

ИЗМЕНЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ КОМПОНЕНТОВ ВЕЗИКУЛЯРНОГО АППАРАТА КЛЕТКИ В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МИОБЛАСТОВ В МИОТУБУЛЫ В КУЛЬТУРЕ

© А. В. Салова, Е. А. Леонтьева, Т. П. Моженок, Е. С. Корнилова,
С. А. Кроленко, Т. Н. Беляева

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: avsalova@gmail.com*

Изучение изменений внутриклеточных процессов в ходе дифференцировки миобластов в миотубулы имеет большое значение для понимания фундаментальных проблем клеточной биологии. В первую очередь это относится к изменению пространственной организации вакуолярного аппарата, отражающей изменения свойств мембран, цитоскелета и процессов везикулярного транспорта в ходе дифференцировки. В настоящей работе проанализировано распределение кислых органоидов (лизосом, поздних эндосом, цистерн аппарата Гольджи), аккумулирующих акридиновый оранжевый, в результате образования миотубул в культуре клеток L6J1. Показано, что перинуклеарная локализация кислых клеточных органоидов в миобластах заменяется диффузным распределением этих органоидов по всему объему цитоплазмы миотубул. Использование липофильных красителей RH 414 или di-8-ANEPPS позволило сравнить процесс формирования и динамики эндоцитозных пузырьков в миобластах и миотубулах. Для анализа неспецифического эндоцитоза использовались также полупроводниковые нанокристаллы — квантовые точки (КТ), конъюгированные с ТАТ-пептидом, который относится к пептидам, проникающим в клетку через мембрану. Нами показано, что комплексы КТ—ТАТ поступают в миобласты путем эндоцитоза. Обнаружено, что комплексы КТ—ТАТ проникают в миобласты, но не проникают в миотубулы даже при инкубации в течение 24 ч, что может свидетельствовать об изменениях свойств плазматической мембраны в процессе дифференцировки скелетных мышечных волокон.

Ключевые слова: миобласты, миотубулы, дифференцировка, квантовые точки, конфокальная микроскопия, акридиновый оранжевый, RH 414.

Принятые сокращения: АО — акридиновый оранжевый, КТ — квантовые точки.

Дифференцировка миобластов — миогенез — это сложный динамический процесс, который состоит из нескольких этапов. Каждый этап характеризуется существенными изменениями в экспрессии генов, клеточной морфологии, внутриклеточной структуре и поведении клеток. В процессе дифференцировки одноядерные миобласты сливаются, образуя многоядерные миотубулы, и затем превращаются в высокодифференцированные скелетные мышечные волокна, в которых синтезируются специфические сократительные белки (Burattini et al., 2004; Spangenburg et al., 2004; Tannu et al., 2004; Kollias et al., 2006; Puente et al., 2006).

Проблема дифференцировки скелетных мышечных волокон давно привлекает внимание широкого круга биологов. Помимо изучения этого явления в процессе эмбриогенеза или репарации за счет клеток-сателлитов (стволовых клеток мышц) широкое применение нашли исследования на клеточных культурах. Существует несколько дифференцирующихся миогенных клеточных линий, в которых происходит слияние миобластов в многоядерные миотубулы и их превращение в скелетные мышечные волокна. Несмотря на детальное всестороннее исследование этих процессов, ряд аспектов проблемы остается еще малоизученным. В первую очередь это относится к

изменению пространственной организации вакуолярного аппарата, отражающей изменения свойств мембран, цитоскелета и процессов везикулярного транспорта в ходе дифференцировки.

Эндоцитоз является одним из путей везикулярного транспорта, обеспечивающих поступление макромолекул внутрь клетки в составе мембранных везикул — эндосом. Существует несколько типов эндоцитоза, которые связаны с участками мембраны с определенными свойствами. Так, например, рецепторопосредованный эндоцитоз осуществляется через клатринокаймленные ямки, тогда как неспецифический эндоцитоз (микро- и макропиноцитоз), как правило, связан с рафтами различного состава (Conner, Schmid, 2003).

Как известно, для изучения динамики внутриклеточных структур в процессе эндоцитоза используют различные флуоресцентные красители, позволяющие выявлять и характеризовать мембранные структуры, участвующие в этом процессе. Так, например, АО проникает через мембрану в цитоплазму клетки и далее накапливается за счет протонирования в органоидах со сниженным уровнем pH (далее кислые органоиды). С другой стороны использование липофильных красителей позволяет следить за судьбой внутриклеточных структур, формирующихся на

плазматической мембране (Niles, Malik, 1999; Minshall et al., 2000; John et al., 2001). В последнее время в исследованиях подобного рода применяют полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы — квантовые точки (КТ) (Rajan et al., 2008; Беляева и др., 2009; Rajan et al., 2008; Delehanty et al., 2009; Zhang et al., 2010), поскольку они обладают рядом преимуществ по сравнению с флуоресцентными красителями: это высокий квантовый выход, высокая фотоустойчивость, широкая полоса возбуждения, узкая симметричная полоса эмиссии.

Для применения CdSe/ZnS КТ в биологических исследованиях необходимо обеспечить их растворимость и биосовместимость. С этой целью на поверхности нанокристаллов формируют гидрофильные группы, часть из которых может служить спейсером для присоединения к ним биологических молекул. Для этого в биологии часто используется покрытие ПЭГ. Для доставки в клетку КТ должны быть конъюгированы с определенными биомолекулами. Такими молекулами могут быть пептиды или белки, которые способны распознавать определенные структуры на поверхности клеток и обеспечивать проникновение в клетку.

В настоящей работе, для характеристики изменений эндоцитоза в процессе дифференцировки миобластов в миотубулы (Крылова, Фридлянская, 1988) наряду с органическими флуоресцентными красителями, использовали CdSe/ZnS КТ, конъюгированные с ТАТ-пептидом. ТАТ-пептид относится к пептидам, проникающим в клетку непосредственно через мембрану, но конъюгация его с КТ изменяет путь входа. Показано, что КТ, конъюгированные с аргинин- и(или) лизин-богатыми ТАТ-пептидами, образуют положительно заряженные лиганды, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными рецепторами на клеточной поверхности (например, гепарансульфат протеогликанами) и входят в клетки путем липидного рафтзависимого макропиноцитоза (Ruan et al., 2007; Xue et al., 2007; Chen et al., 2008).

Материал и методы

Клетки линии L6J1, которые являются миобластоподобными клетками скелетной мышцы крысы (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург), культивировали в среде роста, содержащей DMEM, 20 мМ глутамина, 10 % сыворотки крови плодов коровы и 0.1 % гентамицина, в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. Для дифференцировки клетки в количестве $(1.5—2.5) \cdot 10^5$ помещали в чашки Петри с ровными стеклами (22×22 мм), предварительно покрытыми желатином (Крылова, Фридлянская, 1988). В каждую чашку добавляли по 5 мл обогащенной среды роста следующего состава: сыворотка крови плодов коровы — 10%, DMEM — 90%, инсулин — 10 мкг/мл, трансферрин — 10 мкг/мл, дексаметазон — 5 мкг/мл. При достижении монослоем 80—85%-ной плотности (2—3 сут) среду меняли на среду для дифференцировки: DMEM/F-12 (1 : 1), сыворотка крови плодов коровы — 0.5%, кондиционная среда — 1/10 объема среды, цитозинарабинозид (alexan) — 1 мкг/мл, инсулин — 10 мкг/мл, трансферрин — 10 мкг/мл, дексаметазон — 5 мкг/мл. Среду меняли 2 раза в неделю, причем 1/2 объема составляла кондиционная среда. На 5—6 сут культивирования миобластов в среде для дифференцировки появляются миотубулы.

Для выявления кислых мембранных клеточных органоидов (цистерны аппарата Гольджи, поздние эндосомы, лизосомы) в живых клетках использовали флуоресцентный витальный краситель акридиновый оранжевый (АО) (Merck, Германия) в концентрации 0.25—1.00 мкг/мл. Для окраски лизосом и других кислых структур использовали флуорофор Lyso Tracker Green (лизотрекер; Invitrogen, США) в концентрации 50 нг/мл. Окраску клеток проводили в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С в течение 20 мин.

Для прижизненной окраски плазматической мембраны миобластов и миотубул применяли липофильные красители RH 414 (Invitrogen, США) и di-8-ANEPPS (Invitrogen, США) в концентрациях 15 и 5 мкг/мл соответственно. Окраску клеток проводили в атмосфере 5 % CO₂ при 4 или 37 °С в течение 30 мин.

Для характеристики изменений эндоцитоза в процессе дифференцировки миобластов в миотубулы использовали CdSe/ZnS КТ с максимумами флуоресценции 565 и 655 нм, конъюгированные с ТАТ-белком вируса ВИЧ-1 (Invitrogen, США). В опытах с миобластами концентрация КТ—ТАТ составляла 0.1—0.2 нМ, в опытах с миотубулами — 1 нМ. Исходный раствор КТ—ТАТ вносили в культуральную среду, встряхивали на вортексе, добавляли к клеткам и инкубировали от 15 мин до 24 ч в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Флуоресценцию КТ—ТАТ наблюдали в живых клетках.

Для окраски актина в миобластах и миотубулах использовали родамин-фаллоидин (Molecular Probes, США). Клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали 3% раствором формалина (Sigma, США) при комнатной температуре 15 мин, снова промывали в PBS, обрабатывали 0.1%-ным Тритоном X-100 (Sigma, США) 15 мин с последующей отмывкой PBS. Затем красили родамин-фаллоидином (0.2 мкМ) 15 мин, промывали PBS, заключали в среду (Fluorescent Mounting Medium (Dako Cytomation, Дания)).

Для окраски α -актинина в миотубулах использовали моноклональные антитела на саркомерный α -актинин (клон EA-53, Sigma, США). Клетки промывали PBS, фиксировали 4%-ным раствором формалина при комнатной температуре в течение 15 мин, снова промывали PBS, обрабатывали 0.5%-ным Тритоном X-100 15 мин, с последующей отмывкой PBS. Неспецифическое окрашивание блокировали инкубацией в растворе БСА (1 %) 60 мин при комнатной температуре. С первыми антителами клетки инкубировали 60 мин при комнатной температуре в темноте. После этого промывали раствором PBS, содержащим 0.1 % Tween 20 (BioRad, США). В качестве вторых антител использовали конъюгат GAM-FITC (Invitrogen, США) в разведении 1 : 100. Антитела разводили PBS, содержащим 1 % БСА. Инкубацию со вторыми антителами проводили 60 мин при комнатной температуре. Потом промывали раствором PBS, содержащим 0.1 % Tween 20, заключали в среду (Fluorescent Mounting Medium (Dako Cytomation, Дания)).

Исследования проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5. Флуоресценцию АО, di-8-ANEPPS, лизотрекера и α -актинина возбуждали аргоновым лазером (488 нм). Флуоресценцию родамин-фаллоидина возбуждали гелий-неоновым (543 нм) лазером. Флуоресценцию RH 414 возбуждали аргоновым (488 нм) или гелий-неоновым (543 нм) лазером. Флуоресценцию КТ возбуждали диодным (405 нм) или аргоновым (488 нм) лазером. Флуоресценцию АО регистрировали в двух спектральных областях: 500—560 и 590—660 нм.

В опытах с RH 414 излучение регистрировали в области 590—660 нм. В опытах с родамин-фаллоидином излучение регистрировали в области спектра 550—680 нм, с α -актинином — в области 500—560 нм, с di-8-AN-NEPS — в области 590—680 нм, с лизотрекером — в области 500—550 нм. В опытах с КТ, имеющих максимумы флуоресценции 565 и 655 нм, свечение регистрировали в областях 550—580 и 640—670 нм соответственно. Регистрировали одиночные и серийные срезы (Z-серии), которые обычно состояли из 10—20 последовательных оптических срезов с шагом 0.5 мкм. Усреднение изображения проводили по 4—6 кадрам сканирования. Анализ изображений проводили с помощью стандартных программ микроскопа Leica TCS SP5 и программы Image J.

Результаты и обсуждение

Образование поперечнополосатых мышечных волокон сопровождается изменениями в структуре и топографии ряда клеточных органоидов (Ralston, 1993; Lu et al., 2001). Для определения локализации этих структур в клетке интенсивно используется флуоресцентный витальный краситель АО (Zelenin, 1999). На окрашенных АО миобластах (рис. 1, *a*) и миотубулах (рис. 1, *б, в*) помимо мембранных структур диффузно окрашиваются как ядра, так и цитоплазма. Это позволяет выделить несколько типов миотубул, которые формируются в процессе дифференцировки миобластов в культуре: длинные вытянутые миотубулы с ядрами, расположенными цепочкой вдоль клетки; миотубулы, центральная часть которых заполнена ядрами; миотубулы, содержащие хаотично расположенные ядра (рис. 1, *б, в*). Для анализа выбирали длинные вытянутые миотубулы, в которых ядра располагались цепочкой вдоль клетки. Необходимо отметить, что в миотубулах ядра иногда имеют деформированную форму с бороздками и инвагинациями в отличие от ядер в миобластах (рис. 1, *з*). Ранее было показано (Abe et al., 2004), что в миобластах клеточной линии C2C12, которые культивировали в среде для дифференцировки, появляются ядерные инвагинации такого типа. Это связано с тем, что при дифференцировке формирующиеся премиофибриллы и миофибриллы находятся в тесном контакте с ядрами.

В процессе дифференцировки миобластов формируются миофибриллы, которые отвечают за сократительные свойства зрелого мышечного волокна. При этом происходят структурные и функциональные изменения основных мышечных белков актина, миозина и др. Окраска родамин-фаллоидином выявляет реорганизацию фибриллярного актина в миотубулах по сравнению с миобластами. На рис. 2, *a* показаны миобласты L6J1, окрашенные родамин-фаллоидином. Миобласты (рис. 2, *a*) имеют типичную для прикрепленных клеток окраску с большим количеством стресс-фибрилл. В миотубулах (рис. 2, *б*) наблюдается другое расположение фибриллярного актина, а именно интенсивная окраска примембранной области и диффузная окраска цитоплазмы. Подобная окраска примембранной области может указывать на присутствие в ней предшественников миофибрилл (Schultheiss et al., 1990; Sanger et al., 2002). Как известно, предшественники миофибрилл характеризуются наличием мини-саркомеров, ограниченных Z-тельцами, которые состоят из изоформы мышечного α -актина (Thornell, Price, 1991). Наши опыты с использованием антител к α -актину выявили регулярную поперечную исчерченность миотубул,

свидетельствующую о формировании Z-дисков (рис. 2, *в*), что является одним из признаков дифференцированной мышечной клетки.

В настоящей работе мы исследовали изменение распределения кислых структур, окрашенных АО, в процессе дифференцировки миобластов. Ранее нами было показано распределение АО в виде гранул, локализованных в кислых мембранных структурах в миобластах L6J1 и мышечном волокне лягушки (Кроленко и др., 2003; Беляева и др., 2009а; Krolenko et al., 2006). В настоящей работе исследовано распределение гранул АО в миотубулах. В миотубулах выявляются многочисленные гранулы АО, расположенные по всей цитоплазме, в отличие от миобластов, в которых гранул АО меньше и где они в основном локализованы в околоядерной области (рис. 1, *a—в*). В миотубулах гранулы в некоторых случаях образуют скопления в областях цитоплазмы между ядрами. Иногда наблюдаются продольно ориентированные цепочки гранул. Различия в расположении гранул АО, по-видимому, определяется типом миотубул и изменениями в структуре и топографии ряда клеточных органоидов, связанными с формированием миофибрилл в процессе дифференцировки миобластов.

Известно, что в ходе дифференцировки изменяется топография аппарата Гольджи и поздних эндосом (Ralston, 1993; Lu et al., 2001). В миобластах аппарат Гольджи локализован полярно относительно ядра; в миотубулах аппарат Гольджи фрагментирован на множество компарментов, расположенных в виде узких рядов вокруг ядер (перинуклеарно) и между ядрами в местах выхода из эндоплазматического ретикулума. Реорганизация аппарата Гольджи является отражением изменений в циркуляции белков между аппаратом Гольджи и эндоплазматическим ретикулумом и может быть одной из причин значительно увеличения количества гранул АО в миотубулах. Локализация гранул АО, выявляемая в миотубулах, свидетельствует о преобразованиях в эндосомно-лизосомном аппарате клетки во время дифференцировки.

Ранее нами было показано, что в дифференцированных мышечных волокнах кислые органеллы находятся в тесном контакте с поперечными трубочками (Krolenko et al., 2006). В настоящей работе для окраски миобластов и миотубул был использован липофильный краситель RH 414, который применяется для выявления мембран Т-системы в мышечных волокнах. Окраска миотубул RH 414 производили на 5—6-е сут после начала дифференцировки (рис. 3, *б, з*). На этой стадии не удалось выявить Т-трубочки, что, по-видимому, связано с тем, что в миотубулах в этот период еще только начинается формирование мембран Т-системы. Известно, что Т-трубочки занимают перпендикулярное миофибриллам положение при культивировании клеток в течение 2—3 недель, когда уже полностью сформированы миофибриллы (Flucher et al., 1991).

Для изучения процесса эндоцитоза в миобластах и миотубулах использовали окраску клеток RH 414 (рис. 3). Окраска миобластов при 4 °С (рис. 3, *a*) выявляет только плазматическую мембрану клеток. При 37 °С RH 414 окрашивает не только плазматическую мембрану, но и мембраны внутриклеточных структур (рис. 3, *в*). Наблюдается гранулярно-везикулярный характер окраски структур цитоплазмы. Сходные результаты были получены при окраске миотубул, образованных при слиянии миобластов L6J1 (рис. 3, *б, з*). Необходимо отметить, что при 4 °С также хорошо выявляется плазматическая мембрана миотубул (рис. 3, *б*). Использование другого липофильно-

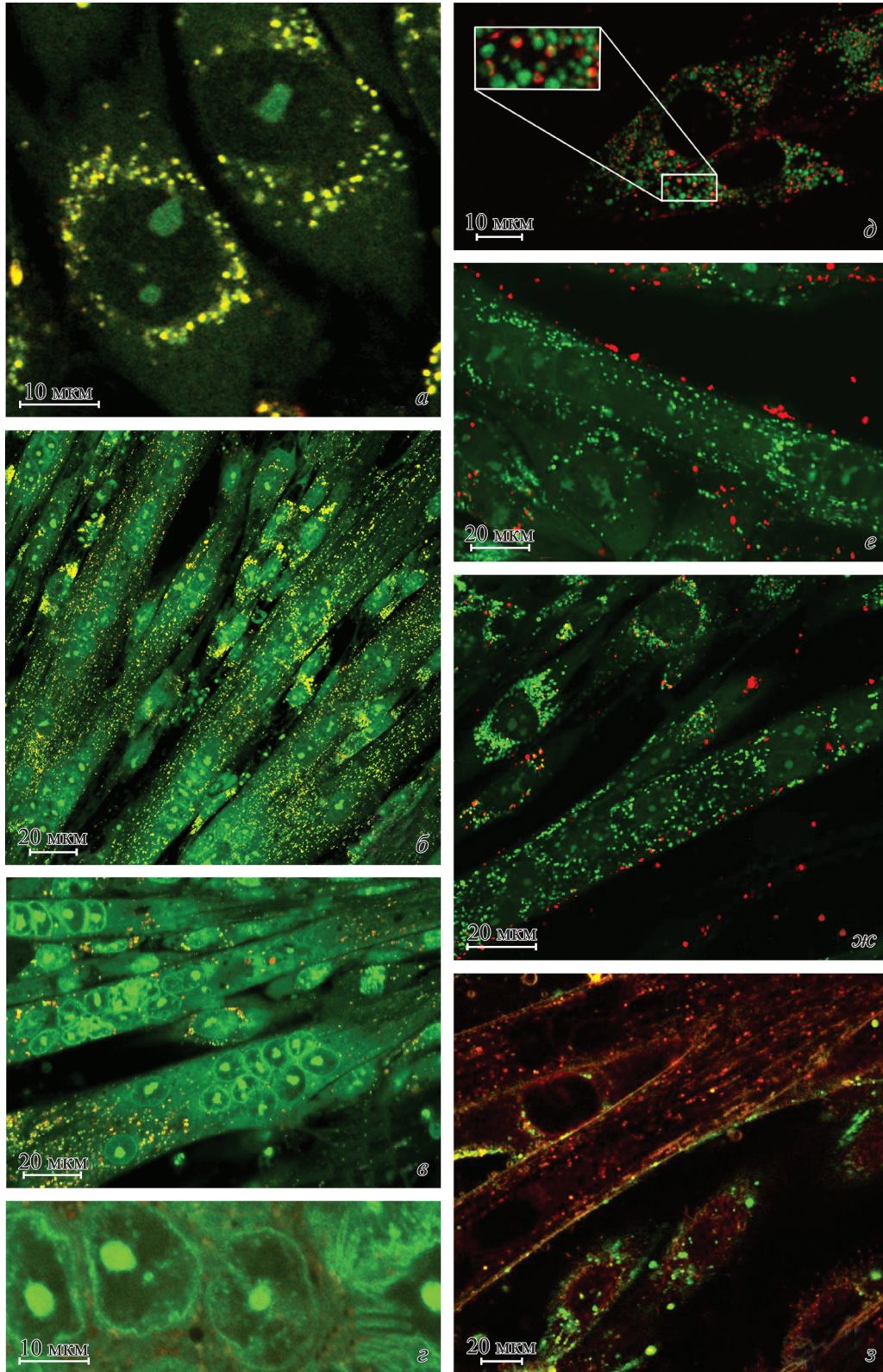


Рис. 1. Конфокальные изображения миофибрилл и миотубул при разных прижизненных окрасках.

a–z — миофибриллы (*a*) и миотубулы (*б–z*), окрашенные АО (1 мкг/мл, 20 мин); флуоресценция в двух спектральных областях 500—560 и 590—660 нм. *a* — гранулы АО в миофибриллах локализованы в околоядерной области. *б, в* — в миотубулах выявляются многочисленные гранулы АО, расположенные по всей цитоплазме. *z* — деформированные ядра с бороздками и инвагинациями в миотубулах. *д* — миофибриллы после инкубации в среде, содержащей КТ—ТАТ (0.1 нМ, 24 ч), окрашенные лизотрекером (50 нг/мл, 20 мин); флуоресценция КТ — в области 640—670 нм, лизотракера — в области 500—550 нм; иногда наблюдаются везикулы, окрашенные лизотрекером, которые содержат комплексы КТ—ТАТ; *вставка* — увеличение участка, демонстрирующего эти везикулы. *е–з* — миотубулы после инкубации в течение 4 (*е*) и 24 (*ж, з*) ч в среде, содержащей КТ—ТАТ (1 нМ), окрашенные АО (0.25 мкг/мл, 20 мин) (*е, ж*) или RH 414 (15 мкг/мл, 30 мин) (*з*); флуоресценция КТ655 — в области 640—670 нм, флуоресценция КТ565 — в области 550—580 нм, АО — в области 500—560 нм, RH 414 — в области 590—660 нм; комплексы КТ—ТАТ выявляются только на плазматической мембране миотубул.

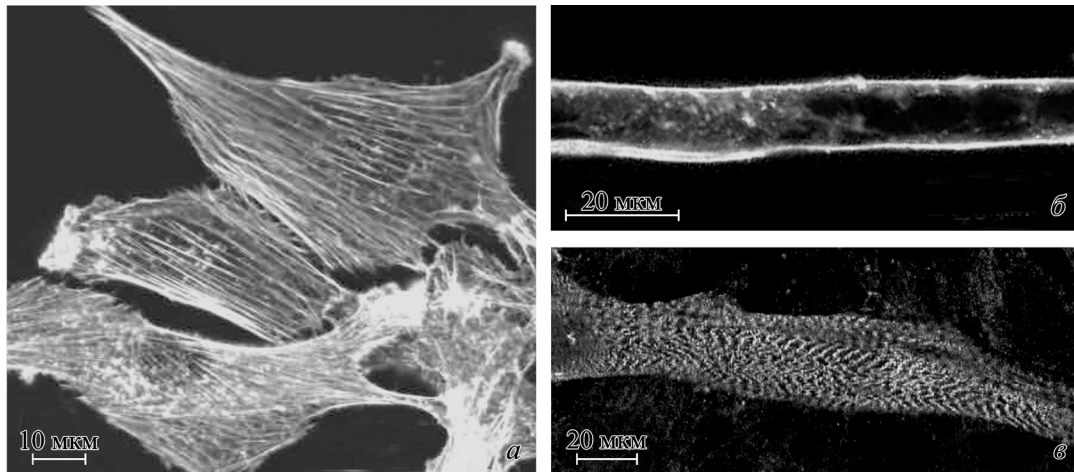


Рис. 2. Конфокальные изображения миобластов и миотубул, распределение актина и α -актинина.

a, б — клетки, окрашенные родамин-фаллоидином; флуоресценция в области 550—680 нм; видны стресс-фибриллы в миобластах (*a*), интенсивная окраска актина в примембранной области и диффузная окраска цитоплазмы в миотубулах (*б*). *в* — клетки, окрашенные антителами на α -актинин; флуоресценция в области 500—560 нм; видна регулярная поперечная исчерченность.

го красителя di-8-ANEPPS при анализе эндоцитоза в миобластах и миотубулах позволило выявить те же закономерности окраски мембранных структур клетки, что и при использовании RH 414 (рис. 4, *a—г*). При 4 °С эти красители окрашивают только плазматическую мембрану миобластов и миотубул, не проникая в клетки, так как блокируется эндоцитоз. Таким образом, внутриклеточные структуры, окрашивающиеся при 37 °С, представляют собой эндоцитозные пузырьки, которые отделяются от плазматической мембраны и поэтому оказываются окрашенными красителем. Мы полагаем, что распределение красителя отражает процесс формирования и движения эндоцитозных пузырьков. Этот вывод подтверждается и в других работах с использованием RH 414 (Niles, Malik, 1999; Minshall et al., 2000).

Дополнительная характеристика эндоцитоза в миобластах и миотубулах была получена при использовании

комплексов КТ с ТАТ-пептидом, который представляет собой фрагмент ТАТ-белка вируса ВИЧ-1. Показано, что ТАТ-пептиды проникают в клетку и способны доставлять в клетки различные белки (Duchardt et al., 2007). КТ, конъюгированные с ТАТ-пептидом, проникают в клетки путем эндоцитоза (Ruan et al., 2007; Xue et al., 2007; Chen et al., 2008). При инкубации миобластов в течение 15 мин комплексы КТ—ТАТ выявляются лишь на поверхности клеток (рис. 5, *a*). Через 60—120 мин происходят их интернализация и распределение по всей цитоплазме в составе мембран везикул (рис. 5, *б*). Следует отметить, что в этом случае часть КТ—ТАТ все еще остается на поверхности клеток, несмотря на отмывку КТ—ТАТ после 15 мин инкубации. При инкубации миобластов в течение 24 ч везикулы с КТ—ТАТ распределены по всей цитоплазме (рис. 5, *в*). Локализацию КТ—ТАТ в клетке анализировали с помощью лизотрекера, который легко про-

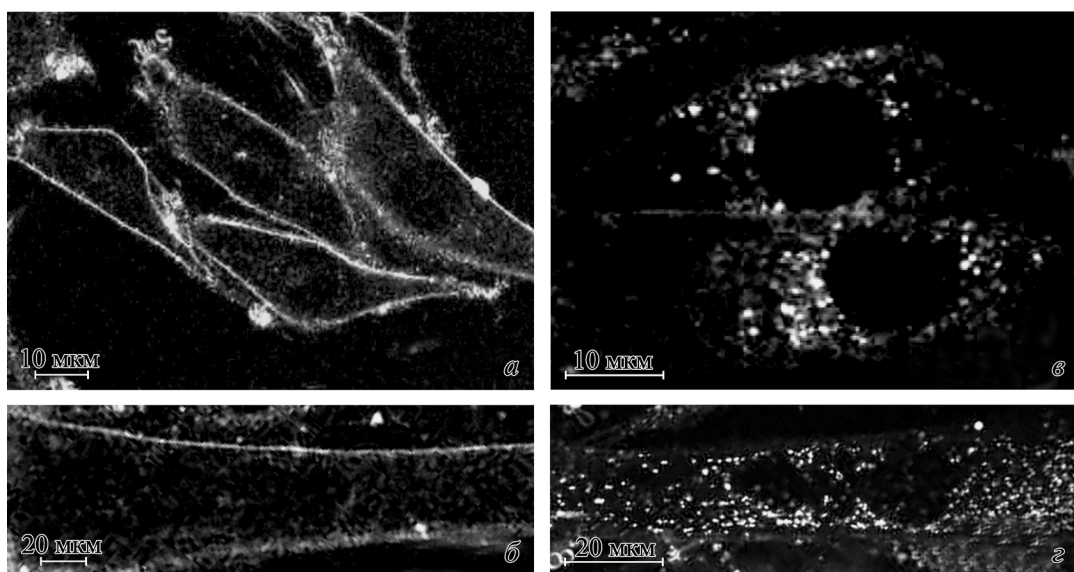


Рис. 3. Конфокальные изображения миобластов и миотубул, окрашенных RH 414.

Миобласты (*a, в*) и миотубулы (*б, г*) после инкубации с RH 414 (15 мкг/мл, 30 мин); флуоресценция в области 590—660 нм. *a, б* — инкубация при 4 °С, хорошо выявляется плазматическая мембрана клеток. *в, г* — инкубация при 37 °С, наблюдаются окраска плазматической мембраны клеток и гранулярно-везикулярный характер окраски структур цитоплазмы.

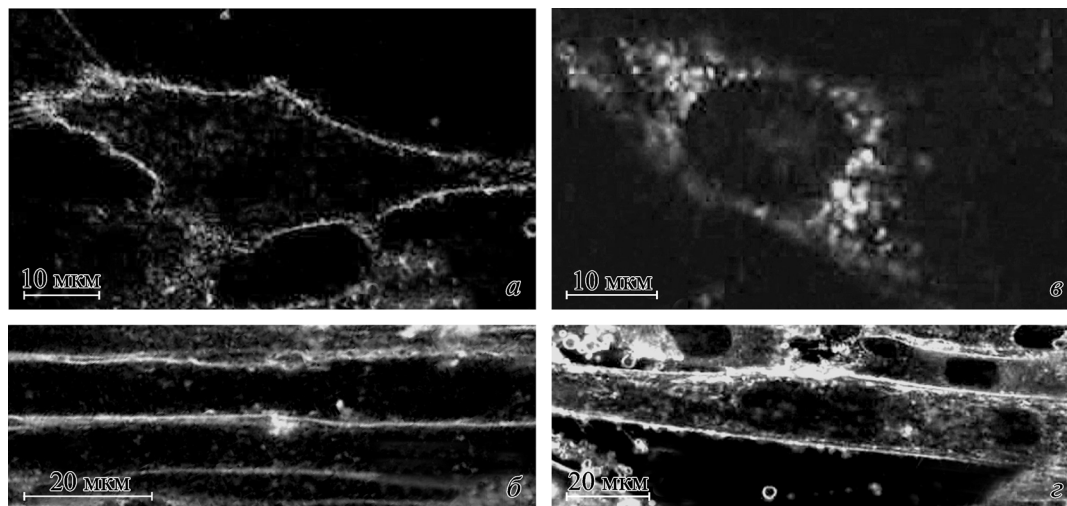


Рис. 4. Конфокальные изображения миобластов и миотубул, окрашенных di-8-ANEPPS.

Миобласты (а, в) и миотубулы (б, д) после инкубации с di-8-ANEPPS (5 мкг/мл, 30 мин); флуоресценция в области 590—680 нм. а, б — инкубация при 4 °С, хорошо выявляется плазматическая мембрана клеток. в, д — инкубация при 37 °С, наблюдаются окраска плазматической мембраны клеток и гранулярно-везикулярный характер окраски структур цитоплазмы.

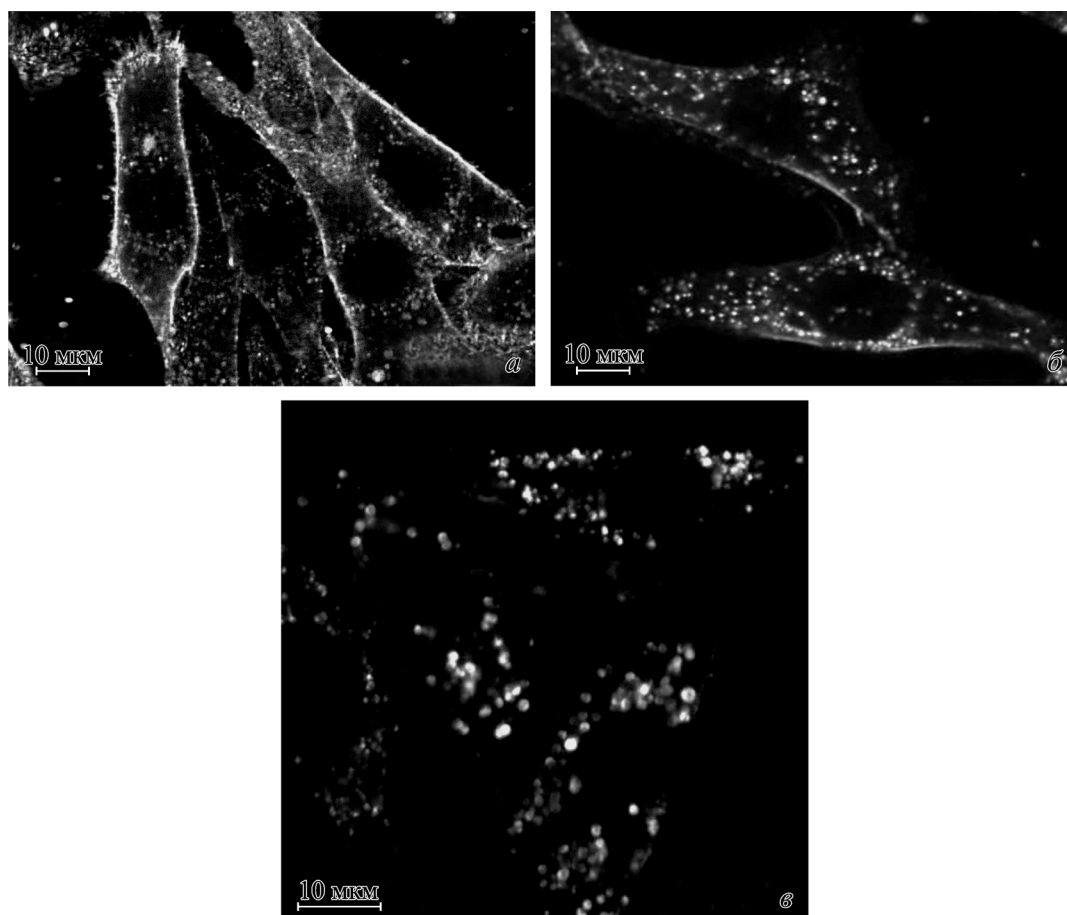


Рис. 5. Конфокальные изображения миобластов с комплексами КТ—ТАТ.

Миобласты после инкубации в среде, содержащей комплексы КТ—ТАТ (0,1 нМ); флуоресценция КТ в области 640—670 нм. а — инкубация в течение 15 мин, комплексы КТ—ТАТ выявляются на поверхности клеток. б — инкубация в течение 120 мин, комплексы КТ—ТАТ выявляются как на поверхности клеток, так и в везикулах в цитоплазме. в — инкубация в течение 24 ч, везикулы с КТ—ТАТ выявляются в цитоплазме.

никает через клеточные мембраны и накапливается в кислых органеллах клетки, по-видимому путем протонирования. Наблюдается соответствие везикул, которые имеют в составе мембран комплексы КТ—ТАТ, везикулам, окрашенным лизотрекером (рис. 1, *д*). Другими авторами на клетках HepG2, HEK 293T/17 и OGY также были получены данные по колокализации лизотрекера и везикул с КТ—ТАТ (Wei et al., 2009; Delehanty et al., 2010; Xiong et al., 2010). Эти факты свидетельствуют о проникновении комплексов КТ—ТАТ путем эндоцитоза.

На рис. 1, *е—з* показаны изображения культуры клеток L6J1 на 5-е сут культивирования в среде для дифференцировки. Клетки инкубировали в течение 4 ч в среде, содержащей комплексы КТ—ТАТ. Комплексы КТ—ТАТ за это время не проникают в миотубулы (рис. 1, *е*). Наряду с миотубулами в культуре встречаются недифференцированные миобласты. Причем в отличие от миотубул наблюдается проникновение в миобласты комплексов КТ—ТАТ и их локализация в околядерной области (рис. 1, *е—з*). Как показал анализ оптических срезов Z-серий миотубул, окрашенных АО или RH 414, комплексы выявляются только на плазматической мембране миотубул и при их инкубации в течение 24 ч в среде, содержащей комплексы КТ—ТАТ (рис. 1, *ж, з*). В опытах использовали КТ с разными максимумами флуоресценции (565 и 655 нм), которые различались по размерам CdSe-ядра (примерно 3 и 7 нм, соответственно). Однако вследствие функционализации КТ размеры комплексов в обоих случаях составляли около 15—20 нм. И те, и другие КТ лишь связывались с плазматической мембраной и не проникали в миотубулы при инкубации от 15 мин до 24 ч (рис. 1, *е—з*).

Известно, что организация везикулярного транспорта в многоядерных скелетных мышечных волокнах существенно отличается от одноядерных мышечных клеток (Ralston, 1993; Kaisto et al., 1999; Ralston et al., 2001). В процессе дифференцировки миобластов происходит перестройка клеточной мембраны, в ходе которой формируются специализированные домены, которые обеспечивают транспортные пути в мышечных волокнах. В наших опытах комплексы КТ—ТАТ не проникали в миотубулы, что может свидетельствовать об изменениях мембраны в процессе дифференцировки на стадиях, предшествующих формированию Т-системы, которая не выявлялась при окраске RH 414.

Возможность проникновения комплексов КТ—ТАТ в миотубулы и скелетные мышечные волокна является важным для изучения процессов дифференцировки и дедифференцировки мышечных клеток, которые актуальны в связи с разработкой новых подходов для диагностики и лечения миопатий и мышечных дистрофий.

Мы благодарим за участие в обсуждении методической части и результатов работы Т. А. Крылову, Л. В. Туроверову и Г. И. Штейна (Институт цитологии РАН).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00817), программы фундаментальных исследований президиума РАН № 21 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов», программы «Ведущие научные школы» (НШ-3273.2010.4) и при использовании оборудования Центра коллективного пользования «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

Список литературы

- Беляева Т. Н., Адамян С. Я., Кроленко С. А., Леонтьева Е. А., Моженок Т. П., Салова А. В., Фаддеева М. Д. 2009а. Распределение и спектры флуоресценции АО в миобластах и одиночных мышечных волокнах. Цитология. 51 (2) : 103—110.
- Беляева Т. Н., Салова А. В., Леонтьева Е. А., Моженок Т. П., Корнилова Е. С., Кроленко С. А. 2009б. Нечелювые квантовые точки в прижизненных конфокально-микроскопических исследованиях клеток. Цитология. 51 (10) : 830—837.
- Кроленко С. А., Адамян С. Я., Беляева Т. Н., Моженок Т. П. 2003. Локализация кислых органоидов в скелетных мышечных волокнах лягушки. Цитология. 45 (7) : 714—721.
- Крылова Т. А., Фридлянская И. И. 1988. Культивирование скелетно-мышечных клеток. В кн.: Методы культивирования клеток. Л.: Наука. 282—290.
- Abe T., Takano K., Suzuki A., Shimada Y., Inagaki M., Sato N., Obinata T., Endo T. 2004. Myocyte differentiation generates nuclear invaginations traversed by myofibrils associating with sarcomeric protein mRNAs. J. Cell Sci. 117 : 6523—6534.
- Burattini S., Ferri P., Battistelli M., Curci R., Luchetti F., Fallaci E. 2004. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. Eur. J. Histochem. 48 : 223—233.
- Chen B., Liu Q., Zhang Y., Xu L., Fang X. 2008. Transmembrane delivery of the cell-penetrating peptide conjugated semiconductor quantum dots. Langmuir. 24 : 11 866—11 871.
- Conner S. D., Schmid S. L. 2003. Regulated portals of entry into the cell. Nature. 422 : 37—44.
- Delehanty J. B., Bradburne C. E., Boeneman K., Susumu K., Farrell D., Mei B. C., Blanco-Canosa J. B., Dawson G., Dawson P. E., Mattoussi H., Medintz I. L. 2010. Delivering quantum dot-peptide bioconjugates to the cellular cytosol: escaping from the endolysosomal system. Integr. Biol. 2 : 265—277.
- Delehanty J. B., Mattoussi H., Medintz I. L. 2009. Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues. Anal. Bioanal. Chem. 393 : 1091—1105.
- Duchardt F., Fotin-Mlecsek M., Schwarz H., Fischer R., Brock R. 2007. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. Traffic. 8 : 848—866.
- Flucher B. E., Terasaki M., Chin H. M., Beeler T. J., Daniels M. P. 1991. Biogenesis of transverse tubules in skeletal muscle in vitro. Develop. Biol. 145 : 77—90.
- John T. A., Vogel S. M., Minshall R. D., Ridge K., Tirupathi C., Malik A. B. 2001. Evidence for the role of alveolar epithelial gp60 in active transalveolar albumin transport in the rat lung. J. Physiol. 533 : 547—559.
- Kaisto T., Rahkila P., Marjomaki V., Parton R. G., Metsikkö K. 1999. Endocytosis in skeletal muscle fibers. Exp. Cell Res. 253 : 551—560.
- Kollias H. D., Perry R. L., Miyake T., Aziz A., McDermott J. C. 2006. Smad7 promotes and enhances skeletal muscle differentiation. Mol. Cell. Biol. 26 : 6248—6260.
- Krotenko S. A., Adamyan S. Ya., Belyaeva T. N., Mozhenok T. P. 2006. Acridine orange accumulation in acid organelles of normal and vacuolated frog skeletal muscle fibres. Cell Biol. Int. 30 : 933—939.
- Lu Z., Joseph D., Bugnard E., Zaal K. J., Ralston E. 2001. Golgi complex reorganization during muscle differentiation: visualization in living cells and mechanism. Mol. Biol. Cell. 12 : 795—808.
- Minshall R. D., Tirupathi C., Vogel S. M., Niles W. D., Gilchrist A., Hamm H. E., Malik A. B. 2000. Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. J. Cell Biol. 150 : 1057—1070.
- Niles W. D., Malik A. B. 1999. Endocytosis and exocytosis events regulate vesicle traffic in endothelial cells. J. Membr. Biol. 167 : 85—101.
- Puente L.G., Voisin S., Lee R.E., Megeney L.A. 2006. Reconstructing the regulatory kinase pathways of myogenesis from phosphopeptide data. Mol. Cell Proteomics. 5 : 2244—2251.

- Rajan S. S., Liu H. Y., Vu T. Q. 2008. Ligand-bound quantum dot probes for studying the molecular scale dynamics of receptor endocytic trafficking in live cells. *ACS Nano*. 2 : 1153—1166.
- Ralston E. 1993. Changes in architecture of the Golgi complex and other subcellular organelles during myogenesis. *J. Cell Biol.* 120 : 399—409.
- Ralston E., Ploug T., Kalhovde J., Lomo T. 2001. Golgi complex, endoplasmic reticulum exit sites, and microtubules in skeletal muscle fibers are organized by patterned activity. *J. Neurosci.* 21 : 875—883.
- Ruan G., Agrawal A., Marcus A. I., Nie S. 2007. Imaging and tracking of tat peptide-conjugated quantum dots in living cells: new insights into nanoparticle uptake, intracellular transport, and vesicle shedding. *J. Amer. Chem. Soc.* 129 : 14 759—14 766.
- Sanger J. W., Chowrashi P., Shaner N. C., Spalshoff S., Wang J., Freeman N. L., Sanger J. M. 2002. Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 66 : 153—162.
- Schultheiss T., Lin Z. X., Lu M. N., Murray J., Fischman D. A., Weber K., Masaki T., Imamura M., Holtzer H. 1990. Differential distribution of subsets of myofibrillar proteins in cardiac nonstriated and striated myofibrils. *J. Cell Biol.* 110 : 1159—1172.
- Spangenburg E. E., Bowles D. K., Booth F. W. 2004. Insulin-like growth factor-induced transcriptional activity of the skeletal alpha-actin gene is regulated by signaling mechanisms linked to voltage-gated calcium channels during myoblast differentiation. *Endocrinology*. 145 : 2054—2063.
- Tannu N. S., Rao V. K., Chaudhary R. M., Giorgianni F., Saeed A. E., Gao Y., Raghov R. 2004. Comparative proteomes of the proliferating C2C12 myoblasts and fully differentiated myotubes reveal the complexity of the skeletal muscle differentiation program. *Mol. Cell Proteomics*. 3 : 1065—1082.
- Thornell L. E., Price M. G. 1991. The cytoskeleton in muscle cells in relation to function. *Biochem. Soc. Trans.* 19 : 1116—1119.
- Wei Y., Jana N. R., Tan S. J., Ying J. Y. 2009. Surface coating directed cellular delivery of TAT-functionalized quantum dots. *Bioconjug. Chem.* 20 : 1752—1758.
- Xiong R., Li Z., Mi L., Wang P. N., Chen J. Y., Wang L., Yang W. L. 2010. Study on the intracellular fate of Tat peptide-conjugated quantum dots by spectroscopic investigation. *J. Fluoresc.* 20 : 551—556.
- Xue F. L., Chen J. Y., Guo J., Wang C. C., Yang W. L., Wang P. N., Lu D. R. 2007. Enhancement of intracellular delivery of CdTe quantum dots (QDs) to living cells by Tat conjugation. *J. Fluoresc.* 17 : 149—154.
- Zelenin A. V. 1999. Acridine orange as a probe for cell and molecular biology. In: *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*. Press. Acad. London: 117—135.
- Zhang H. L., Li Y. Q., Zhang M. Z., Zhao Y. D. 2010. Real-time observation of the effect of iron on receptor-mediated endocytosis of transferrin conjugated with quantum dots. *J. Biomed. Opt.* 15 : 000—000.

Поступила 20 IX 2010

CHANGE IN LOCALIZATION OF CELLULAR VESICULAR APPARATUS
DURING DIFFERENTIATION OF MYOBLASTS INTO MYOTUBULES IN CELL CULTURE

A. V. Salova, E. A. Leontieva, T. P. Mozhenok, E. S. Kornilova,
S. A. Krolenko, T. N. Belyaeva

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

The study of changes in the intracellular processes during differentiation of myoblasts into myotubules is of great importance for understanding several fundamental problems of cell biology. At first, this concerns the spatial organization of vacuolar apparatus that reflects the alterations in the properties of cell membranes, cytoskeleton elements and dynamics of vesicular transport in the course of differentiation. The distribution of acidic membrane organelles (lysosomes, late endosomes, Golgi cisternae) during the myotubule formation was revealed. It was shown that perinuclear localization of acidic organelles in myoblasts was replaced by diffuse distribution of these structures in the whole volume of myotubules. Using lipophilic fluorescent dyes, RH 414 and di-8-ANEPPS, the process of formation and dynamics of endocytic vesicles in myoblasts and myotubules was investigated. In the present work, semiconductive nanocrystals, quantum dots (QDs), conjugated with TAT-peptide, which belongs to cell-penetrating peptides, were used to characterize nonspecific endocytosis. It was shown that QDs—TAT complexes penetrate myoblasts but do not penetrate myotubules even after 24 h incubation, which might be connected with plasma membrane changes during the process of skeletal muscle differentiation.

Key words: myoblasts, myotubules, differentiation, quantum dots, confocal microscopy, acridine orange, RH 414.