

ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНИЗАЦИИ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРА ЭФР

© М. В. Харченко, Е. С. Корнилова, М. С. Меликова¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
¹ *электронный адрес: melikova@mail.cytspb.rssi.ru*

Представление о микротрубочках (МТ) как о пассивных «рельсах», по которым с помощью моторов осуществляется перемещение транспортных пузырьков, является широко распространенным. В настоящей работе методом непрямой двойной иммунофлуоресценции исследовали организацию системы МТ в клетках линий HeLa и A431 в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Показано, что стимуляция эндоцитоза приводит к появлению периферических везикулярных структур, содержащих рецептор ЭФР, с течением времени концентрирующихся в околядерной области, в непосредственной близости от ЦОМТ. Это перемещение зависело от МТ, поскольку нокодазол предотвращал образование околядерных эндосом. Параллельная окраска препаратов антителами к тубулину показала, что организация системы МТ претерпевает значительные изменения в ходе эндоцитоза. Для ранних стадий характерны некоторое укорочение МТ на периферии цитоплазмы и увеличение интенсивности флуоресценции в районе, окружающем ЦОМТ. Далее длинные МТ исчезают, и периферическая часть цитоплазмы демонстрирует диффузное окрашивание, на фоне которого заметны короткие фрагменты МТ. Этой стадии соответствует околядерная локализация эндосом, содержащих ЭФР-рецепторные комплексы. По мере исчезновения рецептор-позитивного окрашивания как результата деградации ЭФР и рецептора в лизосомах радиальная система МТ восстанавливалась. Обсуждается возможная функциональная роль описанных изменений организации тубулинового цитоскелета.

Ключевые слова: рецептор ЭФР, эндосомы, эндоцитоз, микротрубочки, нокодазол, HeLa, A431, предварительное связывание.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, МВЭ — мультивезикулярные эндосомы, МТ — микротрубочки, ЦОМТ — центр организации микротрубочек, ЭФР — эпидермальный фактор роста, PBS — фосфатно-солевой раствор.

Микротрубочки (МТ), один из основных элементов цитоскелета клеток, играют важную роль в осуществлении разнообразных клеточных функций, таких как митоз, поддержание поляризации клеток, регуляция подвижности, позиционирование органелл. Несомненно также участие системы МТ в организации внутриклеточных везикулярных транспортных потоков, одним из частных случаев которого является эндоцитоз. Макромолекулы, в том числе ростовые факторы, попадают в клетку с помощью механизма интернализации, где попадают в периферические ранние эндосомы. Направляемый на деградацию пул молекул обнаруживается в дальнейшем в поздних мультивезикулярных эндосомах (МВЭ), локализованных в околядерной области, где и происходит взаимодействие зрелых МВЭ с лизосомами (Miller et al., 1986; Корнилова и др., 1987; Соколова и др., 1995; Ichikawa et al., 2000). Такая «векторная» организация эндоцитозного пути нарушается при обработке клеток агентами, разрушающими МТ (De Brabander et al., 1998; Clague et al., 1994; Соколова и др., 1998). Многочисленные данные подтверждают взаимодействие эндосом с МТ за счет как адаптерных, так и моторных белков (Kreis et al., 1989; Pierre et al., 1992; Aniento, 2001), так что факт перемещения везикул по МТ, по крайней мере в клетках с ра-

диальной организацией системы МТ, можно считать доказанным.

Несмотря на обилие исследований, данные о роли МТ в эндоцитозе чрезвычайно противоречивы. Так, в некоторых исследованиях сообщается о замедлении прохождения разных стадий эндоцитоза — от сортировки из ранних эндосом в поздние до взаимодействия поздних эндосом с лизосомами (Aniento et al., 1993; D'Arrigo et al., 1997; Xie et al., 2004) — при разрушении МТ деполимеризующими агентами. С другой стороны, в ряде работ была обнаружена независимость эндоцитоза от интактности системы МТ (Diaz et al., 1991; Van Deurs et al., 1995; Соколова и др., 1998). В нашей предыдущей работе (Соколова и др., 1998) с помощью субклеточного фракционирования в градиенте Перколлы мы показали, что разрушение МТ нокодазолом практически не влияло на динамику компарментализации и деградацию ¹²⁵I-ЭФР в эпидермоидных клетках A431 и фибробластоподобных клетках HER14. Тем не менее нокодазол вызывал резкое изменение пространственной организации эндосом — они распределялись равномерно по цитоплазме, не транслоцируясь в околядерную область даже на самых поздних (120—180 мин) этапах эндоцитоза. Причины такого противоречия неясны.

В настоящей работе мы представляем данные, свидетельствующие о том, что после стимуляции эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов система микротрубочек не является пассивными «рельсами» для транспорта эндосом, а сама подвергается ряду последовательных трансформаций.

Материал и методика

Культивирование клеток. В работе использовали клетки A431 и HeLa, полученные из Отдела клеточных культур Института цитологии РАН и Европейской коллекции клеточных культур соответственно. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 8—10 % фетальной сыворотки при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Для опытов по иммунофлуоресценции покровные стекла размером 8 × 8 мм помещали в пластиковые чашки Петри. Клетки выращивали до 50—70 % монослоя, за 24 ч до опыта переводя на среду, содержащую 0.25 % фетальной сыворотки.

Исследование динамики эндоцитоза в условиях «предварительного связывания» лиганда. Для достижения равновесного связывания лиганда с рецепторами монослойные культуры клеток инкубировали в рабочей среде Игла, содержащей 0.1 % БСА и 20 мМ HEPES (pH 7.4), при 4 °С в течение 60 мин в присутствии ЭФР в концентрации 100 нг/мл (клетки линии A431) или 50 нг/мл (клетки линии HeLa). После 5-кратной отмывки PBS от несвязавшегося ЭФР эндоцитоз стимулировали переводом клеток в рабочую среду, не содержащую лиганда, при 37 °С на указанное время.

Обработка клеток нокодазолом. Клетки инкубировали в течение 60 мин при 37 °С в рабочей среде, содержащей 20 мкг/мл нокодазола (Sigma). Все дальнейшие инкубации (в том числе холодовые) проводили при постоянном присутствии нокодазола в рабочей среде.

Антитела. Для специфического выявления рецептора ЭФР использовали поликлональные антитела, узнающие эпитоп экстраклеточного домена рецептор ЭФР человека (получены от д-ра Т. Творогова), в разведении 1 : 500. Моноклональные антитела против тубулина (Sigma) использовали в разведении 1 : 2000. В качестве вторых антител использовали конъюгаты GAR-Alexa и GAM-Alexa (Molecular Probes, Англия) в разведении 1 : 500. Антитела разводили PBS (pH 7.4), содержащем 1 % BSA.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток. После окончания инкубации покровные стекла переносили в пластиковые чашки диаметром 35 мм, дважды промывали PBS, а затем фиксировали 4%-ным раствором формалина (Sigma) на PBS при комнатной температуре в течение 15 мин. После этого клетки промывали 5 раз по 3 мин раствором PBS и обрабатывали 15 мин при комнатной температуре раствором PBS, содержащим 0.5 % Triton X-100 (Sigma). Неспецифическое окрашивание блокировали инкубацией в растворе BSA (1 %), приготовленном на PBS, в течение 30 мин при комнатной температуре. С первыми антителами клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После этого промывали 3 раза по 5 мин раствором PBS, содержащим 0.1 % Tween 20 (BioRad). Инкубацию со вторыми антителами проводили в течение 30 мин при комнатной температуре. Потом промывали, как описано выше. Распределение флуоресцентно меченных белков в клетках изучали с помощью люминесцентного микроскопа AXI-

OSKOP (Германия) с апохроматическим объективом 100 × 1.25 (масляная иммерсия) и стандартным набором возбуждающих и запирающих светофильтров. Флуоресценцию возбуждали светом (450—490 нм), который выделяли из спектра излучения ртутной лампы. Свет флуоресценции выделяли комбинированным светофильтром № 11 (светоделительная пластинка 510 нм, испускание 515—565 нм). Фотографирование проводили с использованием видеокамеры. Изображение анализировали с помощью компьютерной программы KS-100.

Статистическая обработка. Все эксперименты проводили не менее 3 раз. Для анализа выбирали клетки с максимальной степенью расплывания, на краю или вне островков монослоя. Для каждой временной точки просматривали по крайней мере по 3 поля (около 20—30 клеток) на 2 разных стеклах. Контрольные клетки и клетки на ранних сроках эндоцитоза (до 30 мин включительно) представляли собой гомогенную популяцию (более 90 % клеток имели такое же распределение рецептора ЭФР и тубулина, как и на представленных иллюстрациях). На более поздних сроках происходила некоторая рассинхронизация по динамике эндоцитоза. Тем не менее через 90 мин после стимуляции эндоцитоза более 60 % клеток соответствовали варианту 2 (рис. 1, б), около 10 % — варианту 1 (замедленный эндоцитоз), в остальных (около 30 %) деградация к 90-й мин уже полностью прошла.

Результаты

Для анализа эндоцитоза использовали классическую схему, позволяющую максимально синхронизировать молекулярные события в ходе эндоцитоза. Субконфлюэнтные клетки HeLa, выращенные на стеклах, инкубировали с ЭФР (50 нг/мл) при 4 °С в течение 60 мин для достижения максимального связывания ростового фактора с рецептором на плазматической мембране. В таких условиях поступления ЭФР-рецепторных комплексов внутрь клетки не происходит. Перевод клеток в среду температурой 37 °С, не содержащую ЭФР, приводит к синхронной волне интернализации. Типичное представление о пространственной организации эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов дают результаты иммунофлуоресцентного анализа, представленные на рис. 1. Так, до добавления ЭФР рецептор выявлялся в основном на плазматической мембране. Через 15 мин после стимуляции эндоцитоза визуализировались мелкие везикулярные структуры, относительно равномерно распределенные по цитоплазме, что соответствует стадии локализации рецептора в ранних эндосомах. Далее рецептор обнаруживался в основном в ярких скоплениях в околоядерной области. Эти структуры соответствуют поздним эндосомам и лизосомам (Корнилова и др., 1987; Соколова и др., 1998). После 60 мин число и яркость мелких везикулярных структур уменьшалось, а через 90—120 мин исчезало и околоядерное окрашивание, что свидетельствовало о лизосомной деградации интернализированных ЭФР-рецепторных комплексов. Следует отметить, что на поздних сроках (после 40—60 мин) практически во всех клеточных линиях, с которыми мы имели дело, наблюдалась десинхронизация процессов эндоцитоза (рис. 1, б). Так, в варианте 1 в клетках еще не сформировалось компактное «пятно» в околоядерной области. Ва-

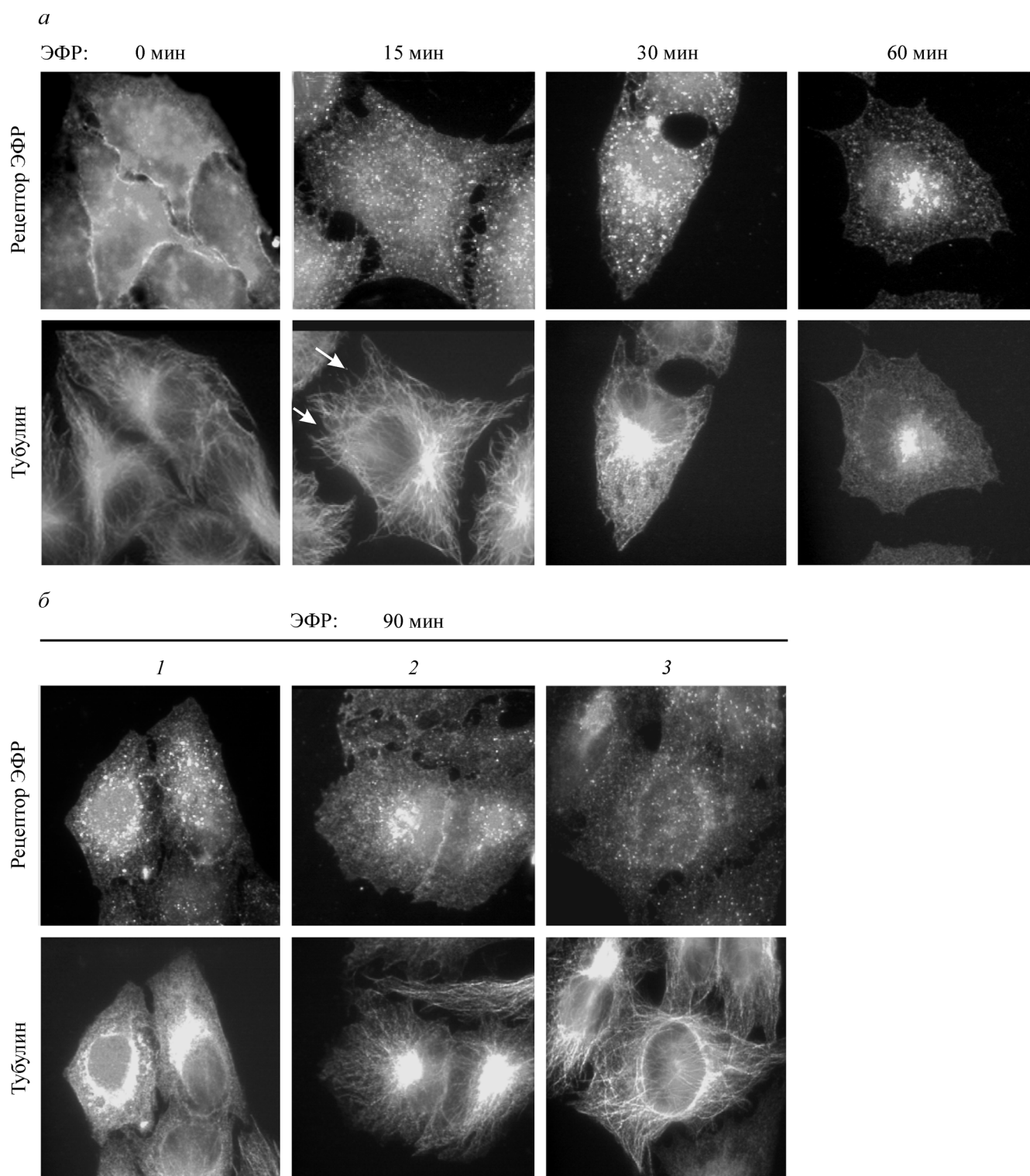


Рис. 1. Иммунофлуоресцентное выявление рецептора ЭФР и тубулина в клетках HeLa в ходе эндоцитоза, стимулированного ЭФР.

Клетки не стимулировали ЭФР (0) или после предварительного связывания ЭФР при 4 °С в течение 60 мин стимулировали эндоцитоз переводом клеток в среду с температурой 37 °С на 15, 30, 60 (*a*) и 90 (*б*) мин соответственно. 1—3 — наиболее типичные варианты распределения рецептора ЭФР и тубулина на поздних стадиях эндоцитоза. Стрелками указаны области цитоплазмы, свободные от МТ.

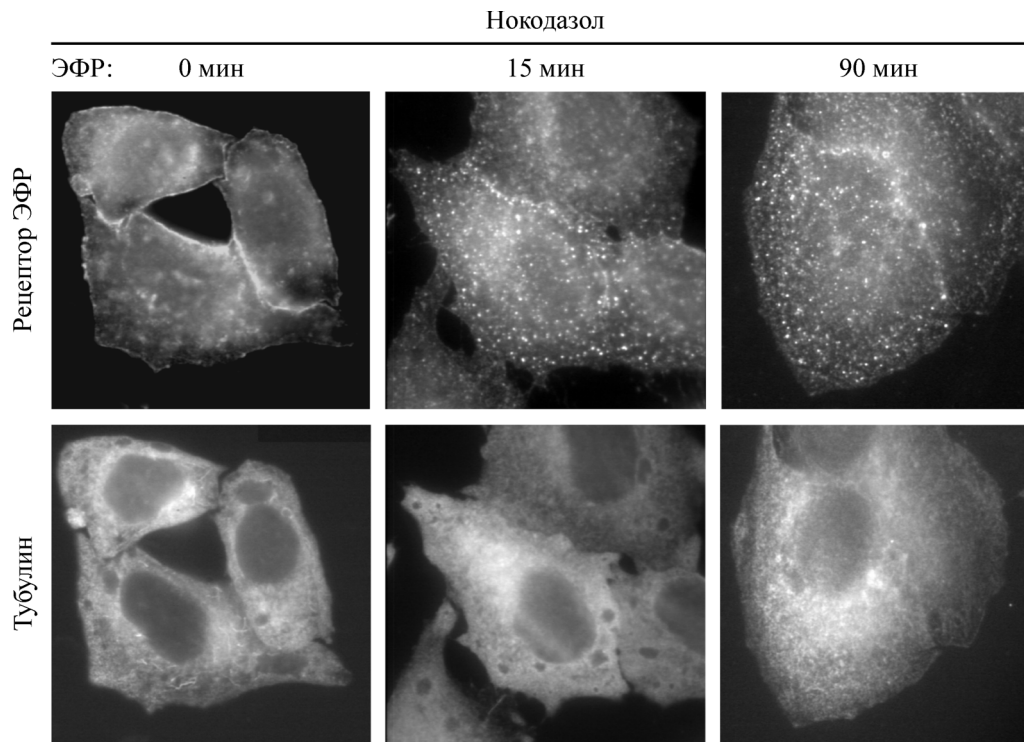


Рис. 2. Влияние нокодазола на внутриклеточную локализацию рецептора ЭФР и тубулина в клетках HeLa в контроле до добавления ЭФР (0) мин и через 15 и 90 мин после стимуляции эндоцитоза.

риант 2 представляет клетку, в которой периферической везикулярной рецепторзависимой флуоресценции не наблюдается, поскольку все интернализированные ЭФР-рецепторные комплексы находятся уже в околоядерной области. Вариант 3 демонстрирует последнюю стадию эндоцитоза, при которой и в околоядерной области практически не обнаруживается рецепторзависимого окрашивания за счет полной деградации эндоцитированного материала. Локализация рецептора ЭФР в клетках, обработанных МТ-деполимеризующим агентом нокодазолом, соответствовала ранним стадиям эндоцитоза и не изменялась в течение всего времени эксперимента (рис. 2, верхний ряд).

В этом эксперименте клетки параллельно окрашивали и антителами на тубулин (рис. 1, а, б, нижний ряд). Видно, что в контрольных (не обработанных ЭФР и неохлажденных) клетках тубулин организован в радиальную систему микротрубочек, максимально концентрирующихся в околоядерной области вокруг ЦОМТ и занимающих всю периферию вплоть до плазматической мембраны. Через 15 мин после стимуляции эндоцитоза развитая радиальная система МТ сохранялась, однако яркость зоны вокруг ЦОМТ возрастала, а некоторые одиночные МТ «поджимались», освобождая периферию цитоплазмы. Причины, приводящие к увеличению интенсивности окрашивания зоны, неясны, однако сообща-

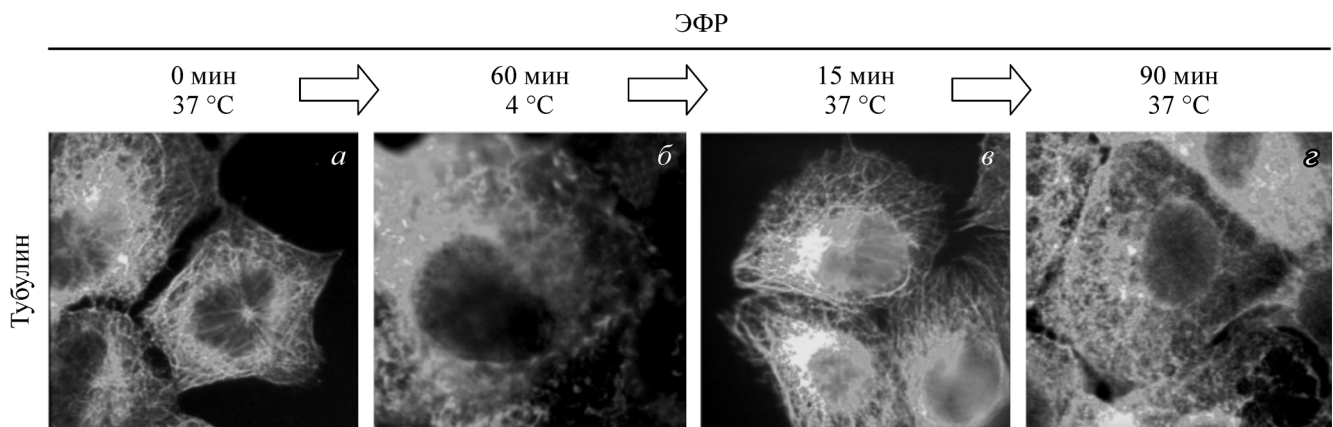


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное выявление тубулина в клетках А 431 в ходе эндоцитоза рецепторов ЭФР, стимулированного по схеме с предварительным связыванием.

а — клетки в контроле; б — к клеткам добавляли ЭФР (100 нг/мл) на 60 мин при 4 °С; в, г — после удаления несвязавшегося лиганда эндоцитоз стимулировали переводом клеток в среду с температурой 37 °С на 15 и 90 мин соответственно.

лось о способности ЭФР стимулировать полимеризацию тубулина (Banan et al., 2002). В дальнейшем перемещение рецептора ЭФР в околадерную область коррелировало с возрастанием в ней интенсивности флуоресценции тубулина и с ремоделированием периферической зоны. Здесь четко выраженные длинные МТ исчезали, и цитоплазма оказывалась заполненной диффузным тубулином в сочетании с короткими беспорядочно разбросанными фрагментами МТ, часто образующими очень разветвленные сетчатоподобные структуры. Вид тубулинового цитоскелета на этих поздних стадиях (30—60—90 мин) эндоцитоза часто напоминал картины, наблюдаемые в клетках, обработанных нокодазолом (рис. 2, нижний ряд). Считается, что постоянное присутствие нокодазола препятствует полимеризации тубулина, поддерживая весь внутриклеточный пул этого белка в диффузном состоянии. В наших экспериментах распределение тубулина в клетках на поздних стадиях в некоторых случаях полностью, а в некоторых частично соответствовало диффузному типу. Во втором случае, как упоминалось выше, можно было визуализировать наличие мелкой паутины коротких фрагментов МТ. Интересно отметить, что при обработке клеток нокодазолом при его длительном (90 мин) присутствии в стимулированных ЭФР клетках также наблюдалось частичное восстановление коротких фрагментов (рис. 2), что, однако, не влияло на распределение эндосом, содержащих рецептор ЭФР.

Хотя схема с предварительным связыванием лиганда при 4 °С является наиболее распространенной при исследовании эндоцитоза, она не учитывает то обстоятельство, что снижение температуры во многих типах клеток само по себе приводит к деполимеризации МТ. Это справедливо в случае как клеток HeLa, так и A431. В последней системе МТ, сохраняя радиальный тип, организует более «запутанную» периферическую сеть (рис. 3, а). Охлаждение этих клеток приводило к фрагментации и деполимеризации МТ (рис. 3, б). Однако уже через 5 мин после перевода клеток в среду с температурой 37 °С система МТ восстанавливалась до уровня контрольной (данные не приводятся) и в дальнейшем претерпевала те же изменения, которые мы наблюдали в клетках HeLa после стимуляции эндоцитоза (рис. 3, в, г). Таким образом, описанный феномен наблюдается по крайней мере в двух различных клеточных линиях, имеющих свои особенности в организации системы МТ.

Обсуждение

В настоящей работе описан обнаруженный нами феномен последовательного ремоделирования системы микротрубочек в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Несмотря на пристальный интерес к роли различных компонентов цитоскелета, в том числе МТ, в транспортных процессах, ранее о подобных изменениях не сообщалось. На наш взгляд, тому существует ряд причин. Во-первых, МТ рассматривались в свете представлений о них как о высокодинамичных в смысле укорочения—удлинения, но относительно стабильных пассивных «рельсах», по которым моторные белки «возят» транспортные везикулы (Murray, Wolkoff, 2003). Во-вторых, основной объем работ по анализу роли МТ в транспортных процессах был выполнен после появления методов, позволяющих следить за поведением флуоресцентных производных разных белков в живой клетке в ре-

жиме реального времени (Ichikawa et al., 2000; Barbero et al., 2002; Clarke et al., 2002; Waguri et al., 2003). Тем не менее в таких исследованиях, как правило, из-за необходимости компьютерной обработки слишком больших массивов данных и других технических трудностей ограничивались относительно короткими отрезками времени (10—20 мин), которые не покрывали весь период эндоцитоза (до 2 ч). Основной задачей таких работ являлось доказательство самой возможности перемещения везикул по МТ либо участки того или иного белка во взаимодействии МТ с эндосомами. В-третьих, эксперименты с применением иммунофлуоресцентной микроскопии проводили в основном в соответствии со схемой без предварительного связывания и соответственно охлаждения клеток, тогда как эксперименты по динамике компартиментализации с применением радиоактивно меченных лигандов практически всегда включали в себя синхронизацию процесса с помощью предварительного связывания. В первом случае ситуация более близка к физиологической, однако следует учесть, что при постоянном присутствии ЭФР в среде связывание и интернализация происходят параллельно и в единицу времени каждый этап эндоцитоза проходит гораздо меньше молекул рецептора. Тем не менее и при такой постановке опытов мы фиксировали хотя и менее выраженные, однако заметные изменения системы МТ, подобные описанным (данные не представлены). В нашей собственной практике мы не раз имели возможность сравнить результаты опытов в двух различных аранжировках и можем утверждать, что в обоих случаях принципиально ход эндоцитоза был одинаков, однако при применении предварительного связывания сортировка из ранних эндосом в поздние проходила эффективнее, а последующая деградация ЭФР и его рецептора в лизосомах — быстрее (данные не представлены). Хотя нельзя исключать возможность того, что восстановившиеся после холода МТ отличаются от МТ в клетках, не подвергавшихся охлаждению, вышеизложенные соображения свидетельствуют в пользу того, что охлаждение—нагревание работает как синхронизатор молекулярных процессов, в норме протекающих в ходе эндоцитоза, и не вносит значительного «возмущения» в изучаемый процесс. К тому же, по имеющимся данным, МТ заякоривают эндосомы на относительно поздних стадиях (через 15—20 мин), до этого момента все события сортировки протекают в основном в периферических ранних эндосомах (Novikoff et al., 1996).

Возможность того, что по крайней мере частичная деполимеризация МТ происходит в норме в определенный момент после стимуляции клеток ЭФР, крайне привлекательна для объяснения ряда наблюдаемых явлений. В свете этих данных относительная нечувствительность лизосомного процессинга ЭФР-рецепторных комплексов к обработке нокодазолом перестает быть парадоксальной. Во-вторых, целый ряд сигнальных молекул и транскрипционных факторов, перемещающихся в ядро при стимуляции клеток ЭФР, ассоциирован с микротрубочками. Так, MAPK, Raf-1, STAT-белки находятся в комплексе с активированным рецептором ЭФР, локализованным в эндосомах, и путешествуют вместе с ним к ядру по микротрубочкам (Василенко и др., 1998; Zang et al., 2001; Lopez-Perez, Salazar, 2006). Известно, что транскрипционный фактор NF-κB ассоциирован с МТ и активируется при действии ЭФР. Обработка клеток нокодазолом влияет на его активность, а также стимулирует активность транскрипционного фактора AP-1/c-fos (Ivanova

et al., 2001). Сообщалось, что действие винбластина приводит к транспорту NF-κB в ядро и активации экспрессии зависимых от него генов (Wang, McDonald, 2004). Нокодазол блокировал транслокацию STAT1 в ядро (Василенко и др., 1998). Физиологически модулируемая деполимеризация—реполимеризация МТ может в этих случаях быть тем механизмом, который регулирует перемещение сигнальных молекул в ядро и активацию ранних ответов клетки на ростовой фактор «в нужное место в нужное время». Об изменении уровня ЭФР-стимулируемой экспрессии c-myc при действии деполимеризующих агентов сообщалось в работе группы Бриана (Bourgarel-Rey et al., 2000).

Одним из существенных вопросов является специфичность данного феномена. Косвенным указанием на существование специфичности является то, что в клетка, экспрессирующая мутантный рецептор со сниженной способностью сортироваться в поздние эндосомы и доставляться затем в лизосомы, никогда не образуются крупных конгломератов эндосом—лизосом, локализованных в околядерной области. Вместо этого мутантный рецептор выявляется либо в эндосомах, распределенных по всей клетке, либо в более крупных, но изолированных везикулах, располагающихся кольцом вокруг ядра (Соколова и др., 1998). Вопрос о специфичности описанного феномена и о механизмах, лежащих в его основе, нуждается в дальнейших исследованиях.

Работа частично выполнена на средства, предоставленные Российским фондом фундаментальных исследований (проект 06-04-49046), а также на средства гранта РИ-16.0/0010-3 и Государственного контракта № 02.445.11.7337 «Внутриклеточная сигнализация в нормальных, опухолевых и стволовых клетках».

Список литературы

- Василенко К. П., Бутова Е. Б., Цупкина Н. И., Никольский Н. Н. 1998. Интактная сеть микротрубочек необходима для ЭФР-индуцированного транспорта транскрипционного фактора STAT1 в ядро клеток A431. *Цитология*. 40 (12) : 1063—1069.
- Корнилова Е. С., Соркин А. Д., Никольский Н. Н. 1987. Динамика компартиментализации эпидермального фактора роста в клетках A431. *Цитология*. 29 (8) : 904—910.
- Соколова И. П., Арнаутков А. М., Благовещенская А. Д., Никольский Н. Н., Корнилова Е. С. 1998. Влияние нокодазола на эндоцитоз рецептора эпидермального фактора роста. *Цитология*. 40 (10) : 855—861.
- Соколова И. П., Вдовина И. Б., Корнилова Е. С., Никольский Н. Н. 1995. Компартиментализация эпидермального фактора роста (ЭФР) в ходе эндоцитоза в клетках, экспрессирующих нормальный и лишенный основных сайтов автофосфорилирования рецептор ЭФР. *Цитология*. 37 (9/10) : 873—882.
- Aniento F., Emans N., Griffiths G., Gruenberg J. 1993. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* 123 : 1373—1388.
- Banan A., Zhang L., Fields J. Z., Farhadi A., Talmage D. A., Keshavarzian A. 2002. PKC-zeta prevents oxidant-induced iNOS upregulation and protects the microtubules and gut barrier integrity. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283 : G909—G922.
- Barbero P., Bittova L., Pfeffer S. R. 2002. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J. Cell Biol.* 156 : 511—518.
- Bourgarel-Rey V., El Khyari S., Rimet O., Bordas B., Guigal N., Braguer D., Seree E., Barra Y., Briand C. 2000. Opposite effects of antimicrotubule agents on c-myc oncogene expression depending on the cell lines used. *Eur. J. Cancer.* 36 : 1043—1049.
- Clague M. J., Urbe S., Aniento F., Gruenberg J. 1994. Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 269 : 21—24.
- Clarke M., Kohler J., Heuser J., Gerisch G. 2002. Endosome fusion and microtubule-based dynamics in the early endocytic pathway of dictyostelium. *Traffic*. 3 : 791—800.
- D'Arrigo A., Bucci C., Toh B. H., Stenmark H. 1997. Microtubules are involved in bafilomycin A1-induced tubulation and Rab5-dependent vacuolation of early endosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 72 : 95—103.
- De Brabander M., Nuydens R., Geerts H., Hopkins C. R. 1988. Dynamic behavior of the transferrin receptor followed in living epidermoid carcinoma (A431) cells with nanovid microscopy. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 9 : 30—47.
- Diaz R., Colombo M. I., Koval M., Mayorga L., Stahl P. 1991. Endosomal density shift is related to a decrease in fusion capacity. *Eur. J. Cell Biol.* 56 : 223—232.
- Ichikawa T., Yamada M., Homma D., Cherry R. J., Morrison I. E., Kawato S. 2000. Digital fluorescence imaging of trafficking of endosomes containing low-density lipoprotein in brain astroglial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269 : 25—30.
- Ivanova T. V., Ivanov V. N., Nadezhkina E. S. 2001. Transcription factors NF-κB and AP-1/c-fos cell response to nocodazole. *Membr. Cell Biol.* 14 : 727—741.
- Jordens I., Fernandez-Borja M., Marsman M., Dusseljee S., Janssen L., Calafat J., Janssen H., Wubbolts R., Neefjes J. 2001. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr. Biol.* 11 : 1680—1685.
- Kreis T. E., Matteoni R., Hollinshead M., Tooze J. 1989. Secretory granules and endosomes show saltatory movement biased to the anterograde and retrograde directions, respectively, along microtubules in AtT20 cells. *Eur. J. Cell Biol.* 49 : 128—139.
- Lopez-Perez M., Salazar E. P. 2006. A role for the cytoskeleton in STAT5 activation in MCF7 human breast cancer cells stimulated with EGF. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* Apr 25; [Epub ahead of print].
- Miller K., Beardmore J., Kanety H., Schlessinger J., Hopkins C. R. 1986. Localization of the epidermal growth factor (EGF) receptor within the endosomes of EGF-stimulated epidermoid carcinoma (A431) cells. *J. Cell Biol.* 102 : 500—509.
- Murray J. W., Wolkoff A. W. 2003. Roles of the cytoskeleton and motor proteins in endocytic sorting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 : 1385—1403.
- Novikoff P. M., Cammer M., Tao L., Oda H., Stockert R. J., Wolkoff A. W., Satir P. 1996. Three-dimensional organization of rat hepatocyte cytoskeleton: relation to the asialoglycoprotein endocytosis pathway. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 1) : 21—32.
- Pierre P., Scheel J., Rickard J. E., Kreis T. E. 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell*. 70 : 887—900.
- Van Deurs B., Holm P. K., Kayser L., Sandvig K. 1995. Delivery to lysosomes in the human carcinoma cell line Hep-2 involves an actin filament-facilitated fusion between mature endosomes and preexisting lysosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 66 : 309—323.
- Waguri S., Dewitte F., Le Borgne R., Rouille Y., Uchiyama Y., Dubremetz J. F., Hoflack B. 2003. Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Mol. Biol. Cell.* 14 : 142—155.
- Wang L., Mac Donald R. C. 2004. Effects of microtubule-depolymerizing agents on the transfection of cultured vascular smooth muscle cells: enhanced expression with free drug and especially with drug-gene lipoplexes. *Mol. Ther.* 9 : 729—737.
- Xie J., Qian L., Wang Y., Hamm-Alvarez S. F., Mircheff A. K. 2004. Role of the microtubule cytoskeleton in traffic of EGF through the lacrimal acinar cell endomembrane network. *Exp. Eye Res.* 78 : 1093—1106.
- Zang M., Waelde C. A., Xiang X., Rana A., Wen R., Luo Z. 2001. Microtubule integrity regulates Pak leading to Ras-independent activation of Raf-1 insights into mechanisms of Raf-1 activation. *J. Biol. Chem.* 276 : 25 157—25 165.

REMODELING OF MICROTUBULE SYSTEM DURING EGF RECEPTOR ENDOCYTOSIS

M. V. Kharchenko, E. S. Kornilova, M. S. Melikova¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; ¹ e-mail: melikova@mail.cytspb.rssi.ru

The idea of microtubules (MTs) as of passive railway tracks, along which transport vesicles travel by use of motor proteins, is widely accepted. In the present work the organization of MT system during EGF-receptor endocytosis was investigated by indirect double immunofluorescence in HeLa and A431 cell lines. Stimulation of cells with EGF resulted in formation of EGF receptor-containing peripheral vesicular endosomes. During time course of endocytosis the endosomes tended to concentrate in juxtranuclear region close to MTOC. This translocation was dependent on MTs since nocodazole treatment resulted in endosomes' scattering throughout the cytoplasm. Parallel staining of the cells with tubulin antibody has revealed significant remodeling of MTs organization during endocytosis. At early stages MTs demonstrated slight retraction at the cell periphery and the increasing intensity of tubulin fluorescence in the juxtranuclear region. Later on, long individual MTs disappeared and peripheral cytoplasm show diffuse staining in combination with a meshwork of short MT fragments. This stage correlated with EGFR localization in juxtranuclear endosomes. Disappearance of EGFR-positive staining due to its lysosomal degradation occurred in parallel to reestablishment of radial MT system. Possible functional significance of described alterations in organization of tubulin cytoskeleton is discussed.
