

## ИНГИБИТОРЫ MAP-КИНАЗНОГО ПУТИ U0126 И PD98059 ПО-РАЗНОМУ ВЛИЯЮТ НА ОРГАНИЗАЦИЮ ТУБУЛИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРА ЭФР

© М. В. Злобина,<sup>1</sup> Ю. Ю. Стебляно, <sup>1, 2</sup> М. А. Шкляева, <sup>1, 2</sup> М. В. Харченко,<sup>1</sup>  
А. В. Салова,<sup>1</sup> Е. С. Корнилова<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,  
и <sup>2</sup>Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета;  
\* электронный адрес: elena.kornilova@gmail.com

Для проверки гипотезы об участии ЭФР-стимулируемой MAP-киназы ERK1/2 в регуляции функционирования системы микротрубочек (MT) изучено влияние двух широко применяемых ингибиторов ERK1/2 — U0126 и PD98059 — на организацию тубулинового цитоскелета в интерфазных культивируемых клетках линии HeLa в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Оказалось, что добавление на 30 мин U0126 или PD98059 к не стимулированным ЭФР клеткам не влияло на радиально организованную систему MT. Однако уже через 15 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР в случае предварительного добавления ингибитора U0126 число MT уменьшалось вплоть до полной их деполимеризации. Если же стимуляцию эндоцитоза ЭФР проводили в присутствии PD98059, незначительная деполимеризация MT через 15 мин наблюдалась в основном с минус-концов MT, в то время как примембранные участки, напротив, стабилизировались, о чем свидетельствовала высокая степень ацетилирования тубулина, и такая картина сохранялась в течение всего времени эксперимента. Выяснилось также, что ингибиторы влияют и на динамику эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов. Количественный анализ показал, что после стимуляции эндоцитоза в присутствии U0126 формируется большее число эндосом (по сравнению с контролем), незначительно изменяющееся в течение всего времени эксперимента; эндосомы локализуются в примембранной области. Под действием PD98059 эндосом формировалось меньше, чем в контроле, при этом, несмотря на наличие отдельных интактных MT, они медленнее кластеризовались (перемещались в околядерную область клетки). Оба ингибитора существенно уменьшали ассоциацию с белком слияния ранних эндосом EEA1, что свидетельствует о замедлении слияний и созревания эндосом в обоих случаях. Показано также, что влияние ингибиторов на появление фосфорилированных форм ERK1/2 различно: U0126 полностью подавлял появление фосфо-ERK1/2; в присутствии PD98059 через 15 мин после стимуляции эндоцитоза обе формы ERK резко активировались, а через 60 мин оставалась активной только ERK2. В обоих случаях динамика активации MAP-киназ существенно отличалась от контрольной. Результаты указывают на участие ЭФР-стимулированного MAP-киназного каскада в регуляции цитоскелета. В то же время они демонстрируют неэквивалентность двух исследованных нами и широко применяемых ингибиторов по отношению к влиянию не только на активность MAP-киназы, но и на такие взаимосвязанные процессы, как изменения организации цитоскелета и динамика эндоцитоза сигнального рецептора.

Ключевые слова: микротрубочки, эндоцитоз, эндосомы, рецептор ЭФР, ERK1/2, U0126, PD98059, клетки линии HeLa.

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

Ранее мы показали, что через 30—60 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов радиально организованная система микротрубочек (MT) претерпевает изменения: происходит хаотизация MT и их фрагментация вплоть до полной деполимеризации в ряде экспериментов. На более поздних сроках радиальность полностью восстанавливается. Этот эффект не связан с процессом охлаждения (нагревания) клеток при стимуляции эндоцитоза в соответствии с протоколом предварительного связывания лиганда, и не наблюдается в отсут-

ствии ЭФР (Харченко и др., 2007; Kharchenko et al., 2007). Очевидно, что возникает вопрос о механизмах, регулирующих эти реорганизации. Поскольку эффект является ЭФР-зависимым, можно предполагать существование нескольких различных механизмов. Первый связан с эндоцитозом как таковым, поскольку сам процесс формирования эндосом, их ассоциации с MT через плюс-концевые кэппирующие белки и динеин-динактиновый комплекс может активировать ряд событий, приводящих к фрагментации и (или) деполимеризации MT. С другой сторо-

ны, связывание ЭФР с рецептором — трансмембранной тирозинкиназой — инициирует целый ряд сигнальных каскадов, например MAP-киназный (Williams et al., 1993), которые также могут опосредовать этот процесс. Так, в частности, сообщалось, что активированная MAP-киназа ERK1/2 декорирует микротрубочки, т. е. связана с ними напрямую (Morishima-Kawahima, Kosik, 1996). С другой стороны, возможны и более опосредованные взаимоотношения. Например, один из MT-повреждающих белков, статин, является субстратом фосфорилирования ERK1/2 (Marklund et al., 1993; Beretta et al., 1995). Известно также, что все компоненты MAP-киназного каскада могут собираться не только на плазматической мембране, но и на мембране эндосом в клетках, стимулированных ЭФР (Fehrenbacher et al., 2009; Wortzel, Seger, 2011). Поскольку эндосомы перемещаются по цитоплазме, используя MT, часть пула активной MAP-киназы и MT могут находиться в непосредственной близости друг от друга. Таким образом, активная, т. е. фосфорилированная, ERK1/2 способна в свою очередь фосфорилировать статин и тем самым регулировать его MT-повреждающую активность. Однако до сих пор нет данных о взаимодействии ERK1/2, MT и статина в ходе эндоцитоза.

Возможны также и другие взаимосвязи между MAP-киназой и MT, данные о которых получены на разных клеточных системах. Так, показано, что сигналы ERK-киназы противодействуют стабилизации MT-сети в кардиомиоцитах (Ng et al., 2011). Продемонстрировано, что транспорт меланосом регулируется ERK, поскольку подавление ее активности с помощью U0126 блокировало двунаправленный транспорт меланосом по MT, а активация ERK его стимулировала (Deacon et al., 2005). Другой подход был использован в экспериментах с агентами, влияющими на динамику системы MT. Так, сообщалось о том, что паклитаксель, вызывающий стабилизацию MT, приводит к активации ERK1/2 (Lee et al., 2003). С другой стороны, обнаружено (Stone, Chambers, 2000), что и стабилизирующие (таксол) и деполимеризующие (колхицин и винбластин) MT агенты инактивируют ERK1/2. Наряду с упомянутыми существует еще целый ряд данных, однако они весьма противоречивы, а причины противоречий далеки от понимания.

Целью настоящей работы являлась проверка того, зависят ли описанные нами реорганизации системы MT в ходе эндоцитоза ЭФР (Kharchenko et al., 2007) от активности ERK1/2. Для этого мы использовали широко распространенный ингибиторный подход, позволяющий подавить фосфорилирование, а следовательно, и активацию ERK1/2. Клетки HeLa перед стимуляцией эндоцитоза инкубировали с двумя наиболее часто применяемыми ингибиторами — U0126 и PD98059, считающимися эквивалентными по влиянию на фосфорилирование MAP-киназы. Мы обнаружили, что оба ингибитора, не влияя на организацию системы MT в отсутствие ЭФР, после стимуляции эндоцитоза ЭФР приводили к изменениям структуры тубулинового цитоскелета, но, к нашему удивлению, эти изменения существенно различались для каждого из ингибиторов, так же как и наблюдаемые изменения в динамике эндоцитоза. Наши данные свидетельствуют, во-первых, о том, что ERK1/2 действительно вовлечена в регуляцию реорганизации MT в ходе эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов, и, во-вторых, показывают, что U0126 и PD98059 различаются по механизмам влияния на клетки, что необходимо учитывать при интерпретации получаемых результатов.

## Материал и методика

Культивирование клеток HeLa. Клетки получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 8 % фетальной сыворотки, при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Для опытов по иммунофлуоресценции покровные стекла размером 8×8 мм помещали в пластиковые чашки Петри. Клетки выращивали до 50—70%-ного монослоя, за 24 ч до эксперимента их переводили на среду, содержащую 0.25 % сыворотки.

Лиганды и антитела. В работе использовали рекомбинантный ЭФР (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 50 нг/мл. Использовали антитела: поликлональные кроличьи, узнающие экстраклеточный домен рецептора ЭФР человека (Cell Signaling, США), в разведении 1 : 100; моноклональные мышиные антитела против  $\alpha$ -тубулина и ацетил- $\alpha$ -тубулина (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 2000; моноклональные мышиные, узнающие EEA1 (Transduction Lab., США), в разведении 1 : 1000. В качестве вторых антител использовали конъюгаты GAR-Alexa Fluor 568, GAM-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Англия) и GAM-Cy3 (Jackson, США) в разведении 1 : 500. Антитела разводили в PBS, pH 7.4, содержащем 1 % БСА. Для иммуноблотинга использовали кроме упомянутых выше антител против 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).

Исследование динамики эндоцитоза в условиях «предварительного связывания» лиганда. Для достижения равновесного связывания лиганда с рецепторами монослойные культуры клеток инкубировали в рабочей среде (среда Игла, содержащая 0.1 % БСА и 20 мМ HEPES, pH 7.4) при 4 °C в течение 60 мин в присутствии 25 нг/мл ЭФР. После 5-кратной отмывки PBS от несвязавшегося ростового фактора эндоцитоз стимулировали переводом клеток в рабочую среду, не содержащую лиганда, с температурой 37 °C на указанное время.

Обработка клеток ингибиторами. Клетки до начала предварительного связывания с ЭФР инкубировали в течение 30 мин при 37 °C в рабочей среде, содержащей U0126 в концентрации 10 мкМ или PD98059 в концентрации 50 мкМ (Sigma, Германия). Все дальнейшие инкубации (в том числе холодовые) проводили при постоянном присутствии ингибитора в рабочей среде.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток. После окончания указанных в тексте инкубаций покровные стекла переносили в пластиковые чашки диаметром 35 мм, дважды промывали PBS, после чего фиксировали либо 4%-ным раствором формалина (Sigma-Aldrich, США) в PBS при комнатной температуре и использовали для выявления антигенов, локализованных на мембранах, либо глутаральдегидным фиксатором (PBS, содержащий 3 % формалина, 0.25 % Тритона X-100 и 0.2 % глутаральдегида) в течение 15 мин при 37 °C для дальнейшего окрашивания цитоскелета. После формалиновой фиксации клетки промывали 5 раз по 3 мин раствором PBS и обрабатывали 15 мин при комнатной температуре раствором PBS, содержащим 0.5 % Тритона X-100. После глутаровой фиксации клетки промывали 2 раза по 10 мин раствором PBS. Когда было необходимо исследо-

вать одновременно цитоскелет и эндосомы, использовали формалиновую фиксацию. Неспецифическое окрашивание блокировали инкубацией в PBS, содержащем 1 % БСА, в течение 30 мин при комнатной температуре. С первыми антителами клетки инкубировали в течение ночи при 4 °С. Далее промывали 3 раза по 5 мин раствором PBS, содержащим 0.1 % Tween-20 (BioRad, США). Со вторыми антителами (GAR для поликлональных антител, GAM — для моноклональных) клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте и затем промывали, как описано выше. Стекла заключали в среду, содержащую 9 мл глицерина, 1 мл PBS, 1 мл ДМСО, 80 мл пропилгалата и 1 мкг/мл красителя DAPI.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Для получения лизата клетки обрабатывали лизирующим буфером: 150 mM NaCl, 20 mM Трис-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Тритона X-100, коммерческий коктейль ингибиторов (Sigma) и 1 mM ортованадата 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. Иммуноблоттинг проводили в соответствии с методикой ECL Western blotting protocol (Amersham, Швеция). Для усиления сигнала использовали систему ECL (Amersham, Швеция).

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Распределение флуоресцентно меченых белков в клетках изучали с помощью двойной непрямой микроскопии на конфокальном микроскопе 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 микротрубочек в клетках HeLa.

Полученные изображения обрабатывали с помощью программ Leica Confocal Software (Zeiss, Германия) и ImageJ 1.40g (National Institute of Health, США) в соответствии с алгоритмом, подробно описанным ранее (Злобина и др., 2013). Так, для оценки степени кластеризации рассчитывали отношение площади целой клетки к площади, занятой везикулами, используя параметр Area функции Measure в программе ImageJ. Полученное отношение обозначали коэффициентом кластеризации Dclust, значение которого прямо пропорционально степени кластеризации. При выполнении этой операции не выставляли никакого порогового значения интенсивности. Для оценки колокализации использовали плагин JACoP для программы ImageJ и оценивали величину колокализации сигнала маркера ранних эндосом EEA1 и рецептора по коэффициенту Пирсона. Оценку среднего количества везикул на клетку проводили по проекции максимальной яркости, представляющей собой сумму всех оптических срезов серии от стекла до верха клетки (10—14 срезов с шагом в 500—1000 нм), при этом положение везикулы автоматически определяется соответствующим положению среза с самым высоким уровнем яркости. Там, где указано, представлены отдельные оптические срезы в области наибольшей расплывчатости клетки. Затем выставляли пороговое значение

интенсивности исходя из максимального соответствия между видимым глазом и компьютерным изображением. Следующим шагом выделяли интересующую нас область изображения, соответствующую одной клетке, и проводили анализ частиц с помощью функции Analyze Particles. В результате получали данные об общем количестве частиц в анализируемой клетке. Подобным образом анализировали не менее 15—30 клеток с трех полей для каждой временной точки. Данные обрабатывали с использованием пакета анализа программы Microsoft Excel, результат выражали средним значением и его 95%-ным доверительным интервалом. Каждый эксперимент проводили не менее трех раз. Представленные изображения были характерны для большинства клеток в данных условиях.

## Результаты и обсуждение

Для синхронизации процессов, инициируемых активацией рецептора ЭФР, был использован протокол стимуляции эндоцитоза с предварительным связыванием лиганда, как описано в разделе «Материал и методика». Протокол основан на том, что при 4 °С ЭФР связывается со своими рецепторами на плазматической мембране, достигая равновесного состояния за 1 ч, но не интернализуется, поскольку формирование инвагинаций происходит лишь при температурах выше 20 °С. Перенос клеток в среду с оптимальной температурой 37 °С стимулирует события, связанные с формированием эндосом через клатринзависимый путь, в виде синхронной волны молекулярных событий. Ингибиторы вводили в инкубационную среду при 37 °С за 30 мин до начала предварительного связывания ЭФР, и далее они присутствовали в среде как в ходе предварительного связывания с ЭФР, так и при последующих инкубациях. В указанный момент времени клетки фиксировали, окрашивали антителами к  $\alpha$ -тубулину и рецептору ЭФР и изображения исследовали с помощью конфокального микроскопа. Из данных, представленных на рис. 1, следует, что клетки, зафиксированные при 37 °С до охлаждения, в контроле (т. е. без ЭФР и ингибиторов), так же как и в присутствии одного из ингибиторов, но без ЭФР, не различаются по наличию густой сети МТ (*первый столбец*). При этом во всех этих случаях диффузное распределение рецептора ЭФР в плазматической мембране не изменялось (*второй столбец*).

Нет различия и в конце периода предварительного связывания ЭФР: во всех трех случаях наблюдаются полная деполимеризация МТ, характерная для эпителиальных клеток при охлаждении (рис. 1, *третий столбец*), и равномерное распределение рецептора ЭФР (рис. 1, *четвертый столбец*). Таким образом, как в отсутствие ЭФР, так и при пониженной температуре, когда ЭФР связан только с мембраной, действие ингибиторов никак не сказывается.

Стимуляция эндоцитоза, однако, вызывает существенные изменения в организации системы МТ (рис. 2). В контроле (т. е. в отсутствие ингибиторов) деполимеризованные на холоде МТ через 15 мин после запуска эндоцитоза полностью восстанавливаются, затем фрагментируются (30—60 мин) и через 90 мин возвращаются к исходному состоянию (рис. 2, *левый столбец*). В присутствии U0126 наблюдается только некоторое восстановление радиальной системы МТ через 15 мин после стимуляции эндоцитоза, а в дальнейшем происходит по-

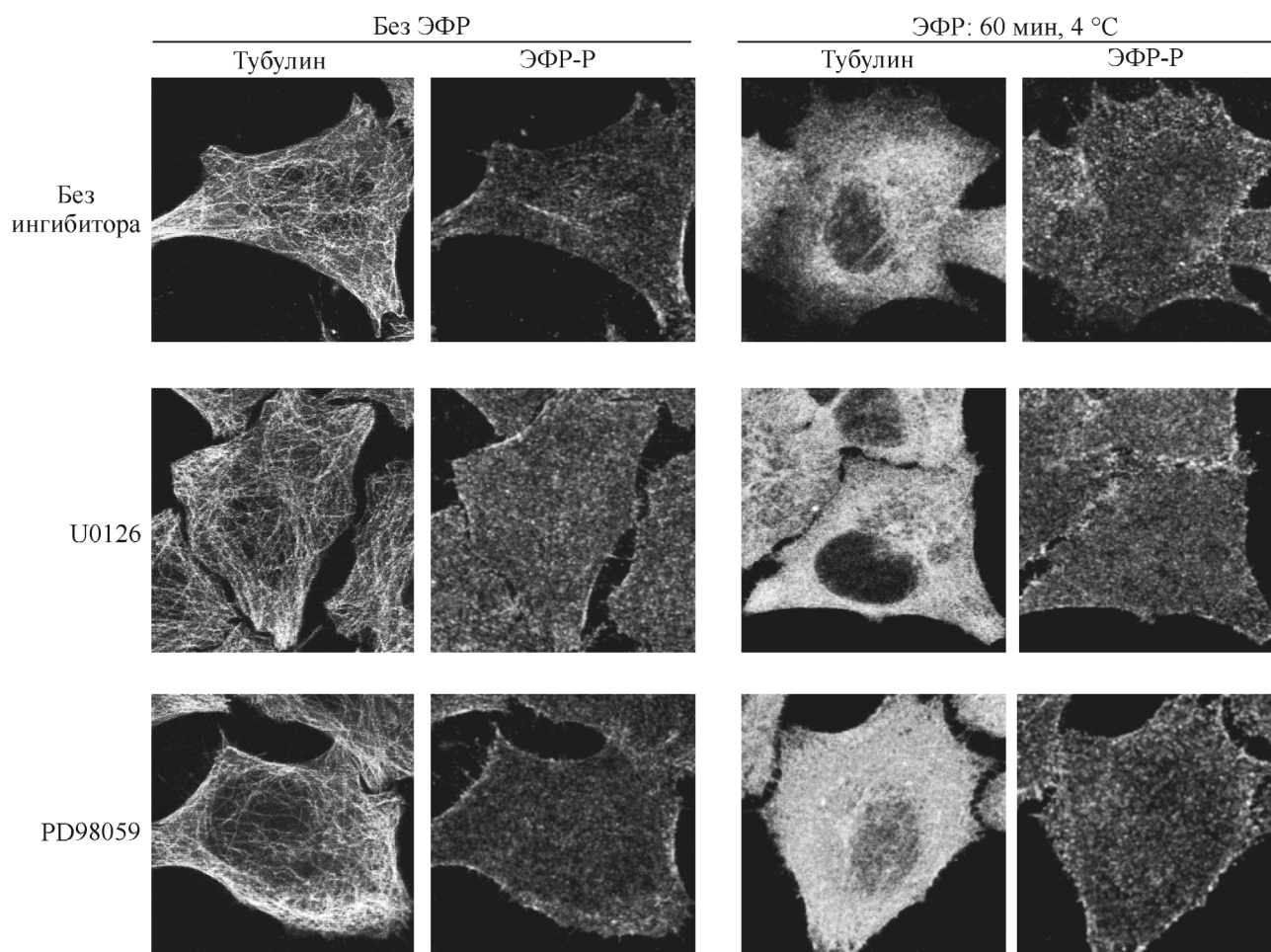


Рис. 1. Влияние ингибиторов киназ ERK1/2 на структуру тубулинового цитоскелета и распределение рецептора ЭФР в клетках HeLa в отсутствие и в присутствии 25 нг/мл ЭФР (60 мин при 4 °C).

Ингибиторы U0126 (10 мкМ) и PD98059 (50 мкМ) добавляли на 30 мин при 37 °C до добавления ЭФР. Клетки фиксировали и окрашивали антителами на тубулин и рецептор ЭФР, как описано в разделе «Материал и методика». Конфокальная микроскопия, об. 63×. Представлены характерные для каждого случая оптические срезы.

степенная деполимеризация МТ вплоть до полного исчезновения интактных МТ (рис. 2, *средний столбец*). Степень этой деполимеризации может отличаться от опыта к опыту, однако описываемый феномен реорганизации системы МТ присутствует всегда. Однако в присутствии ингибитора PD98059 наблюдается совершенно иная картина: система МТ восстанавливается через 15 мин, а далее (30—90 мин) лишь увеличивает свою плотность на периферии клетки (рис. 2, *правый столбец*), хотя число МТ, сходящихся к ЦОМТ, существенно уменьшается по сравнению с ничем не обработанными клетками.

Иммуноблоттинг тотальных лизатов клеток (рис. 3) показал, что сразу после стимуляции эндоцитоза в контрольных клетках (рис. 3, *верхняя панель*) активируются обе формы MAP-киназы ERK, причем активация ERK1 (p44) существенно слабее, чем ERK2 (p42). При этом фосфорилирование ERK2 лишь незначительно снижается через 120 мин после запуска эндоцитоза (рис. 3, *верхняя панель, дорожка 7*), а активация ERK1 (p44), имеет двухфазный характер с максимумами через 15 (*дорожка 3*) и в период между 60-й и 90-й (*дорожки 5, 6*) мин, минимумом через 30 мин (*дорожка 4*) и фактически полным исчезновением этой фосфорилированной формы через 90 мин (*дорожка 7*). Интересно, что поздней волне активации ERK1 соответствует усиление ацетилирования МТ,

что принято рассматривать как свидетельство их стабилизации.

В присутствии U0126 (рис. 3, *средняя панель*) наблюдаются полное подавление фосфорилирования обеих форм ERK-киназы в течение всего времени эксперимента, а также и полное отсутствие ацетилированного тубулина, что соответствует деполимеризации МТ, подтверждаемой данными рис. 2.

На *нижней панели* рис. 3 видно, что в присутствии ингибитора PD98059 в отличие от U0126 происходит сильное фосфорилирование MAP-киназы в клетках через 15 мин после стимуляции эндоцитоза, причем уровни активации ERK1 (p44) и ERK2 (p42) сравнимы друг с другом в отличие от активации ERK1 в контроле. На более поздних стадиях выявляется только слабофосфорилированная форма ERK2 (рис. 3, *нижняя панель*). Таким образом, вместо подавления активации ERK1/2 наблюдается ее резкое кратковременное увеличение через 15 мин, сменяемое слабым уровнем фосфорилирования в течение остального времени эксперимента. Если в контроле ацетилирование тубулина начинает проявляться через 60 мин, то при действии PD98059 существенная часть тубулина оказывается ацетилированной уже на начальном этапе эндоцитоза и далее только увеличивается, что подтверждается и данными иммунофлуоресценции, показы-

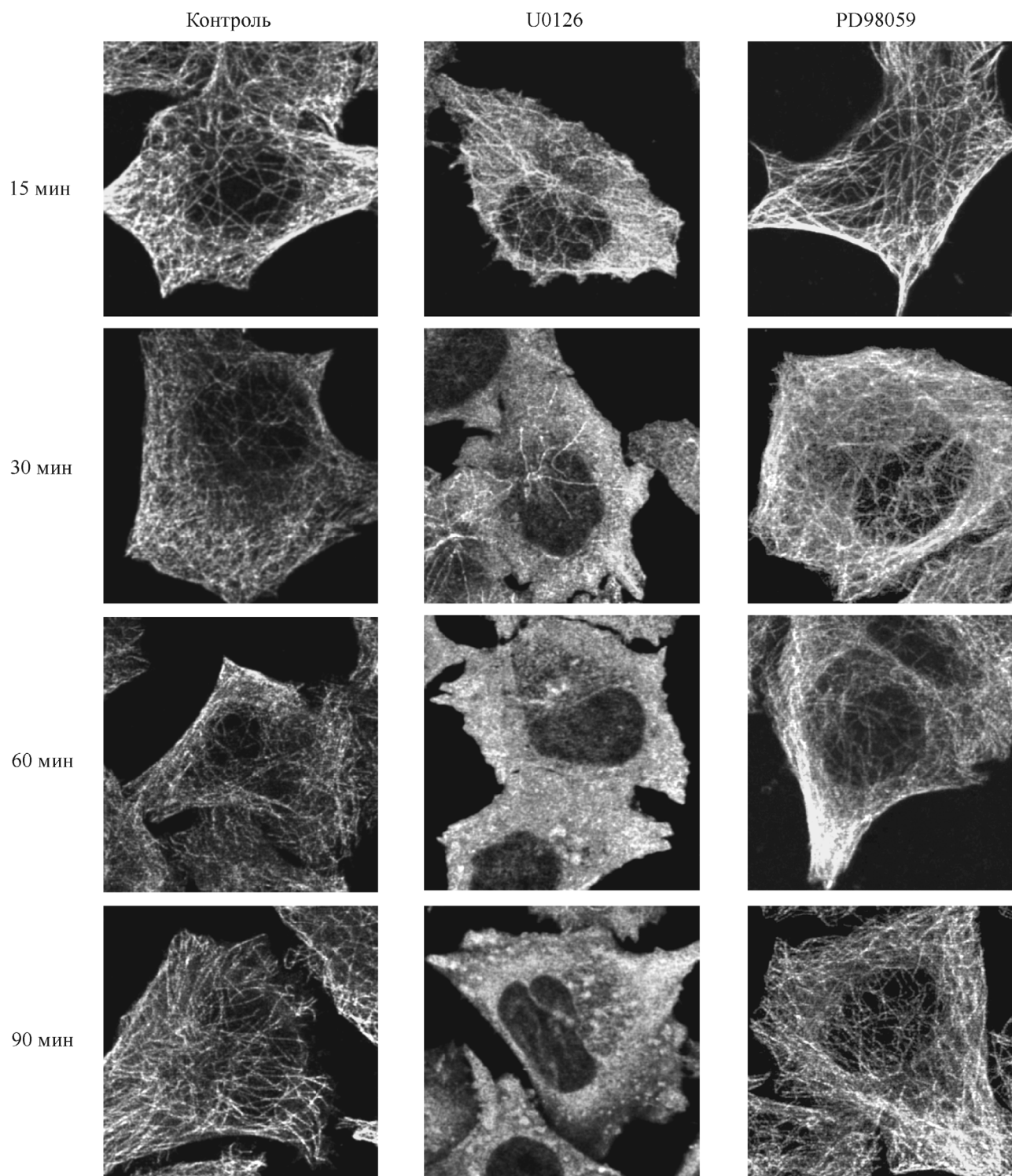


Рис. 2. Динамика изменения тубулинового цитоскелета после стимуляции эндоцитоза ЭФР в контроле и в присутствии ингибитора U0126 или PD98059.

Представлены оптические срезы клеток, фиксированных через 15, 30, 60 и 90 мин после стимуляции эндоцитоза переводом клеток HeLa из холодной среды (4 °С) в среду с температурой 37 °С. Ингибитор присутствовал в среде в течение всего эксперимента. Конфокальная микроскопия, об. 63×.

вающими наличие сети интактных МТ в клетках (рис. 2, правый столбец).

Известно, что МТ участвуют в организации перемещения эндосом по МТ. Поэтому мы исследовали влияние ингибиторов на количество формирующихся эндосом и динамику его изменения в ходе эндоцитоза, на кластери-

зацию, определяемую как отношение всей площади клетки к площади области, занятой основной массой эндосом (Dclust) и отражающую эффективность перемещения эндосом, а также на ассоциацию рецепторсодержащих структур с маркером ранних эндосом, белком заякоривания EEA1 (изображения клеток, окрашенных на EEA1, не

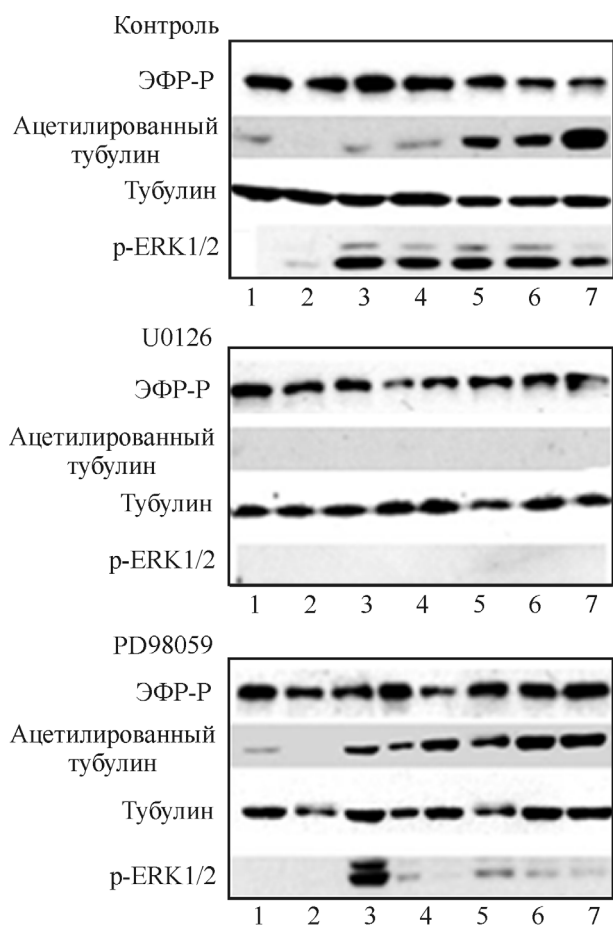


Рис. 3. Выявление в тотальных экстрактах клеток HeLa рецептора ЭФР, ацетилованного тубулина и активированных форм ERK1/2 в контроле и в присутствии ингибитора PD98059 или U0126 в ходе эндоцитоза ЭФР.

Выявляемые белки обозначены *слева* от соответствующей полосы каждой панели. Для определения равномерности нагрузки блоты окрашивали также на тубулин. 1 — клетки до обработки ингибиторами и ЭФР; 2 — клетки после холодной инкубации с ЭФР; 3—7 — через 15, 30, 60, 90 и 120 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР соответственно.

приводятся), свидетельствующую об эффективности слияний и созревания эндосом (рис. 4, 5).

На рис. 4 представлены оптические срезы тех же клеток, что и на рис. 2, но окрашенных антителами к рецептору ЭФР. Видно, что динамика эндоцитоза существенно различается во всех трех случаях. Так, в контрольных клетках (рис. 4, *левый столбец*) поведение рецепторсодержащих эндосом соответствует многократно описанному ранее: мелкие периферические эндосомы, укрупняясь со временем, перемещаются в околядерную область и через 90 мин практически исчезают благодаря взаимодействию с лизосомами и деградации в них ЭФР и самого рецептора. Количественная обработка проекций максимальной яркости, позволяющая оценивать общее число структур во всей клетке, а не только на отдельном оптическом срезе (рис. 5), проведенная по разработанному нами ранее протоколу (Злобина и др., 2013), показала, что через 15 мин после стимуляции эндоцитоза в контрольных клетках в среднем выявляется около 70 рецепторсодержащих структур на клетку, это число уже через 30 мин сокращается вдвое, а через 120 мин не превышает 10 на клетку (рис. 5, *а*). Уменьшение числа эндосом на

ранних этапах связано с эффективными гомотипическими слияниями эндосом, что подтверждается как визуальным увеличением их размеров в течение 15—60 мин (рис. 4, *левый столбец*), так и относительно высоким уровнем колокализации с белком EEA1, опосредующим первую стадию слияния (рис. 5, *в*). Интересно, что, несмотря на период хаотизации системы МТ, наступивший через 30—60 мин, эндосомы очень эффективно кластеризуются в околядерной области, с максимумом кластеризации через 60—90 мин (рис. 2; 5, *б*). Таким образом, наблюдаемые в контроле процессы фрагментации (деполимеризации) МТ приводят не к замедлению перемещения по ним, а к ускорению.

Рис. 4 и 5 демонстрируют также, что в присутствии ингибитора U0126 возникает в среднем больше эндосом, однако они локализованы подмембранно и практически не перемещаются в околядерную область, хотя через 90 мин некоторые укрупняются, по-видимому за счет слияний не изменивших локализацию эндосом. Поскольку в этом случае мы наблюдали полную деполимеризацию МТ после стимуляции эндоцитоза, в 3 раза меньшая по сравнению с контролем степень колокализации рецептора с белком слияния EEA1 (рис. 5, *в*) свидетельствует в пользу важности интактной, но динамичной системы МТ не только для перемещений эндосом, но и для их слияний.

Обработка клеток ингибитором PD98059, напротив, приводит к некоторому замедлению формирования эндосом, которых образуется даже меньше, чем в контроле, причем их число в дальнейшем изменяется также незначительно, возможно вследствие неэффективности слияний в этих условиях, хотя кажущийся размер таких эндосом больше, чем в предыдущем случае (рис. 4, *правый столбец*). Степень колокализации с EEA1 (рис. 5, *в*) также незначительно выше, чем при действии U0126, но существенно ниже контрольной. Однако в рассматриваемом случае перемещение эндосом в околядерную область все же происходит, хотя кластеризация остается значительно менее выраженной, чем в контроле (рис. 5, *б*). Учитывая, что PD98059 не приводит к разборке всех МТ, а, напротив, вызывал их стабилизацию (рис. 2, 3), можно предположить, что не столько интактные, сколько именно динамичные МТ важны как на стадии поиска и захвата вновь формируемых под мембраной эндосом, так и для их транспортировки по МТ.

Таким образом, два ингибитора ERK1/2 влияют противоположным образом на наличие, количество, стабильность и организацию интактных МТ, а также на локализацию и кластеризацию эндосом и эффективность их слияний. Существенно подчеркнуть, что хотя все эти различия разнонаправлены по сравнению с контролем, оба ингибитора подавляют деградацию рецептора ЭФР, что ясно следует из данных рис. 3 (*дорожка* ЭФР-Р на всех трех панелях). Только в этом смысле ингибиторы можно рассматривать как эквивалентные. Характер их влияния как на фосфорилирование ERK1/2, так и на поведение системы МТ и динамику эндоцитоза существенно разный.

Если рассматривать действие U0126 в контексте «статминовой гипотезы», то полученные данные говорят в ее пользу. Действительно, поскольку MAP-киназа, фосфорилируя статмин, подавляет его МТ-повреждающую активность, активация киназы должна приводить к стабилизации МТ, а ее ингибирование — к усилению работы статмина и деполимеризации МТ. Поскольку экспери-

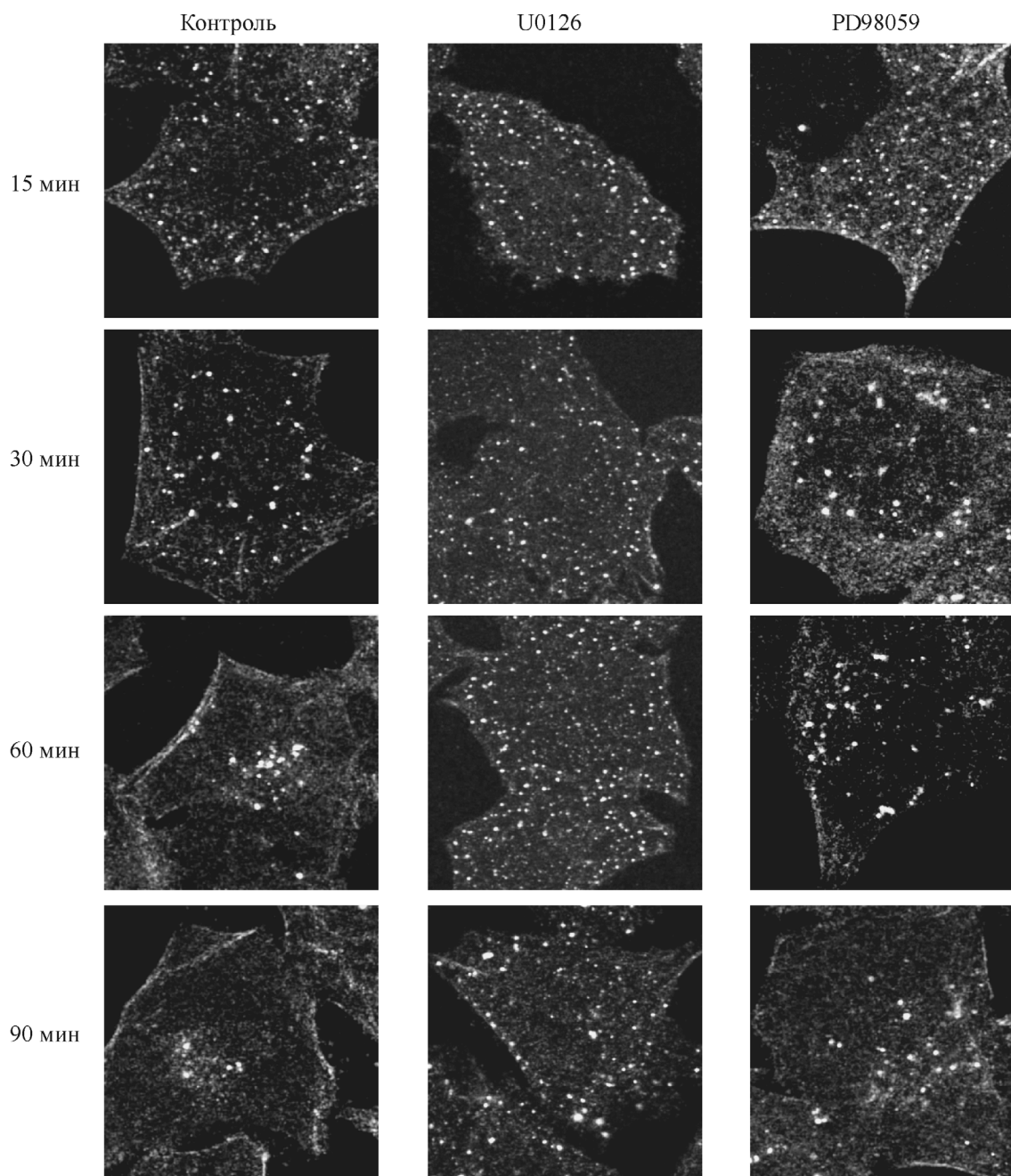


Рис. 4. Распределение рецептора ЭФР в клетках после стимуляции эндоцитоза ЭФР в контроле и в присутствии ингибитора U0126 или PD98059.

Представлены оптические срезы клеток тех же клеток, что и на рис. 2, фиксированных через 15, 30, 60 и 90 мин после стимуляции эндоцитоза переводом в среду с температурой 37 °С. Ингибитор присутствовал в среде в течение всего эксперимента. Конфокальная микроскопия, об. 63×.

ментальное добавление ингибитора влияет на ERK1/2-зависимые процессы не локально, как это имеет место в физиологических условиях (т. е. при действии ЭФР), а тотально, эффект может быть более ярко выраженным. В результате мы наблюдаем практически полную деполимеризацию МТ, сохраняющуюся в течение всего эксперимента, тогда как в норме период фрагментации (деполимеризации) МТ начинается через 15—30 мин и заканчивается через 60—90 мин после стимуляции эндоцитоза ЭФР. Наблюдаемый в норме период хаотизации МТ, коррелирующий с эффективной кластеризацией, может объясняться тем, что активированный статмин после ухода

MAP-киназы с эндосомы представлен небольшим пулом, связанным с эндосомой, и проявляет свою дестабилизирующую активность по отношению к соседним МТ, а не к «собственной» МТ, расчищая, таким образом, пространство перед движущейся по ней эндосомой.

С другой стороны, действие PD98059 противоположно таковому U0126 и фактически заключается в стабилизации МТ, по крайней мере их плюс-концевых частей, локализованных в примембранной области. Следует подчеркнуть, однако, что в области ЦОМТ все же наблюдается уменьшение числа МТ, т. е. действие двух ингибиторов в этом смысле похоже. Можно предполагать, что су-

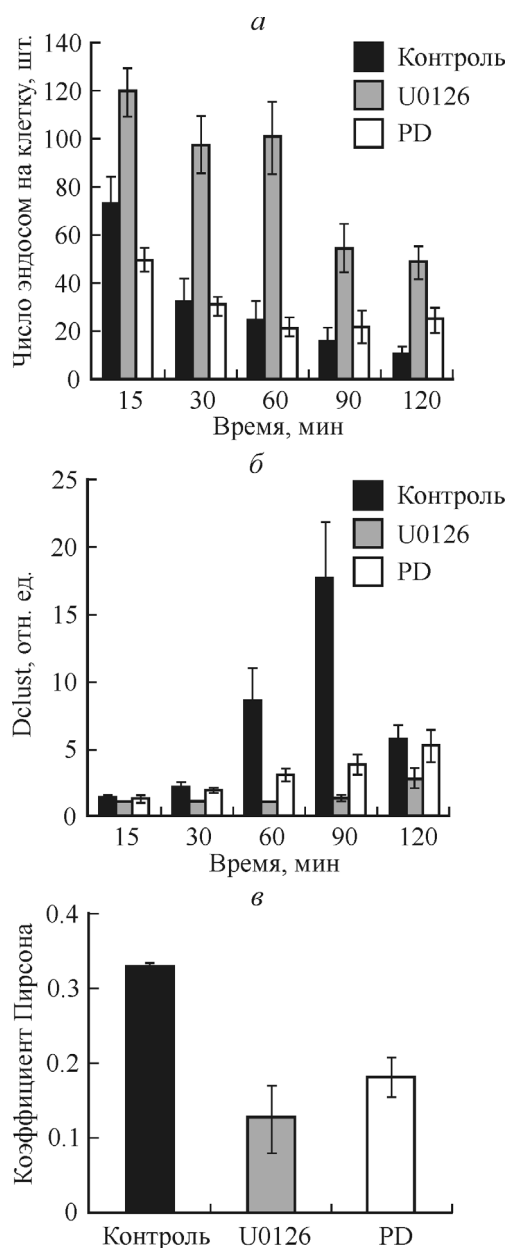


Рис. 5. Изменение числа эндосом (а), динамика их кластеризации (б) и ассоциации с маркером ранних эндосом EEA1 (в) после стимуляции эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в контроле (черные столбики) и в присутствии U0126 (серые столбики) или PD98059 (белые столбики). Представлены средние значения и их 95%-ный доверительный интервал.

По горизонтали — время после стимуляции эндоцитоза, мин; по вертикали — число эндосом на клетку (а), коэффициент кластеризации Dclust, отн. ед. (б), и колокализация рецептора ЭФР и маркера ранних эндосом EEA1, выраженная как коэффициент Пирсона (в). Данные получены с помощью количественной обработки проекций максимальной яркости клеток в соответствии с алгоритмом, описанным в разделе «Материал и методика». Представлены данные анализа колокализации в клетках через 15 мин после стимуляции эндоцитоза, окрашенных антителами против рецептора и EEA1.

существуют дополнительные факторы в случае PD98059, в результате которых наблюдаются эти эффекты. Действительно, еще в 2003 г. было показано, что PD98059 в отличие от U0126 опосредует усиленное образование активных форм кислорода в митохондриях, которые могут вызывать фосфорилирование ERK1/2 через Raf-1-незави-

симый путь, но зависимый от MEK-киназы, стоящей выше в каскаде фосфорилирования по отношению к ERK (Cerioni et al., 2003). Наблюдаемое нами резкое усиление фосфорилирования ERK2 и особенно ERK1 (p44) в присутствии PD98059 на ранней стадии эндоцитоза, нехарактерное для действия одного только ЭФР, может вызываться окислительным стрессом как побочным эффектом действия PD98059. Кроме того, следует учитывать различия механизмов действия двух ингибиторов. Хотя их привычно называют ингибиторами ERK1/2, реальным субстратом этих веществ является киназа MEK. При этом PD98059 препятствует фосфорилированию (а следовательно, и активации) MEK ее вышестоящими активаторами, исключая тем самым возможность активации и ERK1/2 по механизму каскадного фосфорилирования, тогда как U0126, не предотвращая фосфорилирования самой MEK, препятствует фосфорилированию ERK1/2-киназы активированной MEK-киназой (Lee et al., 2003).

Таким образом, использованные нами ингибиторы не могут рассматриваться как эквивалентные, и при выборе одного из них должны учитываться все обсуждаемые различия. Наши данные показывают, что вызываемые ими эффекты могут быть даже противоположными и существенно искажать интерпретацию получаемых данных. Тем не менее пертурбации в системе MAP-киназного каскада оказывают существенное влияние на динамику эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов в основном через влияние на организацию тубулинового цитоскелета. Действительно, отсутствие MT ожидаемо препятствует перемещению эндосом в околядерную область, тогда как стабилизация MT на краю клетки может влиять на эффективность механизма поиска и захвата эндосом динамичными плюс-концами MT, в меньшей степени влияя на эффективность слияний эндосом. Замедленная транслокация эндосом при действии PD98059, несмотря на наличие MT, сходящихся в ЦОМТ, может быть связана с предпочтением в использовании динамичных, а не стабильных MT в качестве «рельсов», что подтверждается полученными нами ранее данными (Злобина и др., 2010).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-00838) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### Список литературы

- Злобина М. В., Корнилова Е. С., Харченко М. В. 2013. Анализ динамики эндоцитоза рецептора ЭФР на основе обработки изображений, полученных с помощью конфокальной световой микроскопии на фиксированных клетках. Цитология. 55 (5): 348—357. (Zlobina M. V., Kharchenko M. V., Kornilova E. S. 2013. Analysis of EGF receptor endocytosis dynamics based on semiquantitative processing of confocal immunofluorescent images of fixed cells. Cell Tissue Biol. 7 (4): 382—391.)
- Злобина М. В., Харченко М. В., Латкин Д. С., Корнилова Е. С. 2010. Ацетилирование микротрубочек в ходе эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста (c-ErbB1) в интерфазных клетках линии HeLa. Цитология. 52 (6): 466—476. (Zlobina M. V., Kharchenko M. V., Latkin D. S., Kornilova E. S. 2010. Acetylation of microtubules during endocytosis of epidermal growth factor receptor (c-ErbB1) in interphase HeLa cells. Tsitologiya. 52 (6): 466—476.)
- Харченко М. Б., Корнилова Е. С., Меликова М. С. 2007. Изменения организации системы микротрубочек в ходе эндоцитоза рецептора ЭФР. Цитология. 49 (3): 243—249. (Kharchen-



- ko M. V., Kornilova E. S., Melikova M. S. 2007. Remodeling of microtubule system during EGF receptor endocytosis. *Tsitologiya*. 49 (3) : 243—249.)
- Beretta L., Dubois M. F., Sobel A., Bensaude O. 1995. Stathmin is a major substrate for mitogen-activated protein kinase during heat shock and chemical stress in HeLa cells. *Eur. J. Biochem*. 227 : 388—395.
- Cerioni L., Palomba L., Cantoni O. 2003. The Raf/MEK inhibitor PD98059 enhances ERK1/2 phosphorylation mediated by peroxynitrite via enforced mitochondrial formation of reactive oxygen species. *FEBS Lett*. 547 : 92—96.
- Deacon S. W., Nascimento A., Serpinskaya A. S., Gelfand V. I. 2005. Regulation of bidirectional melanosome transport by organelle bound MAP kinase. *Curr. Biol*. 15 : 459—463.
- Fehrenbacher N., Bar-Sagi D., Philips M. 2009. Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Mol. Oncol*. 3 : 297—307.
- 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 : 349—359.
- Lee M.-Sh., Taylor R., Davis T. L., Hauke R., Lin M.-F., Zelivianski S., Spellman M., Kellerman M., Kakitelashvili V., Zhou X.-W., Lugo E. 2003. ERK inhibitor PD98059 enhances docetaxel-induced apoptosis of androgen-independent human prostate cancer cells. *Int. J. Cancer*. 107 : 478—485.
- Marklund U., Brattsand G., Shingler V., Gullberg M. 1993. Serine 25 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem*. 268 : 15 039—15 047.
- Morishima-Kawahima M., Kosik K. 1996. The pool of MAP kinase associated with microtubules is small but constitutively active. *Mol. Biol. Cell*. 7 : 893—905.
- Ng D. C., Ng I. H., Yeap Y. Y., Badrian B., Tsoutsman T., McMullen J. R., Semsarian C., Bogoyevitch M. A. 2011. Opposing actions of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in regulating microtubule stabilization during cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem*. 286 : 1576—1587.
- Stone A. A., Chambers T. C. 2000. Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Exp. Cell Res*. 254 : 110—119.
- Williams R., Sanghera J., Wu F., Carbonaro-Hall D., Campbell D. L., Warburton D., Pelech S., Hall F. 1993. Identification of a human epidermal growth factor receptor-associated protein kinase as a new member of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase family. *J. Biol. Chem*. 268 : 18 213—18 217.
- Wortzel I., Seger R. 2011. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. *Genes Cancer*. 2 : 195—209.

Поступила 19 XII 2014

INHIBITORS OF MAP-KINASE PATHWAY U0126 AND PD98059  
DIFFERENTLY AFFECT ORGANIZATION OF TUBULIN CYTOSKELETON  
AFTER STIMULATION OF EGF RECEPTOR ENDOCYTOSIS

M. V. Zlobina,<sup>1</sup> Yu. Yu. Steblyanko,<sup>1,2</sup> M. A. Shklyaeva,<sup>1,2</sup> V. V. Kharchenko,<sup>1</sup>  
A. V. Salova,<sup>1</sup> E. S. Kornilova<sup>1,2, \*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg,  
and <sup>2</sup> Cytology and Histology Department of St. Petersburg State University;  
\* e-mail: elena.kornilova@gmail.com

To confirm the hypothesis about the involvement of EGF-stimulated MAP-kinase ERK1/2 in the regulation of microtubule (MT) system, the influence of two widely used ERK1/2 inhibitors, U0126 and PD98059, on the organization of tubulin cytoskeleton in interphase HeLa cells during EGF receptor endocytosis has been investigated. We have found that addition of U0126 or PD98059 to not-stimulated with EGF cells for 30 min has no effect on radially organized MT system. However, in the case of U0126 addition before EGF endocytosis stimulation, the number of MT per cell decreased within 15 min after such stimulation and was followed by complete MT depolymerization by 60—90 min. Stimulation of EGF endocytosis in the presence of PD98059 resulted only in insignificant depolymerization of MT and it could be detected mainly from their minus-ends. At the same time, MT regions close to plasma membrane became stabilized, which was proved by increase in tubulin acetylation level. This situation was characteristic for all period of the experiment. It has been also found that the inhibitors affect endocytosis dynamics of EGF-receptor complexes. Quantitative analysis demonstrated that the stimulation of endocytosis in the presence of U0126 generated a greater number of endosomes compared to control cells, and their number did not change significantly during the experiment. All these endosomes were localized peripherally. Effect of PD98059 resulted in the formation of lower number of endosomes that in control, but they demonstrated very slow clusterization despite the presence of some intact MT. Both inhibitors decreased EGFR colocalization with early endosomal marker EEA1, which indicated a delay in endosome fusions and maturation. The inhibitors were also shown to affect differently phospho-ERK 1 and 2 forms: U0126 completely inhibited phospho-ERK1 and 2, while, in the presence of PD98059, the two ERK forms demonstrated sharp transient activation in 15 min after stimulation, but only phospho-ERK2 could be detected after 60 min of endocytosis. In both cases, MAP-kinase activation dynamics was significantly different from the control. Our results suggest involvement of EGF-stimulated MAP-kinase pathway in cytoskeleton regulation. At the same time, they demonstrate that the two studied and widely used inhibitors are not equivalent with respect to not only the effect on MAP-kinase activity but also to such interdependent processes such as changes in cytoskeleton organization and signaling receptor' endocytosis.

Key words: microtubules, endocytosis, endosomes, EGF receptor, ERK1/2, U0126, PD98059, HeLa cell line.