

УДК 57.085.23

СТАДИИ КЛЕТОЧНОГО КАННИБАЛИЗМА – ЭНТОЗА – В КУЛЬТУРЕ НОРМАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА*

© 2015 А.С. Гаранина**, Л.А. Хашба, Г.Е. Онищенко

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-4309,
электронная почта: anastasiacit@gmail.com*

Поступила в редакцию 06.07.15

Энтоз является одним из вариантов клеточного каннибализма, при котором клетка внедряется в другую клетку и, как правило, погибает внутри последней. Внимание исследователей в основном сосредоточено на начальной и конечной стадиях энтоза. При этом изучают преимущественно опухолевые клетки, переведенные в суспензионное состояние. В настоящей работе проведено исследование изменения морфологии обеих клеток-участниц энтоза на протяжении всего процесса. В качестве объекта выбрана субстратзависимая культура нормальных кератиноцитов человека HaCaT. С помощью совмещения световой и сканирующей электронной микроскопии показано, что одна клетка полностью окружена плазматической мембраной другой клетки. Изучая структуры «клетка-в-клетке», мы проследили структурные и функциональные изменения, происходящие в ходе энтоза в обеих клетках. Обнаружено изменение локализации и формы ядра наружной клетки, деградация ядра внутренней клетки, постепенное разрушение клеточных контактов между клетками-участницами энтоза, неоднократное перемещение мембранных органелл (аппарата Гольджи, лизосом, митохондрий и аутофагосом) наружной клетки, перестройка ее цитоскелета, а также изменение состояния лизосом, аутофагосом и митохондрий в обеих клетках-участницах. Основываясь на этих данных, нам удалось разделить энтоз на пять стадий, что позволит систематизировать описание данного варианта клеточной гибели.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: энтоз, стадии энтоза, клеточный каннибализм, клеточные органеллы.

В настоящее время различают две основные формы клеточной гибели: некроз и программированную гибель (ПКГ) [1]. Существует около 15 видов ПКГ [2]. В 2009 г. Комитет по номенклатуре клеточной гибели впервые включил энтоз в список вариантов клеточной гибели [3]. Энтоз является одним из видов клеточного каннибализма [4], при котором одна клетка внедряется внутрь другой клетки [5]. Изначально предполагалось, что инициацией внедрения служит открепление клетки от субстрата [6–10]. Однако исследования последних лет свидетельствуют, что структура «клетка-в-клетке» может образовываться и без открепления клеток от матрикса [11]. Показано, что энтоз характерен в основном для опухолевых клеток, но может встречаться и в некоторых популяциях нормальных клеток [12].

Принятые сокращения: ПКГ – программированная клеточная гибель, СЭМ – сканирующая электронная микроскопия.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM15-215, 13.09.2015.

** Адресат для корреспонденции.

Несмотря на то, что исследованием энтоза активно занимаются многие ученые, точные механизмы этого явления до сих пор не изучены. В работах, как правило, исследуют начальную и конечную стадии энтоза, а именно процесс внедрения и судьбу внедрившейся клетки. Показано, что в первом случае важную роль играют молекулы E-кадгерина, входящие в состав адгезивных контактов, которые формируются между клетками-участницами энтоза [13]. Активное внедрение клетки происходит с участием ее актомиозинового комплекса. Судьба же данной клетки может быть различной: она может выйти из наружной клетки, поделиться внутри нее или подвергнуться лизосомоопосредованной деградации [5, 12]. Энтоз является длительным процессом (от 20 ч и более) [5]. Для понимания того, что определяет судьбу внедрившейся клетки, необходимо установить последовательность событий, происходящих в обеих клетках-участницах в ходе энтоза, и определить механизмы, действующие на каждом этапе данного процесса.

Цель нашей работы состояла в выделении стадий энтоза на основе анализа последователь-

ности структурных изменений самих клеток, а также локализации и функционального состояния ряда мембранных органелл клеток и компонентов цитоскелета. В дальнейшем это позволит исследовать механизмы процессов, обеспечивающих реализацию каждой стадии энтоза. В качестве объекта исследования выбрана культура клеток HaCaT, обладающих сильной адгезией к субстрату. Эта клеточная линия является моделью нормальных кератиноцитов человека, для которых явление энтоза еще не описано.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культура клеток. Работу проводили на культуре клеток HaCaT (нормальные кератиноциты человека), любезно предоставленной Е.А. Воротеляк (Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН). Клетки выращивали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10%-ной фетальной сыворотки теленка (FBS) («PAA Laboratories», Австрия), 2 mM L-глутамин («ПанЭко») и антибиотика-антимикотика («Sigma», США) со следующими конечными концентрациями агентов: 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл фунгизона. Клетки культивировали при 37° и 5%-ном содержании CO₂.

Морфологический анализ клеток. Клетки фиксировали раствором Буэна (15 частей насыщенного водного раствора пикриновой кислоты, 5 частей 40%-ного формалина и 1 часть ледяной уксусной кислоты) в течение 30 мин и отмывали буфером PBS, pH 7,4 («Sigma», США). Препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

Прижизненное наблюдение. Прижизненные наблюдения проводили при анализе аутофагосом и митохондрий клеток. Для выявления аутофагосом использовали краситель моноданзил-кадаверин (стоковый раствор 85,5 mM на ДМСО) («Sigma», США). Для выявления митохондрий использовали потенциалзависимый краситель родамин 123 (стоковый раствор 1 мг/мл) («Sigma», США). Оба красителя вносили на 30 мин из расчета 1 мкл на 1 мл среды. После окрашивания клетки отмывали средой без сыворотки 2 раза по 5 мин. Полученный препарат монтировали на камеру для прижизненных наблюдений, заполненную средой культивирования.

Цитохимическое окрашивание. Для выявления везикул кислого компартмента использовали прижизненный краситель LysoTracker Red DND-99 («Invitrogen», США). Стоковый раствор разводили в соотношении 1 : 5 в ДМСО и затем добавляли к клеткам из расчета 1 мкл раствора на 1 мл среды. После этого клетки оставля-

ли на 30 мин в CO₂-инкубаторе. Перед фиксацией клетки промывали средой DMEM без сыворотки. В качестве фиксатора использовался 4%-ный раствор формальдегида на PBS, продолжительность фиксации – 20 мин. Для выявления полимеризованного F-актина был использован фаллоидин, меченый TRITC («Sigma», США): стоковый раствор 1 мг/мл, разведенный на метаноле, рабочий раствор 0,005 мг/мл, разведенный на PBS. Время инкубации с красителем – 45 мин. Ядра клеток докрашивали DAPI (0,1 мкг/мл) («Sigma», США) в течение 10 мин и заключали в смесь глицерин : PBS (1 : 1).

Иммуноцитохимическое окрашивание. Клетки фиксировали 4%-ным раствором формальдегида. Для нарушения целостности мембран клетки на 7 мин помещали в 0,2%-ный раствор Triton X100, промывали PBS и помещали в первые антитела на 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. Для выявления аппарата Гольджи использовали кроличьи поликлональные антитела к маннозидазе II («Abcam», США; 1 : 200), системы микротрубочек – мышинные моноклональные антитела к α -тубулину («Sigma», США; 1 : 1000), β -катенина – кроличьи антитела к данному белку («Sigma», США; 1 : 1000). После этого клетки промывали PBS и помещали во вторые антитела на 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. В качестве вторых антител были использованы моноклональные антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 («Invitrogen», США; 1 : 800), и моноклональные антитела ослика к IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 568 («Invitrogen», США; 1 : 800).

Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Leica (Германия), используя объектив N Plan 100 \times /1,25, oil, и люминесцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss Inc.», Германия) с объективом PlanApo 63 \times /1,4, oil. Съемку препаратов проводили с использованием приложения Leica Application Suite и Axiovision соответственно, дальнейшую обработку фотографий осуществляли в программе ImageJ. Построение гистограммы и вычисление величин стандартного отклонения проводили в программе Microsoft Office Excel 2007.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Клетки фиксировали 2,5%-ным глutarовым альдегидом с 2%-ным формалином на 0,1 M PBS и обезжизивали по стандартной схеме. Образец высушивали в критической точке (для CO₂ t = 31°, p = 73,8 бар). Стекла с клетками монтировали на металлические столики. На образец напыляли смесь Au–Pd (золото–палладий). Препараты анализировали в сканирующем электронном микроскопе SCAN JSM («JEOL», Япония).

Корреляционная микроскопия. Для того чтобы найти определенные клетки в СЭМ, мы проводили следующую процедуру: на фиксированном 2,5%-ным глутаровым альдегидом препарате искали энтозы с помощью фазово-контрастной микроскопии (Axiovert 200M, $\times 63$) и отмечали маркером места их локализации. Под дифференциально-интерференционным микроскопом (DIC) («Leica», Германия) (объективы HI Plan10 \times /0,22 и 20 \times /0,30) счищали слой клеток вокруг метки на стекле с помощью тонкой иглы. После этого проводили стандартную проводку для СЭМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Встречаемость энтозных клеток в исследуемой культуре. В культуре клеток HaCaT мы обнаружили структуры, в которых одна клетка находилась внутри другой клетки (картины «клетка-в-клетке»). При этом наблюдалось характерное изменение морфологии обеих клеток. В наружной клетке (клетке-каннибале) ядро приобретало бобовидную форму и смещалось к периферии. По всем остальным признакам наружная клетка, как правило, не отличалась от соседних клеток: она была хорошо распластана, имела ярко выраженную ламеллу и размер, сопоставимый с размерами соседних клеток. Внутренняя клетка (внедрившаяся клетка) обычно имела округлую форму и находилась внутри крупной вакуолярной неокрашиваемой структуры – энтозной вакуоли (рис. 1, а). Эти морфологические признаки соответствовали характеристикам энтоза, описанным в литературе [5].

Для того чтобы убедиться, что одна клетка находится внутри другой, мы проанализировали энтозные клетки, используя метод корреляционной микроскопии. На рис. 1, б видно, что плазматическая мембрана наружной клетки полностью покрывает внутреннюю клетку. Стоит отметить, что внедрившихся клеток может быть несколько, а именно: несколько клеток в одной или «клетка-в-клетке-в-клетке».

Доля энтозов в культуре составляла в среднем 0,5% на первые сутки культивирования, а затем снижалась до 0,06% на четвертые сутки (рис. 1, в).

Морфологические изменения внутренней и наружной клеток на разных стадиях энтоза. При анализе структур «клетка-в-клетке» нами выявлено, что морфология внутренней клетки, а также состояние и расположение органелл наружной клетки могут быть различными. Это связано с тем, что наблюдаемые энтозные клетки находятся на разных этапах данного процесса. Мы разделили энтоз на пять стадий по следующим

признакам: морфология ядра и цитоплазмы внедрившейся клетки, наличие контактов между клетками-участницами энтоза, состояние и расположение органелл обеих клеток.

Форма и размер внутренней клетки. На ранней стадии энтоза (непосредственно после внедрения одной клетки в другую) внутренняя клетка имеет округлую форму. Ее размер совпадает с размером клетки данной линии, находящейся в суспензии (рис. 1, г, 1). Впоследствии на поверхности внутренней клетки обнаруживаются небольшие выросты в форме шипиков (вторая стадия энтоза) (рис. 1, г, 2). Затем очертания клетки становятся неровными, ее размер уменьшается (третья и четвертая стадии энтоза) (рис. 1, г, 3, 7). На поздней (пятой) стадии исследуемого процесса внутренняя клетка имеет неправильную форму, а ее размер значительно меньше исходного (рис. 1, г, 8, 9).

Наличие пространства между плазматической мембраной внутренней клетки и мембраной энтозной вакуоли. На ранней стадии энтоза плазматическая мембрана внутренней клетки тесно контактирует с мембраной энтозной вакуоли, поэтому пространство между ними не выявляется. На второй стадии энтоза, когда сохраняются лишь единичные места контакта двух мембран, начинают четко выявляться границы внутренней клетки и энтозной вакуоли (рис. 1, г, 2). На третьей и четвертой стадиях энтоза расстояние между двумя мембранами достигает максимального значения из-за уменьшения размеров внутренней клетки (рис. 1, г, 3, 7). На последней стадии энтоза пространство между плазматической мембраной внутренней клетки и мембраной энтозной вакуоли вновь сокращается (рис. 1, г, 9).

Состояние ядра и цитоплазмы внутренней клетки. В большинстве случаев внутренняя клетка в ходе энтоза подвергается деградации. Как следствие, изменяется морфология ее ядра. На первой стадии энтоза оно имеет округлую форму, богато эухроматином, в нем четко выявляются несколько ядрышек (рис. 1, г, 4). Такое состояние ядра внутренней клетки сохраняется также в течение второй стадии энтоза (рис. 1, г, 5). Однако на третьей стадии ядро внутренней клетки несколько деформируется, приобретая неправильную форму (рис. 1, г, 6). На четвертой стадии оно значительно сжимается, хроматин постепенно конденсируется, ядрышки не выявляются (рис. 1, г, 10). На заключительной стадии ядро внутренней клетки подвергается фрагментации (рис. 1, г, 11, 12). Параллельно изменениям морфологии ядра внутренней клетки происходит усиление вакуолизации ее цитоплазмы.

Контакты между внутренней и наружной клетками. Известно, что необходимым услови-

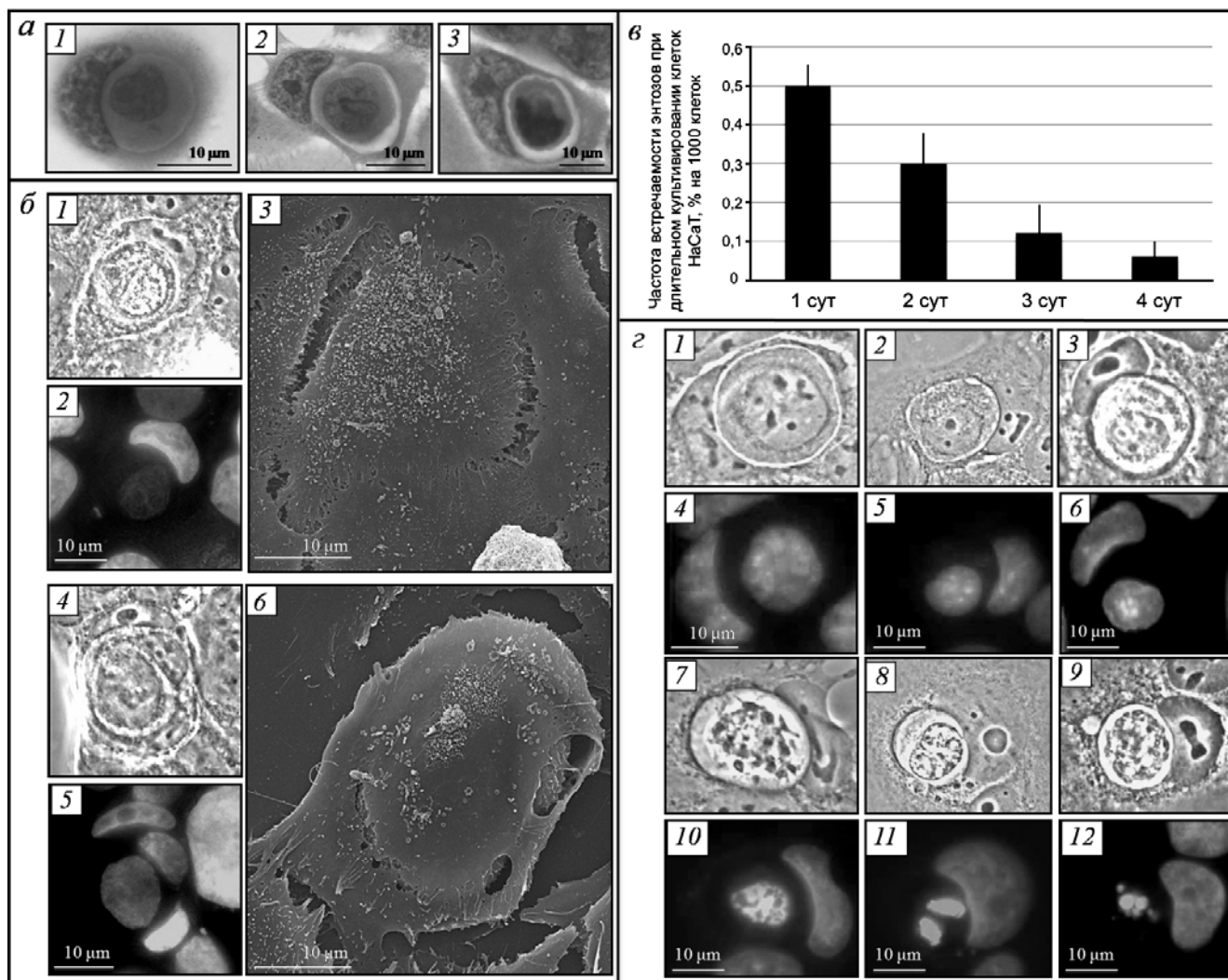


Рис. 1. Энтоз в культуре клеток HaCaT. *а* – Изменение морфологии клеток-участниц энтоза, световая микроскопия, окрашивание гематоксилин-эозином; *б* – доказательство локализации клетки внутри другой клетки, корреляционная микроскопия: 1, 4 – фазово-контрастная микроскопия, 2, 5 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание DAPI, 3, 6 – СЭМ; *в* – гистограмма частоты встречаемости энтозов в культуре клеток HaCaT; *г* – стадии деградации внедрившейся клетки: 1 – первая стадия, 2 – вторая стадия, 3 – третья стадия, 7 – четвертая стадия, 8, 9 – пятая стадия; 1–3, 7–9 – фазово-контрастная микроскопия, 4–6, 10–12 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание DAPI

ем формирования структуры «клетка-в-клетке» является образование адгезивных контактов (опосредованных E-кадгеринами) между наружной и внутренней клетками. Мы провели поэтапный анализ состояния адгезивных контактов между клетками-участницами энтоза. Для этого клетки окрашивали антителами к β -катенину, связывающемуся с внутриклеточным доменом E-кадгерина [14]. На ранней стадии энтоза антителами окрашивалось толстое кольцо между мембранами внедрившейся клетки и энтозной вакуоли (рис. 2, *а*, 3). На второй стадии энтоза β -катенин выявлялся по периферии внутренней клетки и по периферии энтозной

вакуоли (рис. 2, *а*, 6). На третьей стадии обнаруживались единичные места контакта внедрившейся клетки с энтозной вакуолью, в состав которых входил β -катенин. Однако такие картины встречались редко. Как правило, начиная с третьей стадии энтоза окрашивание антителами к β -катенину между внедрившейся клеткой и энтозной вакуолью не обнаруживалось (рис. 2, *а*, 9). Таким образом, мы показали, что в ходе энтоза молекулы, присущие контактам адгезии, такие как β -катенин, постепенно деградируют.

Аппарат Гольджи внутренней и наружной клеток. В одноядерных клетках диктиосомы аппарата Гольджи располагались, как правило, по

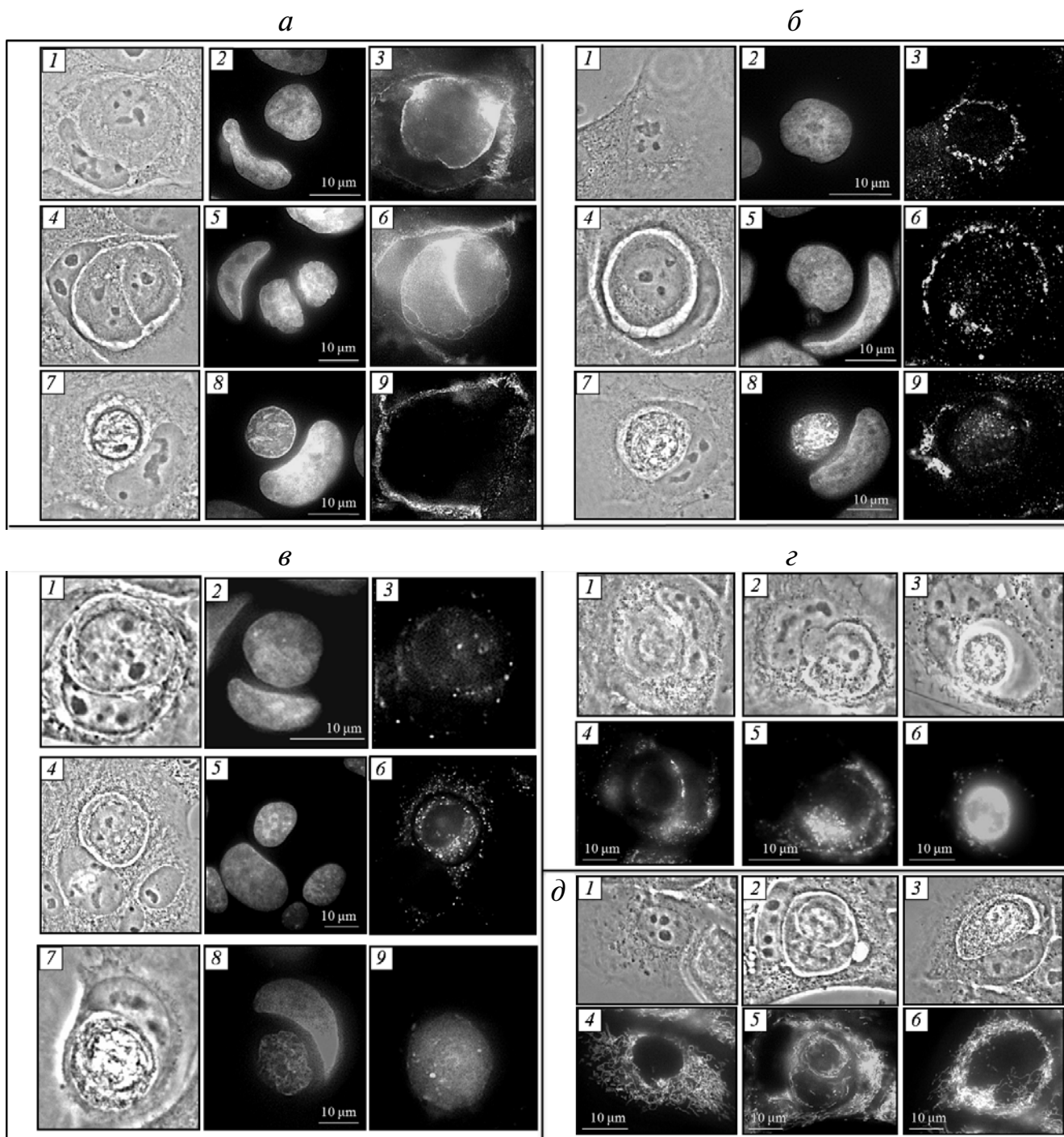


Рис. 2. Энтоз в культуре клеток NaCaT. *а* – Выявление контактов между клетками-участницами энтоза: 1–3 – первая стадия, 4–6 – вторая стадия, 7–9 – четвертая стадия; 1, 4, 7 – фазово-контрастная микроскопия; 2, 5, 8 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание DAPI; 3, 6, 9 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание антителами к β -катенину; *б* – выявление аппарата Гольджи: 1–3 – одноядерная клетка, 4–6 – вторая стадия энтоза, 7–9 – четвертая стадия; 1, 4, 7 – фазово-контрастная микроскопия; 2, 5, 8 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание DAPI; 3, 6, 9 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание антителами к маннозидазе II; *в* – выявление лизосом: 1–3 – первая стадия, 4–6 – вторая стадия, 7–9 – четвертая стадия; 1, 4, 7 – фазово-контрастная микроскопия; 2, 5, 8 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание DAPI; 3, 6, 9 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание LysoTracker Red; *г* – выявление аутофагосом: 1, 4 – первая стадия, 2, 5 – вторая стадия, 3, 6 – пятая стадия; 1–3 – фазово-контрастная микроскопия; 4–6 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание моноданзилкадаверинном; *д* – выявление митохондрий: 1, 4 – одноядерная клетка, 2, 5 – вторая стадия энтоза, 3, 6 – четвертая стадия; 1–3 – фазово-контрастная микроскопия; 4–6 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание родамином-123

периферии ядра клетки (рис. 2, б, 3). В ходе энтоза локализация аппарата Гольджи в наружной клетке изменялась. На ранних стадиях диктиосомы аппарата Гольджи клетки-каннибала перемещались в область энтозной вакуоли, полностью окружая ее (рис. 2, б, 6). Такое расположение аппарата Гольджи наружной клетки сохранялось вплоть до четвертой/пятой стадии. В некоторых случаях происходило повторное перераспределение диктиосом в клетке-каннибале — они возвращались в околядерную область. Во внедрившейся клетке аппарат Гольджи выявлялся в перинуклеолярном пространстве в течение первых двух стадий энтоза. Начиная с третьей стадии диктиосомы аппарата Гольджи внутренней клетки, как правило, распадались на отдельные цистерны и везикулы (рис. 2, б, 9). На пятой стадии аппарат Гольджи во внедрившейся клетке не выявлялся. Таким образом, мы показали, что в ходе энтоза происходит перераспределение диктиосом аппарата Гольджи в наружной клетке, а во внедрившейся клетке наблюдается длительная сохранность аппарата Гольджи.

Лизосомы и аутофагосомы внутренней и наружной клеток. Было показано, что в одноядерных клетках лизосомы располагаются преимущественно в околядерной зоне. На первой стадии энтоза лизосомы клетки-каннибала начинают перераспределяться и локализуются по периферии энтозной вакуоли. Однако их количество невелико (рис. 2, в, 3). На второй стадии количество лизосом в наружной клетке значительно увеличивается (рис. 2, в, 6). В дальнейшем в клетке-каннибале выявляются лизосомы, хаотично расположенные в цитоплазме. При этом их количество уменьшается. Во внедрившейся клетке на первой стадии энтоза лизосомы собраны вблизи ядра, их число невелико (рис. 2, в, 3). На второй и третьей стадиях предположительно происходит увеличение числа лизосом и их перераспределение — они обнаруживаются по всей цитоплазме клетки (рис. 2, в, 6). Затем лизосомы внутренней клетки начинают сливаться, ее цитоплазма закисляется, и на пятой стадии Lyso-Tracker Red окрашивается вся энтозная вакуоль (рис. 2, в, 9).

На начальной стадии энтоза в наружной клетке были обнаружены аутофагосомы, располагающиеся по всей цитоплазме клетки (рис. 2, г, 4). На второй стадии аутофагосомы клетки-каннибала, как правило, локализовались по периферии энтозной вакуоли (рис. 2, г, 5). На заключительных стадиях энтоза в наружной клетке были выявлены более крупные аутофагосомы вблизи энтозной вакуоли (рис. 2, г, 6). При этом их количество было значительно меньше, чем на первых стадиях энтоза. Во внедрившейся клетке на

ранней стадии энтоза были обнаружены единичные аутофагосомы в цитоплазме. Затем количество аутофагосом во внутренней клетке постепенно увеличивалось (вторая и третья стадии энтоза), они начинали сливаться (четвертая стадия), и на поздней стадии энтоза выявлялось диффузное окрашивание всей внедрившейся клетки моноданзилкадаверинном.

Следовательно, можно предположить, что в деградации внедрившейся клетки принимает участие как кислый везикулярный компартмент, так и аутофагосомы обеих клеток-участниц энтоза.

Митохондрии внутренней и наружной клеток. В клетках линии NaCaT митохондрии имеют нитевидную форму, хотя встречаются и небольшие митохондрии округлой формы. Как правило, митохондрии располагаются равномерно по всей цитоплазме клетки (рис. 2, д, 4). При энтозе (на всех его стадиях) митохондрии наружной клетки преимущественно собраны вокруг энтозной вакуоли (рис. 2, д, 5, 6). Стоит отметить, что во внедрившейся клетке на ранних стадиях энтоза (первой и второй) митохондрии, локализованные вокруг ядра клетки, были способны поддерживать потенциал на мембране (рис. 2, д, 5). Однако, начиная с третьей стадии энтоза, мембранный потенциал митохондрий внутренней клетки постепенно сбрасывался, а на заключительных стадиях митохондрии внедрившейся клетки не выявлялись (рис. 2, д, 6). Таким образом, в ходе энтоза происходит перераспределение митохондрий наружной клетки, а митохондрии внедрившейся клетки сохраняются в рабочем состоянии вплоть до третьей стадии.

Цитоскелет внутренней и наружной клеток. Актиновый цитоскелет. Внедрение одной клетки внутрь другой при энтозе происходит за счет работы актомиозинового комплекса во внедряющейся клетке [5, 13]. Мы исследовали расположение актиновых микрофиламентов в обеих клетках-участницах энтоза на разных стадиях данного процесса. В клетке-каннибале актиновые микрофиламенты выявлялись по периферии клетки, в виде отдельных стресс-фибрилл в цитоплазме клетки, а также по периферии энтозной вакуоли на всех стадиях энтоза. Во внедрившейся клетке на ранней стадии энтоза обнаруживались одна или две зоны с высоким содержанием актина в проксимальной части относительно ядра наружной клетки (рис. 3, а, 3). Кроме того, актиновые микрофиламенты располагались в кортикальной зоне внутренней клетки. Затем актиновый цитоскелет внедрившейся клетки выявлялся по периферии клетки и в цитоплазме в виде коротких хаотично расположенных филаментов (рис. 3, а, 6, 9). На заклю-

чительной стадии энтоза во внутренней клетке сохранялись отдельные короткие актиновые микрофиламенты в цитоплазме.

Система микротрубочек. В ходе энтоза происходит неоднократное перемещение мембранных органелл клетки-каннибала. Известно, что транспорт клеточных органелл осуществляется с помощью микротрубочек [15, 16]. В связи с этим мы исследовали локализацию микротрубочек в ходе энтоза. В культуре клеток HaCaT система микротрубочек выглядит как трехмерная сеть (рис. 3, б, 3). На ранних стадиях энтоза встречались два варианта расположения микротрубочек в клетке-каннибале: 1) с сохранением трехмерной сети (иногда со слабо выраженным преимуществом вокруг энтозной вакуоли) (рис. 3, б, 6), если клетка-каннибал была хорошо распластана по субстрату; 2) с преимущественной локализацией вокруг энтозной вакуоли в

виде плотных тяжей (рис. 3, б, 9), если наружная клетка была слабо распластана. Такое расположение микротрубочек в наружной клетке сохраняется вплоть до заключительной стадии энтоза. На последней же стадии микротрубочковый цитоскелет клетки-каннибала всегда имеет черты сходства с трехмерной сетью (рис. 3, б, 12). Примечательно, что в ошаренной внедрившейся клетке микротрубочки были собраны и располагались вблизи ядра в виде плотных тяжей на первой и второй стадиях энтоза. По мере деградации внутренней клетки ее микротрубочки постепенно разбирались (третья и четвертая стадии энтоза), а на пятой стадии не выявлялись. Таким образом, микротрубочки наружной клетки в некоторых случаях перестраиваются, окружая энтозную вакуоль, на ранних стадиях энтоза; микротрубочки внедрившейся клетки длительное время не разбираются.

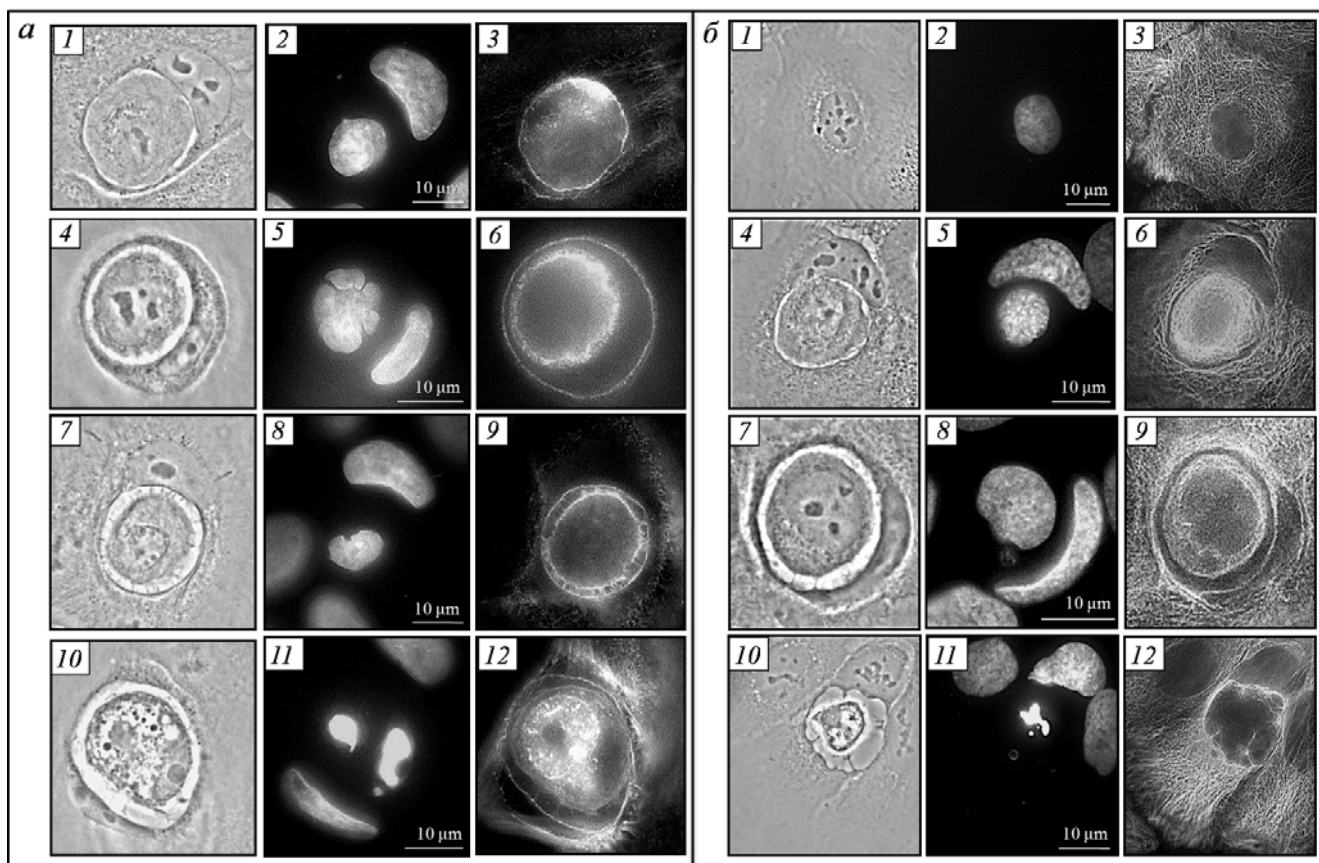


Рис. 3. Энтоз в культуре клеток HaCaT. *a* – Выявление актинового цитоскелета: 1–3 – первая стадия, 4–6 – вторая стадия, 7–9 – третья стадия, 10–12 – пятая стадия; 1, 4, 7, 10 – фазово-контрастная микроскопия; 2, 5, 8, 11 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание DAPI; 3, 6, 9, 12 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание фаллоидином; *б* – выявление системы микротрубочек: 1–3 – одноядерная клетка, 4–6 – первая стадия энтоза, 7–9 – вторая стадия, 10–12 – пятая стадия; 1, 4, 7, 10 – фазово-контрастная микроскопия; 2, 5, 8, 11 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание DAPI; 3, 6, 9, 12 – флуоресцентная микроскопия, окрашивание антителами к α -тубулину

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы впервые описали энтоз в культуре нормальных кератиноцитов человека HaCaT. Наибольшее число энтозов в данной клеточной линии наблюдается на первые сутки культивирования и составляет 0,5%. Согласно данным литературы, частота встречаемости энтозов в культурах опухолевых клеток значительно выше [5]. Высказывается мнение о том, что инициацией энтоза в большинстве клеточных линий является открепление клетки от субстрата. Клетки линии HaCaT, являясь нормальными клетками, имеют большую адгезию к субстрату по сравнению с опухолевыми клетками [17]. По-видимому, именно разницей в степени адгезии к субстрату можно объяснить различия в уровне энтозов в культурах нормальных и опухолевых клеток.

Сопоставляя морфологические характеристики клеток и их органелл, нам впервые удалось представить энтоз как последовательность событий, связанных с изменением организации, функциональной активности и целостности органелл клетки-каннибала и внедрившейся клетки. На основе полученных данных мы выделили пять стадий энтоза (после внедрения одной клетки в другую).

Мы предполагаем, что изменения, происходящие в обеих клетках-участницах энтоза, отражают процессы, необходимые для обеспечения деградации внедрившейся клетки. После внедрения одной клетки в другую первая клетка оказывается окруженной плазматической мембраной клетки-каннибала (рис. 4, *a*; см. цветную вклейку). При этом между клетками сохраняется большое число адгезивных контактов.

На ранней стадии энтоза начинает происходить первая модификация мембраны энтозной вакуоли за счет белков аутофагии (рис. 4, *b*, *в*). По данным литературы белки аутофагии, такие как Atg5, Atg7, Vps34 и LC3, принимают участие в перестройке мембраны энтозной вакуоли [18, 19]. Кроме того, в состав мембраны энтозной вакуоли входят интегральные белки лизосомных мембран – LAMP [5]. Это объясняет постепенное разрушение контактов между клетками. В то же время изменяется локализация аппарата Гольджи наружной клетки. Известно, что аппарат Гольджи участвует в созревании белков и образовании лизосом [20, 21]. Мы предполагаем, что перераспределение аппарата Гольджи на

первой стадии энтоза, в результате которого он располагается по периферии энтозной вакуоли, необходимо для образования дополнительных лизосом и аутофагосом, наблюдающегося на второй стадии энтоза, именно вблизи энтозной вакуоли. Это связано с тем, что в конце второй – начале третьей стадии энтоза лизосомы клетки-каннибала сливаются с модифицированной мембраной энтозной вакуоли (рис. 4, *г*). Таким способом в составе мембраны последней, по-видимому, и оказываются мембранные белки лизосом, которые защищают наружную клетку от действия гидролаз (рис. 4, *д*) [22]. Помимо этого происходит высвобождение лизосомных гидролаз клетки-каннибала внутрь энтозной вакуоли (рис. 4, *е*).

Длительная сохранность аппарата Гольджи и системы микротрубочек во внедрившейся клетке необходима для того, чтобы также продуцировать дополнительные лизосомы и аутофагосомы и обеспечивать их транспорт внутри клетки. Следовательно, в деградации внутренней клетки принимают участие лизосомы как клетки-каннибала, так и самой внедрившейся клетки.

Перераспределение митохондрий в наружной клетке, а также способность митохондрий внутренней клетки поддерживать потенциал на мембране в течение длительного времени в ходе энтоза могут быть связаны с необходимостью синтеза большого количества энергии, необходимой для работы других клеточных органелл.

Появление крупных аутофагосом в клетке-каннибале вблизи энтозной вакуоли на пятой стадии энтоза, вероятно, обусловлено тем, что в них могут находиться избыточные или отработавшие органеллы наружной клетки либо фрагменты энтозной вакуоли с остатками внедрившейся клетки.

Таким образом, мы составили картину структурно-функциональных изменений, происходящих в клетках в ходе энтоза. Тем не менее остается невыясненной судьба энтозной вакуоли и материала, находящегося в ней, – происходит ли полная деградация содержимого вакуоли или его экструзия. В дальнейшем предстоит исследовать механизмы, обеспечивающие различные этапы энтоза, и сопоставить их в нормальных и опухолевых клетках.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Curruie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer*, **26**, 239–257.
2. Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Alnemri, E.S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Bertrand, M.J., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Cecconi, F., Chan, F.K., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.M., Di Daniele, N., Dixit, V.M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Fimia, G.M., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Gougeon, M.L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Joseph, B., Jost, P.J., Kaufmann, T., Kepp, O., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., Lopez-Otin, C., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J.C., Martin, S.J., Martinou, J.C., Medema, J.P., Meier, P., Melino, S., Mizushima, N., Moll, U., Munoz-Pinedo, C., Nunez, G., Oberst, A., Panaretakis, T., Penninger, J.M., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Ravichandran, K.S., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Shi, Y., Simon, H.U., Stockwell, B.R., Szabadkai, G., Tait, S.W., Tang, H.L., Tavernarakis, N., Tsujimoto, Y., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Villunger, A., Wagner, E.F., Walczak, H., White, E., Wood, W.G., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Melino, G., and Kroemer, G. (2015) Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015, *Cell Death Differ.*, **22**, 58–73.
3. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., and Melino, G. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death, *Cell Death Differ.*, **12** (Suppl. 2), 1463–1467.
4. Yuan, J., and Kroemer, G. (2010) Alternative cell death mechanisms in development and beyond, *Genes Dev.*, **24**, 2592–2602.
5. Overholtzer, M., Mailloux, A.A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S.J., King, R.W., Cibas, E.S., and Brugge, J.S. (2007) A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion, *Cell*, **131**, 966–979.
6. Doukometzidis, K., and Hengartner, M.O. (2008) Dying to hold you, *Nature*, **451**, 530–531.
7. Guadamillas, M.C., Cerezo, A., and Del Pozo, M.A. (2011) Overcoming anoikis – pathways to anchorage-independent growth in cancer, *J. Cell. Sci.*, **124**, 3189–3197.
8. Ishikawa, F., Ushida, K., Mori, K., and Shibamura, M. (2015) Loss of anchorage primarily induces non-apoptotic cell death in a human mammary epithelial cell line under atypical focal adhesion kinase signaling, *Cell Death Dis.*, **6**, 1–12.
9. Krajcovic, M., Johnson, N.B., Sun, Q., Normand, G., Hoover, N., Yao, E., Richardson, A.L., King, R.W., Cibas, E.S., Schnitt, S.J., Brugge, J.S., and Overholtzer, M. (2011) A non-genetic route to aneuploidy in human cancers, *Nat. Cell Biol.*, **13**, 324–330.
10. Mazzone, M., Selfors, L.M., Albeck, J., Overholtzer, M., Sale, S., Carroll, D.L., Pandya, D., Lu, Y., Mills, G.B., Aster, J.C., Artavanis-Tsakonas, S., and Brugge, J.S. (2010) Dose-dependent induction of distinct phenotypic responses to Notch pathway activation in mammary epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 5012–5017.
11. Wan, Q., Liu, J., Zheng, Z., Zhu, H., Chu, X., Dong, Z., Huang, S., and Du, Q. (2012) Regulation of myosin activation during cell–cell contact formation by Par3–Lgl antagonism: entosis without matrix detachment, *Mol. Biol. Cell*, **23**, 2076–2091.
12. Overholtzer, M., and Brugge, J.S. (2008) The cell biology of cell-in-cell structures, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 796–809.
13. Sun, Q., Cibas, E.S., Huang, H., Hodgson, L., and Overholtzer, M. (2014) Induction of entosis by epithelial cadherin expression, *Cell Res.*, **24**, 1288–1298.
14. Gama, A., and Schmitt, F. (2012) Cadherin cell adhesion system in canine mammary cancer, *Vet. Med. Int.*, **2012**, 1–8.
15. Hirokawa, N. (1996) Organelle transport along microtubules – the role of KIFs, *Trends Cell Biol.*, **6**, 135–141.
16. Welte, M.A. (2004) Bidirectional transport along microtubules, *Curr. Biol.*, **14**, 525–537.
17. Balzer, E.M., and Konstantopoulos, K. (2012) Intercellular adhesion: mechanisms for growth and metastasis of epithelial cancers, *WIREs Syst. Biol. Med.*, **4**, 171–181.
18. Florey, O., Gammoh, N., Kim, S.E., Jiang, X., and Overholtzer, M. (2014) V-ATPase and osmotic imbalances activate endolysosomal LC3 lipidation, *Autophagy*, **11**, 88–99.
19. Florey, O., Kim, S.E., Sandoval, C.P., Haynes, C.M., and Overholtzer, M. (2011) Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes, *Nat. Cell Biol.*, **13**, 1335–1343.
20. Green, S.A., Zimmer, K.P., Griffiths, G., and Mellman, I. (1987) Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins, *JCB*, **105**, 1227–1240.
21. Rohrer, J., and Kornfeld, R. (2001) Lysosomal hydrolase mannose 6-phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network, *Mol. Biol. Cell*, **12**, 1623–1631.
22. Fukuda, M. (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking, *J. Biol. Chem.*, **266**, 21327–21330.

**STAGES OF CELL CANNIBALISM – ENTOSIS –
IN NORMAL HUMAN KERATINOCYTE CULTURE****A. S. Garanina*, L. A. Khashba, G. E. Onishchenko**

*M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-4309,
E-mail: anastasiacit@gmail.com*

Received July 6, 2015

Entosis is a type of cell cannibalism during which one cell penetrates into another cell and usually dies inside it. Researchers mainly pay attention to initial and final stages of entosis. Besides tumor cells in suspension are the primary object of studies. In the present study, we investigated morphological changes of both cells-participants of entosis during this process. The substrate-dependent culture of human normal keratinocytes HaCaT was chose for the work. A combination of light microscopy and scanning electron microscopy was used to prove that one cell was completely surrounded by the plasma membrane of another cell. We investigated such “cell-in-cell” structures and described the structural and functional changes of both cells during entosis. The outer cell nucleus localization and shape were changed. Gradual degradation of the inner cell nucleus and of the junctions between the inner and the outer cells was revealed. Moreover, repeated redistribution of the outer cell membrane organelles (Golgi apparatus, lysosomes, mitochondria, and autophagosomes), rearrangement of its cytoskeleton, and change in the lysosomal, autophagosomal, and mitochondrial state in both entotic cells were observed during entosis. On the basis of these data, we divided entosis into five stages that make it possible to systematize description of this type of cell death.

Key words: entosis, stages of entosis, cell cannibalism, cell organelles