

УДК 57.085.23:57.044

МИКРОТРУБОЧКИ И АКТИНОВЫЕ ФИЛАМЕНТЫ УЧАСТВУЮТ В ОБЕСПЕЧЕНИИ СЛИЯНИЙ И РАЗДЕЛЕНИЙ ВЕЗИКУЛ НА ЭНДОЦИТОЗНОМ ПУТИ ЭФР-РЕЦЕПТОРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

© 2020 г. М. В. Харченко^{1,*}, М. В. Злобина^{1,3}, Р. С. Каменцева¹, Е. С. Корнилова^{1,2}

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

³Центрально-Европейский Технологический Институт, Университет Масарика, Брно, 62500 Чехия

*E-mail: mariannakharchenko@gmail.com

Поступила в редакцию 02.02.2020 г.

После доработки 21.02.2020 г.

Принята к публикации 21.02.2020 г.

Исследовали влияние разборки микротрубочек нокодазолом и деполимеризации актинового цитоскелета цитохалазином D, а также их сочетанного действия на динамику эндоцитоза комплексов эпидермального фактора роста и его рецептора в клетках HeLa. С помощью конфокальной микроскопии показали, что в клетках, фиксированных через разные промежутки времени после стимуляции эндоцитоза, на его ранних стадиях имеет место высокая степень колокализации рецептора с маркером ранних эндосом EEA1, коррелирующая с укрупнением эндосом в результате слияний, и перемещение эндосом на более поздних стадиях в околядерную область (ОЯО). Перемещение в ОЯО зависит от микротрубочек. Нокодазол не препятствует формированию эндосом, но блокирует их слияния и перемещение. В то же время разрушение актиновых микрофиламентов, не нарушая процесса EEA1-зависимых слияний и транспортировки эндосом в ОЯО, приводит к укрупнению эндосом, препятствуя разделению ранних эндосом и созревших мультивезикулярных эндосом. При разрушении обоих типов цитоскелета вновь сформированные рецептор-содержащие эндоцитозные пузырьки не укрупняются, не созревают и не перемещаются в ОЯО. Прижизненная съемка эндосом с ЭФР, связанным с квантовыми точками, подтвердила данные, полученные на фиксированных клетках, и позволила проанализировать характер перемещений эндосом. Оказалось, что редкие периоды быстрого линейного пробега сменяются длительными хаотическими колебаниями в пределах небольшой области, при этом направления линейных пробежек могут быть совершенно различными, а не только в сторону ЦОМТ. Наши данные позволяют предположить, что роль микротрубочек заключается не только в обеспечении перемещения эндосом, но и в обеспечении платформы для их слияний. Это предположение может объяснить и кажущиеся хаотичными перемещения эндосом, позволяющие повысить вероятность их контактов и, следовательно, слияний.

Ключевые слова: рецептор ЭФР, эндоцитоз, эндосомы, слияния, EEA1, микротрубочки, микрофиламенты, нокодазол, цитохалазин D

DOI: 10.31857/S004137712005003X

Система тубулиновых микротрубочек и актиновых микрофиламентов выполняет в эукариотических клетках множество функций — от придания механической прочности клетке до участия в ее делении. В культивируемых эпителиальных клетках система микротрубочек организована радиально, имея центр схождения (ЦОМТ) в околядерной области, в непосредственной близости от аппарата Гольджи и большей части лизосом. В связи с этим сложилось устойчивое представление об интерфаз-

ных микротрубочках как о “рельсах”, обеспечивающих перемещения везикул и аггросом на большие (по меркам клетки) расстояния с помощью моторных белков. Такая организация позволяет упорядочивать процессы эндоцитоза, в ходе которых везикулы с грузом, формируемые практически на всей поверхности плазматической мембраны, могут концентрироваться в околядерной области (ОЯО), что повышает вероятность их взаимодействия, в частности, с лизосомами, и увеличивает эффективность деградации груза (Matteoni, Kreis, 1987). Радиальные микротрубочки также обеспечивают эффективность доставки экзоцитозных пузырьков и секреторных гранул от транс-сети аппарата Гольджи к плазматической мембране.

Принятые сокращения: КТ — квантовые точки; ОЯО — околядерная область; ЦОМТ — центр организации микротрубочек; ЭФР — эпидермальный фактор роста; EEA1 — early endosomal autoantigen 1; TSA — трихостатин А; ЭФР-КТ — эпидермальный фактор роста, связанный с квантовой точкой.

Таким образом, за микротрубочками закрепились роль основных “транспортных артерий” в клетках разных типов. В связи с этим в последние годы интерес исследователей сместился в сторону анализа взаимодействия и роли актиновых филаментов в транспортных процессах (Delevoeye et al., 2016; MacDonald et al., 2018; Muriel et al., 2016), в том числе в ремоделировании мембран везикул в ходе их слияний, тубуляции и разделения.

Однако целый ряд вопросов, часто парадоксальных, остался без ответа. Так, можно считать установленным, что эндосомы, сформировавшиеся в ходе рецептор-опосредованного эндоцитоза, перемещаются от периферии в околядерную область клетки с помощью моторного белка динеина. По существующим оценкам, динеин развивает скорость, при которой он способен преодолеть вместе с грузом расстояние от плазматической мембраны до ОЯО за 1–5 мин (Минин, Кулик, 2004). Однако на практике это расстояние проходится в среднем за 20–40 мин. Общей точки зрения на то, чем обусловлен этот “временной парадокс кластеризации эндосом”, не существует.

Эндоцитоз рецептора ЭФР является классической моделью так называемого деградационного пути (Veguinet et al., 1984; Корнилова и др., 1987). После связывания ЭФР с рецептором на мембране формируются везикулы, которые доставляются ЭФР-рецепторные комплексы в так называемые ранние эндосомы – популяцию везикул, осуществляющих сортировку входящих грузов. В ходе этого процесса часть из них возвращается на мембрану (рециклирует), тогда как везикулы с направляемыми на деградацию грузами (ЭФР-рецепторные комплексы в их числе) увеличиваются в размерах за счет слияния друг с другом. Слияния обеспечиваются за счет того, что ранние эндосомы несут все белки, необходимые для слияний, в том числе белок заякоривания EEA1 (early endosomal autoantigen 1). Этот белок считают классическим маркером ранних эндосом (Simonsen et al., 1998). В результате слияний размер эндосом увеличивается, за счет чего создается избыток мембраны, позволяющий в дальнейшем формировать внутренние пузырьки эндосом, куда отсортировываются грузы, которые после слияния с лизосомами подвергаются деградации (Babst, 2011). Такие эндосомы с внутренними пузырьками называют мультивезикулярными телами, и часто рассматривают как поздние эндосомы.

В целом описанный процесс называется созреванием. Зрелые поздние эндосомы теряют способность сливаться с ранними эндосомами, но могут взаимодействовать с лизосомами, формируя, согласно работам группы Луцио, гибридные эндолизосомы (Luzio et al., 2001). Таким образом, в ходе эндоцитоза рецептор-содержащие эндосомы укрупняются в размерах на раннем этапе и сливаются с лизосомами на позднем, перемещаясь при этом из периферической области клетки в ОЯО.

В настоящей работе, используя нокодазол и цитохалазин Д, деполимеризующие микротрубочки и актиновые филаменты соответственно, мы рассмотрели влияние целостности этих структур на такие аспекты эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в клетках HeLa, как характер перемещения, слияния (разделения) и созревания рецептор-содержащих эндосом.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Культивирование клеток. В работе использованы клетки карциномы шейки матки человека HeLa, полученные из Европейской коллекции клеточных культур. HeLa, экспрессирующие GFP- α -тубулин (линия HeLa H5-1), были любезно предоставлены О.В. Микитась (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. Чумакова, РАМН, Москва). Клетки культивировали в среде ДМЕМ (ПанЭко, Россия), содержащей 8% фетальной сыворотки (РАА, Австрия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для клеток линии HeLa H5-1 в среду также добавляли 500 мкг/мл генетицина (G418) (Mediatech, США). Клетки растили до 60–70% монослоя. Для экспериментов с иммунофлуоресцентным окрашиванием клетки сеяли на покровные стекла размером 10 × 10 мм, а для прижизненной микроскопии – в камеры с тонким стеклянным дном (Nunc Surface, Дания).

Лиганды и их производные. Для стимуляции эндоцитоза использовали рекомбинантный ЭФР (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 50 нг/мл. Для прижизненной микроскопии лиганд метили с помощью квантовых точек (КТ) на основе CdSe/ZnS, покрытых полиэтиленгликолем (с пиками эмиссии в красной (КТ655) области спектра) и конъюгированных со стрептавидином (Invitrogen, США). Комплексы ЭФР-КТ формировали, инкубируя 4 нМ биотинилированного ЭФР (Invitrogen, США) с КТ в концентрации 1 нМ в среде ДМЕМ, содержащей 0.1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 20 мМ HEPES, pH 7.4 (среда А), в течение 30 мин при 4°C, при постоянном покачивании.

Антитела. Для мечения рецептора ЭФР использовали поликлональные антитела кролика (Cell Signaling, США) в разведении 1 : 100 и моноклональные мышинные: против α -тубулина (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 2000, против EEA1 (Transduction Lab, США) в разведении 1 : 1000 и антитела, узнающие LAMP1 (маркер лизосом) (Abcam, Англия) в разведении 1 : 200. В качестве вторых антител использовали GAR-Alexa Fluor 568, GAM-Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США), GAM-Cy3 (Jackson, США) в разведении 1 : 500. Антитела разводили в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS, pH 7.4), содержащем 1% БСА.

Стимуляция эндоцитоза. Использовали схему предварительного связывания: ЭФР инкубировали с клетками 60 мин при 4°C для достижения равновесия

ного связывания лиганда с рецепторами. В таких условиях интернализация лиганд-рецепторных комплексов не происходит. После отмывки с помощью PBS не связавшегося лиганда эндоцитоз стимулировали переводом клеток в среду А, не содержащую ЭФР, при 37°C на указанное время, что позволяло инициировать синхронную волну событий.

Ингибиторы. Для деполимеризации МТ клетки инкубировали в среде А, содержащей 20 мкМ нокодазола (Sigma-Aldrich, США), для стабилизации – 500 нг/мл трихостатина А (TSA) (Sigma-Aldrich, США). Для разрушения актиновых микрофиламентов использовали цитохалазин Д (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 10 мкМ. Ингибиторы добавляли к клеткам за 30 мин до стимуляции эндоцитоза по отдельности или в комбинации. Стимуляцию эндоцитоза проводили при постоянном присутствии ингибиторов в рабочей среде.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток. После окончания инкубации покровные стекла трижды промывали PBS, после чего фиксировали 3.6%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США) в PBS в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали 5 раз по 3 мин раствором PBS и проводили пермеабиллизацию в течение 15 мин при комнатной температуре раствором 0.5%-ного Тритона X-100 в PBS (Sigma-Aldrich, США). Неспецифическое мечение блокировали 1%-м раствором БСА в PBS в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее клетки инкубировали с первыми антителами в течение ночи при 4°C. Далее промывали 5 раз по 2 мин раствором PBS. Инкубацию со вторыми антителами проводили 15 мин при 37°C в темноте. Затем клетки промывали, как описано выше. Препараты монтировали с использованием глицериновой заливки, содержащей 1% DABCO (Sigma-Aldrich, США).

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Распределение флуоресцентно меченых белков в клетках исследовали с помощью лазерных сканирующих конфокальных микроскопов Leica TCS SL и Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) с иммерсионным масляным объективом с увеличением 100 × 1.40 или 63 × 1.32. Прижизненные наблюдения проводили с помощью микроскопа Leica TCS SP5 с термостатируемой камерой. Зеленую флуоресценцию возбуждали аргоновым лазером (488 нм), красную – He-Ne-лазером (543 нм). Флуоресценцию на разных длинах волн сканировали отдельно с помощью программы Leica Confocal Software. Размер изображения был 1024 × 1024 пикселей, частота сканирования 400–700 Гц. Интервал между съемкой кадров при прижизненной микроскопии составлял 1.5–3 с. Проводили 2- или 3-кратное усреднение по линиям.

Анализ и обработка изображений. Полученные изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ 1.40g (National Institute of Health, США). Для оценки колокализации использовали плагин JACoP

для ImageJ (Bolte, Cordelières, 2006). В расчет брали коэффициент Мандерса M1, отражающий долю пикселей с красным сигналом, содержащих и зеленый сигнал, по отношению к общему сигналу с красного канала (Manders et al., 1993). Для построения треков эндосом использовался плагин для ImageJ Manual Tracking (Fabrice Cordeli, Institut Curie, Франция).

Математическая обработка данных по перемещению эндосом. Для исследования направленных перемещений эндосом их координаты пересчитывали с целью изменения их ориентации по отношению к ЦОМТ. При этом строили дополнительную ось 0x' (между координатой начала движения каждой конкретной эндосомы и ЦОМТ), по отношению к которой полученные ранее координаты ху преобразовывались по формуле параллельного сдвига и поворота осей координат:

$$\begin{aligned}x' &= (x - a) \cos \alpha + (y - b) \sin \alpha, \\y' &= -(x - a) \sin \alpha + (y - b) \cos \alpha,\end{aligned}$$

где: x, y – координаты до преобразования; x', y' – координаты после преобразования; a, b – начальные координаты эндосомы; α – угол поворота оси x .

Статистическая обработка данных. Каждый эксперимент проводили как минимум 3 раза. Числовые данные обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel. Представленные изображения типичны для большинства клеток. Для каждой группы анализировали от трех до семи полей (15–30 клеток). На графиках приведены средние значения с доверительными интервалами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены организация системы микротрубочек (*левая колонка*) и типичное распределение эндосом, содержащих рецептор ЭФР в клетках HeLa, через 15 и 90 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР (*правая колонка*). В контроле микротрубочки формируют радиальную систему, при этом на раннем этапе эндоцитоза (15 мин) множество относительно мелких ярких рецептор-содержащих везикул распределено в подмембранной области клетки. Через 90 мин общий вид микротрубочек не изменился, тогда как рецептор ЭФР локализован в крупных кластерах везикул в ОЯО, а периферические эндосомы практически отсутствуют. При инкубации клеток в присутствии нокодазола (рис. 1, *нижняя панель*) мы видим полностью деполимеризованные микротрубочки: тубулин равномерно распределен по всему объему цитоплазмы. В то же время эндосомы и через 15, и через 90 мин распределены по клетке, при этом их яркость и кажущийся размер значительно уменьшаются.

Такой же эффект наблюдается при действии нокодазола на распределение популяции везикул, несущих маркер ранних эндосом EEА1 (рис. 2): в контроле, в необработанных ЭФР клетках яркие EEА1-

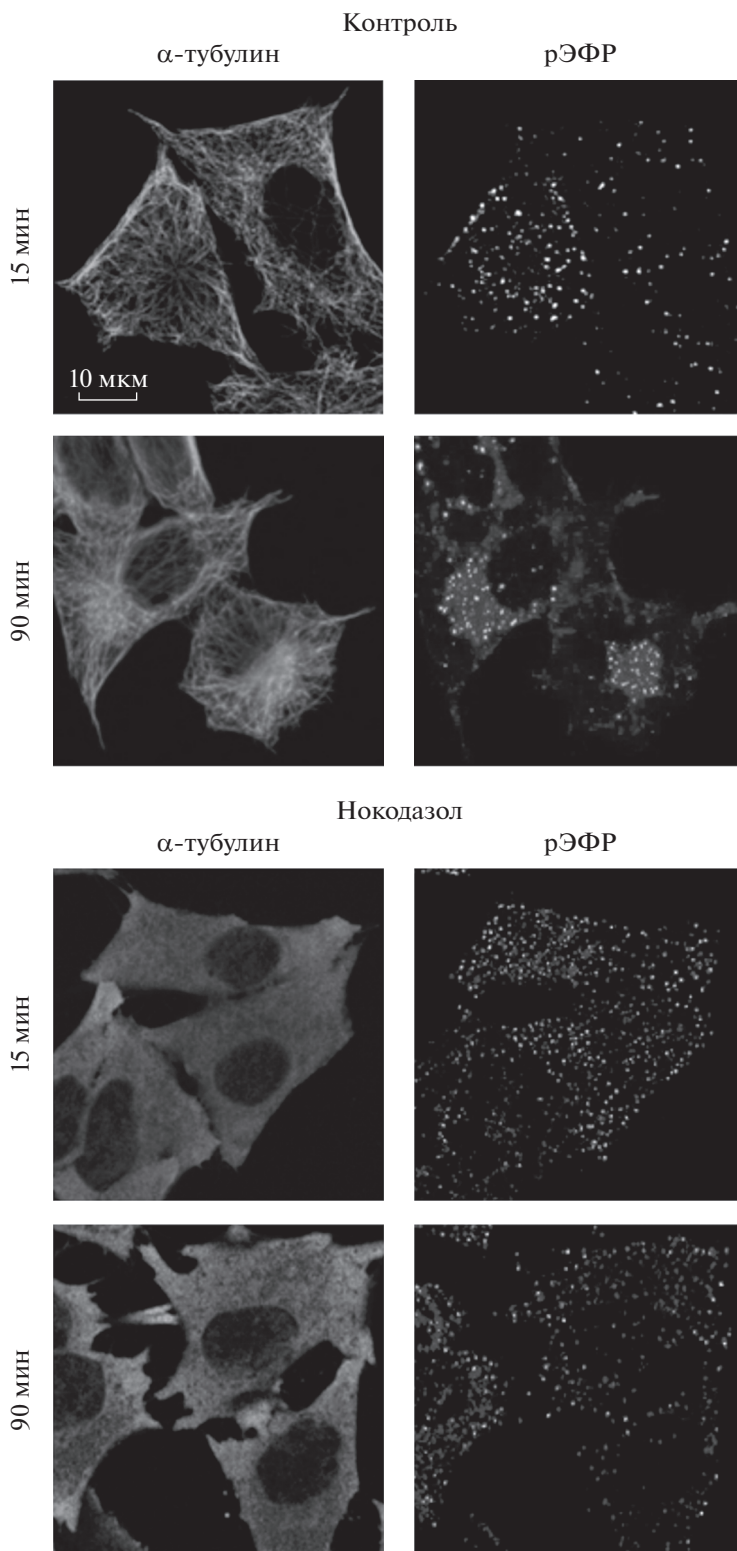


Рис. 1. Локализация эндосом при стимуляции эндоцитоза рецептора ЭФР в контрольных клетках и при действии 20 мкМ нокодазола. Представлены конфокальные изображения клеток, меченных антителами против α -тубулина (*левый столбец*) и рецептора ЭФР (*правый столбец*). Эндоцитоз стимулировали добавлением 50 нг/мл ЭФР, как описано в разделе “Материал и методика”; клетки фиксировали в указанное на рисунке время.

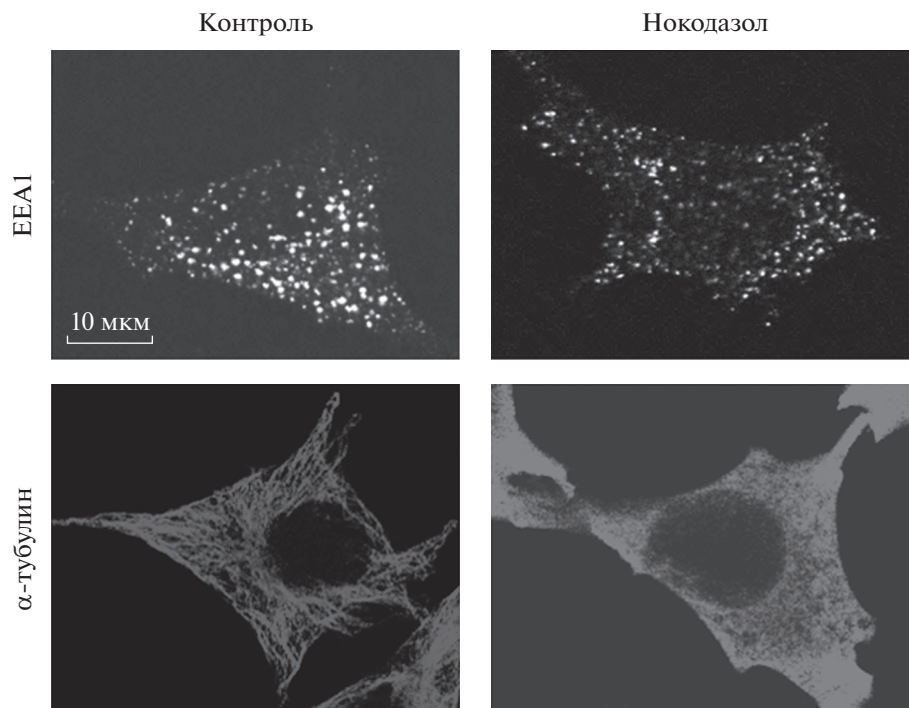


Рис. 2. Демонстрация деполимеризации микротрубочек под действием 20 мкМ нокодазола приводит к уменьшению размера EEA1-везикул и изменяет их распределение в клетке. Представлены конфокальные изображения клеток, меченных антителами против EEA1 (верхний ряд) и α -тубулина (нижний ряд).

положительные эндосомы локализуются в области вокруг ядра, тогда как после деполимеризации микротрубочек они “рассыпаются” по цитоплазме, в основном по периферии, и их яркость и (или) кажущийся размер уменьшаются.

Эти данные позволяют утверждать, что микротрубочки участвуют, во-первых, в позиционировании EEA1-положительных эндосом и, во-вторых, в процессе перемещения рецептор-содержащих эндосом из примембранной области в ОЯО. Надо отметить, что наши предыдущие работы, посвященные динамике эндоцитоза рецептора ЭФР подтверждают представленные данные на рис. 1 и 2 (Kharchenko et al., 2007; Zlobina et al., 2013). В целом, эти исследования позволяют предполагать, что формирование околоядерных кластеров происходит постепенно и равномерно. Однако объяснить на основе этого представления временной парадокс кластеризации невозможно.

Поэтому мы обратились к прижизненной съемке процесса перемещения эндосом, используя в качестве лиганда ЭФР, связанный с полупроводниковыми флуоресцентными нанокристаллами, называемыми квантовыми точками (КТ). Такой лиганд (ЭФР-КТ), содержащий 4–6 молекул ЭФР на одну КТ, интересен своей яркостью и фотостабильностью, что особенно важно для прижизненных микроскопических наблюдений. В специально проведенных работах мы показали, что ЭФР-КТ интерна-

лизуются только в комплексе с рецептором, и не вносят каких-либо искажений в процессы слияний эндосом, формирования мультивезикулярных тел и перемещений эндосом по микротрубочкам (Salova et al., 2017, 2016).

Наблюдения за поведением эндосом, меченных ЭФР-КТ, показали, что характер перемещения везикул не соответствует равномерному поступательному однонаправленному движению. На рис. 3 представлены клетки с треками некоторых эндосом, которые оставались в фокальной плоскости в течение времени наблюдения. Из этих изображений видно, что на стадии пребывания ЭФР-КТ в ранних эндосомах (рис. 3а) основной тип движения — довольно хаотичное перемещение на небольшие расстояния, ограниченное небольшой областью, т.е. фактически “топтанье на месте”. Но даже в тех случаях, когда отмечали относительно длинные линейные пробеги, их направление отнюдь не соответствовало перемещению к ЦОМТ. Везикула могла двигаться параллельно плазматической мембране, резко изменить направление на противоположное, остановиться и начать движение под углом 45 градусов к первоначальному. В любом случае, таких быстрых перемещений за 7 мин (с 15-ой по 22-ю) наблюдали немного, большую часть времени везикулы колебались в пределах небольших ограниченных областей.

Для наглядности мы представили все треки в измененных координатах: строили дополнительную

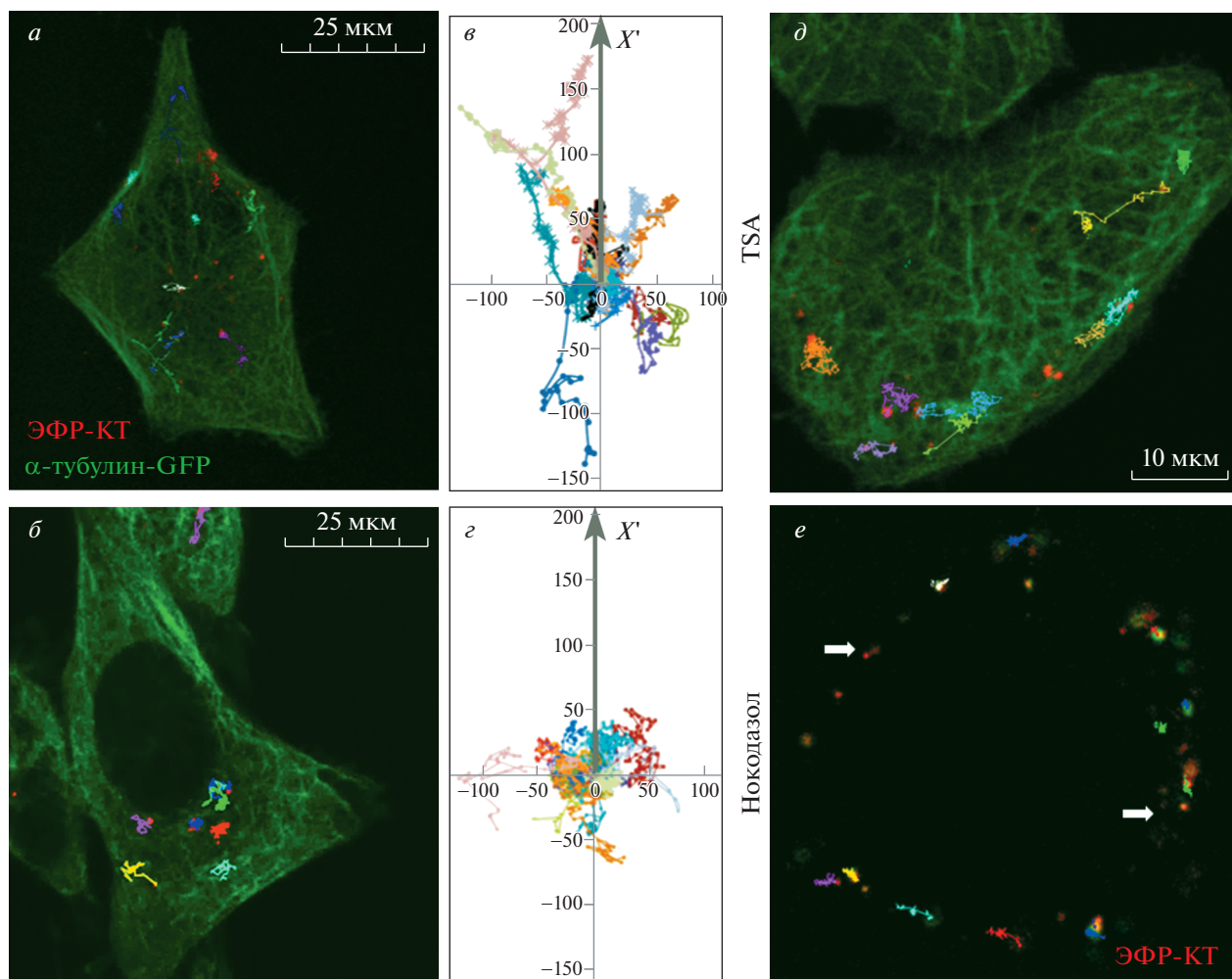


Рис. 3. Перемещения эндосом на разных стадиях эндоцитоза в контроле (*a–г*) и под действием 500 нг/мл TSA (*д*) и 20 мкМ нокодазола (*е*). Эндоцитоз стимулировали в клетках, экспрессирующих α -тубулин-GFP (зеленый цвет), добавлением ЭФР-КТ (красный цвет), как описано в разделе “Материал и методика”. *a, д, е* – Результирующие треки перемещения некоторых эндосом в интервале 15–22 мин после запуска эндоцитоза; *е* – через 40–47 мин, белыми стрелками указаны эндосомы для сравнения их кажущихся размеров. *в, г* – Треки эндосом в координатах, измененных так, что начало трека находится в точке (0,0), а ось $0x'$ показывает направление на ЦОМТ (см. “Материал и методика”).

ось $0x'$ между координатой начала движения каждой конкретной эндосомы (x, y) и ЦОМТ, и эти координаты преобразовывали по формуле параллельного сдвига и поворота осей координат, начальная точка трека соответствовала координатам (0,0). Таким образом, в идеальном случае треки частиц, двигавшихся к ЦОТМ, были бы выстроены от нулевой координаты вдоль оси $0x'$. В реальности, из рис. 3*в* (график) следует, что такую “целеустремленность” проявляют единичные эндосомы. Тем не менее, на поздних сроках (40–47 мин, рис. 3*б, г*) эндосомы все же кластеризуются в ОЯО, и длина линейных пробегов сокращается, хотя хаотичность их направления остается. Все же в общем, можно сказать, что приближение к ЦОМТ делает эндосомы менее подвижными. Также очевидно, что суммарное расстояние, пройденное везикулой за время съемки, гораздо больше, чем расстояние, на которое она приближается к ОЯО, и

время, затрачиваемое на образование кластера, будет существенно превышать то, которое требовалось бы при линейном строго направленном движении везикулы, определяемое скоростью перемещения моторного белка.

Пытаясь интерпретировать подобные данные, следует учитывать то обстоятельство, что сеть микротрубочек в использованных нами клетках HeLa, представляет собой не систему сильно натянутых строго радиальных прямых трубочек, а скорее действительно густую переплетенную сеть, в которой линейные прямые участки микротрубочек могут на плюс-концевых участках сильно изгибаться, порой приобретая кажущуюся “антипараллельность” (Howard, Homan, 2009). К тому же эта сеть трехмерна и отдельные участки демонстрируют колебательные движения, наподобие волн.

Таким образом, разнонаправленные движения не обязательно обеспечиваются участием и динеина, и кинезина, что предполагается в модели “перетягивания каната” (Welte, 2004). Везикула, движущаяся с помощью динеина к минус-концу микротрубочки (т.е. к ЦОМТ), может просто сбиваться другой микротрубочкой, проходящей поперек ее пути, и эта везикула попадает в ячейку сети из микротрубочек и будет находиться там, пока не появится возможность прикрепиться к свободной молекуле динеина и проскочить на ней дальше. Она при этом может прикрепиться и к динеину на другой микротрубочке, идущей под углом к исходной, или к участку микротрубочки, делающей петлю и изогнутой так, что движение все в том же направлении к минус-концу трубочки кажется движением в противоположную сторону. В пользу наших рассуждений говорит тот факт, что в конечном итоге все эндосомы, которые должны попасть в ОЯО, доставляются туда, несмотря на временные затраты.

Мы проанализировали также, что происходит с ЭФР-рецепторными комплексами в живых клетках, в которых микротрубочки разрушены нокодазолом или стабилизированы ингибитором деацетилазы HDAC6 (TSA). Как известно, ацетилирование микротрубочек связано с их стабилизацией, в результате чего подавляется процесс динамической нестабильности их плюс-концов, необходимый для поиска и захвата отделившихся от мембраны только что сформированных эндосом (Matsuyama et al., 2002; Deribe et al., 2009; Lomakin et al., 2009; Gao et al., 2010). На рис. 3*d* показана клетка, обработанная TSA, на которой нанесены треки рецептор-содержащих эндосом через 15–22 мин после стимуляции эндоцитоза. Как мы показали, несмотря на все сложности перемещения везикул в контрольных клетках на этом сроке выявляются длинные линейные пробеги эндосом, часто направленные к центру клетки. Однако обработка TSA приводит, во-первых, к формированию запутанной сети утолщенных микротрубочек, а, во-вторых, сформированные эндосомы совершают только незначительные перемещения параллельно плоскости мембраны в довольно ограниченных областях. Следует отметить, что сами эндосомы в этом случае гораздо крупнее контрольных, что говорит о возможности слияний эндосом, но невозможности зависимых от микротрубочек перемещений в условиях их стабилизации.

В случае же разборки микротрубочек нокодазолом (рис. 3*e*) мы видим лишь колебательные подмембранные движения эндосом, при том, что сами они очень маленькие. Поскольку в обоих случаях мы не затрагивали сеть кортикального актина, можно предположить, что актиновые филаменты могут в какой-то мере поддерживать движение, но не линейное, а хаотичное, и также способны поддерживать слияния эндосом в присутствии стабильных микротрубочек, тогда как при их деполимеризации ни длинные перемещения, ни слияния невозможны.

Наши данные говорят в пользу того, что микротрубочки могут быть не только рельсами, по которым движутся эндосомы, но и платформами, дающими точки опоры для мембранных структур при их взаимодействии. Чтобы проверить это предположение, мы проанализировали поведение эндосом на разных стадиях эндоцитоза, включая стадию их наиболее интенсивных слияний (рис. 4) Видно, что в контроле через 15 мин после стимуляции эндоцитоза мелкие рецептор-содержащие везикулы колокализуются с EEA1-положительными везикулами, что свидетельствует о начале процессов слияния и укрупнения эндосом. Действительно, через 30 мин видны укрупненные эндосомы, тогда как с 60-ой мин эти крупные эндосомы уже не колокализуются с EEA1. В клетках, предобработанных нокодазолом, рецептор-содержащие везикулы формируются (как уже было показано на рис. 3) и даже колокализуются с EEA1, но никакой динамики в дальнейшем не наблюдается – в отсутствие микротрубочек эндосомы так и остаются мелкими и не укрупняются, даже несмотря на частичную колокализацию с EEA1.

В присутствии цитохалазина Д, т.е. в условиях, когда актиновые филаменты не функционируют, а микротрубочки интактны, даже на ранних сроках наблюдается укрупнение везикул, причем через 15 мин мы видим еще не очень большие рецепторные везикулы, но существенно увеличенные EEA1-позитивные ранние эндосомы. В дальнейшем процесс слияний только усиливается, приводя к формированию всего нескольких, но очень крупных рецептор- и EEA1-позитивных эндосом. Если эндоцитоз стимулируется в отсутствие интактных микротрубочек и актиновых нитей, то колокализация рецептор-содержащих везикул с EEA1 лишь к 90-й мин после стимуляции превышает контроль.

На рис. 5*a* представлена динамика колокализации рецептора ЭФР и EEA1, полученная на основе обработки результатов экспериментов, аналогичных описанному выше. Мы оценивали степень колокализации, используя коэффициент Мандерса, соответствующий доле пикселей изображения, содержащих сигнал в красном канале (рецептор ЭФР) и в зеленом канале (EEA1) по отношению к общему количеству пикселей с красным сигналом. Согласно этим расчетам, степень колокализации рецептора ЭФР с EEA1 максимальна через 15–30 мин после стимуляции эндоцитоза, а затем (через 60 мин) резко снижается. В параллельных экспериментах, изображения которых не представлены в этой статье, мы определяли колокализацию рецептора ЭФР с маркером лизосом Lamp1 (рис. 5*b*) и показали ее увеличение к 60 мин после стимуляции эндоцитоза. При действии нокодазола колокализация с EEA1 была исходно меньше, чем в контроле, при этом она слегка увеличивалась к 30-ой мин, возможно, за счет примембранных слияний, и далее не изменялась, оставаясь на уровне более высоком, чем в контроле. Действительно, на рис. 4 видно, что везикулы как бы

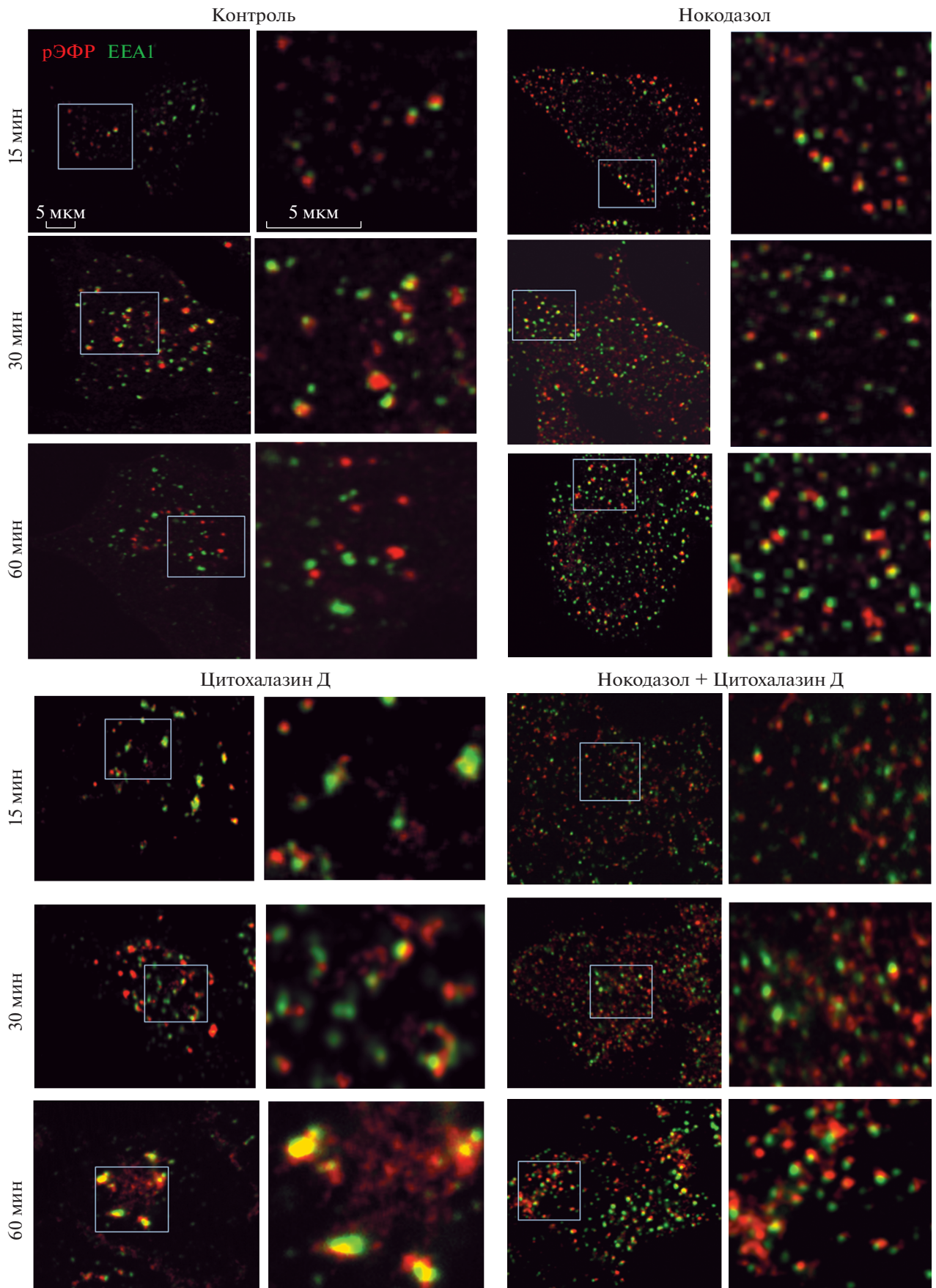


Рис. 4. Локализация рецептора ЭФР и EEA1 в ходе эндоцитоза в контроле и при действии 20 мкМ нокодазола и (или) 10 мкМ цитохалазина Д. Показаны совмещенные изображения клеток, меченных антителами против EEA1 (зеленый цвет) и рецептора ЭФР (красный цвет). Рамкой выделены участки, представленные в увеличенном масштабе *справа* от каждого изображения для всех случаев. Эндоцитоз стимулировали добавлением 50 нг/мл ЭФР, клетки фиксировали в указанное на рисунке время.

“замерли” на стадии формирования ранних двудомных структур, локализованных вблизи от плазматической мембраны. Практически полное отсутствие колокализации с Lamp1 говорит о том, что созревания эндосом в этом случае действительно не происходит.

Разрушение актиновых нитей цитохалазином Д при интактных микротрубочках демонстрирует высокую степень колокализации, уменьшающуюся только после 60-ой мин и не достигающую к 90-ой мин контрольного уровня, что подтверждает наше предположение о важности актиновых филаментов для сегрегации ранних эндосом и мультивезикулярных тел. Совместное же действие нокодазола и цитохалазина Д демонстрирует очень низкую степень колокализации двух сигналов, что говорит о том, что упорядоченного процесса слияния и созревания эндосом и их разделения на поздних этапах не происходит.

Таким образом, наши данные говорят о том, что и микротрубочки, и актиновые нити способны поддерживать слияния везикул эндоцитозного пути, однако такой эффект актиновых филаментов проявляется лишь на начальной стадии в отсутствие микротрубочек или при их неспособности захватывать только что сформированные рецептор-содержащие везикулы. Если же при нефункциональных актиновых филаментах в клетке присутствуют микротрубочки, то слияния продолжают продолжаться гораздо дольше и приводят к более значительному укрупнению везикул, чем в контроле.

Кроме того, показано, что микротрубочки участвуют в слиянии аутофагосом с эндосомами (Köchl et al., 2006). Таким образом, микротрубочки являются первичным элементом цитоскелета с точки зрения обеспечения слияний, тогда как в норме функция филаментов заключается в отделении сформированных мультивезикулярных тел от EEA1-позитивных ранних эндосом, делая возможным их дальнейшую доставку в лизосомы и деградации ЭФР-рецепторных комплексов. Действительно, участие высокодинамичных Agr2/3-зависимых актиновых сетей в искривлении, тубуляции мембран и в процессах разделения мембранных структур были показаны в ряде работ (Derivery et al., 2009).

Вполне вероятно, что процессы сближения и слияния везикул, как и их разделения, заключающиеся в реорганизации и объединении мембранных слоев в первом случае и их разрыва во втором, требуют фик-

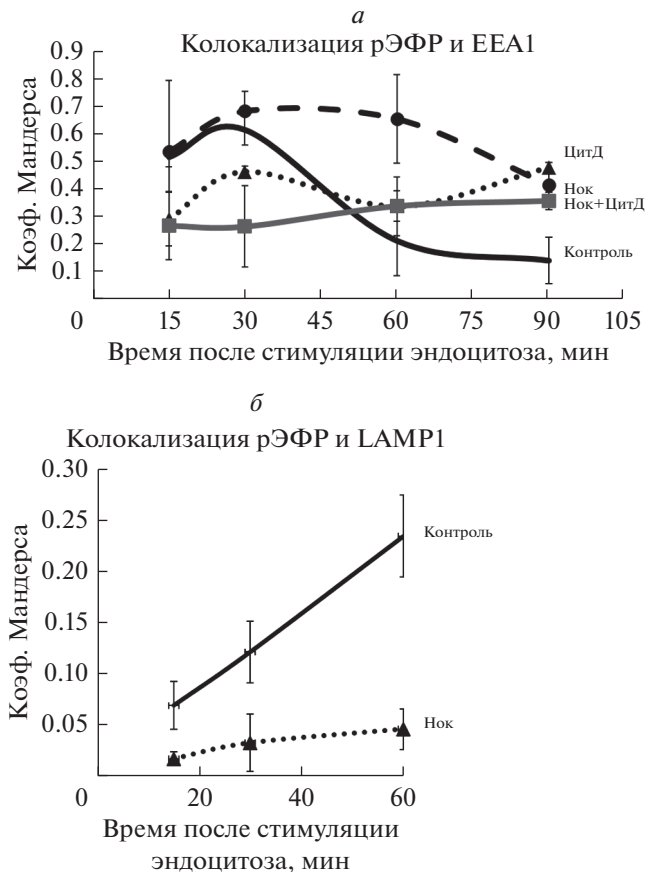


Рис. 5. Колокализация рецептора ЭФР и с маркерами ранних эндосом (EEA1, *а*) и лизосом (Lamp1, *б*) в ходе эндоцитоза в контроле и при действии 20 мкМ нокодазола (Нок) и (или) 10 мкМ цитохалазина Д (ЦитД). Колокализацию оценивали с помощью коэффициента Мандерса М1 (Коэф. Мандерса) (доля пикселей, содержащих сигнал рецептора ЭФР и EEA1/Lamp1, по отношению к общему сигналу рецептора ЭФР).

сации взаимодействующих структур на определенное время на некой платформе, которой выступают микротрубочки, и эта их роль столь же важна, как и роль путей сообщения. С точки зрения этого предположения, становится понятным и кажущийся хаотичным способ-зависимого от микротрубочек перемещения везикул по клетке. Действительно, в случае непрерывного равномерного направленного движения по трубочкам вероятность контактов между эндосомами (учитывая соотношения их размера и масштаба клетки) была бы очень низка, однако кажущееся хаотичным движение с множеством остановок существенно повышает шанс таких взаимодействий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке темы государственного задания Института цитологии РАН (№ 0124-2019-0004).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Авторы заявляют об отсутствии экспериментов с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Корнилова Е.С., Соркин А.Д., Никольский Н.Н.* 1987. Динамика компартиментализации эпидермального фактора роста в клетках А431. Цитология. Т. 29. № 8. С. 904. (*Kornilova E.S., Sorokin A.D., Nikol'skiĭ N.N.* 1987. Compartmentalization dynamics of the epidermal growth factor in A431 cells. Tsitologiya. V. 29. № 8. P. 904.)
- Минин А.А., Кулик А.В.* 2004. Внутриклеточный транспорт. Принципы регуляции. Успехи биол. химии. Т. 44. С. 225. (*Minin A.A., Kulik A.V.* 2004. Intracellular transport. Principles of regulation. Uspekhi Biol. Khimii. V. 44. P. 225.)
- Babst M.* 2011. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. Curr. Opin. Cell Biol. V. 23. P. 452.
- Beguïnot L., Lyall R.M., Willingham M.C., Pastan I.* 1984. Down-regulation of the epidermal growth factor receptor in KB cells is due to receptor internalization and subsequent degradation in lysosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. V. 81. P. 2384.
- Boite S., Cordelières F.P.* 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. J. Microsc. V. 224. P. 213.
- Delevoye C., Heiligenstein X., Ripoll L., Gilles-Marsens F., Dennis M.K., Linares R.A., Derman L., Gokhale A., More I. E., Faundez V., Marks M.S., Raposo G.* 2016. BLOC-1 brings together the actin and microtubule cytoskeletons to generate recycling endosomes. Curr. Biol. V. 26. P. 1.
- Deribe Y.L., Wild P., Chandrashaker A., Curak J., Schmidt M.H.H., Kalaidzidis Y., Milutinovic N., Kratchmarova I., Buerkle L., Feichko M.J., Schmidt P., Kittanakom S., Brown K.R., Jurisica I., Blagoev B. et al.* 2009. Regulation of epidermal growth factor receptor trafficking by lysine deacetylase HDAC6. Sci. Signal. V. 2. P. ra84.
- Derivery E., Sousa C., Gautier J.J., Lombard B., Loew D., Gautreau A.* 2009. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. Dev. Cell. V. 17. № 5. P. 712–723.
- Gao Y., Hubbert C.C., Yao T.-P.* 2010. The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation. J. Biol. Chem. V. 285. P. 11219.
- Howard J., Hyman A.A.* 2009. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. V. 10. P. 569.
- Kharchenko M.V., Aksyonov A.A., Melikova M.M., Kornilova E.S.* 2007. Epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis is accompanied by reorganization of microtubule system in HeLa cells. Cell Biol. Int. V. 31. P. 349.
- Köchl R., Hu X.W., Chan E.Y., Tooze S.A.* 2006. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. Traffic. V. 7. P. 129.
- Lomakin A.J., Semenova I., Zaliapin I., Kraikivski P., Nadezhkina E., Slepchenko B.M., Akhmanova A., Rodionov V.* 2009. CLIP-170-dependent capture of membrane organelles by microtubules initiates minus-end directed transport. Dev. Cell. V. 17. P. 323.
- Luzio J.P., Mullock B.M., Pryor P.R., Lindsay M.R., James D.E., Piper R.C.* 2001. Relationship between endosomes and lysosomes. Biochem. Soc. Trans. V. 29. P. 476.
- MacDonald E., Brown L., Selvais A., Liu H., Waring T., Newman D., Bithell J., Grimes D., Urbé S., Clague M.J., Zech T.* 2018. HRS–WASH axis governs actin-mediated endosomal recycling and cell invasion J. Cell Biol. V. 217. P. 2549.
- Manders E.M.M., Verbeek F.J., Aten J.A.* 1993. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. J. Microsc. V. 169. P. 375.
- Matsuyama A., Shimazu T., Sumida Y., Saito A., Yoshimatsu Y., Seigneurin-Berny D., Osada H., Komatsu Y., Nishino N., Khochbin S., Horinouchi S., Yoshida M.* 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. EMBO J. V. 21. P. 6820.
- Matteoni R., Kreis T.E.* 1987. Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. J. Cell Biol. V. 105. P. 1253.
- Muriel O., Tomas A., Scott C.C., Gruenberg J.* 2016. Moesin and cortactin control actin-dependent multivesicular endosome biogenesis. Mol. Biol. Cell. V. 27. P. 3305.
- Salova A.V., Belyaeva T.N., Leontieva E.A., Zlobina M.V., Kharchenko M.V., Kornilova E.S.* 2016. Quantum dots implementation as a label for analysis of early stages of EGF receptor endocytosis: A comparative study on cultured cells. Oncotarget. V. 7. P. 6029.
- Salova A. V., Belyaeva T.N., Leontieva E.A., Kornilova E.S.* 2017. EGF receptor lysosomal degradation is delayed in the cells stimulated with EGF-Quantum dot bioconjugate but earlier key events of endocytic degradative pathway are similar to that of native EGF. Oncotarget. V. 8. P. 44335.
- Simonsen A., Lippé R., Christoforidis S., Gaullier J.M., Brech A., Callaghan J., Toh B.H., Murphy C., Zerial M., Stenmark H.* 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. Nature. V. 394. P. 494.
- Welte M.A.* 2004. Bidirectional transport along microtubules. Curr. Biol. V. 14. P. 525.
- Zlobina M.V., Kharchenko M.V., Kornilova E.S.* 2013. Analysis of EGF receptor endocytosis dynamics based on semi-quantitative processing of confocal immunofluorescent images of fixed cells. Cell Tiss. Biol. V. 7. P. 382.

MICROTUBULES AND ACTIN FILAMENTS ARE INVOLVED IN FACILITATING OF FUSIONS AND FISSIONS OF VESICLES OF EGF-RECEPTOR COMPLEXES' ENDOCYTIC PATHWAY

M. V. Kharchenko^{a,*}, M. V. Zlobina^{a,c}, R. S. Kamentseva^a, and E. S. Kornilova^{a,b}

^a*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, 194064 Russia*

^b*Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia*

^c*Central European Institute of Technology, Masaric University, Brno, 62500 Czech Republic*

**e-mail: mariannakharchenko@gmail.com*

Effect of microtubule depolymerization by nocodazole and actin cytoskeleton disassembly by cytochalazine D alone and in combination, on the dynamics of endocytosis of epidermal growth factor receptor complexes with EGF (EGF-R) in HeLa cells was studied. The use of confocal microscopy on the cells fixed at different time intervals after stimulation of endocytosis showed that at the early stages there is a high degree of the receptor colocalization with early endosome marker EEA1, which correlates with enlargement of the endosomes as a result of fusions, and the movement of endosomes at later stages to the perinuclear region (PR). Translocation to PR depends on microtubules. Nocodazole does not prevent endosomes' formation, but blocks their fusions and movement. At the same time, the destruction of actin microfilaments, without disturbing the process of EEA1-dependent fusions and the transport of endosomes in the PR, leads to enlargement of endosomes, preventing the separation of early endosomes and mature multivesicular endosomes. With the destruction of both types of cytoskeleton, the newly formed receptor-containing endocytic vesicles do not enlarge, do not mature and do not move to the PR. Live imaging of endosomes using EGF-quantum dots complexes confirmed the data obtained on fixed cells and allowed us to analyze the nature of the movements of endosomes. It turned out that rare periods of fast linear runs alternates with more frequent periods of chaotic oscillations within a small area. The directions of linear paths can be different, and not just in the direction of MTOC. Our data suggest that the role of MT is not only to facilitate endosomes' movements, but also to provide a platform for their fusion and fissions. This assumption can also explain the seemingly chaotic movements of endosomes, which increase the probability of their contacts and, therefore, fusions.

Keywords: EGF receptor, endocytosis, endosomes, fusion, EEA1, microtubules, microfilaments, nocodazole, cytochalazine D