

**АНАЛИЗ ДИНАМИКИ ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРА ЭФР
НА ОСНОВЕ ОБРАБОТКИ ИЗОБРАЖЕНИЙ,
ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ КОНФОКАЛЬНОЙ СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ
НА ФИКСИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ**

© М. В. Злобина,¹ М. В. Харченко,¹ Е. С. Корнилова^{1, 2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ²Санкт-Петербургский государственный университет;
¹электронный адрес: aquimaria@gmail.com

Эндоцитоз сигнальных рецепторов, в частности рецептора ЭФР, начинаясь на плазматической мембране и заканчиваясь в общем случае деградацией в околядерных лизосомах, подразумевает множественные взаимодействия эндосом друг с другом и с различными компартментами (лизосомами, транссетью аппарата Гольджи), что приводит к изменению размеров эндосом. Кроме того, характерной чертой эндоцитозного пути является перемещение эндосом с периферии клетки в околядерную область. Таким образом, эндоцитоз как высокодинамический процесс развивается во времени и пространстве. Очевидно, что одним из продуктивных подходов к изучению регуляции эндоцитоза является метод световой иммунофлуоресцентной микроскопии, разрешение которой позволяет оценивать динамику этого процесса на уровне одной или нескольких клеток. Различные воздействия, влияющие на регуляторные компоненты эндоцитоза, неизбежно отражаются на динамике изменения размеров эндосом и (или) их перемещений, что позволяет выявлять как ключевые, так и вторичные компоненты регуляторных механизмов. Однако визуальная оценка подобных воздействий часто оказывается весьма субъективной и не дает возможности как получить статистически достоверные данные, так и сравнить между собой несколько экспериментов даже в одной серии. В настоящей работе введены такие параметры, как кажущиеся размеры везикул (величина диаметра, площади или объема) и число везикул на клетку, позволяющие количественно оценивать эффективность слияний эндосом. Кроме того, предлагается коэффициент, отражающий кластеризацию везикул в околядерной области, как мера перемещения везикул по микротрубочкам к ядру (D_{clust}) и даны примеры применения предложенных параметров при анализе эндоцитоза рецептора ЭФР.

Ключевые слова: рецептор ЭФР, EEA1, эндосомы, микротрубочки, флуоресцентная конфокальная микроскопия, анализ изображений.

Принятые сокращения: МВЭ — мультивезикулярные эндосомы, МТ — микротрубочки, ОЯО — околядерная область, ПМ — плазматическая мембрана, ТК — тирозинкиназа, ЦОМТ — центр организации микротрубочек, ЭФР — эпидермальный фактор роста, ЭФР-Р — рецептор ЭФР.

В настоящее время считается установленным, что эндоцитоз сигнальных рецепторов, в частности рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР), не только является способом десенситизации клетки, но и участвует в генерации сигналов различной внутриклеточной локализации (Polo, Di Fiore, 2006; Platta, Stenmark, 2011; Schiefermeier et al., 2011). В соответствии с текущими представлениями, формирование ЭФР-рецепторных комплексов на плазматической мембране (ПМ) и их димеризация приводят к активации рецепторной тирозинкиназы (ТК) и рекрутированию в окаймленные клатрином ямки, дающие начало мелким (диаметром 100—120 нм) эндосомам (Johannessen et al., 2006). Активированный рецептор в таких эндосомах, в свою очередь, способен стимулировать фактор обмена нуклеотидов малой ГТФазы Rab5 (RIN1), в результате чего Rab5 переходит в ГТФ-связанную форму, ассоциируется с мембраной ранней эндосомы и начинает

рекрутировать на нее белки, необходимые для дальнейших слияний и перемещения по микротрубочкам (Barbieri et al., 2003; Loubéry et al., 2008).

Одним из ключевых белков, регулирующих дальнейшие события, является фосфатидилинозитол-3-киназа Vps34, рекрутируемая Rab5-ГТФ. Ее активация в результате ассоциации с эндосомой приводит к появлению на эндосомной мембране доменов, обогащенных фосфатидилинозитол-3-фосфатом (PI3P) — липидом, характерным именно для эндоцитозного пути (Gillooly et al., 2000). С ним способны связываться белки, обладающие FYVE-доменом, в частности так называемый аутоантиген ранних эндосом EEA1, ответственный за узнавание и закрепление гомотипических ранних эндосом на первой стадии слияния, до формирования комплекса слияния, формируемого белками SNARE (Christoforidis et al., 1999; Lawe et al., 2000).

Укрупнение эндосом в ходе эндоцитоза — одно из самых очевидных процессов, регистрируемых визуально. Увеличение размеров происходит в результате так называемых гомотипических слияний эндосом, находящихся на одинаковой стадии созревания, и основная фьюзогенная активность связана именно с ранними, Rab5-положительными эндосомами. Эти слияния необходимы для прохождения дальнейших стадий созревания ранних эндосом и превращения их в поздние эндосомы с мультивезикулярной морфологией (МВЭ), поскольку создают «избыток» мембраны, которая служит основой для формирования внутренних пузырьков мультивезикулярных эндосом. Именно в этих пузырьках, обогащенных PI3P, концентрируются трансмембранные грузы, подвергающиеся деградации после взаимодействия поздних эндосом с лизосомами (Dunn, Maxfield, 1992; Gillooly et al., 2000; Luzio et al., 2010).

Параллельно с укрупнением эндосом идет процесс транспортировки эндосом по микротрубочкам (МТ) с помощью моторного белка динеина, результатом чего является их концентрация в околядерной области, где расположен центр организации микротрубочек (ЦОМТ) и локализовано большинство лизосом (Aniento et al., 1993). Перемещение эндосом может способствовать не только лизосомной деградации, но и переносу активированного рецептора в иное микроокружение и генерации новых сигналов (Platta, Stenmark, 2011).

В ходе этих процессов происходит созревание эндосом. Под этим термином подразумевается изменение состава мембраны и соответственно набора белков, способных с ней взаимодействовать. Состав мембраны изменяется в результате удаления части компонентов за счет рециклирующих доменов, а также появления новых компонентов за счет слияния с везикулами, формируемыми в транссети аппарата Гольджи и несущими, в частности, лизосомные ферменты (Dunn, Maxfield, 1992; Futter et al., 1996). Модификация свойств мембраны определяет изменение набора сигнальных белков-мишеней, с которыми может взаимодействовать локализованный в ней активированный рецептор. Так, если сразу после формирования эндосом, еще до рекрутирования EEA1, с рецептором взаимодействуют белки APPL1/2, ответственные за ремоделирование хроматина и запуск экспрессии генов раннего ответа, то позднее на эндосомах могут формироваться два MAP-киназных комплекса, собираемых на ранних и поздних эндосомах с помощью различных адапторных систем (Nada et al., 2009; Zoncu et al., 2009).

Таким образом, поиски механизмов регуляции и координации процессов транспорта и сигнализации являются весьма актуальными (Polo, Di Fiore, 2006). Очевидно, что любые воздействия, приводящие к нарушению процессов слияния или транспортировки, могут быть напрямую связаны и с нарушениями в проведении сигнала. Однако для получения достоверных данных по влиянию на эндоцитоз одной визуальной оценки зачастую оказывается недостаточно. Возникает необходимость введения неких параметров, позволяющих, во-первых, получать статистически достоверные данные, т. е. данные, усредненные при анализе не одной клетки, а некоторой их популяции, а во-вторых, делающих возможным сравнение результатов разных опытов. Учитывая определенные ограничения, характерные для оптической микроскопии, мы выбрали несколько параметров, позволяющих количественно описывать ход эндоцитоза, т. е. оценивать кажущиеся размеры везикул (определяемые не только ис-

тинными физическим размерами, но и яркостью сигнала, и существованием нижнего предела разрешения в 200 нм, и выбором фокальной плоскости), их число и изменение их локализации в определенный момент после стимуляции интернализации.

Необходимость подобного рода анализов уже осознана в научном мире, предпринимаются попытки мультифакторных количественных исследований с целью выявления корреляций между различными событиями везикулярного транспорта, его регуляции и внутриклеточной сигнализации (Collinet et al., 2010). Однако при отсутствии автоматических систем получения изображений большого количества клеток, необходимых вычислительных мощностей и наличии ряда других проблем хотелось бы иметь возможность «нормировать» данные экспериментов вручную, с наименьшими затратами времени. Так, например, в работе Саблиной с соавторами (2012) предлагался алгоритм подсчета стрессовых гранул в культивируемых клетках, однако различия в яркости эндосом, как правило, гораздо больше, чем в описанном случае, что ограничивает возможность применения этого алгоритма.

В настоящей работе предложены алгоритмы оценки основных параметров эндоцитоза с помощью программы ImageJ при обработке изображений клеток, фиксированных на разных сроках после стимуляции эндоцитоза и окрашенных соответствующими антителами, на примере сравнительного анализа поведения рецептора ЭФР и белка слияния EEA1.

Материал и методика

Культивирование клеток. В работе использовали клетки карциномы шейки матки человека HeLa, полученные из Европейской коллекции клеточных культур. Клетки HeLa культивировали в среде, приготовленной на основе ДМЕМ (ПанЭко, Россия), содержащей 8 % эмбриональной сыворотки телят (РАА, Австрия), при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Клетки растили до 50—70%-ного монослоя. Для экспериментов с иммунофлуоресцентным окрашиванием в чашки помещали покровные стекла размером 10×10 мм, на которые производили посев клеток.

Лиганды и антитела. В работе использовали рекомбинантный ЭФР (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 50 нг/мл. Для специфического выявления рецептора ЭФР использовали поликлональные антитела кролика, узнающие экстраклеточный домен рецептора ЭФР человека (Cell Signaling, США), в разведении 1 : 100, моноклональные мышиные антитела против α -тубулина (Sigma-Aldrich, США) использовали в разведении 1 : 2000, а Mab, узнающие EEA1 (Transduction Lab., США), использовали в разведении 1 : 1000. В качестве вторых антител использовали конъюгаты GAR-Alexa Fluor 568, GAM-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Англия) и GAM-Cy3 (Jackson, США) в разведении 1 : 500. Антитела разводили в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.4), содержащем 1 % БСА.

Стимуляцию эндоцитоза проводили по двум схемам. В схеме с предварительным связыванием клетки инкубировали с лигандом в среде ДМЕМ, содержащей 0.1 % БСА и 20 мМ HEPES, pH 7.4 (среда А), в течение 60 мин при 4 °С для достижения его равновесного связывания с рецепторами. После трехкратной отмывки PBS от

несвязавшегося ростового фактора эндоцитоз стимулировали переводом клеток в среду А, не содержащую лиганда, при 37 °С на указанное время, что позволяло инициировать синхронную волну событий.

При импульсной загрузке лиганд добавляли непосредственно к клеткам, инкубируемым в среде А при 37 °С, на 5 мин. После трехкратной отмывки несвязавшегося лиганда теплым (37 °С) раствором PBS клетки переводили в среду А не содержащую лиганда, при температуре 37 °С, на указанное время, включающее в себя 5-минутную импульсную загрузку. В этом случае клетки находятся в более физиологических условиях, однако синхронность интернализации и последующих событий снижается.

Обработка клеток нокодазолом. Для деполимеризации МТ клетки инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в среде А, содержащей нокодазол (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 20 мкМ. Все дальнейшие инкубации (в том числе стимуляцию эндоцитоза) проводили при постоянном присутствии агента в рабочей среде.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток. После окончания инкубации покровные стекла переносили в пластиковые чашки диаметром 35 мм, дважды промывали PBS, после чего фиксировали. Часть клеток на стеклах фиксировали 4%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США) в PBS при комнатной температуре и использовали для выявления антигенов, локализованных на мембранах. Другую часть клеток фиксировали глутаральдегидным фиксатором (PBS, содержащий 3% формалина, 0.25 % Тритона X-100 и 0.2 % глутаральдегида) в течение 15 мин при 37 °С для последнего иммунофлуоресцентного окрашивания тубулина. После формалиновой фиксации клетки промывали 5 раз по 3 мин раствором PBS и обрабатывали 15 мин при комнатной температуре раствором PBS, содержащим 0.5 % Тритона X-100. После глутаровой фиксации клетки промывали 2 раза по 10 мин раствором PBS. Неспецифическое окрашивание блокировали инкубацией в PBS, содержащем 1 % БСА, в течение 30 мин при комнатной температуре. С первыми антителами клетки инкубировали в течение ночи при 4 °С. Далее промывали 3 раза по 5 мин раствором PBS, содержащим 0.1 % Tween-20 (Bio-Rad, США). Инкубацию со вторыми антителами в течение 30 мин проводили при комнатной температуре в темноте и затем промывали, как описано выше. Стекла заключали в заливку, содержащую 9 мл глицерина, 1 мл PBS, 1 мл ДМСО, 80 мл пропилгалата и 1 мкг/мл DAPI.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Распределение флуоресцентно меченых белков в клетках изучали с помощью лазерных сканирующих конфокальных микроскопов Leica TCS SL и Leica TCS SP5 (Zeiss, Германия). Использовали иммерсионные масляные объективы с увеличениями 100.0×1.40 и 63.0×1.32. Зеленую флуоресценцию возбуждали аргоновым лазером (488 нм), красную — He-Ne-лазером (543 нм). Флуоресценцию на разных длинах волн сканировали раздельно с помощью программы Leica confocal software (Zeiss, Германия). Срез сканирования после просмотра всей клетки по оси Z выбирали ниже ядра или в нижней его части, т. е. там, где локализуется основная масса эндосом и МТ в хорошо распластанных клетках HeLa. Выбирали максимально распластанные клетки с надежно определяемыми границами.

Анализ и обработка изображений и статистический анализ данных. Полученные изобра-

жения обрабатывали с помощью программ Leica Confocal Software и ImageJ 1.40g (National Institute of Health, США).

Для оценки степени кластеризации рассчитывали отношение площади целой клетки к площади, занятой везикулами, используя параметр Area функции Measure в программе ImageJ. Полученное отношение считали коэффициентом кластеризации D_{clust} , значение которого прямо пропорционально степени кластеризации. При выполнении этой операции не выставляли никакого порогового значения интенсивности.

Для оценки колокализации EEA1-везикул и эндосом использовали плагин JACoP для программы ImageJ. В расчет брали долю совпадений везикул с зеленой (EEA1) и красной (ЭФР-Р) флуоресценцией по отношению к общему сигналу с красного канала.

Оценку среднего количества везикул на клетку и вычисление их размеров проводили по следующему алгоритму. Для определения кажущихся размеров частиц на анализируемом изображении на основе данных технического файла устанавливали соответствие между размером изображения, выраженным в пикселях, и его линейным размером с использованием функции Set Scale. Затем выставляли пороговое значение интенсивности исходя из максимального соответствия между видимым глазом и компьютерным изображением. Следующим шагом выделяли интересующую нас область изображения, соответствующую одной клетке, и проводили анализ частиц с помощью функции Analyze Particles. В результате получали данные о площади каждой частицы и их общем количестве в анализируемой клетке. Исходили из допущения, что везикулы представляют собой сферу с видимой площадью сечения (Area). Исходя из этого рассчитывали диаметр везикулы и ее объем. В расчет брали частицы, площадь которых была не меньше 30 000 нм², что соответствует минимальному размеру внутриклеточной везикулы, которую можно детектировать с помощью световой микроскопии. Подобным образом анализировали не менее 15—30 клеток с 3 полями. Получали усредненные данные по количеству частиц и их размерам с помощью пакета статистического анализа. Результат выражали средним значением и его доверительным интервалом (95 %). После дополнительной математической обработки с использованием функции «гистограмма» в пакете анализа программы Microsoft Excel получали распределение частиц по кажущимся диаметрам в расчете на 1 клетку. Каждый эксперимент проводили не менее 3 раз. Представленные изображения были характерны для большинства клеток в данных условиях. Для каждой временной точки просматривали от 3 до 7 полей (по 15—30 клеток).

Результаты и обсуждение

Выбор клеток HeLa в качестве модельного объекта основывался на следующих соображениях. Во-первых, HeLa экспрессируют около 200—400 тыс. рецепторов на 1 клетку, что достаточно для надежной детекции эндосом, но не сопровождается побочными эффектами, характерными для клеток, сверхэкспрессирующих этот белок (например, клетки A431, у которых 2—3 млн рецепторов на 1 клетку). Во-вторых, клетки HeLa характеризуются высокой степенью распластности (после фиксации их толщина не превышает нескольких микрометров), что позволяет проводить оценку параметров эндоцитоза лишь

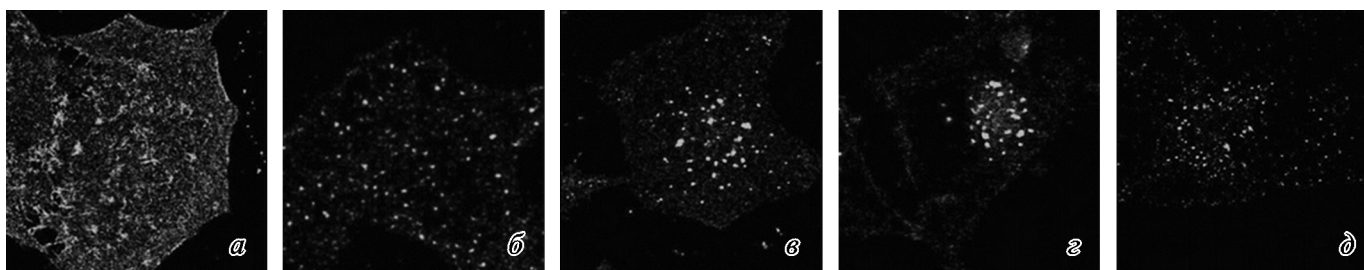


Рис. 1. Выявление рецептора ЭФР в ходе эндоцитоза, стимулированного по схеме с предварительным связыванием. *a* — клетки связывали ЭФР в течение 60 мин при 4 °С; *b–d*: эндоцитоз стимулировали переводом клеток в среду при 37 °С на 15 (*b*), 30 (*в*), 60 (*г*) и 90 (*д*) мин соответственно, после чего фиксировали и окрашивали антителами против рецептора ЭФР и GAR-Alexa568.

по одному срезу, содержащему основную часть эндосом, соответствующему плоскости, в которой располагаются микротрубочки. Анализ данных, полученных на основе сложения серии оптических срезов с шагом в 500 нм, показал, что на расстоянии 1–3 мкм от поверхности субстрата (эта плоскость проходит под ядром или пересекает ядро в его нижней части) выявляется более 80–90 % эндосом. Таким образом, эндосомы, локализованные выше этой плоскости и над ядром, могут «теряться», и общая оценка числа эндосом оказывается заниженной, но эта ошибка не превышает величины в 10 %. Таким образом, распластанность клеток позволяет работать с их изображением как с 2D-объектом.

Типичная серия изображений, отражающих динамику эндоцитоза рецептора ЭФР в клетках HeLa, представлена на рис. 1. Эндоцитоз предварительно связанного при 4 °С ЭФР в этом случае стимулировали переводом клеток в условия при температуре 37 °С, фиксировали их через 15, 30, 60 и 90 мин, окрашивали антителами к рецептору ЭФР и анализировали с помощью конфокального микроскопа фирмы, как описано в разделе «Материал и методика». Видно, что через 1 ч после связывания ЭФР на холоде рецептор локализуется в плазматической мембране, образуя несущественно различающиеся по яркости от фона остальной мембраны мелкие кластеры, возможно представляющие собой окаймленные ямки (рис. 1, *a*). Через 15 мин (рис. 1, *б*) в клетке визуализируется россыпь мелких ярких везикул, содержащих рецептор ЭФР. Следует учитывать, что такое распределение в силу малой толщины ламеллы отражает околосоматную локализацию эндосом, а не их перераспределение по всей цитоплазме и указывает на то, что в клетках HeLa интернализация идет не только с латеральной, но и со всей поверхности клетки. Через 30 мин (рис. 1, *в*) эндосомы явно укрупняются и перераспределяются с периферии клетки в околоядерную область (ОЯО), что трактуется как их перемещение в направлении ЦОМТ. Эти процессы максимально выражены через 60 мин после стимуляции эндоцитоза (рис. 1, *г*). Через 90 мин видны очень мелкие, разбегающиеся от центра клетки — везикулы, что отражает как процесс деградации в лизосомах, так и рециклирование части рецептора обратно на плазматическую мембрану.

Следует подчеркнуть, что динамика эндоцитоза достаточно лабильна, и в одних случаях уже через 60 мин можно наблюдать лишь единичные эндосомы, полностью исчезающие через 90 мин, а в других — довольно длительное (в течение 120–150 мин) присутствие их в клетке. Это отражает возможность регуляции выбора пути на деградацию или рециклирование в зависимости от обще-

го сигнального контекста, в котором находятся клетки, однако динамика, приведенная на рис. 1, является наиболее типичной.

Таким образом, основными визуально регистрируемыми параметрами являются размер и число эндосом, а также степень их кластеризации в ОЯО, отражающая динамику перемещения по микротрубочкам. Эти параметры можно оценивать с помощью программы ImageJ. Приходилось учитывать, что выставление порога приводит к увеличению площади самых крупных и ярких объектов или слиянию двух ярких объектов в один, тогда как объекты меньшей яркости не выделяются и, таким образом, выпадают из выборки, хотя четко визуализируются при взгляде через объектив. В тех ситуациях, когда их учет был для нас особенно важен, в функции Analyze particles в опции размера (Size) мы пользовались возможностью выделения интервалов интересующих нас размеров. Основным принципом, на основании которого мы подбирали условия, состоял в максимальном соответствии размеров «масок объектов» тому, что видит наблюдатель.

Для оценки степени кластеризации использовали функцию Measure, позволяющую определить количество пикселей, попадающих в выделенную область. В этом случае пороговое значение не выставляется, чтобы учесть все пиксели даже с фоновым уровнем яркости, составляющие интересующую нас площадь. Основываясь на том, что чем эффективнее будет перемещение эндосом по микротрубочкам в сторону к ЦОМТ, тем меньшую долю

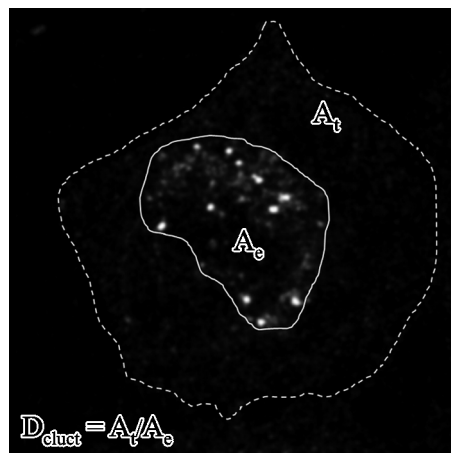


Рис. 2. Определение коэффициента кластеризации D_{clust} . Штриховой линией обведена площадь всей клетки (A_t), сплошной — зона локализации эндосом (A_e). В левом углу приведена формула, по которой определяли величину коэффициента.

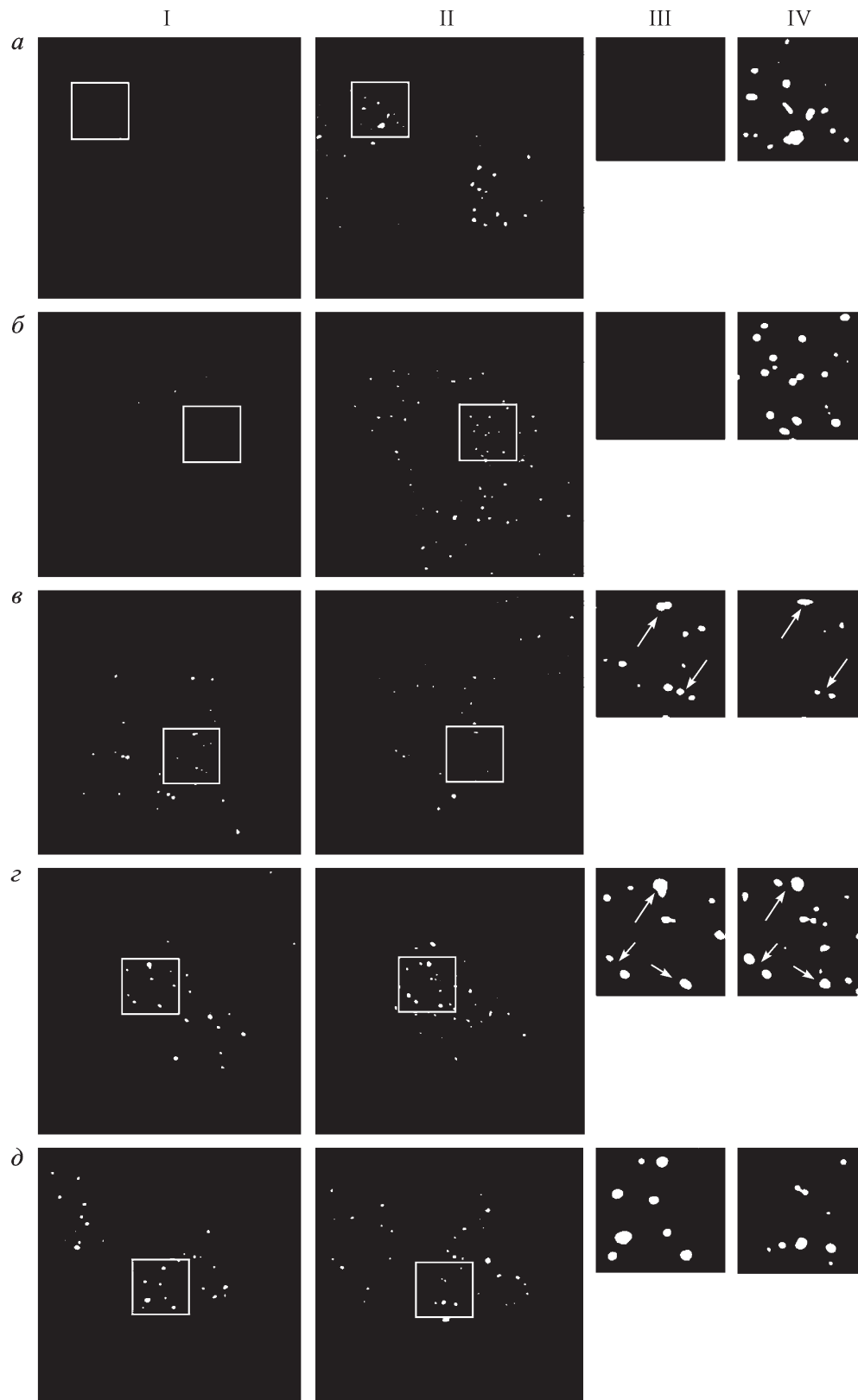


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное выявление локализации рецептора ЭФР (ЭФР-Р) и EEA1 в ходе эндоцитоза. ЭФР-Р (ряды I и III) и EEA1 (ряды II и IV) в intactных клетках (панель *a*), в клетках после холодного связывания ЭФР (*б*) и через 15 (*в*), 30 (*г*) и 60 (*д*) мин после стимуляции эндоцитоза переводом в среду при 37 °С. *Рамками* на соответствующих изображениях выделены участки клетки, представленные в *рядах* III и IV в увеличенном виде. Одинаково направленными *стрелками* обозначены колокализирующиеся везикулы.

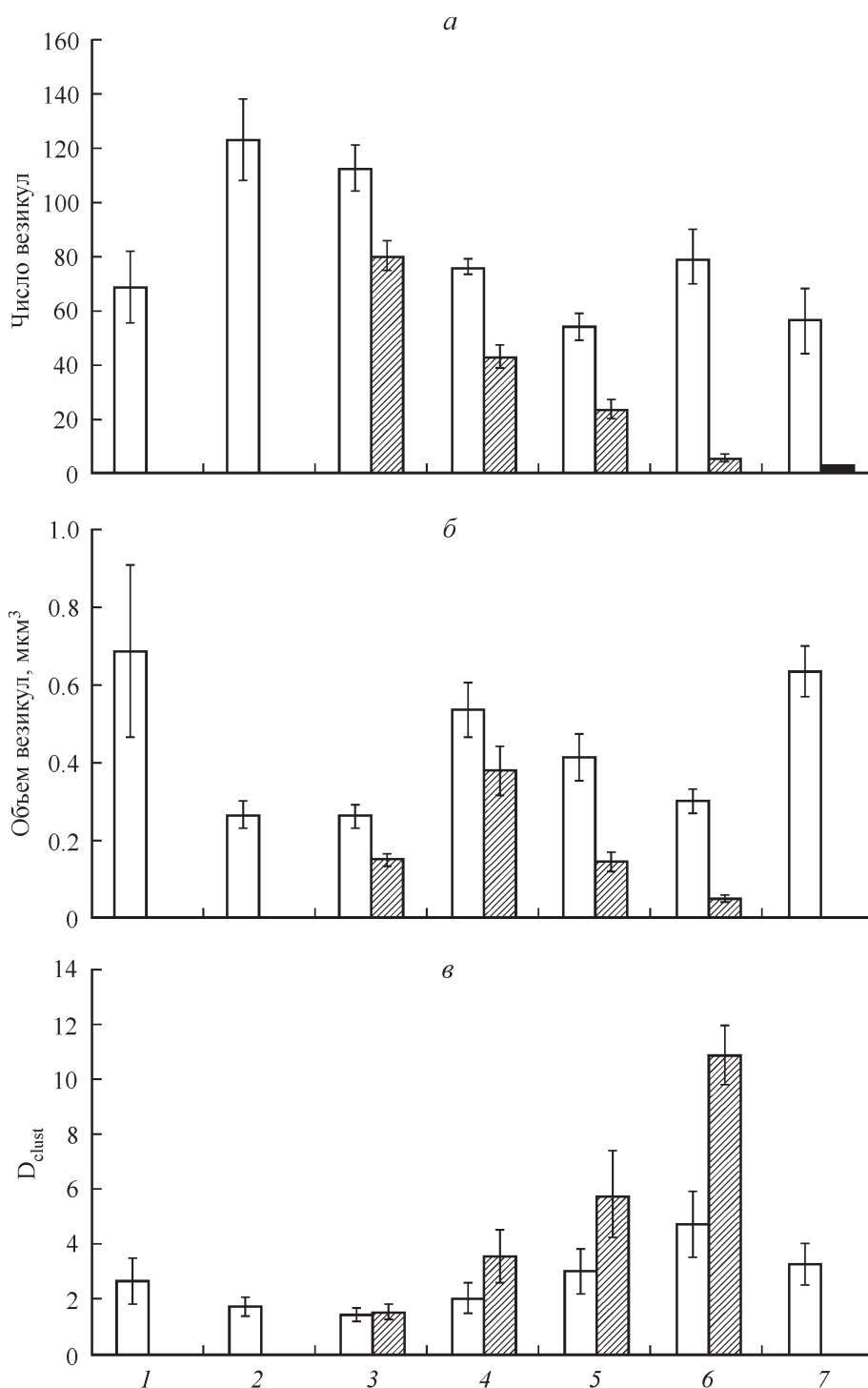


Рис. 4. Динамика изменений среднего числа везикул на клетку (а), их объема (б) и степени кластеризации (в) в ходе эндоцитоза.

1 — клетки до стимуляции эндоцитоза, 2 — через 60 мин связывания ЭФР при 4 °С, 3—7 — через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после перевода клеток в среду при 37 °С. Светлые столбики — EEA1, темные — ЭФР-Р. Представлены средние значения и их доверительный интервал (95 %).

площади клетки они будут занимать и тем плотнее будет кластер, мы высчитывали отношение площади всей клетки (A_t) к площади области, занимаемой основной массой эндосом (A_e), как это представлено на рис. 2. Таким образом, величина этого отношения, обозначенного нами как коэффициент кластеризации D_{clust} , будет тем больше, чем быстрее эндосомы перераспределяются к ОЯО. При минимальном значении коэффициента, равном 1, эндосомы

занимают всю площадь клетки или расположены при- мембранно.

В качестве примера использования этого подхода мы приводим данные обработки эксперимента, в котором анализировали поведение как рецептора ЭФР, так и ключевого белка слияния EEA1 (рис. 3). Мы обнаружили, что EEA1-позитивные везикулы в культивируемых клетках HeLa выявляются до любых обработок (интактные клет-

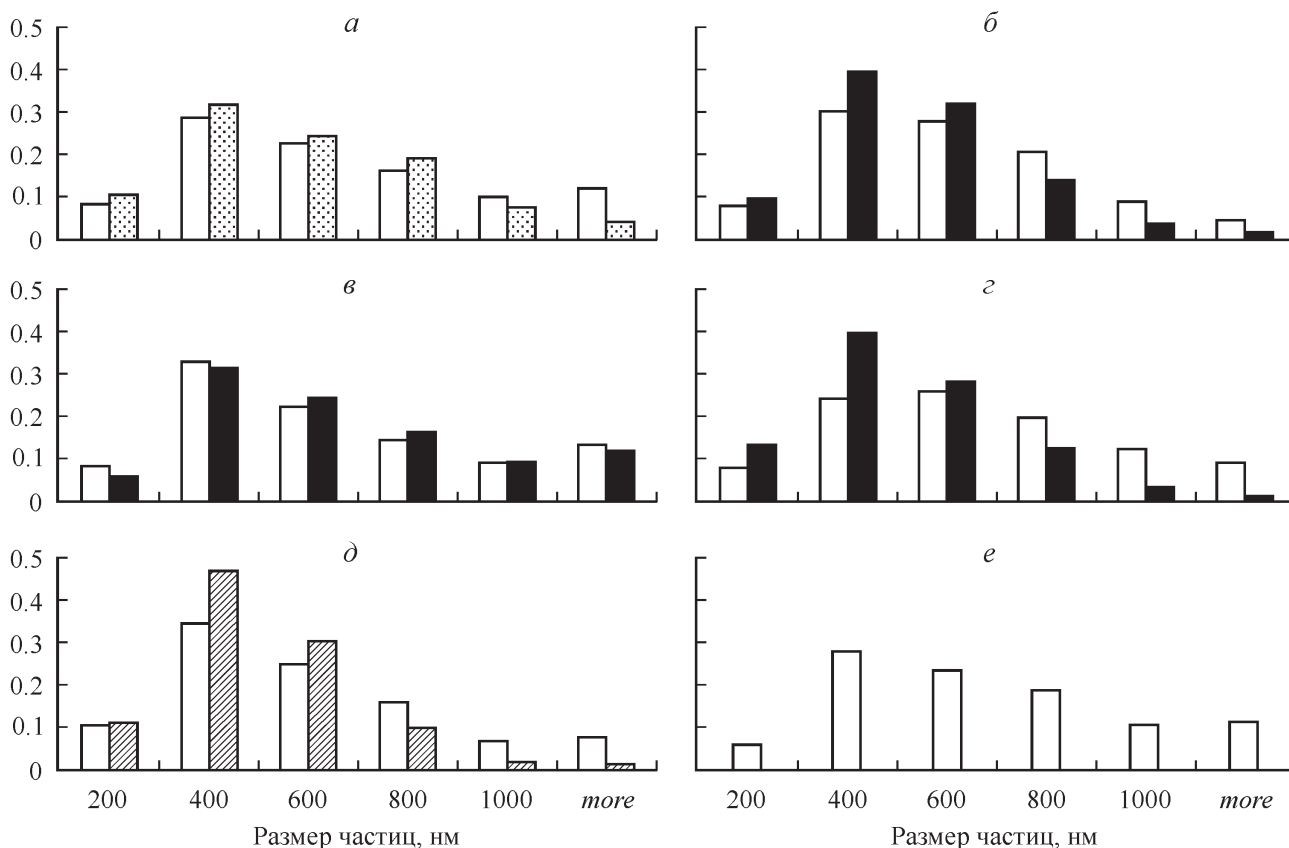


Рис. 5. Распределение везикул по их линейным размерам (с шагом в 200 нм), вычисленным на основе оценки площади везикул.

a — распределение EEA1-везикул в интактных клетках (белые столбцы) и после холодной инкубации с ЭФР (серые столбцы); *б*—*г* — распределение по размерам EEA1-везикул (белые столбцы) и эндосом с рецептором ЭФР (черные столбцы) через 15, 30 и 60 мин соответственно; *д* — распределение EEA1-везикул в клетках, содержащих эндосомы (белые столбцы) и уже без эндосом (заштрихованные столбцы) через 90 мин после стимуляции эндоцитоза; *е* — распределение EEA1-везикул (белые столбцы) по размерам через 120 мин после стимуляции эндоцитоза. По горизонтали — размер частиц, нм, *more* — размер частиц, превышающий 1000 нм; по вертикали — количество везикул определенного размера по отношению к общему количеству везикул в клетке, отн. ед.

ки, рис. 3, панель *a*). Их число в среднем варьирует в пределах 60 штук на клетку (рис. 4, панель *a*, столбец 1), более 20 % популяции имеют диаметр более 800 нм (рис. 5, *a*, белые столбцы), т. е. являются довольно крупными везикулами, наряду с которыми присутствуют и мелкие со средним кажущимся диаметром около 400 нм (см. соответствующую врезку на рис. 3, панель *a*; 5, *a*, белые столбцы). EEA1-везикулы преимущественно крупные,

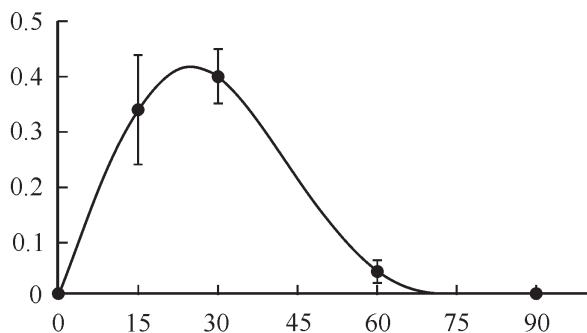


Рис. 6. Динамика колокализации EEA1-везикул и рецептор-содержащих эндосом в ходе эндоцитоза.

По оси абсцисс — время после стимуляции эндоцитоза, мин; по оси ординат — доля совпадений красной флуоресценции (рецептор ЭФР) и зеленой (EEA1), нормированная на всю рецепторсвязанную флуоресценцию.

имеют тенденцию к кластеризации в ОЯО, поскольку D_{clust} в этом случае больше 2 (рис. 4, панель *в*).

Через 1 ч связывания на холоде рецептор по-прежнему локализован на плазматической мембране, тогда как EEA1-везикулы распределяются из ОЯО на периферию (рис. 3, панель *б*), при этом падает доля крупных везикул и увеличивается доля мелких (рис. 5, *б*, белые столбцы). Поскольку среднее число частиц на клетку увеличивается, эти данные свидетельствуют о фрагментации EEA1-везикул, а уменьшение значения D_{clust} подтверждает перераспределение к мембране.

Через 15 мин после стимуляции эндоцитоза мы видим появление эндосом, в основном мелких и локализованных примембранно (рис. 4, *б*, *в*; 5, *б*). Хотя среднее число EEA1-везикул на клетку в общем случае больше, чем эндосом, с этого момента начинает проявляться синхронный характер поведения эндосом (черные столбцы на гистограммах) и EEA1-везикул. Так, в период с 15-й до 60-й мин включительно число EEA1-везикул и эндосом уменьшается, причем эндосомы в отличие от EEA1-везикул практически исчезают из клеток уже к 90-й мин после стимуляции эндоцитоза. Средний объем обеих структур достигает максимума к 30 мин, после чего начинает падать до минимальных размеров к 90-й мин. Через 30 мин наблюдается почти полное совпадение распределения двух органелл по размерам, в том числе и увеличение доли крупных (рис. 5, *в*). Мы попы-

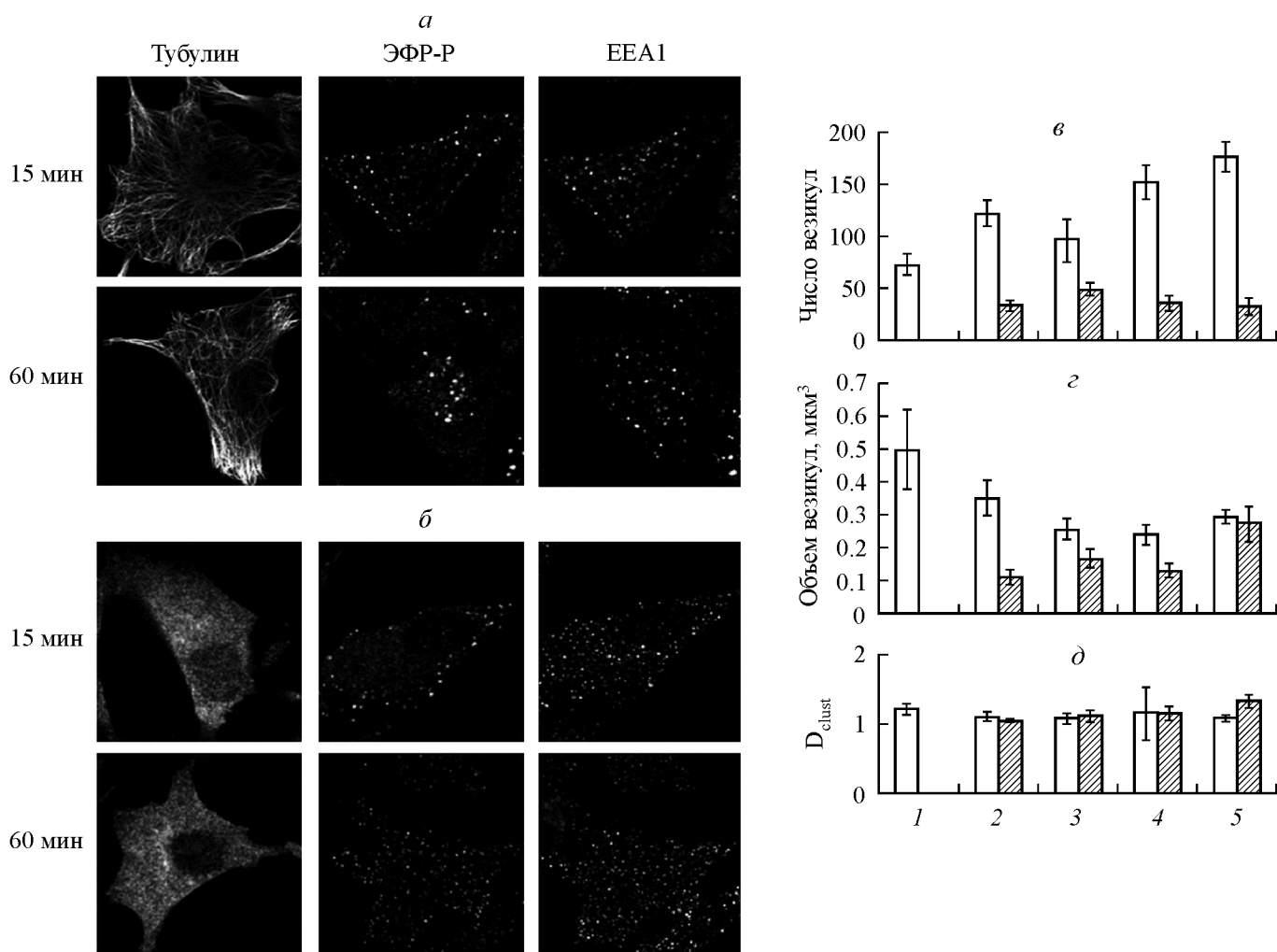


Рис. 7. Влияние деполимеризации микротрубочек нокодазолом на локализацию, число EEA1-везикул и эндосом и их объем при стимуляции эндоцитоза по схеме импульсной загрузки лиганда.

а, б — флуоресцентные изображения клеток через 15 и 60 мин после стимуляции эндоцитоза в контроле (*а*) и в присутствии нокодазола (*б*). *Левый столбец* — окраска на тубулин, *средний* — на рецептор ЭФР (ЭФР-Р), *правый* — на EEA1; *в* — гистограммы изменения числа EEA1-везикул и эндосом на клетку, их объема и коэффициента кластеризации (среднее и его 95%-ный доверительный интервал) в условиях стимуляции эндоцитоза в присутствии нокодазола. *Столбцы* на гистограммах: 1 — клетки до стимуляции эндоцитоза, 2 — через 5 мин пульса, 3–5 — через 15, 30 и 90 мин после стимуляции эндоцитоза соответственно; *белые столбцы* — EEA1-везикулы, *заштрихованные столбцы* — эндосомы.

тались на увеличенных фрагментах черно-белых изображений клеток на рис. 3 отразить тот факт, что через 15–30 мин значительная часть эндосом колокализирована с EEA1-позитивными везикулами (такие везикулы отмечены стрелками на врезках рис. 3). Действительно, оценка доли совпадений двух органелл показывает, что колокализация везикул достигает максимума через 30 мин после стимуляции эндоцитоза, но практически не наблюдается через 60 мин (рис. 6). В цветном изображении (не представлено) мы видим, что эндосомы и EEA1-везикулы образуют общие структуры с четкой доменной организацией через несколько минут после стимуляции эндоцитоза, которые затем укрупняются, сохраняя рецептор- и EEA1-домены, а к 60-й мин сегрегируют.

Интересно, что с точки зрения кластеризации при общей тенденции к увеличению рецептор-позитивные структуры демонстрируют больший по сравнению с EEA1-везикулами рост величины D_{clust} , особо ярко выраженный после 60-й мин (рис. 4, *в*). Это связано, во-первых, с тем, что не все EEA1-везикулы вовлечены во взаимодействие с эндосомами, и они сохраняют перифериче-

ское положение; во-вторых, после сегрегации рецептор- и EEA1-содержащих доменов из общей везикулы эндосомы еще продолжают процесс созревания (и перемещения), тогда как EEA1-везикулы, возможно фрагментируются после этого, затем укрупняются и к 120-й мин возвращаются в исходное состояние по числу, объему и локализации всей популяции (рис. 4, 5). Возможность еще одного цикла фрагментации EEA1-везикул, связанного с процессом сегрегации, подтверждает то, что через 90 мин в клетках, в которых эндосомы исчезли в результате деградации рецептора в лизосомах, доля крупных EEA1-везикул увеличивается, тогда как в тех, где эндосомы еще присутствуют, относительно увеличена доля мелких везикул (рис. 5, *д*).

Тот факт, что в интактных клетках EEA1-везикулы собраны в основном в ОЯО, а также их перераспределение на периферию после инкубации при 4 °С, после которой деполимеризуются МТ, вызывает вопрос о роли МТ в слиянии органелл эндоцитозного пути. Мы провели эксперимент, в котором сравнили поведение EEA1-везикул и эндосом с рецептором в условиях деполимеризации МТ

нокодазолом (рис. 7). Во избежание влияния низких температур при предварительном связывании ЭФР добавляли к клеткам непосредственно при 37 °C на 5 мин, а несвязавшийся лиганд удаляли. Как видно на панелях *a* и *b* рис. 7, обработка клеток нокодазолом приводит к существенному уменьшению числа вновь сформированных эндосом, их размеров и отсутствию кластеризации. Количество эндосом практически не изменяется в течение всего времени эксперимента, так же как не наблюдается достоверного изменения их объема. Интересно, что EEA1-везикулы также постепенно уменьшают свой объем при увеличении среднего числа на клетку. Несмотря на это, некоторая доля примембранных везикул формирует двухдоменные структуры с мелкими же эндосомами, но дальнейших слияний в таких условиях не происходит. Некоторое увеличение объема эндосом к 90-й мин (рис. 7, *z*) происходило только в некоторых клетках, причем эти укрупненные структуры были локализованы примембранно.

Таким образом, суммируя результаты, мы можем предполагать, что предсуществующий в клетке пул EEA1-позитивных везикул опосредует слияния ранних эндосом, формируя гибридные органеллы, в которых EEA1-домен работает как платформа для закоривания и сближения таких же гибридных органелл. Если первичное формирование примембранных двухдоменных структур возможно и в отсутствие МТ, то для дальнейших циклов слияния они необходимы, возможно обеспечивая точку опоры для взаимного позиционирования везикул и формирования SNARE-комплексов. Обработка данных в общем случае выявляет несколько больший размер EEA1-везикул по сравнению с рецепторсодержащими структурами, однако это может отражать технический момент (EEA1-длинный белок, локализованный только на мембране эндосомы, тогда как антитела к рецептору получены на его экстраклеточный домен, после эндоцитоза попадающий внутрь эндосомы). Однако полученные нами ранее данные по действию вортманнина, ингибитора PI(3)-киназы Vps34, блокирующего формирование внутренних пузырьков эндосом, показывают, что в таких условиях формируются аномально большие эндосомы в виде бубликов, пустые внутри (Железнова и др., 2001). Таким образом, относительно меньшие размеры рецепторной части везикул по сравнению с EEA1-структурами могут говорить о том, что в ходе процессов слияния, поддерживаемого EEA1-везикулами, домен гибридной эндосомы, обогащенный рецептором, продолжает формировать внутренние пузырьки, что является необходимым событием для созревания эндосом и превращения их в поздние мультивезикулярные структуры.

После ряда слияний, приводящих к укрупнению гибридной везикулы, EEA1-домены выделяются из общей структуры и восстанавливают затем исходную популяцию EEA1-везикул. Этот цикл несколько напоминает предложенный Луцио с коллегами (Luzio et al., 2010) сценарий формирования гибридных эндолизосом, реализующийся на следующей стадии эндоцитоза и позволяющий многократно использовать лизосомы со всем их гидролитическим аппаратом. Таким образом, вполне вероятно, что ключевые процессы слияния на разных этапах эндоцитозного пути организованы по общему принципу с участием везикул-посредников.

Следует отметить, что о выявлении популяции EEA1-везикул в интактных клетках разных типов, более того, о существовании четко выраженных EEA1-доменов

в эндосомах сообщалось рядом авторов (Das, Pellett, 2011; Veas et al., 2012). Однако даже в этих работах проводится мысль о том, что EEA1 рекрутируется на мембрану эндосомы из цитоплазмы, а выявляемые авторами везикулы возникли в результате этого процесса. Однако с такой точкой зрения трудно согласиться хотя бы потому, что сигнал цитоплазматического EEA1 практически равен фону в контроле, но при действии вортманнина, когда EEA1 уходит с мембран, происходит резкое повышение флуоресценции цитоплазмы (Железнова и др., 2003).

Таким образом, наши данные, подтвержденные в значительной степени предложенным нами подходом с использованием полуколичественного анализа изображений, позволяют предполагать, что EEA1-везикулы выступают в роли посредников в процессе слияния эндосом, содержащих рецептор ЭФР.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-32256 и 12-04-00838).

Список литературы

- Железнова Н. Н., Меликова М. С., Харченко М. В., Никольский Н. Н., Корнилова Е. С. 2003. Роль фосфатидилинозитол-3-киназ P85/P110 и HVPS34 в эндоцитозе ЭФР-рецепторных комплексов. Цитология. 45 (6) : 574—581.
- Саблина А. А., Чудинова Е. М., Надеждина Е. С., Иванов П. А. 2012. Стрессовые гранулы в клетках с интактными или разрушенными микротрубочками: анализ с помощью нового алгоритма обработки видеоизображений. Цитология. 54 (7) : 560—565.
- Aniento F., Emans N., Griffiths G., Gruenberg J. 1993. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. J. Cell Biol. 123 : 1373—1388.
- Barbieri M. A., Kong C., Chen P. I., Horazdovsky B. F., Stahl P. D. 2003. The SRC homology 2 domain of Rin1 mediates its binding to the epidermal growth factor receptor and regulates receptor endocytosis. J. Biol. Chem. 278 : 32 027—32 036.
- Beas A. J., Taupin V., Teodorof C., Nguyen L. T., Garsia-Marcos M., Farquhar M. G. 2012. Gas promotes EEA1 endosome maturation and shuts down proliferative signal through interaction with GIV (Girdin). Mol. Biol. Cell. 23 : 4623—4634.
- Christoforidis S., McBride H. M., Burgoyne R. D., Zerial M. 1999. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. Nature. 397 : 621—625.
- Collinet C., Sto M., Bradshaw C. R., Samusik N. et al. 2010. Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. Nature. 464 : 243—249.
- Das S., Pellett P. E. 2011. Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells. J. Virol. 85 : 5864—5879.
- 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.
- Futter C. E., Pearse A., Hewlett L. J., Hopkins C. R. 1996. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. J. Cell Biol. 132 : 1011—1023.
- Gillooly D. J., Morrow I. C., Lindsay M., Gould R., Bryant N. J., Gaullier J. M., Parton R. G. et al. 2000. Localization of phosphatidylinositol-3-phosphate in yeast and mammalian cells. EMBO J. 19 : 4577—4588.
- Johannessen L. E., Pedersen N. M., Pedersen K. W., Madhus I. H., Stang E. 2006. Activation of the epidermal growth factor (EGF) receptor induces formation of EGF receptor- and grb2-containing clathrin-coated pits. Mol. Cell. Biol. 26 : 389—401.

Lawe D. C., Patki V., Heller-Harrison R., Lambright D., Corvera S. 2000. The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 binding. *J. Biol. Chem.* 275 : 3699—3705.

Loubéry S., Wilhelm C., Hurbain I., Neveu S., Louvard D., Couudrier E. 2008. Different microtubule motors move early and late endocytic compartments. *Traffic*. 9 : 492—509.

Luzio J. P., Gray S. R., Bright N. A. 2010. Endosome-lysosome fusion. *Biochem. Soc. Trans.* 38 : 1413—1416.

Nada S., Hondo A., Kasai A., Koike M., Saito K., Uchiyama Y., Okada M. 2009. The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *EMBO J.* 28 : 477—489.

Platta H. W., Stenmark H. 2011. Endocytosis and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 : 393—403.

Polo S., Di Fiore P. P. 2006. Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell*. 124 : 897—900.

Schiefermeier N., Teis D., Huber L. A. 2011. Endosomal signaling and cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 : 615—620.

Zoncu R., Perera R. M., Balkin D. M., Pirruccello M., Toomre D., De Camilli P. A. 2009. Phosphoinositide switch controls the maturation and signaling properties of APPL endosomes. *Cell*. 136 : 1110—1121.

Поступила 6 XII 2012

ANALYSIS OF EGF RECEPTOR ENDOCYTOSIS DYNAMICS BASED ON SEMIQUANTATIVE PROCESSING OF CONFOCAL IMMUNOFLUORESCENT IMAGES OF FIXED CELLS

M. V. Zlobina,¹ M. V. Kharchenko,¹ E. S. Kornilova^{1,2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² St. Petersburg State University;
e-mail: aquimaria@gmail.com

Endocytosis of signaling receptors EGF receptor in particular, starting at the plasma membrane and finishing in perinuclear lysosomes implies endosomes' multiple interactions with homotypic endosomes and vesicles of other origin (lysosomes, trans-Golgi network), which results in endosomal size changes. In addition, the characteristics of endocytic pathway is endosomes' translocation from cell periphery to juxtannuclear region. Thus, endocytosis as a highly dynamic process develops in time and space. Obviously one of the most productive approach is light immunofluorescent microscopy that allows of estimating endocytosis dynamics at the level of one or several cells. Different impacts influencing endocytic regulator components are inevitably reflected on dynamics of endosome size and (or) its translocation. This provide possibility to uncover the both crucial and secondary components of regulatory machinery. However, visual estimation of such effects is often too subjective and does not allow getting statistically reliable data. Comparison of different experiments even in the case of the same series is also impeded. In this work we use such parameters as apparent vesicle size (diameter, area or volume) and vesicle number per cell to provide quantitative estimation of fusion efficacy, as well as the coefficient reflecting vesicles' clusterization in perinuclear region as a measure of their translocation along microtubules toward nucleus (D_{clust}) and present these parameters application using EGF receptor endocytosis as an example.

Key words: EGF receptor, EEA1, endosomes, microtubules, fluorescent confocal microscopy, image.