

УДК 576.311.33

Кундельчук О.П.

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ СТРЕСС-ИНДУЦИРОВАННЫХ FM4-64-ОКРАШЕННЫХ ВЕЗИКУЛ В ВАКУОЛЯРНЫЙ ЛЮМЕН BY-2 КЛЕТОК ЗАВИСИТ ОТ СИНТЕЗА ПРОТЕИНОВ *DE NOVO* И БРЕФЕЛДИН А-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ МАШИНЫ, НО НЕ ОТ ИНТАКТНОСТИ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР

*Херсонский государственный университет,**Херсон, 40 лет Октября, 73000*

Kundelchuk O.P.

STRESS-INDUCED FM4-64-STAINED BODIES DELIVERY INSIDE VACUOLE LUMEN OF BY-2 CELLS WERE DEPENDENT FROM PROTEIN SYNTHESIS *DE NOVO* AND BREFELDIN A-SENSITIVE MACHINERY NOT CYTOSKELETON STRUCTURES INTACTNESS

Kherson state university, Kherson, 40 October, 73000

*Аннотация. В данной работе в результате проведенного исследования было показано, что в контрольных условиях появление FM4-64-позитивных интравacuолярных везикул в BY-2 клетках зависит только от доступности источников энергии для клеток, и не предотвращается обработкой клеток циклогексимидом D, брефелдином A, латранкулином B или оризалином. В то же время, стресс-индуцированное драматическое аккумуляирование FM4-64-окрашенных везикул внутри вакуолярного люмена строго зависит от синтеза протеинов *de novo* и частично зависит от брефелдин A-чувствительной клеточной транспортной машины, но не от интактности цитоскелетных структур клетки.*

Ключевые слова: BY-2 клетки, FM4-64, интравacuолярные везикулы, 2-деоксиглюкоза, азид натрия, циклогексимид D, брефелдин A, оризалин, латранкулин B.

Abstract. In this paper it was shown that in control conditions the FM4-64-positive intravacuolar vesicles appearance in BY-2 cells was strong dependent from energy sources access only and could not be prevented with Cycloheximide D, Brefeldin A, Latrunculine B or Oryzalin treatment. At the same time stress-induced dramatic FM4-64-stained vesicles accumulation inside vacuole lumen was strong dependent from protein synthesis de novo and partly dependent from Brefeldin A-sensitive cell machinery not cytoskeleton structure intactness.

Key words: BY-2 cells, FM4-64, intravacuolar vesicles, 2-Deoxyglucose, Sodium Azide, Cycloheximide D, Brefeldin A, Latrunculine B, Oryzalin.

Вступление

Прижизненный флюоресцентный краситель FM4-64 широко используется в качестве маркера эндоцитоза в исследованиях живых растительных клеток [4]. Этот краситель быстро интернализируется растительными клетками и после 10 - 15 минут инкубации выявляется внутри клеток в виде эндоцитозных везикул различного размера. Через 1 ч и более инкубационного периода FM4-64 окрашивание выявляется в тонопласте и иногда – внутри вакуолярного люмена в виде FM4-64-окрашенных телец [4, 16].

Проведенные нами исследования на BY-2 клетках подтвердили динамику интернализации FM4-64 окрашенных структур, описанную в литературных источниках. При этом особый интерес вызвали FM4-64-окрашенные везикулы, которые появляются внутри вакуолярного люмена некоторых клеток. Колокализация эндоцитозного материала с везикулами внутри вакуолярного люмена была выявлена также и другими исследователями. Например, Herman E. и Lamb C. [13] наблюдали обогащённые арабиногалактанами гликопротеины на поверхности клеток и внутри листовых клеток *Nicotiana tabacum* в форме цитоплазматических мультивезикулярных телец и как частично деградированные мультивезикулярные тельца, секвестрированные внутри центральной вакуоли. Tanchak M. и Fowke L. [38] и Record R. и Griffing L. [29] показали депозицию эндоцитозного маркера – катионного ферритина – в вакуоль протопластов сои. При этом полученные авторами данные были

интерпретированы как результат слияния мультивезикулярных телец с тонопластом (цитировано по [13]).

Следует отметить, что на сегодняшний день имеется мало информации о механизмах доставки таких везикул внутрь вакуолярного люмена. Herman E. и Lamb C. [13] было установлено, что эти везикулы могут быть секвестированы внутрь вакуоли и что они имеют двойные мембраны. При этом внутренняя мембрана данных везикул является производной плазматической мембраны, тогда как внешняя мембрана – производной тонопласта. Авторы отмечают, что этот механизм поступления везикул вовнутрь вакуоли в значительной степени похож на секвестрацию микроаутофагических везикул внутрь вакуолярного люмена.

В соответствии с литературными данными – везикулы внутри вакуолярного люмена могут иметь как минимум два источника происхождения: биосинтетический путь доставки веществ из цитоплазмы в вакуоль (т.н. the cytoplasm-to-vacuoly targeting (Cvt) biosynthetic pathway) и аутофагический путь деградации клеточных компонентов [2]. Недавно, Contento A. с коллегами [7] было показано, что FM4-64-окрашенные везикулы были колокализованы с GFP-Atg8-аутофагосомным маркером внутри вакуолярного люмена протопластов *Arabidopsis*.

Известно, что аутофагия у растительных клеток задействована в процессах старения [12], в ответе растительных клеток на депривацию питательных веществ [3, 6], в ответе врожденной иммунной системы [34], и т.д. В наших экспериментах нами было выявлено значительное накопление внутривакуолярных FM4-64-окрашенных везикул в культуре стареющих ВУ-2 клеток, а также в клеточной культуре после воздействия стрессовых факторов и после бактериального заражения культуры.

Анализ литературных данных и результаты собственных исследований позволили предположить происхождение внутривакуолярных FM4-64-позитивных везикул как результат конвергенции эндоцитозного и аутофагического транспортных путей в клетке. В тоже время мало известно о

возможных молекулярных механизмах, вовлечённых в доставку везикул, позитивных по эндоцитозным маркерам, внутрь вакуолярного люмена. Например, отсутствует информация относительно источников энергии, вовлечённости синтеза протеинов *de novo*, участия брефелдин А-чувствительной машины и цитоскелетных структур в механизмах доставки данных везикул внутрь вакуолярного люмена.

Для ответа на эти вопросы нами были использованы соответствующие ингибиторы для контроля влияния доставки FM4-64-позитивных везикул внутрь вакуолярного люмена ВУ-2 клеток в контрольных условиях и в условиях действия стрессовых факторов.

Материалы и методы

Клеточная культура. Суспензионная культура клеток *Nicotiana tabacum* (ВУ-2) выращивалась на питательной среде MS в колбах на шейкере в темноте при температуре +26°C. Для проведения экспериментальных работ использовалась 2-3 дневная культура клеток.

FM4-64 окрашивание. Краситель FM4-64 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) растворяли в ДМСО (стоковый раствор 2 мМ). Суспензионную культуру клеток ВУ-2 окрашивали 4 мкМ раствором красителя FM4-64 на протяжении 10 – 30 минут с последующим отмыванием избытка красителя и постинкубацией клеток в свежей питательной среде на протяжении 1 – 24 часов.

Обработка ингибиторами. Для предотвращения синтеза протеинов *de novo* клеточную культуру обрабатывали 100 мкМ раствором циклогексимида D (Sigma; стоковый раствор в 10 мМ этаноле). Для разрушения микротрубочек или актиновых микрофиламентов использовали раствор 15 мкМ оризалина (Dow Elanco; стоковый раствор 0,15 М в ацетоне) или 10 мкМ латранкулин В (Calbiochem; стоковый раствор 10 мМ в ДМСО), соответственно. Для нарушения работы брефелдин А-чувствительной клеточной машины клеточная культура обрабатывалась раствором 100 мкг/мл брефелдина А (BFA) (Sigma-

Aldrich; стоковый раствор 10 мг/мл в ДМСО). Для проведения экспериментов по депривации энергии ВУ-2 клетки инкубировали в растворах, содержащих одновременно 50 мМ 2-деоксиглюкозы (Sigma-Aldrich; стоковый раствор 1 М в воде) и 0,02% азид натрия (Sigma-Aldrich; стоковый раствор 2% в воде).

Для проверки нашей гипотезы относительно аутофагического происхождения FM4-64-окрашенных везикул внутри вакуолярного люмена растительных клеток, нами были индуцированы стрессовые условия путём кратковременного лишения ВУ-2 клеток глюкозы и источников энергии в результате обработки культуры клеток растворами 50 мМ 2-деоксиглюкозы и 0,02% азид натрия на протяжении 2 часов с последующим отмыванием ингибиторов (три промывания по 5 мин каждое) и постинкубацией ВУ-2 клеток на свежей питательной среде на протяжении 24 часов.

В соответствии с литературными данными, оба вещества – 2-деоксиглюкоза и азид натрия – являются ингибиторами АТФ-зависимых источников энергии в клетках [31]. Кроме того, было показано, что 2-деоксиглюкоза может имитировать в клетках условия голодания [14] и ускорять процессы формирования аутофагических везикул [28].

Для контроля вовлечённости синтеза протеинов *de novo*, цитоскелетных структур и ВФА-чувствительной клеточной машины в стресс-индуцированное интравакуолярное накопление везикул – пост-стрессовое инкубирование ВУ-2 клеток проводили в свежей питательной среде с добавлением соответствующих ингибиторов на протяжении 24 часов.

Микроскопия. Для визуализации внутриклеточных FM4-64-окрашенных структур нами использовался инвертированный лазерный сканирующий микроскоп Zeiss LSM 510 с аргоновым лазером (длина волны экситации 488 нм, длина волны эмиссии 665 нм).

Результаты

Двухдневную суспензионную культуру ВУ-2 клеток обрабатывали 4 мкМ раствором красителя FM4-64 на протяжении 30 мин и затем отмывали избыток

красителя. С помощью конфокального лазерного микроскопа были выявлены быстро движущиеся цитоплазматические FM4-64-окрашенные везикулы (рис. 1). После 1 ч и более инкубационного периода было выявлено окрашивание тонопласта и появление FM4-64-позитивных интравакуолярных везикул в некоторых клетках. На протяжении последующих 10 ч инкубации большинство клеток приобрели яркое окрашивание тонопласта и FM4-64-окрашенные тельца внутри вакуолярного люмена. Количество клеток с FM4-64-позитивными интравакуолярными везикулами зависело от возраста клеточной культуры, от длительности постинкубации культуры после процедуры FM4-64-окрашивания (табл. 1 а-б), от стрессовых условий окружающей среды (табл. 1в).

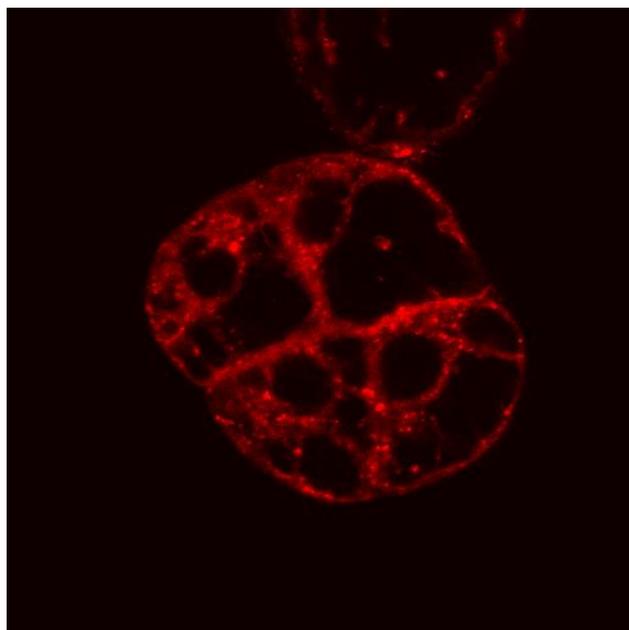


Рис. 1. Трёхдневная суспензионная культура ВУ-2 клеток через 30 мин после окрашивания прижизненным флуоресцентным красителем FM4-64. На фотографии видно появление FM4-64-окрашенных везикул в цитоплазме ВУ-2 клеток.

Обработка окрашенной FM4-64 клеточной культуры 15 мкМ оризалином, ингибитором микротрубочек, не оказала влияния на движение цитоплазматических и интравакуолярных везикул. Тогда как обработка окрашенной FM4-64 клеточной культуры 10 мкМ латранкулином В или 50 мМ

2-деоксиглюкозой с 0,02% азидом натрия полностью останавливала движение цитоплазматических везикул, но не предотвращала Броуновское движение FM4-64-окрашенных везикул внутри вакуолярного люмена. Таким образом, движение FM4-64-позитивных цитоплазматических везикул зависело от интактности актиновых микрофиламентов и доступности внутриклеточных источников энергии, но не от целостности микротрубочкового цитоскелета ВУ-2 клеток.

Следует отметить, что блокирование в ВУ-2 клетках доступности энергетических ресурсов в результате предобработки растворами 50 мМ 2-деоксиглюкозы + 0,02% азидом натрия перед FM4-64 окрашиванием – полностью предотвращало появление FM4-64-окрашенных цитоплазматических везикул, окрашивание тонопласта и появление FM4-64-окрашенных интравакуолярных везикул (рис. 2).

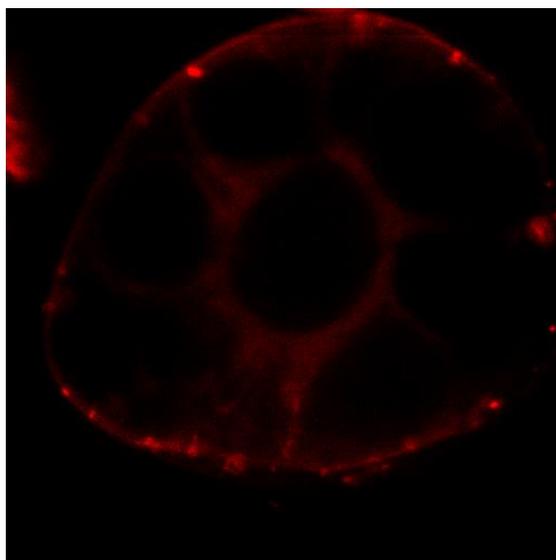


Рис. 2. Трёхдневная суспензионная культура ВУ-2 клеток после 2 ч инкубации в смеси растворов 50 мМ 2-деоксиглюкозы + 0,02% азид натрия и последующего окрашивания 4 мкМ FM4-64 на протяжении 6 ч. Схема эксперимента: 2 ч (0,02% азид натрия + 50 мМ 2-деоксиглюкоза) → 6 ч (4 мкМ FM4-64 + 0,02% азид натрия + 50 мМ 2-деоксиглюкоза). На фотографии видно, что депривация источников внутриклеточной энергии

не позволила появиться FM4-64-окрашенным структурам внутри клеток табака.

Тогда как предобработка ВУ-2 клеток 100 мкг/мл ВФА или 10 мкМ латранкулином В перед окрашиванием FM4-64 ингибировала, но не предотвращала появление FM4-64-окрашенных цитоплазматических везикул, окрашивание тонопласта и появление FM4-64-окрашенных внутривакуолярных телец (рис. 3). Следует отметить, что после обработки брэфелдином А (ВФА) некоторые цитоплазматические везикулы формировали т.н. ВФА-компарменты: две или более крупные FM4-64-окрашенные везикулярные структуры в цитоплазме (рис. 3). Предобработка ВУ-2 клеток 100 мкМ циклогексимидом D или 15 мкМ оризалином перед применением FM4-64 красителя не оказала видимого эффекта на последующий образец внутриклеточного распределения FM4-64-зависимого окрашивания внутриклеточных структур (рис. 4).

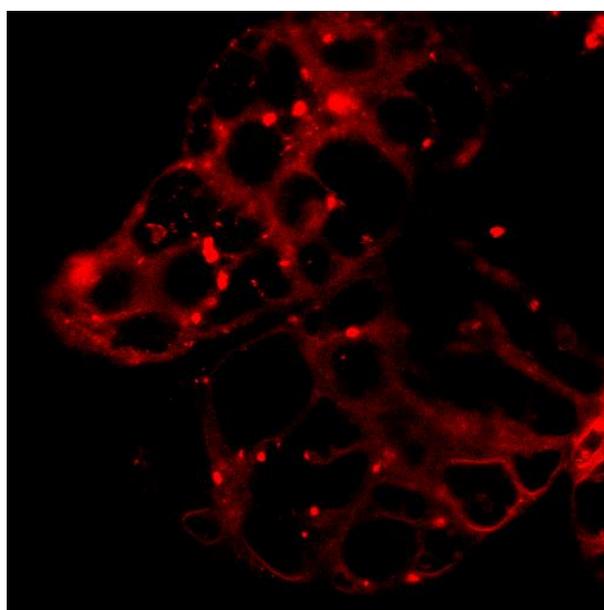


Рис. 3. Трёхдневная суспензионная культура ВУ-2 клеток после обработки в течение 2 ч 100 мкг/мл ВФА, окрашивания 4 мкМ FM4-64, отмывания избытка красителя и последующей инкубации клеток в свежей питательной среде, содержащей ВФА. Схема эксперимента: 2 ч 100 мкг/мл

ВГА → 30 мин 4 мкМ FM4-64 → 6 ч в ВГА. На фотографии видно, что обработка брэфелдином А замедлила появления окрашивания тонопласта и заингибировала появление внутривакуолярных FM4-64-окрашенных везикул. При этом видно формирование в цитоплазме ВГА-компарментов, вызванное действием брэфелдина А на клеточную машину везикулярного транспорта.

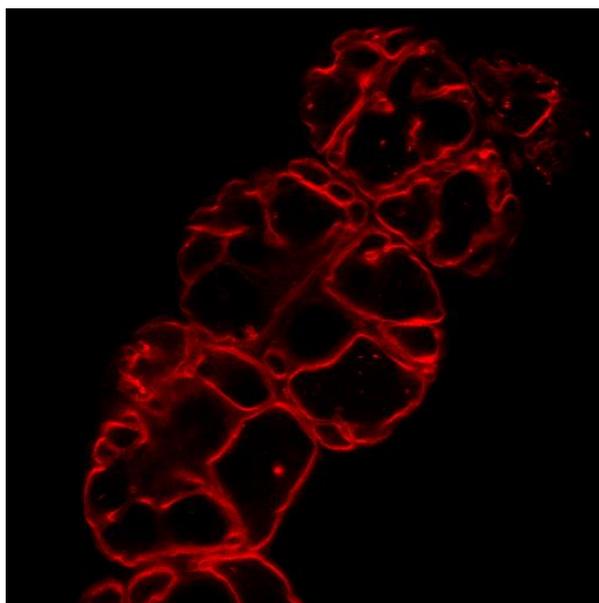


Рис. 4. Трёхдневная суспензионная культура ВУ-2 клеток после окрашивания FM4-64, отмывания красителя и последующей 6 ч инкубации клеток в питательной среде с добавлением 15 мкМ оризалина. Схема эксперимента: 2 ч 15 мкМ оризалина → 30 мин 4 мкМ FM4-64 → 6 ч культивирования в свежей питательной среде с оризалином. На фотографии видно, что разрушение микротрубочкового цитоскелета оризалином не препятствовало развитию FM4-64-окрашивания тонопласта и появлению одиночных FM4-64-окрашенных внутривакуолярных везикул.

Для индуцирования стрессовых условий FM4-64-окрашенные ВУ-2 клетки были обработаны смесью 50 мМ 2-деоксиглюкозы и 0,02% азида натрия на протяжении 2 ч с последующим отмыванием ингибиторов из клеточной среды

и постинкубацией клеток в свежей культуральной среде, не содержащей ингибиторы. После 24 ч постинкубирования ВУ-2 клеток в свежей культуральной среде было выявлено драматическое накопление FM4-64-позитивных телец внутри вакуолярного люмена клеток (табл. 1в, рис. 5).

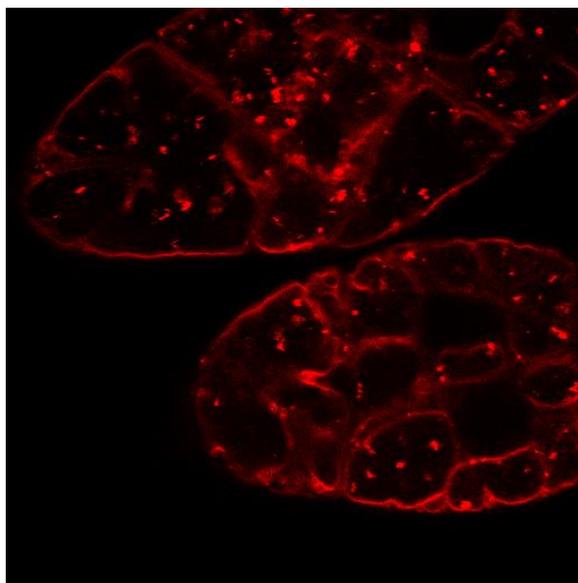


Рис. 5. Двухдневная суспензия ВУ-2 клеток после окрашивания FM4-64, 2 ч депривации источников энергии, отмывания ингибиторов и 24 ч постинкубации в свежей питательной среде без ингибиторов. Схема эксперимента: 30 мин 4 мкМ FM4-64 → 2 ч (0,02% азид натрия + 50 мМ 2-деоксиглюкоза) → 24 ч отмывание в свежей питательной среде MS. На фотографии видно, что 2 ч голодания клеток привело к драматическому накоплению внутри вакуолярного люмена FM4-64-окрашенных везикул.

Пост-инкубирование стрессированных ВУ-2 клеток в свежей питательной среде в присутствии 100 мкМ циклогексимида D полностью предотвращало дополнительное, по сравнению с базовым до стрессовым уровнем, накопление внутривакуолярных везикул (табл. 1д, рис. 6). Пост-инкубирование стрессированных ВУ-2 клеток с 100 мкг/мл ВФА почти в два раза снижало количество клеток с драматическим накоплением внутривакуолярных везикул (табл. 1е): только $27,4 \pm 8,5\%$ стрессированных клеток показали резкое

накопление FM4-64-окрашенных везикул внутри вакуолярного люмена после ВФА обработки (рис. 7). При этом ни 10 мкМ латранкулин В, ни 15 мкМ оризалин не оказали заметного влияния на интенсивность накопления внутривакуолярных везикул в ВУ-2 клетках по сравнению с клетками, инкубированными после стресса в питательной среде без ингибиторов (табл. 1 е-ж).

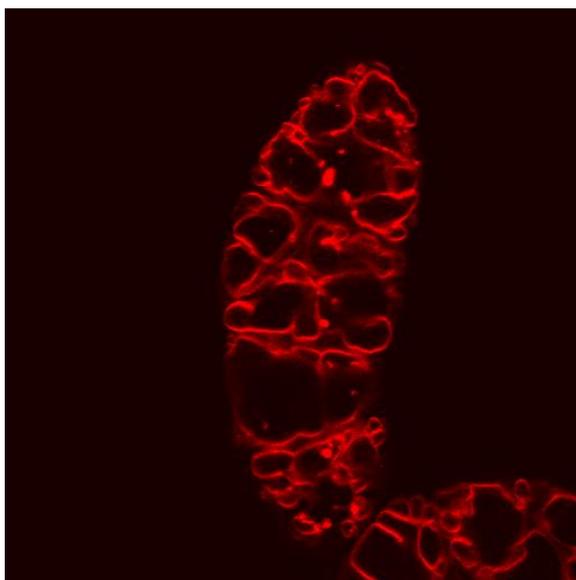


Рис. 6. Двухдневная суспензионная культура ВУ-2 клеток после FM4-64 окрашивания, 2 ч депривации энергии с помощью ингибиторов, отмывания ингибиторов и 24 ч постинкубации в свежей питательной среде в присутствии циклогексимида D. Схема эксперимента: 30 мин 4 мкМ D → 2 ч (0,02% азид натрия + 50 мМ 2-деоксиглюкоза) → 24 ч отмывание в свежей среде с 100 мкМ циклогексимидом D. На фотографии видно, что обработка циклогексимидом D не препятствовала окрашиванию тонопласта, однако – блокировала драматическое накопление FM4-64-окрашенных везикул внутри вакуолярного люмена ВУ-2 клеток.

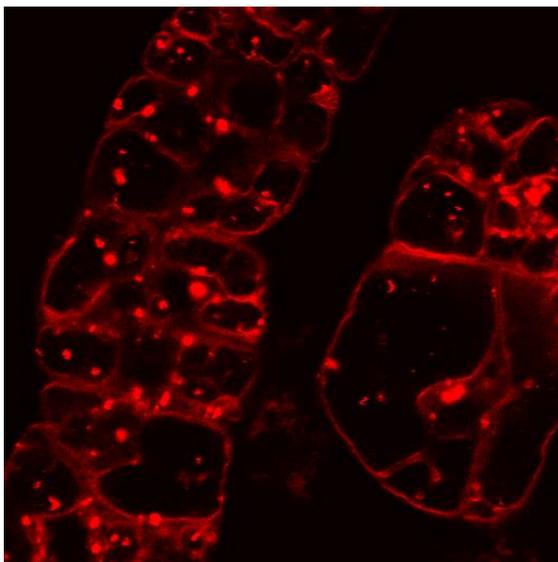


Рис. 7. Двухдневная суспензионная культура ВУ-2 клеток после окрашивания FM4-64, 2 ч депривации источников энергии, отмывания ингибиторов и 24 ч постинкубации в свежей питательной среде с брефелдином А. Схема эксперимента: 30 мин 4 мкМ FM4-64 → 2 ч (0,02% азид натрия + 50 мМ 2-деоксиглюкоза) → 24 ч отмывание в питательной среде с 100 мкг/мл ВФА. На фотографии видно окрашивание тонопласта и гипернакопление FM4-64 позитивных везикул внутри вакуолярного люмена ВУ-2 клеток.

Следует отметить, что было выявлено три различных образца окрашивания клеток после любого типа обработок: (1) клетки только с FM4-64 окрашенным тонопластом; (2) клетки только с FM4-64-окрашенными везикулами внутри вакуолярного люмена; (3) клетки с одновременным FM4-64-окрашиванием и тонопласта, и внутривакуолярных везикул.

Таблица 1

Накопление FM4-64-окрашенных телец внутри вакуолей ВУ-2 клеток в различных экспериментальных условиях

Варианты:	Обработка ВУ-2 клеток:	Количество просмотренных	Количество ВУ-2 клеток, %:		
			(-)	(+)	(+++)

		BY-2 клеток:			
А	FM4-64 → → → → 2h MS	146	49,7%	51,3%	0%
Б	FM4-64 → → → → 26h MS	102	45,1%	41,2%	13,7%
В	FM4-64 → 2h DS → 24h MS	197	23,4%	30,5%	46,1%
Г	FM4-64 → 2h DS → 24h MS+CyclD	132	54,5%	45,5%	0%
Д	FM4-64 → 2h DS → 24h MS+BFA	106	52,8%	19,8%	27,4%
Е	FM4-64 → 2h DS → 24h MS+LatrB	110	18,2%	23,6%	58,2%
Ж	FM4-64 → 2h DS → 24h MS+Oryz	125	21,9%	27,6%	50,5%

*Сокращения: **FM4-64** – BY-2 клетки, которые были 30 мин обработаны 4 мкМ FM4-64 красителем в MS среде с последующим отмывание избытка красителя; **MS** – инкубирование BY-2 клеток в MS питательной среде; **DS** – инкубирование BY-2 клеток в MS питательной среде с 50 мМ 2-деоксиглюкозой + 0,02% азида натрия; **MS+CyclD** – инкубирование BY-2 клеток в MS питательной среде с 100 мкМ циклогексимида D; **MS+BFA** - инкубирование BY-2 клеток в MS питательной среде с 100 мкг/мл BFA; **MS+LatrB** - инкубирование BY-2 клеток в MS питательной среде с 10 мкМ латранкулина B; **MS+Oryz** - инкубирование BY-2 клеток в MS питательной среде с 15 мкМ оризалина; (-) – BY-2 клетки без FM4-64-окрашенных внутривакуолярных везикул; (+) – BY-2 клетки с конститутивным (базовым) уровнем FM4-64-окрашенных везикул внутри вакуолярного люмена; (+++) – BY-2 клетки с драматическим количеством FM4-64-окрашенных везикул внутри вакуолярного люмена.

Обсуждение

Окрашивание клеток флуоресцентным красителем FM4-64 широко используется для исследования событий эндоцитоза в растительных клетках [4]. Недавно методика FM4-64 окрашивания была использована для выявления конвергенции между эндоцитозным и секреторным клеточным путём [8], между эндоцитозным и биосинтетическим вакуолярным путём [40], между эндоцитозным и аутофагическим деградиционным путём [7, 43] в растительных клетках. Результаты этих исследований показали возможность использовать

краситель FM4-64 для исследования клеточных процессов, конвергентных с эндоцитозным путём.

В ходе наших экспериментов было установлено появление FM4-64-окрашенных интравакуолярных везикул. В соответствии с литературными данными, везикулы внутри вакуолярного люмена могут иметь различное происхождение: они могут быть либо компонентами биосинтетической машины, доставляющей грузы из цитоплазмы в вакуоль, либо компонентами аутофагического деградационного пути [2]. Необходимо отметить, что эти клеточные пути имеют определённую конвергенцию с эндоцитозным везикулярным транспортом в растительных клетках [7,40, 43], и поэтому могут быть источником выявленных в наших экспериментах FM4-64-окрашенных телец внутри вакуолярного люмена.

В наших экспериментах было выявлено драматическое накопление FM4-64-позитивных везикул внутри вакуолярного люмена ВУ-2 клеток: (1) после стрессовых условий, индуцированных кратковременной обработкой 2-деоксиглюкозой + 0,02% азидом натрия с последующей постинкубацией клеток в культуральной среде без ингибиторов; (2) после бактериального заражения клеточной культуры; (3) в клетках стареющей культуры. Поскольку это был во всех случаях стресс-индуцированный ответ мы предположили, что выявленный феномен имеет аутофагическую природу.

В литературе описаны макро- и микроаутофагические механизмы формирования вакуолярных везикул: в процессе макроаутофагии часть цитоплазмы клетки обособляется в аутофагосому, имеющую двойную мембрану, и затем аутофагические везикулы доставляются в вакуолярный люмен; в процессе микроаутофагии – часть цитозоля обособляется путём инвагинации цитозольного содержимого в мембрану тонопласта с последующим формированием аутофагических везикул [2]. Следует отметить, что оба механизма формирования внутривакуолярных везикул были выявлены у растительных клеток [22]. Нерман Е. и Lamb С. [13] показали локализацию арабиногалактан-обогащённых гликопротеинов в частично деградированных

мультивезикулярных тельцах, секвестированных внутри центральной вакуоли клеток листьев *Nicotiana tabacum*. При этом авторы исследования предположили микроаутофагический механизм секвестрации данных мультивезикулярных телец внутрь вакуоли.

Необходимо отметить, что для клеток дрожжей был предположен подобный механизм деградации мембран: компоненты плазматической мембраны эндоцитируются и транспортируются к вакуолярной мембране с помощью везикулярного транспорта; где они подвергаются инвагинации в вакуолярный люмен путём микроаутофагоцитоза и затем деградируют с образованием аутофагических телец [24, 46-47].

Нами были выявлены в небольших количествах FM4-64-позитивные везикулы внутри вакуолярного люмена также и в контрольных условиях. В соответствии с Niwa Y. et al. [23], аутофагия у растений вовлечена не только в процессы выживания во время экстремальных субстрат-лимитирующих условий, но и является важным механизмом контроля качества клеточных компонентов в также и в обычных условиях.

Следует отметить, что Yano et al., [43] и Yamada et al., [42] в ходе экспериментов по углеводному голоданию не выявили аккумуляции интравакуолярных везикул в ВУ-2 клетках, окрашенных FM4-64. Известно, что интравакуолярная деградация – это очень быстрый процесс и часто аутофагические тельца внутри клеток дрожжей возможно выявить только после ингибирования активности вакуолярной сериновой протеазы Ser с помощью PMSF [37], а внутри вакуолярного люмена растительной клетки – только после добавления конканамицина А [39, 44], поскольку конканамицин А является специфическим ингибитором вакуолярной АТФ-азы (V-ATPase) [21], и в результате его применения внутри вакуоли увеличиваются значения рН, что предотвращает активирование вакуолярных протеаз [35].

В наших экспериментах с помощью специальных ингибиторов мы создавали в ВУ-2 клетках условия очень сильной депривации энергии и глюкозы, что промотировало в клетках драматическую деградацию мембран.

Возможно, что в наших экспериментальных условиях активность вакуолярных протеаз была не достаточной для деградации секвестированного клеточного материала, что позволило выявить накопление FM4-64-окрашенных интравакуолярных везикул.

Для выявления возможных механизмов доставки FM4-64-окрашенных везикул внутрь вакуолярного люмена, мы обрабатывали суспензионную культуру ВУ-2 клеток различными ингибиторами. Полученные нами результаты показали, что конститутивный уровень FM4-64-позитивных везикул внутри вакуолярного люмена не ингибировался обработкой циклогексимидом D, однако, стресс-индуцированное накопление FM4-64-окрашенных везикул сильно зависело от процесса синтеза протеинов *de novo*. Takatsuka С. с коллегами [36] показали, что обработка циклогексимидом D ингибировала процессы аутофагии в клетках растений. В клетках дрожжей *Pichia pastoris* обработка циклогексимидом D предотвращала стрессовую микроаутофагию, индуцированную голодом, но не макроаутофагическую секвестрацию пероксисом внутрь вакуолярного люмена [41]. С другой стороны, Abeliovich Н. с коллегами [1] было показано, что индуцирование макроаутофагии в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* происходило в условиях отсутствия синтеза протеинов *de novo*, однако аутофагосомы, которые при этом формировались, были значительно мельче обычных. На клетках животных Lawrence В. и Brown W. [20] было выявлено, что предобработка циклогексимидом вызывала драматическое ингибирование аутофагической деградации вследствие того, что формирующиеся аутофагические вакуоли не получали лизосомные маркеры, что не позволяло им преобразовываться в зрелые деградационные аутофагические вакуоли.

В ходе проведенных нами экспериментов на стрессированных ВУ-2 клетках, пост-инкубированных с ВФА, было установлено, что ВФА-чувствительная клеточная транспортная машина частично задействована в инкорпорацию FM4-64-окрашенных везикул внутрь вакуолярного люмена: было выявлено двукратное уменьшение количества клеток с драматическим

накоплением интравакуолярных везикул после обработки брефелдином А, по сравнению с клетками, постинкубированными без данного ингибитора. По нашим данным, до этого возможное влияние ВФА на секвестрацию интравакуолярных везикул в растительных клетках не исследовалось. На клеточной линии НТ-29 раковых клеток толстого кишечника человека было показано, что ВФА не оказывает влияния на конститутивный аутофагический деградационный путь [25], однако, у фибробластов крыс в условиях пищевого стресса было выявлено, что обработка брефелдином А ингибировала стресс-индуцированное формирование аутофагических везикул по сравнению с их формированием в необработанных ингибитором клетках [27].

В соответствии с полученными нами экспериментальными данными, стресс-индуцированная секвестрация FM4-64-позитивных везикул внутрь вакуолярного люмена ингибировалась в разной степени, как обработкой циклогексимидом D, так и инкубацией с брефелдином А. Выявленный ингибирующий эффект брефелдина А может быть результатом как нарушения процессинга протеинов в аппарате Гольджи, так и следствием повреждения клеточной машины секвестрации интравакуолярных везикул *per se*. С другой стороны, известно, что события эндоцитоза ингибируются, но не предотвращаются в процессе обработки клеток брефелдином А [5, 10, собственные не опубликованные данные]. Поэтому, вполне возможно, что обработка ВФА задерживает конвергенцию FM4-64-позитивного эндоцитозного пути и аутофагического деградационного пути в ВУ-2 клетках, а не нарушает работу клеточной интравакуолярной секвестрационной машины как таковой.

В наших исследованиях антицитоскелетные обработки ВУ-2 клеток оризалином или латранкулином В не оказали заметного влияния на стресс-индуцированное аккумуляирование интравакуолярных везикул. По нашим данным на сегодняшний день отсутствуют прямые литературные данные, касающиеся участия микротрубочкового цитоскелета в аутофагическом процессе у растительных клеток. Недавно, Ketelaar T. с коллегами [15] выявили у растений *Arabidopsis* гомологи аутофагических протеинов Atg8 (Apg8/Aut7),

которые являются новым семейством микротрубочко-связывающих протеинов. Авторы исследования предположили, что связывание с микротрубочками участвует в процессах аутофагии в растительных клетках. Согласно литературным данным, протеины Arg8/Aut7 дрожжей задействованы как в процессах макроаутофагии [2], так и в процессах микроаутофагии [33]. Однако, недавно было показано, что микроаутофагическая секвестрация везикул внутри вакуолярного люмена клеток дрожжей не требует интактности микротрубочек [19]. При этом отсутствуют прямые данные участия микротрубочек в доставке макроаутофагических везикул внутрь вакуолярного люмена клеток дрожжей. Kirisako T. с коллегами [17] было показано, что клетки дрожжей, перенесенные на голодные питательные среды, содержащие 1 мМ PMSF (ингибитор вакуолярных протеаз) и 10 мкг/мл нокодазола (антимикротрубочковый препарат) – могли аккумулировать аутофагические тельца внутри своих вакуолей и у мутантной по белкам микротрубочек линии *tub2* – аутофагические тельца также нормально аккумулировались внутри вакуолей. Согласно результатам, полученным Sakai с коллегами [32], обработка PMSF препятствовала секвестрации микроаутофагических, но не макроаутофагических везикул внутрь вакуолярного люмена клеток дрожжей *Pichia pastoris*. Вполне возможно, что выявленный Kirisako T. с коллегами [17] феномен связан с макроаутофагическими событиями. Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что у дрожжей микротрубочки не принимают участия ни в процессах микроаутофагической, ни в процессах макроаутофагической секвестрации везикул внутрь вакуолярного люмена клеток. Известно, что в клетках животных конвергенция между эндоцитозным и макроаутофагическим транспортными путями нуждается в интактности микротрубочек. Например, Fengsrud M. с коллегами [9] и Kochl R. с коллегами [18] было показано, что микротрубочки способствовали слиянию аутофагосом с эндосомами в гепатоцитах в условиях стрессового голодания. С другой стороны, Rinnonen E. с коллегами [26] было выявлено, что в фибробластах крыс в условиях голодания по мере аутофагического материала с

катионизированным ферритином в качестве эндоцитозного маркера высвобождался во внутрь литической вакуоли независимо от организации микротрубочек. Следует отметить, что нами не были найдены прямые литературные данные, касающиеся участия микротрубочек в событиях микроаутофагии в клетках животных.

Кроме того, по нашим данным отсутствует информация о возможном участии актиновых микрофиламентов в доставке везикул внутрь вакуолярного люмена у растительных клеток. Reggiori F. с коллегами [30] было показано, что у дрожжей неселективная аутофагия не нуждается в актиновых микрофиламентах для секвестрации везикул внутрь вакуолярного люмена, однако, селективная аутофагия (например, пероксофагия) в клетках требует интактности актиновых микрофиламентов. Подобные результаты были получены Hamasaki M. с коллегами [11], которыми было показано, что селективное проникновение эндоплазматического ретикулума в аутофагосомы является актин-зависимым [11]. Waguri S. с коллегами [45] было выявлено, что разрушение актиновых микрофиламентов цитохалазином D предотвращало секвестрацию С-образных мультивезикулярных телец, содержащих эндоцитозный маркер – пероксидазу зрена – внутрь индуцированного гормональной обработкой вакуолярного люмена GH4C1 клеток. Таким образом, селективная аутофагия как в клетках животных, так и в клетках дрожжей является зависимой от интактности актиновых микрофиламентов.

Таким образом, в контрольных условиях появление FM4-64-позитивных интравакуолярных везикул в ВУ-2 клетках зависит только от доступности источников энергии для клеток, и не предотвращается обработкой клеток циклогексимидом D, брефелдином А, латранкулином В или оризалином. В тоже время, стресс-индуцированное драматическое аккумуляирование FM4-64-окрашенных везикул внутри вакуолярного люмена строго зависит от синтеза протеинов *de novo* и частично зависит от брефелдин А-чувствительной клеточной транспортной машины, но не от интактности цитоскелетных структур клетки.

Экспериментальная часть исследования выполнена на базе лаборатории профессора Криса Хавеса, Оксфорд Брукс университет, Оксфорд, Великобритания.

Литература

1. Abeliovich H., Dunn W.A., Kim J., Klionsky D.J. Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps // *J. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 151(5). – P. 1025 - 1034.
2. Abeliovich H., Klionsky D. Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 2001. – Vol. 65(3). – P. 463 - 479.
3. Aubert S., Gout E., Bligny R., Marty-Mazars D., Barrieu F., Alabouvette J., Marty F., Douce R. Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates // *J. Cell Biol.* – 1996. – Vol. 133. – P. 1251 - 1263.
4. Bolte S., Talbot C., Boutte Y., Catrice O., Read N.D., Satiat-Jeunemaitre B. FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells // *J. Microsc.* – 2004. – Vol. 214. – P. 159 - 173.
5. Carroll A.D., Moyen C., Van Kesteren P., Tooke F., Battey N.H., Brownlee C. Ca^{2+} annexins, and GTP modulate exocytosis from maize root cap protoplasts // *Plant Cell.* – 1998. – Vol. 10. – P. 1267 - 1276.
6. Chen M.-H., Liu L.-F., Chen Y.-R., Wu H.-K., Yu S.-M. Expression of α -amylases, carbohydrate metabolism, and autophagy in cultured rice cells is coordinately regulated by sugar nutrient // *Plant J.* – 1994. – Vol. 6(5). – P. 625 - 636.
7. Contento A.L., Xiong Y., Bassham D. Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein // *Plant J.* – 2005. – Vol. 42. – P. 598 - 608.

8. Dettmer J., Hong-Hermesdorf A., Stierhof Y.D., Schumacher K. Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. – 2006. – Vol. 18(3). – P. 715 - 730.
9. Fengsrud M., Roos N., Berg T., Liou W., Slot J.W., Seglen P.O. Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: effects of vinblastine and asparagines on vacuole distributions // *Exp. Cell Res.* – 1995. – Vol. 221(2). – P. 504 - 519.
10. Gaynor E.C., Chen C.-Y., Emr S., Graham T.R. Arf is required for maintenance of yeast Golgi and endosome structure and function // *Mol. Biol. Cell*. – 1998. – Vol. 9. – P. 653 - 670.
11. Hamasaki M., Noda T., Baba M., Ohsumi Y. Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast // *Traffic*. – 2005. – Vol. 6(1). – P. 56 - 65.
12. Hanaoka H., Noda T., Shirano Y., Kato T., Hayashi H., Shibata D., Tabata S., Ohsumi Y. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 129. – P. 1181 - 1193.
13. Herman E.M., Lamb C.J. Arabinogalactan-rich glycoproteins are localized on the cell surface and in intravacuolar multivesicular bodies // *Plant. Physiol.* – 1992. – Vol. 98. – P. 264 - 272.
14. Kang H.T., Hwang E.S. 2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic // *Life Sci.* – 2006. – Vol. 16(12). – P. 1392 - 1399.
15. Ketelaar T., Voss C., Dimmock S.A., Thumm M., Hussey P.J. *Arabidopsis* homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 567(2-3). – P. 302 - 306.
16. Kim D.H., Eu Y.-J., Yoo C.M., Kim Y.-W., Pih K.T., Jin J.B., Kim S.J., Stenmark H., Hwang I. Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells // *Plant Cell*. – 2001. – Vol. 13. – P. 287 - 301.

17. Kirisako T., Baba M., Ishihara N., Miyazawa K., Ohsumi M., Yoshimori T., Noda T., Ohsumi Y. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast // *J. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 147(2). – P. 435 - 444.
18. Kochl R., Hu X.W., Chan E.Y., Tooze S.A. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes // *Traffic.* – 2006. – Vol. 7(2). – P. 129 - 145.
19. Kunz J.B., Schwarz H., Mayer A. Determination of four sequential stages during microautophagy *in vitro* // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279(11). – P. 9987 - 9996.
20. Lawrence B.P., Brown W.J. Inhibition of protein synthesis separates autophagic sequestration from the delivery of lysosomal enzymes // *J. Cell Sci.* – 1993. – Vol. 105(Pt2). – P. 473 - 480.
21. Matsuoka K., Higuchi T., Maeshima M., Nakamura K. A vacuolar-type H⁺-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells // *Plant Cell.* – 1997. – Vol. 9. – P. 533 - 546.
22. Moriyasu Y., Hillmer S. Autophagy and vacuole formation. In D.G. Robinson, J.C. Rogers, eds, *Vacuolar Compartments* // *Annu. Plant Rev.* – 2000. – Vol. 5. – P. 71 - 89.
23. Niwa Y., Kato T., Tabata S., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K, Moriyasu Y. Disposal of chloroplasts with abnormal function into the vacuole in *Arabidopsis thaliana* cotyledon cells // *Protoplasma.* – 2004. – Vol. 223 (2-4). – P. 229 - 232.
24. Odorizzi G., Babst M., Emr S.D. Fab1p PrdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body // *Cell.* – 1998. – Vol. 95. – P. 847 - 858.
25. Ogier-Denis E., Bauvy C., Houri J.J., Codogno P. Evidence for a dual control of macroautophagic sequestration and intracellular trafficking of N-linked glycoproteins by the trimeric G(i3) protein in HT-29 cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1997. – Vol. 235(1). – P. 166 - 170.

26. Punnonen E.L., Autio S., Kaija H., Reunanen H. Autophagic vacuoles fuse with the prelysosomal compartment in cultured rat fibroblasts // *Eur. J. Cell Biol.* – 1993. – Vol. 61(1). – P. 54 - 66.
27. Purhonen P., Pursiainen K., Reunanen H. Effects of Brefeldin A on autophagy in cultured rat fibroblasts // *Eur. J. Cell Biol.* – 1997. – Vol. 74(1). – P. 63 - 67.
28. Ravikumar B., Stewart A., Kita H., Kato K., Duden R., Rubinsztein D.C. Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy // *Hum. Mol. Genet.* – 2003. – Vol. 12(9). – P. 985 - 994.
29. Record R.D., Griffing L.R. Convergence of endocytotic and lysosomal pathways in soybean protoplasts // *Planta.* – 1988. – Vol. 176. – P. 425 - 432.
30. Reggiori F., Monastyrska I., Shintani T., Klionsky D.J. The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Biol. Cell.* – 2005. – Vol. 16(12). – P. 5843 - 5856.
31. Sakai M., Ogawa K. Energy-dependent lysosomal wrapping mechanism (LWM) during autophagolysosome formation // *Histochemistry.* – 1982. – Vol. 76(4). – P. 479 - 488.
32. Sakai Y., Koller A., Rangell L.K., Keller G.A., Subramani S. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates // *J. Cell Biol.* - 1998. – Vol. 141(3). – P. 625 - 636.
33. Sattler T., Mayer A. Cell-free reconstitution of microautophagic vacuole invagination and vesicle formation // *J. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 151(3). – P. 529 - 538.
34. Seay M., Patel S., Dinesh-Kumar S.P. Autophagy and plant innate immunity // *Cellular Microbiology.* – 2006. – Vol. 8(6). – P. 899 - 906.
35. Takano J., Miwa K., Yuan L., von Wiren N., Fujiwara T. Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability // *PNAS.* – 2005. – Vol. 102(34). – P. 12276 - 12281.

36. Takatsuka C., Inoue Y., Matsuoka K., Moriyasu Y. 3-methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions // *Plant Cell Physiol.* – 2004. – Vol. 45(3). – P. 265 - 274.

37. Takeshige K., Baba M., Tsuboi S., Noda T., Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction // *J. Cell Biol.* – 1992. – Vol. 119. – P. 301 - 311.

38. Tanchak M.A., Fowke L.C. The morphology of multivesicular bodies in soybean protoplasts and their role in endocytosis // *Protoplasma.* – 1987. – Vol. 134. – P. 173 - 182.

39. Thompson A.R., Doelling J.H., Suttangkakul A., Vierstra R.D. Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways // *Plant. Physiol.* – 2005. – Vol. 138(4). – P. 2097 - 2110.

40. Tse Y.C., Mo B., Hiller S., Zhao M., Lo S.W., Robinson D.G., Jiang L. Identification of multivesicular bodies as prevacuolar compartments in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells // *Plant Cell.* – 2004. – Vol. 16. – P. 672 - 693.

41. Tuttle D.L., Dunn W.A.Jr. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *J. Cell Sci.* – 1995. – Vol. 108(Pt1). – P. 25 - 35.

42. Yamada K., Fuji K., Shimada T., Nishimura M., Hara-Nishimura I. Endosomal proteases facilitate the fusion of endosomes with vacuoles at the final step of the endocytotic pathway // *Plant J.* – 2005. – Vol. 41(6). – P. 888 - 898.

43. Yano K., Matsui S., Tsuchiya T., Maeshima M., Kutsuna N., Hasezawa S., Moriyasu Y. Contribution of the plasma membrane and central vacuole in the formation of autolysosomes in cultured tobacco cells // *Plant Cell Physiol.* – 2004. – Vol. 45(7). – P. 951 - 957.

44. Yoshimoto K., Hanaoka H., Sato S., Kato T., Tabata S., Noda T., Ohsumi Y. Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy // *Plant Cell.* – 2004. – Vol. 16(11). – P. 2967 - 2983.

45. Waguri S., Kohmura M., Gotow T., Watanabe T., Ohsawa Y., Kominami E., Uchiyama Y. The induction of autophagic vacuoles and the unique endocytic

compartments, C-shaped multivesicular bodies, in GH4C1 cells after treatment with 17beta-estradiol, insulin and EGF // Arch. Histol. Cytol. – 1999. – Vol. 62(5). – P. 423 - 434.

46. Wendland B., Emr S.D., Riezman H. Protein traffic in the yeast endocytic and vacuolar protein sorting pathways // Curr. Opin. Cell Biol. – 1998. – Vol. 10. – P. 513 - 522.

47. Wurmser A.E., Emr S.D. Phosphoinositide signaling and turnover: PtdIns(3)P, a regulator of membrane traffic, is transported to the vacuole and degraded by a process that requires luminal vacuolar hydrolase activities // EMBO J. – 1998. – Vol. 17. – P. 4930 - 4942.

Статья отправлена: 29.10.2015 г.

© Кундельчук О.П.