

АНАЛИЗ СУБПОПУЛЯЦИЙ ВЕЗИКУЛ, НЕСУЩИХ АУТОАНТИГЕН РАНИХ ЭНДОСОМ EEA1

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

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

Конфокальный иммунофлуоресцентный анализ интерфазных клеток HeLa показал, что аутоантиген ранних эндосом EEA1, участвующий в регуляции гомотипических слияний, ассоциирован с везикулами, которые можно разделить на две субпопуляции по их размерам, локализации и уровню связывания с EEA1. Клетки в течение 12 ч до исследования вели на среде, лишенной сыворотки, для минимизации лигандстимулируемого эндоцитоза ростовых сывороточных факторов. Первая субпопуляция представлена в основном крупными везикулами, сильно декорированными EEA1. Эти везикулы локализованы преимущественно в околядерной области. Эксперименты по разборке микротрубочек показывают, что такая локализация обеспечивается тубулиновым цитоскелетом. Вторая субпопуляция представлена многочисленными мелкими везикулами, которые слабо метятся антителами на EEA1 и распределены в основном по периферии цитоплазмы. Двойной непрямой иммунофлуоресцентный анализ фиксированных клеток показал, что околядерные везикулы, обогащенные EEA1, полностью колокализуются с ключевым белком ранних эндосом — малой ГТФазой Rab5, тогда как около половины слабо декорированных EEA1 периферических везикул негативны по Rab5. Обнаружено, что число Rab5-позитивных везикул в расчете на клетку больше, чем везикул, несущих EEA1. Таким образом, в лишенных сыворотки клетках HeLa с низким уровнем эндоцитоза выявляются субпопуляция везикул, обогащенных EEA1 и Rab5 (обозначаемых как EEA1+++/Rab5+), и субпопуляция слабо окрашенных EEA1-везикул, которые могут быть как Rab5-положительными, так и отрицательными (EEA1+/Rab5+ и EEA1+/Rab5-). Кроме того, в клетках присутствует фракция везикул, ассоциированных только с Rab5 (EEA1-/Rab5+). Полученные данные могут свидетельствовать о различной функциональной роли всех этих субпопуляций, несущих белки, традиционно рассматриваемые как эквивалентные друг другу маркеры ранних эндосом.

Ключевые слова: ранние эндосомы, EEA1, Rab5, конфокальная иммунофлуоресценция, клетки HeLa.

Аутоантиген ранних эндосом 1 (EEA1, early endosomal autoantigen 1) — белок, работающий на первой стадии гомотипического слияния и осуществляющий узнавание и заякоривание ранних эндосом друг с другом. EEA1 — крупный белок, содержащий на С-терминальном конце FYVE-домен, узнающий специфический фосфорилированный липид эндосомной мембраны фосфоинозитид-3-монофосфат (PI3P), и RBD-домен, связывающийся с активированной формой малой ГТФазы Rab5 (Rab5-GTP). На N-конце также выявлен домен, способный взаимодействовать с Rab5. N- и С-домены разделены линейным сверхскрученным участком, участвующим в формировании гомодимеров EEA1 (Dumas et al., 2001; Merithew et al., 2003). Предполагают, что активированный Rab5, рекрутируя на мембрану эндосомы фосфатидилинозитол-3-киназу Vps34, создает домены, обогащенные PI3P, что приводит к ассоциации с мембраной ранней эндосомы димера EEA1 за счет связывания как с липидом, так и с Rab5 (Lawe et al., 2002). При этом его двойной линейный участок оказывается ориентированным перпендикулярно мембране, и за счет N-концевого Rab5-связывающего участка такой димер может заякоривать другую эндосому, несущую активированный Rab5,

на расстоянии около 100 нм. Стабилизация мембран двух везикул напротив друг друга позволяет вступить в игру комплементарным SNARE-белкам, сближающим мембраны на расстояние, достаточное для реорганизации биллипидных слоев и формирования единой мембраны.

Таким образом, в современном представлении о регуляции слияния ранних эндосом ключевая роль принадлежит малой ГТФазе Rab5, которая ассоциируется с мембраной эндоситозного пузырька, формирующегося de novo уже после его отделения от плазматической мембраны. Принято считать, что и рекрутирование EEA1 на мембрану эндосомы происходит каждый раз заново из цитоплазматического растворимого пула (Simonsen et al., 1998; Rubino et al., 2000; Zoncu et al., 2009). В силу этого и Rab5, и EEA1 часто рассматривают в качестве универсальных маркеров ранних эндосом. Однако как в наших исследованиях (Злобина и др., 2013), так и в других (Zoncu et al., 2009) EEA1-положительные везикулы обнаруживаются в клетках и в отсутствие стимулированного эндоцитоза. Кроме того, цитоплазма клеток практически не метится антителами к EEA1, что свидетельствует об очень низкой концентрации не ассоциированного с мембранами белка. Таким образом, исследование биогенеза

ЕЕА1-везикул весьма актуально для понимания механизмов функционирования эндосомного аппарата клеток.

В настоящей работе использовали клетки HeLa, находящиеся в условиях сывороточного голодания в течение 12 ч для истощения среды культивирования по интернализуемым ростовым факторам. Мы выявили и описали две субпуляции ЕЕА1-положительных везикул и исследовали их колокализацию с Rab5 на основе анализа конфокальных изображений клеток.

Материал и методика

Культивирование клеток. Использовали клетки карциномы шейки матки человека HeLa из Европейской коллекции клеточных культур (Великобритания). Клетки культивировали в среде ДМЕМ (ПанЭко, Россия), содержащей 8 % фетальной сыворотки (РАА, Австрия), при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Для экспериментов с иммунофлуоресцентным окрашиванием клетки выращивали до 50–70 %-ного монослоя на покровных стеклах размером 10 × 10 мм, помещенных в чашки Петри. За 12 ч до стимуляции эндцитоза клетки переводили в среду ДМЕМ, не содержащую сыворотки. Для деполимеризации микротрубочек клетки инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в среде, содержащей нокодазол (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 20 мкМ.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток. Покровные стекла дважды промывали PBS, после чего фиксировали 3.6%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США), приготовленным на PBS, при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем клетки промывали 5 раз по 3 мин раствором PBS и обрабатывали 15 мин при комнатной температуре раствором PBS, содержащим 0.5 % Тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США). Неспецифическое окрашивание блокировали в 1%-ном растворе BSA (на PBS) 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 проводили в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Потом стекла с клетками промывали, как описано выше, и заключали в среду, содержащую 9 мл глицерина, 1 мл PBS, 1 мл DMSO и 80 мл пропилгалата.

Антитела. Для специфического выявления рецептора ЭФР использовали поликлональные антитела кролика, узнающие экстраклеточный домен рецептора ЭФР человека (Cell Signaling, США), и антитела к Rab5 (Cell Signaling, США) в разведении 1 : 100. Моноклональные мышинные антитела против α -тубулина (Sigma-Aldrich, США) использовали в разведении 1 : 2000. Антитела, узнающие ЕЕА1 (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) в разведении 1 : 500. Антитела разводили в PBS, pH 7.4, содержащем 1 % BSA.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Распределение флуоресцентно меченных белков в клетках изучали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Carl 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 — лазером He-Ne (543

нм). Флуоресценцию на разных длинах волн сканировали отдельно с помощью программы Leica Confocal Software. Плоскость сканирования выбирали ниже ядра или в нижней его части, т. е. там, где локализуется основная масса эндосом и микротрубочек в хорошо распластанных клетках HeLa.

Анализ и обработка изображений. Полученные изображения обрабатывали с помощью программ Leica Confocal Software (Carl Zeiss, Германия) и ImageJ 1.40g (National Institute of Health, США). Оценку количества везикул, их размеров и интенсивности флуоресценции проводили, как описано ранее (Злобина и др., 2013). Для оценки колокализации использовали плагин JACoP для программы ImageJ (Bolte, Cordelières, 2006). В расчет брали коэффициент Мандерса M1, отражающий долю пикселей с красным сигналом, содержащих и зеленый сигнал, по отношению к общему сигналу с красного канала (Manders et al., 1993).

Статистическая обработка данных. Каждый эксперимент проводили не менее 3 раз. Данные обрабатывали с использованием пакета анализа программы Microsoft Excel. В экспериментах по иммунофлуоресценции для анализа выбирали клетки с максимальной степенью распластывания, на краю или вне островков монослоя. Представленные изображения были характерны для большинства клеток в данных условиях. Для каждой точки просматривали от 3 до 7 полей (15–30 клеток). Статистическую достоверность различия сравниваемых независимых выборок определяли при помощи непарного двухвыборочного *t*-теста с различными дисперсиями. Критический уровень значимости принимали равным 0.05. На графиках приведены средние значения и их доверительные интервалы.

Результаты

На рис. 1 представлены результаты одновременного окрашивания флуоресцентно меченными антителами к ЕЕА1 и рецептору ЭФР фиксированных клеток HeLa. За 12 ч до начала эксперимента клетки переводили на среду, не содержащую сыворотки. Мечение антителами против рецептора ЭФР демонстрирует диффузное распределение белка, соответствующее его равномерной локализации на плазматической мембране и подтверждающее отсутствие рецепторсодержащих эндосом (рис. 1, *а*). Следует отметить, что фокальную плоскость выбирали таким образом, чтобы можно было зафиксировать максимальное число эндосом. Обычно она совпадает с плоскостью, в которой локализуется и основная масса микротрубочек (рис. 1, *б*). Вследствие сильной распластности клеток толщина их ламеллы не превышает 3–5 мкм. Учитывая то, что разрешение по оси Z оценивается в 500 нм, антитела благодаря их яркости и высокой плотности антигена на плазматической мембране (200–400 тыс. рецепторов на 1 клетку) регистрируются и в плоскости, отстоящей от мембраны на 1–2 мкм. На изображении той же клетки, снятом в канале, регистрирующем флуоресценцию ЕЕА1 (рис. 1, *а–в*), четко видны везикулярные структуры, имеющие тенденцию к околядерной локализации, и практически отсутствует диффузное окрашивание цитоплазмы.

Совместное мечение клеток антителами к ЕЕА1 и тубулину показывает (рис. 1, *б, д*), что ЕЕА1-положительные структуры колокализуются с микротрубочками (MT). Более того, обработка клеток нокодазолом, вызы-

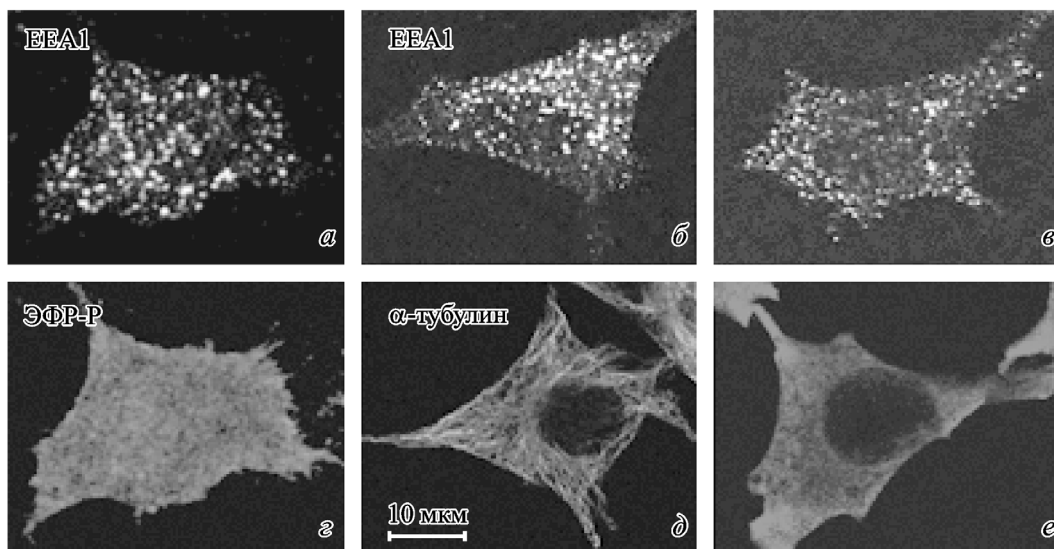


Рис. 1. Выявление EEA1-везикул в клетках HeLa, находящихся в условиях сывороточного голодания в течение 12 ч. Фиксированные клетки окрашены флуоресцентно мечеными антителами к EEA1 (a–e), рецептору ЭФР (z) и α -тубулину (d, e). a–z, б–d и в–e — пары изображений одной и той же клетки, полученные в зеленом и красном каналах соответственно. a, б, z, d — необработанные клетки; в, e — клетки после инкубации с нокадазолом (20 мкМ) 30 мин при 37 °С.

вающая деполимеризацию МТ, приводит к «рассыпанию» околоядерного кластера EEA1-везикул и их равномерному распределению по всей цитоплазме (рис. 1, e). Таким образом, система МТ участвует в околоядерном

позиционировании пула EEA1-везикул в условиях минимально активного эндоцитозного процесса.

При визуальном анализе изображений клеток, меченых антителами против EEA1 (рис. 2, a, б), становится

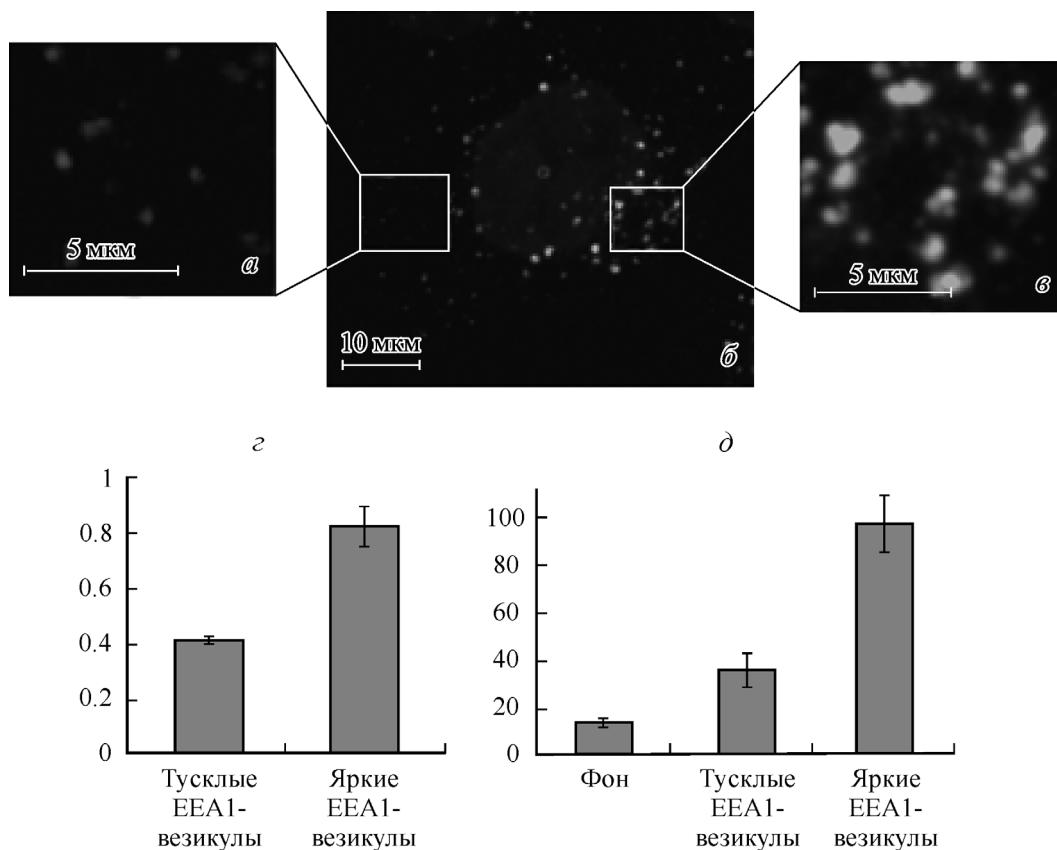


Рис. 2. Две субпопуляции EEA1-позитивных везикул.

Рамкой слева и справа на изображении б выделены участки клетки, содержащие преимущественно тусклые и яркие везикулы соответственно, увеличенные изображения которых показаны на а и в соответственно; z — среднее значение площади тусклой и яркой везикул, μm^2 ; d — среднее значение интенсивности флуоресценции пикселя (в уровнях серого), фонового участка клетки и двух типов везикул.

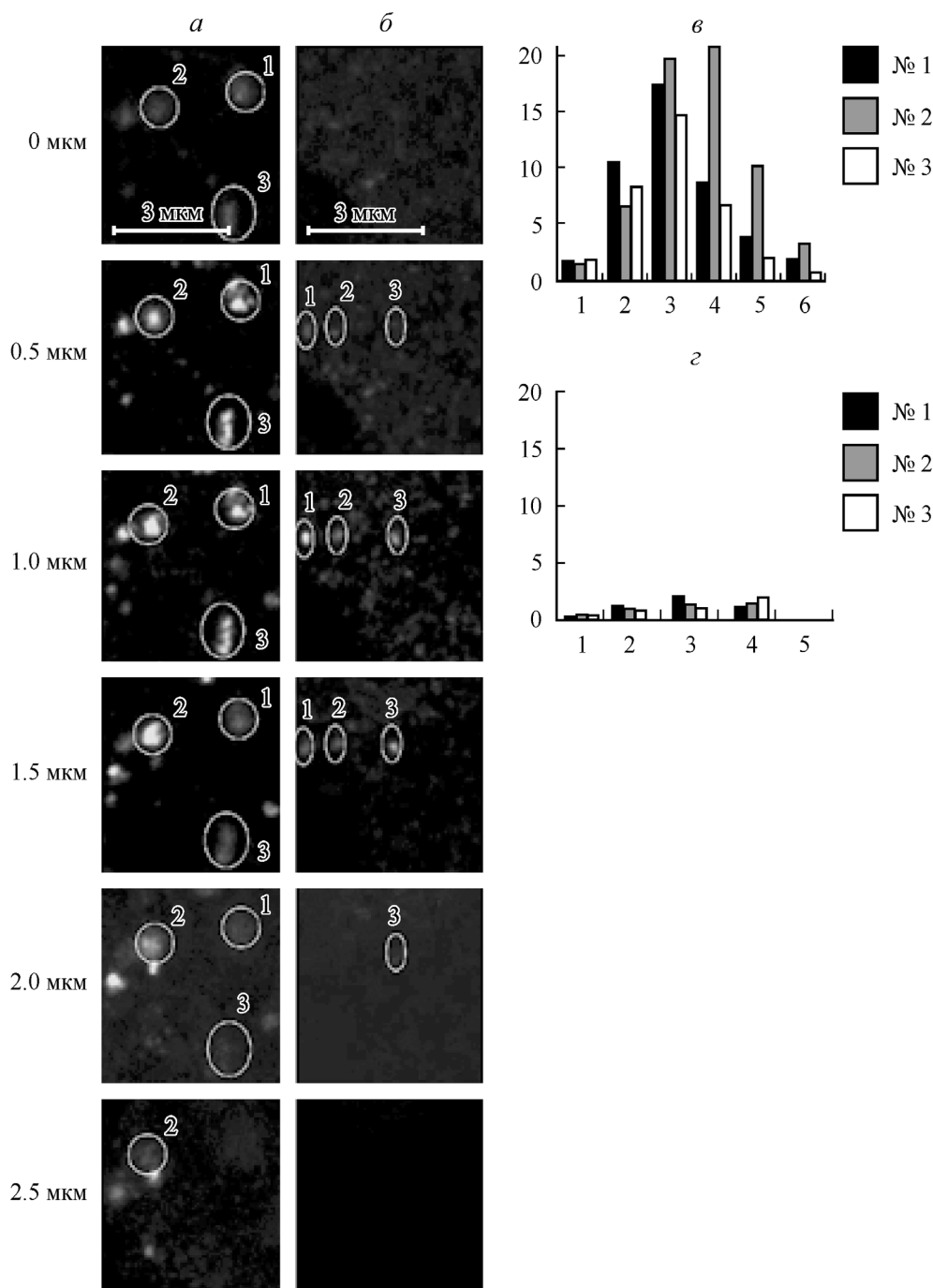


Рис. 3. Сравнение размеров тусклых и ярких везикул.

a, б — Z-серия оптических срезов участка клетки с яркими (*a*) и тусклыми (*б*) EEA1-везикулами. Цифры слева — шаг серии по оси Z, мкм. Выделены кружками и пронумерованы везикулы, средняя интенсивность пикселя которых для каждого среза представлена на гистограммах *в* и *г* (соответствующих панелям *a* и *б*); по горизонтали — порядковый номер оптического среза; по вертикали — средняя интенсивность пикселя (уровень серого).

очевидным наличие двух типов везикул — ярких, сильно декорированных EEA1 (EEA1+++), и менее ярких (тусклых, EEA1+). Первые преимущественно локализованы в околоядерной области, хотя могут находиться и на периферии, и имеют большие кажущиеся размеры (кажущиеся, так как оценка произведена по свечению исследуемых частиц) и зачастую сложную форму (рис. 2, *в*). Везикулы же, локализованные на периферии, в основном слабее декорированы EEA1 (рис. 2, *a*).

Анализ кажущейся площади, средней интенсивности пикселя и интегральной интенсивности флуоресценции

везикул показал, что первый тип имеет в среднем большую площадь и большую среднюю интенсивность пикселя (рис. 2, *г, д*).

Различия в яркости и размерах на первый взгляд могут объясняться тем, что тусклые маленькие везикулы просто находятся вне фокальной плоскости. Однако анализ серии последовательных оптических срезов, сделанных с шагом в 500 нм, показал, что мы действительно имеем дело с везикулами разного размера: если крупные яркие везикулы были видны на 4–5 срезах (рис. 3, *a*), то тусклые выявлялись лишь на 2–3 (рис. 3, *б*). На гисто-

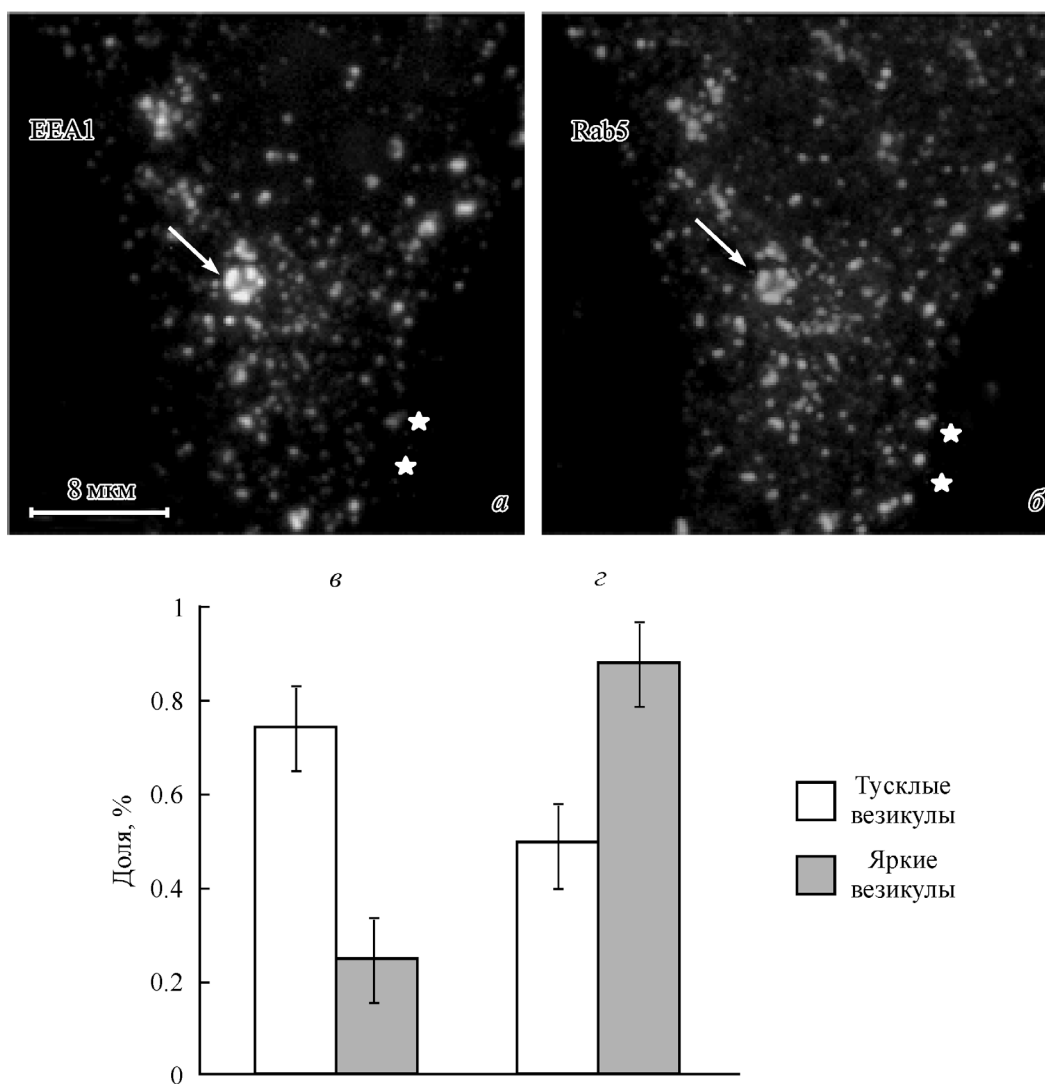


Рис. 4. Двойное иммунофлуоресцентное мечение голодающих клеток HeLa антителами к EEA1 (а) и Rab5 (б).

Представлено изображение типичной клетки. Стрелкой обозначены колокализованные белки, звездочками — везикулы, позитивные по Rab5, но лишённые EEA1. в — соотношение тусклых и ярких EEA1-везикул в расчете на клетку, полученное на основе обработки изображений 10 клеток по протоколу, описанному в тексте; г — доля тусклых и ярких везикул, колокализованных с Rab5 (коэффициент Мандерса M1; см. раздел «Материал и методика»).

граммах (рис. 3, в, г) представлены распределения средней интенсивности пикселя на серии последовательных оптических срезов нескольких, отмеченных *кружками* на изображениях а и б, соответственно ярких и тусклых везикул. Таким образом, мы можем определенно говорить о том, что концентрация EEA1 на мембране ярких околядерных везикул в среднем более чем в 2 раза выше, чем на мембране тусклых периферических пузырьков.

Для подсчета числа везикул в клетке в программе ImageJ необходимо выделить объекты, что достигается введением порога интенсивности (в пределах 0—255). Мы стремились к тому, чтобы получающееся в результате бинаризованное изображение везикулы — ее маска — по площади максимально соответствовало видимой глазом. Однако порогового значения, подходящего для всех везикул, не существует. Так, в условиях нашего эксперимента и получения изображения максимальное соответствие размеров маски и кажущихся размеров везикулы достигалось при пороге в 50—60 ед., но при этом оставались только яркие, тогда как все тусклые мелкие везику-

лы просто исчезали. Их можно было выделить при снижении порога, однако в этом случае маски ярких везикул оказывались сильно завышенными по сравнению с размерами видимых глазом структур. Кроме того, маски близко лежащих ярких везикул в этом случае просто сливались. Поэтому оценку числа везикул двух субпопуляций мы проводили в два этапа: сначала выделяли и обсчитывали яркие везикулы, затем из исходного имиджа вычитали полученные в первом случае маски. В результате оставались только мелкие тусклые везикулы, и их маски при более низком пороговом значении корректно отражали их видимый размер.

На рис. 4, а, б показаны результаты мечения одной и той же клетки антителами против EEA1 и Rab5. Используя описанный выше подход, мы выяснили, что в голодающих клетках HeLa яркие везикулы составляют около 30 % от всей популяции EEA1-позитивных везикул (рис. 4, а, в) — 200—300 штук на 1 клетку. Поскольку считается, что ассоциация EEA1 с мембраной эндосомы жестко определяется малой ГТФазой Rab5, мы проанали-

зировали колокализацию этих белков на двух типах везикул. Количественная обработка изображений показала (рис. 4, з), что среди ярких EEA1-структур от 90 до 100 % содержат Rab5 (EEA1+++/Rab5+), тогда как среди тусклых EEA1-везикул Rab5-позитивными (EEA1+/Rab5+) являются лишь около 50 % (рис. 4, з). Яркость (т. е. концентрация антигена) Rab5-позитивных структур также выше на везикулах, содержащих больше EEA1 (ср. рис. 4, а и б), хотя отличие не такое сильное, как в случае EEA1. Таким образом, по отношению к Rab5 можно выделить несколько типов EEA1-везикул — EEA1+/Rab5+, EEA1-/Rab5+ и EEA1+/Rab5-. Rab5-везикулы, не содержащие EEA1, локализованы по всей цитоплазме, но существенная их часть выявляется в непосредственной близости от плазматической мембраны.

Обсуждение

Текущие представления о регуляции эндоцитоза позволяют предполагать, что формируемая *de novo* эндосома рекрутирует все необходимые для ее последующего функционирования регуляторные раннеэндосомные белки непосредственно из цитоплазмы сразу после отсоединения от плазматической мембраны. В качестве ключевого белка, организующего весь процесс, рассматривается малая ГТФаза Rab5, участвующая в биогенезе эндо-лизосомной системы (Hirota et al., 2007; Zeigerer et al., 2012). При этом необходимым условием сборки всех нужных белков является активация Rab5, т. е. ее переход в ГТФ-связанное состояние (Zeigerer et al., 2012). Однако механизмы, регулирующие и запускающие этот переход, пока изучены плохо. В случае стимулированного эндоцитоза, например рецепторопосредованного, можно предполагать, что рецептор за счет активности цитоплазматического домена при попадании в эндосому может рекрутировать белки, переводящие Rab5 в ГТФ-связанное состояние. Действительно, показано, что такой механизм действует в случае лигандзависимой интернализации рецептора ЭФР: формирование комплекса с ЭФР активирует тирозинкиназу рецептора, которая в свою очередь стимулирует работу фактора обмена нуклеотидов RIN1, специфичного для Rab5 (Balaji et al., 2012). Поэтому в клетках, длительное время находящихся в условиях сывороточного голодания для истощения среды культивирования по ростовым факторам и гормонам, подавляется активация соответствующих рецепторов, что должно выражаться в снижении уровня эндоцитоза и уменьшении числа Rab5-положительных эндосом. Соответственно должна падать и ассоциация EEA1 с мембранами. Однако даже в голодающих клетках разных линий выявляется большая популяция мембранно-связанного EEA1, причем ее величина (оцениваемая по интегральной флуоресценции сигнала EEA1 по проекциям максимальной яркости клеток) остается постоянной даже после синхронной стимуляции эндоцитоза рецептора ЭФР высокими концентрациями ростового фактора (Злобина и др., 2013).

Одно из объяснений наличия EEA1-везикул в нестимулированных клетках может заключаться в том, что, хотя в условиях сывороточного голодания истощаются факторы внешней среды, способные стимулировать рецепторопосредованный эндоцитоз, клетки часто способны сами синтезировать и секретировать такие ростовые факторы, как TGF- α , формирующий комплексы с тем же рецептором ЭФР. Однако в наших экспериментах рецеп-

тор-позитивные везикулы в клетках до добавления ЭФР отсутствовали, как и не выявлялся активированный (т. е. фосфорилированный по тирозину) рецептор. Другим постоянным источником ранних эндосом в клетке могут быть везикулы, обслуживающие конститутивный эндоцитоз — рафтопосредуемый и жидкофазный. К сожалению, проверить это предположение трудно, поскольку неизвестны эффективные способы подавления конститутивного эндоцитоза, кроме применения различного рода ингибиторов. Последние же, как правило, имеют невысокую специфичность, к тому же клетки плохо переносят их присутствие в течение нескольких суток — времени, необходимого для сколько-нибудь заметной деградации долгоживущих регуляторных белков (Zeigerer et al., 2012).

Однако опираясь на многократно подтвержденные данные о том, что основная масса эндосом, сформированных в процессе конститутивного эндоцитоза, затем рециклирует, можно провести аналогию с судьбой конститутивно интернализуемого и рециклирующего рецептора трансферрина, даже несмотря на использование им рецепторопосредованного механизма интернализации. Так, при сравнении эндоцитоза рецептора ЭФР и рецептора трансферрина было обнаружено, что если первый на ранних стадиях полностью колокализуется с EEA1-везикулами, то трансферриновый рецептор взаимодействует с ними лишь кратковременно и неэффективно (Leonard et al., 2008). Таким образом, происхождение EEA1-позитивных пузырьков остается несмым, однако можно говорить о существовании постоянного пула EEA1-везикул, избирательно взаимодействующих с пузырьками, содержащими интернализованный груз.

Наиболее известная функция белка EEA1 заключается в закоривании ранних гомотипических эндосом на первой стадии их слияния. Поскольку считается, что ассоциация EEA1 с мембраной строго зависит от наличия активного Rab5, то и EEA1, и Rab5 рассматриваются исследователями как эквивалентные маркеры ранних эндосом. Мы впервые обратили внимание на то, что популяция EEA1-везикул неоднородна и четко разделяется на две субпопуляции: блеклые, как правило мелкие, везикулы, разбросанные по всей цитоплазме, и яркие, как правило более крупные, часто сложной формы, собранные в основном в околядерной области за счет взаимодействия с микротрубочками. Мы подтвердили, что первый тип везикул действительно содержит меньше EEA1, чем второй. Более того, лишь 50 % этих слабо декорированных EEA1-везикул содержат идентифицируемое количество Rab5, считающегося, как говорилось выше, совершенно необходимым для ассоциации EEA1 с мембраной. Строго говоря, чувствительность иммунофлуоресцентного метода не исключает ассоциации с везикулой очень малых количеств Rab5, однако можно предполагать, что такие различия должны каким-то образом регулироваться, т. е. они являются неслучайными.

Ранее на основании анализа поведения EEA1 и рецептора ЭФР в ходе стимулированного ЭФР эндоцитоза мы предположили, что яркие крупные EEA1-положительные везикулы опосредуют слияния везикул, содержащих рецептор, формируя с ними гибридные органеллы (Злобина и др., 2013). Слияние эндосом на этом этапе необходимо для увеличения площади поверхности везикулы и получения «избыточной» мембраны, из которой в процессе созревания эндосом будут формироваться внутренние пузырьки мультивезикулярных поздних эндосом.образова-

ние этих пузырьков сопряжено с перемещением в них мембранных белков (например, сигнальных рецепторов), которые в дальнейшем подвергаются лизосомной деградации. Таким образом, функция ярких околядерных EEA1-везикул заключается в предоставлении платформы для слияний и возможности созревания ранних эндосом в поздние. Функция же блеклых EEA1-везикул, как Rab5-положительных, так и не содержащих этой малой ГТФазы (или содержащих очень малые ее количества), пока неясна и нуждается в дальнейших исследованиях.

Мы обнаружили также существенное число Rab5-положительных везикул, не несущих EEA1. Их природа также неясна, однако можно сделать ряд предположений. Так, существуют данные, свидетельствующие о том, что активированный рецептор ЭФР сразу после интернализации рекрутирует на мембрану эндосомы белок APPL1/2, который участвует в активации генов раннего ответа и перемещается в ядро, причем его уход с эндосомы коррелирует с ассоциацией с эндосомной мембраной EEA1 (Zoncu et al., 2009). Интерес вызывают данные о том, что в ответ на стимуляцию ЭФР в клетке появляются Rab5-положительные везикулы, несущие протонную помпу, которые затем сливаются с рецептор- и EEA1-содержащими эндосомами и обеспечивают закисление эндосомного люмена, что также необходимо для созревания эндосом (Zhang et al., 2011). Если в первом случае мы имеем дело с самым ранним этапом существования эндосомных структур, то во втором, по мнению авторов, источником везикул является транссеть аппарата Гольджи, т. е. биосинтетический путь. Очевидно, что если авторы правы, то использование Rab5 как маркера ранних эндосом оказывается некорректным.

Существенно, что в обоих упоминаемых случаях мы имеем дело с эндоцитозом ЭФР-рецепторных комплексов. Возможно, существование субпопуляции везикул, несущих Rab5, но лишенных EEA1, объясняется тем, что в поляризованных клетках EEA1 работает на первой стадии эндоцитоза только в случае формирования базолатеральных эндоцитозных пузырьков, тогда как при интернализации с апикальной поверхности эту функцию выполняет белок тубуларин (Wilson et al., 2000). Вопрос о том, что важнее для взаимодействия с EEA1-везикулами — место формирования везикулы или интернализуемый груз, остается открытым.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-32256 и 12-04-00838) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Злобина М. В., Харченко М. В., Корнилова Е. С. 2013. Анализ динамики эндоцитоза рецептора ЭФР на основе обработки изображений, полученных с помощью конфокальной световой микроскопии на фиксированных клетках. Цитология. 55 (5): 348—357. (Zlobina M. V., Kharchenko M. V., Kornilova E. S. 2013. Analysis of EGF receptor endocytosis dynamics based on semi-quantitative processing of confocal immunofluorescent images of fixed cells. Tsitologiya. 55 (5): 348—357.)
- Balaji K., Mooser C., Janson C. M., Bliss J. M., Hojjat H., Colicelli J. 2012. RIN1 orchestrates the activation of RAB5 GTPases and ABL tyrosine kinases to determine the fate of EGFR. J. Cell Sci. 125: 5887—5896.
- Dumas J. J., Merithew E., Sudharshan E., Rajamani D., Hayes S., Lawe D., Corvera S., Lambright D. G. 2001. Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. Mol. Cell. 8: 947—958.
- Hirota Y., Kuronita T., Fujita H., Tanaka Y. 2007. A role for Rab5 activity in biogenesis of endosomal and lysosomal compartments. Biochem. Biophys. Res. Commun. 364: 40—47.
- Lawe D. C., Chawla A., Merithew E., Dumas J., Carrington W., Fogarty K., Lifshitz L., Tuft R., Lambright D., Corvera S. 2002. Sequential roles for phosphatidylinositol 3-Phosphate and Rab5 in tethering of early endosomes via their interaction with EEA1. J. Biol. Chem. 277: 8611—8617.
- Leonard D., Hayakawa A., Lawe D., Lambright D., Belive K. D., Standley C., Lifshitz L. M., Fogarty K. E., Corvera S. 2008. Sorting of EGF and transferrin at the plasma membrane and by cargo-specific signaling to EEA1-enriched endosomes. J. Cell Sci. 121: 3445—3458.
- Merithew E., Stone C., Eathiraj S., Lambright D. G. 2003. Determinants of Rab5 interaction with the N terminus of early endosome antigen 1. J. Biol. Chem. 278: 8494—8500.
- Rubino M., Miaczynska M., Lippe R., Zerial M. 2000. Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. J. Biol. Chem. 275: 3745—3748.
- Simonsen A., Lippe R., Christoforidis S., Gaullier J. M., Brech A., Callaghan J., Toh B. H., Murphy C., Zerial M., Stenmark H. 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. Nature. 394: 494—498.
- Wilson J. M., De Hoop M., Zorzi N., Toh B. H., Dotti C. G., Parton R. G. 2000. EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. Mol. Biol. Cell. 11: 2657—2671.
- Zeigerer A., Gilleron J., Bogorad R., Marsico G., Nonaka H., Seifert S., Epstein-Barash H., Kuchimanchi S., Peng C. G., Ruda V. M., Del Conte-Zerial P., Hengstler J. G., Kalaidzidis Y., Kotliansky V., Zerial M. 2012. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system *in vivo*. Nature. 485: 465—470.
- Zhang C., Li A., Zhang X., Xiao H. 2011. A novel TIP30 protein complex regulates EGF receptor signaling and endocytic degradation. J. Biol. Chem. 286: 9373—9381.
- Zoncu R., Perera R. M., Balkin D. M., Pirruccello M., Toomre D., De Camilli P. 2009. A phosphoinositide switch controls the maturation and signaling properties of APPL endosomes. Cell. 136: 1110—1121.

Поступила 1 VII 2014

ANALYSIS OF VESICLE SUBPOPULATIONS CARRYING EARLY ENDOSOMAL
AUTOANTIGENE EEA1*M. V. Zlobina,¹ R. S. Kamentseva,² E. S. Kornilova,^{1,2} M. V. Kharchenko¹, **¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² St. Petersburg State University;
* e-mail: mariannakharchenko@gmail.com

Confocal immunofluorescent analysis of interphase HeLa cells has demonstrated that involved in regulation of homotypic fusions early endosomal autoantigene EEA1 is associated with vesicles represented by two populations differing in apparent size, localization and the level of bound EEA1. Before analysis the cells have been preincubated in serum-deprived medium for 12 h to minimize ligand-dependent endocytosis of serum growth factors. The first subpopulation is mainly represented by large vesicles strongly decorated with EEA1. These vesicles are localized presumably in juxtannuclear region. Microtubule depolymerization experiments have shown that this localization is maintained by tubulin cytoskeleton. The second subpopulation consists of numerous small vesicles slightly stained by EEA1 antibody and localized more peripherally. Double indirect immunofluorescent analysis of fixed cell images has revealed that juxtannuclear vesicles enriched in EEA1 are fully colocalized with key protein of early endosomes small GTPase Rab5, whereas about 50 % of slightly decorated peripheral vesicles are Rab5-negative. It is found that the number of Rab5-positive vesicles per cell is higher than that of EEA1-positive vesicles. Thus, in serum-deprived HeLa cells with low endocytic activity two subpopulations of EEA1-vesicles are revealed: the first one carries the both EEA1 at high level and Rab5 (EEA1⁺⁺⁺/Rab5⁺), and the second subpopulation consists of weakly decorated EEA1-vesicles, that can be both Rab5-positive and -negative (EEA1⁺/Rab5⁻ и EEA1⁺/Rab5⁺). Besides, there are vesicles carrying Rab5 only (EEA1⁻/Rab5⁺). The data obtained favor different functional role of all these subpopulations, which are associated with proteins widely considered as equivalent markers of early endosomes.

Key words: early endosomes, EEA1, Rab5, confocal immunofluorescence, HeLa cells.
