

ВЕЗИКУЛЫ, НЕСУЩИЕ ЕЕА1, НЕ ЯВЛЯЮТСЯ АУТОФАГОСОМАМИ В КЛЕТКАХ HeLa, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В УСЛОВИЯХ СЫВОРОТОЧНОГО ГОЛОДАНИЯ

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

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и ² Биологический факультет
С.-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034;
* электронный адрес: vera77867@mail.ru

В соответствии с современной моделью, стимуляция эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов приводит к рекрутированию на ранние эндосомы цитоплазматического за jakiрающего белка ЕЕА1, необходимого для их дальнейшего слияния. Однако ЕЕА1-позитивные везикулы выявляются и в не стимулированных ростовым фактором клетках, инкубировавшихся в условиях лишения сыворотки. Известно также, что длительное сывороточное голодание индуцирует в клетках образование аутофагосом, в котором могут принимать участие и компартменты эндоцитозного пути. Чтобы проверить, не являются ли ЕЕА1-везикулы, выявляемые в клетках в условиях сывороточного голодания, аутофагосомами, мы исследовали динамику изменения количества и средних размеров ЕЕА1- и LC3-положительных везикул, а также оценили колокализацию белка ЕЕА1 с маркером аутофагосом LC3 в клетках HeLa, культивируемых в течение 12—36 ч в среде с дефицитом компонентов сыворотки. Оказалось, что количество аутофагосом в среднем гораздо меньше числа ЕЕА1-везикул на клетку. Показано, что индукция голодания приводила к увеличению лишь среднего размера аутофагосом, в то время как количество и средний размер ЕЕА1-везикул не изменялись. Колокализация белков ЕЕА1 и LC3 в клетках, культивируемых в бессывороточных условиях в течение 12—18 ч, была очень низкой и незначительно возрасала к 36 ч. Блокирование биосинтетического пути с помощью брефельдина А, вызывающего разборку аппарата Гольджи, приводило к уменьшению числа и увеличению среднего размера ЕЕА1-везикул, а также увеличению среднего размера LC3-везикул и усилению их колокализации с ЕЕА1. Таким образом, большинство ЕЕА1-везикул, присутствующих в клетках, культивируемых в условиях сывороточного голодания, не являются аутофагосомами. Более выраженный эффект брефельдина А указывает на то, что он, по-видимому, является более сильным фактором стресса по сравнению с лишением сыворотки, а также позволяет предполагать существенную роль биосинтетического пути в биогенезе ЕЕА1-везикул.

Ключевые слова: ЕЕА1, LC3, ранние эндосомы, сывороточное голодание, аутофагосомы, брефельдин А, клетки HeLa.

Принятые сокращения: ЭПС — эндоплазматическая сеть, ЭС — эмбриональная сыворотка, ЭФР — эпидермальный фактор роста, ЕЕА1 — early endosomal autoantigen1, LC3 — microtubule-associated protein 1 light chain 3, PIP3 — фосфатидилинозитол-3-фосфат.

Известно, что белок ЕЕА1, работающий на первой стадии слияния ранних эндосом (Christofordis et al., 1999), не имеет трансмембранных доменов и связывается с мембранный эндосомы за счет взаимодействия с малой ГТФазой Rab5 и липидом фосфатидилинозитол-3-фосфатом (PIP3) (Patki et al., 1998; Simonsen et al., 1998). Согласно современным представлениям, интернализация лиганд-рецепторного комплекса в клетку в процессе эндоцитоза приводит к рекрутированию из цитоплазмы на поверхность ранней эндосомы малой ГТФазы Rab5 и ее активации. Она в свою очередь привлекает фосфатидилинозитол-3-киназу Vps34, которая создает на мемbrane ранней эндосомы участки, обогащенные PIP3. Таким образом, считается, что в отсутствие в клетках эндоцитоза ЕЕА1 локализован в цитоплазме, в то время как его стимуляция приводит к рекрутированию белка на поверхность ранних эндосом (Simonsen et al., 1998; Liu et al., 2007).

Однако мы заметили, что в клетках и до стимуляции эндоцитоза эпидермальным фактором роста (ЭФР) выявляется популяция везикул, несущих ЕЕА1 (ЕЕА1-везикулы) (Злобина и др., 2013, 2014), что согласуется с наблюдениями других авторов (Zoncu et al., 2009; Verma et al., 2015).

Можно предполагать, что ЕЕА1 рекрутируется на эндосомы, которые формируются при интернализации факторов роста, содержащихся в сыворотке. Эти компоненты сыворотки способны также влиять на сигнальные пути, активируемые фактором роста, например ЭФР. Для минимизации побочных эффектов компонентов сыворотки при исследовании сигнальных путей и связанных с ними процессов, запускаемых определенным стимулом, например ЭФР, широко применяется уже давно разработанный протокол. Согласно этому протоколу культивируемые клетки за 6—24 ч до добавления стимула переводят в среду со значительно сниженным содержанием сыворотки

(0.1—0.25 % вместо общепринятых 10) (Lee et al., 2006; Siddiqui et al., 2007). Мы переводили клетки на среду, содержащую 0.25 % сыворотки, за 12 ч до стимуляции эндоцитоза рецептора ЭФР (Злобина и др., 2014). Оказалось, что и в этом случае белок EEA1 локализовался преимущественно не в цитоплазме, а на поверхности везикул, различающихся по размерам и количеству ассоциированного с ними EEA1 (Злобина и др., 2013, 2014).

Подобное поведение можно объяснить целым рядом причин. Так, учитывая длительное сывороточное голодание клеток, можно предполагать, что в них развивается процесс аутофагии.

Процесс аутофагии инициируется при различных стрессовых воздействиях, в том числе в условиях недостатка питательных веществ, получаемых клеткой извне. Недостаток питательных веществ может быть вызван прежде всего дефицитом компонентов сыворотки в среде для культивирования.

Процесс образования аутофагосом подробно описан в ряде работ (Simonsen et al., 2009; Alers et al., 2012; Пупышев и др., 2014). Известно, что процесс аутофагии регулируется эволюционно консервативной группой белков Atg. Общепринятым маркером аутофагосом является мембранный-связанная форма белка LC3 — LC3-II. LC3-II появляется на мемbrane аутофагосомы в ходе процесса, называемого LC3-конверсией. Так, в процессе формирования изолированной мембраны аутофагосомы (фагофора) цитоплазматический белок LC3 взаимодействует с Atg4, что приводит к расщеплению его C-концевой части с образованием LC3-I. Затем к LC3-I присоединяется фосфатидилэтаноламин, в результате чего LC3-II встраивается в мембрану формирующейся аутофагосомы (Lamb et al., 2013). На конечном этапе формирования аутофагосомы белки Atg диссоциируют с мембраны, но LC3 остается встроенным в нее. Мембрана фагофора смыкается, и LC3 оказываются во внутреннем пространстве аутофагосомы. Постоянная мембранныя локализация LC3 позволяет использовать этот белок в качестве надежного маркера аутофагосом (Fader et al., 2009).

Точно неизвестно, мембранны каких органелл могут являться донором для образования аутофагосом. Источником аутофагосом принято считать эндоплазматическую сеть (ЭПС), но определенный вклад в формирование аутофагосом могут вносить также аппарат Гольджи, плазматическая мембрана и, что наиболее интересно в нашем случае, эндосомы (Lamb et al., 2013). Известно, что сформировавшаяся аутофагосома может претерпевать процесс созревания путем взаимодействия, в частности, с компонентами эндоцитозного пути с образованием так называемых амфисом. Так, было показано, что амфисомы могут быть обогащены EEA1, а также маркерами поздних эндосом (Berg et al., 1998; Razi et al., 2009). В настоящее время считается, что пути аутофагии и эндоцитоза тесно взаимодействуют в клетке.

Таким образом, основная цель данного исследования заключалась в том, чтобы выяснить, являются ли EEA1-везикулы, наблюдавшиеся нами в клетках, культивируемых продолжительное время в условиях минимальной эндоцитозной активности, аутофагосомами или же имеют иное происхождение.

Материал и методика

Культивирование и обработка клеток ингибитором. Клетки линии HeLa были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭС), при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. В экспериментах по иммунофлуоресценции клетки культивировали до достижения ими плотности 50—70 % монослоя на поверхности покровных стекол размером 10×10 мм в чашках Петри. Для инициации сывороточного голодания клетки переводили на среду, содержащую 0.25 % ЭС, на определенное время.

В ряде экспериментов клетки обрабатывали ингибитором брефельдином А в концентрации 10 мг/мл (ICN Biomedicals, США). Перед добавлением ингибитора клетки культивировали в течение 12 ч в условиях сывороточного голодания или в присутствии 10 % ЭС. Затем к ним добавляли брефельдин А, растворенный в среде, содержащий соответствующее количество сыворотки, и культивировали клетки в присутствии ингибитора в течение 24 ч.

Иммунофлюресцентное окрашивание клеток. Клетки фиксировали 4%-ным раствором формальдегида, приготовленным на PBS, при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем стекла с клетками промывали PBS 5 раз по 5 мин, после чего клетки пермеабилизовывали 0.5%-ным раствором Тритона X-100 в PBS (15 мин). Неспецифическое окрашивание блокировали инкубацией клеток в течение 30 мин при комнатной температуре в растворе PBS, содержащем 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). Часть препаратов инкубировали с первыми антителами к LC3 в течение ночи при 4 °C, после чего докрашивали клетки 1 ч при комнатной температуре антителами к EEA1. Другую часть препаратов инкубировали одновременно с антителами против рецептора ЭФР и белка p230 в течение ночи при 4 °C. Далее клетки промывали 5 раз по 5 мин раствором PBS, содержащим 0.1 % Tween 20 (BioRad, США), после чего их инкубировали с раствором соответствующих вторичных антител GAR-Alexa Fluor 568 или GAM-Alexa Fluor 488 в течение 15 мин при 37 °C. Препараты заключали в глицериновую среду, содержащую 0.2 M DABCO (1,4 диазабицикло[2.2.2]октан) (Sigma-Aldrich, США).

Антитела. В работе использовали первичные поликлональные кроличьи антитела, узнающие белок LC3 (его цитозольную и ассоциированную с мембранами форму), в разведении 1 : 300 (MBL, Япония); кроличьи антитела, узнающие экстраклеточный домен рецептора ЭФР человека (Cell Signaling, США), в разведении 1 : 100; моноклональные мышиные антитела против белка EEA1 (1 : 200, Transduction Lab, США), а также моноклональные антитела против белка p230 (1 : 150, Transduction Lab, США). В качестве вторичных антител использовали GAR-Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, США) и GAM-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, США) в разведении 1 : 200. Антитела разводили в растворе PBS, содержащем 1 % БСА.

Конфокальная микроскопия. Распределение флуоресцентно меченных белков в клетке изучали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия), используя масляный объектив с увеличением 40×. Флуоресценцию GAM-Alexa Fluor 488 возбуждали аргоновым лазером (488 нм, диапазон детекции 500—560 нм),

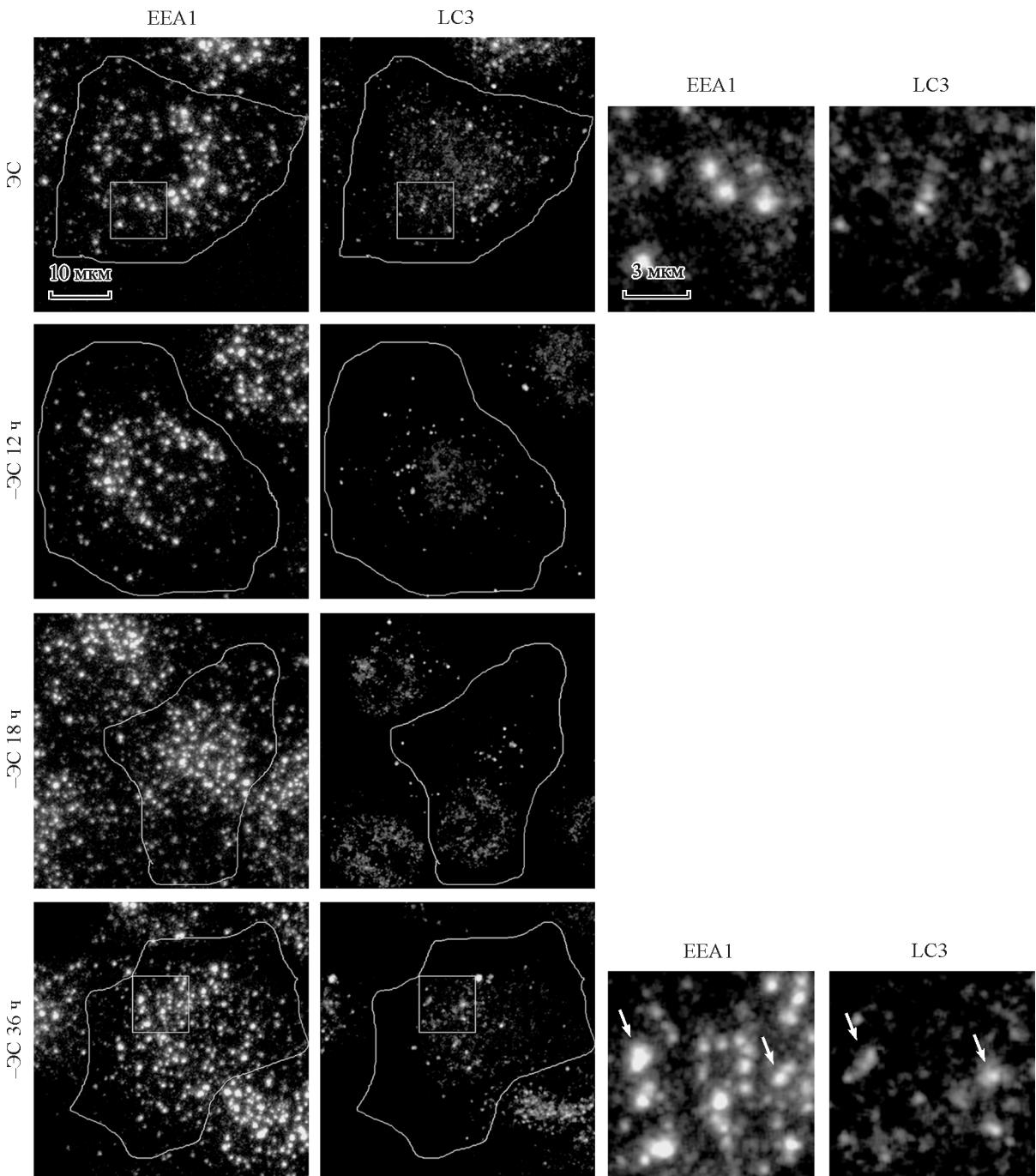


Рис. 1. Везикулы, несущие EEA1 и LC3, в клетках HeLa после стимуляции сывороточного голодания. Иммунофлуоресценция. Конфокальная микроскопия.

Клетки культивировали в присутствии 10 % эмбриональной сыворотки (ЭС, контроль), в ее отсутствие ($-ЭС$) в течение 12, 18 и 36 ч. На снимках слева белой линией выделены контуры клеток. Участки клеток, заключенные в квадрат, представлены в большем увеличении в правой части рисунка. Стрелками отмечены структуры, содержащие одновременно сигналы EEA1 и LC3.

GAR-Alexa Fluor 568 — Не-Не-лазером (543 нм, диапазон детекции 580—660 нм). Флуоресценцию на разных длинах волн сканировали раздельно с помощью программы Leica Confocal Software. Снимали 3—5 полей зрения в режиме XYZ, получая серию оптических срезов клеток с шагом по оси Z 0.5 мкм. Для анализа выбирали клетки с максимальной степенью распластывания, на краю или вне островков монослоя. Представленные изображения были характерны для большинства клеток в данных условиях.

Анализ и обработка изображений. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ 1.48v (National Institute of Health, США). Оценку числа везикул на 1 клетку и вычисление их размеров проводили на основе максимальных проекций оптических срезов по следующему алгоритму. На анализируемом изображении устанавливали соответствие между размером изображения в пикселях и его линейным размером с использованием функции «Set Scale». Затем выставляли пороговое значение интенсивности исхода из максималь-

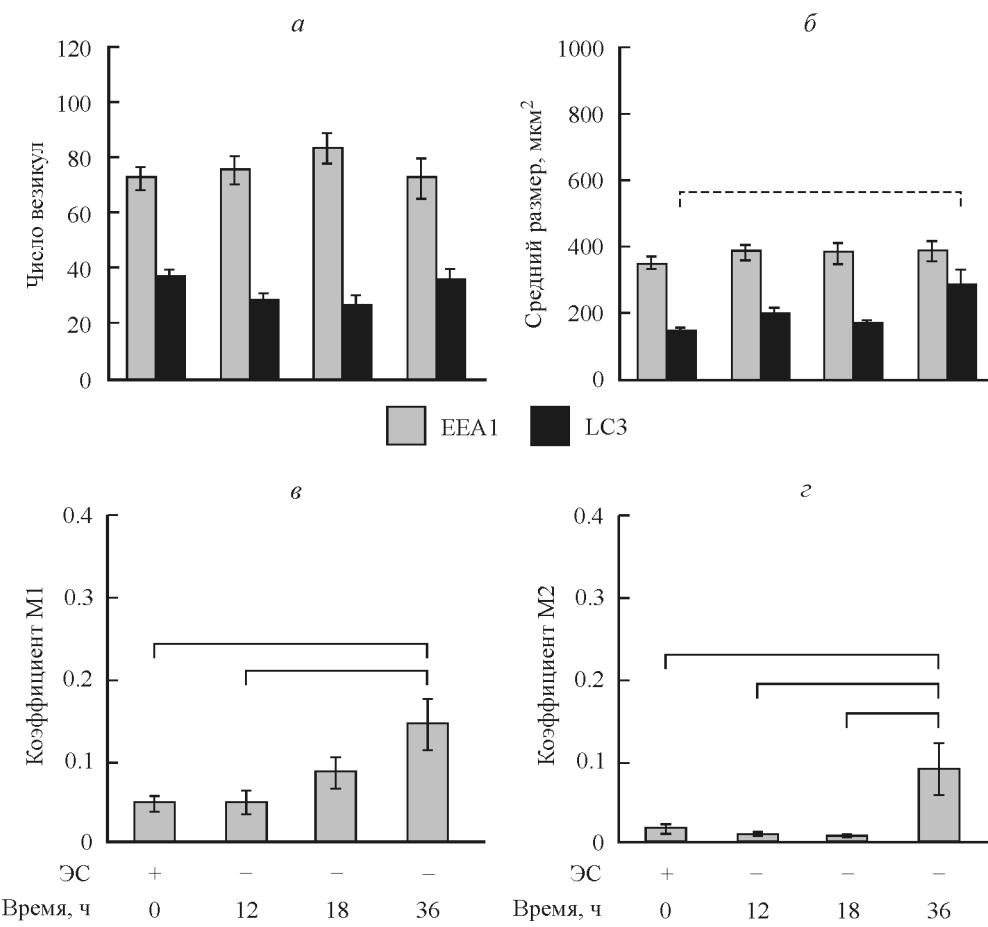


Рис. 2. Влияние сывороточного голодания на число (а), средний размер (б) и степень колокализации EEA1- и LC3-везикул (в, г) в клетках HeLa.

Число (а) и средний размер (б) везикул, несущих EEA1 (серые столбцы) и LC3 (черные столбцы), оценивали в клетках HeLa, культивируемых в течение 12, 18 и 36 ч в отсутствие ЭС. Штриховой линией (б) показано достоверное различие ($P < 0.05$) между параметрами LC3-везикул. Колокализацию LC3 с EEA1 (в, г) оценивали с помощью расчета коэффициентов Мандерса M1 и M2 соответственно (см. раздел «Материал и методика»). Непрерывной линией указаны достоверные отличия ($P < 0.05$).

ного соответствия между исходным и бинаризованным изображениями. Следующим шагом выделяли интересующую нас область изображения, соответствующую одной клетке, и проводили анализ частиц с помощью функции «Analyze Particles». В расчет брали частицы, площадь которых была не меньше 20 000 нм².

Для оценки колокализации белков использовали плагин JACoP для программы ImageJ (Bolte, Cordelieres, 2006). Колокализацию оценивали с помощью коэффициентов Мандерса M1 и M2. Коэффициент M1 отражает суммарную интенсивность сигнала пикселей первого канала, содержащих второй сигнал, по отношению к суммарной интенсивности сигналов всех пикселей первого канала. Коэффициент M2 отражает суммарную интенсивность сигнала пикселей второго канала, содержащих первый канал, по отношению к суммарной интенсивности сигналов всех пикселей второго канала (Manders et al., 1993). В нашем случае сигналами первого канала являлась иммунофлуоресценция вторичных антител GAR-Alexa Fluor 568, специфичных для антител против белка LC3 и рецептора ЭФР; сигналами второго канала — иммунофлуоресценция вторичных антител GAM-Alexa Fluor 488, специфичных для антител к белкам EEA1 и p230.

Статистическая обработка. Для каждого варианта (временной точки) эксперимента анализировали 15—30 клеток. Каждый эксперимент проводили не менее трех раз. Анализ данных производили в программе SPSS statistics 19 (IBM, США), используя U-критерий Манна—Уитни. Результаты считали достоверными при $P < 0.05$. Данные представлены средними и их ошибками.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы проверить, являются ли EEA1-везикулы, выявляемые в клетках при длительном сывороточном голодании, аутофагосомами, мы проанализировали колокализацию везикул, несущих EEA1 и LC3, их количество и средний размер в клетках, культивируемых в среде с пониженным содержанием сыворотки на протяжении 12—36 ч.

На рис. 1 представлены проекции максимальной яркости клеток, флуоресцентно меченых антителами против EEA1 и LC3. Мы обнаружили, что в контрольных клетках, культивируемых в среде с оптимальным содержанием сыворотки (10 %), выявляется около 30—40 LC3-положительных везикул (рис. 2, а). Примерно такое

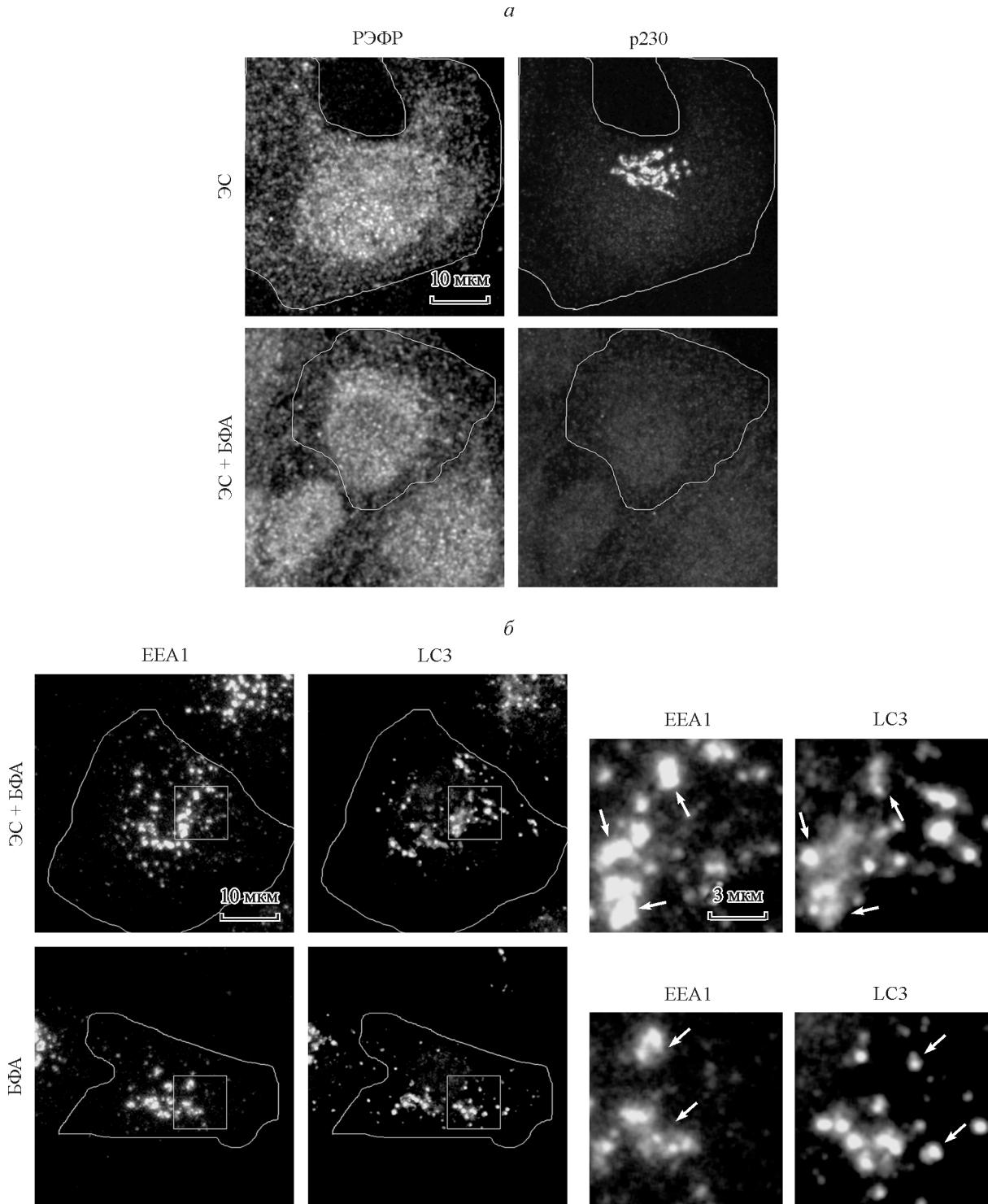


Рис. 3. Влияние брефельдина А (БФА) на число и морфологию EEA1- и LC3-везикул в клетках HeLa. Иммунофлуоресценция. Конфокальная микроскопия.

a — культивирование в присутствии только 10 % ЭС, а также в присутствии ЭС и 10 мг/мл брефельдина А (БФА) в течение 24 ч; иммунофлуоресцентное мечение рецептора ЭФР (РЭФР) и белка p230 (маркера транссети аппарата Гольджи). *б* — культивирование в присутствии БФА (24 ч на фоне голодания) или в среде, содержащей 10 % ЭС и БФА (ЭС + БФА). На снимках слева белой линией выделены контуры клеток. Участки клеток, заключенные в квадрат, представлены в большем увеличении в правой части рисунка. Стрелками показаны структуры, содержащие одновременно сигналы EEA1 и LC3.

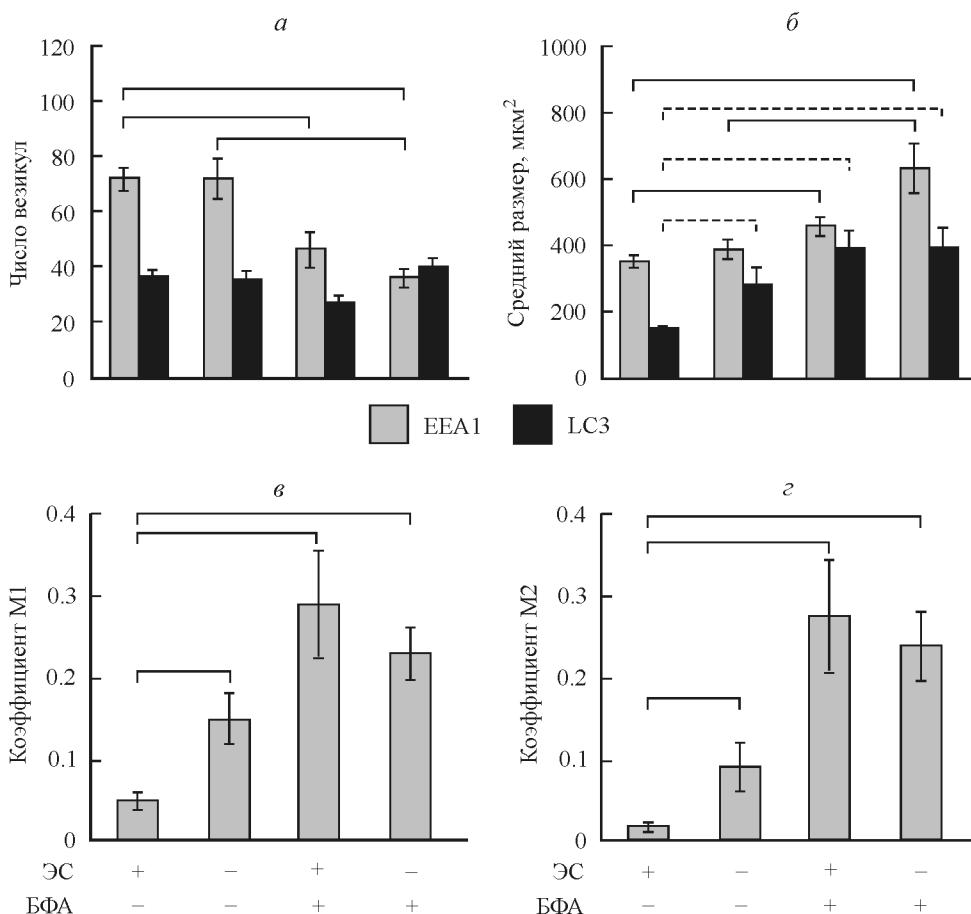


Рис. 4. Влияние брефельдина А (БФА) на число (а), средний размер (б) и степень колокализации EEA1- и LC3-вакуолей (в, г) в клетках HeLa.

Вакуоли, положительные по EEA1 (серые столбцы) и LC3 (черные столбцы), оценивали в клетках, культивируемых в присутствии брефельдина А в течение 24 ч в среде, содержащей 10 % ЭС или лишенной ее. Штриховой линией (б) показаны достоверные различия ($P < 0.05$) между параметрами LC3-вакуолей, непрерывной линией (а, б) — между параметрами EEA1-вакуолей. Колокализацию LC3 с EEA1 (в, г) оценивали с помощью расчета коэффициентов Мандерса M1 и M2 соответственно (см. раздел «Материал и методика»); непрерывной линией (в, г) указаны достоверные различия ($P < 0.05$).

же количество вакуолей выявлялось и в клетках, голодающих на протяжении 12—36 ч (рис. 2, а). Однако средний размер LC3-вакуолей при увеличении продолжительности сывороточного голодания возрастал. Так, при 36-часовом голодании их размер был в примерно 1.5 раза больше, чем у контрольных ($P = 0.001$; рис. 2, б). Напротив, EEA1-вакуоли не претерпевали никаких изменений: их количество и размер оставались такими же, как в контроле, даже в клетках, подвергнутых сывороточному голоданию в течение 36 ч (рис. 2, а, б).

Колокализацию EEA1 с LC3-вакуолями исследовали методом двойной непрямой иммунофлуоресценции, а ее степень оценивали с помощью коэффициентов Мандерса M1 и M2 (Manders et al., 1993), как описано в разделе «Материал и методика». Коэффициент M1 выражает отношение суммарной интенсивности сигнала первого канала (LC3), содержащего и сигнал второго канала (EEA1), к суммарной интенсивности всего сигнала первого канала. Аналогично M1 коэффициент M2 выражает отношение интенсивностей сигнала второго канала, содержащего первый, по отношению к суммарной интенсивности сигнала второго канала. Оказалось, что значение коэффициентов колокализации M1 и M2 в контрольных клетках было менее 0.05 и не изменялось после 12 и 18 ч

сывороточного голодания по сравнению с контролем, не превышая значения 0.1 (рис. 2, в, г). Такая величина коэффициентов M1 и M2 фактически может быть интерпретирована как отсутствие колокализации двух сигналов (Manders et al., 1993). Значения коэффициентов Мандерса M1 и M2 возрастили по сравнению с контролем только в клетках, голодающих в течение 36 ч ($P = 0.06$ и $P = 0.011$ соответственно; рис. 2, в, г). Однако эти значения также оставались низкими (не более 0.2). В клетках, подвергавшихся голоданию в течение 36 ч, EEA1- и LC3-вакуоли располагались преимущественно в околяядерной области близко друг к другу (рис. 1). На изображениях участков околяядерной области этих клеток видно, что только часть вакуолей содержала оба сигнала (рис. 1). Для сравнения на рис. 1 в большем увеличении представлены участки околяядерной области контрольных клеток, в которых не обнаруживалось вакуолей, содержащие одновременно EEA1- и LC3-белки. Поскольку колокализация EEA1- и LC3-белков в клетках, культивируемых в бессывороточных условиях в течение 12 и 18 ч, не возрастала по сравнению с контролем, участки этих клеток не представлены.

Эти результаты согласуются с сообщениями о том, что в клетках, культивируемых в среде с оптимальным

содержанием сыворотки, белки EEA1 и LC3 колокализованы крайне незначительно (Schmid et al., 2007), а при индукции сывороточного голодания их колокализация несколько возрастает (Razi et al., 2009). Таким образом, даже в клетках, подвергнутых голоданию в течение 12–18 ч, подавляющее большинство EEA1-везикул, по-видимому, не имеет отношения к аутофагосомам.

Существование в клетке длительно живущих везикул может свидетельствовать о том, что они представляют собой не постоянно возникающие и исчезающие транспортные пузырьки, а являются «предсуществующими» компартментом клетки, чей биогенез связан с биосинтетическим транспортным путем. Для проверки этого предположения мы культивировали клетки в течение длительного времени (24 ч) в присутствии ингибитора брефельдина А, вызывающего слияние аппарата Гольджи с ЭПС и таким образом блокирующего биосинтетический путь. Действительно, в клетках, подвергнутых действию брефельдина А, маркер транссети аппарата Гольджи белок p230 не выявляется (рис. 3, а). Как видно на рис. 3, б, длительное воздействие вызывает значительные изменения морфологии EEA1-везикул. Так, в клетках, обработанных ингибитором, количество EEA1-везикул уменьшается в 1.5–2 раза вне зависимости от того, добавляли ингибитор в среду с оптимальным или пониженным содержанием сыворотки ($P = 1 \cdot 10^{-4}$ и $P = 0.008$ соответственно; рис. 4, а). При этом средний размер EEA1-везикул возрастал по сравнению с клетками, не подвергнутыми действию брефельдина А (рис. 4, б). Можно предполагать, что в таких клетках процесс рецепторопосредованного эндоцитоза может быть нарушен. Косвенно это предположение подтверждается данными из литературы. Так, подавление экспрессии субъединиц белка окаймления COPI,участвующего в транспорте между цистернами аппарата Гольджи и из него в ЭПС, приводило к фрагментации аппарата Гольджи и вместе с тем к значительному снижению интернализации ЭФР-рецепторного комплекса (Razi et al., 2009).

Мы также обнаружили, что брефельдин А в значительной степени влиял и на аутофагосомы, поскольку действие ингибитора приводило к увеличению средних размеров LC3-везикул (рис. 4, б). Подобное влияние брефельдина А на формирование аутофагосом хорошо известно (Kuroku et al., 2007). Так, оказывая действие на ЭПС, которая считается основным источником предшественника аутофагосомы — фагофора (Fader et al., 2009), брефельдин А наряду с клеточным голоданием является мощным фактором стресса, приводящим к рекрутированию LC3 на поверхность фагофора (LC3-конверсии) (Kuroku et al., 2007).

Действительно, наши данные подтверждают это заключение. Интересно, что действие брефельдина А приводило к гораздо более существенному увеличению колокализации EEA1- и LC3-везикул, чем даже 36-часовое голодание (рис. 4, в, г). Этот результат свидетельствует о том, что EEA1 может участвовать в процессе созревания аутофагосом при действии сильного стресса, каковым является действие брефельдина А.

На основании полученных данных можно заключить, что сывороточное голодание на протяжении 12–36 ч не вызывает видимых изменений ни морфологии, ни количества EEA1-везикул, а также существенного возрастания их колокализации с маркером аутофагосом LC3. Это свидетельствует о том, что обнаруженнное нами ранее наличие EEA1-везикул в клетках, культивируемых в услов-

иях минимальной эндоцитозной активности, не связано с индукцией в них процесса аутофагии. Блокирование биосинтетического пути, напротив, значительно влияет на популяцию EEA1-везикул, уменьшая их количество и увеличивая их размеры. Это может быть связано как с большой ролью биосинтетического пути в биогенезе EEA1-везикул, так и с реакцией на стресс.

Авторы глубоко благодарны В. А. Пospelovу (Институт цитологии РАН) за предоставление антител к белку LC3.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (проект 01201354836) и ФАНО России.

Исследование проведено с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ.

Список литературы

Zlobina M. V., Kamentseva R. S., Kornilova E. S., Xarchenko M. V. 2014. Анализ субпопуляций везикул, несущих аутоантigenы ранних эндосом EEA1. Цитология. 56 (10) : 741—748. (Zlobina M. V., Kamentseva R. S., Kornilova E. S., Xarchenko M. V. 2014. Analysis of vesicle subpopulations carrying early endosomal autoantigene EEA1. Tsitologiya. 56 (10) : 741—748.)

Zlobina M. V., Xarchenko M. V., Kornilova E. S. 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 semiquantitative processing of confocal immunofluorescent images of fixed cells. Cell Tissue. Biol. (Tsitologiya). 7 (4) : 382—391.)

Pupysh A. B. 2014. Репаративная аутофагия и аутофаговая гибель клетки. Функциональные и регуляторные аспекты. Цитология. 56 (3) : 179—196. (Pupysh A. B. 2014. Reparative autophagy and autophagy death of cells. Functional and regulatory aspects. Tsitologiya. 56 (3) : 179—196.)

Alers S., Löffler A. S., Wesselborg S., Stork B. 2012. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. Mol. Cell. Biol. 32 : 2—11.

Berg T. O., Fengsrød M., Stromhaug P. E., Berg T., Seglen P. O. 1998. Isolation and characterization of rat liver amphiosomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. J. Biol. Chem. 273 : 21 883—21 892.

Bolte S., Cordelieres F. P. 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. J. Microscopy. 224 : 213—232.

Callaghan J., Simonsen A., Gaullier J., Toh B., Stenmark H. 1999. The endosome fusion regulator early-endosomal autoantigen 1 (EEA1) is a dimer. Biochem. J. 338 : 539—543.

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.

Fader C. M., Colombo M. I. 2009. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. Cell Death Differ. 16 : 70—78.

Kuroku Y., Fujita E., Tanida I., Ueno T., Isoai A., Kumagai H., Momoi T. 2007. ER stress (PERK/eIF2α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. Cell Death Differ. 14 : 230—239.

Lamb C. A., Yoshimori T., Tooze S. A. 2013. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 14 : 759—774.

Lee C. S., Kim I. S., Park J. B., Lee M. N., Lee H. Y., Suh P. G., Ryu S. H. 2006. The phox homology domain of phospholipase D

- activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nature Cell Biol.* 8 : 477—484.
- Liu P., Bartz R., Zehmer J. K., Ying Y. S., Zhu M., Serrero G., Anderson R. G. 2007.* Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim. biophys. acta.* 1773 : 784—793.
- Manders E. M. M., Verbeek F. J., Aten J. A. 1993.* Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J. Microscopy.* 169 : 375—382.
- Patki V., Lawe D. C., Corvera S., Virbasius J. V., Chawla A. 1998.* A functional PtdIns(3)P-binding motif. *Nature.* 394 : 433—434.
- Razi M., Chan E. Y., Tooze S. A. 2009.* Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. *J. Cell Biol.* 185 : 305—321.
- Schmid D., Pypaert M., Münz C. 2007.* Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity.* 26 : 79—92.
- Siddiqui S. S., Siddiqui Z. K., Uddin S., Minshall R. D., Malik A. B. 2007.* p38 MAPK activation coupled to endocytosis is a determinant of endothelial monolayer integrity. *Amyk. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292 : L114—L124.
- 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.
- Simonsen A., Tooze S. A. 2009.* Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* 186 : 773—782.
- Verma N., Keinan O., Selitrennik M., Karn T., Filipits M., Lev S. 2015.* PYK2 sustains endosomal-derived receptor signalling and enhances epithelial-to-mesenchymal transition. *Nature Commun.* 6. DOI :10.1038/ncomms7064.
- 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 6 XI 2015

EEA1 CARRYING VESICLES ARE NOT AUTOPHAGOSOMES IN SERUM-DEPRIVED HeLa CELLS

V. V. Kosheverova,^{1,*} R. S. Kamentseva,^{1,2} M. V. Kharchenko,¹ E. S. Kornilova^{1,2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,
 and ² Faculty of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034;
 e-mail: vera77867@mail.ru

According to current model, stimulation of EGF-receptor endocytosis results in recruitment onto early endosomes cytosolic tether protein EEA1 necessary for their further fusions. However, EEA1-positive vesicles are found in the cells not treated with growth factor, that were incubated in serum-free conditions. It is known also that prolonged serum deprivation induces autophagosomes formation, the process possibly involving endocytic compartments. To check whether EEA1-positive vesicles seen in serum-deprived HeLa cells are autophagosomes, we here evaluated colocalization of EEA1 and autophagosome marker LC3 and studied dynamics of the EEA1- and LC3-vesicles' number and size during 12—36 h cell cultivation in serum-free medium. It was found that the number of autophagosomes per cell is significantly less than the number of EEA1-vesicles. We show that serum starvation results in increase of only mean autophagosomes' size, while the number and size of EEA1-vesicles did not change. Colocalization of EEA1 and LC3 in serum-free cells was very low during first 12—18 h of starvation and increased insignificantly only by 36 h. Biosynthetic pathway inhibition by Golgi apparatus disruption by brefeldin A, decreased the number and increased the size of EEA1-vesicles. LC3-vesicles also demonstrated an increase of mean size and growth of colocalization with EEA1. Thus, we conclude that the majority of EEA1-vesicles in serum-starved cells are not autophagosomes. More pronounced effect of brefeldin A indicates that blockade of biosynthetic pathway is more strong stress factor comparing to serum deprivation in HeLa cells. This also suggests that this pathway is involved in EEA1-vesicles biogenesis.

Key words: EEA1, LC3, early endosomes, serum starvation, autophagosomes, brefeldin A, HeLa cells.