

УДК 576.342

## ЭПИДЕРМАЛЬНЫЙ ФАКТОР РОСТА В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА ВЫЗЫВАЕТ УМЕНЬШЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА CD146, НЕ ВЛИЯЯ НА ЕГО ИНТЕРНАЛИЗАЦИЮ

© 2020 г. Р. С. Каменцева<sup>1, \*</sup>, М. В. Истомина<sup>2</sup>, М. В. Харченко<sup>1</sup>, Е. С. Корнилова<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*E-mail: rkamentseva@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.

После доработки 15.04.2020 г.

Принята к публикации 17.04.2020 г.

Ранее методом проточной цитометрии нами было показано, что при длительном культивировании мезенхимных стромальных клеток эндометрия в присутствии эпидермального фактора роста (ЭФР) снижается количество CD146 на плазматической мембране. Одна из возможных причин – усиление неспецифической интернализации CD146 в таких условиях. В данном исследовании с помощью конфокальной микроскопии мы показали, что в контроле CD146 локализован не только на плазматической мембране, но и в везикулах, где он частично колокализует с маркерами ранних и рециклирующих эндосом. Однако стимуляция эндоцитоза рецептора ЭФР не влияет на количество CD146<sup>+</sup> везикул в течение 60 мин, хотя количество эндосом, содержащих рецептор ЭФР, значительно возрастает. Более того, при культивировании в присутствии ЭФР в течение 5 сут падает общая интенсивность флуоресценции клетки, ассоциированная как с CD146, так и с рецептором ЭФР. Таким образом, снижение количества CD146 при длительной инкубации в присутствии ЭФР не связано с усилением его эндоцитоза.

**Ключевые слова:** CD146, мезенхимные стромальные клетки человека, эпидермальный фактор роста

**DOI:** 10.31857/S0041377120070020

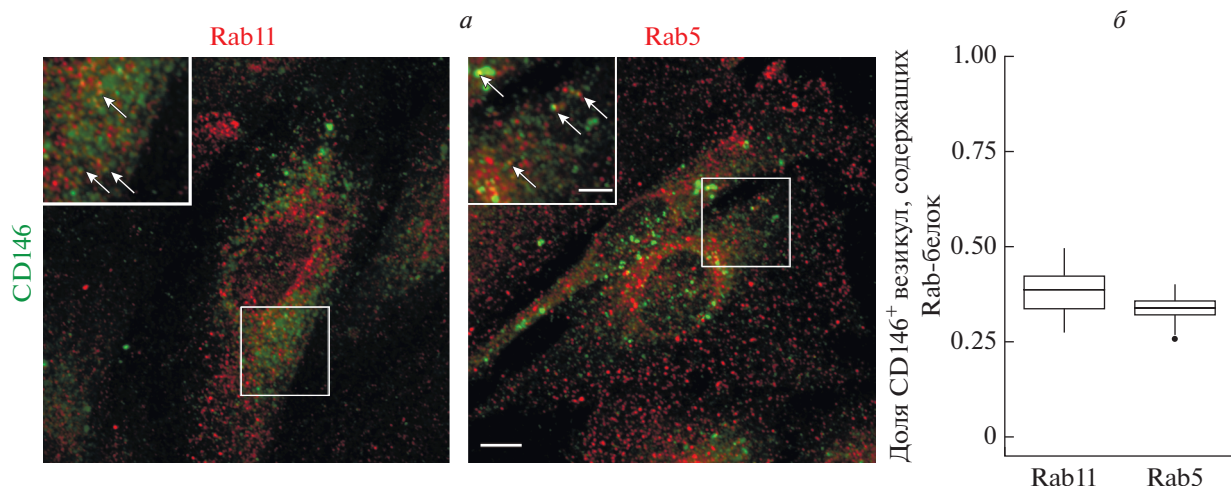
Поверхностный маркер CD146 (также известный как белок адгезии меланомы MCAM, Muc-18, S-endo 1, гицерин) часто используют для выделения и характеристики мезенхимных стромальных клеток (МСК) (Sorrentino et al., 2008). В различных исследованиях показано, что уровень CD146 может коррелировать со скоростью пролиферации и эффективностью дифференцировки (Ulrich et al., 2015; Padua et al., 2016). Кроме того, мы обнаружили, что для МСК характерен высокий уровень экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР), сравнимый с таковым в клетках в линии HeLa. Методом проточной цитометрии мы показали, что доля CD146<sup>+</sup> клеток в популяции эндометриальных мезенхимных стромальных клеток (энМСК) снижается при культивировании в течение 5 сут в среде, содержащей ЭФР, причем этот эффект лишь частично связан с увеличением плотности культуры (Каменцева и др., 2018).

Проточная цитометрия живых клеток, использованная нами ранее, позволяет оценить количество CD146 лишь на их поверхности. Полученные данные могут свидетельствовать об усилении интернализации этого белка под действием ЭФР. Действительно, для интернализации многих белков существенную роль играет ди-лейциновый мотив в цитоплазматическом домене (Wang et al., 2007), и подобный мотив обнаружен в структуре CD146 (Guezguez et al., 2006). Однако данные о внутриклеточной локализации и возможных путях эндоцитоза CD146 в МСК практически отсутствуют. Таким образом, целью данного исследования, было исследовать внутриклеточную локализацию CD146 в энМСК в контроле и под действием ЭФР.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клетки.** Мезенхимные стромальные клетки человека, полученные из десквамированного эндометрия (энМСК) и охарактеризованные в Институте цитологии РАН (Земелько и др., 2011), культивировали в полной культуральной среде (ПКС) на основе DMEM/F12 (Gibco, Великобритания), содержащей

**Принятые сокращения:** МСК – мезенхимные стромальные клетки; ПКС – полная культуральная среда; энМСК – эндометриальные мезенхимные стромальные клетки; ЭФР – эпидермальный фактор роста; рЭФР – рецептор ЭФР.



**Рис. 1.** Колокализация внутриклеточного CD146 с маркерами рециклирующих и ранних эндосом. *а* – энМСК, меченые антителами против CD146 (зеленый) и Rab11, либо Rab5 (красный), *стрелками* отмечены колокализирующиеся везикулы. Масштабный отрезок на основных изображениях – 10 мкм, на врезках – 5 мкм. *б* – Результаты количественной оценки колокализации CD146 с Rab-белками представлены в виде графика типа “boxplot”, где отражены минимальное и максимальное значения, верхний и нижний квартили и медиана.

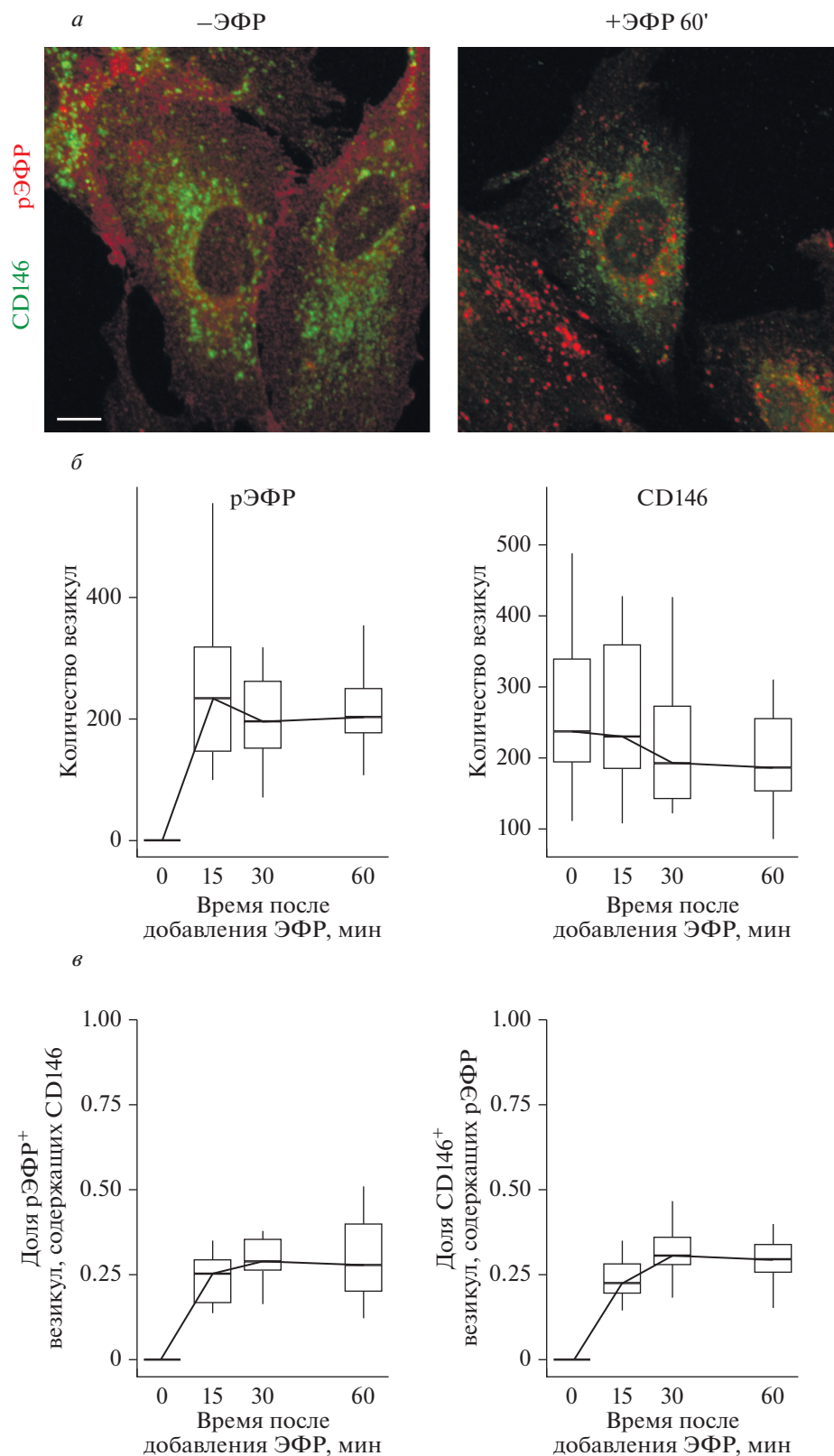
10% фетальной бычьей сыворотки (Biowest, Франция), GlutaMAX (Gibco, Великобритания) и антибиотик/антимикотик (Cargicor, Германия) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Иммунофлуоресцентное мечение.** Для иммунофлуоресцентного мечения энМСК сеяли на покровные стекла с плотностью 10 тыс. клеток/см<sup>2</sup>. На следующие сутки среду заменяли на ПКС, либо на ПКС, содержащую 10 нМ ЭФР (Molecular Probes, США). В этих средах клетки культивировали в течение указанного времени, после чего фиксировали формальдегидом в концентрации 3.6% (Sigma-Aldrich, США), приготовленным на PBS, в течение 15 мин. Далее все растворы готовили на основе PBS. После фиксации клетки промывали PBS и пермеабелизовали Brij56 в концентрации 0.05% (Sigma-Aldrich, США) 15 мин с последующими отмывками. Затем неспецифическое мечение блокировали с помощью 1%-ного бычьего сывороточного альбумина (БСА), в котором также разводили антитела: моноклональные антитела мыши против CD146 (клон P1H12, Cell Signaling (CS), Нидерланды, кат. № 13475) в разведении 1 : 50, поликлональные антитела кролика против рЭФР (CS, кат. № 4267), Rab5 (CS, кат. № 3547) или Rab11 (CS, кат. № 5589) в разведении 1 : 100. Клетки инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4°C. С вторичными антителами козы против антител мыши и кролика, конъюгированными с Alexa-488 и Alexa-568 соответственно (Molecular Probes, США), в разведении 1 : 200 и с добавлением Hoechst33342 в концентрации 1 мкг/мл (Molecular Probes, США) энМСК инкубировали 15 мин при 37°C. Затем клетки промывали PBS. Готовые препараты заключали в глицериновую среду, содержащую 1% DABCO (Sigma-Aldrich, США).

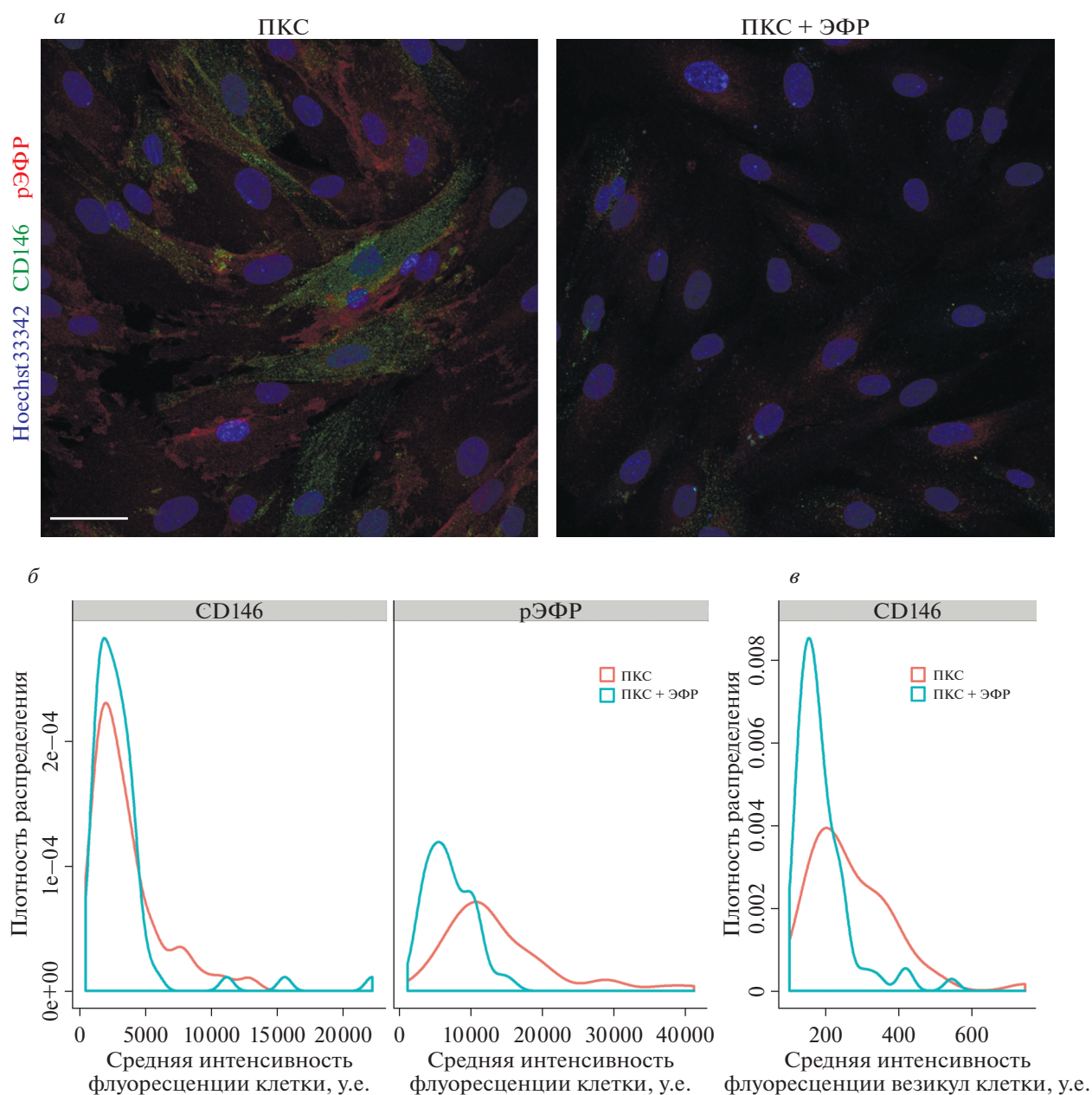
**Конфокальная микроскопия.** Микроскопические изображения получали с помощью конфокального микроскопа Olympus FLUOVIEW 3000 (Olympus, Япония) с объективом 40×/1.3 с масляной иммерсией. Для возбуждения флуоресценции использовали диодные источники света с длинами волн 405, 488 и 561 нм. Для регистрации флуоресценции в разных каналах использовали режим последовательного сканирования. Мощность лазеров и напряжение на детекторе оставались неизменными в течение эксперимента. “Стопки” изображений размером 1024 × 1024 пикселей получали в режиме *хуз* с шагом в 500 нм по оси *z*.

**Анализ изображений.** Изображения анализировали в программе Fiji на базе ImageJ 1.52p (Schindelin et al., 2012). Для сегментации везикул использовали метод вычитания из исходного изображения картинки, полученной с помощью медианного фильтра с экспериментально подобранным радиусом 10 пикселей (Dunn et al., 2011). Такая манипуляция позволяет увеличить разницу интенсивности пикселей между краем везикулы и прилегающей областью, что способствует более точной сегментации. Полученные в результате сегментации на проекциях максимальной яркости контуры везикул переносили на исходное изображение для оценки интенсивности флуоресценции везикул. Для оценки интенсивности флуоресценции контуры клеток выделяли на проекциях максимальной яркости вручную. Для оценки колокализации везикул на оптическом срезе в базальной части клетки определяли долю частичного совпадения контуров везикул одного канала с масками везикул другого канала.

**Анализ данных.** Полученные данные анализировали в программе RStudio (RStudio, США). Все экс-



**Рис. 2.** Внутриклеточная локализация CD146 в ходе эндоцитоза рЭФР. *а* – Эндоцитоз в энМСК был стимулирован добавлением ЭФР (10 нМ), затем клетки были зафиксированы в указанное время и помечены антителами против CD146 (зеленый) и рЭФР (красный), масштабный отрезок – 10 мкм; *б* – результаты оценки количества везикул, *в* – результаты количественной оценки колокализации CD146 с рЭФР. На графиках данные представлены в виде графика типа “boxplot”, где отражены минимальное и максимальное значения, верхний и нижний и медиана.



**Рис. 3.** Интенсивность флуоресцентного мечения, ассоциированного с CD146 и pЭФР, снижается в течение 5 сут культивирования в среде, содержащей ЭФР. *a* – энМСК культивировали в течение 5 сут в ПКС или в ПКС, содержащей 10 нМ ЭФР (ПКС+ЭФР), затем клетки были зафиксированы, помечены антителами против CD146 (зеленый) и pЭФР (красный) и окрашены Hoechst33342 (синий), масштабный отрезок – 50 мкм; на графиках представлена плотность распределения клеток по средней интенсивности флуоресцентного мечения целой клетки (*б*) или CD146<sup>+</sup> везикул (*в*).

перименты были повторены как минимум 3 раза, на иллюстрациях представлен репрезентативный эксперимент. В каждом эксперименте анализировали не менее 10–15 клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы обнаружили, что, в энМСК CD146 располагается не только на плазматической мембране, но и

во внутриклеточных везикулах (рис. 1*a*, 2*a*). Подобная картина описана для других молекул клеточной адгезии иммуноглобулинового суперсемейства, например, для PECAM-1 (Mammadzada et al., 2016). В среднем  $33.5 \pm 1.2\%$  этих везикул колокализуется с маркером ранних эндосом Rab5 и  $38.4 \pm 1.7\%$  – с маркером околядерного рециклирующего компартмента Rab11 (рис. 1*б*), но часть везикул не колокализуется с этими маркерами. Транспорт через Rab11<sup>+</sup>

компаратмент описан для многих молекул клеточной адгезии и играет регуляторную роль в миграции, взаимодействии клетки с матриксом, эпителиально-мезенхимальном переходе и установлении клеточной полярности (Nishimura, Sasaki, 2008). Природа везикул, не содержащих исследованные Rab-белки, нам неизвестна.

Под действием ЭФР происходит быстрая интернализация рЭФР в течение 15 мин с формированием в среднем  $251 \pm 44$  везикул, но количество CD146<sup>+</sup> везикул за то же время не увеличивается (рис. 2б). При этом около 25% рЭФР<sup>+</sup> везикул колокализуются с CD146 (рис. 2в). Оценка скорости интернализации CD146 с помощью антител, конъюгированных с флуорохромом (Nollet et al., 2017), показала, что заметное количество CD146<sup>+</sup> эндосом появляется лишь в течение 3 ч. Можно предположить, что интернализация CD146 и рЭФР происходит с помощью разных механизмов, хотя их колокализация может свидетельствовать как о неспецифическом включении CD146 в рЭФР<sup>+</sup> окаймленные ямки на мембране, так и о пересечении их путей в процессе слияний эндосом.

Полученные нами ранее данные указывали на снижение количества CD146 лишь на поверхности клеток в ходе длительного (5 сут) культивирования в среде, содержащей ЭФР. За это время клетки формируют плотный монослой. С помощью иммунофлуоресцентного анализа мы обнаружили, что снижается общее количество CD146 в клетке, в том числе и в везикулах, и это происходит во всей популяции энМСК (рис. 3). Кроме того, снижается и общая интенсивность флуоресценции рЭФР. Интересно, что на клетках эндотелия показано, что количество CD146 на поверхности клетки увеличивается при формировании монослоя (Bardin et al., 2001), тогда как в энМСК мы наблюдаем противоположный эффект. Вероятно, существуют тканеспецифические механизмы регуляции экспрессии CD146.

Таким образом, снижение количества CD146 при культивировании в среде, содержащей ЭФР, не связано с усилением интернализации CD146. Мы предполагаем, что CD146 и рЭФР, хоть и медленно, но деградируют в лизосомах в ходе культивирования с ЭФР, при том, что синтез новых молекул может быть подавлен.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00188).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении исследований не проводили экспериментов с участием животных или людей.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., Арцыбашева И.В., Зенин В.В., Кирсанов А.А., Бичева Н.К., Корсак В.С., Никольский Н.Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. Т. 53. № 12. С. 919. (Zemelko V.I., Grinchuk T.M., Domnina A.P., Artzibasheva I.V., Zenin V.V., Kirsanov A.A., Bichevaia N.K., Korsak V.S., Nikolsky N.N. 2012. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: Isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Cell Tiss. Biol. V. 6. № 1. P. 1.)
- Каменцева П.С., Кошеверова В.В., Харченко М.В., Истомина М.В., Семенов О.М., Шатрова А.Н., Домнина А.П., Корнилова Е.С. 2018. Доля клеток CD146<sup>+</sup> в популяции эндометриальных мезенхимных стромальных клеток снижается под действием ЭФР и TGF- $\alpha$ . Цитология. Т. 60. № 10. С. 801. (Kamentseva P.S., Kosheverova V.V., Kharchenko M.V., Istomina M.V., Semyonov O.M., Shatrova A.N., Domnina A.P., Kornilova E.S. 2018. CD146<sup>+</sup> cells content in endometrial mesenchymal stromal cells (enMSC) population decreased after treating with EGF and TGF- $\alpha$ . Tsitologiya. V. 60. № 10. P. 801.) <https://doi.org/10.7868/S0041377118100077>
- Bardin N., Anfosso F., Massé J.M., Cramer E., Sabatier F., Bivic A.L., Sampol J., Dignat-George F. 2001. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. Blood. V.98. P. 3677. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.13.3677>
- Dunn K.W., Kamocka M.M., McDonald J.H. 2011. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. Am. J. Physiol. V. 300. P. C723. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>
- Guezguez B., Vigneron P., Alais S., Jaffredo T., Gavard J., Mè R-M., Dunon D. 2006. A dileucine motif targets MCAM-1 cell adhesion molecule to the basolateral membrane in MDCK cells. FEBS Lett. V. 580. P. 3649. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.048>
- Mammadzada P., Gudmundsson J., Kvanta A., André H. 2016. Differential hypoxic response of human choroidal and retinal endothelial cells proposes tissue heterogeneity of ocular angiogenesis. Acta Ophthalmol. V. 94. P. 805. <https://doi.org/10.1111/aos.13119>
- Nishimura N., Sasaki T. 2008. Regulation of epithelial cell adhesion and repulsion: role of endocytic recycling. J. Med. Invest. V. 55. P. 9. <https://doi.org/10.2152/jmi.55.9>
- Nollet M., Stalin J., Moyon A., Traboulsi W., Essaadi A., Robert S., Malissen N., Bachelier R., Daniel L., Foucault-Bertaud A., Gaudy-Marqueste C., Lacroix R., Leroyer A.S., Guillet B., Bardin N. et al. 2017. A novel anti-CD146 antibody specifically targets cancer cells by internalizing the molecule. Oncotarget. V. 8. P. 112283. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22736>

- Paduano F., Marrelli M., Palmieri F., Tatullo M.* 2016. CD146 expression influences periapical cyst mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Rev. Rep.* V. 12. P. 592. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9674-4>
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P. et al.* 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* V. 9. P. 676. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sorrentino A., Ferracin M., Castelli G., Biffoni M., Tomaselli G., Baiocchi M., Fatica A., Negrini M., Peschle C., Valtieri M.* 2008. Isolation and characterization of CD146<sup>+</sup> multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp. Hematol.* V. 36. P. 1035. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.03.004>
- Ulrich C., Abruzzese T., Maerz J. K., Ruh M., Amend B., Benz K., Rolaufts B., Abele H., Hart M. L., Aicher W. K.* 2015. Human placenta-derived CD146-positive mesenchymal stromal cells display a distinct osteogenic differentiation potential. *Stem Cells Dev.* V. 24. P. 1558. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0465>
- Wang Q., Zhu F., Wang Z.* 2007. Identification of EGF receptor C-terminal sequences 1005-1017 and di-leucine motif <sup>1010</sup>LL<sup>1011</sup> as essential in EGF receptor endocytosis. *Exp. Cell. Res.* V. 313. P. 3349. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.06.014>

## Epidermal Growth Factor Causes the Decrease of CD146 Level Not Related to Its Internalization in Human Endometrial Mesenchymal Stromal Cells

R. S. Kamentseva<sup>a,\*</sup>, M. V. Istomina<sup>b</sup>, M. V. Kharchenko<sup>a</sup>, and E. S. Kornilova<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, 194064 Russia*

<sup>b</sup>*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, 195251 Russia*

<sup>c</sup>*Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, 199034 Russia*

\**e-mail: rkamentseva@yandex.ru*

We have previously shown using flow cytometry that during prolonged cultivation of endometrial MSC in the presence of EGF, the amount of CD146 on the plasma membrane decreased. One of the possible explanations is the increased non-specific CD146 internalization under such conditions. In this study using confocal microscopy we showed that in the control cells CD146 is localized not only on the plasma membrane, but also in vesicles where it partially colocalized with markers of early and recycling endosomes. However, stimulation of endocytosis of the EGF receptor does not affect the number of CD146<sup>+</sup> vesicles until at least 60 min, although the number of endosomes containing the EGF receptor increases significantly. In addition, only small portion of EGFR-positive endosomes contained CD146. Moreover, during cultivation in the presence of EGF for 5 days the total fluorescence intensity of both CD146 and the EGF receptor in the whole cell decreases. Thus, the decrease in the amount of CD146 during prolonged incubation in the presence of EGF is not associated with an increase of its endocytosis.

**Keywords:** CD146, human mesenchymal stromal cells, epidermal growth factor