

АЦЕТИЛИРОВАНИЕ МИКРОТРУБОЧЕК В ХОДЕ ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА (c-ErbB1) В ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ HeLa

© М. В. Злобина, М. В. Харченко, Д. С. Латкин, Е. С. Корнилова¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹электронный адрес: *elena.kornilova@gmail.com*

Методом иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии изучали ацетилирование микротрубочек (МТ) в ходе эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста, c-ErbB1. Обнаружено, что стимуляция эндоцитоза c-ErbB1 при образовании его комплекса с эпидермальным фактором роста (ЭФР) приводит к постепенному увеличению ацетилирования МТ, достигающего максимума через 60—90 мин и затем снижающегося до контрольного уровня. Рецепторсодержащие эндосомы при этом постепенно укрупняются и перераспределяются в околядерную область. Через 60—90 мин крупные эндосомы формируют плотные кластеры вокруг центра организации микротрубочек (ЦОМТ). Другой нативный лиганд c-ErbB1, трансформирующий фактор роста- α (ТФР- α), в отличие от ЭФР вызывающий рециклирование рецептора, также инициирует волну ацетилирования, но эффект выражен слабее и эндосомы в этом случае не укрупняются и не формируют плотных скоплений в области ЦОМТ. Обработка клеток ингибитором деацетилаз трихостатином А (TSA) приводит к полному ацетилированию всей популяции МТ в клетке. В этих условиях транслокация эндосом, содержащих комплекс ErbB1 с ЭФР, носит такой же характер, как и в не обработанных ингибитором клетках, однако размер эндосом не увеличивается по мере их перемещения в околядерную область. Ацетилирование особенно ярко выражено на сильно искривленных участках МТ, располагающихся ближе к ЦОМТ и формирующих там плотную спутанную сеть, тогда как периферические плюс-концы МТ в основном прямые и не модифицированы. Полученные данные позволяют предполагать, что ацетилирование МТ не является критичным для преимущественного связывания динеина или кинезина и соответственно для организации перемещения эндосом в определенном направлении, а связано со стабилизацией определенного пула МТ, которые поддерживают гомотипическое слияние эндосом на ранних стадиях их созревания.

Ключевые слова: эндоцитоз, c-ErbB1, ЭФР, ТФР- α , эндосомы, микротрубочки, ацетилирование, TSA.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, МТ — микротрубочки, ТФР- α — трансформирующий фактор роста α , ЦОМТ — центр организации микротрубочек, ЭФР — эпидермальный фактор роста, PBS — фосфатно-солевой раствор, TSA — trichostatin A.

Микротрубочки (МТ) — один из трех основных типов цитоскелета клеток — состоят из димеров альфа- и бета-тубулина, организованных в протофиламенты по принципу «голова—хвост». За счет латеральных взаимодействий друг с другом 13 протофиламентов образуют полый цилиндр, или трубочку (Fosket, Morejohn, 1992). МТ участвуют в поддержании формы клетки, опосредуют клеточную подвижность, в митозе формируют веретено деления. С помощью моторных белков — кинезинов и динеина — по МТ транспортируются клеточные органеллы и крупные молекулярные комплексы (Pierre et al., 1992; Prahlad et al., 1998; Kanai et al., 2004).

Во многих типах клеток подавляющее большинство МТ в интерфазе образует радиальную систему, сходящуюся в околядерной области в точке, называемой центром организации МТ (ЦОМТ), которая обычно содержит centrosому. Однако в клетках могут присутствовать и МТ, не закрепленные в ЦОМТ (Vorobjev et al., 1997; Бураков, Надеждина, 2006). МТ — высокодинамичные струк-

туры, способные быстро изменять свою длину за счет циклов полимеризации—деполимеризации периферического, или плюс-конца, и деполимеризации минус-конца, обычно заякоренного на centrosоме (Kirschner, Mitchison, 1986). Очевидно, что «динамическая нестабильность» МТ в интерфазе позволяет осуществлять быстрые реорганизации всей системы, например в ходе установления поляризации или при движении клетки по субстрату, а также повышает вероятность взаимодействия плюс-конца МТ с внутриклеточными мишенями, такими как хромосомы, везикулы, крупные молекулярные комплексы и др. (Lomakin et al., 2009).

Наряду с динамичными МТ, $T_{1/2}$ которых составляет от 5 до 15 мин, в клетках существуют и стабильные пулы МТ, существующие в течение нескольких часов (Verhey, Gaertig, 2007). Хотя механизмы возникновения и функции стабильных МТ в клетке неизвестны, их характерной чертой является целый ряд посттрансляционных модификаций. Например, для α -тубулина описаны ацетилирование

по остатку лизина40 (Lys40), удаление С-концевого остатка тирозина (детирозинирование), фосфорилирование и др. (Verhey, Gaertig, 2007). В зависимости от типа клеток различным модификациям могут подвергаться как одна и та же МТ, так и их различные субпопуляции. Более того, «набор» возможных модификаций в клетке может различаться: так, сообщалось, что в клетках HeLa, растущих в присутствии сыворотки, выявляются ацетилованные МТ, а детирозинированные практически отсутствуют, тогда как в клетках Ptk-2 реализуется обратная ситуация (Bulinski et al., 1988). Данные относительно значения той или иной модификации для жизни клетки весьма неполны и противоречивы, хотя существует консенсус относительно того, что сами по себе модификации являются не причиной стабилизации МТ, а ее следствием.

Одной из интенсивно разрабатываемых в настоящее время гипотез является участие стабильных МТ в транспортных процессах. Это предположение подтверждается данными о преимущественных взаимодействиях моторных белков с определенным образом модифицированными МТ. Действительно, конкретная модификация может диктовать предпочтительное связывание определенных изоформ кинезина или динеина с МТ, тем самым обеспечивая дополнительный уровень специфичности транспортных процессов. Однако и эти данные полны противоречий. Так, в ряде работ (Reed et al., 2006; Cai, 2009) делается вывод о том, что ацетилованные МТ предпочтительно узнаются кинезинами (т. е. поддерживают транспорт к плюс-концу МТ, на периферию клетки), тогда как в других исследованиях утверждается, что минус-концевой мотор динеин проявляет повышенное сродство к ацетилованному тубулину и именно динеинзависимый транспорт ускоряется при этой модификации (Verhey, Gaertig, 2007; Vaughan et al., 2008). В то же время сообщается, что кинезин-1 предпочитает ацетилованным МТ детирозинированные (Dunn et al., 2007) и что экспорт рецептора трансферрина из околядерного рециклирующего компартмента зависит от детирозинированных МТ и кинезина (Lin et al., 2002).

Подавляющее большинство работ, посвященных выяснению роли, в частности, ацетилования МТ, выполнено либо на клетках, культивируемых в присутствии сыворотки (т. е. постоянно подверженных воздействию целой палитры эндогенных стимуляторов разнообразных внутриклеточных сигнальных каскадов), либо с использованием ингибиторов, химически или генетически подавляющих фермент, деацетилирующий МТ (HDAC6), или моторные белки. Одним из следствий таких подходов может быть изменение реальной динамики процессов модификации тубулина, в результате чего становится невозможным соотносить действие конкретного природного стимула (ростового фактора, гормона и т. д.) и динамику, степень и характер ацетилования МТ. Логично предположить тем не менее, что в физиологических условиях время, продолжительность и интенсивность ацетилования МТ контролируются определенными сигнальными путями, однако очень мало известно о том, какие именно сигналы и каким образом могут участвовать в этом процессе (Gundersen et al., 1994). Сказанное в полной мере относится к таким регуляторам жизнедеятельности клеток, как пептидные ростовые факторы, воздействие которых на клетку опосредуется трансмембранными рецепторами, содержащими цитоплазматический тирозинкиназный домен.

Рецептор эпидермального фактора роста, или c-ErbB1, первый из четырех идентифицированных транс-

мембранных тирозинкиназных рецепторов семейства c-ErbB, широко экспрессируется в клетках различного происхождения. Формирование комплекса рецептора с лигандом на поверхности клетки приводит как к активации рецепторной тирозинкиназы и инициации ряда сигнальных каскадов, так и к стимуляции эндоцитоза лиганд-рецепторных комплексов. В ходе этого процесса рецепторсодержащие эндосомы закориваются на плюс-конце МТ и начинают динеинзависимое перемещение по МТ к ее минус-концу. Окончательная судьба рецептора зависит от того, с каким лигандом был образован комплекс (Ebner, Derynck, 1991; Stein, Staros, 2006). c-ErbB1 имеет несколько нативных лигандов, различающихся по своим свойствам. Так, например, ТФР- α и ЭФР, связываясь с рецептором с одинаковой аффинностью, диссоциируют из комплекса при разных значениях pH (при 6.5—6.0 и <5.0 соответственно). Эндосомы по мере продвижения по эндоцитозному пути закисляются, в результате ТФР- α диссоциирует раньше, чем ЭФР. Поскольку диссоциация приводит к быстрой деактивации тирозинкиназы рецептора, необходимой для убиквитинзависимой доставки его в лизосомы, рецептор, стимулированный ТФР- α , преимущественно рециклирует из эндосом, тогда как рецептор в комплексе с ЭФР проходит весь путь из ранних в поздние эндосомы и попадает в лизосомы, где и деградирует (Ebner, Derynck, 1991).

Таким образом, система «с-ErbB1—лиганд» является удобной моделью лигандстимулируемого эндоцитоза, в ходе которого осуществляется как динеинзависимый транспорт в околядерную область, так и кинезинзависимое рециклирование в обратном направлении.

Задача настоящей работы состояла в том, чтобы выяснить, влияет ли стимуляция эндоцитоза рецептора c-ErbB1 в клетках HeLa на ацетилование МТ, а если да, то каким образом. Использование ЭФР и ТФР- α , нативных лигандов, направляющих рецептор преимущественно на путь лизосомной деградации или рециклирования, в комбинации с TSA, ингибитором деацетилазы HDAC6, было выбрано в качестве физиологически релевантного подхода для поиска ответа на вопрос о том, какие именно стадии эндоцитоза могут коррелировать с ацетилованием МТ.

Материал и методика

Культивирование клеток. В работе использовали клетки HeLa, полученные из Европейской коллекции клеточных культур. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % фетальной сыворотки при 37 °C 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 °C в течение 60 мин в присутствии ЭФР или ТФР- α в концентрации 25 нг/мл. После 5-кратной отмывки PBS от несвязавшегося ростового фактора эндоцитоз стимулировали переводом клеток в рабочую среду, не содержащую лиганда, при 37 °C на указанное время.

Обработка клеток TSA. Клетки инкубировали в течение 60 мин при 37 °С в рабочей среде, содержащей 500 нг/мл TSA (Sigma, Германия). Все дальнейшие инкубации (в том числе холодовые) проводили при постоянном присутствии ингибитора в рабочей среде.

Антитела. Для специфического выявления с-ErbB1 использовали поликлональные антитела, полученные на эпитоп экстраклеточного домена рецептора ЭФР человека (дар д-ра Д. Творогова), в разведении 1 : 500. Моноклональные антитела против α -тубулина, ацетил- α -тубулина (Sigma, США) использовали в разведении 1 : 2000. В качестве вторых антител использовали конъюгаты GAR-Alexa 562 и GAM-Alexa 488 (Molecular Probes, Англия), а также GAM-Cy3 (Jackson, США) в разведении 1 : 500. Антитела разводили в PBS pH 7.4, содержащем 1 % БСА. Для иммуноблотинга использовали кроме упомянутых выше антитела против фосфотириозина pY-20 (Sigma, США), фосфорилированной формы Erk1/2 (Cell Signaling, США), в разведениях, рекомендуемых фирмой-производителем. В качестве вторых антител в иммуноблотинге использовали GAR-HRP и GAM-HRP (Sigma, США).

Электрофорез и иммуноблотинг. Для получения лизата клетки обрабатывали лизирующим буфером: 150 mM NaCl, 20 mM Трис-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1%-ный Тритон X-100, коммерческий коктейль ингибиторов (Sigma) и 1 mM ортованадат натрия. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд, используя БСА для построения калибровочной кривой. Каждая проба содержала 50 мкг белка. Электрофоретическое разделение белков лизата проводили в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в модификации Лэммли. Иммуноблотинг проводили в соответствии с методикой ECL Western blotting protocol (Amersham, Швеция). Для усиления сигнала использовали систему ECL (Amersham, Швеция).

Субклеточное фракционирование в градиенте плотности Перколл проводили по методу, описанному ранее (Корнилова и др., 1987). Этот метод позволяет разделить лизосомы (1—3-я фракции со дна пробирки), частично перекрывающиеся с ними (3—6-я фракции) поздние и ранние эндосомы (7—9-я фракции). После выравнивания фракций по белку их смешивали с 5-кратным буфером Лэммли и проводили электрофорез и иммуноблотинг, как описано выше.

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%-ный Тритон X-100 (Sigma, США). 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, США). Инкубацию со вторыми антителами проводили 30 мин при комнатной температуре. Потом промывали, как описано выше. При двойном окрашивании ацетилированного и тотального α -тубулина окрашивание проводили последовательно. На первом этапе проводили окрашивание ацетил- α -тубули-

на, причем после отмытки от вторых антител проводили фиксацию сформировавшегося комплекса (ацетилированный тубулин, специфичные к нему первые антитела, вторые антитела GAM-cy3) в 4%-ном растворе формалина (Sigma, США) на PBS в течение 5 мин. Отмывали от фиксатора 3 раза по 3 мин раствором PBS, затем проводили окрашивание тотального α -тубулина.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Распределение флуоресцентномеченных белков в клетках изучали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Zeiss, Германия). 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. Срез сканирования выбирали ниже ядра или в нижней его части, т. е. там, где локализуется основная масса эндосом и МТ в клетках HeLa.

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 двух разных стеклах. Степень ацетилирования оценивали с помощью программы ImageJ 1.40 g (National Institute of Health, Maryland, США). В расчет брали параметр «% Area» (т. е. оценивали долю площади, занятой ацетилированным тубулином, по отношению к площади целой клетки, выраженную в %) при установленном пороговом значении интенсивности 71. В качестве площади всей клетки брали площадь, занятую тубулином. Пороговое значение интенсивности определяли исходя из максимального соответствия между видимым глазом и компьютерным изображением. Число клеток, которые анализировали в каждой временной точке, составляло от 19 до 26. Статистический анализ полученных данных проводили в программе Microsoft © Excel 2.0, используя критерий Стьюдента для непарных выборок с разной дисперсией. На графике представлены средние значения с доверительными интервалами.

Результаты

Используемый нами подход с предварительным связыванием лиганда при 4 °С позволяет в значительной мере синхронизировать молекулярные события, инициирующиеся при стимуляции эндоцитоза в результате перевода клеток в среду с температурой 37 °С. Очевидно, что при исследовании поведения МТ охлаждение является нежелательным моментом, поскольку в клетках HeLa оно приводит к деполимеризации МТ. Тем не менее ранее нами было показано, что после нагревания радиальная система МТ восстанавливается в течение 5—10 мин и ЭФР-рецепторные комплексы проходят через те же эндосомные компартменты, что и при импульсном добавлении ЭФР. Основное отличие состоит в том, что переход из ранних в поздние эндосомы и затем в лизосомы осуществляется медленнее, но синхронизированно (Корнилова и др., 1987; Diaz et al., 1991). В результате становится возможным достоверно выявлять относительно небольшие изменения, в ином случае теряющиеся на фоне постоянно присутствующего в среде ростового фактора. Клетки перед экспериментом также выдерживали от 12 до 24 ч в среде, практически лишенной сыворотки, для минимизации возможных неконтролируемых сигналов.

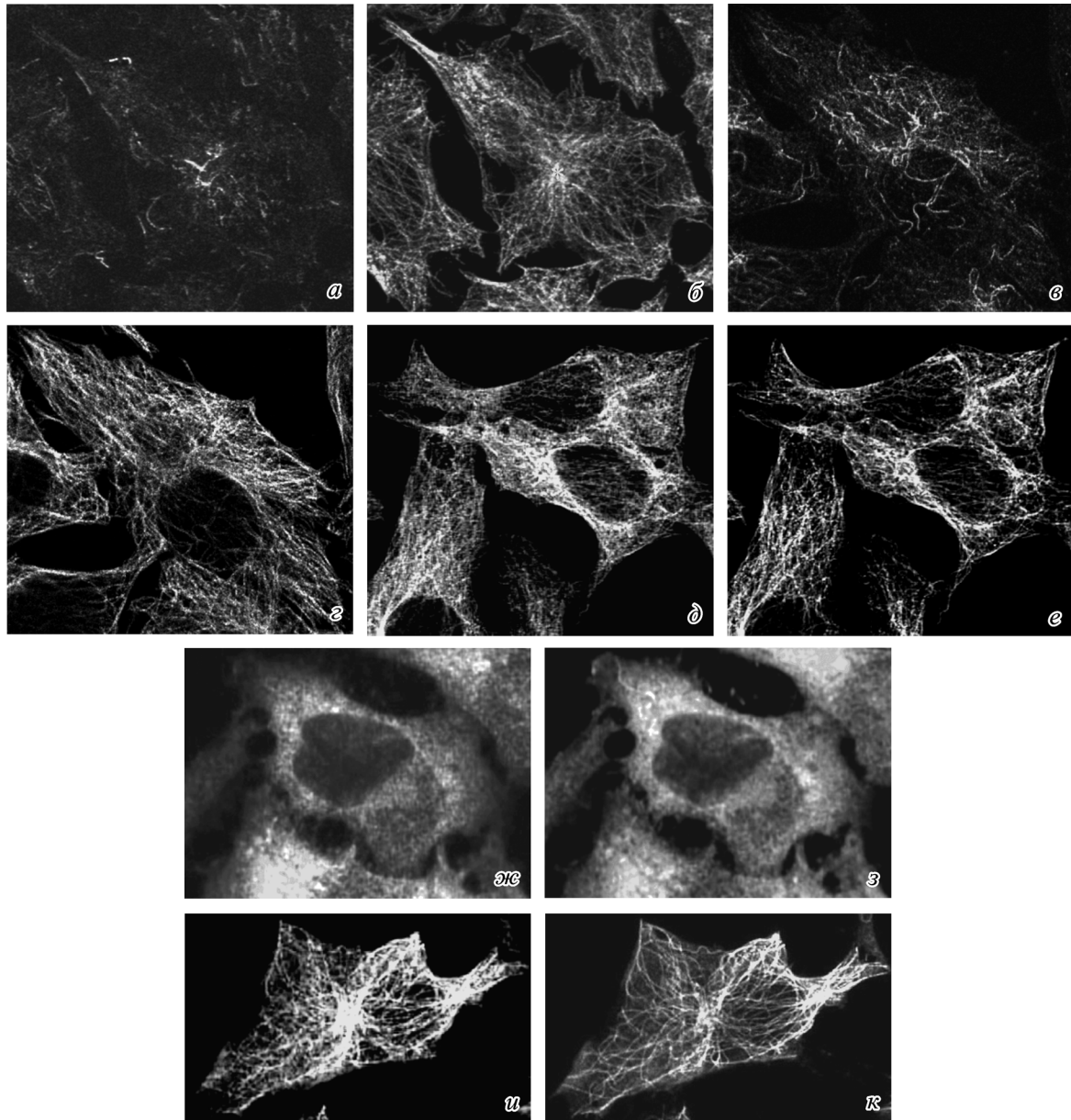


Рис. 1. Ацетилирование микротрубочек под действием ЭФР в контроле и при обработке клеток HeLa ингибитором деацетилаз TSA.

В левом столбце (а, в, д, ж, и) представлены результаты окраски клеток антителами на ацетилированный α -тубулин, в правом (б, з, е, з, к) — окраска тех же клеток антителами на общий α -тубулин. а, б — клетки не обрабатывали ни лигандом, ни ингибитором; в, з — клетки окрашивали через 60 мин после стимуляции эндоцитоза с-ErbB1 под действием ЭФР по схеме с предварительным связыванием лиганда; д—к — клетки обрабатывали TSA в отсутствие лиганда (д, е), затем инкубировали их при 4 °С в течение 1 ч (ж, з), после чего возвращали в среду с температурой 37 °С на 15 мин (и, к).

Оказалось, что в контрольных клетках, не подверженных воздействию ЭФР, количество ацетилированного тубулина весьма мало, а участки МТ, подвергшиеся модификации, в основном локализованы в непосредственной близости от ЦОМТ (рис. 1, а, б). Однако через 60 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР протяженность ацетилированных участков возрастает, а модификации подвергаются участки МТ, расположенные и в периферической области клеток. Интересно отметить, что модифицируются не все МТ и не по всей длине (рис. 1, в, г). Добавление ингибитора деацетилаз TSA приводит к практически идентичной картине распределения антител, узнающих как тотальный, так и ацетилированный тубулин (рис. 1, д, е), хотя интенсивность флуоресцентного

сигнала с отдельных участков МТ может несколько различаться.

Если обработанные TSA клетки подвергнуть холодной инкубации, необходимой для связывания лиганда, то МТ деполимеризуются, оставаясь ацетилированными, а при переводе клеток в среду с температурой 37 °С из модифицированных димеров собираются радиально организованные МТ с такой же скоростью, что и в контрольных, не обработанных TSA клетках (рис. 1, ж—к). Таким образом, ацетилирование не препятствует полимеризации МТ, и в присутствии TSA можно проводить предварительное связывание лиганда с последующей стимуляцией эндоцитоза переводом в среду с температурой 37 °С.

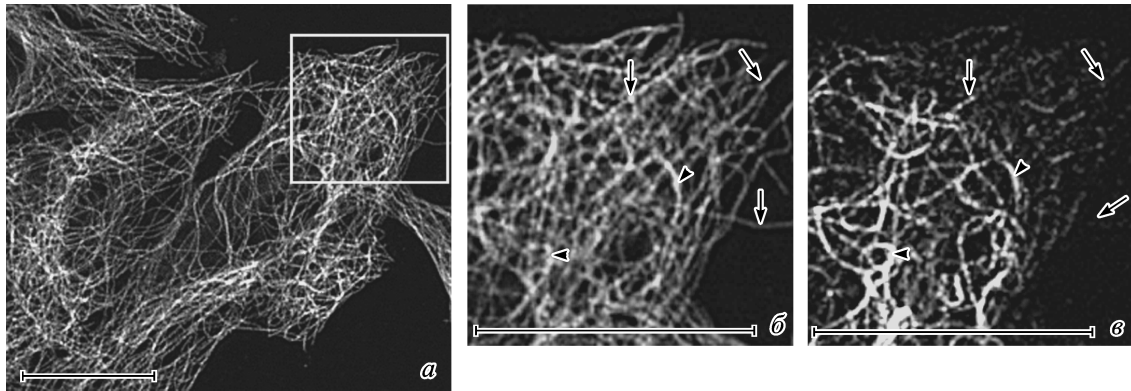


Рис. 2. Через 60 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР с-ErbB1 ацетилированию подвергаются преимущественно дистальные искривленные участки микротрубочек.

Окрашивание клеток антителами на общий (а, б) и ацетилированный (а, в) тубулин. Часть изображения а, выделенная рамкой, представлена в увеличенном масштабе на изображениях б и в. Стрелками отмечены участки микротрубочек, практически не окрашиваемые антителами на ацетилированный тубулин, головками стрелок — участки с интенсивной окраской. Масштабные отрезки — 1 мкм.

При большем увеличении видно, что антитела на ацетилированный тубулин взаимодействуют с субпопуляцией МТ, характеризующихся в основном существенной искривленностью и расположенных ближе к околядерной области, тогда как прямые МТ, особенно локализованные на периферии клетки, практически не модифицируются (рис. 2).

Чтобы выяснить, участвует ли ацетилирование в обеспечении преимущественного взаимодействия с кинезином или динеином, мы стимулировали эндоцитоз с-ErbB1 двумя его нативными лигандами с различной внутриклеточной судьбой. Из-за различающейся чувствительности к уровню внутриэндоцитозного рН комплекс рецептора с ТФР- α диссоциирует раньше, чем в случае ЭФР, что приводит к быстрому дефосфорилированию с-ErbB1. Из данных, представленных на рис. 3, А, следует, что ЭФР поддерживает тирозинное фосфорилирование рецептора вплоть до 90 мин после стимуляции эндоцитоза, тогда как в присутствии ТФР- α рецептор в основном дефосфорилируется уже через 60 мин. Поскольку тирозинкиназная активность рецептора необходима для его продвижения по пути лизосомной деградации, в случае ТФР- α рецептор, по данным субклеточного фракционирования в градиенте Перколла (рис. 3, Б), через 60 мин эндоцитоза не достигает не только лизосом, но и зрелых поздних эндосом, при этом основная часть рецептора локализована в более легких фракциях (расположенных на блотах правее), чем рецептор в комплексе с ЭФР. Следовательно, рецептор под действием ТФР- α деактивируется быстрее, чем в комплексе с ЭФР, и в

массе своей рециклирует, не доходя до стадии зрелых эндосом.

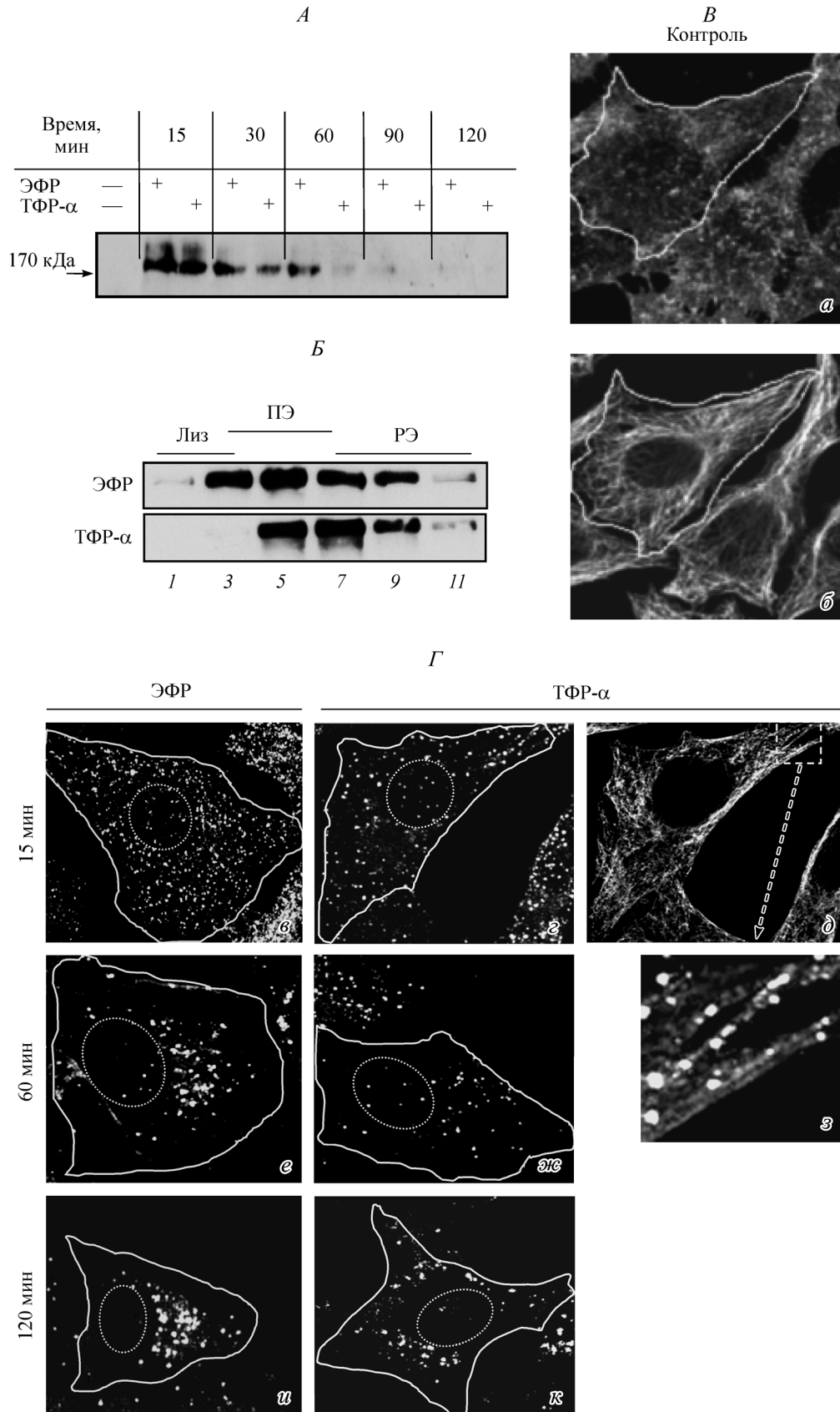
Сравнение изменения локализации с-ErbB1 в ходе эндоцитоза, стимулированного ЭФР и ТФР- α , позволило выявить различия между ними. В контрольных клетках рецептор демонстрировал диффузное распределение, характерное для мембранной локализации (рис. 3, В, изображение а). На параллельной фотографии приведена окраска той же клетки антителами на тубулин (рис. 3, В, изображение б). Контур клетки, обведенный по изображению б, практически совпадает с контуром, обведенным по краям клеточной мембраны. Поскольку при стимуляции эндоцитоза рецептор быстро перестает выявляться на мембране, в дальнейшем для описания данных по локализации эндосом мы использовали этот прием выделения контура клетки и положения ее ядра по зоне, окрашенной антителами на тубулин в той же клетке.

Поскольку при анализе изображений на конфокальном микроскопе мы фокусировались на оптическом срезе, расположенном в области локализации основной части системы МТ, в него попадала зона под ядром и в нижней части ядра. Таким образом, эндосомы, выявляемые в области ядра на некоторых изображениях, на самом деле расположены ниже и не могут рассматриваться как доказательство попадания с-ErbB1 в ядро.

Видно, что через 15 мин после стимуляции эндоцитоза с-ErbB1 выявляется в мелких дискретных структурах, распределенных равномерно по цитоплазме, что традиционно описывается как локализация в ранних эндосомах. Через 60 мин в случае стимуляции эндоцитоза ЭФР эндо-

Рис. 3. Динамика фосфорилирования по тирозину (А) и компартиментализации с-ErbB1 в ходе эндоцитоза, стимулированного ЭФР и ТФР- α (Б—Г).

А — окраска антителами на фосфотирозин тотального лизата клеток, в которых эндоцитоз с-ErbB1 стимулировали разными лигандами на указанное время после предварительного связывания. Б — клетки через 60 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР (верхний блот) или ТФР- α (нижний блот) обрабатывали для центрифугирования в градиенте 17%-ного Перколла, затем после ультрацентрифугирования фракции отбирали со дна (левая часть блота) и нечетные фракции (номера указаны под блотом) после уравнивания по белку параллельных фракций подвергали электрофорезу и иммуноблоттингу антителами на с-ErbB1. Положение в градиенте ранних (РЭ), поздних (ПЭ) эндосом и лизосом (Лиз) определяли, как описано ранее (Корнилова и др., 1987). В — результаты двойного непрямого иммунофлуоресцентного анализа распределения с-ErbB1 (а) и тубулина (б) в клетках HeLa, не обработанных лигандом. Белый контур, совпадающий с очертаниями клетки на изображении а, практически полностью занят тубулиновым цитоскелетом, таким образом, область, занятая системой микротрубочек, в высокой степени коррелирует с общей площадью клетки. Контур ядра, дающие представление о локализации эндосом, в дальнейшем оценивали по параллельным изображениям системы микротрубочек, не приводя последние во всех случаях для упрощения восприятия иллюстрации. Г: в, г, е, ж, и, к отражают локализацию содержащих рецептор эндосом через 15 (верхний ряд), 60 (средний ряд) и 120 (нижний ряд) мин после стимуляции эндоцитоза с-ErbB1 с помощью ЭФР (левый столбец) или ТФР- α (остальные изображения); д — распределение тубулина в клетке на г; з — увеличенное совместное изображение тубулина и эндосом в периферической области клетки, отмеченной рамкой на д; видно, что более светлые эндосомы локализованы вдоль микротрубочек.



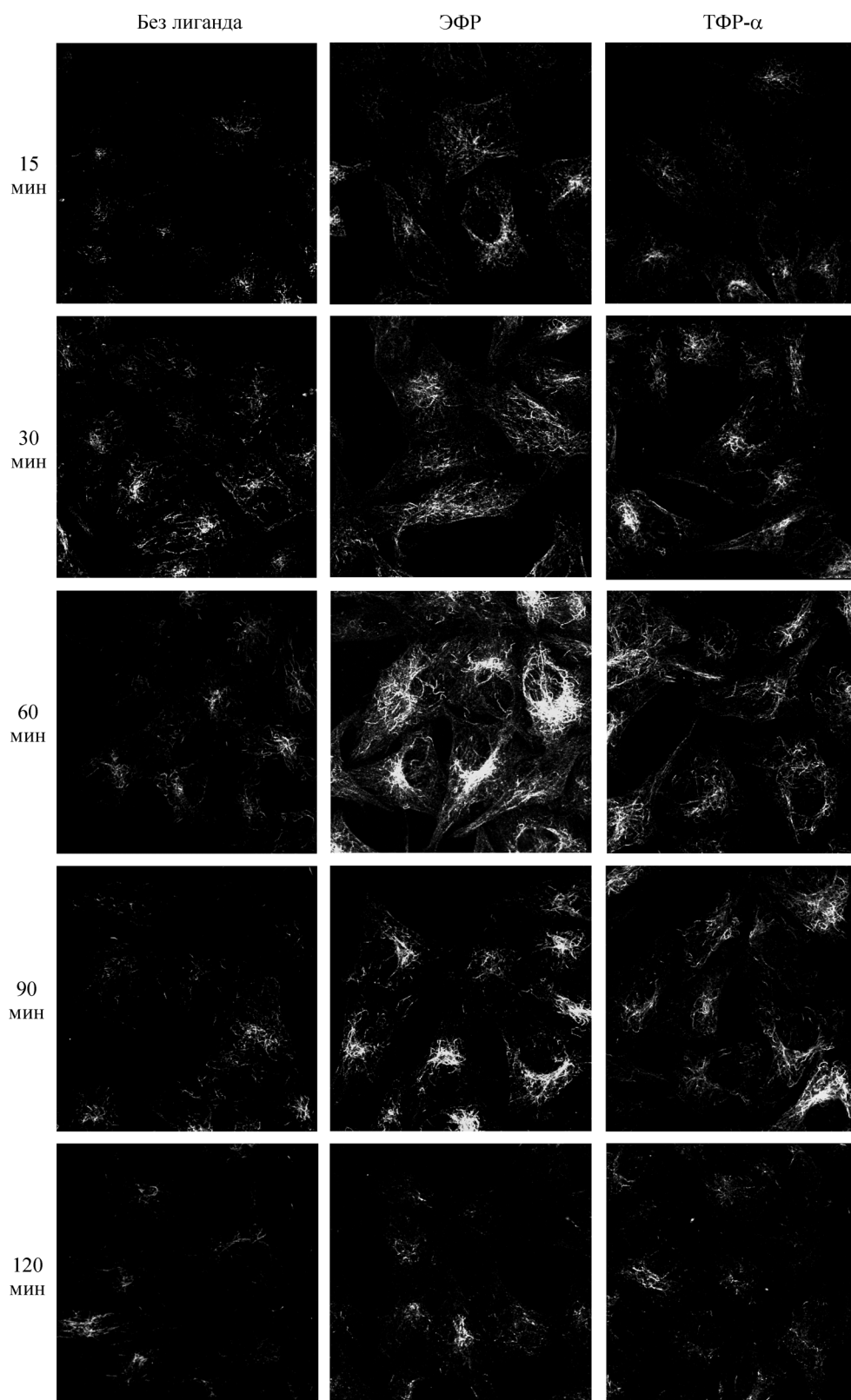


Рис. 4. Динамика ацетилирования микротрубочек в клетках HeLa, не обработанных лигандом (левый столбец), стимулированных ЭФР (средний столбец) или ТФР-α (правый столбец).

Слева указано время после стимуляции эндоцитоза по схеме с предварительным связыванием лиганда. Клетки после фиксации окрашивали антителами на ацетилированный тубулин.

сомы увеличиваются в размерах и начинают собираться в околоядерной зоне, через 120 мин образуя довольно плотные кластеры крупных везикул (рис. 3, Г, изображения *в*, *е*, *и*). Сравнение этих данных с результатами биохимического анализа, приведенными на рис. 3, А, показывает, что рецептор в этих эндосомах уже дефосфорилирован (рис. 3, А). Это, скорее всего, отражает его перемещение во внутренние пузырьки мультивезикулярных поздних эндосом, что соответствует поздней стадии созревания эндосом.

Если же эндоцитоз рецептора стимулировали ТФР- α , то изменения в его локализации в значительной степени совпадали с таковыми в случае ЭФР. Однако, несмотря на некоторое укрупнение эндосом, они не образовывали плотного кластера даже через 120 мин после стимуляции эндоцитоза (рис. 3, Г, изображения *г*, *ж*, *к*).

Анализируя ацетилирование МТ в контроле и после стимуляции эндоцитоза двумя лигандами, мы обнаружили, во-первых, что процедура охлаждения клеток и последующего нагревания весьма незначительно влияет на уровень ацетилирования клеток, не обработанных лигандом (рис. 4, левый столбец изображений). Во-вторых, стимуляция эндоцитоза с-ErbB1 под действием ЭФР приводит к постепенному увеличению площади клетки, занятой модифицированными МТ, причем ацетилированию подвергаются и более периферические участки МТ. Ацетилирование достигает максимума через 60–90 мин, при этом в основном увеличивается уже не столько площадь, занятая модифицированными МТ, сколько интенсивность их ацетилирования. Хотя рецепторсодержащие эндосомы через 60 мин собираются в околоядерной области и остаются там и в дальнейшем (рис. 3, Г), ацетилирование МТ начинает падать и через 120 мин достигает базального уровня (рис. 4, средний столбец изображений).

Стимуляция эндоцитоза под действием ТФР- α имела тот же характер, что и в случае ЭФР, однако слабее выраженный. На рис. 5 приведены данные количественной обработки изображений клеток, окрашенных антителами на ацетилированный тубулин. Видно, что через 60 мин после стимуляции эндоцитоза имеется достоверное различие в площади, занятой модифицированным тубулином, при действии двух лигандов. Поскольку обработку изображений проводили по одному срезу и учитывали только площадь, занятую сигналом выше порогового значения, но не его интенсивность, реальная суммарная разница в ацетилировании МТ под действием ЭФР и ТФР- α на самом деле гораздо значительнее.

Поскольку, как мы показали ранее (рис. 1), ингибитор деацетилаза TSA не влияет на динамику полимеризации (деполимеризации) тубулина и на восстановление радикальной сети МТ, обработка клеток TSA, приводящая к ацетилированию всех МТ, может быть использована для выявления влияния ацетилирования на моторопосредуемую подвижность эндосом. Однако анализ влияния ацетилирования МТ под действием TSA на локализацию ЭФР-содержащих эндосом показал (рис. 6), что перемещение в околоядерную область в присутствии ингибитора происходит приблизительно с той же эффективностью, что и в контрольных, не обработанных TSA клетках, но в результате эндосомы не формируют столь же плотного околоядерного кластера, как это происходит в отсутствие TSA. Основным результатом действия ингибитора является то, что эндосомы практически не увеличиваются в размерах, а это означает существенное подавление гомотипического слияния эндосом в околоядерной области.

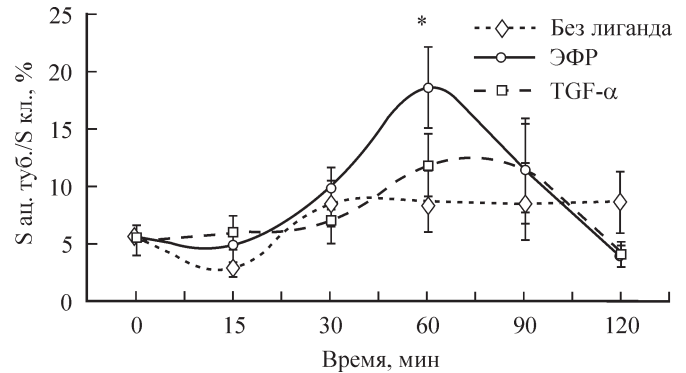


Рис. 5. Количественная оценка динамики ацетилирования микротрубочек в контроле и под действием ЭФР или ТФР- α , полученная при обработке изображений, пример которых приведен на рис. 4.

Контрольные клетки подвергали тем же операциям, что и стимулированные, но без добавления лиганда. По оси абсцисс — время после стимуляции эндоцитоза (37 °C) по схеме с предварительным связыванием; по оси ординат — отношение площади, занятой ацетилированным тубулином, к общей площади клетки (%). Для каждой точки обрабатывали изображения от 19 до 26 клеток. Звездочка — различия достоверны ($P < 0.05$).

Обсуждение

Основным результатом настоящей работы является впервые продемонстрированный факт увеличения ацетилирования МТ в интерфазных клетках HeLa при стимуляции эндоцитоза активированного лигандом рецептора с-ErbB1 (рис. 2). Уровень ацетилирования в данных экспериментах увеличивался, достигал максимума через 60–90 мин после стимуляции эндоцитоза и затем опускался до контрольных значений, причем эффект ЭФР оказался более выраженным по сравнению с эффектом ТФР- α . Существенно также подчеркнуть, что ацетилированию наиболее интенсивно подвергались искривленные МТ в околоядерной области и именно в этой области скапливались увеличенные в размерах ЭФР-содержащие эндосомы. Следует отметить, что под действием ингибитора деацетилаза TSA ацетилировались практически все МТ, однако искривленных МТ было гораздо меньше, чем в не обработанных ингибитором клетках.

Поскольку считается, что ацетилирование, как и другие посттрансляционные модификации тубулина, происходят в основном на стабильных МТ, можно предполагать, что прямые немодифицированные участки — это динамичные плюс-концы, тогда как ацетилированы могут быть как целые стабильные искривленные МТ, так и прямые минус-концевые участки динамичных МТ. Сравнение с данными по действию TSA, при котором в равной степени ацетилируются и искривленные, и прямые участки МТ, говорит о том, что преимущественное ацетилирование искривленных участков связано не столько, например, с большим сродством ацетилтрансфераз к МТ с высокой степенью кривизны, сколько с большей стабильностью искривленных участков МТ по сравнению с прямыми участками.

Существующие литературные данные позволяют предполагать, что ацетилирование МТ может служить сигналом узнавания определенными моторными белками, хотя данные о том, какими именно — динеином или кинезином, противоречивы (Reed et al., 2006; Verhey, Gaertig, 2007; Vaughan et al., 2008; Cai et al., 2009). Мы предполага-

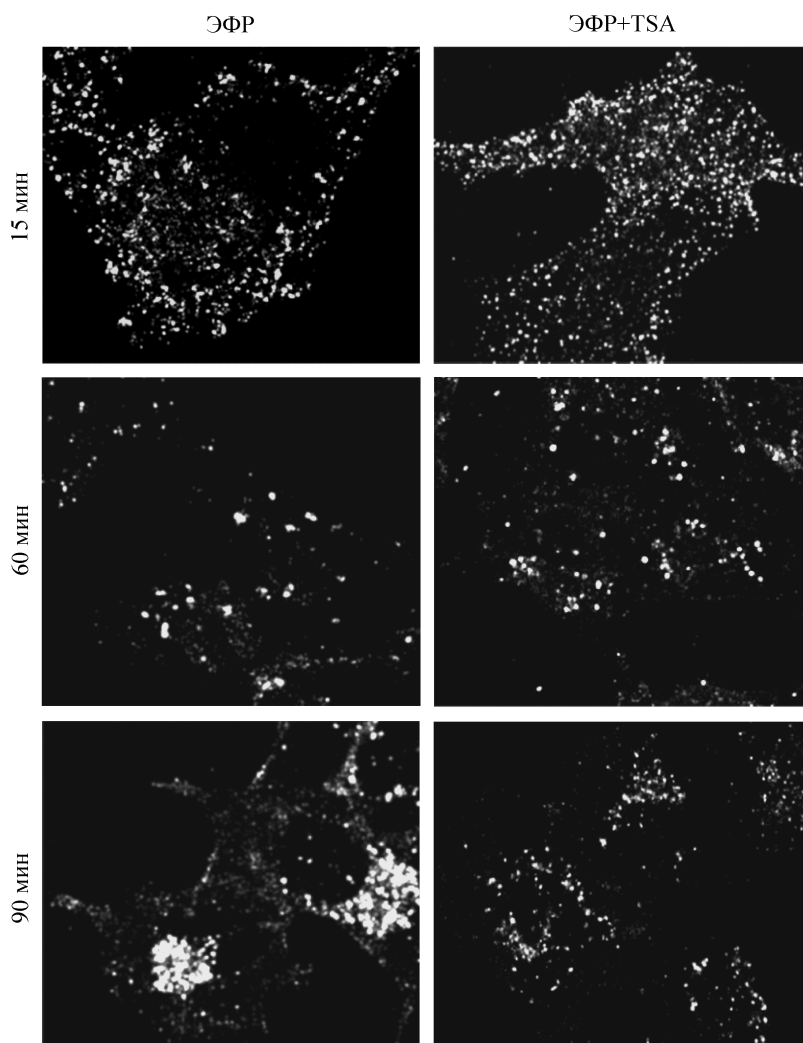


Рис. 6. Изменение локализации с-ErbB1 после стимуляции эндоцитоза ЭФР в контроле и в клетках, предварительно обработанных TSA.

Левый столбец — в клетках стимулировали эндоцитоз ЭФР на 15, 60 и 90 мин (указано слева). Правый столбец — клетки обрабатывали TSA, затем стимулировали эндоцитоз ЭФР так же, как и в контрольных клетках. После фиксации препараты окрашивали антителами на с-ErbB1.

гали, что использование системы с ярко выраженными стадиями, зависящими от динеина и (или) кинезина, может представить данные в пользу одного из предположений.

Действительно, если в случае ЭФР мы имеем дело с динеинзависимым ретроградным транспортом в течение всего времени эксперимента, вплоть до попадания в лизосомы, то ТФР- α первоначально стимулирует динеинзависимое перемещение, и лишь через 30–60 мин можно ожидать волну кинезинопосредуемого рециклирования. Тогда разумно предполагать, что, сравнивая динамику ацетилирования МТ под действием двух лигандов, можно получить ответ на вопрос о том, какой именно моторный белок имеет большее сродство к ацетилированному тубулину.

Если бы ацетилированные МТ поддерживали кинезинзависимый транспорт, то можно было бы ожидать увеличения ацетилирования МТ на более поздних сроках (т. е. через 60–90 мин) при действии ТФР- α , и это увеличение должно было быть более выраженным по сравнению с эффектом ЭФР. Этого, однако, не происходило. Более того, ЭФР вызывал значительно больший подъем

уровня ацетилирования, чем ТФР- α . Полученные данные на первый взгляд легко интерпретировать в пользу преимущественной ассоциации ацетилированных МТ с минус-концевым мотором динеином. Действительно, если ЭФР, вызывающий сильный эффект, проходит свой динеинопосредуемый путь до конца (к области ЦОМТ), то ТФР- α «сходит с дистанции» гораздо раньше, в результате чего сигнал прекращается. В этом случае при экспериментальном подавлении активности деацетилазы HDAC6 с помощью TSA, т. е. при тотальном ацетилировании всех МТ в клетке, можно было бы ожидать сравнимого или превосходящего по скорости образования околядерного кластера эндосом. Однако основное обнаруженное нами отличие сводилось к тому, что хотя перемещение эндосом в область ЦОМТ и происходило, размеры эндосом практически не увеличивались (рис. 6, левый столбец изображений), тогда как в клетках, не обработанных TSA, эндосомы существенно укрупнялись уже через 60 мин после стимуляции эндоцитоза. Интересно, что в контрольных, не обработанных TSA, клетках увеличение размеров эндосом коррелирует с усилением ацетилирования МТ, причем преимущественно в околядерной области. Можно

было бы предположить, что ацетилирование МТ «в нужном месте в нужное время» поддерживает не столько транспорт, сколько слияние эндосом на поздних стадиях их созревания, например за счет замедления скорости перемещения динеина, связанного с созревающими эндосомами, по ацетилированным участкам. Тогда идущие друг за другом по МТ эндосомы попадали бы в «транспортную пробку», что обеспечивало бы им физический контакт, необходимый для слияния. Этому предположению на первый взгляд противоречат данные с использованием TSA, который, вызывая полное ацетилирование МТ, тем не менее скорее препятствовал, чем способствовал слияниям эндосом. Однако немаловажным, на наш взгляд, является то обстоятельство, что в клетках, обработанных TSA (например, приведенных на рис. 1), даже полностью ацетилированные МТ остаются в основном прямыми.

Таким образом, одно из возможных объяснений полученных результатов может быть связано не столько с самим ацетилированием, сколько со стабилизацией МТ, одним из следствий которой наряду с модификациями является искривление ранее прямых МТ. Действительно, как показано на рис. 2, в стимулированных ЭФР клетках ацетилированная субпопуляция МТ представлена в основном сильно искривленными МТ, образующими спутанную сеть с большим числом пересечений. Двойное непрямо окрашивание клеток антителами на ацетилированный тубулин и рецептор ЭФР показывает, что именно на этих пересечениях и локализуются крупные рецепторсодержащие эндосомы (к сожалению, эти данные не могут быть приведены в черно-белом формате, поскольку яркость ацетилированных МТ и эндосом практически совпадает). Важно подчеркнуть, что при искривлении МТ клетка может, используя один и тот же мотор (в данном случае динеин), сводить в одной точке цитоплазмы несколько эндосом благодаря наличию пересечений различных МТ или их петель.

Механизмы, приводящие к искривлению, изучены недостаточно, но действие разнонаправленных моторных белков вкуче с взаимодействиями между разными типами цитоскелета, а также ослабление латеральных связей тубулиновых протофиламентов при стабилизации МТ, очевидно, могут являться одной из причин изменения формы стабильных МТ (Bicek et al., 2009). В пользу предположения об участии модифицированных МТ в регуляции слияния говорит и двухфазный характер ацетилирования МТ (усиление модификации сменяется ее уменьшением; данные рис. 3), поскольку известно, что слияние эндосом по мере их созревания требует локального повышения уровня ионов Ca^{2+} , опосредуемого каналами, локализованными в мембранах эндосом и активирующимися при снижении уровня внутриэндосомального pH, что происходит постепенно по мере созревания эндосом (Calcraft et al., 2009; Martina et al., 2009). При этом сам кальций, как сообщалось, подавляет ацетилирование МТ (Maruta et al., 1986).

В соответствии с современной концепцией, наиболее фьюзогенными являются ранние эндосомы, однако с какого-то момента способность к гомотипическому слиянию падает и начинается стадия созревания ранних эндосом в поздние, сопровождаемая увеличением плотности эндосом (Корнилова и др., 1987; Diaz et al., 1991). Скорее всего, именно с этим этапом эндоцитоза и связано продемонстрированное нами изменение уровня ацетилирования МТ, поскольку четко выраженной деградации рецептора, стимулированного ЭФР, в наших экспериментах не

наблюдалось и через 120 мин после стимуляции эндоцитоза. Таким образом, события, связанные со слиянием с лизосомами, происходят, скорее всего, позже и регулируются не зависимым от ацетилирования МТ образом. Возможно, именно стадия взаимодействия зрелых эндосом с лизосомами связана с описанным нами ранее феноменом фрагментации МТ (Kharchenko et al., 2007).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют, скорее, в пользу того, что для правильного протекания процесса эндоцитоза важно не столько само по себе ацетилирование МТ, дающее преимущество пути, опосредуемому тем или иным моторным белком, сколько их стабилизация, маркером которой и является эта модификация, а также их искривление. Именно эти события могут влиять на уровень слияния эндосом, которое является необходимым этапом их созревания и дальнейшего взаимодействия с лизосомами. Тем не менее нельзя исключать и то, что ацетилированный тубулин в свою очередь является сигналом для рекрутирования к созревающим эндосомам каких-то белков или белковых комплексов, регулирующих поздние стадии эндоцитоза. Вполне вероятно также, что ферменты, поддерживающие баланс ацетилирования (деацетилирования) МТ, например деацетилаза HDAC6, могут играть важную регуляторную роль в транспортных процессах, отличную от их ферментативной активности. Дальнейшие исследования должны дать ответ на эти вопросы.

Однако с высокой степенью уверенности мы можем говорить, что в эпителиальных клетках линии HeLa ацетилирование МТ после стимуляции эндоцитоза рецептора c-ErbB1 отражает возникновение популяции стабильных искривленных МТ, связанных не столько с перемещением по ним рецепторсодержащих эндосом к центру клетки или от него, сколько с поддержанием слияния эндосом, достигающих определенной степени зрелости в случае ЭФР, но не созревающих до нужного состояния под действием ТФР- α .

Работа частично выполнена на средства, предоставленные Российским фондом фундаментальных исследований (проект 09-04-01215а), программой президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и программой президента РФ «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4).

Список литературы

- Бураков А. В., Надеждина Е. С. 2006. Динеин и динактин как организаторы системы клеточных микротрубочек. *Онтогенез*. 37(5) : 1—17.
- Корнилова Е. С., Соркин А. Д., Никольский Н. Н. 1987. Динамика компартиментализации эпидермального фактора роста в клетках A431. *Цитология*. 29 (8) : 904—910.
- Bicek A. D., Tuzel E., Demtchouk A., Uppalati M., Hancock W. O., Kroll D. M., Odde D. J. 2009. Anterograde transport drives microtubule bending in LLC-PK1 epithelial cells. *Mol. Biol. Cell*. 20 : 2943—2953.
- Bulinski J. Ch., Richards J. E., Piperno G. 1988. Posttranslational modifications of alpha tubulin: detyrosination and acetylation differentiate populations of interphase microtubules in cultured cells. *J. Cell Biol.* 106 : 1213—1220.
- Cai D., McEwen D. P., Martens J. R., Meyhofer E. R., Verhey K. J. 2009. Single molecule imaging reveal differences in microtubule track selection between kinesin motors. *PLoS Biol.* 7 (10) : e1000216.
- Calcraft P. J., Ruas M., Pan Z., Cheng X., Arredouani A., Hao X., Tang J., Rietdorf K., Teboul L., Chuang K. T., Lin P.,

- Xiao R., Wang C., Zhu Y., Lin Y., Wyatt C. N., Parrington J., Ma J., Evans A. M., Galione A., Zhu M. X. 2009. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*. 459 : 596—600.
- 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.
- Dunn S., Morrison E. E., Liverpool T. B., Molina-Paris C., Cross R. A., Alonso M. C., Peckman M. 2007. Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J. Cell Sci.* 121 : 1085—1095.
- Ebner R., Derynck R. 1991. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α : differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes. *Cell Regulation*. 2 : 599—612.
- Fosket D. E., Morejohn L. C. 1992. Structural and functional organization of tubulin. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43 : 201—240.
- Gundersen G. G., Kim I., Chapin C. J. 1994. Induction of stable microtubules in 3T3 fibroblasts by TGF-beta and serum. *J. Cell Sci.* 107 : 645—659.
- Kanai Y., Dohmae N., Hirokawa N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*. 43 : 513—525.
- Kharchenko M. V., Aksyonov A. A., Melikova M. S., Kornilova E. S. 2007. Epidermal growth factor (EGF) receptor endocytosis is accompanied by reorganization of microtubule system in HeLa cells. *Cell Biol. Int.* 31(4) : 349—350.
- Kirschner M. W., Mitchison T. 1986. Microtubule dynamics. *Nature*. 324 : 621.
- Lin S., Gundersen G. G., Maxfield F. R. 2002. Export from pericentriolar endocytic recycling compartment to cell surface depends on stable, detyrosinated (Glu) microtubules and kinesin. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 96—109.
- Lomakin A. J., Semenova I., Zaliapin I., Kraikivski P., Nadezhdina E., Slepchenko B., Akhmanova A., Rodionov V. 2009. CLIP-170-dependent capture of membrane organelles by microtubules initiates minus-end directed transport. *Develop. Cell.* 17 : 323—333.
- Martina J. A., Lelouvier B., Puertollano R. 2009. The calcium channel mucolipin-3 is a novel regulator of trafficking along the endosomal pathway. *Traffic*. 10 : 1143—1156.
- Maruta H., Greer K., Rosenbaum J. L. 1986. The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell Biol.* 103 : 571—579.
- Pierre P., Scheel J., Rickard J. E., Kreis T. E. 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell*. 70 : 887—900.
- Prahlad V., Yoon M., Moir R. D., Valr R. D., Goldman R. D. 1998. Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament network. *J. Cell Biol.* 143 : 159—170.
- Reed N. A., Cai D., Blasius T. L., Jih G. T., Meyhofer E., Gaertig J., Verhey K. J. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.* 16 : 2166—2172.
- Stein R. A., Staros J. V. 2006. Insights into the evolution of the ErbB receptor family and their ligands from sequence analysis. *BMC Evol. Biol.* 6 : 79.
- Vaughan E. E., Geiger R. C., Miller A. M., Loh-Marley P. L., Suzuki T., Miyata N., Dean D. A. 2008. Microtubule acetylation through HDAC6 inhibition results in increased transfection efficiency. *Mol. Ther.* 16 : 1841—1847.
- Verhey K. J., Gaertig J. 2007. The tubulin code. *Cell Cycle*. 6 (17) : 2152—2160.
- Vorobjev I. A., Svitkina T. M., Borisi G. G. 1997. Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells. *J. Cell Sci.* 110 : 2635—2645.

Поступила 10 II 2010

ACETYLATION OF MICROTUBULES DURING ENDOCYTOSIS OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (c-ErbB1) IN INTERPHASE HeLa CELLS

M. V. Zlobina, M. V. Kharchenko, D. S. Latkin, E. S. Kornilova¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: elena.kornilova@gmail.com

Acetylation of microtubules (MT) during endocytosis of epidermal growth factor receptor, c-ErbB1, was studied by confocal immunofluorescence microscopy. It was found that stimulation of endocytosis of c-ErbB1 complexed with the epidermal growth factor (EGF), resulted in continuous raising of MT acetylation that reached its maximum at 60—90 min and then went down to the control level. Simultaneously, the receptor-containing endosomes grew in size and were redistributed into juxtranuclear region. Enlarged endosomes formed dense clusters around MTOC in 60—90 min. Another native c-ErbB1 ligand, transforming growth factor- α (TGF- α) and unlike EGF causing the receptor recycling, also initiated a wave of MT acetylation, but the effect was expressed more poorly. In this case, endosomes did not grow in size and did not form dense clusters near the MTOC. Cell treatment with deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) caused acetylation of the whole cellular MT population. Under these conditions, translocations of EGF-c-ErbB1-containing endosomes had the same pattern as in the cells untreated with the inhibitor, but the size of endosomes didn't increase during their redistribution into juxtranuclear region. Acetylation was especially pronounced in strongly bent MT regions positioned proximally to MTOC and forming there a dense meshwork whereas peripheral MT plus-ends were basically straight and not modified. We assume that MT acetylation is not so much crucial for preferential interaction with dynein or kinesin and, accordingly, for organization of endosome translocations in a certain direction. It is rather the result of stabilization of some MT pool which supports homotypic fusion of endosomes at early stage of their maturation.

Key words: endocytosis, c-ErbB1, EGF, TGF- α , endosomes, acetylation, microtubules, TSA.