

На правах рукописи

БУРАКОВ Антон Владимирович

**ЦИТОСКЕЛЕТ КАК СИСТЕМА ПУТЕЙ
ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА
В КЛЕТКАХ ЖИВОТНЫХ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена в лаборатории структуры и функции цитоскелета
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего профессионального образования
«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Надеждина Елена Сергеевна

Официальные оппоненты:

Александрова Антонина Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина РАМН», Москва

Гривенников Игорь Анатольевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной генетики Российской академии наук», Москва

Ширинский Владимир Павлович, доктор биологических наук, профессор, директор института экспериментальной кардиологии Российского Кардиологического Научно-производственного Комплекса Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Защита состоится 20 мая 2014 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.52 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские Горы, д.1, стр.12, Биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан февраля 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Калистратова Е.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность проблемы

Внутриклеточный транспорт определяет ряд ключевых процессов, жизненно важных как для самой клетки, так и для всего организма в целом. Это процессы эндо- и экзоцитоза, поляризация клетки в ответ на воздействие внешних сигналов и направленная локомоция, которая обеспечивает заживление ран, развитие воспалительных процессов, нормальное протекание эмбриогенеза и рост сосудов. Вместе с тем, поляризация и локомоция клеток играют определяющую роль при малигнизации опухолей в процессе канцерогенеза.

Транспорт по цитоплазме осуществляется моторными белками, перемещающими органеллы вдоль элементов цитоскелета. Цитоскелет клеток животных представлен актиновыми микрофиламентами, промежуточными филаментами и микротрубочками. При этом длинные беспорядочно расположенные промежуточные филаменты обеспечивают жёсткость клетки и помогают удерживать митохондрии в определённых клеточных компартментах, не участвуя в процессах внутриклеточного транспорта. Перемещение органелл осуществляется вдоль микротрубочек (МТ) и микрофиламентов (МФ) посредством моторных белков, относящихся к семействам кинезинов, динеинов и миозинов.

Моторные белки – это молекулы, использующие химическую энергию гидролиза АТФ для осуществления своих конформационных изменений, что приводит к последовательным «шагам» такой молекулы по МТ или МФ. Каждый моторный белок движется в одном строго заданном направлении. Поэтому наличие на поверхности органеллы одновременно различных моторных белков, а также выборочная активация нужных моторов позволяет осуществлять направленный транспорт по цитоплазме.

Степень разработанности темы исследования

Благодаря исключительной важности процессов внутриклеточного транспорта для жизнедеятельности клеток, исследования в этой области были особенно интенсивными в последние два десятилетия, благодаря бурному развитию современных методов исследований. Была не только детально описана морфология цитоскелета, но и проведена 3D-реконструкция молекул моторных белков, описан механизм их перемещения и некоторые способы регуляции. Однако ряд фундаментальных вопросов об организации внутриклеточного транспорта оставался без ответа, не давая возможности объединить все известные факты в одну непротиворечивую схему. Данная работа раскрывает ряд механизмов, определяющих архитектуру тубулиновой транспортной системы, и объясняет, чем обусловлена однонаправленность транспорта

по актиновой транспортной сети. Исследования, приведённые в работе, подразделяются на три основные части.

Первая и вторая части работы посвящены исследованию молекулярных механизмов, обеспечивающих выполнение двух условий, необходимых для обеспечения эффективного транспорта по МТ: 1) центр организации МТ должен располагаться в геометрическом центре клетки, 2) центр организации должен эффективно удерживать минус-концы МТ, обеспечивая их радиальность. Действительно, транспорт по радиальным МТ наиболее эффективен, т.к. минимизирует расход АТФ благодаря укорочению транспортных путей, и кроме того, радиальность МТ обеспечивает механизм *search and capture*, являющийся одним из способов регуляции внутриклеточного транспорта.

Обычно в качестве центра организации МТ выступает центросома – единственная немембранная органелла у большинства клеток позвоночных: ещё в 70-х годах XX века было показано, что именно её активность обеспечивает радиальность системы МТ. Хотя центросома впервые была описана Теодором Бовери ещё в конце XIX века и получила своё название благодаря центральному расположению в клетке, механизмы её позиционирования оставались неизвестными. Белковый состав центросомы весьма сложен. В её состав входят около трёхсот белков, выполняющих самые разные функции, вплоть до регуляции клеточного цикла. Однако в контексте разговора о клеточном транспорте основная роль центросомы – организация МТ как системы радиальных путей для моторных белков. Это происходит в результате образования (нуклеации) на центросоме новых МТ и удержания (заякоривания) уже существующих. Процесс заякоривания микротрубочек до сих пор недостаточно изучен; известно лишь, что этот процесс требует слаженной работы множества белков, организованных в функциональные комплексы переменного состава.

Третья часть работы посвящена изучению вопроса, чем обусловлено направление перемещения органелл по элементам цитоскелета. Общеизвестно, что по МТ транспорт органелл идёт в обе стороны, в то время как по МФ лишь в одну. Логично предположить, что направленность транспорта зависит от присутствия в транспортной системе соответствующих моторных белков. Однако миозин VI, обильно представленный в цитоплазме на поверхности мембранных органелл, в системе *in vitro* перемещается к минус-концам МФ. При этом свидетельств наличия двунаправленного транспорта по МФ в живых клетках нет. Следовательно, возможность двунаправленного транспорта определяется какими-то иными факторами.

В целом, эта работа раскрывает ряд механизмов, определяющих архитектуру системы МТ как основной транспортной системы клетки, и отвечает на вопрос, чем

обусловлена однонаправленность транспорта по другой транспортной системе – актиновой транспортной сети.

Исходя из вышесказанного, в настоящей работе были поставлены следующие **ЦЕЛИ**:

1. Исследовать молекулярные механизмы, определяющие архитектуру основной транспортной системы клетки – сети микротрубочек
2. Установить фактор, определяющий направленность транспорта мембранных органелл по другой транспортной системе – сети актиновых микрофиламентов.

В соответствии с поставленными целями были сформулированы следующие **ЗАДАЧИ**:

1. Изучить *in vivo* силы, помещающие и удерживающие центросому в геометрическом центре интерфазной клетки. Выяснить молекулярную природу всех этих сил и механизмы их регуляции. Построить рабочую модель позиционирования центросомы, объясняющую её центральное положение в интерфазной клетке и способную к саморегуляции при внесении изменений в систему *in vivo* и *in silico*.
2. Исследовать *in vivo* и *in vitro* роль динеина как функционально активного компонента центросомы. Изучить работу этого минус-концевого моторного белка в качестве структурно-образующего элемента цитоскелета, обеспечивающего удержание на центросоме минус-концов микротрубочек.
3. Изучить *in vivo* и *in vitro* роль серин-треониновой протеинкиназы LOSK в процессах организации микротрубочек вокруг центросомы. Исследовать работу этого белка как одного из участников процесса заякоривания микротрубочек.
4. Детально изучить механизмы миозин-зависимого транспорта органелл по сети актиновых филаментов *in vivo* и *in vitro*. Установить, какую роль в этом процессе играет динамика микрофиламентов и какие фундаментальные свойства актомиозиновой транспортной системы она обуславливает.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведённых исследований была впервые описана совокупность механизмов позиционирования центросомы в интерфазных клетках животных. Применение нового оригинального метода локального разрушения системы МТ в сочетании с методами прижизненной флуоресцентной видеомикроскопии и воздействиями различных ингибиторов позволило получить новые данные, которые легли в основу компьютерной модели, описывающей все аспекты центрирования. В результате данный процесс полностью изучен: выявлены силы, воздействующие на МТ,

регуляторы данного процесса, и выяснен относительный вклад каждого из участников. Полученные результаты впервые позволяют объяснить центральное расположение centrosомы в клетках животных.

Кроме того, в настоящей работе впервые продемонстрировано участие в процессе заякоривания МТ на centrosоме двух белков – динеина и киназы LOSK. В обоих случаях данные прижизненных экспериментов *in vivo* полностью подтверждались затем результатами экспериментов *in vitro*. Роль моторного белка динеина в качестве структурно-образующего элемента цитоскелета показана впервые. Функции киназы LOSK, описанной ранее как белок, связанный с микротрубочками и centrosомой, в качестве участника процесса заякоривания МТ, также впервые продемонстрированы в данной работе. Полученные данные позволили существенно углубить имевшиеся представления об архитектуре тубулиновой транспортной сети и способах её формирования и поддержания.

В заключительной части работы дан ответ на вопрос о механизмах транспорта по МФ, определяющих однонаправленность этого транспорта. Было применено сочетание различных молекулярно-биологических и цитологических методов (прижизненной центрифужной видеомикроскопии, иммунофлуоресцентной микроскопии, электронной микроскопии, восстановления флуоресценции после обесцвечивания (FRAP) и системы изучения подвижности *in vitro*) с последующим компьютерным моделированием. Благодаря комплексному применению этих методов впервые было показано, что направленность транспорта по МФ зависит не от наличия соответствующих моторных белков, а от динамики самих филаментов, составляющих транспортную сеть.

Понимание пространственной организации внутриклеточного транспорта даёт возможность подробнее исследовать многие процессы, чрезвычайно интересные как с точки зрения фундаментальной цитологии, так и с биомедицинской точки зрения. В частности, способы перемещения в цитоплазме клеток различного рода патогенов могут определять инфекционность того или иного возбудителя заболеваний. Разработка фармакологических агентов, влияющих на внутриклеточный транспорт патогенных частиц, является одной из задач современной молекулярной медицины. Кроме того, выше упоминалось о роли внутриклеточного транспорта в процессе поляризации, влияющего на протекание ангиогенеза, эмбриогенеза, канцерогенеза, заживление ран и осуществление иммунного ответа. Разработка стимуляторов или ингибиторов этих процессов также является перспективным направлением современной прикладной биологии. Таким образом, полученные в данной работе результаты имеют не только фундаментальное, но и существенное научно-практическое значение для современной клеточной биологии.

В результате выполнения настоящей работы были сформулированы следующие **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:**

Положение 1:

Позиционирование centrosомы осуществляется благодаря совместной работе цитоплазматического динеина, актомиозиновой системы и сил, продуцируемых динамичными плюс-концами микротрубочек. Динамика плюс-концов микротрубочек оказывает дестабилизирующий эффект на положение centrosомы. Центрирование осуществляется за счёт тянущего усилия динеиновых моторов, приложенного пропорционально длине микротрубочек, и центростремительного тока актина; активность динеина при этом регулируется малой ГТФазой Cdc42. Таким образом, в интерфазных клетках животных существует сложный саморегулирующийся процесс поддержания центра симметрии тубулиновой транспортной системы.

Положение 2:

Цитоплазматический динеин и протеинкиназа LOSK участвуют в заякоривании минус-концов микротрубочек на centrosоме и организуют их в радиальную звезду, не влияя при этом на процесс нуклеации. Нарушение работы любого из этих белков приводит к хаотизации всей системы микротрубочек. Активность динеина обеспечивает структурную целостность centrosомы, а активность протеинкиназы LOSK необходима для поддержания уровня centrosомного динактина. Ингибирование LOSK приводит к нарушениям клеточной адгезии, динамики фокальных контактов, поляризации и локомоции клетки. Таким образом, динеин и киназа LOSK входят в число белков, необходимых для функционирования centrosомы как центра организации тубулиновой транспортной сети.

Положение 3:

Миозин-зависимый транспорт органелл по цитоплазме происходит лишь при условии непрерывного тредмиллинга микрофиламентов. Тредмиллинг исключает возможность перемещения грузов по микрофиламентам в сторону их минус-концов. Таким образом, однонаправленность транспорта по актину определяется свойствами элементов цитоскелета, образующих транспортную сеть, а не наличием или отсутствием в цитоплазме соответствующих моторных белков.

Участие автора.

Участие автора заключалось в проведении экспериментов и получении научных результатов; в цифровой и статистической обработке и в дальнейшем анализе этих результатов, в построении на их основе математических моделей; в последующей

формулировке научных положений и выводов, а также в написании научных статей по результатам работы.

Степень достоверности и апробация работы.

Основные результаты и положения диссертационной работы были доложены на ежегодных научных конференциях Института Белка РАН (Пушино, 2000г., 2002г., 2003 г., 2008 г., 2011г., 2013г.), ежегодных конференциях ASCB – Американского Общества Клеточной Биологии (США, 2001г., 2002г., 2005г., 2009г., 2010г., 2013г), Всероссийском симпозиуме «Клеточная биология на пороге XXI века» (Санкт-Петербург, 2000г.), конференции EMBO/EMBL “Centrosomes and spindle pole bodies” (Гейдельберг, 2002), заседаниях Московского семинара по клеточной биологии (Москва, 2002г., 2009г., 2013г.), I и II съездах Общества клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2003г., 2007 г.), симпозиуме EMBO/FEBS «Frontiers in Cytoskeleton Research» (Госау, 2003г.), IX Международной школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2005), Международных симпозиумах по биологической подвижности (Пушино, 2006г., 2008г., 2010г., 2012г.) летней конференции ASCB/ECF «Dynamic Interplay Between Cytoskeletal and Membrane Systems» (Дижон, 2007г.), международной конференции «Protein biosynthesis, structure and function» (Пушино, 2007г.), школе-семинаре по проблемам организации внутриклеточного транспорта, цитоскелета и путей передачи сигнала (Санкт-Петербург, 2009г.), I Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 2011г.), XXXVIII конгрессе FEBS (Санкт-Петербург, 2013г.), Всероссийском симпозиуме по биологии клетки в культуре (Санкт-Петербург, 2013).

Материалы диссертации доложены на объединённом заседании отделов электронной микроскопии и функциональной биохимии биополимеров НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ в рамках Московского семинара по клеточной биологии 2 октября 2013 г.

По теме диссертации опубликовано 48 печатных работ; в том числе 14 статей в отечественных и зарубежных реферируемых научных журналах, статья в тематическом сборнике, 33 тезисов докладов на российских и международных конференциях. 9 статей индексируются в ISI Web of Science.

Объём и структура диссертации.

Диссертация изложена на 232 страницах машинописного текста и состоит из Введения, Обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание Материалов и Методов исследования, Результатов и Обсуждения в трёх частях,

Выводов, Заключение, Списка видео, Списка публикаций и Списка литературы. Работа иллюстрирована 63 рисунками и 4 таблицами. Библиография включает 435 публикаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры

В работе были использованы клетки различных линий млекопитающих, земноводных и рыб, в частности CV-1, Vero и BS-C-1 (зелёная мартышка), СНО-K1 (китайский хомячок), РЕ (эмбриональные клетки почки свиньи), HeLa (карцинома шейки матки человека), клетки линии меланофоров ксенопуса и первичные меланоциты тернеции. Клеточные культуры млекопитающих выращивали при стандартных условиях (температура 37°C, содержание углекислого газа в среде 5%); меланофоры ксенопуса при 27°C. Использовали соответствующие культуральные среды с добавлением антибиотиков и сывороток. Перед проведением экспериментов клетки рассаживали на покровные стёкла, подложки для получения цитопластов, ΔТС3-Bioptechs чаши и пр.

Способы фиксации клеток

Для различных видов иммунофлуоресцентного окрашивания использовались разные типы фиксации. Во всех случаях остатки культуральной среды удалялись ополаскиванием в PBS. Затем следовала собственно фиксация: **(А) Метанолом**: клетки помещали в 100% метанол (–20°C) на 10 минут. Затем отмывали от фиксатора в PBS комнатной температуры в течение 10 минут. **(Б) Метанолом/формалином**: 100% метанол (–20°C, 5 мин), затем постфиксация 3% параформальдегидом на PBS (+4°C, 5-20 мин) и пермеабиллизация 0,5% Triton X100 (1 мин при комнатной температуре). Затем отмывка в PBS три раза по 10 минут **(В) Формалином**: клетки помещали на 5-20 минут в 3-4% раствор параформальдегида на PBS при комнатной (или +4°C) температуре. При этом проводилась предварительная, или одновременная, или последующая пермеабиллизация Triton X-100 (0,2%-1%) или моделящим раствором (4 М глицерин с 0,5% Triton X-100 в буфере М: 0.5 М имидазола, 0.5М КСl, 1мМ ЭДТА, 5мМ MgCl₂, 10mМЭГТА, 1мМ меркаптоэтанол; рН=6.7) в течение 0,5 – 1 мин **(Г) Глютаровым альдегидом**: клетки помещали в моделящий раствор (1,5 мин), затем промывали буфером М, затем 15-20 мин в 0.5% растворе глютарового альдегида на PBS комнатной температуры. Отмывка проводилась сначала PBS трижды по 15 мин, затем NaBH₄ на PBS (2.5 мг/мл) дважды по 15 мин, затем PBS дважды по 15 мин.

Антитела и красители

В работе были использованы следующие антитела: первичные мышинные моноклональные: к α -тубулину DM-1A (Sigma), к ϵ -тубулину (Sigma), к ацетилированному тубулину (Abcam), к p50 (BD Transduction Laboratories), к p150Glued (BD Transduction Laboratories), к тяжелой цепи динеина DHC (Abcam), к паксиллину (BD Biosciences), к актину (Sigma), к GFP (Русбиолинк), к GSK-3 β и к P-GSK-3 β («Cell Signaling Technology»), первичные крысиные моноклональные к α -тубулину YOL1/34 (Abcam), первичные кроличьи поликлональные: к перичентрину и к найнеину (Abcam Inc.), к маннозидазе II (Covance, Abcam), к структурному домену LOSK (получены ранее в нашей лаборатории), к γ -тубулину (любезно предоставлены Р. Узбековым), к Туг-тубулину (любезно предоставлены С. Bulinski), к DHC (любезно предоставлены R. Valee).

В качестве вторичных антител использовались козы и овечьи антитела к иммуноглобулинам мыши, кролика или крысы, конъюгированные с флуорохромами FITC, TRITC, Alexa 488, Cy3, Cy5, AMCA, приобретенные в фирмах: Sigma, Jackson ImmunoResearch, Kirkegaard & Perry Laboratories Gaithersburg. F-актин окрашивали родамин-меченым фаллоидином (Sigma-Aldrich), для визуализации ядер использовали окрашивание красителями DAPI или Hoechst 3325.

Химические вещества и ингибиторы

Для локальной разборки микротрубочек использовали микрокапилляр с раствором нокодазола (10 мкг/мл) и флуоресцеина (1 мкг/мл) в культуральной среде. Для специфического подавления динамики микротрубочек использовали смесь таксола и нокодазола (120 и 600 нМ соответственно). Для стабилизации актина джасплакинолид добавляли до конечной концентрации в культуральной среде 1 мкМ (Cramer, 1999) на 5 минут. Активность киназы лёгких цепей миозина подавляли ML7 в концентрации 50 мкМ (Sigma). Окадаевую кислоту (EMD Biosciences-Calbiochem) добавляли на 2 ч в концентрации 0,5 мкМ. Агрегацию меланосом в клетках ксенопуса индуцировали 10^{-8} М мелатонина, а дисперсию – 10^{-8} М меланоцит-стимулирующего гормона.

Микроинъекции

Для наблюдения микротрубочек клетки инъецировали раствором тубулина (6-7 мг/мл) из мозга крупного рогатого скота, конъюгированного с Cy3 (Amersham) по стандартной методике. Актиновые филаменты метили путём инъекций родамин-меченого кроличьего актина скелетных мышц (Cytoskeleton, Inc.), разведённым буфером для микроинъекций (1 мМ HEPES, 0.2 мМ MgCl₂, 0.2 мМ АТФ, рН 7.5) до конечной концентрации 1,3 мг/мл. Раствор фаллоидина для стабилизации актиновых филаментов в меланофорах микроинъецировали в концентрации 100 мкМ.

Флуоресцентные латексные бусины, $D = 0.22$ мкм (Polysciences, Inc.) инъецировали в меланофоры после разведения 2,5% суспензии 1:100. Для ингибирования RhoA в клетки инъецировали бактериальный токсин С3-трансферазу в концентрации 0,1 мг/мл (Cytoskeleton Inc.). Для ингибирования Cdc42 инъецировали доминантно-негативный Cdc42, N17Cdc42 в концентрации 0,75 мг/мл (Cytoskeleton Inc.). Активность динеина подавляли путём инъекций моноклональных антител 74.1 (Covance Research Products Inc.), рекомбинантного p150Glued-CC1 (10 мг/мл) и рекомбинантного динамитина p50, очищенного путём MonoQ хроматографии. Антитела 74.1 и контрольные мышинные неиммунные IgG были очищены на колонке с Protein A-агарозой. В экспериментах с «клеточными тенями» клетки инъецировали смесью ДНК-конструктов pEGFP-LamB с LOSK-ΔT либо LOSK-K63R-ΔT. Для работы использовались микроинъектор и микроманипулятор фирмы Eppendorf.

Работа с белками и ДНК.

Микротрубочки выделяли из головного мозга свиней или крыс и очищали тубулин по ранее описанной методике (Castoldi and Popov, 2003). Электрофорез и иммуноблоттинг белков проводили, как описано ранее (Шанина с соавт., 2001). Очистку плазмидной ДНК проводили при помощи наборов Endo Free Plasmid Maxi (или Mega) Kit, QIAprep Spin Miniprep (или Midiprep) Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Рестриктные эндонуклеазы и прочие ферменты для клонирования были приобретены в Сибэнзиме (Новосибирск, Россия) и в Fermentas International (Burlington, Canada). Полученные конструкции верифицировали автоматическим секвенированием в Центре коллективного пользования «Геном» (Россия). Помимо собственных, в работе были использованы некоммерческие ДНК-конструкции, любезно предоставленные плазмиды, кодирующая GFP-тубулин (Е. Корнилова); плазмиды YFP-CLIP170 и GFP-EB1 (А. Ахманова); GFP-центрин2 (G. Borisy); pEGFP-LamB (С. Курчашова). Полноразмерная кДНК человеческой LOSK была любезно предоставлена Исследовательским Институтом ДНК Kazuza (Япония), полноразмерная кДНК человеческого p150Glued была любезно предоставлена Dr. W. Steffen (Германия), кДНК паксиллина была любезно предоставлена проф. И. Кавериной (США). Для деплеции посредством RNAi использовали вектор pG-Shin2, любезно предоставленный Dr. S.-I. Kojima (США). В ряде случаев для отделения фракции клеток с экспрессией EGFP использовали систему FACSVantage SE (BD Biosciences).

Световая микроскопия

Для наблюдения клеток и осуществления фото- и видеосъёмки были использованы: Флуоресцентный микроскоп AxioPhot (Zeiss) с объективами Neofluar и Plan-Apo 40× и 63× 1.25 NA, снабжённый охлаждаемой CCD-камерой MicroMax 782Y (Princeton Instruments), управляемой программным обеспечением WinView32. Инвертированный

микроскоп ICM-405 (Opton), с фазовоконтрастным суховоздушным объективом 32× и подогревом предметного столика. Инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 200M (Zeiss), снабжённый системой термостатирования и 12-битной цифровой видеокамерой AxioCamHR, управляемой программой AxioVision. Инвертированный флуоресцентный микроскоп Diaphot 300 (Nikon), с системой терморегуляции Biopteh, объективами Plan-Apo 40x и 100x и цифровой охлаждаемой CCD камерой CH350 (Photometrix) с 512x512 матрицей, управляемой программным обеспечением Metamorph. Съёмка зоны FRAP производилась посредством камеры Andor iXon EMCCD (Andor Technology). Фазовоконтрастные снимки меланофоров были получены при помощи видеокамеры Watec-902B CCD (Watec Corp., Japan). Для уменьшения фотоповреждения клеток в среду добавляли раствор оксиразы (Oxurase, Company) и её субстрат – молочную кислоту.

Трансфекции клеток млекопитающих.

В работе использовались три способа трансфекции – при помощи липосом, путём электропорации, и путём микроинъекций ДНК в ядра клеток. Для липосомных трансфекций в соответствии с инструкциями производителей использовали следующие липосомы: Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), Unifectin M и Unifectin-56 (Институт биоорганической химии, Москва), TransIT-LT1 (Mirus Bio LLC, США). Электропорацию проводили на электропораторе «Multiporator» (Eppendorf) двумя импульсами по 570V длительностью 50 мксек, с использованием фирменных растворов. Инъекции ДНК проводили на микроинъекторе фирмы Eppendorf (см. Микроинъекции).

Получение цитопластов, восстановление микротрубочек.

Клетки рассаживали на специальные подложки для центрифугирования и подвергали воздействию: (А) цитохалазина Д (1 мкг/мл) и нокодазола (1мкг/мл), 2-3 часа, (Б) цитохалазина Б (2 мкг/мл), 1 час, (В) латрункулина Б (2 мкМ), 2 часа. Подложки центрифугировали клетками вниз при 37°C (1 час при 3000 об/мин в клеточной центрифуге, либо 10 мин при 14 000 об/мин в центрифуге Eppendorf). Затем клетки промывали в двух сменах культуральной среды и помещали в чистую среду, которую через час заменяли на новую. Для экспериментов по восстановлению клетки охлаждали на ледяной бане 2 часа, затем добавляли 1,5 мкг/мл нокодазола, нагревали чашки до +37°C и отмывали нокодазол в течение соответствующих промежутков времени. В ряде случаев использовали только нокодазол или только ледяную баню.

Электронная микроскопия

Препараты для исследований платиновых реплик изготавливали как описано ранее (Svitkina, 2007). Декорирование актиновых филаментов субфрагментами миозина S1 или тяжёлым меромиозином проводили как описано ранее (Rodionov et al, 1998).

In vitro motility assay.

Приготовление меченых родамин-фаллоидином актиновых филаментов, абсорбция меченых актиновых филаментов на покрытые нитроцеллюлозой покровные стёкла и сборка проточной камеры осуществлялась как было описано в (Sellers and Jiang, 1998). Выделение пигментных гранул осуществляли как было описано ранее (Kashina et al, 2004), но в ИМВ буфер для ресуспендирования финального осадка меланосом, был добавлен 1мМ DTT, 1 мМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз (type I, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) и 25 мМ GTP- γ -S.

Анализ данных

Полученные изображения анализировали с помощью программ ImageJ, ScionImage (Scion) и Metamorph (Universal Imaging Corp.). Для нахождения геометрического центра клеток и цитопластов использовалась программа Autodesk Inventor 9 (Autodesk). Диаграммы и графики были построены с помощью программ Sigma Plot 7.0 и Origin 6.1. Динамика распространения нокодазола была смоделирована как описано в (Burakov et al., 2003). Коэффициенты диффузии пигментных гранул высчитывали как описано в (Slepchenko et al, 2007). Анализ движения гранул проводили как описано в (Zaliapin et al, 2004; Zaliapin et al, 2005).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ЧАСТЬ 1. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПОЗИЦИОНИРОВАНИЯ ЦЕНТРОСОМ В ИНТЕРФАЗНЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Первая часть работы посвящена изучению механизмов, определяющих центральную симметрию тубулиновой транспортной системы клетки. Чтобы визуализировать МТ, культивируемые клетки линии BS-C-1 были микроинъецированы флуоресцентно меченым тубулином (рис.1). Иммунофлуоресцентное окрашивание фиксированных клеток антителами к ϵ - и γ -тубулину подтвердило, что точка схождения МТ соответствует позиции центросомы, и что МТ прикрепляются к менее подвижной материнской центриоли.

В первую очередь было изучено, сохранит ли центросома своё центральное положение в клетке, если нарушить симметрию системы клеточных МТ. Чтобы внести дисбаланс в силы, влияющие на центросому, цитоплазматические МТ локально разрушали путём поднесения к одному из краёв клетки микрокапилляра с нокодазолом (10 мкг/мл), смешанным с флуоресцеином. Прижизненная видеосъёмка флуоресцирующих МТ продемонстрировала, что сразу после поднесения капилляра на ближайшем к нему краю клетки МТ быстро деполимеризовались, и возрастал уровень растворённого тубулина (рис.1). В то же время на противоположном краю клетки микротрубочки оставались интактными на протяжении минимум 20 минут после начала

воздействия нокодазолом, и параметры динамики микротрубочек в этом участке не отличались от таковых в контрольных клетках.

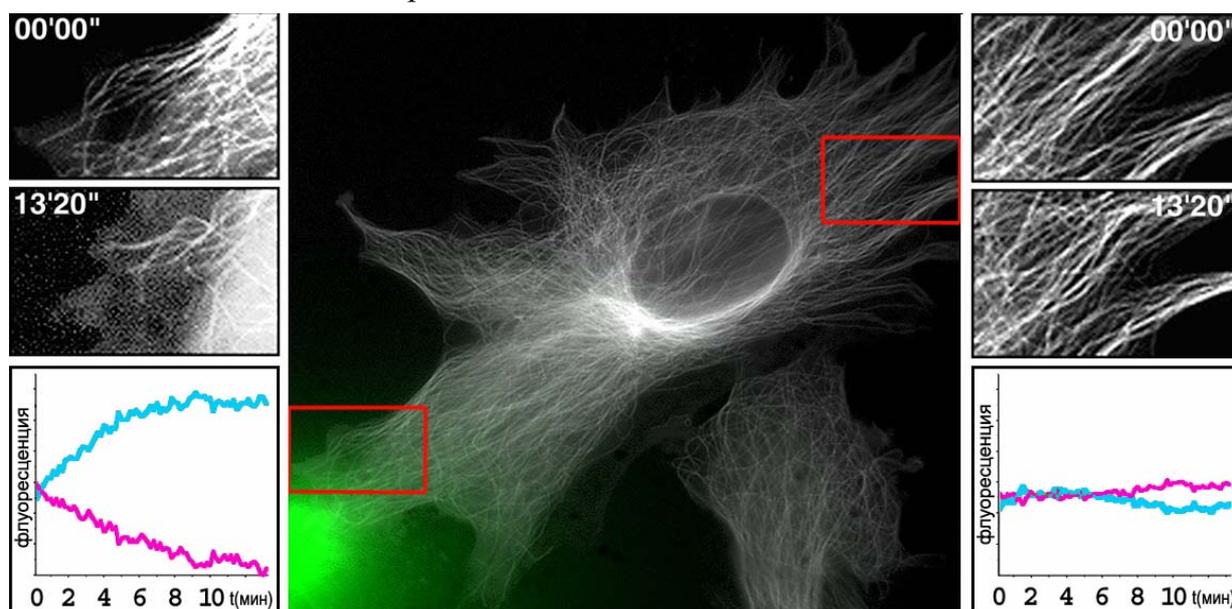


Рисунок 1. Локальное разрушение микротрубочек поднесением капилляра с нокодазолом. В центре: снимок клетки со светящимися микротрубочками, сделанный сразу после поднесения нокодазола (зелёное пятно). Обведённые красным участки показаны увеличенными слева и справа, при этом верхние снимки сделаны в начале, а нижние – в конце наблюдения. На графиках приведена динамика концентрации мономерного тубулина (голубым) и полимерного (лиловым) на соответствующих краях клетки. Масштабная линейка – 20 мкм.

Локальность эффекта воздействия нокодазола была подтверждена специально разработанной компьютерной моделью. Результаты моделирования показали, что концентрация нокодазола на дальнем крае клетки составила менее 1 нМ после двадцати минут локального воздействия нокодазолом, и значит, действительно, была ниже минимального уровня, способного влиять на динамику МТ (Vasques et al., 1997). После этого было изучено поведение центросом в клетках с нарушенной симметрией микротрубочек.

Результатом локального воздействия нокодазола явилось быстрое движение центросомы по направлению к микрокапилляру (рис.2А). Это явление наблюдалось во всех без исключения экспериментальных клетках. В качестве контрольного эксперимента к клеткам подносили микрокапилляр с культуральной средой без нокодазола. Это не приводило к деполимеризации микротрубочек, а также к сколько-нибудь заметному изменению центросомой своей первоначальной позиции. Наблюдаемое перемещение центросомы не зависело от клеточного ядра – в случае нахождения ядра позади центросомы относительно нокодазола, перед ним или сбоку от него, это никак не влияло на направление перемещения центросомы. Чтобы проверить независимый характер перемещения центросомы, был поставлен аналогичный эксперимент с цитопластом, лишённым ядра, но содержащим центросому. Поведение

центросомы в этом случае было аналогично поведению центросомы в клетках с ядрами, смещение центросомы составило 2,9 мкм за время наблюдения 10 мин (рис.2Б).

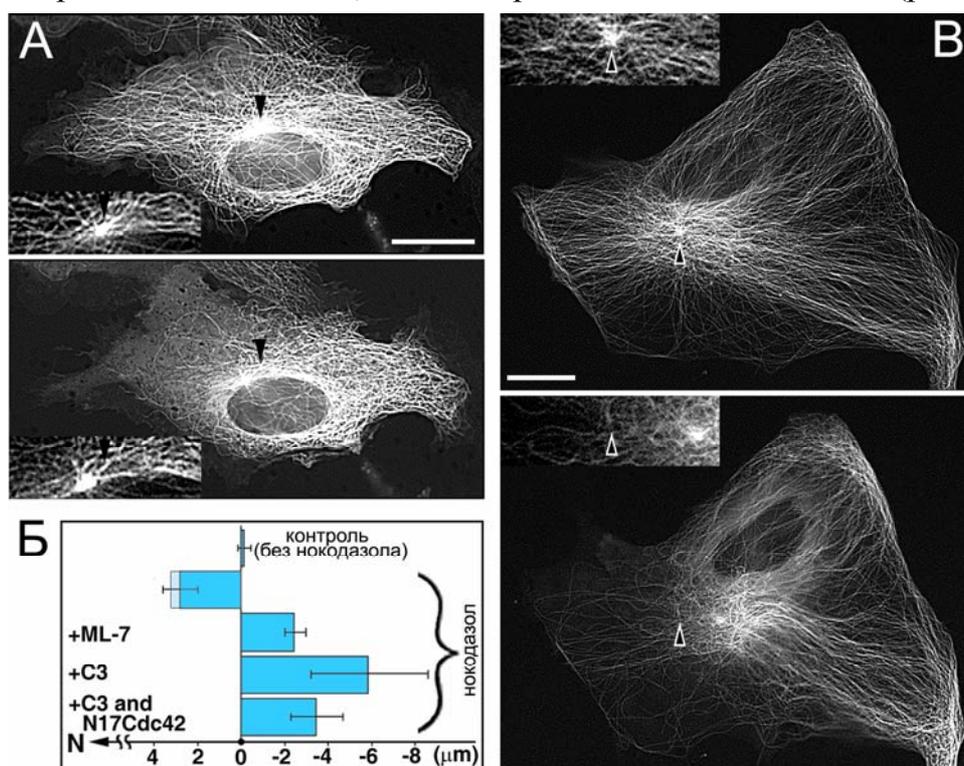


Рисунок 2. Смещение центросомы в клетке при локальной разборке микротрубочек.
А. Положение центросомы до (вверху) и после (внизу) локальной аппликации нокодазола. Начальное положение центросомы показано чёрной стрелкой. На вставках показана позиция центросомы при большем увеличении. Масштабная линейка – 20 мкм.
Б. Сравнительная диаграмма смещений центросомы относительно центроида в среднем за 630 секунд наблюдения. 0 – точка центроида, N – направление к пятну нокодазола
В. Перемещение центросомы в клетке с подавленной активностью ГТФазы RhoA. Показана клетка до (вверху) и после (внизу) локальной разборки микротрубочек. Клетка была предварительно инъецирована ингибитором RhoA – C3 трансферазой. Начальное положение центросомы указано стрелкой. Масштабная линейка – 20 мкм.

Для чистоты эксперимента, движение центросом изучали лишь в неподвижных клетках, где центроид не смещался относительно первоначального положения. Однако и в случаях движения клеток поведение центросомы оставалось прежним – она смещалась относительно центроида в сторону разборки МТ.

Следующим этапом работы стало изучение роли актомиозиновой сократимости в наблюдаемом смещении центросомы. Для этого перед локальной разборкой МТ в клетках ингибировали либо киназу лёгких цепей миозина (путём обработки ML7), либо белок RhoA (путём микроинъекций C3 трансферазы). При этом центростремительный ток актина, выявляемый флуоресцентной прижизненной спекл-микроскопией, полностью подавлялся в клетках обоими ингибиторами. Оказалось, что локальное разрушение МТ в клетках с подавленной актомиозиновой сократимостью индуцирует быстрое смещение центросомы в направлении от зоны разборки (рис.2Б,В). Отсюда был

сделан предварительный вывод, что силы, влияющие на центросому со стороны МТ, главным образом тянущие, а не толкающие.

Известно, что тянущее усилие, приложенное к звезде МТ, главным образом продуцируется благодаря работе динеиновых моторов, связанных с элементами клеточного кортекса или заякоренных где-либо в цитоплазме (Dujardin and Vallee, 2002; Gundersen, 2002). Следующим этапом работы было выяснить, зависит ли позиционирование центросомы от работы цитоплазматического динеина, для чего в клетки были микроинъецированы блокирующие динеин моноклональные антитела 74.1. Подавление активности динеина приводило к резкому смещению центросомы из своего обычного местоположения к ближайшему краю клетки. Сходный эффект наблюдали при инъекциях рекомбинантного динамитина, который разрушает динактиновый комплекс и меняет нормальную локализацию динеина (Echeverri et al., 1996; Burkhardt et al., 1997). Эффект подавления активности динеина являлся независимым от актомиозиновых сил, так как ингибирование динеина не влияло на скорость центростремительного тока актина. Следовательно, процесс центрирования центросомы требует активной работы цитоплазматического динеина.

Чтобы изучить регуляцию работы динеина при центрировании, исследовали участие в этом процессе малой ГТФазы Cdc42. Для этого была поставлена серия экспериментов по смещению центросомы путём локальной разборки МТ в клетках, предварительно микроинъецированных не только С3 трансферазой, но и доминантно-негативным рекомбинантным белком N17Cdc42. Таким образом, в этих клетках была подавлена активность как актомиозиновой системы, так и Cdc42 (рис.3). В предыдущих экспериментах центросома при местном разрушении МТ непрерывно двигалась по направлению от этой зоны. Подтягивающие центросому силы так велики, что зачастую рвут ещё не разобравшиеся микротрубочки, заякоренные в кортексе. Результатом становится увеличение скорости движения центросомы от зоны разборки (рис. 3А,Б). В клетках, инъецированных С3 трансферазой и N17Cdc42, зачастую одной МТ было достаточно, чтобы удержать на месте центросому или даже обратить вспять направление её движения (рис. 6 А,В). Следовательно, тянущих сил в этом случае уже не хватает для разрыва микротрубочек, хотя активность динеиновых моторов не затронута. Значит, подавление активности Cdc42 приводит к уменьшению тянущего усилия микротрубочек, приложенного к центросоме и генерируемого динеином.

Каков же вклад динамики МТ в процесс центрирования? Возникло предположение, что смещение центросомы из центра клетки, наблюдавшееся после подавления активности динеина, могло быть обусловлено толкающими силами динамичных плюсконцов МТ. Чтобы проверить это, динамика МТ была заморожена при помощи сверхнизких доз таксола и нокодазола. Оказалось, что при подавлении динамики МТ

полностью исчезает смещение centrosомы, вызванное динеин-блокирующими антителами. Следовательно, несбалансированные силы, воздействующие на centrosому в отсутствие динеина, генерируются динамичными плюс-концами МТ.

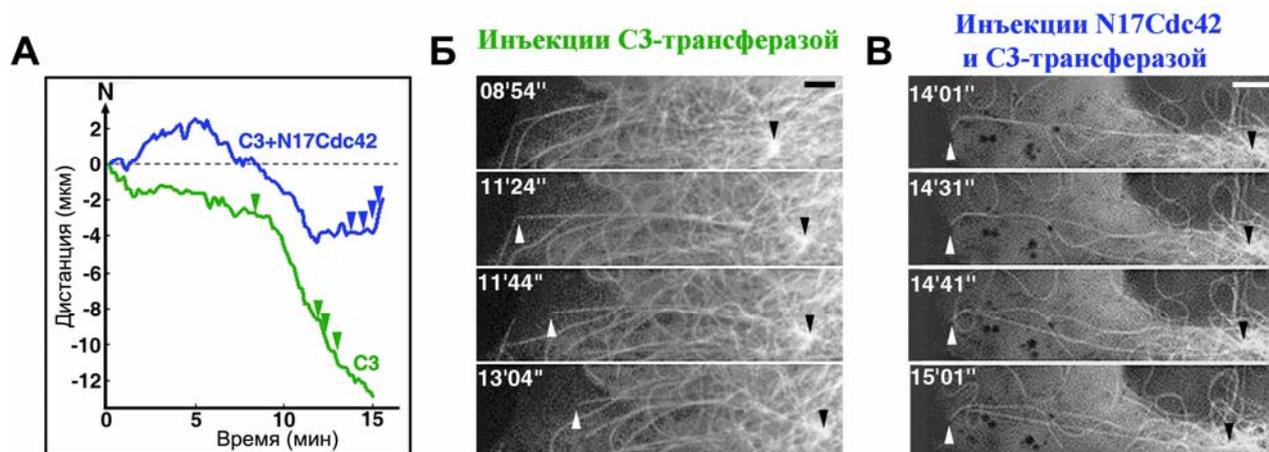


Рисунок 3. *Cdc42* регулирует работу динеина по позиционированию centrosомы. **А** – Кинетика движения centrosомы при локальной разборке микротрубочек в клетках, инъецированных C3-трансферазой или C3-трансферазой и N17Cdc42. Отмечены моменты времени, запечатлённые на **Б** и **В** (соответствуют чёрным стрелкам справа). **Б** – без центростремительного тока актина centrosома непрерывно движется от места локальной разборки микротрубочек. Белая стрелка указывает на разрыв заякоренной в кортексе микротрубочки (см. текст). **В** – в отсутствие как тока актина, так и активности *Cdc42*, centrosома движется хаотично. Белой стрелкой обозначена удерживающая centrosому микротрубочка. Масштабная линейка – 5 мкм

Оставалось выяснить, генерируются ли тянущие силы динеином лишь в кортексе, или же они приложены к микротрубочкам по всей их длине. В дальнейших экспериментах были изучены механизмы центрирования в цитопластах клеток *Vero*, система микротрубочек в которых постепенно утрачивала радиальность по мере того как МТ переставали взаимодействовать с клеточным кортексом. Однако centrosома сохраняла при этом центральное положение, следовательно, взаимодействие микротрубочек с одним лишь краем клетки не играет решающей роли в процессах центрирования.

В заключение была построена компьютерная модель, чтобы путём метода так называемой обратной разработки (англ. *reverse engineering*) ответить на вопросы: сколько моторов и МТ вовлечены в центрирующий механизм и каковы его характеристичные силы? тянет ли динеин лишь за плюс-концы МТ или вдоль всей их длины? какова природа децентрирующих сил? Кроме собственных экспериментальных данных, в модели был учтён ряд параметров и величин, взятых из исследований других авторов. Результаты компьютерного моделирования полностью совпали с имеющимися экспериментальными данными и позволили сделать ряд предсказаний, которые на современном этапе развития микроскопии пока не представляется возможным проверить

экспериментально. Так, внесение в модель величины скорости смещения центросомы (Bugakov et al., 2003), скорости центростремительного тока актина (Alexandrova et al., 2008), эффективной константы трения для краткосрочных контактов МТ и МФ (Bormuth et al., 2009), коэффициента эластичности деформированного МФ (Mogilner and Oster, 1996) и времени контакта МФ с МТ (Howard, 2001) позволило предсказать, что для успешного центрирования достаточно в среднем двух контактов МФ с каждой из МТ.

Таким образом, в первой части работы был впервые описан механизм позиционирования центросом в интерфазных клетках. Именно этот механизм определяет центральную симметрию тубулиновой транспортной сети.

ЧАСТЬ 2. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ПРОТЕИНКИНАЗЫ LOSK И ДИНЕИНА В ФОРМИРОВАНИИ РАДИАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК

Тубулиновая транспортная сеть представлена звездой МТ, отходящих от центросомы, расположенной в центральной области клетки. Центросома нуклеирует новые МТ и заякоривает их минус-концы, защищая от деполимеризации. Известно, что за процесс нуклеации отвечают в основном кольцевые комплексы белка γ -тубулина (γ -TuRC), а в процесс заякоривания каким-то образом вовлечены такие белки перичентриолярного материала, как перичентрин, найнеин, PCM-1, Cep 135, BBS 4, EB-1, AKAP 450, CAP 350 и CLASP. Кроме того, центросома содержит порядка 300 различных белков, функции многих из которых пока неясны. Одним из таких белков являлась киназа LOSK.

Серин-треониновая протеинкиназа LOSK (Long Ste20-like Kinase) была впервые описана в нашей лаборатории как белок, связанный с МТ и центросомой (Zinovkina et al., 1997); другими авторами эта киназа была также описана под именем SLK. LOSK повсеместно экспрессируется в клетках млекопитающих, и её активность постоянна на протяжении всего клеточного цикла, слегка возрастая во время митоза.

Чтобы изучать функции LOSK, был создан доминантно-негативный конструктор K63R- Δ T. K63R- Δ T, слитый с GST, был экспрессирован в *E. coli* и очищен: он не демонстрировал никакой киназной активности – ни автофосфорилирования, ни фосфорилирования MBP. Кроме того, пятикратный избыток мутантной киназы полностью ингибировал её нормальную киназную активность.

Полноразмерная EGFP-слитая LOSK распределяется по цитоплазме и частично солокализуется с МТ. Активный Δ T-фрагмент киназы, транскрибированный Δ N Δ T и мутантный K63R- Δ T были распределены диффузно. Если клетки обрабатывали даже низкими дозами детергента, продукты экспрессии полностью вымывались из клеток. Таким образом, N-концевой домен LOSK не имеет сродства ни к МТ, ни к центросоме, однако N-концевые фрагменты LOSK способны конкурировать с эндогенной киназой за

любые цитоплазматические субстраты. Поскольку эндогенная LOSK связывается с МТ, предположили, что её киназная активность может как-то влиять на их организацию. Чтобы проверить это, исследовали строение системы МТ в клетках *Vero*, экспрессирующих доминантно-негативный K63R-ΔТ, активный ΔТ и неактивный ΔNΔТ.

Анализ полученных данных показал, что ~80% контрольных клеток *Vero* обладают радиальной системой МТ с чётко выраженными центрами организации (рис.4В). Экспрессия ΔТ вызывает небольшое снижение числа клеток с радиальными МТ; ΔNΔТ имеет более выраженный эффект, а в большинстве клеток, экспрессирующих K63R-ΔТ, МТ располагались хаотично (рис.4Б,В). Этот эффект не зависел от плотности монослоя. Аналогичные результаты были получены с использованием конструкта DsRed-K63RΔТ. Интенсивность флуоресценции тубулина была измерена вдоль линейных отрезков поперёк клеток. Если график имеет характерную форму колокольчика, это говорит о радиальности микротрубочек; в клетках с хаотичным расположением МТ график становился более плоским, с многочисленными нерегулярными пиками (рис.4Б, внизу). Таким образом, экспрессия в клетках доминантно-негативного мутанта LOSK приводила к хаотизации клеточных МТ.

Чтобы удостовериться, что влияние доминантно-негативной LOSK на радиальность МТ является специфическим эффектом, была проведена деплеция киназы посредством RNAi в клетках *Vero* и *HeLa*. На 7й-8й день после трансфекции интенсивность окрашивания клеток антителами к LOSK резко снижалась, что являлось индикатором нокадауна LOSK. При этом контрольные вектора не влияли на уровень содержания киназы. Данные иммуноблотинга показали, что содержание LOSK падает до уровня ~5% от исходного. Иммунофлуоресцентное окрашивание МТ в клетках *Vero* с нокадауном LOSK показало, что радиальность МТ в них нарушена, как и в клетках с экспрессией K63R-ΔТ (рис.4В). Экспрессия полноразмерной LOSK, K63R-ΔТ или ΔТ, также как деплеция LOSK посредством RNAi, приводят к гибели клеток в течение 2 суток. Это затрудняет постановку эксперимента по спасению клеток с нокадауном LOSK. Интересно, что хотя экспрессирующие ΔТ клетки погибают, строение системы МТ в них остаётся нормальным. Значит, нарушение системы МТ не является следствием клеточной гибели, вызванной ингибированием LOSK.

Эффект ингибирования LOSK был изучен ещё в нескольких типах культивируемых клеток, в частности, в клетках *CHO-K1* (фибробластоподобные клетки из яичника китайского хомячка) и *CV-1*, выделенных, как и клетки *Vero*, из почки зелёной мартышки. Оказалось, что LOSK регулирует радиальность организации МТ и в клетках этих линий. Работа проводилась в основном на клетках *Vero* благодаря их отчётливо радиальной системе МТ и высокому уровню экспрессии в них K63R-ΔТ.

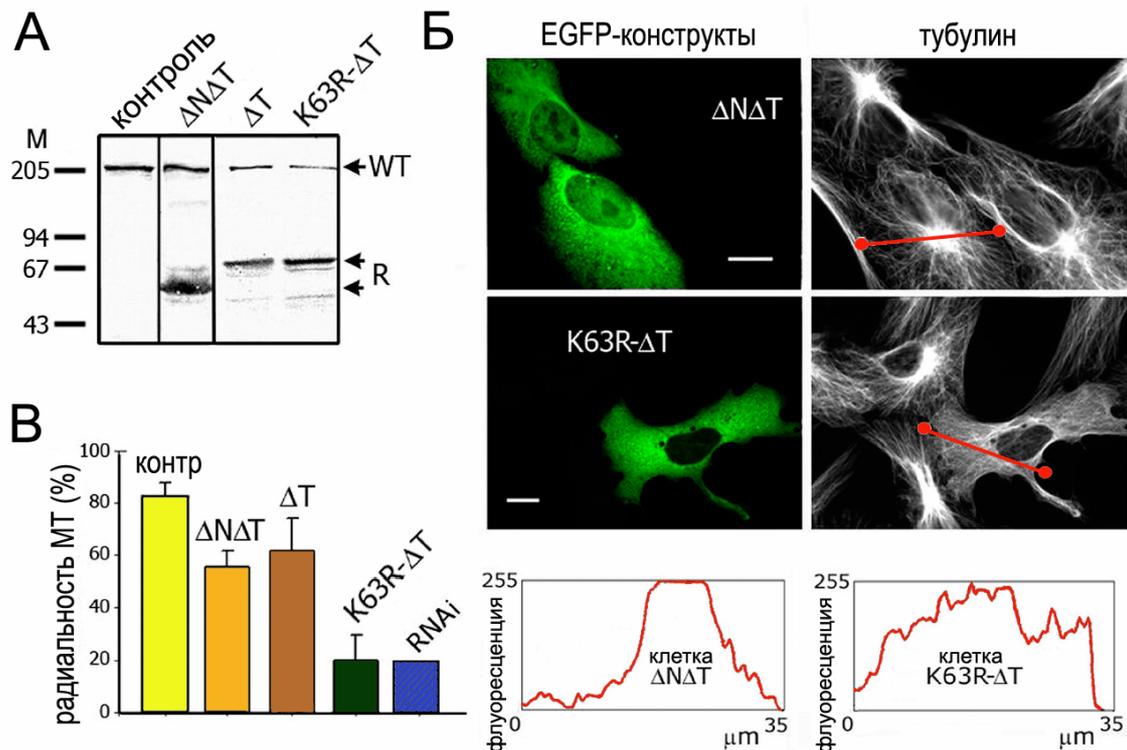


Рисунок 4. Экспрессия доминантно-негативной LOSK нарушает радиальность микротрубочек. **А.** Иммуноблоттинг клеточных гомогенатов с антителами к LOSK. Контроль – нетрансфицированные клетки; остальные дорожки – клетки, трансфицированные обозначенными конструктами. Маркёры молекулярных масс указаны в кДа. WT – эндогенная LOSK дикого типа; R – рекомбинантные фрагменты LOSK. **Б.** Контрольные клетки Vero и экспрессирующие неактивную $\Delta N\Delta T$, обладают нативной системой микротрубочек, тогда как в клетках с экспрессией K63R- ΔT система микротрубочек дезорганизована. Внизу приведены лайнсканы интенсивности флуоресценции, проведённые вдоль обозначенных на снимках линий. **В.** Доля клеток с выраженной радиальностью системы микротрубочек. Для каждого столбца подсчитано по 50 клеток в каждом из трёх независимых экспериментов. Ошибка представляет собой SD.

Чтобы выяснить, какие из функций centrosомы затрагиваются подавлением активности киназы, было изучено влияние K63R- ΔT на способность centrosом нуклеировать и заякоривать МТ как *in vivo*, так и *in vitro*. В первом случае были проведены эксперименты по восстановлению МТ после разборки нокодазолом. Как в контрольных, так и в экспрессирующих K63R- ΔT клетках Vero спустя две минуты после начала отмывки нокодазола возникали одиночные звёздочки из коротких МТ. Эти звёздочки росли в размерах и МТ достигали края клеток к 4й-5й минуте как в контрольных, так и в трансфицированных клетках. Однако уже 6 минут спустя после отмывки нокодазола МТ в трансфицированных клетках становились хаотичными, в то время как в контрольных клетках они продолжали сохранять радиальную организацию. Сходные результаты были получены на клетках с деплецией LOSK. Отсюда следует, что в клетках с подавленной активностью LOSK centrosомы не способны заякоривать МТ, хотя их нуклеирующая микротрубочки активность остаётся интактной.

Затем была исследована активность центросом трансфицированных клеток в системе *in vitro*. Для этого проводили сборку МТ из экзогенного тубулина на так называемых «клеточных тенях», образующихся после обработки клеток детергентом. Поскольку LOSK-ΔТ и K63R-ΔТ вымывались из клеток при обработке Triton-X100, одновременно синтезировали в клетках EGFP-слитый ламин В, устойчивый к воздействию детергента. Чтобы гарантировать совместное попадание в клетку обоих генетических конструкторов, смесь ДНК рEGFP-LamВ с ΔТ либо с K63R-ΔТ вводилась в клетки путём микроинъекций. Экспрессия рEGFP-LamВ никак не влияла при этом на воздействие фрагментов LOSK на систему микротрубочек. Центросомы клеток, экспрессировавших рEGFP-LamВ и K63R-ΔТ, после обработки нокадазолом и последующей пермеабиллизации Triton-X100, успешно индуцировали полимеризацию очищенного тубулина и организовывали вновь образованные МТ в характерные звёзды, при этом размер этих звёзд был таким же, как у контрольных клеток. Эти данные подтверждают, что способность центросомы нуклеировать МТ не затрагивается ингибированием LOSK.

Чтобы установить причину утраты центросомой способности заякоривать МТ, было изучено содержание в ней основных белков, отвечающих за поддержание её структурной целостности и за организацию МТ. Клетки, экспрессирующие K63R-ΔТ, имели на центросомах то же количество найнеина, что и контрольные клетки; а количество γ -тубулина и перицентрина уменьшалось на 20% как в клетках, экспрессирующих ΔТ, так и в клетках, экспрессирующих K63R-ΔТ (рис.5А,Б). Значит, неспособность центросом заякоривать микротрубочки в клетках с экспрессией K63R-ΔТ не зависит от количества этих центросомных белков. Было обнаружено, что в клетках с экспрессией K63R-ΔТ на центросомах уменьшалось количество динактина – как p150Glued, так и динамитина (рис.5А,Б). Для оценки суммарного содержания динактина в трансфицированных клетках был проведён иммуноблоттинг клеток *HeLa*, эффективность трансфекции в которых составляла 100%. Ни общее количество p150Glued, ни общее количество динамитина не уменьшалось при ингибировании LOSK (рис.5Д). Затем в клетках Vero одновременно экспрессировали EGFP-p150Glued и DsRed-K63R-ΔТ и наблюдали характерные плюс-концевые «кометы», которые ничем не отличались в контрольных и экспрессирующих DsRed-K63R-ΔТ клетках. Эти результаты говорят о том, что сам динактин остаётся интактным, но при этом открепляется от центросомы, и о влиянии киназы LOSK исключительно на работу центросомного динактина.

Чтобы подтвердить специфичность такого влияния, было изучено содержание динактина в клетках с деплецией LOSK. Оказалось, что деплеция LOSK коррелирует со снижением содержания обеих субъединиц динактина на центросоме (рис.5В,Г). Чтобы удостовериться, что наблюдаемый объект является центросомой, клетки окрашивали

антителами к γ -тубулину и к субъединицам динактинового комплекса. После деплеции LOSK отношение уровней флуоресценции γ -тубулина и динамитина значительно возросло (рис.5Г). При этом «кометы» динактина в клетках оставались неизменными.

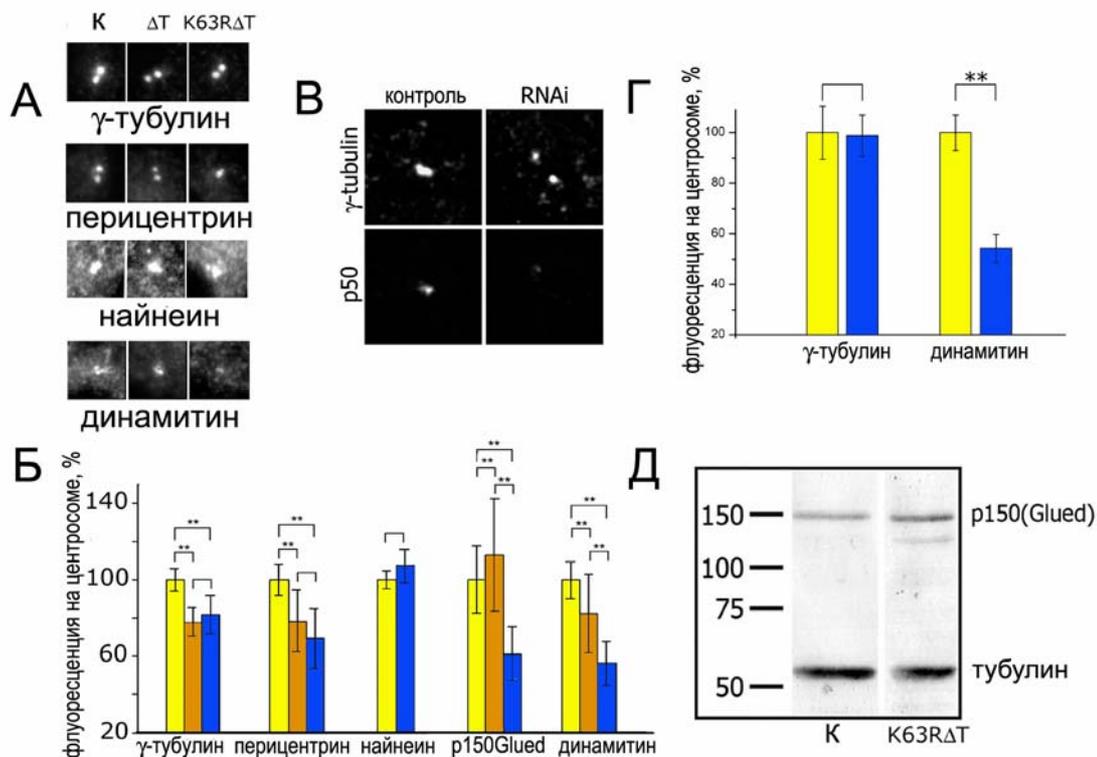


Рисунок 5. Влияние LOSK на белковый состав центросомы: уменьшение центросомного динактина при ингибировании или деплеции LOSK. (А) – Снимки центросом, окрашенных антителами к обозначенным белкам. Сверху указаны экспрессируемые конструкции, К – контрольные клетки (Б) – Гистограмма интенсивности флуоресценции окрашенных антителами центросом. Для каждой точки измерено от 30 до 50 центросом. Различия обозначены как (*) при $p < 0.05$ и (**) при $p < 0.01$. Жёлтым обозначены контрольные клетки, оранжевым ΔT , и синим K63R- ΔT . (В) – Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание динамитина (p50) и γ -тубулина в контрольных и деплецированных по LOSK посредством RNAi клетках. (Г) – Гистограмма интенсивности флуоресценции окрашенных антителами центросом. Для каждой точки измерена флуоресценция у 28-43 центросом. Жёлтые столбики – контрольные клетки, синие – RNAi. (Д) – Иммуноблоттинг контрольных клеток (К) и клеток с экспрессией K63R- ΔT , обработанный антителами к p150Glued и тубулину. Маркеры молекулярных масс приведены в кДа.

Следовательно, LOSK способна регулировать внутриклеточное распределение динактина, регулируя его связывание с центросомой. Чтобы исследовать влияние LOSK на нецентросомный динактин, было изучено влияние ингибирования LOSK на аппарат Гольджи, поскольку динактин обеспечивает его структурную целостность. Оказалось, что степень компактизации аппарата Гольджи не менялась в клетках, экспрессирующих как ΔT , так и K63R ΔT . Это означает, что активность LOSK не оказывает влияния на динеин/динактин, связанный с аппаратом Гольджи. Дальнейшие эксперименты показали, что хаотизация МТ, вызванная ингибированием LOSK, влечёт за собой

нарушение поляризации клеток, значительную стабилизацию их фокальных контактов, и нарушение их направленной локомоции при выползании в экспериментальную рану монослоя.

Итак, посредством опытов *in vivo* и *in vitro* было продемонстрировано, что серин-треониновая протеинкиназа LOSK участвует в закоривании МТ на центросоме, и что ингибирование её активности приводит к утрате радиальности тубулиновой транспортной системы клетки и к истощению пула центросомного динактина.

Хорошо известно, что динактин является кофактором минус-концевого моторного белка динеина, перемещающего органеллы по МТ. Корреляция уровня центросомного динактина и радиальности системы МТ позволила нам сделать предположение об участии динеина/динактина в нуклеации или в удержании МТ на центросоме, или же в координации работы нуклеирующих и удерживающих комплексов. Следующим этапом работы стало изучение функций динеина/динактина на центросоме.

Для ингибирования динеина был выбран фрагмент белка p150Glued-CC1, избыток которого разобщает динеин/динактиновый комплекс (Karki and Holzbaaur, 1995). Сначала проверили влияние этого ингибитора на зависимый от динеина внутриклеточный транспорт. Для этого GST-p150Glued-CC1 был синтезирован в *E. coli* и очищен методом аффинной хроматографии. Электрофоретическое исследование показало, что молекулярная масса синтезированного фрагмента GST-p150Glued-CC1 соответствовала расчетной (65 кДа), и очищенный препарат содержал преимущественно целевой белок (рис.6А). Раствор белка инъецировали в меланоциты тернеции, пигментные гранулы в которых находились в диспергированном состоянии. Это не влияло на жизнеспособность меланоцитов – они оставались прикрепленными к субстрату, и гранулы в них были подвижны. После обработки адреналином в контрольных клетках (черная стрелка на рис.6) происходила агрегация пигментных гранул, тогда как в инъецированных клетках этого не наблюдалось (белая стрелка), хотя клетки сохраняли жизнеспособность. Инъекция свободного GST не влияла на меланоциты и их гранулы. Поскольку пигментные гранулы агрегируют посредством динеинового транспорта по микротрубочкам, очевидно, что p150Glued-CC1 ингибирует динеин в меланоцитах.

Чтобы изучить эффект ингибирования динеина в клетках млекопитающих, клетки линий *HeLa* и *Vero* были трансфицированы pEGFP-p150Glued-CC1. Через 24 ч. после трансфекции клетки фиксировали и проводили иммуофлуоресцентное окрашивание антителами к тубулину и к маннозидазе II (маркёру Гольджи), или же из клеток изготавливали гомогенат для проведения иммуноблоттинга. На иммуноблотах антитела к GFP выявляли пептид расчетной для рекомбинантного pEGFP-p150-CC1 молекулярной массы 64 кДа. Компактный аппарат Гольджи в клетках *Vero* при экспрессии pEGFP-p150-CC1 распадался на отдельные мелкие везикулы, что говорит об

ингибировании динеина. В большинстве трансфицированных клеток *Vero* и *HeLa* происходило нарушение радиальной системы МТ; статистическая обработка показала, что рEGFP-p150-CC1 в несколько раз уменьшает долю клеток с радиальным расположением МТ.

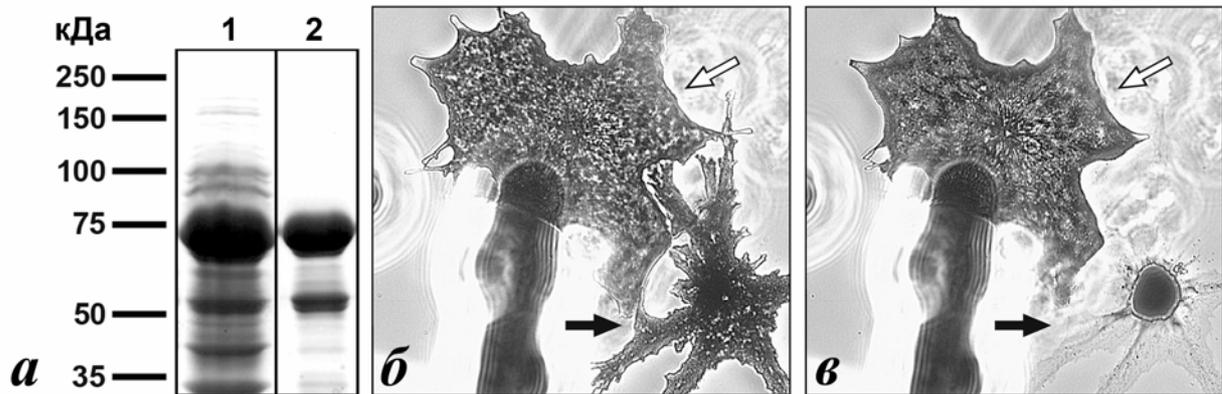


Рисунок 6. Микроинъекция *GST-p150Glued-CC1* нарушает работу динеина в меланофорах тернеции. **А** – Гель, окрашенный кумасси. Дорожка 1: лизат *E. coli*, экспрессирующей фрагмент *GST-p150Glued-CC1*, дорожка 2 – препарат белка, очищенный путём аффинной хроматографии. **Б,В** – Агрегация пигментных гранул, индуцированная добавлением в среду адреналина спустя 30 мин после микроинъекции. Стрелками обозначены инъекцированная и контрольная клетки. **Б** – 10 секунд, **В** – 10 минут после добавления адреналина.

Для выяснения, нарушает рEGFP-p150-CC1 нуклеирующую или же заякоривающую активность centrosомы в клетках *Vero*, был проведён эксперимент по восстановлению МТ после их разрушения нокодазолом. Спустя 3 минуты после начала отмывки во всех клетках образовывались звёзды из коротких МТ, отходящих от centrosомы (рис.7А,Г). Через 10 минут МТ в них удлинялись и достигали края клеток (рис.7Б,Д). Через час проявлялась специфика клеток с экспрессией рEGFP-p150-CC1 – в них система МТ теряла радиальность и становилась хаотичной, тогда как в контрольных или экспрессирующих рEGFP-p150-ID клетках МТ оставались радиальными (рис.7В,Е). Таким образом, при экспрессии в клетках рEGFP-p150-CC1 centrosома сохраняла способность нуклеировать МТ, но, по-видимому, не могла удерживать их в виде звезды длительное время.

Для дальнейшего изучения влияния динеина на способность centrosом к нуклеации была осуществлена сборка МТ из очищенного тубулина в системе *in vitro*, по той же методике, что и при изучении киназы LOSK; и изучено влияние на этот процесс ингибиторов динеина. Клетки с разрушенными нокодазолом МТ, не фиксируя, пермеабелизовали детергентом, и полученные «клеточные тени» инкубировали в контрольном буфере, или с антителами 74.1, или с *GST-p150Glued-CC1*; а затем инкубировали в растворе тубулина при 37°C, фиксировали и окрашивали антителами (рис.8А).

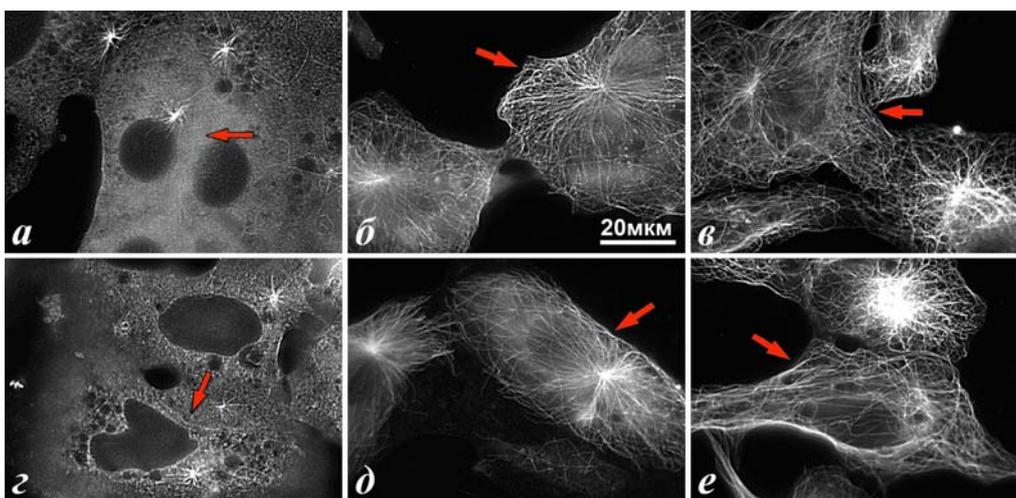


Рисунок 7. Экспрессия p150-CC1 нарушает работу centrosомы, не затрагивая её способности нуклеировать микротрубочки. **А-В** – экспрессия pEGFP-p150-ID, **Г-Е** – экспрессия pEGFP-p150-CC1 (клетки с экспрессией обозначены стрелками). **А,Г** – 3 минуты отмывки нокодазола, **Б,Д** – 10 минут, **В,Е** – 1 час.

Концентрация тубулина была подобрана таким образом, чтобы не образовывались свободные МТ в растворе и сборка шла только на centrosомах. Выделенный из мозга свиней препарат тубулина был достаточно чистым, в нем выявлялось незначительное содержание примесей даже при большой перегрузке геля (рис.8Б). Оптимальной для сборки на centrosомах оказалась концентрация $\sim 1,2$ мкг/мл тубулина, при которой от centrosом отрастали МТ в виде звезды, и в препарате были видны лишь единичные свободные МТ (рис.8Г). В центре звезды из МТ находилась именно centrosома, что было подтверждено посредством окрашивания «клеточных теней» антителами к γ -тубулину (рис.8Ж,З). При этом на centrosомах сохранялся динеин и динактин, что подтверждалось окрашиванием антителами 74.1, анти-DHC и анти-p150Glued. Если «тени» инкубировали с чистым буфером, то в цитоплазме были видны единичные остаточные эндогенные МТ, а звёзды из МТ никогда не образовывались (рис.8В).

В среднем 93% «клеточных теней» имели centrosому с образовавшейся вокруг звездой из МТ, в состав которой входило $14,7 \pm 4,3$ МТ. После преинкубации с антителами 74.1 происходило некоторое уменьшение количества нуклеированных на centrosомах МТ: теперь 68% клеток содержали звезду, в состав которой входило в среднем $11,7 \pm 5,1$ МТ (рис.8Д). Таким образом, антитела 74.1 в некоторой степени ингибировали способность centrosомы к нуклеации МТ. В экспериментах с GST-p150-CC1 вместо свиного использовали тубулин мозга крыс. После инкубации с ним в среднем 79% «клеточных теней» формировали звезду, в состав которой входило $39,4 \pm 15,3$ МТ. После преинкубации с GST-p150-CC1 и в присутствии этого белка доля «теней» со звездой не уменьшалась, и в среднем в звезде насчитывалось $31,3 \pm 8,9$ МТ (рис.8Е). Таким образом,

GST-p150-CC1 также слегка ингибировал нуклеирующую активность centrosомы, но столь же слабо, как и антитела 74.1.

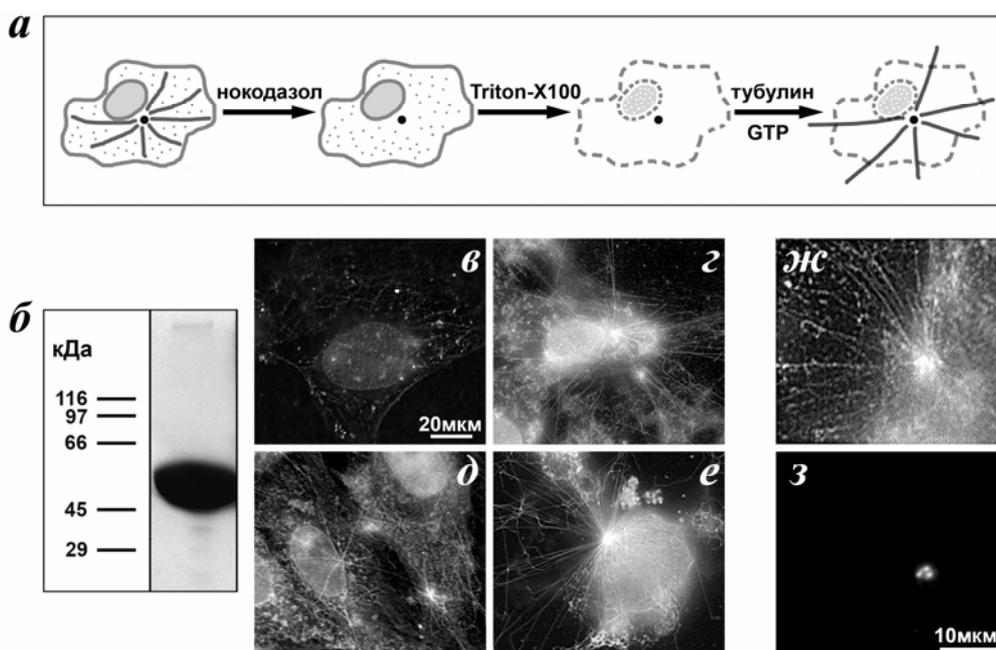


Рисунок 8. Centrosома *in vitro* нуклеирует микротрубочки после ингибирования динеина различными способами. **А** – схема постановки эксперимента, **Б** – препарат тубулина, гель окрашен кумасси. **В-Е** – сборка микротрубочек на «клеточных тенях»: **В** – «тени», инкубированные с буфером без тубулина, **Г-З** – инкубированные с раствором тубулина, **Д** – преинкубированные с антителами 74.1, **Е** – с белком GST-p150-CC1. **Ж,З** – двойное иммунофлуоресцентное окрашивание «клеточной тени» антителами к α -тубулину (**Ж**) и γ -тубулину (**З**)

Итак, при действии агентов, нарушающих динеин-динактиновые взаимодействия, способность centrosомы нуклеировать МТ *in vivo* и *in vitro* нарушается незначительно. Следовательно, хаотизация МТ в клетках при ингибировании динеина связана скорее с подавлением процесса заякоривания. Чтобы в деталях изучить этот вопрос, от экспериментов *in vitro* было решено перейти к прижизненным наблюдениям за МТ в живых клетках.

Для изучения роли динеина в радиальной организации, МТ в фибробластах *Vero* или *CV-1* поместили путём микроинъекций конъюгированного с Cy-3 тубулина, и затем инъецировали клетки во второй раз контрольным или анти-динеиновым реагентом. Сразу после второй микроинъекции начинали цейтраферную видеосъёмку. Использовали два ингибитора динеина – антитела 74.1 и рекомбинантный p150Glued-CC1. Негативный контроль состоял в микроинъекциях мышиним неиммунным иммуноглобулином G (IgG). В качестве позитивного контроля использовали микроинъекции рекомбинантного p50, поскольку его избыток приводит к диссоциации динактинового комплекса (Echeverri et al, 1996).

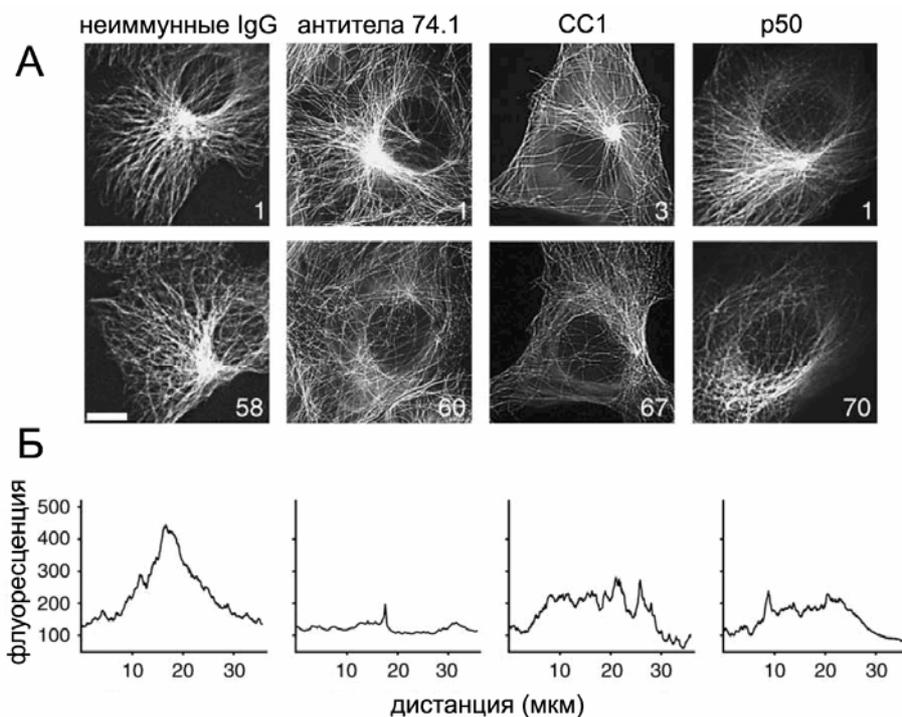


Рисунок 9. Система микротрубочек в клетках Vero при ингибировании динеина. (А) Первые и последние кадры видеороликов, демонстрирующих систему микротрубочек. Клетки инъецированы (слева направо) неиммунными мышинными IgG, антителами 74.1, рекомбинантным p150Glued-CC1, и рекомбинантным p50. Масштабная линейка 10 мкм. (Б) Лайнсканы интенсивности флуоресценции, проведённые поперёк клеток с нижних кадров панели А. Видно, что свечение в области centrosомы заметно снижается в клетках, инъецированных 74.1, CC1 и p50 – не неиммунными IgG.

Выяснилось, что вдобавок к ожидаемому смещению centrosомы из клеточного центра (см. выше), антитела 74.1 (5 мг/мл) или белок CC1 (10 мг/мл) вызывают в течение первых 60-70 минут кардинальные нарушения радиальной организации МТ (рис.9). Инъекция белка p50 (20 мг/мл) имеет сходный эффект (рис.9А,Б). Количественная оценка действия ингибиторов продемонстрировала, что CC1 и антитела 74.1 вызывают резкое уменьшение фракции клеток с радиальными МТ по сравнению с клетками, инъецированными неиммунными IgG, (двукратное и трёхкратное соответственно (рис.9А,10А). Далее был проведён анализ кинетики процесса утраты радиальности МТ путём измерений флуоресценции в области centrosомы после микроинъекций ингибиторов. Время полупериода (*half-time*) для процесса снижения уровня флуоресценции оказалось равным ~20 минутам (рис.10Б). Из этого был сделан вывод, что для поддержания радиальности системы МТ в интерфазных фибробластах Vero необходима постоянная активность динеина.

Чтобы определить, действительно ли МТ-фокусирующая активность динеина требуется на протяжении всей интерфазы, сравнили влияние ингибиторов на радиальность МТ, находящихся в ранней (G_1) или поздней ($S-G_2$) интерфазе. Чтобы определить, фазу клеточного цикла, в клетках экспрессировали слитый с GFP центрин-2,

который ассоциирован с центриолями; и подсчитывали число центриолей в трансфицированных клетках. Наличие одной пары центриолей служило индикатором G₁-фазы, а двух пар центриолей – S-G₂ фаз. Клетки, находящиеся как в G₁, так и в S-G₂ фазах, микроинъекцировали антителами 74.1, и определяли фракцию клеток с радиальными МТ путём окрашивания клеток антителами к α-тубулину. Анализ полученных данных показал, что хотя содержание клеток с нарушенной системой МТ было слегка повышено в фазах S-G₂ по сравнению с G₁, разрушающее действие ингибиторов динеина в G₁ фазе было значительным. Следовательно, активность динеина необходима для организации МТ на протяжении всей интерфазы.

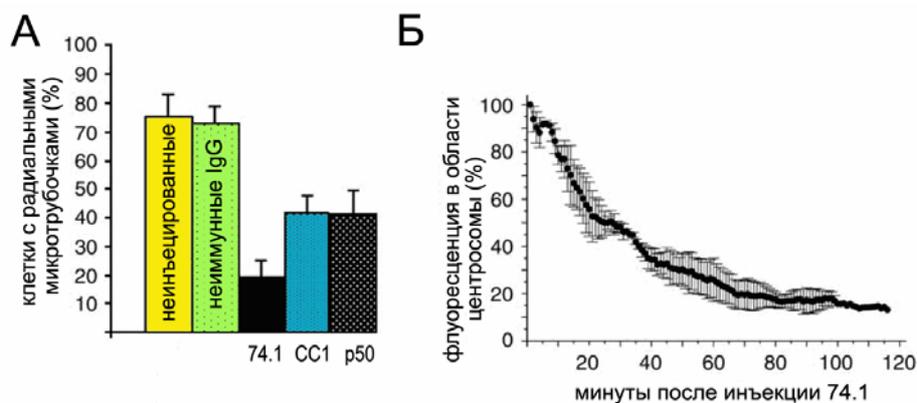


Рисунок 10. Анализ нарушения системы микротрубочек при ингибировании динеина. **(А)** Процентное содержание клеток с радиальной системой микротрубочек среди контрольных и микроинъекцированных различными ингибиторами динеина. **(Б)** Динамика уменьшения флуоресценции микротрубочек в области центросомы в клетках, инъекцированных 74.1.

Была учтена возможность того, что нарушение радиальности МТ после инъекций ингибиторов динеина связано с подавлением минус-концевого транспорта по МТ, что привело к снижению содержания centrosомных белков, отвечающих за нуклеацию и заякоривание. Для этого было изучено влияние ингибиторов динеина на количество некоторых белков centrosомы. В клетках с подавленной активностью динеина оценивали количество белков, выполняющих в centrosоме структурную роль (перицентрин), либо вовлечённых в процессы нуклеации МТ (γ-тубулин) или заякоривания (наинеин и p150^{Glued}). Для этого клетки были инъекцированы антителами 74.1, и проведено иммунофлуоресцентное окрашивание инъекцированных клеток соответствующими антителами; а затем проанализирована интенсивность флуоресценции в области centrosом. Оказалось, что инъекции клеток ингибитором не меняют уровень содержания основных белков centrosомы, ответственных за нуклеацию, заякоривание или за её структурную организацию, по сравнению с неинъекцированными клетками или с клетками, инъекцированными контрольным буфером (рис.11А,Б). Значит, дезорганизация радиальной системы МТ в клетках с подавленной активностью динеина

не связана с утратой структурной целостности centrosомы, и роль динеина в радиальной организации МТ в интерфазных клетках не ограничивается транспортом её компонентов.

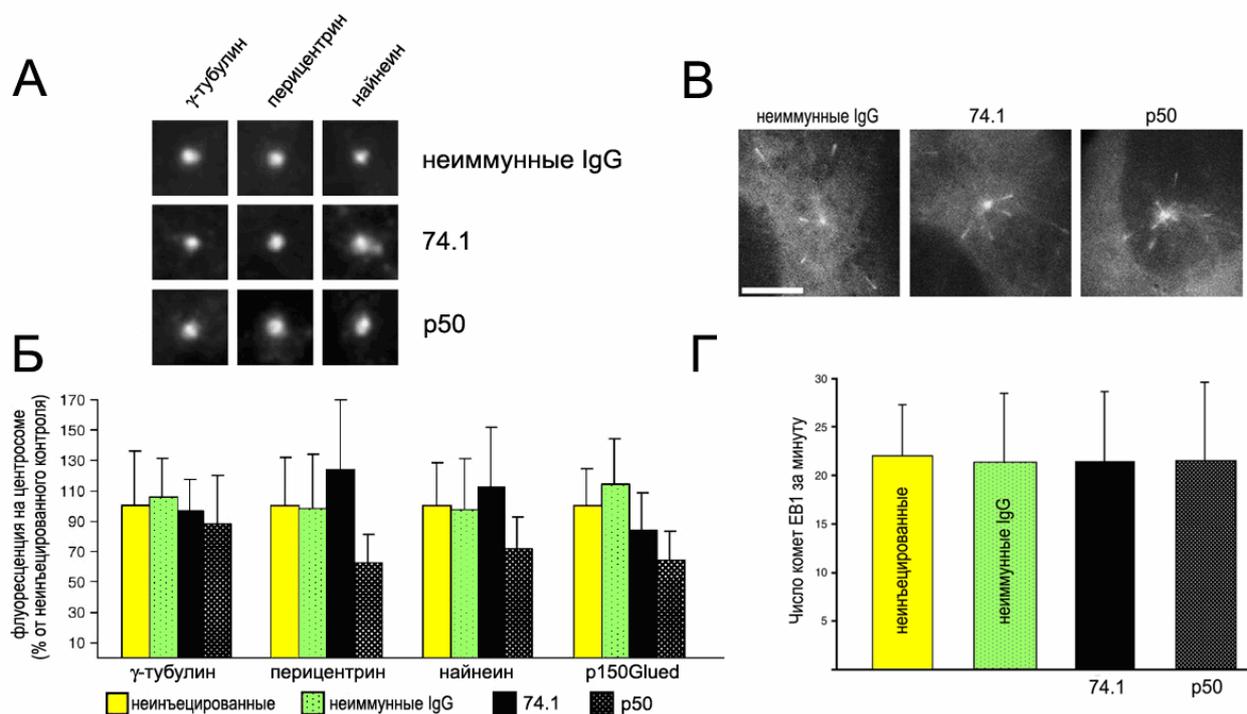


Рисунок 11. Инъекции ингибиторов динеина не меняют количество основных белков centrosомы и не влияют на процесс нуклеации. (А) Окрашивание антителами к γ -тубулину, перицентрину или найнеину клеток, инъецированных неиммунными IgG, антителами 74.1 или рекомбинантным p50. (Б) Сравнение количества centrosомных белков в контрольных клетках и клетках, инъецированных неиммунными IgG, антителами 74.1 или субъединицей динактина p50. (В) Кадры видеороликов, на которых видны «кометы» GFP-EB1, вылетающие из centrosом. Видео снято спустя 60 минут после инъекций в клетки неиммунных IgG, антител 74.1 или рекомбинантного p50 соответственно. (Г) Анализ количества «комет» GFP-EB1, вылетающих из centrosомы в контрольных клетках или в клетках, инъецированных ингибиторами динеина.

Способность centrosомы организовать МТ зависит от соотношения скоростей нуклеации МТ на centrosоме и их открепления от неё (Keating et al, 1997). Значит, нарушение радиальности МТ при ингибировании динеина связано либо с нарушением нуклеации МТ, либо с утратой centrosомой способности их удерживать; или же обоими этими процессами. Чтобы изучить *in vivo* участие динеина в нуклеации МТ, в клетках был экспрессирован GFP-слитый белок EB1, который специфически метит растущие плюс-концы цитоплазматических МТ. Частота появлений флуоресцентных «комет» на centrosоме обеспечивает возможность оценить в клетках нуклеирующую активность centrosомы (Piehl et al, 2004). И в контрольных, и в инъецированных ингибиторами динеина клетках, кометы EB1 возникали из яркой точки, соответствующей centrosоме (рис.11В). Статистический анализ показал, что среднее число таких возникновений было одинаковым в контрольных клетках и в инъецированных ингибиторами (рис. 11Г).

Отсюда следует вывод, что для нуклеации МТ на центросоме активность цитоплазматического динеина не требуется. Кроме того, видеосъёмка центросомной области с высоким временным разрешением после инъекций ингибиторов показала, что дезорганизация радиальной системы часто сопровождается откреплением от центросомы целых пучков МТ; причём этот эффект был специфичным. Следовательно, активность динеина требуется именно для удержания МТ на центросомах интерфазных клеток.

Итак, микроинъекции клеток *Vero* ингибиторами динеина приводят к быстрому нарушению радиальности МТ в инъекцированных клетках, причём это никак не коррелирует с уменьшением скорости нуклеации на центросоме или с утратой её основных белковых компонентов. Однако скорость открепления МТ от центросомы в таких клетках увеличена. Возможно, работа динеина на центросоме заключается в возвращении МТ, освободившихся из центросомных сайтов нуклеации или заякоривания. Чтобы вернуть на место такую МТ, динеин может связаться с ней посредством динактина или других, ещё не идентифицированных белков, и подтянуть назад минус-концом вперёд вдоль МТ, заякоренных на центросоме. Сходный механизм существует в митотических клетках, где динеин-зависимый транспорт МТ по МТ организует полюса митотического веретена деления. По-видимому, роль динеина в организации радиальной системы МТ консервативна у митотических и интерфазных клеток.

Таким образом, результатом проведённых экспериментов стало открытие того факта, что минус-концевой моторный белок динеин играет структурно-образующую роль в организации тубулиновой транспортной сети, и его работа связана с удержанием микротрубочек на центросоме. Наряду с киназой LOSK, от активности которой зависит количество центросомного динактина, динеин можно внести в список белков, отвечающих за процессы заякоривания.

ЧАСТЬ 3. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ МИОЗИН-ЗАВИСИМОГО ТРАНСПОРТА МЕМБРАННЫХ ОРГАНЕЛЛ ПО АКТИНОВЫМ МИКРОФИЛАМЕНТАМ

Помимо тубулиновой транспортной системы клетки, состоящей из МТ, кинезинов и динеина, цитоскелет клеток животных образует ещё одну – это сеть МФ, по которым органеллы перемещаются посредством миозиновых моторов. Актиновая транспортная сеть отличается от тубулиновой не только отсутствием геометрически правильной организации элементов цитоскелета. Вторым фундаментальным отличием является однонаправленность транспорта. В многочисленных работах, посвящённых миозин-зависимому транспорту, МФ, как и МТ, всегда рассматривались просто в качестве «рельсов», по которым движутся молекулярные моторы. Однако отсутствие в клетках минус-концевого транспорта по МФ при наличии в цитоплазме минус-концевого

миозина VI наводит на мысль о различиях в механизмах транспорта по МТ и МФ. Задачей данной работы стало изучение роли динамики МФ в процессах миозин-зависимого транспорта.

В экспериментах были использованы меланофоры ксенопуса, главная функция которых (быстрая агрегация или дисперсия пигментных гранул) сейчас изучена достаточно полно. Известно, что агрегация зависит исключительно от МТ, а дисперсия включает кинезин-зависимый транспорт вдоль МТ и миозин-зависимый – вдоль МФ. Была выдвинута гипотеза о том, что динамика МФ необходима для транспорта органелл по актину. Для проверки гипотезы изучили агрегацию и дисперсию пигмента в меланофорах, обработанных актин-стабилизирующим веществом джасплакинолидом в низкой концентрации (1мкМ) в течение 5 минут. Оказалось, что агрегация пигментных гранул происходила с нормальной кинетикой, а скорость диспергирования пигмента была резко снижена в обработанных клетках (рис.12А). Эти данные говорят о том, что стабилизация МФ специфически влияет на зависящий от них этап транспорта пигментных гранул.

Затем изучили, как воздействует джасплакинолид на актин-зависимый транспорт в отсутствие МТ. Для этого исследовали воздействие различных стабилизирующих МФ веществ на движение меланосом в меланофорах, предварительно обработанных нокодазолом. Меланосомы в таких клетках непрерывно двигались в присутствии стимула к дисперсии пигмента. Вскоре после воздействия джасплакинолида (5 минут инкубации), видимое движение гранул резко уменьшилось, что означает, что такая обработка ингибирует движение гранул вдоль МФ. Для количественной оценки этого эффекта вычисляли коэффициент диффузии, т.е. наклон кривой среднего квадратичного смещения с течением времени, аппроксимированной к прямой линии (рис.12). Обработка джасплакинолидом уменьшала коэффициент диффузии примерно в восемь раз (до 0.48×10^{-3} мкм²/с по сравнению с 4.03×10^{-3} мкм²/с в контроле). Сходное ингибирование наблюдали также при микроинъекции клеток раствором фаллоидина. Результатом этих инъекций было падение коэффициента диффузии до $0,91 \times 10^{-3}$ мкм²/с по сравнению с $3,79 \times 10^{-3}$ мкм²/с, которое наблюдали у контрольных клеток, инъецированных буфером (рис.12Б). Значит, влияние стабилизирующих актин веществ на транспорт пигментных гранул и в самом деле связано именно с ингибированием динамики актина, а не является специфическим химическим свойством, например, джасплакинолида.

Известно, что ингибирование миозина Va приводит к полному подавлению актин-зависимого транспорта меланосом в клетке (Rogers et al, 1999). Чтобы оценить эффект подавления транспорта при добавлении джасплакинолида, оценивали актин-зависимое движение меланосом в клетках с разобранными МТ и с экспрессией доминантно-

негативного миозина. Оказалось, что актин-зависимый транспорт в таких клетках подавлен до уровня, сходного с таковым при обработке джасплакинолидом (рис.12Б, MST-GFP; $0,39 \times 10^{-3}$ мкм²/с). Это лишний раз доказывает, что стабилизация актина в клетках приводит к очень существенному подавлению транспорта пигментных гранул вдоль МФ.

Коэффициент диффузии не даёт возможности оценить длину одиночных линейных смещений частиц и их скоростей на таких отрезках, а описывает сразу все типы поведения пигментной гранулы, включая паузы и случайные смещения, не зависящие от моторов. Поэтому был проведён детальный анализ траекторий меланосом путём разложения их на составные части, т.е. на линейные пробежки вдоль МФ и на случайные перемещения, похожие на диффузию – используя в качестве математического инструмента так называемый *multiscale trend analysis* (МТА) (Zaliapin et al, 2005) (рис.12В). Оказалось, что обработка джасплакинолидом примерно втрое уменьшала длину линейных пробежек по актину и количество времени, которое пигментные гранулы проводили, перемещаясь вдоль МФ. Скорость актин-зависимого движения также снижалась. Таким образом, актин-зависимое движение пигментных гранул действительно было подавлено в клетках со стабилизированными актиновыми филаментами.

Затем были проведены серии контрольных экспериментов. Чтобы проверить, насколько обработка джасплакинолидом стабилизирует МФ в меланофорах, применили метод FRAP (восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания). При помощи этого метода была изучена динамика актина в отсутствие и в присутствии джасплакинолида в клетках, микроинъецированных родамин-меченым актином. Восстановление флуоресценции актина в клетках, обработанных джасплакинолидом, происходило гораздо медленнее, чем в контрольных (рис.13). Следовательно, обработка джасплакинолидом и в самом деле эффективно подавляет динамику актина.

Далее была исследована возможность того, что подавление транспорта обусловлено реорганизацией актинового цитоскелета под воздействием джасплакинолида. Для этого была изучена организация МФ в цитоплазме до и после воздействия джасплакинолида: сначала путём прижизненной световой микроскопии клеток, микроинъецированных родамин-меченым актином, а затем посредством электронной микроскопии платиновых реплик отдельных участков клеток, обработанных субъединицами миозина I (S1), декорирующими МФ. Прижизненные снимки одних и тех же клеток до и спустя 5 минут после начала воздействия показали, что обработка джасплакинолидом не приводит к перераспределению флуоресценции актина. Электронная микроскопия продемонстрировала, что общее распределение МФ, равно как и их локальная плотность

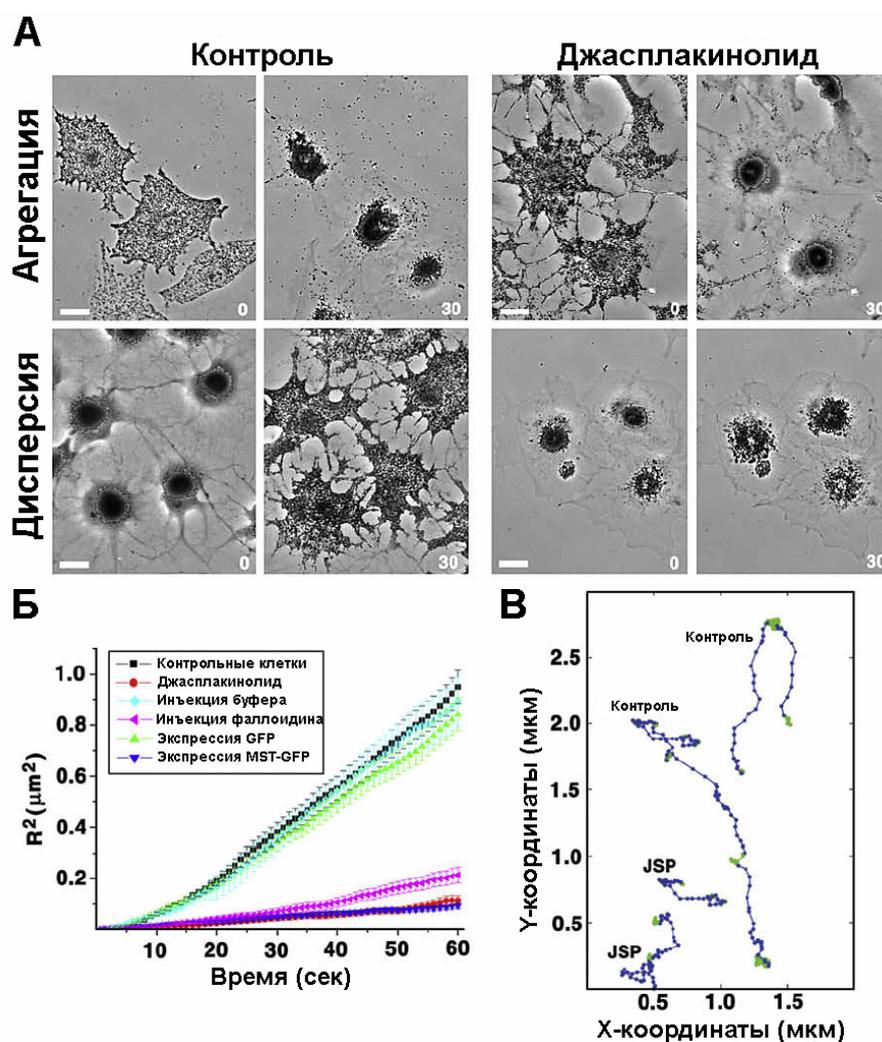


Рисунок 12. Стабилизация актиновых филаментов в меланофорах подавляет транспорт пигментных гранул.

(**А**) Раскадровка видеороликов, демонстрирующих процессы агрегации и дисперсии меланосом в контрольных и обработанных 1 мкМ джасплакинолида клетках. Агрегация пигмента проходит нормально в обоих случаях, а скорость дисперсии существенно снижена при обработке джасплакинолидом. Масштабная линейка 20 мкм. (**Б**) Динамика движения пигментных гранул по актину в клетках с разобранными микротрубочками. Представлены графики роста средних квадратов расстояния, пройденного гранулами из стартовой точки. Погрешность соответствует $\pm SD$. (**В**) Разложение траекторий пигментных гранул в клетках с разрушенными микротрубочками на линейную составляющую (синее) и на случайные смещения, обусловленные диффузией (зелёное). Длина линейных сегментов, соответствующих актин-зависимым пробежкам, существенно короче в клетках, обработанных джасплакинолидом.

были сходными в обработанных джасплакинолидом и в контрольных необработанных меланофорах. Следовательно, кратковременное воздействие на меланофоры низких концентраций джасплакинолида, применявшееся в наших экспериментах, не приводит к заметным изменениям в организации МФ. Поэтому наблюдаемое ингибирование актин-зависимого транспорта не может быть объяснено изменениями в пространственной организации актиновых филаментов.

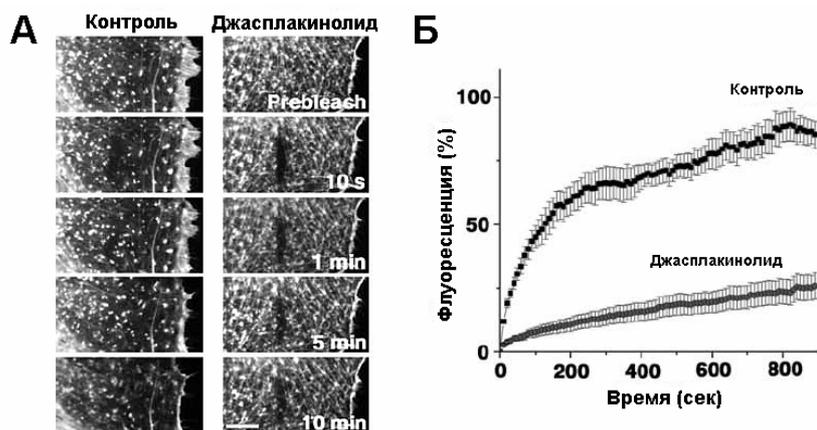


Рисунок 13. Обработка джасплакинолидом стабилизирует актиновые филаменты (А) Последовательность кадров, документирующих FRAP-анализ меченых родамином актиновых филаментов в контрольных и обработанных джасплакинолидом клетках. Числа обозначают время после выжигания. Масштабная линейка 10 мкм. (Б) График восстановления флуоресценции в зонах обесцвечивания. Погрешность соответствует SEM, подсчитанной для 10 различных клеток.

Наконец, была проверена возможность того, что джасплакинолид подавляет транспорт пигментных гранул путём ингибирования миозина. Для этого из меланофоров были выделены пигментные гранулы, и в системе *in vitro* сравнили движение гранул вдоль МФ в присутствии или в отсутствие джасплакинолида. И в контроле и в опыте пигментные гранулы часто прикреплялись к МФ и двигались вдоль них; в обоих препаратах это происходило одинаково часто и со сходными скоростями. Чтобы исключить возможность того, что в нашей системе МФ снижают концентрацию джасплакинолида в растворе путём его связывания, было изучено движение гранул вдоль стабилизированных МФ, собранных из родамин-меченого актина. Оказалось, что и в этих условиях меланосомы двигались со скоростями, совпадающими с контрольными образцами. Из всего этого следует вывод о том, что подавление транспорта в обработанных джасплакинолидом клетках не может объясняться ингибированием активности миозина Va и утратой его способности осуществлять транспорт органелл.

Чтобы проверить, не влияет ли стабилизация МФ на способность гранул перемещаться по цитоплазме вообще, включая и транспорт вдоль МТ, изучили влияние стабилизации МФ джасплакинолидом на двунаправленный транспорт индивидуальных меланосом вдоль МТ в процессе агрегации. Анализ полученных данных показал, что подавление динамики МФ не влияет ни на скорость, ни на продолжительность одиночных пробежек пигментных гранул вдоль МТ, ни на продолжительность пауз. Следовательно, стабилизация МФ не приводит к появлению некой актиновой «паутины», в которой могут запутаться меланосомы. Чтобы окончательно исключить версию о появлении такой «паутины», изучили, влияет ли обработка джасплакинолидом на диффузию цитоплазматических частиц, которые не являются грузами для миозина.

Для этого измерили и проанализировали перемещение флуоресцентных латексных зёрен, микроинъектированных в меланофоры в присутствии и в отсутствие джасплакинолида. Коэффициенты диффузии латексных зёрен в обоих случаях оказались схожими ($0,41 \times 10^{-3}$ и $0,39 \times 10^{-3}$ мкм²/с, соответственно). Следовательно, стабилизация МФ никак не ограничивает движение цитоплазматических частиц безотносительно к природе этой подвижности. И значит, динамика МФ содействует именно миозин-зависимому транспорту пигментных гранул посредством специфического механизма, влияющего на способность актиновых «рельсов» самим обеспечивать движение органелл.

Чтобы проверить, применим ли такой механизм к транспорту других органелл, проверили влияние стабилизации актина на транспорт лизосом, помеченных флуоресцентным маркером LysoTracker. Известно, что лизосомы движутся вдоль актиновых рельсов посредством миозиновых моторов, как и пигментные гранулы. Оказалось, что линейные пробежки лизосом по актину в клетках, обработанных джасплакинолидом, были короче; и что время, проведённое ими на МФ, уменьшалось. Следовательно, универсальным свойством актин-зависимого движения мембранных органелл является необходимость динамики микрофиламентов.

Таким образом, миозинV-зависимый транспорт органелл по актину осуществляется в клетке исключительно по динамичным актиновым филаментам, которые теряют субъединицы актина на «заострённых» минус-концах и добавляют их к своим «оперённым» плюс-концам. Анализ данных FRAP говорит о том, что средняя скорость роста МФ в цитоплазме составляет ~4,3 мкм/мин, что превышает скорость движения пигментных органелл вдоль МФ. Такой опережающий темп роста филамента по сравнению со скоростью миозин-зависимого движения говорит о том, что миозиновые моторы, перемещающие органеллы к растущим концам филаментов, никогда не достигают конца транспортных «рельс», а лишь «перешагивают» на другой МФ в случае необходимости. Получается, что рост МФ существенно увеличивает дистанции перемещения органелл путём увеличения длины «рельс» как путей эффективного транспорта. Ингибирование динамики актина блокирует удлинение актиновых «рельс» перед движущимися органеллами, и органеллы, достигающие конца такого «рельса», вынуждены остановиться или перейти на прилегающий соседний МФ. Но для того, чтобы такой переход произошёл, плотность МФ в цитоплазме должна гарантировать, чтобы каждая органелла в каждый момент времени имела поблизости несколько соприкасающихся МФ. В заключение нами были изучены электронномикроскопические стереопары участков меланофоров, которые показали, что большинство МФ, составляющих транспортную сеть, не контактируют с поверхностью меланосом. Значит, переход органелл на соседний соприкасающийся актиновый «рельс» – гораздо более редкое событие, чем непрерывный транспорт вдоль одного и того же филамента.

Поэтому органеллы, достигшие концов стабильных МФ, вынуждены прекратить своё перемещение – что и было продемонстрировано в приведённых экспериментах.

Эти данные впервые объясняют механизм транспорта по цитоплазме всех типов мембранных органелл, использующих миозин для движения вдоль МФ. МФ высокодинамичны во всех типах эукариотических клеток, изученных до сих пор. Значит, движение таких органелл, как митохондрии (Hollenbeck and Saxton, 2005), синаптические пузырьки (Bridgman, 2004) и секреторные гранулы (Eichler et al, 2006) осуществляется именно вдоль динамичных МФ. Рост филамента является существенным фактором, определяющим расстояние, на которое перемещается органелла в цитоплазме. Из полученных данных следует, что в физиологических условиях двунаправленный транспорт по МФ в клетке попросту невозможен, даже при наличии на поверхности мембранных органелл минус-концевого миозина VI. Действительно, если длин стабилизированных МФ не хватает для перехода плюс-концевого миозина V с одного МФ на другой и филаментам нужно удлиняться, чтобы моторный белок продолжил своё движение, то непрерывная разборка их с минус-концов уменьшает и без того недостаточную длину одиночных пробегов минус-концевого миозина.

Таким образом, в заключительной части работы впервые показано, что однонаправленность внутриклеточного транспорта по актину определяется тредмиллингом МФ, образующих транспортную сеть. Это коренным образом меняет представление о роли элементов цитоскелета в процессах внутриклеточного транспорта, и теперь МФ больше не могут рассматриваться в качестве пассивных участников этого процесса.

ВЫВОДЫ:

1. Позиция интерфазной центросомы обусловлена сбалансированным механизмом обратной связи с участием трёх сил, приложенных к микротрубочкам и генерируемых цитоплазматическим динеином, актомиозиновой системой и динамичными плюс-концами микротрубочек. При этом динамика плюс-концов микротрубочек дестабилизирует положение центросомы, а динеиновые и актомиозиновые силы центрируют её.
2. Основной центрирующей силой является сила динеина, приложенная вдоль микротрубочек пропорционально их длине. Активность динеина при этом регулируется малой ГТФазой Cdc42. Актомиозиновые силы слабее и сами по себе недостаточны для центрирования.

3. Радиальность системы интерфазных микротрубочек зависит от активности динеина и протеинкиназы LOSK, которые участвуют в заякоривании микротрубочек на centrosome, не влияя заметным образом на их нуклеацию.
4. Динеин удерживает микротрубочки на centrosome, причём этот процесс не связан с транспортом основных функциональных centrosomных белков.
5. Активность протеинкиназы LOSK необходима для поддержания уровня centrosomного динактина; ингибирование LOSK приводит также к нарушениям клеточной адгезии, динамики фокальных контактов, поляризации и локомоции клетки.
6. Миозин-зависимый транспорт органелл в цитоплазме клеток осуществляется только при условии непрерывного тредмиллинга микрофиламентов, хотя те же моторные белки перемещают грузы вдоль стабилизированных микрофиламентов в системе *in vitro*.
7. Механизм миозин-зависимого транспорта исключает возможность перемещения грузов в клетке к минус-концам микрофиламентов. Таким образом, именно динамичность микрофиламентов является фактором, определяющим однонаправленность внутриклеточного транспорта по актиновой транспортной сети.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МТ – микротрубочки; МФ – микрофиламенты

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. Бураков А.В. Перемещение по субстрату цитопластов клеток CV-1, имеющих centrosому и лишённых её // *Цитология*. – 2003. – т.45(2). – с.132-142
2. Burakov A., Nadezhdina E., Slepchenko B., Rodionov V. Centrosome positioning in interphase cells // *Journal of Cell Biology*. – 2003. – Vol.162.№ 6. – p.963-969.
3. Бураков А.В., Коваленко О.В., Потехина Е.С., Надеждина Е.С., Зиновкина Л.А. Для организации микротрубочек на centrosome интерфазных клеток *in vivo* необходима активность протеинкиназы LOSK (SLK) // *Доклады Академии Наук*. – 2005. – т.403. № 6. – с.840-842
4. Бураков А.В., Надеждина Е.С. Динеин и динактин как организаторы системы клеточных микротрубочек // *Онтогенез*. – 2006. –т.37.№ 5. – с.1-17

5. Brodsky I.B., **Burakov A.V.**, Nadezhdina E.S. Microtubules' interaction with cell cortex is required for their radial organization, but not for centrosome positioning // *Cell Motility and the Cytoskeleton*. – 2007. – Vol.64.№ 6. – p.407-417
6. Жаппарова О.Н., **Бураков А.В.**, Надеждина Е.С. Динеин-динактиновый комплекс необходим для удержания, но не для нуклеации микротрубочек на centrosome // *Биохимия*. – 2007. – т.72.№ 11. – с.1515-1524
7. **Burakov A**, Kovalenko O, Semenova I, Zhapparova O, Nadezhdina E, Rodionov V. Cytoplasmic dynein is involved in the retention of microtubules at the centrosome in interphase cells // *Traffic*. – 2008. – Vol.9.№ 4. – p.472-80.
8. **Burakov AV**, Zhapparova ON, Kovalenko OV, Zinovkina LA, Potekhina ES, Shanina NA, Weiss DG, Kuznetsov SA, Nadezhdina ES. Ste20-related Protein Kinase LOSK (SLK) Controls Microtubule Radial Array in Interphase // *Molecular Biology of the Cell*. – 2008. – Vol.19(5). – p.1952-1961
9. Semenova I*, **Burakov A***, Berardone N, Zaliapin I, Slepchenko B, Svitkina T, Kashina A, Rodionov V. Actin dynamics is essential for Myosin-based transport of membrane organelles // *Current Biology*. – 2008. – Vol.18(20). – p.1581-1586. *(Contributed equally)
10. Усова Е.В., **Бураков А.В.**, Шпильман А.А., Надеждина Е.С.Нарушение радиальной системы интерфазных микротрубочек при избытке сыворотки в среде культивирования клеток // *Биофизика*. – 2008. – т.53,№ 6. – с.972-977
11. Zhapparova ON, Bryantseva SA, Dergunova LV, Raevskaya NM, **Burakov AV**, Bantysh OB, Shanina NA, Nadezhdina ES. Dynactin Subunit p150Glued Isoforms Notable for Differential Interaction with Microtubules // *Traffic*. – 2009. – Vol.10(11). – p.1635-46.
12. Zhu J, **Burakov A**, Rodionov V, Mogilner A. Finding the Cell Center by a Balance of Dynein and Myosin Pulling and Microtubule Pushing: a Computational Study // *Molecular Biology of the Cell*. – 2010. – Vol.21(24). – p.4418-27.
13. **Бураков А.В.**, Надеждина Е.С. Протеинкиназа LOSK в регуляции сети микротрубочек и в клеточной локомоции // *Биофизика*. – 2010. – т.55, № 6. – с.996-1001
14. **Burakov A**, Nadezhdina E. Association of nucleus and centrosome: magnet or velcro? // *Cell Biology International*. – 2013. – Vol.37(2). – p.95–104

Статьи в сборниках

15. Надеждина Е.С., Фокин А.И., **Бураков А.В.** Аппарат Гольджи и его роль в организации микротрубочек в клетках // *Сборник Роль цитоскелета в жизнедеятельности культивируемых клеток, ред. Пинаев Г.П., Богданова М.С., Кольцова А.М., издание политех. университета, Санкт-Петербург, – 2013. – 116–128*

Тезисы докладов на конференциях

16. Бураков А.В., Надеждина Е.С. Влияет ли centrosoma на перемещение фибробластоподобных клеток по субстрату? // Цитология. 2001. т.43. №4. с.324-325
17. Potekhina E.S., Zinovkina L.A., Chernyak B.V., Burakov A.V., Gusev N.B., Kuznetsov S.A., Nadezhkina E.S. Ste20-related Protein Kinases LOSK Phosphorylates Both Actin-Binding Protein Calponin and Apoptosis-Related Protein Bcl-2 // Molecular Biology of the Cell. 2001. Suppl. Vol. 12. p. 415a
18. Burakov A.V., Nadezhkina E.S., Rodionov V.I. The Nature of the Centering Force // Molecular Biology of the Cell. 2002. Suppl. Vol. 13. p. 199a
19. Zinovkina L., Burakov A., Kovalenko O., Potekhina E., Nadezhkina E. Catalytically Dead LOSK(SLK) Kinase Domain Inhibits Microtubule Organization Activity of Centrosome // Cell Motility and the Cytoskeleton. 2003. Vol. 54. №2. p. 182
20. Kovalenko O.V., Zinovkina L.A., Burakov A.V., Nadezhkina E.S. Long Ste20-related protein kinase (LOSK/SLK) is involved in development and maintenance of cellular microtubule radial array // Workshop Information of EMBO/FEBS Workshop on Frontiers in Cytoskeleton Research, 2003, p. 60
21. Burakov A., Nadezhkina E., Slepchenko B., Rodionov V. Position of the centrosome in interphase cells is determined by cytoplasmic dynein // Workshop Information of EMBO/FEBS Workshop on Frontiers in Cytoskeleton Research, 2003, p. 131
22. Бураков А.В., Надеждина Е.С., Родионов В.И. Механизмы, обеспечивающие расположение centrosомы в геометрическом центре клеток // Цитология. 2003. т.45. №9. с. 852-853
23. Коваленко О.В., Бураков А.В., Зиновкина Л.А., Потехина Е.С., Надеждина Е.С. Протеинкиназа LOSK/SLK регулирует радиальное расположение микротрубочек в клетке // Цитология. 2003. т.45. №9. с. 886-887
24. Бураков А.В. Функции моторного белка динеина в centrosome // Материалы 9й Международной школы-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века», 2005, с. 11
25. Burakov A.V., Kovalenko O.V., Zinovkina L.A., Potekhina E.S., Zhapparova O.N., Kuznetsov S.A., Nadezhkina E.S. Ste2-related Mammalian Protein Kinase Losk is Involved in Development of Cellular Microtubule Radial Array // Materials of 45th ASCB Annual Meeting, 2005, p.671a-672a
26. Burakov A.V., Nadezhkina E.S. Centrosomal dynein – the supposed role in microtubule organization // Materials of International Symposium «Biological motility: basic research and practice», 2006, p.72-73
27. Nadezhkina E.S., Burakov A.V., Kovalenko O.V., Zhapparova O.N., Rodionov V.I. Dynein and dynactin in organization of microtubule radial array // Materials of International Symposium «Biological motility: basic research and practice», 2006, p. 98-99
28. Nadezhkina E.S., Burakov A.V., Kovalenko O.V., Zhapparova O.N., Brodsky I.B., Zinovkina L.A., Potekhina E.S., Shanina N.A., Rodionov V.I. Dynein, dynactin and protein kinase LOSK in microtubule array organization // Materials of International Conference on “Protein biosynthesis, structure and function”, 2007, p.51
29. Burakov A.V., Kovalenko O.V., Zhapparova O.N., Nadezhkina E.S., Rodionov V.I. Dynein and Dynactin in Microtubule Array Organization // Materials of ASCB/ECF summer meeting «Dynamic Interplay Between Cytoskeletal and Membrane Systems», 2007, p.30-31
30. Бураков А.В., Жаппарова О.Н., Коваленко О.В., Родионов В.И., Надеждина Е.С. Динеин, динактин и протеинкиназа LOSK как организаторы радиальной системы клеточных микротрубочек // Цитология. 2007. т.49. №9. с.722-723
31. Burakov A.V., Semenova I.V., Rodionov V.I., Nadezhkina E.S. Actin dynamics is required for intracellular myosin-dependent transport // Materials of international symposium «Biological motility: achievements and perspectives», 2008, Vol.2, p. 209-210

32. Nadezhdina E.S., Zhapparova O.N., Kovalenko O.V., Burakov A.V., Shanina N.A., Bryantseva S.A. Phosphorylation of one of new dynactin p150^{glued} subunit isoforms with protein kinase LOSK is required for radial organization of microtubules in interphase // Materials of international symposium «Biological motility: achievements and perspectives», 2008, Vol.2, p. 246-247
33. Shpilman A.A., Burakov A.V., Nadezhdina E.S. *In silico* VS *in vitro*: Mimitation v.1.0. program allows to predict morphological and dynamic changes of tubulin cytoskeleton caused by microtubule stabilization // Materials of international symposium «Biological motility: achievements and perspectives», 2008, Vol.2, p. 274-275
34. Usova E.V., Burakov A.V., Nadezhdina E.S. Excess of growth factors in culture medium induces changes in microtubule organization in Vero cells and subsequent mitotic malfunctions // Materials of international symposium «Biological motility: achievements and perspectives», 2008, Vol.2, p. 284-285
35. A.V. Burakov, O.N. Zhapparova, E. Nadezhdina. LOSK/SLK Kinase Is Essential for Intercellular Coordination and Directed Cell Locomotion in Experimental Wound. Materials of ASCB 49th Annual Meeting, 2009, p.127
36. С.А. Брянцева, А.В. Бураков, О.Н. Жаппарова, Е.С. Надеждина. Новые изоформы белка p150Glued, основной субъединицы динактина. Цитология 2010, том 52 №3, с.257-258
37. А.В. Бураков, Е.С. Надеждина. Протеинкиназа LOSK(SLK) регулирует межклеточные взаимодействия и направленное перемещение клеток по субстрату. Цитология, 2010, том 52 №3, с.258
38. A.V. Burakov, O.N. Zhapparova, E.S. Nadezhdina. LOSK kinase is essential for directed cell locomotion and intercellular interactions. Materials of International Symposium “Biological motility from fundamental achievements to nanotechnologies”, Pushchino, Russia, 2010 May 11-16., page 62-63
39. E. S. Nadezhdina, I. B. Brodsky, A. V. Burakov. (2010) Transport Organelles of Early Secretory Pathway Contribute to Microtubule Radial Array Organization. *Mol. Biol. Cell*, v. 21, 2040
40. O. N. Zhapparova, S. Bryantseva, A. V. Burakov, N. A. Shanina, E. S. Nadezhdina. (2010) The Role of Dynactin Phosphorylation in the Organization of Microtubules. *Mol. Biol. Cell*, v. 21, 2041
41. Бродский И.Б., Бураков А.В., Жаппарова О.Н., Фокин А.И., Надеждина Е.С. Центросома и аппарат Гольджи в организации клеточных микротрубочек // Сборник тезисов ежегодной научной конференции Института белка РАН. 2011. с.10
42. Бродский И.Б., Бураков А.В., Надеждина Е.С. Образование радиальной системы микротрубочек в бесцентросомных цитопластах зависит от линии клеток и определяется органеллами раннего везикулярного транспорта // Цитология. 2011. т.53., №9. с.693-694
43. Бураков А.В., Фокин А.И., Надеждина Е.С. Роль аппарата Гольджи в организации системы микротрубочек в различных клетках // Цитология. 2011. т.53., №9. с.694
44. A.I Fokin, I.B. Brodsky, E.S. Nadezhdina, A.V. Burakov. Differential contributions of Golgi to microtubule organization in affined cells // Materials of International Symposium “Biological motility. Fundamental and Applied Science”, Pushchino, Russia, 2012 May 11-15., page 54
45. Надеждина Е.С., Бураков А.В., Фокин А.И. Вариабельность микротрубочки-организующей активности аппарата Гольджи. Сборник тезисов ежегодной научной конференции Института белка РАН, стр. 13, Пущино, 8-9 июня 2013
46. A.I. Fokin, A.V. Burakov, E.S. Nadezhdina. Variations in Golgi capability to organize microtubules. *FEBS Journal*, vol. 280, suppl.1, 2013, page 202.
47. А.И.Фокин, А.В.Бураков, Е.С.Надеждина. Роль аппарата Гольджи в организации микротрубочек. I. Регуляция организации микротрубочек протеинкиназами. Цитология. 2013 т.55 с.659.
48. A. Fokin, I. Brodsky, E. Nadezhdina and A. Burakov. The search of molecular mechanisms of natural variability of Golgi-mediated microtubule organization. *Molecular Biology of the Cell*, 2013, vol. 24, 1184