

УБИКВИТИНИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЭФР С ДЕЛЕЦИЯМИ И ТОЧЕЧНЫМИ МУТАЦИЯМИ С-ТЕРМИНАЛЬНОГО ДОМЕНА В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА

© К. А. Кондратов,¹ М. С. Меликова,¹ А. Л. Чернорудский^{1,2} Е. С. Корнилова^{1,3}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

и ² Нижегородская государственная медицинская академия;

³ электронный адрес: elena.kornilova@gmail.com

Проведен анализ убиквитинирования рецепторов ЭФР, несущих различные мутации С-терминального домена. Эти мутанты различаются как по набору мажорных сайтов автофосфорилирования, определяющих способ связывания с убиквитин-лигазой с-Cbl, так и по наличию остатков лизина, служащего потенциальным акцептором убиквитина. Обнаружено, что рецептор, лишенный тирозинкиназной активности в результате замены лизина на фенилаланин в АТФ-связывающем сайте тирозинкиназного (ТК) домена (K721), практически не убиквитинируется, так же как и рецептор, лишенный всех сайтов связывания с с-Cbl в результате делеции 165 С-терминальных аминокислотных остатков (CD165). В то же время динамика и характер убиквитинирования других делеционных мутантов значительно различаются. Так, способный связывать с-Cbl напрямую, но лишенный сайтов связывания Grb2 рецептор (CD123) убиквитинировался в наименьшей степени и лишь на ранних сроках после стимуляции эндоцитоза ЭФР. Рецептор, обладающий всеми сайтами связывания как для с-Cbl, так и для Grb2, но лишенный домена из 63 аминокислотных остатков на С-конце рецептора ЭФР (CD63), содержащего два сайта фосфорилирования (Y1148 и Y1173) и 4 остатка лизина, убиквитинировался слабее и содержал больше низкоубиквитинированных форм, чем рецептор дикого типа. Однако эти остатки лизина не являются акцепторными сайтами для убиквитина, поскольку полноразмерный мутант, лишенный, как и CD63, мажорных сайтов автофосфорилирования Y1148 и Y1173, убиквитинируется так же, как и делеционный мутант. Таким образом, С-концевая область рецептора ЭФР, не являясь субстратом убиквитинирования, вовлечена в регуляцию этого процесса. Обнаружено также, что паттерн убиквитинирования рецептора различается при быстром и медленном эндоцитозе. В первом случае количество рецептора ЭФР быстро уменьшалось в результате эффективной деградации. При этом уровень с-Cbl, ассоциированного с рецептором, оставался практически неизменным, тогда как количество общего внутриклеточного с-Cbl значительно падало. Обработка клеток ингибитором протеасом MG132 лишь частично блокировала убыль с-Cbl. Во втором случае общее количество как рецептора, так и с-Cbl практически не изменялось, что свидетельствует о преобладании пути рециклирования таких рецепторов, даже несмотря на их убиквитинирование.

Ключевые слова: рецептор ЭФР, сайты автофосфорилирования, С-терминальный домен, убиквитинирование, убиквитин-лигаза с-Cbl, эндоцитоз.

Принятые сокращения: АО — аминокислотный остаток, БСА — бычий сывороточный альбумин, МВТ — мультивезикулярные тела, ПМ — плазматическая мембрана, ПЭ — поздние эндосомы, РЭ — ранние эндосомы, ТК — тирозинкиназа, ТКЛ — тотальный клеточный лизат, ЭФР — эпидермальный фактор роста, PBS — фосфатно-солевой раствор.

Одним из последствий активации ТК рецептора ЭФР в результате его связывания с ростовым фактором на плазматической мембране является убиквитинирование рецептора — посттрансляционная модификация, заключающаяся в ковалентном присоединении С-терминального глицинового остатка убиквитина (76 АО) к одному или нескольким остаткам лизина на белке-мишени с образованием изопептидной связи. Считается, что основным ферментом, осуществляющим модифицирование рецептора, является убиквитин-лигаза с-Cbl, активируемая ТК рецептора (Fukazawa et al., 1996). Интересно, что с-Cbl может взаимодействовать с рецептором как напрямую, через сайт автофосфорилирования Y1045 на его С-терминальном конце, так и опосредованно, через адаптерный белок Grb2, который в свою очередь присоединяется к рецепто-

ру через фосфорилированные остатки тирозина в положениях 1068 и 1086 (см. ссылки в обзоре: Меликова и др., 2003). До сих пор не вполне понятно физиологическое значение существования двух способов взаимодействия рецепторов с с-Cbl.

К настоящему моменту сформировалось представление о том, что убиквитинирование трансмембранных рецепторов необходимо для узнавания модифицированного белка, мультимерными сортирующими комплексами (endosomal sorting complexes required for transport, или ESCRT0-III), результатом взаимодействия с которыми является помещение белка во внутренние пузырьки мультивезикулярных, или поздних, эндосом (Teis et al., 2008). Зрелые ПЭ затем сливаются с лизосомами, и таким образом содержимое внутренних пузырьков подвергается ли-

зосомной деградации. Предполагается, что убиквитинированный рецептор последовательно передается «с рук на руки» всем четырем комплексам, в результате чего группа рецепторов концентрируется перед попаданием в инвагинации мембраны эндосом, дающим начало внутренним пузырькам. До сих пор неясно, как именно определяется строгая очередность взаимодействия рецептора с ESCRT-комплексами.

Мы обратили внимание на то, что профиль убиквитинирования рецептора (т. е. набор форм рецептора, содержащих разное количество убиквитина и в результате значительно различающихся по подвижности в геле) в клетках A431 изменялся в ходе эндоцитоза. Более того, было показано, что истощение пула свободного убиквитина в клетке приводит к замедлению процесса созревания ПЭ (Меликова и др., 2004; Melikova et al., 2006). Эти данные позволили нам предположить, что убиквитинирование рецептора является динамическим процессом, результатом баланса активностей убиквитин-лигазы и деубиквитирующих ферментов и что конкретный паттерн убиквитинирования может определять специфичность взаимодействия рецептора с определенным сортирующим комплексом. Для проверки этой гипотезы необходимо идентифицировать конкретные сайты убиквитинирования и выяснить, есть ли закономерности в последовательности их модификации в ходе эндоцитоза.

Очевидная на первый взгляд стратегия решения задачи по идентификации сайтов убиквитинирования осложняется рядом обстоятельств. Во-первых, молекула рецептора ЭФР, состоящая из 1186 АО, содержит более 50 остатков лизина. Поскольку субстратом убиквитинирования с-Cbl может являться только внутриклеточный домен (с 645-го по 1186-й АО), количество интересующих нас сайтов падает до 27, причем 21 из них локализован в ТК-доме рецептора (с 687-го по 955-й АО) и лишь 6 — в регуляторном С-терминальном домене (с 956-го по 1186-й), содержащем основные сайты автофосфорилирования, вовлеченные в инициацию рецепторзависимых сигнальных каскадов (Никольский и др., 1987).

В качестве первого шага к решению более общей задачи — выявить, какие домены рецептора преимущественно убиквитинируются (и тем самым сузить область дальнейшего поиска), мы решили выяснить, как способ связывания с-Cbl с рецептором влияет на его убиквитинирование и являются ли лизины, содержащиеся в регуляторном домене, акцепторами убиквитина.

Материал и методика

Клетки и их культивирование. В работе использовали панель клеток, полученных на основе фибробластов мыши NIH3T3, экспрессирующих различные делеционные и точечные мутации С-терминального домена рецептора ЭФР человека. Клетки CD165 лишены 165 С-терминальных АО, всех сайтов связывания с с-Cbl и всех 6 остатков лизина (K1037, K1075, K1136, K1164, K1155 и K1158). Негативным контролем также являлись клетки, потерявшие в результате точечной мутации в АТФ-связывающем сайте способность активировать ТК (K721). Линия CD123 (без 123 концевых АО) имела только сайт прямого связывания с с-Cbl (Y1045), но была лишена 5 концевых остатков лизина. Рецептор в клетках CD63 в свою очередь обладает всеми тремя сайтами связывания убиквитин-лигазы, однако в этом мутанте отсут-

ствуют последние 4 остатка лизина. Был использован также полноразмерный рецептор с 2 точечными мутациями последних мажорных сайтов автофосфорилирования — Y1148 и Y1173 (M133), но обладающий всеми С-терминальными остатками лизина. Клетки линий K721, WT, CD123 и CD165 были получены от д-ра Ульриха (Институт им. Макса Планка, ФРГ), а CD63 и M133 — от д-ра Соркина (Университет Колорадо, США).

Клетки культивировали в среде DMEM, 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.

Стимуляцию эндоцитоза ЭФР проводили, преинкубируя клетки при 4 °С в течение 1 ч в рабочей среде (DMEM с добавлением 0.1 % БСА, 20 мМ HEPES, pH 7.4), содержащей 50 нг/мл ЭФР. После удаления несвязавшегося ЭФР эндоцитоз стимулировали переводом клеток в рабочую среду, не содержащую лиганда, при 37 °С на определенное время. По окончании инкубационного периода клетки помещали на лед, промывали 3 раза PBS и добавляли лизисный буфер (1%-ный Тритон X-100, 0.5%-ный NP-40, 10 мМ NaF, 150 мМ NaCl, коммерческий коктейль ингибиторов (Sigma, США), 1 мМ ортованадат натрия, 10 мМ N-этилмалеимид, 20 мМ Трис-HCl, pH 7.6) на 10 мин. Клетки собирали раббером и центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 g. Супернатант (ТКЛ) собирали и определяли концентрацию белка по методу Лоури. После этого пробы из одного эксперимента уравнивали по содержанию белка.

Опыты по воздействию MG132 (10 мкМ) проводили при постоянном присутствии агента в течение всего времени эксперимента, добавляя его в инкубационную среду через 30 мин после начала предварительного связывания ЭФР на льду.

Иммунопреципитация и иммуноблоттинг. В работе использовали антитела против рецептора ЭФР для его иммунопреципитации (производства фирмы Cell Signaling, США), убиквитин-лигазу с-Cbl выявляли антителами фирмы BD biosciences (США). Окраску на убиквитин проводили антителами фирмы ДАКО (Дания). Клетки обрабатывали для получения ТКЛ, как описано выше. Электрофорез проводили по методу Лэммли с нагрузкой белка на одну дорожку, равной 70 мкг. Для иммунопреципитации в пробы после уравнивания по содержанию белка добавляли антитела против рецептора ЭФР. Пробу инкубировали в течение ночи с антителами при постоянном перемешивании на шейкере при 4 °С. После этого к пробам добавляли 20 мкл сефарозы, конъюгированной с белком А, и инкубировали 4 ч. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при 2000 g, супернатант сливали, а осадок промывали 3 раза лизисным буфером. К иммунопреципитату или ТКЛ добавляли буфер Лэммли и инкубировали при 98 °С в течение 10 мин. После этого пробы центрифугировали и наносили на 7.5%-ный Ds-Na-ПААГ. По окончании электрофореза проводили блоттинг на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) и положение интересующих нас белков выявляли антителами непосредственно или после стриппинга.

Эксперименты по субклеточному фракционированию в градиенте 17%-ного Перколла проводили, как подробно описано ранее (Корнилова и др., 1987), причем в качестве метки положения РЭ, ПЭ и лизосом ис-

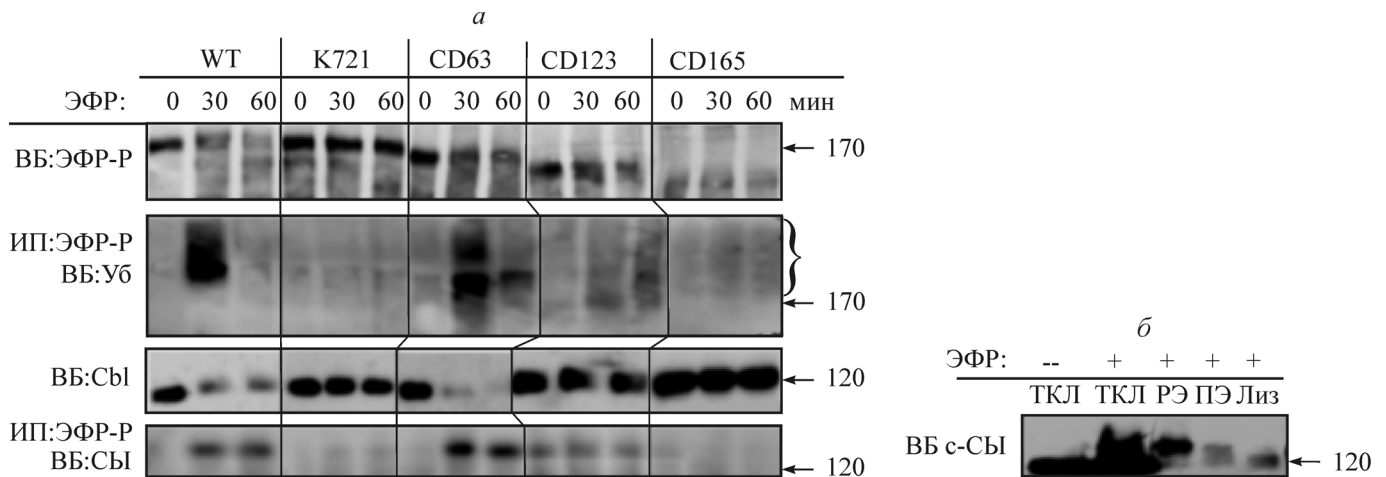


Рис. 1. Анализ поведения рецептора ЭФР (ЭФР-Р) и убиквитин-лигазы с-Сb1 в ходе быстрого эндоцитоза в клетках, экспрессирующих нормальный и мутантные рецепторы ЭФР.

Эндоцитоз предварительно связанного при 4 °С ЭФР (0 мин) стимулировали переводом клеток в среду при температуре 37 °С на 30 и 60 мин, после чего получали ТКЛ (а, б) или субклеточные фракции РЭ, ПЭ и лизосом (б) как описано в разделе «Материал и методика». а — после электрофореза аликвоты ТКЛ рецептор (верхняя панель) и с-Сb1 (третья сверху панель) выявляли методом вестерн-блоттинга (ВБ) соответствующими антителами; после иммунопреципитации (ИП) рецептора из ТКЛ проводили электрофорез и ВБ, блоты окрашивали антителами на убиквитин (вторая панель сверху) и с-Сb1 (вторая панель снизу). Справа стрелками указано положение полноразмерного рецептора ЭФР (170 кДа) и с-Сb1 (120 кДа). Скобкой указана зона локализации убиквитинированных форм рецептора. б — выявление с-Сb1 в ТКЛ нестимулированных («—») и стимулированных («+») ЭФР клеток WT, а также во фракциях РЭ, ПЭ и лизосом (Лиз) этих же стимулированных клеток через 60 мин после инициации эндоцитоза в клетках WT.

пользовали ¹²⁵I-ЭФР. Фракции лизировали в буфере Лэммли и подвергали электрофорезу и блоттингу, как описано выше.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что вышеописанные делеционные мутанты различаются по скорости интернализации и в большей степени по скорости перехода ЭФР-рецепторных комплексов из РЭ в ПЭ и дальнейшей деградации. Рецепторы, лишённые ТК-активности или 165 АО, практически не сортировались в ПЭ и в основном рециклировались из РЭ. Рецептор CD123 демонстрировал медленную сортировку в ПЭ и низкую скорость деградации, тогда как рецепторы дикого типа (WT) и CD63 быстро интернализировались, эффективно накапливались в ПЭ и деградировали (Соколова и др., 1995; Kornilova et al., 1996).

Экспериментально о динамике прохождения по эндоцитозному пути можно судить по скорости падения общего числа рецепторов в клетках после стимуляции эндоцитоза ЭФР. Действительно, данные, представленные на рис. 1, а, верхняя панель, показывают, что в клетках линий WT, CD63 и в меньшей степени CD123 число рецепторов уменьшается уже через 30 мин после стимуляции эндоцитоза, тогда как в клетках K721 и CD165 оно остается практически неизменным и через 60 мин. Дальнейший анализ показал, что сильно убиквитинируются только рецепторы WT и CD63, тогда как в линиях CD123 и CD165 убиквитинирование значительно снижено, а в клетках K721 практически не выявляется (рис. 1, а, вторая панель сверху). Существенно, что в этом эксперименте высокий уровень убиквитинирования выявляется через 30 мин после стимуляции, падая через 60 мин. Для рецепторов дикого типа и CD63 характерно наличие не только низко-, но и высокоубиквитинированных форм, в то время как в CD123 выявляется только слабая полоса в райо-

не, лежащем сразу над рецептором, что позволяет предполагать существование лишь низкоубиквитинированной формы. Однако, поскольку в этом эксперименте первой анализируемой временной точкой было 30 мин, нельзя утверждать, что убиквитинирование максимально именно к этому времени. Тем не менее, учитывая обратную зависимость между уровнем рецептора и степенью убиквитинирования для эффективно модифицируемых версий рецептора, можно предполагать, что и на более ранних стадиях убиквитинирование CD123 в этом случае не было значительным.

Хотя уровень убиквитинирования мутанта CD165, лишённого всех сайтов связывания с с-Сb1, чрезвычайно низок, он тем не менее отличен от базального, и убиквитин при окрашивании равномерно распределяется по всей зоне выше основной полосы рецептора. Возможно, этот факт объясняется тем, что в клетках NIH3T3 собственный рецептор дикого типа, экспрессируясь на очень низком уровне, способен, однако, образовывать димеры с мутантным рецептором и в результате может обеспечивать его модификацию, если предполагать, что убиквитинирование, так же как и автофосфорилирование, происходит по кросс-молекулярному механизму (Schlessinger, 2000). То же замечание справедливо и в отношении ТК-негативного мутанта K721.

То, что только три мутанта подвергаются ЭФР-стимулируемому убиквитинированию, подтверждают и данные анализа ассоциации с-Сb1 с рецептором ЭФР (рис. 1, а, нижняя панель). Только в клетках линий WT, CD63 и в меньшей степени CD123 выявляется убиквитин-лигаза в комплексе с рецептором. Интересно отметить, что уровень ассоциации не изменяется и через 60 мин после стимуляции эндоцитоза, когда общее количество рецептора и его убиквитинирование в клетках значительно падают. Подобный феномен мы выявляли и ранее с помощью иммунофлуоресцентных и биохимических подходов (Melnikova et al., 2006). Возможно, это несоответствие связано с

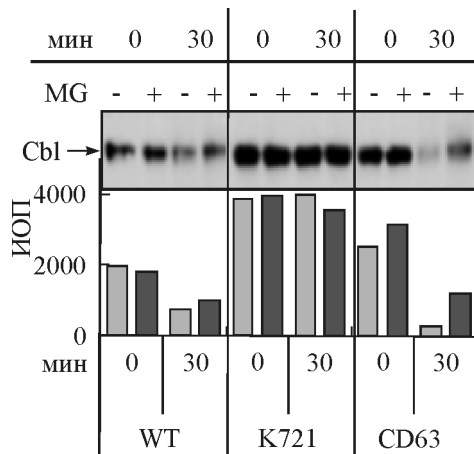


Рис. 2. Влияние ингибитора протеасом MG132 на уровень внутриклеточного c-Cbl в ходе эндоцитоза.

В клетках WT, K721 и CD63 стимулировали эндоцитоз предварительно связанного ЭФР в отсутствие («—») и в присутствии («+») MG132 (10 мкМ). Непосредственно после предварительного связывания (0 мин) и через 30 мин после стимуляции эндоцитоза клетки обрабатывали для получения ТКЛ, подвергали электрофорезу и иммуноблоттингу, после чего блот окрашивали антителами на с-Cbl. Внизу в виде гистограммы приведены величины интегральной оптической плотности (ИОП) для каждой полосы.

тем, что в каждый момент времени лишь небольшая доля общего внутриклеточного пула убиквитин-лигазы находится в комплексе с рецептором ЭФР. В пользу такого предположения говорит и чрезвычайная многофункциональность с-Cbl, которая может выполнять не только ферментативную, но и адапторную функцию в целом ряде процессов, не связанных с эндоцитозом (см. обзор: Меликова и др., 2003).

Кроме того, мы обнаружили, что в клетках, эффективно деградирующих рецептор, падает и общее количество внутриклеточного с-Cbl. Это позволяет говорить об индукции деградации убиквитин-лигазы при стимуляции лизосомного эндоцитозного пути. Возникает вопрос о механизмах этой деградации. Одно из предположений связано с длительным сохранением комплекса с-Cbl — рецептор ЭФР. Возможно, что с-Cbl, так и не покидая комплекса, попадает вместе с рецептором в лизосомы. Однако ранее при иммунофлуоресцентном анализе мы обнаружили, что антитела окрашивают с-Cbl на поздних эндоллизосомах даже тогда, когда рецептор уже не выявляется. Создается впечатление, что с-Cbl, покидая комплекс с рецептором на самых поздних стадиях, тем не менее остается ассоциированным с поверхностью эндоллизосом. Против возможности лизосомной деградации убиквитин-лигазы говорят и другие данные (Alwan et al., 2003).

Электрофоретический анализ с-Cbl во фракциях РЭ, ПЭ и Лиз, полученных с помощью фракционирования в градиенте Перколла (Корнилова и др., 1987) в сравнении с ТКЛ в контроле и через 60 мин после стимуляции эндоцитоза показал (рис. 1, б), что значительная доля анализируемого белка в ТКЛ изменяет свою подвижность после стимуляции эндоцитоза. Многочисленные данные литературы приписывают такое изменение в основном фосфорилированию, акцепторными сайтами которого с-Cbl чрезвычайно богат (см. обзор: Меликова и др., 2003). При этом пул с-Cbl, ассоциированный с компартаментами эндоцитозного пути, распределялся следующим образом: в РЭ обнаруживалась наибольшая часть белка, причем

только в высокомодифицированной форме. ПЭ содержали широкий спектр Cbl с разной подвижностью, тогда как во фракции лизосом выявлялся белок с подвижностью, характерной для нестимулированных клеток.

Интересно, что подавление ТК-активности рецептора с помощью синтетического ингибитора AG1478 приводит к фактически немедленному дефосфорилированию с-Cbl и выходу его из комплекса с рецептором (Кондратов и др., 2006). Выявляемый нами с помощью иммунопреципитации из ТКЛ ассоциированный с рецептором с-Cbl (рис. 1, а, нижняя панель) в основном имеет подвижность, характерную для РЭ, однако наличие «неактивированных» форм с-Cbl во фракциях ПЭ и лизосом подтверждает наше предположение о возможности сохранения ассоциации этого белка с поверхностью эндоллизосом даже после диссоциации комплекса с рецептором и дефосфорилирования с-Cbl.

Другим возможным механизмом снижения общего количества с-Cbl после стимуляции эндоцитоза может быть его деградация по протеасомному пути (Magnifico et al., 2003). Для проверки этого предположения мы проинкубировали клетки WT, K721 и CD63 в присутствии ингибитора протеасом MG132. Поскольку уже через 30 мин после стимуляции эндоцитоза количество убиквитин-лигазы значительно снижалось, мы выбрали для анализа именно эту временную точку. Денситометрический анализ представленного блота (рис. 2) показал, что присутствие MG132 не оказывало практически никакого влияния на уровень с-Cbl в нестимулированных клетках, тогда как после стимуляции в клетках с эффективной сортировкой (WT и CD63) количество убиквитин-лигазы в присутствии ингибитора несколько возросло. Существенно, однако, что уровень этого белка под действием MG132 никогда не достигал контрольных значений, даже в клетках с рецептором дикого типа.

Эти результаты свидетельствуют о том, что протеасомный путь деградации действительно вовлечен в регуляцию общего количества с-Cbl в клетке, однако он не является эксклюзивным и более того, имеет место на стадиях, предшествующих поздним этапам созревания эндосом. Действительно, есть сообщения о том, что увеличенная протеасомная деградация с-Cbl коррелирует с его повышенным фосфорилированием (Lennartsson et al., 2006). Учитывая наши данные по фракционированию, можно предположить, что основной мишенью протеасом в таком случае должен быть с-Cbl в РЭ.

Ранее мы сообщали о том, что динамика различных стадий эндоцитоза не является постоянной даже для клеток одной и той же линии (Melikova et al., 2006). По-видимому, эффективность сортировки (и, таким образом, соотношение рецепторов, вступающих на путь рециклирования или направляемых на деградацию), так же как и скорость деградации, зависит от тонкой настройки как сигнальных путей, так и регуляторов транспортной машины. Эта настройка определяется, вероятно, конкретным набором внеклеточных сигнальных стимулов (проще говоря, составом сыворотки, добавляемой в ростовую среду) и позволяет клеткам адаптироваться к условиям жизни в определенном микроокружении.

Условно динамику эндоцитоза можно подразделить на быструю (с эффективной сортировкой и лизосомной деградацией ЭФР-рецепторных комплексов) и медленную, когда количество рецептора ЭФР практически не изменяется в течение относительно длительного времени после стимуляции эндоцитоза. В этом случае даже активи-

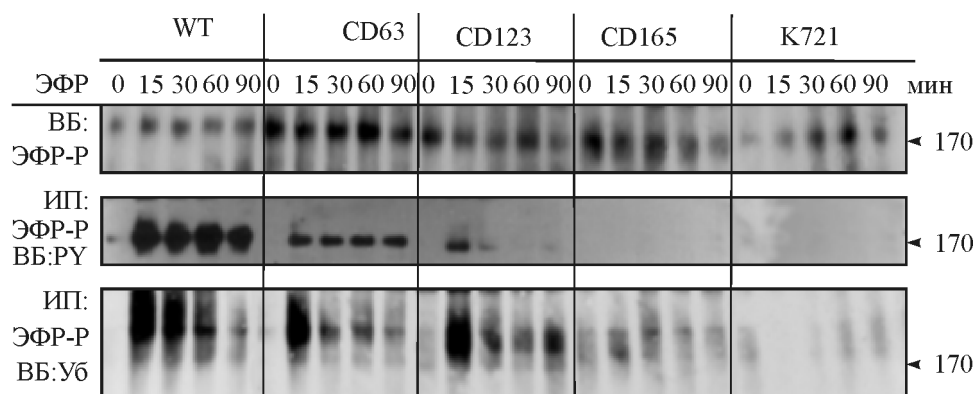


Рис. 3. Анализ поведения рецептора ЭФР (ЭФР-Р), динамики его фосфорилирования по тирозину (РУ) и убиквитинирования (УБ) в ходе медленного эндоцитоза в клетках, экспрессирующих нормальный и мутантные рецепторы ЭФР.

Эндоцитоз предварительно связанного при 4 °С ЭФР (0 мин) стимулировали переводом клеток в среду при температуре 37 °С на 15, 30, 60 и 90 мин, после чего получали ТКЛ. Аликвоту ТКЛ использовали для определения общего количества рецепторов (верхняя панель); оставшуюся часть подвергали иммунопреципитации антителами на рецептор. После электрофореза и иммуноблоттинга блоты окрашивали антителами на рецептор (верхняя панель), фосфотирозин (средняя панель) и убиквитин (нижняя панель). Справа стрелками показано положение неактивированного рецептора ЭФР дикого типа.

вирированные рецепторы в основном аккумулируются в РЭ и рециклируют оттуда, впоследствии опять интернализуются. Поскольку убиквитинирование рецептора рассматривается как сигнал перехода из РЭ в ПЭ, интересно проанализировать, что происходит с убиквитинированием рецептора и какова судьба с-Cbl в подобной ситуации.

Результаты опыта на клетках с медленным эндоцитозом представлены на рис. 3 и 4. Действительно, за 90 мин после стимуляции эндоцитоза количество рецептора не изменялось существенно ни в одной из линий (рис. 3, верхняя панель). Рецептор в клетках WT и CD63 оставался все это время фосфорилированным по тирозину (рис. 3, средняя панель). Формы, постоянно рециклирующие во всех условиях (K721 и CD165), вообще не подвергались тирозинному фосфорилированию как в силу отсутствия ТК-активности (K721), так и в силу потери большинства сайтов автофосфорилирования (CD165). Кстати, последнее обстоятельство приводило и к существенно более низкому уровню фосфорилирования мутанта CD63, характеризующемуся отсутствием домена, содержащего два мажорных сайта автофосфорилирования.

Тем не менее, как и в случае быстрого эндоцитоза, три версии рецептора, способные так или иначе связывать убиквитин-лигазу, подвергались убиквитинированию после действия ЭФР. Интересно, однако, что лишь клетки WT, экспрессирующие полноразмерный рецептор дикого типа, демонстрировали наличие высокоубиквитинированных форм, которые с течением времени сменялись низкоубиквитинированными (рис. 3, нижняя панель). В двух других линиях профиль убиквитинирования был исходно сдвинут в сторону менее убиквитинированных форм. Стоит отметить, что хотя мутант CD63 обладал всеми связывающими сайтами для с-Cbl, тогда как CD123 мог связывать убиквитин-лигазу лишь напрямую через Y1045, характер изменения профиля убиквитинирования у обоих мутантов был весьма схожим.

Таким образом, можно предположить, что С-терминальный домен рецептора, не участвующий ни в каких взаимодействиях с с-Cbl, тем не менее весьма важен для регуляции процесса убиквитинирования рецептора. Значительным различием быстрого и медленного эндоцитоза явилось то, что в последнем случае период существования модифицированных рецепторов во всех линиях ока-

зался более длительным, чем при быстром эндоцитозе. Убиквитинирование мутанта, неспособного связывать с-Cbl (CD165), хотя и отличалось от базального уровня, было очень слабым и не демонстрировало сколько-нибудь воспроизводимой динамики. Эти данные позволяют заключить, что убиквитинирование рецептора само по себе не означает его ультимативной сортировки в ПЭ и деградации и не является единственным событием, необходимым для направления на путь лизосомной деградации. Это означает также, что «решение» о сортировке рецептора в ПЭ принимается далее по эндоцитозному пути, уже после его убиквитинирования.

Данные, полученные на клетках с обоими типами эндоцитоза, на первый взгляд говорят о том, что удаление С-терминальных лизинов хотя и ведет к снижению длительности убиквитинирования и изменению его профиля (учитывая общий уровень экспрессии того или иного рецептора), но не приводит к его полному подавлению. Это может означать, что домен, содержащий основные акцепторные сайты убиквитинирования, лежит вне С-терминального участка. В случае быстрого эндоцитоза различия в модифицировании мутантов, лишенных 63 и 123 терминальных АО, может свидетельствовать в пользу убиквитинирования лизина в положении 1075, присутствующем в первом мутанте и отсутствующем во втором. Однако данные по медленному эндоцитозу не поддерживают этого предположения, так как CD123 убиквитинируется так же, как и его более длинная версия CD63 (рис. 1).

Сравнение делеционного мутанта CD63 и его полноразмерного аналога, в котором два последних тирозина (Y1148 и Y1173) заменены на фенилаланин (M133), показало, что в рецепторе, содержащем всю последовательность, убиквитинирование гораздо выше, чем в мутанте, лишенном в том числе и лизиновых остатков (рис. 4, а). Однако и уровень экспрессии и, следовательно, доля фосфорилированных рецепторов в M133 тоже выше. Оценка отношения убиквитинированного рецептора к фосфорилированному на основании денситометрического анализа соответствующих бандов, представленных на блотах рис. 4, а, показывает, что относительное убиквитинирование практически одинаково для рецепторов, несущих С-терминальные лизины и лишенных их (рис. 4, б). Таким образом, с высокой степенью вероятности С-терминаль-

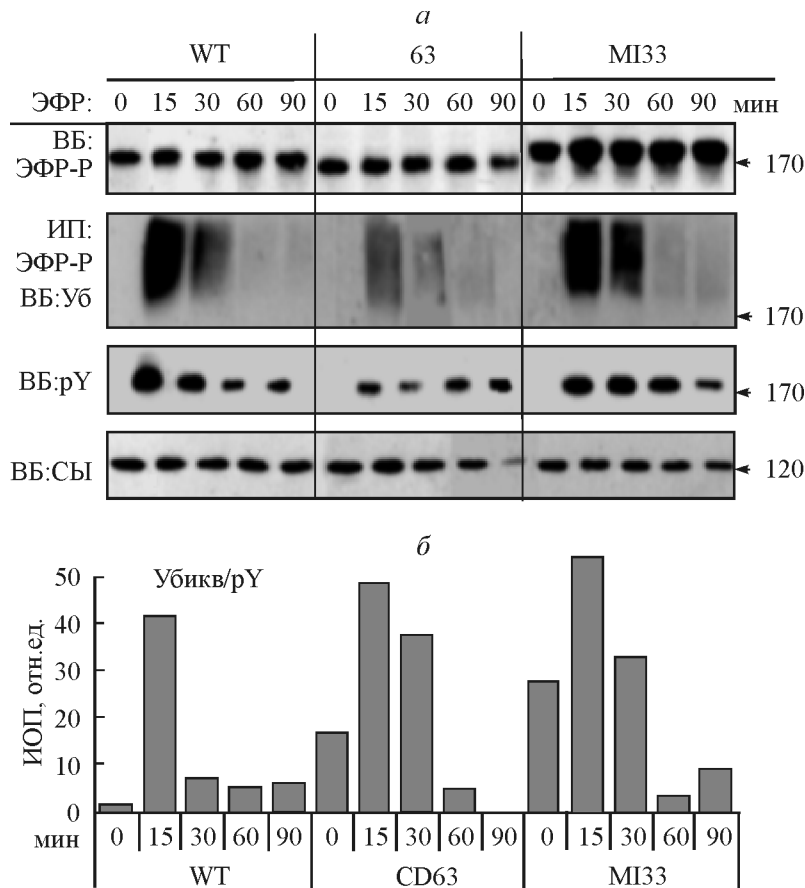


Рис. 4. Сравнение динамики и уровня убиквитинирования рецептора ЭФР в клетках, экспрессирующих нормальный рецептор ЭФР (WT), рецептор, в результате делеции лишенный 63 С-терминальных АО (CD63), и рецептор, лишенный сайтов автофосфорилирования, расположенных в этом же домене (MI33).

а — после получения ТКЛ его часть использовали для иммунопреципитации рецептора, затем проводили электрофорез и блоттинг ТКЛ и преципитата и окрашивали блоты на рецептор, убиквитин, фосфотирозин и с-Sbl, как указано на рисунке. *б* — для адекватного сравнения уровня убиквитинирования в мутантах определяли интегральную оптическую плотность (ИОП) полос, соответствующих фосфорилированному по тирозину рецептору, и ИОП полос, окрашенных на убиквитин соответствующих блотов, представленных на панели *а*. Гистограмма отражает отношение убиквитинированных форм рецептора к количеству его активирования (т. е. фосфорилированной по тирозину) формы. Эндоцитоз стимулировали, как описано выше.

ные остатки лизина не являются сайтами убиквитинирования.

Кроме мутагенеза возможным подходом для окончательного решения этого вопроса может быть идентификация сайтов убиквитинирования с помощью масс-спектрометрии, поскольку убиквитинирование лизина приводит к возникновению триптических пептидов с так называемой убиквитиновой подписью, в которых к лизину присоединены два остатка глицина (Denis et al., 2007). К настоящему времени существует только одна работа, в которой использовался этот подход для идентификации сайтов убиквитинирования рецептора ЭФР (Huang et al., 2006). Авторы определили 5 акцепторных остатков, расположенных исключительно в пределах ТК-домена. Мутация еще 4 остатков лизина в том же домене приводила к практически полному подавлению ЭФР-зависимого убиквитинирования рецептора.

Недостатком данной работы является то, что анализу подвергались остатки через 2 мин после их стимуляции ЭФР, поэтому остается неясным, какое отношение этот паттерн имеет к сортировке в ПЭ, происходящей гораздо ниже. Тем не менее в наших предварительных экспериментах с помощью тандемной масс-спектрометрии через 60 мин после стимуляции эндоцитоза в клетках A431 обна-

ружены два сайта убиквитинирования — K704 и K715, оба также расположенные в ТК-домене, но отличные от идентифицированных остатков лизина (Huang et al., 2006). Локализация сайтов убиквитинирования в ТК-домене кажется физиологически обоснованной, так как убиквитинирование С-терминальных сайтов может препятствовать взаимодействию с многочисленными сигнальными партнерами рецептора, которые происходят параллельно с убиквитинзависимыми процессами узнавания и сортировки рецептора ЭФР в ПЭ. В принципе такой вариант полностью исключить нельзя, поскольку пришивка молекулы убиквитина в непосредственной близости от сайтов присоединения сигнальных субстратов рецептора может негативно сказываться на взаимодействии с ними. Тем не менее представленные результаты свидетельствуют, скорее, против подобной возможности. Интересно также, что даже наличие всех сайтов, обеспечивающих оба способа (прямой и опосредованный через Grb2) связывания с-Sbl с рецептором, не обеспечивают его полноценного убиквитинирования в отсутствие С-терминального домена из 63 АО.

Таким образом, полученные нами данные позволяют говорить о том, что этот С-терминальный участок рецептора, не подвергаясь убиквитинированию в ходе эндоцитоза сам по себе, может участвовать в регуляции убиквити-

нирования ТК-домена, содержащего, по-видимому, основные акцепторные сайты. Дальнейшие исследования должны выявить белки, взаимодействие с которыми может модулировать паттерн убиквитинирования рецептора ЭФР.

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

- Кондратов К. А., Степаняц Н. А., Амосова А. П., Корнилова Е. С. 2006. Поиск методических подходов для выяснения роли тирозинкиназы интернализированного рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) в регуляции поздних стадий эндцитоза. Цитология. 48 (9) : 770.
- Корнилова Е. С., Соркин А. Д., Никольский Н. Н. 1987. Динамика компартиментализации эпидермального фактора роста в клетках А431. Цитология. 29 (8) : 904—910.
- Меликова М. С., Аксенов А. А., Никольский Н. Н., Корнилова Е. С. 2004. Влияние синтетического ингибитора протеасом MG132 на динамику эндцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в клетках А431. Цитология. 46 (7) : 601—608.
- Меликова М. С., Филатова М. М., Корнилова Е. С. 2003. c-Cbl полифункциональный регулятор клеточных процессов. Цитология. 45 (11) : 1134—1148.
- 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. 2005. Компартиментализация эпидермального фактора роста (ЭФР) в ходе эндцитоза в клетках, экспрессирующих нормальный и лишенный основных сайтов автофосфорилирования рецептор ЭФР. Цитология. 37 (9/10) : 873—882.
- Alwan N. A., van Zoelen E. J., van Leeuwen J. E. 2003. Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. J. Biol. Chem. 278 : 35 781—35 790.
- Denis N. J., Vasilescu J., Lambert J. P., Smith J. C., Figeys D. 2007. Tryptic digestion of ubiquitin standards reveals an improved strategy for identifying ubiquitinated proteins by mass spectrometry. Proteomics. 7 : 868—874.
- Fukazawa T., Miyake S., Band V., Band H. 1996. Tyrosine phosphorylation of Cbl upon epidermal growth factor (EGF) stimulation and its association with EGF receptor and downstream signaling proteins. J. Biol. Chem. 271 : 14 554—14 559.
- Huang F., Kirkpatrick D., Jiang X., Gygi S., Sorkin A. 2006. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. Mol. Cell. 21 : 737—748.
- 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.
- Lennartsson J., Wardega P., Engström U., Hellman U., Helldin C. H. 2006. Alix facilitates the interaction between c-Cbl and platelet-derived growth factor beta-receptor and thereby modulates receptor down-regulation. J. Biol. Chem. 281 : 39 152—39 158.
- Magnifico A., Ettenberg S., Yang C., Mariano J., Tiwari S., Fang S., Lipkowitz S., Weissman A. M. 2003. WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation. J. Biol. Chem. 278 : 43 169—43 177.
- 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.
- Schlessinger J. 2000. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. Cell. 103 : 211—225.
- 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.

Поступила 19 II 2009

UBIQUITINATION OF EGF RECEPTORS WITH C-TERMINAL DOMAIN DELETION AND POINT MUTATIONS DURING ENDOCYTOSIS

K. A. Kondratov,¹ M. S. Melikova,¹ A. L. Chernorudsky,^{1,2} E. S. Kornilova^{1,3}

¹ Institute of Cytophysiology RAS, St. Petersburg, and ² Nizhny Novgorod State Medical Academy;

³ e-mail: elena.kornilova@gmail.com

Analysis of ubiquitination of EGF receptor carrying different mutations of C-terminal domain was done. The mutants differed both by the set of major autophosphorylation sites that determine the way of interaction with ubiquitin-ligase c-Cbl, and by the presence of lysine residues which can be possible acceptor sites for ubiquitin. It was found that the receptor lacking tyrosine kinase activity due to lysine for phenylalanine substitution at ATP-binding site of tyrosine kinase (TK) domain (K721) failed to be ubiquitinated as well as the receptor without all binding sites for c-Cbl (CD165), while dynamics and pattern of ubiquitination of other deletion mutants was significantly different. The mutant lacking Grb2 binding sites but able to bind c-Cbl directly (CD123) was minimally ubiquitinated and only at early stages upon EGF endocytosis stimulation. At the same time, the receptor possessing all binding sites for Cbl but lacking C-terminal domain of 63 aminoacid residues (CD63) which contains two autophosphorylation sites (Y1148 and 1173) and 4 lysines, was less ubiquitinated and had more low-ubiquitinated forms comparing to the WT one. However, these lysines are not acceptor sites for ubiquitin since the full-size receptor lacking like CD63 the same major autophosphorylation sites underwent ubiquitination similar to the deletion mutant. Thus, C-terminal region of the EGF receptor, being not a substrate for ubiquitination *per se*, is involved in its regulation. It was also found that ubiquitination pattern at fast endocytosis differed from those at slow one. In the first case the total level of EGFR decreased dramatically as a result of efficient lysosomal degradation. The level of receptor-associated c-Cbl was practically the same, while the total intracellular c-Cbl dropped. Treatment of cells with proteasomal inhibition MG132 blocked the loss of Cbl only partially. In the second case, total amount of both EGF receptor and c-Cbl did not notably change that suggested recycling pathway for receptors even despite them being ubiquitinated.

Key words: EGF receptor, autophosphorylation sites, C-terminal domain ubiquitination, ubiquitin-ligase c-Cbl, endocytosis.