

УДК 576.3

## ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЕ ФАГОСОМ

© 2004 г. П. Г. Бут, Р. А. Муравьев, В. А. Фомина, В. В. Роговин

Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, 119991 Москва, ул.Косыгина, 4  
E-mail: rogovin@orc.ru

Поступила в редакцию 15.10.2003 г.

Превращение новообразованных фагосом в формы, компетентные к взаимодействию с антимикробными органеллами фагоцитов – пероксидазосомами, зависит от ряда реакций между фагосомой и другими вакуолярными органеллами. Посредством временных контактов фагосома неоднократно взаимодействует с ранними и поздними эндосомами, приобретая и теряя сложный набор полипептидов. Кроме того, некоторые полипептиды удаляются из фагосомы путем рециклизации. Новые белки поступают в фагосомы из органелл биосинтетического пути или путем рекрутирования из цитоплазмы. Фагосомы, кроме того, получают белки в процессе взаимодействия с эндосомами. Общим результатом такого процесса трансформации представляется приобретение новых качеств, придающих им способность реагировать с пероксидазосомами.

Крупные микроорганизмы за немногими исключениями поступают в клетку посредством рецепторного фагоцитоза с образованием фагосомы. По классификации Гриффитса (Griffiths, 1996) фагосома представляет собой типичный пузырек, т.е. структуру, создаваемую *de novo*, подвергающуюся необратимым биохимическим изменениям – созреванию. Она принципиально отлична от постоянных клеточных структур, напр., аппарата Гольджи или эндосом, которые в процессе митоза передаются в определенном материальном количестве в дочерние клетки. В фагоцитах процесс созревания фагосом сопровождается развитием аппарата генерации токсических оксидрадикалов (Муравьев, Роговин, 2001) и заканчивается уничтожением фагоцитированных микроорганизмов посредством взаимодействия с антимикробными органеллами – пероксидазосомами (Бут и др., 2002; Муравьев и др., 2002). В ходе созревания фагосомы реагируют со всеми элементами эндоцитозной системы, т.е. с ранними и поздними эндосомами (Robinson *et al.*, 1996). После серии таких реакций фагосома преобразуется в структуру, способную реагировать с пероксидазосомами. Фагосомы, содержащие латекс, непрерывно изменяются в период от 20 мин до 48 ч (Desjardins, Scianimanico, 1998). Эта органелла никогда не достигает стабильного конечного состояния. Это возможно лишь после реакции пероксидазосом с содержащими микроорганизмы фагосомами. За исключением аннексина II и синаптобrevина (белка везикулярного SNARE), содержание которых на протяжении 48 ч остается постоянным, количество эндосомных малых ГТФаз (Rab 5 и Rab 7), трех связывающих ГТФ полипептидов, тримерных Г-белков, аннексина VI и Rap I (белка, связанного с оксидазным комплексом фагоцита) никогда не бывает одинаковым в любой отрезок времени. Отмечено и сильное изменение фосфолипидного состава фагосом. Если в ранних фагосомах (до 60 мин) отноше-

ние сфингомиелина к фосфатидилхолину равно 0.47, то в поздних (до 24 ч) – 1.51. Все это имеет значение для последующего взаимодействия с пероксидазосомами. По фосфолипидному составу ранние фагосомы похожи на плазмалемму и ранние эндосомы. Изменение состава, возможно, зависит от фосфолипазы D, необходимой для созревания фагосом (Meléndez *et al.*, 1998) и функционирования особого белка – переносчика липидов, описанного в плазмалемме (Cockcroft, 1999). От липидного состава мембран фагосом зависит стабильная генерация супероксида ( $O_2^{\cdot -}$ ), необходимого для нормального функционирования миелопероксидазной системы после их реакции с фагосомой, содержащей микроорганизмы.

В самом начале биохимической трансформации посредством рециклизации из фагосом удаляется ряд молекул с поступлением из цитозоля новых белков, в результате чего фагосома становится способной к установлению контакта с ранней эндосомой. Затем вследствие множественных контактов с эндосомами начинает резко изменяться белково-липидный состав фагосом.

Особое значение имеет тип фагоцитируемого микроорганизма. Содержащие микобактерии фагосомы не приобретают  $H^+$  – АТФазу, необходимую для регуляции внутрифагосомной кислотности (Sturgill–Koszycki *et al.*, 1994). Необходимый для процессов слияния Rab 5 появляется на самой ранней стадии развития фагосомы, куда он поступает вместе с клеточной мембраной. Другие мембранные – рецепторы Fc, трансферрина и маннозы – исчезают из фагосом в течение 30 мин после их образования. *In vitro* установлена реакция ранних фагосом и ранних эндосом (Mellman, 1995). Это происходит в присутствии цитозоля, АТФ и NSF, т.е. АТФазы, участвующей в белок-белковых взаимодействиях. При этом под реакцией следует пони-

мать обратимые контакты с эндосомами по типу "kiss and run" (поцелуй и беги) (Storgie, Desjardins, 1996). При таких контактах создаются временные фузионные поры (McBride *et al.*, 1999). Именно, через них происходит взаимодействие двух органелл, а не физическое слияние с появлением смешанной органеллы. В таком контексте следует употреблять термин слияние. Для "слияния" ранних фагосом с ранними эндосомами необходим Rab 5 (Beron *et al.*, 1995). На ранних фагосомах присутствуют несколько гетеротримерных Г-белков, которые совместно с Rab 5 регулируют слияние ранних фагосом с эндосомами. От содержания Rab 5 зависит способность к такому слиянию (Robinson *et al.*, 1996). Действительно, ингибитор диссоциации гуаниннуклеотида (Rab GDJ) нарушает такое слияние (Funato *et al.*, 1997). Это неудивительно, поскольку этот ингибитор подавляет везикулярный транспорт, удаляя Rab-белки с мембран. Для слияния необходима и АТ-Фаза (NSF), поскольку вместе с белками известного аппарата SNARE является участником докинг/фузионного процесса, процесса примыкания/слияния. На мембране фагосомы описаны такие белки SNARE как синтаксины-2,-3 и -4 (Hackam *et al.*, 1996).

Созревание фагосом сопровождается обширной перестройкой клеточного цитоскелета. В этой связи важное значение приобретает присутствие на фагосоме белков, реагирующих с актином, а именно, моззина, альфа-актинина и аннексинов (Majced *et al.*, 1998; Desjardins, Scianimanico, 1998). С возрастанием концентрации  $Ca^{2+}$  аннексины соединяются с фосфолипидами с их видоизменением (Pittis, Garcia, 1999). Наибольшая концентрация  $Ca^{2+}$  обнаружена в околофагосомном пространстве (Stendahl *et al.*, 1994). Для нормального развития фагосом необходимы и другие связывающие  $Ca^{2+}$  белки и, особенно, кальмодулин и его киназа (Malik *et al.*, 2000). Передача белков из эндосом в фагосомы носит избирательный характер. Из ранних эндосом поступает Rab 5, а не Rab 7. Вероятно, в этой связи играют роль описанные на фагосомах термошоковые белки, в частности hsc70 (Desjardins, Scianimanico, 1998). Такого рода белки, как известно, играют роль хаперонов, что важно при поступлении белков в фагосомы.

Наконец, фагосомы сливаются с поздними эндосомами. В макрофагах мышей отмечалась быстрая мобилизация поздних эндосом к содержащим грибки фагосомам (Kaposzta *et al.*, 1999). При реакции с поздними эндосомами фагосомы приобретают Rab 7 (Rabinowitz *et al.*, 1992). Но позднее с их поверхности исчезают Rab 5, а затем и Rab 7, а вместо них появляются гликопротеины, ранее считавшиеся лизосомными.

Конечная цель трансформации или развития содержащих микроорганизмы фагосом в профессиональных фагоцитах заключается в приобретении ими способности реагировать с ключевыми антимикробными органеллами – пероксидазомами.

Поэтому для успешного выживания микроорганизма в фагоците необходимо любыми способами затормозить или остановить развитие фагосомы. Именно так действуют фагоцитированные токсоплазмы (Joiner, Debremetz, 1993), лейшмании и микобактерии (Russell, 1995), вирулентные штаммы гонококков (Rudel, Mayer, 1999). Последние выживают с маркерными характеристиками ранних эндосом. Протозойные паразиты способны переживать в макрофагах с использованием определенной логистики (Bogdan, Dollinghoff, 1999). Так, фагосома преобразуется в паразитофорную вакуоль. При помощи содержащегося в мембране паразита АТФазного протонного насоса создается протонный градиент для активного транспорта питательных веществ, необходимых для размножения паразита (Zilberstein, Dwyer, 1988). Нужные материалы приобретаются путем автофагоцитоза, что показано для содержащей лейшмании паразитофорной вакуоли (Schaible *et al.*, 1999). Присутствующая на поверхности лейшманий кислая фосфатаза блокирует генерацию  $O_2^-$ , дефосфорилируя компоненты НАДФ-Н оксидазного комплекса мембраны фагосом (Remaley *et al.*, 1985). Фосфогликан оболочки паразита ингибирует активность протеинкиназы-С, от которой зависит функция оксидазного комплекса мембраны фагосомы (Neely, Turco, 1987).

Паразитофорную вакуоль создают и другие облигатные протозойные паразиты, в частности, токсоплазмы (Dobrowolsky, Sibley, 1996). Образованная ими паразитофорная вакуоль не сливается с любыми эндосомами (Mordue *et al.*, 1999). Содержащиеся в ней токсоплазмы делятся и в конечном итоге лизируют клетку. При построении такой вакуоли происходит исключение трансмембранных белков, но с избирательным накоплением белков, прикрепленных к мембране через гликозилфосфатидилинозитольный "якорь", и особых липидных микромолекул. Все они участвуют в формировании такой паразитофорной вакуоли (Varma, Mayor, 1998). В результате таких сортировочных процессов образуемая вакуоль становится сегрегированной от эндосомной системы. В отличие от лейшманий токсоплазмы создают такую структуру сразу и не попадают даже в фагосому.

Напротив, микобактерии успешно паразитируют в макрофагах, нарушая созревание фагосом. Содержащие живые микобактерии фагосомы быстро приобретают маркеры ранних эндосом (Malik *et al.*, 2000, 2001). Микобактерии фагоцитируют независимо от сыворотки, но с участием рецепторов комплемента (Ernst, 1998). Инфицирование микобактериями макрофагов не сопровождается возрастанием внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ , а это коррелирует с задержкой развития фагосом (Malik *et al.*, 2000, 2001). Для выживания микобактерий в макрофагах приобретает критическое значение подавление зависимой от  $Ca^{2+}$  внутриклеточной сигнализации, так

как при введении  $\text{Ca}^{2+}$  происходит восстановление антимикробной активности и нормальное созревание фагосом с взаимодействием с эндосомной системой. В основе туберкулезной инфекции лежит, возможно, блокада зависимых от  $\text{Ca}^{2+}$  путей сигнализации с прекращением нормального созревания фагосом. Микобактерии выживают в фагосомах с маркерными характеристиками ранних эндосом.

Как оказалось, для выживания микобактерий в фагосомах макрофагов имеет значение способ проникновения в клетку. Микобактерии выживают, если они поступают в клетку с помощью рецепторов комплемента (Clemens, 1996). Но если бактерии опсонизированы, то они поступают в клетку через рецепторы Fc(gamma), а это сопровождается нормальным развитием фагосом. Таким образом, пути сигнализации с лигандированных рецепторов комплемента и Fc(gamma) разные и связаны с развитием фагосом. В связи с нарушением метаболизма  $\text{Ca}^{2+}$  и сопутствующим ему развитием фагосом особое внимание обращают на кальмодулин и его киназу (Malik *et al.*, 2001). С возрастанием уровня  $\text{Ca}^{2+}$  кальмодулин поступает в фагосомы, содержащие убитые микобактерии. Фагосомы с живыми бактериями содержат очень мало кальмодулина, а повысить его содержание можно, вводя в макрофаг  $\text{Ca}^{2+}$ . При ингибировании кальмодулина нарушается созревание фагосом. То же самое имеет место с выживанием микобактерий в макрофагах человека при блокировании активности киназы кальмодулина. Все это указывает на новую роль кальмодулина и его киназы в развитии фагосом.

В связи с метаболизмом  $\text{Ca}^{2+}$  при микобактериальной инфекции было обращено внимание на эффект экстраклеточного АТФ (Kusner, Adams, 2000; Kusner, Varten, 2001). При стимуляции клеток АТФ через пуриnergичные рецепторы растет концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  и активность фосфолипазы D, что сопровождается нормальным развитием фагосом с последующим уничтожением микобактерий. Оказалось, что и  $\text{Ca}^{2+}$ , и фосфолипаза D необходимы для созревания фагосом.

При поступлении в клетку протозойных паразитов с участием рецепторов комплемента происходит нарушение развития фагосом (Greenberg, Silverstein, 1993; Greenberg, 1999). И в этом случае отмечен дефект в функционировании кальмодулина и его киназы. Сам  $\text{Ca}^{2+}$  выступает в роли многофункционального вторичного медиатора, регулирующего антимикробные реакции (Tse, Tse, 1999), способствующего последующему взаимодействию фагосомы с пероксидазосомой фагоцита. Успешная антимикробная активность фагоцита должна сопровождаться нормальным развитием фагосом с многократными контактами с эндосомами, что придает способность фагосомам реагировать с антимикробными органеллами – пероксидазосомами. Во избежание такого исхода некоторые патогены используют логистику, необходимую для его выжива-

ния. В основном она заключается в полной или частичной сегрегации от эндосомной системы. Эндосомная система играет исключительную роль в развитии антимикробной реакции фагоцита. Для некоторых патогенов это положение верно. Выяснение такого рода взаимодействий фагосом, содержащих различного типа микроорганизмы, имеет важное значение для изучения функционирования эндосомной системы и связи фагосом с антимикробными органеллами – пероксидазосомами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бут П.Г., Муравьев Р.А., Фомина В.А., Роговин В.В. Антимикробная активность миелопероксидазы пероксидазосом нейтрофила // Изв. АН Сер. биол. 2002. № 3. С. 266–270.
- Муравьев Р.А., Бут П.Г., Фомина В.А., Роговин В.В. Механизм бактерицидной активности в фагосомах нейтрофилов // Изв. АН Сер. биол. 2002. № 4. С. 437–441.
- Муравьев Р.А., Роговин В.В. Химические основы неспецифического иммунитета // Изв. АН Сер. биол. 2001. № 3. С. 284–292.
- Beron W., Alvarez-Dominquez C., Mayorga L., Stahl P.D. Membrane trafficking along the phagocytic pathway // Trends Cell Biol. 1995. V. 5. № 1. P. 100–104.
- Bogdan C., Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? // Parasitol. Today. 1999. V. 15. № 1. P. 22–28.
- Clemens D.L. Characterization of the mycobacterium phagosome // Trends Microbiol. 1996. V. 4. № 1. P. 113–118.
- Cockroft S. Mammalian phosphatidylinositol transfer proteins emerging roles in signal transduction and vesicular traffic // Chem. Phys. Lipids. 1999. V. 98. № 1/2. P. 23–33.
- Desjardins M., Scianimanico S. Isolation of phagosomes from professional and nonprofessional phagocytes // Cell Biology. A Lab. Handbook. Sec. Ed. / Ed. Celis J.E. San Diego. Academic Press. 1998. V. 2. P. 75–80.
- Dobrowolsky J.M., Sibley L.D. Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the action cytoskeleton of the parasite // Cell. 1996. V. 84. № 3. P. 933–939.
- Ernst J. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis* // Infect. Immun. 1998. V. 66. № 7. P. 1227–1281.
- Funato K., Beron W., Yang C.Z., Mukhopadhyay A., Stahl P.D. Reconstitution of phagosome-lysosome fusion in streptolysin o-permeabilized cells // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 26. P. 16147–16151.
- Greenberg S. Biology of phagocytosis // Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates 3 rd. / Ed. Gallin J., Snyderman R. Lippincott, Williams, and Wilkins. Philadelphia. 1999. P. 681–702.
- Greenberg S., Silverstein S.C. Complement receptors // Fundamental Immunology / Ed. Paul W.E. Raven Press. N.Y. 1993. P. 941–957.
- Griffiths G. On vesicles and membrane compartments // Protoplasm. 1996. V. 195. № 1. P. 37–58.
- Hackam D.J., Rotstein O.D., Zhang W.-J., Gruenheid S., Gros P., Grinstein S. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1(Nramp1) impairs phagosome acidification // J. Exp. Med. 1998. V. 188. № 2. P. 351–364.
- Joiner K.A., Dubremetz J.F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties // Infect. Immun. 1993. V. 61. № 7. P. 1169–1178.

- Kaposzta R., Marioni L., Hollinshead M., Gordon S., da Silva R.P.* Rapid recruitment of late endosomes and lysosomes in mouse macrophages ingesting *Candida albicans* // *J. Cell Sci.* 1999. V. 112. № 19. P. 3237–3248.
- Kusner D.J., Adams J.* ATP-induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D // *J. Immunol.* 2000. V. 164. № 2. P. 379–388.
- Kusner D.J., Barton J.A.* ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent *Mycobacterium tuberculosis* via calcium-dependent phagosome-lysosome fusion // *J. Immunol.* 2001. V. 167. № 16. P. 3308–3315.
- Majeed M., Perskvist N., Enst J.D., Orselins K., Stendahl O.* Roles of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* in human neutrophils // *Microb. Pathol.* 1998. V. 24. № 2. P. 309–320.
- Malik Z., Denning G.M., Kusner D.J.* Inhibition of  $Ca^{2+}$  signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival with human macrophages // *J. Exp. Med.* 2000. V. 191. № 2. P. 287–302.
- Malik Z., Jyer S.S., Kusner D.J.* *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages // *J. Immunol.* 2001. V. 166. № 11. P. 3392–3401.
- McBride H.M., Rybin V., Murphy C., Giner A., Teasdale R., Zerial M.* Oligomeric complexes link Rab 5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13 // *Cell.* 1999. V. 98. № 2. P. 377–386.
- McNeely T.B., Turco S.J.* Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 148. № 3. P. 653–659.
- Melendez A., Floto R.A., Gillooly D.J., Harnett M.M., Allen J.M.* Fc( $\gamma$ )R1 coupling to phospholipase D initiated sphingosine kinase-mediated calcium mobilization and vesicular trafficking // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 4. P. 9393–9401.
- Mellman J.* Enigma variations: Protein mediators of membrane fusion // *Cell.* 1995. V. 82. № 4. P. 869–872.
- Mordue D.G., Desai N., Dustin M., Sibley L.D.* Invasion of *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring // *J. Exp. Med.* 1999. V. 190. № 12. P. 1783–1792.
- Pittis M.G., Gatica R.C.* Annexin VII and XI are present in a human macrophage-like cell lines: differential translocation on FcR-mediated phagocytosis // *J. Leuk. Biol.* 1999. V. 66. № 4. P. 845–850.
- Rabinowitz S., Horstmann H., Gordon S., Driffiths G.* Immunocytochemical characterization of the endocytic and phagolysosomal compartments in peritoneal macrophages // *J. Cell Biol.* 1992. V. 116. № 1. P. 95–112.
- Remaley A.T., Glew R.H., Kuhns D.B., Basford R.E., Wagoner A.S., Ernst L.A., Pope M.B.* *Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production // *Exp. Parasitol.* 1985. V. 60. № 2. P. 331–337.
- Robinson M.S., Watts C., Zerial M.* Membrane dynamics in endocytosis // *Cell.* 1996. V. 84. № 1. P. 13–21.
- Rudel T., Meyer T.F.* Infection of human cells by *Neisseria*. A paradigm of ancestral apoptosis? // *Nova Acta Leopoldina.* 1999. V. 78. № 307. P. 71–86.
- Russell D.G.* *Mycobacterium* and leishmania: stowaways in the endosome network // *Trends Cell Biol.* 1995. V. 5. № 1. P. 125–128.
- Schaible U.E., Schlesinger P.H., Steinberg T.H., Mangel W.F., Kobayashi T., Russell D.G.* Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cytosol via two independent routes // *J. Cell Sci.* 1999. V. 112. № 3. P. 681–693.
- Stendahl O., Krause K.H., Krischer J., Jerstrom P., Theler J.M., Clark P.G., Carpenter J.L.* Redistribution of intracellular  $Ca^{2+}$  stores during phagocytosis in human neutrophils // *Science.* 1994. V. 265. № 251. P. 1439–1441.
- Storrie B., Desjardins M.* The biogenesis of lysosomes: is it a kiss and run, continuous fusion and fission process? // *Bio Essay.* 1996. V. 18. № 3. P. 895–903.
- Sturgill-Koszycki S., Schlesinger P.H., Chakroborty P., Haddik P.L., Collins H.L., Fok A.K., Allen R.D., Gluck S.L., Heuser J., Russell D.G.* Lack of acidification in mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase // *Science.* 1994. V. 263. № 247. P. 678–681.
- Tse F.W., Tse A.* Regulation of exocytosis via release of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores // *Bio Essay.* 1999. V. 21. № 3. P. 861–869.
- Varma R., Mayor S.* GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface // *Nature.* 1998. V. 394. № 321. P. 798–801.
- Zilberstein D., Dwyer D.M.* Identification a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the protozoan parasite *Leishmania donovani* // *Biochem. J.* 1988. V. 256. № 1. P. 13–21.

## Intracellular Transformation of Phagosomes

**P. G. But**, R. A. Murav'ev, V. A. Fomina, and V. V. Rogovin

*Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*  
e-mail: rogovin@orc.ru

**Abstract**—The transformation of nascent phagosomes into forms capable of interacting with antimicrobial organelles of phagocytes, peroxisomes, depends on certain interactions between phagosomes and other vacuolar organelles. Phagosomes repeatedly interact with early and late endosomes through temporary contacts, which allows them to gain and lose complex sets of proteins. In addition, certain polypeptides are eliminated from phagosomes through recycling. New proteins enter phagosomes from the organelles of the biosynthetic pathway or are recruited from the cytoplasm. In addition, phagosomes receive proteins in the process of interaction with endosomes. The overall result of such transformation is acquiring new properties that make possible their interaction with peroxisomes.