

# Ранний эндоцитоз и зонтичная модель клеточной организации у мицелиальных грибов

Докладчик И.С. Мажейка

Курсановские  
чтения

Москва, 2020



## Часть I. Ранний эндоцитоз, общая информация

Три основных варианта формирования первичной эндоцитозной везикулы (трубки)

**«Обычная»  
везикула**

Образуется путем впячивания внутрь клетки участка плазмалеммы

Размер варьирует от десятков нанометров до микрометров. Крупная везикула может быть со вторичными инвагинациями

**Трубчатая  
инвагинация**

Базовый вариант («обычная» везикула – частный случай).  
Формируется в том случае, если белки, отвечающие за отшнуровку отстают от белков, сжимающих и удлиняющих шейку везикулы

**Классическая  
макропиносома**

Образуется не за счет инвагинации плазмалеммы, а за счет формирования филоподий – актин-зависимых выпячиваний мембраны наружу клетки

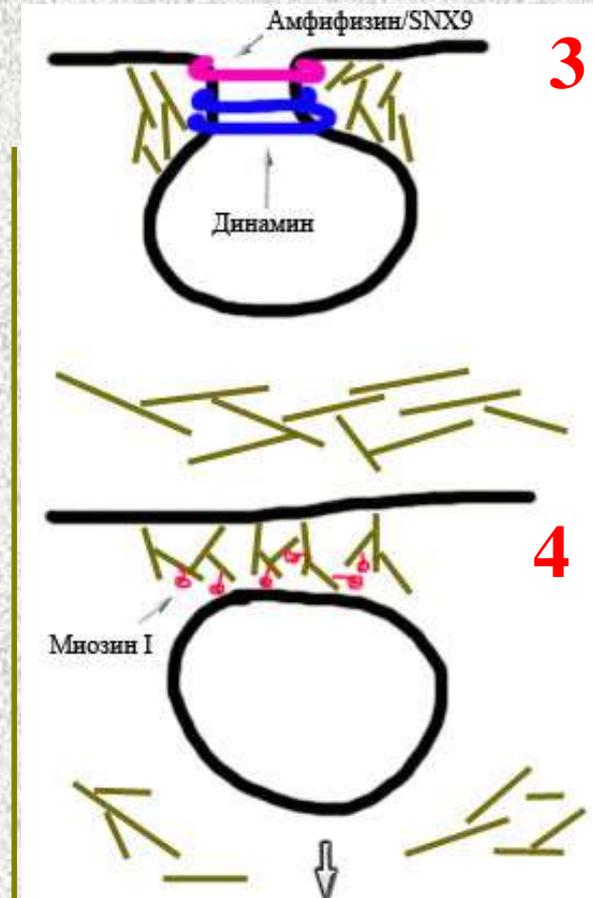
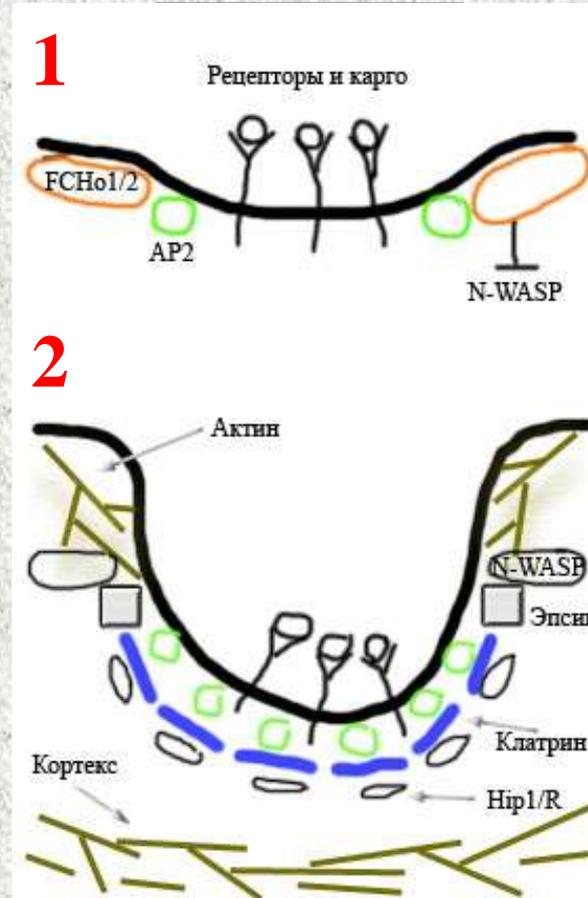
# Часть I. Ранний эндоцитоз, общая информация

Три основных варианта формирования первичной эндоцитозной везикулы (трубки)

«Обычная»  
везикула

Образуется путем  
впячивания внутрь  
клетки участка  
плазмалеммы

Размер варьирует от  
десятков нанометров  
до микрометров.  
Крупная везикула  
может быть со  
вторичными  
инвагинациями



Стадии формирования и отшнуровки первичной везикулы на примере СМЕ (в животных клетках)

# Часть I. Ранний эндоцитоз, общая информация

Три основных варианта формирования первичной эндоцитозной везикулы (трубки)

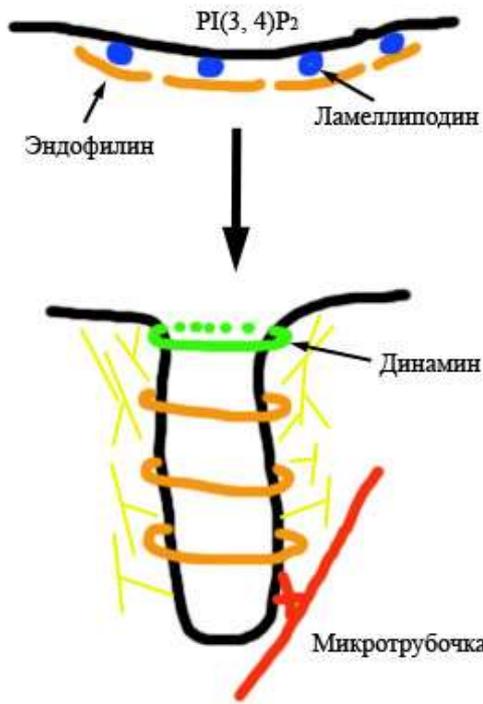


ФЕМЕ-эндоцитоз

← Норма

Трубчатая инвагинация

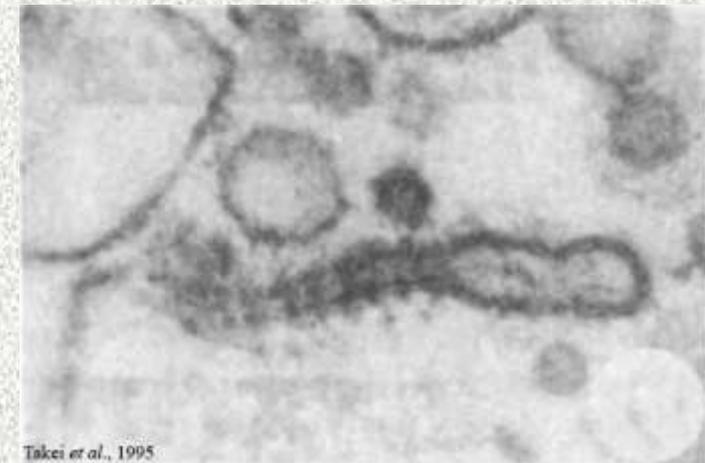
→ Нарушение



Базовый вариант («обычная» везикула – частный случай).  
Формируется в том случае, если белки, отвечающие за отшнуровку отстают от белков, сжимающих и удлиняющих шейку везикулы



Нарушение связи актина с динамином у почкующихся дрожжей



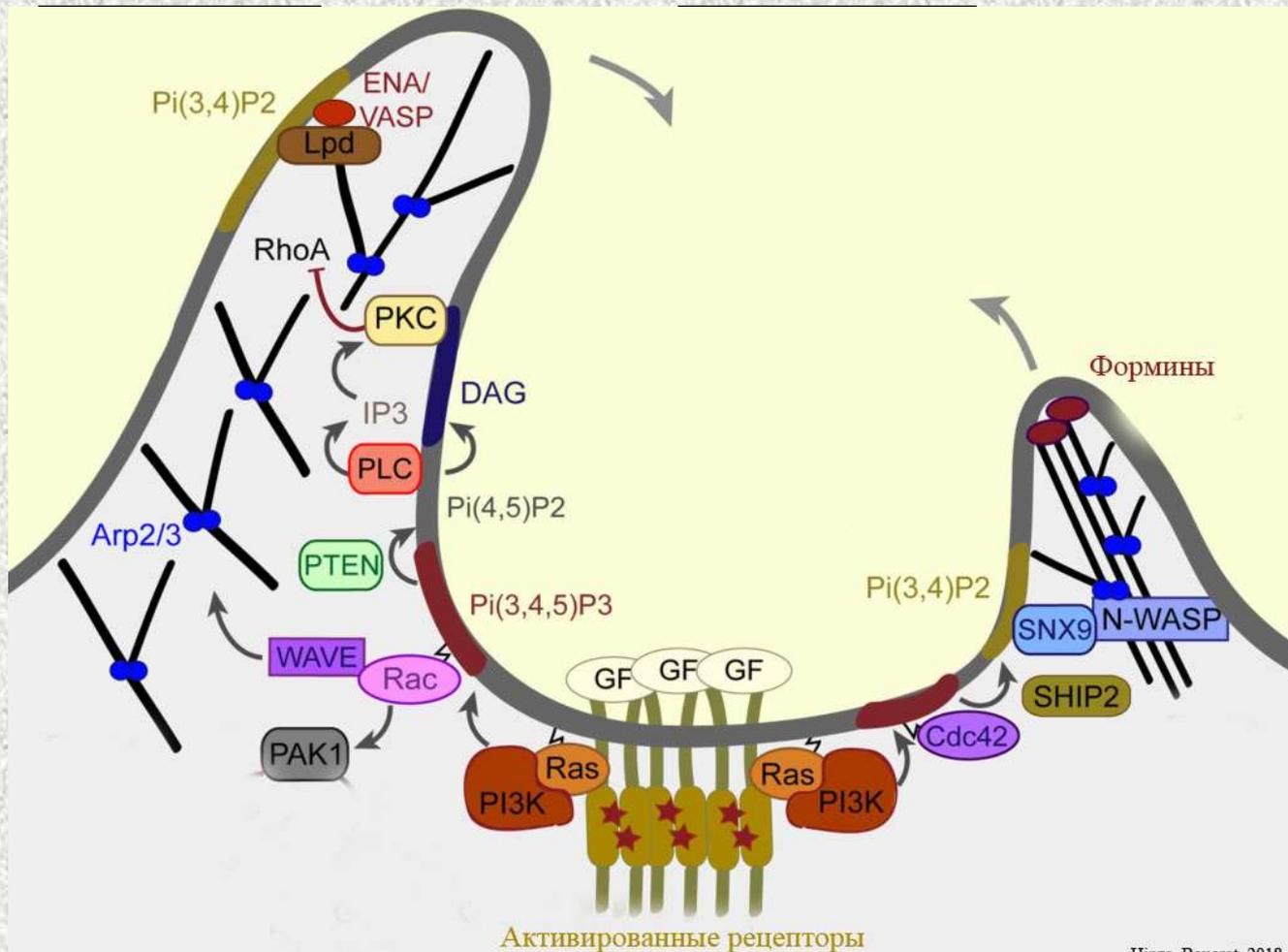
Обработка клетки GTP- $\gamma$ S

# Часть I. Ранний эндоцитоз, общая информация

Три основных варианта формирования первичной эндоцитозной везикулы (трубки)

Классическая макропиносома

Образуется не за счет инвагинации плазмалеммы, а за счет формирования филоподий – актин-зависимых выпячиваний мембраны наружу клетки



## Часть I. Ранний эндоцитоз, общая информация

Три наиболее важных участника раннего эндоцитоза

«Босс, маячок и качок»

BAR-белки

Белки, несущие BAR-домены. Фактически, управляют всеми этапами раннего эндоцитоза. Регулируют посадку в зону формирования первичной везикулы различных белков: адапторных, покровных, динамина, актина и пр. Активируют или блокируют сборку F-актина. Кроме регуляторных функций могут непосредственно обеспечивать инвагинацию мембраны, сужение шейки везикулы и ее отшнуровку

Фосфатидилинозитол

Фосфолипид внутреннего слоя плазмалеммы. За счет различных вариантов своего фосфорилирования формирует «PI-код» и запускает разные варианты и стадии образования эндоцитозной везикулы

Актин

В настоящий момент не известны типы эндоцитоза, проходящие без активного участия актина (исключение – СМЕ при слабом натяжении плазмалеммы и легком карго). Является силовой составляющей раннего эндоцитоза и может участвовать во всех его стадиях – от формирования липидного кластера до отшнуровки везикулы

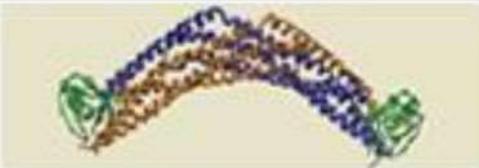
# Часть I. Ранний эндоцитоз, общая информация

## Три наиболее важных участника раннего эндоцитоза

«Босс, маячок и качок»

### BAR-белки

Белки, несущие BAR-домен. Фактически, управляют всеми этапами раннего эндоцитоза. Регулируют посадку в зону формирования первичной везикулы различных белков: адапторных, покровных, динамина, актина и пр. Активируют или блокируют сборку F-актина. Кроме регуляторных функций могут непосредственно обеспечивать инвагинацию мембраны, сужение шейки везикулы и ее отшнуровку

Classical BAR		Arfaptins, ICA69, PICK1, DNMBP (Tuba)
N-BAR		Amphiphysins/BINs, endophilins/BIFs, nadrins
BAR-PH		Oligophrenins, APPLs, GRAFs, centaurin- $\beta$ s
PX-BAR		SNX 1,2,5,6 and 9
F-BAR		Toca-1, FBP17, CIP4 FCh1, FCh2, Fes/Fer kinases, syndapins, srGAPs, PSTPIP-1, PSTPIP-2
I-BAR		IRSp53, MIM, IRTKS

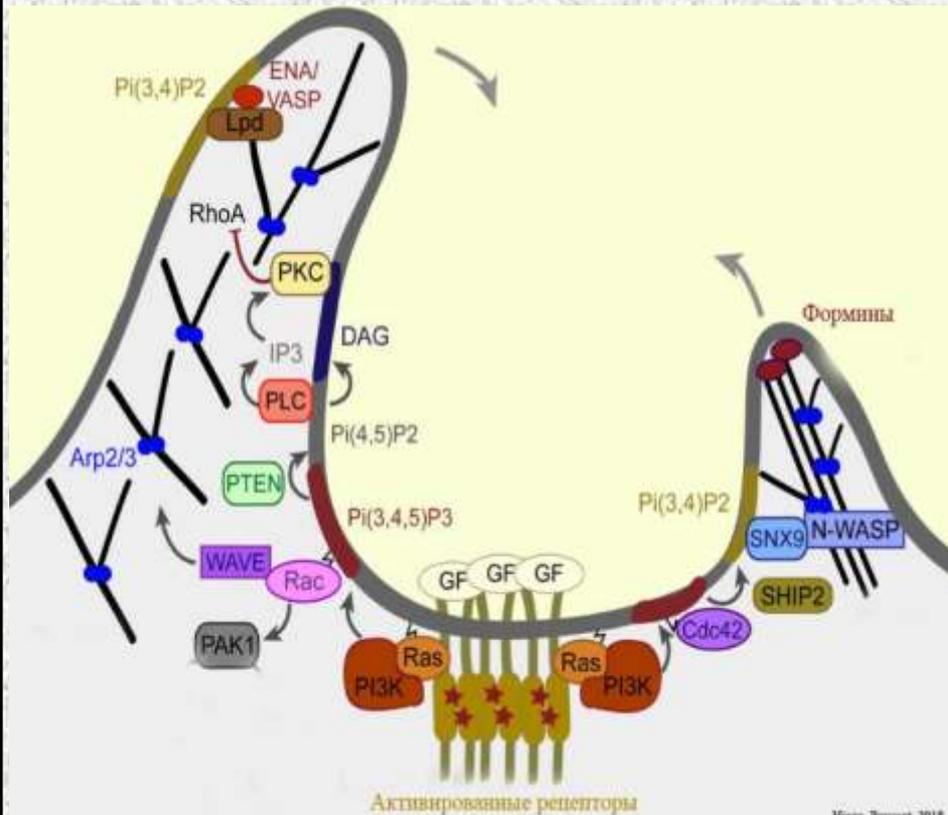
# Часть I. Ранний эндоцитоз, общая информация

Три наиболее важных участника раннего эндоцитоза

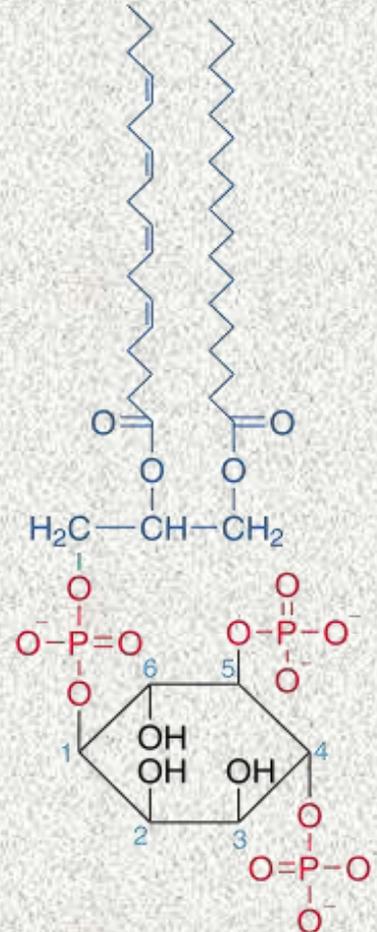
«Босс, маячок и качок»



Фосфатидилинозитол



Фосфолипид внутреннего слоя плазмалеммы. За счет различных вариантов своего фосфорилирования формирует «PI-код» и запускает разные варианты и стадии образования эндоцитозной везикулы

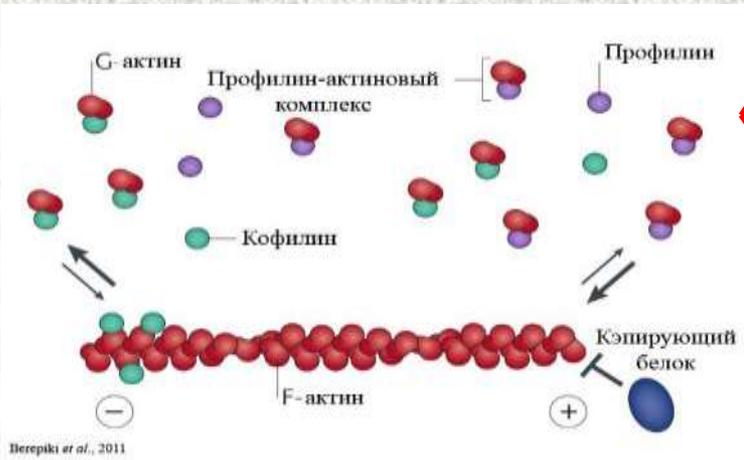


# Часть I. Ранний эндоцитоз, общая информация

## Три наиболее важных участника раннего эндоцитоза

«Босс, маячок и качок»

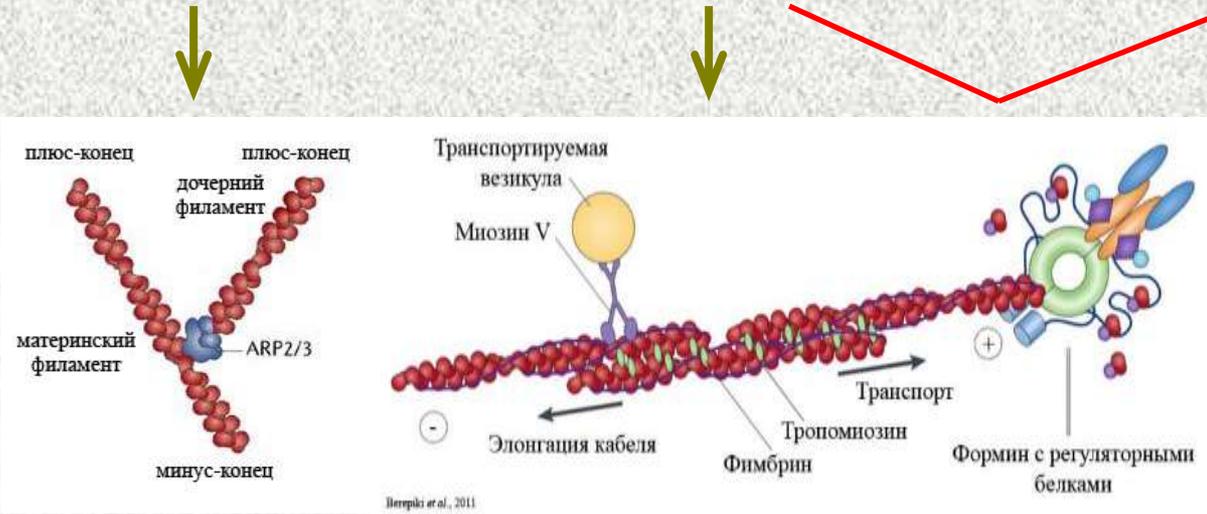
Актин



Фибрилла F-актина – 7 нм  
двуспиральный филамент,  
состоящий из мономеров  
G-актина

Существует два типа  
«второго уровня»  
полимеризации актина:  
Arp2/3-сеть и кабели

В настоящий момент не известны типы эндоцитоза, проходящие без активного участия актина (исключение – СМЕ при слабом натяжении плазмалеммы и легком карго). Является силовой составляющей раннего эндоцитоза и может участвовать во всех его стадиях – от формирования липидного кластера до отшнуровки везикулы



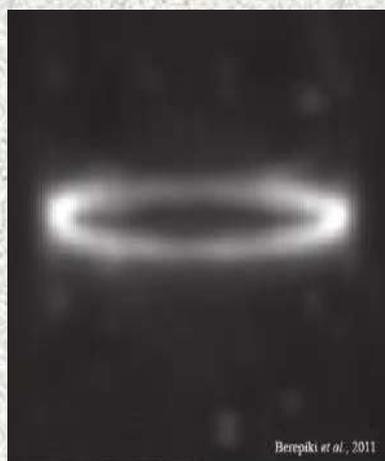
# Часть I. Ранний эндоцитоз, общая информация

Три наиболее важных участника раннего эндоцитоза

«Босс, маячок и качок»

Три основных высокоуровневых структуры актина в  
грибной клетке

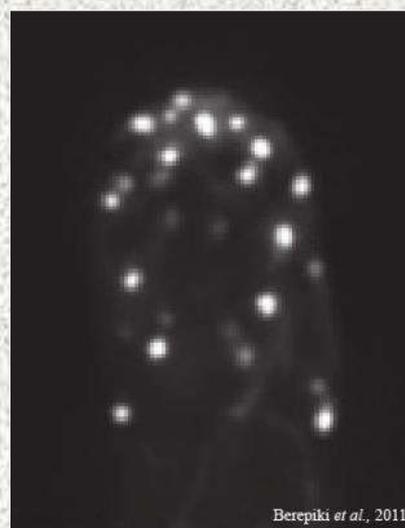
Актин



Кольца



Кабели



Патчи

В настоящий момент не известны типы эндоцитоза, проходящие без активного участия актина (исключение – СМЕ при слабом натяжении плазмалеммы и легком карго). Является силовой составляющей раннего эндоцитоза и может участвовать во всех его стадиях – от формирования липидного кластера до отшнуровки везикулы

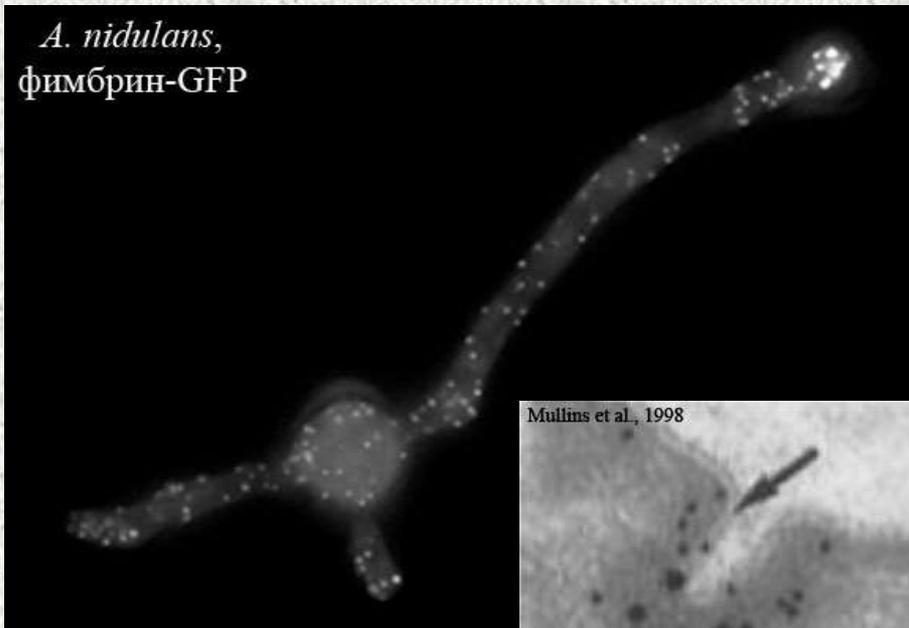
# Часть I. Ранний эндоцитоз, общая информация

## Три наиболее важных участника раннего эндоцитоза

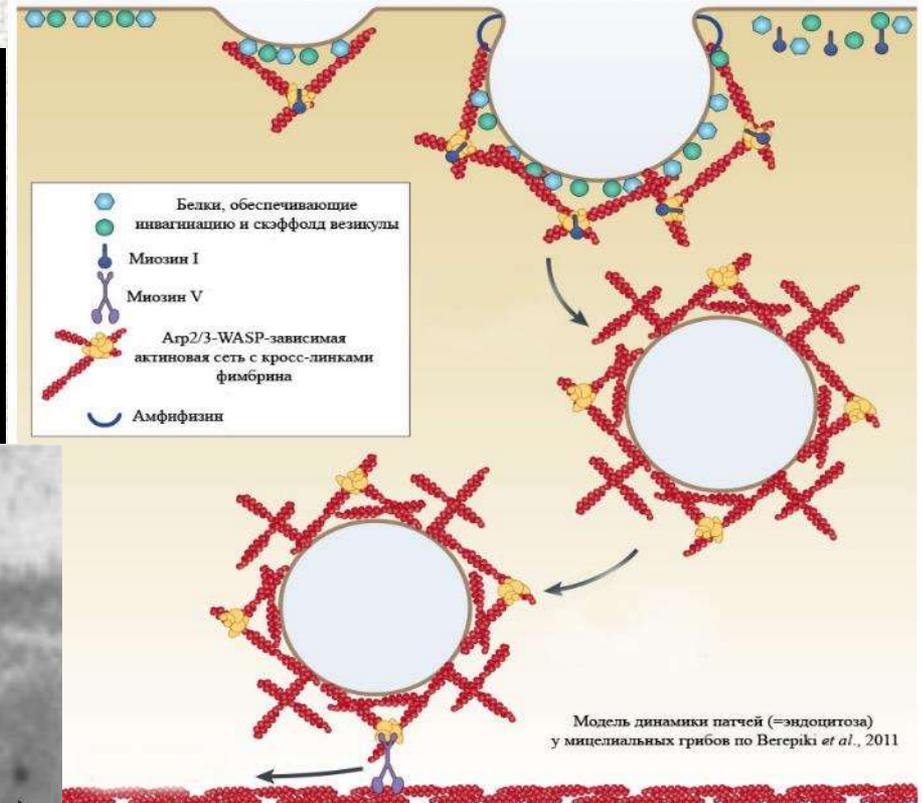
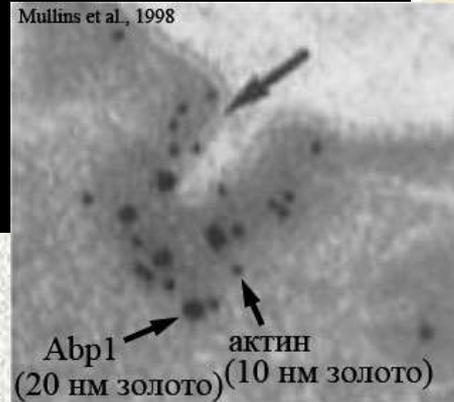
«Босс, маячок и качок»

**Актиновые патчи** – отличительная черта эндоцитоза у некоторых грибов (дрожжи, аспергиллы и некоторые другие мицелиальные аскомицеты). Патч – это локальная *Arp2/3*-сеть, но с мощным кросслинкированием (подобна кортексу в животных клетках). По некоторым источникам в состав патча могут входить «миникабели» актина. Такая *Arp2/3*-сеть формирует скэффолд вокруг первичной везикулы, а не только работает в области шейки везикулы как у животных. Скэффолд способен сохраняться даже после отшнуровки везикулы

*A. nidulans*,  
фимбрин-GFP



Mullins et al., 1998



Модель динамики патчей (=эндоцитоза)  
у мицелиальных грибов по Bergerik *et al.*, 2011

## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

### Материалы и методы

I. Использовали штаммы мицелиальных базидиомицетов, представляющие три эколого-трофические группы

*Stereum hirsutum* и другие ксилотрофы

*Rhizoctonia solani* – гембиотрофный фитопатоген

*Coprinus comatus* – копрогумусовый сапротроф

II. В качестве трэйсера эндоцитоза использовали стироловую флюоресцентную пробу AM4-64

Благодаря длинным липофильным хвостам проба прочно встраивается в плазмалемму. Связывание с плазмалеммой производят на льду (эндоцитоз блокирован), затем образцы переносят в тепло – начинается поглощение метки AM4-64 с помощью эндоцитоза

III. Демполимеризацию F-актина осуществляли цитохалазином Д (CytD) и латрункулином А (LatA)

## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

Три важных результата, связанные с эндоцитозом / ранним эндоцитозом у мицелиальных базидиомицетов и их интерпретация

**I.** Активный эндоцитоз не сконцентрирован в субапикальном динеиновом кольце, как принято считать

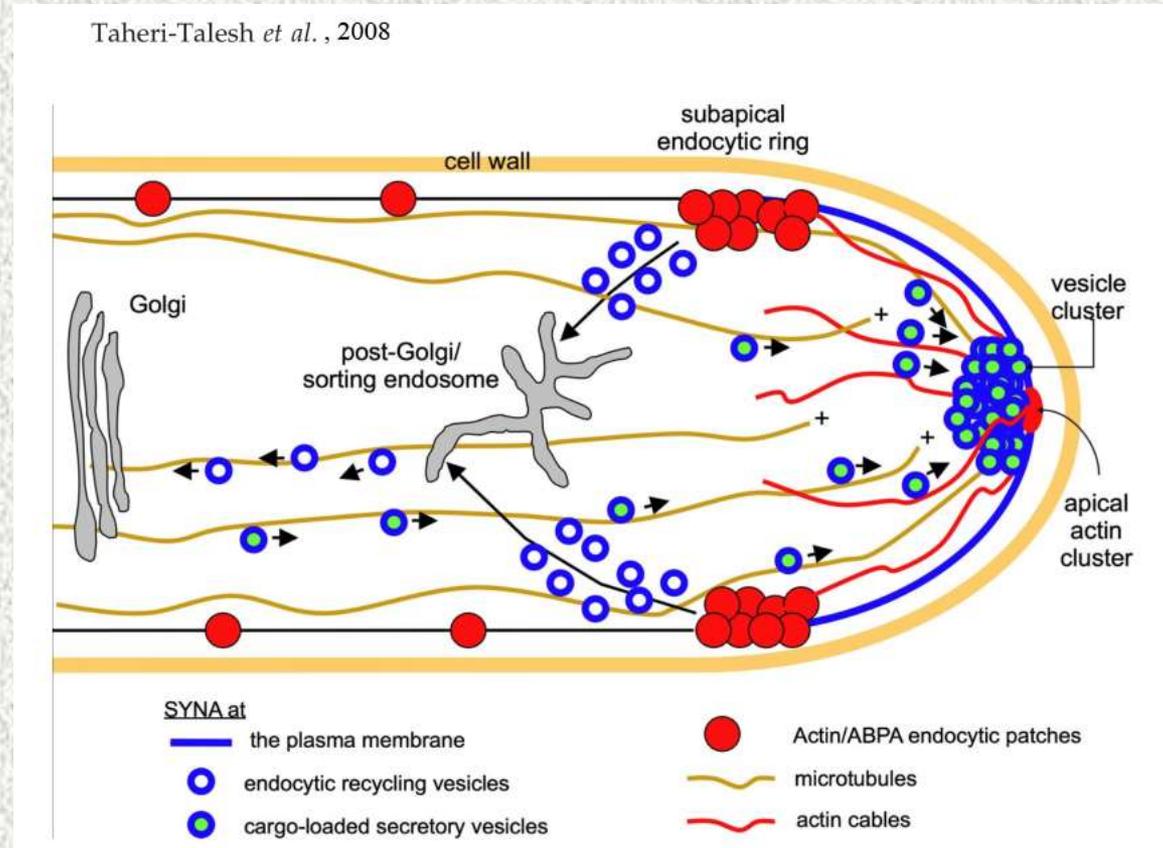
**II.** Макровезикулярный эндоцитоз против парадигмы «внешнего пищеварения» у базидиомицетов

**III.** Деполимеризация F-актина не ингибирует формирование первичных эндоцитозных везикул, но блокирует их отшнуровку

## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

**Результат I.** Активный эндоцитоз не сконцентрирован в субапикальном динеиновом кольце, как принято считать

Внимание специалистов, в основном, обращено на эндоцитоз в апикальных клетках гиф. Работ, посвященных эндоцитозу в других участках мицелия, мало.

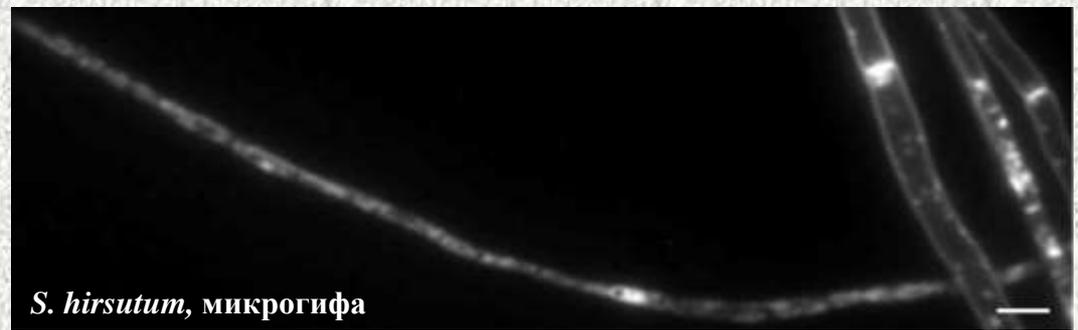


## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

**Результат I.** Активный эндоцитоз не сконцентрирован в субапикальном динеиновом кольце, как принято считать

В действительности, эндоцитозно активны многие клетки гиф, не только апикальные (в молодых участках грибной колонии). Общие эндоцитозные потоки через апекс гифы и ее остальную часть можно сравнить с быстрым ручьем и полноводной рекой, соответственно.

Причем, если активность эндоцитоза в обычных гифах, практически, не зависит от диаметра гифы, то тонкому мицелию ксилотрофов (микрогифам) присущ сверхактивный эндоцитоз



## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

### Результат II. Макровезикулярный эндоцитоз против парадигмы «внешнего пищеварения» у базидиомицетов

Мы выявили два типа раннего эндоцитоза у мицелиальных грибов, отличающихся максимальным размером первичных эндоцитозных везикул

Классический или патчевый эндоцитоз

Диаметр первичных везикул от нескольких десятков нм до 100-200 нм, примерно

Такой эндоцитоз у дрожжей, *Aspergillus nidulans* и т.д.

Макровезикулярный эндоцитоз

Диаметр первичных везикул от нескольких десятков нм до 2 мкм, примерно

Макровезикулярный эндоцитоз мы обнаружили у ксилотрофов и *C. comatus*

Из рассмотренных нами видов грибов патчевый эндоцитоз свойственен *R. solani*

## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

### Результат II. Макровезикулярный эндоцитоз против парадигмы «внешнего пищеварения» у базидиомицетов

Мы выявили два типа эндоцитоза у мицелиальных грибов, отличающихся максимальным размером первичных эндоцитозных везикул



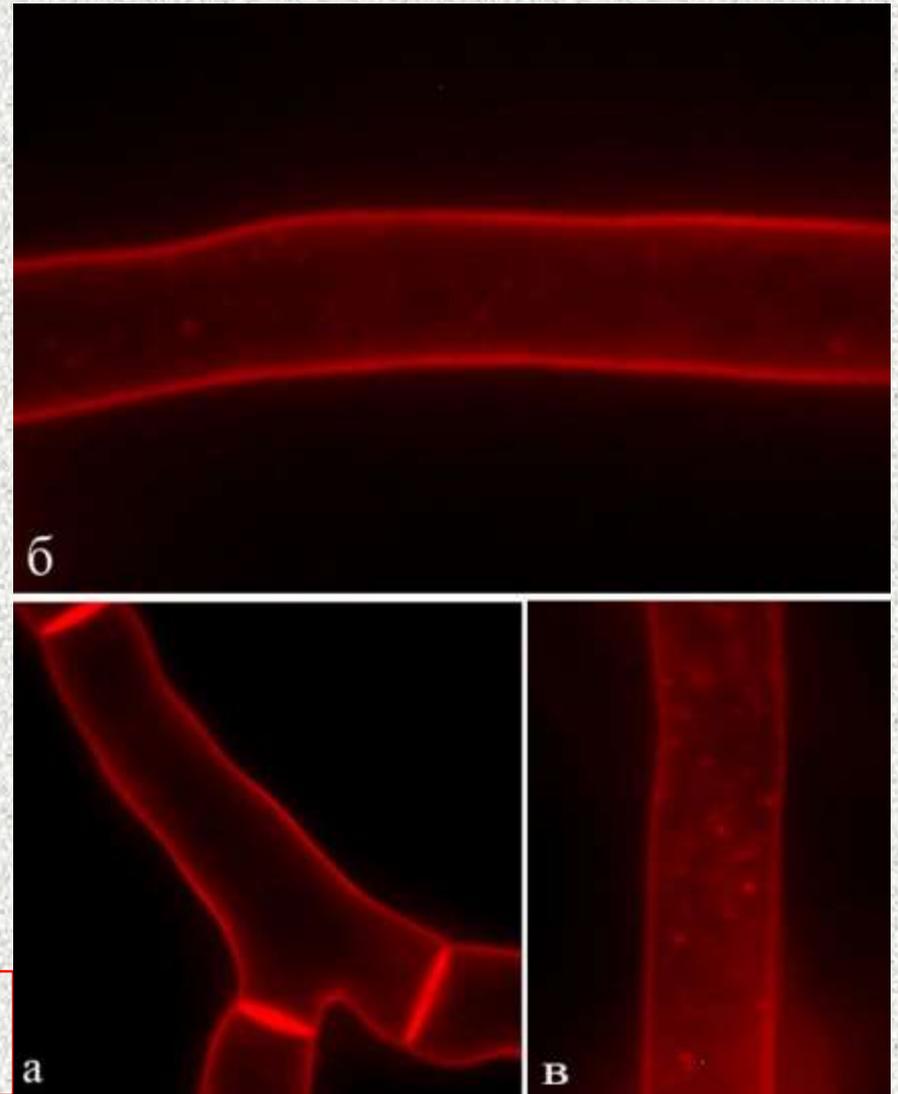
Классический или патчевый эндоцитоз



Диаметр первичных везикул от нескольких десятков нм до 100-200 нм, примерно

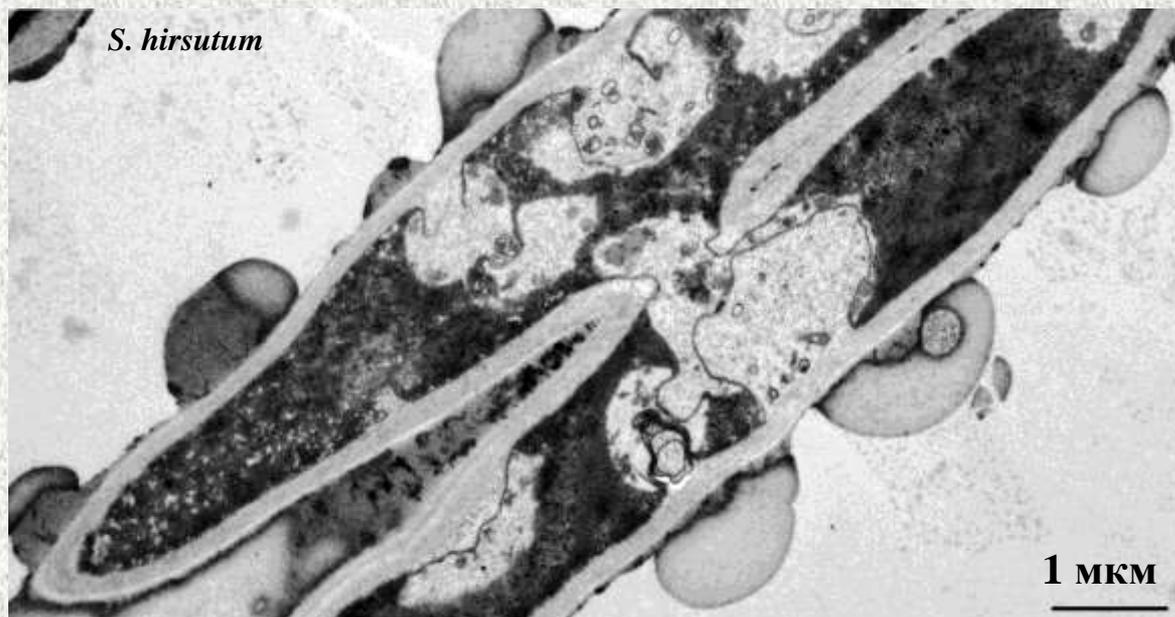
Такой эндоцитоз у дрожжей, *Aspergillus nidulans* и т.д.

Из рассмотренных нами видов патчевый эндоцитоз свойственен *R. solani*



## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

### Результат II. Макровезикулярный эндоцитоз против парадигмы «внешнего пищеварения» у базидиомицетов

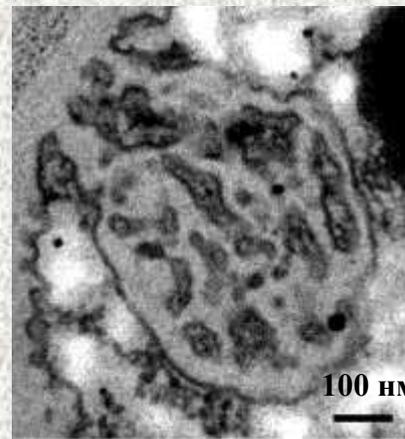
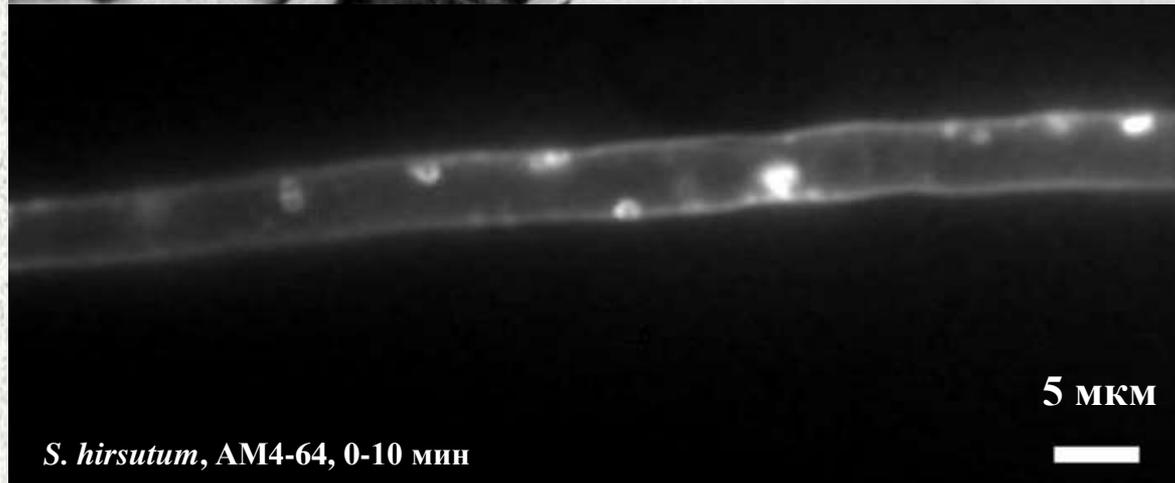


Макровезикулярный  
эндоцитоз



Диаметр первичных  
везикул от нескольких  
десятков нм до 2 мкм,  
примерно

Макровезикулярный  
эндоцитоз мы обнаружили у  
ксилотрофов и *S. comatus*



*S. hirsutum*

## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

### Результат II. Макровезикулярный эндоцитоз против парадигмы «внешнего пищеварения» у базидиомицетов

**Гипотеза:** почвенные и подстилочные базидиомицеты (а также ксилотрофы при гибридно-поисковом росте в почве или в разложившейся древесине) подобны тяжелой бронетехнике (крупны, мощны и всеядны). Они отчасти контролируют свою ги́фосферу (Сидорова и др., 2017), но «выхватывание из-под носа» легкодоступных питательных ресурсов, в т.ч. продуктов собственного внеклеточного гидролиза, микромицетами и прокариотами ги́фосферы неизбежно



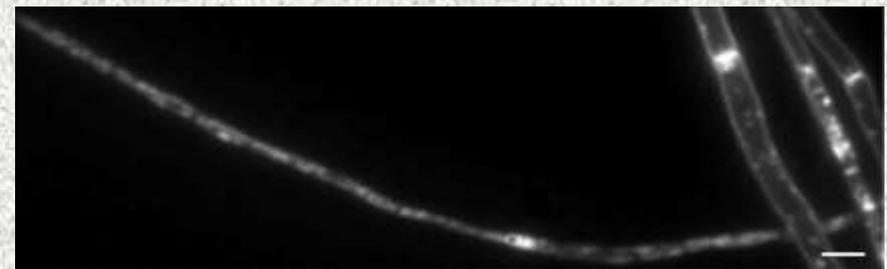
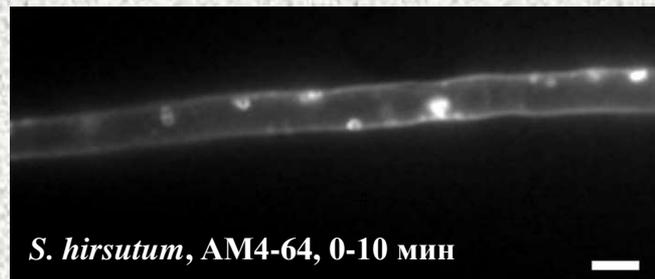
Базидиомицеты не могут полагаться только на «внешнее пищеварение» и обычные способы транспорта продуктов гидролиза в клетки



**Макровезикулярный эндоцитоз**, позволяющий быстро захватывать большие объемы внеклеточной жидкости с питательными веществами и продуктами гидролиза, которые затем можно спокойно метаболизировать внутриклеточно в эндосомально-вакуолярной системе



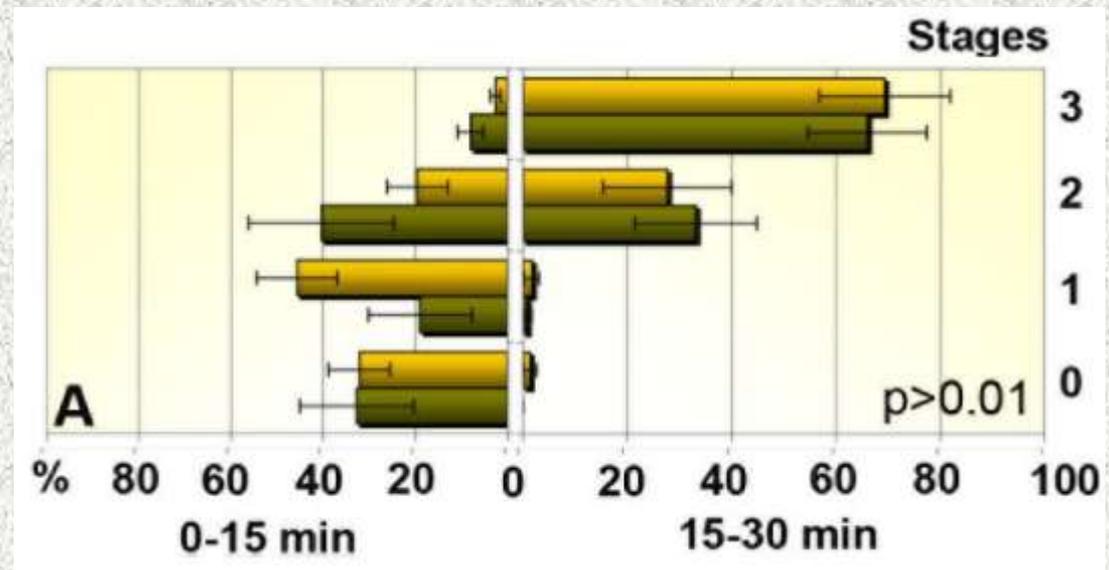
**Микроги́фы (только для ксилотрофов)**, с беспрецедентной скоростью поглощающие ресурсы из питательного субстрата



## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

**Результат III.** Деполимеризация F-актина не ингибирует формирование первичных эндоцитозных везикул, но блокирует их отшнуровку

Мы обнаружили, что у *R. solani* низкие концентрации CytD (10 мкМ) приводят к небольшому ускорению формирования и отшнуровки первичных везикул



Такой результат предсказуем – первичные везикулы *R. solani* одеты актиновым скэфолдом, незначительное размягчение патчей приводит к облегчению отхождения везикул от плазмалеммы

## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

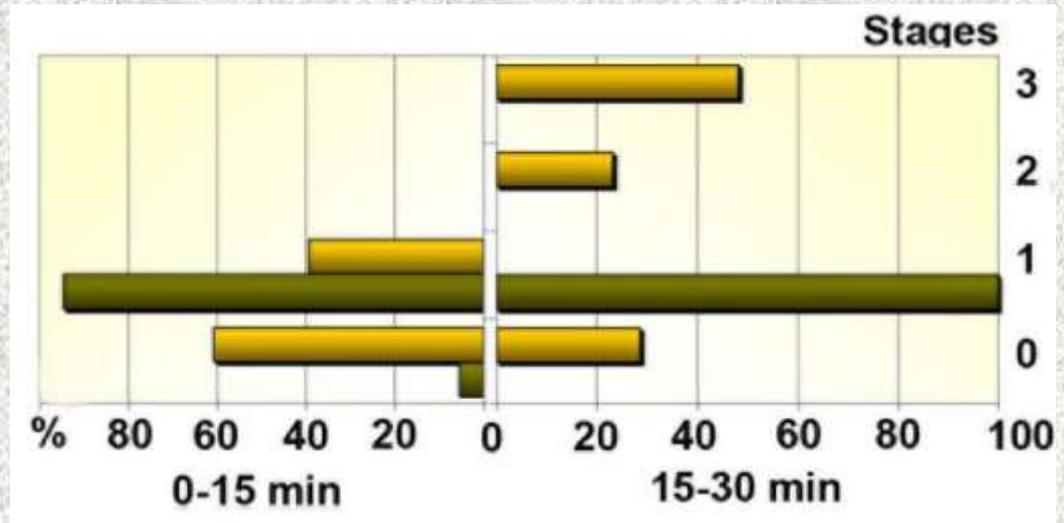
**Результат III.** Деполимеризация F-актина не ингибирует формирование первичных эндоцитозных везикул, но блокирует их отшнуровку

Но повышение концентрации CytD или использование более мощного LatD (от 0,5 мкМ и выше) приводит к неожиданному результату

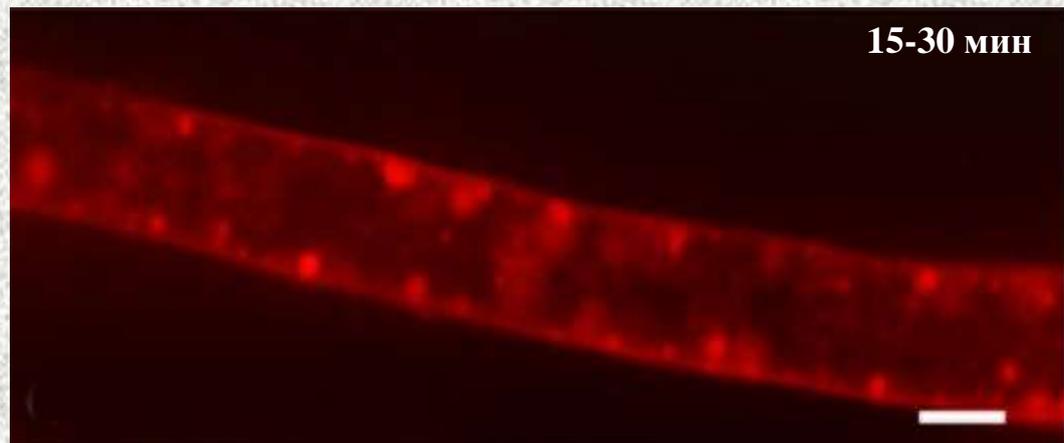


Формирование первичных везикул ускоряется, но блокируется их отшнуровка

Размер, прикрепленных к плазмалемме везикул со временем увеличивается



*R. solani*, 2 мкМ LatA



## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

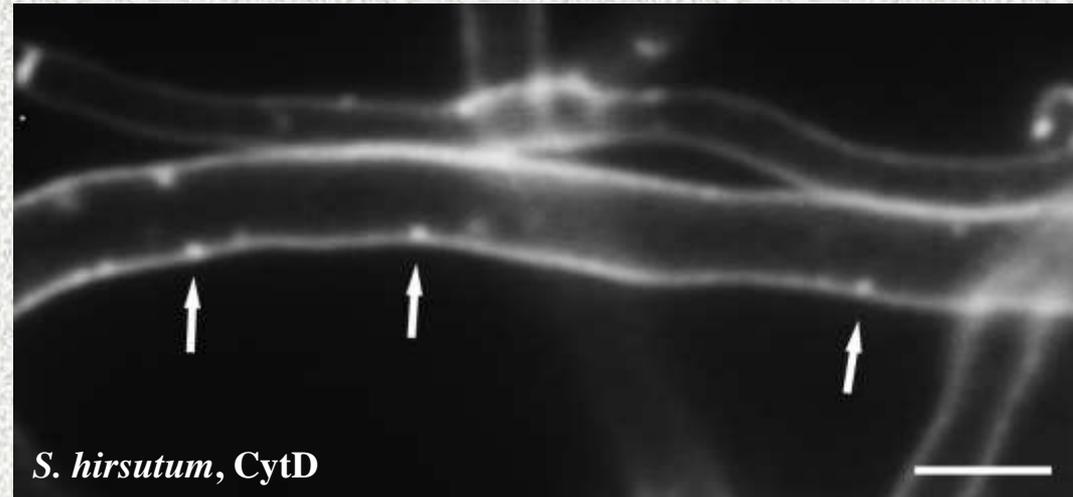
**Результат III.** Деполимеризация F-актина не ингибирует формирование первичных эндоцитозных везикул, но блокирует их отшнуровку

Но повышение концентрации CytD или использование более мощного LatD (от 0,5 мкМ и выше) приводит к неожиданному результату

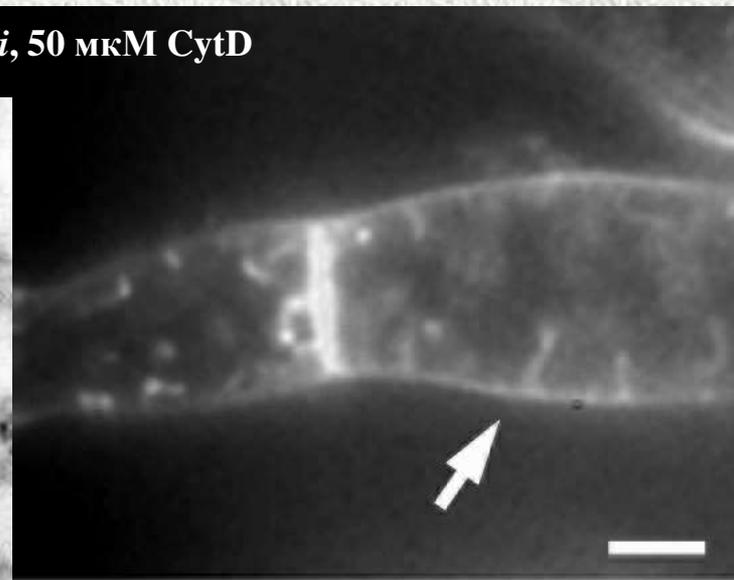
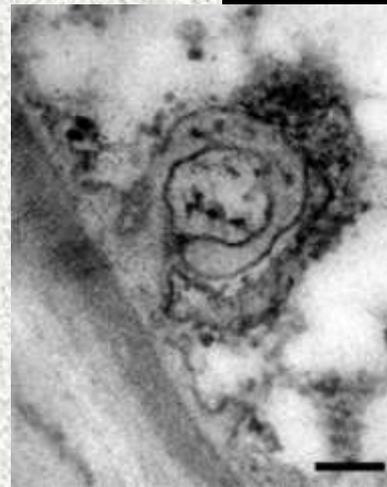


**1** Кроме того, у *S. hirsutum* блокировка отшнуровки первичных везикул происходит уже при 10 мкМ CytD

**2** Во многих клетках мицелия, обработанного CytD или LatA формируются первичные эндоцитозные трубки



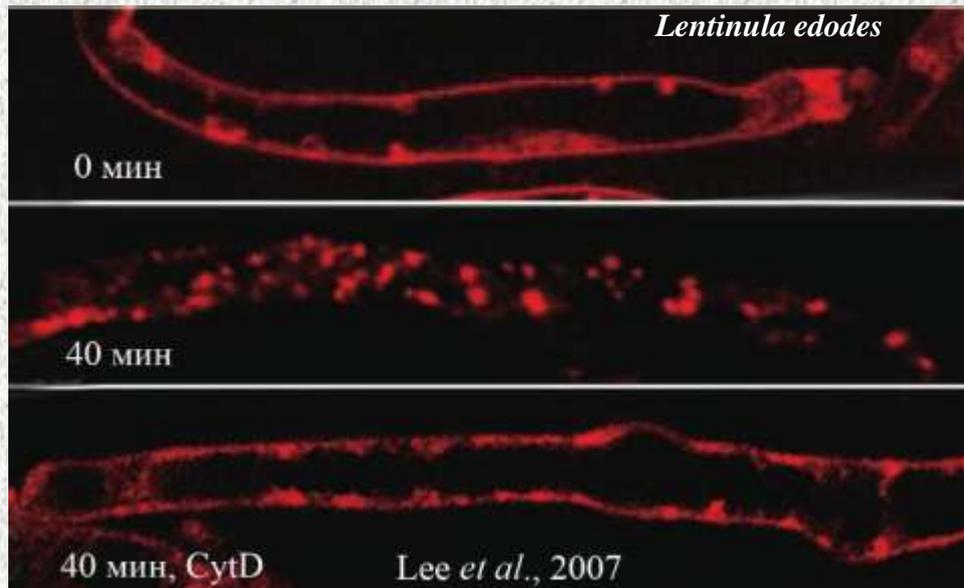
*R. solani*, 50 мкМ CytD



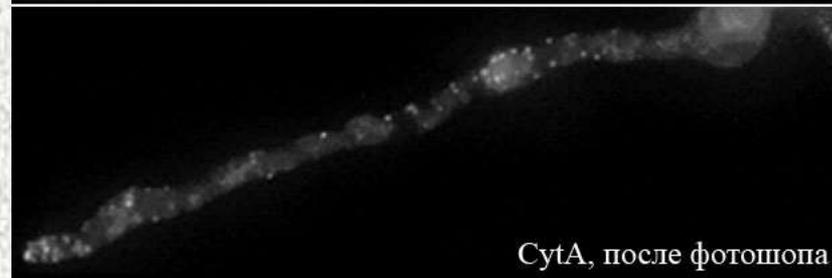
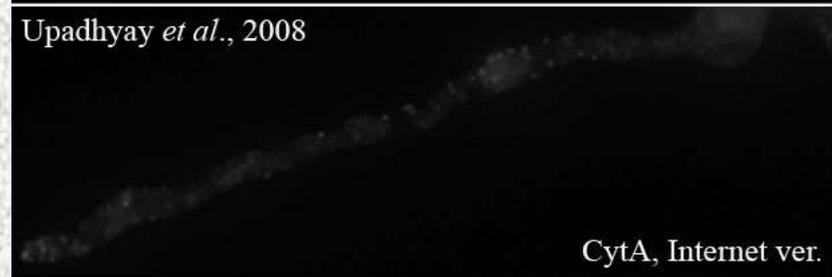
## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

**Результат III.** Деполимеризация F-актина не ингибирует формирование первичных эндоцитозных везикул, но блокирует их отшнуровку

Такой результат, судя по фотографиям в научной литературе, получили не мы одни, но другие авторы не акцентировали внимание на данной особенности



Upadhyay *et al.*, 2008



## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

**Результат III.** Деполимеризация F-актина не ингибирует формирование первичных эндоцитозных везикул, но блокирует их отшнуровку

У делящихся дрожжей, например, 2 мкМ LatA полностью блокирует формирование инвагинаций плазмалеммы, хотя F-актин еще остается в патчах (Basu *et al.*, 2014)



И это вполне объяснимо – натяжение плазмалеммы в дрожжевой клетке обеспечивает тургор, давление которого достигает у дрожжей 1,5 МПа



Как же тогда объяснить принципиально отличный от дрожжевого результат воздействия деполимеризаторов F-актина на мицелиальные грибы



Даже частичная деполимеризация F-актина снижает его «тяговую силу» и делает формирование первичной везикулы невозможной



## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

**Результат III.** Деполимеризация F-актина не ингибирует формирование первичных эндоцитозных везикул, но блокирует их отшнуровку

Мы предлагаем три гипотезы (у последней гипотезы два подварианта), объясняющие способность мицелиальных грибов формировать первичные везикулы при деполимеризованном F-актине

- **Гипотеза I:** тургорное давление у мицелиальных грибов ниже, чем у дрожжей (см. следующие слайды), а деполимеризаторы актина разрушают F-актин не полностью – остаточного актина хватает для образования инвагинации, но не хватает для отшнуровки везикулы
- **Гипотеза II:** деполимеризация актина приводит к «микропермеабилитации» плазмалеммы – увеличивается проницаемость мембраны для ионов (но не для более крупных молекул), что приводит к ее деполяризации ( $H^+$  устремляется в клетку) и выходу ионов наружу. Тургор снижается и инвагинация плазмалеммы возможна без участия актина
- **Гипотеза III:** тургорное давление не единственный регулятор натяжения цитоплазматической мембраны у мицелиальных грибов. Важную роль в регуляции натяжения плазмалеммы играет F-актин

## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

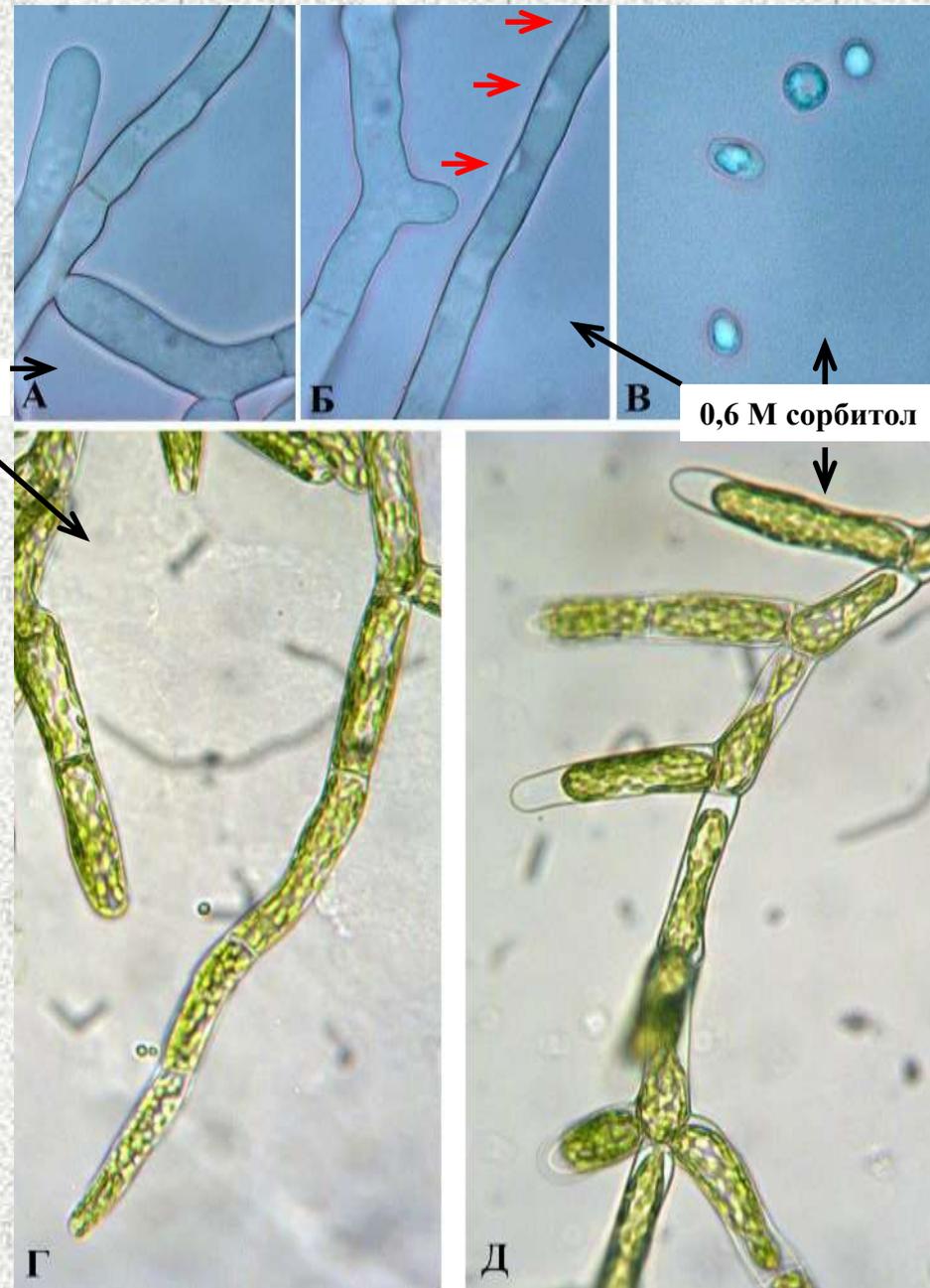
**Гипотеза III:** тургорное давление не единственный регулятор натяжения цитоплазматической мембраны у мицелиальных грибов. Важную роль в регуляции натяжения плазмалеммы играет F-актин

**Некоторые факты о тургоре у мицелиальных грибов:**

Давно известно, что у мицелиальных грибов плазмолиз в гипертонической среде идет «с трудом»

В книге *Fungi: Biology and Applications*, К. Kavanagh (ed.), 2017 пишут «у мицелиальных грибов гифы часто устойчивы к плазмолизу, поэтому, возможно, плазмалемма и клеточная стенка тесно связаны между собой»

А, Б – *R. solani*; В – *Saccharomyces cerevisiae*;  
Г, Д – протонема *Physcomitrella patens*



## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

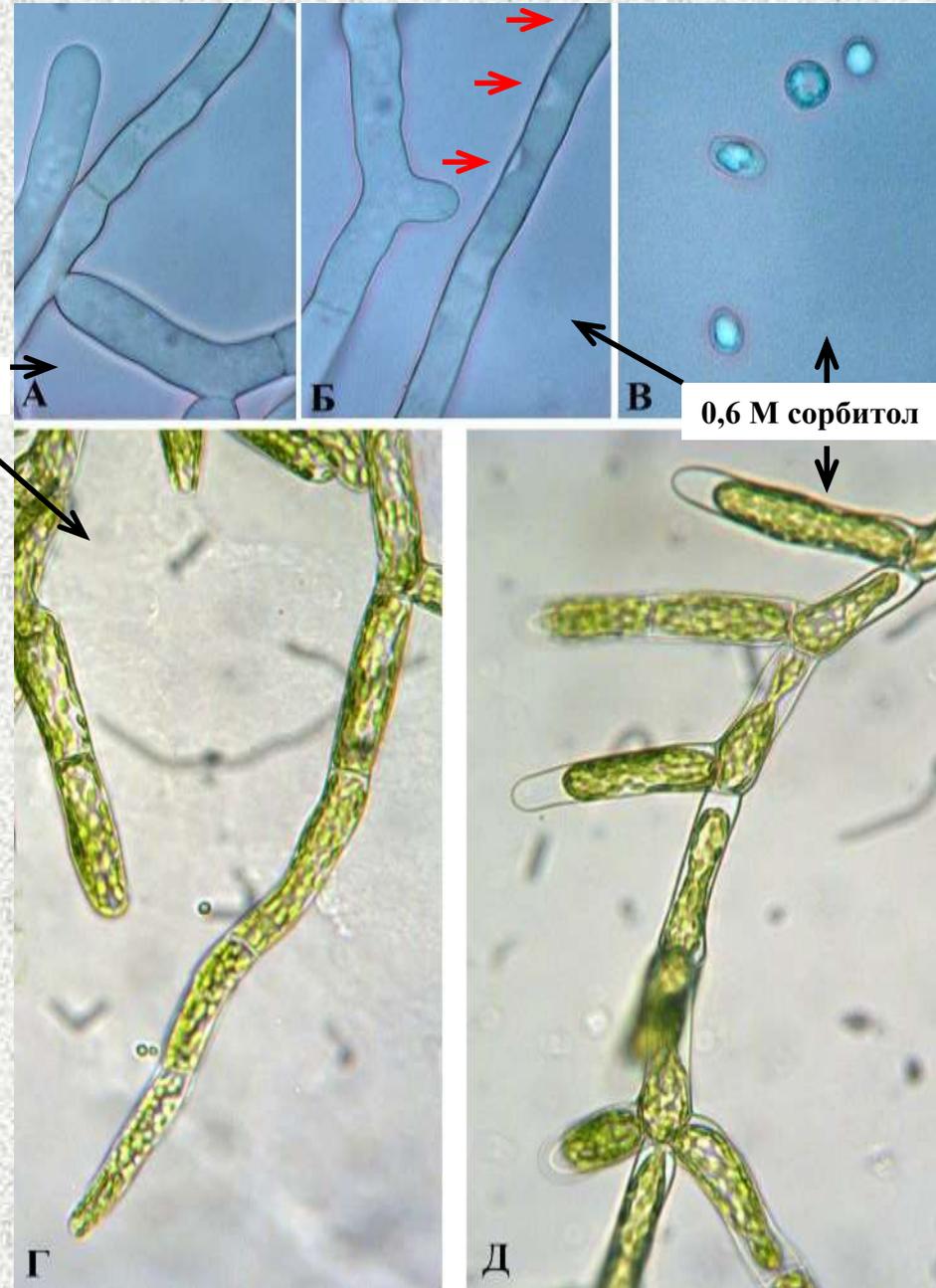
**Гипотеза III:** тургорное давление не единственный регулятор натяжения цитоплазматической мембраны у мицелиальных грибов. Важную роль в регуляции натяжения плазмалеммы играет F-актин

**Некоторые факты о тургоре у мицелиальных грибов:**

При измерении тургорного давления у мицелиальных грибов методом Де Фриза (по первичному плазмолизу) значения доходят до 2 МПа

Более современные методы демонстрируют более скромные показатели. Например, в работе Lee *et al.*, 2004 при измерении тургора у *Neurospora crassa* и *Achlya bisexualis* с помощью микроинъектора значения варьируют от 0,2 до 0,6 МПа в зависимости от условий

А, Б – *R. solani*; В – *Saccharomyces cerevisiae*;  
Г, Д – протонема *Physcomitrella patens*



## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

**Гипотеза III:** тургорное давление не единственный регулятор натяжения цитоплазматической мембраны у мицелиальных грибов. Важную роль в регуляции натяжения плазмалеммы играет F-актин

Если на плазмалемме есть натяжение (хотя и не сильное) и она прижата к клеточной стенке (точнее, к периплазматическому пространству), при этом слабо реагирует на осмотические изменения, но, вероятно, теряет натяжение при деполимеризации актина – можно предположить, что в натяжении плазмалеммы в грибных клетках важное участие принимает актиновый цитоскелет

Два варианта участия F-актина в натяжении цитоплазматической мембраны

Участие внеклеточного актина

«Скрепки» актина в периплазме

Внешний актиновый чехол

Цитоскелетно-каркасная или зонтичная модель



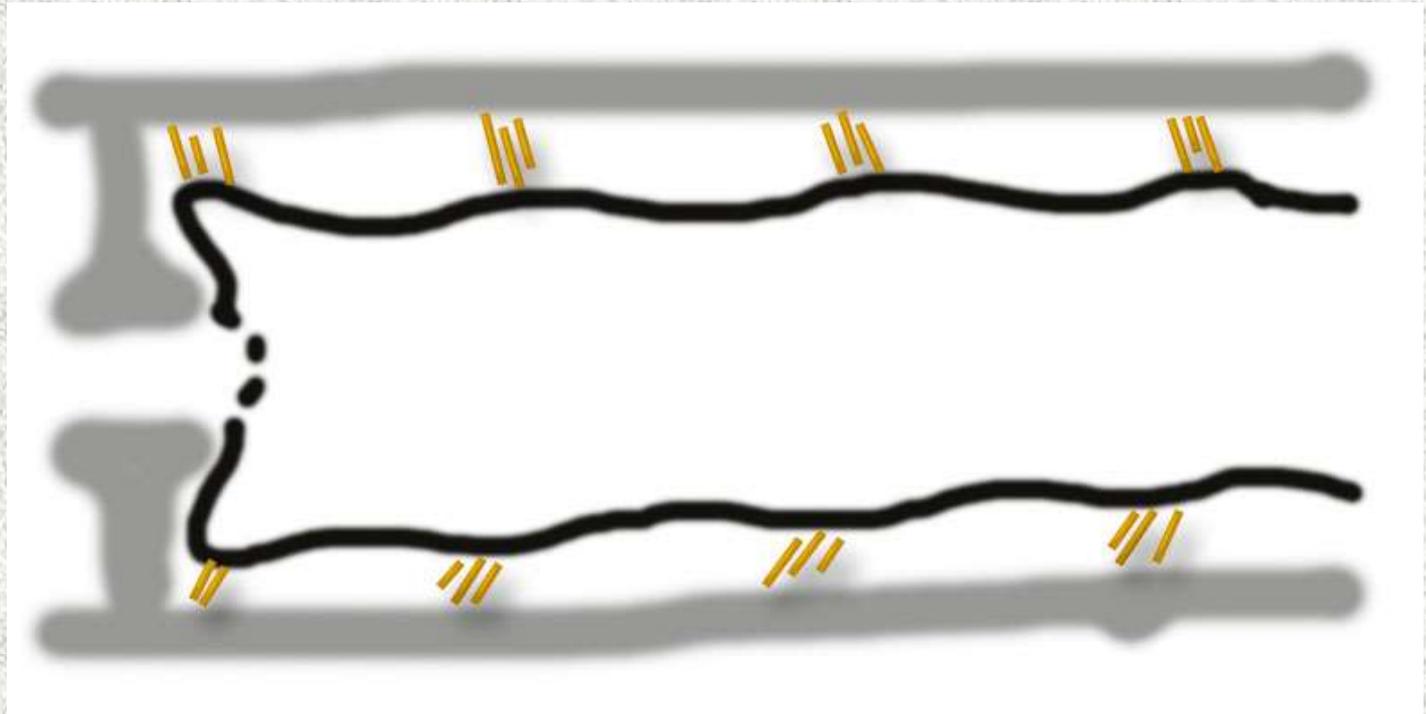
## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

**Гипотеза III:** тургорное давление не единственный регулятор натяжения цитоплазматической мембраны у мицелиальных грибов. Важную роль в регуляции натяжения плазмалеммы играет F-актин

Два варианта участия F-актина в натяжении цитоплазматической мембраны

Участие внеклеточного актина

«Скрепки» актина в периплазме



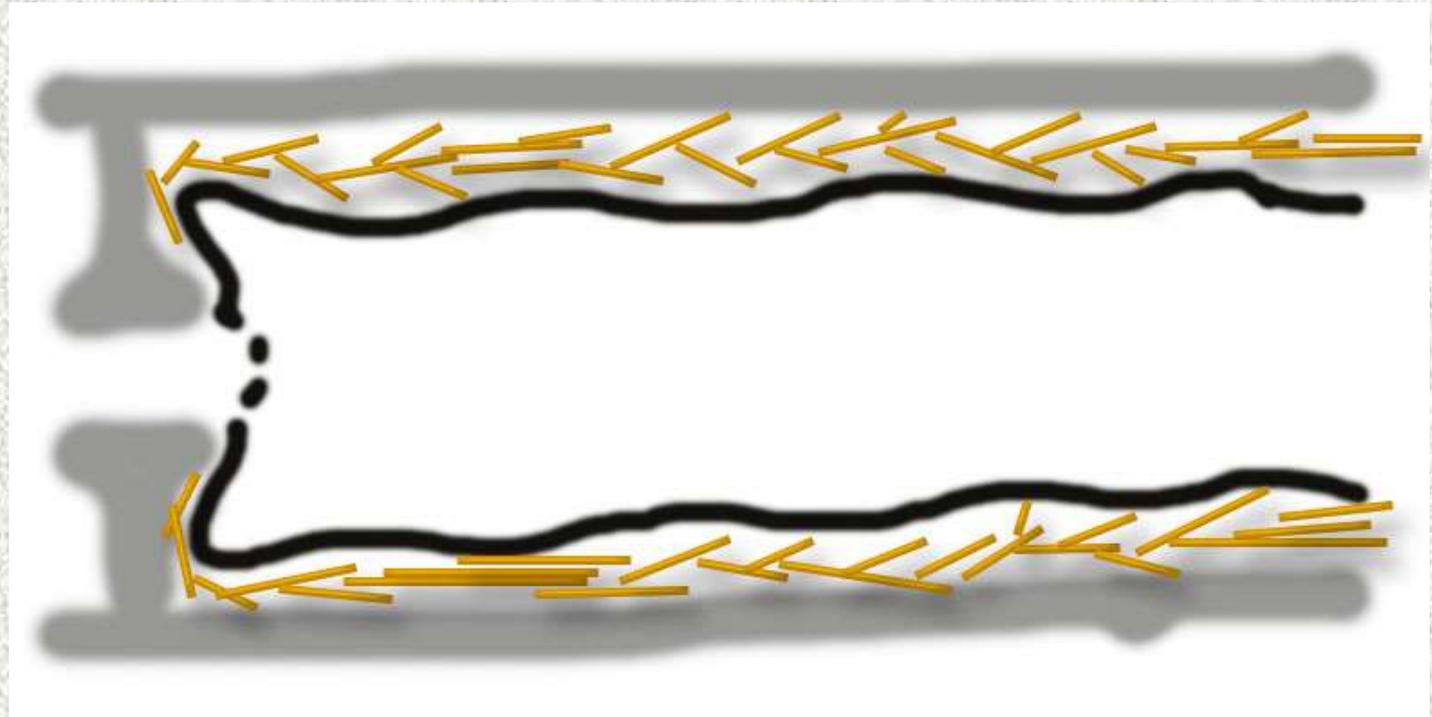
## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

**Гипотеза III:** тургорное давление не единственный регулятор натяжения цитоплазматической мембраны у мицелиальных грибов. Важную роль в регуляции натяжения плазмалеммы играет F-актин

Два варианта участия F-актина в натяжении цитоплазматической мембраны

Участие внеклеточного актина

Внешний (периплазматический) актиновый чехол

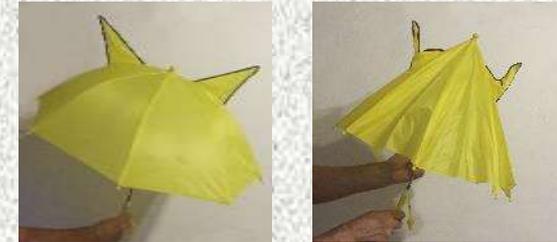


## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

### Цитоскелетно-каркасная или зонтичная модель

#### Основные свойства модели:

**1** Степень раскрытости «зонта» определяет натяжение плазмалеммы



**2** Соседние клетки гифы могут иметь совершенно разное натяжение мембраны (а при тургорной регуляции – градиентная разница)



**3** Возможно изменение натяжения плазмалеммы в определенном участке клеточной поверхности (что может быть важно для формирования крупных макровезикул)



**4** Зонт-система может работать вместе с тургорно-осмотической системой регуляции натяжения мембраны: «зонт» может отключаться в клетках с высоким тургором (апикальные клетки, проростки спор, гаустории и т.д.) и включаться при снижении осмотического давления

## Часть II. Ранний эндоцитоз, собственные результаты нашей группы

### Цитоскелетно-каркасная или зонтичная модель

Зонтичная модель не просто объясняет, как происходит регулирование натяжения плазмалеммы у мицелиальных грибов – это пусть и утрированная, но модель организации грибной клетки. Модель противоречива и имеет много недостатков, но и очевидно, что тургор не играет у мицелиальных грибов такой роли, какую он выполняет у дрожжевых грибов или растений. Мицелиальные грибы слишком пластичны при обрастании субстрата, слишком сильно испытывают на себе гетерогенность внешнего окружения, чтобы значительно зависеть от тургора. Постоянный и всеклеточный тургор снижает и скорость реагирования мицелия на внешние изменения, и физически превращает гифы в негибкие «надутые трубки-баллоны»



Это похоже на мицелий?

# Большое спасибо за внимание

**Ни один гриб в процессе работы  
полностью не пострадал, только  
отдельные его колонии или их части**