МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 576.08:576.311.33:576.314:576.342

ЭНДОЦИТОЗ И ЕГО ИНГИБИТОРЫ У БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *RHIZOCTONIA SOLANI*

О.В. Камзолкина[1,*], **М.А. Киселица**[1], **О.А. Кудрявцева**[1], **О.В. Штаер**[1], **И.С. Мажейка**[1,2]

[1]*Кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*
[2]*Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова, РАН, Россия, 119333, г. Москва, ул. Губкина, д. 3*
[*]*e-mail: o-kamzolkina@yandex.ru*

Эндоцитоз – сложный процесс поглощения из внешней среды и дальнейшего распределения внутри клетки растворимых веществ, макромолекул, микрочастиц и т.п. с помощью везикул, формируемых цитоплазматической мембраной. Эндоцитоз в клетках животных и человека активно и успешно исследуют. Так, классификация данного процесса у животных, основанная только на особенностях образования первичных везикул, включает в себя до десяти различных путей эндоцитоза. Современные знания об эндоцитозе у мицелиальных грибов не столь обширны, поэтому его изучение в данной группе организмов – актуальное и перспективное направление в фундаментальной и прикладной микологии. В настоящей работе мы исследовали воздействие на динамику эндоцитоза у фитопатогенного гетеробазидиального гриба *Rhizoctonia solani* шести различных ингибиторов, действующих как на сборку актинового/тубулинового цитоскелетов, так и на становление разных типов эндоцитоза. Оценку влияния ингибиторов проводили с помощью микроскопического анализа поглощения клетками мицелия флуоресцентного маркера эндоцитоза AM4-64. В результате проведенного исследования выявлено четыре типа воздействия ингибиторов на эндоцитоз *R. solani*: от полного отсутствия воздействия до сильной супрессии разных стадий грибного эндоцитоза. Оказалось, что четыре из шести ингибиторов, используемых для подавления эндоцитоза у животных и человека, оказывают супрессирующее действие на эндоцитоз гетеробазидиального гриба *R. solani*. Это указывает на консервативную природу отдельных механизмов эндоцитоза у исследованного гриба и, возможно, у мицелиальных грибов в целом. Предложены различные гипотезы, касающиеся принципов действия изучаемых ингибиторов на эндоцитозную активность грибов.

Ключевые слова: *эндоцитоз у мицелиальных грибов, флуоресцент AM4-64, механизмы эндоцитоза, ингибиторный анализ, цитоскелет, макропиноцитоз*, *Rhizoctonia solani*

Эндоцитоз представляет собой многофункциональный процесс, который является ключевым в поддержании физиологического статуса и гомеостаза эукариотической клетки [1]. В ходе эндоцитоза клетка собирает внеклеточный материал и связанные с мембраной различные белки, упаковывает их в везикулы различных форм и размеров, отделяет от плазмалеммы и транспортирует в цитоплазму. В цитоплазме первичные эндоцитозные везикулы сливаются между собой и в большинстве случаев с ранними эндосомами. На данном этапе начинается сортировка поглощенного с помощью эндоцитоза материала – часть его может быть возвращена в цитоплазматическую мембрану, передана в аппарат Гольджи, а также направлена на деградацию в вакуолярно-лизосомальную систему и т.д. [2, 3].

Эндоцитоз – это общий термин, описывающий целый спектр близких процессов. Единой терминологической системы, объединяющей данные процессы, пока нет, но многие исследователи подразделяют эндоцитоз на фагоцитоз и пиноцитоз (заключение в везикулу, соответственно, либо твёрдофазного материала, либо жидкости). Макропиноцитоз – формирование крупных везикул (>200 нм в диаметре). Однако именно микропиноцитоз (он же пиноцитоз, или эндоцитоз в узком смысле) чаще всего подразумевают, когда говорят про эндоцитоз (далее мы будем использовать термин эндоцитоз чаще всего именно в таком значении). Также эндоцитоз классифицируют по наличию/виду покровных белков первичной везикулы (клатрин, кавеолин), по участию динамина в отделении везикулы от плазмалеммы, по типам ранних эндосом и по другим признакам [4].

Показано участие эндоцитоза в апикальном росте гиф грибов, в обмене сигнальными молекулами при взаимодействии клеток грибов с растениями, в половом процессе и т.д. [5, 6].

Лучше всего изучен эндоцитоз у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в связи с тем, что для данного гриба получена большая коллекция мутантов по генам, отвечающим за синтез белков, участвующих в эндоцитозе. В клетках *S. cerevisiae* эндоцитоз флуоресцентного производного α-феромона и флуоресцетного маркера FM4-64 протекает в две стадии [7]. Первая стадия занимает 1–3 мин и связана

с процессом накопления меченого α-феромона и/или FM4-64 в определенных участках плазмалеммы и с формированием клатриновой оболочки вокруг впячивания плазмалеммы в данных участках. Одновременно с формированием клатриновой оболочки к сайтам формирования везикул транспортируются адапторные белки [8]. Вторая стадия занимает примерно полминуты, в течение которых происходит сборка F-актина вокруг формирующейся везикулы. Далее происходит отшнуровывание эндоцитозной везикулы с помощью ГТФазы динамина либо, в случае бездинаминовых вариантов, с помощью белков амфифизинов [9]. У почкующихся дрожжей охарактеризован также клатрин-независимый путь поглощения FM4-64 [10]. Показано участие в данном процессе белка формина Bni1p (принимает участие в сборке актиновых филаментов) и ГТФазы Rho1p, в то время как белковый комплекс Arp2/3p, отвечающий за формирование специфических пристеночных структур актина (actin patches), представляющих собой скопление коротких, часто разветвленных, филаментов актина, не участвует в процессе эндоцитоза FM4-64.

Эндоцитоз у мицелиальных грибов исследован поверхностно. Опубликованы сведения о поглощении и накоплении в вакуолях мицелиальных грибов флуоресцента FM4-64 и роли эндоцитоза в апикальном росте гиф [11, 12]. Показано накопление вдоль цитоплазматической мембраны субапикальных участков гиф у *Aspergillus nidulans* белка флотиллина, участвующего в клатрин-независимом пути у животных [13]. У другого вида аспергиллов – *A. oryzae* – обнаружены адапторные белки клатрин-зависимого эндоцитозного пути Aips, близкие по функциям к адапторному белку Abp1p *S. cerevisiae* [14]. Предполагают, что в растущих гифах *A. oryzae* могут действовать одновременно разные эндоцитозные механизмы.

Первые представления об участии цитоскелета (актина и микротрубочек) в эндоцитозе у грибов получены при изучении дрожжевой стадии диморфного базидиомицетного гриба *Ustilago maydis*, а позднее – при исследовании мицелиального гриба *A. nidulans* [15]. Актиновый цитоскелет может принимать участие во всех стадиях эндоцитоза: как в формировании и отделении первичных везикул, так и в перемещении эндосом в клетке. Большая часть экспериментальных данных о связи между актиновым цитоскелетом и эндоцитозом получена для клеток дрожжей [6]. При клатрин-зависимом эндоцитозе у *Candida albicans* динамин и быстро полимеризующийся актин способствуют отделению везикулы от плазмалеммы [8]. В эндоцитозе у *Ashbya gossypii* выявлен активный процесс полимеризации актина с участием комплекса Arp2/3. Ингибирование полимеризации актина латрункулином А влияет на динамику эндоцитоза у грибов [16, 17]. У ряда изученных мицелиальных грибов (*A. gossypii, A. nidulans, U. maydis*) в перемещении везикул и эндосом на существенные расстояния принимают участие микротрубочки и моторные белки (динеин и кинезин). За перемещение на близкие расстояния нередко отвечают актиновые филаменты и миозин. У почкующихся дрожжей любую транспортную функцию выполняет актин [18].

В настоящей работе мы исследовали воздействие на динамику эндоцитоза у фитопатогенного гетеробазидиального гриба *Rhizoctonia solani* различных ингибиторов, действующих как на сборку актинового/тубулинового цитоскелетов, так и на эндоцитоз. Оценку влияния ингибиторов проводили с помощью микроскопического анализа поглощения клетками мицелия флуоресцентного маркера эндоцитоза AM4-64.

Материалы и методы

Штамм гриба и культивирование. Фитопатогенный гриб *R. solani,* штамм 3.3 (коллекция кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова) был выделен из клубней картофеля в 2013 г. Он хорошо растет на стандартной питательной среде Чапека, мицелий имеет высокую скорость роста (5 мм/сут при оптимальной температуре роста 22°C) и состоит из крупных клеток 6–8 мкм шириной и более 100 мкм длиной, что делает данный гриб удобным объектом для флуоресцентно-микроскопического анализа.

Флуоресцентное мечение мицелия R. solani проводили маркером эндоцитоза стириловым флуоресцентом AM4-64 (Biotium, США), он является аналогом известного флуоресцентного зонда от Molecular Probes (Thermo Fisher Scientific) FM4-64FX. Отличается AM4-64 (и FM4-64FX) от классического FM4-64, используемого во многих работах, наличием аминогруппы в гидрофильном участке молекулы. Такая модификация приводит к совместимости с альдегидной фиксацией, в остальном AM4-64 аналогичен классическому FM4-64. При обработке клеток флуоресцент прочно встраивается в липидный бислой плазмалеммы за счёт своих липофильных участков. Флуоресценция метки значительно выше в связанном с мембранами состоянии, нежели в свободном. Низкая специфичность встраивания AM4-64 в мембраны и прочное удерживание в них позволяют анализировать общую динамику эндоцитоза – от начальных этапов поглощения до встраивания AM4-64 вместе с поглощёнными участками мембран в вакуолярную систему клетки.

Мицелий, выращенный на агаризованной среде Чапека (4 сут роста), перед окрашиванием помещали на лёд на 10 мин. Тонкие агаровые блоки с мицелием вырезали из зоны роста колонии (из молодых участков колонии) и помещали на предметное стекло. На мицелий в блоке агара наносили рабочий раствор AM4-64 в концентрации 12 мкМ в 1 мл жидкой питательной среды Чапека и инкубировали мицелий на льду 8 мин в темноте [12]. Препараты трижды отмывали ледяной питательной средой.

Микроскопировали препараты с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Axioskop 40 FL (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 100х с использованием фильтра 43HE сразу (0–15 мин) или через 15 минут (15–30 мин), в течение 15 мин препарат хранили при 25°C. Фотографировали с помощью камеры AxioCam MRc (Carl Zeiss Micro-Imaging GmbH, Германия) не менее 50 клеток для каждого препарата.

Контроль пермеабилизации цитоплазматической мембраны. Повреждение плазмалеммы клеток *R. solani* контролировали йодидом пропидия (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл. Препарат вносили в охлаждённую питательную среду, инубировали 8 мин на холоду и микроскопировали с использованием фильтра 43HE. В пермеабилизированных клетках ядра дают флуоресцентный сигнал в оранжевом спектре.

Ингибиторы. Концентрации и время инкубации для ингибиторов подбирали опытным путём. Использовали следующие ингибиторы (в скобках приведены выбранные условия постановки экспериментов): 1) натамицин (концентрация 80 мкМ, время инкубации 30 мин) – необратимо связывается с эргостерином, влияет на кавеолин/RAFT-зависимый эндоцитоз (здесь используем термин “липидно-доменный эндоцитоз”); 2) диназор (Sigma, США; концентрация 100 мкМ, время инкубации 30 мин) – ингибитор разных видов динамина, который участвует в отщеплении эндоцитозной везикулы от цитоплазматической мембраны; 3) питстоп 2 (Abcam, США; концентрация 7,5 мкМ, время инкубации 15 мин) – препятствует закреплению клатрина на поверхности первичной везикулы; 4) нокодазол (Santa Cruz Biotechnology, США, концентрации 10 мкг/мл, время инкубации 30 мин) – связывается с тубулином, препятствуя полимеризации микротрубочек; 5) монодансилкадаверин (Sigma, США; концентрация 300 мкМ, время инкубации 60 мин) – действует на клатринзависимый путь эндоцитоза у животных; 6) латрункулин А (Santa Cruz Biotechnology, США; концентрации 0,6 и 2 мкМ, время инкубации 20 мин) – ингибитор сборки актиновых филаментов. Проводили преинкубацию агаровых блоков с мицелием *R. solani* в растворе питательной среды с ингибитором (опыт) или без него (контроль), отмывали дважды от ингибиторов и окрашивали флуоресцентом AM4-64 по методу, описанному выше.

Действие каждого потенциального ингибитора проверяли в трёх независимых экспериментах. В полученных с помощью программы AxioVision (Carl Zeiss, Германия) фотографиях оценивали и классифицировали фенотипы 50–150 клеток мицелия гриба для каждого варианта наблюдений (опыт и контроль в интервале 0–15 мин, опыт и контроль 15–30 мин) для каждого из шести ингибиторов. Для каждого ингибитора в трёх независимых экспериментах анализировали одинаковое количество клеток во всех вариантах наблюдений (стандартное требование для статистического критерия хи-квадрат).

Диаграммы распределения наблюдений разных стадий эндоцитоза (ввели четыре ранга от 0 до 3, соответствующие разным клеточным фенотипам и, соответственно, стадиям эндоцитоза, см. Результаты) строили в программе Microsoft Excel. Статистическую обработку проводили в программе Statistica 6 (StatSoft). Достоверность различий в экспериментах проверяли с использованием критерия хи-квадрат Пирсона. Различие между двумя распределениями считали статистически достоверным при $p<0,01$.

Результаты и обсуждение

Наблюдение за перемещением флуоресцентного зонда AM4-64 в клетках мицелия *R. solani* в течение 40 мин от цитоплазматической мембраны к мембранам везикул, эндосом и вакуолей позволило нам разделить общий ход эндоцитоза *R. solani* на четыре дискретные и последовательные стадии (рис. 1). Стадия 0 – сигнал локализован только в цитоплазматической мембране. Стадия 1 – флуоресцентно окрашенные пристеночные везикулы предположительно – первичные эндоцитозные везикулы; возможно, флуоресцируют только макропиноцитозные везикулы (макропиносомы), а сигнал от микропиноцитозных везикул слишком слабый и сливается с сигналом от плазмалеммы. Стадия 2 – сигнал локализован в более крупных, чем на стадии 1, эндомембранных структурах, распределенных как пристеночно, так и в цитоплазме; предположительно на данной стадии маркированы везикулы, эндосомы и маленькие вакуоли, цитоплазматическая мембрана уже не флуоресцирует или флуоресцирует слабо. Стадия 3 – окрашены вакуоли разного размера в цитоплазме, цитоплазматическая мембрана практически не окрашена.

Конечно, такая дискретизация непрерывного процесса, которым является эндоцитоз, достаточно субъективна, но позволяет количественно оценить и статистически обработать характер и степень воздействия ингибиторов на эндоцитоз *R. solani*. На рис. 2 представлена динамика эндоцитоза у *R. solani* (в двух временных интервалах 0–15 мин и 15–30 мин) с преинкубацией препаратов в растворе с ингибитором (опытные наблюдения, тёмные столбики диаграмм) или в питательной среде (контрольные наблюдения, светлые столбики).

На рис. 2 приведены диаграммы с использованием усреднённых между тремя независимыми биологическими экспериментами данных. Такой способ представления результатов может показаться не совсем корректным, поскольку эндоцитоз – сложный процесс со множеством путей реализации, а такие биологические процессы всегда дают большие дисперсии при попытке их количественно оценить и усреднить. Действительно, разброс величины стандартного отклонения (планки погреш-

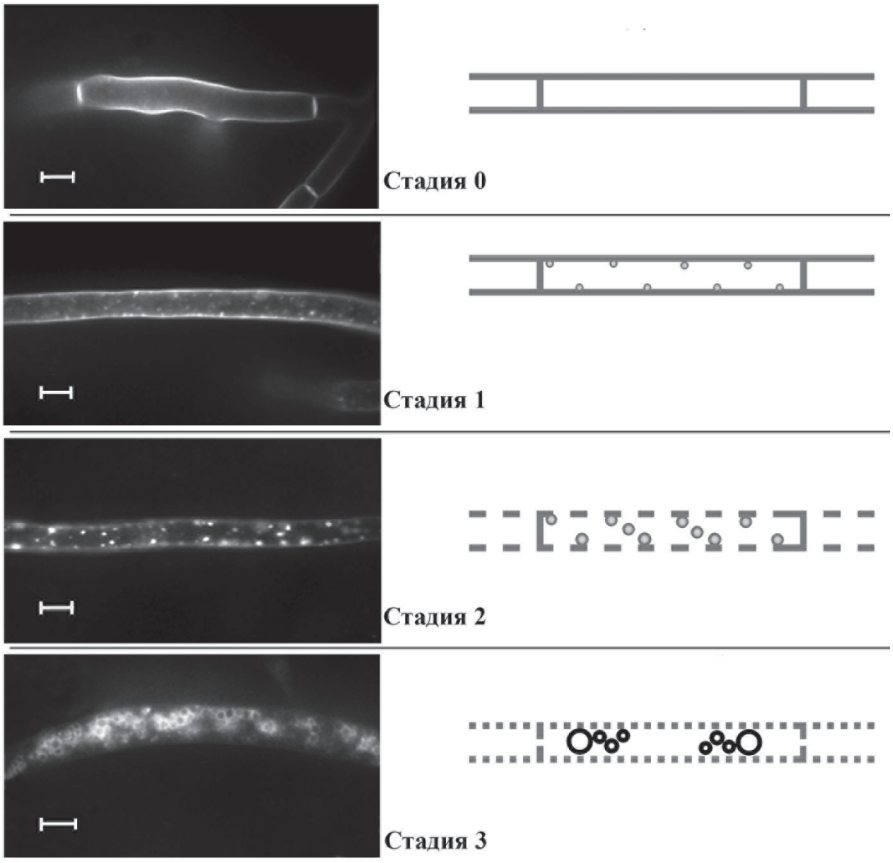

Рис. 1. Иллюстрации распределения флуоресцентного сигнала AM4-64 в клетках *R. solani*: фотографии (слева) и соответствующие им схемы (справа), демонстрирующие принцип разбиения эндоцитоза в клетках гриба на четыре последовательные дискретные стадий (от стадии 0 до стадии 3). Масштабные отрезки соответствуют 10 мкм. Объяснения в тексте

ностей на рис. 2) в ряде опытов достаточно значителен. Однако усредненные диаграммы оказались наиболее показательными в демонстрации тенденций в действии разных ингибиторов на динамику эндоцитоза *R. solani,* поэтому вместо приведения в качестве иллюстрации распределений одного из биологических повторов, наиболее отражающего общую тенденцию, мы использовали усреднённые данные.

По характеру воздействия на эндоцитоз *R. solani* мы разделили используемые ингибиторы на четыре группы. Ингибиторы первой группы – натамицин, диназор, питстоп 2 – значительно подавляют эндоцитоз в клетках изучаемого гриба (рис. 2, *A*–*B*). Для данной группы ингибиторов характерно слабое отличие между опытными наблюдениями в первые 15 мин и в интервале 15–30 мин. Другими словами, в опытных препаратах AM4-64 в начале наблюдений включается в цитоплазматическую мембрану (стадия 0), формируется обычное для ранней стадии 1 количество первичных везикул, но дальнейшее отшнуровывание везикул и передача метки в эндосомы и вакуоли сильно замедляются (но не супрессируются полностью). Также не происходит формирование новых первичных везикул сверх тех, которые образовались в самом начале наблюдения. В итоге эндоцитоз почти останавливается на стадиях 0 и 1 с доминированием стадии 0.

Натамицин (рис. 2, *A*) – полиеновый противогрибной антибиотик. Как и другие полиеновые антибиотики, нистатин и филиппин, он необратимо связывается со стеринами цитоплазматической мембраны, подавляя кавеолин/липидно-доменный эндоцитоз [4, 19]. Данная группа антибиотиков вызывает пермеабилизацию клеток грибов, на чём и основано их фунгицидное действие, поэтому для ингибирования эндоцитоза используют их низкие концентрации. Мы опытным путём подобрали рабочую концентрацию натамицина 80 мкМ. Превышение данной концентрации вызывает появление пермеабилизированных клеток в препаратах *R. solani* (пермеабилизацию можно выявить и по появлению стадии 3 сразу после начала наблюдений, и по тесту с йодидом пропидия). Во всех трёх независимых экспериментах и в усредненных данных распределения опытных и контрольных наблюдений в интервале 15–30 мин достоверно различаются. Тогда как статистических различий между опытом и контролем в первые 15 мин, и опытами 0–15 мин и 15–30 мин в усреднённых данных нет.

Диназор, ингибитор динамина, в концентрации 100 мкМ оказывает, в целом, схожее с натамицином действие на эндоцитоз *R. solani* (рис. 2, *Б*). Динамин – белок, участвующий в отделении первичной эндоцитарной везикулы от плазмалеммы

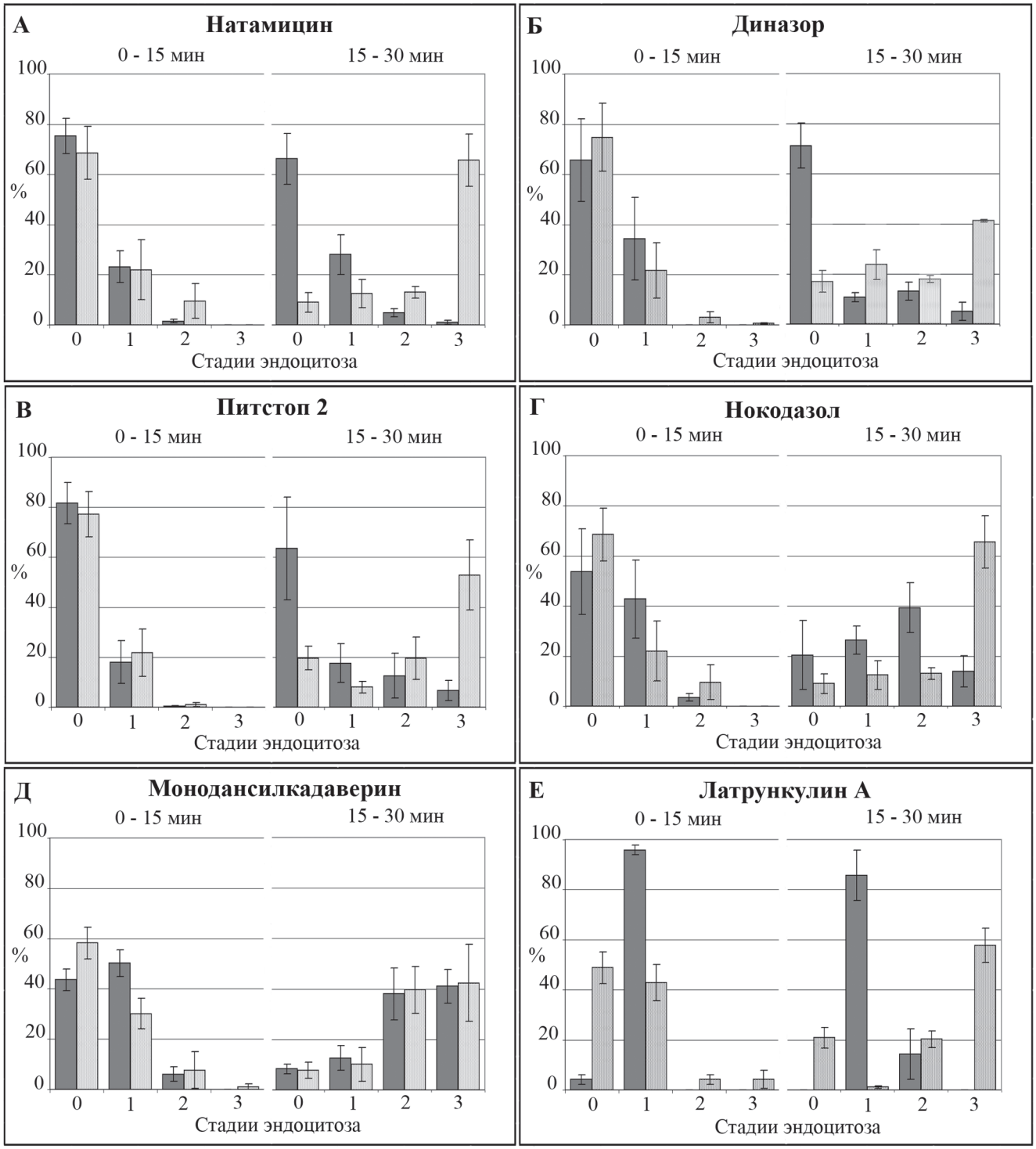

Рис. 2. Диаграммы, отражающие действие шести разных ингибиторов на эндоцитоз *R. solani*. Тёмные столбики диаграмм соответствуют частотам встречаемости (в %) в препаратах клеток, соответствующих каждой из четырёх стадий эндоцитоза в опытных наблюдениях (мицелий обработан соответствующим ингибитором). Светлые столбики – то же для контрольных наблюдений. Каждая диаграмма состоит из двух частей – левая часть отражает распределения наблюдений во временном интервале 0–15 мин; правая – 15–30 мин. Диаграммы построены с использованием усреднённых данных, полученных в трёх независимых экспериментах. Планки погрешностей соответствуют величине стандартного отклонения

в некоторых типах эндоцитоза [9]. Согласно обзорной работе [20], у животных динамин так или иначе принимает участие в шести из десяти типов эндоцитоза. Как и в случае натамицина, во всех экспериментах распределения опытных и контрольных наблюдений в интервале 15–30 мин статистически различны. Но в отличие от натамицина у диназора опыты 0–15 мин и 15–30 мин согласно критерию хи-квадрата также имеют разные распределения. Последнее может быть связано с несколько меньшим ингибиторным эффектом диназора относительно натамицина: на диаграммах (рис. 2, *А* и *Б*) видно, что стадии 2 и 3 в случае диназора более выражены, чем у натамицина – часть

сформированных первичных везикул (стадия 1) все же транспортируются внутрь клетки.

Питстоп 2 (рис. 2, *B*) – современный высокоэффективный ингибитор, разработанный медицинскими исследователями, в том числе для клинического применения. Питстоп 2 взаимодействует с одним из сайтов связывания N-концевого домена тяжёлой цепи клатрина и препятствует прикреплению клатрина к адапторным белкам, например, к амфифизину [21]. Таким образом, питстоп 2 является ингибитором клатрин-зависимых путей эндоцитоза. Производитель (Abcam) указывает, что превышение определенной концентрации ингибитора приводит к множественным побочным действиям в клетке животных. Мы выяснили, что рекомендуемые производителем рабочие концентрации 20–25 мкМ для клеток животных являются слишком высокими для *R. solani*. При таких концентрациях повышается доля повреждённых грибных клеток. Максимальная концентрация питстопа 2, при которой клетки гриба остаются интактными, – 7,5 мкМ. Абсолютно во всех экспериментах с питстопом 2 нет статистической разницы между опытными и контрольными наблюдениями в первые 15 мин – ингибитор совершенно не действует на раннее формирование первичных везикул. Опыты 0–15 и 15–30 мин, а также опыты и контроли 15–30 мин значимо статистически различаются. Последнее вместе с внешним видом диаграмм указывают на то, что питстоп 2 по характеру воздействия в своей группе ингибиторов ближе к диназору, чем к натамицину.

Если бы действие натамицина, диназора и питстопа 2 на эндоцитоз *R. solani* было специфическим, т.е. они влияли бы только на свои канонические мишени (эргостерин, динамин и клатрин соответственно), то натамицин, вероятнее всего, препятствовал бы формированию первичных везикул (диназор и питстоп 2, возможно, не влияют на сам процесс впячивания везикулы). Иначе говоря, с самого начала наблюдений стадия 1 была бы менее представлена хотя бы в случае одного из двух обсуждаемых ингибиторов. Но наши результаты демонстрируют схожесть контролей и опытов в интервале 0–15 мин, а у питстопа 2 они еще и статистически одинаковы с высоким уровнем достоверности. Кроме того, если действие на эндоцитоз диназора и питстопа 2 могут значительно пересекаться (динамин задействован в клатрин-зависимом эндоцитозе, но динамин используют и некоторые не клатриновые типы эндоцитоза), то натамицин и питстоп 2/диназор по определению ингибируют совершенно разные пути эндоцитоза. Отсюда следует, что каждый из названных ингибиторов теоретически должен блокировать лишь часть эндоцитозной активности гриба. При нашем методе количественной оценки динамики эндоцитоза с использованием ранжирования фенотипов целых клеток, скорее всего, выключение отдельных путей эндоцитоза на фоне работающих других не привело бы к такому значительному снижению встречаемости стадий 2 и 3.

Можно предложить несколько гипотез, объясняющих механизмы действия натамицина, диназора и питстопа 2. Первая гипотеза – изучаемые ингибиторы оказывают неспецифическое действие на клетки *R. solani*. Неспецифическое воздействие ингибиторов может быть множественным и даже возможно влияние в целом, например, на катаболизм клетки, но всё же первым кандидатом на роль неспецифической мишени является актин. Широкое участие актина в эндоцитозных процессах показано во многих научных работах: в обзорной публикации Г.Дж. Доэрти и Х.Т. МакМахон [20] для шести путей эндоцитоза из десяти у животных отмечено участие актина; актиновые филаменты участвуют в формировании эндоцитарных везикул и в их транспорте к ранним эндосомам у дрожжей [22]; цитохалазин Д (ингибитор сборки F-актина) подавляет эндоцитоз у ксилотрофного гриба *Lentinula edodes* [12] и т.д. Также известно, что актин принимает непосредственное участие в образовании макропиносом [20], а мы выше указывали, что, возможно, на стадии 1 окрашены преимущественно именно макропиносомы.

Для диназора и полиеновых антибиотиков показано их влияние на актин клетки [4, 19]. Например, в случае полиеновых антибиотиков предполагают, что они нарушают связь между актином и плазмалеммой [19]. Возможно, поэтому натамицин полностью не препятствует формированию первичных везикул, но блокирует их транспорт к эндосомам.

Для питстопа 2 у нас нет информации относительно его воздействия на актин, однако даже для данного ингибитора современного поколения установлены различные побочные эффекты на живую клетку, в том числе влияние на клатрин-независимый эндоцитоз, на вязкость мембран и т.д. [4, 23].

Вторая гипотеза, объясняющая значительное и схожее влияние ингибиторов первой группы на эндоцитоз *R. solani*, – реакция фитопатогенного гриба на ингибиторы в виде снижения активности эндоцитоза, что может являться защитным механизмом против цитотоксических веществ, выделяемых растением-хозяином или другими микроорганизмами. Возможно, гриб предотвращает вход в свои клетки молекул извне, “почувствовав” в окружающей среде физиологически активные вещества, влияющие на грибной метаболизм. Второй гипотезе противоречат наши неопубликованные данные, полученные при инкубации культуры *R. solani* в присутствии антибиотиков – бензилпенициллина и гризеофульвина. Данные антибиотики не ингибировали эндоцитоз, хотя подавляли накопление биомассы мицелия *R. solani*. Тем не менее, полностью отбрасывать обсуждаемую гипотезу не стоит.

Ко второй группе ингибиторов эндоцитоза у *R. solani* мы отнесли нокодазол (рис. 2, *Г*). Во всех

биологических повторах распределения опытов и контролей 15–30 мин, а также опытов 0–15 мин и опытов 15–30 мин, статистически различаются. Из диаграммы на рис. 2, *Г* видно, что в начале наблюдений нокодазол, как и ингибиторы первой группы, мало влияет на эндоцитоз, но в интервале 15–30 мин он начинает оказывать ингибиторное воздействие. Однако, если натамицин, диназор и питстоп 2 препятствуют переходу стадий 0 и 1 в стадии 2 и 3, то нокодазол замедляет эндоцитоз *R. solani* на этапе перехода стадии 2 в стадию 3. Другими словами, нокодазол частично подавляет транспорт эндосом к вакуолям, либо слияние эндосом, макропиносом или маленьких вакуолей в более крупные структуры, но не влияет на формирование первичных везикул и их транспорт к эндосомам.

Нокодазол является эффективным обратимым деполимеризатором микротрубочек. Полученный нами результат согласуется с данными, показанными на клетках животных и даже для отдельных других мицелиальных грибов – принято считать, что, как минимум, ранние стадии эндоцитоза не зависят от тубулинового цитоскелета [12]. Известно, что, по крайней мере, в верхушечных клетках грибов ранние эндосомы активно двунаправленно перемещаются с помощью микротрубочек [3, 24]. Более крупные эндомембранные структуры (поздние эндосомы, вакуоли, макропиносомы и т.д.), скорее всего, особенно на дальние расстояния, транспортируются с участием микротрубочкового цитоскелета [18]. Таким образом, нарушение сборки микротрубочек приводит к замедлению внутриклеточного транспорта эндосом и вакуолей.

В третью группу по типу действия на эндоцитоз *R. solani* попал монодансилкадаверин. Данное вещество используют как ингибитор клатрин-зависимого эндоцитоза, однако известны проявления его активности в отношении макропиноцитоза, фагоцитоза и актина [4, 19]. В концентрациях ниже 100 мкМ монодансилкадаверин применяют для относительно специфического флуоресцентного мечения кислых и аутофагических вакуолей, а также аутофагосом [25]. На рис. 2, *Д* видно, что характер распределения в диаграммах как в интервале 0–15 мин, так и 15–30 мин между опытными и контрольными наблюдениями схожи. Статистически нет различий в интервале 0–15 мин в одном из биологических экспериментов, а в интервале 15–30 мин – в одном эксперименте и в усреднённых данных. Но даже в опытах со статистическим различием распределения в целом похожи. Отсюда можно сделать вывод о том, что монодансилкадаверин не оказывает выраженного воздействия на эндоцитоз *R. solani*. Поскольку мы использовали в работе максимальную концентрацию испытуемого вещества (300 мкМ), приводимую в научной литературе, и не обнаружили даже слабого влияния монодансилкадаверина на динамику поглощения грибом AM4-64, то следует полагать, что эндоцитоз у грибов не чувствителен к монодансилкадаверину.

Латрункулин А, ингибитор сборки актиновых филаментов, отнесенный нами к последней четвёртой группе по типу воздействия, введён в работу для установления непосредственной зависимости общего грибного эндоцитоза от работы актинового цитоскелета. Однако несмотря на то, что латрункулин А другие исследователи применяли в работе с грибами [16, 17], мы обнаружили, что действие данного вещества на клетки *R. solani* носит, скорее, специфический повреждающий характер. При обработке мицелия *R. solani* латрункулином А в концентрациях ниже 1 мкМ воздействие его на гриб не имеет чётких закономерностей – так, при работе с латрункулином в концентрации 0,6 мкМ мы получили неоднозначные результаты в разных биологических экспериментах. Концентрации выше 1 мкМ приводят к практически полному доминированию стадии 1 в обоих временных интервалах (рис 2, *Е*, диаграммы построены для 2 мкМ концентрации латрункулина). Иными словами, обработка 2 мкМ латрункулином мицелия *R. solani* вызывает быструю интернализацию значительной поверхности плазмалеммы – цитоплазматическая мембрана большинства клеток формирует множество везикул, но дальнейшее их развитие и транспорт оказываются заблокированы. Причём речь идёт не просто об ингибировании эндоцитоза при переходе от 1 ко 2 стадии, здесь уже в интервале 0–15 мин нет стадии 0 и доминирует стадия 1, а значит, происходит своеобразное специфическое нарушение целостности клетки и цитоплазматической мембраны. Анализ обработанных латрункулином клеток с помощью электронной микроскопии показал (данные не представлены), что такие клетки теряют свою обычную форму, а клеточная стенка оказывается повреждённой во многих местах. Повреждения клеточной стенки, конечно, вряд ли обусловлены прямым действием латрункулина А. Возможно, распад на мономеры филаментов актинового кортекса, вызывает резкое изменение внутреннего давления клетки на стенку. Последнее может снижать прочность клеточной стенки в определенных участках, и в процессе инфильтрации смолой при приготовлении ТЭМ-препаратов данные участки повреждаются. Возможно, именно распад пристеночных структур актина и филаментов актина приводит к наблюдаемой нами массированной интернализации плазмалеммы. Принято считать, что макропиносомы возникают за счёт образования выростов плазмалеммы при участии актиновых филаментов. Наши результаты располагают к выдвижению интересной гипотезы – может быть, некоторые типы макропиносом возникают не за счёт цитоскелетной поддержки актином, а, наоборот, за счёт локальной разборки актинового кортекса, что приводит при определённых условиях к ослаблению натяжения участка плазмалеммы и её локальной интернализации.

На основании полученных нами результатов четыре из шести ингибиторов, используемых для

подавления эндоцитоза у животных и человека, оказывают супрессирующее действие на эндоцитоз гетеробазидиального гриба *R. solani*, что указывает на консервативную природу отдельных механизмов эндоцитоза у исследованного гриба и, возможно, у мицелиальных грибов в целом. В пользу такой консервативности говорит и то, что деполимеризация микротрубочкового цитоскелета у *R. solani* замедляет только поздние стадии, не влияя на ранние стадии эндоцитоза. Однако характер влияния на динамику включения внутрь клеток метки AM4-64 у таких ингибиторов как натамицин, диназор и питстоп 2 чётко указывает на неоднозначность интерпретации их влияния на грибной эндоцитоз.

Необходимо дальнейшее изучение грибного эндоцитоза с расширением методических подходов: подключением методов молекулярно-генетического мечения эндоцитозных структур, более детального морфометрического анализа и т.п. Кроме фундаментального значения исследования особенностей эндоцитоза у грибов могут иметь практическое применение, например, при создании специфических фунгицидов, предотвращающих грибные поражения древесных материалов и сельскохозяйственных культур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №16-04-00814).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Goode B.L., Eskin J.A., Wendland B.* Actin and endocytosis in budding yeast // Genetics. 2015. Vol. 199. N 2. P. 315–358.

2. *Tokarev A.A., Alfonso A., Segev N.* Overview of intracellular compartments and trafficking pathways // Trafficking inside cells: Pathways, mechanisms and regulation / Ed. N. Segev. N.Y.: Springer, 2009. P. 3–14.

3. *Penalva M.A.* Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward // Curr. Opin. Microbiol. 2010. Vol. 13. N 6. P. 684–692.

4. *Dutta D., Donaldson J.G.* Search for inhibitors of endocytosis // Cell Logist. 2012. Vol. 2. N 4. P. 203–208.

5. *Fuchs U., Steinberg G.* Endocytosis in the plant-pathogenic fungus *Ustilago maydis* // Protoplasma. 2005. Vol. 226. N 1–2. P. 75–80.

6. *Toshima J.Y.*, *Toshima J., Kaksonen M., Martin A.C., King D.S., Drubin D.G.* Spatial dynamics of receptor-mediated endocytic trafficking in budding yeast revealed by using fluorescent alpha-factor derivatives // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. Vol. 103. N 15. P. 5793–5798.

7. *Weinberg J., Drubin D.G.* Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast // Trends Cell. Biol. 2012. Vol. 22. N 1. P. 1–13.

8. *Epp E.*, *Nazarova E., Regan H., Douglas L.M., Konopka J.B., Vogel J., Whiteway M.* Clathrin- and Arp2/3-independent endocytosis in the fungal pathogen *Candida albicans* // MBio. 2013. Vol. 4. N 5. e00476-13.

9. *Wang D., Sletto J., Tenay B., Kim K.* Yeast dynamin implicated in endocytic scission and the disassembly of endocytic components // Commun. Integr. Biol. 2011. Vol. 4. N 2. P. 178–181.

10. *Prosser D.C., Drivas T.G., Maldonado-Baez L., Wendland B.* Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin // J. Cell Biol. 2011. Vol. 195. N 4. P. 657–671.

11. *Fischer-Parton S.*, *Parton R.M., Hickey P.C., Dijksterhuis J., Atkinson H.A., Read N.D.* Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae // J. Microsc. 2000. Vol. 198. N 3. P. 246–259.

12. *Lee M.T.*, *Szeto C.Y., Ng T.P., Kwan H.S.* Endocytosis in the shiitake mushroom *Lentinula edodes* and involvement of GTPase LeRAB7 // Eukaryot. Cell. 2007. Vol. 6. N 12. P. 2406–2418.

13. *Takeshita N., Diallinas G., Fischer R.* The role of flotillin FloA and stomatin StoA in the maintenance of apical sterolrich membrane domains and polarity in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* // Mol. Microbiol. 2012. Vol. 83. N 6. P. 1136–1152.

14. *Masuo K., Higuchi Y., Kikuma T., Arioka M., Kitamoto K.* Functional analysis of Abp1p-interacting proteins involved in endocytosis of the MCC component in *Aspergillus oryzae* // Fungal Genet. Biol. 2013. Vol. 56. P. 125–134.

15. *Straube A.*, *Brill M., Oakey B.R., Horio T., Steinberg G.* Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis* // Mol. Biol. Cell. 2003. Vol. 14. N 2. P. 642–657.

16. *Walther A., Wendland J.* Apical localization of actin patches and vacuolar dynamics in *Ashbya gossypii* depend on the WASP homolog Wal1p // J. Cell Sci. 2004. Vol. 117. N 21. P. 4947–4958.

17. *Aghamohammadzadeh S., Ayscough K.R.* Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis // Nat. Cell Biol. 2009. Vol. 11. N 8. P. 1039–1042.

18. *Schuster M.*, *Lipowsky R., Assmann M.-A., Lenz P., Steinberg G.* Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. Vol. 108. N 9. P. 3618–3623.

19. *Ivanov A.I.* Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? // Exocytosis and endocytosis. Methods Mol. Biol. Vol. 440. / Ed. A.I. Ivanov. N.Y.: Humana press, 2008. P. 15–33.

20. *Doherty G.J., McMahon H.T.* Mechanisms of endocytosis // Annu. Rev. Biochem. 2009. Vol. 78. P. 857–902.

21. *Willox A.K., Sahraoui Y.M., Royle S.J.* Non-specificity of Pitstop 2 in clathrin-mediated endocytosis // Biol. Open. 2014. Vol. 3. N 5. P. 326–331.

22. *Girao H., Geli M.I., Idrissi F.Z.* Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals // FEBS Lett. 2008. Vol. 582. N 14. P. 2112–2119.

23. *von Kleist L., Stahlschmidt W., Bulut H.* et al. Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition // Cell. 2011. Vol. 146. N 3. P. 471–484.

24. *Steinberg G.* Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi // Curr. Opin. Microbiol. 2014. Vol. 20. N 100. P. 10–18.

25. *Niemann A., Baltes J., Els sser H.P.* Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine // J. Histochem. Cytochem. 2001. Vol. 49. N 2. P. 177–185.

Поступила в редакцию
29.03.2017
Принята в печать
15.06.2017

MYCOLOGY AND ALGOLOGY

ENDOCYTOSIS AND ITS INHIBITORS IN BASIDIOMYCETOUS FUNGUS RHIZOCTONIA SOLANI

O.V. Kamzolkina[1,*], ***M.A. Kiselica***[1], ***O.A. Kudryavtseva***[1], ***O.V. Shtaer***[1], ***I.S. Mazheika***[1,2]

[1]*Department of Mycology and Algology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*
[2]*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, ul. Gubkina 3, Moscow, 119333, Russia*
[*]*e-mail: o-kamzolkina@yandex.ru*

Endocytosis is a complex process of absorption from the external environment and further distribution within the cell of soluble substances, macromolecules, microparticles, and etc. which occurs with the participation of vesicles formed by the cytoplasmic membrane. Endocytosis in the cells of animals and humans is actively and successfully explored. Thus, the classification of this process in animals, based only on the characteristics of the formation of primary vesicles, includes up to ten different ways of endocytosis. Modern knowledge of endocytosis in mycelial fungi is not so extensive, so its study in this group of organisms is an actual and promising direction in fundamental and applied mycology. In the present work, we investigated the effect of six different inhibitors, acting both on the assembly of actin/tubulin cytoskeletons and on the formation of different types of endocytosis, on the dynamics of endocytosis in the phytopathogenic heterobasidial fungus *Rhizoctonia solani* The effect of inhibitors was evaluated by microscopic analysis of the mycelial cell absorption of a fluorescent marker of endocytosis AM4-64. As a result of the study, four types of inhibitor effects on *R. solani* endocytosis were revealed: from complete absence of action to severe suppression of different stages of fungal endocytosis. Four of the six inhibitors, used to inhibit endocytosis in animals and humans, have a suppressing effect on the endocytosis of the heterobasidial fungus *R. solani*, which indicates the conservative nature of individual mechanisms of endocytosis in the examined fungus and, possibly, in mycelial fungi as a whole. Various hypotheses on the principles of the action of the studied inhibitors on the endocytosis activity of fungi are proposed.

Keywords: *endocytosis in filamentous fungi, AM4-64 fluorescent, mechanisms of endocytosis, inhibitory analysis, cytoskeleton, macropinocytosis, Rhizoctonia solani*

Сведения об авторах

Камзолкина Ольга Владимировна – докт. биол. наук, проф. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: o-kamzolkina@yandex.ru

Киселица Марина Алексеевна – студентка кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: kiselicam@mail.ru

Кудрявцева Ольга Александровна – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: for-ol-ga@yandex.ru

Штаер Оксана Васильевна – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: sht-oks@yandex.ru

Мажейка Игорь Стасисович – канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: mycol@yandex.ru