C в течение 60 мин (точка 0). Затем несвязавшийся лиганд отмывали, а эндоцитоз стимулировали переводом клеток в среду температурой 37 °C. В контроле чашки помещали на лед через 30, 60, 90 и 120 мин тепловой инкубации и обрабатывали, как описано в разделе «Материал и методика». К параллельным сериям клеток добавляли тирфостин (0.3 мкМ) через 30, 60 и 90 мин после стимуляции эндоцитоза и далее обрабатывали их, как и контрольные. В дальнейшем эти клетки подвергали субклеточному фракционированию в градиенте Перколла. Количество интернализованного лиганда (г) определяли как сумму радиоактивности всех фракций градиента. Все данные выражали как долю (в %) от количества первоначально связанного с клеткой ¹²⁵I-ЭФР, которое принимали за 1. Представлены данные репрезентативного опыта серии из 9 экспериментов.

лигандов методом осаждения высокомолекулярных белков раствором, содержащим 5 % ТХУ и 1 % ФВК (рис. 1, в). Для удаления поверхностно-связанного (неинтернализованного либо рециклированного) лиганда клетки обрабатывали на льду 0.2 М натрий-ацетатным буферным раствором (pH 4.5), содержащим 150 мМ NaCl (буфер А). Буфер А также собирали в вials и использовали для определения количества неинтернализованного ¹²⁵I-ЭФР (рис. 1, а). После экстракции уксусной кислотой клетки промывали холодной средой Игла, а затем PBS до восстановления нейтральных значений pH. Обработанные та-

ким образом клетки либо использовали для субклеточно-го фракционирования, либо лизировали в 1 М NaOH в течение 30 мин и переносили их в виалы для определения количества интернализированного лиганда.

Субклеточное фракционирование в градиенте плотности Перколла. Для определения внутриклеточного распределения эндоцитированного ЭФР клетки собирали в буферный раствор ТЭС (10 мМ триэтаноламина, 0.25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, pH 6.8) и обрабатывали для центрифугирования в 17%-ном Перколле, как описано ранее (Корнилова и др., 1987). Градиент формировали центрифугированием в течение 25 мин при 28 000 об/мин в угловом роторе 65 на центрифуге Spinko L2-65K (Beckman). Фракционирование градиента проводили со дна пробирки через иглу. Измерение радиоактивности проб осуществляли на гамма-счетчике Mini-Gamma (LKB). Количественную оценку радиоактивности интернализированного и деградированного лигандов проводили по программе «Градиент».

Анализ рециклирования ЭФР-рецепторных комплексов. Клетки инкубировали в рабочей среде при 4 °C в течение 60 мин в присутствии ^{125}I -ЭФР в концентрации 10 нг/мл. После удаления несвязавшегося ^{125}I -ЭФР эндоцитоз стимулировали переводом клеток в рабочую среду, не содержащую лиганда, при 37 °C на 15 мин. По окончании инкубации чашки с клетками помещали на лед, затем отмывали несвязавшийся лиганд средней Игла. Для удаления поверхностно-связанного (неинтернализированного) лиганда клетки обрабатывали на льду буфером А. Затем их промывали PBS. После этого к клеткам добавляли рабочую среду, содержащую 0.3 мкМ AG1478 и не содержащую этого агента и продолжали инкубацию в течение 10, 20 и 30 мин при 37 °C. Далее чашки с клетками помещали на лед, собирали среду в виалы. Затем отмывали несвязавшийся лиганд буфером А, собирая раствор в виалы для определения количества поверхностно-связанного ^{125}I -ЭФР. После этого промывали клетки PBS и добавляли 1 М NaOH на 30 мин, используя затем щелочной раствор для определения внутриклеточного содержания ^{125}I -ЭФР.

Анализ олигомеризации рецепторов ЭФР. Изучение олигомеризации рецептора проводили по методу Ванга (Wang et al., 2002). Клетки, выращенные на чашках Петри диаметром 9 см, после воздействия тирфостина или ЭФР снимали раббером в 500 мл фосфатного буфера, собирали в пробирки и добавляли раствор DSS в конечной концентрации 5 мМ и оставляли на 2 ч на холоде (4 °C). Затем к пробам добавляли Трис-HCl (pH 7.6) до конечной концентрации 10 мМ на 15 мин. После этого клетки центрифугировали 15 мин при 2000 g, супернатант сливали, а к осадку клеток добавляли лизисный буфер (1 % Тритона X-100, 0.5 % NP-40, 10 мМ NaF, 150 мМ NaCl, коктейль ингибиторов фирмы Sigma, 1 мМ ортованадата натрия, 10 мМ N-этилмаллимида, 20 мМ Трис-HCl, pH 7.6). После лизиса пробы центрифугировали (16 000 g, 15 мин). Супернатант собирали и анализировали распределение белков на градиентном (4—16 %) Ds-Na-ПА-АГ-электрофорезе с последующим иммуноблоттингом.

И м м у н о б л о т и н г. В работе использовали антитела против рецептора ЭФР производства Sigma (США). Клетки лизировали, как описано выше. Супернатант собирали и определяли концентрацию белка по методу Лоури. После этого пробы из одного эксперимента уравнивали по содержанию белка. Электрофорез проводили по методу Лэммли (Laemmly, 1970) с нагрузкой белка на одну до-

рожку, равной 70 мкг. Белки с геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану и инкубировали ее с антителами к рецептору ЭФР. Рецептор выявляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL) в соответствии с указаниями фирмы-производителя (BioRad).

Результаты и обсуждение

Применение протокола с предварительным связыванием лиганда при 4 °C позволяет синхронизировать все последующие стадии эндоцитоза после его стимуляции при переводе клеток в среду при температуре 37 °C. В контрольных клетках в таких условиях количество меченого лиганда, связанного с рецепторами на плазматической мембране, уменьшается почти в 5 раз за 120 мин (рис. 1, а). Параллельно с этим увеличивается количество метки, выявляемой в инкубационной среде, причем в основном за счет выхода продуктов деградации ЭФР (ср. рис. 1, б и в). Деградация начинается через 30 мин после стимуляции эндоцитоза и далее увеличивается, достигая через 120 мин 40 % от первоначально связанного с клетками количества лиганда. Уровень внутриклеточного, интернализированного ^{125}I -ЭФР постепенно возрастает, достигая максимума через 30—60 мин, и затем начинает убывать в результате лизосомной деградации.

Как показано нами ранее (Кондратов и др., 2006), AG1478 оказывает ингибирующее влияние на фосфорилирование рецептора ЭФР по тирозину уже через 5 мин после добавления. В этом эксперименте мы добавляли тирфостин через 30, 60 и 90 мин после стимуляции эндоцитоза. Как видно на рис. 1, добавление ингибитора приводило к увеличению количества ^{125}I -ЭФР на плазматической мембране, а также к уменьшению внутриклеточного ЭФР на всех сроках эксперимента (вплоть до 120 мин). Логично предположить, что быстрая инактивация интернализированных рецепторов приводит к их возвращению на плазматическую мембрану. Очевидно, что рециклировать могут только ЭФР-рецепторные комплексы, локализованные на внешней мембране эндосом, до их попадания во внутренние пузырьки. Не исключено также, что еще на внешней мембране эндосомы уже отсортированные рецепторы ЭФР становятся недоступными для рециклирования благодаря взаимодействию с определенным сортирующим комплексом.

В любом случае видно, что доля способных к рециклированию ЭФР-рецепторных комплексов уменьшается с увеличением времени, прошедшего после стимуляции эндоцитоза, но даже через 90 мин некоторая часть интернализированных рецепторов способна к возвращению на поверхность. Поскольку данные по субклеточному фракционированию в градиенте Перколла (рис. 4, а, в) клеток, динамика поведения ^{125}I -ЭФР в которых представлена на рис. 3, показывают, что и через 120 мин после интернализации значительная часть лиганда ассоциирована с фракцией РЭ, это свидетельствует о существовании некой «критической точки», после которой рециклирование невозможно даже для рецепторов, находящихся на поверхности РЭ.

Поскольку по условиям эксперимента рециклирование происходит в среде, свободной от экзогенного лиганда, возвращающиеся на поверхность комплексы имеют тенденцию к диссоциации. В результате количество их на мембране, как правило, увеличивается, но при этом увеличивается и количество интактного ^{125}I -ЭФР в среде

(рис. 2, кривые 1, 3). Однако из данных, представленных на рис. 1, следует, что рециклировавшие после добавления AG1478 рецепторные комплексы остаются преимущественно связанными с мембраной и впоследствии реинтернализуются (такая волна особенно четко видна при добавлении тирфостина через 30 мин).

В данных экспериментах (включавших в себя дальнейшее субклеточное фракционирование) уровень рециклирования несколько недооценен, поскольку повторная интернализация может происходить довольно быстро, в течение минут. Часто во избежание этого добавляется избыток немеченого лиганда, но, с другой стороны, 100-кратное увеличение общей концентрации ЭФР может значительно повлиять на уровень рециклирования в целом. Поэтому мы даже в специально поставленных опытах избытка холодного лиганда не добавляли. Тем не менее в обоих случаях видно (рис. 1, а; 2, кривая 2), что в присутствии тирфостина количество метки увеличивается преимущественно на мембране, а не в среде. Это означает, что AG1478, стимулируя рециклирование, тем не менее подавляет диссоциацию рециклировавших ЭФР-рецепторных комплексов (ср. рис. 3, кривые 1 и 2).

Причины этого феномена могут быть связаны с тем, что тирфостин, как сообщалось (Arteaga et al., 1997), способен приводить к димеризации рецепторов в отсутствие лиганда, что может изменять константы ассоциации и диссоциации рецептора с ЭФР. Действительно, обработав клетки тирфостоном в течение разного времени и подвергнув их инкубации в присутствии кросс-сшивающего реагента DSS, мы обнаружили, что существенная часть рецепторов ЭФР локализована в геле значительно выше, чем мономерный белок (170 кДа). Однако эта область в градиентном геле покрывает область мол. масс порядка 600—800 кДа, что соответствует мол. массе не столько димеров (350—400 кДа), сколько олигомеров (рис. 4). Интересно, что воздействие ЭФР на клетки приводило к образованию таких же олигомеров, однако их доля была максимальной через 5 мин после стимуляции клеток лигандом и резко падала уже через 10 мин, снижаясь через 60 мин почти до базального уровня. Поскольку эффективность сшивки ниже 100 %, мы не можем оценить реальную степень димеризации.

Считается установленным, что тирозинкиназная активность рецептора является необходимым условием для вступления на путь лизосомной деградации. Однако до сих пор неясно, вплоть до какого момента рецепторная ТК необходима для регуляции лизосомного пути. Наши данные показывают (рис. 1, в), что добавление тирфостина через 30—60 мин после стимуляции эндочитоза максимально подавляет деградацию. На более поздних сроках деградация оказывается практически нечувствительной к действию тирфостина. Интересно, что даже и на ранних сроках AG1478 не полностью блокировал деградацию ЭФР. Это означает, что уже через 30 мин после стимуляции эндочитоза некоторое количество рецепторов успевает пройти критическую стадию, после которой деградация уже становится неизбежной. С другой стороны, использованная нами концентрация тирфостина блокировала лишь ЭФР-стимулируемый эффект и те рецепторы, которые отвечали за базальный, ЭФР-независимый, уровень ТК активности и могут обеспечивать наблюдаемый нами уровень остаточной деградации. Тем не менее на поздних стадиях мы наблюдали парадоксальный результат: добавление тирфостина через 90 мин после стимуляции эндочитоза не столько подавляло, сколько стимули-

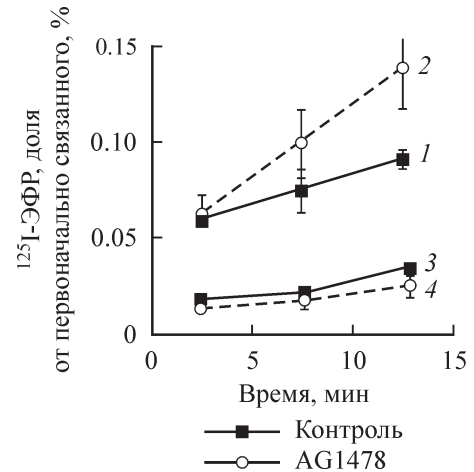


Рис. 2. Влияние тирфостина на рециклирование и диссоциацию ЭФР-рецепторных комплексов.

Клетки, эндочитировавшие ¹²⁵I-ЭФР в течение 15 мин в присутствии и в отсутствие тирфостина, помещали на лед, неинтернализированный лиганд удаляли с помощью Na-ацетатного буфера и продолжали инкубацию при 37 °C в течение следующих 20 мин. Через 5, 15 и 20 мин клетки опять помещали на лед и обрабатывали Na-ацетатным буфером. Инкубационную среду использовали для оценки количества диссоциировавшего лиганда (кривые 3 и 4), тогда как количество радиоактивности в Na-ацетатном буфере отражало уровень поверхностно-связанного лиганда (кривые 1 и 2). Кривые 1 и 3 — к клеткам не добавляли тирфостин, кривые 2 и 4 — клетки инкубировали с тирфостоном.

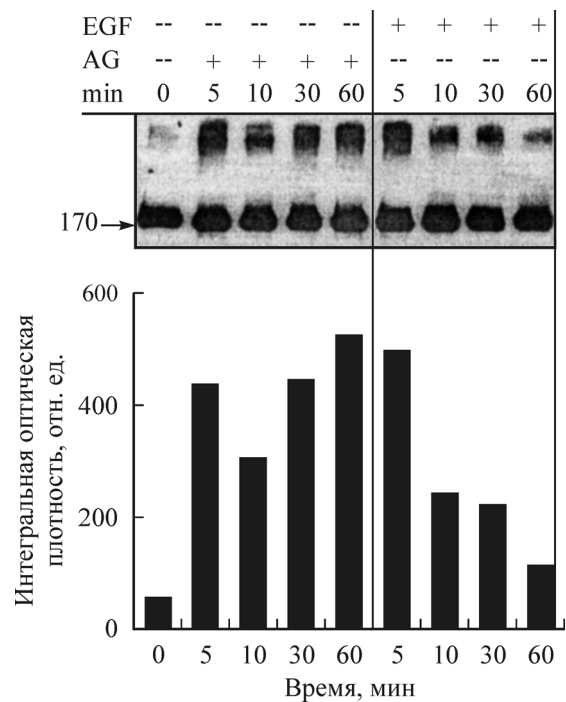


Рис. 3. Лиганднезависимая олигомеризация рецепторов ЭФР при действии тирфостина.

Клетки инкубировали, как во всех экспериментах по стимуляции эндочитоза, но к некоторым из них не добавляли ни тирфостин, ни ЭФР (0) либо, как указано на рисунке, добавляли тирфостин или ЭФР. Через указанное время клетки лизировали, инкубировали с кросс-сшивающим агентом DSS и подвергали электрофорезу в градиентном (4—16 %) геле, с последующим иммуноблотингом. Положение мономерного рецептора указано стрелкой. На денситограмме (внизу) представлены данные по интегральной оптической плотности (отн. ед.) соответствующих высокомолекулярных бандов.

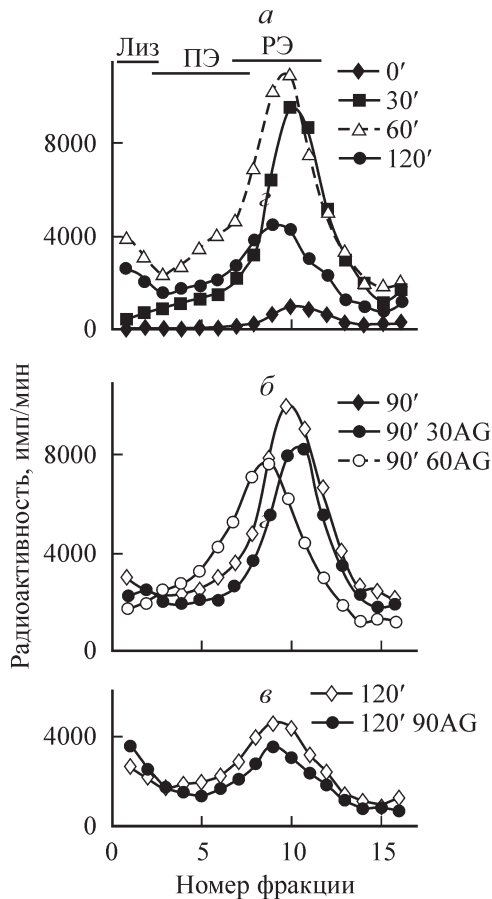


Рис. 4. Компартиментализация интернализированного ¹²⁵I-ЭФР в контроле (а) и в клетках, подвергавшихся обработке тирфостинном (б, в) через 90 (б) и 120 (в) мин после стимуляции эндоцитоза.

Тирфостин добавляли через 30 и 60 мин (б) или через 90 мин (в) после стимуляции эндоцитоза. После окончания инкубации клетки центрифугировали в градиенте Перколла, как описано в разделе «Материал и методика». Градиенты разделяли на фракции, начиная со дна центрифужной пробирки. Лиз — лизосомы, ПЭ — поздние эндосомы, РЭ — ранние эндосомы. Радиоактивность каждой фракции определяли на гамма-счетчике и выражали в имп/мин.

ровало деградацию ЭФР. Хотя увеличение не было значительным, тем не менее этот эффект воспроизводился в 7 из 9 экспериментов при условии «быстрого эндоцитоза». Этот результат чрезвычайно интересен, поскольку указывает на то, что активная рецепторная ТК обеспечивает некое временное окно для процессов, возможно и не связанных с регуляцией эндоцитоза как такового. Можно предполагать, что в поддержании рецепторной ТК в стимулированном состоянии участвуют не только пассивные (диссоциация с лигандом за счет снижения pH в ПЭ), но и некие активные механизмы.

Весьма существенным является вопрос о том, как влияет тирфостин на компартиментализацию интернализированных ЭФР-рецепторных комплексов на разных этапах эндоцитоза. Для этого клетки, содержащие только внутриклеточный ¹²⁵I-ЭФР, подвергали субклеточному фракционированию в градиенте 17%-ного Перколла (рис. 4). Видно, что обработка ацетатным буфером (pH 4.5) приводит к удалению более чем 90 % поверхностно-связанного при 4 °С лиганда (рис. 4, а). После стимуляции эндоцитоза повышением температуры до 37 °С и обработки ацетатным буфером в дальнейшем (30 и 60 мин) в клетках

оставалось все больше метки, ассоциированной с пиком, максимум которого расположен в 10—11-й фракциях. По данным наших предыдущих исследований, это свидетельствует о локализации меченого фактора роста в РЭ (Корнилова и др., 1987). Через 60 мин наблюдается увеличение плеча радиоактивности, связанной с более плотными фракциями (1—7-я), что соответствует ПЭ и наиболее плотным лизосомам (1—3-я фракции). При этом количество метки в РЭ через 120 мин падает, а положение максимума этого пика сдвигается в 8—9-ю фракции.

Если добавить тирфостин через 30 мин после стимуляции эндоцитоза (90'30AG; рис. 4, б), то по сравнению с контрольными клетками через 90 мин пик меченого лиганда сдвигается вправо (максимум в 10—11-й фракциях), при этом общее количество метки оказывается меньше контрольных значений как в области РЭ, так и в областях с большей плотностью, что свидетельствует о частичной блокировке ЭФР-рецепторных комплексов в РЭ. Добавление тирфостина через 60 мин после стимуляции эндоцитоза (90'60AG) приводило к смещению пика в область более зрелых эндосом и уменьшению доли метки, седиментирующей в области лизосом. От эксперимента к эксперименту это смещение было более или менее выраженным (в зависимости от общей динамики эндоцитоза), однако надежно воспроизводимым.

На более поздних сроках (рис. 4, в) по сравнению с контролем (120 мин) добавление AG1478 к клеткам через 90 мин вызывало перераспределение интернализированной метки из относительно плотных, т. е. уже прошедших определенный процесс созревания, РЭ (8—10-я фракции) во фракцию лизосом (1—3-я фракции), что коррелирует с данными по увеличению выхода деградированного ЭФР из клеток (рис. 1, в).

Полученные нами данные свидетельствуют о замедлении созревания эндосом на определенном позднем этапе эндоцитоза в результате деактивации рецепторной ТК. Интересно, что подобные изменения в динамике компартиментализации мы наблюдали при действии ингибитора протеасом MG132, приводящем к истощению пула свободного убиквитина в клетке (Melikova et al., 2006). Поскольку подавление активности ТК приводит к немедленной диссоциации рецептора и убиквитин-лигазы c-Cbl, весьма высока вероятность того, что причиной аналогичного влияния тирфостина на динамику компартиментализации ЭФР-рецепторных комплексов может быть неспособность более обеспечивать необходимый паттерн убиквитинирования.

Кроме того, мы обнаружили, что только часть рецепторов может вступать на путь рециклирования из ранних эндосом после деактивации рецепторной киназы, что указывает на сложный и многостадийный характер процесса сортировки, некоторые стадии которого могут зависеть от наличия ТК в меньшей степени, чем другие. Несмотря на это, на позднем этапе эндоцитозного пути существует по крайней мере один этап, для прохождения которого необходима активированная рецепторная ТК, что противоречит представлению о том, что ТК нужна только для выхода ЭФР-рецепторных комплексов из РЭ, происходящего на ранних (15—30 мин) стадиях после стимуляции эндоцитоза.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-49046 и 08-04-90729-моб_ст) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Благовещенская А. Д., Соколова И. П., Корнилова Е. С., Никольский Н. Н. 1994. Зависимость эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста от степени занятости рецепторов. Цитология. 36 (7) : 664—674.
- Кондратов К. А., Степаняц Н. А., Амосова А. П., Корнилова Е. С. 2006. Поиск методических подходов для выяснения роли тирозинкиназы интернализованного рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) в регуляции поздних стадий эндоцитоза. Цитология. 48 (9) : 770.
- Корнилова Е. С., Соркин А. Д., Никольский Н. Н. 1987. Динамика компартиментализации эпидермального фактора роста в клетках A431. Цитология. 29 : 904—910.
- Никольский Н. Н., Соркин А. Д., Сорокин А. Б. 1987. Эпидермальный фактор роста. Л.: Наука. 200 с.
- Соколова И. П., Вдовина И. Б., Корнилова Е. С., Никольский Н. Н. 1995. Компартиментализация эпидермального фактора роста (ЭФР) в ходе эндоцитоза в клетках, экспрессирующих нормальный и лишенный основных сайтов автофосфорилирования рецептор ЭФР. Цитология. 37 (9/10) : 873—882.
- Arteaga C. L., Ramsey T. T., Shawver L. K., Guyer C. A. 1997. Unliganded epidermal growth factor receptor dimerization induced by direct interaction of quinazolines with the ATP binding site. J. Biol. Chem. 272 : 23 247—23 254.
- Cochet C., Kashles O., Chamber E. M., Borello I., King C. R., Shlessinger J. 1988. Demonstration of EGF-induced receptor dimerization in living cells using a chemical covalent cross linking agent. J. Biol. Chem. 263 : 3290—3295.
- Di Guglielmo G. M., Baass P. C., Ou W.-J., Posner B. I., Bergeron J. J. 1994. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchoma. EMBO J. 13 : 4269—4277.
- Dunn K. W., Maxfield F. R. 1992. Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. J. Cell Biol. 120 : 77—83.
- Kornilova E., Sorkina T., Beguinot L., Sorkin A. 1996. Carboxyl-terminal receptor domain 1022—1123 is responsible for the lysosomal targeting of EGF receptors. J. Biol. Chem. 271: 30 340—30 346.
- Laemmly U. K. 1970. Structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Melikova M. S., Kondratov K. A., Kornilova E. S. 2006. Two different stages of epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis are sensitive to free ubiquitin depletion produced by proteasome inhibitor MG132. Cell Biol. Int. 30 : 31—43.
- Miller K., Beardmore J., Kanety H., Schlessinger J., Hopkins C. R. 1986. Localization of the epidermal growth factor (EGF) receptor within the endosomes of EGF-stimulated epidermoid carcinoma (A431) cells. J. Cell Biol. 102 : 500—509.
- Schlessinger J. 2000. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. Cell. 103 : 211—225.
- Skarpen E., Johannessen L. E., Bjerk K., Fasteng H., Gueren T. K., Lindeman B., Thoresen G. H., Christoffersen T., Stang E., Huitfeldt H. S., Madhus I. H. 1998. Endocytosed epidermal growth factor (EGF) receptors contribute to the EGF-mediated growth arrest in A431 cells by inducing a sustained increase in p21/CIP1. Exp/ Cell Res. 243 : 161—172.
- Sorkin A., Kornilova E., Teslenko L., Sorokin A., Nikolsky N. 1989. Recycling of epidermal growth factor-receptor complexes in A431 cells. Biochim. biophys. acta. 1011 : 88—96.
- Teis D., Saksena S., Emr S. D. 2008. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. Develop. Cell. 15 : 578—589.
- Wang Y., Pennock S., Chen X., Wang Z. 2002. Internalization of inactive EGF receptor into endosomes and the subsequent activation of endosome-associated EGF receptors. Epidermal growth factor. Sci. STKE. 161 : PL17.
- Wunderlich W., Fialka I., Teis D., Alpi A., Pfeifer A., Parton R. G., Lottspeich F., Huber L. A. 2001. A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. J. Cell Biol. 152 : 765—776.

Поступила 2 II 2009

ANALYSIS OF TYRPHOSTIN AG1478 EFFECT ON BEHAVIOR OF INTERNALIZED EGF RECEPTOR AT DIFFERENT STAGES OF ENDOCYTOSIS

K. A. Kondratov,¹ A. L. Chernorudskiy,^{1,2} A. P. Amosova,¹ E. S. Kornilova^{1,3}¹Institute of Cytology RAS, St. Petersburg and ²Nizhny Novgorod State Medical Academy;
³e-mail: elena.kornilova@gmail.com

In the present work the effect of specific inhibitor of the receptor tyrosine kinase, tyrphostin AG1478, has been analyzed for behavior of internalized EGF receptor at different stages upon stimulation of endocytosis. It was found that tyrphostin addition in 30 min after endocytosis stimulation resulted in recycling of a significant portion of ¹²⁵I-EGF onto cell surface. This portion was decreasing with time. EGF-receptor complexes, being recycled under action of AG1478, however, did not dissociate possibly because of tyrphostin ability to initiate receptor oligomerization in the absence of the ligand which can possibly affect dissociation constants. It was found that only a portion of EGF receptor localized in early endosomes was able to recycle upon TK inhibition. Addition of the inhibitor in 30 and 60 min after endocytosis stimulation resulted in decrease of labeled EGF degradation. At early stages internalized EGF-receptor complexes was blocked mostly in early endosomes, while at late stages their accumulation occurred in incompletely matured late endosomes. These data speak in favor of late endocytic stage existence transition through which depends on the receptor TK. Besides, tyrphostin addition in 90 min after endocytosis led not to decrease, but on the contrary, to increase in degradation. That speaks about the existence of the mechanisms providing a time window during which receptor TK can carry out the functions which are not connected directly with endocytosis.

Key words: EGF receptor, AG1478, tyrosine kinase, endocytosis, internalization, recycling, compartmentalization, early and late endosomes, lysosomes, degradation, Percolla gradient.