

*На правах рукописи*

КОНДРАТОВ  
КИРИЛЛ АЛЕКСАНДРОВИЧ

УБИКВИТИНИРОВАНИЕ РЕЦЕПТОРА ЭФР В ХОДЕ  
ЭНДОЦИТОЗА:  
РОЛЬ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ C-CVL И  
C-ТЕРМИНАЛЬНОГО ДОМЕНА РЕЦЕПТОРА ЭФР

03.00.25

гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

---

Санкт-Петербург  
2009

Работа выполнена в Учреждении Российской Академии Наук Институт цитологии РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук Корнилова Елена Сергеевна  
Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Поспелов Валерий Анатольевич  
Институт цитологии РАН

доктор медицинских наук, профессор  
Галебская Людвиг Вячеславовна  
СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова

Ведущее учреждение: Биолого-почвенный факультет  
Санкт-Петербургского государственного университета

Защита состоится 26 июня 2009 года в 13 часов на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

Сайт института: [www.cytspb.rssi.ru](http://www.cytspb.rssi.ru)

Электронный адрес: [cellbio@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:cellbio@mail.cytspb.rssi.ru).

Факс: +7 (812) 297-03-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан 23 мая 2009 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Е.В. Каминская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Эпидермальный фактор роста (ЭФР) – небольшой белок (53 аминокислотных остатка, АО), выделяемый во внеклеточное пространство. За без малого пятьдесят лет, прошедших с момента его открытия, показано, что ЭФР играет огромную роль в процессах пролиферации и дифференцировки клеток, апоптоза и др. Молекула ЭФР воздействует на клетки путём взаимодействия на их поверхности со своим специфическим рецептором (РЭФР). Каждая часть молекулы РЭФР выполняет вполне определённую функцию. Внеклеточная часть отвечает за связывание лиганда и димеризацию рецептора. Внутриклеточная часть РЭФР состоит из трех доменов: подмембранного, тирозинкиназного и С-концевого (Wells, 1999). В тирозинкиназном домене РЭФР находится активный центр фермента тирозинкиназы с важнейшим аминокислотным остатком – лизином 721. Мутация этого лизина приводит к полной инактивации тирозинкиназной активности РЭФР. В С-концевом домене находятся семь АО тирозина, которые в активированном рецепторе подвергаются автофосфорилированию. В фосфорилированном виде каждый из этих остатков служит для связывания с определёнными нижележащими сигнальными молекулами. Одной из молекул, взаимодействующих с РЭФР, является убиквитинлигаза с-Cbl. РЭФР фосфорилирует эту лигазу, а с-Cbl в ответ на фосфорилирование производит убиквитинирование рецептора. В активации убиквитинлигазы с-Cbl принимает участие три тирозиновых остатка в молекуле РЭФР (Sorkin, Goh., 2008). Тирозин 1045 непосредственно связывается с убиквитинлигазой. Тирозины 1068 и 1086 служат сайтами взаимодействия с с-Cbl через белок-адаптор Grb2. В С-концевой области после остатка тирозина 1086 в молекуле рецептора нет известных сайтов связывания с-Cbl. Таким образом, сайты взаимодействия РЭФР и убиквитинлигазы известны достаточно хорошо. Однако до сих пор неясно, какую роль играет каждый из этих сайтов связывания с-Cbl. Непонятно, может ли нарушение взаимодействия с каким-либо из этих сайтов влиять на убиквитинирование РЭФР. Неясно также, влияет ли С-концевая область рецептора, не содержащая сайтов взаимодействия с убиквитинлигазой, на характер убиквитинирования РЭФР.

Кроме активации сигнальных каскадов, взаимодействие ЭФР со своим рецептором вызывает запуск эндоцитоза РЭФР. Эндоцитоз РЭФР – сложный многостадийный процесс, контролируемый многими белками. На первой стадии происходит интернализация лиганд-рецепторных комплексов с поверхности клетки в составе мембранных везикул. После этого происходит слияние везикул со специальными клеточными компартментами – ранними эндосомами. В ранних эндосомах происходит сортировка лиганд-рецепторных комплексов. В ходе процесса сортировки часть рецепторов рециклирует обратно на клеточную мембрану (Maxfield, McGraw, 2004), а часть попадает в следующий компартмент – поздние эндосомы. В дальнейшем в процессе созревания поздних эндосом происходит перемещение лиганд-рецепторных комплексов во внутренние пузырьки этих органелл. Везикулярная структура, обогащенная внутренними пузырьками, получила название мультивезикулярных тел (МВТ) (Katzmann et al., 2002). На последней стадии МВТ сливаются с лизосомами, где и происходит деградация РЭФР (Luzio et al., 2007). Процессом сортировки в ранних эндосомах и МВТ управляют сложные белковые

агрегаты, получившие название ESCRT-комплексов (Williams, Urbe, 2007). Различают четыре таких комплекса: ESCRT-0, -I, -II и -III. Известно, что эти комплексы последовательно и в строгой очередности передают груз (РЭФР) друг другу. Однако чем определяется последовательность взаимодействия ESCRT комплексов с грузом, не до конца понятно.

Давно и надёжно установлено, что РЭФР подвергается деградации в лизосомах (Futter et al., 1996). Однако существуют данные о влиянии на деградацию этой молекулы цитоплазматических протеолитических комплексов – протеасом. Давно известно, что в большинстве случаев в протеасомах деградируют белки, подвергавшиеся модификации убиквитином (Glickman, Ciechanover, 2002). Было также показано, что ингибирование протеолитической активности протеасом приводит к падению деградации РЭФР (Longva et al., 2002). Косвенно участие протеасом-зависимого пути подтверждается тем, что убиквитинированные формы РЭФР на иммуноблоте выявляются в виде размазанного шлейфа. Это может объясняться наличием нескольких полиубиквитиновых цепей, пришитых к этой молекуле. Однако непонятно, как именно протеасома участвует в эндоцитозе РЭФР. Одним из объяснений этого процесса может быть то, что убиквитинированный рецептор в ранних эндосомах узнаётся протеасомой, которая отсекает часть его С-терминального домена. В результате этого последовательность, ответственная за взаимодействие с белками, осуществляющими сортировку на путь лизосомной деградации, становится доступной для связывания с ними. При подавлении активности протеасом эта последовательность остаётся экранированной и сортировки не происходит, что отражается в результате и на скорости деградации рецептора.

Следует отметить, что процесс убиквитинирования РЭФР изучен недостаточно хорошо. В частности неизвестно, какие именно лизины в молекуле РЭФР подвергаются убиквитинированию. Кроме этого не совсем понятно, на каких именно стадиях требуется убиквитинирование РЭФР, требуется ли дополнительное убиквитинирование для прохождения более поздних стадий или достаточно одиночного «импульса» убиквитинирования для прохождения всего эндоцитозного пути. Особо интересной для исследователя представляется возможность блокировать процесс убиквитинирования на различных этапах, а также отменять эту блокировку с целью изучения роли убиквитинирования на разных стадиях эндоцитоза РЭФР. К сожалению, на сегодняшний день не имеется специфических ингибиторов убиквитинлигазы c-Cbl. Эту проблему можно было бы обойти, имея возможность непосредственно манипулировать связыванием c-Cbl и РЭФР. Одним из возможных способов воздействия на эндоцитоз РЭФР может служить ингибирование протеасом. Другим непрямым воздействием на процесс убиквитинирования может быть ингибирование тирозинкиназы РЭФР. На сегодняшний день ясно, что тирозинкиназная активность РЭФР необходима для инициации взаимодействия с убиквитинлигазой c-Cbl. Однако неясно, требуется ли тирозинкиназная (ТК) активность для постоянного поддержания связи с убиквитинлигазой и будет ли c-Cbl проявлять убиквитинлигазную активность, если РЭФР прекратит фосфорилировать эту лигазу. Невьясненным остаётся вопрос о том, как долго рецептор сохраняется убиквитинированным после нарушения взаимодействия с c-Cbl.

## **ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:**

Цель работы – исследовать участие убиквитин-зависимых систем в регуляции эндоцитоза РЭФР.

Задачи работы:

1. Определить, какие стадии эндоцитоза РЭФР чувствительны к действию ингибитора протеасом MG132, а также выявить возможный механизм этого действия.
2. Определить, как влияет ингибирование тирозинкиназной активности РЭФР тирфостином AG1478 на параметры его эндоцитоза, связывание с c-Cbl и убиквитинирование этого рецептора.
3. Выяснить, участвует ли C-терминальный домен РЭФР в регуляции его убиквитинирования.
4. Определить сайты убиквитинирования РЭФР.

## **ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:**

1. РЭФР в эндосомах не подвергается протеолизу протеасомами. Воздействие ингибитора протеасом MG132 на эндоцитоз РЭФР объясняется истощением пула свободного убиквитина.
2. На эндоцитозном пути существует, по крайней мере, две стадии, чувствительные к истощению пула свободного убиквитина. Одна из них располагается на этапе перехода из ранних эндосом в поздние, а вторая – на стадии созревания поздних эндосом.
3. c-Cbl активирован в течение всего времени прохождения эндоцитозного пути РЭФР. Убиквитинирование рецептора является динамическим процессом. Характер убиквитинирования определяется путем баланса работы убиквитинлигазы c-Cbl и деубиквитинирующих ферментов. Сам c-Cbl подвергается деградации после стимуляции эндоцитоза.
4. AG1478 – быстрый и эффективный ингибитор тирозинкиназы РЭФР. Однако действие этого ингибитора нельзя рассматривать как обратимое, поскольку после его удаления наблюдается неравномерное восстановление сайтов фосфорилирования РЭФР и неравномерная реактивация нижележащих сигнальных каскадов.
5. Делеции в C-терминальном домене РЭФР приводят как к изменению характера убиквитинирования этой молекулы, так и к перераспределению высоко- и низко-убиквитинированных форм. При этом лизины этого домена не убиквитинируются.

## **НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ.**

Впервые показано, что причиной действия ингибиторов протеасом на эндоцитоз РЭФР является истощение пула свободного убиквитина.

Впервые показано, что удаление тирфостина AG1478 из среды приводит к неполной реактивации РЭФР. Восстанавливается фосфорилирование по тирозину 1173 и не восстанавливается по тирозину 1045. В связи с этим нет восстановления фосфорилирования c-Cbl и есть восстановление фосфорилирования ERK1/2 после удаления ингибитора.

Впервые показано, что сайты убиквитинирования РЭФР находятся в тирозинкиназном домене этого белка.

Впервые показано, что делеции в С-терминальном домене РЭФР приводят к изменению динамики убиквитинирования этой молекулы.

## **ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАБОТЫ.**

Теоретическое значение работы заключается в углублении понимания механизмов эндоцитоза, связанных с убиквитинированием РЭФР.

С практической точки зрения чрезвычайно важны полученные нами данные о неравномерности восстановления сигнальных путей РЭФР, ведущих к стимуляции пролиферации и негативной регуляции сигнала при отмене воздействия AG1478.

Многие опухоли эпителиального происхождения характеризуются повышенным уровнем экспрессии РЭФР. Разрабатываются терапевтические подходы, рассчитанные на подавление функционирования рецептора за счёт ингибирования его ТК-активности. Ингибиторы ТК, в том числе AG1478, рассматриваются в качестве привлекательного инструмента для решения этой задачи (Ellis et al., 2006). Тем не менее, никто не анализирует, что происходит с ТК активностью и сигнальной функцией РЭФР после отмены этих ингибиторов.

Наши данные могут объяснять возникновение устойчивости к терапии с помощью AG1478. К тому же подобный ход событий не исключён при применении других ингибиторов тирозинкиназы РЭФР. Таким образом, анализ фосфорилирования индивидуальных сайтов рецептора после отмены ингибитора представляется весьма существенным для разработки оптимальных стратегий противоопухолевой терапии.

## **АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ.**

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ (3 статьи). Основные положения докладывались на Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре» (Санкт-Петербург, 2006), на юбилейной конференции, посвященной 50-летию Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2007), на конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пущино 2007).

## **ОБЪЁМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ:**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, списка цитируемой литературы и приложения. Работа изложена на страницах машинописного текста и иллюстрирована рисунком.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

### *Культивирование клеток.*

В работе использовали клетки линии A431, полученные из Российского банка клеточных культур. Кроме этого в работе использовали панель клеток, полученных на основе фибробластов мыши NIH3T3, экспрессирующих различные делеционные и точечные мутантные формы С-терминального домена рецептора ЭФР человека. Клетки линий K721F, WT (HER 14), CD123 и CD165 были получены от д-ра Ульриха, а CD63 и MI33 – от д-ра Соркина. Клетки культивировали на пластиковых чашках в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки. В опыт брали монослойные культуры на 3-и сутки после посева. За 24 ч до начала эксперимента клетки переводили на среду, содержащую 0.2 % эмбриональной сыворотки.

### *Стимуляция эндоцитоза.*

Стимуляцию эндоцитоза РЭФР проводили, предъинкубируя клетки при 4 °С в течение 1 ч в рабочей среде (DMEM с добавлением 0.1 % БСА, 20 мМ HEPES, pH 7.4), содержащей 100 нг/мл ЭФР для клеток A431 и 50 нг/мл ЭФР для мышинных фибробластов, экспрессирующих различные формы РЭФР. После удаления несвязавшегося ЭФР эндоцитоз стимулировали переводом клеток в рабочую среду, не содержащую лиганд, при температуре 37 °С, на определенное время. По окончании инкубационного периода клетки помещали на лед, промывали 3 раза PBS и добавляли лизисный буфер (1% Тритон X-100, 0.5 % NP-40, 10 мМ NaF, 150 мМ NaCl, коммерческий коктейль ингибиторов (Sigma), 1 мМ ортованадат натрия, 10 мМ N-этилмалеимид, 20 мМ Трис-HCl, pH 7.6) на 10 мин. Клетки собирали раббером и центрифугировали в течение 10 мин при 13 тыс. g. Супернатант (ТКЛ) собирали и определяли концентрацию белка по методу Лоури. После этого пробы из одного эксперимента уравнивали по содержанию белка.

### *Иммунопреципитация и иммуноблоттинг.*

В работе использовали антитела против рецептора ЭФР производства фирмы Sigma. Убиквитинлигазу c-Cbl и фосфотирозин выявляли антителами фирмы BD Biosciences. Окраску на убиквитин проводили антителами фирмы DAKO. NEDD8 и сайты фосфорилирования РЭФР выявляли антителами производства Cell Signaling. ERK1/2 и ERK1/2 окрашивали антителами производства Santa Cruz Laboratories. Клетки обрабатывали для получения ТКЛ, как описано выше. Электрофорез проводили по методу Лэммли с нагрузкой белка на одну дорожку, равной 70 мкг. Для иммунопреципитации в пробы после уравнивания по содержанию белка добавляли антитела против рецептора ЭФР. Пробы инкубировали ночь с антителами при постоянном перемешивании на шейкере при температуре 4 °С. После этого к пробам добавляли 20 мкл сефарозы, конъюгированной с белком А, и инкубировали 4 ч. Затем пробы центрифугировали в течение 5 мин при 2 тыс. g, супернатант сливали, а осадок промывали три раза лизисным буфером. К иммунопреципитату или ТКЛ добавляли буфер Лэммли и инкубировали при 98 °С в течение 10 мин. После этого пробы центрифугировали и наносили на 7.5%-ный полиакриламидный гель для проведения электрофореза в денатурирующих условиях. По окончании электрофореза проводили блоттинг на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad) и положение интересующих нас белков выявляли антителами непосредственно или после стриппинга.

### *Субклеточное фракционирование в градиенте плотности Перколл.*

Для определения внутриклеточного распределения эндоцитированного ЭФР клетки собирали в буферный раствор ТЭС (10 мМ триэтанолamina, 0.25 М сахарозы, 1 мМ ЭДТА, pH 6.8) и обрабатывали для центрифугирования в 17 %-ном Перколле, как описано ранее (Корнилова и др., 1987). Градиент формировали центрифугированием в течение 25 мин при 28 тыс. об/мин в угловом роторе 65 на

центрифуге Spinko L2-65K (Beckman). Фракционирование градиента проводили со дна пробирки через иглу. Измерение радиоактивности проб осуществляли на гамма-счетчике Mini-Gamma (LKB). Количественную оценку радиоактивности интернализированного и деградированного лигандов проводили по программе «Градиент».

#### *Анализ рециклирования ЭФР-рецепторных комплексов.*

Клетки инкубировали в рабочей среде при 4 °С в течение 60 мин в присутствии <sup>125</sup>I-ЭФР в концентрации 10 нг/мл. После удаления несвязавшегося <sup>125</sup>I-ЭФР эндоцитоз стимулировали переводом клеток в рабочую среду, не содержащую лиганд, при температуре 37 °С на 15 мин. По окончании инкубации чашки с клетками помещали на лед, затем отмывали несвязавшийся лиганд средой Игла. Для удаления поверхностно-связанного (неинтернализованного) лиганда клетки обрабатывали на льду буфером с низким рН. Затем их промывали PBS. После этого к клеткам добавляли рабочую среду, содержащую 0.3 мкМ AG1478 и не содержащую этого агента, после чего продолжали инкубацию в течение 10, 20, 30 мин при 37 °С. Далее чашки с клетками помещали на лед и собирали среду в вials. Затем отмывали несвязавшийся лиганд буфером с низким рН, собирая раствор в вials для определения количества поверхностно-связанного <sup>125</sup>I-ЭФР, после чего промывали клетки PBS и добавляли 1М NaOH на 30 мин, используя затем щелочной раствор для определения внутриклеточного содержания <sup>125</sup>I-ЭФР.

#### *Анализ олигомеризации рецепторов ЭФР.*

Изучение олигомеризации рецептора проводили по методу Ванга (Wang et al., 2005). Клетки, выращенные на чашках Петри диаметром 9 см, после воздействия тирфостина AG1478 или ЭФР снимали раббером в 500 мл фосфатного буфера, собирали в пробирки, добавляли раствор DSS в конечной концентрации 5мМ и оставляли на 2 ч на холоде (4 °С). Затем к пробам добавляли Трис-НСI (рН 7.6) до конечной концентрации 10 мМ на 15 минут. После этого клетки центрифугировали 15 мин при 2000 g, супернатант сливали, а к осадку клеток добавляли лизисный буфер (1 % Тритона X-100, 0.5 % NP-40, 10 мМ NaF, 150 мМ NaCl, коктейль ингибиторов фирмы Sigma, 1 мМ ортованадат натрия, 10 мМ N-этилмалеимида, 20 мМ Трис-НСI, рН 7,6). После лизиса пробы центрифугировали (16 тыс. g, 15 минут). Супернатант собирали и анализировали распределение белков на электрофорезе в градиентном (4 – 16 %) полиакриламидном геле с последующим иммуноблоттингом.

#### *Определение сайтов убиквитинирования РЭФР.*

К лизату клеток A431 после запуска эндоцитоза на 60 мин добавляли антитела против РЭФР и проводили иммунопреципитацию по вышеописанной процедуре. Иммунопреципитат наносили на 7.5 полиакриламидный гель и проводили электрофорез. После электрофореза гель окрашивали Кумасси G250. После окрашивания проявлялась мажорная полоса в области 170 КДа. Затем из геля вырезали эту область. Вырезанная из полиакриламидного геля содержащая белок полоса измельчалась скальпелем и многократно промывалась смесью ацетонитрила и 50 мМ бикарбоната аммония в равных объемных долях для удаления красителя. После добавления к кускам геля рабочего раствора трипсина (50 нг модифицированного свиного трипсина в 10 мкл 50 мМ раствора аммония бикарбоната) пробы оставляли на льду на 20 мин для вхождения трипсина в гель. Затем добавляли 30 мкл 50 мМ раствора бикарбоната аммония и инкубировали пробы 4 ч при температуре 37 °С. После инкубации пептиды экстрагировали из геля 5 %-ной муравьиной кислотой и высушивали на SpeedVac (Thermo Savant). Смесью триптических пептидов в растворе 50 %-ного (v/v) ацетонитрила и 0.1 %-ной (v/v) трифторуксусной кислоты анализировали на гибридном масс-спектрометре LTQ-FT (Thermo Electron) с HPLC-хроматографом Agilent 1100 (Agilent Technologies). Пептиды вначале загружали в микрокапиллярную колонку с материалом C18 для обратнофазовой хроматографии. Элюирование пептидов проводили линейным градиентом 5-40 %-ного буфера А (97.5 %-ный ацетонитрил/0.15 % ная



муравьиная кислота) в буфере Б (2.5 %-ный ацетонитрил/0.15 %-ная муравьиная кислота). Разделенные фракции напрямую поступали в масс-спектрометр. Снятие спектров проходило в режиме автоматического переключения на тандемную масс-спектрометрию в зависимости от интенсивности сигнала. Полученные спектры анализировали с помощью алгоритма Phenyx (<http://phenyx.vital-it.ch/pwi/>) с использованием баз данных белковых последовательностей NCBI и Swiss-Prot, с обязательной ручной верификацией результатов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Влияние ингибиторов протеасом на эндоцитоз РЭФР

На основании того, что ингибиторы активности протеасом подавляют деградацию эндоцитируемых лиганд-рецепторных комплексов РЭФР-ЭФР, была выдвинута гипотеза, в соответствии с которой РЭФР подвергается частичному протеолизу протеасомой. Для проверки этой гипотезы нами было проведено исследование состояния РЭФР после стимуляции эндоцитоза. Для этой цели проводили иммуноблоттинг лизата клеток A431 на разных стадиях эндоцитоза и выявляли РЭФР антителами против внеклеточной части этой молекулы (рис. 1,А).

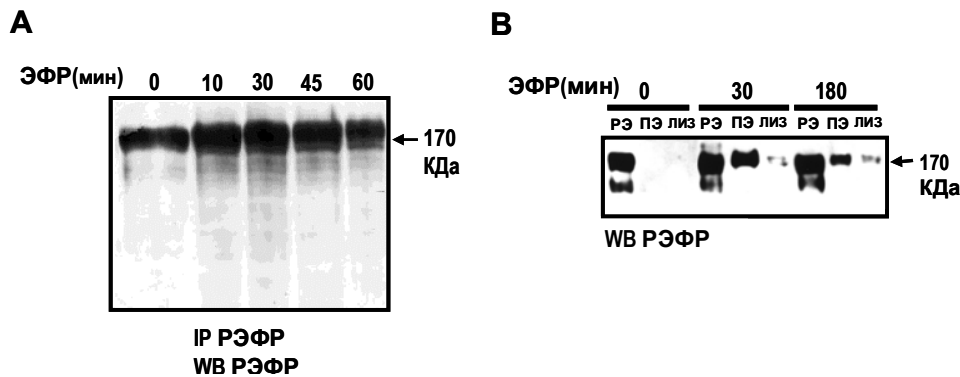


Рисунок 1. Выявление РЭФ в тотальных лизатах (А) и перколльных фракциях (В) на разных стадиях стимуляции эндоцитоза. Окраска антителами против РЭФР.  
РЭ – ранние эндосомы, ПЭ – поздние эндосомы, Лиз - лизосомы

Как видно на представленном рисунке, даже через 60 мин после стимулирования эндоцитоза не наблюдается увеличения низкомолекулярных форм РЭФР (рис. 1,А). С помощью субклеточного фракционирования в градиенте плотности Перколла было проведено исследование РЭФР в различных клеточных компартментах на разных сроках стимуляции  $^{125}\text{I}$ -ЭФР (рис. 1,В). Как видно на представленном рисунке, не наблюдается появления «усечённых» форм рецептора ни в поздних эндосомах, ни в лизосомах. Таким образом, РЭФР доставляется в лизосомы в виде полноразмерной молекулы, т.е. никакого частичного протеолиза в норме не происходит (рис. 1,В). Это означает, что сам рецептор не является мишенью протеасом.

Ранее мы обнаружили, что процесс эндоцитоза РЭФР может происходить с разными скоростями в одних и тех же клетках. Нами было выделены два условных типа эндоцитоза: «медленный» эндоцитоз, при котором осуществляется задержка меченого ЭФР в ранних эндосомах и переход в поздние эндосомы и деградация происходит достаточно медленно, и «быстрый» эндоцитоз, когда меченый ЭФР достаточно быстро переходит из ранних в поздние эндосомы и лизосомы.

Для выяснения роли протеасом в процессе эндоцитоза РЭФР мы подвергали стимулированные ЭФР клетки воздействию ингибитора протеасом MG132 (рис. 2). Проведенный нами анализ влияния ингибитора протеасом MG132 показал, что в зависимости от динамики эндоцитоза ЭФР-рецепторные комплексы блокируются на разных стадиях эндоцитоза. В наших условиях границей между «медленным» и «быстрым» эндоцитозом служит показатель деградации  $^{125}\text{I}$ -ЭФР через 90 мин после запуска эндоцитоза. Если за это время деградирует 20 и более процентов  $^{125}\text{I}$ -ЭФР, то эндоцитоз можно отнести к категории «быстрого». Если же нет – то эндоцитоз «медленный». В серии из 32 опытов было показано, что в случае «медленного» эндоцитоза MG132 блокирует меченый ЭФР в ранних эндосомах. Однако в случае «быстрого» эндоцитоза ингибитор вызывает задержку радиоактивной метки в пике, соответствующем поздним эндосомам. Смещение максимума этого пика в менее «плотную» область градиента свидетельствует о неполном созревании ПЭ при подавлении активности протеасом.

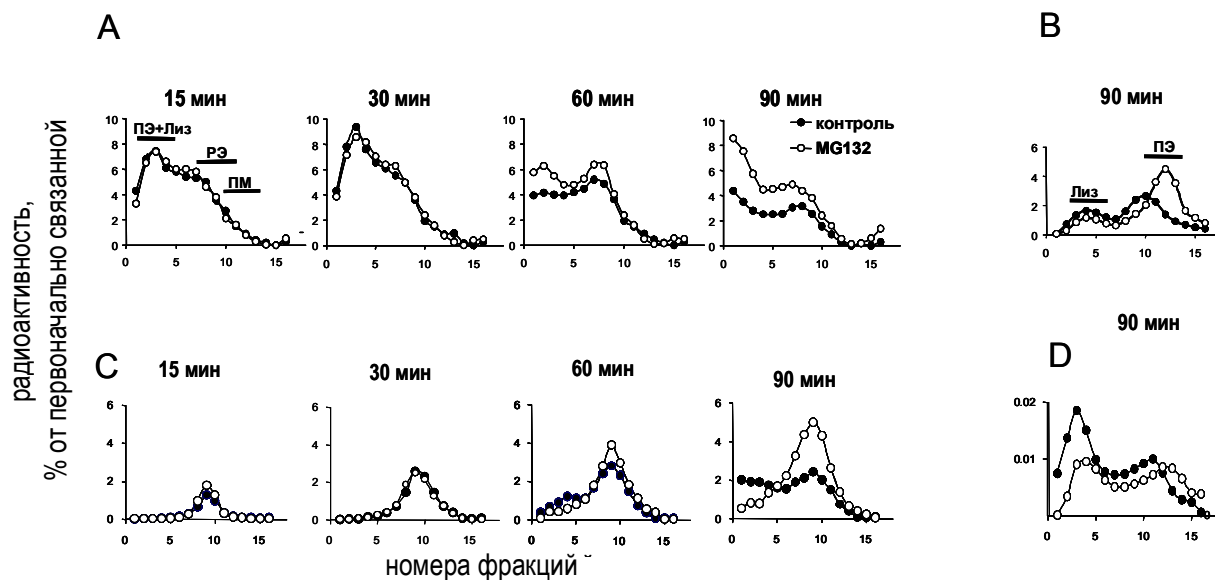


Рисунок 2. Распределение интернализованного  $^{125}\text{I}$ -ЭФР в клетках A431 на разных стадиях стимуляции эндоцитоза  
 А – Воздействие MG132 на клетки с быстрой динамикой эндоцитоза. Разделение радиоактивного  $^{125}\text{I}$ -ЭФР во фракциях после центрифугирования в 17 %-ном градиенте Перколл  
 В – Воздействие MG132 на клетки с быстрой динамикой эндоцитоза. Распределение радиоактивного  $^{125}\text{I}$ -ЭФР после центрифугирования в 33 %-ном градиенте Перколл. Производилось объединение фракций лизосом и поздних эндосом.  
 С – Воздействие MG132 на клетки с медленной динамикой эндоцитоза. Распределение радиоактивного  $^{125}\text{I}$ -ЭФР во фракциях после центрифугирования в 17 %-ном градиенте Перколл.  
 D – Воздействие MG132 на клетки с медленной динамикой эндоцитоза. Распределение радиоактивного  $^{125}\text{I}$ -ЭФР после центрифугирования в 33 %-ном градиенте Перколл. Производилось объединение фракций лизосом и поздних эндосом.  
 РЭ – ранние эндосомы, ПЭ – поздние эндосомы, Лиз – лизосомы, ПМ – плазматическая мембрана

Суммируя эти данные, мы предположили, что причиной такого действия MG132 на эндоцитоз является не столько прямое действие протеасом на определённый белок регулятор эндоцитоза, сколько побочный эффект этого ингибитора, заключающийся в накоплении высокоубиквитинированных форм множества белков и, как следствие, истощении внутриклеточного пула свободного убиквитина. Для проверки этой гипотезы мы провели иммуноблоттинг лизатов клеток, подвергавшихся воздействию ингибиторов

протеасом MG132 и лактацистина на разных стадиях эндоцитоза РЭФР. Блоты окрашивали антителами против убиквитина. Действительно, как видно на представленном блоте, при обработке клеток ингибиторами протеасом наблюдается существенное накопление убиквитинированных белков. Кроме того, мы с помощью иммуноблоттинга исследовали область низких молекулярных масс с целью определить, насколько сильным будет уменьшение пула убиквитина под воздействием MG132 (рис. 3,В).

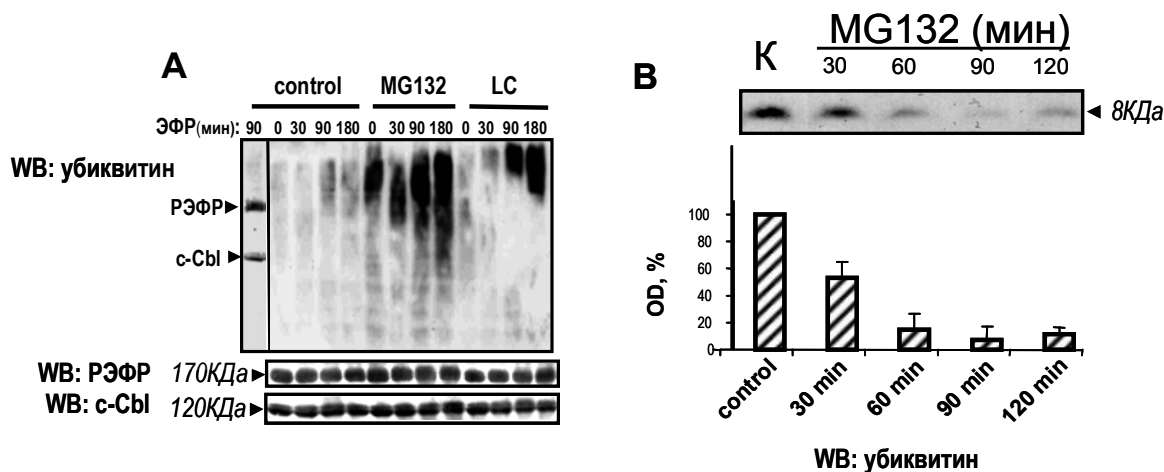


Рисунок 3. Выявление убиквитинированных белков и мономерного убиквитина в клетках A431

А – Иммуноблоттинг лизатов клеток, подвергавшихся воздействию ингибитором протеасом MG132 и лактацистина (LC). Обработка ингибиторами проводилась сразу после запуска эндоцитоза на 30, 90 и 180 мин. Окраска антителами против убиквитина, РЭФР и c-Cbl.

В – Иммуноблоттинг лизатов клеток A431, подвергавшихся действию MG132 в течение 30, 60, 90 и 120 мин. Окраска антителами против убиквитина. Показана нижняя область геля, содержащая полосу мономерного убиквитина. Убиквитинированные белки не видны. Внизу результат денситометрии этого геля.

Как видно на представленном рисунке, истощение пула свободного убиквитина было весьма существенным. Уже через 90 мин после воздействия ингибитора протеасом MG132 наблюдалось снижение количества неконъюгированного убиквитина примерно в 10 раз по сравнению с уровнем этого белка в необработанных клетках. Таким образом, мы считаем, что наблюдаемые эффекты могут свидетельствовать о том, что именно истощение пула свободного убиквитина лежит в основании наблюдаемых блокировок прохождения эндоцитозного пути.

Действительно, истощение пула свободного убиквитина в одинаковых экспериментальных условиях происходит с одной и той же динамикой, но при медленном эндоцитозе «критически низкий» уровень достигается тогда, когда ЭФР-рецепторные комплексы находятся в основном в РЭ. При быстром эндоцитозе значительная часть рецепторов уже успевает пройти первую точку массового убиквитинирования и останавливается там, где должна проходить вторая волна убиквитинирования, что и отражают представленные результаты.

Предполагают, что убиквитинирование мембранных белков работает как маркер для нескольких последовательно ассоциирующихся с эндосомами белковых комплексов, результатом работы которых является перемещение «помеченных» белков с внешней мембраны эндосомы во внутренние пузырьки МВТ. Процесс формирования таких пузырьков и превращение эндосомы в мультивезикулярное тело и составляет суть процесса созревания поздних эндосом. Только зрелая поздняя эндосома способна

взаимодействовать с лизосомой. До сих пор среди исследователей отсутствует согласие относительно того, на какой стадии происходит убиквитинирование рецептора ЭФР, ответственное за его доставку в лизосомы. Одни считают, что убиквитинирование происходит на плазматической мембране (Longva et al., 2002), другие придерживаются мнения, в соответствии с которым убиквитинирование как сигнал лизосомной деградации имеет место на эндосомах (Levkowitz et al., 1998). В обоих случаях считается, что, будучи один раз модифицированным, рецептор остается таковым в ходе всей своей последующей «эндоцитозной» жизни. Наши данные свидетельствуют, что на эндоцитозном пути, кроме этапа перехода из ранних в поздние эндосомы, есть еще, по крайней мере, одна стадия, для прохождения которой необходимо дополнительное убиквитинирование, и это убиквитинирование существенно для полноценного созревания поздних эндосом.

## **2. Влияние ингибитора тирозинкиназной активности тирфостина AG1478 на эндоцитоз РЭФР и фосфорилирование этого рецептора, а также нижележащих сигнальных молекул c-Cbl и ERK1/2.**

Еще одно подтверждение нашей гипотезы могло бы быть получено, если бы можно было непосредственно подавлять убиквитинирование в любой интересующий нас момент, а затем восстанавливать его. Поскольку убиквитинирует рецептор убиквитинлигаза c-Cbl, которая активируется посредством фосфорилирования, осуществляемого тирозинкиназой рецептора, можно предполагать, что подавление активности рецепторной ТК будет приводить к прекращению ассоциации РЭФР и c-Cbl. В результате этого дополнительное убиквитинирование (если такое имеется) не будет происходить. Мы решили использовать ингибитор тирфостин AG1478, который, во-первых, широко применяется в экспериментальной практике; а во-вторых, считается, что его действие обратимо (Levitzki, Gazit., 1995). Если это так, то существует реальная возможность манипулировать динамикой эндоцитоза, блокируя ТК-активность РЭФР на определенных стадиях, а затем после удаления ингибитора восстанавливать ход эндоцитоза. Однако анализ литературы показал, что детальных исследований действия AG1478 не проводилось. Таким образом, на первом этапе мы определили временные и концентрационные характеристики действия AG1478 на модели культивируемых клеток A431. Мы применяли протокол, который позволяет следить за активностью только интернализированных рецепторов (по окончании инкубации неинтернализированный ЭФР удаляли с поверхности с помощью ацетатного буфера pH 4.5, в результате рецептор на ПМ быстро дефосфорилировался).

Вначале было определено минимальное время воздействия тирфостина, которое требуется для полной блокады ТК-активности РЭФР. Для этого мы провели иммунопреципитацию антителами против РЭФР из клеток A431, которые подвергались воздействию тирфостина AG1478 на различные сроки через 15 мин после запуска эндоцитоза (рис. 4,А). Как видно на представленном рисунке, уже 5 минутное воздействие тирфостина приводит к полному дефосфорилированию РЭФР и разрушению его комплексов с c-Cbl. Оказалось, что AG1478 в концентрации 0.5 мкМ эффективно подавляет фосфорилирование тирозина в рецепторе ЭФР на разных стадиях эндоцитоза (рис. 4,В), причем максимальный эффект развивается уже через 5

мин после добавления к клеткам ингибитора (рис. 4,А). Как и ожидалось, убиквитинлигаза с-Cbl быстро диссоциирует из комплекса с рецептором, причём эта диссоциация происходит на всех исследованных стадиях эндоцитоза (рис. 4,В). Наиболее интересно то, что после удаления с-Cbl рецептор не оставался в том состоянии убиквитинирования, которое наблюдалось на момент диссоциации РЭФР и с-Cbl, а быстро деубиквитинировался (рис. 4,В). Это означает, что уровень убиквитинирования на всём эндоцитозном пути есть результат баланса убиквитирующей и деубиквитирующей активностей. Таким образом, наше предположение о возможности дополнительных актов убиквитинирования подтвердилось.

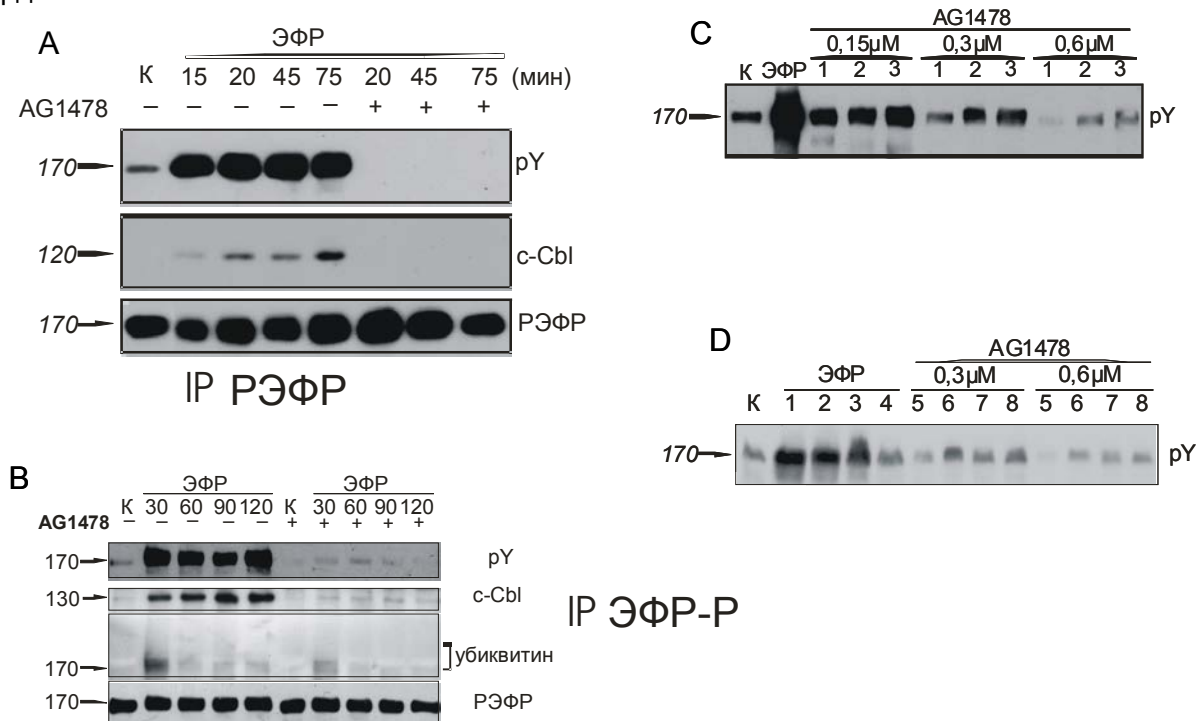


Рисунок 4. Определение временных и концентрационных характеристик воздействия тирфостина AG1478 на фосфорилирование РЭФР, его убиквитинирование и связывание с убиквитинлигазой с-Cbl в клетках A431.

А – Иммуноблоттинг после иммунопреципитации антителами против РЭФР из лизатов клеток на разных стадиях эндоцитоза РЭФР. К части клеток через 15 мин после запуска добавлялся тирфостин AG1478. Окраска антителами против РЭФР, фосфотирозина, с-Cbl.

В – Иммуноблоттинг после иммунопреципитации антителами против РЭФР из лизатов клеток A431, подвергавшихся воздействию 0,3 мкМ тирфостина AG1478 в течении 5 мин перед лизисом. Обработка тирфостином проводилась на разных сроках запуска эндоцитоза РЭФР. Окраска антителами против РЭФР, фосфотирозина, с-Cbl, убиквитина.

С – Иммуноблоттинг лизатов клеток A431. Окраска антителами против фосфотирозина. 1. Клетки после пяти минут воздействия тирфостина. 2. Клетки после отмывки и восстановления фосфорилирования ЭФР-Р на 15 мин. 3. Клетки после отмывки и восстановления фосфорилирования РЭФР на 30 мин.

Д – Иммуноблоттинг лизатов клеток A431. Окраска антителами против фосфотирозина. 1. 20 мин ЭФР. 2. 35 мин ЭФР. 3. 110 мин ЭФР. 4. 200 мин ЭФР. 5. Клетки после пяти минут воздействия тирфостина. 6. Клетки после отмывки и восстановления фосфорилирования ЭФР-Р на 15 мин. 7. Клетки после отмывки и восстановления фосфорилирования ЭФР-Р на 90 мин. 8. Клетки после отмывки и восстановления фосфорилирования ЭФР-Р на 180 мин.

Суммируя вышепредставленные данные, можно сказать, что тирфостин AG1478 следует применять только для быстрого подавления активности ТК. Как мы показали, ингибирование ТК активности рецептора приводит к диссоциации его комплекса с убиквитинлигазой с-Cbl (рис. 4,А,В). Если исходить из гипотезы об однократном акте

убиквитинирования, то можно предположить, что в этом случае убиквитинирование будет сохраняться на том уровне, который наблюдался до добавления тирфостина AG1478, и дополнительного убиквитинирования происходить не будет. Однако, к нашему удивлению, оказалось что, уже через 5 мин после добавления тирфостина убиквитинирование значительно падало (рис. 4,В). Поскольку ассоциация рецептора с c-Sb1 нарушалась при действии тирфостина AG1478, можно сделать вывод, что убиквитинирование носит динамический характер, и постоянная активность c-Sb1 нужна для поддержания определенного уровня убиквитинирования, в противном случае рецептор быстро деубиквитинируется соответствующими ферментами.

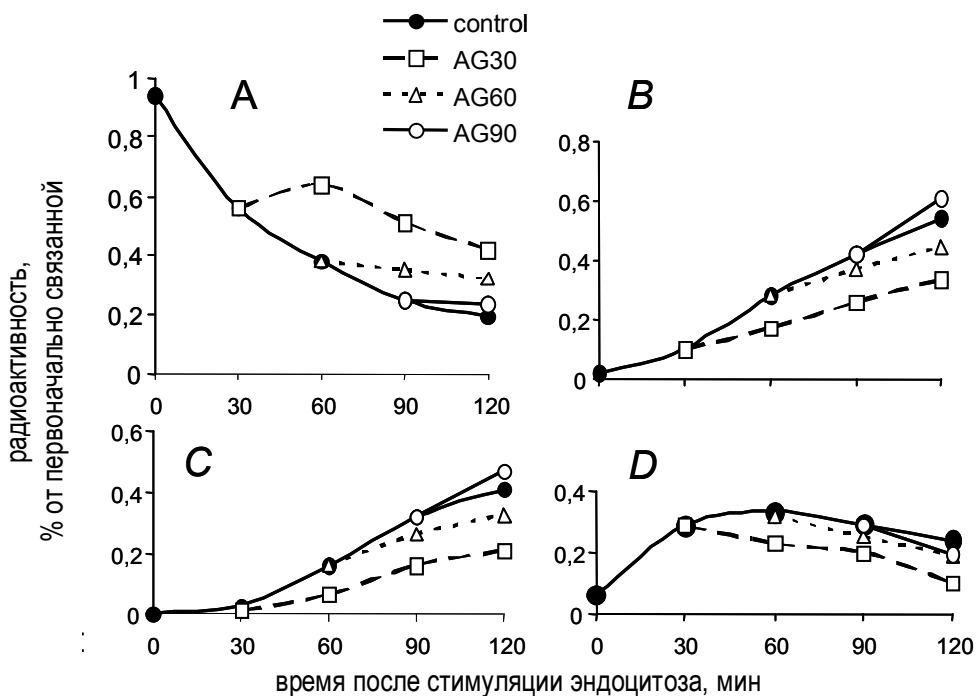


Рисунок 5. Влияние 0.3 мкМ AG1478 на динамику эндоцитоза РЭФР

A –  $^{125}\text{I}$ -ЭФР, связанный на поверхности клеток.

B – Выход  $^{125}\text{I}$ -ЭФР в культуральную среду.

C – Доля деградировавшего  $^{125}\text{I}$ -ЭФР в культуральной среде.

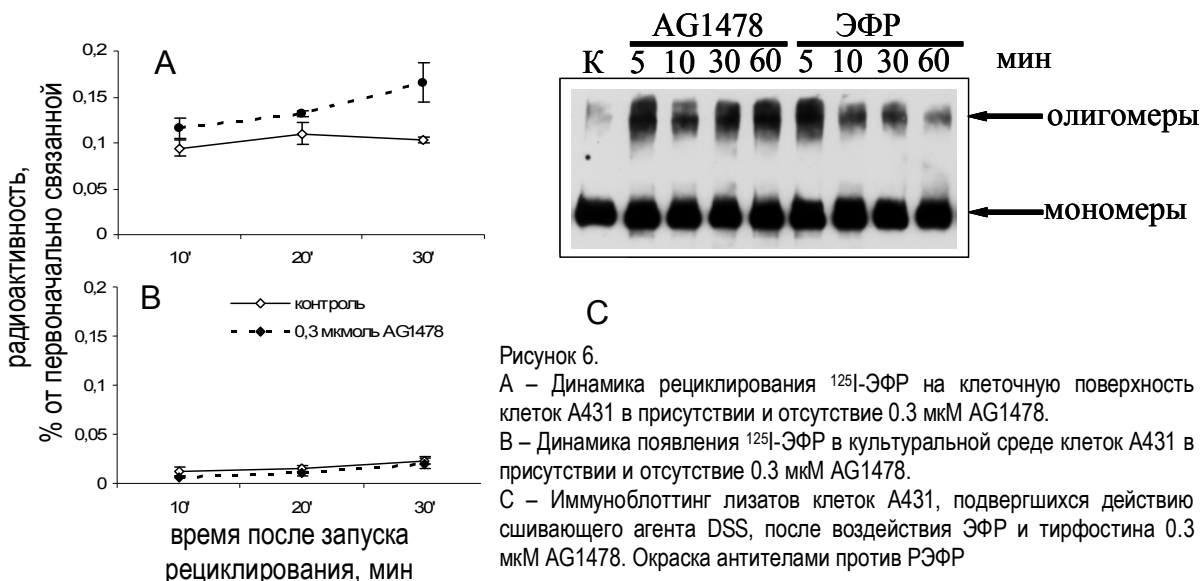
D – Внутриклеточный  $^{125}\text{I}$ -ЭФР.

Проверка концентрационных характеристик действия тирфостина AG1478 показала, что тирфостин в концентрации 0.6 мкМ полностью подавляет фосфорилирование рецептора, тогда как в концентрации 0.15 мкМ он действует лишь частично. В концентрации же 0.3 мкМ фосфорилирование снижается до базального уровня (рис. 4,С). Поскольку нас интересовала также возможность восстановления ТК-активности рецептора, мы проверили, что происходит с фосфорилированием рецептора после удаления тирфостина AG1478 из инкубационной среды. Оказалось, что даже при использовании самой низкой концентрации фосфорилирование восстанавливается не полностью, а при 0.6 мкМ – практически не восстанавливается. Если «отмывать» ингибитор дольше, то через 180 мин уровень фосфорилирования сравняется с уровнем фосфорилирования рецептора в не обработанных тирфостином клетках (рис. 4, D). Однако это происходит не столько за счет восстановления исходного уровня, сколько

благодаря падению контрольного уровня вследствие начала деградации рецепторов при достижении ими лизосом.

Далее, используя меченный радиоактивным йодом ЭФР, мы исследовали, как влияет воздействие тирфостина AG1478 на поведение РЭФР на разных стадиях эндоцитоза. Оказалось, что воздействие тирфостина приводит к падению выхода в среду  $^{125}\text{I}$ -ЭФР (рис. 5,В). Кроме того, обработка клеток тирфостином приводила к падению деградации  $^{125}\text{I}$ -ЭФР (рис. 5,С) при воздействии на ранних сроках эндоцитоза (при добавлении тирфостина через 30 и 60 мин после запуска эндоцитоза) и к незначительному, но воспроизводимому увеличению деградации при воздействии на поздних сроках эндоцитоза (при добавлении тирфостина через 90 мин после запуска эндоцитоза). Таким образом, работа тирозинкиназы РЭФР, с одной стороны, стимулирует вступление на путь деградации, а с другой стороны, препятствует её преждевременному началу на поздних этапах. Также было показано, что воздействие тирфостина приводит к повышению доли  $^{125}\text{I}$ -ЭФР на ПМ (рис. 5,А) и снижению его доли внутри клеток (рис. 5,Д).

Поскольку тирфостин в этом эксперименте вызывал увеличение доли лиганд-рецепторных комплексов на поверхности клетки, мы предположили, что этот ингибитор будет вызывать рециклирование РЭФР на клеточную поверхность. Для этой цели мы провели эксперименты с использованием  $^{125}\text{I}$ -ЭФР по методике, описанной в «Материалах и методах».



Как и следовало ожидать, подавление ТК-активности РЭФР приводит к его рециклированию на клеточную мембрану (рис. 6,А). Интересно, что рециклировавшие под действием AG1478 лиганд-рецепторные комплексы не диссоциируют, поскольку радиоактивность в среде не увеличивается (рис. 6,В), что отличает процесс рециклирования в отсутствие ингибитора. Возможно, повышенное сродство ЭФР к рецептору в нашем случае связано со способностью ингибитора формировать димеры в отсутствие лиганда, что может сказываться на стабильности такого комплекса с ЭФР. Анализ состояния рецепторов с помощью кросс-сшивающего агента DSS показал, что

AG действительно стимулирует образование олигомеров, причем в большей степени, чем ЭФР (рис. 6,С).

Таким образом, AG1478 подавляет эндоцитоз РЭФР так же, как и ингибитор протеасом MG132. Однако следует иметь ввиду, что ситуации, складывающиеся в клетках под действием MG132 и AG1478, неидентичны. Если в первом случае ТК рецептора находится в рабочем состоянии, ассоциированном с с-Cbl, и базальный уровень убиквитинирования сохраняется, то при действии AG рецепторы полностью деубиквитинируются. Поскольку синхронность прохождения по эндоцитозному пути весьма относительна, отдельные рецепторы могут находиться на разных стадиях эндоцитозного пути. Таким образом, часть из них может быть «поймана» до повторного убиквитинирования и в результате будет накапливаться в поздних эндосомах, в то время как деубиквитинирование части рецепторов, уже прошедших эту точку до добавления тирфостина AG1478, будет способствовать ускоренной их деградации. Однако общий характер действия MG132 и AG1478 позволяет заключить, что ТК-активность и на позднем этапе необходима именно для стимуляции «дополнительного» убиквитинирования РЭФР.

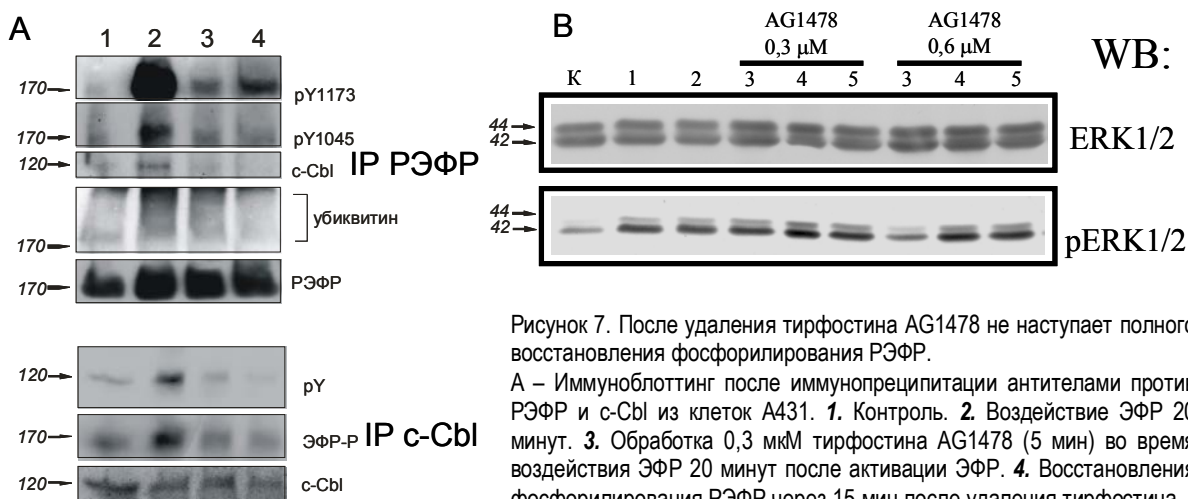


Рисунок 7. После удаления тирфостина AG1478 не наступает полного восстановления фосфорилирования РЭФР.

А – Иммуноблоттинг после иммунопреципитации антителами против РЭФР и с-Cbl из клеток A431. 1. Контроль. 2. Воздействие ЭФР 20 минут. 3. Обработка 0,3 мкМ тирфостина AG1478 (5 мин) во время воздействия ЭФР 20 минут после активации ЭФР. 4. Восстановления фосфорилирования РЭФР через 15 мин после удаления тирфостина.

В – Иммуноблоттинг лизатов клеток A431.

1. Клетки после 20 минут активации эндоцитоза. 2. Клетки после 20 минут активации эндоцитоза и удаления ЭФР с поверхности ацетатным буфером. 3. Клетки после 20 минут активации эндоцитоза и 5 минут воздействия тирфостина AG1478. 4. Клетки после 20 минут активации эндоцитоза и пяти минут воздействия тирфостина. После этого клетки на 30 минут возвращались на 37 °С. 5. Клетки после 20 минут активации эндоцитоза и пяти минут воздействия тирфостина. После этого клетки на 60 минут возвращались на 37 °С. Окраска антителами против ERK1/2 и фосфоERK1/2.

Как было показано выше, отмывка тирфостина AG1478 приводила к восстановлению фосфорилирования рецептора, однако оно не возвращалось к исходному уровню. Интересно также, что в ходе отмывки не восстанавливалась ассоциация рецептора с убиквитинлигазой. Проанализировав влияние тирфостина AG1478 и его отмывки на фосфорилирование индивидуальных сайтов рецептора, Y1045 и Y1173, мы обнаружили, что фосфорилирование обоих сайтов подавляется ингибитором одинаково, тогда как они в разной степени чувствительны к отмывке: фосфорилирование Y1173 восстанавливается в значительной мере, тогда как Y1045 – не восстанавливается совсем (рис. 7,А). Известно, что фосфорилированный остаток



тирозина Y1045 является основным ТК-зависимым сайтом связывания с-Cbl с рецептором, тогда как Y1173 можно считать мажорным «сигнальным» сайтом, нужным для активации ряда сигнальных молекул, в частности MAPK-каскада серин-треониновых киназ. Для проверки гипотезы о том, что после удаления ингибитора восстанавливается фосфорилирование одной из MAPK киназ, ERK1/2, и не восстанавливается фосфорилирование с-Cbl, мы провели преципитацию с-Cbl (рис. 7,А, нижняя панель) и выявление в лизатах фосфорилированной формы ERK1/2 (рис. 7,В). Как видно на представленном рисунке, воздействие тирфостина AG1478 (0.3 мкМ) не приводит к существенному снижению фосфорилирования ERK1/2. В то же время тирфостин в концентрации 0.6 мкМ вызывает падение фосфорилирования этой киназы. Однако уже через 30 мин фосфорилирование ERK1/2 восстанавливалось.

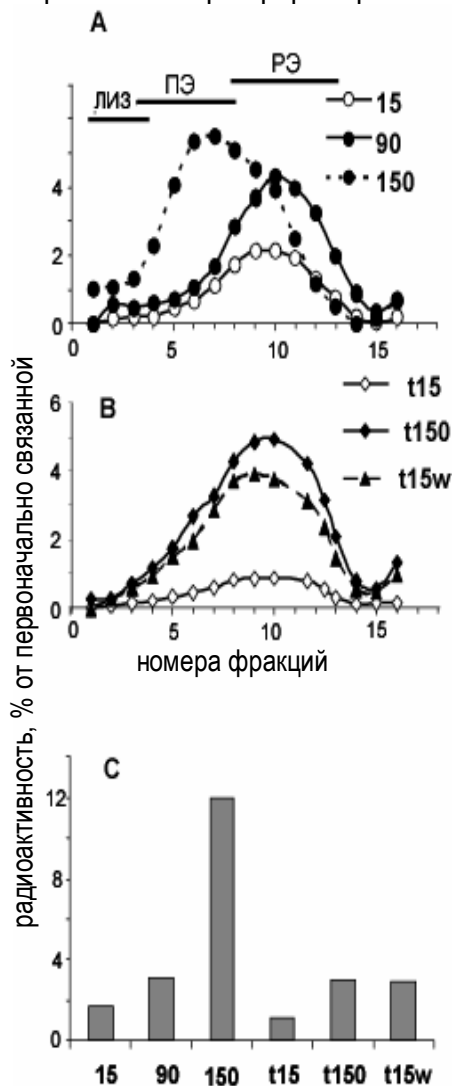


Рисунок 8. Динамика эндоцитоза и деградации РЭФР после удаления 0.6 мкМ AG1478 в клетках A431.

А – Распределение интернализованного  $^{125}\text{I}$ -ЭФР в градиенте Перколла в контроле. Цифра справа время (мин) после запуска эндоцитоза. Лиз – лизосомы. ПЭ – поздние эндосомы. РЭ – ранние эндосомы.

В – Распределение интернализованного  $^{125}\text{I}$ -ЭФР в градиенте Перколла через 15 (*t15*) и 150 (*t150*) мин после запуска эндоцитоза в присутствии AG1478 (0.6 мкМ). *t15w* – Через 15 мин после запуска эндоцитоза (в присутствии тирфостина) ингибитор удалялся и эндоцитоз запускался до 150 мин.

С – Деградация  $^{125}\text{I}$ -ЭФР в случаях, представленных на панелях А и В.

Мы предположили, что если после удаления тирфостина AG1478 не наблюдается восстановления фосфорилирования с-Cbl, то это должно приводить к угнетению процесса эндоцитоза РЭФР. Для проверки этой гипотезы мы провели серию экспериментов с использованием  $^{125}\text{I}$ -ЭФР. Оценивалась скорость деградации  $^{125}\text{I}$ -ЭФР (рис. 8,С) и распределение радиоактивности в градиенте плотности Перколла (рис. 8,А,В).

Как видно на представленном рисунке, в контрольных клетках РЭФР через 15 и 90 мин находится в области ранних эндосом (рис. 8,А). Его смещение в область поздних эндосом и лизосом наступает только после 150 мин после запуска эндоцитоза. При этом воздействие тирфостина AG1478 в течение 15 мин приводит к значительному уменьшению количества  $^{125}\text{I}$ -ЭФР, связанного с ранними эндосомами. Возможно, это происходит как за счёт подавления интернализации, так и за счёт усиления рециклирования РЭФР на клеточную мембрану (рис. 8,В). Кроме того, удаление тирфостина AG1478 из культуральной среды не приводит к увеличению деградации лиганд-рецепторных комплексов (рис. 8,С), что подтверждает наши данные по убиквитинированию.

Таким образом, после удаления тирфостина AG1478 наблюдается восстановление проведения сигнала через MAPK каскад, но нет восстановления естественной деградации РЭФР. Данное наблюдение имеет достаточно большое значение для оценки возможностей применения тирфостина AG1478 в терапии опухолей, характеризующихся повышенным уровнем активности рецептора ЭФР. Следует иметь в виду, что подобная ситуация может складываться в организме пациента, когда через некоторое время после приема препарата наблюдается снижение его концентрации. При этом в клетках не будет задействован естественный механизм негативной регуляции ТК-активности РЭФР путём его эндоцитоза, но будет проявляться активность MAPK киназ, которая может приводить к повышенной пролиферации клеток.

### ***3. Изучение влияния делеций в С-терминальном домене РЭФР на его убиквитинирование в ходе эндоцитоза.***

Ранее нами было показано, что профиль убиквитинирования рецептора (т. е. набор форм рецептора, содержащих разное количество убиквитина и, в результате, значительно различающихся по подвижности в геле) в клетках A431 изменялся в ходе эндоцитоза (Melikova et al., 2006). Опираясь на этот факт, а также на то, что снижение пула свободного убиквитина приводит к замедлению эндоцитоза РЭФР, мы предположили, что убиквитинирование рецептора является динамическим процессом, результатом баланса активностей убиквитинлигазы и деубиквитинирующих ферментов, и конкретный паттерн убиквитинирования может определять специфичность взаимодействия рецептора с определенным сортирующим комплексом. Для проверки этой гипотезы необходимо идентифицировать конкретные сайты убиквитинирования и выяснить, есть ли закономерности в последовательности их модификации в ходе эндоцитоза.

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

автофосфорилирования Y1045 на его С-терминальном конце, так и опосредованно, через адаптерный белок Grb2, который, в свою очередь, присоединяется к рецептору через фосфорилированные остатки тирозина в положении 1068 и 1086 (Sorkin, Goh, 2008). До сих пор не вполне понятно физиологическое значение существования двух способов взаимодействия рецептора с с-Cbl. В дальнейшем мы решили выяснить, как способ связывания с-Cbl с рецептором влияет на его убиквитинирование и являются ли лизины, содержащиеся в регуляторном домене, акцепторами убиквитина.

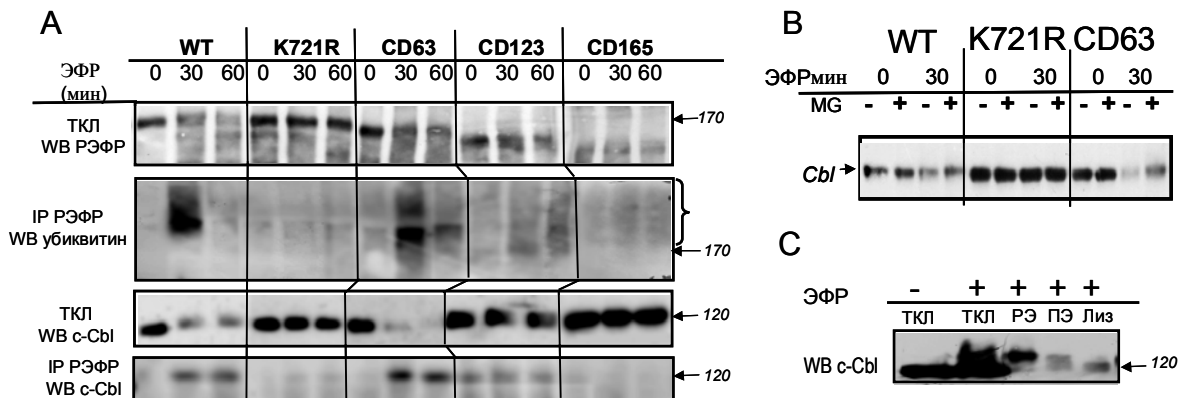


Рисунок 9. Исследование динамики убиквитинирования и уровня с-Cbl в клетках, обладающих различными делециями С-терминального участка РЭФР. Клетки с быстрой динамикой эндоцитоза.

А – Иммуноблоттинг лизатов и иммунопреципитатов клеток HER14, CD63, CD123, CD165, K721R.

В – Иммуноблоттинг клеток HER14 (WT), CD63, K721R на различных стадиях воздействия ЭФР.

С – Иммуноблоттинг перколловых фракций полученных из лизата клеток HER14 через 30 мин после запуска эндоцитоза. Выявление с-Cbl.

TKL – тотальный клеточный лизат, РЭ – ранние эндосомы, ПЭ – поздние эндосомы.

Для этой цели была использована панель клеток, полученных на основе фибробластов мыши NIH3T3, экспрессирующих различные делеционные и точечные мутантные формы С-терминального домена рецептора ЭФР человека. Клетки CD165 лишены 165 С-терминальных АО, всех сайтов связывания с с-Cbl и всех 6 остатков лизина (K1037, K1075, K1136, K1164, K1155 и K1158). Негативным контролем также являлись клетки, потерявшие в результате точечной мутации в АТФ-связывающем сайте способность активировать ТК (K721R). Линия CD123 (без 123 концевых АО) имела только сайт прямого связывания с с-Cbl (Y1045), но была лишена 5 концевых остатков лизина. Рецептор в клетках CD63, в свою очередь, обладает всеми тремя сайтами связывания убиквитинлигазы, однако в этом мутанте отсутствуют последние 4 остатка лизина. Был использован также полноразмерный рецептор с двумя точечными мутациями последних мажорных сайтов автофосфорилирования – Y1148 и Y1173 (Mi33), но обладающий всеми С-терминальными остатками лизина. Ранее было показано, что вышеописанные делеционные мутанты различаются по скорости интернализации и, в большей степени, по скорости перехода ЭФР-рецепторных комплексов из РЭ в ПЭ и дальнейшей деградации. Рецепторы, лишенные ТК-активности или 165 АО, практически не сортировались в ПЭ и в основном рециклировались из РЭ. Рецептор CD123 демонстрировал медленную сортировку в ПЭ и низкую скорость деградации, тогда как рецепторы дикого типа (WT) и CD63 быстро интернализировались, эффективно накапливались в ПЭ и деградировали (Соколова и др., 1995; Kornilova et al, 1996).

Клетки, полученные на основе фибробластов мышцы путём трансфекции плазмид с человеческим ЭФР, обладают не слишком высоким уровнем экспрессии этого белка, поэтому судить о динамике эндоцитоза РЭФР можно по скорости падения общего количества рецептора в клетках после стимуляции ЭФР.

Действительно, данные, представленные на рис. 9,А, показывают, что в клетках линий WT, CD63 и, в меньшей степени, CD123 количество рецептора уменьшается уже через 30 мин после стимуляции эндоцитоза, тогда как в клетках K721R и CD165 оно остается практически неизменным и через 60 мин. Дальнейший анализ показал, что сильно убиквитинируются только рецепторы WT и CD63, тогда как в линиях CD123 и CD165 убиквитинирование значительно снижено, а в клетках K721R практически не выявляется. Существенно, что в этом эксперименте высокий уровень убиквитинирования выявляется через 30 мин после стимуляции, падая к 60 мин. Для рецепторов дикого типа и CD63 характерно наличие не только низко-, но и высокоубиквитинированных форм, в то время как в CD123 выявляется только слабая полоса в районе, лежащем сразу над рецептором, что позволяет предполагать существование лишь низкоубиквитинированной формы. Однако, поскольку в этом эксперименте первой анализируемой временной точкой была 30-минутная, нельзя утверждать, что убиквитинирование было максимальным именно к этому моменту времени. Тем не менее, учитывая обратную зависимость между уровнем рецептора и степенью убиквитинирования для эффективно модифицируемых версий рецептора, можно предполагать, что и на более ранних стадиях убиквитинирование CD123 в этом случае не было значительным. Хотя уровень убиквитинирования мутанта CD165, лишённого всех сайтов связывания с с-Cbl, чрезвычайно низок, он, тем не менее, отличен от базального, и убиквитин при окрашивании равномерно распределяется по всей зоне выше основной полосы рецептора. Возможно, этот факт объясняется тем, что в клетках NIH3T3 существует очень низкий уровень рецептора дикого типа. Однако этот рецептор, образуя димеры с мутантным рецептором, может обеспечивать его модификацию, если предполагать, что убиквитинирование, так же как и автофосфорилирование, происходит по кросс-молекулярному механизму (Schlessinger, 2000). То же замечание справедливо и в отношении ТК-негативного мутанта K721.

То, что только три мутанта подвергаются ЭФР-стимулируемому убиквитинированию, подтверждают и данные анализа ассоциации с-Cbl с рецептором ЭФР (рис. 9,А). Только в клетках линий WT, CD63 и, в меньшей степени, CD123, выявляется убиквитинлигаза в комплексе с рецептором. Интересно отметить, что уровень ассоциации не изменяется и через 60 мин после стимуляции эндоцитоза, когда убиквитинирование рецептора и его общее количество в клетках значительно падают. Подобный феномен мы выявляли и ранее с помощью иммунофлуоресцентных и биохимических подходов. Возможно, это несоответствие связано с тем, что в каждый момент времени лишь небольшая доля общего внутриклеточного пула убиквитинлигазы находится в комплексе с рецептором ЭФР. В пользу такого предположения говорит и чрезвычайная многофункциональность с-Cbl, которая может выполнять не только ферментативную, но и адапторную функцию в целом ряде процессов, не связанных с эндоцитозом (см. обзор Меликовой и др., 2003).

Кроме того, мы обнаружили, что в эффективно деградирующих рецептор клетках падает и общее количество внутриклеточного с-Cbl. Это позволяет говорить об индукции

деградации убиквитинлигазы при стимуляции лизосомного эндоцитозного пути. Возникает вопрос о механизмах этой деградации. Одно из предположений связано с длительным сохранением комплекса с-Cbl-рецептор ЭФР. Возможно, что с-Cbl, так и не покидая комплекс, попадает вместе с рецептором в лизосомы. Однако ранее при иммунофлуоресцентном анализе мы обнаружили, что антитела окрашивают с-Cbl на поздних эндолизосомах даже тогда, когда рецептор уже не выявляется. Создается впечатление, что с-Cbl, покидая комплекс с рецептором на самых поздних стадиях, тем не менее остается ассоциированным с поверхностью эндолизосом. Против возможности лизосомной деградации убиквитинлигазы говорят и данные, представленные в работе Алвана (Alwan et al., 2003).

Электрофоретический анализ с-Cbl во фракциях РЭ, ПЭ и Лиз, полученных с помощью фракционирования в градиенте Перколла, в сравнении с ТКЛ в контроле и через 60 мин после стимуляции эндоцитоза показал (рис. 9,С), что значительная доля анализируемого белка в ТКЛ изменяет свою подвижность после стимуляции эндоцитоза. Многочисленные данные литературы приписывают такое изменение в основном фосфорилированию, акцепторными сайтами которого с-Cbl чрезвычайно богат (см. данные в обзоре Меликовой и др., 2003). При этом пул с-Cbl, ассоциированный с компартментами эндоцитозного пути, распределялся следующим образом: в РЭ обнаруживалась наибольшая часть белка, причем только в высокомодифицированной форме. ПЭ содержали широкий спектр Cbl с разной подвижностью, тогда как во фракции лизосом выявлялся белок с подвижностью, характерной для нестимулированных клеток. Интересно, что подавление ТК-активности рецептора с помощью синтетического ингибитора AG1478 приводит к фактически немедленному дефосфорилированию с-Cbl и выходу его из комплекса с рецептором. Выявляемый нами с помощью иммунопреципитации из ТКЛ ассоциированный с рецептором с-Cbl (рис. 9,А) в основном имеет подвижность, характерную для РЭ, однако наличие «неактивированных» форм с-Cbl во фракциях ПЭ и лизосом подтверждает наше предположение о возможности сохранения ассоциации этого белка с поверхностью эндолизосом даже после диссоциации комплекса с рецептором и дефосфорилирования с-Cbl.

Другим возможным механизмом снижения общего количества с-Cbl после стимуляции эндоцитоза может быть его деградация по протеасомному пути (Magnifico et al., 2003). Для проверки этого предположения мы проинкубировали клетки WT, K721R и CD63 в присутствии ингибитора протеасом MG132. Поскольку уже через 30 мин после стимуляции эндоцитоза количество убиквитинлигазы значительно снижалось, мы выбрали для анализа именно эту временную точку. Присутствие MG132 не оказывало практически никакого действия на уровень с-Cbl в нестимулированных клетках, тогда как после стимуляции в клетках с эффективной сортировкой (WT и CD63) количество убиквитинлигазы в присутствии ингибитора несколько возрастало. Существенно, однако, что уровень этого белка под действием MG132 никогда не достигал контрольных значений, даже в клетках с рецептором дикого типа (рис. 9,В). Эти результаты свидетельствуют о том, что протеасомный путь деградации действительно вовлечен в регуляцию общего количества с-Cbl в клетке, однако он не является эксклюзивным и, более того, имеет место на стадиях, предшествующих поздним этапам созревания эндосом. Учитывая наши данные по фракционированию, можно предполагать, что основной мишенью протеасом должен быть с-Cbl в РЭ.

Как выше было показано, динамика различных стадий эндоцитоза не является постоянной даже для клеток одной и той же линии. По всей видимости, эффективность сортировки (и, таким образом, соотношение рецепторов, вступающих на путь рециклирования или направляемых на деградацию), так же как и скорость деградации, зависит от тонкой настройки как сигнальных путей, так и регуляторов транспортной машинерии. Эта настройка определяется, по всей вероятности, конкретным набором внеклеточных сигнальных стимулов (проще говоря, составом сыворотки, добавляемой в ростовую среду) и позволяет клеткам адаптироваться к условиям жизни в определенном микроокружении.

Результаты опыта на клетках с медленным эндоцитозом представлены на рис. 10. Действительно, за 90 мин после стимуляции эндоцитоза количество рецептора не изменялось существенно ни в одной из линий (рис. 10, А). Рецептор в клетках WT и CD63 оставался все это время фосфорилированным по тирозину. Формы, постоянно рециклирующие во всех условиях (K721R и CD165), вообще не подвергались тирозинному фосфорилированию, как в силу отсутствия ТК активности (K721), так и в силу потери большинства сайтов автофосфорилирования (CD165). Кстати, последнее обстоятельство приводило и к существенно более низкому уровню фосфорилирования мутанта CD63, характеризующегося отсутствием домена, содержащего два мажорных сайта автофосфорилирования.

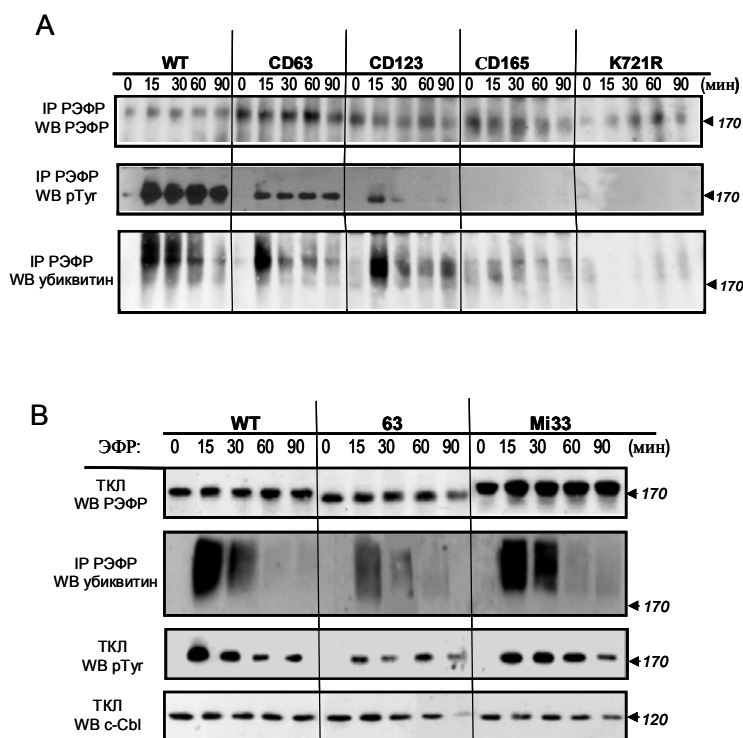


Рисунок 10. Исследование динамики убиквитинирования и уровня с-Cbl в клетках, обладающих различными делециями С-терминального участка. Клетки с медленной динамикой эндоцитоза.

А – Иммунопреципитация РЭФР из клеток HER14 (WT), CD63, CD123, CD165, K721R на различных сроках запуска эндоцитоза РЭФР. Окрашивание на убиквитин, РЭФР, фосфотирозин.

В – Иммуноблоттинг лизатов и иммунопреципитации РЭФР из клеток HER14 (WT), CD63, Mi33 (Y1148F, Y1173F). Окрашивание на убиквитин, РЭФР, фосфотирозин и с-Cbl.

Тем не менее, как и в случае быстрого эндоцитоза, три версии рецептора, способные так или иначе связывать убиквитинлигазу, подвергались убиквитинированию после действия ЭФР. Интересно, однако, что лишь клетки WT, экспрессирующие полноразмерный рецептор дикого типа, демонстрировали наличие высокоубиквитинированных форм, которые с течением времени сменялись

низкоубиквитинированными. В двух других линиях профиль убиквитинирования был исходно сдвинут в сторону менее убиквитинированных форм. Стоит отметить, что хотя мутант CD63 обладал всеми связывающим сайтами для c-Cbl, тогда как CD123 мог связывать убиквитинлигазу лишь напрямую через Y1045, характер изменения профиля убиквитинирования у обоих мутантов был весьма схожим. Таким образом, можно предположить, что C-терминальный домен рецептора, не участвующий ни в каких взаимодействиях с c-Cbl, тем не менее весьма существен для регуляции процесса убиквитинирования рецептора. Значительным отличием быстрого и медленного эндоцитоза явилось то, что в последнем случае период существования модифицированных рецепторов во всех линиях оказался более длительным, чем при быстром эндоцитозе. Убиквитинирование мутанта, не способного связывать c-Cbl (CD165), хоть и отличалось от базального уровня, было очень слабым и не демонстрировало сколько-нибудь воспроизводимой динамики. Эти данные позволяют заключить, что убиквитинирование рецептора само по себе не означает его ультимативной сортировки в ПЭ и деградации и не является единственным событием, необходимым для направления на путь лизосомной деградации. Это означает также, что «решение» о сортировке рецептора в ПЭ принимается далее по эндоцитозному пути, уже после его убиквитинирования.

Данные, полученные на клетках с обоими типами эндоцитоза, на первый взгляд говорят о том, что удаление C-терминальных лизинов, хотя и ведет к снижению длительности убиквитинирования и изменению его профиля (учитывая общий уровень экспрессии того или иного рецептора), но не приводит к его полному подавлению. Это может означать, что домен, содержащий основные акцепторные сайты убиквитинирования, лежит вне C-терминального участка.

Интересно также, что даже наличие всех сайтов, обеспечивающих оба способа (прямой и опосредованный через Grb2) связывания c-Cbl с рецептором, не обеспечивает его полноценного убиквитинирования в отсутствие C-терминального домена из 63 АО. Таким образом, полученные нами данные позволяют говорить о том, что этот C-терминальный участок рецептора, не подвергаясь убиквитинированию в ходе эндоцитоза сам по себе, может участвовать в регуляции убиквитинирования ТК-домена, содержащего, по всей видимости, основные акцепторные сайты. Дальнейшие исследования должны выявить белки, взаимодействие с которыми может модулировать паттерн убиквитинирования рецептора ЭФР.

#### ***4. Изучение сайтов убиквитинирования РЭФР на поздних сроках эндоцитоза***

Известно, что в ходе сортировки в МВТ РЭФР передается комплексами сигнальных молекул, называемыми ESCRT комплексами. Поскольку взаимодействие РЭФР и убиквитинлигазы не нарушается до поздних стадий эндоцитоза, мы предположили что это взаимодействие необходимо для дополнительных раундов убиквитинирования рецептора. По данным единственной работы (Huang et al 2006), в которой проводилось определение сайтов убиквитинирования, масс-спектрометрически определены 6 остатков лизина (K692, K713, K730, K843, K905, K946), а также показано, что мутация еще трех лизинов (K689, K690, K733) кроме этих шести приводит к существенному падению убиквитинирования ЭФР-Р. Все эти лизины находились в тирозинкиназном домене

РЭФР. Следует отметить, что в данной работе методом масс-спектрометрии исследовалось убиквитинирование рецептора после 2 мин активации. Таким образом, выявленные сайты могут участвовать скорее в регуляции интернализации, чем в сортировке в поздние эндосомы.

Таблица 1. Модифицированные пептиды, обнаруженные после 60 минут стимуляции ЭФР

Пептид	Модификация	Модифицированный АО
VLGSGAFGTVYK	Убиквитинирование	K704
VKIPVAIK	Убиквитинирование	K715
SLKEISDGDVIISGNK	Убиквитинирование	K430
ELKEPLTPSGEAPNQALLR	Фосфорилирование	T669
RPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSR	Фосфорилирование	Y1086

При помощи метода тандемной масс-спектрометрии нами исследовалось убиквитинирование РЭФР после 60 мин активации. Достоверно показаны три сайта убиквитинирования (Таблица 1). Два сайта (K704 и K715) обнаружены в тирозинкиназном домене РЭФР. Третий сайт (K430) был обнаружен во внеклеточной части рецептора. Следует отметить, что убиквитинирование этого сайта не может быть результатом активности с-Cbl, поскольку эта лигаза осуществляет свою активность только внутри клетки. По-видимому, убиквитинирование во внеклеточном домене РЭФР возникает в результате действия убиквитинлигаз, существующих вне клетки. Однако изучение работы этих лигаз выходит за рамки данного исследования. Кроме сайтов убиквитинирования нами были обнаружены два хорошо известные сайта фосфорилирования РЭФР – тирозин 1086 и треонин 669. Следует отметить, что сайты убиквитинирования не совпадают с сайтами в вышеупомянутой работе. Тот факт, что ни один из обнаруженных нами сайтов убиквитинирования не совпадал с ранее открытыми, может говорить о том, что на поздних стадиях эндоцитоза убиквитинирование радикально отличается от убиквитинирования на ранних стадиях. Однако это утверждение нуждается в дальнейшей проверке.

### ВЫВОДЫ:

1. Воздействие ингибиторов протеасом на эндоцитоз рецепторов ЭФР реализуется не напрямую, а благодаря побочному эффекту ингибиторов, длительное присутствие которых в среде инкубации приводит к истощению пула свободного убиквитина в клетках.
2. Для поддержания убиквитинированного состояния рецептора ЭФР вплоть до поздних этапов эндоцитоза необходима постоянная активация ТК рецептора и его ассоциации с убиквитинлигазой с-Cbl, при этом на двух этапах эндоцитоза – при сортировке в ПЭ и на поздних стадиях созревания ПЭ, – происходит массивное добавление убиквитина к молекулам рецептора.
3. Экспериментальное подавление активности рецепторной ТК приводит к быстрому деубиквитинированию рецептора. Это свидетельствует о том, что профиль убиквитинирования рецептора в каждый текущий момент после стимуляции эндоцитоза является результатом баланса активностей убиквитинлигазы с-Cbl и ассоциированных с эндосомами деубиквитинирующих ферментов.



4. Специфический ингибитор активности ТК рецептора ЭФР тирфостин AG1478 может быть использован для быстрого и эффективного подавления рецепторной ТК. Однако после его удаления фосфорилирование индивидуальных сайтов восстанавливается неравномерно: основной «сигнальный» сайт Y1173, ответственный за активацию MAP-киназного каскада, значительно рефосфорилируется, тогда как сайт Y1045, ответственный за лизосомную деградацию рецептора, практически не фосфорилируется.
5. Стимуляция эндоцитоза рецептора ЭФР приводит к уменьшению общего количества c-Cbl. Сравнение судьбы убиквитинлигазы c-Cbl в клетках с быстрым и медленным эндоцитозом показало, что лишь часть этого уменьшения можно отнести на счет деградации на протеасомах, которая происходит на ранних стадиях эндоцитозного пути.
6. Убиквитинирование рецептора является необходимым, но недостаточным для его доставки в лизосомы.
7. Основные сайты убиквитинирования рецептора локализованы в ТК-домене, однако C-терминальный домен рецептора, не являясь акцептором убиквитина, играет существенную роль в регуляции степени и длительности убиквитинирования рецептора ЭФР.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Кондратов К.А.**, Меликова М.С., Чернорудский А.Л., Корнилова Е.С. 2009. Убиквитинирование рецепторов ЭФР с делециями и точечными мутациями C-терминального домена в ходе эндоцитоза. Цитология. 51(7): 617-623.
2. **Кондратов К.А.**, Чернорудский А.Л., Амосова А.П., Корнилова Е.С. 2009. Анализ влияния тирфостина AG1478 на поведение интернализованного рецептора ЭФР на разных стадиях эндоцитоза. Цитология. 51(6): 520-525.
3. Melikova M.S., **Kondratov K.A.**, Kornilova E.S. 2006. Two different stages of epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis are sensitive to free ubiquitin depletion produced by proteasome inhibitor MG132. Cell Biol. Int. 30(1): 31-43.
4. Латкин Д.С., **Кондратов К.А.**, Чернорудский А.Л., Злобина М.В., Харченко М.В. 2008. Влияние тирфостина AG1478 на статус индивидуальных сайтов фосфорилирования рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР). Материалы международного научно-методического семинара: «Современные методы микроскопии в исследовании живых систем». Санкт-Петербург. С. 22.
5. **Кондратов К.А.**, Чернорудский А.Л., Амосова А.П., Корнилова Е.С. 2007. Участие C-концевого домена рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) в регуляции убиквитинирования рецептора. Цитология. 49(9): 759-760.
6. **Кондратов К.А.**, Амосова А.П., Чернорудский А.Л., Корнилова Е.С. 2007. Анализ влияния синтетического ингибитора тирозинкиназы рецептора ЭФР тирфостина AG1478 на фосфорилирование различных тирозиновых остатков рецептора. Тезисы Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». Пущино. С. 12-15.
7. **Кондратов К.А.**, Степанянц Н.А., Амосова А.П., Корнилова Е.С. 2006. Поиск методических подходов для выяснения роли тирозинкиназы интернализованного рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР) в регуляции поздних стадий эндоцитоза. Цитология 48(9): 770.

## СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Меликова М.С., Филатова М.М., Корнилова Е.С. 2003. c-Cbl - полифункциональный регулятор клеточных процессов. *Цитология*. 45: 1134-1148.
- Никольский Н.Н., Соркин А.Д., Сорокин А.Б. 1987. Эпидермальный фактор роста. Л. Наука. 200 с.
- Соколова И.П., Вдовина И.Б., Корнилова Е.С., Никольский Н.Н. 1995. Компарментализация эпидермального фактора роста (ЭФР) в ходе эндоцитоза в клетках, экспрессирующих нормальный и лишенный основных сайтов автофосфорилирования рецептор ЭФР. *Цитология*. 37 (9/10): 873-882
- Alwan H.A., van Zoelen E.J., van Leeuwen J.E. 2003. Ligand-induced lysosomal epidermal growth factor receptor (EGFR) degradation is preceded by proteasome-dependent EGFR de-ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 278: 35781–35790.
- Ellis A.G., Doherty M.M., Walker F., Weinstock J., Nerrie M., Vitali A., Murphy R., Johns T.G., Scott A.M., Levitzki A., McLachlan G., Webster L.K., Burgess A.W., Nice E.C. 2006. Preclinical analysis of the analinoquinazoline AG1478, a specific small molecule inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase. *Biochem. Pharmacol.* 71(10): 1422-34.
- 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 (6): 1011-23.
- Huang F., Kirkpatrick D., Jiang X., Gygi S., Sorkin A. 2006. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol. Cell.* 17;21(6):737-48.
- Glickman M.H., Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82(2): 373-428.
- Katzmann D.J., Odorizzi G., Emr S.D. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3(12): 893-905.
- Kornilova E., Sorkina T., Beguinot L., Sorkin A. 1996. Carboxyl-terminal receptor domain 1022-1123 is responsible for the lysosomal targeting of EGF receptors. *J. Biol. Chem.* 271: 30340-30346.
- Levkowitz G., Waterman H., Zamir E., Kam Z., Oved S., Langdon W.Y., Beguinot L., Geiger B., Yarden Y. 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* 12(23): 3663-74.
- Levitzki A., Gazit A. 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*. 267(5205): 1782-8.
- Longva K.E., Blystad F.D., Stang E., Larsen A.M., Johannessen L.E., Madshus I.H. 2002. Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol.* 156(5): 843-54.
- Luzio J.P., Pryor P.R., Bright N.A. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8(8): 622-32.
- Magnifico A., Ettenberg S., Yang C., Mariano J., Tiwari S., Fang S., Lipkowitz S., Weissman A.M. 2003. WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* 278: 43169–43177.
- Maxfield F.R., McGraw T.E. 2004. Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5(2): 121-32.
- Sorkin A., Goh L.K. 2008. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* (17): 3093-3106.
- Schlessinger J. 2000. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103: 211-225.
- Wang Q., Villeneuve G., Wang Z. 2005. Control of epidermal growth factor receptor endocytosis by receptor dimerization, rather than receptor kinase activation. *EMBO Rep.* 6(10): 942-8.
- Wang Y., Pennock S., Chen X., Wang Z. 2002. Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 22 (20): 7279-90.
- Wells A. 1999. EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31(6): 637-43.
- Williams R.L., Urbé S. 2007. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8(5): 355-68.